การบำบัดฟอสฟอรัสในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง
สีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้ง

Phosphorus Removal in Rearing Water from Shrimp Cultivation

by Selected Purple Non-Sulfur Bacteria from Shrimp Ponds

ปฐมา บุญรักษ์

Patama Bunruk

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Microbiology

Prince of Songkla University

2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การบำบัดฟอสฟอรัสในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้ง

Phosphorus Removal in Rearing Water from Shrimp Cultivation by Selected Purple Non-Sulfur Bacteria from Shrimp Ponds

ปฐมา บุญรักษ์

Patama Bunruk

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Microbiology

Prince of Songkla University

2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การบำบัดฟอสฟอรัสในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้ง

ผู้เขียน นางสาวปฐมา บุญรักษ์

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

....

(ศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

คณะกรรมการสอบ

....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล อินทระสังขา)

....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

....กรรมการ

(ดร.อำไพทิพย์ สุขหอม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ ....
(ศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ..
(นางสาวปฐมา บุญรักษ์)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.............................

(นางสาวปฐมา บุญรักษ์)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การบำบัดฟอสฟอรัสในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้ง

ผู้เขียน นางสาวปฐมา บุญรักษ์

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงกุ้งสามารถสร้างรายได้สูงมาก แต่ขณะเดียวกันก็สามารถก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมโดยมีสาเหตุหลักจากการปล่อยน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการบำบัดลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งน้ำทิ้งอุดมไปด้วยธาตุอาหารโดยเฉพาะฟอสฟอรัส ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดปัญหายูโทรฟิเคชั่น เพื่อแก้ปัญหานี้การบำบัดทางชีวภาพเป็นวิธีการที่ดีในการนำมาประยุกต์ใช้และการใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ (purple non-sulfur bacteria; PNSB) เป็นหนึ่งในทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงในการบำบัดน้ำเสีย และความหลากหลายของรูปแบบการเจริญ จึงนำมาสู่วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อทราบคุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้ง การแยกและคัดเลือก PNSB ที่มีความสามารถในการลดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้ง และการเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อในการกำจัดฟอสฟอรัสโดยหาสภาวะที่เหมาะสมในการบำบัด ผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้งที่ใช้ในการทดลอง พบปริมาณฟอสฟอรัสมีค่าสูงไม่เหมาะตามมาตรฐานคุณภาพน้ำเลี้ยงเพื่อการผลิตกุ้งทะเล ขณะที่พารามิเตอร์อื่นๆ อยู่ในระดับที่เหมาะสม การแยก PNSB จากตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจากบ่อกุ้งในจังหวัดพังงาและสงขลาสามารถแยกเชื้อได้ทั้งสิ้น 83 ไอโซเลท เมื่อทำการคัดเลือกเชื้อขั้นแรกในอาหารเลี้ยงเชื้อ Glutamate-acetate ที่เติมเกลือแกง 1.5% (w/v) พบว่า PNSBจำนวน 42 ไอโซเลท (51%) สามารถเจริญได้ดี (OD_{660} > 1.0) ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง และ สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง อย่างไรก็ตามผลการคัดเลือกเชื้อขั้นที่สองซึ่งทดสอบการเจริญในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อ พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลท (W12 และ W48) ที่เจริญได้ดี จึงนำมาทดสอบความสามารถในการลดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อในการคัดเลือกเชื้อขั้นที่ 3 พบว่าไอโซเลททั้งสองมีประสิทธิภาพในการลดฟอสฟอรัสมากกว่า 50% โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทั้งสองสภาวะการเลี้ยงยกเว้นสายพันธุ์ W12 ลดฟอสฟอรัสได้ 46% ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง ดังนั้นทั้งสองสายพันธุ์มีความเป็นไปได้ที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อกำจัดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้งและจากผลการเทียบเคียงโดยวิธีทางอณูชีววิทยาใช้ยีน 16 S rRNA พบว่าไอโซเลท W12 คือ *Afifella marina*และ W48 คือ *Rhodovulum sulfidophilum* เพื่อเพิ่ม

ประสิทธิภาพในการกำจัดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้งจึงใช้เชื้อทั้งสองผสมกันที่อัตราส่วน 1:1 ในน้ำเลี้ยงปราศจากเชื้อและหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยการออกแบบการทดลองที่ใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology) ซึ่งกำหนดชุดทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design) พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการลดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อ คือ การใช้กล้าเชื้อ 5% ปรับสภาวะน้ำเลี้ยงให้มี pH เริ่มต้น 7.5 ความเค็ม 2.5% โดยบำบัดภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสงเป็นเวลา 96 ชม. และยืนยันผลการทดลองในน้ำเลี้ยงกุ้งดิบ (ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่เวลา 72 ชม. พบว่า กล้าเชื้อผสมลดฟอสฟอรัสและไนเตรทได้ 28.33% และ 49.27% ตามลำดับ ขณะที่ชุดควบคุมไม่เติมกล้าเชื้อ (native control) ลดฟอสฟอรัสได้ 22.77% ส่วนไนเตรทลดได้ 48.19% โดยการลดค่า sCOD (soluble Chemical Oxygen Demand) ของทั้งสองชุดไม่ต่างกันที่ 24 ชม. ซึ่งลดได้ประมาณ 90% (sCOD < 10 มก./ล.) แต่ไนไตรท์ของชุดควบคุมมีค่ามากกว่า 1 มก./ล. รวมทั้งค่า pH ที่สูงขึ้นซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้ง ขณะที่ชุดที่ใช้กล้าเชื้อผสมสามารถควบคุม pH และไนไตรท์ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมตลอดการทดลอง ซึ่งมีค่า pH ระหว่าง 7.5 - 8.2 และไนไตรท์ต่ำกว่า 1 มก./ล. ทั้งนี้กิจกรรมของเชื้อผสมในการกำจัดฟอสฟอรัสเกิดขึ้นได้ดีภายใน 24 ชม.แรก จากการย้อมสีเซลล์ด้วย Methylene blue และ DAPI (4,6-diaminido-2-phenylindole) พบว่า เชื้อผสมสามารถลดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้งแล้วนำมาสะสมในรูปแบบ polyphosphate แกรนูล ซึ่งเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบำบัด

Thesis Title Phosphorus removal in rearing water from shrimp cultivation by selected purple non-sulfur bacteria from shrimp ponds

Author Miss Patama Bunruk

Major Program Microbiology

Academic Year 2016

ABSTRACT

Shrimp cultivation not only produces high income but also causes environmental impacts. One of the key environmental concerns for shrimp cultivation is the discharge of rearing water with high levels of nutrients, especially phosphorus into waterways, resulting in eutrophication. To solve this problem, biological treatment is well recognized for applying; and the use of purple non-sulfur bacteria (PNSB) is one of alternative attractive choices because of their high removal efficiency in wastewater treatment with various metabolic growth conditions. Therefore, this study aimed to investigate water quality of rearing water from shrimp cultivation, to isolate and screen PNSB from shrimp ponds with their ability for reducing phosphorus in water from shrimp cultivation, and to optimize conditions for phosphorus removal. It was found that water quality of rearing water had phosphorus level that was dramatically higher than the standard level for discharge whist other parameters were in the optimal range. A total of 83 PNSB strains were isolated from water and sediment samples collected from various shrimp ponds located on Phang-nga and Songkhla provinces. For primary screening, there were 42 strains (51%) grew well (OD_{660} > 1.0) in glutamate-acetate broth supplemented with 1.5% (w/v) NaCl, under conditions of microaerobic-light and aerobic-dark. However, in secondary screening only two strains (W12 and W48) could grow well in sterile rearing water collected from shrimp ponds. Both strains were selected for tertiary screening to investigate their ability to remove phosphorus in sterile rearing water under both incubating conditions. They produced no significant differences for phosphorus removal efficiency (> 50%) with exception under microaerobic-light conditions as strain W12 roughly reduced 46% phosphorus. These 2 strains had the possibility to be used as inoculants for removal of phosphorus from rearing water in shrimp ponds. The molecular identification using 16s rRNA gene found that both selected isolates were *Afifella marina* W12 and *Rhodovulum*

sulfidophilum W48. The optimization for phosphorus removal using Response Surface Methodology with Central Composite Design by a mixed culture of both selected strains (ratio 1:1) in sterile rearing shrimp water under aerobic-dark conditions for 96 h found that the optimal conditions were 5% inoculum, initial pH 7.5 and 2.5% salinity. Confirmation of the results, non-sterile rearing shrimp water was used under the the optimized conditions at 72 h removals of phosphorus and nitrate by a mixed culture were 28.33 and 49.27%, respectively. On the other hand, native control as no inoculation reduced 22.77% for phosphorus and 48.19% for nitrate. However, no significant difference was found for removal of sCOD (soluble Chemical Oxygen Demand) at 24 h by inoculated PNSB and control sets as roughly 90% reduction (< 10 mg/L sCOD). In contrast, unsuitable conditions for shrimp growth were observed in the native control as higher levels of nitrite (> 1 mg/L) and pH. The mixed culture, throughout the experiment, could control pH and nitrite in ranges of standard water quality that suitable for shrimp cultivation, which requires pH value in a range of 7.5 – 8.2 and nitrite level less than 1 mg/L. The removal efficiency of the mixed cultive was high at the 24 h of treatment. Methylene blue and DAPI (4,6-diaminido-2-phenylindole) stains confirmed that the mixed culture removed phosphorus from rearing water and then accumulated in the form of polyphosphate granules as their increasing with longer treating times.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ดวงพร คันธโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่มอบโอกาสในการทำงานวิจัยและการเรียนรู้ประสบการณ์ใหม่ๆ ตลอดจนคำแนะนำต่างๆในการทำวิจัย และความช่วยเหลือในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณโครงการพัฒนาและส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) ที่มอบโอกาสในการพัฒนางานวิจัยและทุนการศึกษาตลอดหลักสูตร และขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา และบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ดร.โตมร นุ่นแก้ว ดร.ขนกวรรณ มุกขตา คุณสุภาภรณ์ ชุมพล คุณพิทยา หนูคงบัตร สมาชิกห้องปฏิบัติการวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 608 และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน สำหรับคำแนะนำต่างๆ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

ท้ายที่สุดนี้ วิทยานิพนธ์เล่มนี้จะสำเร็จไม่ได้ หากขาดกำลังใจและการสนับสนุนสำคัญจากคุณแม่ คุณพ่อ และ Dr. Noel Ye Naung จึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ปฐมา บุญรักษ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการรูป	(13)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวอักษร	(16)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	14
ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย	14
2. วิธีการวิจัย	15
วัสดุและอุปกรณ์	15
วิธีการทดลอง	16
3. ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง	25
4. สรุปผลการทดลอง	63
ข้อเสนอแนะ	65
เอกสารอ้างอิง	66
ภาคผนวก	72
ก อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียสังเคราะห์แสง	72
ข การย้อมสี และสารเคมี	73
ค การเทียบเคียงเชื้อโดยวิธีการทางอณูชีววิทยา	75
ประวัติผู้เขียน	80

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณออกซิเจนที่ส่งผลต่อกุ้งและสิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยง	5
2	ข้อมูลการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลและสัตว์น้ำชายฝั่ง ณ วันที่ 1 พฤษภาคม 2558	8
3	มาตรฐานน้ำทิ้งจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง	9
4	วิธีการวิเคราะห์พารามิเตอร์ในการติดตามคุณภาพน้ำเลี้ยง	16
5	ปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยสำหรับออกแบบการทดลองด้วยวิธี RSM โดยใช้ CCD	21
6	จำนวนการทดลองทั้งหมดที่ได้จากการออกแบบด้วย CCD	21
7	คุณลักษณะของน้ำและตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่ใช้แยกเชื้อ PNSB จากจังหวัดพังงาและสงขลา	25
8	แบคทีเรีย PNSB ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดพังงาและสงขลา	26
9	คุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้งจากบ่อเลี้ยงจำนวน 12 บ่อในจังหวัดพังงาและสงขลาเปรียบเทียบกับมาตรฐานคุณภาพน้ำเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อการผลิตกุ้งทะเล	28
10	ผลการออกแบบการทดลองโดยใช้ CCD ในการลดฟอสฟอรัส หลังการบำบัดน้ำเลี้ยงกุ้งโดยใช้เชื้อผสม *A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 ที่อัตราส่วน 1: 1 ภายใต้สภาวะไร้แสง-มีอากาศ และสภาวะมีแสง-มีอากาศเล็กน้อย เป็นเวลา 48 ชม.	37
11	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของโมเดล สำหรับค่าการลดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้งจากการใช้เชื้อผสม (*A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48) อัตราส่วน 1:1 ภายใต้สภาวะไร้แสง-มีอากาศ และสภาวะมีแสง-มีอากาศเล็กน้อย เป็นเวลา 48 ชม.	38
12	การใช้ CCD ด้วย cubic model แสดงค่าจริงและค่าทำนายของการลดไนเตรท หลังการบำบัดน้ำเลี้ยงกุ้งโดยใช้เชื้อ *A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 (อัตราส่วน 1:1) ภายใต้สภาวะไร้แสง-มีอากาศและสภาวะมีแสง-มีอากาศเล็กน้อยเป็นเวลา 48 ชม.	40

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่		หน้า
13	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของ cubic models สำหรับค่าการลดไนเตรทจากการใช้เชื้อผสม (*A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 อัตราส่วน 1:1) ภายใต้สภาวะไร้แสง-มีอากาศ และสภาวะมีแสง-มีอากาศเล็กน้อย เป็นเวลา 48 ชม.	41
14	ค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรปรวนและ *P*-values ที่สอดคล้องกันของการลดฟอสฟอรัสภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสงเป็นเวลา 48 ชม. หลังการเติมกล้าเชื้อผสม	42
15	การกำหนดปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการลดฟอสฟอรัสภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง	45
16	การกำหนดปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการลดไนเตรทภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง	46
17	ค่าการวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ของน้ำเลี้ยงกุ้งดิบ ระหว่างการทดสอบการยืนยันผลที่เวลา 0 และ 96 ชม.	52

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	จำนวน PNSB ที่เจริญในอาหาร GA ที่เติม 1.5% NaCl ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสงและสภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง เป็นเวลา 48 ชม.	29
2	จำนวนแบคทีเรีย PNSB ที่เจริญในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อ ภายใต้สภาวะมีอากาศไร้แสง และ สภาวะมีอากาศเล็กน้อยมีแสง เป็นเวลา 7 วัน	30
3	ประสิทธิภาพการลดฟอสเฟตในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อภายใต้สภาวะมีอากาศไร้แสง และสภาวะมีอากาศเล็กน้อยมีแสงเป็นเวลา 7 วัน โดย PNSB ที่คัดเลือกได้	31
4	การย้อม polyphosphate ด้วยสี methylene blue ของ PNSB 2 ไอโซเลท (A) W12 และ (B) W48 ที่บ่มในสภาวะมีอากาศไร้แสง โดย หัวลูกศรแสดง poly-p ภายในเซลล์	32
5	แผนภูมิต้นไม้ไฟโลเจเนติกของไอโซเลท W12 and W48 โดยใช้วิธีหาระยะห่างแบบ Neighbour-joining (NJ) ด้วย MEGA software package 6.0 เทียบกับไอโซเลทอ้างอิงโดยใช้ลำดับเบส 16S rDNA และประเมินความน่าเชื่อถือของกิ่งด้วยวิธี bootstrap analysis	34
6	3D Response Surface แสดงผลของ 3 ปัจจัย ได้แก่ เปอร์เซ็นต์กล้าเชื้อ pH เริ่มต้นและความเค็ม ต่อเปอร์เซ็นต์การลดฟอสฟอรัส ภายใต้สภาวะไร้แสง-มีอากาศ โดยแต่ละกราฟแสดงผลความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย โดยปัจจัยที่ 3 กำหนดเป็นค่ากลางนั้นๆ ตามตารางที่ 5	43
7	ประสิทธิภาพการลด (A) ฟอสฟอรัส และ (B) ไนเตรท ในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อที่ไม่ได้ปรับสารอาหาร โดยใช้ เชื้อผสม (*A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 อัตราส่วน 1:1) ใน 3 ชุดการทดลองที่แตกต่างกัน ภายใต้สภาวะ มีอากาศ-ไร้แสง โดย ตัวอักษรที่แตกต่างกันบนกราฟแท่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)	48

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
8	ประสิทธิภาพของการลดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อปรับสภาพ (sCOD ประมาณ 100 มก./ล. และฟอสฟอรัสประมาณ 10 มก./ล.) โดยเชื้อผสม PNSB (*A. marina* W12 และ*R. sulfidophilum* W48 อัตราส่วน 1:1) ที่ pH 3 ระดับ ได้แก่ pH 7.0 7.3 และ 7.5 โดยใช้กล้าเชื้อ 5% และความเค็ม 2.50% ภายใต้สภาวะมีอากาศ ไร้แสง เป็นเวลา 96 ชม.	50
9	ประสิทธิภาพการลดฟอสฟอรัสและไนเตรทในน้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพ (sCOD ประมาณ 100 มก./ล. ฟอสฟอรัสประมาณ 10 มก./ล.) โดย *A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 และเชื้อผสม (อัตรา 1 : 1) ที่ปริมาณกล้าเชื้อ 5% pH 7.5 และความเค็ม 2.50% ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง เป็นเวลา 96 ชม.	52
10	ศักยภาพการลด (A) ฟอสฟอรัส (B) ไนเตรท และ (C) sCOD ในน้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพ (sCOD ประมาณ 100 มก./ล. ฟอสฟอรัสประมาณ 10 มก./ล. ไนเตรท ประมาณ 50 มก./ล.) โดยใช้เชื้อผสม PNSB (*A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 อัตราส่วน =1:1) และบ่มภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสงเป็นเวลา 96 ชม.	54
11	การเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ที่วัดระหว่างการบำบัดน้ำเลี้ยงกุ้งดิบโดยเชื้อผสม PNSB (*A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 อัตราส่วน =1:1) ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง	56
12	เปอร์เซ็นต์การลด (A) ฟอสฟอรัส (B) ไนเตรท (C) sCOD และ (E) แอมโมเนียม โดยเชื้อผสม PNSB (*A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 อัตราส่วน = 1 : 1) ในน้ำเลี้ยงกุ้งดิบ ปรับสภาพ (sCOD ประมาณ 100 มก./ล. ฟอสฟอรัสประมาณ 10 มก./ล. ไนเตรท ประมาณ 50 มก./ล.) ซึ่งบ่มภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง เป็นเวลา 24 ชม.	58

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
13	การเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ที่วัดระหว่างการบำบัดน้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพ (sCOD ประมาณ 100 มก./ล. ฟอสฟอรัสประมาณ 10 มก./ล. ไนเตรท ประมาณ 50 มก./ล.) โดยเชื้อผสม PNSB (*A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 อัตราส่วน =1:1) ซึ่งบ่มภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง เป็นเวลา 24 ชม.	60
14	จำนวนประชากร PNSB ไอโซเลท *A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 ในน้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพระหว่างการบำบัด โดยใช้วิธี นับแบบ Spread plate ภายใต้สภาวะอากาศเล็กน้อย-มีแสง	61
15	การย้อมสี poly-p ของเชื้อผสม ด้วยวิธี DAPI staining ที่เวลา (A) 0 ชม. (B) 6 ชม. (C) 12 ชม. (D) 18 ชม. และ (E) 24 ชม. โดย poly-P เรืองแสงสีเขียว และตัวเซลล์เรืองแสงสีน้ำเงิน	62

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

ก.	กรัม
ชม.	ชั่วโมง
ซม.	เซนติเมตร
มก.	มิลลิกรัม
มคก	ไมโครกรัม
มม.	มิลลิเมตร
มล.	มิลลิลิตร
ล.	ลิตร
COD	Chemical Oxygen Demand
mM	Millimolar
OD	Optical Density
ORP	Oxidation Reduction Potential
PNSB	Purple Non-sulfur Bacteria
rpm	Revolution Per Minute
v/v	Volume Per Volume
w/v	Weight Per Volume

บทที่ 1

บทนำ

1. บทนำต้นเรื่อง

ประเทศไทยเป็นผู้นำในการส่งออกกุ้งยาวนานกว่า 30 ปี ทั้งในรูปแบบของกุ้งสด กุ้งแช่เย็น กุ้งแช่แข็ง และกุ้งแปรรูป ซึ่ง สร้างรายได้เข้าสู่ประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท โดยในปี 2557 มีการส่งออกกุ้งช่วงสิบเดือนแรกปริมาณ 127,446.95 ตัน คิดเป็นมูลค่า 50,405.26 ล้านบาท แต่เมื่อเทียบกับปีที่ผ่านมาพบว่าการส่งออกมีปริมาณลดลงถึง 24.39 % เนื่องมาจากการแพร่ระบาดของโรค EMS (Early Mortality Syndrome) หรือโรคตายด่วน ดังนั้นแนวทางป้องกันที่ดี คือ การใช้ลูกกุ้งคุณภาพ และมีการบำบัดสภาพบ่อให้เหมาะสมแก่การเพาะเลี้ยงทั้งดินเลนก้นบ่อและน้ำที่ใช้เลี้ยง (สมาคมอาหารแช่แข็งไทย, 2557)

การควบคุมคุณภาพน้ำเลี้ยงให้ได้มาตรฐานและเหมาะสมต่อสัตว์น้ำเป็นสิ่งสำคัญต่อผลผลิตที่ได้เป็นอย่างมากโดยเฉพาะการเลี้ยงกุ้ง สืบเนื่องจากรูปแบบการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนา (Intensive shrimp culture) เป็นวิธีการเลี้ยงกุ้ง ที่มีปริมาณ ความหนาแน่นสูงพร้อมให้อาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยต้องมีการให้ในปริมาณที่เหมาะสม (Funge-Smith & Briggs, 1998) แต่ส่วนใหญ่มีการให้อาหารในปริมาณมากเกินความต้องการ ทำให้มี สาร อาหารโดยเฉพาะฟอสฟอรัสและไนเตรทตกค้างในบ่อปริมาณมาก ประกอบกับของเสียจากการขับถ่ายของกุ้ง ทำให้เกิดตะกอนแขวนลอย และบางส่วนตกค้างบริเวณก้นบ่อซึ่งทำให้เกิดกลิ่นเหม็น น้ำและดินมีความเค็มสูง ซึ่งส่งผล เสียต่อกุ้งโดยทำให้กุ้งเจริญเติบโตช้า น้ำหนักลดลง อ่อนแอ เสี่ยงต่อการติดโรคและตายในที่สุด เกษตรกรจึงต้องทำการถ่ายน้ำทิ้งออกจากบ่อโดยปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติในพื้นที่ใกล้เคียง ทั้งนี้หากไม่ผ่านการบำบัดให้อยู่ในระดับมาตรฐานน้ำทิ้งที่เหมาะสม น้ำทิ้งจากบ่อกุ้งที่ปล่อยออกไปจะทำให้ เกิดปัญหาแหล่งน้ำตามมา เช่น น้ำมีความเค็มสูงขึ้น มีธาตุอาหารสูงโดยเฉพาะ อย่างยิ่งฟอสฟอรัสและไนโตรเจน (Burford et al., 2003; Costanzo, O'Donohue, & Dennison, 2004; Herbeck, Unger, Wu, & Jennerjahn, 2013) โดย Burford และคณะ (2003) พบว่าในสภาพน้ำทะเลหรือน้ำเค็ม ฟอสฟอรัสเป็นสารอาหารที่จำกัดการเจริญ (limiting nutrient) ต่อการเจริญของแพลงก์ตอนพืชมากกว่าไนโตรเจน และเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดปัญหา Eutrophication จากการที่แพลงก์ตอนพืชหรือพืชน้ำสามารถใช้ธาตุอาหารนั้นและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ทำให้

ออกซิเจนในน้ำช่วงเวลากลางคืนลดต่ำลง มากจนทำให้สัตว์น้ำตาย และระบบนิเวศเสียสมดุลในที่สุด

ปัจจุบันมีการศึกษาวิธีการบำบัดน้ำทิ้งทางชีวภาพให้ได้มาตรฐานทั้งการพัฒนาระบบการบำบัดน้ำทิ้งโดยควบคุมปัจจัยทั้งทางกายภาพและปัจจัยทางชีวภาพภายในระบบ ทั้งนี้เพื่อให้จุลินทรีย์ สาหร่ายสีเขียว และโดยเฉพาะแบคทีเรีย สามารถเจริญเติบโตและลดฟอสฟอรัส ไนเตรทและ Biochemical Oxygen Demand (BOD)ให้ได้ตามมาตรฐานน้ำทิ้ง ของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ (purple non-sulfur bacteria; PNSB) บางชนิด เช่น *Rhodopseudomonas palustris* และ *Rhodobacter sphaeroides* เป็นต้น มีศักยภาพในการลดฟอสฟอรัสโดยนำไปสะสมภายในเซลล์ในรูปโพลีฟอสเฟตแกรนูลเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน (Liang, Hung, Hsu, & Yeh, 2010) รวมทั้งสามารถลดแอมโมเนีย ลดไนเตรท (Kim, Lee, Kim, & Moon, 1999) และสามารถลด BOD ได้เป็นอย่างดี (Hülsen, Batstone, & Keller, 2014; Idi, Nor, Wahab, & Ibrahim, 2015; Kantachote, Torpee, & Umsakul, 2005; Kornochalert, Kantachote, Chaiprapat, & Techkarnjanaruk, 2014a, 2014b) ดังนั้น ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวทำให้การบำบัดน้ำทิ้งจากบ่อกุ้งด้วย PNSB อาจเป็นวิธีทางเลือกที่ดีสำหรับเกษตรกร เนื่องจากสามารถกำจัดทั้งสารอินทรีย์ และไนเตรท ฟอสฟอรัส แอมโมเนียได้สูง โดยใช้ต้นทุนต่ำ สามารถบำบัดในบ่อที่มีอยู่เดิม อีกทั้ง PNSB มีความหลากหลายทางสรีรวิทยา เจริญได้ดีทั้งในสภาพมีแสงไร้อากาศและภายใต้สภาพมีอากาศไร้แสง (Fuhs & Chen, 1975; Liang et al., 2010) แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อกลุ่มนี้เป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องทำในระดับห้องปฏิบัติการก่อนการขยายระดับสู่ภาคสนาม จึงนำมาสู่วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ การแยก PNSB ในน้ำและตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกุ้ง เพื่อหาไอโซเลทที่มีศักยภาพในการลดฟอสฟอรัสในน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยการตรวจวัดฟอสฟอรัสละลายน้ำ (ออร์โธฟอสเฟต ; PO_4-P) ซึ่งไอโซเลทที่ผ่านการคัดเลือกสามารถนำไปใช้ได้ เพื่อการเพิ่มศักยภาพ การบำบัด โดยการหาสภาวะของการเลี้ยง เช่น pH และความเค็ม ที่เหมาะสมเพื่อการลดฟอสฟอรัส โดยเชื้อที่คัดเลือกได้ในน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งให้ได้มากที่สุด

2. การตรวจเอกสาร

2.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับการเลี้ยงกุ้ง

การเลี้ยงกุ้งให้ได้ผลผลิตที่ดีนั้นต้องอาศัย ทั้งความรู้ ความใส่ใจ และการบริหารจัดการที่ดี เริ่มตั้งแต่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งต้องมีความรู้และประสบการณ์ในการเลี้ยงมาก่อน การเลือกสถานที่ การบริหารจัดการ เช่น รูปแบบฟาร์ม การแบ่งพื้นที่ใช้สอยภายในฟาร์ม ประเภทของบ่อเลี้ยง การเตรียมพื้นบ่อให้มีออกซิเจนเพียงพอและมีการย่อยสลายสารอินทรีย์ การเตรียมน้ำ การเลือกลูกกุ้งคุณภาพที่ปลอดเชื้อ (specific pathogen free) มีความต้านทานเชื้อ (specific pathogen resistant) มีความแข็งแรงเจริญเติบโตดีและไม่ใช้ยาปฏิชีวนะ โดยกำหนดความหนาแน่นของลูกกุ้งที่เหมาะสม คือ 100,000 ตัว/ไร่ (intensive shrimp farm) นอกจากนี้ต้องควบคุมการให้อาหารและการจัดการสภาวะแวดล้อมในระหว่างการเลี้ยงที่เหมาะสม เพราะนอกจากอาหารจะเป็นต้นทุนส่วนใหญ่ในการเลี้ยงประมาณ 60-70% แล้ว ยังเป็นปัจจัยสำคัญในการเลี้ยงกุ้งให้ประสบผลสำเร็จโดยส่งผลต่อคุณภาพน้ำเลี้ยงและสุขภาพของกุ้ง ดังนั้นจึงควรควบคุมสภาวะแวดล้อมในระหว่างการเลี้ยงให้เหมาะสม ดัง จะกล่าวต่อไป (พุทธ, 2549; สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล , 2556)

2.1.1 การให้อาหารกุ้ง

หลักในการให้อาหารกุ้ง คือ ต้องให้ในปริมาณที่พอดีและในเวลาที่เหมาะสมตลอดทุกมื้อระหว่างการเลี้ยง โดยอัตราการให้อาหารขึ้นอยู่กับขนาดกุ้ง อุณหภูมิ ความหนาแน่น คุณภาพน้ำ และสุขภาพของกุ้ง ทั้งนี้กุ้งสามารถกินอาหารในเวลากลางวันได้ดีกว่าเวลากลางคืน ปกติจะให้อาหารในอัตรา 1-2 กก./กุ้ง 1 แสนตัว/วัน และปรับปริมาณ 0.5-1 กก./กุ้ง 1 แสนตัว/วัน หากให้อาหารน้อยเกินไปจะทำให้กุ้งโตช้าและทำให้กินกันเอง แต่หากให้อาหารมากเกินไปจะทำให้คุณภาพน้ำและดินเสื่อมโทรมลง โดยจุลินทรีย์จะย่อยสารอินทรีย์จากอาหารและปล่อยแอมโมเนียออกมา ทำให้กุ้งเครียด โตช้า อ่อนแอ และมีโอกาสติดเชื้อสูงขึ้น อาหารที่จำเป็นต่อการ เจริญเติบโตของกุ้ง ได้แก่

- โปรตีน เนื่องจากกุ้งเป็น สัตว์น้ำกลุ่มที่กินเนื้อ (carnivorous) จึงต้องการอาหารที่มีโปรตีนสูงในการสร้างกล้ามเนื้อ เอนไซม์ ฮอร์โมน ภูมิคุ้มกัน และสารพันธุกรรม อาหารกุ้งที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งมีโปรตีนสูงประมาณ 35-50% หากอาหารมีโปรตีนน้อยไปจะทำให้การเจริญเติบโต

ช้า และกุ้งจะผอมเนื่องจากนำโปรตีนในกล้ามเนื้อมาใช้ทดแทน ในช่วงสุดท้ายก่อนจับมีการให้โปรตีนปริมาณมากเพื่อเร่งอัตราการเจริญเติบโต

- ไขมัน เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของกุ้ง โดยใช้เป็นสารตั้งต้นในการลอกคราบและการสืบพันธุ์ อีกทั้งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ กุ้งต้องการไขมันประมาณ 6.5-15% ของอาหาร

- คาร์โบไฮเดรต เป็นแหล่งพลังงานที่มีราคาถูกในอาหารกุ้ง หากปรับระดับคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมจะสามารถช่วยลดระดับความต้องการโปรตีนของกุ้งได้

- ไวตามิน เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีความจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตที่ดี แต่ต้องการในปริมาณน้อย โดยเป็นสารช่วยในกระบวนการเผาผลาญอาหารหลายชนิด เช่น วิตามินซี

- เกลือแร่ เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการสร้างเปลือก การเลี้ยงกุ้งความหนาแน่นสูงในน้ำที่มีความเค็มต่ำหรือน้ำที่มีเกลือแร่ละลายอยู่น้อยจะทำให้กุ้งมีเปลือกบางและอาจมีการเกร็งของกล้ามเนื้อ และอุณหภูมิเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว เช่น ในช่วงเวลาสุ่มกุ้งอาจทำให้กุ้งตายได้ทั้งนี้เกลือแร่ที่จำเป็นสำหรับการเลี้ยงกุ้งที่ความเค็มต่ำ คือ เกลือแร่หลักที่มีอยู่ในน้ำทะเล เช่น โซเดียม (Na^{+}) โปแตสเซียม (K^{+}) แคลเซียม (Ca^{2+}) และแมกนีเซียม (Mg^{2+}) โดยเกษตรกรควรเตรียมน้ำให้มีเกลือแร่ใกล้เคียงกับน้ำทะเลธรรมชาติ ที่สัดส่วนแคลเซียมต่อแมกนีเซียมต่อโปแตสเซียม 1:3:1 โดยต้องรักษาให้ในน้ำเลี้ยงกุ้งมีเกลือแร่หลักทั้ง 3 ชนิด ไม่น้อยกว่า 100 300 และ 100 มก./ล. ตามลำดับ

2.1.2 คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง

การเลี้ยงกุ้งจำเป็นต้องใช้เทคโนโลยีและการจัดการที่ดี โดยการดูแลคุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเป็นปัจจัยสำคัญมาก เนื่องจากส่งผลกระทบต่ออัตราการรอด การเจริญเติบโต ความต้านทานโรค กรณีที่น้ำคุณภาพไม่ดี ทำให้กุ้งเครียด โตช้า กุ้งอ่อนแอ และติดโรคต่างๆได้ง่าย ทำให้ค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงสูงขึ้น และอาจต้องจับกุ้งก่อน เวลาที่ควร สำหรับการ กำหนดค่าดัชนีที่สำคัญต่อคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยง มีดังนี้ (พุทธ, 2549; สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล , 2556)

- ความเค็ม (Salinity) เป็นดัชนีวัดปริมาณความเข้มข้นของอิออน (ion) ที่ละลายในน้ำ ค่าความเค็มของน้ำทะเลขึ้นอยู่กับปริมาณอิออนที่สำคัญ 7 ชนิด ได้แก่ โซเดียม โปแตสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม คลอไรด์ ซัลเฟต และไบคาร์บอเนต ในการเลี้ยงกุ้งทะเลควรมีความเค็มอยู่ระหว่าง 2.5-3.5% สำหรับกุ้งกุลาดำความเค็มที่เหมาะสมอยู่ในช่วงระหว่าง 1.5-3.0% ส่วนกุ้งขาวสามารถทำการเลี้ยงในช่วงความเค็ม 0.2-3.5% แต่ระดับที่เหมาะสมคือ 2.0-2.5% ในปัจจุบันพบว่าการเลี้ยงกุ้งที่ความเค็ม 0.3-1.0% สามารถเลี้ยงกุ้งได้ง่ายเนื่องจากมีปัญหาเรื่องความเสียหายจากโรค

กุ้งน้อยมากโดยเฉพาะปัญหาจากโรคแบคทีเรียเรืองแสงในบ่อกุ้งเป็นต้น เกษตรกรหลายรายจึงได้หันมาเลี้ยงกุ้งทะเลในระบบความเค็มต่ำมากขึ้น ทั้งนี้หากน้ำเลี้ยงกุ้งมีความเค็มสูงกว่าเลือดในตัวกุ้งจะทำให้กุ้งสูญเสียน้ำจนตาย ส่วนในกรณีที่น้ำเลี้ยงกุ้งมีความเค็มต่ำกว่าในเลือดกุ้ง จะทำให้ระดับความเข้มข้นของเลือดในตัวกุ้งจางลงและตายในที่สุด ดังนั้นจึงต้องมีความเค็มในระดับที่เหมาะสม

- ความเป็นกรดด่าง (pH) จะมีการเปลี่ยนแปลงมากในช่วงวันโดยมีผลต่อการเจริญเติบโตและการลอกคราบของกุ้ง รวมทั้งส่งผลต่อการละลายของแร่ธาตุและสารที่ละลายในน้ำในรอบวันควรอยู่ระหว่าง 7.5-8.2 เพื่อลดภาวะพิษจากก๊าซไข่เน่า (H_2S) และแอมโมเนีย (NH_3) โดย pH ต่ำกว่า 7.5 ก๊าซไข่เน่าจะยิ่งเป็นพิษมากแต่ถ้า pH สูงกว่า 8.5 จะเกิด NH_3 เป็นส่วนใหญ่และเป็นพิษสูงต่อกุ้งหาก pH ต่ำลงมา NH_3 จะเปลี่ยนอยู่ในรูป NH_4^+ ซึ่งไม่เป็นพิษต่อกุ้ง สามารถควบคุม pH จากการให้อาหาร ออกซิเจน การถ่ายน้ำบางส่วนหรือใช้สารกลุ่มกรดหรือด่าง

- ออกซิเจนละลายน้ำ มีความสำคัญต่อกุ้งในการหายใจ รวมทั้งจุลินทรีย์และแพลงก์ตอนใช้ในการย่อยสลายเศษอาหารและสิ่งขับถ่ายต่างๆของกุ้งด้วย ทั้งนี้ปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมควรมากกว่า 5 มก./ล. ดังตารางที่ 1 และควรรักษาระดับด้วยการตีน้ำให้ฟุ้งหรือพ่นอากาศลงในน้ำโดยเฉพาะกลางคืนหรือช่วงกลางวันที่ฟ้าปิดไม่มีแสงแดดรวมทั้งควบคุมการให้อาหารในปริมาณที่เหมาะสม เพื่อไม่ให้เกิดอาหารส่วนเกินมากเกินไปจนทำให้จุลินทรีย์และแพลงก์ตอนเจริญเร็วและแย่งใช้ออกซิเจนกับกุ้งโดยเฉพาะในเวลากลางคืน

ตารางที่ 1 ปริมาณออกซิเจนที่ส่งผลต่อกุ้งและสิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยง

ระดับออกซิเจน (มก/ล.)	ผลต่อกุ้งและสิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยง
> 5 มก./ล.	กุ้งเจริญเติบโตดีสารอินทรีย์และของเสียสลายตัวได้อย่างรวดเร็ว
3-4 มก./ล.	กุ้งเจริญเติบโตช้าอัตราการสะสมของเสียในบ่อเพิ่มขึ้น
2-3 มก./ล.	กุ้งเจริญเติบโตช้าเครียดกินอาหารลดลง อาหารเหลือในบ่อ
1-2 มก./ล.	ระบบภูมิคุ้มกันโรคกุ้งลดลงติดโรคต่างๆง่ายขึ้น เกิดการย่อยสลายของเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจนกุ้งลอยหัว
< 1 มก./ล.	กุ้งตาย

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก พุทธ, 2549

- อุณหภูมิ (Temperature) การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในน้ำมีผลต่อสัตว์น้ำ โดยอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นทุก 1 องศาเซลเซียสจะทำให้เมตาบอลิซึมเพิ่มขึ้น 10 เท่า ทำให้ต้องการอาหารและออกซิเจนเพิ่มขึ้น และส่งผลทางอ้อมต่อกิจกรรมการย่อยสลายอินทรีย์สารของจุลินทรีย์

เนื่องจากปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดลง นอกจากนี้อุณหภูมิยังส่งผลต่อการกินอาหารของกุ้ง โดยช่วงที่เหมาะสม คือ 27-31 องศาเซลเซียส แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำลงถึง 24 องศาเซลเซียสจะทำให้กุ้งกินอาหารลดลง 50% และจะไม่กินอาหารเมื่ออุณหภูมิลดลงถึง 20 องศาเซลเซียส

- ความโปร่งแสงของน้ำ (Transparency) บางครั้งเรียกว่าความขุ่น (Turbidity) เป็นค่าแสดงความสามารถที่แสงส่งผ่านลงสู่ผิวน้ำ โดยแสงมีความสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthesis) ของแพลงก์ตอนพืชเพื่อผลิตสารอินทรีย์และออกซิเจน ค่าที่เหมาะสมสำหรับการดำรงชีวิตของกุ้งอยู่ที่ระดับความลึก 20-40 เซนติเมตร

- ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) เป็นก๊าซที่เกิดขึ้นในบ่อกุ้งจากบริเวณก้นบ่อหรือในสภาวะขาดออกซิเจนโดยแบคทีเรียที่ใช้ซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในการหายใจ (Sulfate reducing bacteria) ได้แก่ *Desulfovibrio, Desulfotomaculum, Desulfomonas* ทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ทำให้เกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์หรือก๊าซไข่เน่า โดยค่าที่ปลอดภัยควรน้อยกว่า 0.002 มก./ล. หากมีมากกว่า 0.05 มก./ล. จะเป็นพิษต่อกุ้งโดยทำให้กุ้งเสียการทรงตัวและตายในที่สุด

- แอมโมเนีย (NH_3) เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่เกิดจากการขับถ่ายของเสียจากสัตว์น้ำและการเน่าสลายของอาหารที่ตกค้างในบ่อโดยอยู่ในรูปของก๊าซแอมโมเนียและแอมโมเนียมไอออนซึ่งขึ้นกับค่า pH เมื่อ pH ของน้ำสูง สารกลุ่มนี้จะอยู่ในรูปของก๊าซแอมโมเนียเป็นส่วนใหญ่และเป็นพิษต่อกุ้ง โดยเป็นอันตรายต่อเหงือกทำให้เหงือกบวมน้ำและแลกเปลี่ยนออกซิเจนลดลง เมื่อแอมโมเนียแพร่เข้าสู่เลือด ยิ่งทำให้ต้องการออกซิเจนมากขึ้นเพื่อเพิ่มการหายใจและขับแอมโมเนียออก หรือบางครั้งกุ้งอาจลดการหายใจเพื่อลดการรับแอมโมเนียแทน ขณะที่ pH ต่ำลงจะทำให้แอมโมเนียเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมไอออนซึ่งไม่เป็นพิษต่อกุ้ง ปริมาณของแอมโมเนียในบ่อกุ้งไม่ควรสูงกว่า 0.1 มก./ล. หากมีค่า 0.1-0.4 มก./ล. จะทำให้กุ้งโตช้า และเมื่อค่ามากกว่า 0.4 มก./ล. กุ้งจะเครียดและตาย ทั้งนี้ปริมาณแอมโมเนียในน้ำบ่งบอกถึงการให้อาหารแก่สัตว์น้ำมากเกินไปหรือการเลี้ยงสัตว์น้ำในอัตราที่หนาแน่น ทำให้การเกิดกระบวนการ Nitrification โดย Nitrifying bacteria กำจัดแอมโมเนียไปเป็นไนเตรทไม่ทันท่วงที

- ไนไตรท์ (NO_2-N) เป็นสารกึ่งกลางที่เกิดจากการเปลี่ยนระหว่างแอมโมเนียและไนเตรท ปริมาณไนไตรท์ในบ่อกุ้งไม่ควรเกิน 1 มก./ล. หากมีปริมาณมากเกินไปอาจทำให้สัตว์น้ำมีสีซีดและติดเชื้อได้ง่ายเนื่องจากไนไตรท์จะแย่งจับออกซิเจนกับ Haemocyanin ในเม็ดเลือด ทำให้กุ้งขาดออกซิเจน และทำให้ pH ในเลือดต่ำลง สมดุลเกลือแร่เปลี่ยนไป

- ไนเตรท (NO_3-N) เกิดจากการที่ไนไตรท์ถูกออกซิไดซ์โดยใช้ออกซิเจนผ่านกระบวนการ Nitrification ในบ่อกุ้งควรมีปริมาณไนเตรทไม่เกิน 60 มก./ล. ทั้งนี้ไนเตรทไม่

ก่อให้เกิดอันตรายต่อกุ้งในทางตรงเมื่อเทียบกับแอมโมเนียและไนไตรท์ แต่จะส่งผลในทางอ้อม โดยก่อให้เกิดปัญหา Eutrophication เนื่องจากเป็นธาตุอาหารที่จุลินทรีย์และแพลงก์ตอนใช้ในการเจริญเติบโตร่วมกับฟอสฟอรัส

2.1.3 การบำบัดน้ำทิ้งและเลนจากการเลี้ยงกุ้ง

วิธีการบำบัดน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งโดยทั่วไปสำหรับเกษตรกร คือ การตกตะกอนสารอินทรีย์ ซากแพลงก์ตอน และตะกอนดินในบ่อตกตะกอนประมาณ 1 วัน แล้วจึงสูบน้ำทิ้งเข้าสู่บ่อเติมอากาศเพื่อเร่งกระบวนการบำบัดโดยใช้เวลาประมาณ 10-20 วัน ขึ้นอยู่กับคุณภาพของน้ำทิ้ง เมื่อน้ำทิ้งมีคุณภาพดีขึ้นตามมาตรฐานแล้วจึงปล่อยน้ำออกไปยังแหล่งน้ำสาธารณะหรือนำกลับมาหมุนเวียนใช้ในการเลี้ยงกุ้งครั้งต่อไป ทั้งนี้หากเกษตรกรมีพื้นที่อย่างจำกัดอาจทำการตกตะกอนและเติมอากาศในบ่อเดียวกันได้และเมื่อทิ้งน้ำไปแล้วจะเหลือดินเลนที่เน่าเสียและขาดออกซิเจน โดยของเสียเหล่านี้จะมีสารอินทรีย์คาร์บอนและไนโตรเจนในปริมาณสูง เกษตรกรสามารถทำการบำบัดในบ่อโดยไม่เอาเลนออกจากบ่อเลี้ยง หรือ อาจต้องตักเลนออกนอกบ่อในกรณีที่มีสารอินทรีย์ปริมาณมากจนไม่สามารถบำบัดในบ่อได้ ต้องเก็บรักษาและบำบัดดินเลนให้อยู่ในบริเวณที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยที่สุด เพราะหากปล่อยให้ไหลลงแหล่งน้ำจะทำให้แหล่งน้ำเสื่อมโทรมเร็วยิ่งขึ้น (สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล, 2556)

2.2 ผลกระทบจากการเลี้ยงกุ้ง

หลังจากการจับกุ้งแต่ละรอบการผลิตจะมีการสะสมของเศษอาหารจำนวนมาก รวมทั้งสารอินทรีย์ที่เกิดขึ้นใหม่จากการหมุนเวียนธาตุอาหารที่ถูกย่อยสลายแล้วทั้งในส่วนน้ำและตะกอนดิน หากไม่มีการจัดการบำบัดน้ำที่ดีแล้วระบายลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติจะก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมในระยะยาว โดยเฉพาะปัญหาความอุดมสมบูรณ์มากเกินไป หรือ เกิด Eutrophication ซึ่งคือการที่แหล่งน้ำมีธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสมากเกินพอ ทำให้พืชน้ำและแพลงก์ตอนพืชซึ่งเป็นอาหารของสัตว์น้ำมีจำนวนมากขึ้น ทำให้สัตว์น้ำมีอาหารอุดมสมบูรณ์และเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้มีสารอินทรีย์เพิ่มมากขึ้นทั้งจากของเสียจากการขับถ่ายและซากสิ่งมีชีวิต ทำให้แบคทีเรียต้องใช้ออกซิเจนในการย่อยสลายมากขึ้นจนปริมาณก๊าซออกซิเจนลดต่ำลงถึงระดับที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ต่ำกว่า 4 มก./ล. ซึ่งเป็นระดับที่ก่อให้เกิดความเครียดต่อสัตว์น้ำหรือภาวะ Hypoxia จะส่งผลเสียอย่างชัดเจนโดยทำให้เกิดการตายของสัตว์น้ำในเวลากลางคืน (สำนักงานนโยบายและแผน

ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม , 2548; Paerl, 2006) นอกจากนี้ การปล่อยน้ำทิ้งบ่อกุ้งยังส่งผลให้ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตลดลงโดยเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตในสายใยอาหารและระบบนิเวศ (Serrano-Grijalva, Sánchez-Carrillo, Angeler, Sánchez-Andrés, & Álvarez-Cobelas, 2011) และหากปล่อยน้ำทิ้งใกล้กับบริเวณแนวปะการัง (Back-reef area) จะเป็นอันตรายต่อหญ้าทะเล Meadows และปะการัง เนื่องจากบริเวณดังกล่าวมีอัตราแลกเปลี่ยนน้ำอย่างจำกัดจึงส่งเสริมให้เกิด Eutrophication เพิ่มขึ้น ทำให้สาหร่ายเจริญเพิ่มมากขึ้นจนเกิดแนวเงาและการแย่งพื้นที่ของสิ่งมีชีวิต (Herbeck et al., 2013) โดยทั่วไปการบ่งชี้ Eutrophication ในแหล่งน้ำทำได้จากการวัดความเข้มข้นของฟอสฟอรัสซึ่งต้องมีค่ามากกว่า 1.1 ไมโครโมลาร์ (Herbeck et al., 2013; Smith, Tilman, & Nekola, 1999) หากเกิดในแหล่งน้ำตื้นจะพบพืชน้ำขนาดใหญ่เจริญปกคลุมผิวน้ำอย่างหนาแน่น เช่น สายหนาม (*Najas* sp.) รวมทั้งสาหร่ายสีเขียวขนาดใหญ่ (Cladophora) ขณะที่แหล่งน้ำลึกจะพบพืชน้ำขนาดเล็กหรือแพลงก์ตอนพืชเช่น *Oscillatoria* เป็นต้น (สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม , 2548; สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล , 2556)

การปล่อยน้ำทิ้งบ่อกุ้งที่ไม่ได้ผ่านการบำบัดให้ได้มาตรฐานเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดความเสื่อมโทรมของแหล่งน้ำและการประมง (สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล , 2556) โดยสถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลได้สรุปข้อมูลฟาร์มมาตรฐานสัตว์น้ำชายฝั่งปี 2558 ดังตารางที่ 2 พบว่า เกษตรกรมุ่งเน้นการเลี้ยงกุ้งทะเลมากเป็นอันดับหนึ่งเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเลทั้งหมด โดยมีการขึ้นทะเบียนฟาร์มกุ้งทะเล 20,494 ฟาร์ม ใช้พื้นที่ 305,552 ไร่ และมีฟาร์มเพียง 31.56% เท่านั้นที่ผ่านมาตรฐาน GAP (Good Aquacultural Practice)

ตารางที่ 2 ข้อมูลการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลและสัตว์น้ำชายฝั่ง ณ วันที่ 1 พฤษภาคม 2558

ชนิดสัตว์น้ำชายฝั่ง	จำนวนราย	เนื้อที่(ไร่)	จำนวนฟาร์ม	จำนวนฟาร์มที่ได้มาตรฐาน GAP
กุ้งทะเล (Marine Shrimp)	19,378	305,552.40	20,494	6,468
ปลาทะเล (Marine Fish)	7,503	13,981.37	7,584	1,982
ปูทะเล (Crab)	2,000	15,980.71	2,009	175
หอยทะเล (Mollusk)	4,569	81,753.05	4,752	1,551

ที่มา: สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล, 2558

นอกจากนี้ รายงาน แผนแม่บทการพัฒนาลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลา (สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม , 2548) พบว่าพื้นที่นากุ้งในเขตลุ่มน้ำฯ ประมาณ 6,800-9,500 ไร่ มีการปล่อยน้ำเสียลงสู่ทะเลสาบสงขลาและพบว่าน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งมีค่า BOD ปริมาณฟอสฟอรัส และไนเตรทที่สูงมาก โดย ดำรง (2551) ได้ตรวจสอบคุณภาพน้ำเสียจากบ่อกุ้งจังหวัดตรัง พบว่า ค่า ออร์โธฟอสเฟต มีค่า 0.54 มก./ล. และมีฟอสฟอรัสรวม 3,730.08 มก./ล. ขณะที่มีแอมโมเนียม 0.47 มก./ล. และไนโตรเจนรวม 8.98 มก./ล. ทั้งนี้ หากน้ำทิ้งเหล่านี้ไม่ผ่านการบำบัดก่อนปล่อยออกสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติจะก่อให้เกิด ปัญหา Eutrophication ทำให้แหล่งน้ำขาดออกซิเจนและเน่าเสีย สัตว์น้ำต่างๆไม่สามารถดำรงอยู่ได้และตายในที่สุด ทั้งนี้ กรมควบคุมมลพิษได้กำหนดมาตรฐานน้ำทิ้งจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง และมีการรายงานคุณภาพน้ำทิ้งบ่อกุ้งจากการใช้ระบบบำบัดน้ำทิ้งของฟาร์มสาธิตต้นแบบ แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 มาตรฐานน้ำทิ้งจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง

พารามิเตอร์	หน่วย	มาตรฐานน้ำทิ้ง
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	-	6.5-9.0
ค่าบีโอดี (BOD)	มก./ล.	20
สารแขวนลอย	มก./ล.	70
แอมโมเนีย	มก.ไนโตรเจน/ล.	1.1
ไฮโดรเจนซัลไฟด์	มก./ล.	0.01
ฟอสฟอรัสรวม	มก.ฟอสฟอรัส/ล.	0.4
ไนโตรเจนรวม	มก.ไนโตรเจน/ล.	4

ที่มา : พุทธ, 2544 และสถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล, 2556

2.3 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ไม่ใช้ออกซิเจนในที่นี้กล่าวถึงเฉพาะกลุ่มสีม่วง

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่ใช้ออกซิเจน (Anoxygenic phototrophic purple bacteria) เป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มใหญ่ที่แพร่กระจายในธรรมชาติพบได้ทั้งในแหล่งน้ำบนบก รวมทั้งบริเวณสิ่งแวดล้อมที่รุนแรง (ไม่ปกติ) ทั้งอุณหภูมิ pH และความเค็ม เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง ไข่ เกลียว และกลม การขยายพันธุ์ส่วนใหญ่เป็นแบบ Binary fission เซลล์มีสีแดง ม่วง-แดง ส้ม น้ำตาล เหลือง หรือเขียว สามารถสังเคราะห์แสงโดยใช้รงควัตถุ คือ แบคเทอริโอ

คลอโรฟิลล์ *a* หรือ *b* (Bacteriochlorophyll*a* or *b*) และคาโรทินอยด์ (Carotenoids) ได้แก่ Spirilloxanthin Spheroidene Lycopene และ Rhodopsin คุณสมบัติเด่น คือ สามารถสังเคราะห์ ด้วยแสงภายใต้สภาวะไร้อากาศซึ่งเจริญได้ในทั้งสภาวะ Photoautotrophy โดยใช้ก๊าซไฮโดรเจน หรือไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและ สิ่งมีชีวิตชนิดอื่นเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแทนน้ำแล้วเปลี่ยนเป็นฟอร์มที่ไม่มีพิษ เช่น ซัลเฟอร์ ซัลเฟต และสภาวะ Photoheterotrophy โดยใช้สารอินทรีย์โมเลกุลเล็ก เช่น Malate Acetate Pyruvate เป็นตัวให้อิเล็กตรอนตลอดจนสามารถเจริญแบบ Chemoheterotrophy ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ เมื่อไม่มีแสง (Johannes F Imhoff, 1992; Johannes F Imhoff, Hiraishi, & Süling, 2005) สามารถแบ่งตามการสะสมซัลเฟอร์ไว้ภายในเซลล์หรือไม่สะสมได้เป็น 2 กลุ่มย่อย ดังนี้

1. Purple sulfur bacteria หรือ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่สะสมซัลเฟอร์ สามารถทนต่อซัลไฟด์ในระดับ mM และออกซิไดซ์ซัลไฟด์เป็นซัลเฟอร์แล้วสะสมภายในเซลล์หรืออาจใช้ไทโอซัลเฟต ก๊าซไฮโดรเจน เฟอร์รัส (Fe^{2+}) และไนไตรท์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้ สามารถเจริญได้ดีในสภาวะ Photoautotrophy ซึ่งไม่มีออกซิเจนและสามารถเจริญได้อย่างจำกัดในสภาวะ Photoheterotrophy และเจริญ ได้ไม่ดีในสภาวะ Chemoheterotrophy เมื่อใช้อณูชีววิทยาจัดสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าอยู่ในกลุ่ม Gamma-proteobacteria มีรูปร่างกลม แท่ง เกลียว เช่น *Allochromatium Marichromatium Thermochromatium Thiocapsa Thiospirillum Ectothiorhodospira Ectothiorhodosinus* และ *Halorhodospira* เป็นต้น

2. Purple nonsulfur bacteria (PNSB) หรือ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ภายในเซลล์เมื่อใช้ซัลไฟด์ หรือซัลเฟอร์ในรูปรีดิวซ์ เป็นตัวให้อิเล็กตรอน สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะ Photoautotrophy Heterotrophy (Chemoorganotrophy) และเจริญได้ดีในสภาวะ Photoheterotrophy (Photoorganotrophy) โดยใช้สารอินทรีย์ได้หลากหลาย เช่น Malate Succinate Fumarate Acetate รวมทั้ง Ethanol Lactate และ Propionate บางชนิดสามารถย่อยสลายสารประกอบ Aromatic เช่น Benzoate อนุพันธ์ของ Benzoate Cyclohexane และ Toluene การแบ่งกลุ่มโดยใช้อณูชีววิทยาจัดเป็นกลุ่ม Alpha-proteobacteria มีรูปร่างกลม แท่งแท่ง-กลม และเกลียว เช่น *Rhodobacter Rhodopseudomonas Blastochloris Rhodoplanes Rhodocistac Rhodospirillum Rhodovibrio Roseospira* และ *Roseospirillum* เป็นต้น และกลุ่ม Beta-proteobacteria มีรูปร่างกลม แท่ง โค้ง เช่น *Rhodocyclus Rhodoferaxc* และ *Rubrivivax* เป็นต้น

PNSB เป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเด่นโดยสามารถเจริญได้หลายสภาวะทั้งแบบ Photoautotrophy Photoheterotrophy และ Heterotrophy ขึ้นอยู่กับสภาวะสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงมี การนำแบคทีเรียกลุ่มนี้มาประยุกต์ใช้ให้เกิด ประโยชน์อย่างมากมายเช่น การบำบัดน้ำเสีย การใช้เป็น

แหล่งอาหารโปรตีน (Single-cell protein) เพื่อเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ รวมทั้งในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ นอกจากนี้ยังสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) ที่มีคุณสมบัติต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค หรือสารกระตุ้นการเจริญของพืช รวมทั้งการสร้างก๊าซ ไฮโดรเจนจากการตรึง ก๊าซไนโตรเจน เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน ทางเลือก (Alternative energy) เป็นต้น (Chumpol, Kantachote, Nitoda, & Kanzaki, 2017; Kornochalert et al., 2014b; Sakpirom, Kantachote, Nunkaew, & Khan, 2017)

2.4 การบำบัดน้ำทิ้งโดยใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์

2.4.1 การลดฟอสฟอรัส

การเลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่ก่อให้เกิดสารอินทรีย์และอนินทรีย์ในปริมาณสูง แต่เนื่องจากการบำบัดด้วยวิธีทางเคมีมีข้อจำกัดด้านค่าใช้จ่ายที่สูงทั้งจากสารเคมีและการกำจัดตะกอนเกลือฟอสเฟต ในปัจจุบันจึงมีการใช้วิธีทางชีวภาพ ได้แก่ การใช้จุลินทรีย์มาช่วยในการบำบัด เช่น การใช้ PAOs (Polyphosphate accumulating organisms) สามารถสะสมฟอสฟอรัสภายในเซลล์ในรูปของโพลีฟอสเฟตแกรนูล (poly-P) สูง 5-13% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมากกว่าจุลินทรีย์ทั่วไปที่มีการสะสมเพียง 1.5-2% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำให้มีการบำบัดฟอสฟอรัสอย่างมีประสิทธิภาพ เรียกระบบดังกล่าวว่า ระบบการกำจัดฟอสฟอรัสทางชีวภาพ แบบเพิ่มพูน (Enhanced biological phosphorus removal; EBPR) ซึ่งเริ่มระบบจากการเลี้ยงเซลล์ ในสภาวะไร้ออกซิเจน โดย PAOs จะสลาย polyP ที่สะสมไว้เป็นแหล่งพลังงานในการสร้าง ATP และใช้ในการดึง Volatile fatty acids (VFAs) เข้าสู่เซลล์ เช่น อะซิเตท เพื่อใช้ในการเจริญ ขณะเดียวกันก็สะสมในรูปโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate; PHA) ทำให้ในสภาวะนี้มีการปล่อยฟอสเฟตออกจากเซลล์ในปริมาณมาก ซึ่งถือเป็นการเตรียมเซลล์ให้พร้อมต่อการดูดซึมฟอสเฟต หลังจากนั้นจึงเข้าสู่สภาวะการลดฟอสฟอรัสที่แท้จริงโดยเติมอากาศเข้าสู่ระบบ เมื่อได้รับออกซิเจนเซลล์สามารถเจริญได้โดยสลาย PHA เพื่อเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต และดูดซึมฟอสเฟตกลับคืนเป็นจำนวนมากเพื่อสะสมเป็น poly-P โดยอาศัยเอนไซม์ polyphosphatekinase ช่วยในการต่อโมเลกุลฟอสเฟตด้วยพันธะ phosphoanhydride ขณะเดียวกัน แบคทีเรียกลุ่มอื่นที่ไม่สะสม PHA จะค่อยๆลดจำนวนลงทำให้ PAOs เป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นขึ้นมา จึงทำให้ในระบบมีปริมาณฟอสเฟตลดลง ได้มาก (Blackall, Crocetti, Saunders, & Bond, 2002; Fuhs & Chen, 1975; Liang et al., 2010) ตัวอย่างการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการลดฟอสฟอรัส ในน้ำทิ้งที่มีความเค็มใกล้เคียงกับน้ำทิ้งบ่อกุ้ง เช่น นุกูล

และคณะ (2542) ได้ใช้ระบบ EBPR ในการบำบัดฟอสฟอรัสในน้ำทิ้งที่มีความเค็มระดับน้ำทะเล (3.5% NaCl) ซึ่งเป็นแหล่งน้ำทิ้งที่มาจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ รวมทั้งอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารทะเล และศึกษากลุ่มแบคทีเรียที่สามารถบำบัดฟอสฟอรัสแบบชีวภาพในระบบ EBPR โดยใช้เทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization Techniques (FISH) พบว่า แบคทีเรียในกลุ่ม Beta-proteobacteria มีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพของระบบ EBPR และสามารถสะสมฟอสฟอรัสในตะกอนเซลล์แห้งสูงถึง 5-10%

จากประสิทธิภาพการลดฟอสฟอรัสได้สูงของ PAOs ที่พบในระบบ EBPR จึงทำให้มีการศึกษามุ่งเน้นเพื่อหาแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการเป็น PAOs เพิ่มมากขึ้น (BAO et al., 2007; Tian-Ming et al., 2007) โดยรายงานวิจัยของ Liang และคณะ (2010) ได้ศึกษาศักยภาพการสะสม poly-P ของ PNSB ที่คัดแยกได้จาก Activated sludge เพื่อหาไอโซเลทที่สะสม poly-P ด้วยการย้อมสี 4.6-diaminido-2-phenylindole (DAPI) และศึกษาความหลากหลายโดยใช้ *puf*M gene ซึ่งเป็น conserved photosynthesis gene purple bacteria ที่ควบคุม light-harvesting reaction center ที่เฉพาะต่อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วง (Purple phototrophic bacteria; PNSB) และพบ *Rhodopseudomonas palustris* ที่สามารถสะสม poly-P ได้สูงจำนวน 4 ไอโซเลท ผลการศึกษาศักยภาพการสะสมฟอสฟอรัสภายในเซลล์ ของ PNSB โดยเลี้ยงเชื้อในสภาวะการเจริญต่างๆ รวมทั้งสภาวะตามระบบ EBPR ซึ่งเริ่มจากสภาวะไร้อากาศและตามด้วยสภาวะมีอากาศ แต่มีการออกแบบเพิ่มเติมโดยการให้แสงในสภาวะไร้อากาศเพื่อให้เซลล์มีการเจริญแบบ Photoheteroph พบว่า PNSB ที่ทำการศึกษามีลักษณะ การสะสม poly-P ที่แตกต่างจาก EBPR ทั่วไป คือ ในสภาวะไร้อากาศ-มีแสง เซลล์สามารถสะสม poly-P ได้ โดยไอโซเลท *R. palustris* G11 สามารถสะสมได้มากถึง 13-15% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และหลังจากปรับให้อยู่ในสภาวะมีอากาศไร้แสง พบว่าเซลล์สามารถสะสมฟอสฟอรัสได้ใกล้เคียงกับระดับเดิมหรือลดลงเล็กน้อยตลอดการเลี้ยง ดังนั้นจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจว่า PNSB มีรูปแบบการสะสม poly-P แตกต่าง จาก PAOs ที่พบในระบบ EBPR ทั่วไป โดยสามารถสะสม poly-P ได้ทั้งในสภาวะไร้อากาศ (มีการให้แสง) ซึ่งไม่ต่างจากสภาวะมีอากาศ ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติเด่นของเชื้อกลุ่มนี้ที่สามารถเจริญแบบ Photoheteroph โดยใช้กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อสร้างพลังงานสำหรับใช้ในการเจริญ อีกทั้งมีพลังงานเหลือมากพอสำหรับการนำมาใช้ในการสร้าง poly-P สะสมเพื่อเป็นแหล่งพลังงานภายในเซลล์ต่อไป ในขณะที่แบคทีเรียทั่วไปที่ใช้สภาวะ heterotroph ต้องมีการย่อยสลายสารอินทรีย์เพื่อนำมาเป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งจะได้พลังงานมากจากการที่ต้องมีอากาศ (aerobic respiration) ขณะที่การหายใจแบบไม่ใช้อากาศ (anaerobic respiration) ได้พลังงานน้อยกว่าจึงไม่เหลือพลังงานมากพอสำหรับนำมาใช้ในการสะสม poly-P นั่นเอง

2.4.2 การลดไนโตรเจน

น้ำในบ่อกุ้งมีสารประกอบไนโตรเจนจากเศษอาหารและการขับถ่ายในปริมาณมาก โดยจะปรากฏในรูปแอมโมเนีย ไนเตรท และไนไตรท์ ทั้งนี้ในสภาวะมีออกซิเจน จะเกิด Nitrification โดยอาศัยแบคทีเรียกลุ่ม Ammonium oxidizers เช่น *Nitrosomonas Nitrosococcus* และ *Nitrosovibrio* ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์ และอาศัยแบคทีเรียกลุ่ม Nitrite oxidizers เช่น *Nitrobacter Nitrospira* และ *Nitrococcus* ในการออกซิไดซ์ไนไตรท์เป็นไนเตรท นอกจากนี้ ในสภาวะขาดออกซิเจน จะมีจุลินทรีย์บางกลุ่มที่เจริญได้โดยอาศัยไนเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายแทนออกซิเจนเรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า Denitrifying bacteria ได้แก่ *Achromobacter Bacillus Clostridium Lactobacillus Micrococcus Proteus Pseudomonas* ซึ่งทำให้เกิดกระบวนการ Denitrification โดยจะเปลี่ยนไนเตรทให้อยู่ในรูปก๊าซไนโตรเจน (ดวงพร, 2545) ดังนี้

$$NO_3^- \longrightarrow NO_2^- \longrightarrow NO \longrightarrow N_2O \longrightarrow N_2$$

2.5 การออกแบบการทดลองด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)

วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM) เป็นวิธีการทางสถิติเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการหรือการทดลอง โดยอาศัยการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยและค่าตอบสนองที่สนใจ (Response) และการออกแบบการทดลองให้เหมาะสมกับลักษณะข้อมูล เพื่อให้ได้ค่าตอบสนองสูงสุด ทั้งนี้วิธีการออกแบบที่เป็นที่นิยมและให้ค่าครอบคลุมระดับปัจจัย คือ วิธีส่วนประสมกลาง (Central Composite Design; CCD) ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยการกระจายระดับของข้อมูลออกจากจุดศูนย์กลาง และรวมค่าการกระจายในระดับแกนและค่าที่มุม จึงประกอบด้วยระดับปัจจัย 5 ระดับ ได้แก่ $-\alpha$, -1, 0, 1 และ $+\alpha$ ทั้งนี้ผลการทดลองใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Multiple regression analysis และสามารถประมวลผลทางสถิติ แล้วนำเสนอในรูปแบบกราฟพื้นผิวตอบสนอง (response surface plot) เพื่อให้ง่ายต่อการศึกษาผลระหว่างปัจจัยร่วม (Myers, Montgomery, & Anderson-Cook, 2016) ทั้งนี้ ในปัจจุบันมีรายงานวิจัยซึ่งนำวิธี CCD มาใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการบำบัดน้ำทิ้งต่างๆรวมทั้งฟอสฟอรัส (Beuckels, Smolders, & Muylaert, 2015; Cathie Lee, Mah, Leo, Wu, & Chai, 2014; Li, Zou, Zhang, & Sun, 2014; Zhang et al., 2011)

3. วัตถุประสงค์

1. แยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง PNSB ที่เจริญในน้ำและตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกุ้ง

2. คัดเลือก PNSB ที่มีศักยภาพในการลดฟอสฟอรัสในน้ำทิ้งจากบ่อกุ้ง

3. เพิ่มศักยภาพการลดฟอสฟอรัสในน้ำทิ้งจากบ่อกุ้งโดยหาสภาวะที่เหมาะสมของกล้าเชื้อที่คัดเลือกได้

4. ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

นำข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยเป็นแนวทางในการ ใช้ PNSB เพื่อการบำบัดน้ำทิ้ง โดยเฉพาะฟอสฟอรัสรวมทั้งการปรับปรุงคุณภาพน้ำขณะทำการเลี้ยงกุ้งและสัตว์น้ำชนิดอื่นต่อไป เพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ยั่งยืนและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง PNSB

- หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 150 × 20 มม.
- Petridish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม.
- หลอดทังสเตน (60 วัตต์)
- พาราฟินเหลว
- Anaerobic jar, gas pack และ indicator

2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่องหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ของบริษัท TOMY
- เครื่องอบลมร้อน (Hot air oven) ของบริษัท Venticell
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) 6400 ของบริษัท Jenway
- เครื่อง Spectroquant Move 100 Mobile Colorimeter ของบริษัท Merck
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermoreactor) Spectroquant TR420 ของบริษัท Merck
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของบริษัท Denver Instrument
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) Sorvall Rc.
- กล้องจุลทรรศน์ ของบริษัท Olympus (สำหรับศึกษาลักษณะเชื้อ)
- กล้องจุลทรรศน์แบบ Epifluorescence ของบริษัท Olympus (สำหรับศึกษาลักษณะ poly-P ภายในเซลล์)
- เครื่องวัดความเข้มแสงหน่วยเป็นลักซ์ รุ่นที่ใช้ LX-50 Digicom

วิธีการทดลอง

1. การวิเคราะห์ทางเคมี

ทำการวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ ค่า pH และค่าการนำไฟฟ้า โดย pH-conductivity meter (Seven Multi, Mettler Toledo, USA); ค่าฟอสฟอรัส โดยชุดวิเคราะห์ฟอสฟอรัส (Merck, 1.14842.0001, APHA 4500-P C); ค่าไนไตรท์ โดยชุดวิเคราะห์ไนไตรท์ (Merck, 1.14776.0001, EPA 354.1, APHA 4500-NO_2B); ค่าไนเตรท โดยชุดวิเคราะห์ไนเตรท (Merck, 1.14773.0001, APHA 4500-NO_3B); ค่าแอมโมเนียม โดยชุดวิเคราะห์แอมโมเนียม (Merck, 1.14752.0001, EPA 350.1, APHA 4500-NH_3D); ค่าซีโอดีละลายน้ำโดยชุดทดสอบซีโอดี (Merck, 1.14540.0001, EPA 4.10.4, APHA 5220 D); ค่าซัลไฟด์ โดยชุดทดสอบซัลไฟด์ (Merck, 1.14779.0001, ISO 8466-1 and DIN 38402 A51) และความเค็มเกลือ (%) โดย salinometer แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 วิธีการวิเคราะห์พารามิเตอร์ในการติดตามคุณภาพน้ำเลี้ยง

พารามิเตอร์	**วิธีการวิเคราะห์**
ฟอสฟอรัส (มก./ล.)*	Phosphate Test (Merck: 1.14842.0001) APHA 4500-P C
ไนเตรท (มก./ล.)	Nitrate Test (Merck, 1.14773.0001) APHA 4500-NO_3B
ไนไตรท์ (มก./ล.)	Nitrite Test (Merck: 1.14776.0001) EPA 354.1, APHA 4500-NO_2B
แอมโมเนียม (มก./ล.)	Ammonium Test (Merck, 1.14752.0001) EPA 350.1, APHA 4500-NH_3D
ความเป็นกรด-เบส (pH)	pH meter (Instruction)
ซีโอดีละลายน้ำ (มก./ล.)**	COD Cell Test (Merck: 1.14540.0001) EPA 4.10.4, APHA 5220 D
ค่าการนำไฟฟ้า (เดซิซีเมนต์/เมตร)	Electrical conductivity meter (Instruction)
ความเค็ม (%)	Salinometer (Instruction)

* ฟอสฟอรัส วัดค่าในรูปออร์โธฟอสเฟต (PO_4-P)

** วัดค่าซีโอดีละลายน้ำ โดยทำการตกตะกอนเกลือด้วย Silver nitrate 0.25 g/ml ต่อ 1% NaCl ก่อนวิเคราะห์ผล (APHA 4500-Cl^-B)

2. การเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินสำหรับการแยกเชื้อและศึกษาคุณลักษณะน้ำและตะกอนดิน

เลือกเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกุ้งในจังหวัดพังงาและสงขลา อย่างละ 13 จุดต่อ 1 บ่อ เพื่อเป็นตัวแทนของแต่ละบ่อ (Representative sample) โดยเก็บตัวอย่างดินจุดละประมาณ 100 ก. ที่ความลึก จนถึง 10 ซม. และตัวอย่างน้ำจุดละ 100 มล. ที่ความลึกจากผิวน้ำประมาณ 50 ซม. เก็บตัวอย่างทั้งหมดบรรจุในกล่องน้ำแข็งทึบเพื่อขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ แล้วจึงทำการแยกเชื้อ PNSB ตลอดจนวัดพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ฟอสฟอรัส ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity; EC) และความเค็ม

3. การแยกเชื้อ PNSB จากบ่อเลี้ยงกุ้ง

การแยกเชื้อในน้ำทำโดยการถ่ายตัวอย่างน้ำปริมาตร 10 มล. ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 150 × 15 มม. (ปริมาตร 20 มล.) ซึ่งบรรจุอาหารเหลว Glutamate-Acetate medium (GA) ที่เติม NaCl 1.5% (w/v) (Mukkata et al., 2015) ที่มีความเข้มข้นสองเท่า ปริมาตร 10 มล. ส่วนการแยกเชื้อจากตะกอนดินทำโดยนำตัวอย่างดินหนัก 1 ก. ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาดเท่ากันซึ่งบรรจุอาหาร GA ความเข้มข้นปกติ ปริมาตร 10 มล. แล้วเติมพาราฟินเหลว 1 มล. ปิดทับเพื่อให้เป็นสภาวะไร้อากาศ (Kantachote et al., 2005) ปิดฝาเกลียวแล้วนำไปส่องไฟด้วยหลอดไฟทังสเตน 60 วัตต์ ปรับระยะห่างกับหลอดทดลองให้มีความเข้มแสง 3,500 ± 200 ลักซ์โดยใช้เครื่องวัดความเข้มแสง (LX-50 Digicom) อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส บ่มประมาณ 5 - 7 วัน หลอดทดลองที่มีแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่เป็นกลุ่มเป้าหมาย เจริญปรากฏเป็นสีชมพู ส้ม แดง และน้ำตาล แล้วจึงนำเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีขีดเป็นเส้นฟันปลา (streak) บนอาหารแข็ง GA medium ซึ่งเติม NaCl 1.5% (w/v) นำไปบ่มไว้ใน Anaerobic jar ส่องไฟที่ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ เป็นเวลา 5 วัน และทำการ re-streak จนได้โคโลนีเดี่ยว (single colony) ตรวจความบริสุทธิ์ของเชื้อด้วยการย้อม Gram stain แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เก็บเชื้อที่บริสุทธิ์ใน 20% กลีเซอรัล ที่ตู้แช่แข็ง – 80°C

4. การเตรียมกล้าเชื้อ

นำ PNSB บริสุทธิ์ทั้งหมดที่แยกได้จากน้ำและตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกุ้งมาเลี้ยงในอาหารเหลว GA ที่เติม NaCl 1.5% (w/v) ปริมาตร 18 มล. ซึ่งบรรจุในหลอดฝาเกลียวขนาด 150 × 20 มม. แล้วนำเชื้อไปบ่มโดยใช้หลอดไฟทังสเตน และให้แสง 3,500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 48 ชม. แล้วจึงถ่ายเชื้อในอาหาร GA หลอดใหม่ หลังจากเลี้ยงเชื้อสองครั้งจึงนำเชื้อที่ได้มาวัดค่า

OD ที่ 660 nm ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปรับความขุ่นให้ได้ 1.0 (OD_{660}= 1.0) มีปริมาณเซลล์ 4.7 × 10^8 CFU/ml เพื่อให้มีปริมาณเชื้อเท่ากัน และใช้เป็นกล้าเชื้อ โดยมีอาหารที่ปราศจากเชื้อเป็น blank

5. การคัดเลือกเชื้อ PNSB ที่มีศักยภาพในการกำจัดฟอสฟอรัส

5.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำเลี้ยงกุ้งและศึกษาคุณลักษณะน้ำ

เก็บน้ำเลี้ยงกุ้งก่อนปล่อยออกจากบ่อเลี้ยงซึ่งอุดมไปด้วยสารอาหารและของเสีย บรรจุให้เต็มถังทึบแสงขนาด 25 ล. เพื่อป้องกันการ สังเคราะห์ด้วยแสง นำมาวัดพารามิเตอร์ ได้แก่ ปริมาณฟอสฟอรัส ไนเตรท ไนไตรท์ แอมโมเนียม pH ค่าซีโอดีละลาย (Soluble Chemical Oxygen Demand; sCOD) ค่าการนำไฟฟ้าและความเค็ม และเก็บไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4 ± 2ºC นำน้ำเลี้ยงกุ้งจากบ่อที่พบค่าฟอสฟอรัสมากที่สุดมากรองด้วยผ้าขาวบาง และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ได้ “น้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อ”

5.2 การคัดเลือกเชื้อขั้นเบื้องต้น

เพื่อคัดเลือก PNSB ที่สามารถเจริญได้ดีในน้ำเลี้ยงกุ้ง จึงนำ PNSB ทั้งหมดที่แยกได้มาคัดเลือกหาเชื้อที่สามารถเจริญได้ดี (OD_{660}> 1.0) ทั้ง 2 สภาวะ คือ มีอากาศ-ไร้แสงและ อากาศเล็กน้อย-มีแสงในอาหาร GA ที่มี NaCl 1.5% (w/v) ดังนี้

5.2.1 สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง (Chemoorganotroph) ใส่กล้าเชื้อ 1 มล.ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 150 x 25มม. (ปริมาตร 50 มล.) ซึ่งบรรจุอาหาร GA ที่เติม NaCl 1.5% (w/v) ปริมาตร 9 มล. หุ้มหลอดด้วย Aluminum foil เพื่อป้องกันแสง บ่มในเครื่อง shaker ที่ 150 rpm อุณหภูมิ 30ºC ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชม. นำไปวัดการเจริญด้วย Spectrophotometer โดยวัดค่า OD_{660}และใช้ชุดควบคุมคือหลอดที่ไม่เติมเชื้อในอาหาร GA เป็น blank

5.2.2 สภาวะอากาศเล็กน้อย-มีแสง (Photoheterotroph) ใส่กล้าเชื้อ 2 มล.ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด150 x 15 มม. (ปริมาตร 20 มล.) ซึ่งบรรจุอาหาร GA ที่เติม NaCl 1.5% (w/v) ปริมาตร 18 มล. บ่มด้วยหลอดไฟทังสเตนโดยให้แสง 3,500 ลักซ์ เป็นเวลา 48 ชม.แล้วทำการวัดการเจริญด้วย Spectrophotometer ที่ OD_{660} เช่นเดิม

5.3 การคัดเลือกเชื้อขั้นที่ 2

นำเชื้อที่ได้จากการคัดเลือกในขั้นแรกมาทดสอบการเจริญในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อ เพื่อหลีกเลี่ยงการตกค้างของสารอาหารจำนวนมากจาก GA จึงทำการ ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย 0.85% NaCl ก่อนปรับกล้าเชื้อให้มี OD_{660} = 1.0 โดยใช้ 0.85% NaCl แล้วทำการเลี้ยงเชื้อ โดยใช้กล้าเชื้อ 10% ในสภาวะมีอากาศ-ไร้แสงและสภาวะอากาศเล็กน้อย-มีแสงเช่นเดิม เป็นเวลา 7 วัน โดยมีชุดควบคุมเป็นหลอดที่ไม่เติมเชื้อในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อ วัดการเจริญและคัดเลือกไอโซเลทที่มีค่า OD_{660} สูงทั้งสองสภาวะเพื่อนำไปศึกษาประสิทธิภาพการลดฟอสฟอรัสในขั้นที่ 3 ต่อไป

5.4 การคัดเลือกเชื้อขั้นที่ 3

นำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกขั้นที่ 2 มาทดสอบความสามารถในการลดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อ โดยทำการทดสอบทั้ง 2 สภาวะเป็นเวลา 7 วันเช่นเดิม โดยใช้กล้าเชื้อ 10% ก่อนการวิเคราะห์ค่า นำตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อนำส่วน ใส (supernatant) มาวัดปริมาณฟอสฟอรัสและ pH ในวันที่ 0 และวันที่ 7 แล้ววัดค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงตามสูตรที่แสดงด้านล่าง สำหรับเซลล์ที่แยกไว้ นำไปย้อมสี methylene blue เพื่อตรวจหาการสะสม poly-p ภายในเซลล์ (Hülsen et al., 2014; Hupfer, Gloss, Schmieder, & Grossart, 2008) และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สำหรับการทดลองนี้มีชุดควบคุมปราศจากเชื้อ (abiotic control) คือน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อเพื่อดูผลของปัจจัยทางเคมี-กายภาพที่อาจส่งผลต่อการลดของฟอสฟอรัส

$$\text{การลดฟอสฟอรัส (\%)} = \frac{[\text{ความเข้มข้นฟอสฟอรัสในวันที่ } 0] - [\text{ความเข้มข้นฟอสฟอรัสในวันที่ } 7]}{[\text{ความเข้มข้นฟอสฟอรัสในวันที่ } 0]} \times 100$$

6. การเทียบเคียงเชื้อกลุ่ม purple non-sulfur bacteria

นำเชื้อ PNSB ที่คัดเลือกได้จากขั้นที่ 3 ซึ่งสามารถเจริญได้ดีในน้ำเลี้ยงกุ้งและลดฟอสฟอรัสได้มากที่สุดมาทำการเทียบเคียงในระดับชนิดด้วยการเทียบลำดับเบส 16S rRNA gene โดยนำเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร GA เป็นเวลา 48 ชม.มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที แล้วแยกเซลล์ออกมาสกัด genomic DNA ด้วย DNA extraction kit (PowerSoil; MO Bio, Carlsbad, CA, USA) ตามคู่มือของบริษัท ที่ผลิต และเพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene โดยเทคนิค PCR ใช้ primer 8F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') และ 1492R (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3') โดยมีขั้นตอน 3 ขั้นตอน ได้แก่ denaturation step (94 °C, 30 วินาที) annealing

step (52 ºC 30 วินาที) และ extension step (72 ºC, 60 วินาที) นำ PCR products ไป purify โดยใช้ Gel/PCR DNA fragment extraction kit (Geneaid, Qiagen, Taiwan) ตามคู่มือ แล้วส่งวิเคราะห์ลำดับเบส และประเมินผลด้วยโปรแกรม CHROMAS PRO version 1.5 (Technelysium, South Brisbane, QLD, Australia) เทียบลำดับเบสในฐานข้อมูลของ Genbank โดยใช้ NCBI-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยเชื้อ W12 และ W48 ใช้ 1308 และ 1310 basepairs ตามลำดับ รวมทั้งสร้างแผนภูมิต้นไม้ไฟโลเจเนติกด้วยวิธีหาระยะห่างแบบ Neighbour-joining (NJ) ด้วย MEGA software package 6.0 และประเมินความน่าเชื่อถือของกิ่งด้วยวิธี bootstrap analysis

7. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดฟอสฟอรัสด้วย Response surface methodology (RSM)

7.1 การออกแบบการทดลอง

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในการกำจัดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้ง โดยวางแผนแบบ RSM และกำหนดชุดทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) โดยทำการศึกษาในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อ ปรับสภาพซึ่ง ปรับค่า sCOD ด้วย Sodium acetate (ประมาณ 100 มก./ล. ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยที่วัดได้ในน้ำเลี้ยงกุ้ง) และปรับค่าฟอสฟอรัส ด้วย Dipotassium phosphate (ประมาณ 10 มก./ล.) และทดสอบปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการบำบัด ได้แก่ ปริมาณกล้าเชื้อ pH เริ่มต้นและความเค็ม ซึ่งทั้ง 3 ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยปัจจัยละ 5 ระดับ (ตารางที่ 5) โดยแปรระดับปัจจัยตามช่วงค่าที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกุ้ง และเพื่อรักษาต้นทุนการบำบัดให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมจึงเลือกใช้ปริมาณกล้าเชื้อสูงสุดเพียง 5% ในการออกแบบ ทั้งนี้ จากจำนวนปัจจัยและระดับปัจจัยดังกล่าวสามารถนำไปกำหนดชุดการทดลองได้ 20 ชุดการทดลองดังตารางที่ 6 และทำการทดลองตามชุดการทดลองที่ได้ โดยเลี้ยงเชื้อภายใต้ 2 สภาวะ ได้แก่ สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง (เขย่าที่ 150 rpm) และสภาวะมีอากาศเล็กน้อย -มีแสง (ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์) ทำการเลี้ยง โดยใช้เชื้อผสม W12 และ W48 อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 48 ชม. แล้วจึงวัดปริมาณฟอสฟอรัสและไนเตรทที่ลดลงด้วย Test kit

ตารางที่ 5 ปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี RSM โดยใช้ CCD

ปัจจัย	**ระดับ**				
	-α	**-1**	**0**	**1**	**+α**
ปริมาณกล้าเชื้อ (Inoculum) (%v/v)	0.98	2	3.5	5	6.02
ความเป็นกรดด่าง (pH)	5.32	6	7	8	8.68
ความเค็ม (Salinity) (%)	0.32	1	2	3	3.68

ตารางที่ 6 จำนวนการทดลองทั้งหมดที่ได้จากการออกแบบด้วย CCD

Std	**Run**	**Block**	**Inoculum (%)**	**Initial pH**	**Salinity (%)**
18	1	1	3.50	7.00	2.00
10	2	1	6.02	7.00	2.00
16	3	1	3.50	7.00	2.00
3	4	1	2.00	8.00	1.00
11	5	1	3.50	5.32	2.00
19	6	1	3.50	7.00	2.00
13	7	1	3.50	7.00	0.32
5	8	1	2.00	6.00	3.00
7	9	1	2.00	8.00	3.00
2	10	1	5.00	6.00	1.00
20	11	1	3.50	7.00	2.00
12	12	1	3.50	8.68	2.00
15	13	1	3.50	7.00	2.00
6	14	1	5.00	6.00	3.00
9	15	1	0.98	7.00	2.00
14	16	1	3.50	7.00	3.68
1	17	1	2.00	6.00	1.00
8	18	1	5.00	8.00	3.00
17	19	1	3.50	7.00	2.00
4	20	1	5.00	8.00	1.00

7.2 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลทางสถิติของข้อมูลที่ได้จากการทดลองสามารถแสดงความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยด้วยสมการที่เหมาะสมกับข้อมูลที่สุด ได้แก่ สมการควอดราติกและคูบิก (สมการที่ 1 และ 2 ตามลำดับ) สำหรับการลดฟอสฟอรัสและไนเตรทได้มากที่สุด

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3$$

(สมการที่ 1)

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3 + \beta_{111}X_1^3 + \beta_{222}X_2^3 + \beta_{333}X_3^3 + \beta_{123}X_1X_2X_3$$

(สมการที่ 2)

Y คือ ผลการตอบสนองที่ทำนายด้วยสมการ (1 หรือ 2) ขณะที่ X_1 และ X_i คือ ตัวแปรที่ใช้ทดลอง ส่วน β_0 คือ ค่าคงที่ของสมการ ขณะที่ β_1 β_2 และ β_3 คือ ผลของปัจจัยเดียว β_{11} β_{22} β_{33} คือ ผลของปัจจัยที่เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า β_{12} β_{13} β_{23} คือ ผลร่วมของระหว่างปัจจัย β_{111} β_{222} β_{333} คือ ผลของปัจจัยที่เพิ่มขึ้นเป็นสามเท่า β_{123} คือ ผลร่วมของทั้งสามปัจจัย วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยการศึกษาค่าความแปรปรวน (ANOVA) และคำนวณค่าที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยในการลดฟอสฟอรัส และไนเตรท โดยใช้ Design-Expert software (version 6.0.2) (Stat-Ease Corporation, USA)

7.3 การยืนยันผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย CCD

นำสภาวะที่เหมาะสมของการลดฟอสฟอรัสและไนเตรทที่ได้จากการออกแบบโดยใช้ CCD มาทดสอบเพื่อยืนยันผลการทดลอง โดย เลี้ยงเชื้อผสม อัตราส่วน 1:1 ตามสภาวะ ที่ได้ในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อ ปรับสภาพ และบ่ม สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง และมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง เป็นเวลา 96 ชม. แล้วบันทึกผลการลดฟอสฟอรัสและไนเตรทเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง หากผลการทดลองไม่เป็นไปตามผลที่คาดไว้ ให้ทำการทดลองโดยเปลี่ยนระดับของปัจจัย ดังนี้

7.3.1 การยืนยันผลครั้งที่ 1

กำหนดสภาวะการทดลอง โดยพิจารณา ลักษณะที่เหมาะสมจากชุดการทดลอง CCD และต้นทุนในการบำบัด ร่วมกับความสามารถของเชื้อในการลดฟอสฟอรัสได้ในสิ่งแวดล้อม

ที่มีความเค็มสูง และสภาวะแวดล้อมการเจริญของกุ้ง สามารถกำหนดสภาวะ ได้ 3 ชุดการทดลองได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 ปริมาณกล้าเชื้อ 6% ความเป็นกรดด่าง 7.50 และความเค็ม 1.50%

ชุดการทดลองที่ 2 ปริมาณกล้าเชื้อ 4% ความเป็นกรดด่าง 7.50 และความเค็ม 1.50%

ชุดการทดลองที่ 3 ปริมาณกล้าเชื้อ 5% ความเป็นกรดด่าง 7.50 และความเค็ม 2.50%

ทำการทดลองโดย ใส่เชื้อผสม อัตราส่วน 1:1 ตามสภาวะข้างต้นในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อ บ่มในสภาวะมีอากาศ ไร้แสงเป็นเวลา 96 ชม. แล้วบันทึกผลการลดฟอสฟอรัสและไนเตรทเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง

7.3.2 การยืนยันผลครั้งที่ 2

กำหนดชุดการทดลองโดยปรับ pH เริ่มต้น เป็น 3 ระดับ ได้แก่ 7.0 7.3 และ 7.5 ใช้เชื้อผสมเป็นกล้าเชื้อปริมาณ 5% ในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อ ปรับสภาพ โดยใช้ Sodium acetate และ Dipotassium phosphate ปรับค่า sCOD ประมาณ 100 มก./ล. และค่าฟอสฟอรัสประมาณ 10 มก./ล. ตามลำดับ และความเค็ม 2.50% บ่มในสภาวะมีอากาศ ไร้แสงเช่นเดิม เป็นเวลา 96 ชม. แล้วบันทึกผลการลดฟอสฟอรัสและไนเตรทเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง

7.3.3 การยืนยันผลครั้งที่ 3

เพื่อให้สอดคล้องกับสภาพจริงของการบำบัดมากที่สุด ทำการเลี้ยงเชื้อ ทั้งในสภาวะเชิงเดี่ยว และเชื้อผสม อัตราส่วน 1:1 ในน้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพที่เติมเชื้อ (treatment set) โดยใช้ Sodium acetate, Dipotassium phosphate และ Sodium nitrate ปรับค่า sCOD ประมาณ 100 มก./ล. ค่าฟอสฟอรัสประมาณ 10 มก./ล. และค่าไนเตรท ประมาณ 50 มก./ล. ตามลำดับใช้สภาวะได้แก่ ปริมาณกล้าเชื้อ 5% pH 7.50 และความเค็ม 2.50% โดยมีชุดควบคุมที่ไม่เติม กล้าเชื้อ ได้แก่ น้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพ (native control) เหมือนกับชุด ที่เติมกล้าเชื้อ ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะมีอากาศ ไร้แสง โดยวัดปริมาณฟอสฟอรัสและไนเตรทที่ลดลงด้วย Test kit รวมทั้งค่า pH EC และ ORP (Oxidation reduction potential; redox potential ด้วย ORP meter) ที่เวลา 0 ชม. และ 96 ชม.

8. การหาศักยภาพของเชื้อในการกำจัดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้ง

8.1 การหาศักยภาพของเชื้อภายในเวลา 96 ชม.

ทำการเลี้ยงเชื้อผสม *A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 (อัตราส่วน 1:1) ในน้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพ (sCOD ประมาณ 100 มก./ล. ฟอสฟอรัสประมาณ 10 มก./ล. ไนเตรท ประมาณ 50 มก./ล.) และกำหนดสภาวะที่เหมาะสมตามการ ยืนยันผลครั้งที่ 3 (ปริมาณกล้าเชื้อ 5% pH 7.50 และความเค็ม 2.50%) เช่นเดิม โดยมีชุดควบคุม คือ น้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพที่ไม่เติม กล้าเชื้อ (native control) เลี้ยงเชื้อในสภาวะมีอากาศ ไร้แสง โดย วิเคราะห์พารามิเตอร์ ได้แก่ ปริมาณฟอสฟอรัส ไนเตรท ไนไตรท์ แอมโมเนียม sCOD pH EC และ ORP ที่เวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชม.

8.2 การหาศักยภาพของเชื้อภายในเวลา 24 ชม.

ทำการเลี้ยงเชื้อผสม *A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 (ในอัตราส่วน 1:1) ในน้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพ (sCOD ประมาณ 100 มก./ล. ฟอสฟอรัสประมาณ 10 มก./ล. ไนเตรท ประมาณ 50 มก./ล.) และกำหนดสภาวะ (ปริมาณกล้าเชื้อ 5% pH 7.50 และความเค็ม 2.50%) เช่นเดิม โดยมีชุดควบคุม คือ น้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพที่ไม่เติม กล้าเชื้อ (native control) เลี้ยงเชื้อในสภาวะมีอากาศ ไร้แสง โดยวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส ไนเตรท แอมโมเนียม sCOD pH EC และ ORP นอกจากนี้ ทำการนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี spread plate และตรวจจับการสะสม Poly-P โดยเปลี่ยนวิธีการ ย้อมสีด้วย Methylene blue เป็นการย้อมด้วยสี DAPI staining ที่เวลา 0, 6, 12,18 และ 24 ชม.

9. การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เว้นแต่มีการระบุไว้เป็นอย่างอื่น และ กรณีที่ไม่ได้ใช้ RSM ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ One way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้ Duncan multiple range test ด้วยโปรแกรม SPSS 11.5 (Lead Technologies, Armonk, NY, USA) เพื่อทดสอบความแตกต่างของพารามิเตอร์ในการทดลองแต่ละชุด

บทที่ 3

ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

1. คุณลักษณะตัวอย่างน้ำและตะกอนดินบ่อกุ้งสำหรับการแยกเชื้อ

จากการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดพังงาและสงขลา จำนวน 15 บ่อ แล้วนำตัวอย่างมาวัดพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ฟอสฟอรัส pH ความเค็ม และค่าการนำไฟฟ้าดังแสดงใน ตารางที่ 7 พบว่า ค่าฟอสฟอรัสเฉลี่ยในน้ำเลี้ยงกุ้ง คือ 3.99 ± 0.92 มก./ล. โดยมีความแตกต่างกันมาก ค่าเฉลี่ยความเป็นกรดด่างในตัวอย่างน้ำเป็นเบสเล็กน้อย (7.24 ± 0.20) ขณะที่ค่าเฉลี่ยความเป็นกรดด่างในตัวอย่างดินมีค่าต่ำกว่า โดยมีสภาพเป็นกรดเล็กน้อย (6.76 ± 1.06) และกระจายในช่วงกว้าง ขณะที่ค่าการนำไฟฟ้าซึ่งแสดงประจุของสารอาหารที่ละลายในตัวอย่างของน้ำและดินมีความแตกต่างกันมาก โดยมีค่าเฉลี่ย 27.99 ± 11.06 และ 19.33 ± 14.51 เดซิซีเมนต่อเมตรในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตามลำดับ และในตัวอย่างน้ำมีค่าความเค็มเฉลี่ย 2.2 ± 1.1%

ตารางที่ 7 คุณลักษณะของน้ำและตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่ใช้แยกเชื้อ PNSB จากจังหวัดพังงาและสงขลา

พารามิเตอร์	**น้ำเลี้ยงกุ้ง**		**ตะกอนดิน**	
	ค่าเฉลี่ย ± SD	**(พิสัย)**	**ค่าเฉลี่ย ± SD**	**(พิสัย)**
ฟอสฟอรัส (มก./ล.)	3.99 ± 0.92	(< 0.5 – 5.3)	nd	nd
ความเป็นกรด-เบส	7.24 ± 0.20	(6.31 - 7.60)	6.76 ± 1.06	(3.79 - 8.11)
ค่าการนำไฟฟ้า (เดซิซีเมนต์/เมตร)	27.99 ± 11.06	(10.13 - 46.20)	19.33 ± 14.51	(0.82 - 79.32)
ความเค็ม (%)	2.2 ± 1.1	(1.0-4.2)	nd	nd

ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ยจาก 15 ตัวอย่าง และ standard deviation (SD), nd = not determined (ไม่ได้ทำการศึกษา)

เมื่อพิจารณาพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ตรวจวัดในตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งดัง ตารางที่ 7 พบว่า ค่า pH และความเค็มอยู่ในช่วงมาตรฐานคุณภาพน้ำเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้ง

น้ำเค็มในประเทศไทย (TAS-7401-2009; FAO 2016) และสอดคล้องตามคำแนะนำคุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้งของงานวิจัย (Thongrak, Prato, Chiayvareesajja, & Kurtz, 1997) โดยค่า pH ที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งอยู่ในช่วงระหว่าง 7.0 – 8.3 และมีความเค็มระหว่าง 0.05 – 3.50% อย่างไรก็ตาม จากการตรวจวัดพารามิเตอร์ในงานวิจัยนี้ชี้ชัดว่า ฟอสฟอรัสที่วัดได้มีปริมาณสูงกว่าระดับมาตรฐานซึ่งควรมีค่าน้อยกว่า 0.1 มก./ล. (Thongrak et al., 1997) นอกจากนี้ระดับฟอสฟอรัสที่ตรวจวัดได้มีปริมาณสูงกว่าค่าฟอสฟอรัสที่สูงเกินมาตรฐานที่เคยตรวจวัดได้จากน้ำทิ้งจากบ่อกุ้งใน Gila Bend ประเทศสหรัฐอเมริกา (McIntosh & Fitzsimmons, 2003) โดยรายงานระดับฟอสฟอรัสที่สูงเฉลี่ย 0.33 มก./ล. ซึ่งอยู่ในช่วงระหว่าง 0.06 – 0.78 มก./ล. ทั้งนี้ การพบค่าฟอสฟอรัสที่สูงอาจเกิดจากการให้อาหารกุ้งในปริมาณมากเกินจำเป็น หรือการใช้ปุ๋ยสำหรับน้ำเลี้ยงใหม่ รวมถึงการใช้น้ำเลี้ยงกุ้งหมุนเวียนซึ่งมีธาตุอาหารตกค้างในปริมาณมาก (Anh, Kroeze, Bush, & Mol, 2010; Herbeck et al., 2013; Thomas, Courties, El Helwe, Herbland, & Lemonnier, 2010)

2. การแยกเชื้อในน้ำและตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกุ้ง

จากการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดพังงา จำนวน 15 บ่อ แล้วนำมาแยกเชื้อ PNSB โดยใช้อาหาร GA ที่เติม NaCl 1.5% พบว่า PNSBในน้ำเลี้ยงกุ้งและตะกอนดินสามารถเจริญในหลอดทดลอง แล้วทำให้ บริสุทธิ ได้ทั้งหมด 83 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลทที่แยกได้จากน้ำ 68 ไอโซเลทคิดเป็น 81.93% ซึ่งแยกมาจากตัวอย่างน้ำจำนวน 45 ตัวอย่าง (เฉลี่ย 3 ไอโซเลท/2 ตัวอย่าง) และ15 ไอโซเลทที่แยกได้จากตะกอนดิน 45 ตัวอย่าง คิดเป็น 18.07% (เฉลี่ย 3 ไอโซเลท/10 ตัวอย่าง) ซึ่งแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 PNSB ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดพังงาและสงขลา

ชนิดของตัวอย่าง	**จำนวนไอโซเลทที่แยกได้**		
	พังงา (2 อำเภอ)	**สงขลา (2 อำเภอ)**	**รวม**
น้ำ (n = 45)	47	21	68
ตะกอนดิน (n = 45)	13	2	15
รวม (n = 90)	60	23	83

n = จำนวนตัวอย่าง

จังหวัดพังงา ประกอบด้วย อำเภอเมือง และอำเภอตะกั่วป่า

จังหวัดสงขลา ประกอบด้วย อำเภอระโนด และอำเภอเทพา

ตามปกติ PNSB พบกระจายทั่วไปในพื้นที่ต่างๆ เช่น น้ำจืด น้ำทะเล ดิน น้ำเสีย (Liang et al., 2010; Mukkata et al., 2015; Nunkaew, Kantachote, Nitoda, & Kanzaki, 2015) จากผลการแยกแบคทีเรีย PNSB จากบ่อเลี้ยงกุ้งดังตารางที่ 8 ชี้ให้เห็นว่า แบคทีเรีย PNSB ส่วนใหญ่แยกได้จากน้ำเลี้ยงกุ้ง โดยพิจารณาจากจำนวนไอโซเลทที่มากกว่าต่อตัวอย่าง คิดเป็น 81.93% โดยผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าของ (Mukkata et al., 2015) ทั้งนี้ สาเหตุที่แยก PNSB ได้น้อยในดินเกิดจากผลของความขุ่นในลำน้ำ และระยะห่างระหว่างตะกอนดินและผิวน้ำ ทำให้ปิดกั้นแสงอาทิตย์ไม่ให้ส่องผ่านไปถึงตะกอนดินบริเวณก้นบ่อ จึงพบ PNSB ได้น้อย

3. การคัดเลือกเชื้อ PNSB ที่มีศักยภาพในการกำจัดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้ง

3.1 ลักษณะตัวอย่างน้ำที่ใช้สำหรับการคัดเลือกเชื้อ

ตารางที่ 9 แสดงพารามิเตอร์ที่วัดได้จากตัวอย่างน้ำเลี้ยงจากบ่อกุ้งสำหรับการคัดเลือกเชื้อ ซึ่งแสดงค่าเฉลี่ยของฟอสฟอรัส ไนเตรท ไนไตรท์ และแอมโมเนียม ได้แก่ 3.45 ± 1.45, 10.84 ± 2.70, 0.026 ± 0.009 และ 1.31 ± 0.75มก./ล. ตามลำดับ ขณะที่ค่า pH มีค่า 7.57 ± 0.50 ค่าการนำไฟฟ้า 20.63 ± 5.55 เดซิซีเมนต่อเมตร และค่าความเค็ม 1.95 ± 0.65 % ซึ่งค่าเหล่านี้ไม่มีความแตกต่างจากตัวอย่างน้ำที่ใช้ในการแยกเชื้อดังแสดงใน ตารางที่ 7 สำหรับ sCOD มีค่าเฉลี่ย 32.25 ± 34.05 มก./ล. กล่าวได้ว่านำเลี้ยงกุ้งที่นำมาศึกษามีค่าฟอสฟอรัสอยู่ในเกณฑ์ที่สูง

ตารางที่ 9 คุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้งจากบ่อเลี้ยงจำนวน 12 บ่อในจังหวัดพังงาและสงขลา เปรียบเทียบกับมาตรฐานคุณภาพน้ำเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อการผลิตกุ้งทะเล

พารามิเตอร์	น้ำเลี้ยงกุ้ง		มาตรฐาน
	ค่าเฉลี่ย ± SD	ช่วง	
ฟอสฟอรัส (มก./ล.)*	3.45 ± 1.45	(<0.5 – 5.3)	< 0.1[a]
ไนเตรท (มก./ล.)	10.84 ± 2.70	(8.86 - 15.68)	< 60[b]
ไนไตรท์ (มก./ล.)	0.026 ± 0.009	(0.020 - > 0.400)	≤ 1[b]
แอมโมเนียม (มก./ล.)	1.31 ± 0.75	(0.41 - 2.49)	ม.ป.
ความเป็นกรด-เบส	7.57 ± 0.50	(6.77 - 8.36)	7.0 - 8.3[b]
ค่าซีโอดีละลายน้ำ (มก./ล.)	26.00 ± 25.43	(< 10 - 83)	ม.ป.
ค่าการนำไฟฟ้า (เดซิซีเมนต์/เมตร)	20.63 ± 5.55	(12.63 - 30.50)	ม.ป.
ความเค็ม (%)	1.95 ± 0.65	(1.0 - 3.2)	0.05 - 3.5[b]

ม.ป. = ไม่ปรากฏ

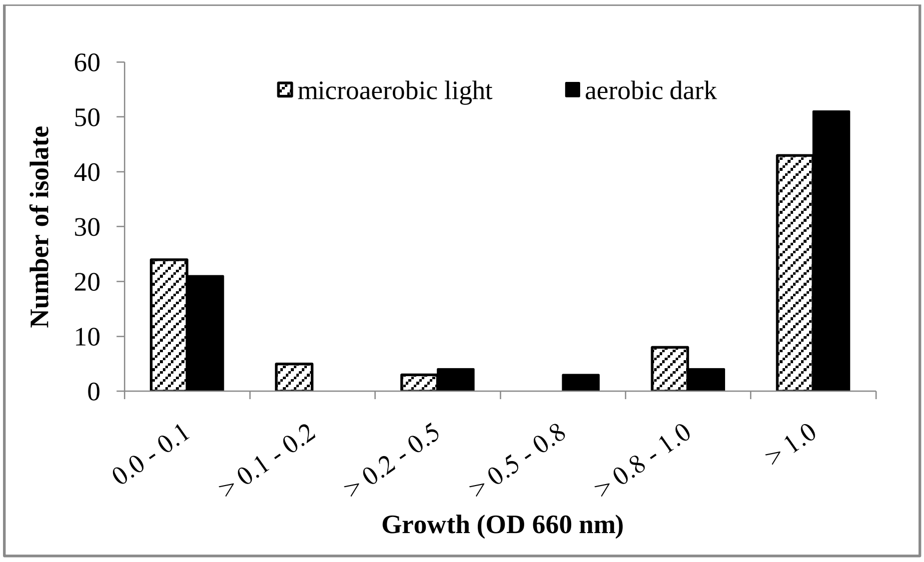
* = ฟอสฟอรัส วัดค่าในรูปออร์โธฟอสเฟต (PO_4-P)

a = Thongrak และคณะ (1997)

b = Thai Agricultural Standard of good aquaculture practices for marine shrimp farm (TAS-7401-2009)

3.2 การคัดเลือกเชื้อขั้นเบื้องต้น

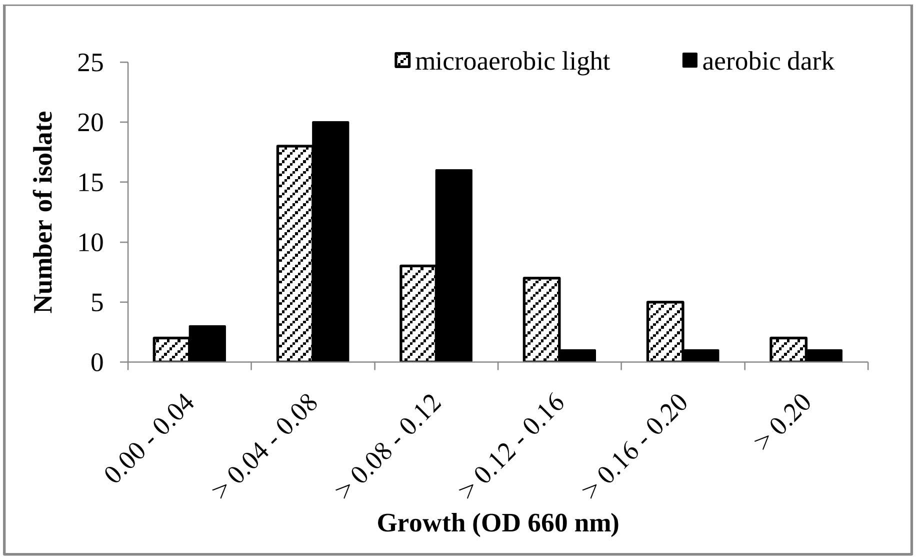
จากการนำ PNSB ทั้งหมดที่แยกได้จำนวน 83 ไอโซเลท จากตัวอย่างน้ำเลี้ยงกุ้งและตะกอนดินมาคัดเลือกขั้นเบื้องต้นโดยการทดสอบการเจริญในอาหาร GA ที่เติม 1.5% NaCl ภายใต้ 2 สภาวะ (มีอากาศเล็กน้อย-มีแสงและมีอากาศ-ไร้แสง) พบว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญ ได้ดีภายใต้สภาวะมีอากาศไร้แสงโดยมีค่า OD_{660}> 1.0 จำนวน 51 ไอโซเลท (61.45%) และมีเพียง 42 ไอโซเลท (50.60%) ที่มีค่า OD_{660}> 1.0 ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อยมีแสง ดังแสดงใน รูปที่ 1 ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียที่เจริญดีทั้ง 2 สภาวะจำนวนทั้งสิ้น 42 ไอโซเลทมาศึกษาการเจริญในน้ำเลี้ยงบ่อกุ้งในการคัดเลือกเชื้อขั้นที่ 2 ต่อไป



รูปที่ 1 จำนวน PNSB ที่เจริญในอาหาร GA ที่เติม 1.5% NaCl ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสงและสภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง เป็นเวลา 48 ชม.

3.3 การคัดเลือกเชื้อขั้นที่ 2

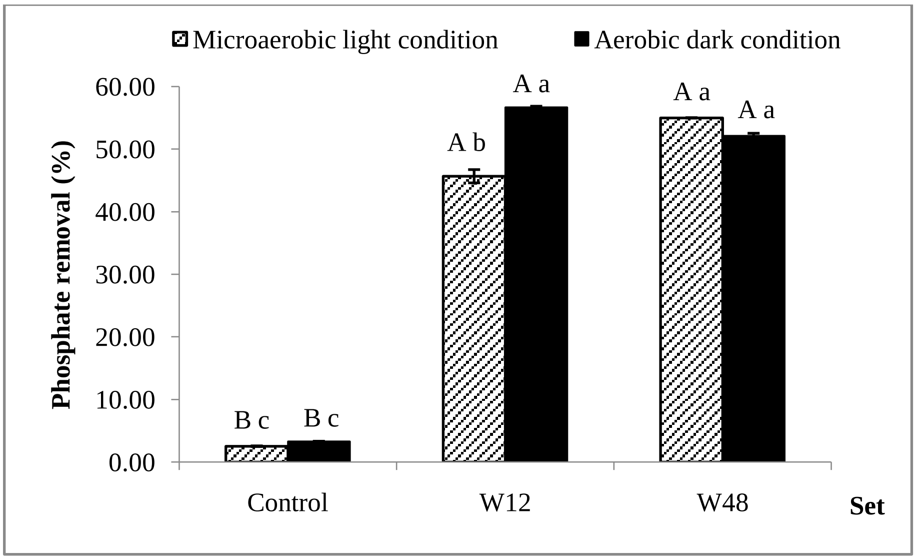
จากการนำ PNSB จำนวน 42 ไอโซเลทที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นมาศึกษาการเจริญในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อ ดังแสดงในรูป 2 พบว่า แบคทีเรียทั้งหมดเจริญโดยมีค่า OD_{660} น้อยกว่า 0.5 ทั้ง 2 สภาวะ ทั้งนี้ แบคทีเรีย ไอโซเลท W12 และ W48 แสดงค่าการเจริญสูงสุด ($OD_{660} \approx$ 0.2) ดังนั้นจึงนำ PNSB ทั้ง 2 ไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการลดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อต่อไป และจากผลการทดลองแสดงว่าน้ำเลี้ยงกุ้งที่นำมาศึกษามีสารอาหารสำหรับการเจริญต่ำกว่าอาหาร GA ที่เติม 1.5% NaCl



รูปที่ 2 จำนวน PNSB ที่เจริญในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อ โดยใช้กล้าเชื้อ 10% บ่มภายใต้สภาวะมีอากาศไร้แสงและ สภาวะมีอากาศเล็กน้อยมีแสงเป็นเวลา 7 วัน

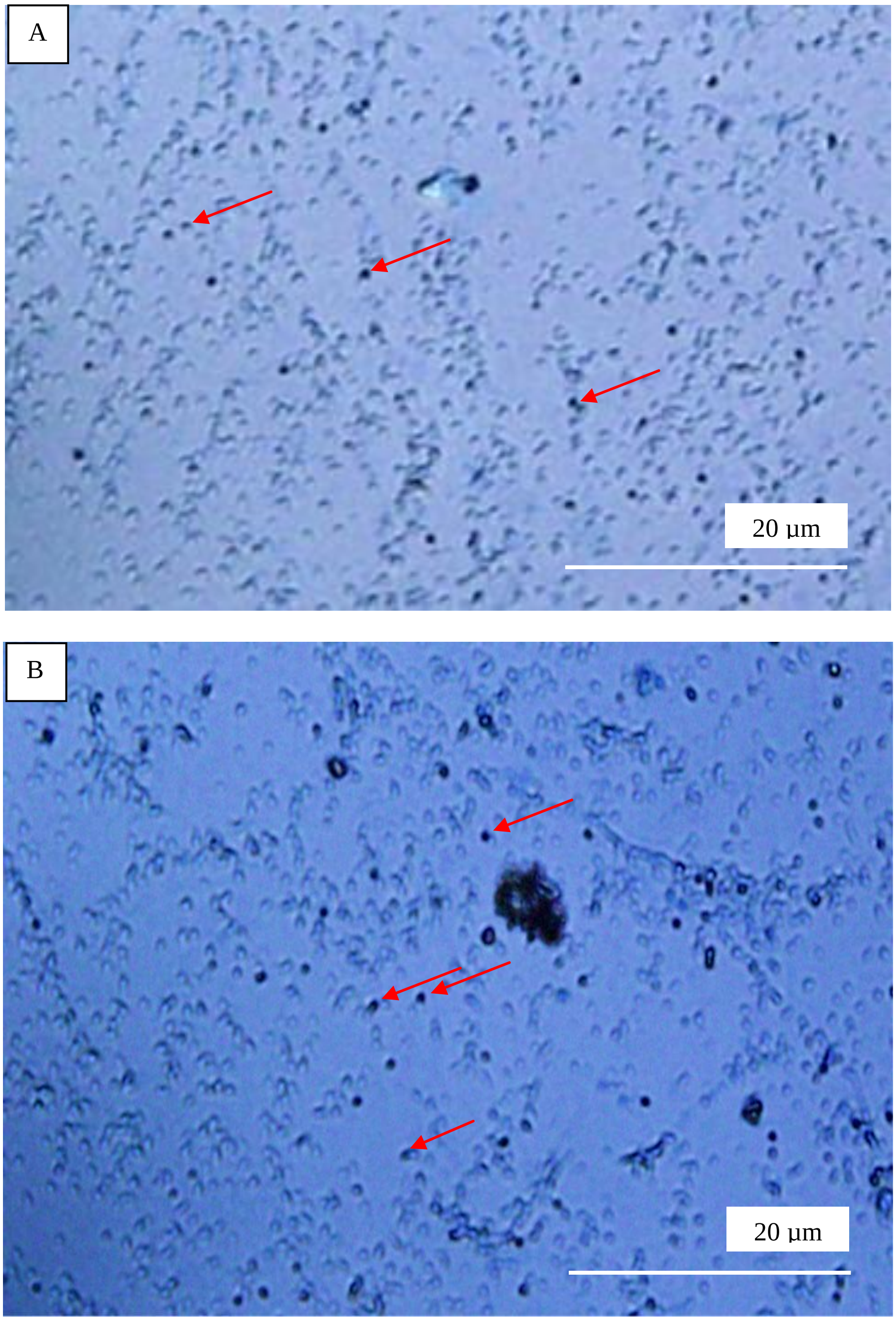
3.4 การคัดเลือกเชื้อขั้นที่ 3

รูปที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์การลดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อภายใต้ทั้ง 2 สภาวะที่เวลา 7 วันของการเลี้ยง โดยใช้ PNSB ที่คัดเลือกได้ทั้ง 2 ไอโซเลท (W12 and W48) ทั้งนี้ ไอโซเลท W12 แสดงเปอร์เซ็นต์การลดฟอสฟอรัสสูงสุด คือ 56.69 ± 0.17% ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสงตามด้วยไอโซเลท W48 สามารถลดฟอสฟอรัสได้ 55.00 ± 0.04% ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย -มีแสง และ 52.14 ± 0.40% ภายใต้สภาวะมีอากาศ -ไร้แสง แต่ทั้งนี้ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ในขณะที่เชื้อไอโซเลท W12 สามารถลดฟอสฟอรัสได้ต่ำสุด คือ 45.67 ± 1.06% ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย -มีแสง ทั้งนี้ ในชุดควบคุมปราศจากเชื้อ (abiotic control) พบการหายไปของฟอสฟอรัสเล็กน้อย (2.54 ± 0.06% และ 3.28 ± 0.06% ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย -มีแสง และสภาวะมีอากาศ -ไร้แสง ตามลำดับ) นอกจากนี้ ค่า pH เพิ่มขึ้นอย่างมาก จาก 6.90 เป็น 8.22 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง รวมทั้งในชุดควบคุม ปราศจากเชื้อ ดังนั้น จากผลการศึกษาจึงยังคงคัดเลือก PNSB ทั้ง 2 ไอโซเลทซึ่งได้แก่ W12 และ W48 โดยแยกได้จากตัวอย่างน้ำเลี้ยงกุ้งจากอำเภอเมือง จังหวัดพังงา และอำเภอเทพา จังหวัดสงขลา ตามลำดับ เพื่อนำไปใช้เป็นเชื้อผสมในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการลดฟอสฟอรัสต่อไป



รูปที่ 3 ประสิทธิภาพการลดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อภายใต้สภาวะมีอากาศไร้แสงและสภาวะมีอากาศเล็กน้อยมีแสงเป็นเวลา 7 วัน โดย PNSB ที่คัดเลือกได้ โดยตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันบนกราฟแท่งแสดงความแตกต่างระหว่างชุดการทดลอง 3 ชุด (ชุดควบคุม, ชุดการทดลองที่ใส่เชื้อ W12 และ W48); ขณะที่ความแตกต่างของอักษรพิมพ์เล็กแสดงความแตกต่างระหว่าง 2 สภาวะในแต่ละชุดการทดลอง คือ ชุดควบคุม (abiotic ปราศจากเชื้อ) และชุดการทดลองที่ $p < 0.05$

เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำตัวเซลล์ไปย้อมสีด้วย Methylene blue เพื่อติดตาม poly-p ที่สะสมภายในเซลล์ โดย Methylene blue มีความจำเพาะกับ poly-p และติดสีม่วงอมชมพู และตัวเซลล์ติดสีฟ้าอ่อน ดังแสดงใน รูปที่ 4 ทั้งนี้ เซลล์ที่ย้อมในสภาวะมีอากาศ-ไร้แสง และมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง ไม่มีความแตกต่างกัน



รูปที่ 4 การย้อม polyphosphate ด้วยสี methylene blue ของ PNSB 2 ไอโซเลท (A) W12 และ (B) W48 ที่บ่มในสภาวะมีอากาศไร้แสง โดยหัวลูกศรแสดง poly-p ภายในเซลล์

จากผลการศึกษาการคัดเลือกเชื้อทั้ง 3 ขั้นตอน พบว่า ไอโซเลท PNSB ที่คัดแยกได้สามารถเจริญในน้ำเลี้ยงกุ้ง แม้ว่าการเจริญไม่สูง (รูปที่ 2) ทั้งนี้ อาจเนื่องจากการมีธาตุอาหารอยู่น้อยในน้ำเลี้ยง แต่อย่างไรก็ตาม ไอโซเลทดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในบ่อเลี้ยงกุ้ง ได้ โดยทั้ง 2 ไอโซเลทมีประสิทธิภาพค่อนข้างสูงในการลดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้งโดย ยังไม่มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (รูปที่ 3) และเมื่อบ่มเชื้อในสภาวะมีอากาศ-ไร้แสง พบว่าประสิทธิภาพการลดฟอสฟอรัสสูงกว่าการบ่มเชื้อในสภาวะมีแสง-มีอากาศเล็กน้อย อาจเนื่องจากเชื้อชอบสภาวะ chemoorganotroph โดยใช้สารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน และใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย (Kantachote et al., 2005; Liang et al., 2010; Nunkaew, Kantachote, Nitoda, & Kanzaki, 2012) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยเกี่ยวกับการนำ PNSB มาใช้ในการลดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงบ่อกุ้งยังมีจำนวนน้อย ดังนั้นจึงยกตัวอย่างผลงานวิจัยอื่นที่เกี่ยวข้องในการบำบัดโดยใช้ PNSB เช่น ผลการวิจัยของ (Takeno, Sasaki, Watanabe, Kaneyasu & Nishio, 1999) ซึ่งรายงานความสามารถของ *Rhodobacter sphaeroides* IL106 ในการลดฟอสฟอรัสในน้ำทิ้งจากฟาร์มหอยนางรมได้เพียง 10% หลังจากใช้เชื้อบำบัดเป็นเวลา 7 วัน อย่างไรก็ตาม งานวิจัยของ (Hülsen et al., 2014) ได้มีการปรับสภาวะที่เหมาะสมและกระตุ้นการเจริญโดยใช้รังสีอินฟาเรด พบว่า หลังการบำบัดโดยใช้เชื้อ PNSB เป็นเวลา 24 ชม. สามารถลดฟอสฟอรัสในน้ำทิ้งอุตสาหกรรมและน้ำทิ้งครัวเรือนได้สูงถึง 88% ขณะที่งานวิจัยนี้แสดงประสิทธิภาพการลดฟอสฟอรัสโดย PNSB ค่อนข้างต่ำ อาจเนื่องจากในน้ำเลี้ยงกุ้งมีธาตุอาหารน้อยกว่าน้ำเสียอื่น อีกทั้งไม่ได้ทำการปรับสภาวะใดใดนั่นเอง

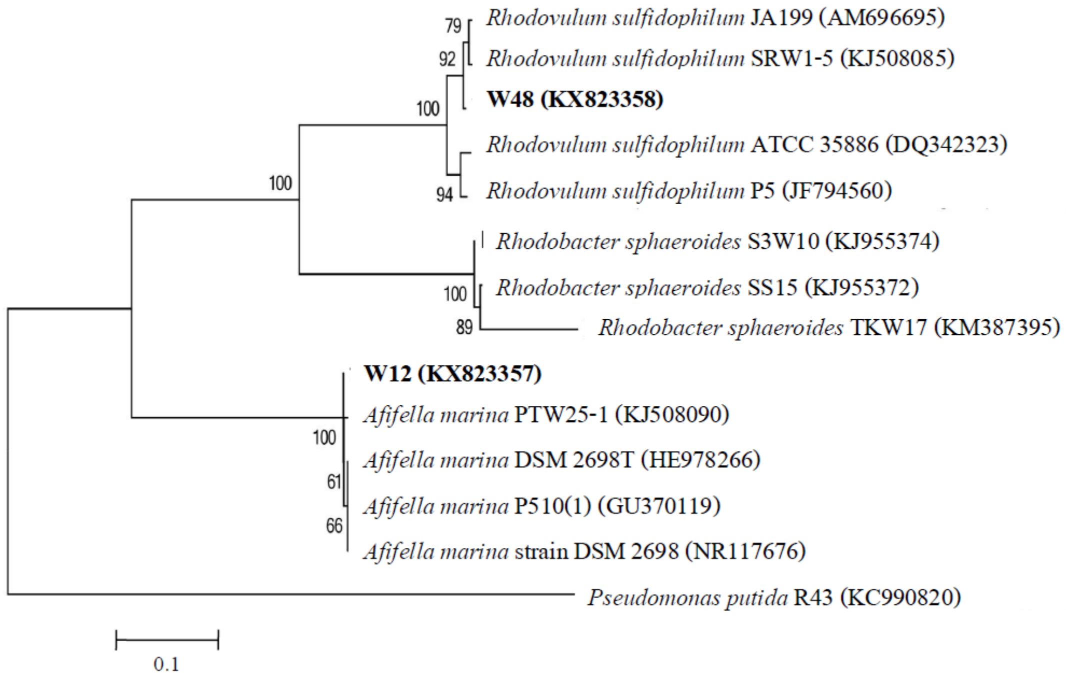
เป็นที่น่าสนใจว่าเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกสามารถลดฟอสฟอรัสได้ปริมาณพอสมควรโดยไม่แสดงการเจริญที่สูง ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ถูกเลี้ยงในอาหาร GA ซึ่งมีธาตุอาหารสูงก่อนถูกนำมาเลี้ยงในน้ำเลี้ยงกุ้งซึ่งมีธาตุอาหารน้อยกว่า ทำให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำเข้าสู่สภาวะการอดอยาก และตอบสนองโดยลดการเจริญและเพิ่มการสะสม poly-p เพื่อเป็นแหล่งพลังงานภายในเซลล์ (Ault-Riché, Fraley, Tzeng, & Kornberg, 1998; Liang et al., 2010) ผลการทดลองทั้งหมดระบุว่า PNSB ที่คัดเลือกได้ สามารถลดฟอสฟอรัสจากสิ่งแวดล้อมแล้วสามารถนำมาสะสมในรูปแบบ poly-p (รูปที่ 4; Hülsen et al., 2014; Liang et al., 2010) อย่างไรก็ตาม การตรวจจับ poly-p โดยใช้การย้อมสีด้วย Methylene blue ไม่สามารถแสดงแกรนูล poly-p ที่ชัดเจน เนื่องด้วยผลของสารอินทรีย์จำนวนมากในน้ำเลี้ยงกุ้ง ดังรูปที่ 4

หลังสิ้นสุดการทดลอง พบว่า pH เพิ่มขึ้นจาก 7.0 เป็น 8.2 โดยประมาณ ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกุ้ง โดยค่า pH ที่เพิ่มขึ้นในระบบการบำบัดอาจเกิดจาก การนำฟอสฟอรัสเข้าสู่เซลล์ (Serralta, Ferrer, Borras, & Seco, 2006) และการลดลงของสารอินทรีย์ที่

ละลายอยู่ในน้ำ โดยกระบวนการ ammonification รวมทั้งความสามารถของ PNSB ในการนำ CO_2 เข้าไปใช้ภายในเซลล์ (Cohen & Kirchmann, 2004; Hülsen et al., 2014; Kantachote et al., 2005) ทั้งนี้ ระดับ pH ที่สูงสามารถทำให้ฟอสเฟตตกตะกอนเป็นแคลเซียมฟอสเฟต หรือ แมงกานีสฟอสเฟตที่ไม่ละลายน้ำ (Cohen & Kirchmann, 2004) ซึ่งเป็นกระบวนการทางเคมีอย่างหนึ่งที่ช่วยลดฟอสฟอรัสในแหล่งน้ำธรรมชาติ ตามที่พบการลดลงของฟอสฟอรัสเล็กน้อยใน ชุดควบคุมปราศจากเชื้อ

4. การเทียบเคียงเชื้อกลุ่ม purple non-sulfur bacteria

จากผลการเทียบเคียงโดยใช้ 16S rDNA sequence กับฐานข้อมูลใน NCBI Gene Bank และผลการสร้าง phylogenetic tree โดย MEGA 6 (รูปที่ 5) ระบุว่า เชื้อ PNSB ที่คัดเลือกได้ทั้ง 2 ไอโซเลทได้แก่ W12 (accession numbers KX823357) และ W48 (accession numbers KX823358) มีความคล้ายคลึงกับ *Afifella marina* PTW25-1 และ *Rhodovulum sulfidophilum* SRW1-5 ที่ความคล้ายคลึง 100 และ 99% ตามลำดับ



รูปที่ 5 แผนภูมิต้นไม้ไฟโลเจเนติก ของไอโซเลท W12 and W48 โดยใช้วิธีหาระยะห่างแบบ Neighbour-joining (NJ) ด้วย MEGA software package 6.0 เทียบกับไอโซเลทอ้างอิงโดยใช้ลำดับเบส 16S rDNA และประเมินความน่าเชื่อถือของกิ่งด้วยวิธี bootstrap analysis

5. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดฟอสฟอรัสด้วย Response surface methodology (RSM)

5.1 ผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย CCD

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อผสม ระหว่าง *A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 (อัตราส่วน 1: 1) ในการกำจัดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้ง โดยการออกแบบชุดทดลองด้วย CCD แสดงดังตารางที่ 10 แล้ววิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 11 โดยใช้โมเดลที่เหมาะสม สำหรับข้อมูลแต่ละชุด ได้แก่ โมเดลคูบิกและควอดราติก สามารถสร้างสมการความสัมพันธ์ของปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย ซึ่งได้แก่ ปริมาณกล้าเชื้อ (X_1) pH เริ่มต้น (X_2) และความเค็ม (X_3) ต่อผลการลดฟอสฟอรัส (Y_P) ภายใต้สภาวะไร้แสง-มีอากาศ และสภาวะมีแสง-มีอากาศเล็กน้อย ทั้งนี้ ค่านัยสำคัญทางสถิติของสมการโมเดลสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยค่า *F*-test โดยค่า *F*-values ที่สูงจะสามารถอธิบายความหลากหลายของข้อมูลอย่างเพียงพอและเป็นจริง และจากสมการการลดฟอสฟอรัส ภายใต้สภาวะไร้แสง-มีอากาศ (สมการที่ 3) และการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนดังตารางที่ 11 พบว่า โมเดลมีค่า *F-value* เท่ากับ 9.91 ชี้ให้เห็นว่าโมเดลมีนัยสำคัญ และค่าความแปรปรวน (ANOVA) ของ Cubic model พบว่า มีค่าสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > F = 0.005$) นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาค่า Lack of fit *F*-value ของโมเดล พบว่า มีค่า 1.29 ซึ่งระบุถึงการไม่มีความสัมพันธ์กับค่า pure error อย่างมีนัยสำคัญโดยมีโอกาส 30.75% ที่ Lack of Fit *F*-value นี้จะเกิดขึ้นจากการรบกวน นอกจากนี้ ค่า lack of fit ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.3075 จึงคาดว่าโมเดลมีความ เหมาะสมกับการทดลองนี้ อีกทั้งค่า coefficients of variation (R^2) ซึ่งมีค่า 0.9555 แสดงว่า ค่าที่ทำการทดลองและค่าที่ทำนายจากโมเดลมีความใกล้เคียงกันมาก แม้ค่า adjusted R^2 มีค่า 0.8591 ดังนั้น สมการ ที่ 3 จึงมีความเหมาะสมในการทำนายการลดฟอสฟอรัส และสามารถนำโมเดลของการลดฟอสฟอรัสในสภาวะไร้แสง-มีอากาศไปใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยต่อการลดฟอสฟอรัสต่อไป

$$Y_P = 13.18 - 1.22X_1 - 16.25X_2 + 5.15\,X_3 + 2.92\,X_1^2 - 2.80\,X_2^2 - 2.31\,X_3^2 + 5.56\,X_1X_2 - 4.43\,X_1X_3 + 6.68\,X_2X_3 + 3.77\,X_1^3 + 4.01\,X_2^3 - 3.72\,X_3^3 - 3.68\,X_1\,X_2\,X_3 \quad \text{(สมการที่ 3)}$$

ขณะที่สมการการลดฟอสฟอรัส ภายใต้สภาวะมีแสง-มีอากาศเล็กน้อย แสดงดังสมการที่ 4 และการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนดังตารางที่ 11 พบว่าโมเดลควอดราติกมีค่า *F*-value เท่ากับ 5.00 ชี้ให้เห็นว่า โมเดลมีนัยสำคัญ และค่าความแปรปรวน (ANOVA) ของ Quadratic model พบว่า โมเดลมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > F < 0.05$) และค่า R^2 มีค่าสูงเท่ากับ 0.8180 แต่อย่างไรก็ตาม

ค่า Lack of fit มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า < 0.0001 แสดงว่า โมเดลไม่มีความเหมาะสมกับการทดลอง ดังนั้น จึงไม่นำโมเดลของการลดฟอสฟอรัสในสภาวะมีแสง-มีอากาศเล็กน้อยมาพิจารณาในการทดลอง

$$Y_P = -123.49 + 7.90X_1 + 1.33\,X_2 - 0.062\,X_3 + 26.28\,X_1^2 + 52.41\,X_2^2 + 20.04\,X_3^2 + 4.08\,X_1\,X_2 - 5.39\,X_1X_3 + 0.61\,X_2\,X_3 \quad \text{(สมการที่ 4)}$$

ตารางที่ 10 ผลการออกแบบการทดลองโดยใช้ CCD ในการลดฟอสฟอรัส หลังการบำบัดน้ำเลี้ยงกุ้งโดยใช้เชื้อผสม *A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 ที่อัตราส่วน 1: 1 ภายใต้สภาวะไร้แสง-มีอากาศ และสภาวะมีแสง-มีอากาศเล็กน้อย เป็นเวลา 48 ชม.

Standard order	Run no.	%Inoculum (X_1)	pH (X_2)	%Salinity (X_3)	Phosphorus removal (%)			
					Aerobic-dark†		Microaerobic-light*	
					Actual	Predicted	Actual	Predicted
1	17	2.00	6.00	1.00	32.00	30.75	-19.96	-34.64
2	10	5.00	6.00	1.00	27.45	26.20	1.47	-16.22
3	4	2.00	8.00	1.00	-24.32	-25.57	-14.19	-41.37
4	20	5.00	8.00	1.00	8.11	6.86	10.81	-6.63
5	8	2.00	6.00	3.00	23.00	21.75	3.08	-25.22
6	14	5.00	6.00	3.00	15.48	14.23	-9.79	-28.34
7	9	2.00	8.00	3.00	8.11	6.86	-1.46	-29.50
8	18	5.00	8.00	3.00	8.11	6.86	14.76	-16.30
9	15	0.98	7.00	2.00	3.80	5.57	-98.81	-62.47
10	2	6.02	7.00	2.00	35.51	37.28	-64.23	-35.89
11	5	3.50	5.32	2.00	11.76	13.53	-2.57	22.50
12	12	3.50	8.68	2.00	-4.76	-2.99	-12.66	26.96
13	7	3.50	7.00	0.32	13.92	15.69	-90.45	-66.72
14	16	3.50	7.00	3.68	-4.15	-2.38	-107.88	-66.93
15	13	3.50	7.00	2.00	15.32	13.18	-118.60	-123.49
16	3	3.50	7.00	2.00	6.49	13.18	-123.18	-123.49
17	19	3.50	7.00	2.00	14.45	13.18	-122.30	-123.49
18	1	3.50	7.00	2.00	12.61	13.18	-122.19	-123.49
19	6	3.50	7.00	2.00	9.91	13.18	-121.40	-123.49
20	11	3.50	7.00	2.00	20.89	13.18	-122.20	-123.49

† = Cubic model   * = Quadratic model   - = ค่าการเพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของโมเดล สำหรับค่าการลดฟอสฟอรัส ในน้ำเลี้ยงกุ้งจากการใช้เชื้อผสม (*A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48) อัตราส่วน 1:1 ภายใต้สภาวะไร้แสง-มีอากาศ และสภาวะมีแสง-มีอากาศเล็กน้อย เป็นเวลา 48 ชม.

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F-Value	Prob > F	R^2	Adj R^2
Aerobic-dark condition†							
Model	3278.87	13	252.22	9.91	0.0050	0.9555	0.8591
Residual	152.63	6	25.44				
Lack of Fit	31.30	1	31.30	1.29	0.3075	not significant	
Pure Error	121.33	5	24.27				
Corrected total	3431.50	19					
Microaerobic-light condition*							
Model	49739.23	9	5526.58	5.00	0.0096	0.8180	0.6543
Residual	11063.81	10	1106.38				
Lack of Fit	11051.09	5	2210.22	868.92	< 0.0001	significant	
Pure Error	12.72	5	2.54				
Cor Total	60803.04	19					

† = Cubic model * = Quadratic model

นอกจากนี้ได้ทำการวัดผลการลดไนเตรทจากชุดการทดลองเดียวกัน สามารถสร้างสมการการลดไนเตรท (Y_N) ภายใต้สภาวะไร้แสง-มีอากาศ (สมการที่ 5) และผลการ ลดไนเตรทของทั้ง 20 ชุดการทดลองแสดง ดังตารางที่ 12 และค่าความแปรปรวน (ANOVA) แสดงดังตารางที่ 13 จากสมการ โมเดลคูบิกมีค่า *F-value* เท่ากับ 4.08 ซึ่งระบุได้ว่าโมเดลมีนัยสำคัญ สำหรับค่า ANOVA แสดงค่า $P > F$ มีค่าน้อยกว่า 0.05 ชี้ให้เห็นว่า Cubic model มีนัยสำคัญ นอกจากนี้ ค่า coefficients of variation (R^2) ซึ่งมีค่าสูงถึง 0.8984 แต่ค่า adjusted R^2มีค่าแตกต่างกันมากซึ่งมีค่าเพียง 0.6783 และเมื่อพิจารณาค่า Lack of fit *F*-value ของโมเดล ซึ่งมีค่า 68.33 และพบการมีนัยสำคัญของ Lack of fit ($P > F = 0.0004$) แสดงว่าโมเดลไม่มีความ เหมาะสมกับการทดลองนี้ดังนั้น จึงไม่นำโมเดลของการลดไนเตรทภายใต้สภาวะไร้แสง-มีอากาศ มาพิจารณาในการทดลอง

$$Y_N = 34.29 + 25.65X_1 + 55.05X_2 - 15.52X_3 - 6.24X_1^2 - 3.08X_2^2 -14.18X_3^2 -10.76X_1X_2 - 2.98X_1X_3 + 0.068X_2X_3 -13.45X_1^3 - 22.36X_2^3 + 1.37X_3^3 + 15.12X_1 X_2 X_3 \quad \text{(สมการที่ 5)}$$

ขณะที่การศึกษาการลดไนเตรทภายใต้สภาวะมีแสง-มีอากาศเล็กน้อย สามารถสร้างสมการได้ดังสมการที่ 6 ผลการลดไนเตรทจาก 20 ชุดการทดลองแสดง ดังตารางที่ 12 และค่าความแปรปรวน (ANOVA) แสดงดังตารางที่ 13 จากสมการ โมเดลมีค่า *F-value* เท่ากับ 1.54 ซึ่งระบุได้ว่าโมเดลไม่มีนัยสำคัญ อีกทั้งค่า $P > F$ มีค่ามากกว่า 0.05 ชี้ให้เห็นว่า Cubic model ไม่มีนัยสำคัญ และค่า Lack of fit *F*-value ของโมเดล ซึ่งมีค่า 262.69 ระบุว่า สมการนี้ขาดความเหมาะสมอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ อีกทั้งค่า R^2และค่า adjusted R^2 มีค่าต่ำและแตกต่างกันมาก (0.7699 และ 0.2714 ตามลำดับ) ดังนั้น จึงไม่นำโมเดลของการลดไนเตรทภายใต้สภาวะไร้แสง-มีอากาศ มาพิจารณาในการทดลอง

$$Y_N = 21.93 + 0.085X_1 + 65.38X_2 - 4.91X_3 - 19.95X_1^2 + 2.58X_2^2 - 7.32X_3^2 - 0.20X_1X_2 - 0.55X_1X_3 + 7.68X_2X_3 + 0.27X_1^3 - 23.06X_2^3 + 0.085X_3^3 - 2.87X_1 X_2 X_3 \quad \text{(สมการที่ 6)}$$

ตารางที่ 12 การใช้ CCD ด้วย cubic model แสดงค่าจริงและค่าทำนายของการ ลดไนเตรท หลังการบำบัดน้ำเลี้ยงกุ้งโดยใช้เชื้อ *A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 (อัตราส่วน 1:1) ภายใต้สภาวะไร้แสง-มีอากาศ และสภาวะมีแสง-มีอากาศเล็กน้อย เป็นเวลา 48 ชม.

Standard order	Run no.	%Inoculum (X_1)	pH (X_2)	%Salinity (X_3)	Nitrate removal (%)			
					Aerobic-dark		Microaerobic-light	
					Actual	Predicted	Actual	Predicted
1	17	2.00	6.00	1.00	-58.86	-48.74	-48.64	-30.81
2	10	5.00	6.00	1.00	23.27	33.38	-52.16	-34.33
3	4	2.00	8.00	1.00	58.16	68.28	15.31	33.13
4	20	5.00	8.00	1.00	36.73	46.85	22.45	40.27
5	8	2.00	6.00	3.00	-51.08	-40.97	-78.29	-60.47
6	14	5.00	6.00	3.00	-41.38	-31.27	-72.54	-54.72
7	9	2.00	8.00	3.00	5.71	15.83	27.86	45.68
8	18	5.00	8.00	3.00	32.86	42.97	21.32	39.15
9	15	0.98	7.00	2.00	51.80	37.50	-10.71	-35.92
10	2	6.02	7.00	2.00	10.07	-4.23	-7.86	-33.06
11	5	3.50	5.32	2.00	53.68	39.38	54.17	28.96
12	12	3.50	8.68	2.00	26.09	11.79	54.68	29.47
13	7	3.50	7.00	0.32	28.06	13.76	34.29	9.08
14	16	3.50	7.00	3.68	-11.09	-25.39	18.57	-6.63
15	13	3.50	7.00	2.00	35.78	34.29	15.45	21.93
16	3	3.50	7.00	2.00	33.56	34.29	16.35	21.93
17	19	3.50	7.00	2.00	32.49	34.29	23.86	21.93
18	1	3.50	7.00	2.00	31.43	34.29	18.57	21.93
19	6	3.50	7.00	2.00	42.12	34.29	20.24	21.93
20	11	3.50	7.00	2.00	25.43	34.29	28.46	21.93

- = ค่าการเพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของ cubic models สำหรับค่าการลดไนเตรท จากการใช้เชื้อผสม (*A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 อัตราส่วน 1:1) ภายใต้สภาวะไร้แสง-มีอากาศ และสภาวะมีแสง-มีอากาศเล็กน้อย เป็นเวลา 48 ชม.

Source	Sum of squares	DF	Mean square	*F*-Value	Prob > F	R^2	Adj R^2
Aerobic dark condition							
Model	19444.07	13	1495.70	4.08	0.0471	0.8984	0.6783
Residual	2198.92	6	366.49				
Lack of Fit	2048.98	1	2048.98	68.33	0.0004	significant	
Pure Error	149.94	5	29.99				
Cor Total	21642.99	19					
Microaerobic light condition							
Model	21706.56	13	1669.74	1.54	0.3081	0.7699	0.2714
Residual	6487.02	6	1081.17				
Lack of Fit	6365.85	1	6365.85	262.69	< 0.0001	significant	
Pure Error	121.17	5	24.23				
Cor Total	28193.58	19					

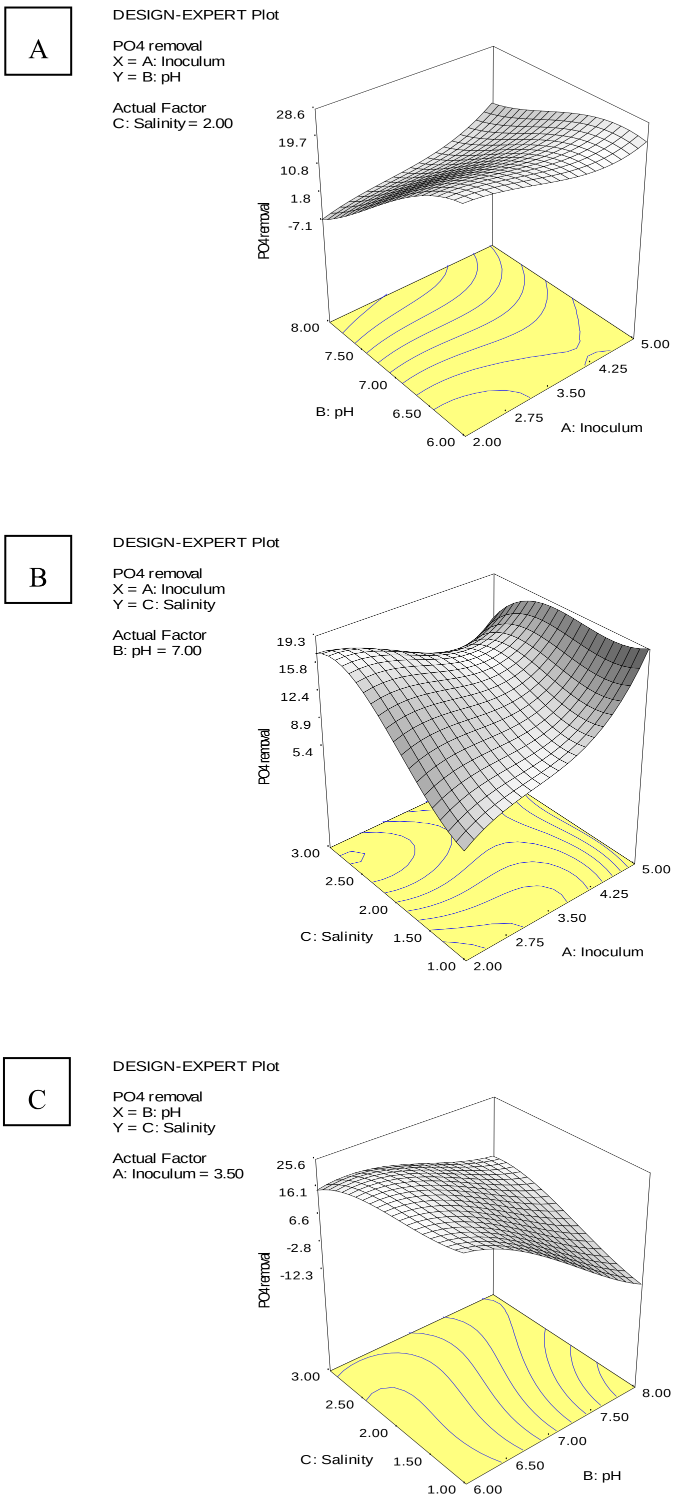
จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้น ชี้ชัดว่าโมเดลของการลดฟอสฟอรัสในสภาวะไร้แสง-มีอากาศ มีความเหมาะสมกับชุดข้อมูล จึงนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัยต่อการลดฟอสฟอรัสแสดงดัง ตารางที่ 14 และ กราฟสามมิติที่สร้างจากโปรแกรม Design-Expert ดังรูปที่ 6

ตารางที่ 14 ค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรปรวน และ *P*-values ที่สอดคล้องกัน ของการลดฟอสฟอรัสภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง เป็นเวลา 48 ชม. หลังการเติมกล้าเชื้อผสม

Term	Phosphorus removal (%)	
	Coefficient	*P*-value
Constant	13.1769	0.005**
Inoculum (X_1)	-1.2203	0.6976
pH (X_2)	-16.2484	0.0845
Salinity (X_3)	5.1539	0.0361*
Inoculum × pH	5.5632	0.0096**
Inoculum × Salinity	-4.4259	0.0179*
pH × Salinity	6.6759	0.0052**

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$.



รูปที่ 6 3D Response Surface แสดงผลของ 3 ปัจจัย ได้แก่ เปอร์เซ็นต์กล้าเชื้อ pH เริ่มต้นและความเค็ม ต่อเปอร์เซ็นต์การลดฟอสฟอรัส ภายใต้สภาวะไร้แสง-มีอากาศ โดยแต่ละกราฟแสดงผลความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย โดยปัจจัยที่ 3 กำหนดเป็นค่ากลางนั้นๆ ตามตารางที่ 5

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัย ดังตารางที่ 14 พบว่า ความเค็มเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลโดยตรงต่อการลดฟอสฟอรัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ขณะที่ปริมาณกล้าเชื้อ หรือ pH เริ่มต้น ไม่ได้ส่งผลโดยตรงต่อการลดฟอสฟอรัสอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของ 2 ปัจจัยร่วมกันต่อการลดฟอสฟอรัส พบว่า ปัจจัยร่วมระหว่างปริมาณกล้าเชื้อและ pH มีผลต่อการลดฟอสฟอรัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) รวมถึงปัจจัยร่วมระหว่างปริมาณกล้าเชื้อและความเค็ม สามารถส่งผลต่อการลดฟอสฟอรัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ ปัจจัยร่วมระหว่าง pH และความเค็ม มีความสัมพันธ์กับการลดฟอสฟอรัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เช่นกัน สำหรับการวิเคราะห์กราฟสามมิติที่สร้างจากโปรแกรม Design-Expert ดังรูปที่ 6 สามารถแสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัยต่อการลดฟอสฟอรัสพบว่า การลดฟอสฟอรัสมีประสิทธิภาพสูงขึ้นเมื่อมีความเค็ม เพิ่มสูง (รูปที่ 6B) และ pH ต่ำ (รูปที่ 6A, C) ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของ *A. marina* และ *R. sulfidophilum* ที่ต้องอาศัยสภาวะที่มีเกลือในการเจริญ (Hiraishi & Ueda, 1994; Johannes F. Imhoff, 1983) จากงานวิจัยก่อนหน้าของ Mukkata และคณะ (2015) พบว่า *A. marina* และ *R. sulfidophilum* สามารถแยกได้จากบ่อกุ้งที่มีความเค็ม 3.5% และเจริญได้ในสภาวะที่มีความเค็มสูง 4% อีกทั้งสามารถทนความเค็มได้สูงถึง 10% ขณะเดียวกันสภาวะ pH ต่ำส่งผลให้เกิดการนำฟอสฟอรัสเข้าสะสมภายในเซลล์แบคทีเรียมากขึ้น ดังรายงานงานวิจัยของ Serralta และคณะ (2006) ที่ศึกษาผลของ pH ต่อการลดฟอสฟอรัสในสภาวะมีอากาศพบว่า เมื่อ pH เพิ่มสูงขึ้นทำให้อัตราการนำฟอสฟอรัสเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียที่สะสม poly-p (PAO) ลดลง และหาก pH สูงกว่า 8.2–8.25 ส่งผลให้อัตราการนำฟอสฟอรัสเข้าสู่เซลล์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด

ผลการวิเคราะห์ด้วย CCD โดยใช้พารามิเตอร์ได้แก่ ปริมาณกล้าเชื้อ pH เริ่มต้น และความเค็มในช่วงที่กำหนด สามารถแสดงสภาวะที่คาดว่าสามารถลดฟอสฟอรัสและไนเตรทได้สูงสุดแสดงใน ตารางที่ 15 และ 16 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาค่าความพึงพอใจ (Desirability = 1) ของข้อมูล สามารถสรุปช่วงของสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ปริมาณกล้าเชื้อ 4 - 6% pH 7.0 - 7.5 และความเค็ม 1.2- 2.5%

ตารางที่ 15 การกำหนดปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการลดฟอสฟอรัสภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง

Factor	Goal	Lower limit	Upper limit	Lower weight	Upper weight
Inoculum	is in range	0.98	6.02	1	1
pH	is in range	6	8	1	1
Salinity	is in range	1	3	1	1
P removal	maximize	-24.32	35.51	1	1

Solutions

Number	Inoculum	pH	Salinity	P removal	Desirability
1	6.02	7.19	1.81	36.17	1.00
2	5.99	6.73	1.20	40.32	1.00
3	5.93	6.99	1.44	36.03	1.00
4	1.95	6.00	1.00	30.76	0.92
5	1.96	6.00	1.00	30.74	0.92
6	1.94	6.00	1.00	30.74	0.92
7	2.12	6.00	1.00	30.66	0.92
8	1.83	6.00	1.01	30.65	0.92
9	1.90	6.00	1.02	30.61	0.92
10	1.61	6.00	1.00	30.26	0.91

ตารางที่ 16 การกำหนดปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการลดไนเตรท ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง

Factor	Goal	Lower limit	Upper limit	Lower weight	Upper weight
Inoculum	is in range	0.98	6.02	1	1
pH	is in range	6.00	8.00	1	1
Salinity	is in range	1.00	3.00	1	1
NO_3^- removal	maximize	-58.86	58.16	1	1

Solutions

Number	Inoculum	pH	Salinity	Nitrate removal	Desirability
1	4.28	7.56	1.36	68.77	1.00
2	4.54	7.95	2.48	61.19	1.00
3	3.52	7.43	1.57	59.85	1.00
4	4.13	7.28	1.46	60.01	1.00
5	4.40	7.52	1.98	65.94	1.00
6	4.99	7.55	1.53	61.68	1.00
7	4.61	7.32	1.62	61.62	1.00
8	4.16	7.76	2.35	63.96	1.00
9	4.64	7.35	1.16	60.08	1.00
10	5.01	6.00	1.00	33.39	0.79

5.2 การยืนยันผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย CCD

5.2.1 การยืนยันผลครั้งที่ 1

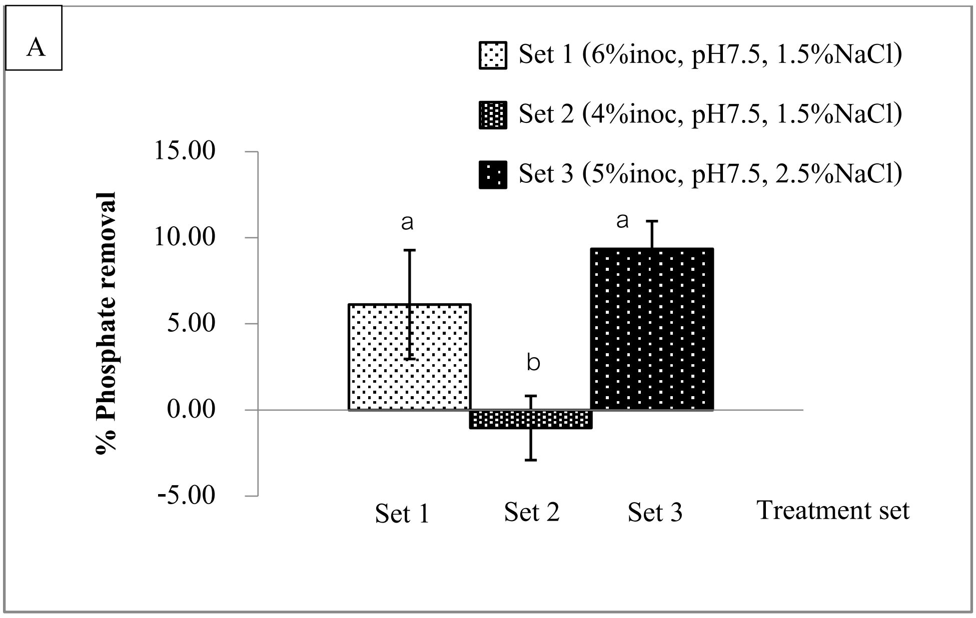
จากผลการออกแบบเพื่อหาสภาวะของปัจจัยในการลดฟอสฟอรัสและไนเตรทโดยใช้ CCD พบช่วงสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ปริมาณกล้าเชื้อ 4 - 6% pH เริ่มต้น 7.0 - 7.5 และความเค็ม 1.2- 2.5% นั้น เมื่อพิจารณาร่วมกับต้นทุนในการบำบัด และความสามารถของเชื้อในการเจริญและลดฟอสฟอรัสได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีความเค็มสูง (รูปที่ 6B, C) และสภาวะการเจริญของกุ้ง จึงสามารถกำหนดสภาวะการทดลองได้ 3 ชุดการทดลอง ได้แก่

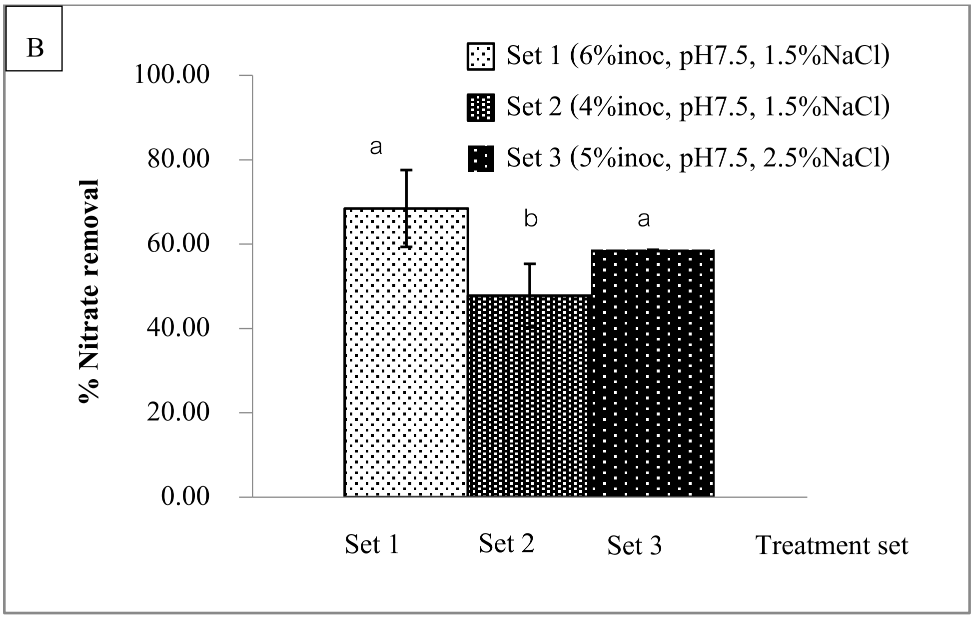
ชุดการทดลองที่ 1 ปริมาณกล้าเชื้อ 6% ความเป็นกรดด่าง 7.50 และความเค็ม 1.50%

ชุดการทดลองที่ 2 ปริมาณกล้าเชื้อ 4% ความเป็นกรดด่าง 7.50 และความเค็ม 1.50%

ชุดการทดลองที่ 3 ปริมาณกล้าเชื้อ 5% ความเป็นกรดด่าง 7.50 และความเค็ม 2.50%

โดยใส่เชื้อผสม (*A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48) อัตราส่วน 1 : 1 ตามสภาวะข้างต้นในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อ บ่มในสภาวะมีอากาศ ไร้แสงเป็นเวลา 4 วัน ผลการทดลองแสดงดัง รูปที่ 7 พบว่า ฟอสฟอรัสลดลงมากที่สุด 9.35 ± 1.62% เมื่อเลี้ยงเชื้อในชุดการทดลองที่ 3 (รูปที่ 7A) โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 5% pH เริ่มต้น7.50 และความเค็ม 2.50% รองลงมาคือ การเลี้ยงเชื้อในชุดการทดลองที่ 1 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 6% pH เริ่มต้น 7.50 และความเค็ม 1.50% และพบการเพิ่มขึ้นของฟอสฟอรัสเมื่อเลี้ยงเชื้อในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งใช้ปริมาณกล้าเชื้อต่ำสุด คือ 4% pH เริ่มต้น 7.50 และความเค็ม 1.50% ทั้งนี้ การที่เชื้อลดฟอสฟอรัสได้น้อยนั้น อาจเนื่องมาจากค่า pH ที่สูงคือ 7.5 ทำให้เชื้อเจริญได้น้อย และเมื่อใช้ ปริมาณกล้าเชื้อ ต่ำ จึงทำให้มีประสิทธิภาพลดลง และจากผลในการวิเคราะห์ด้วย RSM คาดว่า หากเลี้ยงเชื้อภายใต้ pH ประมาณ 7 จะทำให้ลดฟอสฟอรัสได้มากขึ้น ขณะที่สภาวะความเค็มที่สูง จะทำให้ลดฟอสฟอรัสได้ดียิ่งขึ้น





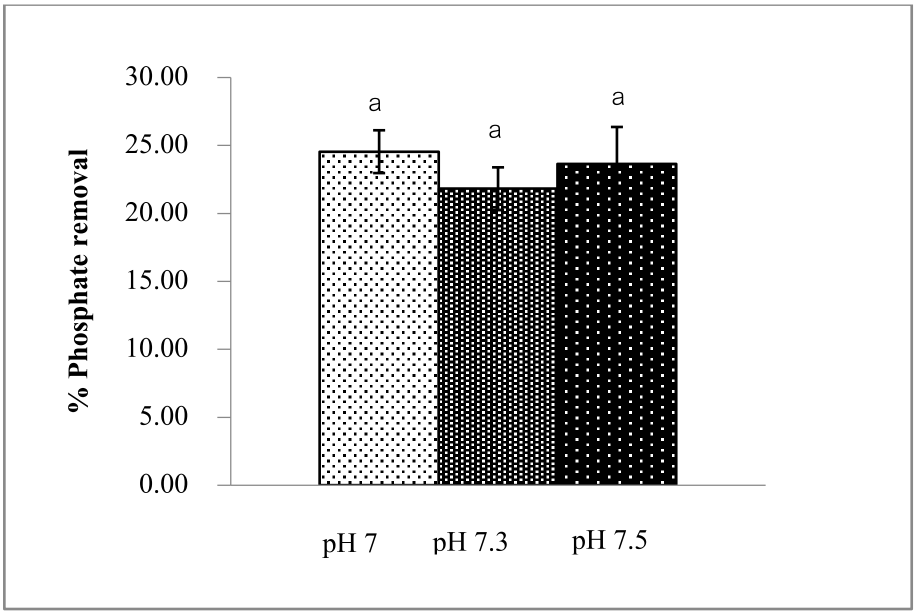
รูปที่ 7 ประสิทธิภาพการลด (A) ฟอสฟอรัส และ (B) ไนเตรท ในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อที่ไม่ได้ปรับสารอาหาร โดยใช้เชื้อผสม (*A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 อัตราส่วน 1:1) ใน 3 ชุดการทดลองที่แตกต่างกัน ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันบนกราฟแท่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ขณะที่ค่าเปอร์เซ็นต์ไนเตรทที่ลดลง (รูปที่ 7B) เป็นค่าโดยประมาณที่เชื้อสามารถลดได้ (เนื่องจากค่าไนเตรทที่เหลือมีค่าต่ำกว่าค่าที่สามารถวัดได้ จึงยึดค่าต่ำสุดที่วัดได้) พบว่า เชื้อสามารถลดไนเตรทได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงในชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งลดลงประมาณ 68.42% โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 6% ความเป็นกรดด่าง 7.50 และความเค็ม 1.50% รองลงมาได้แก่ คือ 58.62% ในชุดการทดลองที่ 3 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 5% ความเป็นกรดด่าง 7.50 และความเค็ม 2.50% และลดไนเตรทได้น้อยที่สุด คือ 47.83% ภายใต้ชุดการทดลองที่ 2 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 4% ความเป็นกรดด่าง 7.50 และความเค็ม 1.50%

เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองทั้งหมด พบว่า สภาวะการทดลองที่ลดฟอสฟอรัสและไนเตรทได้ดี และประหยัดต้นทุนในการบำบัดมากที่สุด ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 5% ความเป็นกรดด่าง 7.50 และความเค็ม 2.50%

5.2.2 การยืนยันผลครั้งที่ 2

เนื่องจากผลของปัจจัยต่อการลดฟอสฟอรัสแสดงให้เห็นว่า pH เริ่มต้นต่ำ ส่งผลให้ลดฟอสฟอรัสได้ดียิ่งขึ้น จึงกำหนดชุดการทดลองโดยปรับ pH เริ่มต้นเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 7.0 7.3 และ 7.5 ความเค็ม 2.50% ใส่กล้าเชื้อผสม ปริมาณ 5% ในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อปรับสภาพ (sCOD ประมาณ 100 มก./ล. ฟอสฟอรัสประมาณ 10 มก./ล.) บ่มในสภาวะมีอากาศ ไร้แสงเช่นเดิมเป็นเวลา 96 ชม. บันทึกผลการลดฟอสฟอรัสและไนเตรทเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง และผลการทดลองแสดงได้ดัง รูปที่ 8



รูปที่ 8 ประสิทธิภาพของการลดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้งปราศจากเชื้อปรับสภาพ (sCOD ประมาณ 100 มก./ล. และฟอสฟอรัสประมาณ 10 มก./ล.) โดยเชื้อผสม PNSB (*A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 อัตราส่วน 1:1) ที่ pH 3 ระดับ ได้แก่ pH 7.0 7.3 และ 7.5 โดยใช้กล้าเชื้อ 5% และความเค็ม 2.50% ภายใต้สภาวะมีอากาศ ไร้แสง เป็นเวลา 96 ชม.

ผลการทดลองดัง รูปที่ 8 พบว่า เชื้อผสมที่เลี้ยงในน้ำจากบ่อกุ้งโดยปรับ pH ทั้ง 3 ระดับ สามารถลดฟอสฟอรัสได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ pH 7.0, 7.3 และ 7.5 สามารถลดฟอสฟอรัสได้ 24.55 ± 1.57%, 23.64 ± 1.57% และ 21.82 ± 2.73% ตามลำดับ แต่เนื่องด้วยค่า pH ในบ่อกุ้งในรอบวันควรอยู่ระหว่าง 7.5 - 8.2 จึงเลือกใช้ pH 7.5 ในการทดลองต่อไป นอกจากนี้ การทดลองแสดงการลดฟอสฟอรัสได้สูงขึ้นประมาณสองเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับการยืนยันผลครั้งที่ 1 (รูปที่ 7A และ 8) อาจเนื่องจากได้ทำการปรับสภาพน้ำเลี้ยงกุ้งที่ใช้ในการทดลอง (sCOD ประมาณ 100 มก./ล. ฟอสฟอรัสประมาณ 10 มก./ล.) ขณะที่ค่าไนเตรทในการทดลองต่ำกว่าค่าที่สามารถตรวจวัดได้ จึงไม่ได้แสดงผล จึงจะทำการปรับไนเตรทให้อยู่ในเกณฑ์ที่วัดได้ ในการทดลองถัดไปโดยใช้ค่าเฉลี่ยที่พบได้ในน้ำทิ้งจากบ่อกุ้งทั่วไป

5.2.3 การยืนยันผลครั้งที่ 3

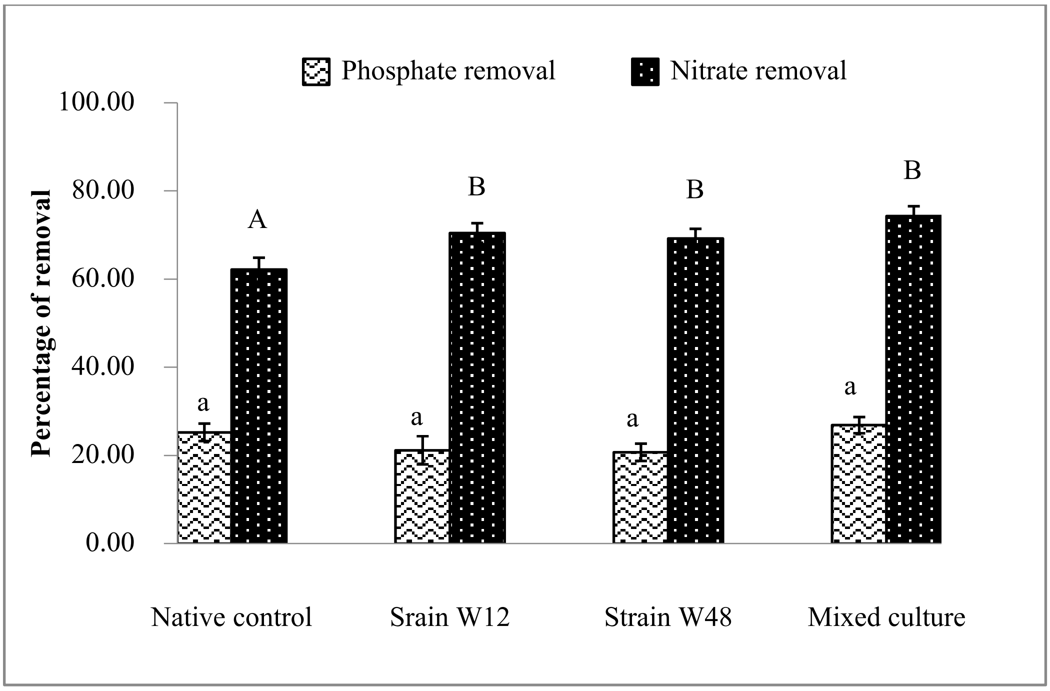
เพื่อให้สอดคล้องกับสภาพจริงของการบำบัดมากที่สุด จึงทำการเลี้ยงเชื้อ *A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 และเชื้อผสม (*A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 อัตราส่วน 1:1) ในน้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพที่เติมเชื้อ (treatment set) (sCOD ประมาณ 100 มก./ล.

ฟอสฟอรัสประมาณ 10 มก./ล. ไนเตรท ประมาณ 50 มก./ล.) โดยปรับสภาวะที่เหมาะสมตามผลการทดลองข้างต้นได้แก่ ปริมาณกล้าเชื้อ 5% pH เริ่มต้น 7.50 และความเค็ม 2.50% โดยมีชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ ได้แก่ น้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพ (native control) เหมือนกับชุดที่เติมเชื้อ ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะมีอากาศ ไร้แสง โดยวัดปริมาณฟอสฟอรัสและไนเตรทที่ลดลงด้วย Test kit รวมทั้งค่า pH EC และ ORP ที่เวลา 0 ชม. และ 96 ชม.

จากผลการเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ในน้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพ ดัง รูปที่ 9 พบว่า ชุดการทดลองที่ใส่เชื้อ PNSB สามารถลดไนเตรทได้มากกว่า native control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ขณะที่ลดฟอสฟอรัสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย ชุดการทดลองที่ใส่เชื้อผสมแสดงการลดลงของฟอสฟอรัสมากที่สุด คือ 26.88 ± 1.84% ตามด้วย native control ชุดการทดลองที่ใส่เชื้อ W12 และ W48 ซึ่งลดได้ 25.25 ± 1.98% 21.19 ± 3.21% และ 20.72 ± 1.96% ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับผลการลดไนเตรท พบว่า ชุดการทดลองที่ใส่เชื้อผสมแสดงการลดลงของไนเตรทมากที่สุด คือ 74.33 ± 2.22% และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ใส่เชื้อ *A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 ซึ่งพบค่าการลดลงของไนเตรท คือ 70.48 ± 2.22% และ 69.20 ± 2.22% ตามลำดับ ขณะ ที่ชุด native control พบการลดไนเตรท 57.67 ± 8.00%

นอกจากนี้ พารามิเตอร์อื่นๆ ได้แก่ pH EC และ ORP ที่วัดก่อนและหลังการบำบัด แสดงดังตารางที่ 17 พบว่า ชุดการทดลองทั้งหมด มีการเพิ่มขึ้นของ pH และ EC หลังสิ้นสุดการทดลอง ขณะที่ ORP มีค่าลดลงแต่แสดงค่าเป็นบวก แสดงว่าอยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจน

จากผลการทดลองทั้งหมด พบว่าการใช้เชื้อผสม ระหว่าง *A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 สามารถลดฟอสฟอรัสและไนเตรทได้มากที่สุด จึงใช้เชื้อผสมไปทดลองในขั้นต่อไป



รูปที่ 9 ประสิทธิภาพการลดฟอสฟอรัสและไนเตรทในน้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพ (sCOD ประมาณ 100 มก./ล. ฟอสฟอรัสประมาณ 10 มก./ล.) โดย *A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 และเชื้อผสม (อัตรา 1 : 1) ที่ปริมาณกล้าเชื้อ 5% pH 7.5 และความเค็ม 2.50% ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง เป็นเวลา 96 ชม.

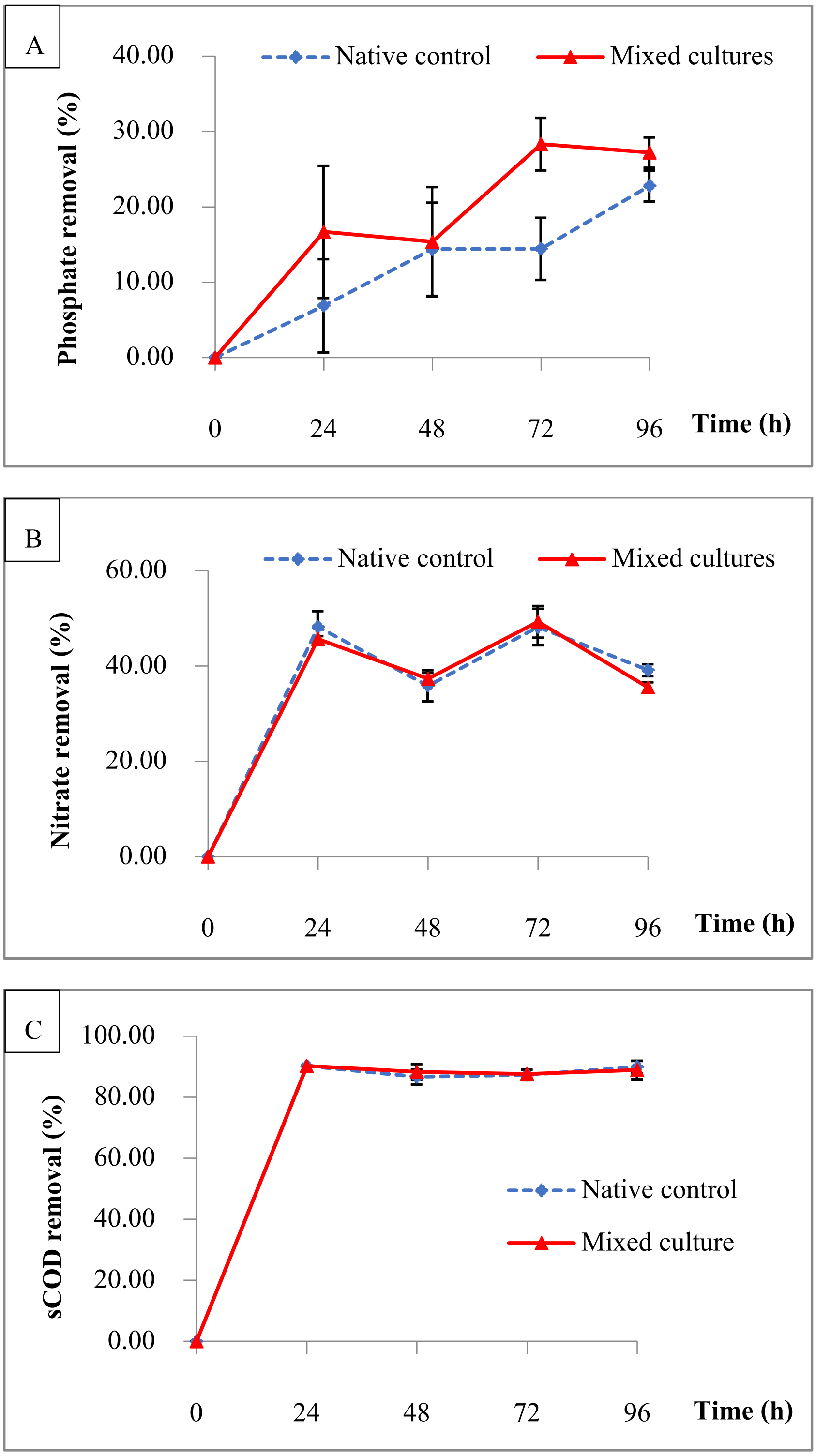
ตารางที่ 17 ค่าการวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ของน้ำเลี้ยงกุ้งดิบ ระหว่างการทดสอบการยืนยันผล ที่เวลา 0 และ 96 ชม.

Parameter	**pH**		**EC (mS/cm)**		**ORP (mV)**	
Set	**0 hour**	**96 hours**	**0 hour**	**96 hours**	**0 hour**	**96 hours**
Native control	7.56±0.01	8.34±0.01	26.30±0.00	26.70±0.00	192.33±2.06	154.40±8.63
A. marina W12	7.56±0.01	8.29±0.01	25.70±0.00	25.97±0.06	194.37±8.21	148.93±4.24
R. sulfidophilum W48	7.56±0.01	8.25±0.03	25.70±0.00	25.83±0.06	201.21±6.39	145.93±8.29
Mixed W12:W48 = 1:1	7.55±0.02	8.29±0.01	25.80±0.00	25.90±0.00	197.60±5.11	142.83 ±15.86

6. การหาศักยภาพของ PNSB ในการกำจัดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้ง

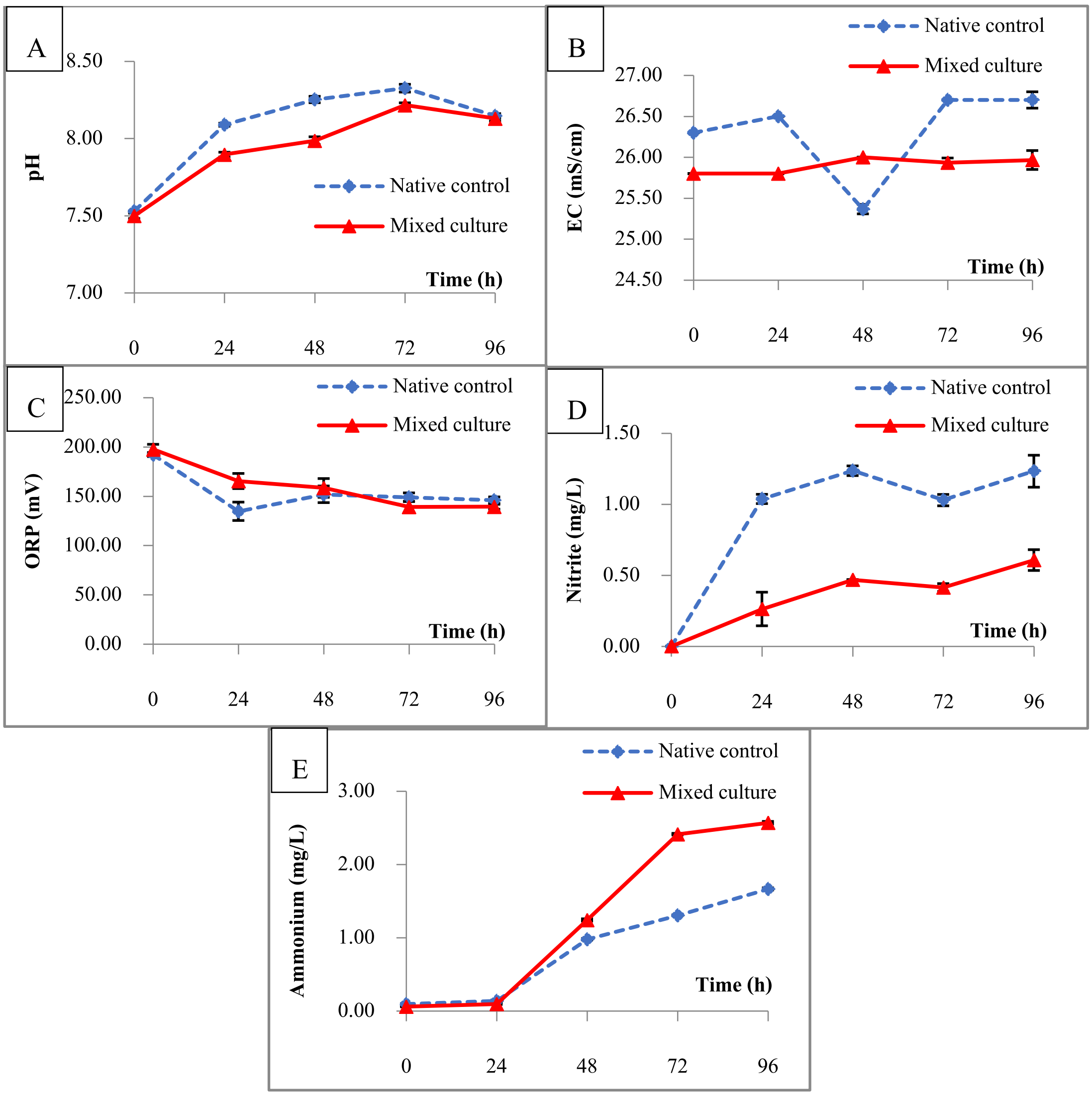
6.1 การหาศักยภาพของเชื้อผสม PNSB ภายในเวลา 96 ชม.

จากการเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ในน้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพ (COD ประมาณ 100 มก./ล. ฟอสฟอรัสประมาณ 10 มก./ล. ไนเตรท ประมาณ 50 มก./ล.) ดังรูปที่ 10 พบว่า ชุดการทดลองที่ใส่เชื้อผสมสามารถลดฟอสฟอรัสได้อย่างรวดเร็ว 16.68 ± 8.78 % ภายใน 24 ชม.แรก และสามารถลดฟอสฟอรัสได้สูงสุด 28.33 ± 3.49% เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชม. ขณะที่ native control สามารถลดฟอสฟอรัสได้สูงสุด 22.77 ± 2.06% ที่เวลา 72 ชม. (รูปที่ 10A) เมื่อพิจารณาการลดไนเตรท (รูปที่ 10B) พบว่า ชุดการทดลองที่ใส่เชื้อผสมสามารถลดไนเตรทได้อย่างรวดเร็ว 45.66 ± 0.63% ภายใน 24 ชม. และลดไนเตรทสูงสุด 49.27 ± 3.32% ที่เวลา 72 ชม. ทั้งนี้ไม่มีความแตกต่างกับชุด native control ซึ่งลดไนเตรทได้สูงสุด 48.19 ± 3.32% นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาการลด sCOD พบว่า ชุดการทดลองที่ใส่เชื้อผสมและ native control สามารถลดค่า sCOD ในน้ำทิ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพภายใน 24 ชม. โดยไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งลดได้สูงถึง 90.20 ± 0.00% และเหลือ sCOD ต่ำกว่า 10 มก./ล. ดังแสดงในรูปที่ 10C



รูปที่ 10 ศักยภาพการลด (A) ฟอสฟอรัส (B) ไนเตรท และ (C) sCOD ในน้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพ (sCOD ประมาณ 100 มก./ล. ฟอสฟอรัสประมาณ 10 มก./ล. ไนเตรท ประมาณ 50 มก./ล.) โดยใช้เชื้อผสม PNSB (*A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 อัตราส่วน =1:1) และบ่มภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสงเป็นเวลา 96 ชม.

อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาพารามิเตอร์ระหว่างการบำบัดดังแสดงใน รูปที่ 11A พบว่า pH ของทุกชุดการทดลองมีค่าสูงขึ้น โดยชุดการทดลองที่ใส่เชื้อผสมแสดงค่า pH ต่ำกว่าในชุด native control โดย pH ที่วัดได้ ณ เวลา 72 ชม. ในชุด mixed culture และ native control ได้แก่ 8.22 ± 0.02% และ 8.33 ± 0.03% ตามลำดับ ทั้งนี้ค่า pH ในชุด native control ที่บันทึกได้มีค่าสูงกว่าค่า pH ที่เหมาะสมในรอบวันของน้ำเลี้ยงกุ้ง ซึ่งมีค่าระหว่าง 7.5 - 8.2 การที่ pH สูงขึ้นส่งผลต่อการเกิดแอมโมเนียที่เป็นพิษสูงต่อกุ้งและสัตว์น้ำ (พุทธ, 2549; สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล , 2556) และเมื่อพิจารณาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการลดฟอสฟอรัส พบว่า pH เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้อัตราการสะสม poly-P ในเซลล์ต่ำลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Liang และคณะ (2010) ที่ศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อการสะสม poly-P ของ *Rps. palustris* ที่คาดว่า pH ที่สูงขึ้นอาจส่งผลในการยับยั้งการสะสม poly-P ภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังส่งผลต่อการเจริญและกิจกรรมของแบคทีเรีย เช่น การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของ *Rhodobacter sulfidophilus* เฉพาะที่ pH 6.75-7.75 เท่านั้น เช่นเดียวกันนั้น ชุดการทดลองที่ใส่เชื้อผสมสามารถควบคุมค่าไนไตรท์ให้ต่ำกว่า 1 มก./ล. ตลอดการทดลอง โดยมีค่าสูงสุด 0.608 ± 0.073 มก./ล. ดังแสดงใน รูปที่ 11D ซึ่งเป็นค่าที่ ยอมรับได้สำหรับการเลี้ยงกุ้ง ในขณะที่ชุด native control พบค่าไนไตรท์ที่สูงเกิน 1 มก./ล. เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชม.จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ทั้งนี้ไนไตรท์ที่สูงส่งผลเสียต่อกุ้งและสัตว์น้ำ โดยแย่งจับออกซิเจนกับ Haemocyanin ในเม็ดเลือด ทำให้กุ้งหรือสัตว์น้ำขาดออกซิเจน และทำให้ pH ในเลือดต่ำลง สมดุลเกลือแร่เปลี่ยนไป ลำตัวซีดจาง และติดเชื้อได้ง่าย (พุทธ, 2549; สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล , 2556) อย่างไรก็ตาม ค่าแอมโมเนียมที่ได้จากการทดลองทั้งสามชุดการทดลอง ตามรูปที่ 11E มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชม. และมีค่าผันผวนในชุดการทดลองที่เติมเชื้อผสมในชั่วโมงที่ 72 และ 96 แต่ปริมาณดังกล่าวอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งซึ่งควรมีค่าไม่เกิน 6.5 มก./ล. (Audelo-Naranjo, Martínez-Córdova, Gómez-Jiménez, & Voltolina, 2017)

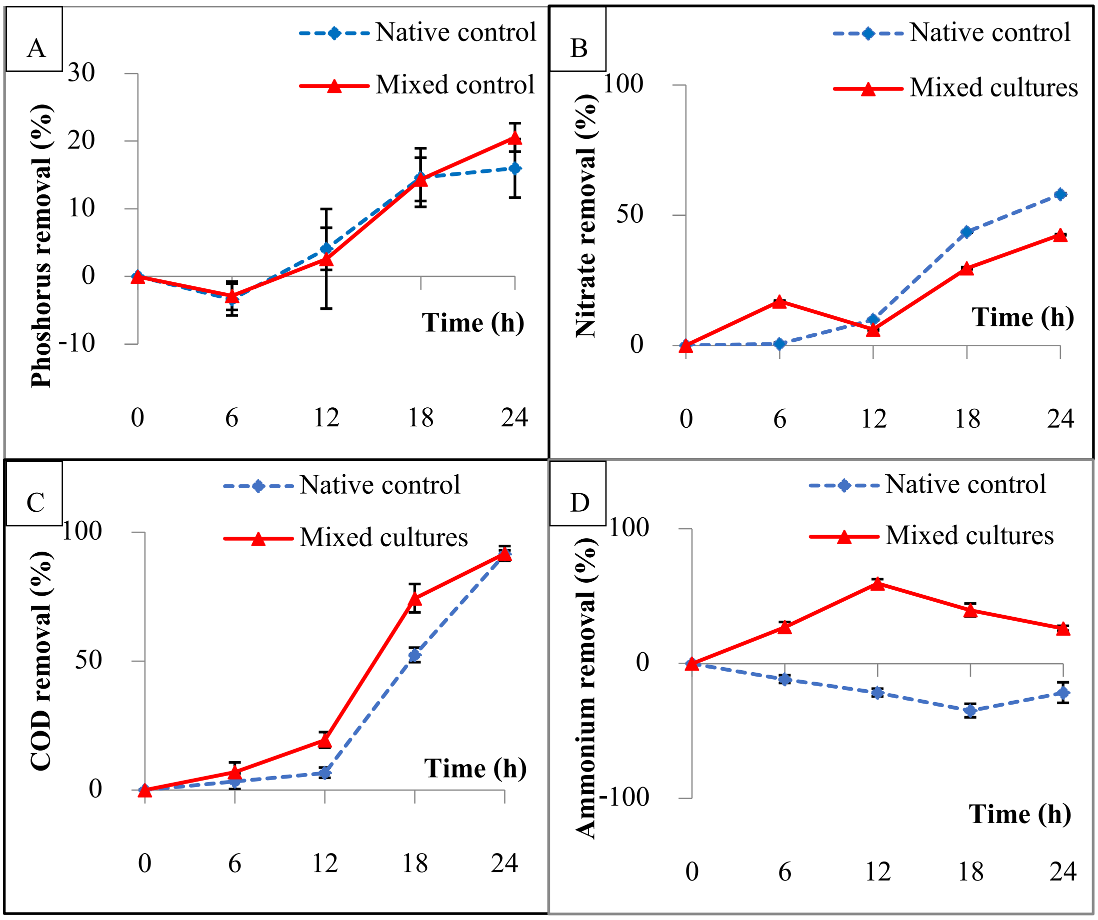


รูปที่ 11 การเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ที่วัดระหว่างการบำบัดน้ำเลี้ยงกุ้งดิบโดยเชื้อผสม PNSB (*A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 อัตราส่วน =1:1) ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง

จากผลการทดลองทำให้ทราบว่า การเลี้ยงเชื้อผสมเพื่อลดฟอสฟอรัสและไนเตรท ในสภาวะมีอากาศ-ไร้แสงนั้น กิจกรรมของเชื้อเกิดขึ้นได้ดีภายใน 24 ชม.แรก จึงควรลดเวลาการบำบัดจาก 96 ชม.เป็น 24 ชม. โดยแสดงได้จากการลดลงอย่างรวดเร็ว ของค่าฟอสฟอรัส ไนเตรท และ sCOD ดังนั้น จึงทำการศึกษากิจกรรมของเชื้อภายใน 24 ชม.ต่อไป เพื่อจะได้ทราบผลของการใช้เชื้อผสมต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพ

6.2 การหาศักยภาพของเชื้อภายในเวลา 24 ชม.

เนื่องจากผลการทดลองข้างต้นทำให้ทราบว่า การเลี้ยงเชื้อผสมเพื่อลดฟอสฟอรัสและไนเตรทในสภาวะมีอากาศ-ไร้แสงนั้น กิจกรรมของเชื้อเกิดขึ้นได้ดีภายใน 24 ชม. แรก นอกจากนี้ยังพบว่า sCOD ลดลงอย่างรวดเร็วถึง 90 % ภายใน 24 ชม. และเหลือ sCOD ต่ำกว่า 10 มก./ล. (รูปที่ 10C) จึงมุ่งเน้นศึกษาศักยภาพของเชื้อภายใน 24 ชม.แรก โดยทำการเลี้ยงเชื้อผสม *A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 (ในอัตราส่วน 1:1) ในน้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพ (sCOD ประมาณ 100 มก./ล. ฟอสฟอรัสประมาณ 10 มก./ล. ไนเตรท ประมาณ 50 มก./ล.) และกำหนดสภาวะ (ปริมาณกล้าเชื้อ 5% pH 7.50 และความเค็ม 2.50%) เช่นเดิม โดยมีชุดควบคุม คือ น้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพที่ไม่เติมเชื้อ (native control) เลี้ยงเชื้อในสภาวะมีอากาศ ไร้แสง โดยวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส ไนเตรทแอมโมเนียม sCOD ดังแสดงในรูปที่ 12 และพารามิเตอร์อื่นๆได้แก่ pH EC ORP แสดงในรูปที่ 13 นอกจากนี้ ได้ทำการนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี spread plate แสดงในรูปที่ 14 และตรวจจับการสะสม Poly-P โดยเปลี่ยนวิธีการ ย้อมสีด้วย Methylene blue เป็นการย้อมสี DAPI staining ที่เวลา 0, 6, 12,18 และ 24 ชม. ดังแสดงในรูปที่ 15



รูปที่ 12 เปอร์เซ็นต์การลด (A) ฟอสฟอรัส (B) ไนเตรท (C) sCOD และ (E) แอมโมเนียม โดยเชื้อผสม PNSB (*A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 อัตราส่วน = 1 : 1) ในน้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพ (sCOD ประมาณ 100 มก./ล. ฟอสฟอรัสประมาณ 10 มก./ล. ไนเตรท ประมาณ 50 มก./ล.) ซึ่งบ่มภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง เป็นเวลา 24 ชม.

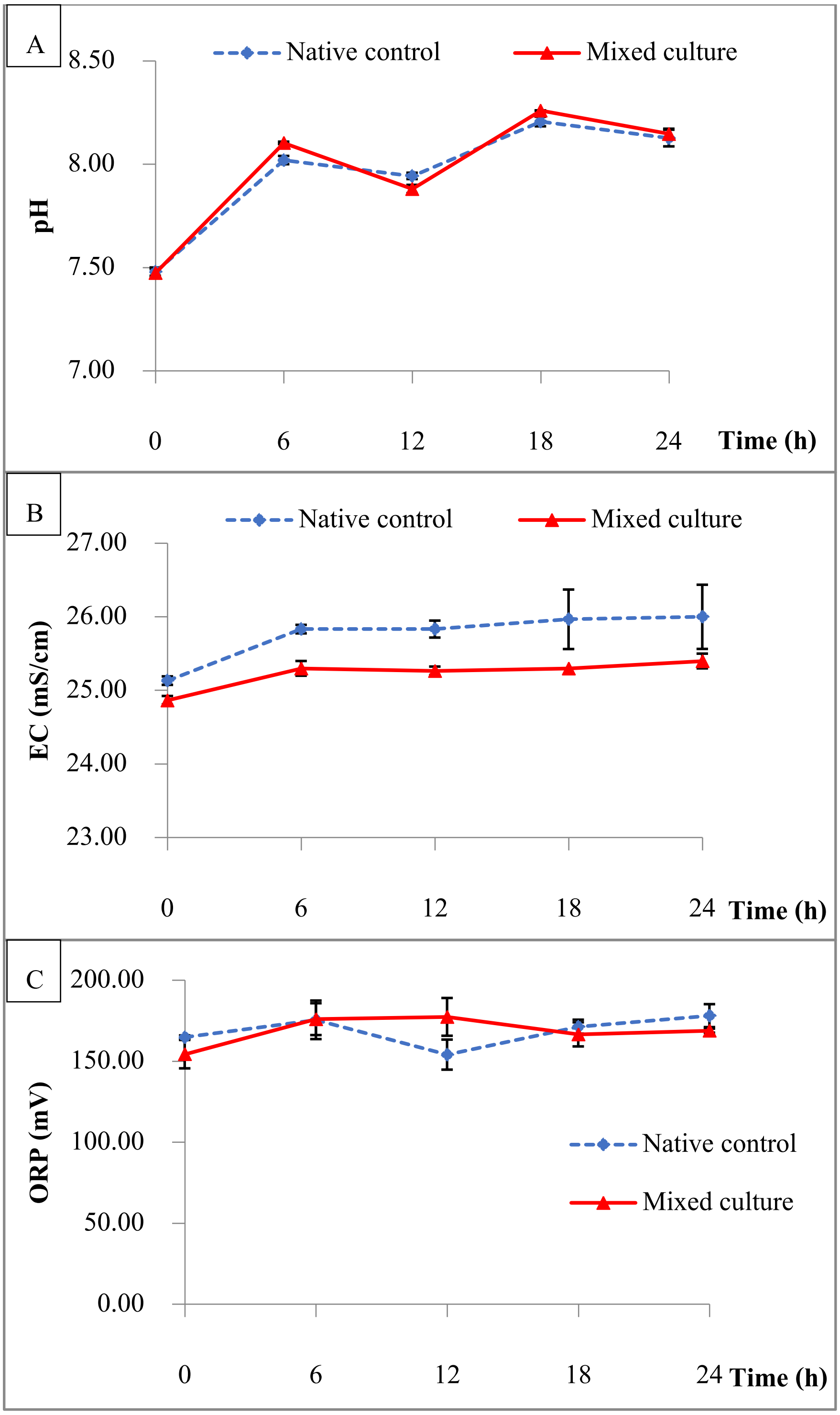
จากการศึกษาศักยภาพของเชื้อ ผสมในการกำจัดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพ ภายในเวลา 24 ชม.พบว่า ชุดการทดลองที่ใส่เชื้อผสมแสดงแนวโน้มการลดฟอสฟอรัสที่สูงขึ้นโดยสามารถลดฟอสฟอรัสได้อย่างรวดเร็ว 14.36 ± 3.20% ภายใน 18 ชม. และสามารถลดฟอสฟอรัสได้ 20.56 ± 2.01% เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชม. ขณะที่ native control สามารถลดฟอสฟอรัสได้สูงสุด 15.99 ± 4.33% เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชม.ฟอสฟอรัสดังแสดงในรูปที่ 12A

ขณะเดียวกัน ชุดการทดลองที่ใส่เชื้อผสมสามารถลดไนเตรทอย่างรวดเร็ว 16.90 ± 0.24% ภายในเวลาเพียง 6 ชม.และเมื่อเวลาผ่านไปจนสิ้นสุดการทดลองพบว่าอัตราการลดไนเตรทต่ำลง 42.46 ±0.24% ขณะที่เวลา 6 ชม.ชุด native control ลดไนเตรทได้เพียง 0.57 ± 0.43% และเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าไนเตรทลดลง 58.00 ± 0.43% ดังแสดงในรูปที่ 12B

นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาการลด sCOD ดังแสดงในรูปที่ 12C พบว่า ชุดการทดลองที่ใส่เชื้อผสมสามารถลดค่า sCOD ในน้ำทิ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ และรวดเร็วกว่าเมื่อเทียบกับชุด native control ที่เวลาต่างๆ โดยหลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 12 ชม. ชุดการทดลองที่ใส่เชื้อผสมมีการลด sCOD 19.33 ± 3.06% ซึ่งมากกว่าชุด native control (6.63 ± 1.99%) ประมาณ 3 เท่า และที่เวลา 18 ชั่วโมงชุดการทดลองที่ใส่เชื้อผสมมีอัตราการลดลงของ sCOD อย่างรวดเร็ว คือ 74.33 ± 5.51% และเหลือ sCOD เพียง 25.67 ± 5.51 มก./ล. ซึ่งใกล้เคียงกับค่า COD มาตรฐานของน้ำทิ้งหลังบำบัด (20 มก./ล.) ขณะที่ชุด native control ลด sCOD ได้ 52.32± 2.81% และเหลือ sCOD 48.00 ± 2.83 มก./ล. เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชม. ชุดการทดลองที่ใส่เชื้อผสมมีอัตราการลด sCOD ต่ำลง แต่สามารถลด sCOD ได้มากถึง 91.67 ± 2.89 % โดยค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ คือ 5 มก./ล. ขณะที่ native control แสดงการลด sCOD ได้ 91.39 ± 1.52% ซึ่งมีอัตราสูงเช่นกัน

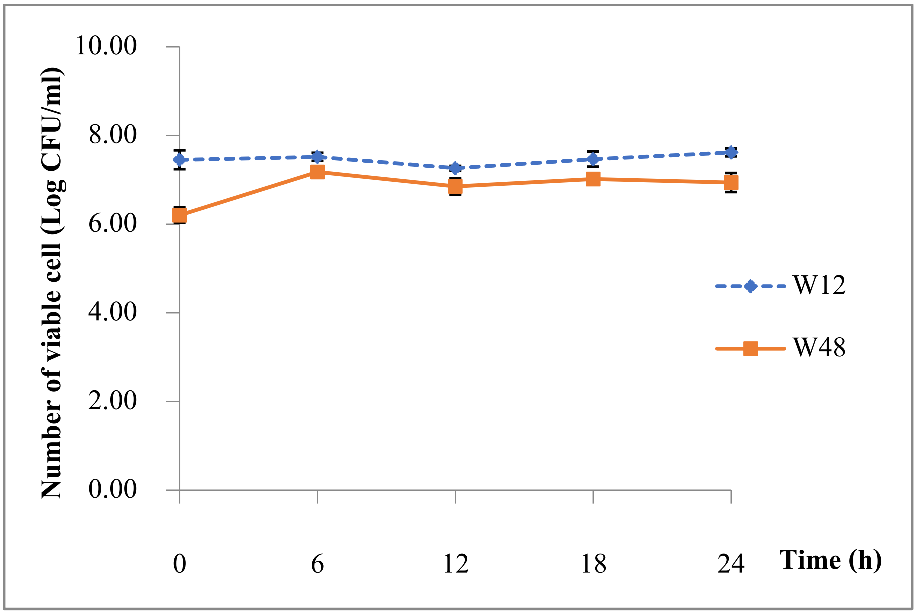
สำหรับการลดแอมโมเนียม (รูปที่ 12D) พบว่า ชุดการทดลองที่ใส่เชื้อผสมสามารถลดแอมโมเนียมได้สูงสุด 59.38 ± 3.13% ที่เวลา 12 ชม. และมีแนวโน้มต่ำลงเหลือ 26.04 ± 1.80% เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ขณะที่ชุด native control พบการเพิ่มขึ้นของแอมโมเนียม ซึ่งกล่าวได้ว่า การใช้กล้าเชื้อผสมสามารถช่วงลดธาตุอาหารพืชโดยเฉพาะแอมโมเนียม เนื่องจากพบปริมาณแอมโมเนียมต่ำ (รูปที่ 11E) และกรณีการบำบัดน้ำเลี้ยงกุ้งควรใช้เวลาสูงสุด 24 ชม.

พารามิเตอร์อื่นๆ ระหว่างการบำบัดแสดงใน รูปที่ 13 พบว่า ค่า pH เฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองที่ใส่เชื้อผสมและชุดควบคุมมีค่าใกล้เคียงกัน และมีค่าเพิ่มสูงขึ้นจาก pH 7.5 เป็น 8.02-8.10 เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 6 ชม. และคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง ส่วนค่า EC แสดงแนวโน้มเช่นเดียวกับค่า pH โดยมีค่าสูงขึ้นเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชม.และคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง ค่า ORP คงที่ตลอดการทดลอง ขณะที่ไนไตรท์มีค่าต่ำและไม่สามารถวัดค่าได้ (5-400 มคก./ล.) จึงไม่ได้แสดงค่า



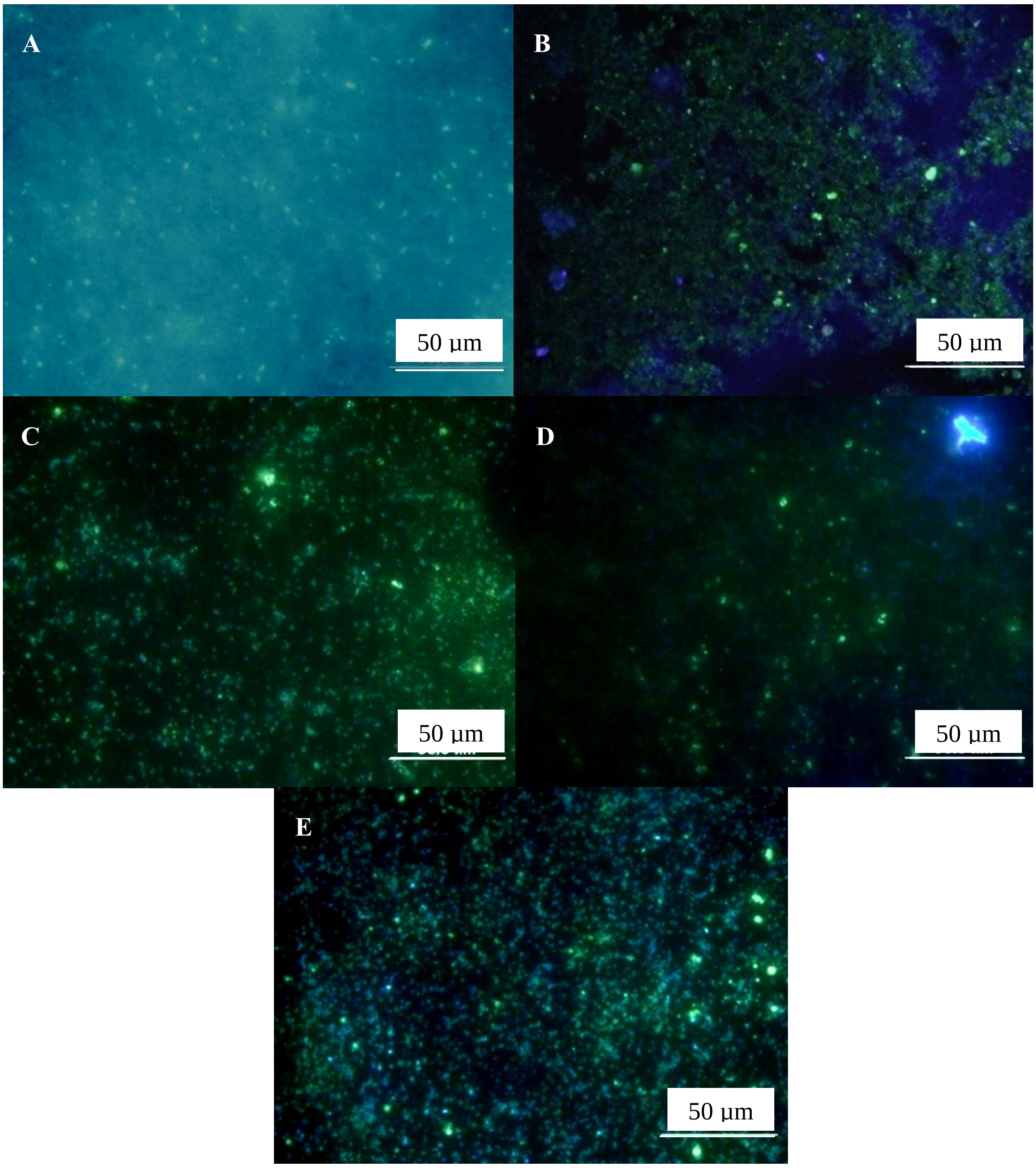
รูปที่ 13 การเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ที่วัดระหว่างการบำบัดน้ำเลี้ยงกุ้งดิบ ปรับสภาพ (sCOD ประมาณ 100 มก./ล. ฟอสฟอรัสประมาณ 10 มก./ล. ไนเตรท ประมาณ 50 มก./ล.) โดยเชื้อผสม PNSB (*A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 อัตราส่วน =1:1) ซึ่งบ่มภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง เป็นเวลา 24 ชม.

การนับจำนวนเชื้อ ผสมในน้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพ ณ ช่วงเวลาต่างๆ ด้วยวิธี Spread plate บ่มภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง เพื่อแยกความแตกต่างของเชื้อผสม โดย *A. marina* W12 แสดงโคโลนีสีชมพู และ *R. sulfidophilum* W48 แสดงโคโลนีสีน้ำตาล จากการทดลองพบว่าประชากรของเชื้อ *A. marina* W12 คงที่ตลอดการทดลอง ขณะที่เชื้อ *R. sulfidophilum* W48 เพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่เวลา 6 ชม. และคงที่ตลอดการทดลองเช่นกัน ดังแสดงใน รูปที่ 14 ทั้งนี้ ผลที่ได้อาจคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง เนื่องจากนำเชื้อที่เลี้ยงในสภาวะมีอากาศ-ไร้แสง มานับปริมาณในสภาวะ มีอากาศเล็กน้อย -มีแสง ดังนั้น จึงควรเลี้ยงในสภาวะเดียวกัน ซึ่งหากเลี้ยงในสภาวะมีอากาศ-ไร้แสง *A. marina* W12 จะแสดงโคโลนีสีขาวขุ่น และ *R. sulfidophilum* W48 จะแสดงโคโลนีสีสีชมพูอ่อน



รูปที่ 14 จำนวนประชากร PNSB ไอโซเลท *A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 ในน้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพระหว่างการบำบัด โดยใช้วิธีนับแบบ Spread plate ภายใต้สภาวะอากาศเล็กน้อย-มีแสง

นอกจากนี้ ได้ทำการศึกษาการสะสม Poly-P ภายในเซลล์แบคทีเรีย ไอโซเลท *A. marina* W12 และ *R. sulfidophilum* W48 ในน้ำเลี้ยงกุ้งดิบปรับสภาพ ด้วยวิธีการย้อมสี DAPI staining ที่เวลา 0 6 12 18 และ 24 ชม. และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ Fluorescence Microscope แสดงดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 การย้อมสี poly-p ของเชื้อผสม ด้วยวิธี DAPI staining ที่เวลา (A) 0 ชม. (B) 6 ชม. (C) 12 ชม. (D) 18 ชม. และ (E) 24 ชม. โดย poly-P เรืองแสงสีเขียว และตัวเซลล์เรืองแสงสีน้ำเงิน

ผล การศึกษาการสะสม Poly-P ภายในเซลล์ด้วยวิธีการย้อมสี DAPI staining แสดงดังรูปที่ 15 พบว่า Poly-P มีลักษณะเรืองแสงสีเขียวซึ่งแยก ออกเมื่อเทียบ กับตัวเซลล์ที่เรืองแสงสีน้ำเงิน (Liang et al., 2010) ทั้งนี้เซลล์เริ่มมีการสะสม Poly-P ที่เวลา 6 ชม. ซึ่งเริ่มพบการเรืองแสงสีเขียวแยกแตกต่างจากสีน้ำเงิน อย่างชัดเจน และเมื่อเวลาผ่านไปพบการเรืองแสงสีเขียวต่อสีน้ำเงินเพิ่มมากขึ้น (รูปที่ 15A-E) แสดงให้เห็นว่า เมื่อเวลาผ่านไปมีการสะสม Poly-P ในเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งมีความสอดคล้องกับปริมาณฟอสฟอรัสที่ลดลงดังแสดงในรูปที่ 12A

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้งที่ใช้ในการทดลองชี้ชัดว่า ปริมาณฟอสฟอรัสมีค่าสูงกว่ามาตรฐานคุณภาพน้ำเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อการผลิตกุ้งทะเล ทั้งนี้อาจเกิดจากการให้อาหารกุ้งในปริมาณมากเกิน ความจำเป็น ทำให้ฟอสฟอรัสในอาหารตกค้างในปริมาณสูง การสะสมของของเสียจากการขับถ่ายของกุ้งการใส่ปุ๋ยในน้ำเลี้ยงใหม่เพื่อเร่งการเจริญของ Phytoplankton ซึ่งสร้างห่วงโซ่อาหารในบ่อกุ้ง และการใช้น้ำเลี้ยงกุ้งหมุนเวียนซึ่งมีธาตุอาหารตกค้างในปริมาณมาก ดังนั้นหลังจากการเก็บเกี่ยวผลผลิต เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งควรทำการบำบัดน้ำเลี้ยงก่อนระบายออกสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติ เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาระบบนิเวศที่จะตามมา

ผลการแยกเชื้อแบคทีเรีย PNSB ในตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจากบ่อกุ้ง แยก PNSB ได้จำนวน 83 ไอโซเลทและส่วนใหญ่แยกได้จากน้ำเลี้ยงกุ้ง (ประมาณ 82%) เนื่องจากความขุ่นในน้ำเลี้ยง และระยะห่างระหว่างตะกอนดินและผิวน้ำ ทำให้ปิดกั้นแสงอาทิตย์ไม่ให้ส่องผ่านไปถึงตะกอนดินบริเวณก้นบ่อจึงทำให้พบเชื้อในตะกอนดินได้น้อยกว่าในน้ำเลี้ยง

การคัดเลือก PNSB จากเชื้อจำนวนมาก แต่มีเพียง สองไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงในการลดฟอสฟอรัส ในน้ำเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ *Afifella marina* W12 และ *Rhodovulum sulfidophilum* W48

สภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้งโดยใช้ไอโซเลทที่คัดเลือกได้ (ผสมกันในอัตราส่วน 1: 1) ด้วยต้นทุนต่ำในการบำบัด คือ ใช้กล้าเชื้อ 5% ปรับสภาวะน้ำเลี้ยงให้มี pH 7.5 ความเค็ม 2.5% และบำบัดในสภาวะมีอากาศ-ไร้แสงภายในระยะเวลา 96 ชม. สามารถลดฟอสฟอรัสและไนเตรทในน้ำเลี้ยงกุ้งดิบได้สูงประมาณ 26% และ 74% ตามลำดับ

เมื่อศึกษาศักยภาพในการบำบัดน้ำเลี้ยงกุ้งดิบภายในเวลา 96 ชม. โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมตามที่กล่าวมาพบว่า เชื้อผสมทั้งสองมีศักยภาพสูงในการบำบัดดังนี้

- กิจกรรมของเชื้อผสมเกิดขึ้นได้ดีภายใน 24 ชม. แรกโดย
- ลดฟอสฟอรัสได้อย่างรวดเร็วเฉลี่ย 21% ลดไนเตรทได้เฉลี่ย 46% และลดค่า sCOD ได้เฉลี่ย 92% เหลือ sCOD เพียงประมาณ 5 มก./ล.

- ขณะเดียวกันเชื้อผสมสามารถควบคุม pH ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมในรอบวันของน้ำเลี้ยงกุ้ง ซึ่งมีค่าระหว่าง 7.5 - 8.2 ขณะที่ชุด native control มี pH สูงกว่าช่วงที่เหมาะสม ซึ่งส่งผลต่อการเกิดแอมโมเนียที่เป็นพิษสูงต่อกุ้งและสัตว์น้ำ
- นอกจากนี้เชื้อผสมสามารถควบคุมไนไตรท์ให้ต่ำกว่า 1 มก./ล. ตลอดการทดลอง โดยพบค่าสูงสุด 0.6 มก./ล.ซึ่งอยู่ในช่วงค่าที่ ยอมรับได้ในบ่อกุ้ง ขณะที่ชุด native control พบค่าไนไตรท์ที่สูงเกิน 1 มก./ล. และส่งผลเสียต่อกุ้งและสัตว์น้ำ
- เชื้อผสม ทั้งสอง สามารถลดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้ง โดยนำมาสะสมในรูปแบบ Polyphosphate แกรนูล เพื่อเป็นแหล่งพลังงานภายในเซลล์ ซึ่งตรวจสอบได้จากการย้อมสีเซลล์ด้วย Methylene blue และ DAPI ซึ่งพบปริมาณ poly-P สะสมมากขึ้นตามระยะเวลาการบำบัด

ข้อเสนอแนะ

เมื่อพิจารณาการใช้กล้าเชื้อในการบำบัดน้ำเลี้ยงกุ้งจากผลการศึกษาทั้งหมด พบว่าสามารถลดฟอสฟอรัส ไนเตรท และ sCOD ได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังสามารถควบคุม pH และไนไตรท์ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกุ้ง และเพื่อให้งานวิจัยสามารถนำไปปฏิบัติได้จริงในชุมชน ควรมีการศึกษาต่อในการบำบัดภายใต้สภาวะไม่ให้อากาศ-มีแสง สลับกับสภาวะไม่ให้อากาศ-ไร้แสง เพื่อเลียนแบบสภาวะบ่อกุ้งตามธรรมชาติและลดต้นทุนการบำบัดมากที่สุดจากการที่ไม่ให้อากาศ เพื่อพิจารณาผลที่ได้

นอกจากนี้ควรพิจารณาศึกษาต่อในการใช้กล้าเชื้อผสมดังกล่าวในระหว่างการเลี้ยงกุ้ง เพราะนอกจากกล้าเชื้อผสมสามารถบำบัดฟอสฟอรัส ไนเตรท และ sCOD ได้อย่างรวดเร็วแล้ว ยังสามารถควบคุมระดับ pH และไนไตรท์ ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกุ้ง จึงเป็นการช่วยรักษาสภาวะน้ำเลี้ยงกุ้งในระหว่างการเพาะเลี้ยง ซึ่งอาจส่งผลให้ไม่ต้องมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้ง นำไปสู่การลดต้นทุนการผลิต อีกทั้งน้ำหลังการเลี้ยงกุ้งอาจอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานน้ำทิ้งสำหรับปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมได้โดยไม่จำเป็นต้องผ่านการบำบัด หรือง่ายต่อการบำบัดมากขึ้น ซึ่งเป็นแนวทางการลดต้นทุนการเลี้ยงกุ้งได้อีกทางโดยยังคงรักษาสภาวะแวดล้อมไว้ได้ เป็นแนวทางการเลี้ยงกุ้งที่ยั่งยืนเพราะเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ตลอดจนเป็นการส่งเสริมการเลี้ยงกุ้งแบบอินทรีย์ (organic shrimp farming)

เอกสารอ้างอิง

ดวงพร คันธโชติ. 2545. นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

ดำรงค์ โลหะลักษณาเดช, วิกิจ ผินรับ และประนอม ชุมเรียง. 2551. ประสิทธิภาพของดินป่าชายเลนในการบำบัดน้ำเสียในอำเภอกันตัง จังหวัดตรัง. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง 2(1): 66-68.

นุกูล อินทรสังขลา, เยิร์ก เคลเลอร์, ฟิลิป บอนด์ และลินดา แบล็คออล. 2542. การศึกษาแบคทีเรียที่สามารถบำบัดฟอสฟอรัสแบบชีวภาพในน้ำทิ้งที่มีความเค็มโดยใช้เทคนิค FISH. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37.

พุทธ ส่องแสงจินดา. 2544. การจัดการสารประกอบไนโตรเจนและออกซิเจนในฟาร์มเลี้ยงกุ้งระบบปิด . ศูนย์วิจัยพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย กรมประมง.

พุทธ ส่องแสงจินดา. 2549. สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง. การบริหารจัดการองค์ความรู้ : การปฏิบัติที่ดีสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว).

สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง. 2556. คู่มือการเลี้ยงกุ้งขาว .

สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง. 2558. สรุปฟาร์มมาตรฐานสัตว์น้ำชายฝั่ง . http://www.shrimpaqua.com/index.php/the-standard-fish-farm-installations เข้าถึงข้อมูล 3/5/2558.

สมาคมอาหารแช่แข็งไทย. 2557. สถานการณ์กุ้งและแนวโน้มปี 2558. TFFA newsletter (ตุลาคม), 6-8.

สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2548. รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการจัดทำแผนแม่บทการพัฒนาลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลา เล่มที่ 1. (บทที่ 2: น้ำ หน้า 22-23). http://www.onep.go.th/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=126&Itemid=252 (เข้าถึงข้อมูลวันที่10/5/15).

Anh, P. T., Kroeze, C., Bush, S. R., & Mol, A. P. J. (2010). Water pollution by intensive brackish shrimp farming in south-east Vietnam: Causes and options for control. *Agricultural Water Management,* 97(6), 872-882. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.agwat.2010.01.018

APHA. AWWA and WEF. 1999. Standard method for the examination of water and wastewater. 20th ed. American public health association. Washington, D.C.

Audelo-Naranjo, J. M., Martínez-Córdova, L. R., Gómez-Jiménez, S., & Voltolina, D. (2017). Intensive culture of *Litopenaeus vannamei* without water exchange and with an artificial substrate. *Hidrobiológica,* 22(1), 1-7.

Ault-Riché, D., Fraley, C. D., Tzeng, C.-M., & Kornberg, A. (1998). Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology,* 180(7), 1841-1847.

BAO, L.-l., Dong, L., LI, X.-k., HUANG, R.-x., ZHANG, J., Yang, L., & XIA, G.-q. (2007). Phosphorus accumulation by bacteria isolated from a continuous-flow two-sludge system. *Journal of environmental sciences,* 19(4), 391-395.

Beuckels, A., Smolders, E., & Muylaert, K. (2015). Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Research,* 77, 98-106. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.018

Blackall, L. L., Crocetti, G. R., Saunders, A. M., & Bond, P. L. (2002). A review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek,* 81(1), 681-691. doi: 10.1023/a:1020538429009

Burford, M. A., Costanzo, S. D., Dennison, W. C., Jackson, C. J., Jones, A. B., McKinnon, A. D., Trott, L. A. (2003). A synthesis of dominant ecological processes in intensive shrimp ponds and adjacent coastal environments in NE Australia. *Marine Pollution Bulletin,* 46(11), 1456-1469. doi: https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00282-0

Cathie Lee, W. P., Mah, S.-K., Leo, C. P., Wu, T. Y., & Chai, S.-P. (2014). Phosphorus removal by NF90 membrane: Optimisation using central composite design. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers,* 45(4) , 1260-1269. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2014.02.011

Chumpol, S., Kantachote, D., Nitoda, T., & Kanzaki, H. (2017). The roles of probiotic purple nonsulfur bacteria to control water quality and prevent acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) for enhancement growth with higher survival in white shrimp (Litopenaeus vannamei) during cultivation. *Aquaculture,* 473, 327-336.

Cohen, Y., & Kirchmann, H. (2004). Increasing the pH of wastewater to high levels with different gases—CO2 stripping. *Water, Air, and Soil Pollution,* 159(1), 265-275.

Costanzo, S. D., O'Donohue, M. J., & Dennison, W. C. (2004). Assessing the influence and distribution of shrimp pond effluent in a tidal mangrove creek in north-east Australia. *Marine Pollution Bulletin,* 48(5), 514-525.

Fuhs, G. W., & Chen, M. (1975). Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Microbial Ecology,* 2(2), 119-138.

Funge-Smith, S. J., & Briggs, M. R. P. (1998). Nutrient budgets in intensive shrimp ponds: implications for sustainability. *Aquaculture,* 164(1 –4), 117-133. doi: https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00181-1

Herbeck, L. S., Unger, D., Wu, Y., & Jennerjahn, T. C. (2013). Effluent, nutrient and organic matter export from shrimp and fish ponds causing eutrophication in coastal and back-reef waters of NE Hainan, tropical China. *Continental Shelf Research,* 57, 92-104.

Hiraishi, A., & Ueda, Y. (1994). Intrageneric structure of the genus *Rhodobacter*: transfer of *Rhodobacter sulfidophilus* and related marine species to the genus *Rhodovulum* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,* 44(1), 15-23.

Hülsen, T., Batstone, D. J., & Keller, J. (2014). Phototrophic bacteria for nutrient recovery from domestic wastewater. *Water Research,* 50, 18- 26. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.051

Hupfer, M., Gloss, S., Schmieder, P., & Grossart, H.-P. (2008). Methods for detection and quantification of polyphosphate and polyphosphate accumulating microorganisms in aquatic sediments. *International Review of Hydrobiology,* 93(1), 1-30.

Idi, A., Nor, M. H. M., Wahab, M. F. A., & Ibrahim, Z. (2015). Photosynthetic bacteria: an eco-friendly and cheap tool for bioremediation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology,* 14(2), 271-285.

Imhoff, J. F. (1983). *Rhodopseudomonas marina* sp. nov., a new marine phototrophic purple bacterium. *Systematic and Applied Microbiology,* 4(4), 512-521. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020(83)80009-5

Imhoff, J. F. (1992). Taxonomy, phylogeny, and general ecology of anoxygenic phototrophic bacteria *Photosynthetic Prokaryotes* (pp. 53-92): Springer.

Imhoff, J. F., Hiraishi, A., & Süling, J. (2005). Anoxygenic phototrophic purple bacteria *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (pp. 119-132): Springer.

Kantachote, D., Torpee, S., & Umsakul, K. (2005). The potential use of anoxygenic phototrophic bacteria for treating latex rubber sheet wastewater. *Electronic Journal of Biotechnology,* 8, 0-0.

Kim, J. K., Lee, B.-K., Kim, S.-H., & Moon, J.-H. (1999). Characterization of denitrifying photosynthetic bacteria isolated from photosynthetic sludge. *Aquacultural Engineering,* 19(3), 179-193.

Kornochalert, N., Kantachote, D., Chaiprapat, S., & Techkarnjanaruk, S. (2014a). Bioaugmentation of latex rubber sheet wastewater treatment with stimulated indigenous purple nonsulfur bacteria by fermented pineapple extract. *Electronic Journal of Biotechnology,* 17(4), 174-182.

Kornochalert, N., Kantachote, D., Chaiprapat, S., & Techkarnjanaruk, S. (2014b). Use of *Rhodopseudomonas palustris* P1 stimulated growth by fermented pineapple extract to treat latex rubber sheet wastewater to obtain single cell protein. *Annals of Microbiology,* 64(3), 1021-1032. doi: 10.1007/s13213-013-0739-1

Li, Y., Zou, J., Zhang, L., & Sun, J. (2014). Aerobic granular sludge for simultaneous accumulation of mineral phosphorus and removal of nitrogen via nitrite in wastewater. *Bioresource Technology,* 154, 178-184. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.033

Liang, C.-M., Hung, C.-H., Hsu, S.-C., & Yeh, C. (2010). Purple nonsulfur bacteria diversity in activated sludge and its potential phosphorus-accumulating ability under different cultivation conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 86(2), 709-719.

McIntosh, D., & Fitzsimmons, K. (2003). Characterization of effluent from an inland, low-salinity shrimp farm: what contribution could this water make if used for irrigation. *Aquacultural Engineering,* 27(2), 147-156. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8609(02)00054-7

Mukkata, K., Kantachote, D., Wittayaweerasak, B., Techkarnjanaruk, S., Mallavarapu, M., & Naidu, R. (2015). Distribution of mercury in shrimp ponds and volatilization of Hg by isolated resistant purple nonsulfur bacteria. *Water, Air, & Soil Pollution,* 226(5), 148.

Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*: John Wiley & Sons.

Nunkaew, T., Kantachote, D., Nitoda, T., & Kanzaki, H. (2012). The use of rice straw broth as an appropriate medium to isolate purple nonsulfur bacteria from paddy fields. *Electronic Journal of Biotechnology,* 15(6), 7-7.

Nunkaew, T., Kantachote, D., Nitoda, T., & Kanzaki, H. (2015). Selection of salt tolerant purple nonsulfur bacteria producing 5-aminolevulinic acid (ALA) and reducing methane emissions from microbial rice straw degradation. *Applied Soil Ecology,* 86, 113-120.

Sakpirom, J., Kantachote, D., Nunkaew, T., & Khan, E. (2017). Characterizations of purple non-sulfur bacteria isolated from paddy fields, and identification of strains with potential for plant growth-promotion, greenhouse gas mitigation and heavy metal bioremediation. *Research in Microbiology,* 168(3), 266-275.

Serralta, J., Ferrer, J., Borras, L., & Seco, A. (2006). Effect of pH on biological phosphorus uptake. *Biotechnology and Bioengineering,* 95(5), 875-882.

Serrano-Grijalva, L., Sánchez-Carrillo, S., Angeler, D., Sánchez-Andrés, R., & Álvarez-Cobelas, M. (2011). Effects of shrimp-farm effluents on the food web structure in subtropical coastal lagoons. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology,* 402(1), 65-74.

Smith, V. H., Tilman, G. D., & Nekola, J. C. (1999). Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution,* 100(1), 179-196.

Takeno, K., Sasaki, K., Watanabe, M., Kaneyasu, T., & Nishio, N. (1999). Removal of phosphorus from oyster farm mud sediment using a photosynthetic bacterium, *Rhodobacter sphaeroides* IL106. *Journal of Bioscience and Bioengineering,* 88(4), 410-415. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80218-7

Thomas, Y., Courties, C., El Helwe, Y., Herbland, A., & Lemonnier, H. (2010). Spatial and temporal extension of eutrophication associated with shrimp farm wastewater discharges in the New Caledonia lagoon. *Marine Pollution Bulletin,* 61(7), 387-398.

Thongrak, S., Prato, T., Chiayvareesajja, S., & Kurtz, W. (1997). Economic and water quality evaluation of intensive shrimp production systems in Thailand. *Agricultural Systems,* 53(2), 121-141. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0308-521X(96)00065-0

Tian-Ming, C., Li-Bo, G., Li-Wei, C., Shu, C., Xiao-Dan, L., Zhong-Li, C., & Shun-Peng, L. (2007). Enhanced biological phosphorus removal with P seudomonas putida GM6 from activated sludge. *Pedosphere,* 17(5), 624-629.

Zhang, L., Wan, L., Chang, N., Liu, J., Duan, C., Zhou, Q., Wang, X. (2011). Removal of phosphate from water by activated carbon fiber loaded with lanthanum oxide. *Journal of Hazardous Materials,* 190(1) , 848- 855. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.04.021

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

Glutamate-Acetate medium (GA + 1.5% NaCl medium)

Sodium L-glutamate	3.8 g
Sodium acetate	5.4 g
Yeast extract	2.0 g
NaCl	15.0 g
KH_2PO_4	0.5 g
K_2HPO_4	0.5 g
$(NH_4)_2HPO_4$	0.8 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 g
$CaCl_2.2H_2O$	0.053 g
Nicotinic acid	0.001 g
Biotin	0.010 g
$MnSO_4.5H_2O$	0.012 g
Ferric citrate	0.025 g
Thiamine hydrochloride	0.001 g
$CoCl_2.6H_2O$	0.950 g
Distilled water	1000 mL

ปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5.0 นอร์มัล และสารละลายไฮโดรคลอลิก 5.0 นอร์มัล กรณีที่เป็นอาหารแข็งเติมวุ้นร้อยละ 1.5 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การย้อมสี และสารเคมี

1. การย้อมสีแกรม

1) เตรียมสีย้อม ดังนี้
   a. Crystal violet โดยนำสารละลาย A (ละลาย crystal violet 2.0 ก. ลงใน 95% ethyl alcohol ปริมาตร 20 มล.) และสารละลาย B (ละลาย ammonium oxalate 0.8 ก. ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มล.) ผสมเข้าด้วยกัน ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง
   b. สารละลายไอโอดีน โดยบดไอโอดีน 1 ก. และ potassium iodine 2.0 ก. ผสมเข้าด้วยกัน แล้วค่อยๆเติมน้ำกลั่นปริมาตร 300 มล. ลงไปจนไอโอดีนละลาย เก็บไว้ในขวดสีชา
   c. 95% ethyl alcohol
   d. Safranin โดยละลาย Safranin 2.5 ก. ลงใน 95% ethyl alcohol ปริมาตร 10 มล. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล.
2) นำเชื้อแบคทีเรียมา เกลี่ยบนสไลด์ให้กระจายเป็นฟิล์มบางๆ ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง
3) หยด Crystal violet บนรอยเกลี่ยให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสีทิ้ง
4) หยดสารละลายไอโอดีน บนรอยเกลี่ย ทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายทิ้ง โดยสารละลายไอโอดีนช่วยให้เซลล์ติดสีย้อมได้ดีขึ้น
5) หยด 95% ethyl alcohol เพื่อล้างสีออก ทิ้งไว้ 5 วินาที ล้างน้ำสะอาดเบาๆ
6) หยด Safranin บนรอยเกลี่ย ทิ้งไว้ประมาณ 30-60 วินาที ล้างน้ำ และซับให้แห้ง
7) ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยแบคทีเรียแกรมบวก ติดสีม่วงของ Crystal violet และแบคทีเรียแกรมลบ ติดสีแดงของ Safranin

2. การย้อมสี Polyphosphate แกรนูล โดย Methylene blue (Hulsen et al., 2014)

1) เตรียมสีย้อม Methylene Blue โดยละลาย Methylene blue 0.3 ก. ลงใน 95% Ethanol 30.0 มล. และ Deionized water 100 มล. กรองด้วยกระดาษกรอง
2) นำเชื้อแบคทีเรีย มาทำ smear บนสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปผ่านเปลวไฟ
3) ย้อมเซลล์ด้วยสีย้อม Methylene blue ทิ้งไว้ 15 นาที
4) ล้างสไลด์เบาๆ ด้วยน้ำกลั่น พักไว้ให้แห้ง
5) ส่องด้วยกล้อง Epifluorescence

3. การย้อมสี Polyphosphate แกรนูล โดย DAPI (Liang et al., 2010)

1) เตรียมสีย้อม DAPI โดยนำ 4,6-diaminido-2-phenylindole ละลายกับ Deionized water ให้มีความเข้มข้น 20 มคก/มล.
2) นำเชื้อแบคทีเรียมา เกลี่ยบนสไลด์ให้กระจายเป็นฟิล์มบางๆ ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปผ่านเปลวไฟ
3) ย้อมเซลล์ด้วยสีย้อม DAPI ทิ้งไว้ 30 นาที
4) ส่องด้วยกล้อง Epifluorescence

ภาคผนวก ค

การเทียบเคียงเชื้อโดยวิธีการทางอณูชีววิทยา

Report of microbial identification by 16S rDNA sequence analysis

Sample name: W12

LOCUS	KX823357 1308 bp DNA linear BCT 09-SEP-2016
DEFINITION	*Afifella marina* strain w12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION	KX823357
VERSION	KX823357
KEYWORDS	.
SOURCE	*Afifella marina*
ORGANISM	*Afifella marina* Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhodobiaceae; *Afifella*.
REFERENCE	1 (bases 1 to 1308)
AUTHORS	Bunruk, P. and Kantachote, D.
TITLE	Phosphorus removal in water from shrimp cultivation by purple non-sulfur bacteria isolated from shrimp ponds
JOURNAL	Unpublished
REFERENCE	2 (bases 1 to 1308)
AUTHORS	Bunruk, P. and Kantachote, D.
TITLE	Direct Submission
JOURNAL	Submitted (08-SEP-2016) MICROBIOLOGY, PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY, 15 KANGANAWANICH, HATYAI, SONGKHLA 90112, Thailand

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1308

/organism="Afifella marina"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="w12"

/db_xref="taxon:1080"

rRNA <1..>1308

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 gcactcttcg gagtgagtgg cagacgggtg agtaacgcgt gggaatctac ccagtggtac

61 gggataaccc gaggaaactc gagctaatac cgtatacgcc cttcggggga aagatttatt

121 gccattggat gagcccgcgt cggattagct tgttggtggg gtaacggcct accaaggcaa

181 cgatccgtag ctggtctgag aggatgatca gccacactgg gactgagaca cggcccagac

241 tcctacggga ggcagcagtg gggaatcttg gacaatgggg gaaaccctga tccagccatg

301 ccgcgtgagt gaagaaggcc ctagggttgt aaagctcttt cagcggggaa gataatgacg

361 gtacccgcag aagaagcccc ggctaacttc gtgccagcag ccgcggtaat acgaaggggg

421 ctagcgttgt tcggaattac tgggcgtaaa gcgcgcgtag gcggattgtt aagtcagggg

481 tgaaatccca gagctcaact ctggaactgc ctctgatact ggcaatctcg agtccggaag

541 aggttggtgg aattccgagt gtagaggtga aattcgtaga tattcggagg aacaccagag

601 gcgaaggcgg ccaactggtc cgagactgac gctgaggcgc gaaagcgtgg ggagcaaaca

661 ggattagata ccctggtagt ccacgccgta aacgatggat gctagccgtt ggtgggtata

721 ctcatcagtg gcgcagctaa cgcattaagc atcccgcctg gggagtacgg tcgcaagatt

781 aaaactcaaa ggaattgacg gggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa

841 gcaacgcgca gaaccttacc agctcttgac atcccgatcg cggttaccgg agacggtttc

901 cttcagctag gctggatcgg tgacaggtgc tgcatggctg tcgtcagctc gtgtcgtgag

961 atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa ccctcgccct tagttgccag cattcagttg

1021 ggcactctaa ggggactgcc ggtgataagc cgagaggaag gtggggatga cgtcaagtcc

1081 tcatggccct tacgggctgg gctacacacg tgctacaatg gcggtgacag tgggaaaatc

1141 cccaaaaacc gtctcagttc ggattgtcct ctgcaactcg gggcatgaa ggtggaatcg

1201 ctagtaatcg tggatcagca tgccacggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc

1261 cgtcacacca tgggagttgg ttctacccga agacggtgcg ctaacccg

Sample name: W48

LOCUS	KX823358 1310 bp DNA linear BCT 09-SEP-2016
DEFINITION	*Rhodovulum sulfidophilum* strain W48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION	KX823358
VERSION	KX823358
KEYWORDS	.
SOURCE	*Rhodovulum sulfidophilum*
ORGANISM	*Rhodovulum sulfidophilum* Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; *Rhodovulum*.
REFERENCE	1 (bases 1 to 1310)
AUTHORS	Bunruk, P. and Kantachote, D.
TITLE	Phosphorus removal in water from shrimp cultivation by purple non-sulfur bacteria isolated from shrimp ponds
JOURNAL	Unpublished
REFERENCE	2 (bases 1 to 1310)
AUTHORS	Bunruk,P. and Kantachote,D.
TITLE	Direct Submission
JOURNAL	Submitted (08-SEP-2016) MICROBIOLOGY, PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY, 15 KANGANAWANICH, HATYAI, SONGKHLA 90112, Thailand
COMMENT	##Assembly-Data-START## Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing ##Assembly-Data-END##
FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..1310 /organism="Rhodovulum sulfidophilum" /mol_type="genomic DNA"

/strain="W48"

/db_xref="taxon:35806"

rRNA <1..>1310

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 gtcgagcgaa cccttcgggg ttagcggcgg acgggtgagt aacgcgtggg aacgtgccct

61 tctctgcgga ataggctcgg gaaactgggt ttaataccgc atacgccctt cgggggaaag

121 atttatcgga gaaggatcgg cccgcgtctg attaggtagt tggtggggta atggcctacc

181 aagcctacga tcagtagctg gtttgagagg atgatcagcc acactgggac tgagacacgg

241 cccagactcc tacgggaggc agcagtgagg aatcttggac aatgggggaa accctgatcc

301 agccatgccg cgtgagcgat gaaggcctta gggttgtaaa gctctttcag tcgtgaagat

361 aatgacggta gcgacagaag aagccccggc taactccgtg ccagcagccg cggtaatacg

421 gagggggcta gcgttgttcg gaattactgg gcgtaaagcg cgcgtaggcg gactattaag

481 tcggggggtga aatcccgggg ctcaaccccg gaactgcctc cgatactggt agtctagagt

541 tcgagagagg tgagtggaat tccgagtgta gaggtgaaat tcgtagatat tcggaggaac

601 accagtggcg aaggcggctc actggctcga tactgacgct gaggtgcgaa agcgtgggga

661 gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac gatgaatgcc agtcgtcggc

721 aagcatgctt gtcggtgaca cacctaacgg attaagcatt ccgcctgggg agtacggccg

781 caaggttaaa actcaaagga attgacgggg gcccgcacaa gcggtggagc atgtggttta

841 attcgaagca acgcgcagaa ccttaccaac ccttgacatc ctgatcgcgg ttacccgaga

901 gggtttcctt cagttcggct ggatcagtga caggtgctgc atggctgtcg tcagctcgtg

961 tcgtgagatg ttcggttaag tccggcaacg agcgcaaccc acactcttag ttgccagcat

1021 tcagttgggc actctaagag aactgccgat gataagtcgg aggaaggtgt ggatgacgtc

1081 aagtcctcat ggcccttacg ggttgggcta cacacgtgct acaatggcag tgacaatggg

1141 ttaatcccaa aaaactgtct cagttcggat tgttctctgc aactcgagag catgaagtcg

1201 gaatcgctag taatcgcgta acagcatgac gcggtgaata cgttcccggg ccttgtacac

1261 accgcccgtc acaccatggg agttgggttt acccgaagac ggtgcgccaa

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวปฐมา บุญรักษ์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5710220051

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	**ชื่อสถาบัน**	**ปีที่สำเร็จการศึกษา**
วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาชีววิทยา) (เกียรตินิยมอันดับ 1)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2556

ทุนการศึกษา

ทุนพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.)

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Bunruk, P., Kantachote, D. and Sukhoom, A. 2017. Isolation and selection of purple non-sulfur bacteria for phosphate removal in rearing water from shrimp cultivation. *Journal of Applied and Physical Sciences*, 3(2), 73-80.

Bunruk, P., Kantachote, D. and Mallavarapu, M. Potential of purple nonsulfur bacteria for phosphate removal in rearing water from shrimp cultivation. (Manuscript in preparation).