รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ
ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อบาซิลลัสทนเค็มสำหรับปรับปรุงคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้ง
Seed of Halo-tolerant *Bacillus* for Water Improvement in Shrimp Aquaculture

ผศ.ดร.ยุทธพงษ์ สังข์น้อย
ผศ.ดร.สมพงศ์ โอทอง
ดร.ธีญาภรณ์ แก้วทวี
อานนท์ อุปบัลลังก์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2562 รหัสโครงการ NAT620128S

1.ชื่อชุดโครงการ –

2. ชื่อโครงการเดี่ยว

ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อบาซิลลัสทนเค็มสำหรับปรับปรุงคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้ง
Seed of Halo-tolerant *Bacillus* for Water Improvement in Shrimp Aquaculture

3.คณะนักวิจัย และหน่วยงานต้นสังกัด

1) ผศ.ดร. ยุทธพงษ์ สังข์น้อย	สาขาวิชาวาริชศาสตร์และนวัตกรรมการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ
2) ดร. ธีญาภรณ์ แก้วทวี	สาขาวิชาวาริชศาสตร์และนวัตกรรมการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ
3) อาจารย์อานนท์ อุปบัลลังก์	สาขาวิชาวาริชศาสตร์และนวัตกรรมการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ
4) ผศ.ดร. สมพงศ์ โอทอง	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

4. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2562 ภายใต้รหัสโครงการ NAT620128S คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดารุณีฟาร์ม และคุณดารุณี สงหนู ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอนุญาตให้เก็บตัวอย่างมาศึกษา ขอขอบคุณนางสาวทศพร เพชรทองเกลี้ยง บัณฑิตศึกษาผู้รับทุนเชื่อมโยงในโครงการนี้ และขอขอบคุณสาขาวิชาวาริชศาสตร์และนวัตกรรมการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติที่สนับสนุนอุปกรณ์ เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ และห้องปฏิบัติการสำหรับการศึกษาวิจัยครั้งนี้

คณะนักวิจัย

5. บทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรีย *Bacillus* ทนเค็ม และสร้างเป็นผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อชนิดผง เพื่อประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้ง จากการคัดแยกเชื้อในตัวอย่างตะกอนดินและน้ำเสีย และนำมาจัดจำแนกเชื้อด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus pumilus* (TS23), *B. subtilis* (TW24 และ TW34) และ *B. tequilensis* (BR001 และ BR002) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Heterotrophic nitrifying–aerobic denitrifying bacteria และสามารถเจริญเติบโตในความเค็มที่เหมาะสมเท่ากับ 0.5–3% NaCl และpH ที่เหมาะสมเท่ากับ 7–7.5 จากการศึกษาพบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ TS23, BR001 และ BR002 มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำเสียสังเคราะห์ และพบว่ากล้าเชื้อผสมระหว่าง *B. tequilensis* BR001 และ BR002 ในสัดส่วน 70:30 มีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 10^8–10^9 CFU/mL และมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการบำบัดน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) เป็นระยะเวลา 5 วัน โดยสามารถลดปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทได้มากที่สุดเท่ากับ 82.30%, 70.57% และ 26.07% ตามลำดับ เมื่อนำกล้าเชื้อผสมทั้งสองสายพันธุ์นี้มาสร้างเป็นผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มชนิดผง โดยใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรเป็นสารพา พบว่าขี้เลื่อยบดเหมาะสมมากที่สุดต่อการเป็นสารพาในสัดส่วน 1:1 และผลการทดสอบภายในระยะเวลา 7 วัน พบว่าผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมชนิดผงมีประสิทธิภาพในการลดแอมโมเนียได้เฉลี่ยเท่ากับ 98.62–99.52% ลดไนไตรท์ได้เฉลี่ยเท่ากับ 56.15–99.60% ลดไนเตรทเฉลี่ยเท่ากับ 43.08–51.96% และสามารถลดปริมาณออร์โธฟอสเฟต สารแขวนลอยทั้งหมด และค่า COD ได้เท่ากับ 81.91%, 81.31% และ 74.42% ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าการเก็บรักษากล้าเชื้อผสมเป็นระยะเวลา 6 เดือนที่อุณหภูมิห้อง มีจำนวนเซลล์รอดชีวิตสูงอยู่ในช่วง 2.87×10^9 ถึง 3.50×10^9 CFU/g จากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ระหว่างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมชนิดผงกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าเป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสม สามารถลดปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท และค่า COD ได้เท่ากับ 98.13%, 85.40%, 88.60% และ 34.89% ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า อย่างไรก็ตาม พบว่าผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมสามารถลดปริมาณแขวนลอยทั้งหมดในวันที่ 30 ได้เท่ากับ 36.82% และลดปริมาณออร์โธฟอสเฟตวันที่ 25 ถึงวันที่ 30 ได้เฉลี่ยอยู่ในช่วง 13.17%–18.35% ซึ่งสามารถลดได้ต่ำกว่าผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าและชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Abstract

This study aimed to isolate the halo-tolerant *Bacillus*, produce a powder seedling product and apply to water quality improvement in shrimp aquaculture. Five strains of halo-tolerant *Bacillus* were obtained from sediment and wastewater. They showed heterotrophic nitrifying –aerobic denitrifying characters and they were identified as *Bacillus pumilus* (TS23), *B. subtilis* (TW24 and TW34) and *B. tequilensis* (BR001 and BR002). The strains grew well with the optimum salinity and pH of 0.5–3% NaCl and 7–7.5, respectively. *Bacillus* strains TS23, BR001, and BR002 exhibited high efficiency of inorganic nitrogen removal in synthetic wastewater. The 30:70 mixture ratio of 2 strains (*B. tequilensis* BR001 and BR002) showed the highest cell viability rate of 10^8–10^9 CFU/mL and also the highest ammonia, nitrite, and nitrate removal rates (82.30%, 70.57%, and 26.07%, respectively) in the 5-day experiment using Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured water. Wood sawdust was the most suitable carrier to produce powder seedling form mixing strains (1:1 ratio). The efficiencies of *Bacillus* powder seedling under 7 days in ammonia, nitrite andnitrate removal in a range of 98.62–99.52%, 56.15–99.60% and 43.08–51.96%, respectively. And resulting in the amount of orthophosphate, total suspended solids and COD were reduced at 81.91%, 81.31% and 74.42%, respectively. The products stored in room temperature, its suitable condition for growth abilities of *Bacillus* from 2.87×10^9 to 3.50×10^9 CFU/g in 6 months. The *Bacillus* powder seedling (BR001: BR002 mixture) from this study was later compared with commercial products to determine the efficiency of water quality improvement after 30 days. The results indicated no significant difference ($p>0.05$) in reducing the amount of ammonia, nitrite, nitrate, and COD. That was decreased at 98.13%, 85.40%, 88.60% and 34.89%, respectively. However, the amount of total suspended solids and orthophosphate in the experimental ponds using *Bacillus* seedling product were significantly less ($p<0.05$) compared to ponds applying commercial product. The total suspended solids were lessening on day 30 at 36.82% and the value of orthophosphate decreased intake from day 25 to day 30 was in the range of 13.17%–18.35%.

6. บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

6.1 บทนำ

การเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะการเลี้ยงกุ้ง เป็นหนึ่งในภาคประมงที่สำคัญของประเทศไทย เพราะมีปริมาณการผลิต การบริโภค และการส่งออกปริมาณมากในแต่ละปี นำรายได้เข้าสู่ประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท (สถิติการประมงแห่งประเทศไทย, 2560) ระบบการเลี้ยงกุ้งของประเทศไทยในปัจจุบันได้พัฒนาจากระบบการเลี้ยงแบบพึ่งพิงธรรมชาติ มาเป็นการเลี้ยงแบบพัฒนาหรือแบบหนาแน่น (super-intensive) โดยเน้นการเพิ่มปัจจัยการผลิต ได้แก่ จำนวนลูกกุ้ง และปริมาณอาหารต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ในสัดส่วนที่มากเกินไป ทำให้เกิดการสะสมของของเสียในระบบเลี้ยง และเกิดการเสียสมดุลของกระบวนการทางชีวภาพในระบบเลี้ยงที่มาจากการขับถ่ายของกุ้งในปริมาณมากและเกิดจากอาหารที่กุ้งกินไม่หมด ซึ่งของเสียที่เป็นปัญหาสำคัญดังกล่าว ได้แก่ สารอนินทรีย์ไนโตรเจน (แอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท) ออร์โธฟอสเฟต และสารแขวนลอย เป็นต้น โดยเฉพาะแอมโมเนียและไนไตรท์ที่มีความเป็นพิษโดยตรงต่อกุ้ง ทำให้กุ้งอ่อนแอ เครียด ขัดขวางการลอกคราบและการใช้ออกซิเจน ติดโรค และตายในที่สุด (Achuthan *et al*., 2006) ส่วนไนเตรทและออร์โธฟอสเฟตเป็นสารอาหารที่สำคัญของแพลงก์ตอนพืช ทำให้แพลงก์ตอนพืชเจริญเติบโตได้ดี (bloom) โดยเฉพาะถ้าเป็นกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) จะให้โทษมากกว่าประโยชน์ เพราะขัดขวางการใช้ออกซิเจนของกุ้งและบางชนิดสร้างสารชีวพิษ (biotoxin) ที่เป็นอันตรายต่อกุ้งและผู้บริโภค นอกจากนี้การย่อยสลายสารออร์โธฟอสเฟตและแพลงก์ตอนพืชที่ตายลงของแบคทีเรีย ส่งผลให้มีอัตราการใช้ออกซิเจนในน้ำสูง ทำให้กุ้งขาดออกซิเจน และอาจตายทั้งหมด จะเห็นได้ว่าปัญหาการสะสมของของเสียในระบบเลี้ยง ส่งผลกระทบในเชิงลบสูงมากต่อการเลี้ยงกุ้ง ดังนั้นการรักษาระดับความสมดุลของกระบวนการทางชีวภาพในระบบการเลี้ยงกุ้ง จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง

ในแหล่งน้ำหรือแหล่งเลี้ยงกุ้งจะมีเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย (heterotrophic bacteria) ตามธรรมชาติ ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์กลุ่มแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท โดยกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพดีในการใช้สารอินทรีย์ในแหล่งน้ำ ได้แก่ *Bacillus* และยังมีรายงานว่า *Bacillus* มีคุณสมบัติเป็นเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (heterotrophic nitrifying bacteria) หรือ เฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟเออร์ (heterotrophic nitrifier) ที่มีความสามารถในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนโดยการเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนไตรท์และไนเตรทตามกระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) และ *Bacillus* ยังสามารถนำแอมโมเนียไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนให้กับเซลล์ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Bacillus* สามารถเปลี่ยนไนเตรทให้กลายเป็นแก๊สไนโตรเจนอิสระด้วยกระบวนการดีไนตริฟิเคชันแบบใช้อากาศ (aerobic-denitrification) ได้ด้วย ในปัจจุบัน *Bacillus* ได้รับการพัฒนาและนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำในการเลี้ยงสัตว์น้ำ ทั้งสัตว์น้ำจืดและน้ำเค็ม แต่ประสิทธิภาพในการปรับปรุงคุณภาพน้ำของ *Bacillus* เหล่านั้นอาจไม่สูงมากนัก เพราะสามารถนำไปใช้ได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม เข้าข่ายอรรถประโยชน์ครอบจักรวาล ทั้งที่

ในความเป็นจริงสายพันธุ์ *Bacillus* แต่ละชนิดชอบความเค็มที่แตกต่างกัน ถึงแม้ว่า *Bacillus* สายพันธุ์น้ำจืดบางชนิดสามารถทนอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูง แต่บทบาทหน้าที่และความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ย่อมด้อยกว่าสายพันธุ์ที่มีแหล่งกำเนิดจากทะเล นอกจากนี้ข้อดีอีกประการหนึ่งของ *Bacillus* คือ ความสามารถในการสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เพื่อรักษาและยืดอายุของเซลล์ จึงทำให้สามารถพัฒนา *Bacillus* เป็นผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อในรูปชนิดผงที่มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน สะดวกต่อการใช้ และการขนส่งได้มากขึ้น สำหรับผลการทดลองการผลิตผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมชนิดผงที่มี *Bacillus* 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. tequilensis* สายพันธุ์ BR001 และ BR002 ในสัดส่วน 70:30 ผสมกับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรในสัดส่วน 1:1 คือ ขี้เลื่อยบด ใช้สำหรับปรับปรุงคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ในระยะเวลา 30 วัน ส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียไนไตรท์ และไนเตรทลดลงได้ดีที่สุดเท่ากับ 98.13, 85.40 และ 88.60% ตามลำดับ สำหรับปริมาณออร์โธฟอสเฟตลดลงได้มากที่สุดเท่ากับ 18.35% รวมถึงค่า COD ที่ลดลงเท่ากับ 34.89% และปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดมีการลดลงเฉลี่ย 36.82% ดังนั้น กล่าวได้ว่าการคัดแยกและพัฒนาสายพันธุ์ *Bacillus* ทนเค็มผสมสำหรับนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเลี้ยงกุ้งที่ต้องเลี้ยงในน้ำกร่อยหรือน้ำเค็ม เพื่อลดปัญหาการสะสมของเสีย และปรับสมดุลของกระบวนการทางชีวภาพในระบบเลี้ยง อันจะนำมาซึ่งผลผลิตกุ้งที่คาดหวัง สร้างความมั่นคงทางด้านรายได้ให้กับเกษตรกร และสร้างความยั่งยืนให้กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งของประเทศต่อไป

6.2 วัตถุประสงค์

1) คัดแยกและจัดจำแนก *Bacillus* ทนเค็มที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้ง

2) สร้างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้ง

3) เปรียบเทียบประสิทธิภาพการปรับปรุงคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งระหว่างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มที่ผลิตขึ้นกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า

6.3 สรุป

จากผลการวิจัยนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรีย *Bacillus* ทนเค็มสายพันธุ์ TS23, TW24, TW31, TW34, BR001 และ BR002 จากตัวอย่างตะกอนดินและน้ำเสีย ซึ่งเชื้อเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็น Heterotrophic nitrifying–aerobic denitrifying bacteria จากการศึกษายีน 16S rDNA พบว่า แบคทีเรียนี้มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus pumilus* (TS23), *B. subtilis* (TW24 และ TW34) และ *B. tequilensis* (BR001 และ BR002) ส่วนระดับความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus* spp. อยู่ที่ 0.5–3% NaCl และ pH อยู่ในช่วง 7–7.5 โดยสายพันธุ์ TW24, TW34, BR001 และ BR002 ปริมาณเซลล์ 1% มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำเสียสังเคราะห์ในเวลา 7 วันมากที่สุด ทั้งนี้เชื้อ 5 สายพันธุ์สามารถลดปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทได้ในช่วง 84.7–86.5%, 78.8–83.1% และ 66.2–73.3% ตามลำดับ ซึ่งสายพันธุ์ TS23, BR001 และ BR002 สามารถกำจัดสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อได้มากที่สุด ตั้งแต่วันที่ 4 ถึงวันที่ 7 โดยลดแอมโมเนียได้เฉลี่ยเท่ากับ 63.5%, 64.1% และ 63.4% ตามลำดับ ลดไนไตรท์ได้เฉลี่ยเท่ากับ 66.0%, 71.8% และ 63.4% ตามลำดับ และลดไนเตรทได้เฉลี่ยเท่ากับ 69.1%, 62.5% และ 45.6% ตามลำดับ นอกจากนี้ เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถลดปริมาณออร์โธฟอสเฟตอยู่ในช่วง 45.5–69.1% สำหรับสัดส่วนที่เหมาะสมที่สุดของกล้าเชื้อผสม *Bacillus* BR001 ต่อ BR002 เท่ากับ 70:30 ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 1 ถึงวันที่ 3 ของการทดลองเฉลี่ยเท่ากับ 10^8–10^9 CFU/mL และประสิทธิภาพของกล้าเชื้อผสม BR001:BR002 ในการบำบัดน้ำจากการเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 5 วัน สามารถลดปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทได้มากที่สุดเท่ากับ 82.30%, 70.57% และ 26.07% ตามลำดับ และเมื่อศึกษาวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรที่เหมาะสมในการผลิตกล้าเชื้อชนิดผง พบว่า ขี้เลื่อยบดเหมาะสมต่อการเป็นสารพาในการสร้างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมในสัดส่วน 1:1 ซึ่งประสิทธิภาพการบำบัดน้ำของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมชนิดผงในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 7 วัน สามารถลดแอมโมเนียได้เฉลี่ยเท่ากับ 98.62–99.52% ลดไนไตรท์ได้เฉลี่ยเท่ากับ 56.15–99.60% ลดไนเตรทได้เฉลี่ยเท่ากับ 43.08–51.96% และสามารถลดปริมาณออร์โธฟอสเฟต สารแขวนลอยทั้งหมด และค่า COD ได้เท่ากับ 81.91%, 81.31% และ 74.42% ตามลำดับ สำหรับการเก็บรักษา

ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมชนิดผงที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่าสามารถรักษาจำนวนเซลล์ได้สูงกว่าที่อุณหภูมิ 4 °C ภายในระยะเวลา 6 เดือน โดยมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตเฉลี่ยอยู่ในช่วง 2.87×10^9 ถึง 3.50×10^9 CFU/g หลังจากทำการทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมชนิดผงและผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) เป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่า ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมสามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้ดีในช่วงวันที่ 5 ถึงวันที่ 15 เฉลี่ยเท่ากับ 76.80–98.13% โดยมีแอมโมเนียคงเหลือในระบบ 0.09±0.04 mg-N/L และในวันที่ 30 มีปริมาณไนไตรท์และไนเตรทเหลือเฉลี่ย 0.05±0.01 และ 0.17±0.02 mg-N/L ตามลำดับ โดยพบว่าสามารถลดปริมาณไนไตรท์และไนเตรทได้ดีที่สุดในวันที่ 10 และวันที่ 25 เท่ากับ 85.40% และ 88.60% ตามลำดับ โดยมีปริมาณไนไตรท์ และไนเตรทสะสมในระบบเท่ากับ 0.02±0.01 และ 0.05±0.04 mg-N/L ส่วนค่า COD ลดลงในวันที่ 5 ถึงวันที่ 30 เหลือเฉลี่ย 58.83±4.56 mg/L (ลดลง 34.89%) ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพการลดปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท และค่า COD ระหว่างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่กลับพบว่าผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมสามารถลดปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดในวันที่ 30 ได้มากที่สุดเท่ากับ 9.67±0.24 mg/L (36.82%) นอกจากนี้สามารถลดปริมาณออร์โธฟอสเฟตในวันที่ 25 ถึงวันที่ 30 เฉลี่ยอยู่ในช่วง 13.17%–18.35% ทำให้ปริมาณออร์โธฟอสเฟตเหลือในระบบเท่ากับ 12.60±0.05 mg-P/L ซึ่งเหลือน้อยกว่าการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าและชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมที่คัดแยกได้จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถนำมาใช้ทดแทนหรือเทียบเท่ากับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าได้

7. ภาคผนวก

7.1 แนบสำเนาบทความที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว

Phatthongkleang, T., Sangnoi, Y., O–Thong, S., Uppabullung, A. and Keawtawee, T. 2019. The efficiency of *Bacillus* spp. to remove ammonia in shrimp aquaculture. Wichcha Journal 38(1): 1–15.

Indexed in TCI

The Efficiency of *Bacillus* spp. to Remove Ammonia in Shrimp Aquaculture

Thossaporn Phatthongkleang[1], Yutthapong Sangnoi[1*], Sompong O-Thong[2], Arnon Uppabullung[1] and Teeyaporn Keawtawee[1]

Abstract

Salt-tolerant *Bacillus* was used to eliminate ammonia in shrimp aquaculture wastewater. *Bacillus* strains were isolated from sediment and water collected from shrimp farms and domestic wastewater. Ammonium oxidizing ability was screened by Griess-Ilosvay method. Five isolates were identified as *Bacillus* spp. with salt requirement within the range of 0-40 g/L NaCl and an optimal pH of 7. *Bacillus* strains TS41, TW31, HS12, HW34 and ES33 exhibited preliminary ammonium removal efficiency on HNM medium for 84.21%-94.86%. Improved ability of synthesized shrimp wastewaters was determined by applying 1% and 5% cell suspension for 7 days. SF experiment with 1% cell suspension of ES33 showed highest ammonium removal of 66.38%, while the results of other treatments showed no significance ($p > 0.05$). SNF experiment, all five *Bacillus* strains showed ammonium removal of 78-96% at day 7. NSF experiment, ES33 provided the highest ammonium removal efficiency of 1% cell suspension at day 7 for 93.14%. The amounts of nitrite and nitrate were presented in all experiments and removed by *Bacillus* species. The results demonstrated the process of nitrification-denitrification reaction. Consequently, our *Bacillus* strains may propose as heterotrophic nitrification-aerobic denitrification species.

Keywords: Salt-tolerant *Bacillus*, Shrimp aquaculture wastewater, Ammonium removal efficiency, Cell suspension, Nitrification-denitrification

[1] Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University.

[2] Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University.

[*] Corresponding author e-mail: yutthapong.s@psu.ac.th

Received: 8 March 2019, Revised: 30 April 2019, Accepted: 15 May 2019

Introduction

Ammonia is a natural component of the nitrogen cycle in the ecosystem because of the substantial amounts of uneaten feedstuff and faeces generated in the process (Lin and Wu, 1996; Read and Fernandes, 2003), which causes rapid accumulation of ammonia in the water. Thus, ammonia induces a large variety of physiological disturbances and immunosuppression on aquatic animals. It is toxic to aquatic animals.

Nitrogen-containing compounds released into the environment can create serious problems, such as eutrophication in river and coastal areas (Fennesy and Cronk, 1997). Furthermore, nitrite accumulation was a critical issue inherent in the aquaculture industry, because coastal aquaculture such as marine shrimp and sea bass are important to the economy of Thailand (Paungfoo *et al*., 2007). However, a more serious risk is that the toxicity of ammonia could cause outbreak of shrimp diseases and ultimately result in huge economic losses (Cheng and Chen, 1999). Hence, treatment of culture water to decrease the rapid accumulation of ammonia for such an activity has become increasingly crucial.

There are three mechanisms to remove ammonia, nitrite, and nitrate in aquaculture, including physical, chemical and biological methods (Wang *et al*., 2008), but other physical and chemical methods are not able to remove nitrite completely. Typically, adding of chemical substances is totally accumulative in shrimp culture pond and environment (Charoendat *et al*., 2016). The best way to accomplish is through the natural biological mechanism which occurs without pollution and residues (Li *et al*., 2005). Usawakesmanee (2016) suggested that the treatment of wastewater by biological method helps to reduce treating cost.

The biological process that has the ability to transform ammonia to nitrite and further transform nitrite to nitrate is called the nitrification process which is performed by nitrifying bacteria. In the past, nitrifying bacteria was well known as autotrophic bacteria such as *Nitrobacter* and *Nitrosomonas* (Zhang *et al*., 2012; Chankaew *et al*., 2018). Despite nitrogen's transformative ability to nitrify bacteria, they have slow growth and less competition when compared with other heterotrophic bacteria (Sirianuntapiboon *et al*., 2015; Chankaew *et al*., 2018). Nitrogen content in wastewater has large decrease by activities of heterotrophic bacteria, nitrifying bacteria and denitrifying bacteria. These organisms have ability to transform nitrogen compounds as energy source and cell precursor (Sirianuntapiboon *et al*., 2015). Recently, heterotrophic bacteria capable of removing ammonia, nitrite and nitrate have been reported. Some of them can reduce nitrate

to free nitrogen under aerobic conditions via aerobic-denitrification process. Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria such as *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. and *Alcaligenes faecalis* were isolated and their nitrogen removal efficiency determined by several research studies (Joo *et al*., 2005; Wan *et al*., 2011; Yang *et al*., 2011). One of the promising bacterium used for ammonium removal or wastewater treatment is *Bacillus*. *Bacillus* is widely used in the aquaculture industry to improve water quality, promote growth and prevent diseases of aquatic animals (Vaseeharan and Ramasamy, 2003; Chankaew *et al*., 2018). In case of nitrification-denitrification process, *Bacillus* could perform not only heterotrophic nitrification, but also aerobic denitrification. All *Bacilli* are aerobic heterotrophs, implying that they can simultaneously work on nitrification and denitrification (Gupta and Gupta, 2001). Moreover, *Bacillus* species are capable of using nitrate and nitrite as alternative electron acceptors when oxygen is absent (Seenivasagan *et al*., 2017). Other unique characteristics of *Bacillus* are rapid growth, good competition, variety of carbon and nitrogen utilization, salt tolerance, and endo-spore formation (Rosovitz *et al*., 1998; Suharti and Vries, 2004; Manzo *et al*., 2013; Meeboon and Saimmai, 2019). Isolation and understanding of characteristics of *Bacillus* in the nitrification-denitrification process is very important in order to develop and apply them for wastewater treatment. One desirable property for brackish and marine aquaculture treatment is salt-tolerant ability. The bacteria must able to survive and provide good performance in saline conditions. Therefore, the aims of this study are to isolate salt-tolerant *Bacillus* and to determine the efficiency of ammonium removal in wastewater from marine shrimp aquaculture.

Materials and Methods

1. Sample collection

Sediment and water samples were collected from marine shrimp farms and domestic wastewater in Pak Meng Beach (7°30’ N and 99°19’ E), Trang Province, Thailand. Samples were kept in sterile polyethylene bags and stored at 4 °C for further study.

2. Isolation and screening of *Bacillus*

Each 1 g or 1 ml of samples was enriched into 100 ml of nutrient broth supplemented with 2% NaCl and an enrichment medium (peptone 5 g, beef extract 3 g, sea salt 2 g, shrimp feed 1g and H_2O 1000 ml) at 35 °C and shaken at 170 rpm for 24-48 hours. One milliliter of the suspended liquid was serially diluted from 10^{-1} to 10^{-8} in a tube containing 9 ml of distilled water. Suspension tubes were treated in

an 80 °C water bath for 10 min. Then 0.1 ml of diluted solution was taken from each tube and spread on nutrient agar supplemented with 2% NaCl (Zhao *et al*., 2017). Gram positive, rod shape and endo-spore forming colony was selected and transferred to fresh medium. Purified isolates of *Bacillus* were obtained by repeated streaking on fresh agar plates. Biochemical characteristics, catalase and oxidase test of *Bacillus* were examined.

3. Preliminary testing for ammonium oxidizing ability

One milliliter of *Bacillus* inoculum was transferred to the nutrient broth (NB) medium (peptone 5 g, beef extract 3 g, ammonium sulfate 15 g and H_2O 1000 ml) and incubated at 35 $^{\circ}C$ for 14 days. Nitrite-oxidizing reaction was tested by Griess-Ilosvay method (Lu *et al*., 2012). Positively tested suspensions with red color were further isolated by spreading on nutrient agar medium.

4. Preliminary testing for heterotrophic nitrifying-denitrifying characteristic

Bacillus spp. were incubated in a 250 ml serum bottle containing 100 ml of heterotrophic nitrification medium (HNM) ($(NH_4)_2SO_4$ 0.66 g, sodium succinate 4.72 g, KH_2PO_4 0.50 g, Na_2HPO_4 0.50 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.20 g, NaCl 20.00 g and H_2O 1000 ml) (Zhang *et al*., 2012). The incubation was performed at 30 °C on a rotary shaker at 160 rpm for 7 days. The concentration of ammonium nitrogen (NH_4^+-N), nitrite (NO_2^--N) and nitrate (NO_3^--N) were determined on day 7.

5. Salt requirement and optimal pH on growth

One milliliter of cell suspension was cultured in a tube with 10 ml of NB medium. The pH of NB was varied at 3, 5, 7, 9 and 11. Salt requirement trial was set at 0, 10, 20, 30 and 40 g/L (ppt). Cultivation tubes were shaken at 170 rpm for 24 hrs. Growth profile of *Bacillus* was determined by optical density (OD) at 600 nm (Song *et al*., 2011; Seenivasagan *et al*., 2017).

6. Shrimp wastewater preparing

Four experiments of different shrimp wastewaters were designed. Experimental wastewaters were devised as sterilized and non-sterilized treatments. Each of them was exactly separated as fermented and non-fermented with shrimp feed. For fermented trials, shrimp wastewaters were synthesized by fermentation of 1% commercial shrimp feed for 3 days. The synthesized shrimp wastewaters are shown in Table 1.

7. Efficiency of ammonium removal

Bacillus strains grown in Heterotrophic nitrification medium and preliminary showed high efficiency of ammonium removal and were further studied for inorganic nitrogen removal of four synthesized shrimp wastewaters (Table 1). Cell

suspensions of *Bacillus* spp. were prepared in NB until 10^7 CFU/ml. In each experimental study, cell suspension used both of 1% (50 ml) and 5% (250 ml) in 5 L of prepared wastewaters. All designed experiments and control treatment (CTRL) were performed for 7 days in an aerated system. Each CTRL treatment was same prepared as that experiments but no added bacterial cell suspension. Every day 4 and day 7, wastewaters were sampled and examined for the concentration of ammonia, nitrite and nitrate followed by the standard colorimetric method (Strickland and Parsons, 1972).

Table 1 Synthesized shrimp wastewaters for ammonium removal study

Experiment	Sterilization (121 °C, 15 mins)	Fermentation (1% shrimp feed, 3 days)
1-SF	sterilized	fermented
2-SNF	sterilized	non-fermented
3-NSF	non-sterilized	fermented
4-NSNF	non-sterilized	non-fermented

8. Statistics analysis

Results were shown as the average of at least three independent experiments and were presented as means±SD (standard deviation of means). All statistical analyses were carried out by one-way ANOVA. That performed using the software package SPSS and minimum significant differences were calculated by the Duncan multiple range test ($p < 0.05$).

Results

1. Isolation and characterization of *Bacillus*

Thirty-three isolates were proposed as *Bacillus*. Then, 24 out of 33 isolates exhibited positive results with Griess-Ilosvay testing. All 24 isolates were preliminarily determined for nitrogen removal (NH_3, NO_2^- and NO_3^-) on HMN medium. Only 5 strains, including TS41, TW31, HS12, HW34 and ES33, showed high ammonium removal efficiency of more than 90% (94.86%, 93.94%, 93.17%, 90.65% and 84.21%, respectively) (Figure 1). These 5 strains were able to transform ammonia to nitrite, but only minimally continue to nitrate. Figure 2 shows ability of strains TS41, TW31, HS12, HW34 and ES33 on nitrite production of 11.55, 18.76, 6.43,

0.98 and 16.15 mg-N/L, respectively and nitrate production of 2.09, 2.11, 1.31, 1.73 and 1.65 mg-N/L, respectively.

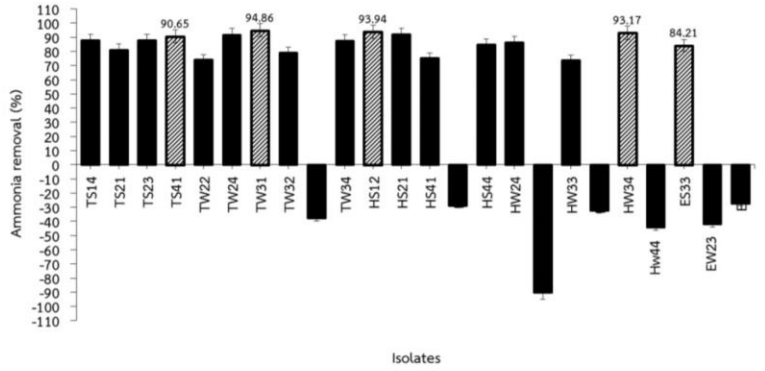


Figure 1 Ammonium oxidizing ability of *Bacillus* spp. on HNM medium. Values are means±SD (error bars) for three replicates.

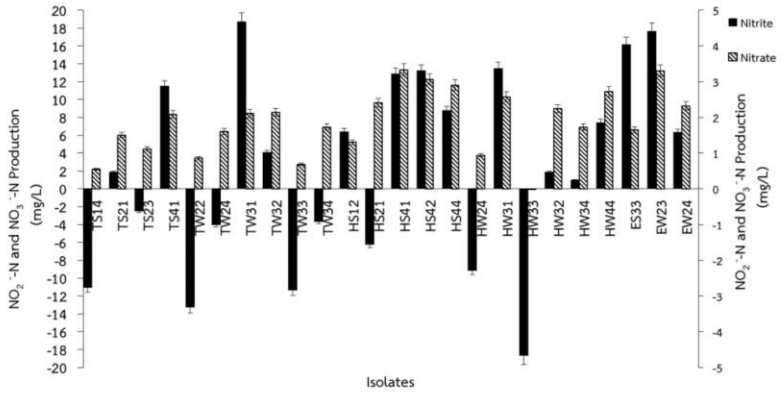


Figure 2 Nitrite and nitrate production abilities of *Bacillus* spp. on HNM medium. Values are means±SD (error bars) for three replicates.

2. Salt requirement and optimal pH on growth of *Bacillus*

The results showed that five isolated *Bacillus* strains have slight growth at pH 3-5. They have optimal growth at pH 7 and then growth slightly decreases to a pH of 9-11 (Figure 3). Our *Bacillus* isolates can grow in wide spectra

of salt concentration of 0-40 g/L NaCl. Whereas strain, HW34, had slight growth at 0-10 g/L NaCl, but it displayed maximum growth when the salt concentration rose to 20-40 g/L NaCl (Figure 3).

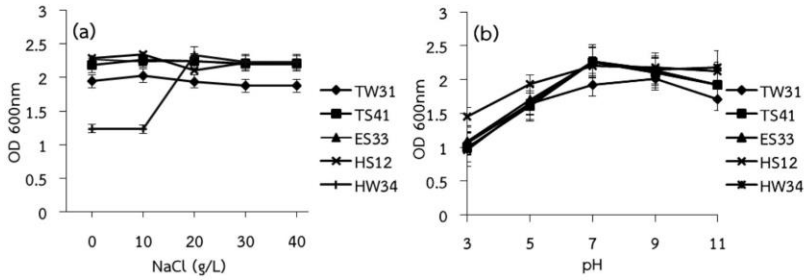


Figure 3 Growth profiles of *Bacillus* spp. under different salinity (a) and pH (b)
Values are means±SD (error bars) for three replicates.

3. Efficiency of *Bacillus* on ammonium removal of synthesized shrimp wastewater

3.1 Ammonium removal efficiency

Which all five *Bacillus* strains were studied for treatment in four different experiments of synthesized shrimp wastewaters as shown in Table 1. Each *Bacillus* cell suspension of 1% and 5% was applied to synthesized wastewaters and was aerated for 7 days. The result of experiment 1 (SF) showed that 1% and 5% cell suspension adding all five *Bacillus* provided slight ammonium removal at day 4 (initial ammonia was 3.61±0.04 mg-N/L). The amount of ammonium removed was about 53-66% until day 7, whereas removal showed no significance ($p > 0.05$) of all strains and control treatments (Figure 4a). Experiment 2 (SNF), 1% cell suspension of all five *Bacillus* strains showed ammonium removal ability of 78-96% at day 7 displaying significant ammonium removal ability 5% higher than cell suspension and control treatments. Ammonium removal capabilities of strains TW31, ES33 and HW34 (1% cell suspension) were fast and high after 4 days of operation (initial ammonia was 2.15±0.05 mg-N/L). In contrast, 5% cell suspension of strains TW31, ES33, HW34 and HS12 at day 4 exhibited an increasing amount of ammonium. High volume addition of these bacteria may firstly produce ammonia during cell adjustment into new conditions. Then cells will be harmonized to wastewater and ammonium removal capability (Figure 4b). Experiment 3 (NSF), 1% cell suspension of strains ES33, HW34 and TS41 exhibited rapid ammonium removal at day 4 (initial

ammonia was 1.18±0.01 mg-N/L). Strain ES33 provided the highest ammonium removal efficiency of 1% cell suspension at day 4 and 7 for 90.01% and 93.14%, respectively. Ammonium removal of strains TW31 and TS41 showed effectiveness at 5% cell suspension at day 4 for 81.04% and 87.22%, respectively (Figure 4c). Strains TS41 and HS12 with 5% cell suspension have provided ammonium removal ability of 83.67% and 85.27%, respectively. Non-sterilized and non-fermented shrimp wastewater treatments (NSNF; experiment 4) showed overall ammonium removal efficiency with a range of 60-96% (initial ammonia was 1.18±0.01 mg-N/L). However, the results have no significance ($p > 0.05$) between 1% and 5% of cell suspension as well as dates of treatments (Figure 4d).

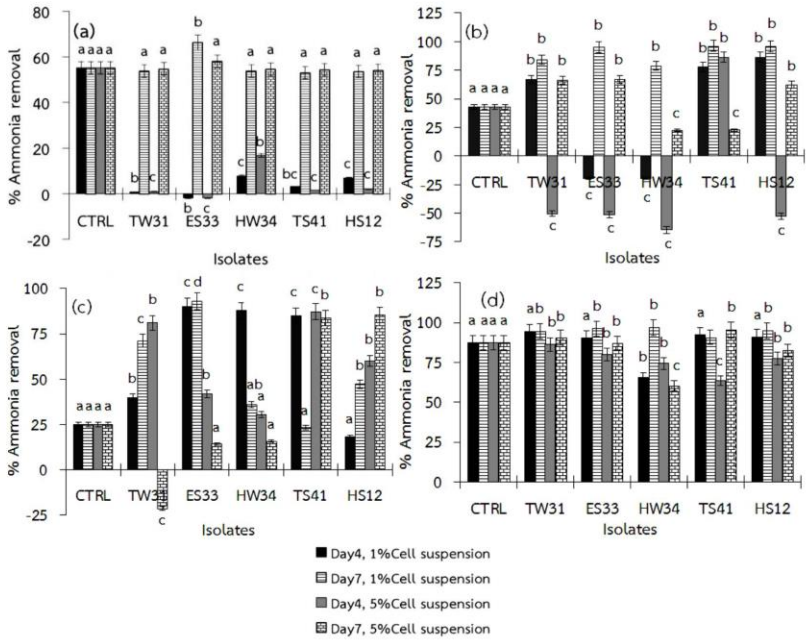


Figure 4 Ammonium removal efficiencies of *Bacillus* spp. (a), 1-SF; (b), 2–SNF; (c), 3-NSF; (d), 4-NSNF. Values represent the mean±SD (n=3). Values with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among them.

3.2 Nitrite removal efficiency and nitrate production

The initial nitrite concentration of synthesized wastewater was maintained at the low level (<1 mg-N/L). However, NO_2^- volumes of experiments

were produced and eliminated in the incubation process. In the SNF experiment, *Bacillus* strain TW31 with 5% cell suspension had removed nitrite volume at day 4 and 7, about 94.69% and 95.30%, respectively and showed higher than 1% cell suspension. Moreover, strains ES33, HW34, TS41 and HS12 demonstrated highest nitrite removal with 1% cell suspension at day 4 for 96.66%, 88.18%, 86.51 and 91.06%, respectively (Figure 5a). The control trial of SNF, in contrast, showed very low nitrite production and removal due to death of microorganisms in raw wastewater by autoclaving. Hence, the control trial of NSF showed nitrite removal of approximately 29%. This confirmed our assumption that live microorganism cells in raw wastewater played a role in nitrogen removal proficiency. *Bacillus* strains TW31, ES33, HW34, TS41 and HS12 with 1% cell suspension exhibited remarkably high nitrite removal for 87.40%, 93.70%, 92.12%, 68.50 and 96.06%, respectively (Figure 5b). Nitrate removal in the SF experiment showed highest ability for nitrate removal with 98.80% at day 4 (5% cell suspension) by strain HS12. Followed by 95.11% removal at day 4 (5% cell suspension) for strain TS41. While, other 3 isolates showed no significance ($p > 0.05$) for nitrate removal, except strain TW31 with 5% cell suspension (day 7), but had no nitrite removal ability (Figure 5c). The NSF experiment of nitrate result displayed 1% cell suspension of strains TW31, ES33, HW34 and HS12 and provided high nitrate removal at day 4 of 45.54%, 84.81%, 89.49% and 86.62%, respectively (Figure 5d). Whereas, strain TS41 exhibited the highest nitrate removal ability with 5% cell suspension after incubating for 7 days.

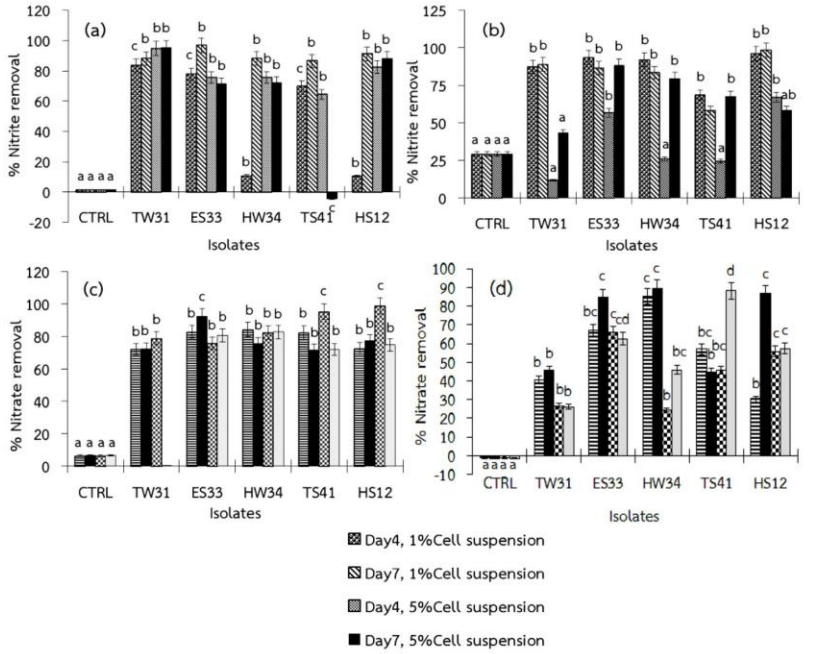


Figure 5 Nitrite (a-b) and nitrate (c-d) removal efficiencies of *Bacillus* spp. (a), SNF; (b), NSF; (c), SF; (d), NSF. Values represent the mean±SD (n=3). Values with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among them.

Discussion

Zhang *et al*. (2012) reported a similar study of growth and nitrification efficiency of other *Bacillus* spp. which displayed high growth at an initial pH of 7-8. Consistent with those reported in this present study, acidic (pH 5-6) or alkaline (pH 9-10) conditions were hazardous to the growth of *Bacillus*. The slightly alkaline environment was conducive to heterotrophic nitrification (Mevel and Prieur, 2000). Mevel and Prieur (2000) reported that *Bacillus* MS 30 had an optimal growth salinity of 16 g/L NaCl, and it could not grow when the salinity was increased to 28.50 g/L NaCl. Therefore, our five *Bacillus* strains should be proposed as salt–tolerant species with a wide range of salinity of at least 0-40 g/L NaCl. That salinity range is for optimal growth of coastal species (Sutin, 2010). This characteristic expands their application scope, regardless of the coastal and mariculture wastewaters containing high salinity.

The ammonium removal result of experiment 3 (NSF) of all *Bacillus* strains provided higher efficiency than other experiments. NSF experiment was non-sterilized; hence, it still consisted of indigenous bacteria (Ongsara *et al*., 2012). Moreover, fermented shrimp feed released organic compounds as nutrients serving bacteria. A combination of microorganisms between our *Bacillus* isolates and indigenous microorganisms showed co-working and synergy on ammonium elimination ability. While sterilized wastewater in experiment 2 (SNF), displayed no contaminated microorganisms in the trial. The result of this treatment showed lower ammonium removal efficiency than NSF treatment. This suggested that the ability of only *Bacillus* strains for ammonium removal was less, in contrast with the cooperation of microorganisms. Shrimp feed consists mainly of protein and phosphorus (Hmadhloo *et al*., 2013). It will release nitrogen and phosphorus compounds to serve *Bacillus* spp. and other microorganisms (Mclntosh *et al*., 2001; Dechmahitkul *et al*., 2007). Non-sterilized shrimp wastewater decomposed organic and inorganic matters by wild microorganisms (O-Thong *et al*., 2003). *Bacillus* strains were heterotrophic nitrification bacteria. They have efficiency for ammonium removal and a less complex nitrification process than autotrophic bacteria (Gupta and Gupta, 2001). Therefore, heterotrophic *Bacillus* may have high potential to be applied in aquaculture wastewater treatment.

In this study, our *Bacillus* isolates were found to be leading to aerobic nitrification. Yang *et al*. (2011) described that NO_2^- is converted to NO_3^- by the nitrification process and nitrate can be further converted to free nitrogen in aerobic denitrification reactions by heterotrophic nitrification bacterium. In our investigation, five *Bacillus* strains showed ammonium removal characteristics as well as the ability to transform ammonium to nitrite. Furthermore, they can eliminate and transform nitrite to nitrate as well as remove nitrate. However, free nitrogen gas that is reduced from nitrate in the operation system should be further analyzed.

Conclusions

Five *Bacillus* strains, including TW31, HS12, HW34, TS41 and ES33, were isolated based on the characteristic high efficiency ammonium removal ability. These *Bacillus* strains have the property of salt tolerance. When treating the synthesized shrimp wastewaters with 5 isolated *Bacillus*, 1% and 5% of cell starters were not effectively significant for ammonium removal ability. Indeed, 1% cell starter was suggested for use in order to reduce costs. Nitrite amounts were presented in all experiments and further highly removed reaching 96% by *Bacillus* species. In addition, nitrate volumes were produced in all experiments and then

removed almost 100% by our *Bacillus* isolates. Consequently, our five *Bacillus* isolates can be proposed as heterotrophic nitrification–aerobic denitrification species. Moreover, these five *Bacillus* strains can be used for removal of ammonia, nitrite and nitrate in shrimp aquaculture with saline conditions.

Acknowledgments

This research project was supported by Government Budget Grant of Thailand (NAT620128S).

References

Chankaew, S., O-Thong, S. and Sangnoi, Y. (2018). Nitrogen removal efficiency of salt-tolerant heterotrophic nitrifying bacteria. *Chiang Mai Journal of Science*, 45(1), 11-20.

Charoendat, U., Chumchareon, M. and Phumee, P. (2016). Effects of Creat (*Andrographis paniculata* Wall. Ex Nees) Extract on Growth Performance and Bacterial Disease Resistance in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). *RMUTSV Research Journal*, 8(2), 190-202.

Cheng, S.Y. and Chen, J.C. (1999). Haemocyanin oxygen affinity and the fractionation of oxyhemocyanin and deoxyhemocyanin for *Penaeus monodom* exposed to elevated nitrite. *Aquatic Toxicology*, 45(1), 35-46.

Dechmahitkul, W., Youkong, C., Poomputra, K., Akeprathumchai, S. and Mekvijitsaeng, P. (2007). Study on media formulation and production process of *Bacillus subtilis* spores for animal probiotics. *KMUTT Research and Development Journal*, 30(2), 251-259.

Fennesy, M.S. and Cronk, J.K. (1997). The effectiveness and restoration potential of riparian ecotones for the management of nonpoint source pollution, particularly nitrate. *Environmental Science and Technology*, 27(4), 285-317.

Gupta, A.B. and Gupta, S.K. (2001). Simultaneous carbon and nitrogen removal from high strength domestic wastewater in an aerobic RBC biofilm. *Water Research*, 35(7), 1714-1722.

Hmadhloo, S., Tanyaros, S. and Phumee, P. (2013). Effect of C : N ratio in integrated culture of White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) using biofloc technology. *RMUTSV Research Journal*, 5(1), 96-106.

Joo, H.S., Hirai, M. and Shoda, M. (2005). Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification–aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4. *Bioscience and Bioengineering*, 100(2), 184-191.

Li, P., Zhang, S. and Liu, D.L. (2005). Study progress of bacterial aerobic denitrification. *Microbiology*, 25(1), 60-64.

Lin, S.H. and Wu, C.L. (1996). Electrochemical removal nitrite and ammonia for aquaculture. *Water Research*, 30(3), 715-721.

Lu, Y., Wang, X., Liu, B., Liu, Y. and Yang, X. (2012). Isolation and characterization of heterotrophic nitrifying strain W1. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 20(5), 995-1002.

Manzo, N., Luccia, D.B., Isticato, R., Apuzzo, D.E., Felice, D.M. and Ric, E. (2013). Pigmentation and sporulation are alternative cell fates in *B. pumilus* SF214. *PLOS ONE*, 8(4), 1-12.

Mclntosh, D., Samocha, T.M., Jones, E.R., Lawrence, A.L., Horowitz, S. and Horowitz, A. (2001). Effects of two commercially available low-protein diets (21% and 3%) on water and sediment quality on the production *Litopenaeus vannamei* in an outdoor tank system with limited water discharge. *Aquaculture Engineering*, 25(2), 69-82.

Meeboon, N. and Saimmai, A. (2019). Characterization of biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* AS6 isolated from mangrove sediment in Phuket province. *Rajamangala University of Technology Srivijaya Research Journal*, 11(1), 67-83.

Mevel, G. and Prieur, D. (2000). Heterotrophic nitrification by a thermophilic *Bacillus* species as influenced by different culture conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(5), 465-473.

Ongsara, N., Sungpud, J. and Liamtong, S. (2012). Microbiological quality of drinking water at Nakhon Si Thammarat Rajabhat University. *Wichcha Journal Nakhon Si Thammarat Rajabhat University*, 31(2), 11-21.

O-Thong, S., Jiapakdee, R. and Intrasungkha, N. (2003). Wastewater generated from marine shrimp feed and its treatment potential by internal filter system. *Thaksin University Journal*, 6(1), 41-53.

Paungfoo, C., Prasertsan, P., Burrell, P.C., Intrasungkha, N. and Blackall, L.L. (2007). Nitrifying bacterial communities in an aquaculture wastewater treatment system using fluorescence in situ hybridization (FISH), 16S rRNA gene cloning, and phylogenetic analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(4), 985-990.

Read, P. and Fernandes, T. (2003). Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe. *Aquaculture*, 226(1-4), 139-163.

Rosovitz, M.J., Voskuil, M.I. and Chambliss, G.H. (1998). *Bacillus*. *Microbiology and Microbial Infections Systematic Bacteriology*, 2, 709-729.

Seenivasagan, R., Kasimani, R., Babalola, O.O., Karthika, A., Rajakumar, S. and Ayasamy, P.M. (2017). Effect of various carbon source, temperature and pH on nitrate reduction efficiency in mineral salt medium enriched with *Bacillus weinstephnisis* (DS45). *Groundwater for Sustainable Development*, 5, 21-27.

Sirianuntapiboon, S., Chaochon, A. and Chairoung, N. (2015). Efficiency of sequencing batch reactor (SBR) system for treatment of textile wastewater. *Wichcha Journal Nakhon Si Thammarat Rajabhat University*, 34(1), 1-25.

Song, Z.F., An, J., Fu, G.H. and Yang, X.L. (2011). Isolation and characterization of an aerobic denitrifying *Bacillus* sp. YX-6 from shrimp culture ponds. *Aquaculture*, 319, 188-193.

Strickland, J.D.H. and Parsons, T.R. (1972). *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Canada: Fishery Research Board.

Suharti, H.A. and Vries, S. (2004). NO reductase from *Bacillus azotoformans* is a bifunctional enzyme accepting electrons from menaquinoland a specific endo genous membrane-bound cytochrome C 551. *Biochemistry*, 43, 13487-13495.

Sutin, S. (2010). Water quality of mullet (*Liza oligolepis*, Bleeker, 1985) at Nakhon Si Thammarat bay, Nakhon Si Thammarat province. *Wichcha Journal Nakhon Si Thammarat Rajabhat University*, 29(2), 58-63.

Usawakesmanee, N. (2016). The Use of dried water hyacinth as a feed supplement for rearing Silver barb (*Puntius gonionotus*). *Wichcha Journal Nakhon Si Thammarat Rajabhat University*, 35(1), 70-78.

Vaseeharan, B. and Ramasamy, P. (2003). Control of pathogenic *Vibrio* spp. By *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*, 36(2), 83-87.

Wan, C., Yang, X., Lee, D.J., Du, M., Wan, F. and Chen, C. (2011). Aerobic denitrification by novel isolated strain using as nitrogen source. *Bioresource Technology*, 102(15), 7244-7248.

Wang, Y.B., Li, J.R. and Lin, J.D. (2008). Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. *Aquaculture*, 281, 1-4.

Yang, X.P., Wang, S.M., Zhang, D.W. and Zhou, L.X. (2011). Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. *Bioresource Technology*, 102(2), 854-862.

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

Zhao, C., Yan, X., Yang, S. and Chen, F. (2017). Screening of *Bacillus* strains from Luzhou-flavor liquor making for high-yield ethyl hexanoate and low-yield propanol. *Food Science and Technology*, 77, 60-66.

7.2 ผลการวิจัยส่วนที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์หรือตีพิมพ์ไม่ได้ แต่อยู่ในวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยประกอบไปด้วย

7.2.1 วิธีการ

1. การคัดแยกเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มจากธรรมชาติ

1) การคัดแยกแบบไม่มีการเพิ่มปริมาณเชื้อ

เก็บตัวอย่างน้ำและดินจากบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล ป่าชายเลน และบริเวณชายฝั่ง โดยตัวอย่างน้ำเก็บด้วยกระบอกเก็บน้ำ แล้วใส่ในขวดพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างน้ำปริมาตร 1 ลิตร ส่วนตัวอย่างดินเก็บด้วยท่อพีวีซี (corer) โดยกดท่อพีวีซีลงในดินให้ได้ระดับความลึก 5 เซนติเมตร จากพื้นผิว แล้วนำตัวอย่างดินที่ได้เก็บใส่ในถุงซิป จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างน้ำและดินลงในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็ง ก่อนนำมาคัดแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ

นำตัวอย่างดิน 1 กรัม หรือ ตัวอย่างน้ำ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางในหลอดทดลองด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อ (1.5% NaCl) ให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-1}–10^{-6} จากนั้นทำการแยกเชื้อด้วยวิธี Heat-shock โดยแช่หลอดทดลองในน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมินาน 10 นาที แล้วนำลงไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้องทันที จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างในแต่ละหลอดทดลองมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (2% NaCl) ด้วยวิธี Spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่มีลักษณะเป็นฝ้าสีขาวขุ่น ทำการแยกโคโลนีดังกล่าวด้วยห่วงเขี่ยเชื้อ แล้ว streak plate บนอาหารแข็ง NA (2% NaCl) ใหม่ ทำการ streak plate ซ้ำ ๆ จนได้เป็นโคโลนีเดี่ยว ทำการย้อมสีสปอร์ (spore stain) ด้วยวิธี Schaffer–Fulton's method เพื่อตรวจสอบการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ (จุรีย์รัตน์, 2552) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยการย้อมสีแกรมแล้วดูด้วยกลองจุลทรรศน์ (Purivirojkul *et al*., 2005)

2) การคัดแยกแบบมีการเพิ่มปริมาณเชื้อ

นำตัวอย่างดิน 1 กรัม หรือ ตัวอย่างน้ำ 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB (2% NaCl) ที่เติมอาหารเลี้ยงสัตว์น้ำ (อาหารเม็ด) บดละเอียด 1% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมาเจือจางในน้ำเกลือปราศจากเชื้อ (1.5% NaCl) ให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-1}–10^{-6} แล้วทำการแยกเชื้อด้วยวิธีการ Heat-shock และทำเชื้อให้บริสุทธิ์ตามวิธีการดังข้อ 1 ในหัวข้อ 1)

3) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการย้อมแกรม สังเกตการสร้างเอนโดสปอร์ และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี โดย *Bacillus* จะต้องเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่งหรือท่อน ให้ผล catalase test เป็นบวก และสร้างสปอร์ เมื่อได้เชื้อ *Bacillus* บริสุทธิ์แล้ว ทำการเก็บรักษาเซลล์ที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ทำการศึกษาต่อไป

2. การทดสอบการต้องการความเค็ม และ pH ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *Bacillus*

1) การต้องการความเค็มที่เหมาะสม

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้มาเลี้ยงในอาหาร NB ที่มีระดับของ NaCl 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0% ตามลำดับ โดยใช้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร/ฟลาสก์ ซึ่งทำการทดลองระดับความเค็มละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD 600 nm)

2) ค่า pH ที่เหมาะสม

นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ (จากผลการศึกษาในวงเล็บ 1) พร้อมปรับ pH ให้มีค่า 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10 และ 10.5 ตามลำดับ (Song *et al*., 2011; Seenivasagan *et al*., 2017) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร/ฟลาสก์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าการเจริญเติบโตของเชื้อที่ OD 600 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

3. การจัดจำแนกชนิด *Bacillus* ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

สกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *Bacillus* บริสุทธิ์ทั้งหมดที่คัดแยกได้ ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอทางการค้า Genomic DNA minikit (Geneaid) เพิ่มปริมาณชิ้นยีน 16S rRNA ด้วยเครื่อง Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ universal primers 27F (5'AGAGTTTGATCATGGCTCAG3') และ 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') จากนั้นทำผลิตภัณฑ์ PCR products ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอทางการค้า GF-1 AmbiClean Kit (PCR/Gel) (Vivantis) แล้วส่งวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอที่สถานวิจัยจีโนม และชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นำลำดับดีเอ็นเอที่ได้มาเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank/EMBL/DDBJ database ด้วย BLAST program และวิเคราะห์ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 6.06 (Tamura *et al*., 2013)

4. การทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำ

1) การเตรียมหัวเชื้อ *Bacillus*

นำ *Bacillus* ที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในอาหาร NB ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2% ปริมาตร 10 mL ต่อหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง และนำมาทำการขยายเชื้อให้มีปริมาณเชื้อ 10^8 CFU/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2% ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทดสอบประสิทธิภาพในขั้นตอนต่อไป

2) ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำในระดับฟลาสก์ (ระบบปิด)

นำหัวเชื้อ *Bacillus* เริ่มต้นจากข้อ 4 ในหัวข้อ 1) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร (1% v/v) ในฟลาสก์ที่บรรจุน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีส่วนประกอบ $(NH_4)_2SO_4$ 0.05 กรัม/ลิตร, KNO_3 0.00203 กรัม/ลิตร, $NaNO_2$ 0.026 กรัม/ลิตร และอาหารเม็ดสำเร็จรูปแบบจมสำหรับเลี้ยงกุ้ง 1.164 กรัม/ลิตร (ไนโตรเจนเท่ากับ 0.065%) ในปริมาตรน้ำทะเล 1 ลิตร ทำการปรับ pH ให้มีค่า 7.0 (O–Thong *et al*., 2003; Rajakumar *et al*., 2008) โดยปรับ pH ให้เท่ากับค่า pH ที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2 และทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 µm (Zokaeifar *et al*., 2014) เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำน้ำเสียสังเคราะห์ไปทำการตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำของเหลวส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทในวันที่ 0, 4 และ 7 ของการทดลอง ซึ่งทำการทดลองชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ จัดเป็นชุดควบคุม (ไม่มีการเติมหัวเชื้อ *Bacillus*) และชุดทดลอง (มีการเติมหัวเชื้อ *Bacillus*)

3) ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำในระดับขวดโหล (ระบบเปิด)

เนื่องจากกล้าเชื้อ *Bacillus* ที่ทำการศึกษาจะต้องนำไปใช้ระบบการเลี้ยงกุ้ง ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาในระบบเปิด โดยนำหัวเชื้อ *Bacillus* เริ่มต้นจากข้อ 4 ในหัวข้อ 1) โดยแบ่งเป็นปริมาตร 50 มิลลิลิตร (1% v/v) และ 250 มิลลิลิตร (5% v/v) เติมลงในในขวดโหล (ระบบเปิด) ที่บรรจุน้ำจากการเลี้ยงกุ้งจริงปริมาตร 5 ลิตร ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยเติมอากาศด้วยปั๊มลม จัดชุดควบคุม (ไม่มีการเติมหัวเชื้อ *Bacillus*) และชุดทดลอง (มีการเติมหัวเชื้อ *Bacillus*) เป็น 2 แบบ

แบบที่ 1 ชุดทดลองน้ำเลี้ยงกุ้งที่มีการฆ่าเชื้อ ประกอบด้วย ชุดควบคุม 1 ชุด ชุดทดลองที่เติมหัวเชื้อ 1% 1 ชุด และชุดทดลองที่เติมหัวเชื้อ 5% 1 ชุด (ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ)

แบบที่ 2 ชุดทดลองน้ำเลี้ยงกุ้งที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ 1 ชุด ประกอบด้วย ชุดควบคุม 1 ชุด ชุดทดลองที่เติมหัวเชื้อ 1% 1 ชุด และชุดทดลองที่เติมหัวเชื้อ 5% 1 ชุด (ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ)

วัดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำทุกวันที่ 0, 4 และ 7 ของการทดลอง ได้แก่ แอมโมเนีย (NH_3) ไนไตรท์ (NO_2^-) ไนเตรท (NO_3^-) ออร์โธฟอสเฟต (PO_4^{3-}) ออกซิเจนละลายน้ำ (DO) อุณหภูมิ (Temperature) และพีเอช (pH) (ตารางที่ 1) (Chankaew *et al*., 2018; Sangnoi *et al*., 2017)

5. การศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อ *Bacillus* ผสม

1) การเตรียมกล้าเชื้อ *Bacillus* BR001 และ BR002

นำเชื้อ *B. tequilensis* BR001 และ BR002 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำในการเลี้ยงกุ้งดีที่สุดมาเลี้ยงในอาหาร NB ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2% ปริมาตร 10 mL ต่อหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง และนำมาทำการขยายเชื้อให้มีปริมาณเชื้อ 10^8 CFU/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2% ปริมาตร 500 mL เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นในการศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมในขั้นตอนต่อไป

2) การทดสอบสัดส่วนของกล้าเชื้อที่เหมาะสม

นำกล้าเชื้อ *B. tequilensis* BR001 และ BR002 จากข้อ 5 ในหัวข้อ 1) มาศึกษาสัดส่วนกล้าเชื้อผสมที่ระดับ 30:70, 40:60, 50:50, 60:40 และ 70:30 โดยจัดเป็นชุดควบคุม (ไม่มีการเติมหัวเชื้อ) และชุดทดลอง (มีการเติมหัวเชื้อในสัดส่วนที่กำหนดข้างต้น) ชุดทดลองละ 3 ซ้ำ โดยเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 5 วัน ในขวดโหลที่บรรจุน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ทำการศึกษาในระบบเปิดที่มีการเติมอากาศตลอดเวลา จากนั้นวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ ปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท ทุกวันตลอดระยะเวลาการทดลอง (Liang *et al*., 2011; Yang *et al*., 2011; Lu *et al*., 2012)

6. การสร้างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสม

1) การเตรียมวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร

นำวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร 10 ชนิด ได้แก่ ขุยมะพร้าวบด แกลบบด ทะลายปาล์มบด รำข้าวบด ปลายข้าวบด ชานอ้อยบด ขี้เลื่อยบด แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเจ้า และแป้งข้าวเหนียว มาทำการบด โดยใช้เครื่องปั่นให้มีขนาดเล็กลงประมาณ 1 มิลลิเมตร ให้ได้น้ำหนักของวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรชนิดละ 2 กิโลกรัม บรรจุในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท จากนั้นนำมาทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใช้ไอน้ำร้อนแรงดันสูงที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น และเก็บวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรไว้ในที่มิดชิดเพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการสร้างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมต่อไป

ทั้งนี้ วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรได้มาจากการซื้อจากร้านค้าปลีก และรับอนุเคราะห์จากสถานีเพาะชำกล้าไม้ สำนักจัดการทรัพยากรป่าไม้ที่ 12 (นครศรีธรรมราช) และเกษตรกรสวนมังคุดอำเภอชะอวด จังหวัดนครศรีธรรมราช คุณวิโรจน์ บุญวงศ์

2) การสร้างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผง

นำสายพันธุ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมระหว่าง BR001 และ BR002 มาทำเป็นผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อผง โดยใช้สัดส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อผสม 70:30 โดยนำกล้าเชื้อเหลว (cell suspension) จากข้อ 5 ในหัวข้อ 1) มาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้ตกตะกอน จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อ (2% NaCl) แล้วผสมกับ Polyvinylpyrolidole (PVP) ความเข้มข้น 0.5% ใน

สัดส่วน 1:1 (v/v) เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 20 นาที ปรับความเข้มข้นให้มีปริมาณของเซลล์ 10^9 CFU/ml (สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณเซลล์กับค่า OD $_{600}$) (ดัดแปลงจาก Nimrat *et al.*, 2012) จากนั้นนำมาผสมด้วยเครื่องผสมกับวัสดุยึดเกาะที่ปราศจากเชื้อที่แตกต่างกัน 10 ชนิดจากข้อ 6 ในหัวข้อ 1) ในสัดส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน ใส่ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผงในถุงซิปหรือภาชนะปลอดเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผงปริมาตร 5% (w/v) มาทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ในระดับขวดโหล ปริมาตร 5 ลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยจัดเป็นชุดควบคุม (ไม่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผง) และชุดทดลอง (มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผง) ชุดทดลองละ 3 ซ้ำ โดยวัดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำทุกวัน ได้แก่ แอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท อุณหภูมิ ค่าพีเอช (pH) ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ปริมาณออร์โธฟอสเฟต ค่าซีโอดี (Chemical oxygen demand, COD) และปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด (Total suspended solid, TSS) (ตารางที่ 1) ในวันที่ 0, 4 และ 7

7. การศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสม

นำผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อผง *Bacillus* ทนเค็มผสมระหว่าง BR001 และ BR002 ในวัสดุยึดเกาะที่มีประสิทธิภาพการบำบัดน้ำดีที่สุดจากการทดลองข้อ 6 มาศึกษาอายุการเก็บรักษาทุกเดือน เป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยนำเชื้อผง 1 กรัม มาเลี้ยงในอาหาร NB (2% NaCl) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์ (cell viability) และความบริสุทธิ์ของเซลล์ (purity)

8. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำในการเลี้ยงกุ้งระหว่างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า

นำผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อผง *Bacillus* ทนเค็มผสมระหว่าง BR001 และ BR002 ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดจากผลการทดลองข้อ 6 มาทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนาไม (*Litopenaeus vannamei*) จริง โดยเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าจำนวน 1 ยี่ห้อ ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อผง 5% (w/v) สำหรับการทดลอง แบ่งบ่อการทดลองเป็น 2 แบบ ได้แก่ บ่อที่เป็นชุดควบคุม (ไม่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อในระหว่างการเลี้ยง) และบ่อที่เป็นชุดทดลอง (มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อในระหว่างการเลี้ยง) ทำการทดสอบเป็นระยะเวลา 1 เดือน โดยตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำ และมีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทุก ๆ 5 วัน ซึ่งคุณภาพน้ำที่ตรวจวัด ได้แก่ แอมโมเนีย ไนไตรท์ ไน เตรท อุณหภูมิ ค่าพีเอช ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ปริมาณออร์โธฟอสเฟต ค่าซีโอดี และปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด (ตารางที่ 1)

9. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของพารามิเตอร์คุณภาพน้ำต่าง ๆ ระหว่างชุดการทดลองและชุดควบคุม โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

ระหว่างกลุ่มทดลอง โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test และ T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (R Program)

ตารางที่ 1 วิธีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

Parameter	Method	Reference
Ammonia (mg–N/L)	Phenol–hypochlorite method	Strickland and Parsons (1972)
Nitrite (mg–N/L)	Colorimetric method	Strickland and Parsons (1972)
Nitrate (mg–N/L)	Cadmium reduction method	Strickland and Parsons (1972)
Orthophosphate (mg–P/L)	Ascorbic acid	Strickland and Parsons (1972)
Total suspended solid (mg/L)	Gravimetric method	APHA, AWWA and WEF (1995)
Chemical Oxygen Demand (mg/L)	Open reflux	Boyd and Tucker, (1992)
Dissolved oxygen (mg/L)	Dissolved oxygen Meter	–
pH	pH meter	–
Temperature (°C)	Thermometer	–
Salinity (ppt)	Salinity refractometer	–

7.2.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการคัดแยกเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มจากธรรมชาติ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี

จากการคัดแยกเชื้อ *Bacillus* ที่มีความสามารถในการทนเค็มสำหรับปรับปรุงคุณภาพน้ำจากการเลี้ยงกุ้ง พบว่า สามารถคัดแยก *Bacillus* จากตัวอย่างน้ำและดิน บริเวณบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล ป่าชายเลน และบริเวณน้ำทิ้งชายฝั่งชุมชน จำนวน 6 ไอโซเลท (TS23, TW24, TW31, TW34, BR001 และ BR002) ที่ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างแท่ง มีการสร้างเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ และหลังจากทำการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี (ตารางที่ 2) และผลการจัดจำแนกชนิดด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ยีน 16S rDNA พบว่าเชื้อ TS23 มีค่าความคล้ายคลึงกับ *Bacillus pumilus* ที่ระดับ 97% เชื้อ TW24 และ TW34 มีค่าความคล้ายคลึงกับ *B. subtilis* ที่ระดับ 99% และ 96% ตามลำดับ เชื้อ TW31 มีค่าความคล้ายคลึงกับ *B. cereus* ที่ระดับ 96% ในขณะที่ BR001 และ BR002 มีค่าความคล้ายคลึงกับ *B. tequilensis* เท่ากันที่ระดับ 99% (ตารางที่ 3) ซึ่งแสดงในแผนภูมิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ดังภาพที่ 1

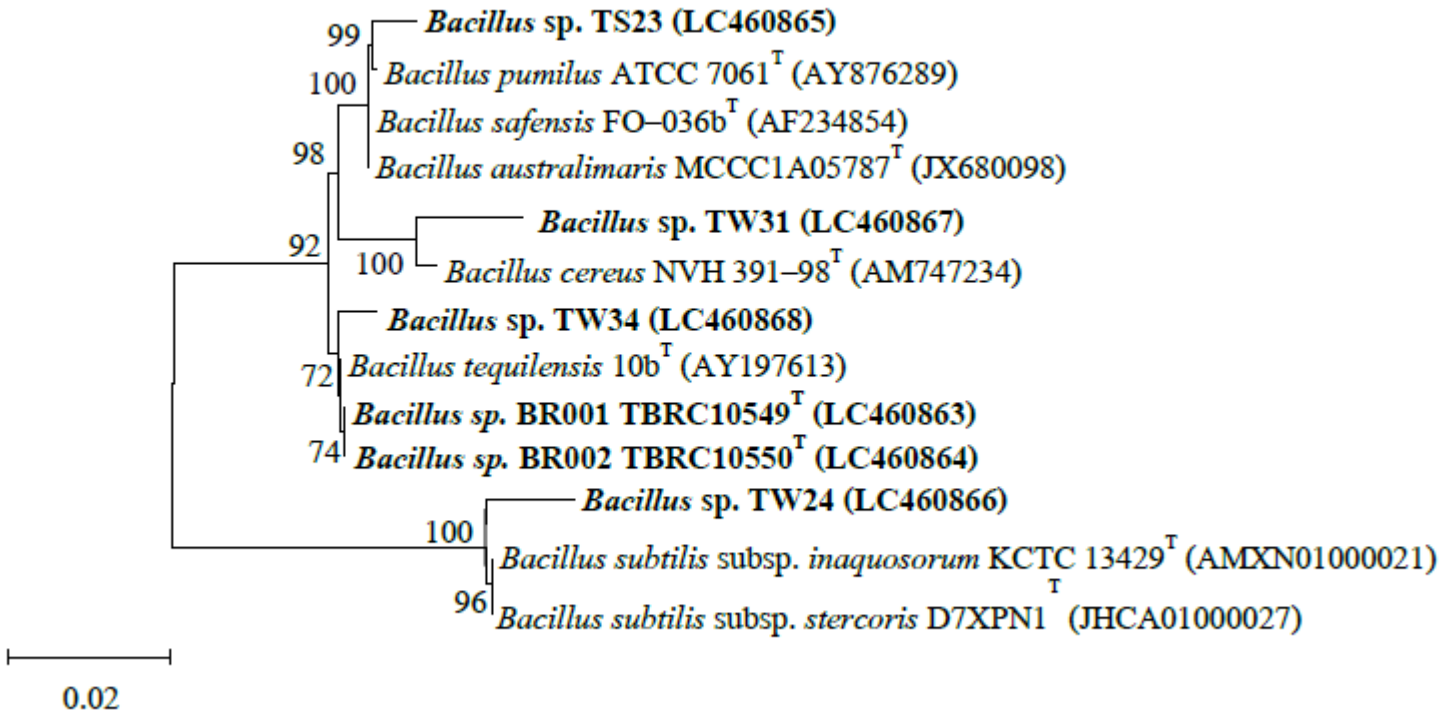
จากผลการทดลองความเค็ม และ pH เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และความสามารถในการลดแอมโมเนียของ *Bacillus* โดย pH ที่เหมาะสมต่อ Heterotrophic nitrifying bacteria จะอยู่ในช่วง 6–9 (ธงชัย, 2544) และมีค่าความเค็มในช่วงที่เหมาะสมของเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มอยู่ในช่วง 0–30 g/L NaCl (0–30 ppt) และจากการศึกษาชนิดของ *Bacillus* ที่คัดแยกได้โดยใช้ยีน 16S rDNA แสดงให้เห็นว่ามีกลุ่มของ *Bacillus* 4 สายพันธุ์ คือ *B. pumilus*, *B. tequilensis*, *B. subtilis* และ *B. cereus* โดย *Bacillus* สามารถพบได้ทั่วไปในสภาพแวดล้อมธรรมชาติ ในสิ่งแวดล้อมทางทะเล และจากสัตว์บริเวณผิวหน้าดิน นอกจากนี้ยังถูกพบจากการคัดแยกในปลา สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน บริเวณพื้นที่ด้านล่างของบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ (วรวุฒิ และชาคริยา, 2558; Hill *et al*., 2009) มีการรายงานคุณสมบัติของ *Bacillus* ที่มีความสามารถในการทนต่อเกลือ รวมถึงมีคุณสมบัติในการเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ในกระบวนการ Denitrification ในสภาวะที่มีอากาศ โดยการเปลี่ยนผลิตภัณฑ์ไนเตรทเป็นก๊าซไนโตรเจนอิสระ หรือเปลี่ยนไนเตรทกลับเป็นไนไตรท์ได้ (ศิริลักษณ์, 2553; Liu *et al*., 2006; Lu *et al*., 2012) ทั้งนี้ จากการจัดจำแนกชนิดด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ TW31 ที่มีค่าความคล้ายคลึงกับ *B. cereus* นั้นจะยังคงนำไปศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในลำดับขั้นตอนต่อไป เพื่อทำการศึกษาและเปรียบเทียบเชื้อแบคทีเรียภายในกลุ่ม *Bacillus* ด้วยกัน เพื่อสามารถคัดเลือก *Bacillus* สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดไปใช้ในขั้นตอนต่อไป ซึ่งจากการรายงานผลของ Lalloo และคณะ (2007) ที่ศึกษาคุณสมบัติ *B. cereus* B002 ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำในการเลี้ยงปลาสวยงาม พบว่า *Bacillus* B002 สามารถลดแอมโมเนียได้มากถึงเท่ากับ 77%

ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความสามารถทนเค็มของ *Bacillus* spp.

Characteristic	TS23	TW24	TW31	TW34	BR001	BR002
Isolation source	Sediment	Water	Water	Water	Water	Water
Morphology	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Gram staining	+	+	+	+	+	+
Endospore formation	+	+	+	+	+	+
Oxidase	–	–	–	–	–	–
Catalase	+	+	+	+	+	+
Optimal salinity (%)	0.5–2.5	0.5–2.5	1.5–4	1.5–2.5	2–4	0.5–4
Optimal pH	7.5	7	7	7.5	7.5	8

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์และเทียบเคียงความคล้ายคลึง (Similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย

Isolate	Identification Result	Sequence (bp)	Similarity (%)	Accession Number
TS23	*Bacillus pumilus* ZY05	566	97	GQ477159.1
	Bacillus australimaris H2	566	97	MK256796.1
TW24	*Bacillus subtilis* APBSWPTB156	726	99	MG733629.1
TW31	*Bacillus cereus* DBT3SC1	749	96	GU122947.1
TW34	*Bacillus subtilis* CICC10028	788	96	AY881638.1
BR001	*Bacillus tequilensis* 10b	1416	99	AY197613
BR002	*Bacillus tequilensis* 10b	1416	99	AY197613



ภาพที่ 1 แผนภูมิวิวัฒนาการของ *Bacillus* spp. ที่คัดแยกได้โดยศึกษาจากยีน 16S rDNA (Bar=0.02)

2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำ

2.1 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำระดับฟลาสก์ (ระบบปิด: Non–aerated system) ในน้ำเสียสังเคราะห์

1) การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย

ประสิทธิภาพของ *Bacillus* ต่อการบำบัดน้ำในน้ำเสียสังเคราะห์เป็นเวลา 7 วัน พบว่า *Bacillus* จำนวน 6 ไอโซเลท ในปริมาณ 1% (v/v) สามารถลดปริมาณแอมโมเนียในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ตั้งแต่วันที่ 4 และมีการลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดย *Bacillus* TS23, BR001, TW24, TW31, BR002 และ TW34 สามารถลดแอมโมเนียได้ 85.20%, 83.42%, 83.38%, 84.22%, 84.22% และ 81.58% ตามลำดับ ขณะที่ชุดควบคุมสามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้เพียง 29.34% (ภาพที่ 2 A)

2) การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์

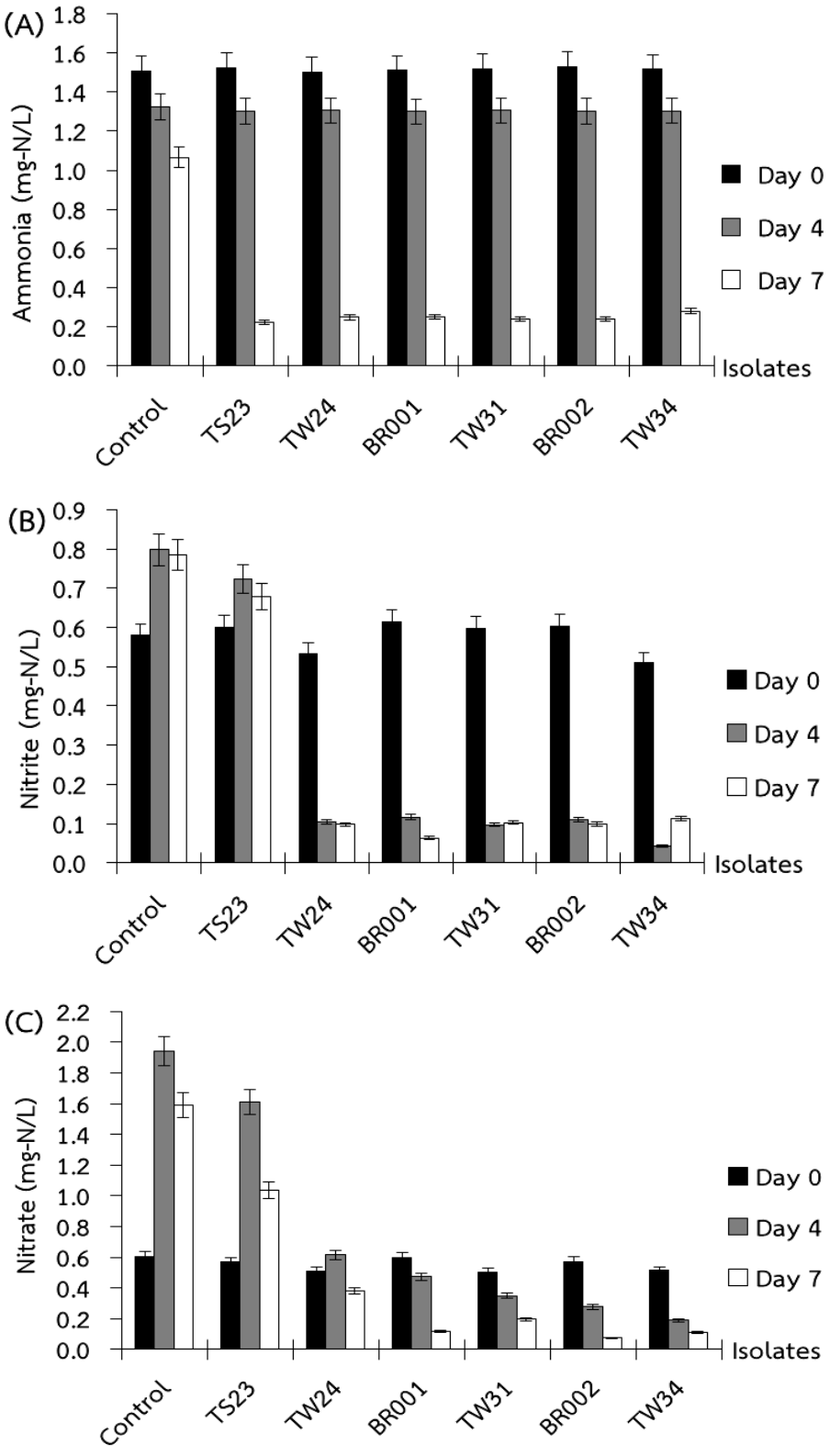
Bacillus ปริมาณ 1% (v/v) สามารถลดปริมาณไนไตรท์ได้ตั้งแต่วันที่ 4 ต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ยกเว้นชุดการทดลองที่เติม *Bacillus* TS23 และชุดควบคุมมีปริมาณไนไตรท์เพิ่มขึ้นในวันที่ 4 เท่ากับ 0.12±0.01 และ 0.22±0.04 mg–N/L ตามลำดับ นั่นคือ มีไนไตรท์เพิ่มขึ้น 20.32% และ 37.55% ตามลำดับนั่นเอง ในวันที่ 7 *Bacillus* BR001 สามารถลดไนไตรท์ได้มากที่สุดเท่ากับ 0.55±0.01 mg–N/L หรือ 89.66% โดยมีปริมาณไนไตรท์เริ่มต้นเท่ากับ 0.61±0.01 mg–N/L (ภาพที่ 2 B)

3) การเปลี่ยนแปลงของไนเตรท

กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) สามารถลดปริมาณไนเตรทได้ตั้งแต่วันที่ 4 ต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) *Bacillus* BR002, BR001, TW34, TW31 และ TW24 ปริมาณ 1% มีการลดลงของไนเตรทเท่ากับ 86.91%, 80.23%, 78.28%, 60.69% และ 24.99% ตามลำดับ โดยชุดทดลองที่เติม *Bacillus* TS23 และชุดควบคุมมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณไนเตรท 81.60% และ 72.88% ตามลำดับ โดยในการทดลองมีปริมาณไนเตรทเริ่มต้นเท่ากับ 0.51±0.01–0.61±0.03 mg–N/L (ภาพที่ 2 C)

จากผลการทดลอง พบว่า แอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทลดลงได้ตั้งแต่วันที่ 4 ต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 ประสิทธิภาพของการใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% สามารถลดแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทได้ดีและมีการสะสมปริมาณไนไตรท์ และไนเตรทในระบบน้อย โดยการสะสมไนไตรท์ และไนเตรทสามารถพบได้ในระบบการปรับปรุงคุณภาพน้ำ เนื่องมาจากไนไตรท์ที่เกิดขึ้นในระบบเป็นสารที่ไม่คงตัวที่สามารถเปลี่ยนรูปไปเป็นไนเตรทได้ โดยแบคทีเรียใช้แอมโมเนียในน้ำเป็นแหล่งอาหาร และเปลี่ยนรูปแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Yao และคณะ

(2013) ซึ่งรายงานว่าการใช้ *B. methylotrophicus* L7 สามารถกำจัดแอมโมเนีย และ TN ได้ และ 53% ตามลำดับ ในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปริมาณ NH_4^+ เริ่มต้นในช่วง 59.2–120 mg–N/L ส่งผลให้มีการสะสมของไนไตรท์ในระบบ นอกจากนี้ Zhang และคณะ (2012) พบว่า *Bacillus* L7 สามารถกำจัดไนไตรท์ได้ดีในสภาวะที่มีไนไตรท์เริ่มต้น 55–65 mg–N/L และเกิดไนเตรทในระบบปริมาณ 13–35 mg–N/L นอกจากนี้ จากการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* ทั้ง 6 สายพันธุ์ ในชุดทดลองแบบไม่ให้อากาศในขวดรูปชมพู่ อากาศที่ได้ในระบบเกิดจากการเขย่า อาจมีผลให้ออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจำกัด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kutako และคณะ (2009) พบว่า ในสภาวะที่ออกซิเจนมีปริมาณที่จำกัดนั้น *Bacillus* สามารถทำให้เกิดกระบวนการ Nitrogen assimilation ที่มีการใช้สารอนินทรีย์ไนโตรเจนเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตจำกัดได้ จากการทดลองพบว่า *Bacillus* TW24, BR002, TW31, BR001 และ TW34 ปริมาณ 1% มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนได้ดีที่สุด โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียเฉลี่ยอยู่ในช่วง 84.73–86.45% ในขณะที่ในการทดลองครั้งนี้ ประสิทธิภาพในการกำจัดไนไตรท์ และไนเตรทเฉลี่ยอยู่ในช่วง 78.83–83.08% และ 66.22–73.31% ตามลำดับ โดยมีไนไตรท์ และไนเตรทเริ่มต้นอยู่ในช่วง 0.57±0.05–0.64±0.04 mg–N/L และ 0.51±0.01–0.61±0.03 mg–N/L ตามลำดับ อาจเนื่องจาก *Bacillus* สามารถลดแอมโมเนียให้อยู่ในระดับต่ำ ส่งผลต่อปริมาณไนไตรท์ที่เกิดขึ้นลดลงตามไปด้วย และเปลี่ยนเป็นไนเตรทได้ต่อเนื่อง แตกต่างกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม *Bacillus* ที่จะมาช่วยในการกำจัดแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทในระบบจึงทำให้ค่าของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในการทดลองยังคงเพิ่มขึ้นในระหว่างการทดลองสำหรับผลการลดลงของแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทที่เกิดขึ้น *Bacillus* spp. มีความสามารถในการใช้สารอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยนำแอมโมเนียไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อสร้างเซลล์ และเจริญเติบโต (nitrogen assimilation) สำหรับการลดลงของปริมาณไนไตรท์ในระบบ มีผลมาจากการ oxidation แอมโมเนียของเชื้อที่เชื่อมต่อไปยังกระบวนการ Denitrification ซึ่งอาจเปลี่ยนไปเป็นไนเตรท และก๊าซไนโตรเจนได้ (Sakai *et al*., 1997)



ภาพที่ 2 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำของ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) ในชุดทดลองน้ำเสียสังเคราะห์ระบบปิด

2.2 **ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำระดับขวดโหล (ระบบเปิด**: Aerated system) **ในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง**

1. การทดลองในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

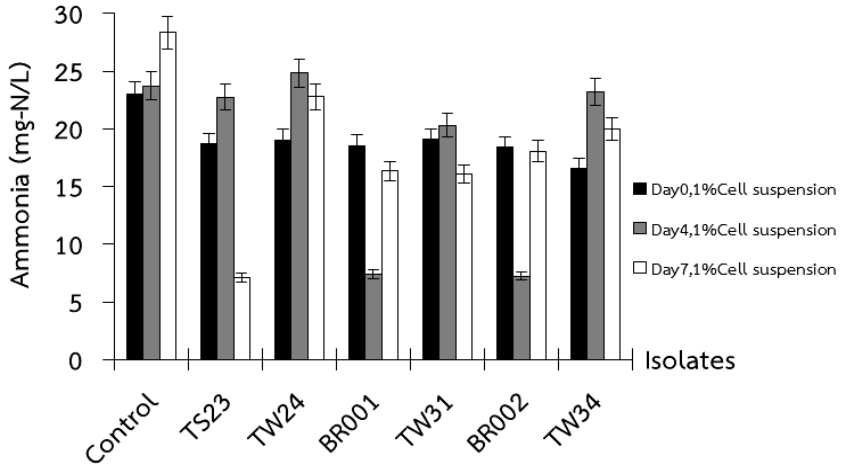
1.1) การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย

- การทดลองกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v)

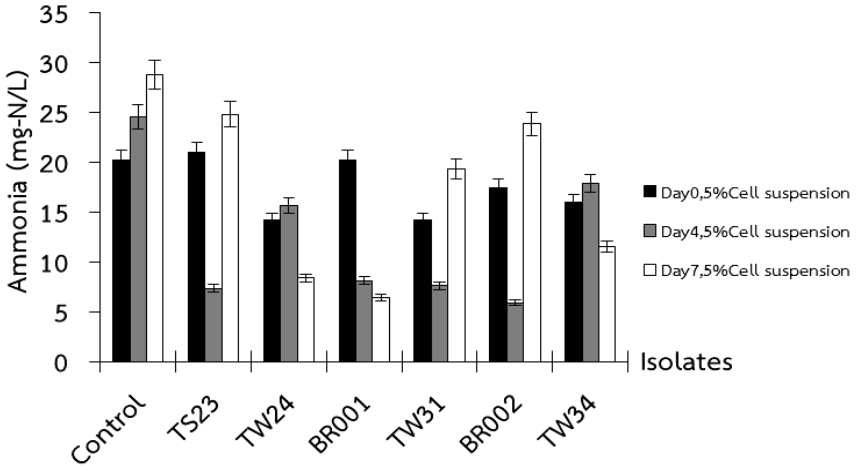
Bacillus BR002 และ BR001 ในปริมาณ 1% ส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียลดลงจากแอมโมเนียเริ่มต้น 16.57±2.37–23.22±6.05 mg–N/L เหลือปริมาณ 6.98±1.90–7.39±1.85 mg–N/L (ภาพที่ 3) หรือเท่ากับ 60.57% และ 60.10% ตามลำดับ หลังจากวันที่ 4 จนถึงวันที่ 7 ปริมาณแอมโมเนียมีการเพิ่มขึ้น โดย *Bacillus* TS23 สามารถลดแอมโมเนียได้ 62.03% ในวันที่ 7 ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมที่มีการเพิ่มขึ้น 23.47% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

- การทดลองกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% (v/v)

การเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% ส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียลดลงได้ดีในวันที่ 4 โดยที่ *Bacillus* BR002, TS23, BR001 และ TW31 ลดแอมโมเนียได้ 66.10%, 64.92%, 59.78% และ 46.42% ตามลำดับ และ *Bacillus* BR001 สามารถลดแอมโมเนียได้ต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 โดยลดแอมโมเนียจาก 20.24±4.33 mg–N/L เหลือ 6.46±1.52 mg–N/L (ลดลง 68.06%) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียเมื่อใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียเมื่อใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% (v/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

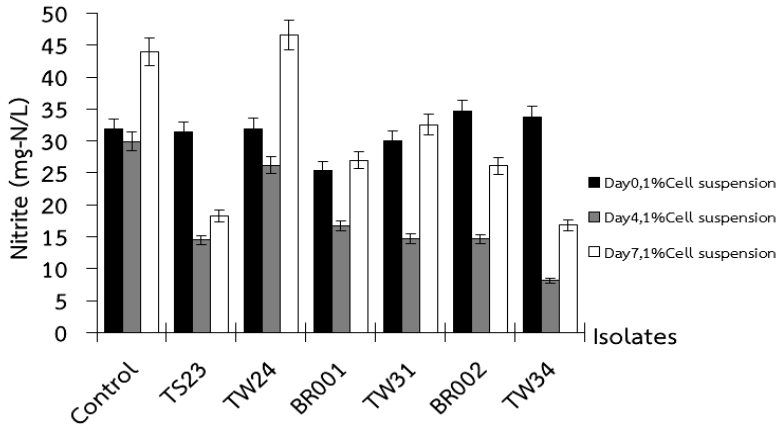
1.2) การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์

- การทดลองกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v)

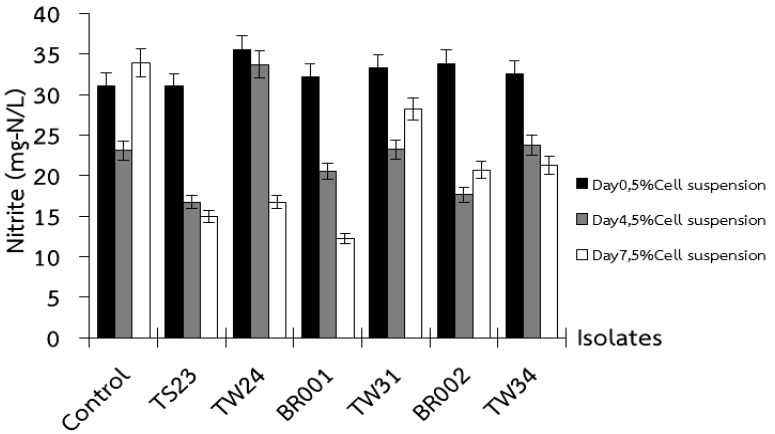
กล้าเชื้อ *Bacillus* TW34, BR002, TS23, TW31, BR001 และ TW24 ปริมาณ 1% ส่งผลให้ปริมาณไนไตรท์ลดลงได้ดีตั้งแต่ 34.36–75.82% ในวันที่ 4 โดยมีปริมาณไนไตรท์เริ่มต้น 30.09±3.49 ถึง 36.74±12.95 mg–N/L (ภาพที่ 5) หลังจากนั้นปริมาณไนไตรท์มีการเพิ่มขึ้น ระหว่างการทดลอง *Bacillus* TW34 สามารถลดไนไตรท์ได้สูงสุดในวันที่ 4 และ 7 เท่ากับ 75.82% และ 50.24% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุม ที่มีไนไตรท์เพิ่มขึ้น 37.84% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

- การทดลองกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% (v/v)

ในชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* BR002 และ T23 ปริมาณ 5% มีปริมาณการลดลงได้ดีในวันที่ 4 เท่ากับ 53.81–56.32% และในชุดการทดลองที่เติม *Bacillus* BR001, TW24, TS23 และ TW34 สามารถลดปริมาณไนไตรท์ได้ต่อเนื่องจากวันที่ 4 จนถึงวันที่ 7 เท่ากับ 62.14%, 52.88%, 51.65% และ 34.71% ตามลำดับ ซึ่งในการทดลองมีปริมาณไนไตรท์เริ่มต้นเฉลี่ย 32.48±7.10 mg–N/L และสามารถลดปริมาณไนไตรท์ลดลงเหลือเฉลี่ย 16.31±1.04 mg–N/L ในวันที่ 7 ของการทดลอง (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์เมื่อใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์เมื่อใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% (v/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

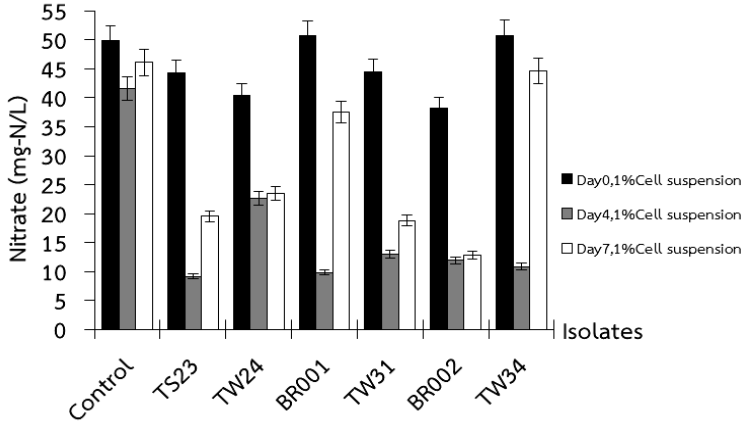
1.3) การเปลี่ยนแปลงของไนเตรท

- การทดลองกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v)

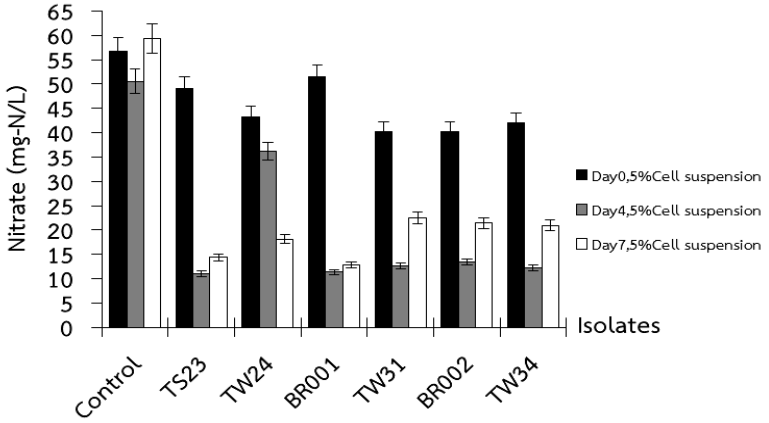
Bacillus ปริมาณ 1% ทำให้ไนเตรทลดลงได้ดีตั้งแต่วันที่ 4 ของการทดลอง ซึ่งสามารถลดปริมาณไนเตรทได้เฉลี่ย 64.81% โดยมีปริมาณไนเตรทเริ่มต้นเฉลี่ย 45.27±12.01 mg–N/L และลดลงต่ำสุดเหลือ 9.86±0.11mg–N/L ในวันที่ 4 ของชุดการทดลองที่เติม *Bacillus* BR001 (ภาพที่ 7) แต่หลังจากวันที่ 4 จนถึงวันที่ 7 ปริมาณไนเตรทมีการเพิ่มขึ้น ส่วน *Bacillus* BR002 มีประสิทธิภาพในการลดไนเตรทได้ดีทั้งในวันที่ 4 (ลดไนเตรทได้ 68.70%) และวันที่ 7 สามารถลดไนเตรทได้ 66.46% ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมที่มีการลดลงของไนเตรทเพียง 7.66% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

- การทดลองกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% (v/v)

การเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% ปริมาณไนเตรทลดลงได้ดีตั้งแต่วันที่ 4 เฉลี่ย 16.24–77.92% และในวันที่ 7 เฉลี่ย 43.95–74.99% โดย *Bacillus* BR001 มีประสิทธิภาพในการลดไนเตรทได้มากที่สุดเท่ากับ 77.92% (ปริมาณไนเตรทเริ่มต้น 51.44±16.07 mg–N/L ลดลงได้ 40.08±6.00 mg–N/L ในวันที่ 4 และมีปริมาณไนเตรทเหลือ 12.87±0.09 mg–N/L ในวันที่ 7) (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 7 การเปลี่ยนแปลงของไนเตรทเมื่อใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของไนเตรทเมื่อใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% (v/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

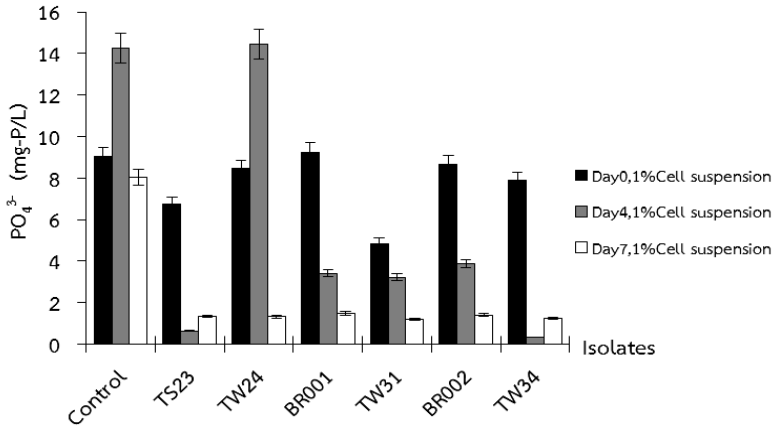
1.4) การเปลี่ยนแปลงของออร์โธฟอสเฟต

- การทดลองกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v)

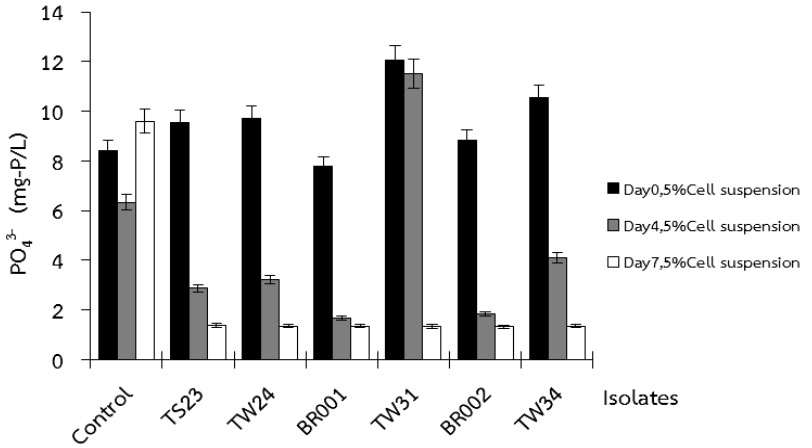
ปริมาณออร์โธฟอสเฟตลดลงอย่างต่อเนื่องจากวันเริ่มต้นจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งลดได้ดีในวันที่ 7 โดยมีปริมาณออร์โธฟอสเฟตเริ่มต้นเฉลี่ย 7.86±0.29 mg–P/L ลดลงในวันที่ 4 เฉลี่ยเหลือ 5.42±0.04 และวันที่ 7 ลดเหลือ 2.18±0.19 mg–P/L ตามลำดับ (ภาพที่ 9) ซึ่งชุดการทดลองที่เติม *Bacillus* TW34 ทำให้ปริมาณออร์โธฟอสเฟตลดลงมากที่สุดในวันที่ 4 มีค่า 0.30±0.00 mg–P/L (95.80%) และวันที่ 7 *Bacillus* TW34, BR001 และ BR002 มีผลทำให้ลดลงเหลือเฉลี่ย 1.36±0.00 mg–P/L (84.20%, 84.00% และ 83.90% ตามลำดับ)

- การทดลองกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% (v/v)

การเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* 5% พบว่า ปริมาณออร์โธฟอสเฟตมีการลดลงต่อเนื่องเช่นเดียวกัน โดย *Bacillus* BR002 มีประสิทธิภาพทำให้ออร์โธฟอสเฟตลดลงในวันที่ 4 มากที่สุด เท่ากับ 79.27 % (ปริมาณออร์โธฟอสเฟตเริ่มต้นเฉลี่ย 9.64±0.05 mg–P/L) และ *Bacillus* TW31 ทำให้ออร์โธฟอสเฟตลดลงมากที่สุดในวันที่ 7 เท่ากับ 88.89% และมีออร์โธฟอสเฟตเหลืออยู่ในระบบเท่ากับ 1.34±0.00 mg–P/L (ภาพที่ 10) ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมที่มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณออร์โธฟอสเฟต 14.20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



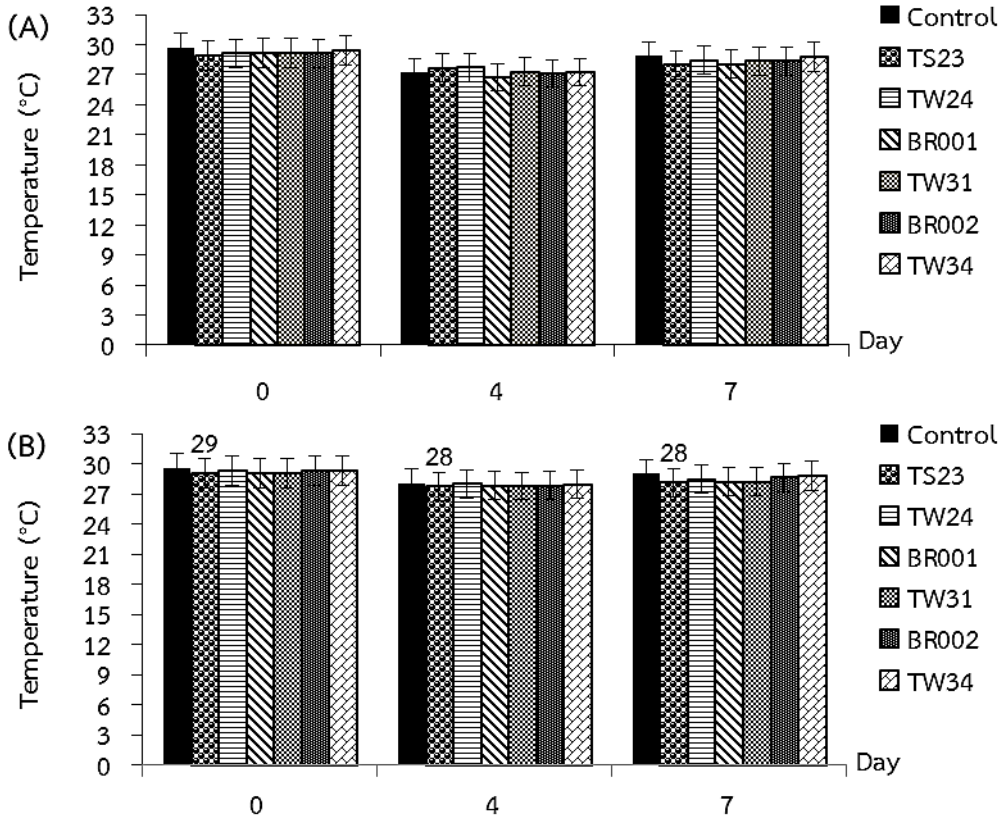
ภาพที่ 9 การเปลี่ยนแปลงของออร์โธฟอสเฟตเมื่อใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของออร์โธฟอสเฟตเมื่อใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% (v/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

1.5) การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ

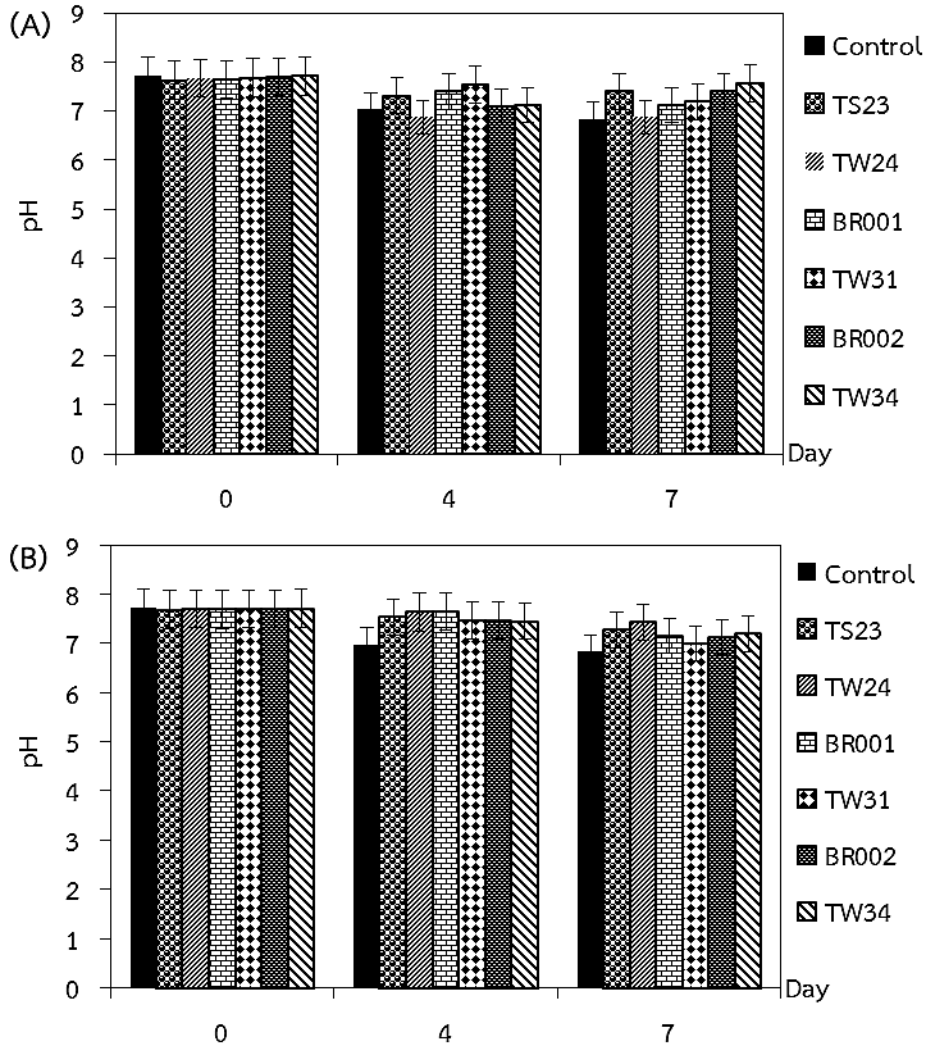
ชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) (ภาพที่ 11 A) และปริมาณ 5% (v/v) (ภาพที่ 11 B) อุณหภูมิในการทดลองเริ่มต้นการทดลองจนถึงวันที่ 7 ของการทดลองอยู่ในช่วงเฉลี่ย 28.43±0.73 ถึง 29.20±0.44 ℃ โดยมีการลดลงเล็กน้อยในวันที่ 4 เฉลี่ย 27.58±0.53 ℃ ในทุกชุดการทดลองรวมถึงชุดควบคุม



ภาพที่ 11 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเมื่อใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) (A) และ 5% (v/v) (B) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

1.6) การเปลี่ยนแปลงของ pH

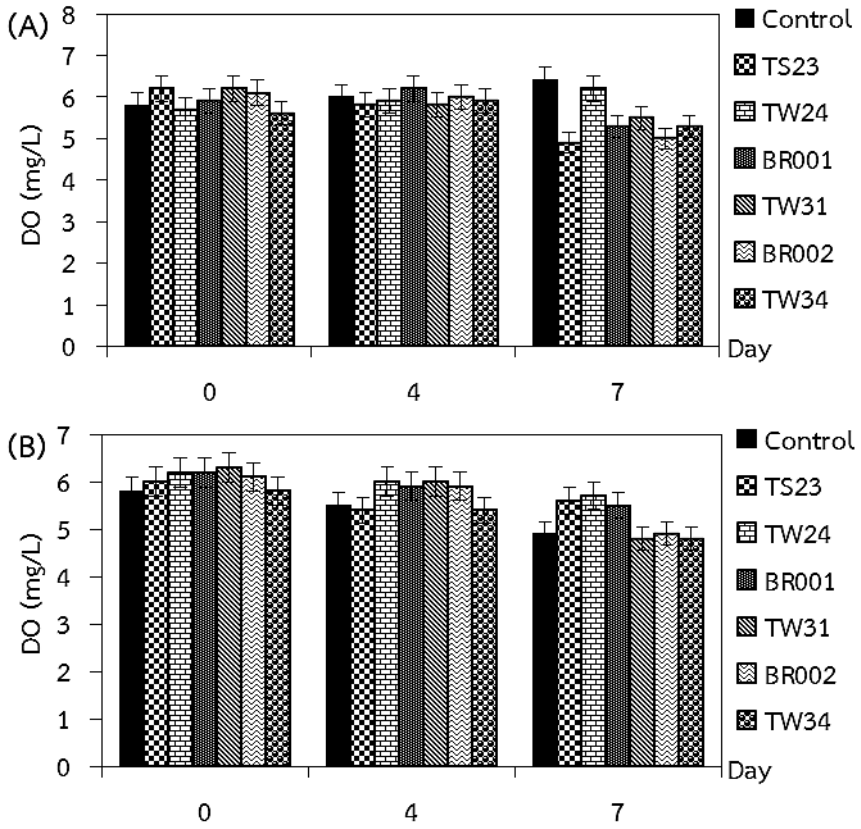
ค่า pH เริ่มต้นของชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) (ภาพที่ 12 A) และปริมาณ 5% (v/v) (ภาพที่ 12 B) รวมถึงชุดควบคุม เฉลี่ยเท่ากับ 7.68±0.01 มีการลดลงต่อเนื่องจากวันที่ 4 (pH เหลือเฉลี่ย 7.30±0.38) และวันที่ 7 (pH เหลือเฉลี่ย 7.15±0.48) ของการทดลอง ยกเว้นชุดการทดลองของกล้าเชื้อ *Bacillus* TS23, BR002 และ TW34 ปริมาณ 1% มีการเพิ่มขึ้นของค่า pH เล็กน้อยในวันที่ 7 มีค่าเท่ากับ 7.40±0.47, 7.39±0.47 และ 7.57±0.47 ตามลำดับ



ภาพที่ 12 การเปลี่ยนแปลงของ pH เมื่อใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) (A) และ 5% (v/v) (B) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

1.7) การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำ

ในชุดการทดลองเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) (ภาพที่ 13 A) และปริมาณ 5% (v/v) (ภาพที่ 13 B) รวมถึงชุดควบคุม มีค่าออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ยเริ่มต้น 5.80±0.01 mg/L ชุดทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* 1% มีการเพิ่มขึ้นของออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ยเป็น 5.93±0.02 mg/L ในขณะที่ชุดทดลองเติมเชื้อ *Bacillus* 5% มีการเพิ่มขึ้นของออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ย 5.88±0.02 mg/L และทั้ง 2 ชุดการทดลองมีการลดลงในวันที่ 7 เฉลี่ยเหลือ 4.80±0.01 mg/L



ภาพที่ 13 การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำเมื่อใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) (A) และ 5% (v/v) (B) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

2. การทดลองในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

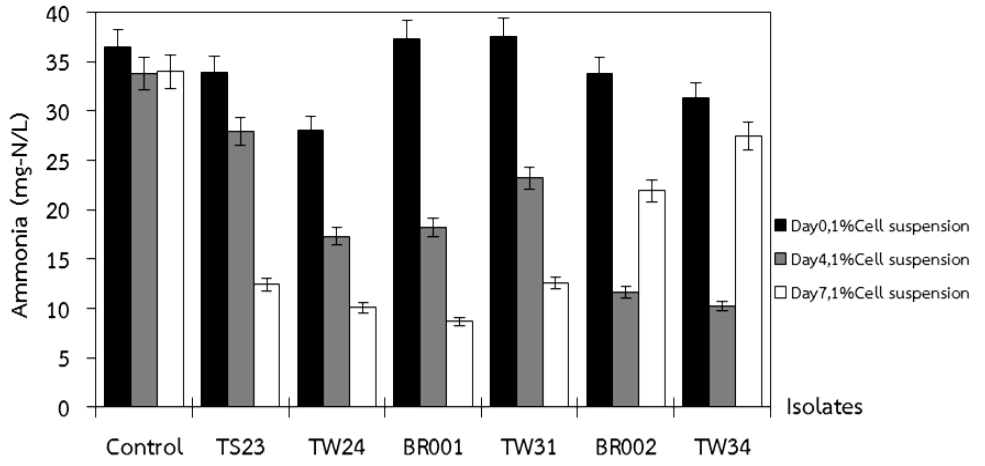
2.1) การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย

- การทดลองกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v)

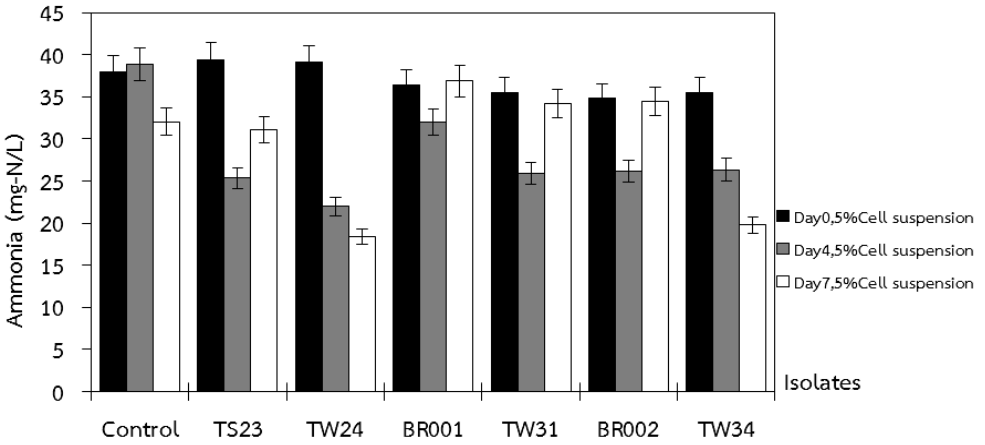
Bacillus BR001, TW31, TW24 และ TS23 ลดแอมโมเนียเริ่มต้นจาก 28.08±8.45–36.49±1.23 mg–N/L เหลือ 8.67±0.38–12.60±3.67 mg–N/L (ภาพที่ 14) โดยคิดเป็น 76.77%, 66.49%, 64.16% และ 63.28% ตามลำดับ ในขณะที่ *Bacillus* TW34 และ BR002 สามารถลดแอมโมเนียในวันที่ 4 ได้ดีกว่าวันที่ 7 เท่ากับ 67.36% และ 65.46% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมที่แอมโมเนียมีการลดลงเพียง 6.82% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

- การทดลองกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% (v/v)

Bacillus TS23, TW31, BR002 และ BR001 ปริมาณ 5% สามารถลดแอมโมเนียได้ 35.76%, 27.00%, 24.95% และ 12.01% ตามลำดับ ซึ่งระหว่างวันที่ 5 ถึง 7 มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอมโมเนีย (ภาพที่ 15) *Bacillus* TS21, TW24 และ TW34 สามารถลดแอมโมเนียได้ต่อเนื่องจากวันที่ 4 จนถึงสิ้นสุดการทดลองลดลงได้ 44.31–63.74% ตามลำดับ



ภาพที่ 14 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียเมื่อใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 15 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียเมื่อใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% (v/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

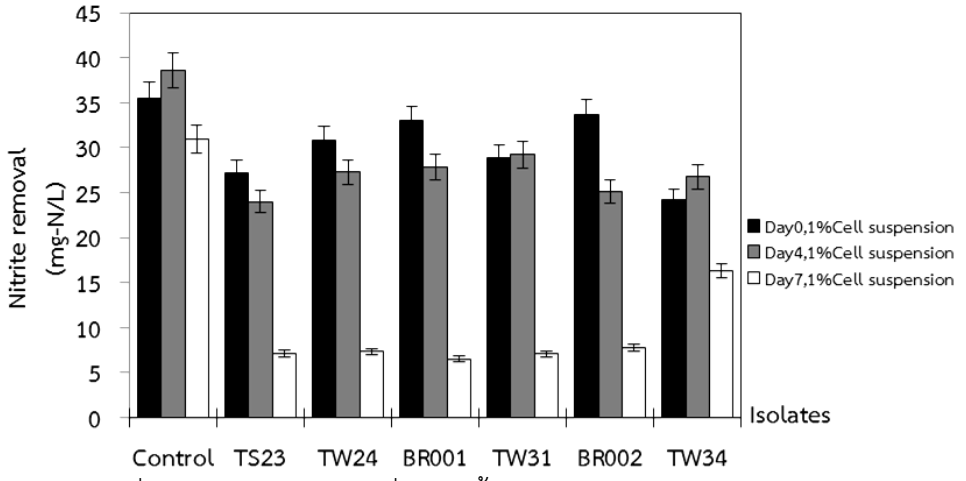
2.2) การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์

- การทดลองกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v)

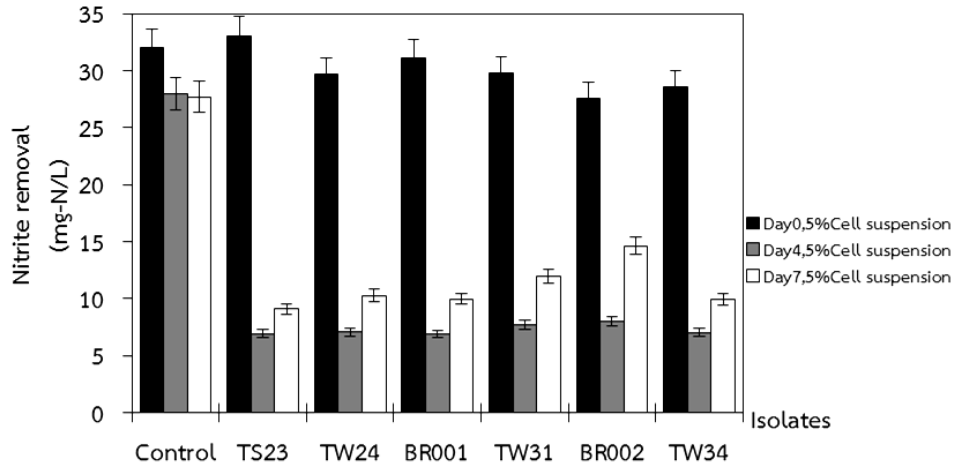
กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% ทำให้ไนไตรท์ลดลงได้ตั้งแต่วันที่ 4 และลดได้ดีในวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ปริมาณไนไตรท์เริ่มต้นเฉลี่ย 30.68±8.69 mg–N/L ลดเหลือเพียง 8.86±1.35 mg–N/L ในวันที่ 7 โดย *Bacillus* BR001, BR002, TW24, TW31 และ TS23 มีประสิทธิภาพในการลดไนไตรท์ได้ 80.25%, 76.89%, 76.24%, 75.54% และ 73.79% ตามลำดับ (ภาพที่ 16)

- การทดลองกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% (v/v)

กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% ทำให้ปริมาณไนไตรท์ลดลงได้ดีในวันที่ 4 ปริมาณไนไตรท์ในวันเริ่มต้นการทดลองเท่ากับ 30.44±7.90 mg–N/L ลดเหลือเฉลี่ย 7.31±3.60 mg–N/L ในวันที่ 4 (ภาพที่ 17) จากประสิทธิภาพการลดไนไตรท์ของ *Bacillus* TS23, TW34, BR001, TW24, BR002 และ TW31 เท่ากับ 84.54%, 83.18%, 82.60%, 81.34%, 81.01% และ 74.49% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมที่มีการลดลงของไนไตรท์เพียง 13.58% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพที่ 16 การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์เมื่อกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 17 การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์เมื่อกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% (v/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

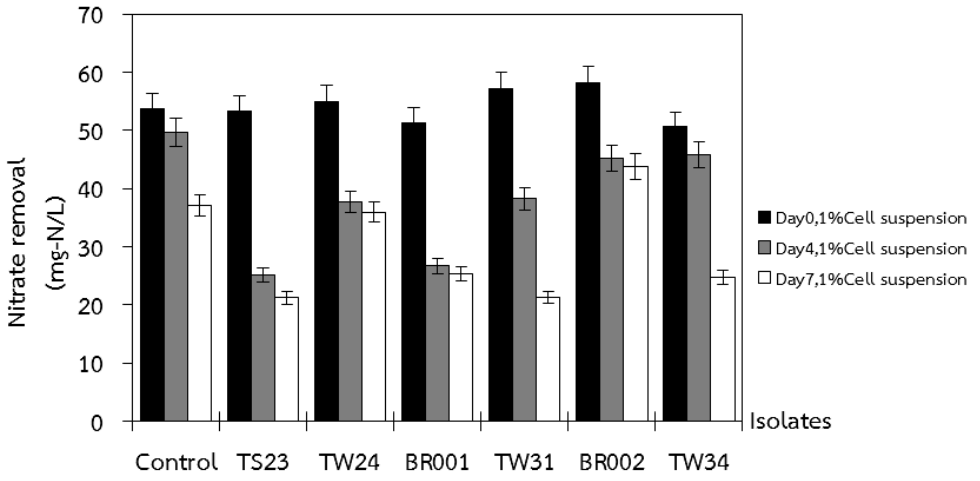
2.3) การเปลี่ยนแปลงของไนเตรท

- การทดลองกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v)

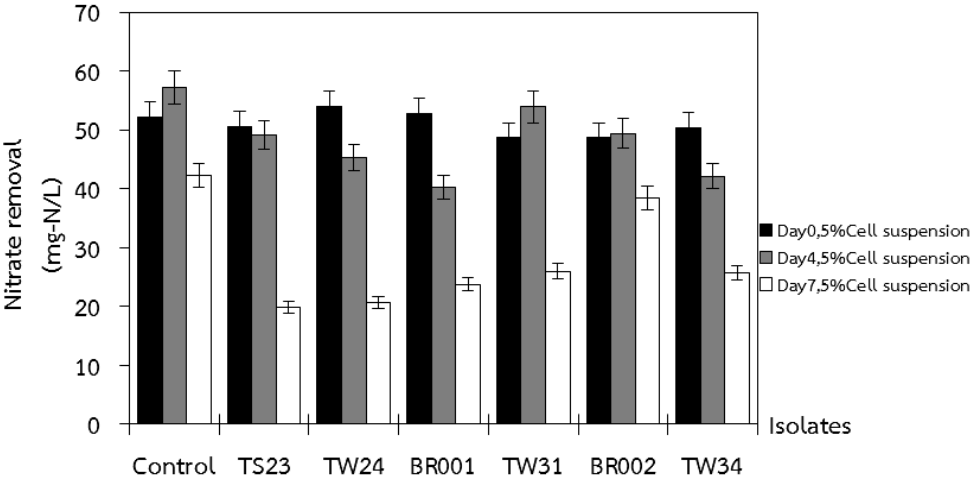
กล้าเชื้อ *Bacillus* TS23, BR001, TW31, TW24, BR002 และ TW34 สามารถลดปริมาณไนเตรทในวันที่ 4 ได้ 52.93%, 48.01%, 33.15%, 31.30%, 22.26% และ 9.42% ตามลำดับ จากปริมาณไนเตรทเริ่มต้นเฉลี่ย 53.87±15.85 mg–N/L ลดลงเฉลี่ยเหลือ 29.36±2.79 mg–N/L ในวันที่ 7 ซึ่ง *Bacillus* ทั้ง 6 ไอโซเลท ลดไนเตรทได้เฉลี่ย 47.35% (วันที่ 7) (ภาพที่ 18)

- การทดลองกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% (v/v)

Bacillus ปริมาณ 5% สามารถลดไนเตรทได้ต่อเนื่องจากวันเริ่มต้นถึงวันที่ 4 และลดลงได้ดีในวันที่ 7 จากปริมาณไนเตรทเริ่มต้นเท่ากับ 48.72±6.73 ถึง 53.92±6.55 mg–N/L ลดลงเฉลี่ยเหลือ 27.20±0.31 mg–N/L ในวันที่ 7 (ภาพที่ 19) โดยกล้าเชื้อ *Bacillus* TS23, TW24, BR001 และ TW34 สามารถลดไนเตรทได้ 59.40%, 54.44%, 40.92% และ 39.03% ตามลำดับ



ภาพที่ 18 การเปลี่ยนแปลงของไนเตรทเมื่อใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 19 การเปลี่ยนแปลงของไนเตรทเมื่อใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% (v/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

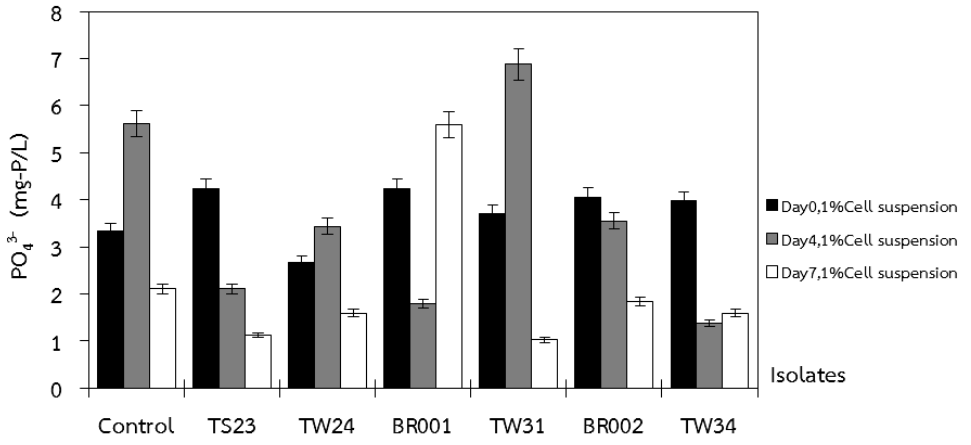
2.4) การเปลี่ยนแปลงของออร์โธฟอสเฟต

- การทดลองกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v)

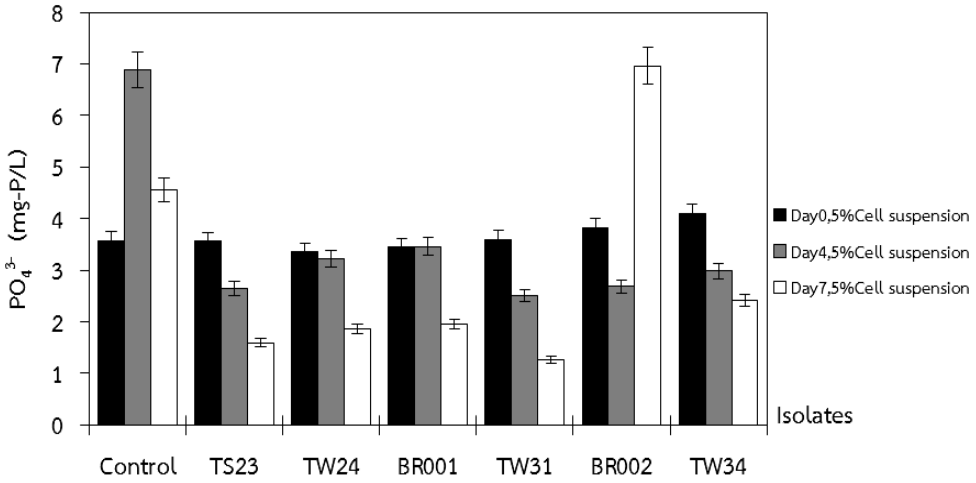
Bacillus TW34, BR001, TS23 และ BR002 ปริมาณ 1% ทำให้ออร์โธฟอสเฟตลดลงได้ดีในวันที่ 4 เท่ากับ 65.81%, 57.66%, 49.98% และ 12.27% ตามลำดับ จากปริมาณออร์โธฟอสเฟตเริ่มต้นเฉลี่ย 3.82±0.04 mg–P/L ลดเหลือเฉลี่ย 2.33±0.03 mg–P/L (ภาพที่ 20) ซึ่งในชุดการทดลองที่เติม *Bacillus* TS23, TW34 และ BR002 มีการลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 เหลือปริมาณออร์โธฟอสเฟตในระบบเฉลี่ย 1.45±0.07 mg–P/L คิดเป็น 73.33%, 60.05% และ 54.77% ตามลำดับ

- การทดลองกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% (v/v)

หลังจากเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* 5% พบว่า ปริมาณออร์โธฟอสเฟตมีการลดลงต่อเนื่อง โดย *Bacillus* BR002 มีผลให้ปริมาณออร์โธฟอสเฟตลดลงมากที่สุดในวันที่ 4 เท่ากับ 29.66% และในวันที่ 7 ชุดการทดลองที่เติม *Bacillus* TW31, TS23, TW24, BR001 และ TW34 มีปริมาณออร์โธฟอสเฟตลดลงมากที่สุดเหลือ 1.26±0.1–2.42±0.01 mg–P/L (ภาพที่ 21)



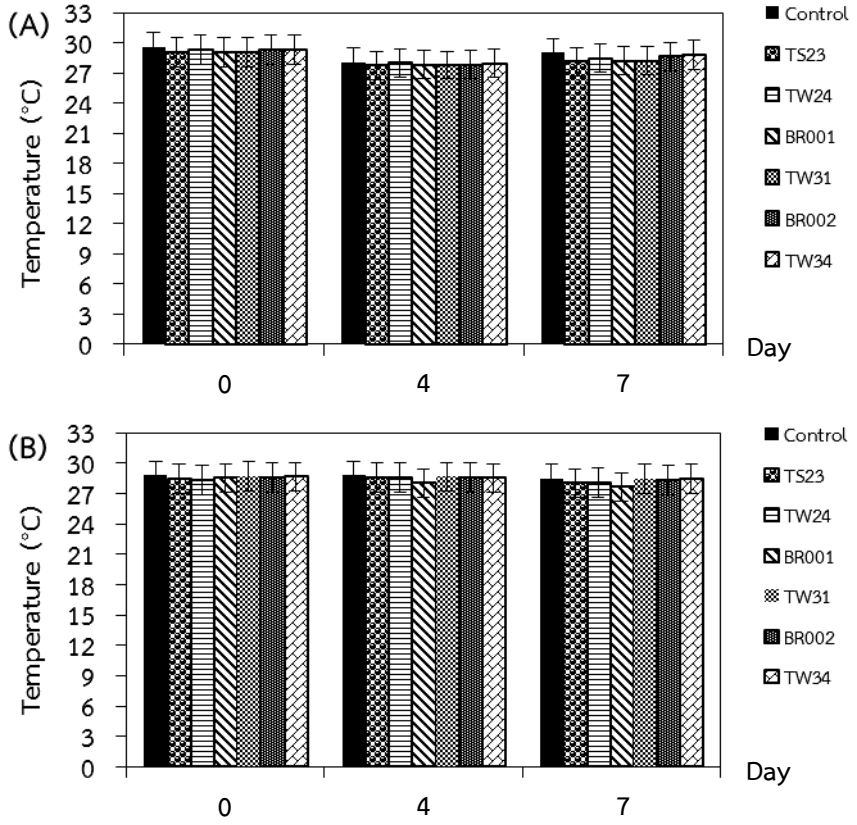
ภาพที่ 20 การเปลี่ยนแปลงของออร์โธฟอสเฟตเมื่อใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 21 การเปลี่ยนแปลงของออร์โธฟอสเฟตเมื่อใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% (v/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

2.5) การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ

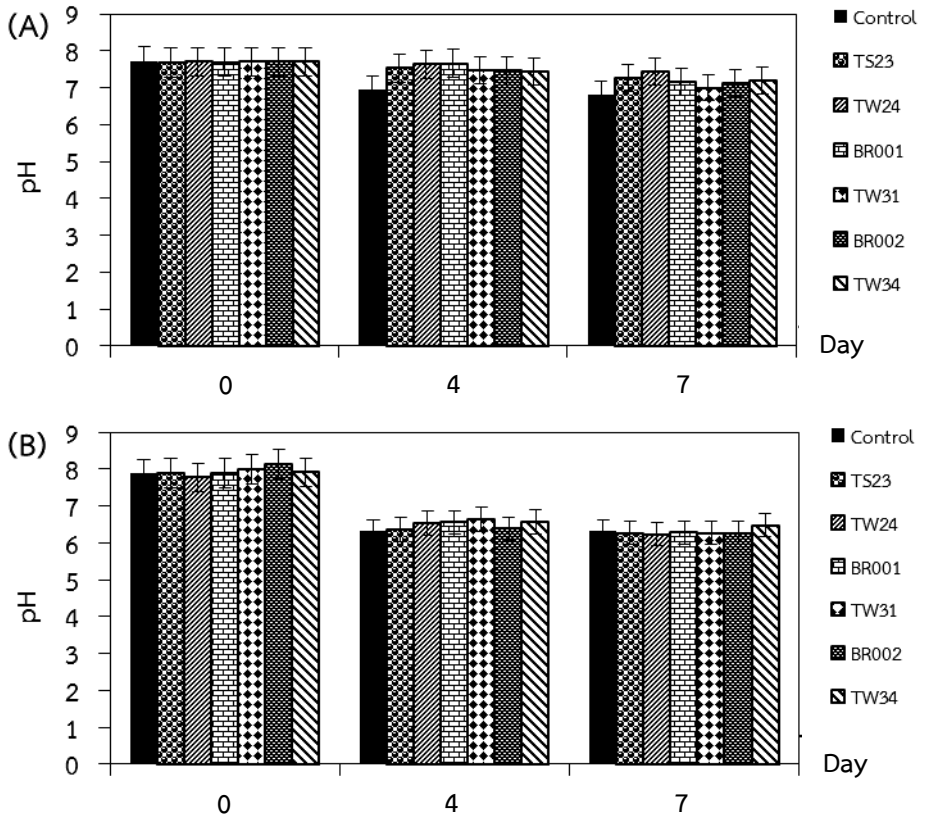
ชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) (ภาพที่ 22 A) และปริมาณ 5% (v/v) (ภาพที่ 22 B) อุณหภูมิในการทดลองอยู่ในช่วงเฉลี่ย 28.59±1.00 ℃ ถึง 28.16±0.91 ℃ โดยมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 4 เฉลี่ย 28.87±1.55 ℃ ในทุกชุดการทดลอง รวมถึงชุดควบคุม



ภาพที่ 22 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเมื่อใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) (A) และ 5% (v/v) (B) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

2.6) การเปลี่ยนแปลงของ pH

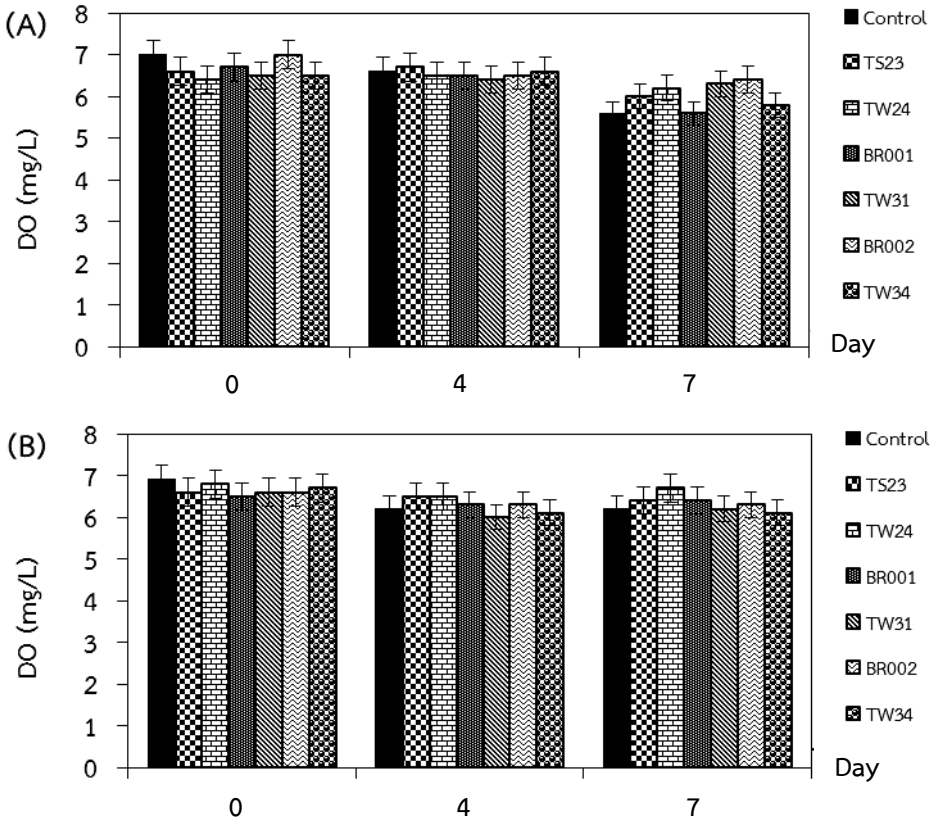
ชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) (ภาพที่ 23 A) และปริมาณ 5% (v/v) (ภาพที่ 23 B) และชุดควบคุมมีการลดลงของค่า pH ตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 ลดลงจาก pH เริ่มต้นเฉลี่ย 7.97±0.01 เฉลี่ยเหลือ 6.75±0.24 ในวันที่ 4 และลดลงเหลือเฉลี่ย 6.61±0.24 ในวันที่ 7 ค่า pH ที่ลดลงมากที่สุด คือ ชุดการทดลองที่เติมเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% มีค่า 6.23±0.02



ภาพที่ 23 การเปลี่ยนแปลงของ pH เมื่อใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) (A) และ 5% (v/v) (B) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

2.7) การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำ

ในชุดการทดลองเติมเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) (ภาพที่ 24 A) และ ปริมาณ 5% (v/v) (ภาพที่ 24 B) รวมถึงชุดควบคุม ค่าออกซิเจนละลายน้ำมีการลดลง โดยมีค่าออกซิเจนละลายน้ำเริ่มต้นเฉลี่ย 6.67±0.02 mg/L ยกเว้นในชุดการทดลองเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* TS23, TW24 และ TW34 (ปริมาณ 1%) มีค่าออกซิเจนละลายน้ำในวันที่ 4 เท่ากับ 6.70±0.01, 6.50±0.01 และ 6.60±0.01 mg/L ตามลำดับ หลังจากนั้นปริมาณออกซิเจนละลายน้ำทั้งชุดการทดลองที่เติมเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% มีการลดลงเฉลี่ยเหลือ 6.17±0.01 mg/L



ภาพที่ 24 การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำหลังการใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (v/v) (A) และ 5% (v/v) (B) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

จากการทดลองการใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 1% (v/v) และปริมาณ 5% (v/v) ในการกำจัดแอมโมเนียในเวลา 7 วัน พบว่า น้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อมีแอมโมเนียเริ่มต้นอยู่ในช่วงเฉลี่ย 16.57–36.49 mg–N/L หลังจากเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* TS23, BR002 และ BR001 สามารถลดแอมโมเนียได้เฉลี่ย 59.94–69.93% เหลือแอมโมเนียปริมาณ 6.98–7.39 mg–N/L ส่วนในระบบที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อสามารถลดแอมโมเนียได้เฉลี่ย 31.63–48.42% มีแอมโมเนียเริ่มต้นอยู่ในช่วงเฉลี่ย 28.08–39.42 mg–N/L เหลือแอมโมเนียปริมาณ 8.67–12.44 mg–N/L จะเห็นได้ว่า ปริมาณเริ่มต้น และปริมาณคงเหลือของแอมโมเนียในระบบที่ผ่านการฆ่าเชื้อมีปริมาณที่น้อยกว่าระบบที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ เกิดจากการที่นำน้ำทิ้งไปผ่านการฆ่าเชื้อ เป็นการทำให้ปราศจากเชื้อ มวลชีวภาพ และจุลินทรีย์ตัวอื่น ทำให้ระบบการย่อยสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ภายในระบบหยุดลง (Shan and Obbard, 2001) มีเพียงความสามารถของกล้าเชื้อ *Bacillus* spp. ที่ได้จากการเติมลงไปในระหว่างการทดลองมาช่วยย่อยสลายสารอนินทรีย์ในระบบ และกำจัดแอมโมเนียที่คงเหลืออยู่ในระบบได้ แตกต่างกับชุดการทดลองน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่มีปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้นที่มากกว่า เนื่องจากน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงกุ้งธรรมชาติจะมีปริมาณสารไนโตรเจนที่เกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์มากกว่าน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ มีผลจากการทำงานของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำตลอดเวลา เกิดการปลดปล่อยเอนไซม์ที่มีผลต่อกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ (Chanpun *et al*., 2007) แม้ว่าในการทดลองกล้าเชื้อ *Bacillus* จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียให้ลดลงได้ แต่ในระบบก็ยังคงมีแอมโมเนียเหลืออยู่ ทำให้ปริมาณแอมโมเนียคงเหลือในวันที่ 7 ของการทดลองมากกว่าในระบบที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

ขณะเดียวกันการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนียในวันที่ 4 และวันที่ 7 ของการทดลอง ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ *Bacillus* TS23, BR002 และ BR001 ปริมาณ 1% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ สามารถลดแอมโมเนียได้ดีในวันที่ 4 และมีแนวโน้มการลดแอมโมเนียต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 ได้ดีกว่าในชุดการทดลองในน้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อเล็กน้อย เฉลี่ยอยู่ในช่วง 48.56–63.74% สอดคล้องกับการรายงานของ Boopathy และคณะ (2015) ซึ่งศึกษากลุ่มเชื้อ *Bacillus* ที่ ในการบำบัดน้ำในการเลี้ยงกุ้ง พบว่า ในน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ กลุ่มเชื้อ *Bacillus* สามารถกำจัดแอมโมเนียได้มากที่สุด 95% ในช่วงวันที่ 4 ของการทดลอง ขณะที่น้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อสามารถกำจัดแอมโมเนียได้ 85% ในเวลา 8 วัน เนื่องจากการเติม *Bacillus* ลงไปมีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนีย และมีส่วนช่วยส่งเสริมกลุ่มจุลินทรีย์ในน้ำให้สามารถกำจัดแอมโมเนียได้มากขึ้น และส่งผลให้ไนไตรท์ และไนเตรทลดลงได้ นอกจากนี้ อุณหภูมิในระหว่างการทดลองทั้งในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และไม่ฆ่าเชื้อเฉลี่ย 28.51±0.86–28.68±0.68°C มีส่วนที่สามารถส่งผลทำให้แอมโมเนียมีการลดลงในวันที่ 4 และต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งมีการเปลี่ยนรูปของแอมโมเนีย โดยผ่านกระบวนการ Nitrification ที่มีอุณหภูมิเหมาะสมอยู่ในช่วง 20–30°C และกระบวนการ Denitrification (อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 25–35°C) (กษิดิศ, 2551)

ไนไตรท์มีการลดลงได้ตั้งแต่วันที่ 4 และ 7 ของการทดลอง ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* TS23, BR002 และ BR001 ทำให้ปริมาณไนไตรท์เริ่มต้นเฉลี่ย 32.48 mg–N/L ลดเหลือเฉลี่ย 16.31 mg–N/L ลดลงได้ดีในวันที่ 4 ในชุดการทดลองน้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ขณะที่ชุดการทดลองน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาณไนไตรท์เริ่มต้นเฉลี่ย 30.68 mg–N/L ลดเหลือ 7.31–8.86 mg–N/L ในวันที่ 7 จะเห็นได้ว่า ในชุดการทดลอง

น้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาณไนไตรท์จะเพิ่มขึ้น และลดลงได้ทั้งวันที่ 4 และ 7 เนื่องจากเมื่อมีการลดลงของแอมโมเนียก็จะส่งผลทำให้ปริมาณไนไตรท์เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณการเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียในระหว่างการทดลอง โดยแอมโมเนียจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไนไตรท์ในกระบวนการ Nitritification โดยแบคทีเรียในกลุ่ม Ammonium oxidizing และ pH จะมีส่วนสำคัญที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งช่วง pH 6 มีผลทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นช้าลง (สุบัณฑิต และวีระพงศ์, 2552; Rajakumar *et al*., 2008) โดย *Bacillus* spp. มีประสิทธิภาพในการลดไนไตรท์ได้เฉลี่ย 37–75% สอดคล้องกับประสิทธิภาพของ *B. cereus* PB88 ในการจัดการคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งได้ 98.51% ในเวลา 7 วัน (Barman *et al*., 2017)

หลังจากแอมโมเนียถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ และไนไตรท์สามารถเปลี่ยนเป็นไนเตรทในกระบวนการ Nitritification นั้น ระหว่างการทดลองมีการลดลงของไนเตรทตั้งแต่วันที่ 4 และ 7 ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่าน และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ มีปริมาณไนเตรทอยู่ในช่วงค่อนข้างสูงเฉลี่ย 40–60 mg–N/L หลังจากเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ทำให้ไนเตรทลดลงเหลือปริมาณ 15–30 mg–N/L โดย *Bacillus* TS23, BR001 และ BR002 สามารถลดไนเตรทได้เฉลี่ย 15–50% การลดลงของไนเตรทในระหว่างการทดลองในเวลา 7 วันสอดคล้องกับการศึกษาของ Saïd และคณะ (2014) พบว่า *B. tequilensis* และ *B. cereus* สามารถลดไนเตรทได้เท่ากับ 37.4% และ 80% ในเวลา 6 วัน ทั้งนี้ ปริมาณไนเตรทเริ่มต้นที่สูงในการทดลองทั้ง 2 ระบบครั้งนี้ อาจเกิดจากจุลินทรีย์ในน้ำทิ้งที่มีอยู่เดิม หรือผลการออกซิไดซ์ไนไตรท์เป็นไนเตรทของเชื้อ *Bacillus* ที่เติมลงไป และในขณะเดียวกันก็สามารถส่งผลให้มีการลดลงของไนเตรทในระหว่างการทดลอง เนื่องจาก *Bacillus* สามารถใช้ไนไตรท์ หรือไนเตรทในการเจริญเติบโตได้ โดย Ahn (2006) กล่าวว่า *B. subtilis* เป็นพวกที่เจริญได้เมื่อมีออกซิเจน หรือมีแต่ไนไตรท์ หรือไนเตรท และเจริญอยู่ได้เมื่อมีทั้งออกซิเจน และไนเตรทรวมกัน สอดคล้องกับผลการลดลงของออกซิเจนละลายน้ำที่ลดต่ำลงในระหว่างการทดลอง ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า *Bacillus* spp. จะมีการใช้ไนเตรท และออกซิเจนเพื่อการเจริญเติบโตในระหว่างการทดลอง อย่างไรก็ตาม ไนเตรทก็สามารถเปลี่ยนเป็นก๊าซไนโตรเจนอิสระในกระบวนการ Denitrification ในสภาวะที่มีอากาศได้ (Yang *et al*., 2011) ซึ่งภายในระบบหากมีการขาดออกซิเจน และไบคาร์บอเนต ก็จะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้แบคทีเรียเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนเตรทไม่สมบูรณ์ (พุทธ, 2562)

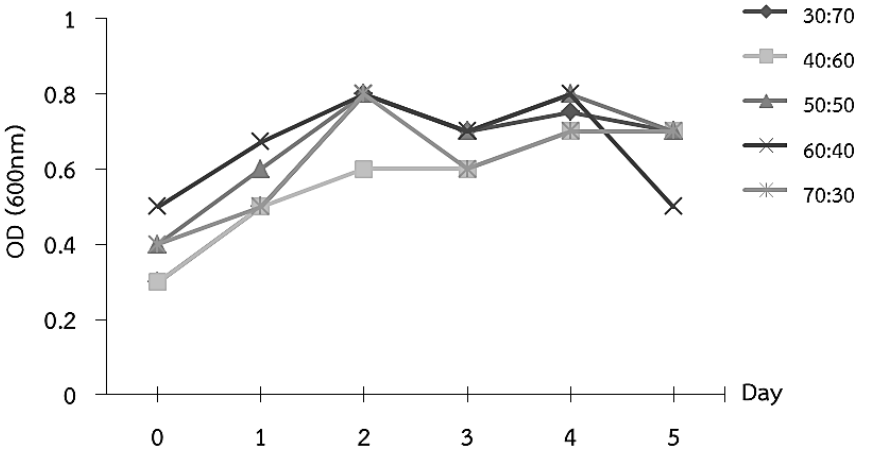
Muthuwani และ Lin (1996) รายงานว่า การถ่ายน้ำจากการเลี้ยงกุ้งทำให้ธาตุไนโตรเจน และฟอสฟอรัสถูกปลดปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติเฉลี่ยร้อยละ 45 และ 26 ตามลำดับ ซึ่งออร์โธฟอสเฟตเป็นฟอสฟอรัสอนินทรีย์ที่ละลายน้ำ จากการทดลองเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 1% และ 5% มีผลต่อการลดลงของปริมาณออร์โธฟอสเฟตตั้งแต่วันที่ 4 และวันที่ 7 ซึ่งประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ปริมาณ 1% มีผลต่อการลดของปริมาณออร์โธฟอสเฟตมากกว่ากล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% ในวันที่ 7 เล็กน้อย ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% สามารถควบคุมปริมาณสารอนินทรีย์ฟอสเฟตได้ดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ

Bacillus spp. และการลดลงในวันที่ 4 การใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* TW34, BR001, TS23 และ BR002 สามารถเปลี่ยนแปลงปริมาณออร์โธฟอสเฟตในระบบให้มีแนวโน้มลดลงเฉลี่ยอยู่ในช่วง 50–75% โดยในการทดลองปริมาณออร์โธฟอสเฟตเริ่มต้นเฉลี่ยอยู่ในช่วง 3.8–8.0 mg–P/L ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานน้ำทิ้งจากการเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง มีผลมาจากอาหารกุ้งที่เติมลงไปในขั้นตอนการเตรียมน้ำเสีย ซึ่งสูตรอาหารเม็ดสำเร็จรูปจะมีฟอสฟอรัสจากวัตถุดิบเป็นส่วนประกอบถึง 51% (จูอะดี และพัชรี, 2553; พุทธ และวลีรัตน์, 2547) ทั้งนี้ หลังจากทดลองการใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* 1% และ 5% ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 7 วัน มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณออร์โธฟอสเฟตที่ทำให้ปริมาณลดลงส่งผลให้ปริมาณฟอสฟอรัสรวมมีปริมาณอยู่ในช่วงค่ามาตรฐานน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งปริมาณ 0.4 mg/L (กรมประมง, 2546)

4. ผลการศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อ *Bacillus* ผสม

4.1 **ผลการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ** *Bacillus*

กล้าเชื้อผสม *Bacillus* BR001: BR 002 ในสัดส่วน 30:70, 40:60, 50:50, 60:40 และ 70:30 มีช่วงการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในช่วงวันที่ 1 ถึง 2 ของการทดลองที่ OD_{600nm} 0.4–0.8 โดยความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเฉลี่ยเท่ากับ 10^8 CFU/mL จากนั้นมีการเพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 10^8–10^9 CFU/mL และมีการลดลงเล็กน้อยในวันที่ 3 ของการทดลองที่ OD_{600nm} 0.4–0.6 เท่ากับ 10^7–10^8 CFU/mL จากนั้นการเจริญเติบโตของเชื้อเฉลี่ยเหลือเพียง 10^5–10^7 CFU/mL ในวันที่ 4 ถึง 5 ของการทดลอง (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 ลักษณะการเจริญเติบโตของกล้าเชื้อผสม *Bacillus* BR001: BR002 ที่สัดส่วนที่แตกต่างกันในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งแบบระบบเปิด

4.2 **การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทเมื่อใช้กล้าเชื้อผสมในน้ำจากการเลี้ยงกุ้ง**

1) การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย

หลังจากการใช้กล้าเชื้อผสมของ *Bacillus* BR001:BR002 ในสัดส่วน 30:70, 40:60, 50:50, 60:40 และ 70:30 สามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้ตั้งแต่วันที่ 1 ไปจนถึงวันที่ 5 ของการทดลอง ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยกล้าเชื้อผสมในสัดส่วน 40:60, 50:50, 60:40 และ 70:30 สามารถลดแอมโมเนียได้เท่ากับ 83.17%, 80.68%, 88.11% และ 82.30% ตามลำดับ (ปริมาณแอมโมเนียเฉลี่ยเหลือในระบบเท่ากับ 2.97 ถึง 5.20 mg-N/L) ซึ่งในการทดลองมีปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้นเฉลี่ย 24.97±0.35 mg-N**/L** (ภาพที่ 26)

2) การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์

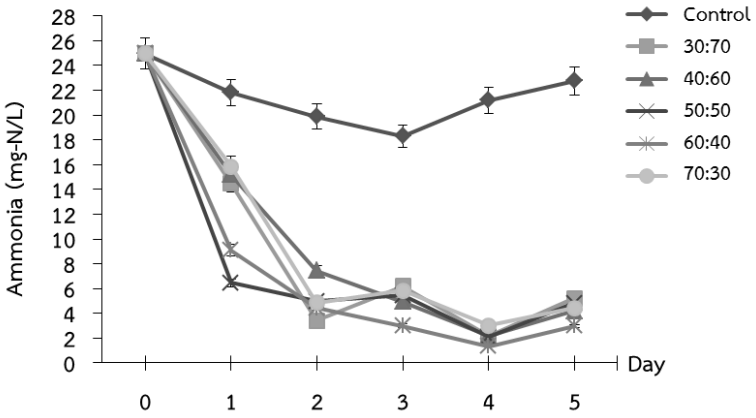
ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมต่อการบำบัดน้ำเป็นเวลา 5 วัน พบว่า การใช้กล้าเชื้อผสมของ *Bacillus* BR001:BR002 ส่งผลให้ปริมาณไนไตรท์ลดลงได้จนถึงวันที่ 5 ของการทดลอง โดยมีการลดลงได้ดีที่สุดในช่วงวันที่ 1 ถึง 2 เหลือปริมาณไนไตรท์เพียง 4.63 ±0.03–1.90±0.02 mg-N/L (ปริมาณไนไตรท์เริ่มต้น 27.36±0.09 mg-N/L) (ภาพที่ 27) ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยกล้าเชื้อผสมในสัดส่วน 50:50 และ 70:30 ทำให้ปริมาณไนไตรท์ลดลงได้มากที่สุด เท่ากับ 74.11% และ 70.57% ตามลำดับ

3) การเปลี่ยนแปลงของไนเตรท

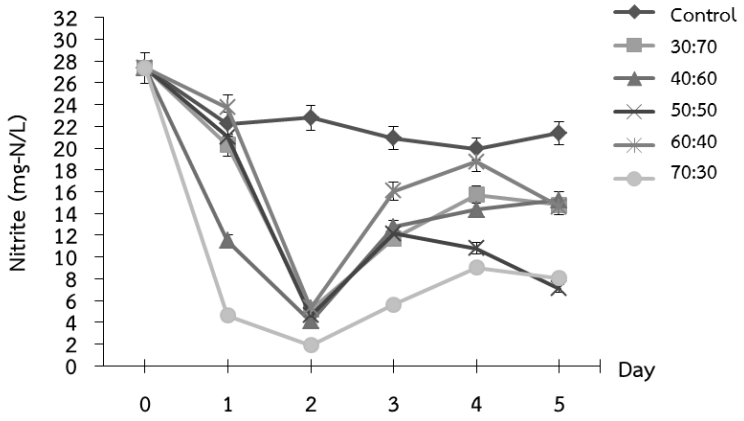
กล้าเชื้อผสม *Bacillus* BR001:BR002 สัดส่วน 70:30 สามารถลดปริมาณไนเตรทได้ดีที่สุดในช่วงวันที่ 1 ถึง 2 เหลือปริมาณไนเตรทเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.76±0.02–19.17±0.20 mg-N/L (ปริมาณไนเตรทเริ่มต้นเท่ากับ 25.93±0.07 mg-N/L) (ภาพที่ 28) และในวันที่ 3 ถึง 5 มีการเพิ่มขึ้นของไนเตรทในระบบ กล้าเชื้อผสมสัดส่วน 30:70 และ 70:30 สามารถลดปริมาณไนเตรทได้เท่ากับ 10.72% และ 26.07% ตามลำดับ โดยปริมาณคงเหลือยังคงต่ำกว่าปริมาณไนเตรทในวันเริ่มต้น ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ที่มีปริมาณไนเตรทลดไปเพียง 1.81% (ปริมาณไนเตรทคงเหลือเท่ากับ 25.46±0.28 mg-N/L)

จากผลการศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมในการบำบัดน้ำจากการเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 5 วัน พบว่า สัดส่วนที่เหมาะสมที่สุดของกล้าเชื้อผสม *Bacillus* BR001:BR002 เท่ากับ 70:30 และมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 1 ถึง 3 ของการทดลองเฉลี่ยเท่ากับ 10^8–10^9 CFU/mL ซึ่ง Pedro และคณะ (1991) กล่าวว่า การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียรวมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารกุ้งเป็นส่วนประกอบสามารถลดสารอินทรีย์ได้ดีกว่าการใช้แบคทีเรียเพียงสายพันธุ์เดียว ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำของกล้าเชื้อผสม *Bacillus* BR001:BR002 นี้สอดคล้องกับการรายงานของ Iriye และ Takatsuka (1999) พบว่า การใช้แบคทีเรียผสมในกลุ่ม *Bacillus* spp. ในการบำบัดน้ำเสียมีประสิทธิภาพในกระบวนการไนตริฟิเคชั่น และมีอัตราการกำจัดสารอินทรีย์วัตถุสารประกอบฟอสเฟตสูง (Reddy *et al*., 2012) ประสิทธิภาพของ *Bacillus* BR001:BR002 ส่งผล

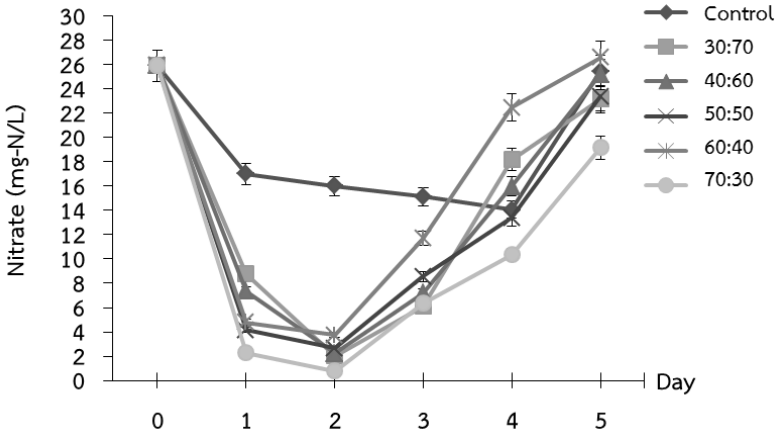
ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในระบบ โดยสามารถลดแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทได้มากที่สุดเท่ากับ 82.30%, 70.57% และ 26.07% ตามลำดับ Boopathy และคณะ (2015) กล่าวว่า *Bacillus* จะเริ่มมีการใช้คาร์บอน และไนโตรเจนในช่วง 3–4 วันแรกในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งและจากนั้นการใช้สารอนินทรีย์ของ *Bacillus* ค่อย ๆ ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการเจริญเติบโตของกล้าเชื้อผสม *Bacillus* BR001:BR002 ที่มีการลดลงในวันที่ 4–5 ของการทดลอง เหลือเฉลี่ย 10^5–10^7 CFU/mL ซึ่งเซลล์ *Bacillus* ที่ยังคงมีประสิทธิภาพก็จะยังคงใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนไตรท์ สำหรับไนเตรทที่เพิ่มขึ้นในระหว่างวันที่ 3 ถึง 5 ของการทดลอง อาจเกิดจากกิจกรรมที่ *Bacillus* ใช้แอมโมเนียและเปลี่ยนไปเป็นไนเตรท หรือความสามารถของ *Bacillus* ที่เปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของไนไตรท์ และไนเตรทเกิดจาก *Bacillus* จะเลือกรับออกซิเจนมาเป็นตัวรับอิเล็กตรอนมากกว่าการใช้ NO_3^- ในสภาวะที่ค่า DO มีปริมาณมาก (ธงชัย, 2544) ซึ่งในการทดลองเป็นเวลา 5 วันได้มีการเติมอากาศในระบบอย่างเต็มที่ตลอดเวลาและสอดคล้องกับการรายงานของ Zokaeifar และคณะ (2014) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของโปรไบโอติก *B. subtilis* สายพันธุ์ L10 และ G1 ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเชื้อเท่ากับ 10^5 CFU/ml และ 10^8 CFU/ml ที่ผสมกับอาหารเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมวัยอ่อน พบว่า ชุดการทดลองที่เติมโปรไบโอติก 10^5 CFU/ml มีปริมาณความเข้มข้นของไนไตรท์ และไนเตรทสูงกว่าในชุดการทดลองที่เติมโปรไบโอติก 10^8 CFU/ml และชุดการทดลองที่ไม่เติมโปรไบโอติกหลังจากเติมโปรไบโอติกในน้ำเลี้ยงกุ้งสัปดาห์ละ 2 ครั้ง



ภาพที่ 26 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียเมื่อใช้กล้าเชื้อผสม *Bacillus* BR001:BR002 โดยมีสัดส่วนที่แตกต่างกัน ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งแบบระบบเปิด



ภาพที่ 27 การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์เมื่อใช้กล้าเชื้อผสม *Bacillus* BR001:BR002 โดยมีสัดส่วนที่แตกต่างกัน ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งแบบระบบเปิด



ภาพที่ 28 การเปลี่ยนแปลงของไนเตรทเมื่อใช้กล้าเชื้อผสม *Bacillus* BR001:BR002 โดยมีสัดส่วนที่แตกต่างกัน ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งแบบระบบเปิด

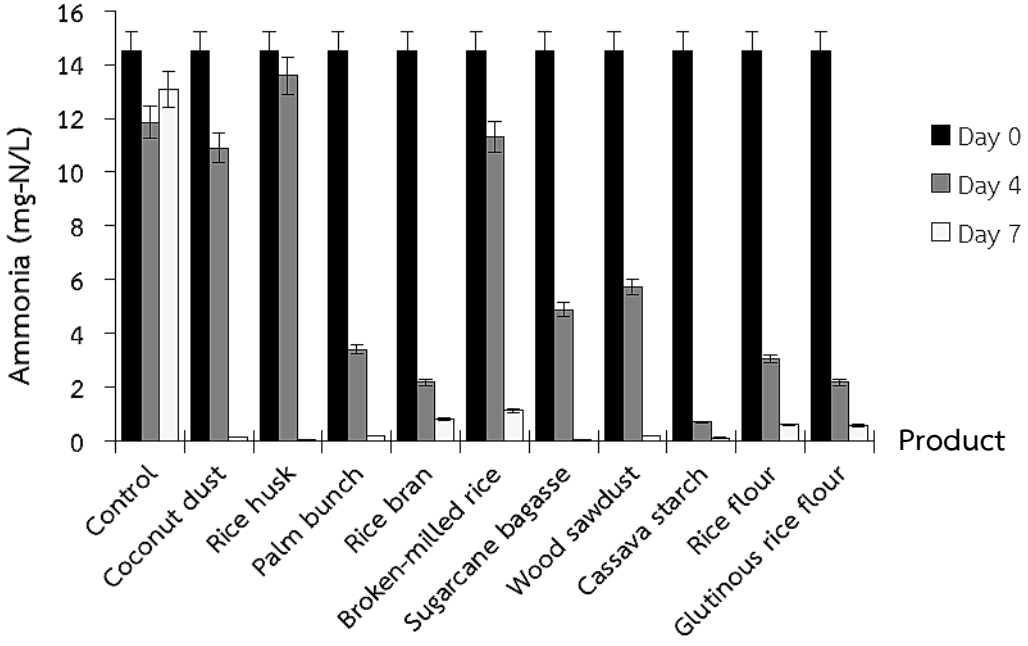
5. ผลการสร้างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมชนิดผง

ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมชนิดผง ซึ่งผสมระหว่าง *Bacillus* BR001:BR002 ในสัดส่วน 70:30 ที่ผสมในวัสดุทางการเกษตรแต่ละชนิด ในสัดส่วน 1:1 เป็นสัดส่วนที่เหมาะสมของการสร้างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ซึ่งนำมาทำการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสม

5.1 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสม

1) การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย

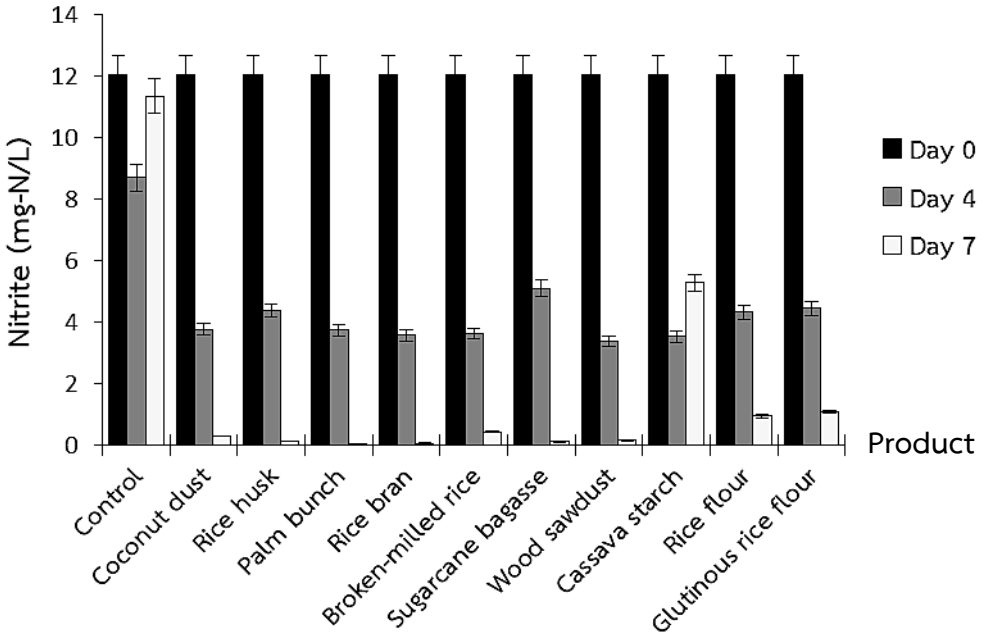
หลังจากเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมปริมาณ 5% (w/v) ที่ผสมในวัสดุทางการเกษตร พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ทดสอบส่งผลให้แอมโมเนียลดลงได้ต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 4 จนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมที่นำมาผสมกับแป้งมันสำปะหลังสามารถลดแอมโมเนียได้ดีที่สุดในวันที่ 4 เท่ากับ 95.10% (ปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้นเฉลี่ย 14.49±8.83 mg-N/L ลดเหลือ 0.71±0.94 mg-N/L) (ภาพที่ 29) และวันที่ 7 ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมที่นำมาผสมกับทะลายปาล์มบด ขุยมะพร้าวบด ขี้เลื่อยบด แป้งมันสำปะหลัง แกลบบด และชานอ้อยบด สามารถลดแอมโมเนียได้เฉลี่ยอยู่ในช่วง 98.62%, 98.69%, 98.90%, 99.10%, 99.52% และ 99.52% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ที่สามารถลดแอมโมเนียได้เพียง 9.79%



ภาพที่ 29 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียเมื่อใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสม (*Bacillus* BR001:BR002 ในสัดส่วน 70:30) และผสมกับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร (สัดส่วน 1:1) ปริมาณ 5% (w/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

2) การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์

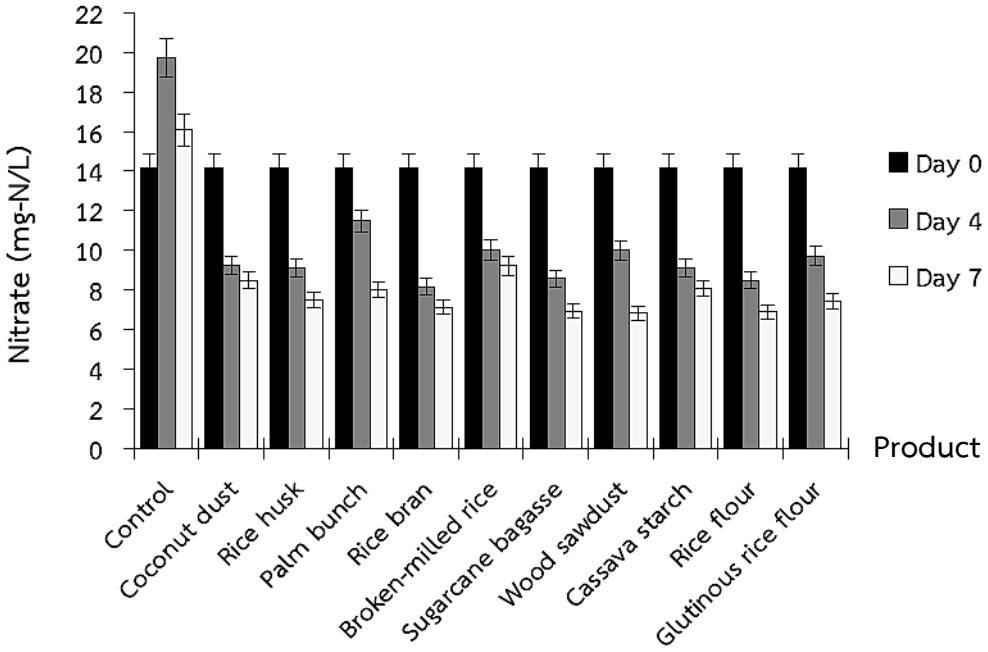
จากการทดลองพบว่า ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมปริมาณ 5% (w/v) ส่งผลให้ปริมาณไนไตรท์ลดได้ตั้งแต่วันที่ 4 และลดลงได้ดีที่สุดในวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมที่นำมาผสมกับขุยมะพร้าวบด แกลบบด ทะลายปาล์มบด รำข้าวบด ปลายข้าวบด ชานอ้อยบด ขี้เลื่อยบด แป้งข้าวเจ้า และแป้งข้าวเหนียว สามารถลดปริมาณไนไตรท์ได้จากวันเริ่มต้นเฉลี่ย 12.07±0.18 mg-N/L เหลือเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.05±0.07 ถึง 0.94±0.04 mg-N/L (ลดปริมาณไนไตรทได้เฉลี่ยเท่ากับ 90.96–99.60%) ซึ่งแตกต่างกันกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาพที่ 30) โดยมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนไตรท์เหลือ 11.35±0.36 mg-N/L หรือปริมาณไนไตรท์ที่ลดลงเพียง 5.95%



ภาพที่ 30 การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์เมื่อใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสม (*Bacillus* BR001:BR002 ในสัดส่วน 70:30) และผสมกับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร (สัดส่วน 1:1) ปริมาณ 5% (w/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

3) การเปลี่ยนแปลงของไนเตรท

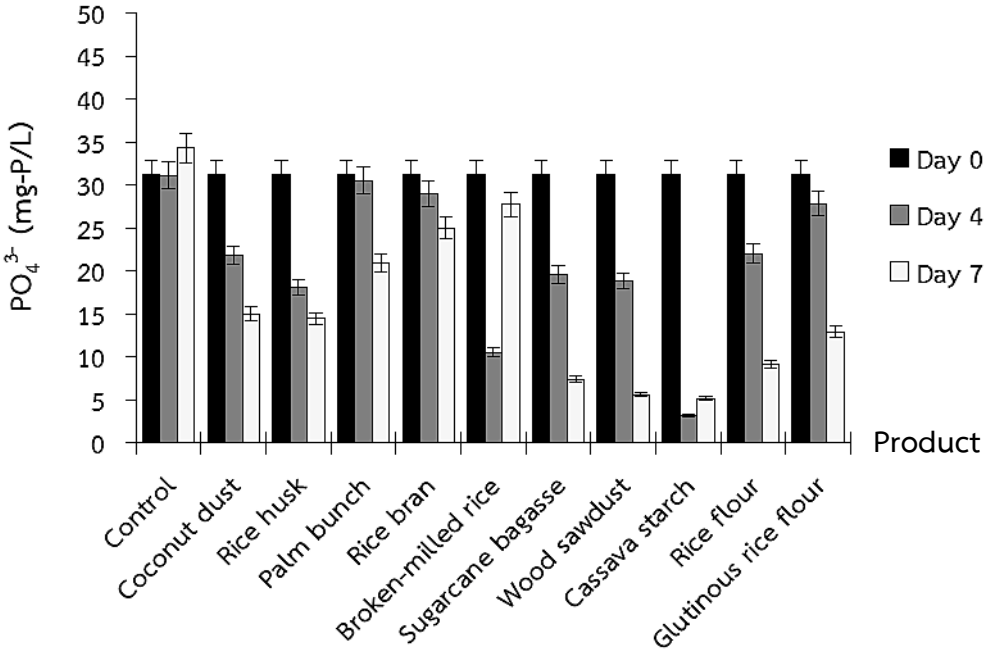
หลังจากมีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมปริมาณ 5% (w/v) ไนเตรทมีการลดลงได้ตั้งแต่วันที่ 4 จนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง โดยในวันที่ 4 ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมส่งผลให้ปริมาณไนเตรทลดได้เท่ากับ 19.02% ถึง 40.18% ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมที่นำมาผสมกับชานอ้อยบด และแป้งข้าวเจ้าส่งผลให้ปริมาณไนเตรทลดลงได้มากที่สุดเท่ากับ 39.50% และ 40.18% ตามลำดับ (ปริมาณไนเตรทเริ่มต้นเฉลี่ย 14.18±0.44 mg-N/L) และในวันที่ 7 ชุดทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมที่นำมาผสมกับขี้เลื่อยบด สามารถลดปริมาณไนเตรทได้เท่ากับ 51.96% หรือ 7.37±3.39 mg-N/L ทำให้ปริมาณไนเตรทคงเหลือในระบบเฉลี่ย 6.81±3.74 mg-N/L แตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ที่มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณไนเตรททำให้มีการสะสมไนเตรทในระบบเฉลี่ย 16.09±6.63 mg-N/L (ปริมาณไนเตรทเพิ่มขึ้น 13.48%) (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 31 การเปลี่ยนแปลงของไนเตรทเมื่อใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสม (*Bacillus* BR001:BR002 ในสัดส่วน 70:30) และผสมกับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร (สัดส่วน 1:1) ปริมาณ 5% (w/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

4) การเปลี่ยนแปลงของออร์โธฟอสเฟต

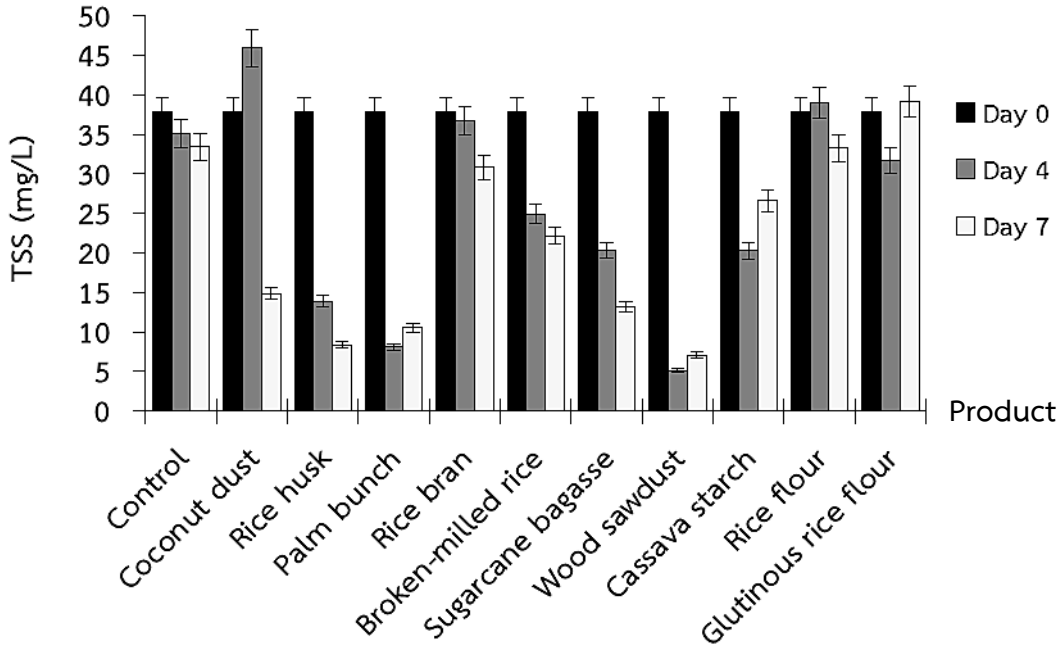
จากการทดลองพบว่า หลังจากมีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมปริมาณ 5% (w/v) ที่นำมาผสมกับแป้งข้าวเจ้า ขุยมะพร้าว ชานอ้อยบด ขี้เลื่อยบด แกลบบด ปลายข้าวบด และแป้งมันสำปะหลัง ส่งผลให้มีปริมาณออร์โธฟอสเฟตลดลงเท่ากับ 29.59%, 30.14%, 37.32%, 39.65%, 41.98%, 66.33% และ 89.65% แตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 36) โดยมีปริมาณออร์โธฟอสเฟตเริ่มต้นเฉลี่ย 31.27±4.30 mg-P/L และในวันที่ 7 ของการทดลองในชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมที่นำมาผสมกับแป้งข้าวเจ้า ชานอ้อยบด ขี้เลื่อยบด และแป้งมันสำปะหลัง ยังคงทำให้ปริมาณออร์โธฟอสเฟตลดลงเหลือเฉลี่ย 5.21±2.80–9.22±3.59 mg-P/L (ลดปริมาณออร์โธฟอสเฟตได้เท่ากับ 70.52%, 76.22%, 81.91% และ 83.33% ตามลำดับ) (ภาพที่ 32)



ภาพที่ 32 การเปลี่ยนแปลงของออร์โธฟอสเฟตเมื่อใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสม (*Bacillus* BR001:BR002 ในสัดส่วน 70:30) และผสมกับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร (สัดส่วน 1:1) ปริมาณ 5% (w/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

5) การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด

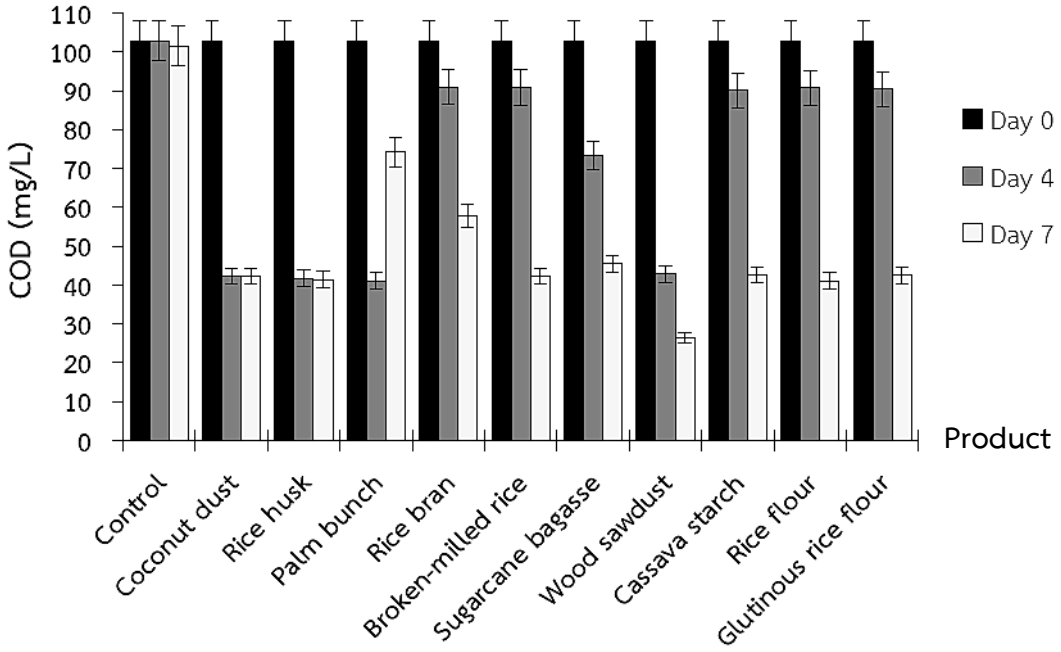
ในการทดลองมีปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดอยู่ในช่วง 37.80±26.55 mg/L หลังจากเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมปริมาณ 5% (w/v) ส่งผลให้มีการลดลงของปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดในวันที่ 4 ในชุดการทลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมที่นำมาผสมกับแกลบบด ทะลายปาล์มบด และขี้เลื่อยบด ส่งผลให้ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดลดลงได้เฉลี่ยอยู่ในช่วง 23.90±6.75–32.73±6.03 mg/L (ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดลดลงได้เท่ากับ 63.23%, 78.48% และ 86.60% ตามลำดับ) และในวันที่ 7 การลดลงของชุดการทลองทั้ง 3 ชุดปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดยังคงลดลงต่อเนื่อง ทำให้ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดภายในระบบลดเหลือเฉลี่ย 7.07±0.47–10.50±0.32 mg/L ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาพที่ 33)



ภาพที่ 33 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดเมื่อใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสม (*Bacillus* BR001:BR002 ในสัดส่วน 70:30) และผสมกับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร (สัดส่วน 1:1) ปริมาณ 5% (w/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

6) การเปลี่ยนแปลงของค่า COD

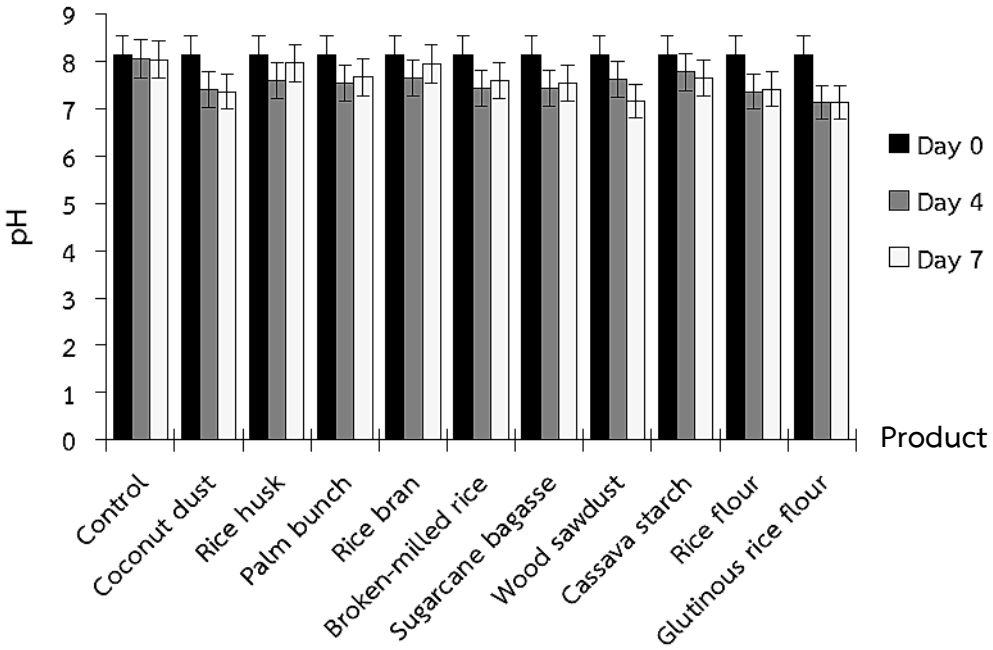
ค่า COD ลดลงในวันที่ 4 หลังจากเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมปริมาณ 5% (w/v) ชุดการทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมที่นำมาผสมกับทะลายปาล์มบด แกลบบด ขุยมะพร้าวบด และขี้เลื่อยบด ลดลงจากค่า COD เริ่มต้นเท่ากับ 102.72±39.75 mg/L ลดเหลือ 41.12, 41.71, 42.31 และ 42.90 mg/L ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ที่ยังคงมีค่า COD อยู่ในระบบเฉลี่ย 101.54±29.61 mg/L และในวันที่ 7 ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมที่นำมาผสมกับขี้เลื่อยบดมีค่า COD ลดลงมากที่สุด โดยเหลือเฉลี่ย 26.27±16.26 mg/L หรือลดลงเท่ากับ 74.42% ขณะที่ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมที่นำมาผสมกับทะลายปาล์มบดมีการเพิ่มขึ้นของค่า COD ทำให้มีค่า COD ในระบบเท่ากับ 74.22±16.20 mg/L (ภาพที่ 34)



ภาพที่ 34 การเปลี่ยนแปลงของค่า COD เมื่อใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสม (*Bacillus* BR001:BR002 ในสัดส่วน 70:30) และผสมกับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร (สัดส่วน 1:1) ปริมาณ 5% (w/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

7) การเปลี่ยนแปลงของค่า pH

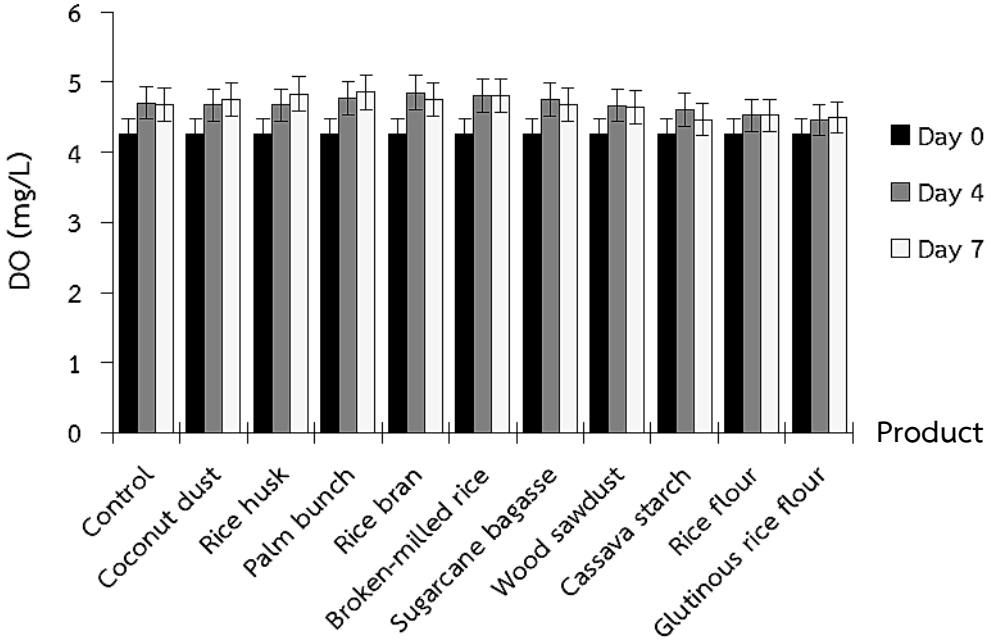
ค่า pH เริ่มต้นของทุกชุดการทดลองเฉลี่ยเท่ากับ 8.12±0.00 มีการลดลงในวันที่ 4 (pH เหลือเฉลี่ย 7.49±0.03) และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 7 (pH เฉลี่ย 7.54±0.01) ยกเว้นชุดควบคุมที่มีการลดลงของ pH ในวันที่ 4 และ 7 เหลือ 8.06±0.00 และ 8.04±0.00 ตามลำดับ (ภาพที่ 35)



ภาพที่ 35 การเปลี่ยนแปลงของค่า pH เมื่อใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสม (*Bacillus* BR001:BR002 ในสัดส่วน 70:30) และผสมกับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร (สัดส่วน 1:1) ปริมาณ 5% (w/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

8) การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำ

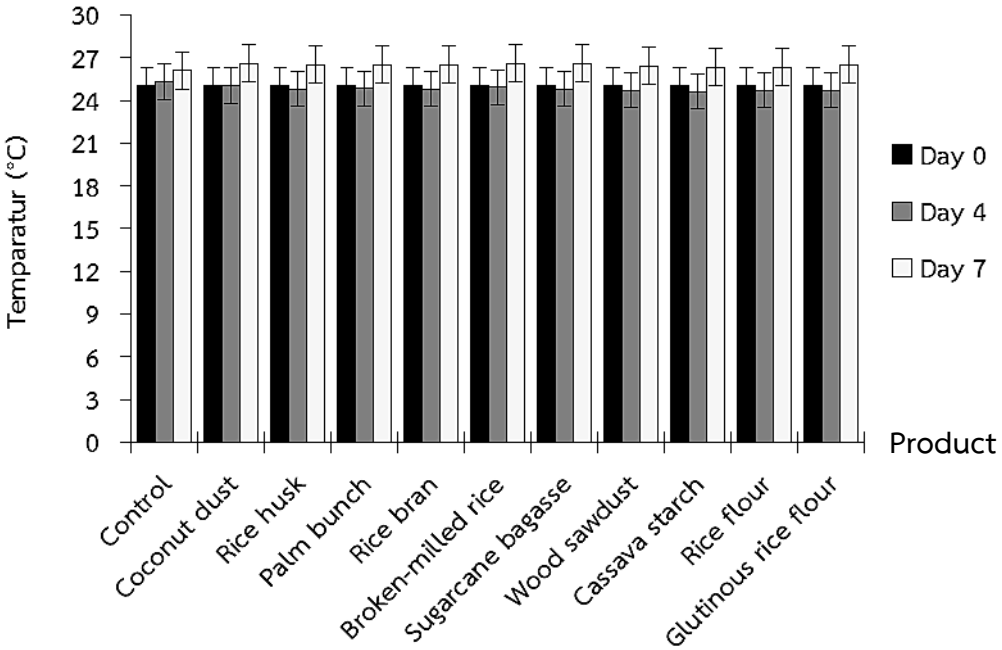
ในชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมปริมาณ 5% (w/v) ที่นำมาผสมกับขุยมะพร้าวบด แกลบบด ทะลายปาล์มบด รำข้าวบด ปลายข้าวบด ชานอ้อยบด ขี้เลื่อยบด แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว และชุดควบคุมมีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำเริ่มต้นเท่ากับ 4.26±0.01 mg/L และมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณออกซิเจนละลายน้ำในทุกชุดการทอลองในวันที่ 4 เฉลี่ยอยู่ในช่วง 4.46±0.03 ถึง 4.85±0.01 mg/L และ 7 เฉลี่ยอยู่ในช่วง 4.47±0.11 ถึง 4.86±0.01 mg/L ตามลำดับ (ภาพที่ 36)



ภาพที่ 36 การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำเมื่อใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสม (*Bacillus* BR001:BR002 ในสัดส่วน 70:30) และผสมกับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร (สัดส่วน 1:1) ปริมาณ 5% (w/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

9) การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ

อุณหภูมิในระหว่างการทดลองในทุกชุดการทดลองเริ่มต้นเท่ากับ 25.04±0.03 ℃ หลังจากนั้นมีการลดลงในวันที่ 4 ของการทดลองเหลือเฉลี่ย 24.61±0.01 ถึง 25.33±0.02 ℃ และมีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 7 ของการทดลองเฉลี่ยเท่ากับ 26.45±0.00 ℃ ในทุกชุดการทดลอง (ภาพที่ 37)



ภาพที่ 37 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเมื่อใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสม (*Bacillus* BR001:BR002 ในสัดส่วน 70:30) และผสมกับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร (สัดส่วน 1:1) ปริมาณ 5% (w/v) ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

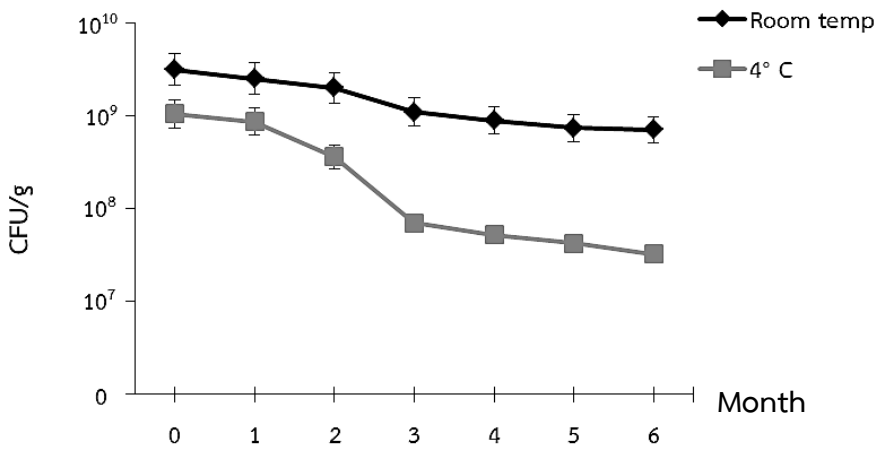
จากผลการทดลองเมื่อใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสม (*Bacillus* BR001:BR002 ในสัดส่วน 70:30) และผสมกับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร (สัดส่วน 1:1) ปริมาณ 5% (w/v) เป็นเวลา 7 วัน พบว่า กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มที่ผสมกับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร 5 ชนิด ได้แก่ ขี้เลื่อยบด ทะลายปาล์มบด ชานอ้อยบด รำข้าวบด และแป้งมันสำปะหลัง ส่งผลให้ปริมาณไนโตรเจนในระบบลดลงได้ดีที่สุด ภายในระบบทดลองมีค่า pH เฉลี่ยเท่ากับ 7.49±0.03 ถึง 8.12±0.00 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ยเท่ากับ 4.26±0.01 ถึง 4.86±0.01 mg/L และอุณหภูมิเฉลี่ยเท่ากับ 24.61±0.01 ถึง 26.45±0.00 °C ซึ่งในแต่ละชุดการทดลองทั้ง 3 พารามิเตอร์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$) โดยผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมที่นำมาผสมกับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร 5 ชนิดข้างต้น สามารถลดแอมโมเนียได้เฉลี่ยอยู่ในช่วง 98.62–99.52% ลดไนไตรท์ได้เฉลี่ยอยู่ในช่วง 56.15–99.60% และสามารถลดไนเตรทเฉลี่ยอยู่ในช่วง 43.08–51.96% รวมถึงมีการลดลงต่อเนื่องของปริมาณออร์โธฟอสเฟต ในชุดการทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมที่นำมาผสมกับขี้เลื่อยบด ส่งผลให้ปริมาณออร์โธฟอสเฟตลดลงเท่ากับ 81.91% เนื่องมาจาก *Bacillus* สามารถสร้างเอนไซม์ Poly phosphate kinase ที่สามารถดูดซับออร์โธฟอสเฟตเข้าสู่เซลล์และใช้เป็นแหล่งพลังงาน ในการสร้างเซลล์ใหม่ และสะสมไว้ในเซลล์อยู่ในรูป Poly phosphate (ธงชัย, 2544; Rout *et al*., 2017) และทำให้ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด และค่า COD ลดลงได้เท่ากับ 81.31% และ 74.42% ตามลำดับ ถึงแม้ว่าวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรดังกล่าวเป็นวัสดุที่มีปริมาณเส้นใยที่สูง โดยทะลายปาล์มบด รำข้าวบด แป้งมันสำปะหลัง ชานอ้อยบด ขี้เลื่อยบดมีปริมาณเส้นใยเฉลี่ยเท่ากับ 26.5%, 27.4%, 39.0%, 72.0% และ 75.0% ตามลำดับ ซึ่งย่อยสลายยาก (high C/N ratio) มักสลายตัวได้ช้า และเป็นวัสดุอินทรีย์ที่มีปริมาณธาตุอาหารในกลุ่มไขมัน โปรตีน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมสูง แต่ในการทดลองได้มีการนึ่งฆ่าเชื้อวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิที่สูงจะสามารถย่อยสลายสารอาหารที่อยู่ในรูปสลับซับซ้อน ทำให้เซลล์ของ *Bacillus* สามารถใช้แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนจากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรในการเจริญเติบโตที่เพิ่มมากขึ้นได้ (มณิศรา และบำรุง, 2559; วิภาภรณ์ และคณะ, 2554 และสวรรยา และคณะ, 2561) รวมถึงปริมาณของวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรที่นำมาใช้ในการทดลองมีปริมาณ 1:1 เป็นปริมาณที่มีส่วนช่วยให้อัตราการรอดชีวิตของ *Bacillus* สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เชื้อ *Bacillus* ที่นำมามาผสมกับวัสดุยึดเกาะและสารพาชนิดอื่น สอดคล้องกับการรายงานผลของ ปิยะวรรณ และปริยาภรณ์ (2558) ที่กล่าวว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกล้าเชื้อผง *B. subtilis* SB-MYP1 ที่นำมาผสมกับสารตัวพาจะใช้กล้าเชื้อ *B. subtilis* SB-MYP1 ในปริมาณ 50% (w/v) ผสมกับสารตัวพาที่เป็น รำข้าวบด และแป้งถั่วเหลืองบด ในปริมาณ 50% (w/v) (1:1 w/v) ส่งผลให้การสูญเสียการมีชีวิตของ *Bacillus* น้อยที่สุด และสามารถผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ปริมาณชนิดผงได้มากที่สุดเท่ากับ 84.60% และ 91.37% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการผสมเชื้อ *Bacillus* กับสารตัวพาในอัตราส่วน 1:2, 1:3, 1:4 และ 1:5 w/v ตามลำดับ โดย *Bacillus* สามารถผลิตเอนไซม์ที่คล้ายกับเอนไซม์ Protease, Amylase และ Lipase รวมถึงสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ที่มีความเฉพาะ และมีความเหมาะสมต่อสมบัติในการยึดเกาะได้ รวมถึงสาร Polyvinylpyrolidole (PVP) ที่เป็นส่วนผสมในขั้นตอนการทำผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มชนิดผงก็มีส่วนช่วยให้เชื้อ *Bacillus* มีการยึดเกาะและรักษาสภาพเซลล์ได้ดี (ณัฏฐิมาและคณะ 2555; Stevens, 2003; Suharti and Vries, 2004) ส่งผลให้ *Bacillus* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์วัตถุในน้ำจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง

ได้ นอกจากนี้ การลดลงของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในปริมาณที่สูง อาจเกิดจากการทำงานของกระบวนการย่อยสลายจากจุลินทรีย์กลุ่มอื่นเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต (assimilation) ได้เช่นกัน (Visvanathan *et al*., 2008) สอดคล้องกับการรายงานของ วารุณี และคณะ (2549) พบว่า การใช้จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* sp. จำนวน 6 สายพันธุ์ต่อการปรับปรุงคุณภาพน้ำจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทต่ำกว่าบ่อการทดลองที่ไม่เติมกลุ่มจุลินทรีย์

ดังนั้น จากผลการทดลองประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มที่ได้จากการผสมกล้าเชื้อ *Bacillus* BR001:BR002 ด้วยวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร 5 ชนิด จึงเลือกใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร คือ ขี้เลื่อยบด เป็นสารพาเพื่อให้กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มยึดเกาะและสร้างเป็นผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ โดยนำไปใช้ในการทดลองการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มในระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งต่อไป

6. การศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมชนิดผง

จากผลการศึกษาอัตราการรอดและปริมาณเชื้อระหว่างการเก็บรักษาในระยะเวลา 6 เดือน พบว่า ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมชนิดผงอยู่ในช่วง 10^9–10^{10} CFU/g ซึ่งการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิห้องส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มได้สูงกว่าการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่สภาวะ 4 °C เนื่องจากปัจจัยของอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่ออัตราการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้ง และสภาพของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในช่วงที่ถูกความร้อนและสภาพแวดล้อมของเซลล์ในระหว่างการให้ความร้อน โดยผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มที่เก็บในอุณหภูมิห้องมีอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มเฉลี่ยอยู่ในช่วง 3.50×10^9 ถึง 2.87×10^9 CFU/g ขณะที่ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มที่เก็บในอุณหภูมิ 4 °C อัตราการรอดชีวิตของเชื้อมีการลดลงในช่วงเดือนที่ 4 ถึงเดือนที่ 6 ของการทดลองเฉลี่ยเท่ากับ 1.85×10^8 ลดลงจนถึง 1.63×10^8 CFU/g (ภาพที่ 38) การลดลงของเชื้อ *Bacillus* เนื่องมาจากเชื้อต้องมีการปรับตัวจะทำให้เชื้ออ่อนแอ ส่งผลให้เชื้อด้อยประสิทธิภาพไป ซึ่งสูตรสำเร็จจะมีส่วนผสมของสารอาหาร สารพา สารยึดเกาะที่เชื้อ *Bacillus* สามารถรักษาความมีชีวิตและประสิทธิภาพของเซลล์ได้ (โชคชัย และหนึ่ง, 2556) และอาจเนื่องมาจากในขั้นตอนกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์มีการเติมสารเชื่อม และสารยึดเกาะ แต่ไม่ได้มีการเติมสารป้องกันเซลล์ที่มีคุณสมบัติป้องกันปฏิกิริยาของโปรตีนและการลดจำนวนลงของเซลล์ที่มีชีวิตที่เป็นส่วนประกอบในวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อโดยการแช่เยือกแข็ง หรือการแช่เย็นผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ (Takeuchi *et al.*, 2000) จากผลการทดลองพบว่า การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มที่อุณหภูมิห้องสามารถคงอัตราการรอดชีวิตและประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มได้ดีกว่าเก็บรักษาในที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งเป็นวิธีที่ประหยัดและง่ายต่อการเก็บรักษา



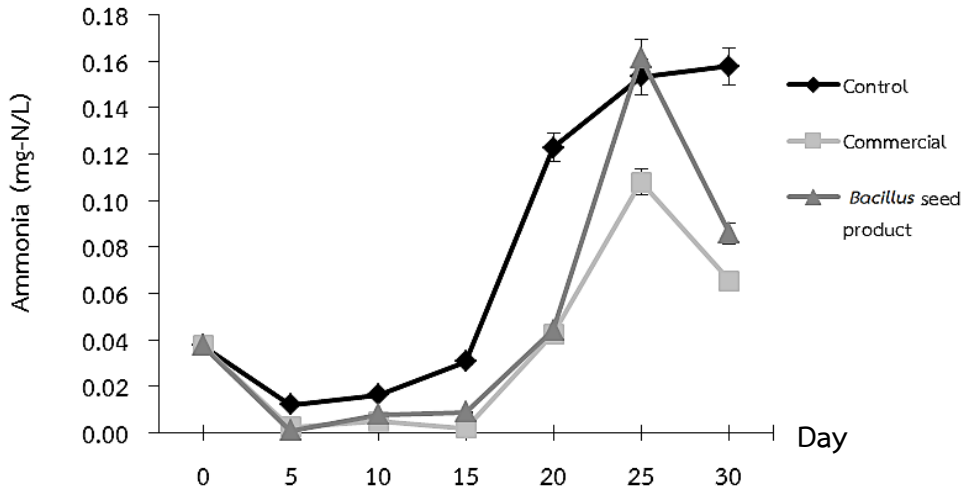
ภาพที่ 38 การรอดชีวิตของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* (BR001:BR002) ทนเค็มผสมที่นำมาผสมกับขี้เลื่อยบดในสัดส่วน 1:1 ในรูปชนิดผง หลังจากเปิดใช้งานผลิตภัณฑ์ในระยะเวลา 6 เดือน

7. การใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมชนิดผงในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง

ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมชนิดผงกับบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่มีขนาดบ่อ 3.5 ไร่ ความลึก 1.8 เมตร โดยมีการตีน้ำให้อากาศ 4 ครั้ง/วัน ให้อาหารกุ้งโดยการหว่านมือ 3 ครั้ง/วัน สำหรับความหนาแน่นของการกุ้งลงเลี้ยงระยะโพสลาร์วา 12 (PL12) ที่ความหนาแน่นอยู่ที่ 200,000 ตัว/ไร่ ที่ความหนาแน่น 70 ตัว/ตารางเมตร ในช่วงที่กุ้งมีอายุ 40 วัน ขนาดประมาณ 100 ตัว/กิโลกรัม ได้ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมม (*Bacillus* seed product) ประกอบด้วย แบคทีเรีย *B. tequilensis* BR001 และ BR002 สัดส่วน 70:30 ที่มีความเข้มข้นของเชื้อที่ 10^{7}–10^{9} CFU/g เปรียบเทียบกับบ่อเลี้ยงกุ้งที่ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า (commercial) ที่ใช้ *Bacillus* 4 ชนิด คือ *B. subtilis, B. megaterium*, *B. licheniformis* และ *B. polymyxa* ที่ความเข้มข้นของเชื้อ 10^{9} CFU/g ซึ่งการขยายกล้าเชื้อเพื่อใช้ปรับปรุงคุณภาพน้ำจะใช้สูตรเดียวกัน โดยใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อปริมาณ 500 กรัม (w/v) อาหารกุ้ง 500 กรัม (w/v) กากน้ำตาล 500 มิลลิลิตร (v/v) และน้ำทะเลที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งจากบ่อพัก 200 ลิตร (v/v) คนส่วนผสมให้เข้ากัน ให้อากาศเบา ๆ ติดต่อกันเป็นเวลา 24–36 ชั่วโมง นำน้ำขยายกล้าเชื้อสาดให้ทั่วบ่อในอัตรา 200 ลิตร/ไร่ และใช้ทุก ๆ 3 วันในระหว่างการเลี้ยงกุ้ง ซึ่งการทดลองใช้เวลาทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเป็นเวลา 30 วัน โดยเก็บน้ำทุก ๆ 5 วันไปทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

7.1 ประสิทธิภาพการลดปริมาณแอมโมเนีย

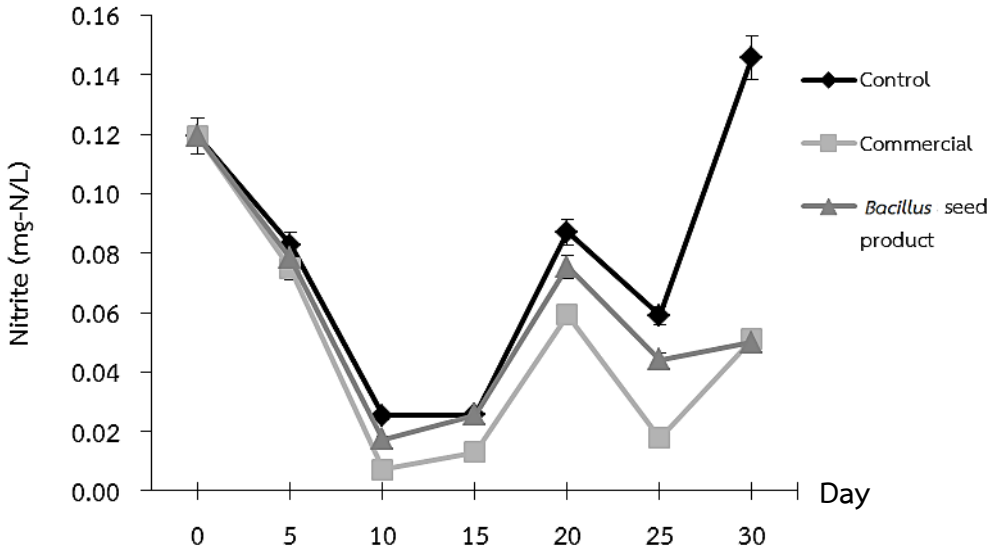
จากการทดลองเป็นเวลา 30 วัน พบว่า ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งที่มีการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสม (*Bacillus* seed product) กับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า (commercial) ส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียลดลงได้ดีในช่วงวันที่ 5 ถึงวันที่ 15 โดยผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมและผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าสามารถลดแอมโมเนียได้เฉลี่ยเท่ากับ 76.80–98.13% และ 86.93–94.67% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งที่เป็นชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และในวันที่ 20 ถึงวันที่ 25 ปริมาณแอมโมเนียในระบบมีการเพิ่มขึ้นทุกบ่อของการทดลอง วันที่ 25 มีการเพิ่มของปริมาณแอมโมเนียขึ้นมากที่สุดจากปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้นเท่ากับ 0.04±0.03 mg-N/L เฉลี่ยเป็น 0.11±0.00 ถึง 0.16±0.00 mg-N/L โดยในวันที่ 30 ปริมาณแอมโมเนียมีการลดลง โดยบ่อที่ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้ามีแอมโมเนียเหลือในระบบเฉลี่ย 0.07±0.02 mg-N/L และบ่อที่ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมมีปริมาณแอมโมเนียในระบบลดลงเหลือ 0.09±0.04 mg-N/L ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ภาพที่ 39)



ภาพที่ 39 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย เมื่อเปรียบเทียบการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าชนิดผงในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

7.2 ประสิทธิภาพการลดปริมาณไนไตรท์

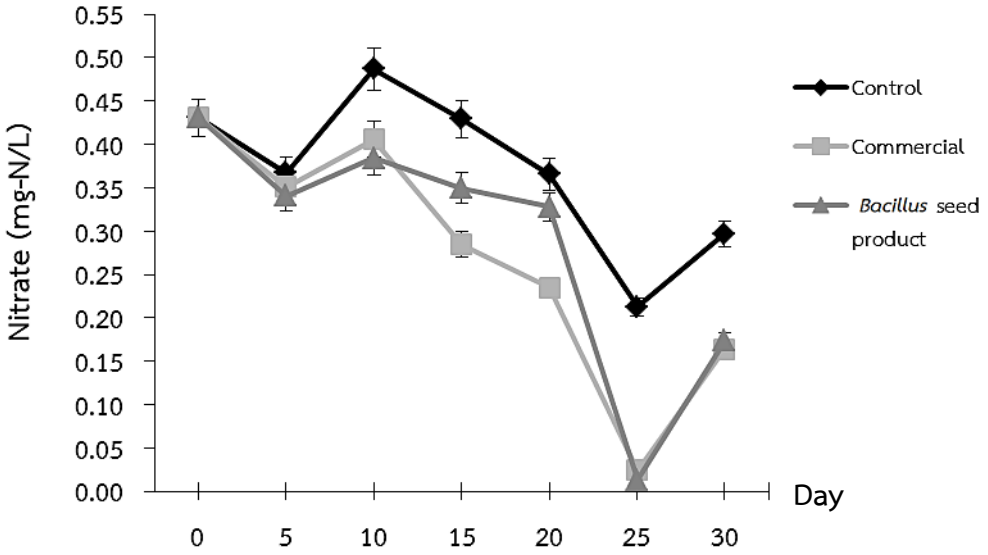
ปริมาณไนไตรท์ลดลงหลังจากใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมและผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า โดยลดลงสูงสุดในวันที่ 10 ของการทดลอง จากปริมาณไนไตรท์เริ่มต้นเท่ากับ 0.12±0.02 mg-N/L บ่อทดลองที่มีการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าปริมาณไนไตรท์ลดลงมากที่สุดเหลือเฉลี่ย 0.01±0.00 mg-N/L (สามารถลดปริมาณไนไตรท์ได้ 94.00%) บ่อทดลองที่มีการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมมีปริมาณไนไตรท์เหลือเฉลี่ย 0.02±0.01 mg-N/L (สามารถลดปริมาณไนไตรท์ได้ 85.40%) ซึ่งแตกต่างกับบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งที่เป็นชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากนั้นปริมาณไนไตรท์ในระบบมีการเพิ่มขึ้นทุกบ่อของการทดลองในวันที่ 15 ถึงวันที่ 20 เฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.06–0.09 mg-N/L ซึ่งเป็นปริมาณไนไตรท์สะสมในระบบที่น้อยกว่าปริมาณไนไตรท์ในวันเริ่มต้น และในวันที่ 30 ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มและผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าส่งผลให้มีปริมาณไนไตรท์เหลือในระบบเฉลี่ย 0.05±0.01 mg-N/L ขณะที่บ่อเพาะเลี้ยงที่เป็นชุดควบคุมมีปริมาณไนไตรท์เหลือในระบบเฉลี่ย 0.15±0.09 mg-N/L (ภาพที่ 40)



ภาพที่ 40 การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์ เมื่อเปรียบเทียบการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

7.3 ประสิทธิภาพการลดปริมาณไนเตรท

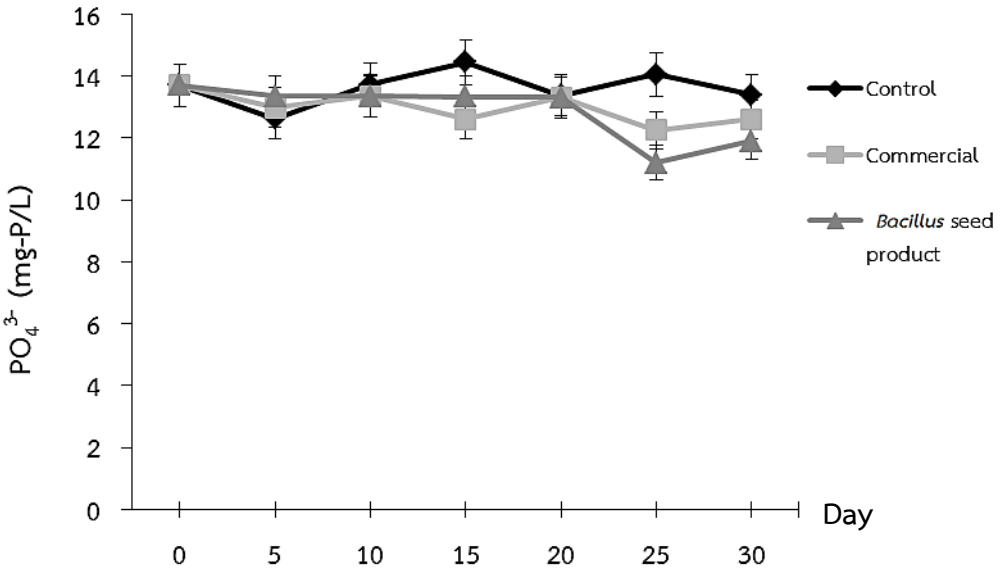
จากการทดลองพบว่า ในวันที่ 5 ทุกชุดการทดลองมีปริมาณไนเตรทที่ลดลงจากปริมาณไนเตรทเริ่มต้นเท่ากับ 0.43±0.03 mg-N/L เหลือเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.34±0.00 ถึง 0.37±0.00 mg-N/L จากนั้นปริมาณไนไตรทมีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 10 ในบ่อเพาะเลี้ยงที่มีการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมเท่ากับ 0.40±0.00 mg-N/L และบ่อเพาะเลี้ยงที่มีการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าเท่ากับ 0.41±0.00 mg-N/L โดยแตกต่างกับบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งที่เป็นชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ที่มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณไนเตรทเป็น 0.49±0.00 mg-N/L และปริมาณไนเตรทมีการลดลงจากวันที่ 15 ถึงวันที่ 25 ซึ่งปริมาณไนเตรทลดลงมากที่สุดในบ่อเพาะเลี้ยงที่มีการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมและผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าเฉลี่ยเท่ากับ 88.60% และ 94.33% ตามลำดับ โดยในวันที่ 30 ปริมาณไนเตรทคงเหลือในระบบในบ่อเพาะเลี้ยงที่เป็นชุดควบคุม บ่อเพาะเลี้ยงที่ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า และบ่อเพาะเลี้ยงที่ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมเท่ากับ 0.30±0.04, 0.16±0.07 และ 0.17±0.02 mg-N/L ตามลำดับ (ภาพที่ 41)



ภาพที่ 41 การเปลี่ยนแปลงของไนเตรท เมื่อเปรียบเทียบการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

7.4 ประสิทธิภาพการลดปริมาณออร์โธฟอสเฟต

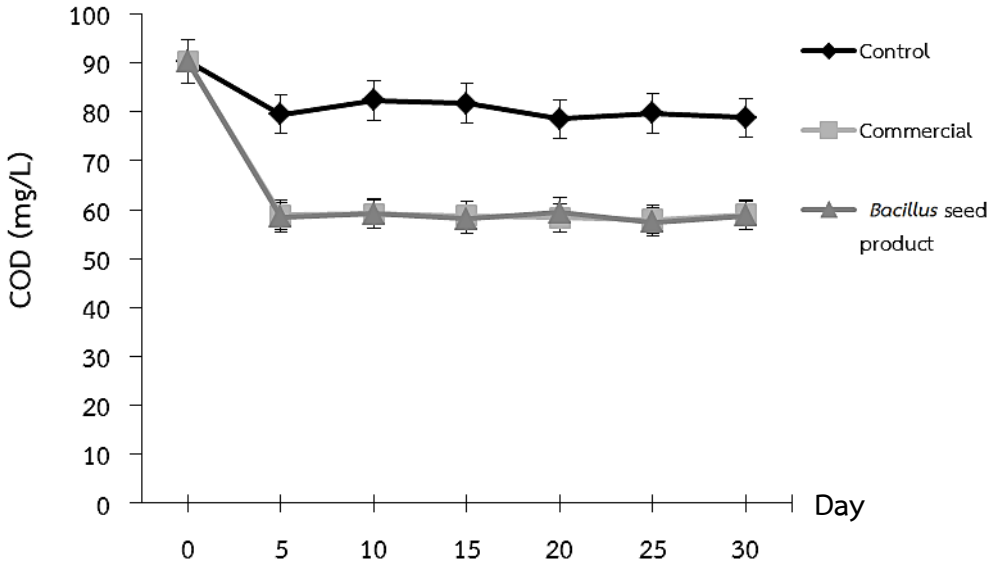
ปริมาณออร์โธฟอสเฟตเริ่มต้นเฉลี่ยเท่ากับ 13.71±0.02 mg-P/L และหลังจากใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมและผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง เป็นเวลา 30 วัน พบว่า ปริมาณออร์โธฟอสเฟตมีการลดลงในวันที่ 5 ของการทดลอง โดยปริมาณออร์โธฟอสเฟตมีการลดลงเหลือเฉลี่ย 12.62±0.01 mg-P/L (บ่อเพาะเลี้ยงที่เป็นชุดควบคุม), 12.99±0.02 mg-P/L (บ่อเพาะเลี้ยงที่ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า) และ 13.36±0.02 mg-P/L (บ่อเพาะเลี้ยงที่ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็ม) ในวันที่ 15 ปริมาณออร์โธฟอสเฟตมีการลดลงในบ่อเพาะเลี้ยงที่ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าและบ่อเพาะเลี้ยงที่ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมเหลือเฉลี่ย 12.60±0.04 mg-P/L และ 12.33±0.01 mg-P/L ตามลำดับ และในวันที่ 25 ปริมาณออร์โธฟอสเฟตมีการลดลงมากที่สุดเท่ากับ 10.63% และ 18.35% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งที่เป็นชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ที่มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณออร์โธฟอสเฟตในระบบ และในวันที่ 30 บ่อเพาะเลี้ยงกุ้งที่เป็นชุดควบคุมปริมาณออร์โธฟอสเฟตเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 13.39±0.00 mg-P/L (ปริมาณออร์โธฟอสเฟตมีการเพิ่มขึ้นเท่ากับ 2.32%) (ภาพที่ 42) ขณะที่การใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าและผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมสามารถลดออร์โธฟอสเฟตได้ 8.07% และ 13.17% ตามลำดับ ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพที่ 42 การเปลี่ยนแปลงของออร์โธฟอสเฟต เมื่อเปรียบเทียบการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

7.5 ประสิทธิภาพการลดค่า COD

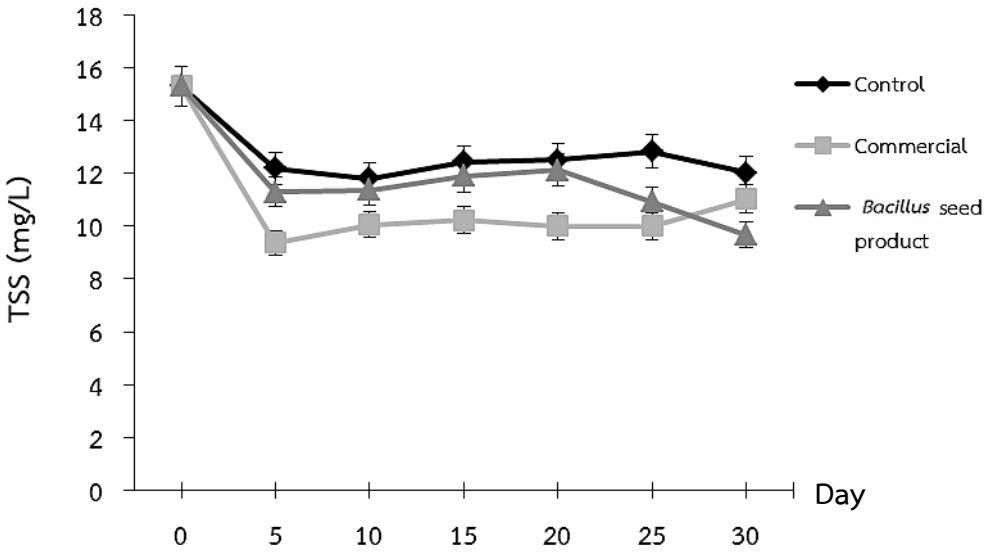
หลังจากใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมและผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าในบ่อเพาะเลี้ยง พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของค่า COD ในบ่อทดลอง โดยค่า COD เริ่มต้นเท่ากับ 90.35±1.42 mg/L ลดลงในวันที่ 5 ถึงวันที่ 30 ของการทดลองในบ่อเพาะเลี้ยงที่ใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมและผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าเหลือเฉลี่ยเท่ากับ 58.46±0.45 mg/L (ค่า COD ที่ลดลงเท่ากับ 35.25%) และ 58.91±0.77 mg/L (ค่า COD ที่ลดลงเท่ากับ 34.80%) ตามลำดับ ในวันที่ 25 ค่า COD ลดลงมากที่สุดในบ่อเพาะเลี้ยงที่ใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมเท่ากับ 36.45% รองลงมาเป็นบ่อเพาะเลี้ยงที่ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าเท่ากับ 35.88% หรือการลดลงของค่า COD เฉลี่ยอยู่ในช่วง 32.42±2.08 ถึง 32.94±3.67 mg/L และในวันที่ 30 ค่า COD ที่เหลือในระบบเฉลี่ยอยู่ในช่วง 58.83±4.56 ถึง 58.97±2.12 mg/L ซึ่งแตกต่างกับบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งที่เป็นชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ที่มีค่า COD ที่เหลือในระบบเฉลี่ย 78.82±4.20 mg/L (ภาพที่ 43)



ภาพที่ 43 การเปลี่ยนแปลงของค่า COD เมื่อเปรียบเทียบการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

7.6 ประสิทธิภาพการลดปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด

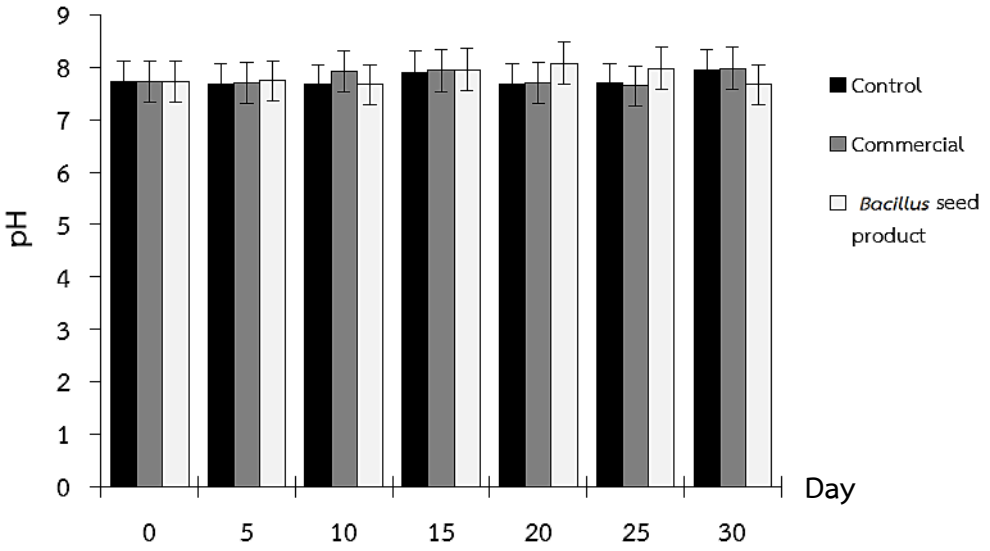
จากการทดลองพบว่า ในบ่อเพาะเลี้ยงมีปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดเริ่มต้นเฉลี่ย 15.30±3.20 mg-/L มีการลดลงในวันที่ 5 ถึงวันที่ 30 ของการทดลอง โดยในวันที่ 5 ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดลดลงเฉลี่ย 3.10±0.12 ถึง 5.93±0.15 mg/L คงเหลือในบ่อเพาะเลี้ยงที่ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าปริมาณ 9.37±3.32 mg/L ในบ่อเพาะเลี้ยงที่ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมปริมาณ 11.30±3.20 mg/L และในบ่อเพาะเลี้ยงที่เป็นชุดควบคุมปริมาณ 12.20±3.20 mg/L โดยในวันที่ 25 ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดในบ่อเพาะเลี้ยงที่ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าและผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมมีการลดลงเหลือปริมาณ 10.00±0.10 mg-/L และ 10.93±0.34 mg/L ตามลำดับ และในวันที่ 30 บ่อเพาะเลี้ยงที่ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมมีปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดเหลือในระบบน้อยที่สุดเท่ากับ 9.67±0.24 mg/L (ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดลดลงได้เท่ากับ 36.82%) ซึ่งต่ำกว่ากับบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งที่เป็นชุดควบคุม (12.03±3.49 mg/L) และบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งที่มีการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า (11.03±2.54 mg/L) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาพที่ 44)



ภาพที่ 44 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

7.7 การเปลี่ยนแปลงของค่า pH

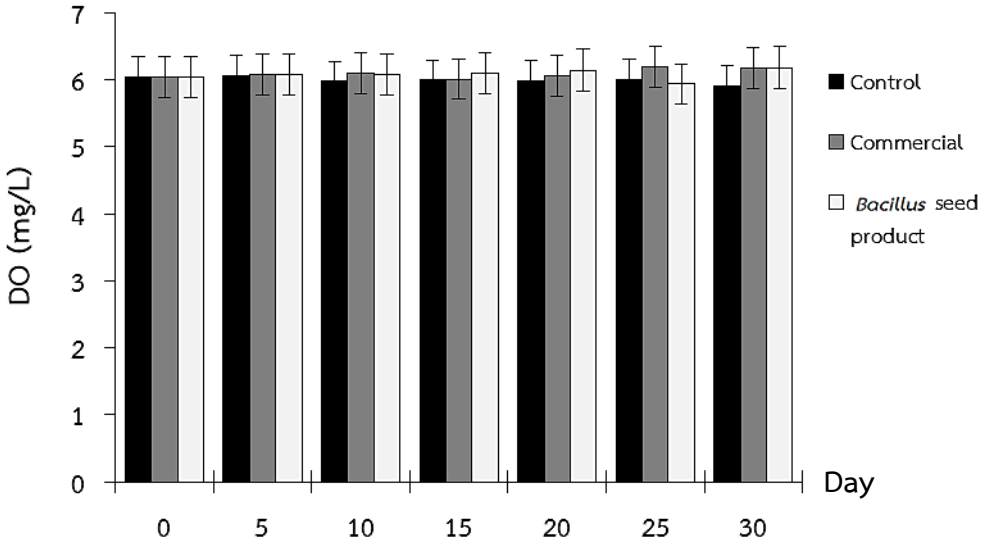
ค่า pH เริ่มต้นในการทดลองเฉลี่ยเท่ากับ 7.73±0.31 มีการเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 30 ของทุกบ่อเพาะเลี้ยงในการทดลองเฉลี่ย 7.69±0.33 ถึง 7.98±0.04 ซึ่งในวันที่ 20 และวันที่ 25 ค่า pH ในบ่อเพาะเลี้ยงที่ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมมีการเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 8.08±0.01 และ 7.98±0.04 ตามลำดับ และในวันที่ 30 การเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของบ่อเลี้ยงกุ้งทั้งบ่อที่เป็นชุดควบคุม และบ่อที่เป็นชุดทดสอบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ภาพที่ 45)



ภาพที่ 45 การเปลี่ยนแปลงของ pH เมื่อเปรียบเทียบการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

7.8 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ

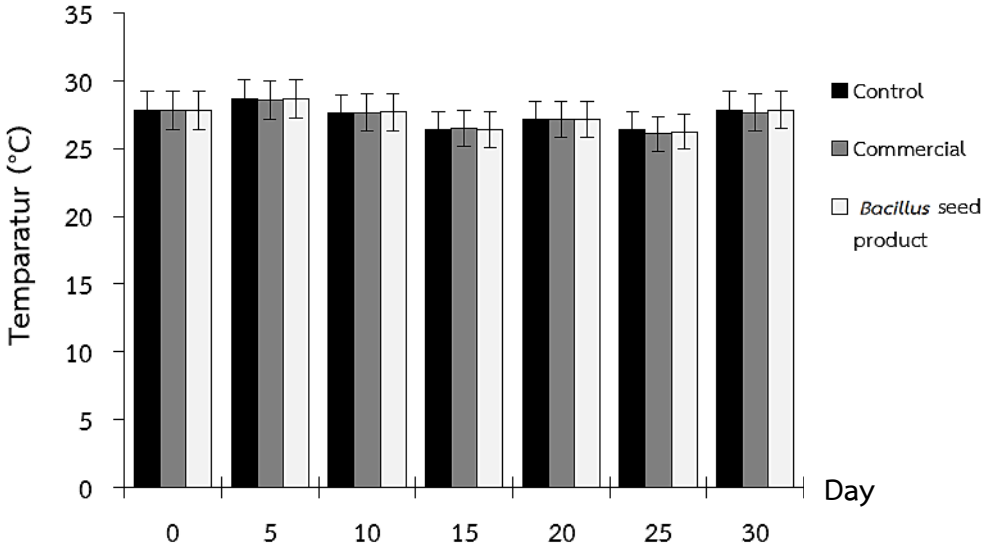
จากการทดลองพบว่า ทุกบ่อเพาะเลี้ยงในการทดลองมีออกซิเจนละลายน้ำเริ่มต้นเฉลี่ย 6.05±0.02 mg/L และมีการเพิ่มขึ้นในบ่อเพาะเลี้ยงที่ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าและผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมในวันที่ 30 ของการทดลองเฉลี่ยเท่ากับ 6.18±0.03 mg/L ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับบ่อเพาะเลี้ยงที่เป็นชุดควบคุมมีการลดลงของออกซิเจนละลายน้ำเหลือในระบบเท่ากับ 5.92±0.03 mg/L (ภาพที่ 46)



ภาพที่ 46 การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำ เมื่อเปรียบเทียบการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

7.9 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ

อุณหภูมิเริ่มต้นในทุกบ่อเพาะเลี้ยงของการทดลองเฉลี่ย 27.82±0.01 ℃ ในวันที่ 5 มีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเฉลี่ย 28.55±0.16–28.67±0.09 ℃ และมีการลดลงในวันที่ 15 เฉลี่ยอยู่ในช่วง 26.37±0.07–26.50±0.06 ℃ และในวันที่ 25 ของการทดลองเฉลี่ยอยู่ในช่วง 26.07±0.03–26.40±0.06 ℃ และในวันที่ 30 อุณหภูมิเพิ่มกลับขึ้นมาเล็กน้อยเฉลี่ย 27.63±0.09 ℃ ถึง 27.83±0.03℃ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ภาพที่ 47)



ภาพที่ 47 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ เมื่อเปรียบเทียบการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

หลังจากการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมและผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าในรูปชนิดผง ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) เป็นเวลา 30 วัน พบว่า ในระหว่างการทดลองมีค่า pH เฉลี่ยเท่ากับ 7.82±0.11 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ยเท่ากับ 6.05±0.02 mg/L และค่าอุณหภูมิเฉลี่ยเท่ากับ 27.30±0.01 ℃ ในทุกบ่อของการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$) ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียลดลงได้ดีในช่วงวันที่ 5 ถึงวันที่ 15 เฉลี่ยเท่ากับ 76.80–98.13% และในวันที่ 30 ส่งผลให้แอมโมเนียในระบบคงเหลือ 0.09±0.04 mg-N/L โดยปริมาณไนไตรท์มีการลดลงมากที่สุดในวันที่ 10 ส่งผลให้ปริมาณไนไตรท์เหลือเฉลี่ย 0.02±0.01 mg-N/L (สามารถลดปริมาณไนไตรท์ได้ 85.40%) และทำให้มีปริมาณไนไตรท์สะสมในระบบเท่ากับ 0.05±0.01 mg-N/L ในวันที่ 30 ของการทดลอง สอดคล้องกับรายงานของ Wardhani และคณะ (2017) ที่ทดสอบประสิทธิภาพของกลุ่มจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. A16ZZ, *Bacillus* sp. BNPK-13 และ *B. cereus* CP1 ในการบำบัดน้ำเสีย พบว่า มีการลดลงของปริมาณแอมโมเนีย 96.28% ปริมาณไนไตรท์ลดลง 88.36% และส่งผลให้มีไนเตรทสะสมเพิ่มขึ้น 76.51% ในเวลา 7 วัน (ความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้นเท่ากับ 350 mg-N/L) ซึ่งไนเตรทที่เกิดขึ้นในระบบเกิดจากการออกซิเดชันของแอมโมเนียไปเป็นไนเตรทผ่านกระบวนการไนตริฟิเคชัน การลดลงของสารอินทรีย์ไนโตรเจนในระหว่างการทดลองในช่วง 5 วันแรกนั้น เกิดหลังจากเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมลงไป เชื้อสามารถดูดซึมสารอินทรีย์ไนโตรเจนบางส่วนเข้าไปในกระบวนการเจริญเติบโต (assimilation) (มะลิวัลย์ และสรวิศ, 2555) ซึ่งเชื้อสามารถใช้สารอินทรีย์ที่มีอยู่เดิมจากกระบวนการย่อยของจุลินทรีย์อื่น ๆ เมื่อสารอินทรีย์ในระบบมีปริมาณลดน้อยลง กระบวนการย่อยสารอินทรีย์อื่น ๆ จึงเกิดขึ้นอีกครั้ง รวมถึงการเจริญเติบโตของเชื้อชะลอช้าลง เนื่องจากต้องการแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนเพื่อการเพิ่มจำนวน (Yan *et al*., 2006; Chanpun *et al*., 2007) ทำให้แบคทีเรียต้องมีการย่อยโปรตีนในอาหารกุ้งเพิ่มขึ้น ส่งผลต่อแอมโมเนียมีปริมาณที่ค่อย ๆ สูงขึ้นอีกครั้งในวันที่ 15 ถึงวันที่ 30 ของการทดลอง ซึ่งระบบการเลี้ยงกุ้งจะมีสารอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจนที่มาจากของเสียของกุ้งที่ขับถ่ายออกมา รวมถึงเศษอาหารที่เหลือภายในบ่อเลี้ยงสามารถละลายอยู่ในน้ำภายในเวลา 3–4 วัน และสะสมภายในบ่อได้ในระยะเวลา 1 เดือน (พุทธ , 2562)

สำหรับปริมาณไนเตรทมีการลดลงและเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 10 ถึงวันที่ 25 ซึ่งประสิทธิภาพการลดไนเตรทเฉลี่ยเท่ากับ 7.26–88.60% (ปริมาณไนเตรทที่ลดได้เฉลี่ยเท่ากับ 0.38±0.05 mg-N/L) และทำให้ในวันที่ 30 มีปริมาณไนเตรทคงเหลือในระบบ 0.16±0.07 mg-N/L โดยหลังจากเกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์จากอาหารกุ้ง ปริมาณแอมโมเนียจะลดลงและปริมาณไนเตรทจะเพิ่มขึ้น ขณะที่ไนไตรท์มีการสะสมและเปลี่ยนแปลงน้อย (Chanpun *et al*., 2007) สอดคล้องกับการรายงานของ Lu และคณะ (2012) ซึ่งศึกษาประสิทธิภาพ *B. subtilis* ในการกำจัดสารประกอบไนโตรเจนในน้ำจากการเลี้ยงปลา ที่มีของเสียจากปลาเป็นอินทรียวัตถุที่ทำให้จุลินทรีย์

เกิดการย่อย เช่นเดียวกับของเสียที่มาจากกุ้งในการเลี้ยงกุ้งทำให้มีสารประกอบไนโตรเจนเพิ่มขึ้น (สุบัณฑิต และวีระพงศ์, 2552) โดยเชื้อ *B. subtilis* ปริมาณ $2x10^{11}$ CFU/mL ลดแอมโมเนียได้ในเวลา 10 วัน สามารถลดไนไตรท์ได้อยู่ในช่วง 0.25–0.50 mg–N/L และลดไนเตรทได้อยู่ในช่วง 2.0–2.5 mg–N/L ขณะที่ผลการทดลองปริมาณออร์โธฟอสเฟตมีการลดลงต่อเนื่องในเวลา 30 วันเฉลี่ยอยู่ในช่วง 2.53–13.17% โดยผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมส่งผลให้ปริมาณออร์โธฟอสเฟตลดลงได้มากที่สุดในวันที่ 25 เท่ากับ 18.35% (ปริมาณออร์โธฟอสเฟตที่ลดลงเท่ากับ 2.52±0.02 mg-P/L) ส่งผลให้เหลือปริมาณออร์โธฟอสเฟตในระบบในวันที่ 30 เท่ากับ 12.60±0.05 mg-P/L โดยออร์โธฟอสเฟตที่ละลายอยู่ในน้ำ ส่วนหนึ่งเกิดจากฟอสฟอรัสที่เหลือจากการดูดซึมเพื่อนำไปใช้ของกุ้ง หลังจากถูกบริโภค เผาผลาญ และขับถ่ายออกมาจากตัวกุ้งอยู่ในรูปตะกอนอินทรีย์สิ่งขับถ่ายและละลายน้ำ (นิคม และคณะ, 2549; พงศ์ศักดิ์ และรัฐชา, 2557) และเกิดจากกิจกรรมการย่อยเศษอาหารที่เหลือของแบคทีเรีย (สมหมาย, 2539) การเปลี่ยนแปลงของปริมาณออร์โธฟอสเฟตสอดคล้องกับค่า COD ลดลงในวันที่ 5 ถึงวันที่ 30 ที่เกิดจากปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำลดต่ำลง โดยวันที่ 25 ค่า COD ลดลงมากที่สุดเท่ากับ 36.45% (ค่า COD ที่ลดลงเท่ากับ 32.94±3.67 mg/L) และในวันที่ 30 ค่า COD ในระบบเหลือเฉลี่ย 58.83±4.56 mg/L (ค่า COD ที่ลดลงเท่ากับ 34.89%) รวมถึงปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดมีการลดลงในวันที่ 5 ถึงวันที่ 30 ของการทดลองเฉลี่ยอยู่ในช่วง 26.14–36.82% โดยในวันที่ 25 ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดมีการลดลงเหลือปริมาณ 10.00±0.10 mg/L และในวันที่ 30 ซึ่งการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมทำให้ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดเหลือในระบบน้อยที่สุดเท่ากับ 9.67±0.24 mg/L (ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดลดลงได้เท่ากับ 5.63±3.03 mg/L หรือเท่ากับ 36.82%) ตามลำดับ การลดลงของค่า COD และปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด ในช่วง 15 วันแรกของการทดลองสอดคล้องกับ Zhao และ คณะ (2009) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของ *B. cereus* DNF409 ในการบำบัดน้ำเสีย พบว่า การใช้ *B. cereus* DNF409 ทำให้ค่า COD ลดลงจาก 127 mg/L เหลือ 36 mg/L (71.7%) และปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดลดลงจาก 9.86 mg/L เหลือ 3.1 mg/L หรือ 68.6% ตามลำดับ และจากผลการศึกษาของ Safitri และคณะ (2015) ที่ใช้กลุ่มจุลินทรีย์ *B. coagulans, B. licheniformis, B. pumilus, B. subtilis, Nitrosomonas* sp. และ *Pseudomonas putida* ในการบำบัดทางชีวภาพของน้ำเสียในโรงบำบัดน้ำเสียพบว่า กลุ่มแบคทีเรียทำให้ปริมาณ BOD, COD และปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดลดลงได้เท่ากับ 71.93%, 64.30% และ 94.85% ตามลำดับ ในเวลา 15 วัน

จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำระหว่างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมและผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าในการเลี้ยงกุ้ง พบว่า ประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท และค่า COD ตลอดระยะเวลา 30 วันของการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) ขณะที่การลดลงของออร์โธฟอสเฟต และปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดในบ่อเพาะเลี้ยงที่มีการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมลดลงได้ดีกว่าบ่อเพาะเลี้ยงที่มีการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) (วันที่ 30 ของการทดลอง) ซึ่งความแตกต่างของสายพันธุ์แบคทีเรียสามารถส่งผลให้ประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำแตกต่างกันได้ ซึ่งอาจเกิดจากความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์และอนินทรีย์ และการใช้ธาตุอาหารเพื่อการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน (Ducklow และ Carlson, 1992) จากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มผสมที่ผลิตขึ้นมานั้นมีประสิทธิภาพสูงในการบำบัดน้ำในการเลี้ยงกุ้ง ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้ทดแทนผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าที่มีอยู่ได้

7.2.3 บทสรุป

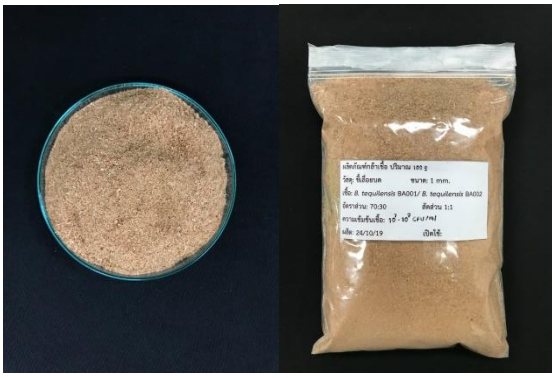
1. สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาพบว่า *Bacillus. tequilensis* BR001 และ BR002 มีคุณสมบัติเป็น Heterotrophic nitrifying–aerobic denitrifying bacteria ที่มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ที่ 0.5–3% NaCl และ pH อยู่ในช่วง 7–7.5 กล้าเชื้อ BR001 และ BR002 ในปริมาณเซลล์ 1% มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำเสียสังเคราะห์ในเวลา 7 วัน มากกว่า 80% และสามารถกำจัดสารอนินทรีย์ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อได้มากที่สุด ตั้งแต่วันที่ 4 ถึงวันที่ 7 ได้มากกว่า 50% สำหรับสัดส่วนของ *B. tequilensis* BR001 และ BR002 ที่นำมาผสมกันเท่ากับ 70:30 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในช่วง 10^8–10^9 CFU/mL ทำให้แอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทลดลงได้มากที่สุดเท่ากับ 82.30%, 70.57% และ 26.07% ตามลำดับ ในการบำบัดน้ำจากการเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 5 วัน การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผงเป็นระยะเวลา 6 เดือน ที่อุณหภูมิห้องสามารถคงความมีชีวิตของ *Bacillus* ได้มากที่สุดเฉลี่ย 10^9 CFU/mL สำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมของสายพันธุ์ *Bacillus* BR001 และ BR002 (สัดส่วน 70:30) ผสมเข้ากับสารพาที่เป็นผงขี้เลื่อยบด (สัดส่วน 1:1) เป็นสูตรที่สามารถลดสารอนินทรีย์ (ปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท และออร์โธฟอสเฟต) ได้สูงสุดเฉลี่ยมากกว่า 98.69%, 98.70%, 51.96% และ 81.91% ตามลำดับ และสมารถลดปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด และค่า COD ได้เฉลี่ยมากกว่า 81.31% และ 74.42% ตามลำดับ ในระยะเวลา 7 วัน และจากผลการทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผงในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) เป็นเวลา 30 วัน สามารถลดแอมโมเนียได้มากที่สุดเท่ากับ 98.13% (วันที่ 5) สามารถลดไนไตรท์ได้เท่ากับ 58.12% ลดไนเตรทได้เท่ากับ 60.42% รวมไปถึงมีค่า COD ที่ลดลงเท่ากับ 34.89% ในวันที่ 30 ของการทดลอง ซึ่งมีประสิทธิภาพไม่ต่างกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า ($p>0.05$) และแม้ว่าการลดลงของปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดในช่วงวันที่ 5 ถึงวันที่ 25 ของการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าจะลดลงได้ดี แต่ในวันที่ 30 ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดลดลงได้มากที่สุดในบ่อทีมีการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผงเท่ากับ 36.82% รวมถึงส่งผลให้ปริมาณออร์โธฟอสเฟตในระบบลดลงในวันที่ 25 ถึงวันที่ 30 เท่ากับ 13.17%–18.35% ซึ่งมี

ค่าต่ำกว่าบ่อเลี้ยงกุ้งที่เป็นชุดควบคุมและบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

2. ผลการอบรมและถ่ายทอดวิธีการใช้และเทคโนโลยีการผลิตผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผง

หลังจากสร้างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผง ที่ใช้ *Bacillus* BR001 และ BR002 (สัดส่วน 70:30) ผสมเข้ากับสารพาที่เป็นผงขี้เลื่อยบด (สัดส่วน 1:1) ซึ่งเป็นสูตรการผลิตผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผงที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำในการเลี้ยงกุ้งในระดับห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 7 วันได้ดีที่สุด จึงได้นำผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อดังกล่าวไปทดสอบประสิทธิภาพการใช้จริงในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) พร้อมทั้งได้ถ่ายทอดองค์ความรู้ของวิธีการใช้ และข้อปฏิบัติที่เหมาะสมต่อการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผงให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง ซึ่งมีคุณดารุณี สงหนู และผู้เกี่ยวข้องของดารุณีฟาร์ม (ที่ตั้ง ดารุณีฟาร์ม หมู่ที่ 8 ตำบลหน้าสตน อำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช) ให้ความอนุเคราะห์สถานที่การทดลอง และให้ความสนใจในการรับข้อมูลของการถ่ายทอดองค์ความรู้ของงานวิจัยในครั้งนี้ ซึ่งข้อมูลที่ได้ถ่ายทอดให้แก่เกษตรกรประกอบด้วย กรรมวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผงเบื้องต้น วิธีการขยายกล้าเชื้อ วิธีการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผง วิธีการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผง คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผง รวมไปถึงให้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับการจัดการคุณภาพน้ำภายในระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) และตรวจสอบคุณภาพน้ำภายในระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งให้แก่ดารุณีฟาร์มในระยะเวลา 1 เดือนของการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผงซึ่งได้แสดงกิจกรรมต่าง ๆ ไว้ดังภาพที่ 48–52



ภาพที่ 48 ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผงที่มีส่วนประกอบ กล้าเชื้อ *Bacillus* BR001 และ BR002 (สัดส่วน 70:30) และสารพาที่เป็นผงขี้เลื่อยบด (สัดส่วน 1:1) ที่นำไปทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผง

ภาพที่ 49 การขยายกล้าเชื้อผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผง เพื่อใช้ปรับปรุงคุณภาพน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ของเกษตรกร

ภาพที่ 50 บริเวณบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ของเกษตรกรที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผง

ภาพที่ 51 การให้ข้อมูลที่แก่เกษตรกรและผู้ที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับกรรมวิธีการผลิตเบื้องต้น วิธีการใช้ วิธีการเก็บรักษา และคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผง และข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับการจัดการคุณภาพน้ำภายในระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

ภาพที่ 52 การเก็บตัวอย่างน้ำ และตรวจสอบคุณภาพน้ำภายในระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งให้แก่ดารุณีฟาร์มในระหว่างการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ผสมชนิดผง

8. ภาคผนวก ก ตารางแสดงผลการทดลอง

1. ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำระดับฟลาสก์ (ระบบปิด: Non–aerated system) ในน้ำเสียสังเคราะห์

1) การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย

ตารางที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ปริมาณ 1% (v/v) ในการกำจัดแอมโมเนียในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำเสียสังเคราะห์ระบบปิด

	Treatment	Day	Initial ammonia (mg-N/L)	Final ammonia (mg-N/L)	Ammonium removal (mg-N/L)	Ammonium removal (%)
Non – aerated system 1 % cell suspension of *Bacillus*	Control	Day 0	1.51±0.04^{a}			
		Day 4		1.32±0.01^{A}	0.18±0.06^{A}	12.25±4.09^{A}
		Day 7		1.06±0.01^{e}	0.55±0.04^{a}	29.34±2.84^{a}
	TS23	Day 0	1.52±0.04^{a}			
		Day 4		1.30±0.01^{B}	0.22±0.04^{A}	14.55±2.67^{A}
		Day 7		0.23±0.01^{a}	1.30±0.05^{b}	85.20±2.98^{b}
	TW24	Day 0	1.50±0.04^{a}			
		Day 4		1.31±0.01^{B}	0.20±0.04^{A}	13.01±2.50^{A}
		Day 7		0.25±0.01^{b}	1.25±0.04^{b}	83.38±2.83^{b}
	BR001	Day 0	1.51±0.06^{a}			
		Day 4		1.30±0.00^{B}	0.21±0.06^{A}	13.95±4.27^{A}
		Day 7		0.25±0.01^{b}	1.26±0.07^{b}	83.42±4.69^{b}
	TW31	Day 0	1.52±0.02^{a}			
		Day 4		1.30±0.00^{B}	0.21±0.02^{A}	14.01±1.49^{A}
		Day 7		0.24±0.00^{ab}	1.28±0.02^{b}	84.22±1.34^{b}
	BR002	Day 0	1.53±0.04^{a}			
		Day 4		1.30±0.01^{B}	0.23±0.04^{A}	14.89±2.86^{A}
		Day 7		0.24±0.00^{ab}	1.29±0.04^{b}	84.22±2.46^{b}
	TW34	Day 0	1.52±0.05^{a}			
		Day 4		1.30±0.00^{B}	0.21±0.05^{A}	13.96±3.22^{A}
		Day 7		0.28±0.00^{c}	1.24±0.05^{b}	81.58±3.23^{b}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

2) การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์

ตารางที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ปริมาณ 1% (v/v) ในการกำจัดไนไตรท์ในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำเสียสังเคราะห์ระบบปิด

	Treatment	Day	Initial nitrite (mg-N/L)	Final nitrite (mg-N/L)	Nitrite removal (mg-N/L)	Nitrite removal (%)
Non – aerated system	Control	Day 0	0.58±0.04^{ab}			
		Day 4		0.80±0.01^{E}	-0.22±0.04^{A}	-37.55±6.17^{A}
		Day 7		0.78±0.01^{e}	-0.21±0.04^{a}	-35.37±6.69^{a}
	TS23	Day 0	0.60±0.01^{ab}			
		Day 4		0.72±0.01^{D}	-0.12±0.01^{B}	-20.32±1.98^{B}
		Day 7		0.68±0.01^{d}	-0.08±0.01^{b}	-12.95±1.21^{b}
	TW24	Day 0	0.53±0.05^{ab}			
		Day 4		0.10±0.00^{B}	0.43±0.05^{D}	80.55±9.73^{D}
		Day 7		0.10±0.00^{b}	0.44±0.05^{de}	81.69±9.32^{d}
	BR001	Day 0	0.61±0.01^{b}			
		Day 4		0.12±0.01^{B}	0.50±0.01^{D}	80.96±1.07^{D}
		Day 7		0.06±0.01^{a}	0.55±0.01^{f}	89.66±1.49^{d}
	TW31	Day 0	0.60±0.01^{ab}			
		Day 4		0.10±0.00^{B}	0.50±0.01^{D}	83.74±2.40^{D}
		Day 7		0.10±0.00^{b}	0.50±0.01^{ef}	82.84±1.43^{d}
	BR002	Day 0	0.60±0.02^{ab}			
		Day 4		0.11±0.00^{B}	0.49±0.02^{D}	81.69±2.61^{D}
		Day 7		0.10±0.01^{b}	0.50±0.01^{ef}	83.52±1.98^{d}
	TW34	Day 0	0.51±0.02^{a}			
		Day 4		0.04±0.01^{A}	0.47±0.03^{D}	91.61±6.55^{D}
		Day 7		0.11±0.01^{b}	0.40±0.02^{d}	77.68±4.36^{d}

1 % cell suspension of *Bacillus*

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p>0.05)

- คือ การเพิ่มขึ้นของปริมาณไนไตรท์ที่มากกว่าวันเริ่มต้น

3) การเปลี่ยนแปลงของไนเตรท

ตารางที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ปริมาณ 1% (v/v) ในการกำจัดไนเตรทในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำเสียสังเคราะห์ระบบปิด

	Treatment	Day	Initial nitrate (mg-N/L)	Final nitrate (mg-N/L)	Nitrate removal (mg-N/L)	Nitrate removal (%)
Non – aerated system 1 % cell suspension of *Bacillus*	Control	Day 0	0.61±0.03^{a}			
		Day 4		1.94±0.01^{H}	-1.34±0.03^{A}	-220.74±4.43^{A}
		Day 7		1.59±0.28^{b}	-0.99±0.31^{a}	-72.88±0.37^{a}
	TS21	Day 0	0.57±0.02^{a}			
		Day 4		1.44±0.00^{F}	-0.87±0.02^{C}	-152.16±3.71^{C}
		Day 7		1.08±0.01^{b}	-0.51±0.03^{a}	-88.25±4.42^{a}
	TS23	Day 0	0.57±0.06^{a}			
		Day 4		1.61±0.01^{G}	-1.04±0.07^{B}	-182.54±12.00^{B}
		Day 7		1.04±0.01^{b}	-0.47±0.06^{a}	-81.60±0.34^{a}
	TW24	Day 0	0.51±0.09^{a}			
		Day 4		0.62±0.00^{E}	-0.11±0.09^{D}	-20.62±7.23^{D}
		Day 7		0.38±0.02^{a}	0.13±0.08^{b}	24.97±16.14^{b}
	BR001	Day 0	0.60±0.03^{a}			
		Day 4		0.48±0.01^{D}	0.12±0.02^{E}	20.80±4.12^{E}
		Day 7		0.12±0.01^{a}	0.48±0.03^{b}	80.23±5.19^{b}
	TW31	Day 0	0.51±0.08^{a}			
		Day 4		0.35±0.01^{C}	0.15±0.08^{EF}	30.62±6.19^{E}
		Day 7		0.20±0.01^{a}	0.31±0.07^{b}	60.69±3.77^{b}
	BR002	Day 0	0.57±0.01^{a}			
		Day 4		0.28±0.00^{B}	0.30±0.01^{FG}	51.71±2.25^{EF}
		Day 7		0.08±0.01^{a}	0.50±0.01^{b}	86.91±1.48^{b}
	TW34	Day 0	0.51±0.06^{a}			
		Day 4		0.19±0.00^{A}	0.32±0.06^{G}	62.73±1.89^{F}
		Day 7		0.11±0.01^{a}	0.40±0.06^{b}	78.28±1.58^{b}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

- คือ การเพิ่มขึ้นของปริมาณไนเตรทที่มากกว่าวันเริ่มต้น

2. **ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำระดับขวดโหล (ระบบเปิด**: Aerated system) **ในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง**

2.1 การทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

1) การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย

ตารางที่ 4 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ปริมาณ 1% (v/v) ในการกำจัดแอมโมเนียในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อระดับขวดโหล

	Treatment	Day	Initial ammonia (mg-N/L)	Final ammonia (mg-N/L)	Ammonium removal (mg-N/L)	Ammonium removal (%)
Sterilized wastewater 1 % cell suspension of *Bacillus*	Control	Day 0	22.97±2.68^{a}			
		Day 4		23.73±10.14^{B}	-0.76±12.79^{B}	-3.31±5.67^{B}
		Day 7		28.36±3.68^{c}	-5.39±6.36^{a}	-23.47±7.68^{a}
	TS23	Day 0	18.70±1.31^{a}			
		Day 4		22.74±9.60^{B}	-4.05±8.61^{B}	-21.64±6.05^{B}
		Day 7		7.10±0.36^{a}	11.60±1.03^{b}	62.03±5.48^{b}
	TW24	Day 0	19.03±1.72^{a}			
		Day 4		24.81±2.50^{B}	-5.77±3.60^{B}	-30.33±8.91^{B}
		Day 7		22.76±5.00^{bc}	-3.72±4.09^{ab}	-19.56±1.50^{a}
	BR001	Day 0	18.52±3.18^{a}			
		Day 4		7.39±1.85^{A}	11.14±6.02^{A}	60.10±2.47^{A}
		Day 7		16.35±1.40^{ab}	2.17±4.58^{ab}	11.73±4.73^{ab}
	TW31	Day 0	19.06±0.67^{a}			
		Day 4		20.30±12.09^{B}	-1.24±12.38^{B}	-6.49±4.94^{B}
		Day 7		16.06±2.40^{bc}	3.00±2.89^{ab}	15.75±5.18^{a}
	BR002	Day 0	18.38±1.04^{a}			
		Day 4		7.24±6.34^{A}	11.14±6.64^{A}	60.57±6.13^{A}
		Day 7		18.05±3.02^{b}	0.32±2.86^{ab}	1.76±5.56^{ab}
	TW34	Day 0	16.57±2.37^{a}			
		Day 4		23.19±0.94^{B}	-6.62±1.43^{B}	-39.92±8.60^{B}
		Day 7		19.98±4.04^{ab}	-3.41±4.47^{ab}	-20.60±6.95^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

ตารางที่ 5 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ปริมาณ 5% (v/v) ในการกำจัดแอมโมเนียในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อระดับขวดโหล

	Treatment	Day	Initial ammonia (mg-N/L)	Final ammonia (mg-N/L)	Ammonium removal (mg-N/L)	Ammonium removal (%)
Sterilized wastewater 5 % cell suspension of *Bacillus*	Control	Day 0	20.19±1.77^{a}			
		Day 4		24.57±2.64^{B}	-4.38±1.96^{A}	-21.68±9.71^{A}
		Day 7		28.83±4.36^{ab}	-8.64±5.85^{a}	-42.79±28.96^{a}
	TS23	Day 0	21.01±1.56^{a}			
		Day 4		7.37±6.11^{A}	13.64±5.03^{B}	64.92±3.97^{B}
		Day 7		24.84±4.87^{b}	-3.84±6.38^{ab}	-18.26±0.38^{ab}
	TW24	Day 0	14.22±4.81^{a}			
		Day 4		15.63±1.44^{A}	-1.40±5.36^{B}	-9.86±7.69^{B}
		Day 7		8.38±5.57^{a}	5.84±1.03^{c}	41.05±7.27^{c}
	BR001	Day 0	20.24±4.33^{a}			
		Day 4		8.14±3.71^{AB}	12.10±7.86^{AB}	59.78±8.83^{A}
		Day 7		6.46±1.52^{a}	13.77±4.24^{abc}	68.06±0.93^{abc}
	TW31	Day 0	14.20±1.21^{a}			
		Day 4		7.61±0.66^{A}	6.59±1.17^{AB}	46.41±8.26^{B}
		Day 7		19.34±2.97^{ab}	-5.13±2.22^{ab}	-36.16±5.65^{a}
	BR002	Day 0	17.50±3.05^{a}			
		Day 4		5.93±2.07^{A}	11.57±4.90^{B}	66.10±7.98^{B}
		Day 7		23.86±4.43^{b}	-6.35±6.39^{ab}	-36.30±6.49^{a}
	TW34	Day 0	16.03±1.65^{a}			
		Day 4		17.90±4.59^{AB}	-1.87±2.97^{AB}	-11.65±8.51^{A}
		Day 7		11.58±2.90^{b}	4.45±4.05^{ab}	27.75±5.29^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

- คือ การเพิ่มขึ้นของปริมาณแอมโมเนียที่มากกว่าวันเริ่มต้น

2) การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์

ตางรางที่ 6 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ปริมาณ 1% (v/v) ในการกำจัดไนไตรท์ในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อระดับขวดโหล

	Treatment	Day	Initial nitrite (mg-N/L)	Final nitrite (mg-N/L)	Nitrite removal (mg-N/L)	Nitrite removal (%)
Sterilized with fermented 1 % cell suspension of *Bacillus*	Control	Day 0	31.87±5.08^{a}			
		Day 4		29.93±4.41^{D}	1.94±0.12^{A}	6.09±2.33^{A}
		Day 7		43.94±1.78^{c}	-12.06±4.36^{a}	-37.84±13.67^{ab}
	TS23	Day 0	31.36±7.64^{a}			
		Day 4		14.49±0.92^{AB}	16.88±8.47^{B}	53.81±7.00^{B}
		Day 7		18.24±2.47^{a}	13.12±9.21^{ab}	41.84±9.37^{bc}
	TW24	Day 0	31.94±5.85^{a}			
		Day 4		26.23±2.37^{B}	5.72±0.90^{AB}	17.89±1.61^{AB}
		Day 7		46.61±0.78^{b}	-14.67±036^{ab}	-45.93±9.91^{abc}
	BR001	Day 0	25.43±1.89^{a}			
		Day 4		16.70±1.24^{CD}	8.74±1.58^{AB}	34.36±6.23^{B}
		Day 7		27.01±4.13^{c}	-1.57±0.66^{a}	-6.17±2.25^{b}
	TW31	Day 0	30.09±3.49^{a}			
		Day 4		14.70±1.51^{AB}	15.40±3.31^{B}	51.16±1.00^{B}
		Day 7		32.55±2.28^{b}	-2.46±0.24^{ab}	-8.17±7.40^{abc}
	BR002	Day 0	34.70±9.41^{a}			
		Day 4		14.64±2.47^{AB}	20.06±1.62^{B}	57.81±3.49^{B}
		Day 7		26.13±3.81^{b}	8.58±0.47^{ab}	24.72±8.65^{abc}
	TW34	Day 0	33.75±9.60^{a}			
		Day 4		8.16±1.37^{A}	25.59±8.38^{B}	75.82±4.82^{B}
		Day 7		16.80±2.12^{a}	16.96±1.71^{b}	50.24±4.69^{c}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

- คือ การเพิ่มขึ้นของปริมาณไนไตรท์ที่มากกว่าวันเริ่มต้น

ตางรางที่ 7 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ปริมาณ 5% (v/v) ในการกำจัดไนไตรท์ในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อระดับขวดโหล

	Treatment	Day	Initial nitrite (mg-N/L)	Final nitrite (mg-N/L)	Nitrite removal (mg-N/L)	Nitrite removal (%)
Sterilized wastewater 5 % cell suspension of *Bacillus*	Control	Day 0	31.10±13.17^{a}			
		Day 4		23.12±1.30^{A}	7.98±11.88^{AB}	25.66±8.20^{B}
		Day 7		33.94±11.01^{c}	-2.84±21.88^{a}	-9.12±0.36^{a}
	TS23	Day 0	31.03±13.66^{a}			
		Day 4		16.75±3.91^{A}	14.29±9.77^{B}	46.04±1.47^{B}
		Day 7		15.01±0.46^{ab}	16.03±13.27^{b}	51.65±2.75^{b}
	TW24	Day 0	35.54±8.57^{a}			
		Day 4		33.72±1.63^{B}	1.82±10.20^{AB}	5.13±8.70^{A}
		Day 7		16.75±2.66^{ab}	18.79±10.30^{b}	52.88±8.97^{b}
	BR001	Day 0	32.22±3.30^{a}			
		Day 4		20.52±3.57^{A}	11.71±6.41^{B}	36.33±9.90^{B}
		Day 7		12.20±0.73^{a}	20.02±2.96^{b}	62.14±9.19^{b}
	TW31	Day 0	33.27±7.55^{a}			
		Day 4		23.23±3.51^{A}	10.04±6.13^{B}	30.17±8.43^{B}
		Day 7		28.23±2.75^{bc}	5.04±9.20^{ab}	15.14±7.65^{b}
	BR002	Day 0	33.83±5.54^{a}			
		Day 4		17.64±1.95^{A}	16.19±5.60^{B}	47.86±6.55^{B}
		Day 7		20.72±3.01^{abc}	13.12±4.66^{b}	38.77±3.76^{b}
	TW34	Day 0	32.59±1.79^{a}			
		Day 4		23.75±2.21^{A}	8.84±1.84^{AB}	27.11±5.65^{B}
		Day 7		21.28±0.32^{abc}	11.31±1.87^{b}	34.71±5.73^{b}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

- คือ การเพิ่มขึ้นของปริมาณไนไตรท์ที่มากกว่าวันเริ่มต้น

3) การเปลี่ยนแปลงของไนเตรท

ตารางที่ 8 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ปริมาณ 1% (v/v) ในการกำจัดไนเตรทในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อระดับขวดโหล

	Treatment	Day	Initial nitrate (mg-N/L)	Final nitrate (mg-N/L)	Nitrate removal (mg-N/L)	Nitrate removal (%)
Sterilized wastewater 1 % cell suspension of *Bacillus*	Control	Day 0	49.92±3.36^{a}			
		Day 4		41.57±5.71^{A}	8.35±3.68^{A}	16.72±6.51^{A}
		Day 7		46.10±3.29^{bc}	3.82±6.62^{a}	7.66±9.38^{a}
	TS23	Day 0	44.26±17.17^{a}			
		Day 4		9.18±0.06^{B}	35.07±7.20^{B}	79.25±8.87^{B}
		Day 7		19.53±0.09^{ab}	24.73±7.18^{b}	55.88±8.81^{b}
	TW24	Day 0	40.48±13.81^{a}			
		Day 4		22.64±0.09^{A}	17.84±3.76^{B}	44.07±3.99^{B}
		Day 7		23.46±0.11^{abc}	17.02±3.71^{b}	42.04±3.88^{b}
	BR001	Day 0	50.68±13.94^{a}			
		Day 4		9.86±0.11^{B}	40.82±4.05^{B}	80.55±7.71^{B}
		Day 7		37.56±0.13^{cd}	13.12±3.84^{b}	25.90±7.31^{b}
	TW31	Day 0	44.53±14.37^{a}			
		Day 4		13.02±0.16^{B}	31.51±4.23^{B}	70.76±1.96^{B}
		Day 7		18.83±0.08^{ab}	25.70±4.42^{b}	57.72±2.38^{b}
	BR002	Day 0	38.14±1.05^{a}			
		Day 4		11.94±0.21^{B}	26.20±1.22^{B}	68.70±3.20^{B}
		Day 7		12.79±0.06^{a}	25.34±0.99^{b}	66.46±2.59^{b}
	TW34	Day 0	50.82±17.44^{a}			
		Day 4		10.87±0.04^{B}	39.95±17.43^{B}	78.61±4.29^{B}
		Day 7		44.68±0.13^{d}	6.15±7.41^{b}	12.09±4.25^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

ตารางที่ 9 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ปริมาณ 5% (v/v) ในการกำจัดไนเตรทในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อระดับขวดโหล

	Treatment	Day	Initial nitrate (mg-N/L)	Final nitrate (mg-N/L)	Nitrate removal (mg-N/L)	Nitrate removal (%)
Sterilized wastewater 5 % cell suspension of *Bacillus*	Control	Day 0	56.81±20.98^{a}			
		Day 4		50.54±6.69^{B}	6.27±7.69^{A}	11.04±1.15^{B}
		Day 7		59.40±0.18^{h}	-2.59±1.03^{a}	-4.56±7.03^{b}
	TS23	Day 0	49.07±19.52^{a}			
		Day 4		11.07±0.13^{A}	38.00±9.42^{A}	77.45±9.58^{A}
		Day 7		14.41±0.11^{b}	34.66±9.63^{a}	70.63±0.00^{a}
	TW24	Day 0	43.33±13.65^{a}			
		Day 4		36.29±0.02^{B}	7.04±3.67^{B}	16.24±1.55^{B}
		Day 7		18.13±0.12^{d}	25.20±3.75^{a}	58.16±1.74^{a}
	BR001	Day 0	51.44±16.07^{a}			
		Day 4		11.36±0.16^{A}	40.08±6.00^{A}	77.92±1.11^{A}
		Day 7		12.87±0.09^{a}	38.57±6.01^{a}	74.99±1.12^{a}
	TW31	Day 0	40.14±7.76^{a}			
		Day 4		12.71±0.17^{A}	27.43±7.62^{A}	68.34±8.98^{A}
		Day 7		22.50±0.02^{g}	17.64±7.78^{a}	43.95±9.39^{a}
	BR002	Day 0	40.31±17.26^{a}			
		Day 4		13.43±0.09^{A}	26.87±7.23^{A}	66.67±2.74^{A}
		Day 7		21.46±0.13^{f}	18.85±7.19^{a}	46.76±2.65^{a}
	TW34	Day 0	41.99±13.42^{a}			
		Day 4		12.23±0.05^{A}	29.77±3.46^{A}	70.89±2.06^{A}
		Day 7		20.98±0.10^{e}	21.02±3.34^{a}	50.05±1.78^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

- คือ การเพิ่มขึ้นของปริมาณไนเตรทที่มากกว่าวันเริ่มต้น

4) การเปลี่ยนแปลงของออร์โธฟอสเฟต

ตารางที่ 10 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ปริมาณ 1% (v/v) ในการกำจัดออร์โธฟอสเฟตในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อระดับขวดโหล

	Treatment	Day	Initial PO_4^{3-} (mg-P/L)	Final PO_4^{3-} (mg-P/L)	PO_4^{3-} removal (mg-P/L)	PO_4^{3-} Removal (%)
Sterilized wastewater	Control	Day 0	9.00±0.02 ^{a}			
		Day 4		14.30±0.00^{F}	-5.20±0.00^{A}	-57.60±0.30^{A}
		Day 7		8.00±1.50^{a}	1.00±1.50^{a}	11.10±16.20^{a}
1 % cell suspension of *Bacillus*	TS23	Day 0	6.80±0.04 ^{a}			
		Day 4		0.60±0.10^{B}	6.10±0.10^{CD}	90.60±1.50^{C}
		Day 7		1.30±0.00^{b}	5.40±0.00^{ab}	80.20±0.50^{b}
	TW24	Day 0	8.50±0.3 ^{a}			
		Day 4		14.50±0.00^{G}	-6.00±0.30^{A}	-71.00±3.60^{A}
		Day 7		1.30±0.00^{b}	7.10±0.30^{c}	84.40±3.50^{b}
	BR001	Day 0	9.20±0.01 ^{a}			
		Day 4		3.40±0.10^{D}	5.80±0.10^{CD}	63.00±0.80^{BC}
		Day 7		1.50±0.00^{b}	7.80±0.00^{c}	84.00±0.10^{b}
	TW31	Day 0	4.90±1.50 ^{a}			
		Day 4		3.20±0.00^{C}	1.60±1.50^{B}	33.60±30.00^{B}
		Day 7		1.20±0.00^{b}	3.60±1.40^{b}	75.20±29.90^{b}
	BR002	Day 0	8.60±0.50 ^{a}			
		Day 4		3.90±0.00^{E}	4.80±0.05^{C}	55.10±5.70^{B}
		Day 7		1.40±0.00^{b}	7.30±0.50^{c}	83.90±5.50^{b}
	TW34	Day 0	7.90±0.02 ^{a}			
		Day 4		0.30±0.00^{A}	7.60±0.00^{D}	95.80±0.40^{C}
		Day 7		1.20±0.00^{b}	6.70±0.00^{c}	84.20±0.20^{b}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

- คือ การเพิ่มขึ้นของปริมาณออร์โธฟอสเฟตที่มากกว่าวันเริ่มต้น

ตารางที่ 11 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ปริมาณ 5% (v/v) ในการกำจัดออร์โธฟอสเฟตในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อระดับขวดโหล

	Treatment	Day	Initial PO_4^{3-} (mg-P/L)	Final PO_4^{3-} (mg-P/L)	PO_4^{3-} removal (mg-P/L)	PO_4^{3-} removal (%)
Sterilized wastewater 5 % cell suspension of *Bacillus*	Control	Day 0	8.41±0.07^{a}			
		Day 4		6.34±0.32^{E}	2.07±0.40^{B}	24.59±4.72^{B}
		Day 7		9.60±0.00^{c}	-1.19±0.07^{a}	-14.20±0.85^{a}
	TS23	Day 0	9.55±0.05^{a}			
		Day 4		2.88±0.03^{B}	6.67±0.07^{EF}	69.85±0.75^{E}
		Day 7		1.38±0.04^{b}	8.17±0.08^{d}	85.56±0.86^{cd}
	TW24	Day 0	9.72±0.03^{a}			
		Day 4		3.22±0.10^{B}	6.49±0.07^{DEF}	66.83±0.73^{E}
		Day 7		1.35±0.00^{ab}	8.37±0.03^{e}	86.11±0.34^{cd}
	BR001	Day 0	7.78±0.06^{a}			
		Day 4		1.68±0.03^{A}	6.10±0.07^{D}	78.45±0.95^{F}
		Day 7		1.35±0.00^{ab}	6.43±0.06^{b}	82.65±0.72^{b}
	TW31	Day 0	12.05±0.06^{a}			
		Day 4		11.52±0.15^{F}	0.53±0.10^{A}	4.43±0.86^{A}
		Day 7		1.34±0.00^{ab}	10.71±0.06^{h}	88.89±0.49^{e}
	BR002	Day 0	8.82±0.07^{a}			
		Day 4		1.83±0.04^{A}	6.99±0.05^{F}	79.27±0.52^{F}
		Day 7		1.32±0.00^{a}	7.50±0.07^{c}	85.01±0.84^{c}
	TW34	Day 0	10.54±0.01^{a}			
		Day 4		4.09±0.06^{C}	6.45±0.07^{DE}	61.20±0.65^{D}
		Day 7		1.35±0.00^{ab}	9.19±0.01^{j}	87.21±0.11^{de}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

- คือ การเพิ่มขึ้นของปริมาณออร์โธฟอสเฟตที่มากกว่าวันเริ่มต้น

5) การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ

ตารางที่ 12 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการทดลอง[1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อระดับขวดโหล

	Treatment	Times		
		Day0	Day4	Day7
Sterilized wastewater 1 % cell suspension of *Bacillus*	Control	29.70±0.57 [a]	27.27±0.93 [a]	28.87±0.66 [a]
	TS23	28.93±0.47 [a]	27.67±0.61 [a]	28.00±0.78 [a]
	TW24	29.10±0.42 [a]	27.73±0.38 [a]	28.43±1.05 [a]
	BR001	29.17±0.52 [a]	26.77±0.09 [a]	28.07±0.86 [a]
	TW31	29.17±0.38 [a]	27.30±0.50 [a]	28.37±0.53 [a]
	BR002	29.10±0.57 [a]	27.07±0.82 [a]	28.37±0.91 [a]
	TW34	29.43±0.33 [a]	27.27±0.91 [a]	28.77±0.90 [a]
	Treatment	**Times**		
		Day0	**Day4**	**Day7**
Sterilized wastewater 5 % cell suspension of *Bacillus*	Control	29.60±0.14 [a]	28.07±0.33 [a]	29.00±0.71 [a]
	TS23	29.03±0.47 [a]	27.73±0.66 [a]	28.13±0.74 [a]
	TW24	29.33±0.33 [a]	27.97±0.33 [a]	28.47±0.79 [a]
	BR001	29.07±0.45 [a]	27.83±0.52 [a]	28.20±0.86 [a]
	TW31	29.03±0.47 [a]	27.77±0.47 [a]	28.20±0.73 [a]
	BR002	29.30±0.28 [a]	27.80±0.42 [a]	28.63±0.66 [a]
	TW34	29.33±0.33 [a]	27.93±0.52 [a]	28.83±0.26 [a]

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

6) การเปลี่ยนแปลงของ pH

ตารางที่ 13 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างการทดลอง[1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อระดับขวดโหล

	Treatment	Times		
		Day0	Day4	Day7
Sterilized wastewater 1 % cell suspension of *Bacillus*	Control	7.71±0.00^{fg}	7.02±0.46^{a}	6.83±0.67^{a}
	TS23	7.63±0.00^{b}	7.31±0.46^{a}	7.40±0.47^{a}
	TW24	7.66±0.00^{d}	6.88±0.47^{a}	6.88±0.48^{a}
	BR001	7.65±0.00^{c}	7.40±0.47^{a}	7.13±0.47^{a}
	TW31	7.68±0.00^{e}	7.54±0.47^{a}	7.19±0.47^{a}
	BR002	7.70±0.01^{f}	7.08±0.01^{a}	7.39±0.47^{a}
	TW34	7.71±0.00^{g}	7.11±0.01^{a}	7.57±0.47^{a}
	Treatment	Times		
		Day0	Day4	Day7
Sterilized wastewater 5 % cell suspension of *Bacillus*	Control	7.71±0.01^{a}	6.96±0.47^{a}	6.83±0.47^{a}
	TS23	7.68±0.04^{a}	7.53±0.47^{a}	7.27±0.47^{a}
	TW24	7.70±0.02^{a}	7.64±0.47^{a}	7.43±0.47^{a}
	BR001	7.69±0.03^{a}	7.65±0.47^{a}	7.15±0.47^{a}
	TW31	7.70±0.02^{a}	7.47±0.47^{a}	6.99±0.47^{a}
	BR002	7.70±0.01^{a}	7.46±0.47^{a}	7.12±0.47^{a}
	TW34	7.71±0.02^{a}	7.45±0.47^{a}	7.20±0.47^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

7) การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำ

ตารางที่ 14 การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำในระหว่างการทดลอง[1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อระดับขวดโหล

	Treatment	Times		
		Day0	Day4	Day7
Sterilized wastewater 1 % cell suspension of *Bacillus*	Control	5.80±0.01^{c}	6.00±0.04^{c}	6.40±0.01^{g}
	TS23	6.20±0.01^{f}	5.80±0.01^{a}	4.90±0.01^{b}
	TW24	5.70±0.01^{b}	5.90±0.01^{b}	6.20±0.01^{f}
	BR001	5.90±0.01^{d}	6.20±0.01^{d}	5.30±0.01^{d}
	TW31	6.20±0.01^{f}	5.80±0.01^{a}	5.50±0.01^{e}
	BR002	6.10±0.01^{e}	6.00±0.06^{c}	5.00±0.06^{c}
	TW34	5.60±0.01^{a}	5.90±0.01^{b}	5.30±0.01^{d}
	Treatment	Times		
		Day0	Day4	Day7
Sterilized wastewater 5 % cell suspension of *Bacillus*	Control	5.80±0.01^{a}	5.50±0.01^{b}	4.90±0.01^{b}
	TS23	6.00±0.06^{b}	5.40±0.01^{a}	5.60±0.01^{d}
	TW24	6.20±0.01^{c}	6.00±0.06^{d}	5.70±0.01^{e}
	BR001	6.20±0.01^{c}	5.90±0.01^{c}	5.50±0.01^{c}
	TW31	6.30±0.01^{d}	6.00±0.06^{d}	4.80±0.01^{a}
	BR002	6.10±0.01^{b}	5.90±0.01^{a}	4.90±0.01^{b}
	TW34	5.80±0.01^{a}	5.40±0.01^{c}	4.80±0.01^{a}

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

2.2 การทดลองในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

1) การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย

ตารางที่ 15 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ปริมาณ 1% (v/v) ในการกำจัดแอมโมเนียในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อระดับขวดโหล

	Treatment	Day	Initial ammonia (mg-N/L)	Final ammonia (mg-N/L)	Ammonium removal (mg-N/L)	Ammonium removal (%)
Non – sterilized wastewater 1 % cell suspension of *Bacillus*	Control	Day 0	36.49±1.23^{a}			
		Day 4		33.81±2.64^{C}	2.68±1.43^{A}	7.35±3.93^{A}
		Day 7		34.00±4.29^{b}	2.48+1.52^{a}	6.82±1.15^{a}
	TS23	Day 0	33.89±2.08^{a}			
		Day 4		27.96±0.52^{BC}	5.92±2.40^{A}	17.48±6.62^{AB}
		Day 7		12.44±0.08^{a}	21.44±12.13^{b}	63.28±5.81^{b}
	TW24	Day 0	28.08±8.45^{a}			
		Day 4		17.31±7.71^{AB}	10.78±9.71^{AB}	38.37±4.59^{B}
		Day 7		10.07±3.53a	18.01±1.65^{b}	64.16±1.49^{b}
	BR001	Day 0	37.33±3.58^{a}			
		Day 4		18.19±3.17^{AB}	19.13±2.15^{AB}	51.26±5.77^{B}
		Day 7		8.67±0.38^{a}	28.65±3.44^{b}	76.77±9.22^{b}
	TW31	Day 0	37.60±9.24^{a}			
		Day 4		23.20±6.28^{ABC}	14.40±1.27^{AB}	38.30±9.99^{B}
		Day 7		12.60±3.67^{a}	25.00±2.31^{b}	66.49±2.75^{b}
	BR002	Day 0	33.81±5.30^{a}			
		Day 4		11.68±3.35^{A}	22.13±5.83^{B}	65.46±7.25^{B}
		Day 7		21.93±5.63^{ab}	11.87±1.47^{ab}	35.14±3.95^{b}
	TW34	Day 0	31.33±8.70^{a}			
		Day 4		10.23±0.57^{A}	21.11±8.16^{B}	67.36±6.06^{B}
		Day 7		27.49±4.56^{ab}	3.84±5.73^{ab}	12.27±8.29^{ab}

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

ตารางที่ 16 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ปริมาณ 5% (v/v) ในการกำจัดแอมโมเนียในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อระดับขวดโหล

	Treatment	Day	Initial ammonia (mg-N/L)	Final ammonia (mg-N/L)	Ammonium removal (mg-N/L)	Ammonium removal (%)
Non – sterilized wastewater	Control	Day 0	37.98±12.12^{a}			
		Day 4		38.90±9.79^{A}	-0.92±6.41^{A}	-2.41±3.22^{A}
		Day 7		32.05±1.83^{ab}	5.94±1.43^{b}	15.63±6.42^{b}
5 % cell suspension of *Bacillus*	TS23	Day 0	39.42±4.01^{a}			
		Day 4		25.32±4.27^{A}	14.10±3.01^{B}	35.76±7.64^{B}
		Day 7		31.05±4.77^{ab}	8.36±7.11^{b}	21.22±8.04^{b}
	TW24	Day 0	39.10±12.74^{a}			
		Day 4		22.00±8.71^{A}	17.10±0.85^{B}	43.72±7.76^{B}
		Day 7		18.34±6.26^{ab}	20.76±2.31^{b}	53.10±1.49^{b}
	BR001	Day 0	36.34±11.97^{a}			
		Day 4		31.98±3.14^{A}	4.37±5.10^{B}	12.01±1.54^{B}
		Day 7		36.85±3.79^{a}	-0.51±1.09^{a}	-1.40±0.50^{a}
	TW31	Day 0	35.52±11.61^{a}			
		Day 4		25.93±1.35^{A}	9.59±1.88^{B}	27.00±1.60^{B}
		Day 7		34.16±6.61^{ab}	1.36±5.90^{b}	3.83±6.60^{b}
	BR002	Day 0	34.82±11.89^{a}			
		Day 4		26.13±1.85^{A}	8.69±2.27^{B}	24.95±3.95^{B}
		Day 7		34.45±6.16^{ab}	0.36±6.95^{b}	1.05±8.68^{b}
	TW34	Day 0	35.52±13.55^{a}			
		Day 4		26.33±0.24^{A}	9.19±3.78^{B}	25.87±38.80^{B}
		Day 7		19.78±9.62^{ab}	15.74±5.29^{b}	44.31±3.03^{b}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

- คือ การเพิ่มขึ้นของปริมาณแอมโมเนียที่มากกว่าวันเริ่มต้น

2) การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์

ตารางที่ 17 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ปริมาณ 1% (v/v) ในการกำจัดไนไตรท์ในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อระดับขวดโหล

		Treatment	Day	Initial nitrite (mg-N/L)	Final nitrite (mg-N/L)	Nitrite removal (mg-N/L)	Nitrite removal (%)
Non – sterilized wastewater	1 % cell suspension of *Bacillus*	Control	Day 0	35.51±14.98^{a}			
			Day 4		38.60±3.20^{A}	-3.08±17.05^{A}	-8.68±8.02^{A}
			Day 7		30.97±3.03^{c}	4.54±18.01^{a}	12.79±0.70^{a}
		TS23	Day 0	27.23±7.79^{a}			
			Day 4		24.00±10.85^{A}	3.23±17.45^{A}	11.86±4.09^{B}
			Day 7		7.14±0.75^{a}	20.09±7.94^{b}	73.79±9.16^{b}
		TW24	Day 0	30.79±5.66^{a}			
			Day 4		27.31±12.14^{A}	3.48±7.01^{A}	11.30±2.78^{B}
			Day 7		7.32±0.78^{a}	23.48±4.89^{b}	76.24±5.87^{b}
		BR001	Day 0	32.99±11.67^{a}			
			Day 4		27.82±11.94^{A}	5.17±3.21^{A}	15.68±0.05^{B}
			Day 7		6.52±0.28^{a}	26.48±1.56^{b}	80.25±5.04^{b}
		TW31	Day 0	28.85±8.68^{a}			
			Day 4		29.23±13.09^{A}	-0.39±1.73^{A}	-1.35±5.35^{A}
			Day 7		7.05±0.83^{a}	21.79±9.38^{b}	75.54±2.52^{b}
		BR002	Day 0	33.64±2.70^{a}			
			Day 4		25.12±11.77^{A}	8.52±1.45^{A}	25.34±4.05^{B}
			Day 7		7.77±0.74^{a}	25.87±2.21^{b}	76.89±6.56^{b}
		TW34	Day 0	24.21±4.18^{a}			
			Day 4		26.77±11.34^{A}	-2.56±5.40^{A}	-10.57±3.60^{AB}
			Day 7		16.30±4.94^{b}	7.92±7.30^{a}	32.69±0.14^{ab}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

- คือ การเพิ่มขึ้นของปริมาณไนไตรท์ที่มากกว่าวันเริ่มต้น

ตารางที่ 18 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ปริมาณ 5% (v/v) ในการกำจัดไนไตรท์ในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อระดับขวดโหล

	Treatment	Day	Initial nitrite (mg-N/L)	Final nitrite (mg-N/L)	Nitrite removal (mg-N/L)	Nitrite removal (%)
Non – sterilized wastewater 5 % cell suspension of *Bacillus*	Control	Day 0	32.02±3.73^{a}			
		Day 4		27.94±3.39^{B}	4.08±7.10^{B}	33.79±1.84^{B}
		Day 7		27.67±6.58^{b}	4.35±2.91^{b}	13.58±9.09^{b}
	TS23	Day 0	33.07±9.46^{a}			
		Day 4		6.91±3.82^{A}	26.16±1.44^{A}	84.54±0.46^{A}
		Day 7		9.08±0.39^{a}	23.99±9.74^{a}	72.54±9.47^{a}
	TW24	Day 0	29.66±9.00^{a}			
		Day 4		7.05±3.71^{A}	22.61±2.62^{A}	81.34±7.76^{A}
		Day 7		10.27±0.87^{a}	19.39±9.18^{a}	65.37±0.96^{a}
	BR001	Day 0	31.12±11.17^{a}			
		Day 4		6.87±3.98^{A}	24.25±3.20^{A}	82.60±8.92^{A}
		Day 7		9.96±0.62^{a}	21.16±0.78^{a}	67.99±4.64^{a}
	TW31	Day 0	29.74±4.79^{a}			
		Day 4		7.70±3.35^{A}	22.04±2.52^{A}	74.49±8.61^{A}
		Day 7		11.92±1.11^{a}	17.82±3.72^{a}	59.91±2.52^{a}
	BR002	Day 0	27.55±10.06^{a}			
		Day 4		7.97±3.36^{A}	19.57±2.35^{A}	81.01±7.86^{A}
		Day 7		14.62±7.20^{ab}	12.93±4.15^{a}	46.93±1.39^{a}
	TW34	Day 0	28.60±7.24^{a}			
		Day 4		7.02±3.70^{A}	21.57±0.29^{A}	83.18±0.16^{A}
		Day 7		9.92±2.45^{a}	18.68±4.87^{a}	65.31±7.02^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

- คือ การเพิ่มขึ้นของปริมาณไนไตรท์ที่มากกว่าวันเริ่มต้น

3) การเปลี่ยนแปลงของไนเตรท

ตารางที่ 19 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ปริมาณ 1% (v/v) ในการกำจัดไนเตรทในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อระดับขวดโหล

	Treatment	Day	Initial nitrate (mg-N/L)	Final nitrate (mg-N/L)	Nitrate removal (mg-N/L)	Nitrate removal (%)
Non – sterilized wastewater 1 % cell suspension of *Bacillus*	Control	Day 0	53.66±13.47^{a}			
		Day 4		49.64±6.89^{C}	4.02±0.31^{B}	7.49±7.85^{B}
		Day 7		37.08±4.84^{b}	16.58±1.94^{a}	30.90±2.24^{a}
	TS23	Day 0	53.22±19.11^{a}			
		Day 4		25.05±3.10^{AB}	28.17±2.21^{A}	52.93±1.73^{A}
		Day 7		21.16±1.74^{a}	32.07±7.47^{a}	60.25±2.83^{a}
	TW24	Day 0	54.90±13.20^{a}			
		Day 4		37.71±3.92^{BC}	17.19±0.82^{A}	31.30±9.71^{A}
		Day 7		35.95±3.99^{b}	18.95±6.87^{a}	34.52±0.72^{a}
	BR001	Day 0	51.33±20.04^{a}			
		Day 4		26.68±3.79^{AB}	24.64±3.68^{A}	48.01±6.14^{A}
		Day 7		25.31±3.16^{a}	26.02±8.81^{a}	50.69±6.64^{a}
	TW31	Day 0	57.14±9.73^{a}			
		Day 4		38.20±3.15^{BC}	18.94±1.86^{A}	33.15±0.75^{A}
		Day 7		21.20±1.31^{a}	35.94±8.42^{a}	62.89±4.73^{a}
	BR002	Day 0	58.09±13.27^{a}			
		Day 4		45.16±3.59^{C}	12.93±0.93^{A}	22.26±8.81^{A}
		Day 7		43.73±3.33^{b}	14.36±6.59^{a}	24.73±8.55^{a}
	TW34	Day 0	50.56±19.99^{a}			
		Day 4		45.80±3.33^{C}	4.76±3.31^{B}	9.42±6.11^{B}
		Day 7		24.76±1.33^{a}	25.80±8.71^{a}	51.03±7.01^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

ตารางที่ 20 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ปริมาณ 5% (v/v) ในการกำจัดไนเตรทในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อระดับขวดโหล

	Treatment	Day	Initial nitrate (mg-N/L)	Final nitrate (mg-N/L)	Nitrate removal (mg-N/L)	Nitrate removal (%)
Non – sterilized wastewater 5 % cell suspension of *Bacillus*	Control	Day 0	52.11±6.93^{a}			
		Day 4		57.13±7.73^{A}	5.02±4.45^{A}	8.78±2.80^{A}
		Day 7		42.26±0.48^{e}	14.87±7.31^{a}	26.02±0.30^{a}
	TS23	Day 0	50.61±8.37^{a}			
		Day 4		49.10±8.17^{A}	1.51±2.05^{B}	3.08±4.92^{B}
		Day 7		19.93±0.24^{a}	29.17±8.02^{a}	59.40±6.70^{a}
	TW24	Day 0	53.92±6.55^{a}			
		Day 4		45.33±2.01^{A}	-8.59±6.38^{B}	-18.95±8.21^{A}
		Day 7		20.65±0.24^{a}	24.68±1.92^{a}	54.44±8.37^{a}
	BR001	Day 0	52.77±8.93^{a}			
		Day 4		40.24±7.89^{A}	12.53±5.39^{B}	31.14±8.25^{B}
		Day 7		23.77±0.00^{b}	16.46±7.89^{a}	40.92±4.45^{a}
	TW31	Day 0	48.77±6.64^{a}			
		Day 4		53.89±3.03^{A}	-5.12±9.67^{A}	-9.49±6.51^{A}
		Day 7		25.93±0.42^{c}	27.95±3.40^{a}	51.87±6.30^{a}
	BR002	Day 0	48.72±6.73^{a}			
		Day 4		49.41±1.26^{A}	-0.69±4.11^{B}	-1.40±8.79^{A}
		Day 7		38.42±0.48^{d}	10.99±0.91^{a}	22.24±2.31^{a}
	TW34	Day 0	50.35±0.00^{a}			
		Day 4		42.14±3.00^{A}	8.21±1.73^{B}	19.49±1.57^{B}
		Day 7		25.69±0.24^{e}	16.45±3.24^{a}	39.03±5.14^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

- คือ การเพิ่มขึ้นของปริมาณไนเตรทที่มากกว่าวันเริ่มต้น

4) การเปลี่ยนแปลงของออร์โธฟอสเฟต

ตารางที่ 21 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ปริมาณ 1% (v/v) ในการกำจัดออร์โธฟอสเฟตในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อระดับขวดโหล

	Treatment	Day	Initial PO_4^{3-} (mg-P/L)	Final PO_4^{3-} (mg-P/L)	PO_4^{3-} removal (mg-P/L)	PO_4^{3-} removal (%)
Non – sterilized wastewater 1 % cell suspension of *Bacillus*	Control	Day 0	3.33±0.04^{a}			
		Day 4		5.62±0.12^{F}	-2.28±0.08^{B}	-68.49±2.42^{B}
		Day 7		2.11±0.04^{a}	1.23±0.02^{a}	36.81±0.69^{a}
	TS23	Day 0	4.22±0.03^{a}			
		Day 4		2.11±0.03^{C}	2.11±0.03^{F}	49.98±0.74^{F}
		Day 7		1.13±0.02^{a}	3.10±0.02^{a}	73.33±0.42^{a}
	TW24	Day 0	2.67±0.03^{a}			
		Day 4		3.44±0.03^{E}	-0.76±0.06^{C}	-28.48±2.13^{C}
		Day 7		1.59±0.04^{a}	1.08±0.06^{a}	40.41±9.97^{a}
	BR001	Day 0	4.24±0.01^{a}			
		Day 4		1.80±0.03^{B}	2.44±0.02^{G}	57.66±0.44^{B}
		Day 7		5.60±4.24^{a}	-1.36±4.24^{a}	-32.05±2.16^{a}
	TW31	Day 0	3.69±0.04^{a}			
		Day 4		6.87±0.03^{G}	-3.18±0.07^{A}	-86.02±1.93^{A}
		Day 7		1.03±0.02^{a}	2.67±0.06^{a}	72.25±1.52^{a}
	BR002	Day 0	4.05±0.01^{a}			
		Day 4		3.55±0.02^{E}	0.50±0.03^{D}	12.27±0.82^{D}
		Day 7		1.83±0.06^{a}	2.22±0.05^{a}	54.77±1.20^{a}
	TW34	Day 0	3.98±0.04^{a}			
		Day 4		1.38±0.03^{A}	2.59±0.07^{J}	65.18±1.67^{H}
		Day 7		1.59±0.10^{a}	2.39±0.14^{a}	60.05±3.54^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

- คือ การเพิ่มขึ้นของปริมาณออร์โธฟอสเฟตที่มากกว่าวันเริ่มต้น

ตารางที่ 22 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ปริมาณ 5% (v/v) ในการกำจัดออร์โธฟอสเฟตในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อระดับขวดโหล

	Treatment	Day	Initial PO_4^{3-} (mg-P/L)	Final PO_4^{3-} (mg-P/L)	PO_4^{3-} removal (mg-P/L)	PO_4^{3-} removal (%)
Non – sterilized wastewater 5 % cell suspension of *Bacillus*	Control	Day 0	3.58±0.08^{a}			
		Day 4		6.89±0.02^{F}	-3.32±0.06^{A}	-92.77±1.75^{A}
		Day 7		4.55±0.05^{ab}	-0.98±0.03^{a}	-27.32±0.87^{ab}
	TS23	Day 0	3.56±0.03^{a}			
		Day 4		2.65±0.02^{AB}	0.91±0.05^{CD}	25.54±1.43^{CD}
		Day 7		1.59±0.11^{a}	1.97±0.09^{b}	55.39±2.49^{b}
	TW24	Day 0	3.35±0.06^{a}			
		Day 4		3.22±0.06^{E}	0.14±0.11^{B}	4.09±3.25^{B}
		Day 7		1.86±0.05^{a}	1.50±0.10^{ab}	44.60±2.85^{b}
	BR001	Day 0	3.45±0.05^{a}			
		Day 4		3.46±0.03^{D}	-0.01±0.05^{B}	-0.43±1.32^{B}
		Day 7		1.96±0.13^{a}	1.49±0.13^{ab}	43.16±3.82^{b}
	TW31	Day 0	3.59±0.03^{a}			
		Day 4		2.51±0.06^{A}	1.08±0.07^{DE}	30.15±1.87^{D}
		Day 7		1.26±0.02^{a}	2.33±0.05^{b}	64.80±1.46^{b}
	BR002	Day 0	3.81±0.05^{a}			
		Day 4		2.68±0.08^{B}	1.13±0.08^{E}	29.66±2.20^{D}
		Day 7		6.96±4.04^{b}	-3.15±4.09^{ab}	-82.60±1.25^{a}
	TW34	Day 0	4.09±0.01^{a}			
		Day 4		2.99±0.05^{C}	1.10±0.05^{DE}	26.82±1.20^{CD}
		Day 7		2.42±0.01^{a}	1.66±0.02^{ab}	40.75±0.43^{b}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

- คือ การเพิ่มขึ้นของปริมาณออร์โธฟอสเฟตที่มากกว่าวันเริ่มต้น

5) การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ

ตารางที่ 23 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการทดลอง[1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

	Treatment	Times		
		Day0	Day4	Day7
Non – sterilized 1 % cell suspension of *Bacillus*	Control	28.57±0.59 [a]	28.87±1.16 [a]	28.30±0.86 [a]
	TS23	28.50±1.12 [a]	28.50±1.58 [a]	28.00±1.19 [a]
	TW24	28.67±1.03 [a]	28.70±1.31 [a]	28.13±0.86 [a]
	BR001	28.47±1.00 [a]	28.50±1.42 [a]	28.03±1.10 [a]
	TW31	28.60±0.86 [a]	28.60±1.39 [a]	28.03±1.03 [a]
	BR002	28.70±0.94 [a]	28.67±1.41 [a]	28.07±0.95 [a]
	TW34	28.57±0.74 [a]	28.77±1.39 [a]	28.17±0.92 [a]

	Treatment	Times		
		Day0	Day4	Day7
Non – sterilized 5 % cell suspension of *Bacillus*	Control	28.77±0.94 [a]	28.77±0.94 [a]	28.47±0.74 [a]
	TS23	28.43±1.22 [a]	28.60±1.55 [a]	28.00±1.02 [a]
	TW24	28.33±1.27 [a]	28.60±1.53 [a]	28.07±1.00 [a]
	BR001	28.53±0.97 [a]	28.03±4.03 [a]	27.67±0.24 [a]
	TW31	28.70±1.00 [a]	28.63±1.41 [a]	28.47±0.84 [a]
	BR002	28.60±0.93 [a]	28.60±1.45 [a]	28.33±0.95 [a]
	TW34	28.63±0.97 [a]	28.53±1.07 [a]	28.47±0.92 [a]

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

6) การเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างการทดลอง

ตารางที่ 24 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างการทดลอง[1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

	Treatment	Times		
		Day0	Day4	Day7
Non – sterilized 11 % cell suspension of *Bacillus*	Control	7.94±0.00^{a}	6.95±0.48^{a}	6.66±0.46^{a}
	TS23	8.04±0.00^{cd}	7.11±0.46^{a}	6.94±0.46^{a}
	TW24	7.97±0.00^{b}	6.99±0.47^{a}	6.95±0.49^{a}
	BR001	8.08±0.00^{d}	7.01±0.46^{a}	6.96±0.46^{a}
	TW31	8.03±0.01^{c}	7.12±0.47^{a}	6.98±0.48^{a}
	BR002	8.03±0.01^{cd}	6.95±0.48^{a}	6.95±0.48^{a}
	TW34	8.01±0.01^{c}	7.03±0.46^{a}	6.97±0.46^{a}
	Treatment	Times		
		Day0	Day4	Day7
Non – sterilized 5 % cell suspension of *Bacillus*	Control	7.88±0.01^{b}	6.32±0.01^{a}	6.32±0.01^{c}
	TS23	7.90±0.00^{c}	6.36±0.02^{b}	6.26±0.00^{ab}
	TW24	7.77±0.00^{a}	6.53±0.01^{d}	6.23±0.02^{a}
	BR001	7.90±0.01^{c}	6.55±0.01^{de}	6.28±0.01^{b}
	TW31	7.98±0.01^{d}	6.64±0.01^{f}	6.26±0.01^{ab}
	BR002	8.14±0.01^{e}	6.38±0.01^{b}	6.26±0.01^{ab}
	TW34	7.91±0.00^{c}	6.56±0.00^{e}	6.47±0.01^{e}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

7) การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำ

ตารางที่ 25 การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำในระหว่างการทดลอง[1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

	Treatment	Times		
		Day0	Day4	Day7
Non – sterilized 1 % cell suspension of *Bacillus*	Control	7.00±0.06^{c}	6.60±0.01^{d}	5.60±0.01^{a}
	TS23	6.60±0.15^{a}	6.70±0.01^{e}	6.00±0.06^{c}
	TW24	6.40±0.06^{a}	6.50±0.01^{c}	6.20±0.01^{d}
	BR001	6.70±0.01^{b}	6.50±0.01^{c}	5.60±0.01^{a}
	TW31	6.50±0.01^{ab}	6.40±0.01^{b}	6.30±0.01^{e}
	BR002	7.00±0.06^{c}	6.50±0.01^{c}	6.40±0.01^{f}
	TW34	6.50±0.01^{ab}	6.60±0.01^{d}	5.80±0.01^{b}

	Treatment	Times		
		Day0	Day4	Day7
Non – sterilized 5 % cell suspension of *Bacillus*	Control	6.90±0.01^{e}	6.20±0.01^{b}	6.20±0.01^{b}
	TS23	6.60±0.01^{b}	6.50±0.01^{d}	6.40±0.01^{d}
	TW24	6.80±0.01^{d}	6.50±0.01^{d}	6.70±0.01^{e}
	BR001	6.50±0.01^{a}	6.30±0.01^{c}	6.40±0.01^{d}
	TW31	6.60±0.01^{d}	6.00±0.06^{a}	6.20±0.01^{b}
	BR002	6.60±0.01^{d}	6.30±0.01^{c}	6.30±0.01^{c}
	TW34	6.70±0.01^{c}	6.10±0.01^{a}	6.10±0.01^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

3. ผลการศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อ *Bacillus* ผสม

3.1 ผลการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus*

ตารางที่ 26 อัตราการเจริญเติบโตของกล้าเชื้อ *Bacillus* BR001:BR002 ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน

Sterilized wastewater : Cell suspension of *Bacillus* BR001 : BR002	Bacterial growth (Colony forming unit (CFU/mL))					
Treatment	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
30:70	5.69×10^{8}	3.24×10^{8}	2.98×10^{8}	5.28×10^{8}	1.72×10^{7}	7.93×10^{7}
40:60	1.82×10^{8}	3.36×10^{9}	4.60×10^{6}	6.45×10^{7}	2.34×10^{6}	3.80×10^{7}
50:50	8.81×10^{8}	4.88×10^{9}	5.50×10^{8}	6.39×10^{8}	3.08×10^{7}	5.15×10^{7}
60:40	6.62×10^{8}	5.25×10^{9}	6.68×10^{8}	3.72×10^{8}	1.61×10^{7}	3.37×10^{5}
70:30	1.58×10^{8}	4.32×10^{8}	5.09×10^{8}	4.37×10^{7}	3.71×10^{6}	3.91×10^{7}

3.2 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทเมื่อใช้กล้าเชื้อผสมในน้ำจากการเลี้ยงกุ้ง

1) การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย

ตารางที่ 27 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียในระหว่างการศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อ *Bacillus* ผสม เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งแบบระบบเปิด

	Treatment	Day	Initial ammonia (mg-N/L)	Final ammonia (mg-N/L)	Ammonia removal (%)
Sterilized wastewater Cell suspension of *Bacillus* BR001 : BR002	Control	Day 0	24.97±0.35^{a}		
		Day 1		21.81±3.46^{B}	
		Day 2		19.89±1.21^{b}	
		Day 3		18.29±2.63^{C}	
		Day 4		21.20±0.22^{b}	
		Day 5		22.75±1.43^{A}	8.86±4.97^{A}
	30:70	Day 0	24.97±0.35^{a}		
		Day 1		14.49±6.11^{AB}	
		Day 2		3.43±0.23^{a}	
		Day 3		6.21±1.31^{AB}	
		Day 4		2.18±0.65^{a}	
		Day 5		5.20±1.38^{B}	79.17±5.32^{A}
	40:60	Day 0	24.97±0.35^{a}		
		Day 1		15.18±6.11^{AB}	
		Day 2		7.46±2.42^{a}	
		Day 3		4.96±0.75^{AB}	
		Day 4		2.18±0.08^{a}	
		Day 5		4.20±0.20^{B}	83.17±1.96^{A}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละแถวของสดมภ์ Day 1, Day 2, Day 3, Day 4 และ Day 5 ในชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

ตารางที่ 27 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียในระหว่างการศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อ *Bacillus* ผสม เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งแบบระบบเปิด

	Treatment	Day	Initial ammonia (mg-N/L)	Final ammonia (mg-N/L)	Ammonia removal (%)
Sterilized wastewater Cell suspension of *Bacillus* BR001 : BR002	50:50	Day 0	24.97±0.35^{a}		
		Day 1		6.46±1.23^{A}	
		Day 2		4.97±0.31^{a}	
		Day 3		5.44±0.86^{AB}	
		Day 4		2.09±0.50^{a}	
		Day 5		4.82±0.17^{B}	80.68±1.09^{A}
	60:40	Day 0	24.97±0.35^{a}		
		Day 1		9.09±1.49^{AB}	
		Day 2		4.45±0.40^{a}	
		Day 3		3.00±0.67^{A}	
		Day 4		1.36±0.15^{a}	
		Day 5		2.97±0.20^{B}	88.11±1.30^{A}
	70:30	Day 0	24.97±0.35^{a}		
		Day 1		15.85±2.02^{AB}	
		Day 2		4.87±0.61^{a}	
		Day 3		5.84±1.07^{B}	
		Day 4		3.03±0.36^{a}	
		Day 5		4.42±0.72^{B}	82.30±4.25^{A}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละแถวของสดมภ์ Day 1, Day 2, Day 3, Day 4 และ Day 5 ในชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

2) การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์

ตารางที่ 28 การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์ในระหว่างการศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อ *Bacillus* ผสม เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งแบบระบบเปิด

	Treatment	Day	Initial nitrite (mg-N/L)	Final nitrite (mg-N/L)	Nitrite removal (%)
Sterilized wastewater : Cell suspension of *Bacillus* BR001 : BR002	Control	Day 0	27.36±0.09^{a}		
		Day 1		22.22±1.55^{B}	
		Day 2		22.81±3.36^{b}	
		Day 3		20.91±3.46^{C}	
		Day 4		19.92±0.38^{c}	
		Day 5		21.38±0.09^{C}	21.86±0.65^{B}
	30:70	Day 0	27.36±0.09^{a}		
		Day 1		20.31±3.44^{B}	
		Day 2		5.15±0.52^{a}	
		Day 3		11.70±0.16^{B}	
		Day 4		15.73±0.13^{b}	
		Day 5		14.78±0.06^{D}	45.99±0.21^{A}
	40:60	Day 0	27.36±0.09^{a}		
		Day 1		11.49±8.56^{A}	
		Day 2		4.09±0.27^{a}	
		Day 3		12.77±0.16^{B}	
		Day 4		14.37±0.45^{b}	
		Day 5		15.24±0.14^{D}	44.33±0.32^{A}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละแถวของสดมภ์ Day 1, Day 2, Day 3, Day 4 และ Day 5 ในชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

ตารางที่ 28 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์ในระหว่างการศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อ *Bacillus* ผสม เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งแบบระบบเปิด

	Treatment	Day	Initial nitrite (mg-N/L)	Final nitrite (mg-N/L)	Nitrite removal (%)
Sterilized wastewater Cell suspension of *Bacillus* BR001 : BR002	50:50	Day 0	27.36±0.09^{a}		
		Day 1		21.06±6.48^{B}	
		Day 2		4.63±0.03^{a}	
		Day 3		12.14±0.15^{B}	
		Day 4		10.81±0.62^{a}	
		Day 5		7.08±0.02^{A}	74.11±0.39^{D}
	60:40	Day 0	27.36±0.09^{a}		
		Day 1		23.72±1.62^{B}	
		Day 2		5.32±0.12^{a}	
		Day 3		16.06±0.29^{B}	
		Day 4		18.76±1.26^{C}	
		Day 5		14.61±0.20^{D}	46.70±0.93^{A}
	70:30	Day 0	27.36±0.09^{a}		
		Day 1		4.62±1.78^{A}	
		Day 2		1.90±0.02^{a}	
		Day 3		5.63±0.14^{A}	
		Day 4		9.04±0.36^{a}	
		Day 5		8.05±0.55^{B}	70.57±1.68^{C}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละแถวของสดมภ์ Day 1, Day 2, Day 3, Day 4 และ Day 5 ในชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

3) การเปลี่ยนแปลงของไนเตรท

ตารางที่ 29 การเปลี่ยนแปลงของไนเตรทในระหว่างการศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อ *Bacillus* ผสม เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งแบบระบบเปิด

	Treatment	Day	Initial nitrate (mg-N/L)	Final nitrate (mg-N/L)	Nitrate removal (%)
Sterilized wastewater Cell suspension of *Bacillus* BR001 : BR002	Control	Day 0	25.93±0.07^{a}		
		Day 1		16.99±0.35^{E}	
		Day 2		16.01±0.37^{d}	
		Day 3		15.12±4.93^{B}	
		Day 4		14.07±0.04^{b}	
		Day 5		25.46±0.28^{A}	1.81±9.63^{A}
	30:70	Day 0	25.93±0.07^{a}		
		Day 1		8.78±0.24^{D}	
		Day 2		2.03±0.15^{b}	
		Day 3		6.10±0.07^{A}	
		Day 4		18.20±0.24^{e}	
		Day 5		23.15±6.90^{BC}	10.72±8.37^{A}
	40:60	Day 0	25.93±0.07^{a}		
		Day 1		7.35±0.04^{C}	
		Day 2		2.25±0.09^{b}	
		Day 3		7.20±0.07^{A}	
		Day 4		15.96±0.04^{d}	
		Day 5		25.19±0.08^{C}	2.85±0.22^{A}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละแถวของสดมภ์ Day 1, Day 2, Day 3, Day 4 และ Day 5 ในชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

ตารางที่ 29 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงของไนเตรทในระหว่างการศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อ *Bacillus* ผสม เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งแบบระบบเปิด

	Treatment	Day	Initial nitrate (mg-N/L)	Final nitrate (mg-N/L)	Nitrate removal (%)
Sterilized wastewater Cell suspension of *Bacillus* BR001 : BR002	50:50	Day 0	25.93±0.07^{a}		
		Day 1		4.16±0.01^{B}	
		Day 2		2.64±0.18^{b}	
		Day 3		8.55±0.04^{AB}	
		Day 4		13.40±0.81^{c}	
		Day 5		23.37±0.15^{BC}	9.87±0.37^{A}
	60:40	Day 0	25.93±0.07^{a}		
		Day 1		4.79±0.37^{B}	
		Day 2		3.74±0.17^{c}	
		Day 3		11.66±0.04^{B}	
		Day 4		22.48±0.04^{f}	
		Day 5		26.57±0.11^{C}	-2.45±9.96^{A}
	70:30	Day 0	25.93±0.07^{a}		
		Day 1		2.28±0.01^{A}	
		Day 2		0.76±0.02^{a}	
		Day 3		6.37±0.11^{A}	
		Day 4		10.35±0.08^{a}	
		Day 5		19.17±0.20^{AB}	26.07±0.63^{B}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละแถวของสดมภ์ Day 1, Day 2, Day 3, Day 4 และ Day 5 ในชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

- การเพิ่มขึ้นของปริมาณไนเตรทที่มากกว่าวันเริ่มต้น

4. ผลการสร้างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็ม

4.1 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็ม

1) การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย

ตารางที่ 30 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มปริมาณ 5% (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

	Treatment	Day	Initial ammonia (mg-N/L)	Final ammonia (mg-N/L)	Ammonium removal (mg-N/L)	Ammonium removal (%)
Non-sterilized shrimp cultured water 5 % of *Bacillus* seed products	Control	Day 0	14.49±8.83^{a}			
		Day 4		11.85±1.46^{B}	2.64±0.27^{A}	18.21±0.88^{A}
		Day 7		13.06±2.37^{b}	1.41±0.83^{b}	9.79±4.79^{b}
	Coconut dust	Day 0	14.49±8.83^{a}			
		Day 4		10.89±1.28^{B}	3.60±0.66^{A}	24.83±6.67^{A}
		Day 7		0.16±0.08^{a}	14.33±0.90^{a}	98.90±1.47^{a}
	Rice husk	Day 0	14.49±8.83^{a}			
		Day 4		13.59±3.92^{B}	0.90±0.98^{A}	6.21±8.91^{B}
		Day 7		0.07±0.03^{a}	14.42±8.81^{a}	99.52±0.81^{a}
	Palm bunch	Day 0	14.49±8.83^{a}			
		Day 4		3.42±3.15^{A}	11.07±0.22^{B}	76.41±0.53^{B}
		Day 7		0.20±0.09^{a}	14.29±8.74^{a}	98.62±0.36^{a}
	Rice bran	Day 0	14.49±8.83^{a}			
		Day 4		2.19±0.48^{A}	12.30±0.08^{B}	84.90±2.68^{B}
		Day 7		0.82±0.10^{a}	13.67±8.76^{a}	94.34±0.48^{a}
	Broken-milled rice	Day 0	14.49±8.83^{a}			
		Day 4		11.30±7.12^{B}	3.19±0.76^{A}	22.00±9.07^{AB}
		Day 7		1.14±0.23^{a}	13.35±8.98^{a}	92.14±1.96^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

ตารางที่ 30 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มปริมาณ 5% (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

	Treatment	Day	Initial ammonia (mg-N/L)	Final ammonia (mg-N/L)	Ammonium removal (mg-N/L)	Ammonium removal (%)
Non-sterilized shrimp cultured water 5 % of *Bacillus* seed products	Sugarcane bagasse	Day 0	14.49±8.83^{a}			
		Day 4		4.90±4.27^{A}	9.59±1.27^{A}	66.21±7.81^{A}
		Day 7		0.07±0.04^{a}	14.42±8.84^{a}	99.52±1.03^{a}
	Wood sawdust	Day 0	14.49±8.83^{a}			
		Day 4		5.71±2.88^{A}	8.77±1.56^{A}	60.55±9.79^{A}
		Day 7		0.19±0.04^{a}	14.30±8.85^{a}	98.69±1.08^{a}
	Cassava starch	Day 0	14.49±8.83^{a}			
		Day 4		0.71±0.94^{C}	13.78±9.77^{A}	95.10±7.45^{C}
		Day 7		0.13±0.05^{a}	14.36±8.79^{a}	99.10±0.71^{a}
	Rice flour	Day 0	14.49±8.83^{a}			
		Day 4		3.08±1.09^{A}	11.41±8.23^{A}	78.76±6.83^{A}
		Day 7		0.62±0.07^{a}	13.87±8.76^{a}	95.72±0.48^{a}
	Glutinous rice flour	Day 0	14.49±8.83^{a}			
		Day 4		2.19±1.08^{A}	12.30±8.13^{A}	84.90±6.10^{A}
		Day 7		0.59±0.13^{a}	13.90±8.78^{a}	95.93±0.63^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

2) การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์

ตารางที่ 31 การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์ในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มปริมาณ 5% (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

	Treatment	Day	Initial nitrite (mg-N/L)	Final nitrite (mg-N/L)	Nitrite removal (mg-N/L)	Nitrite removal (%)
Non-sterilized shrimp cultured water 5 % of *Bacillus* seed products	Control	Day 0	12.07±0.18^{a}			
		Day 4		8.71±0.07^{B}	3.36±0.13^{B}	27.81±1.10^{B}
		Day 7		11.35±0.36^{c}	0.72±0.22^{a}	5.95±1.83^{a}
	Coconut dust	Day 0				
		Day 4		3.77±1.20^{A}	8.29±3.34^{A}	68.73±7.68^{A}
		Day 7		0.29±0.06^{a}	11.77±0.23^{b}	97.57±1.92^{c}
	Rice husk	Day 0				
		Day 4		4.38±2.94^{A}	7.68±3.02^{A}	63.68±5.04^{A}
		Day 7		0.13±0.07^{a}	11.94±0.20^{b}	98.92±1.69^{c}
	Palm bunch	Day 0				
		Day 4		3.74±1.14^{A}	8.33±3.16^{A}	69.00±6.22^{A}
		Day 7		0.05±0.07^{a}	12.02±0.25^{b}	99.60±2.08^{c}
	Rice bran	Day 0				
		Day 4		3.58±1.43^{A}	8.49±3.47^{A}	70.35±8.74^{A}
		Day 7		0.07±0.03^{a}	12.00±0.21^{b}	99.46±1.72^{c}
	Broken-milled rice	Day 0				
		Day 4		3.63±1.33^{A}	8.44±3.37^{A}	69.95±7.94^{A}
		Day 7		0.44±0.12^{a}	11.63±0.13^{b}	96.36±1.08^{c}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

ตารางที่ 31 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์ในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มปริมาณ 5% (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

		Treatment	Day	Initial nitrite (mg-N/L)	Final nitrite (mg-N/L)	Nitrite removal (mg-N/L)	Nitrite removal (%)
Non-sterilized shrimp cultured water	5 % of *Bacillus* seed products	Sugarcane bagasse	Day 0	12.07±0.18^{a}			
			Day 4		5.11±2.92^{A}	6.96±2.87^{A}	57.67±3.81^{A}
			Day 7		0.11±0.08^{a}	11.95±0.25^{b}	99.06±2.11^{c}
		Wood sawdust	Day 0				
			Day 4		3.40±1.35^{A}	8.67±3.39^{A}	71.84±8.06^{A}
			Day 7		0.16±0.04^{a}	11.91±0.20^{b}	98.70±1.65^{c}
		Cassava starch	Day 0				
			Day 4		3.53±1.43^{A}	8.54±3.47^{A}	70.76±8.73^{A}
			Day 7		5.29±2.30^{b}	6.77±2.46^{c}	56.15±20.36^{b}
		Rice flour	Day 0				
			Day 4		4.33±1.55^{A}	7.74±3.58^{A}	64.14±9.69^{A}
			Day 7		0.94±0.04^{a}	11.12±0.22^{b}	92.17±1.80^{c}
		Glutinous rice flour	Day 0				
			Day 4		4.46±1.33^{A}	7.61±3.37^{A}	63.07±7.94^{A}
			Day 7		1.09±0.29^{a}	10.98±0.44^{b}	90.96±3.63^{c}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

3) การเปลี่ยนแปลงของไนเตรท

ตารางที่ 32 การเปลี่ยนแปลงของไนเตรทในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มปริมาณ 5% (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

		Treatment	Day	Initial nitrate (mg-N/L)	Final nitrate (mg-N/L)	Nitrate removal (mg-N/L)	Nitrate removal (%)
Non-sterilized shrimp cultured water	5 % of *Bacillus* seed products	Control	Day 0	14.18±0.44^{a}			
			Day 4		19.74±0.84^{B}	-5.56±1.12^{C}	-39.25±7.88^{C}
			Day 7		16.09±6.63^{a}	-1.91±1.26^{b}	-13.48±4.12^{b}
		Coconut dust	Day 0	14.18±0.44^{a}			
			Day 4		9.26±3.48^{AB}	4.92±1.54^{AB}	34.72±5.00^{AB}
			Day 7		8.48±3.63^{a}	5.70±1.67^{a}	40.18±5.88^{a}
		Rice husk	Day 0	14.18±0.44^{a}			
			Day 4		9.11±3.12^{AB}	5.07±3.10^{AB}	35.74±1.84^{AB}
			Day 7		7.49±2.91^{a}	6.69±2.92^{a}	47.18±0.61^{a}
		Palm bunch	Day 0	14.18±0.44^{a}			
			Day 4		11.48±3.78^{AB}	2.70±1.80^{AB}	19.02±6.78^{AB}
			Day 7		8.00±3.72^{a}	6.18±3.70^{a}	43.59±6.11^{a}
		Rice bran	Day 0	14.18±0.44^{a}			
			Day 4		8.17±2.96^{A}	6.01±2.98^{B}	42.40±1.03^{B}
			Day 7		7.13±3.31^{a}	7.05±3.35^{a}	49.74±3.59^{a}
		Broken-milled rice	Day 0	14.18±0.44^{a}			
			Day 4		10.01±3.37^{AB}	4.17±1.38^{AB}	29.43±3.86^{AB}
			Day 7		9.21±3.02^{a}	4.97±3.00^{a}	35.06±1.17^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

- การเพิ่มขึ้นของปริมาณไนเตรทที่มากกว่าวันเริ่มต้น

ตารางที่ 32 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงของไนเตรทในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มปริมาณ 5% (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

		Treatment	Day	Initial nitrate (mg-N/L)	Final nitrate (mg-N/L)	Nitrate removal (mg-N/L)	Nitrate removal (%)
Non-sterilized shrimp cultured water	5 % of *Bacillus* seed products	Sugarcane bagasse	Day 0	14.18±0.44^{a}			
			Day 4		8.58±3.55^{A}	5.60±3.61^{B}	39.50±5.45^{B}
			Day 7		6.93±4.01^{a}	7.25±4.41^{a}	51.10±1.13^{a}
		Wood sawdust	Day 0	14.18±0.44^{a}			
			Day 4		10.00±3.05^{AB}	4.18±2.04^{AB}	29.46±1.42^{AB}
			Day 7		6.81±3.74^{a}	7.37±3.39^{a}	51.96±3.90^{a}
		Cassava starch	Day 0	14.18±0.44^{a}			
			Day 4		9.09±3.71^{AB}	5.09±2.72A^{B}	35.91±6.27^{AB}
			Day 7		8.07±3.68^{a}	6.11±3.67^{a}	43.08±5.87^{a}
		Rice flour	Day 0	14.18±0.44^{a}			
			Day 4		8.48±3.16^{A}	5.70±2.15^{B}	40.18±2.24^{B}
			Day 7		6.88±3.52^{a}	7.29±3.91^{a}	51.44±7.59^{a}
		Glutinous rice flour	Day 0	14.18±0.44^{a}			
			Day 4		9.72±3.37^{AB}	4.46±1.76^{AB}	31.48±6.55^{AB}
			Day 7		7.42±3.06^{a}	6.76±3.06^{a}	47.69±1.56^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

4) การเปลี่ยนแปลงของออร์โธฟอสเฟต

ตารางที่ 33 การเปลี่ยนแปลงของออร์โธฟอสเฟตในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มปริมาณ 5% (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

	Treatment	Day	Initial PO_4^{3-} (mg-P/L)	Final PO_4^{3-} (mg-P/L)	PO_4^{3-} removal (mg-P/L)	PO_4^{3-} removal (%)
Non-sterilized shrimp cultured water 5 % of *Bacillus* seed products	Control	Day 0	31.27±4.30^{a}			
		Day 4		31.14±9.55^{A}	0.14±0.32^{A}	0.44±3.01^{C}
		Day 7		34.33±6.20^{a}	-3.05±5.70^{c}	-9.77±0.20^{c}
	Coconut dust	Day 0	31.27±4.30^{a}			
		Day 4		21.85±1.42^{B}	9.43±5.73^{B}	30.14±8.31^{A}
		Day 7		15.05±3.36^{b}	16.22±7.41^{a}	51.88±3.71^{a}
	Rice husk	Day 0	31.27±4.30^{a}			
		Day 4		18.14±4.49^{B}	13.13±8.10^{B}	41.98±5.90^{AB}
		Day 7		14.46±3.06^{b}	16.81±7.19^{a}	53.76±3.00^{a}
	Palm bunch	Day 0	31.27±4.30^{a}			
		Day 4		30.52±8.48^{A}	0.76±4.55^{A}	2.42±4.54^{C}
		Day 7		20.98±6.56^{bc}	10.29±0.53^{ab}	32.91±3.67^{ab}
	Rice bran	Day 0	31.27±4.30^{a}			
		Day 4		28.54±2.64^{AB}	2.73±1.68^{AB}	8.74±5.38^{C}
		Day 7		25.93±2.46^{c}	5.35±1.53^{b}	17.10±5.26^{b}
	Broken-milled rice	Day 0	31.27±4.30^{a}			
		Day 4		10.53±7.80^{B}	20.74±4.51^{BC}	66.33±4.41^{B}
		Day 7		27.76±1.09^{c}	3.51±5.10^{b}	11.22±6.31^{b}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

- การเพิ่มขึ้นของปริมาณออร์โธฟอสเฟตที่มากกว่าวันเริ่มต้น

ตารางที่ 33 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงของออร์โธฟอสเฟตในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มปริมาณ 5% (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

		Treatment	Day	Initial PO_4^{3-} (mg-P/L)	Final PO_4^{3-} (mg-P/L)	PO_4^{3-} removal (mg-P/L)	PO_4^{3-} removal (%)
Non-sterilized shrimp cultured water	5 % of *Bacillus* seed products	Sugarcane bagasse	Day 0	31.27±4.30^{a}			
			Day 4		19.60±3.37^{B}	11.67±6.97^{B}	37.32±6.23^{A}
			Day 7		7.44±3.27^{d}	23.84±7.23^{a}	76.22±3.13^{d}
		Wood sawdust	Day 0	31.27±4.30^{a}			
			Day 4		18.87±1.09^{B}	12.40±5.03^{B}	39.65±0.03^{A}
			Day 7		5.66±3.13^{d}	25.61±7.10^{a}	81.91±2.71^{d}
		Cassava starch	Day 0	31.27±4.30^{a}			
			Day 4		3.24±4.62^{C}	28.04±1.11^{C}	89.65±3.53^{D}
			Day 7		5.21±2.80^{d}	26.06±6.38^{a}	83.33±0.42^{d}
		Rice flour	Day 0	31.27±4.30^{a}			
			Day 4		22.02±8.89^{AB}	9.25±5.15^{B}	29.59±8.44^{A}
			Day 7		9.22±3.59^{d}	22.05±7.58^{a}	70.52±4.24^{d}
		Glutinous rice flour	Day 0	31.27±4.30^{a}			
			Day 4		27.85±9.09^{AB}	3.42±0.02^{A}	10.93±4.01^{C}
			Day 7		12.96±3.34^{bd}	18.32±7.37^{ab}	58.57±3.55^{ab}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

5) การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด

ตารางที่ 34 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มปริมาณ 5% (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

	Treatment	Day	Initial TSS (mg/L)	Final TSS (mg/L)	TSS removal (mg/L)	TSS removal (%)
Non-sterilized shrimp cultured water 5 % of *Bacillus* seed products	Control	Day 0	37.80±26.55^{a}			
		Day 4		35.10±3.50^{CDE}	2.70±3.07^{A}	7.14±8.11^{A}
		Day 7		33.43±3.48^{bc}	4.37±3.07^{a}	11.55±8.12^{a}
	Coconut dust	Day 0	37.80±26.55^{a}			
		Day 4		45.90±0.70^{E}	-8.10±7.10^{D}	-21.43±1.71^{E}
		Day 7		14.87±0.62^{ab}	22.93±6.79^{b}	60.67±0.88^{c}
	Rice husk	Day 0	37.80±26.55^{a}			
		Day 4		13.90±0.20^{ABC}	23.90±6.75^{C}	63.23±0.77^{D}
		Day 7		8.37±0.19^{a}	29.43±6.48^{c}	77.87±0.06^{d}
	Palm bunch	Day 0	37.80±26.55^{a}			
		Day 4		8.13±0.43^{AB}	29.67±6.57^{C}	78.48±0.30^{D}
		Day 7		10.50±0.32^{ab}	27.30±6.85^{c}	72.22±1.03^{d}
	Rice bran	Day 0	37.80±26.55^{a}			
		Day 4		36.70±0.56^{CDE}	1.10±6.36^{A}	2.91±9.73^{A}
		Day 7		30.83±0.15^{abc}	6.97±2.57^{a}	18.43±0.28^{b}
	Broken-milled rice	Day 0	37.80±26.55^{a}			
		Day 4		24.93±0.41^{ABCDE}	12.87±6.92^{B}	34.04±1.21^{C}
		Day 7		22.17±0.62^{abc}	15.63±6.79^{d}	41.36±0.88^{c}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

- การเพิ่มขึ้นของปริมาณสารแขวนลอยที่มากกว่าวันเริ่มต้น

ตารางที่ 34 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มปริมาณ 5% (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

		Treatment	Day	Initial TSS (mg/L)	Final TSS (mg/L)	TSS removal (mg/L)	TSS removal (%)
Non-sterilized shrimp cultured water	5 % of *Bacillus* seed products	Sugarcane bagasse	Day 0	37.80±26.55^{a}			
			Day 4		20.33±3.67^{ABCD}	17.47±6.81^{B}	46.21±0.92^{C}
			Day 7		13.17±1.60^{ab}	24.63±5.61^{b}	65.17±7.75^{c}
		Wood sawdust	Day 0	37.80±26.55^{a}			
			Day 4		5.07±0.55^{A}	32.73±6.03^{C}	86.60±8.88^{D}
			Day 7		7.07±0.47^{a}	30.73±6.84^{c}	81.31±1.00^{d}
		Cassava starch	Day 0	37.80±26.55^{a}			
			Day 4		20.27±0.24^{ABCD}	17.53±6.78^{B}	46.38±0.86^{C}
			Day 7		26.60±0.76^{abc}	11.20±6.31^{d}	29.63±9.61^{b}
		Rice flour	Day 0	37.80±26.55^{a}			
			Day 4		38.93±0.50^{DE}	-1.13±6.67^{D}	-3.00±0.56^{E}
			Day 7		33.27±1.20^{bc}	4.53±6.91^{a}	11.99±1.20^{a}
		Glutinous rice flour	Day 0	37.80±26.55^{a}			
			Day 4		31.70±0.56^{BCDE}	6.10±6.91^{A}	16.14±1.18^{B}
			Day 7		39.17±0.61^{c}	-1.37±7.04^{e}	-3.62±1.53^{e}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

- การเพิ่มขึ้นของปริมาณสารแขวนลอยที่มากกว่าวันเริ่มต้น

6) การเปลี่ยนแปลงของค่า COD

ตารางที่ 35 การเปลี่ยนแปลงของค่า COD ในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มปริมาณ 5% (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

		Treatment	Day	Initial COD (mg/L)	Final COD (mg/L)	COD removal (mg/L)	COD removal (%)
Non-sterilized shrimp cultured water	5 % of *Bacillus* seed products	Control	Day 0	102.72±39.75^{a}			
			Day 4		102.87±30.09^{B}	1.19±26.48^{A}	1.16±25.78^{A}
			Day 7		101.54±29.61^{c}	1.19±24.94^{a}	1.16±24.28^{a}
		Coconut dust	Day 0	102.72±39.75^{a}			
			Day 4		42.31±0.68^{A}	60.42±39.50^{D}	58.82±38.45^{D}
			Day 7		42.31±0.26^{ab}	60.42±40.01^{d}	58.82±38.95^{d}
		Rice husk	Day 0	102.72±39.75^{a}			
			Day 4		41.71±0.54^{A}	61.01±40.06^{D}	59.39±39.00^{D}
			Day 7		41.42±0.26^{ab}	61.31±40.01^{d}	59.68±38.95^{d}
		Palm bunch	Day 0	102.72±39.75^{a}			
			Day 4		41.12±0.83^{A}	61.60±40.45^{D}	59.97±39.38^{D}
			Day 7		74.22±16.20^{bc}	28.50±40.57^{b}	27.75±39.49^{b}
		Rice bran	Day 0	102.72±39.75^{a}			
			Day 4		91.00±0.39^{B}	11.73±40.12^{B}	11.42±39.05^{B}
			Day 7		57.74±15.44^{ab}	44.98±25.71^{c}	43.79±25.03^{c}
		Broken-milled rice	Day 0	102.72±39.75^{a}			
			Day 4		90.85±0.51^{B}	11.88±39.92^{B}	11.56±38.86^{B}
			Day 7		42.31±0.93^{ab}	60.42±39.33^{d}	58.82±38.29^{d}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

ตารางที่ 35 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงของค่า COD ในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มปริมาณ 5% (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

		Treatment	Day	Initial COD (mg/L)	Final COD (mg/L)	COD removal (mg/L)	COD removal (%)
Non-sterilized shrimp cultured water	5 % of *Bacillus* seed products	Sugarcane bagasse	Day 0	102.72±39.75^{a}			
			Day 4		73.44±2.89^{B}	29.28±37.32C	28.51±36.33^{C}
			Day 7		45.44±3.41^{ab}	57.29±43.04^{d}	55.77±41.90^{d}
		Wood sawdust	Day 0	102.72±39.75^{a}			
			Day 4		42.90±0.15^{A}	59.82±39.78^{D}	58.24±38.73^{D}
			Day 7		26.27±16.26^{a}	76.45±55.50^{e}	74.42±54.03^{e}
		Cassava starch	Day 0	102.72±39.75^{a}			
			Day 4		90.11±0.90^{B}	12.62±40.12^{B}	12.28±39.05^{B}
			Day 7		42.60±0.39^{ab}	60.12±40.07^{d}	58.53±39.00^{d}
		Rice flour	Day 0	102.72±39.75^{a}			
			Day 4		90.70±0.83^{B}	12.02±39.73^{B}	11.71±38.67^{B}
			Day 7		41.12±0.15^{ab}	61.60±39.87^{d}	59.97±38.81^{d}
		Glutinous rice flour	Day 0	102.72±39.75^{a}			
			Day 4		90.40±0.77^{B}	12.32±40.01^{B}	11.99±38.94^{B}
			Day 7		42.46±0.54^{ab}	60.27±39.53^{d}	58.67±38.48^{d}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

7) การเปลี่ยนแปลงของค่า pH

ตารางที่ 36 การเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มปริมาณ 5% (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

	Treatment	Times		
		Day0	Day4	Day7
Non-sterilized shrimp cultured water 5 % of *Bacillus* seed products	Control	8.12±0.00[a]	8.06±0.00[b]	8.04±0.00[b]
	Coconut dust	8.12±0.00[a]	7.40±0.00[a]	7.35±0.01[a]
	Rice husk	8.12±0.00[a]	7.59±0.07[a]	7.96±0.03[a]
	Palm bunch	8.12±0.00[a]	7.55±0.00[a]	7.66±0.02[a]
	Rice bran	8.12±0.00[a]	7.64±0.10[a]	7.94±0.02[a]
	Broken-milled rice	8.12±0.00[a]	7.43±0.00[a]	7.60±0.03[a]
	Sugarcane bagasse	8.12±0.00[a]	7.43±0.01[a]	7.53±0.01[a]
	Wood sawdust	8.12±0.00[a]	7.62±0.07[a]	7.15±0.02[a]
	Cassava starch	8.12±0.00[a]	7.77±0.01[a]	7.65±0.01[a]
	Rice flour	8.12±0.00[a]	7.35±0.02[a]	7.41±0.01[a]
	Glutinous rice flour	8.12±0.00[a]	7.14±0.01[a]	7.14±0.01[a]

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

8) การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำ

ตารางที่ 37 การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มปริมาณ 5% (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

	Treatment	Times		
		Day0	Day4	Day7
		mg/L	mg/L	mg/L
Non-sterilized shrimp cultured water 5 % of *Bacillus* seed products	Control	4.26±0.01[a]	4.71±0.21[a]	4.68±0.22[a]
	Coconut dust	4.26±0.01[a]	4.67±0.20[a]	4.76±0.10[a]
	Rice husk	4.26±0.01[a]	4.67±0.20[a]	4.83±0.04[a]
	Palm bunch	4.26±0.01[a]	4.77±0.09[a]	4.86±0.01[a]
	Rice bran	4.26±0.01[a]	4.85±0.01[a]	4.75±0.10[a]
	Broken-milled rice	4.26±0.01[a]	4.81±0.01[a]	4.81±0.01[a]
	Sugarcane bagasse	4.26±0.01[a]	4.76±0.01[a]	4.68±0.07[ab]
	Wood sawdust	4.26±0.01[a]	4.67±0.01[a]	4.65±0.01[a]
	Cassava starch	4.26±0.01[a]	4.61±0.02[a]	4.47±0.11[a]
	Rice flour	4.26±0.01[a]	4.53±0.02[a]	4.53±0.02[a]
	Glutinous rice flour	4.26±0.01[a]	4.46±0.03[ab]	4.50±0.04[ab]

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

9) การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ

ตารางที่ 38 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มปริมาณ 5% (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] ในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล

	Treatment	Times		
		Day0	Day4	Day7
		°C	°C	°C
Non-sterilized shrimp cultured water 5 % of *Bacillus* seed products	Control	25.04±0.03[a]	25.33±0.02[a]	26.11±0.01[a]
	Coconut dust	25.04±0.03[a]	25.01±0.01[a]	26.60±0.00[a]
	Rice husk	25.04±0.03[a]	24.81±0.01[a]	26.51±0.01[a]
	Palm bunch	25.04±0.03[a]	24.82±0.01[a]	26.50±0.00[a]
	Rice bran	25.04±0.03[a]	24.81±0.00[a]	26.51±0.00[a]
	Broken-milled rice	25.04±0.03[a]	24.91±0.00[a]	26.61±0.00[a]
	Sugarcane bagasse	25.04±0.03[a]	24.81±0.01[a]	26.61±0.01[a]
	Wood sawdust	25.04±0.03[a]	24.71±0.01[a]	26.42±0.01[a]
	Cassava starch	25.04±0.03[a]	24.61±0.01[a]	26.31±0.01[a]
	Rice flour	25.04±0.03[a]	24.71±0.01[a]	26.31±0.01[a]
	Glutinous rice flour	25.04±0.03[a]	24.71±0.01[a]	26.51±0.00[a]

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 4 ของชุดการทดลอง

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยในแถว Day 7 ของชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

5. การศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็ม

ตารางที่ 39 การเปลี่ยนแปลงของอัตราการรอดชีวิตของเชื้อระกว่างการทดลองในเวลา 6 เดือน

Bacillus seed product	Treatment	Bacterial growth (Colony forming unit (CFU/g))					
		1 Months	2 Months	3 Months	4 Months	5 Months	6 Months
	Room temp	$3.50x10^9$	$3.40x10^9$	$3.30x10^9$	$3.04x10^9$	$2.95x10^9$	$2.87x10^9$
	4 °C	$3.02x10^9$	$2.94x10^9$	$2.56x10^9$	$1.85x10^8$	$1.72x10^8$	$1.63x10^8$

6. ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำในการเลี้ยงกุ้งระหว่างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า

6.1 ประสิทธิภาพการลดปริมาณแอมโมเนีย

ตารางที่ 40 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าเป็นระยะเวลา 30 วัน [1] ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

	Treatment	Day	Initial ammonia (mg-N/L)	Final ammonia (mg-N/L)	Ammonium removal (mg-N/L)	Ammonium removal (%)
Shrimp cultured ponds	Control	Day 0	0.04 ± 0.03^a			
		Day 5		0.01 ± 0.00^a	0.03 ± 0.03^a	68.27 ± 6.94^a
		Day 10		0.02 ± 0.01^A	0.02 ± 0.03^A	56.53 ± 1.71^A
		Day 15		0.03 ± 0.01^b	0.01 ± 0.05^a	18.40 ± 1.59^a
		Day 20		0.12 ± 0.01^B	-0.09 ± 0.04^A	-227.47 ± 3.07^A
		Day 25		0.15 ± 0.00^b	-0.12 ± 0.03^a	-309.07 ± 4.65^a
		Day 30		0.16 ± 0.00^B	-0.12 ± 0.02^A	-321.07 ± 2.75^A
	Commercial	Day 0	0.04 ± 0.03^a			
		Day 5		0.00 ± 0.00^b	0.04 ± 0.03^b	93.88 ± 8.50^b
		Day 10		0.01 ± 0.00^A	0.03 ± 0.03^B	86.93 ± 7.94^B
		Day 15		0.00 ± 0.00^a	0.04 ± 0.03^b	94.67 ± 8.10^b
		Day 20		0.04 ± 0.00^A	-0.01 ± 0.03^A	-13.60 ± 8.18^A
		Day 25		0.11 ± 0.00^a	-0.07 ± 0.04^a	-188.27 ± 9.09^a
		Day 30		0.07 ± 0.02^A	-0.03 ± 0.05^A	$-74.40\ \pm4.35^A$

ตารางที่ 40 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าเป็นระยะเวลา 30 วัน [1] ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

	Treatment	Day	Initial ammonia (mg-N/L)	Final ammonia (mg-N/L)	Ammonium removal (mg-N/L)	Ammonium removal (%)
Shrimp cultured ponds	*Bacillus*	Day 0	0.04±0.03^{a}			
	seed	Day 5		0.00±0.00^{b}	0.04±0.03^{b}	98.13±8.60^{b}
	product	Day 10		0.01±0.00^{A}	0.03±0.03^{B}	79.20±8.41^{B}
		Day 15		0.01±0.00^{c}	0.03±0.03^{b}	76.80±7.66^{b}
		Day 20		0.04±0.00^{A}	-0.01±0.03^{A}	-17.87 ±8.30^{A}
		Day 25		0.16±0.00^{b}	-0.12±0.04^{a}	-330.93±9.08^{a}
		Day 30		0.09±0.04^{C}	-0.05±0.01^{A}	-128.80±8.12^{A}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละแถวของสดมภ์ Day 0, Day 5, Day 10, Day 15 , Day 20, Day 25 และ Day 30 ในชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

- การเพิ่มขึ้นของปริมาณแอมโมเนียที่มากกว่าวันเริ่มต้น

6.2 ประสิทธิภาพการลดปริมาณไนไตรท์

ตารางที่ 41 การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์ในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าเป็นระยะเวลา 30 วัน [1] ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

	Treatment	Day	Initial nitrite (mg-N/L)	Final nitrite (mg-N/L)	Nitrite removal (mg-N/L)	Nitrite removal (%)
Shrimp cultured ponds	Control	Day 0	0.12±0.02^{a}			
		Day 5		0.08±0.00^{a}	0.04±0.02^{a}	30.70±1.42^{a}
		Day 10		0.03±0.00^{C}	0.09±0.02^{A}	78.72±1.87^{A}
		Day 15		0.03±0.02^{a}	0.09±0.03^{a}	78.53±2.39^{a}
		Day 20		0.09±0.00^{B}	0.03±0.01^{A}	27.01±1.09^{A}
		Day 25		0.06±0.00^{b}	0.06±0.01^{a}	50.58±1.95^{a}
		Day 30		0.15±0.09^{B}	-0.03±0.07^{A}	-22.24±2.30^{A}
	Commercial	Day 0	0.12±0.02^{a}			
		Day 5		0.08±0.00^{b}	0.04±0.02^{b}	37.24±1.14^{b}
		Day 10		0.01±0.00^{A}	0.11±0.02^{A}	94.00±1.42^{C}
		Day 15		0.01±0.00^{a}	0.11±0.02^{b}	89.17±1.44^{b}
		Day 20		0.06±0.00^{AB}	0.06±0.02^{C}	50.34±1.51^{C}
		Day 25		0.09±0.01^{a}	0.10±0.01^{c}	85.13±1.52^{c}
		Day 30		0.05±0.01^{A}	0.07±0.03^{B}	57.16±2.18^{B}
	Bacillus seed product	Day 0	0.12±0.02^{a}			
		Day 5		0.08±0.00^{a}	0.04±0.02^{b}	34.38±1.80^{b}
		Day 10		0.02±0.01^{B}	0.10±0.01^{A}	85.40±9.50^{B}
		Day 15		0.03±0.02^{a}	0.09±0.03^{a}	78.60±2.92^{a}
		Day 20		0.08±0.02^{AB}	0.04±0.03^{B}	36.84±2.94^{B}
		Day 25		0.04±0.01^{c}	0.08±0.03^{b}	63.03±2.69^{b}
		Day 30		0.05±0.01^{A}	0.07±0.01^{B}	58.12±8.98^{B}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละแถวของสดมภ์ Day 0, Day 5, Day 10, Day 15 , Day 20, Day 25 และ Day 30 ในชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

- การเพิ่มขึ้นของปริมาณไนไตรท์ที่มากกว่าวันเริ่มต้น

6.3 ประสิทธิภาพการลดปริมาณไนเตรท

ตารางที่ 42 การเปลี่ยนแปลงของไนเตรทในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าเป็นระยะเวลา 30 วัน [1] ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

	Treatment	Day	Initial nitrate (mg-N/L)	Final nitrate (mg-N/L)	Nitrate removal (mg-N/L)	Nitrate removal (%)
Shrimp cultured ponds	Control	Day 0	0.43±0.03^{a}			
		Day 5		0.37±0.00^{c}	0.06±0.03^{a}	14.78±1.19^{a}
		Day 10		0.49±0.00^{A}	-0.06±0.03^{A}	-13.06±1.46^{A}
		Day 15		0.43±0.03^{c}	0.00±0.05^{a}	0.47±1.36^{a}
		Day 20		0.37±0.00^{A}	0.07±0.03^{A}	15.12±1.84^{A}
		Day 25		0.21±0.02^{b}	0.22±0.05^{a}	50.65±1.37^{a}
		Day 30		0.30±0.04^{A}	0.13±0.05^{A}	31.06±1.57^{A}
	Commercial	Day 0	0.43±0.03^{a}			
		Day 5		0.35±0.00^{b}	0.08±0.03^{a}	18.54±1.75^{ab}
		Day 10		0.41±0.00^{B}	0.02±0.03^{B}	5.80±1.46^{B}
		Day 15		0.28±0.00^{a}	0.15±0.03^{b}	33.93±1.14^{b}
		Day 20		0.24±0.00^{B}	0.20±0.03^{B}	45.43±1.75^{B}
		Day 25		0.02±0.01^{a}	0.41±0.04^{b}	94.33±1.81^{b}
		Day 30		0.16±0.07^{B}	0.27±0.10^{B}	61.94±2.28^{B}
	Bacillus seed product	Day 0	0.43±0.03^{a}			
		Day 5		0.34±0.00^{a}	0.09±0.03^{a}	21.74±1.46^{b}
		Day 10		0.40±0.00^{B}	0.03±0.03^{B}	7.26±1.92^{B}
		Day 15		0.30±0.01^{b}	0.13±0.02^{b}	30.05±1.95^{b}
		Day 20		0.26±0.00^{C}	0.17±0.03^{B}	40.49±1.27^{B}
		Day 25		0.05±0.04^{a}	0.38±0.05^{b}	88.60±1.39^{b}
		Day 30		0.17±0.02^{B}	0.26±0.04^{B}	60.42±1.17^{B}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละแถวของสดมภ์ Day 0, Day 5, Day 10, Day 15 , Day 20 , Day 25 และ Day 30 ในชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p>0.05)

- การเพิ่มขึ้นของปริมาณไนเตรทที่มากกว่าวันเริ่มต้น

6.4 ประสิทธิภาพการลดปริมาณออร์โธฟอสเฟต

ตารางที่ 43 การเปลี่ยนแปลงของออร์โธฟอสเฟตในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าเป็นระยะเวลา 30 วัน [1] ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

	Treatment	Day	Initial PO_4^{3-} (mg-P/L)	Final PO_4^{3-} (mg-P/L)	PO_4^{3-} removal (mg-P/L)	PO_4^{3-} removal (%)
Shrimp cultured ponds	Control	Day 0	13.71±0.02^{a}			
		Day 5		12.62±0.01^{a}	1.09±0.03^{a}	7.92±7.93^{c}
		Day 10		13.72±0.01^{A}	-0.01±0.04^{A}	-0.10±9.60^{A}
		Day 15		14.44±0.04^{a}	-0.74±0.03^{a}	-5.38±7.94^{a}
		Day 20		13.38±0.01^{B}	0.33±0.02^{A}	2.38±6.05^{B}
		Day 25		14.06±0.00^{a}	-0.36±0.03^{a}	-2.61±7.32^{a}
		Day 30		13.39±0.00^{B}	0.32±0.02^{B}	-2.32±6.03^{A}
	Commercial	Day 0	13.71±0.02^{a}			
		Day 5		12.99±0.02^{b}	0.72±0.04^{b}	5.23±9.65^{b}
		Day 10		13.36±0.01^{A}	0.35±0.02^{B}	2.53±5.48^{B}
		Day 15		12.60±0.04^{b}	1.10±0.04^{b}	8.05±10.79^{b}
		Day 20		13.31±0.00^{A}	0.39±0.03^{B}	2.88±7.60^{A}
		Day 25		12.25±0.01^{b}	1.46±0.03^{b}	10.63±7.13^{b}
		Day 30		12.60±0.03^{A}	1.11±0.02^{A}	8.07±6.68^{B}
	Bacillus seed product	Day 0	13.71±0.02^{a}			
		Day 5		13.36±0.02^{c}	0.35±0.03^{c}	2.53±7.20^{a}
		Day 10		13.36±0.01^{A}	0.34±0.03^{B}	2.50±1.76^{B}
		Day 15		12.33±0.02^{c}	0.38±0.02^{c}	2.76±4.76^{c}
		Day 20		13.31±0.01^{A}	0.39±0.02^{B}	2.86±5.93^{A}
		Day 25		12.25±0.00^{b}	2.52±0.02^{c}	18.35±5.84^{c}
		Day 30		12.60±0.05^{A}	1.80±0.05^{B}	13.17±1.23^{C}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละแถวของสดมภ์ Day 0, Day 5, Day 10, Day 15 , Day 20 , Day 25 และ Day 30 ในชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p>0.05)

- การเพิ่มขึ้นของปริมาณออร์โธฟอสเฟตที่มากกว่าวันเริ่มต้น

6.5 ประสิทธิภาพการลดค่า COD

ตารางที่ 44 การเปลี่ยนแปลงของค่า COD ในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าเป็นระยะเวลา 30 วัน [1] ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

	Treatment	Day	Initial COD (mg/L)	Final COD (mg/L)	COD (mg/L)	COD removal (%)
Shrimp cultured ponds	Control	Day 0	90.35±1.42^{a}			
		Day 5		79.53±0.81^{a}	10.82±1.82^{a}	11.97±1.58^{a}
		Day 10		82.31±1.93^{A}	8.04±3.29^{A}	8.90±3.75^{A}
		Day 15		81.73±4.21^{a}	8.62±2.92^{a}	9.54±2.26^{a}
		Day 20		78.53±3.67^{A}	11.82±4.21^{A}	13.08±4.67^{A}
		Day 25		79.67±4.26^{a}	10.67±4.74^{a}	11.81±4.84^{a}
		Day 30		78.82±4.20^{A}	11.53±4.33^{A}	12.76±4.84^{A}
	Commercial	Day 0	90.35±1.42^{a}			
		Day 5		58.91±0.77^{b}	31.44±1.17^{b}	34.80±1.28^{b}
		Day 10		59.12±0.67^{B}	31.23±2.00^{B}	34.56±1.32^{B}
		Day 15		58.78±3.73^{b}	31.57±4.15^{b}	34.91±4.07^{b}
		Day 20		58.38±3.72^{B}	31.97±5.01^{B}	35.38±4.45^{B}
		Day 25		57.93±3.12^{b}	32.42±2.08^{b}	35.88±2.14^{b}
		Day 30		58.97±2.12^{B}	31.38±3.02^{B}	34.73±2.22^{B}
	Bacillus seed	Day 0	90.35±1.42^{a}			
	product	Day 5		58.46±0.45^{b}	31.89±1.45^{b}	35.25±1.02^{c}
		Day 10		59.16±2.89^{B}	31.19±2.54^{B}	34.52±2.56^{B}
		Day 15		58.08±2.16^{b}	32.27±0.88^{c}	35.71±8.47^{c}
		Day 20		59.42±3.64^{C}	30.93±4.10^{C}	34.23±3.59^{C}
		Day 25		57.41±3.30^{b}	32.94±3.67^{b}	36.45±3.42^{c}
		Day 30		58.83±4.56^{B}	31.52±3.17^{B}	34.89±3.60^{B}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละแถวของสดมภ์ Day 0, Day 5, Day 10, Day 15 , Day 20 , Day 25 และ Day 30 ในชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

6.6 ประสิทธิภาพการลดปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด

ตารางที่ 45 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าเป็นระยะเวลา 30 วัน [1] ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

	Treatment	Day	Initial TSS (mg/L)	Final TSS (mg/L)	TSS (mg/L)	TSS removal (%)
Shrimp cultured ponds	Control	Day 0	15.30±3.20^{a}			
		Day 5		12.20±3.20^{a}	3.10±0.12^{a}	20.26±0.75^{a}
		Day 10		11.80±3.96^{A}	3.50±1.07^{A}	22.88±6.99^{A}
		Day 15		12.43±3.18^{c}	2.87±0.09^{a}	18.74±0.58^{a}
		Day 20		12.50±3.20^{A}	2.80±0.06^{A}	18.30±0.38^{A}
		Day 25		12.83±3.13^{a}	2.47±0.09^{a}	16.12±0.58^{a}
		Day 30		12.03±3.49^{A}	3.27±0.32^{A}	21.35±2.08^{A}
	Commercial	Day 0	15.30±3.20^{a}			
		Day 5		9.37±3.32^{b}	5.93±0.15^{b}	38.78±0.95^{b}
		Day 10		10.07±3.07^{B}	5.23±0.18^{B}	34.20±1.15^{B}
		Day 15		10.23±3.54^{a}	5.07±0.33^{b}	33.12±2.18^{c}
		Day 20		10.00±0.38^{B}	5.30±3.52^{B}	34.64±2.99^{C}
		Day 25		10.00±0.10^{b}	5.30±3.10^{b}	34.64±2.28^{c}
		Day 30		11.03±2.54^{B}	4.27±0.68^{B}	27.89±4.42^{B}
	Bacillus seed product	Day 0	15.30±3.20^{a}			
		Day 5		11.30±3.20^{c}	4.00±0.00^{c}	26.14±0.00^{c}
		Day 10		11.37±3.57^{A}	3.93±0.38^{A}	25.71±2.51^{A}
		Day 15		11.90±3.17^{b}	3.40±0.26^{c}	22.22±1.73^{b}
		Day 20		12.13±2.78^{A}	3.17±0.43^{C}	20.70±2.78^{B}
		Day 25		10.93±0.34^{b}	4.37±3.44^{c}	28.54±2.47^{b}
		Day 30		9.67±0.24^{C}	5.63±3.03^{C}	36.82±1.83^{C}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละแถวของสดมภ์ Day 0, Day 5, Day 10, Day 15 , Day 20 , Day 25 และ Day 30 ในชุดการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่ และอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

6.7 การเปลี่ยนแปลงของค่า pH

ตารางที่ 46 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าเป็นระยะเวลา 30 วัน [1] ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

Shrimp cultured ponds							
Treatment	Times						
	Day 0	Day 5	Day 10	Day 15	Day 20	Day 25	Day 30
Control	7.73±0.31[a]	7.69±0.33[a]	7.67±0.34[a]	7.91±0.01[a]	7.69±0.33[a]	7.69±0.29[a]	7.95±0.04[a]
Commercial	7.73±0.31[a]	7.70±0.33[a]	7.92±0.01[a]	7.94±0.03[a]	7.70±0.34[a]	7.64±0.32[a]	7.98±0.04[a]
Bacillus seed product	7.73±0.31[a]	7.74±0.36[a]	7.67±0.34[a]	7.96±0.03[a]	8.08±0.01[a]	7.98±0.04[a]	7.67±0.32[a]

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละแถวของในสดมภ์ Day 0, Day 5, Day 10, Day 15 , Day 20 , Day 25 และ Day 30 ในชุดการทดลอง ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

6.8 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ

ตารางที่ 47 การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าเป็นระยะเวลา 30 วัน [1] ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

Shrimp cultured ponds							
Treatment	Times						
	Day 0	Day 5	Day 10	Day 15	Day 20	Day 25	Day 30
	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L		
Control	6.05±0.02[a]	6.06±0.03[a]	5.98±0.01[a]	6.00±0.03[a]	5.99±0.02[a]	6.00±0.05[a]	5.92±0.03[a]
Commercial	6.05±0.02[a]	6.08±0.01[a]	6.10±0.01[a]	6.01±0.06[a]	6.06±0.03[a]	6.20±0.10[a]	6.18±0.03[a]
Bacillus seed product	6.05±0.02[a]	6.08±0.01[a]	6.08±0.01[a]	6.11±0.05[a]	6.15±0.03[a]	5.94±0.05[a]	6.18±0.03[a]

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละแถวของในสดมภ์ Day 0, Day 5, Day 10, Day 15 , Day 20 , Day 25 และ Day 30 ในชุดการทดลอง ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

6.9 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ

ตารางที่ 48 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มกับผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าเป็นระยะเวลา 30 วัน [1] ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

Shrimp cultured ponds							
Treatment	Times						
	Day 0	Day 5	Day 10	Day 15	Day 20	Day 25	Day 30
	°C	°C	°C	°C	°C	°C	°C
Control	27.82±0.01[a]	28.67±0.09[a]	27.60±0.06[a]	26.40±0.06[a]	27.10±0.06[a]	26.40±0.06[a]	27.83±0.03[a]
Commercial	27.82±0.01[a]	28.55±0.16[a]	27.63±0.09[a]	26.50±0.06[a]	27.13±0.07[a]	26.07±0.03[a]	27.63±0.09[a]
Bacillus seed product	27.82±0.01[a]	28.63±0.09[a]	27.67±0.03[a]	26.37±0.07[a]	27.13±0.09[a]	26.23±0.12[a]	27.83±0.03[a]

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เปรียบเทียบกันระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละแถวของในสดมภ์ Day 0, Day 5, Day 10, Day 15 , Day 20 , Day 25 และ Day 30 ในชุดการทดลอง ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

7.2.4 เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2546. ค่ามาตรฐานน้ำทิ้งจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 96 หน้า.

กษิดิศ หนูทอง. 2551. การบำบัดไนโตรเจนในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบปิด. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง 16: 11–22.

จุรีย์รัตน์ ลีสมิทธิ์. 2552. ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร. หน้า 29–31.

จูอะดี พงศ์มณีรัตน์ และพัชรี ซุ่นสั้น. 2553. การสะสมและการขับทิ้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch, 1790) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดแห้งและอาหารปลาสด. วารสารการประมง 63: 487–501.

โชคชัย วนภู และหนึ่ง เตียอำรุง. 2556. การพัฒนาหัวเชื้อ PGPR เพื่อการเก็บรักษาระยะยาว. รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. นครราชสีมา. หน้า 5–23.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, บูรณี พั่ววงษ์แพทย์, ทิพวรรณ กันหาญาติ และรุ่งนภา ทองเครั่ง. 2555. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบ No. 4 แบบเม็ดเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของขิง. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 851–856.

ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2544. การกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทางชีวภาพ. สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร. 703 หน้า.

นิคม ละอองศิริวงค์, ยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตร และทองเพชร สันบูกา. 2549. การทดลองใช้สาหร่ายหนาม (*Najas indica* (Willd) Chane) กำจัดสารประกอบไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 27/2549. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา. 21 หน้า.

ปิยะวรรณ กาสลัก และปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์. 2558. เทคโนโลยีการผลิตหัวเชื้อ (*Bacillus subtilis*) เพื่อการผลิต ผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก. รายงานการวิจัยประจำปี 2558. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา. 53 หน้า.

พงศ์ศักดิ์ หนูพันธ์ และรัฐชา ชัยชนะ. 2557. ผลกระทบของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อการเกิดยูโทรฟิเคชันในแหล่งน้ำและการกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส. วิศวกรรมสาร มก 88: 57–67.

พุทธ ส่องแสงจินดา และวลีรัตน์ มูสิกะสังข์. 2547. คุณภาพน้ำและการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียในระบบการจัดการเลี้ยงกุ้งกุลาดำวิธีต่าง ๆ กัน. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สำนักงานวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง. 16 หน้า.

พุทธ ส่องแสงจินดา. 2562. การจัดการสารประกอบไนโตรเจน ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งระบบปิด. กลุ่มวิจัยวิศวกรรมการเพาะเลี้ยงและสิ่งแวดล้อม ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล ฝั่งอ่าวไทย กรมประมง. เข้าถึงได้จาก https://www.shrimpcenter.com/t-shrimp007.html. [21 กุมภาพันธ์ 2562].

มณิศรา พิริยวิรุตม์ และบำรุง เลิศลอยกุลชัย. 2559. ผลของผงขี้เลื่อยและน้ำยางพาราต่อสมบัติของคอมพอสิตโฟมแป้ง มันสำปะหลัง. วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี) ปีที่ 8 ฉบับที่ 15. หน้า 40–53.

มะลิวัลย์ คุตะโค และสรวิศ เผ่าทองศุข. 2555. บทบาทของกระบวนการทางชีวภาพต่อการเปลี่ยนแปลงสารประกอบไนโตรเจนในบ่อดินสำหรับเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 30: 103–112.

วรวุฒิ เกิดปราง และชาคริยา ฉลาด. 2558. จุลินทรีย์ท้องถิ่นในพื้นที่เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำตามหลักเกษตรธรรมชาติ กรณีศึกษา: ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง. วารสารวิจัย 8: 52–27.

วารุณี แซ่เอี๊ย, ชลอ ลิ้มสุวรรณ, นิติ ชูเชิด และพรเลิศ จันทร์รัชกูล. 2549. ผลของการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* sp. ต่อคุณภาพน้ำและผลผลิตกุ้งกุลาดำในน้ำความเค็มต่ำ. การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 30 มกราคม-2 กุมภาพันธ์. หน้า 196-204.

วิภาภรณ์ ณ ถลาง, กุลวดี ตรองพาณิชย์ และศรุดา โลหะนะ. 2554. คุณค่าทางโภชนาการและความเป็นพิษระดับเซลล์ของเส้นใยปาล์ม ซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้จากการสกัดน้ำมันปาล์ม. วารสารอาหาร ปีที่ 41 ฉบับที่ 1. หน้า 82–87.

ศิริลักษณ์ นามวงษ์. 2553. ศักยภาพของแบคทีเรียทนเค็ม และแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง ทางเทคโนโลยีชีวภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 15: 122–132.

สถิติการประมงแห่งประเทศไทย. 2560. กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สมหมาย เชี่ยววารีสัจจะ. 2539. เอกสารประกอบการสอนรายวิชา 530–441 การจัดการคุณภาพน้ำ. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. สงขลา. หน้า 1–119.

สวรรยา ปัญญานันท์, เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ และกล้าณรงค์ ศรีรอต. 2561. การเตรียมและการศึกษาสมบัติของเซลลูโลสจากกากมันสำปะหลังเพื่อการประยุกต์ใช้ในอาหาร. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า ปีที่ 36 ฉบับที่ 2. หน้า 106–116.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีระพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2552. การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน บทบาทของจุลินทรีย์และการประยุกต์ใช้. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร. หน้า 29–221.

Achuthan, C., Kumar, V. J. R., Manju, N. J., Philip, R. and Singh, I. S. B. 2006. Development of nitrifying bacterial consortia for immobilizing in nitrifying bioreactors designed for penaeid and non-penaeid larval rearing systems in the tropics. Indian Journal of Marine Sciences 35: 240–248.

Ahn, Y. H. 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies. Process Biochemistry 41: 1709–1721.

APHA, AWWA, and WEF. 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th ed. Washington, D. C. 1360 pp.

Barman, P., Bandyopadhyay, P., Kati, A., Paul, T., Mandal, K. A., Mondal, C. K. and Mohapatra, D. K. P. 2017. Characterization and strain improvement of aerobic denitrifying producing bacterium *Bacillus cereus* PB88 for shrimp water quality management. Waste and Biomass Valorization 9: 1319–1330.

Boopathy, R., Kern, C. and Corbin, A. 2015. Use of *Bacillus* consortium in waste digestion and pathogen control in shrimp aquaculture. International Biodeterioration and Biodegradation 102: 159–164.

Boyd, C. E. and Tuker, V. S. 1998. Pond Aquaculture Water Quality Management. Kluwer Academic Publication, Boston. 700 pp.

Chankaew, S., O–Thong, S. and Sangnoi, Y. 2018. Nitrogen removal efficiency of salt–tolerant heterotrophic nitrifying bacteria. Chiang Mai Journal of Science 45: 11–20.

Chanpun, K., Powtongsook, S. and Suntornsuk, W. 2007. Bacterial selection from shrimp ponds for degradation of organic matters. Songklanakarin Journal of Science and Technology 29: 89–99.

Ducklow, H. W. and Carlson, C. A. 1992. Oceanic bacterial production. Advances in Microbial Ecology 12: 113–181.

Hill, J. E., Baiano, J. C. F. and Barnes, A. C. 2009. Isolation of a novel strain of *B. pumilus* from penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens. Fish Diseases 10: 1–10.

Iriye, R. and Takatsuka, H. 1999. Studies on sewage treatment improvement by increase/ domination of genus *Bacillus* bacteria. Journal of Antibacterial and Antifungal Agents 27: 431–440.

Kutako, M., Limpiyakorn, T., Luepromchai, E., Powtongsook, S. and Menasveta, P. 2009. Inorganic nitrogen conversion and change of bacterial community in sediment from shrimp pond after methanol addition. Journal of Applied Sciences 9: 2907–2915.

Lalloo, R., Ramchuran, S., Ramduth, D., Go, J. and Gardiner, N. 2007. Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. Journal of Applied Microbiology 103: 1471–1479.

Liang, S., Zhao, M., Lu, L., Wang, C., Zhao, L. and Liu, W. 2011. Isolation and characteristic of an aerobic denitrifier with high nitrogen removal efficiency. African Journal of Biotechnology 10: 10648–10656.

Liu, B., Xie, J., Liu, W., Wang, T., Wang, H. and Du, W. 2006. Effects of *Bacillus licheniformis* on digestive performance and growth of allo gynogenetic crucian carp. Journal of Dalian Fisheries University 21: 336–340.

Lu, L., Hongxin, T., Guozhi, L. and Wenyan, L. 2012. The effects of *Bacillus subtilis* on nitrogen recycling from aquaculture solid waste using heterotrophic nitrogen assimilation in sequencing batch reactors. Bioresource Technology 124: 180–185.

Muthuwani, U. and Lin, C. K. 1996. Water quality and nutrient budget in intensive shrimp culture ponds. Book of abstracts, The 1996 Annual Meeting of the World Aquaculture Society. Bangkok Thailand. 29 January–2 February. p. 270.

Nimrat, S., Suksawat, S., Boonthai, T. and Vuthiphandchai, V. 2012. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Veterinary Microbiology 159: 443–450.

O–Thong, S., Jiapakdee, R. and Intrasungkha, N. 2003. Wastewater generated from marine shrimp feed and its treatment potential by internal filter system. Thaksin University Journal 6: 41–53.

Pedro, J., Alvaraz, J. and Timothy, M. V 1991. Substrate interactions of benzene toluene and *para*-xylene during microbial degradation by pure culture and mixed culture aquifer slurries. Applied and Environmental Microbiology 57: 2981–2985.

Purivirojkul, W., Maketon, M. and Areechon, N. 2005. Probiotic properties of *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis* in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) culture. Kasetsart Journal: Natural Science 39: 262–273.

Rajakumar, S., Ayyasamy, P. M., Shanthi, K., Thavamani, P., Velmurugan, P., Songa, Y. C. and Lakshmanaperumalsamy, P. 2008. Nitrate removal efficiency of bacterial consortium (*Pseudomonas* sp. KW1 and *Bacillus* sp. YW4) in synthetic nitrate–rich water. Journal of Hazardous Materials 157: 553–563.

Reddy, M. V., Nikhil, G. N., Mohan, V. S., Swamy, Y. V. and Sarma, P. N. 2012. *Pseudomonas otitid* is as a potential biocatalyst for polyhydroxyalkanoates (PHA) synthesis using synthetic wastewater and acidogenic effluents. Bioresource Technology 123: 471–479.

Rout, P. R., Bhunia, P. and Dash, R. R. 2017. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous from domestic wastewater using *Bacillus cereus* GS–5 strain exhibiting heterotrophic nitrification, aerobic denitrification and denitrifying phosphorous removal. Bioresource Technology 244: 484–495.

Safitri, R., Priadie, R., Miranti, M. and Astut, W. A. 2015. Ability of bacterial consortium: *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Nitrosomonas* sp. and *Pseudomonas putida* in bioremediation of waste water in cisirung waste water treatment plant. Agrolife Scientific Journal 4: 146–152.

Saïd, M., Ezzahra, F. A., Jamal, A., Mohammed, R. and Omar, A. 2014. Heterotrophic denitrification by gram–positive bacteria: *Bacillus cereus* and *Bacillus tequilensis*. International Journal of Scientific and Research Publications 4: 1–4.

Sakai, K., Nakamura, K., Wakayama, M. and Moriguchi, M. 1997. Change in nitrite conversion direction from oxidation to reduction in heterotrophic bacteria depending on the aeration conditions. Journal of Fermentation and Bioengineering 84: 47–52.

Sangnoi, Y., Chankaew, S. and O–Thong, S. 2017. Indigenous *Halomonas* spp., the potential nitrifying bacteria for saline ammonium waste water treatment. Pakistan Journal of Biological Science 20: 52–58.

Seenivasagan, R., Kasimani, R., Babalola, O. O., Karthika, A., Rajakumar, S. and Ayyasamy, P. M. 2017. Effect of various carbon source, temperature and pH on nitrate reduction efficiency in mineral salt medium enriched with *Bacillus weinstephnisis* (DS45). Groundwater for Sustainable Development 5: 21–27.

Shan, H. and Obbard, J. P. 2001. Ammonia removal from prawn aquaculture water using immobilized nitrifying bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology 57: 791–798.

Song, Z. F., An, J., Fu, G. H. and Yang, X. L. 2011. Isolation and characterization of an aerobic denitrifying *Bacillus* sp. YX-6 from shrimp culture ponds. Aquaculture. 319: 188–193.

Stevens, E. S. 2003. What makes green plastics green. Biocycle. 44: 24–27.

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

Suharti, H. A. and Vries, S. 2004. NO reductase from *Bacillus azotoformans* is a bifunctional enzyme accepting electrons from menaquinoland a specific endo genous membrane–bound cytochrome C 551. Biochemistry 43: 13487–13495.

Takeuchi, H., Yasuji, T. Yamamoto, H. and Kawashima, Y. 2000. Spray-dried lactose composite particles containing an ion complex of alginate-chitosan for designing a dry-coated tablet having a time-controlled releasing function. Journal of Pharmacy Research 17: 4–99.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725–2729.

Visvanathan, C., Hung, N. Q. and Jegatheesan, V. 2008. Hydrogenotrophic denitrification of synthetic aquaculture wastewater using membrane bioreactor. Process Biochemistry 43: 673–682.

Wardhani, S., Ridho, R. M., Arinafril, A. and Rachman, A. S. 2017. Consortium of heterotrophic nitrification bacteria *Bacillus* sp. and its application on urea fertilizer industrial wastewater treatment. Malaysian Journal of Microbiology 13:156–163.

Yan, L., He, L. Y., Kong, N. H., Tanaka, S. and Lin, Y. 2006. Isolation of a new heterotrophic nitrifying *Bacillus* sp. strain. Journal of Environmental Biology 27: 323–326.

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

Yao, Y. C., Zhang, Q. L., Liu, Y. and Liu, Z. P. 2013. Simultaneous removal of organic matter and nitrogen by a heterotrophic nitrifying–aerobic denitrifying bacterial strain in a membrane bioreactor. Bioresource Technology 143: 83–87.

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

Zhao, S., Hu, N., Chen, Z., Zhao, B. and Liang, Y. 2009. Bioremediation of reclaimed wastewater used as landscape water by using the denitrifying bacterium *Bacillus cereus*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 83: 337–340.

Zokaeifar, H., Babaei, N., Saad, C. R., Kamarudin, M. S., Sijam, K. and Balcazar, J. L. 2014. Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology 36: 68–74.

7.3 ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการทำวิจัยต่อไป

1. การพัฒนาสูตรการผลิตผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมและปรับปรุงผลิตภัณฑ์เพิ่มเติม เพื่อให้ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มคงที่ และมีอัตรารอดชีวิตของเชื้อที่เพิ่มมากขึ้น

2. การเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มชนิดผง และแบบน้ำในการปรับปรุงคุณภาพน้ำเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงสุด ที่อาจช่วยพัฒนาอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศให้มีความยั่งยืนในอนาคต

3. การทดสอบประสิทธิภาพการปรับปรุงคุณภาพน้ำของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* เป็นระยะเวลายาวนานขึ้น ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้ง

4. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างประชาคมของกล้าเชื้อ *Bacillus* กับการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้ง

7.4 บทความวิจัยที่นำเสนอที่ประชุมวิชาการ

Phatthongkleang, T., Sangnoi, Y., Uppabullung, A. and Keawtawee, T. 2018. Efficiency of *Bacillus* spp. to remove ammonia in shrimp aquaculture. Book of abstracts, 8th International Fisheries Symposium 2018. Hat Yai, Thailand. 18–21 November 2018. p. 112.

IFS2018 THAILAND, NOVEMBER 18 – 21, 2018

3-O-07

Efficiency of *Bacillus* spp. to remove ammonia in shrimp aquaculture

Thossaporn Phatthongkleang[1], Yutthapong Sangnoi[1,2*] Arnon Uppabullung[1,2], and Teeyaporn Keawtawee[1,2]

[1]Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90110, Thailand
[2]Discipline of Excellence for Sustainable Aquaculture, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90110, Thailand
*** Corresponding author, Email address: yutthapong.s@psu.ac.th**

Abstract

Ammonium removal in shrimp aquaculture is highly important to prevent ammonium toxicity. This study used salt-tolerant *Bacillus* spp. to eliminate ammonia in shrimp aquaculture wastewater. *Bacillus* spp. were isolated from sediment and water samples collected from shrimp farms and domestic wastewater. Each sample was enriched into nitrate medium which incubated at 30 °C for 14 days. Ammonium oxidizing ability of bacteria was preliminary screened by Griess-Ilosvay method. Then, they were cultivated into heterotrophic nitrification medium and tested for their ammonium removal efficiency. High proficient strains with 90% ammonium removal were selected to further study. Gram staining, morphological and biochemical characteristics, salt requirement and optimal pH on growth of selected strains were examined. Twenty-four isolates were identified as *Bacillus* spp. with salt requirement for growth within a range of 0-4% NaCl. Strain TS41, TW31, HS12, HW34 and ES33 exhibited highly ammonium removal efficiency of 94.86, 93.94, 93.17, 90.65 and 84.21%, respectively under initial pH 7. The ability to improve quality of wastewater from shrimp aquaculture (sterilized and non-sterilized with fermented and non-fermented samples) was determined by applying 1% and 5% of *Bacillus* spp. cell suspension for 7 days. *Bacillus* sp. ES33 showed highest ammonia removal in sterilized-fermented wastewater of 68.27 and 54.37% in 1% and 5% cell suspension, respectively. However, in the condition of non-sterilized-fermented wastewater, highest ammonium removal of 31.22% and 25.03% was found in *Bacillus* spp. ES33 (1% cell suspension) and HS12 (5% cell suspension), respectively. These findings indicated that *Bacillus* strains play significant role on ammonia removal in nitrification process. They could be applied for remediation of aquaculture wastewater and other nitrogen-based effluents.

Keywords: ammonium removal, salt-tolerant *Bacillus* spp., wastewater, nitrification