



การประยุกต์ใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรเพื่อผลิตกล้าเชื้อแบบผงสำหรับบำบัดของเสีย
ในการเลี้ยงกุ้ง

Application of Agricultural Wastes for Producing of Bacterial Seedling Powder for
Shrimp-Cultured Sewage Treatment

สุนิภา จันทรแก้ว
Sunipa Chankaew

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษิตามหลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Doctor of Philosophy in Aquatic Science
Prince of Songkla University

2567

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การประยุกต์ใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรเพื่อผลิตกล้าเชื้อแบบผงสำหรับบำบัดของเสีย
ในการเลี้ยงกุ้ง
Application of Agricultural Wastes for Producing of Bacterial Seedling Powder for
Shrimp-Cultured Sewage Treatment

สุนิภา จันทรแก้ว
Sunipa Chankaew

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Doctor of Philosophy in Aquatic Science
Prince of Songkla University

2567

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์	การประยุกต์ใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรเพื่อผลิตกล้าเชื้อแบบผงสำหรับบำบัดของเสียในการเลี้ยงกุ้ง
ผู้เขียน	นางสาวสุนิภา จันทร์แก้ว
สาขาวิชา	วาริชศาสตร์

คณะกรรมการสอบ

..... ประธาน

(ดร.สรวิต เผ่าทองศุข)

.....กรรมการ
 Digitally signed : 2024.06.04 14:00:35 +07:00
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุทธพงษ์ สังข์น้อย)

.....กรรมการ
Digitally signed : 2024.06.10 22:17:15 +07:00
(รองศาสตราจารย์ ดร.วีระเดช มีอินเกิด)

.....กรรมการ
Digitally signed: 2024.06.11 11:09:33 +07:00
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมหมาย เขียววารีสังจะ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมพงศ์ โอทอง)


Digitally signed : 2024.06.11 18:22:50 +07:00
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กวินพัฒน์ สิริกานติโสภณ)
รักษาการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ค)

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มี
ส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
Digitally signed: 2024.06.04 14:00:37 +07:00
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุทธพงษ์ สังข์น้อย)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....
Digitally signed: 2024.06.04 16:48:13 +07:00
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมพงศ์ โอทอง)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ สุนิภา จันทรแก้ว
(นางสาวสุนิภา จันทรแก้ว)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ สุณีภา จันทร์แก้ว
(นางสาวสุณีภา จันทร์แก้ว)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การประยุกต์ใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรเพื่อผลิตกล้าเชื้อแบบผงสำหรับ
บำบัดของเสียในการเลี้ยงกุ้ง
ผู้เขียน นางสาวสุนิษา จันทรแก้ว
สาขาวิชา วาริชศาสตร์
ปีการศึกษา 2566

บทคัดย่อ

การกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะแอมโมเนีย นับว่ามีความสำคัญมาก เพราะช่วยป้องกันไม่ให้สัตว์น้ำได้รับอันตรายจากความเป็นพิษ ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตกล้าเชื้อเหเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในการเลี้ยงกุ้ง จากการคัดแยกเหเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็ม 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Alcaligenes faecalis* SRNB23, *A. faecalis* SRNB35, *Bacillus oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 พบว่า กล้าเชื้อผสมระหว่าง *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้ดีที่สุดเท่ากับ 77.92 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของ *A. faecalis* SRNB23 คือ sodium citrate ส่วนของ *A. faecalis* SRNB35, *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 คือ sucrose ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมของทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ ammonium sulfate สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมของ *A. faecalis* SRNB23, *A. faecalis* SRNB35, *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 เท่ากับ 4, 2, 4 และ 8 ตามลำดับ สัดส่วนกล้าเชื้อผสมที่เหมาะสมที่สุดระหว่าง *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 เท่ากับ 50:50 ซึ่งสามารถลดแอมโมเนียได้ 66.59 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาการนำวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรมาประยุกต์ใช้เพื่อเป็นกล้าเชื้อสูตรผง พบว่าผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรผงที่ใช้รำข้าวเป็นวัสดุยัดเกาะดีที่สุด โดยสามารถลดแอมโมเนียได้มากที่สุด เมื่อศึกษาความมีชีวิตของกล้าเชื้อที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียสตลอดระยะเวลา 6 เดือน พบว่าจำนวนเชื้อมีแนวโน้มลดลง ซึ่งลดลงจาก 10^{12} CFU/มิลลิลิตร ในวันเริ่มต้นเหลือ 10^6 CFU/มิลลิลิตร ในเดือนที่ 6 เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรผงและสูตรน้ำ ณ ห้องปฏิบัติการ พบว่ากล้าเชื้อสูตรผงสามารถลดแอมโมเนียได้ 98.07 เปอร์เซ็นต์ เกิดไนไตรท์และไนเตรท 5.28 และ 67.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่สูตรน้ำสามารถลดแอมโมเนียได้ 96.24 เปอร์เซ็นต์ ลดไนไตรท์ได้ 47.85 เปอร์เซ็นต์ และเกิดไนเตรท 46.87 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็ม เปรียบเทียบกับการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าในการเลี้ยงกุ้ง พบว่าแอมโมเนียในบ่อที่ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็ม มีปริมาณต่ำกว่า 1.56 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งต่ำกว่าบ่อที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ปริมาณไนไตรท์และไนเตรทในบ่อทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็ม มีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วงท้ายของการทดลอง ซึ่งเกิดจาก

ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันที่เปลี่ยนรูปของแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์และไนเตรท ตามลำดับ เมื่อศึกษาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียทั้ง 2 ชุดการทดลอง พบ Proteobacteria, Bacteroidota, Actinobacteriota และ Firmicutes เป็นไฟลัมหลัก โดยสมาชิกในไฟลัม Firmicutes สามารถพบ *Exiguobacterium* sp. และ *Bacillus* sp. เป็นกลุ่มหลักตลอดการเลี้ยง โดยบ่อที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าพบ *Exiguobacterium* sp. เป็นกลุ่มเด่น แต่แทบจะไม่พบ *Bacillus* sp. ซึ่งแตกต่างกับบ่อทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำที่พบ *Bacillus* sp. เป็นกลุ่มเด่น ส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียในบ่อลดลง ซึ่งแอมโมเนียถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์และไนเตรทตามกระบวนการไนตริฟิเคชัน

คำสำคัญ : เฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรีย, วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร, *Bacillus* sp.,

โครงสร้างประชาคมแบคทีเรีย

Thesis Title	Application of Agricultural Wastes for Producing of Bacterial Seedling Powder for Shrimp-Cultured Sewage Treatment
Author	Miss Sunipa Chankaew
Major Program	Aquatic Science
Academic Year	2023

ABSTRACT

Inorganic nitrogen removal, especially ammonia, is important for aquaculture systems to prevent toxicity from aquatic animals. This study aimed to produce halotolerant heterotrophic nitrifying bacterial seeding with efficiency in removing inorganic nitrogen in shrimp farms. Four strains of halotolerant heterotrophic nitrifying bacteria, including *Alcaligenes faecalis* SRNB23, *A. faecalis* SRNB35, *Bacillus oceanisediminis* Ba9, and *B. vietnamensis* SF- 1 were isolated. The mixture of *B. oceanisediminis* Ba9 seedlings and *B. vietnamensis* SF-1 showed the highest ammonium removal efficiency of 77.92%. The optimal carbon source of *A. faecalis* SRNB23 was sodium citrate during *A. faecalis* SRNB35, *B. oceanisediminis* Ba9 and *B. vietnamensis* SF-1 were sucrose. The optimal nitrogen source showed all strains were ammonium sulfate. C/N ratio of *A. faecalis* SRNB23, *A. faecalis* SRNB35, *B. oceanisediminis* Ba9, and *B. vietnamensis* SF-1 had 4, 2, 4, and 8, respectively. The optimal mixing proportion of *B. oceanisediminis* Ba9 and *B. vietnamensis* SF- 1 was 50:50, indicating an ammonium removal efficiency of 66.59%. The best agricultural byproduct for producing powder formula was rice bran, which had the highest ammonium removal. The viability of powder seedlings that were stored at 4°C for 6 months showed a decrease in cell quantity, half from 10^{12} CFU/ml to 10^6 CFU/ml in 6 months. The laboratory-scale comparison indicated that the powder formula seedling of heterotrophic nitrifying bacteria mixed with rice bran had the highest ammonium removal efficiency of 98.07% and produced nitrite and nitrate for 5.28 and 67.47%, respectively. Liquid formula seedlings of heterotrophic nitrifying bacteria had an ammonium removal efficiency of 96.25%, removed nitrite for 47.58%, and produced nitrate for 46.87%. The seedling of heterotrophic nitrifying bacteria was studied and applied in shrimp ponds. The result showed that the ammonium quantity was below 1.56 mg-N/L in the heterotrophic nitrifying seedling pond, significantly ($p < 0.05$) lower than the commercial bacterial seedling pond. The amounts of nitrite and nitrate in heterotrophic nitrifying seedling ponds were raised later in the culture process. This might have resulted from the nitrification process in which ammonia was transformed into nitrite and then nitrite into nitrate. The community structure of bacteria in both cultures of experiments, the dominance of the bacterial phylum found Proteobacteria,

Bacteroidota,, Actinobacteriota, and Firmicutes. Members of the phylum Firmicutes could find *Exiguobacterium* sp. and *Bacillus* sp. as the main groups throughout the culture. *Exiguobacterium* sp. was found in commercial seedling ponds, but *Bacillus* sp. was rarely found. In contrast with the heterotrophic bacterial seedling pond, *Bacillus* sp. was the dominant. It effectively reduces ammonium when ammonia is converted to nitrite and then nitrate via nitrification.

Keywords: heterotrophic nitrifying bacteria, agricultural wastes, *Bacillus* sp., community structure of bacteria

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุทธพงษ์ สังข์น้อย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่ช่วยเหลือในการวางแผนการทดลอง แนะนำ รวมถึงคอยให้คำปรึกษาและแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สมพงศ์ โธทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ แก้ไข และทำให้วิทยานิพนธ์สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.สรวิศ เผ่าทองสุข ประธานกรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร.วีระเดช มีอินเกิด และรองศาสตราจารย์ ดร.สมหมาย เขียววารีสังจะ ที่สละเวลาเป็นกรรมการ รวมถึงให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (สวก.) ที่สนับสนุนงบประมาณในการทำงานวิจัย ช่วยให้การดำเนินงานวิจัยเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

ขอขอบพระคุณ คุณดำรงศักดิ์ ศรีสนิท เจ้าของฟาร์มดำรงศักดิ์ฟาร์ม ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์พื้นที่ทดลอง ให้ความร่วมมือในการเข้าดำเนินงานและให้ข้อมูลเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ ดร.ชลธิชา มามิมิน ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำในการวิเคราะห์โครงสร้างประชาคมเฮเทอโรโทรฟิคไนโตรไฟอิงแบคทีเรีย

ขอขอบพระคุณอาจารย์อานนท์ อุบลลังก์ ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำในการรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ขอขอบพระคุณ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมการจัดการ ที่อำนวยความสะดวกเรื่องสถานที่และอุปกรณ์ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกคนเป็นอย่างสูงที่ให้พื้นฐานทางด้านการศึกษา อีกทั้งเป็นผู้ให้การสนับสนุนช่วยเหลือทั้งด้านกำลังใจ และกำลังความรู้ สติปัญญา จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอบคุณนางสาวเคียงขวัญ ศักยพันธ์ และนางสาวกานต์ชนก เจียมสกุล ที่ให้คำปรึกษาทางด้านภาษาอังกฤษ

สุณิภา จันทรแก้ว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ	จ
ABSTRACT	ซ
กิตติกรรมประกาศ.....	ซ
สารบัญ.....	ญ
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ.....	ฅ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการศึกษา	29
บทที่ 4 ผลการศึกษาและวิจารณ์ผลการศึกษา.....	40
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา	70
บรรณานุกรม.....	72
ภาคผนวก.....	80
ประวัติผู้เขียน.....	116

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 Primers ที่ใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียกลุ่ม AOB จากน้ำเสียใน Gliwice ประเทศโปแลนด์.....	12
ตารางที่ 2 ชนิดของ probes ที่ใช้ในการศึกษาประชาคมของไนตริไฟอิงแบคทีเรียในไบโอฟิล์มจากตัวกรองในระบบการเพาะเลี้ยงปลา gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>).....	13
ตารางที่ 3 Primers ที่ใช้ในการศึกษาประชากรไนตริไฟอิงแบคทีเรียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกร่อยที่มีความเค็ม 15 ppt และน้ำเค็มที่มีความเค็ม 30 ppt ด้วยยีน 16S rRNA และ <i>amoA</i>	16
ตารางที่ 4 รหัสสายพันธุ์กล้าเชื้อเดี่ยวเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรีย	30
ตารางที่ 5 ชุดการทดลองประสิทธิภาพของกล้าเชื้อผสม	31
ตารางที่ 6 วิธีวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย ไนโตรต์ และไนเตรท	31
ตารางที่ 7 วิธีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมีในการศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงกุ้ง.....	37
ตารางที่ 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์	40
ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์.....	88
ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของกล้าเชื้อผสมเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ เมื่อศึกษาเป็นระยะเวลา 5 วัน	89
ตารางที่ 11 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>A. faecalis</i> SRNB23 ระยะเวลา 5 วัน	90
ตารางที่ 12 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>A. faecalis</i> SRNB35 ระยะเวลา 5 วัน	91
ตารางที่ 13 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>B. oceanisediminis</i> Ba9 ระยะเวลา 5 วัน.....	92
ตารางที่ 14 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>B. vietnamensis</i> SF-1 ระยะเวลา 5 วัน.....	93
ตารางที่ 15 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>A. faecalis</i> SRNB23 โดยใช้ sodium citrate เป็นแหล่งคาร์บอนระยะเวลา 5 วัน	94

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 16 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>A. faecalis</i> SRNB35 โดยใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน ระยะเวลา 5 วัน	94
ตารางที่ 17 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>B. oceanisediminis</i> Ba9 โดยใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน ระยะเวลา 5 วัน	95
ตารางที่ 18 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>B. vietnamensis</i> SF-1 โดยใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน ระยะเวลา 5 วัน	95
ตารางที่ 19 สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสมสำหรับเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>A. faecalis</i> SRNB23 โดยใช้ sodium citrate เป็นแหล่งคาร์บอน และ ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจน	96
ตารางที่ 20 สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสมสำหรับเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>A. faecalis</i> SRNB35 โดยใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน และ ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจน	97
ตารางที่ 21 สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสมสำหรับเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>B. oceanisediminis</i> Ba9 โดยใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน และ ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจน	98
ตารางที่ 22 สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสมสำหรับเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>B. vietnamensis</i> SF-1 โดยใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน และ ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจน	99
ตารางที่ 23 สัดส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อผสมสายพันธุ์ <i>B. oceanisediminis</i> Ba9 ต่อ <i>B. vietnamensis</i> SF-1 ในการกำจัดแอมโมเนีย.....	100
ตารางที่ 24 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนียจากการใช้วัสดุยัดเกาะจากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรในการสร้างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อสูตรผง (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	101
ตารางที่ 25 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจนจากการใช้วัสดุยัดเกาะจากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรในการสร้างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อสูตรผง (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	102

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 26 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตรทจากการใช้วัสดุยึดเกาะจากวัสดุเศษเหลือ ทางการเกษตรในการสร้างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อสูตรผง (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	103
ตารางที่ 27 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช (pH) ระหว่างการทดลองประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มในการบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้ง ในห้องปฏิบัติการ (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	104
ตารางที่ 28 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิระหว่างการทดลองประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ เหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มในการบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งใน ห้องปฏิบัติการ (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	105
ตารางที่ 29 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำระหว่างการทดลองประสิทธิภาพ ของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มในการบำบัดน้ำเสียจาก การเลี้ยงกุ้งในห้องปฏิบัติการ (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	106
ตารางที่ 30 การเปลี่ยนแปลงความเค็มระหว่างการทดลองประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ เหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มในการบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งใน ห้องปฏิบัติการ (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	107
ตารางที่ 31 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนียระหว่างการทดลองประสิทธิภาพของ ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มในการบำบัดน้ำเสีย จากการเลี้ยงกุ้งในห้องปฏิบัติการ (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	108
ตารางที่ 32 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรทระหว่างการทดลองประสิทธิภาพของ ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มในการบำบัดน้ำเสีย จากการเลี้ยงกุ้งในห้องปฏิบัติการ (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	109
ตารางที่ 33 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตรทระหว่างการทดลองประสิทธิภาพของ ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มในการบำบัดน้ำเสีย จากการเลี้ยงกุ้งในห้องปฏิบัติการ (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร).....	110
ตารางที่ 34 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ พีเอช ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำ และความเค็มของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าในการเพาะเลี้ยงกุ้ง	111
ตารางที่ 35 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของอนินทรีย์ไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงกุ้ง (แอมโมเนีย ไนเตรท และไนเตรท) ของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าในการเพาะเลี้ยงกุ้ง	112
ตารางที่ 36 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ พีเอช ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำ และความเค็มของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง	113

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง

หน้า

ตารางที่ 37 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของอนินทรีย์ไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงกุ้ง (แอมโมเนียไนไตรท์ และไนเตรท) ของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำในการเพาะเลี้ยงกุ้ง	114
---	-----

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
ภาพที่ 1 กระบวนการไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันในวัฏจักรไนโตรเจน	4
ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนีย (A), ไนไตรท์ (B) และไนเตรท (C) ในถังอนุบาลลูกกุ้งขาว.....	11
ภาพที่ 3 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียกลุ่ม AOB ที่ได้จากการศึกษาด้วยยีน 16S rRNA จากน้ำเสียใน Gliwice ประเทศโปแลนด์.....	12
ภาพที่ 4 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียกลุ่ม AOB ที่ได้จากการศึกษาด้วยยีน <i>amoA</i> จากน้ำเสียใน Gliwice ประเทศโปแลนด์.....	13
ภาพที่ 5 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียกลุ่ม AOB ในไบโอฟิล์มจากตัวกรองในระบบการเพาะเลี้ยงปลา gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>)	14
ภาพที่ 6 การติดสีเรืองแสงของแบคทีเรีย AOB ในไบโอฟิล์มจากตัวกรองในระบบการเพาะเลี้ยงปลา gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>) ด้วยเทคนิค FISH.....	15
ภาพที่ 7 การติดสีเรืองแสงของไนตริไฟอิงแบคทีเรียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกร่อยโดยใช้ probes ต่าง ๆ.....	17
ภาพที่ 8 ปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการทดลอง	18
ภาพที่ 9 โครงสร้างของประชาคมแบคทีเรียโดยใช้ยีน 16S rRNA, <i>amoA</i> และ <i>nrxA</i>	19
ภาพที่ 10 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท	20
ภาพที่ 11 ลักษณะโครงสร้างของจุลินทรีย์ของทั้ง 2 ระบบด้วยเทคนิค Illumina Sequencing ในระดับไฟล์และระดับสกุลของระบบบำบัดน้ำเสีย SBR ₂ และ SBR ₃	20
ภาพที่ 12 ปริมาณของแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท ในถังกรองชีวภาพ	22
ภาพที่ 13 ความสัมพันธ์ของพลวัตแบคทีเรีย (เปอร์เซ็นต์) ในตัวกรองชีวภาพ	23
ภาพที่ 14 ลักษณะเซลล์ของ <i>Halomonas</i> sp. SKNB4.....	24
ภาพที่ 15 Phylogenetic tree ของ <i>Halomonas</i> sp. SKNB4	24
ภาพที่ 16 ประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์.....	25
ภาพที่ 17 รูปร่างเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SF-1 (ซ้าย) และ SF-5 (ขวา).....	26
ภาพที่ 18 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SF-1 และ SF-5.....	26
ภาพที่ 19 รูปร่างเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ Ba9	27
ภาพที่ 20 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ Ba9	27
ภาพที่ 21 เชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียหลังจากละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	33
ภาพที่ 22 การสเปรย์เพื่อผสมกล้าเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียกับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร (รำข้าว).....	34

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า
ภาพที่ 23 การเตรียมกล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียสูตรน้ำ.....	35
ภาพที่ 24 การบ่มกล้าเชื้อ ปม.1 และกล้าเชื้อกล้าเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียสูตรผง ด้วยอาหารกึ่งและกากน้ำตาล.....	36
ภาพที่ 25 จุดเก็บตัวอย่างน้ำจำนวน 5 จุด (R1-R5) ณ ดำรงศักดิ์ฟาร์ม อ.สิงหนคร จ.สงขลา	38
ภาพที่ 26 ลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาของเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์.....	41
ภาพที่ 27 แผนภูมิวิวัฒนาการของเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยศึกษา จากยีน 16S rRNA (Bar=0.05).....	41
ภาพที่ 28 ความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนของเชื้อเดี่ยว เหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์	44
ภาพที่ 29 ความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนของเชื้อผสมเหทอโรโทรฟิค ไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์	45
ภาพที่ 30 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิง แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์	47
ภาพที่ 31 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิง แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์	49
ภาพที่ 32 สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนีย ของเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์	52
ภาพที่ 33 การทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนของสัดส่วน เชื้อผสมสายพันธุ์ <i>B. oceanisediminis</i> Ba9 ต่อ <i>B. vietnamensis</i> SF-1	53
ภาพที่ 34 ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อสูตรผงโดยใช้สตุยิดเกาะจากเศษเหลือทางการเกษตร	55
ภาพที่ 35 ความมีชีวิตชีวาของการเก็บรักษาในระยะเวลา 6 เดือน ของกล้าเชื้อสูตรผงที่มี รำข้าวเป็นสารพา	56
ภาพที่ 36 ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็ม สูตรผงและสูตรน้ำในการบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งในท้องปฏิบัติการ	59
ภาพที่ 37 คุณภาพน้ำบางประการในบ่อเลี้ยงกุ้ง ณ ดำรงศักดิ์ฟาร์ม อ.สิงหนคร จ.สงขลา	63
ภาพที่ 38 ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ไนโตรเจนในการเลี้ยงกุ้ง ณ ดำรงศักดิ์ฟาร์ม อ.สิงหนคร จ.สงขลา	64
ภาพที่ 39 โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียระดับไฟลัม	69
ภาพที่ 40 โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียระดับสกุลในไฟลัม Firmicutes	69
ภาพที่ 41 ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ไนโตรเจนในการเลี้ยงกุ้ง ณ ดำรงศักดิ์ฟาร์ม อ.สิงหนคร จ. สงขลา.....	115

บทที่ 1

บทนำ

อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งทะเลเป็นอุตสาหกรรมทางการเกษตรที่สร้างรายได้ให้กับประเทศไทยปีละกว่า 6 หมื่นล้านบาท (กรมประมง, 2565) แต่อุตสาหกรรมนี้ยังขาดเสถียรภาพในด้านการผลิต เพราะมีการตายของกุ้งเป็นจำนวนมาก ทำให้ประเทศไทยสูญเสียความเป็นผู้นำของประเทศผู้ส่งออกกุ้งทะเล สาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้กุ้งทะเลตาย และผลผลิตลดลงอย่างมากคือ การระบาดของและการแพร่กระจายของเชื้อโรคในกุ้ง สาเหตุประการหนึ่งมาจากการเปลี่ยนถ่ายน้ำระหว่างบ่อเลี้ยงกุ้งกับสิ่งแวดล้อม ฉะนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงความเสี่ยงของการติดโรคในกุ้ง เกษตรกรจึงหันมาเลี้ยงกุ้งในระบบปิดที่ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำหรือเปลี่ยนถ่ายน้ำเล็กน้อย แต่ปัญหาที่ตามมาของการเลี้ยงกุ้งระบบปิด คือ การสะสมของของเสียภายในบ่อกุ้ง โดยเฉพาะสารกลุ่มอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท ที่เป็นพิษต่อกุ้ง ทำให้กุ้งเครียด อ่อนแอ ติดโรค และตายในที่สุด (Tookwinas, 1996) ดังนั้นการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในระบบการเลี้ยงกุ้งจึงมีความสำคัญมาก โดยในแหล่งน้ำตามธรรมชาติพบว่ามีเฮเทอโรโทรฟิเคไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (heterotrophic nitrifying bacteria) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนผ่านกระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) ที่เปลี่ยนแอมโมเนียซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงต่อกุ้งให้กลายเป็นไนไตรท์ และเปลี่ยนไนไตรท์ให้กลายเป็นไนเตรทซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่ำ (เกียร และคณะ, 2551) และเนื่องจากการเลี้ยงกุ้งทะเลต้องอาศัยน้ำที่มีความเค็มประมาณ 10-25 ส่วนในพันส่วน (ppt) ดังนั้นคุณสมบัติสำคัญที่ต้องการอีกประการหนึ่งของเฮเทอโรโทรฟิเคไนตริไฟอิงแบคทีเรียในการนำมาประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลก็คือ ความสามารถในการทนเค็ม ฉะนั้นการคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิเคไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนเค็มและมีประสิทธิภาพดีในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจน และการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อที่เหมาะสม มีประสิทธิภาพสูง สะดวกและง่ายต่อการขนส่ง จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจและเป็นการตอบสนองความต้องการของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง ซึ่งจะช่วยรักษาสภาพแวดล้อมในบ่อเลี้ยงกุ้งให้สะอาดและสมดุล ทำให้กุ้งมีสุขภาพดี แข็งแรง ลดความเสี่ยงการติดเชื้อและการเกิดโรคระบาด ลดการใช้จ่ายปุ๋ยชีวและสารเคมี รักษาระดับหรือเพิ่มผลผลิตกุ้งทะเลในภาพรวมของประเทศ เพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันกับต่างประเทศ นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื่อดังกล่าวยังเป็นที่สนใจของผู้ประกอบการที่จะพัฒนาต่อยอดผลิตภัณฑ์เพื่อจำหน่ายในเชิงการค้าอีกด้วย ทั้งนี้ได้มีคัดแยกและได้สายพันธุ์เชื้อเฮเทอโรโทรฟิเคไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนเค็มและมีประสิทธิภาพดีในการบำบัดแอมโมเนียมาแล้ว (สุนิภา, 2560; Noorak *et al.*, 2018; Chankaew and Sangnoi, 2023) แต่ยังคงขาดการศึกษาที่นำมาใช้จริงในรูปแบบผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ และการนำไปทดลองใช้จริงในบ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งการนำกล้าเชื้อไปใช้จริงนั้นวิธีการหนึ่งคือการผลิตกล้าเชื้อให้อยู่ในรูปแบบผงที่ช่วยเก็บรักษาเชื้อ เหมาะต่อการนำไปใช้ และสะดวกต่อการขนส่ง โดยวัสดุที่นำมาใช้เป็นสารพาสำหรับให้กล้าเชื้อเกาะยึดนั้นมีหลายชนิด แต่ที่น่าสนใจคือ วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร เช่น รำข้าว ปลายข้าว ขุยมะพร้าว และกากกาแฟ เป็นต้น การนำวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรมาใช้เป็นสารพาในการผลิตกล้าเชื้อแบบผงนั้น

นอกจากจะช่วยรักษาสภาพกล้าเชื้อและเหมาะแก่การพัฒนาเพื่อผลิตในเชิงการค้าแล้ว ยังเป็นการลดภาระการกำจัดขยะและช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรอีกด้วย การคัดแยกเชื้อเห็ดเหอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียจากธรรมชาติ และการพัฒนาผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อแบบผงโดยใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร สำหรับนำมาใช้บำบัดน้ำในการเลี้ยงกุ้งนั้น สอดคล้องกับการพัฒนาประเทศด้วยการใช้โมเดลทางเศรษฐกิจใหม่ที่เรียกว่า “BCG” ซึ่งเป็นการพัฒนา 3 เศรษฐกิจ คือ เศรษฐกิจชีวภาพ (Bioeconomy) เศรษฐกิจหมุนเวียน (Circular Economy) และเศรษฐกิจสีเขียว (Green Economy (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2563)

ดังนั้น งานวิทยานิพนธ์นี้จึงมุ่งหวังสร้างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเห็ดเหอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มที่แยกจากธรรมชาติ โดยการนำวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรมาใช้เป็นวัสดุในการยัดเกาะสำหรับการทำผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อสูตรผง เพื่อนำไปใช้ทดสอบกับการเลี้ยงกุ้งจริงในบ่อเลี้ยงกุ้ง พร้อมทั้งศึกษาปัจจัย สภาวะที่เหมาะสม รูปแบบ สูตรการผลิต และบทบาทของกล้าเชื้อ เพื่อปรับปรุงและพัฒนาผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อให้มีความเหมาะสมสำหรับการใช้งานจริงให้มากที่สุด และเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. พัฒนาผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเห็ดเหอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียแบบผงจากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร
2. ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเห็ดเหอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่ผลิตขึ้นในระบบการเลี้ยงกุ้ง
3. ศึกษาโครงสร้างประชาคมเห็ดเหอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียขณะทดลองใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ

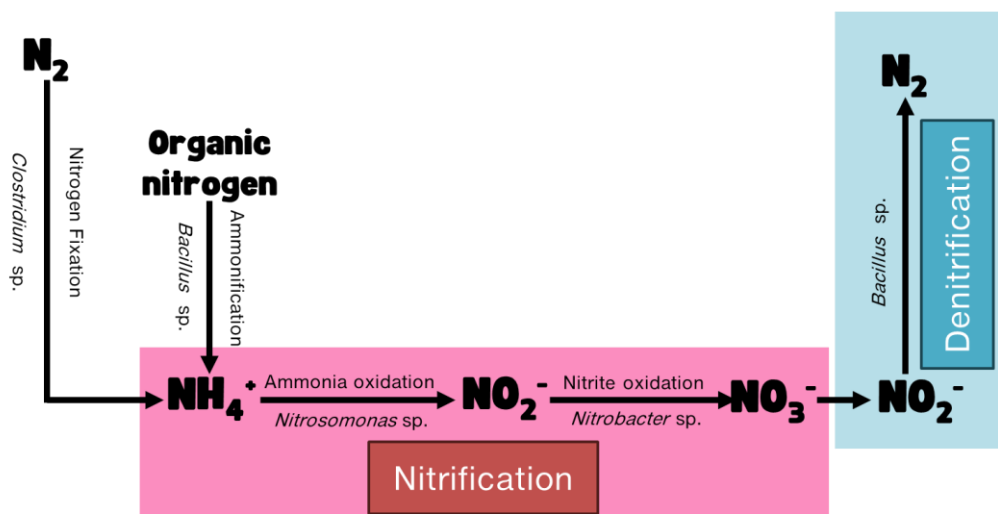
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเห็ดเหอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียแบบผงจากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรมีประสิทธิภาพในการบำบัดสารอินทรีย์ไนโตรเจน
2. เข้าใจบทบาทความสัมพันธ์โครงสร้างประชาคมเห็ดเหอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียกับการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำ เพื่อนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเห็ดเหอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียแบบผงจากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร ให้มีความเหมาะสมกับการบำบัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งมากขึ้น

บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กุ้งทะเลนับว่าเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เป็นสัตว์น้ำที่นิยมบริโภคทั้งในและต่างประเทศ โดยในปี พ.ศ. 2565 ประเทศไทยสามารถผลิตกุ้งได้ปริมาณ 415,696 ตัน แบ่งออกเป็นกุ้งทะเลที่ได้จากฟาร์มเลี้ยง 389,612 ตัน กุ้งจับจากธรรมชาติ 26,084 ตัน คิดเป็น 93.73 และ 6.27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ คิดเป็นมูลค่าการส่งออกรวม 63,332 ล้านบาท โดยกุ้งทะเลที่เกษตรกรนิยมเพาะเลี้ยงมากที่สุดในปัจจุบัน คือ กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ปริมาณ 369,323 ตัน คิดเป็น 94.78 เปอร์เซ็นต์ มูลค่า 58,760 ล้านบาท รองลงมา คือ กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ปริมาณ 19,913 ตัน คิดเป็น 5.11 เปอร์เซ็นต์ มูลค่า 4,517 ล้านบาท นอกจากนี้ยังมีสัตว์น้ำประเภทยื่น ๆ ที่เป็นผลพลอยได้จากธรรมชาติ ซึ่งเป็นสัตว์จำพวกปลาที่จับได้จากฟาร์มเลี้ยงแบบกึ่งพัฒนา จำนวน 44 ตัน หรือร้อยละ 0.01 ของผลผลิตสัตว์น้ำรวมทั้งหมด ในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลส่วนใหญ่ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งพัฒนา (semi-intensive) และแบบพัฒนา (intensive) (กรมประมง, 2566) เพื่อให้ได้ผลตอบแทนต่อหน่วยลงทุนสูงสุด ในช่วงปลายปี พ.ศ. 2555 ผลผลิตกุ้งทะเลของประเทศไทยประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคระบาดและคุณภาพน้ำ โดยการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมประสบปัญหาโรคตับวายเฉียบพลัน (Early Mortality Syndrome: EMS) ทำให้ผลผลิตกุ้งลดลงเป็นจำนวนมาก หลังจากเกิดวิกฤตการณ์โรคระบาดและคุณภาพน้ำในแหล่งเลี้ยงเสื่อมโทรม รวมไปถึงเพื่อลดความเสี่ยงในการนำเข้ามาซึ่งโรคระบาดจากแหล่งน้ำภายนอก และป้องกันไม่ให้เชื้อโรคและน้ำเสียจากแหล่งเลี้ยงปนเปื้อนไปสู่ภายนอก เกษตรกรจึงหันมาเลี้ยงกุ้งแบบระบบปิด (closed system) หรือระบบกึ่งปิด (semi-closed system) ที่ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำเลยหรือเปลี่ยนถ่ายน้ำเพียงเล็กน้อยตลอดการเลี้ยง แต่การเลี้ยงกุ้งในระบบปิดก็นำมาซึ่งการสะสมของของเสียจากอาหารที่กุ้งกินไม่หมด และจากการขับถ่ายของกุ้งเอง โดยของเสียเหล่านั้นอยู่ในรูปสารอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เป็นพิษต่อกุ้ง ทำให้กุ้งเครียด อ่อนแอ กินอาหารลดลง ไม่ลอกคราบ ภูมิคุ้มกันต่ำ เสี่ยงต่อการติดโรค และตายในที่สุด (Achuthan *et al.*, 2006) ซึ่งสารอนินทรีย์ไนโตรเจนดังกล่าว ได้แก่ แอมโมเนีย (ammonia: NH_3) ไนไตรท์ (nitrite: NO_2^-) และไนเตรท (nitrate: NO_3^-) อย่างไรก็ตาม ในแหล่งน้ำธรรมชาติจะมีกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ไนโตรเจนให้อยู่ในรูปของสารอนินทรีย์ไนโตรเจน ซึ่งในขั้นสุดท้ายจะเปลี่ยนไปเป็นสารที่มีพิษน้อยที่สุด หรือไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมนั้น ต้องอาศัยกระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification) ซึ่งเกิดขึ้นในสภาวะมีออกซิเจน แต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ไนเตรทจะถูกรีดิวซ์เป็นแก๊สไนโตรเจน (N_2) โดยกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification) (ภาพที่ 1) (ดวงพร, 2545; Hargreaves, 1998; Linda, 2020)



ภาพที่ 1 กระบวนการไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันในวัฏจักรไนโตรเจน

กระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification) เป็นกระบวนการออกซิไดซ์สารอนินทรีย์ไนโตรเจน ซึ่งเป็นกระบวนการทางชีวภาพ กระบวนการไนตริฟิเคชันแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนย่อย และมีกลุ่มแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง 2 กลุ่ม เรียกรวมว่า ไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Nitrifying bacteria)

ขั้นตอนที่ 1 คือกระบวนการไนไตรเตชัน (Nitrification) หรือไนไตรติฟิเคชัน (Nitrification) เป็นขั้นตอนการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้กลายเป็นไนไตรท์ โดยมีแบคทีเรียในกลุ่ม ammonium oxidizing bacteria (AOB) ทำหน้าที่เปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนไตรท์ แบคทีเรียกลุ่มนี้อยู่ในจีนัส *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*, *Nitrosovibrio* และ *Nitrosogloea* เป็นต้น

ขั้นตอนที่ 2 คือ กระบวนการไนเตรเตชัน (Nitrification) หรือไนเตรติฟิเคชัน (Nitrification) เป็นขั้นตอนในการเปลี่ยนไนไตรท์ให้เป็นไนเตรท โดยมีแบคทีเรียในกลุ่ม nitrite oxidizing bacteria (NOB) ทำหน้าที่เปลี่ยนไนไตรท์ให้เป็นไนเตรท ซึ่งประกอบไปด้วยแบคทีเรียในจีนัส *Nitrobacter*, *Nitrospira* และ *Nitrococcus* เป็นต้น (ธงชัย, 2544; Bitton, 1994)

ไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มที่กล่าวมาข้างต้นเป็นแบคทีเรียกลุ่มออโตโทรฟ (autotroph) ที่ใช้สารอนินทรีย์เป็นอาหาร เจริญเติบโตช้า และมีความสามารถในการแข่งขันต่ำเมื่อเทียบกับแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรฟ (heterotroph) ฉะนั้นจึงมีความพยายามในการคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรฟ (heterotroph) ที่มีความสามารถในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนได้ดีเหมือนแบคทีเรียกลุ่มออโตโทรฟ แต่มีคุณสมบัติในการใช้สารอินทรีย์ได้ดี เรียกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติแบบนี้ว่า เฮเทอโรโทรฟิไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (heterotrophic nitrifying bacteria) ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้สารอินทรีย์คาร์บอน ทำให้เจริญเติบโตดี ใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตสั้น มีความสามารถในการแข่งขันสูง และทนต่อระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียสูง

เช่น *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Halomonas* และ *Pseudomonas* เป็นต้น (Joo *et al.*, 2005; Wen and Wei, 2011; Yang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2013; Sangnoi *et al.*, 2017; Chankaew *et al.*, 2018; Noorak *et al.*, 2018; Phatthongkleang *et al.*, 2019; Chankaew and Sangnoi, 2023)

1. การคัดแยกเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียและประสิทธิภาพการบำบัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนของไนตริไฟอิงแบคทีเรีย

มีรายงานการศึกษาการคัดแยกและการนำไนตริไฟอิงแบคทีเรียมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนแอมโมเนีย โดย Koops *et al.* (1991) ได้รายงานการคัดแยกเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียกลุ่ม ammonia oxidizing bacteria (AOB) จำนวน 8 สายพันธุ์ คือ *Nitrosomonas communis*, *N. ureae*, *N. aestuarii*, *N. marina*, *N. nitrosa*, *N. eutropha*, *N. oligotropha* และ *N. halophila* จากตัวอย่างที่เก็บจากบึง น้ำจืด น้ำกร่อยและทะเล โดยนำตัวอย่างมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวสูตร basal mineral salts medium และมีการเติมเกลือลงในอาหารปริมาณ 11.7 กรัมต่อลิตร และ 23.4 กรัมต่อลิตร สำหรับตัวอย่างน้ำกร่อยและทะเลตามลำดับ โดย *N. eutropha* มีความสามารถในการทนแอมโมเนียสูงสุดที่ 600 มิลลิโมลาร์ ขณะที่ *N. oligotropha* สามารถทนแอมโมเนียได้ต่ำที่สุดที่ 50 มิลลิโมลาร์

นอกจากนี้ยังมีการแยกไนตริไฟอิงแบคทีเรียชนิด *Nitrobacter alkalicus* จากตัวอย่างดินตะกอนในทะเลสาบ โดยเลี้ยงตัวอย่างแบบ batch culture ในอาหารเหลวสูตร sodium bicarbonate based mineral medium ซึ่งนับว่าเป็นสูตรอาหารที่มีความจำเพาะสูงหนึ่งในการคัดเลือกกลุ่มไนตริไฟอิงแบคทีเรียและยังถือว่าเป็นไนตริไฟอิงแบคทีเรียชนิดใหม่ในเวลานั้น (Sorokin *et al.*, 1998)

อย่างไรก็ตาม ไนตริไฟอิงแบคทีเรียซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มออโตโทรฟ มีข้อจำกัดในเรื่องของการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างช้า ใช้ระยะเวลานาน มีความสามารถในการแข่งขันต่ำ และไม่ทนต่อสภาวะที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูง ดังนั้นนักวิจัยจึงหันมาสนใจเชื้อกลุ่มเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้เช่นกัน และยังสามารถใช้สารอินทรีย์ จึงทำให้มีการเจริญเติบโตที่ดี ใช้ระยะเวลาน้อย และมีความสามารถในการแข่งขันสูง และยังพบว่าสามารถทนต่อสภาวะที่แอมโมเนียสูงได้ดีกว่าเชื้อกลุ่มออโตโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (autotrophic nitrifying bacteria) (เกยูร และคณะ, 2551)

โดย Yang *et al.* (2011) ได้แยกเชื้อ heterotrophic nitrifying-denitrifying bacteria จาก activated sludge ในบ่อบำบัดน้ำเสียของเทศบาล จากผลการคัดแยกเชื้อดังกล่าว พบว่าสามารถแยกเชื้อ *Bacillus subtilis* strain A1 เมื่อนำมาศึกษาความสามารถในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนโดยมีแอมโมเนียเริ่มต้นที่ 104.12 ± 1.27 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า *B. subtilis* A1 สามารถกำจัดแอมโมเนียได้ 20.4 ± 2.7 เปอร์เซ็นต์ พบการเกิดไนไตรท์ 0.003 ± 0.001 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และไนเตรท 3.100 ± 0.085 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

เช่นเดียวกับ Lu *et al.* (2012) ที่สามารถแยกเชื้อ heterotrophic nitrifying bacteria จาก activated sludge ซึ่งสามารถแยกเชื้อ *Alcaligenes* sp. W1 และเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการกำจัดแอมโมเนีย พบว่าที่ระดับแอมโมเนีย 200 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร สามารถลดแอมโมเนียได้ 92.34 เปอร์เซ็นต์ และสามารถลดไนโตรเจนรวม (Total Nitrogen) ได้ 81.41 เปอร์เซ็นต์

Zhang *et al.* (2012) ได้รายงานหาเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus methylotrophicus* สายพันธุ์ L7 มีบทบาททั้งในกระบวนการไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันในสภาวะที่มีอากาศ ซึ่งมีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียและไนโตรที่ได้อัตราวันละ 51.58 และ 5.81 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ Chen *et al.* (2012) รายงานหาเชื้อแบคทีเรีย *Rhodococcus* sp. CPZ24 มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้ 86 เปอร์เซ็นต์ เกิดผลิตภัณฑ์ของไนตริฟิเคชัน (ไนไตรท์และไนเตรท) 13.4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถผลิตแก๊สไนโตรเจน (N_2 , N_2O , NO_2 และ NO) 48.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และนำไนโตรเจนไปสร้างเซลล์ 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในเวลา 25 ชั่วโมง Guo *et al.* (2013) ได้รายงานประสิทธิภาพของ *Halomonas campisalis* ha3 ในน้ำเสียที่มีความเค็ม โดยสามารถลดแอมโมเนียได้ 71 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมง (แอมโมเนียเริ่มต้น 140 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ลดไนไตรท์และไนเตรทได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 12 และ 8 ชั่วโมงตามลำดับ รวมถึงเกิดอัตราดีไนตริฟิเคชันที่มีอากาศ 87.5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง

ต่อมาเมื่อนักวิจัยสนใจศึกษาเชื้อแบคทีเรียไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนเค็ม เพราะต้องการนำมาใช้ประโยชน์ในการบำบัดน้ำเสียที่มีเกลือ เช่น ในฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเค็มหรือน้ำกร่อย เป็นต้น ซึ่งมีการศึกษาทั้งการคัดแยกเชื้อ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำระหว่างเชื้อผสมกับเชื้อเดี่ยวด้วย เป็นต้น

โดย Achuthan *et al.* (2006) ได้รายงานการพัฒนากล้าเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียผสม เพื่อใช้ในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนในบ่อเพาะฟักลูกกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) โดยกล้าเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียผสมที่ใช้ในการทดลองนั้น ได้คัดแยกมาจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำและกุ้งก้ามกรามบริเวณชายฝั่ง ซึ่งสามารถคัดแยกเชื้อได้จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ AOB 2 สายพันธุ์ (AMOPCU-1 และ AMONPCU-1) และ NOB 2 สายพันธุ์ (NIOPCU-1 และ NIONPCU-1) และเมื่อทดลองใช้กล้าเชื้อผสมดังกล่าวในรูปแบบ Packed Bed Bioreactor ในบ่อเพาะฟักลูกกุ้ง ปรากฏว่ากล้าเชื้อผสมดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 4 ชั่วโมง และ Osaka *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อประสิทธิภาพในการกำจัดไนเตรทของเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรีย โดยทำการทดลองในสภาวะที่มีความเค็มแตกต่างกัน พบว่า อะซิเตท (acetate) เป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ประสิทธิภาพในการกำจัดไนเตรทได้ดีที่ความเข้มข้นของเกลือ 0-10 เปอร์เซ็นต์ (NaCl) ขณะที่เมทานอล (methanol) ให้ประสิทธิภาพในการกำจัดไนเตรทได้ดีที่ความเข้มข้นของ

เกลือ 0-3 เปอร์เซ็นต์ (NaCl) และพบว่าเมื่อความเข้มข้นของเกลือมากกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ ชุดการทดลองที่เติมเมทานอล ไม่สามารถกำจัดไนเตรทได้

Rajakumar *et al.* (2008) ศึกษาประสิทธิภาพของ *Pseudomonas* sp. KW1 และ *Bacillus* sp. YW4 ในการกำจัดไนเตรท โดยพบว่าแหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดไนเตรท โดยที่ *Pseudomonas* sp. KW1 และ *Bacillus* sp. YW4 ลดปริมาณไนเตรทได้สูงสุด 99.4 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 7 ในเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งมีแป้ง (Starch) ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมในอาหารที่มีไนเตรทสังเคราะห์เป็นแหล่งคาร์บอน

Liang *et al.* (2011) ได้รายงานการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ต่อประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบไนโตรเจนของดีไนตริไฟอิงแบคทีเรียชนิด *Paracoccus denitrificans* DL-23 ใน activated sludge ในน้ำเสีย โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร modified denitrification medium (DM), modified lysogeny broth medium (LB) และ nitrification inhibitor medium (NI) หลังจากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบไนโตรเจนดีที่สุด คือ ใช้ซัคซิเนท (succinate) เป็นแหล่งคาร์บอน สัดส่วน C/N ratio เท่ากับ 10 ความเร็วในการเขย่า 160 รอบต่อนาที และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้ Song *et al.* (2011) พบว่าความเค็มเป็นปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดไนโตรเจนของ *Bacillus* เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตสามารถลดไนโตรเจนจาก 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เป็น 0 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ภายใน 14 ชั่วโมง และพบว่าความเค็มส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน โดยความเค็มในช่วง 0-15 ppt แบคทีเรีย *Bacillus* sp. YX-6 สามารถเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเค็มเพิ่มขึ้น โดยที่ระดับความเค็มที่ 30 ppt ประสิทธิภาพของ *Bacillus* sp. YX-6 สามารถลดไนโตรเจนได้เหลือ 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านกลั่นกรองน้ำทั้งในน้ำทะเลและน้ำจืด

Seenivasagan *et al.* (2017) ศึกษาผลกระทบของแหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ และ pH ต่อประสิทธิภาพการลดไนเตรทของ *Bacillus weinstephnisis* (DS45) โดยการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างน้ำ และดินในบริเวณที่มีการปนเปื้อนไนเตรทพบว่า มีการลดของไนเตรทอย่างรวดเร็ว (83.05 เปอร์เซ็นต์) ที่ 35 องศาเซลเซียส pH 7 ในเวลา 48 ชั่วโมง

2. การพัฒนากล้าเชื้อ

มีรายงานการพัฒนาไนตริไฟอิงแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการบำบัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจน โดย Kumar *et al.* (2009) ได้ทดลองผลิตกล้าเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียผสม เพื่อใช้ในระบบบำบัดน้ำหมุนเวียนจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล โดยกล้าเชื้อที่ผลิตขึ้นนั้นประกอบไปด้วยไนตริไฟอิง

แบคทีเรียชนิด *Nitrosomonas* จำนวน 2 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล คือ สายพันธุ์ AMONPCU-1 และ AMOPCU-1 ซึ่งเชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้ถูกเลี้ยงในอาหารที่เตรียมจากน้ำทะเล (15 หรือ 30 ส่วนในพันส่วน) และมีองค์ประกอบอื่น เช่น $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงในอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 28 องศาเซลเซียส และค่า pH 8.5 การผลิตกล้าเชื้อทำได้โดยการปั่นเหวี่ยงเชื้อที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างตะกอนเชื้อด้วยน้ำทะเลและตรึง (fix) เชื้อเอาไว้ใน 2.5 เปอร์เซ็นต์ glutaraldehyde ซึ่งเตรียมในน้ำทะเลที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นตรึงอีกครั้งใน 2 เปอร์เซ็นต์ osmium tetroxide ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำทะเล จากนั้นกำจัดน้ำออกโดยการล้างด้วย acetone ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 70–100 เปอร์เซ็นต์ แล้วใส่ resin ลงไป เพื่อให้เชื้อเกาะอยู่ที่ resin และเมื่อทดลองนำกล้าเชื้อดังกล่าวไปใช้ในถังหมักขนาด 200 ลิตร ที่จำลองระบบการหมุนเวียนน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง พบว่าปริมาณแอมโมเนียถูกกำจัดไป 1.948 และ 1.242 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 160 และ 270 ตามลำดับ

Dhanasiri *et al.* (2011) ได้ศึกษาการใช้กลุ่มเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (nitrifying bacterial consortia) ในการกำจัดแอมโมเนียในตู้ชนส่งปลาหมอ (zebrafish) โดยได้เปรียบเทียบกลุ่มเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้งกลุ่ม AOB และ NOB จำนวนสองชุด ชุดแรก คือ Nbc 1 ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อเหลวที่ประกอบด้วย *Nitrosomonas marina* เป็นเชื้อ AOB และ *Nitrobacter winogradskyi* กับ *N. alcalicus* เป็นเชื้อ NOB ส่วนชุดที่สอง คือ Nbc 2 ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อผงที่ประกอบด้วย *Nitrosomonas eutropha* เป็นเชื้อ AOB และ *Nitrobacter winogradskyi* เป็นเชื้อ NOB จากการทดลองพบว่า การใช้กลุ่มเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียโดยเฉพาะกลุ่มเชื้อชุด Nbc 1 มีประสิทธิภาพในการลดแอมโมเนียในตู้ชนย้ายปลาหมอได้ดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมกลุ่มเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรีย เพราะในกลุ่มเชื้อดังกล่าวมีองค์ประกอบทั้งเชื้อ AOB และ NOB ซึ่งทำให้กระบวนการไนตริฟิเคชันเกิดได้อย่างสมบูรณ์ และสอดคล้องกับการศึกษา DGGE profile ของกลุ่มเชื้อดังกล่าวที่พบว่า มีแถบ DNA ของเชื้อกลุ่มไนตริไฟอิงแบคทีเรียปรากฏอยู่ในชุดการทดลองที่เติมกลุ่มเชื้อทั้ง 2 ชุด (Nbc 1 และ Nbc 2) ขณะที่ไม่มีแถบ DNA ของเชื้อกลุ่มไนตริไฟอิงแบคทีเรียของชุดควบคุม (Control) ที่ไม่มีการเติมกลุ่มเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรีย

มีนักวิจัยที่ได้พัฒนากล้าเชื้อสูตรสำหรับการเกษตรและศึกษาปริมาณเซลล์คงเหลือ โดย วราภรณ์และสุดฤดี (2553) ได้รายงานการใส่เชื้อสายพันธุ์ XA6 ที่ผสมในส่วนประกอบด้วยทาลคัม แคลเซียม สาร carboxymethyl cellulose (CMC) และน้ำสกัดมันฝรั่งในอัตราส่วน 60, 30, 8 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการคงปริมาณเซลล์เชื้อที่มีชีวิตได้ดีที่สุด 1.63×10^{10} CFU/มิลลิลิตร เมื่อเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิห้อง (28–32 องศาเซลเซียส) นาน 6 เดือน ต่อมาจิตมนัส (2559) ได้ทำการพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* จากการทดลองพบว่า อาหารที่เหมาะสมกับเชื้อ คือ อาหารสูตร molasses ผสม diammonium phosphate และ yeast extract (MDY) มีปริมาณเชื้อเพิ่มสูงที่สุดเท่ากับ $1.30 \pm 0.16 \times 10^9$ CFU/มิลลิลิตร และได้นำไปพ่นฝอย (spray dry) โดยใช้แป้งมันสำปะหลังและสาร CMC ผสมในอัตราส่วน 10:1 และประเมินความมีชีวิตรอดของแบคทีเรีย *B. subtilis* เป็นเวลา 6 เดือน ด้วยวิธี Total plate count พบว่า มีปริมาณ

เชื้อที่อยูรอดตั้งแต่เดือนที่ 0 ถึงเดือนที่ 2 เท่ากับ 2.14×10^8 , 1.12×10^8 และ 1.08×10^8 CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในเดือนที่ 3-6 พบว่ามีปริมาณเชื้อลดลงเหลือ 9.6×10^7 , 1.04×10^7 , 9.6×10^7 และ 1.19×10^6 CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ทั้งนี้สารพา (carrier) เป็นสารสำคัญเพื่อช่วยป้องกันเซลล์จากการทำแห้ง รวมถึงช่วยให้รอดชีวิตมากขึ้นและช่วยรักษาเซลล์ในระหว่างการเก็บรักษา สารพาที่เป็นกลุ่มสารอินทรีย์ ได้แก่ น้ำมันพืช ขี้เลื่อย รำข้าวสาลี แป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งอาหารที่ดีของจุลินทรีย์ (จิตมนัส, 2559) จากการทดลองของ Fravel *et al.* (1995) พบว่าสารพาอินทรีย์ เช่น ชังข้าวโพด กากถั่วเหลือง รำข้าวสาลี มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกัน เท่ากับ 96.6, 25.4 และ 21.1 ตามลำดับ ซึ่งมีผลต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อหลังการทำแห้ง และพบว่าในการผลิตสูตรสำเร็จของเชื้อ *Talaromyces flavus* เมื่อใช้ชังข้าวโพดเป็นสารพามีปริมาณเชื้อรอดชีวิตสูงกว่าเมื่อใช้กากถั่วเหลืองหรือรำข้าวสาลี

สารพาซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรนั้นเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เพราะนอกจากจะช่วยเก็บรักษาเซลล์ของจุลินทรีย์แล้วยังช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรได้อีกด้วย ลักษณะและคุณสมบัติของสารพาที่เป็นวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรที่น่าสนใจมีดังนี้ แกลบ (Husk) เป็นผลผลิตที่ได้จากการสีข้าวเป็นเปลือกของข้าวสาร เป็นส่วนที่เหลือใช้ จากการผลิตข้าวสาร โดยแกลบมาจากการบวกรวมการผลิตข้าว เมื่อได้ข้าวเปลือกมาจะต้องสีข้าว เพื่อเอาเปลือกข้าวออกให้เหลือเฉพาะเม็ดข้าวหรือข้าวสาร โดยสิ่งที่เหลือทิ้งจากการสีข้าว นั่นคือ เปลือกของเม็ดข้าว หรือเรียกว่าแกลบ (สุทัศน์ จันทรบัวลา, 2558) ซึ่งทำหน้าที่ห่อหุ้มเมล็ดข้าวอยู่ภายนอก ได้มาจากการสีข้าว เมล็ดมีลักษณะเป็นรูปทรงรี เมล็ดยาวสีเหลืองอมน้ำตาลเหลืองนวล เมื่อนำแกลบมาส่องกล้องจุลทรรศน์จะมีลักษณะผิวเป็นร่องเรียงกัน ผิวแกลบมีความพรุนมาก องค์ประกอบทางเคมีของแกลบ พบ ความชื้น 7.6-10.2% โปรตีน 1.9-3.7% ไขมัน 0.3-0.8% เส้นใย 35.0-46.0% คาร์โบไฮเดรต 26.5-29.8% เถ้า 13.2-21.0% ซิลิกา 18.8-22.3% (สัจจะชาญ พรีตมะลิ และคณะ, 2552)

กากกาแฟ (Coffee Grounds) เป็นของเหลือทิ้งจากการบวกรวมการการสกัดน้ำกาแฟ โดยจากปริมาณการบริโภคกาแฟในประเทศไทย มีกากกาแฟเหลือทิ้งเป็นจำนวนมากกว่า 290,000 ตัน/ปี กากกาแฟมีส่วนประกอบหลากหลายชนิด เช่น น้ำมัน เส้นใย และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะสารต้านอนุมูลอิสระ (ณัฐพงศ์, 2562) นอกจากนี้กากกาแฟมีปริมาณธาตุอาหารสูงโดยเฉพาะไนโตรเจน ซึ่งพบว่ามีปริมาณสูงถึง 1.2 - 2.4 เปอร์เซ็นต์ และยังมีธาตุอาหารที่จำเป็นชนิดอื่น ๆ เช่น ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม เหล็ก แมกนีเซียม แคลเซียม สังกะสี เป็นต้น เนื่องจากกากกาแฟมีปริมาณคาเฟอีน (caffeine) หลงเหลืออยู่ปริมาณมาก (ประมาณ 0.24 เปอร์เซ็นต์) รวมทั้งมีสารแทนนิน (tannin) และสารประกอบฟีนอลิก อื่นๆ (phenolic compounds) ซึ่งเป็นพิษต่อพืชและจุลินทรีย์ (Ronga *et al.*, 2016; Ciesielczuk *et al.*, 2018)

กากถั่วเหลือง เป็นอาหารที่เป็นแหล่งโปรตีนที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ได้ดี กากถั่วเหลืองมีโปรตีน 44% ความชื้น 10 % ไขมัน 1% เยื่อใย 7.0% เถ้า 6.0% แคลเซียม 0.25% ฟอสฟอรัสใช้ประโยชน์ได้ 0.20% วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ กรดไขมันส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันไม่

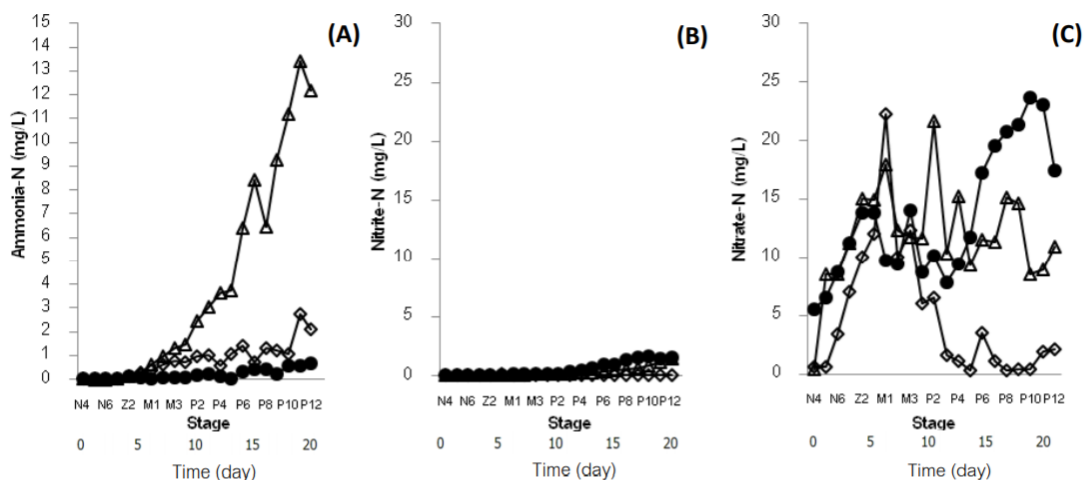
อัมตัวเชิงเดี่ยวหรือไม่อัมตัวเชิงซ้อน มีฟอสฟอรัสสูง แต่มีแคลเซียมและวิตามินบีต่ำ (อัญชลี และ กัญญ์วรา, 2565; Banaszkievicz, 2011)

ขุยมะพร้าวเป็นผลพลอยได้จากการผลิตเส้นใยมะพร้าว คุณสมบัติของขุยมะพร้าวสามารถใช้แทนดินได้ เนื่องจากน้ำได้ดี มีน้ำหนักเบา มีปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่ำ แต่มีปริมาณโปแตสเซียมสูงอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) เท่ากับ 75/186 โดยพบว่าคาร์บอนส่วนใหญ่มาจากลิกนิน (lignin) และเซลลูโลส (cellulose) (สุชาติ และคณะ, 2526)

รำข้าว (rice bran) เป็นผลผลิตพลอยได้จากการกระบวนการสีข้าว โดยได้จากการขัดส่วนที่เป็นเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวออก รำละเอียดนั้นนิยมใช้เป็นอาหารสัตว์มานานมาก ซึ่งจะใช้สำหรับเป็นอาหารหมูและไก่ อาจจะนำไปผสมกับพืชผักอย่างเช่น ต้นกล้วย ปลีกล้วยหรือเศษผักต่างๆ เพื่อใช้เป็นอาหารหมูหรือแม้กระทั่งสัตว์น้ำอย่างปลาก็ได้ โดยองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในรำข้าว ได้แก่ โดยมีโปรตีนประมาณ 12% ไขมันประมาณ 12-13% และเยื่อใยประมาณ 13% นอกจากนี้ยังมี แร่ธาตุ วิตามิน และเอนไซม์ (Luh และคณะ, 1991) ซึ่งคุณสมบัติทางเคมีของรำข้าวดังกล่าวนี้นั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์สถานะที่ใช้ในการเพาะปลูก กระบวนการขัดสี เป็นต้น (Barber และ Benedito de Barber, 1980)

นอกจากนี้การใช้สารเชื่อมหรือสารยึดเกาะ (binder) จะช่วยในการจับตัวของสารพา โดยจะเติมลงไปในระหว่างกระบวนการผลิต ทั้งยังมีสมบัติเป็นสารป้องกันเซลล์ โดยทั่วไปแล้วมีสมบัติละลายน้ำและความหนืดต่ำ สารเชื่อมที่นิยมใช้คือ แป้งแซนแทนกัม เจลลาติน กากน้ำตาล โซเดียมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) เป็นต้น (จิตมนัส, 2559)

นอกจากนี้มียางงานการใช้เชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่ตรึงไว้ด้วยตัวกลางและพบว่าให้ผลดีกว่าใช้เชื้อที่ไม่ได้ตรึงบนตัวกลาง โดยทำการตรึงไนตริไฟอิงแบคทีเรียบนวัสดุต่าง ๆ เช่น ชุมพล และคณะ (2557) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของไนตริไฟอิงแบคทีเรียน้ำเค็มที่ตรึงบนเม็ดโพลีเอสเตอร์ (Saline Nitrifier Polyester Tablet; SNPT) และติดตั้งร่วมกับระบบหมุนเวียนน้ำ เพื่อใช้ในการกำจัดแอมโมเนียและไนโตรที่ในบ่ออนุบาลลูกกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) โดยมีความหนาแน่น 150 ตัว/ลิตร ซึ่งศึกษาตั้งแต่ลูกกุ้งระยะไมซิส 2 จนถึงระยะโพสต์ลาร์วา 12 โดยที่ชุดควบคุมมี 2 ชุด คือ ชุดที่ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ และชุดที่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ พบว่าชุดการทดลองที่ใช้ SNPT มีปริมาณแอมโมเนียต่ำกว่าชุดควบคุมทั้ง 2 ชุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และยังมีประสิทธิภาพในการลดไนโตรที่ให้มีปริมาณใกล้เคียงกับชุดควบคุมทั้ง 2 ชุด ขณะที่ปริมาณของไนเตรทมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเทียบกับชุดควบคุมทั้ง 2 ชุด (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนีย (A), ไนไตรท์ (B) และไนเตรท (C) ในถังอนุบาลลูกกุ้งขาว (Δ ชุดควบคุมที่ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ ; ◊ ชุดควบคุมที่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ และ ● ชุดการทดลองที่มีการหมุนเวียนน้ำโดยใช้ SNPT)
ที่มา: ชุมพล และคณะ (2557)

3. การศึกษาประชาคมไนตริไฟอิงแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

ปัจจุบันเทคโนโลยีทางชีวภาพได้มีการพัฒนามากขึ้น การนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลโดยอาศัยข้อมูลจาก DNA และ RNA มาใช้ในการศึกษา โดยนํายีน 16S rRNA ซึ่งเป็นยีนที่มีการคงสภาพเดิมไม่มีการเปลี่ยนแปลง และมีการแพร่กระจายอยู่อย่างแพร่หลายภายในเซลล์ จึงนิยมใช้ข้อมูลจาก 16S rRNA มาใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการในกลุ่มโปรคาริโอต และนอกจากนี้ยังมีการนํายีน *amoA* ซึ่งพบในกลุ่มแบคทีเรีย AOB และยีน *norB* ในกลุ่ม NOB มาใช้ในการศึกษาไนตริไฟอิงแบคทีเรีย และใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) และ เทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) ร่วมในการศึกษาไนตริไฟอิงแบคทีเรียด้วย

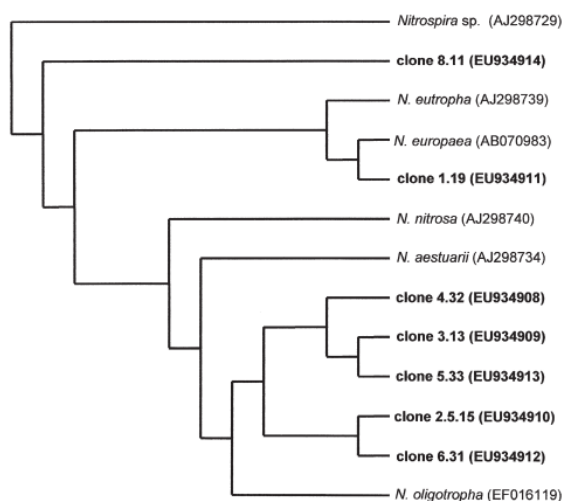
Ziembinska *et al.* (2009) ได้ศึกษากลุ่ม AOB จากน้ำเสียใน Gliwice ประเทศโปแลนด์ โดยใช้เทคนิค DGGE จากการศึกษาได้ใช้ primers จากตารางที่ 1 ซึ่งเป็นยีน 16S rRNA และ ยีน *amoA* ในการศึกษา

ตารางที่ 1 Primers ที่ใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียกลุ่ม AOB จากน้ำเสียใน Gliwice ประเทศโปแลนด์

Target gene	Primer	Sequence
Bacterial 16S rRNA	338F – GC	5'- CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCG GGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG -3'
	518r	5'- ATTACCGCGGCTGCTGG -3'
β -Proteobacterial AOB 16S rRNA	CTO189f-ABC-GC	5'- CCGACCCGCGGCGGGCGGGGCGGG GGCACGGGGGGACMAAAGYAGGGGATC -3'
	CTO 654r	5'- CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC -3'
<i>amoA</i>	Amo1-F-GC	5'- CGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGCG GGGTTTCTACTGGTGGT -3'
	Amo2R-TC	5'- CCCCTCTGCAAAGCCTTCTTC -3'

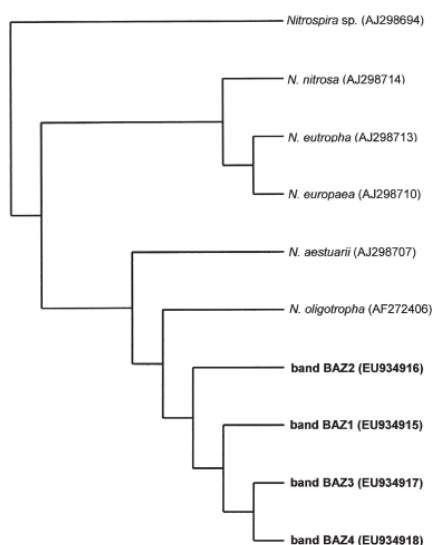
ที่มา: Ziembinska *et al.* (2009)

พบว่าในการศึกษา 16S rRNA พบกลุ่มของแบคทีเรีย *Nitrospira* sp. (ภาพที่ 3) เป็นกลุ่มประชากรที่พบมากที่สุด ในส่วนของการศึกษา *amoA* พบกลุ่มของแบคทีเรีย *Nitrospira* sp. (ภาพที่ 4) เป็นกลุ่มประชากรที่พบมากที่สุดเช่นกัน แสดงให้เห็นว่ายีนทั้งสองนี้สามารถใช้ในการระบุชนิดของแบคทีเรีย *Nitrospira* ได้ดีพอ



ภาพที่ 3 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียกลุ่ม AOB ที่ได้จากการศึกษาด้วยยีน 16S rRNA จากน้ำเสียใน Gliwice ประเทศโปแลนด์

ที่มา: Ziembinska *et al.* (2009)



ภาพที่ 4 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียกลุ่ม AOB ที่ได้จากการศึกษาด้วยยีน *amoA* จากน้ำเสียใน Gliwice ประเทศโปแลนด์

ที่มา: Ziembinska *et al.* (2009)

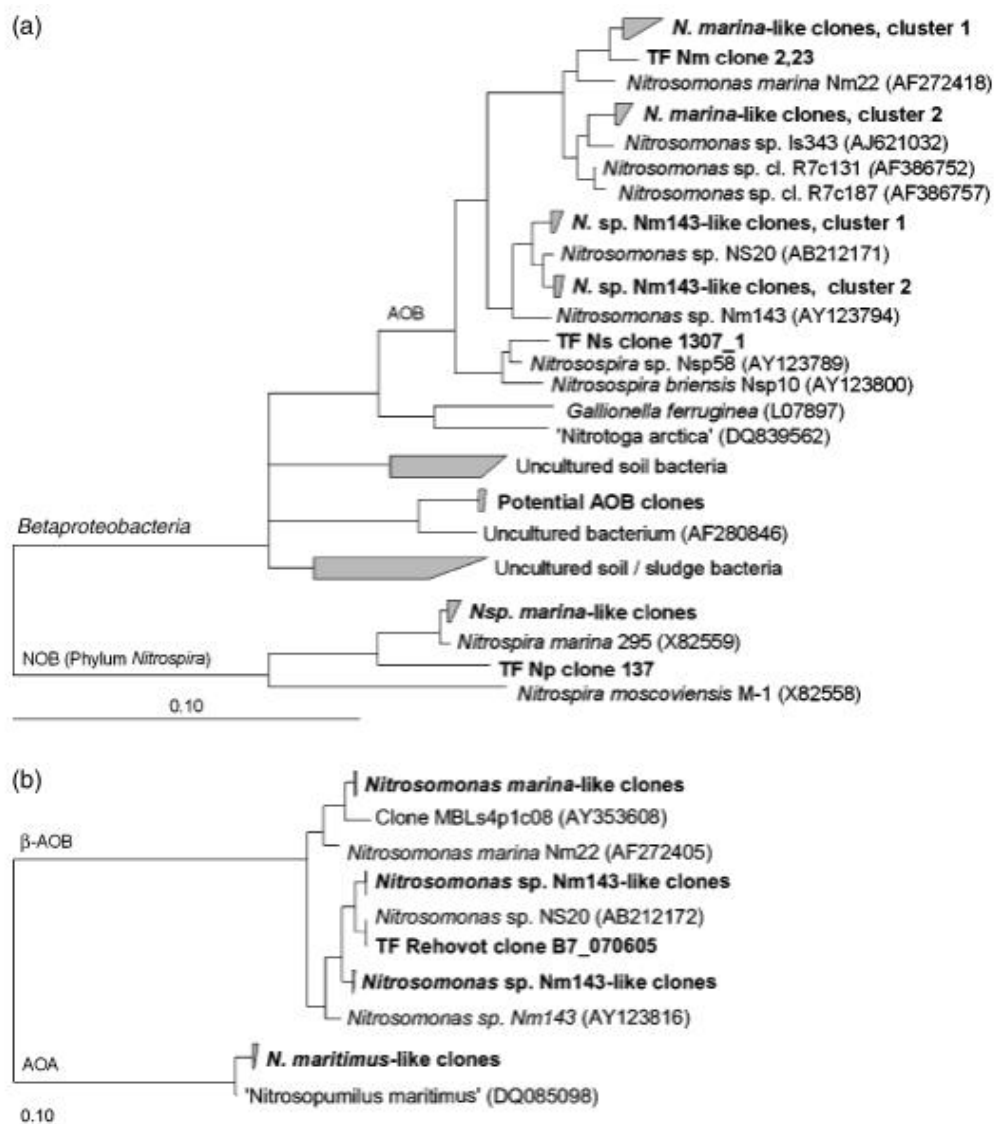
ขณะที่ Foesel *et al.* (2007) ได้ใช้เทคนิค FISH ในการศึกษาประชาคมไนโตรไฟอิงแบคทีเรียในไบโอฟิล์มจากตัวกรองในระบบการเพาะเลี้ยงปลา gilthead seabream (*Sparus aurata*) ซึ่งในการศึกษาได้ใช้ probes จำนวน 5 probes (ตารางที่ 2) ในการศึกษาเชื้อ AOB และ NOB

ตารางที่ 2 ชนิดของ probes ที่ใช้ในการศึกษาประชาคมของไนโตรไฟอิงแบคทีเรียในไบโอฟิล์มจากตัวกรองในระบบการเพาะเลี้ยงปลา gilthead seabream (*Sparus aurata*)

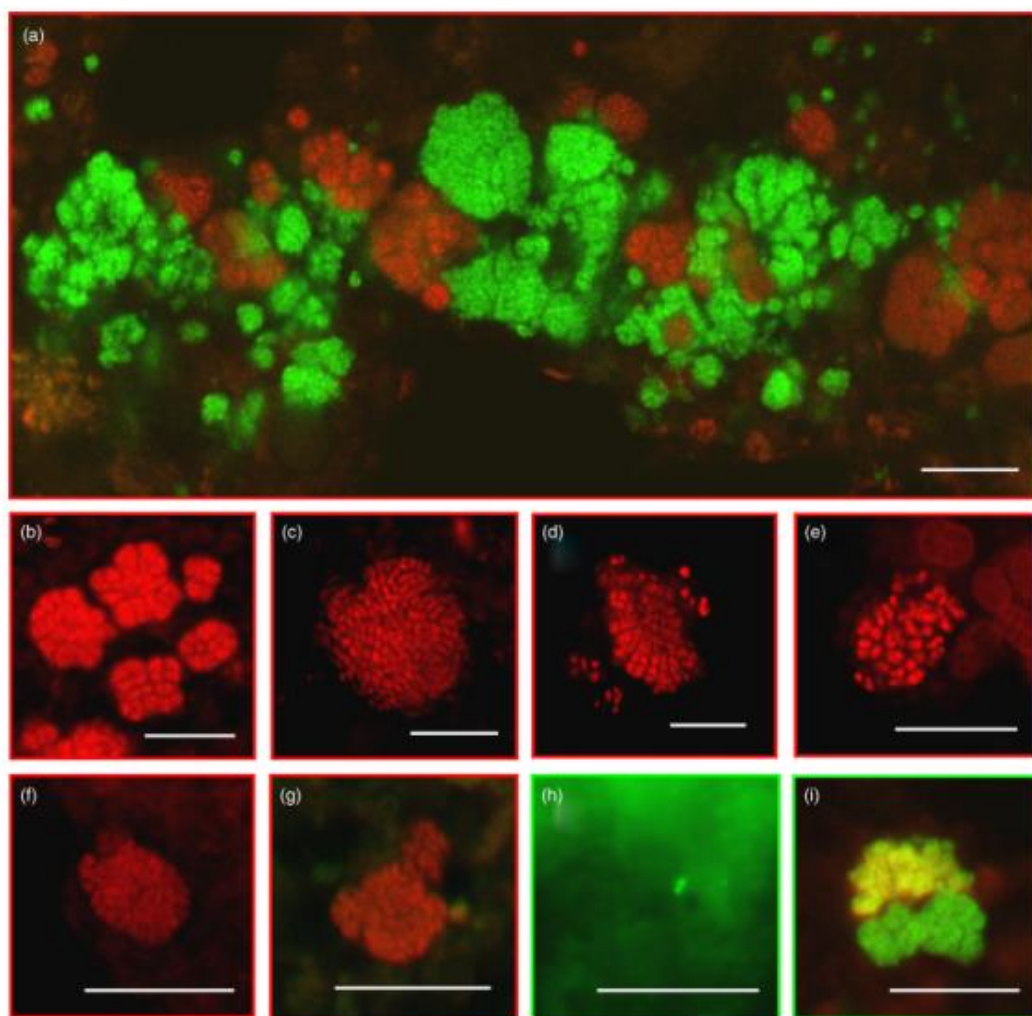
Probe	Sequence (5' – 3')	Target site (16S rRNA gene)	Specificity
AOB			
Nmar831	AACCTAAAAAGGCCCGAC	831–848	<i>Nitrosomonas marina</i> -like clones,
Nm143-446-1	AGTCGCGGTCTTTTCTTC	446–463	cluster 1 <i>Nitrosomonas</i> sp. Nm143-like
Nm143-446-2	CGTCGTAGCCTTTTCTTC	446–463	clones, cluster 1 <i>Nitrosomonas</i> sp. Nm143-like clones, cluster 2
pAOB630	CCACAGTCCTCAATGCAA	630–647	Potential AOB clones
NOB			
Nspmar62	GCCCCGGATTCTCGTTTCG	62–79	<i>Nitrospira marina</i> -like clones

ที่มา: Foesel *et al.* (2007)

จากการศึกษาพบว่า *Nitrosomonas europaea/eutropha* และ *N. marina* เป็นกลุ่มเด่นในกลุ่ม AOB และ *Nitrospira marina* เป็นกลุ่มเด่นใน NOB (ภาพที่ 5) นอกจากนี้ยังมีการติดสีเรืองแสงจาก probe โดยเทคนิค FISH ซึ่งแบคทีเรียกลุ่ม AOB จะให้การติดสีแดง และ NOB จะติดสีเขียว (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 5 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียกลุ่ม AOB ในไบโอฟิล์มจากตัวกรองในระบบการเพาะเลี้ยงปลา gilthead seabream (*Sparus aurata*) (a) การใช้ยีน 16S rRNA ในการติดตาม AOB และ NOB, (b) การใช้ยีน *amoA* ในการติดตาม β -AOB และ AOA
ที่มา: Foesel *et al.* (2007)



ภาพที่ 6 การติดสีเรืองแสงของแบคทีเรีย AOB ในไบโอฟิล์มจากตัวกรองในระบบการเพาะเลี้ยงปลา gilthead seabream (*Sparus aurata*) ด้วยเทคนิค FISH (a) แบคทีเรีย AOB ติดสีแดง และ NOB ติดสีเขียว, (b) *Nitrosomonas* sp., (c) *N. marina*, (d) *N. crytolerans*, (e) *N. communis/nitrosa*, (f) *Nitrospira* sp. และ (i) *Nitrospira moscoviensis* ติดสีเหลือง และ *Nitrospira marina* ติดสีเขียว ซึ่งเป็นกลุ่ม NOB
ที่มา: Foesel *et al.* (2007)

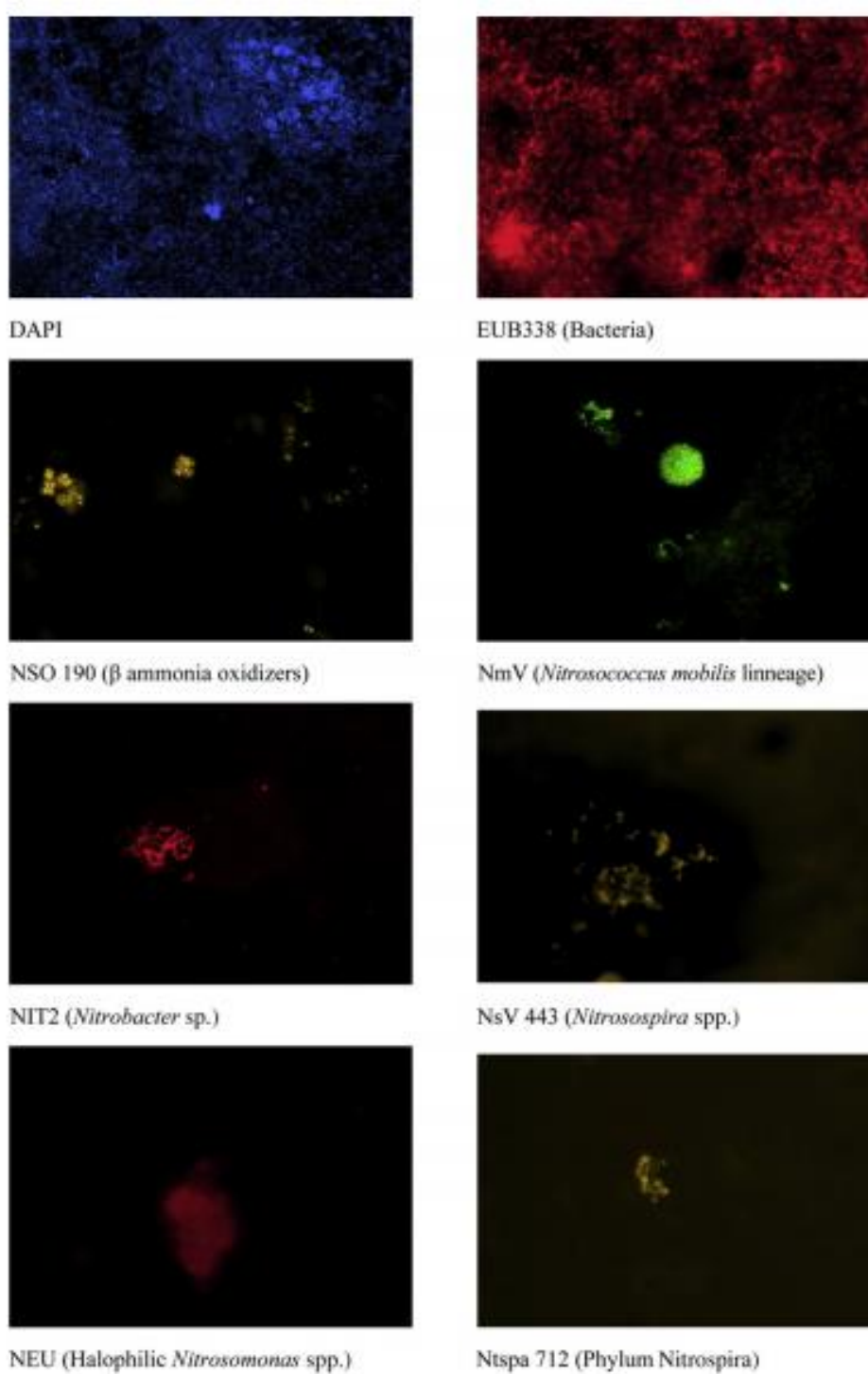
Kumar *et al.* (2013) ได้ศึกษาประชากรไนตริไฟอิงแบคทีเรียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกร่อยที่มีความเค็ม 15 ppt และน้ำเค็มที่มีความเค็ม 30 ppt ซึ่งใช้ยีน 16S rRNA และยีน *amoA* (ตารางที่ 3) โดยใช้เทคนิค FISH ในการศึกษา จากการศึกษพบว่าในตัวอย่างจากน้ำกร่อยพบ *Nitrospira* sp. และ *Nitrosococcus mobilis* และตัวอย่างจากน้ำเค็มพบ *Nitrosomonas* sp. เป็นกลุ่มเด่น อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกลุ่ม NOB พบ *Nitrobacter* sp. และ *Nitrospira* sp. เป็นกลุ่มเด่นเช่นกัน และแสดงการติดสีเรืองแสงของแบคทีเรีย จากภาพที่ 7 จะเห็นว่า β - ammonia oxidizers ที่ติด probe NOS 190 เรืองแสงสีเหลือง *Nitrosococcus mobilis* ติด probe NmV

เรืองแสงสีเขียว *Nitrobacter* sp. ติด probe NIT2 เรืองแสงสีแดง *Nitrosospira* spp. ติด probe NsV 443 เรืองแสงสีเขียวอมเหลือง *Nitrosomanas* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทนความเค็ม ติด probe NEU เรืองแสงสีแดง มีลักษณะเป็นฝ้ายสีแดง และ Phylum Nitrospira ติด probe Ntspa 712 เรืองแสงสีเขียวอมเหลือง (ภาพที่ 7)

ตารางที่ 3 Primers ที่ใช้ในการศึกษาประชากรไนตริไฟอิงแบคทีเรียจากการเพาะเลี้ยงสัณฐานน้ำกร่อยที่มีความเค็ม 15 ppt และน้ำเค็มที่มีความเค็ม 30 ppt ด้วยยีน 16S rRNA และ *amoA*

Targeted DNA	Primer	Sequence (5' – 3')
16S rRNA	16S1	5'-GAGTT TGATCCTGGCTCA-3'
	16S2	5'-ACGGC-TACCTTGTTACGACTT-3'
	Arch21F	5'-TCCGG TTGATCCYGCCGGA-3'
	Arch958R	5'-YCCGGCGTTGAMTCCAATT-3'
<i>amoA</i>	<i>amoA</i> -1F	5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT- 3'
	<i>amoA</i> -1R	5'-CCCCTCKGSAAA GCCTTCTTC-3'

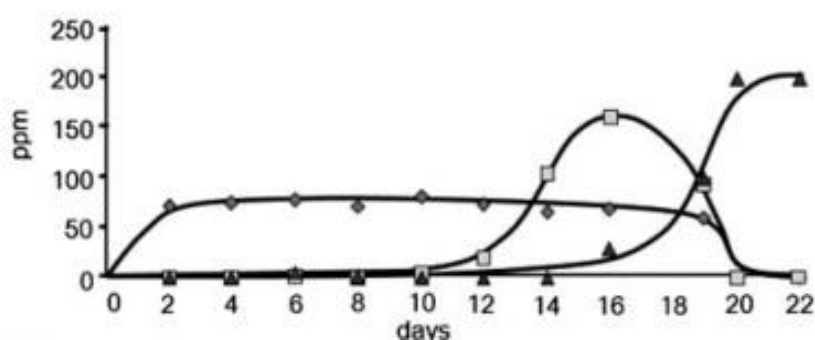
ที่มา: Kumar *et al.* (2013)



ภาพที่ 7 การติดสีเรืองแสงของไนตริไฟอิงแบคทีเรียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกร่อยโดยใช้ probes ต่าง ๆ

ที่มา: Kumar *et al.* (2013)

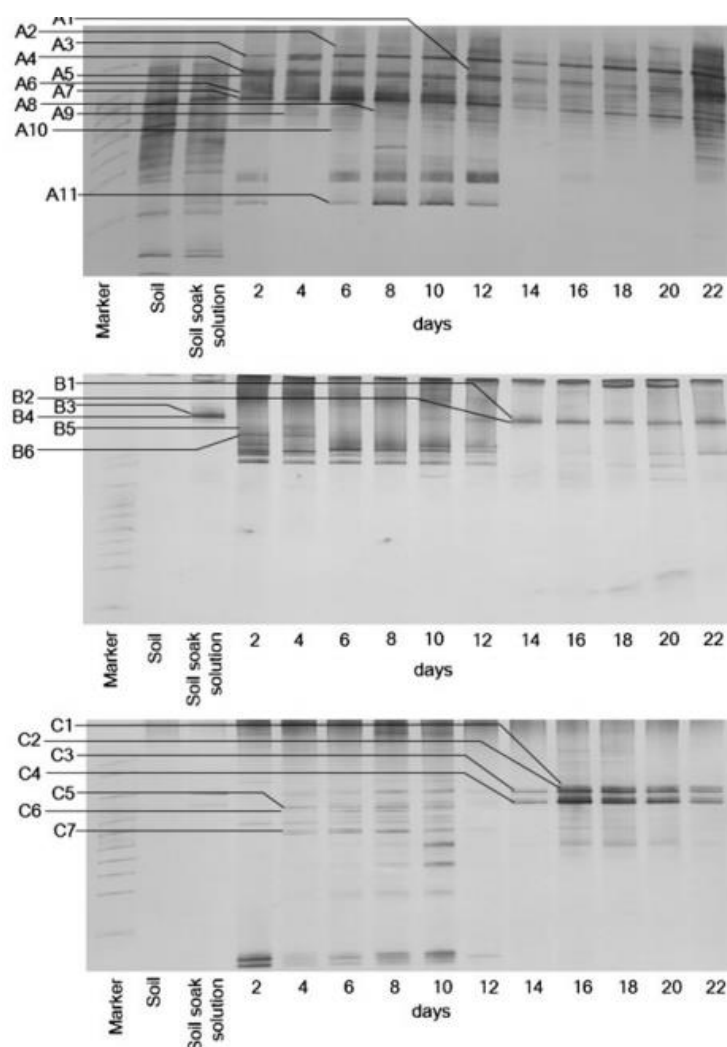
นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างประชาคมกล้าเชื้อกับคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง โดย Saijai *et al.* (2016) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของประชาคมไนโตรไฟอิงแบคทีเรีย กับคุณภาพน้ำ (แอมโมเนีย, ไนไตรท์ และไนเตรท) ในระบบไฮโดรโปนิก (hydroponic system) โดยใช้เทคนิค DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) พบว่าในกระบวนการไนตริฟิเคชัน ตรวจพบแอมโมเนียมีความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในวันที่ 2 ของการทดลอง ไนไตรท์สามารถตรวจพบในวันที่ 12 ของการทดลอง และลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 20 ของการทดลอง ในขณะที่ปริมาณไนเตรทมีการเพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 160 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในวันที่ 16 ของการทดลอง การเปลี่ยนรูปจากไนไตรท์เป็นไนเตรทสามารถตรวจพบได้ในช่วงวันที่ 16-19 ของการทดลอง เมื่อปริมาณไนไตรท์เริ่มลดลงเป็นช่วงเดียวกันกับความสามารถในการตรวจพบปริมาณของไนเตรท (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 ปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการทดลอง (◆แอมโมเนีย, ■ ไนไตรท์ ▲ ไนเตรท)

ที่มา: Saijai *et al.* (2016)

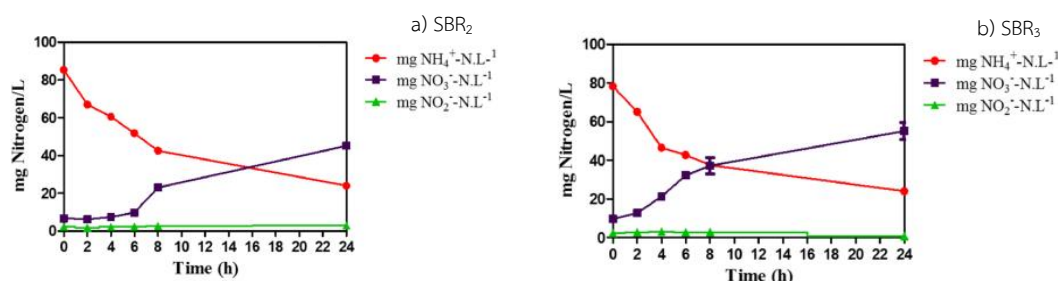
เมื่อศึกษาโครงสร้างของประชาคมแบคทีเรียด้วยยีน 16S rRNA *amoA* และ *nrxA* โดยเฉพาะจากยีน 16S rRNA พบ *Bacillus* และ *Pseudomonas* เป็นกลุ่มหลัก โดย *Bacillus*, *Lysobacter* และ *Pseudomonas* สามารถตรวจพบได้ตลอดการทดลอง และในช่วงวันที่ 12-16 ของการทดลอง พบว่าแอมโมเนียลดลงและไนไตรท์เพิ่มขึ้น และพบ *Nitrosomonas nitrosa* เป็นกลุ่มเด่น เมื่อมีการเปลี่ยนรูปจากไนไตรท์เป็นไนเตรทในช่วงวันที่ 16-19 พบ *Nitrobacter* โดย *N. vulgaris* และ *N. winogradskyi* เป็นกลุ่มเด่นที่สามารถตรวจพบได้ (ภาพที่ 9)



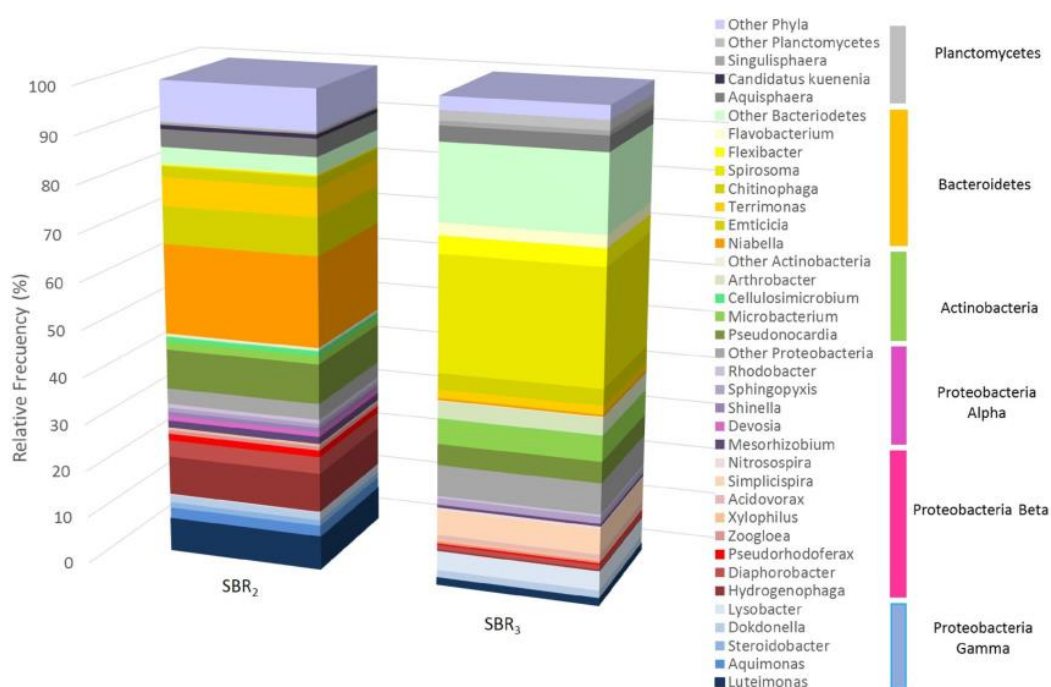
ภาพที่ 9 โครงสร้างของประชาคมแบคทีเรียโดยใช้ยีน 16S rRNA, *amoA* และ *nrxA*
ที่มา: Saijai *et al.* (2016)

Bucci *et al.* (2022) ได้รายงานการบำบัดน้ำทิ้งด้วยระบบ sequential batch reactors (SBRs) จากโรงงานผลิตเวย์โปรตีน พบว่า ระบบ SBR₂ สามารถลดแอมโมเนียได้ 74 เปอร์เซ็นต์และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นของไนเตรตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 จนถึงชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณไนเตรต 40 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เช่นเดียวกับกับระบบ SBR₃ สามารถลดแอมโมเนียได้ 70 เปอร์เซ็นต์ และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นของไนเตรตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 จนถึงชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณไนเตรต 60 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยทั้ง 2 ระบบไม่มีปริมาณของไนไตรท์ แสดงให้เห็นว่าการบำบัดน้ำทิ้งทั้ง 2 ระบบสามารถเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน (ภาพที่ 10) เมื่อศึกษาโครงสร้างของจุลินทรีย์ของทั้ง 2 ระบบด้วยเทคนิค New Generation Sequencing procedures (Illumina) ที่ตำแหน่ง V3 ด้วยยีน 16S rRNA (primer 341 และ 518R) พบแบคทีเรียในไฟลัม (phylum) Bacteroidetes ในระบบ SBR₂ 39 เปอร์เซ็นต์ ในระบบ SBR₃ 52 เปอร์เซ็นต์ และไฟลัม Proteobacteria ในระบบ SBR₂ 35 เปอร์เซ็นต์ ในระบบ SBR₃ 24 เปอร์เซ็นต์ เป็นกลุ่มหลัก ซึ่งมีสัดส่วนของจำนวนแบคทีเรียใกล้เคียงกัน

ในระดับชั้น (class) เบต้า (Beta) อัลฟา (Alpha) และ แกมมา (Gamma) ทั้ง 2 ระบบ โดยพบไฟลัม Actinobacteria ในระบบ SBR₂ 12 เปอร์เซ็นต์ ในระบบ SBR₃ 14 เปอร์เซ็นต์ และพบน้อยที่สุดคือ ไฟลัม Planctomycetes ในระบบ SBR₂ 5 เปอร์เซ็นต์ ในระบบ SBR₃ 6 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 11)



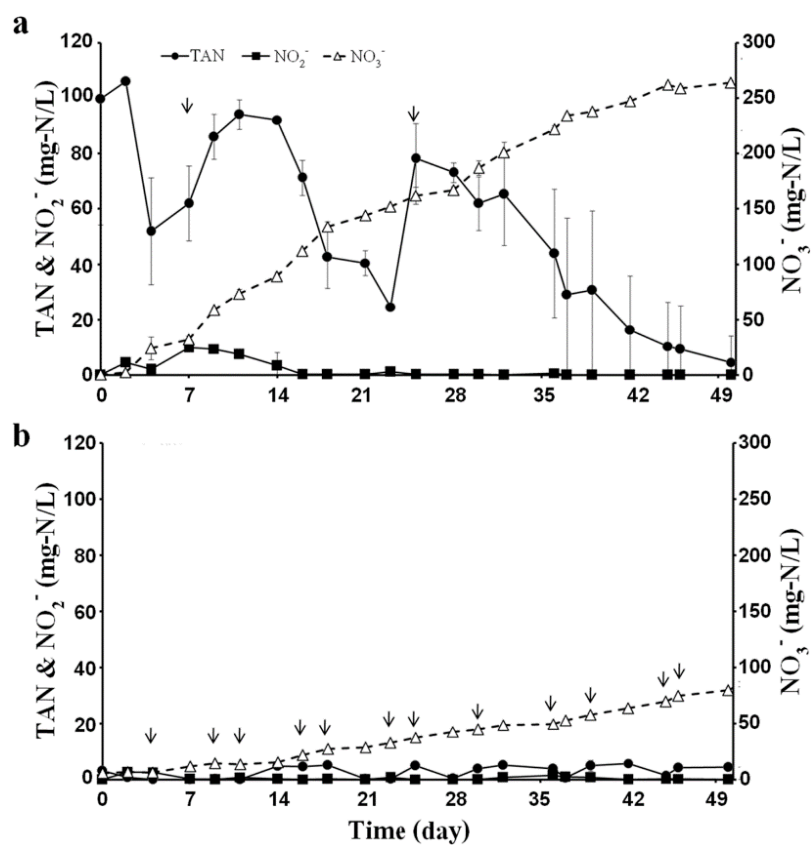
ภาพที่ 10 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท: a) ระบบบำบัดน้ำเสีย SBR₂; b) ระบบบำบัดน้ำเสีย SBR₃
ที่มา: Bucci *et al.* (2020)



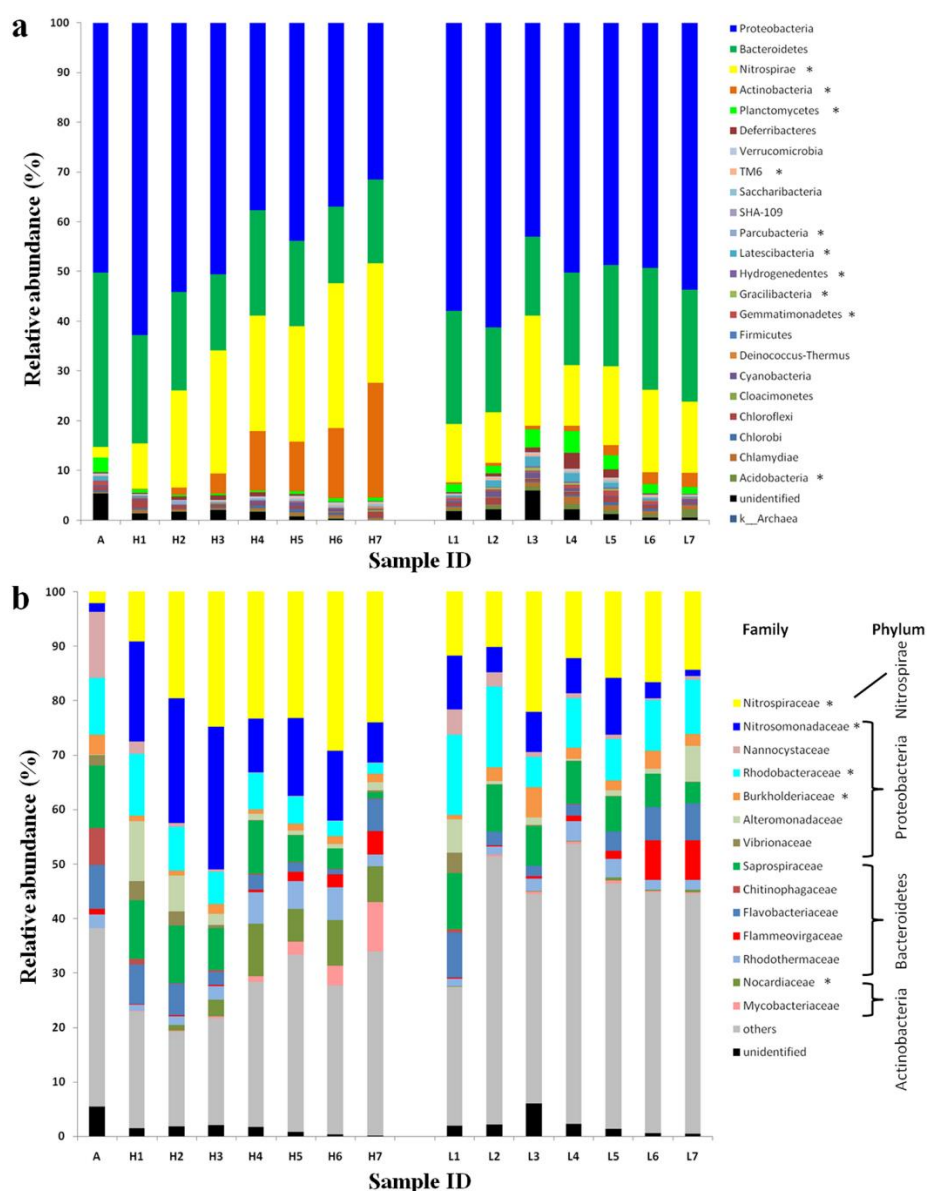
ภาพที่ 11 ลักษณะโครงสร้างของจุลินทรีย์ของทั้ง 2 ระบบด้วยเทคนิค Illumina Sequencing ในระดับไฟลัมและระดับสกุลของระบบบำบัดน้ำเสีย SBR₂ และ SBR₃
ที่มา: Bucci *et al.* (2020)

Burut-Archanai *et al.* (2021) ศึกษาพลวัตของจุลินทรีย์ในตัวกรองชีวภาพแบบไนโตรฟิเคชันในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียน (recirculating aquaculture system, RAS) โดยใช้น้ำเสียที่ผ่านการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ศึกษาที่ระดับแอมโมเนียต่ำ (5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) และระดับสูง (100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) มีการเติมอาหารกุ้งที่มีโปรตีน 38

เปอร์เซ็นต์ลงไปในระบบบำบัดน้ำเพื่อเป็นสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังควบคุมปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) โดยการเติมโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) ตัวอย่างน้ำ 5 มิลลิลิตร ถูกเก็บ 3 ครั้งต่อสัปดาห์ และกรองด้วยกระดาษกรอง GF/C จากนั้นเก็บรักษากระดาษกรองที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาพลวัตของจุลินทรีย์ด้วยยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง V3-V4 ด้วย primer GC-341-F และ 805-R เมื่อวิเคราะห์ Illumina Miseq platform, Next generation sequencing พบว่าในชุดการทดลองที่มีปริมาณแอมโมเนียสูง ปริมาณแอมโมเนียลดลงจาก 99.7 เหลือ 51.9 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และมีแนวโน้มลดลง ปริมาณไนเตรทเพิ่มขึ้นจาก 0.4 เป็น 24.0 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในวันที่ 4 และมีแนวโน้มเพิ่มสูงจนสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณไนเตรทสูง 9.8 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรภายในสัปดาห์แรก จากนั้นมีการลดลง ในส่วนของ การทดลองที่ระดับแอมโมเนียต่ำพบว่าระดับแอมโมเนียและไนเตรทมีการลดลง ในขณะที่ปริมาณไนเตรทมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลอง (ภาพที่ 12) เมื่อศึกษาพลวัตจุลินทรีย์ ชุดการทดลองแอมโมเนียสูงพบ 23 ไฟล์ และชุดการทดลองแอมโมเนียต่ำมี 22 ไฟล์ ทั้ง 2 ชุดการทดลองส่วนใหญ่พบไฟล์ Proteobacteria (31.5–62.7 เปอร์เซ็นต์) ไฟล์ Bacteroidetes (15.4–35.0 เปอร์เซ็นต์) ไฟล์ Nitrospirae (2.0–29.1 เปอร์เซ็นต์) ไฟล์ Actinobacteria (0.05–23.2 เปอร์เซ็นต์) และไฟล์ Planctomycetes (0.4–4.4 เปอร์เซ็นต์) เป็นไฟล์หลัก (ภาพที่ 13) เมื่อพิจารณาในระดับแฟมิลี (family) สามารถแยกได้มากกว่า 160 แฟมิลี โดยที่ 96 และ 13 แฟมิลีอยู่ในไฟล์ Proteobacteria และ Bacteroidetes จากภาพที่ 13b จะเห็นว่า Nitrospiraceae และ Nitrosomonadaceae มีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่อาทิตย์แรกทั้ง 2 ชุดการทดลอง ในขณะที่ Chitinophagaceae, Nannocystaceae และ Saprospiraceae มีปริมาณลดลง เมื่อเทียบกับน้ำทะเล (A)



ภาพที่ 12 ปริมาณของแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท ในถังกรองชีวภาพ: a คือ ชุดการทดลองระดับแอมโมเนียสูง, b คือ ชุดการทดลองระดับแอมโมเนียต่ำ
ที่มา: Burut-Archanai *et al.* (2021)

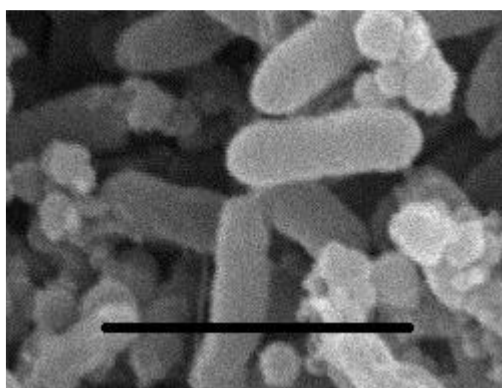


ภาพที่ 13 ความสัมพันธ์ของพลวัตแบคทีเรีย (เปอร์เซ็นต์) ในตัวกรองชีวภาพ: a ระดับฟิลัม; b ระดับแฟมิลี (A คือ ตัวอย่างน้ำทะเล control, H คือ ชุดการทดลองระดับแอมโมเนียสูง, L คือ ชุดการทดลองระดับแอมโมเนียต่ำ)

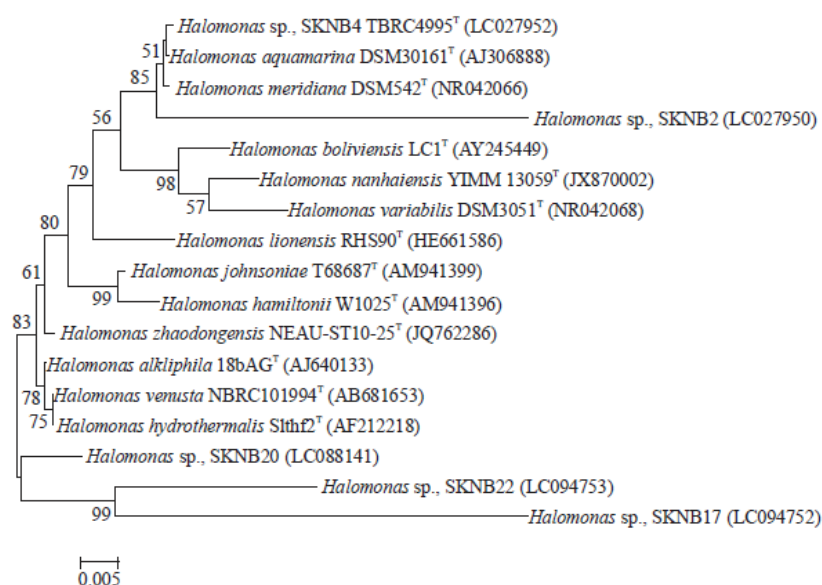
ที่มา: Burut-Archanai *et al.* (2021)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ สุทธิภา (2560) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อจากบ่อเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 14 วัน โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Alcaligenes faecalis* SRNB23 และ *A. faecalis* SRNB35 ที่สัดส่วน 30:70 พบว่าชุดการทดลองที่เติมเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรียสามารถลดปริมาณของแอมโมเนียได้ เท่ากับ 63.07 เปอร์เซ็นต์ มีการเพิ่มขึ้นของไนโตรเจนในระหว่างการทดลองเท่ากับ 0.25 ± 0.02 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร นั่นคือ มีไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 171.00 ± 14.6 เปอร์เซ็นต์ จากวันแรก (Day 0) และมีปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้นในวันที่ 14 ของการทดลองเท่ากับ 3.14 เปอร์เซ็นต์

Sangnoi *et al.* (2017) ได้ทำการศึกษาและคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนีย โดยสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โคโลนีสีขาวครีม รูปร่างแท่งสั้น (ภาพที่ 14) และเมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และวิเคราะห์ phylogenetic tree ปรากฏว่าแบคทีเรียที่แยกได้เป็นสกุล *Halomonas* (ภาพที่ 15) และมีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 800-900 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งนับว่าเป็นความเข้มข้นที่สูงมาก ได้ประมาณ 23-71 เปอร์เซ็นต์ โดยทั่วไปแล้วความเข้มข้นของแอมโมเนียระดับนี้จะเป็นพิษต่อทั้งสัตว์น้ำและเซลล์ของไนตริไฟอิงแบคทีเรียเอง ในรายงานระบุว่าเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียกลุ่ม *Halomonas* spp. เป็นกลุ่มเชื้อที่มีศักยภาพในการนำมาใช้บำบัดน้ำเสียที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงและมีความเค็ม เช่น การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม เป็นต้น

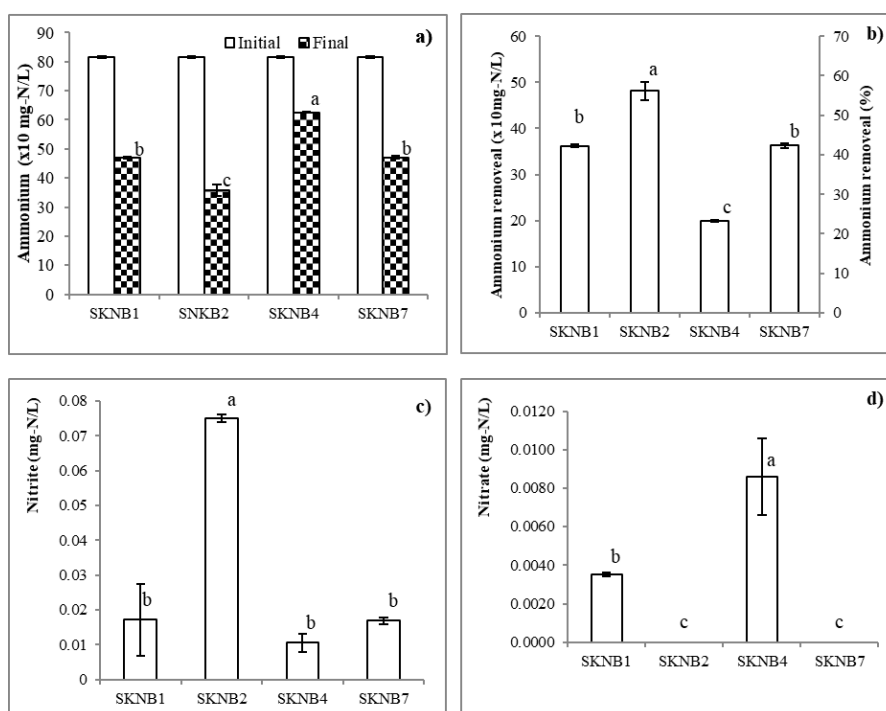


ภาพที่ 14 ลักษณะเซลล์ของ *Halomonas* sp. SKNB4
ที่มา: Sangnoi *et al.* (2017)



ภาพที่ 15 Phylogenetic tree ของ *Halomonas* sp. SKNB4
ที่มา: Sangnoi *et al.* (2017)

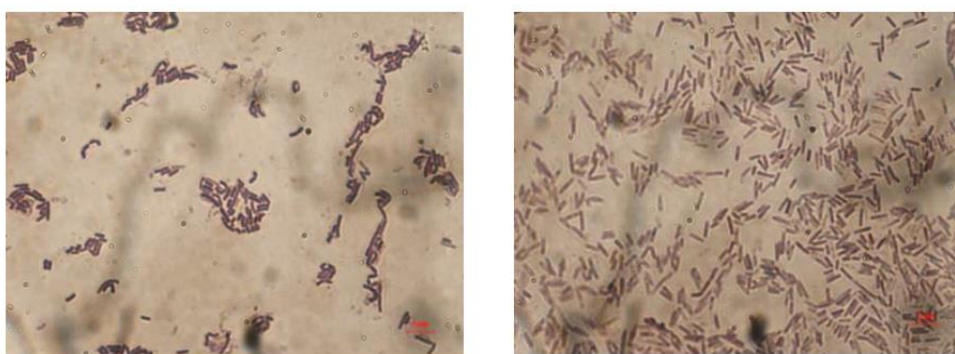
รวมถึงยังมีรายงานเพิ่มเติมเกี่ยวกับประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิคไนโตรไฟอิงแบคทีเรียที่คัดแยกจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งขาว โดย Chankaew *et al.* (2018) รายงานว่าเฮเทอโรโทรฟิคไนโตรไฟอิงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 4 สายพันธุ์ คือ *Bacillus* sp. SKNB1, *Halomonas* sp. SKNB2, *Halomonas* sp. SKNB4 และ *Psychrobacter* sp. SKNB7 เมื่อศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียในอาหาร modified Pep-Beef-AOM medium มีแอมโมเนียเริ่มต้น 815.86 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เป็นเวลา 5 วัน พบว่า *Halomonas* sp. SKNB2 มีความสามารถในการลดแอมโมเนียสูงสุดที่ 56.19 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณไนโตรท์ 0.0751 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียรองลงมาคือ *Psychrobacter* sp. SKNB7 และ *Bacillus* sp. SKNB1 มีความสามารถในการลดแอมโมเนีย 42.36 เปอร์เซ็นต์ และ 42.29 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณไนโตรท์ 0.0169 และ 0.0172 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ และ *Halomonas* sp. SKNB4 มีประสิทธิภาพในการลดแอมโมเนียต่ำสุดที่ 23.32 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณไนโตรท์ 0.0106 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในขณะที่ปริมาณไนเตรทสามารถตรวจพบได้เพียง 2 สายพันธุ์ คือ *Halomonas* sp. SKNB4 และ *Bacillus* sp. SKNB1 ที่ 0.0086 และ 0.0035 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับ *Halomonas* sp. SKNB2 และ *Psychrobacter* sp. SKNB7 ไม่สามารถตรวจพบปริมาณไนเตรทได้ (ภาพที่ 16)



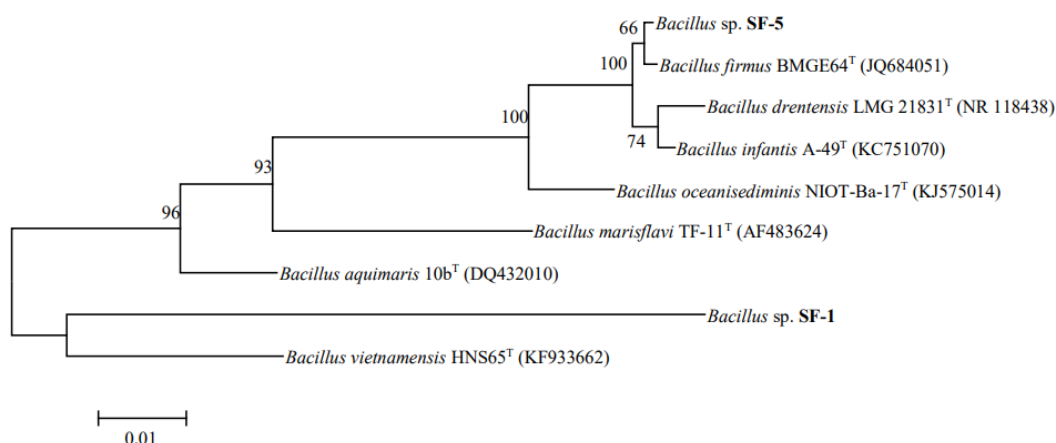
ภาพที่ 16 ประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิคไนโตรไฟอิงแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์; a) ความเข้มข้นเริ่มต้นและความเข้มข้นสุดท้ายของแอมโมเนีย (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร), b) ประสิทธิภาพในการลดแอมโมเนีย (เปอร์เซ็นต์), c) ปริมาณไนโตรท์ (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร), d) ปริมาณไนเตรท (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)

ที่มา: Chankaew *et al.* (2018)

Noorak *et al.* (2018) ได้รายงานการแยกเชื้อจากตัวอย่างดินใต้กระชังเลี้ยงปลากะพงขาว โดยใช้อาหาร Pep-Beef-NOB medium ที่มีส่วนผสมของ beef extract และ peptone ที่เป็นแหล่งสารอินทรีย์ และ NaNO_2 เป็นแหล่งสารอนินทรีย์ไนโตรเจน พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ SF-1 และ SF-5 ที่มีรูปร่างแท่ง แกรมบวก และสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) (ภาพที่ 17) เมื่อทำการจัดจำแนกชนิดด้วยยีน 16S rRNA พบว่า มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus* โดยที่สายพันธุ์ SF-1 มีความใกล้เคียงกับ *B. vietnamensis* และสายพันธุ์ SF-5 มีความใกล้เคียงกับ *B. firmus* (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 17 รูปร่างเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SF-1 (ซ้าย) และ SF-5 (ขวา)
ที่มา: Noorak *et al.* (2018)

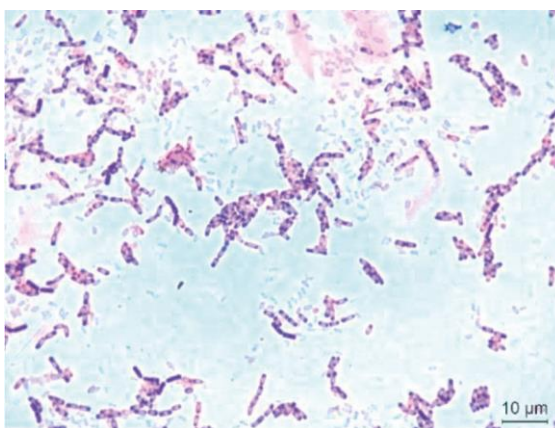


ภาพที่ 18 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SF-1 และ SF-5
ที่มา: Noorak *et al.* (2018)

เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดไนโตรที่ทำการศึกษาในอาหาร Pep-Beef-NOB medium พบว่าสายพันธุ์ SF-1 และ SF-5 มีความสามารถในการกำจัดไนโตรที่สูงสุดที่ 42.42 เปอร์เซ็นต์ และ 37.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ Phatthongkleang *et al.* (2019) ได้คัดแยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากตัวอย่างน้ำและดินในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้ง อ.สีเกา จ.ตรัง พบว่าได้แบคทีเรีย *Bacillus* จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus* sp. TW31, *Bacillus* sp. HS12, *Bacillus* sp. HW34, *Bacillus* sp. TS41 และ *Bacillus* sp. ES33 เมื่อนำมาศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัด

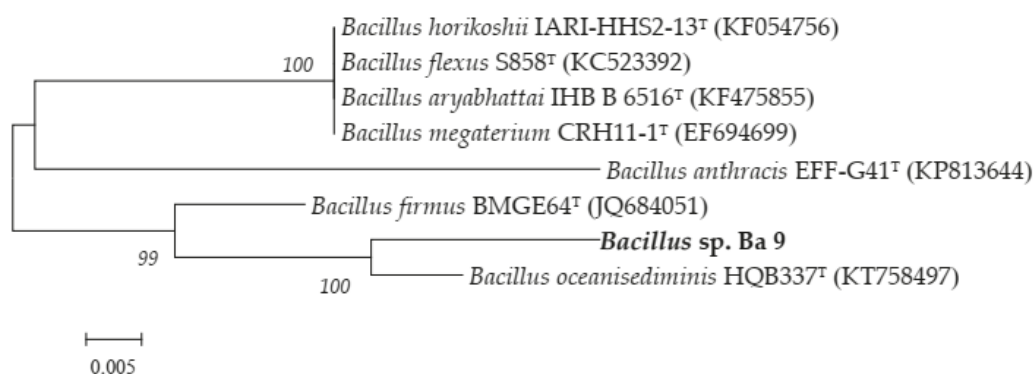
ไนโตรเจนในน้ำเสียสังเคราะห์เป็นเวลา 7 วัน พบว่า *Bacillus* sp. ES33 มีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียสูงสุด

Chankaew และ Sangnoi (2023) ได้รายงานการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินใต้กระชังเลี้ยงปลากะพง บริเวณเกาะยอ จ.สงขลา พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ Ba9 มีลักษณะแกรมบวก รูปแท่ง มีโครงสร้างของเอ็นโดสปอร์ (ภาพที่ 19) เมื่อศึกษาด้วยยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus oceanisedminis* สายพันธุ์ HQB337^T ที่ 97% (ภาพที่ 20) เมื่อนำมาศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียในอาหาร high ammonium medium เป็นเวลา 5 วันพบว่า *B. oceanisedminis* Ba9 สามารถลดแอมโมเนียได้ 64.24 เปอร์เซ็นต์ พบไนโตรทและไนเตรท 0.10 และ 0.08 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และเมื่อนำไปศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์เป็นเวลา 14 วัน พบว่า *B. oceanisedminis* Ba9 สามารถลดแอมโมเนียได้ 96.87 เปอร์เซ็นต์ และลดค่า biochemical oxygen demand (BOD) ได้ 90.86 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 19 รูปร่างเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ Ba9

ที่มา: Chankaew and Sangnoi (2023)



ภาพที่ 20 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ Ba9

ที่มา: Chankaew and Sangnoi (2023)

จากการทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องข้างต้นทำให้เห็นว่า เซลล์เชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียมีประสิทธิภาพ และศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการบำบัดน้ำ และยังมีประเด็นที่น่าสนใจเกี่ยวกับการนำวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรมาใช้เป็นวัสดุยึดเกาะสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรีย ให้อยู่ในรูปของกล้าเชื้อผง เพื่อเป็นการรักษาและยืดอายุของเซลล์ สะดวกต่อการใช้ การเก็บรักษา และการขนส่ง สำหรับใช้ในการบำบัดน้ำเสียในระบบการเลี้ยงกุ้ง

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการศึกษา

1 พื้นที่ศึกษา

1. ห้องปฏิบัติการสาขาวิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
2. ฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้ง ดำรงค์ดีฟาร์ม อำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา

2 วิธีการศึกษา

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ (Chankaew *et al.*, 2017)

- อาหารสูตร modified Pep-Beef-AOB medium

- peptone	5.0	กรัม
- beef extract	3.0	กรัม
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0	กรัม
- K_2HPO_4	0.75	กรัม
- NaH_2PO_4	0.25	กรัม
- MgSO_4	0.03	กรัม
- MnSO_4	0.01	กรัม
- tri-sodium citrate	17.8054	กรัม
- น้ำทะเล (ความเค็ม 22 ppt)	1,000	มิลลิลิตร
- อาหารสูตร modified high ammonium medium

- peptone	5.0	กรัม
- beef extract	3.0	กรัม
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4.0	กรัม
- K_2HPO_4	0.75	กรัม
- NaH_2PO_4	0.25	กรัม
- MgSO_4	0.03	กรัม
- MnSO_4	0.01	กรัม
- tri-sodium citrate	17.8054	กรัม
- น้ำทะเล (ความเค็ม 22 ppt)	1,000	มิลลิลิตร

2. การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม

2.1 การเลี้ยงกล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนโตรฟิกไนโตรไฟอิงแบคทีเรีย

นำกล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนโตรฟิกไนโตรไฟอิงแบคทีเรียจาก culture collection จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Alcaligenes faecalis* SRNB23, *A. faecalis* SRNB35, *Bacillus oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 (สุนิษา, 2560; Noorak et al., 2018; Chankaew and Sangnoi, 2023) มาเลี้ยงในอาหารสูตร modified Pep-Beef-AOB medium บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 3 วัน ตรวจสอบปริมาณของเชื้อแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น 10^9 CFU/มิลลิลิตร ด้วยวิธี Total plate count technique (Yang et al., 2011; Lu et al., 2012 Sangnoi et al., 2017; Chankaew et al., 2018)

2.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมในระดับฟลาสก์

ศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนของเชื้อเดี่ยวเฮเทอโรโทรฟิกไนโตรฟิกไนโตรไฟอิงแบคทีเรียจำนวน 4 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4) โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากันที่ 10^9 CFU/มิลลิลิตร เช่นเดียวกับการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนของเชื้อผสม โดยจับคู่กล้าเชื้อผสมและวางแผนการทดลองตามรายละเอียดดังตารางที่ 5 ซึ่งใช้อัตราส่วนของเชื้อผสมเริ่มต้นในการทดสอบที่ 50:50 และใช้ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากันที่ 10^9 CFU/มิลลิลิตร โดยการศึกษาเริ่มต้นนี้ทำการทดลองในระดับฟลาสก์ ด้วยการเติมกล้าเชื้อเดี่ยวหรือกล้าเชื้อผสมแต่ละชุดการทดลองปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร (1 เปอร์เซ็นต์ v/v) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร modified high ammonium medium ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 วัน (Yang et al., 2011; Sangnoi et al., 2017; Chankaew et al., 2018) จากนั้นศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนของกล้าเชื้อแต่ละชุดการทดลอง โดยตรวจวัดปริมาณแอมโมเนีย ไนโตรท์และไนเตรท ในวันเริ่มต้นและวันสิ้นสุดการทดลอง (Strickland and Parsons, 1972) ซึ่งทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง

$$\text{วิธีการคำนวณปริมาณแอมโมเนียที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(\text{ปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้น} - \text{ปริมาณแอมโมเนียวันสุดท้าย}) \times 100}{\text{ปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้น}}$$

ตารางที่ 4 รหัสสายพันธุ์กล้าเชื้อเดี่ยวเฮเทอโรโทรฟิกไนโตรฟิกไนโตรไฟอิงแบคทีเรีย

Code	Strain
A	<i>Alcaligenes</i> sp. SRNB23
B	<i>Alcaligenes</i> sp. SRNB35
C	<i>Bacillus</i> sp. Ba9
D	<i>Bacillus</i> sp. SF-1

ตารางที่ 5 ชุดการทดลองประสิทธิภาพของกล้าเชื้อผสม

No.	Treatment	No.	Treatment	No.	Treatment	No.	Treatment
1	A	6	AB	10	BD	14	ACD
2	B	7	AC	11	CD	15	BCD
3	C	8	AD	12	ABC	16	ABCD
4	D	9	BC	13	ABD		

หมายเหตุ: A-D คือ รหัสกล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนโตรไฟอิงแบคทีเรียที่เรียงแสดงในตารางที่ 4

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกล้าเชื้อในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจน

3.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมโดยเลี้ยงกล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนโตรไฟอิงแบคทีเรียในอาหารสูตร modified high ammonium medium ในฟลาสก์ที่เติมแหล่งคาร์บอน (carbon sources) ที่แตกต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่ glucose, sucrose, sodium acetate, sodium succinate และ sodium citrate โดยใช้ความเข้มข้นของคาร์บอนแต่ละชนิดเท่ากับ 0.06 โมล (glucose 21.62 กรัมต่อลิตร, sucrose 20.52 กรัมต่อลิตร, sodium acetate 29.41 กรัมต่อลิตร, sodium succinate 29.16 กรัมต่อลิตร และ sodium citrate 35.12 กรัมต่อลิตร) และใช้ ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจน (โดยเติม ammonium sulfate 4 กรัมต่อลิตร จะได้ความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 800 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) เป็นระยะเวลา 5 วัน เมื่อครบ 5 วัน ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย และนำส่วนใสไปวัดปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนไตรท์และไนเตรท (ตารางที่ 6) (Strickland and Parsons, 1972; Chankaew and Sangnoi, 2023)

ตารางที่ 6 วิธีวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท

Parameter	Method	Reference
Ammonia (mg/L)	Colorimetric method	Strickland and Parsons (1972)
Nitrite (mg/L)	Colorimetric method	Strickland and Parsons (1972)
Nitrate (mg/L)	Cadmium Reduction Column	Strickland and Parsons (1972)

หมายเหตุ: ขั้นตอนการวิเคราะห์อย่างละเอียดแสดงไว้ในภาคผนวก

3.2 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยเลี้ยงกล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนโตรไฟอิงแบคทีเรียในอาหารสูตร modified high ammonium medium เป็นระยะเวลา 5 วัน ในฟลาสก์ที่เติมแหล่งคาร์บอน (ความเข้มข้น 0.06 โมล) ที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิด (จากการทดลองที่ 3.1) และเติมแหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) ที่แตกต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่ ammonium chloride และ

ammonium sulfate โดยใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนแต่ละชนิดเท่ากับ 0.2 โมล (ammonium chloride 2 กรัมต่อลิตร และ ammonium sulfate 4 กรัมต่อลิตร) และปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน เซลล์แบคทีเรียเช่นเดียวกับข้อ 3.1 แล้ววัดปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์และไนเตรท (ตารางที่ 6) (Strickland and Parsons, 1972; Chankaew and Sangnoi, 2023)

3.3 สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสม

ศึกษาสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสมโดยเลี้ยงกล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหาร modified high ammonium medium โดยเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม (จากข้อ 3.1 และ 3.2) โดยปรับเปลี่ยนค่าสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 0, 2, 4, 8 และ 16 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 5 วัน และปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียเช่นเดียวกับข้อ 3.1 แล้ววัดปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์และไนเตรท (ตารางที่ 6) (Strickland and Parsons, 1972; Chankaew and Sangnoi, 2023)

3.4 สัดส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อผสม

ในกรณีที่กล้าเชื้อผสมเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียเป็นกล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจน นำกล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 2.2 เลี้ยงในอาหาร modified high ammonium medium (โดยเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม จากข้อ 3.1 และ 3.2) มาศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยศึกษาสัดส่วนกล้าเชื้อผสมที่ระดับ 30:70, 40:60, 50:50, 60:40 และ 70:30 ซึ่งเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 5 วัน หลังจากนั้น ตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียเช่นเดียวกับข้อ 3.1 แล้ววัดปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์และไนเตรท (ตารางที่ 6) (Strickland and Parsons, 1972; Chankaew and Sangnoi, 2023)

4. การศึกษาวัสดุยึดเกาะที่เหมาะสมและเปรียบเทียบประสิทธิภาพสูตรผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสูตรผง

4.1 การเตรียมกล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรีย

นำกล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียสูงสุด จากการทดลองที่ 2.2 มาทำเป็นผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อผงและกล้าเชื้อสูตรน้ำ โดยนำกล้าเชื้อเหลว (cell suspension) ที่ความเข้มข้น 10^9 CFU/มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เพื่อให้ตกตะกอน จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 เซลล์เฮเทอโรโทฟิคไนโตรไฟอิงแบคทีเรียหลังจากละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

4.2 การเตรียมวัสดุยึดเกาะสำหรับผลิตภัณฑักล้าเชื้อสูตรผง

นำวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร ได้แก่ แกลบละเอียด (husk) กาแฟบด (grounded coffee) ถั่วเหลือง (soybean meal) ขุยมะพร้าว (coco peat) และรำข้าว (rice bran) ผสมกับ carboxymethyl cellulose (CMC) ในอัตราส่วน 10:1 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งห่างกัน 1 วัน (ดัดแปลงจาก จิตมนัส, 2559)

4.3 เตรียมผลิตภัณฑักล้าเชื้อสูตรผง

นำกล้าเชื้อในข้อ 4.1 ผสมกับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรในข้อ 4.2 ในอัตราส่วน 1:5 ด้วยวิธีการฉีดพ่น (ภาพที่ 22) จากนั้นนำไปทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงนำผลิตภัณฑักล้าเชื้อสูตรผงใส่ในถุงหรือภาชนะปลอดเชื้อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ดัดแปลงจาก จิตมนัส, 2559)



ภาพที่ 22 การสเปรย์เพื่อผสมกล้าเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคที่เรียกกับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร (รำข้าว)

4.4 การศึกษาความมีชีวิต (cell viability) ของกล้าเชื้อสูตรผง

นำผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อสูตรผงที่ดีที่สุดมาศึกษาความมีชีวิตของเซลล์ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยนับเซลล์รอดชีวิตทุกเดือน ด้วยวิธีการนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) โดยนำกล้าเชื้อสูตรผง 1 กรัม ผสมกับน้ำเกลือปราศจากเชื้อ 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการเจือจาง (dilution method) จำนวน 8 เท่า (10^{-1} - 10^{-8}) ดูดส่วนใส 0.1 มิลลิลิตรมา spread plate บนอาหาร Nutrient Agar+0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl แล้วบ่มในตู้บ่ม (incubator) อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนับจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีจำนวน 30-300 โคโลนี แล้วนำผลมาคำนวณตามสูตร (กมลรัตน์ และคณะ, 2563)

$$\text{จำนวนเชื้อที่มีชีวิต (CFU/g)} = \text{จำนวนโคโลนี} \times \text{ระดับความเจือจาง} \times 10$$

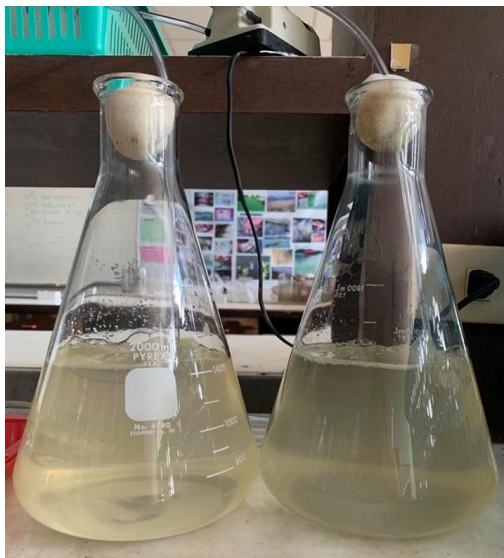
4.5 การศึกษาประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อสูตรผง

นำผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อสูตรผงมาทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อผง 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในการทดลอง โดยวัดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำทุกวัน ได้แก่ แอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และออกซิเจนละลายน้ำ (DO) (Strickland and Parsons, 1972; Chankaew *et al.*, 2018)

4.6 การเตรียมกล้าเชื้อสูตรน้ำ

นำ 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ของกล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคที่เรียมมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Minimal Medium (Sucrose 10 กรัม, K_2HPO_4 2.5 กรัม, KH_2PO_4 2.5 กรัม, $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัม, NaCl 1 กรัม, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 กรัม, $MnSO_4 \cdot H_2O$

0.007 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ให้อากาศตลอดเวลา 48-72 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 23) (ดัดแปลงจาก ชัยวุฒิ, มปป.)



ภาพที่ 23 การเตรียมกล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสูตรน้ำ

4.7 การศึกษาประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อสูตรผงและสูตรน้ำ

นำผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อสูตรผง (ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนสูงสุดจากข้อ 4.2) และกล้าเชื้อสูตรน้ำ (ข้อ 4.6) มาทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งในระดับขวดโหล เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยใช้ผลิตภัณฑ์ ปม.1 เป็นชุดการทดลองควบคุมแบบบวก (Positive control) (ภาพที่ 24) น้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นชุดการทดลองควบคุมแบบลบ (Negative control) และน้ำเสียที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อเป็นชุดการทดลองควบคุม (Control) ในการทดลอง โดยวัดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำทุกวัน ได้แก่ แอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และออกซิเจนละลายน้ำ (DO) (Strickland and Parsons, 1972; Chankaew *et al.*, 2018)

ชุดการทดลองที่ 1	Control	ชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งและไม่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ
ชุดการทดลองที่ 2	Negative control	ชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียปราศจากเชื้อจากการเลี้ยงกุ้งและไม่เติมกล้าเชื้อ
ชุดการทดลองที่ 3	Positive control	ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ ปม.1
ชุดการทดลองที่ 4	LQ	ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ
ชุดการทดลองที่ 5	PD	ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรผง



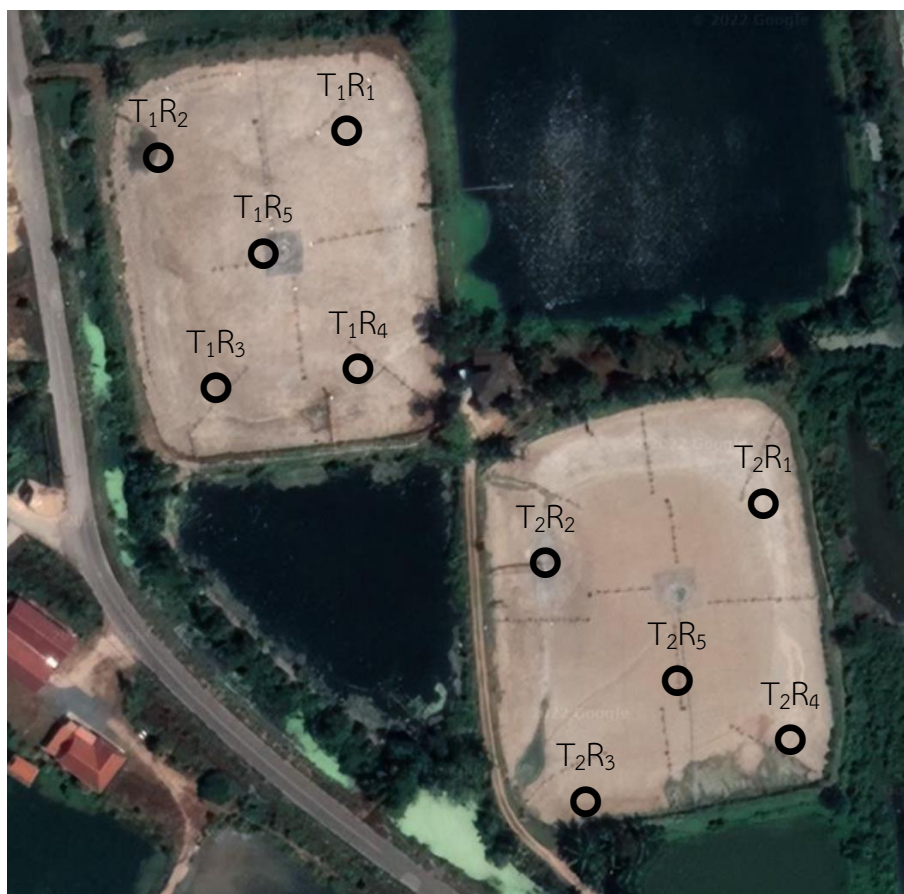
ภาพที่ 24 การบ่มกล้าเชื้อ ปม.1 และกล้าเชื้อกล้าเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสูตรผงด้วยอาหารกุ้งและกากน้ำตาล

5. การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงกุ้ง

นำผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดมาทดลองใช้ ในบ่อเลี้ยงกุ้งของเกษตรกร ณ ตำบลศักดิ์พาร์ม อ.สิงหนคร จ.สงขลา โดยขยายกล้าเชื้อให้มีปริมาณเพียงพอต่อการใช้ในการที่เกษตรกรใช้จริงดังนี้ นำผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ 250 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำสะอาด 250 ลิตร อาหารกุ้ง 500 กรัม และกากน้ำตาล 500 กรัม ให้อากาศจากปั๊มลม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้กล้าเชื้อขยาย 250 ลิตร ต่อบ่อขนาด 1 ไร่ เติมเชื้อที่บ่มแล้ว ทุก ๆ 2 วัน ตลอดการเลี้ยง ซึ่งเปรียบเทียบกับบ่อเลี้ยงกุ้งที่ใช้ผลิตภัณฑ์ทางการค้า โดยวัดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำทุก 3 วัน จากตัวอย่างน้ำจำนวน 5 จุดต่อบ่อ (ภาพที่ 25) จุดละ 1 ลิตร และทำการเก็บน้ำใส่ขวด BOD หลังจากนั้นทำการตกตะกอนออกซิเจน เพื่อวัดค่าออกซิเจนละลายน้ำ (DO) (ภาคผนวก) และเก็บรักษาตัวอย่างน้ำและขวด BOD แช่ในน้ำแข็ง จากนั้นจึงนำมากรองด้วยกระดาษกรอง GF/C ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วเก็บกระดาษกรอง ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาโครงสร้างประชาคมเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรีย และน้ำที่ผ่านการกรองนำไปศึกษาคุณภาพน้ำบางประการ ได้แก่ แอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท อุณหภูมิ ความเค็ม และความเป็นกรด-ด่าง (pH) (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 วิธีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมีในการศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กัลลาเชื้อเห็ด
โอรโพรพิคไนไตรไฟอิงแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงกุ้ง

Parameter	Method	Model/Reference
pH	pH meter	-
Salinity	Salino meter	-
Temperature	Thermometer	-
Dissolved Oxygen (DO)	Titration Method	Strickland and Parsons (1972)
Ammonia	Colorimetric method	Strickland and Parsons (1972)
Nitrite	Colorimetric method	Strickland and Parsons (1972)
Nitrate	Cadmium Reduction Column	Strickland and Parsons (1972)



ภาพที่ 25 จุดเก็บตัวอย่างน้ำจำนวน 5 จุด (R1-R5); T₁ คือ บ่อกึ่งที่ใช้กล้าเชื้อทางการค้า และ T₂ คือ บ่อกึ่งที่ใช้กล้าเชื้อเห็ดโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรีย ณ ตำรังค์ดีฟาร์ม อ.สิงหนคร จ.สงขลา (พิกัด T₁ 7°16'05"N 100°24'57" E, พิกัด T₂ 7°16'02"N 100°25'00"E)

6. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียกับคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง

เมื่อเริ่มการทดลองใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเห็ดโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงกุ้ง นำกระดาดกรองน้ำที่ได้จากการเก็บตัวอย่างน้ำในการทดลองข้อที่ 5 มาศึกษาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียด้วยเทคนิค Next Generation Sequence โดยสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) จากกระดาดกรอง (ดัดแปลงจาก อาภาวรรณ, 2556) โดยที่ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ มากกว่า 1.7 (A260/A280) หลังจากนั้นจึงส่งวิเคราะห์ 16S rRNA V3-4 region Metagenome sequencing ณ Bio-Station Limited (BMKGEN) เขตบริหารพิเศษฮ่องกงแห่งสาธารณรัฐประชาชนจีน (Hong Kong) จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างประชาคมเห็ดโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียกับการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำ (Burut-Archanai *et al.*, 2021)

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าพารามิเตอร์น้ำทั้งแอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท ความเป็นกรด – ด่าง (pH) ออกซิเจนละลายน้ำ (DO) อุณหภูมิ และความเค็ม โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ (R program)

บทที่ 4

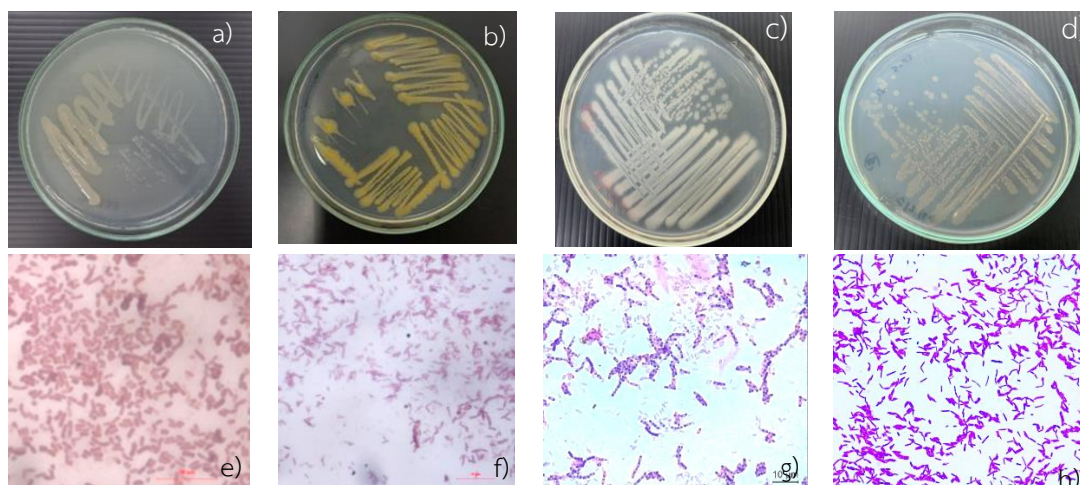
ผลการศึกษาและวิจารณ์ผลการศึกษา

1. เฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็ม

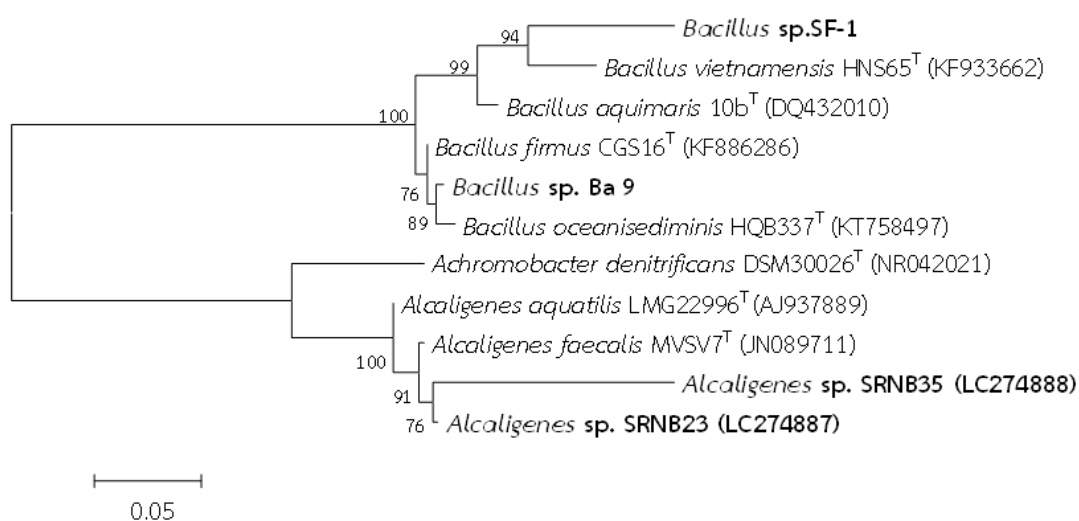
ลักษณะของกล้ำเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียจาก culture collection ที่คัดแยกไว้แล้วจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Alcaligenes faecalis* SRNB23, *A. faecalis* SRNB35, *Bacillus oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร modified Pep-Beef-AOB พบว่าลักษณะของโคโลนีมีสีครีม ส้ม ขาว และเหลืองส้ม ตามลำดับ เมื่อนำมาย้อมสีแกรมและดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า *A. faecalis* SRNB23 และ *A. faecalis* SRNB35 มีลักษณะรูปร่าง ติดสีแดงเป็นแกรมลบ ไม่มีโครงสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ในขณะที่ *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 มีลักษณะรูปร่าง ติดสีม่วงเป็นแกรมบวก มีโครงสร้างเอนโดสปอร์ (ตารางที่ 8 และ ภาพที่ 26) และเมื่อนำเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์นี้มาจัดจำแนกชนิดด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และเปรียบเทียบในฐานข้อมูลของ GenBank/EMBL/DDBJ พบว่าเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ SRNB23 และ SRNB35 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Alcaligenes* โดยมีค่าความคล้ายคลึง (similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์กับแบคทีเรีย *A. faecalis* ที่ 98 และ 91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ Ba 9 มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus oceanisediminis* เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ และ SF-1 มีความคล้ายคลึงกับ *B. vietnamensis* เท่ากับ 92 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในแผนภูมิวิวัฒนาการ (ภาพที่ 27)

ตารางที่ 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์

Characteristic	SRNB23	SRNB35	Ba9	SF-1
Shape	Rod	Rod	Rod	Rod
Pigmentation	Cream	Orange	White	yellow orange
Gram's stain	Negative	Negative	Positive	Positive
Endospore forming	-	-	+	+



ภาพที่ 26 ลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์:
a), e) *A. faecalis* SRNB23; b), f) *A. faecalis* SRNB35; c), g) *B. oceanisediminis* Ba9; d), h) *B. vietnamensis* SF-1



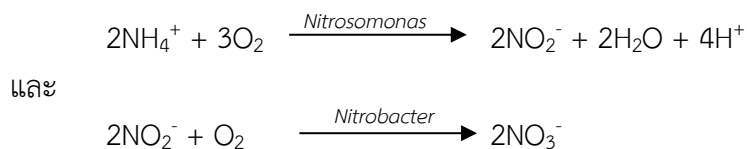
ภาพที่ 27 แผนภูมิวิวัฒนาการของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยศึกษาจากยีน 16S rRNA (Bar=0.05)

จุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีบทบาทที่สำคัญมากต่อระบบนิเวศในแหล่งเลี้ยง โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่พบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป แบคทีเรียมีบทบาทในการหมุนเวียนธาตุอาหารต่าง ๆ ในระบบนิเวศแหล่งน้ำเพื่อให้เกิดความสมดุล ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำส่วนใหญ่โดยเฉพาะสัตว์น้ำกินเนื้อ จะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีส่วนประกอบของโปรตีนมากกว่า 35 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสัตว์น้ำสามารถนำสารอาหารเหล่านี้มาใช้ในการเจริญเติบโตและกระบวนการเมตาบอลิ

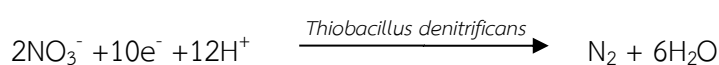
ซึม (metabolism) เพียงบางส่วนเท่านั้น จึงยังเหลือสารอาหารตกค้างอยู่ในแหล่งเลี้ยง เกิดคั่งสะสมในน้ำและดินตะกอนพื้นบ่อ ซึ่งสารอาหารเหล่านี้ถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในระบบนิเวศให้มีปริมาณลดลง และไม่เกิดการสะสมในแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมากเกินไป จนส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำและการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ (สุบัตินิต และวีรพงศ์, 2552) กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในแหล่งน้ำ เช่น กลุ่มเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus*, *Alcaligenes* และ *Halomonas* (Sangnoi et al., 2017; Chankaew et al., 2018) และกลุ่มออโตโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรีย ได้แก่ *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*, *Nitrobacter* และ *Nitrococcus* เป็นต้น (Joo et al., 2005; Wen and Wei, 2011; Yang et al., 2011; Zhang et al., 2012; Guo et al., 2013; Yao et al., 2013)

ในการศึกษาครั้งนี้ เฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Alcaligenes faecalis* SRNB 23, *A. faecalis* SRNB 35, *Bacillus oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 มีความสามารถในการลดแอมโมเนียได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 28 a)) แต่พบว่าสายพันธุ์ *B. vietnamensis* SF-1 มีความสามารถในการลดแอมโมเนียและเปลี่ยนให้เป็นไนไตรท์หรือไนเตรทได้มากที่สุด (ภาพที่ 28 b)) โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับแบคทีเรียอีก 3 สายพันธุ์ที่มีไนเตรทหรือมีไนเตรทน้อยมาก ซึ่งอาจเกิดจากแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์นี้ เป็นเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียที่มีความสามารถในการนำแอมโมเนียไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตและการสร้างเซลล์ (ammonium assimilation) แต่ไม่มีความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ หรือมีความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์ แต่ไม่สามารถออกซิไดซ์ไนไตรท์ไปเป็นไนเตรท ในขณะที่ *B. vietnamensis* SF-1 ได้มีการรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดไนไตรท์ได้ดี (Noorak et al., 2018) หรือเชื้อกลุ่มนี้อาจเป็นเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่มีความสามารถทำให้เกิดได้ทั้งปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันในสภาพมีอากาศ (aerobic-denitrification) ส่งผลให้ไนเตรทถูกเปลี่ยนเป็นแก๊สไนโตรเจนอิสระ จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบไนเตรทได้ เมื่อศึกษาความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียของกล้าเชื้อผสมพบว่า กล้าเชื้อผสมบางสูตรมีความสามารถในการลดแอมโมเนียได้มากกว่ากล้าเชื้อเดี่ยว ซึ่งกล้าเชื้อผสมระหว่าง *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้สูงสุด และสร้างปริมาณไนเตรทได้สูงสุดเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 29) โดยปกติในการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชัน จะต้องอาศัยออโตโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรีย 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม AOB และ กลุ่ม NOB ในการทำปฏิกิริยา แต่พบว่ามีเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรีย เช่น *Alcaligenes* spp., *Bacillus* spp., *Halomonas* spp. และ *Pseudomonas* spp. ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนแอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์และไนเตรท ได้เช่นเดียวกันกับออโตโทรฟิคแบคทีเรีย (Joo et al., 2005; Wen and Wei, 2011; Yang et al., 2011; Zhang et al., 2011; Lu et al., 2012; Zhang et al., 2012; Guo et al., 2013) และพบว่าเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียบางกลุ่มสามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันในสภาพมีอากาศได้ (aerobic-denitrification) (Joo et al., 2005; Wen and Wei, 2011; Yang et al., 2011; Zhang et al., 2012; Guo et al., 2013; Yao et al., 2013; Su et al., 2015) โดยทั่วไปแล้วไนตริไฟอิงแบคทีเรียกับดีไนตริไฟอิงแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียคนละ

กลุ่มกัน คือ ไนตริไฟอิงแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดปฏิกิริยานิตริฟิเคชันซึ่งต้องการออกซิเจนในการเกิดปฏิกิริยา (ดังสมการ) ดังนั้นแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงเป็นกลุ่มแอโรบ (aerobe)



ส่วนดีไนตริไฟอิงแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันซึ่งไม่ต้องการออกซิเจนในการเกิดปฏิกิริยา ดังสมการ

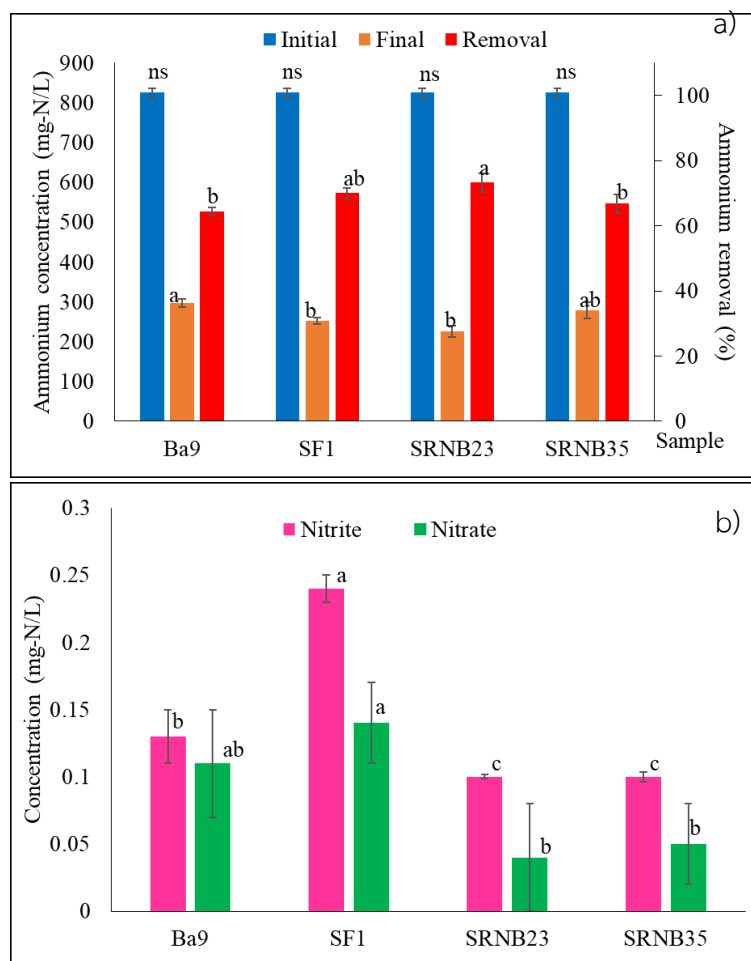


ดังนั้นแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงเป็นกลุ่มแอนแอโรบ (anaerobe) แต่ในขณะที่ทำการทดลองนั้นมีการให้อากาศโดยการเขย่าด้วยเครื่องเขย่า สภาวะในการทดลองจึงอยู่ในสภาวะมีอากาศ แบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้จึงเป็นพวกแอโรบ และปฏิกิริยาที่สามารถเกิดขึ้นได้ควรเป็นปฏิกิริยานิตริฟิเคชันที่มีผลให้แอมโมเนียถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ และถูกเปลี่ยนต่อเป็นไนเตรท ตามลำดับ แต่การทดลองครั้งนี้กลับไม่มีไนเตรทหรือมีไนเตรทน้อยมาก ซึ่งอาจเกิดจากแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นเฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการนำแอมโมเนียไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตและการสร้างเซลล์ แต่ไม่มีความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์และออกซิไดซ์ไนไตรท์ต่อไปเป็นไนเตรทได้ หรือเชื้อกลุ่มนี้อาจเป็นเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่มีความสามารถทำให้เกิดได้ทั้งปฏิกิริยานิตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันในสภาพมีอากาศ (aerobic-denitrification) ส่งผลให้ไนเตรทถูกเปลี่ยนเป็นแก๊สไนโตรเจนอิสระจึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบไนเตรทได้ เช่น *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Bacillus* และ *Alcaligenes* (Joo et al., 2005; Song et al., 2011; Wen and Wei, 2011; Zhang et al., 2011; Chen et al., 2012; Guo et al., 2013; Chankaew et al., 2018) อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาองค์ประกอบของแก๊สไนโตรเจนที่เกิดขึ้นในพลาสติก

2. ประสิทธิภาพการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมในระบบปิด (ระดับพลาสติก)

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนของเชื้อเดี่ยวเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร modified high ammonium medium พบว่าเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *A. faecalis* SRNB23 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการกำจัดแอมโมเนียได้ถึง 72.79 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณไนไตรท์และไนเตรทเพิ่มขึ้น 0.01 และ 0.04 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับแบคทีเรียอีก 3 สายพันธุ์ ในขณะที่สายพันธุ์ *B. oceanisediminis* Ba9, *B. vietnamensis* SF-1 และ *A. faecalis* SRNB35 มีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียสูงโดยสามารถลดแอมโมเนียได้ 64.24, 69.44 และ 66.21

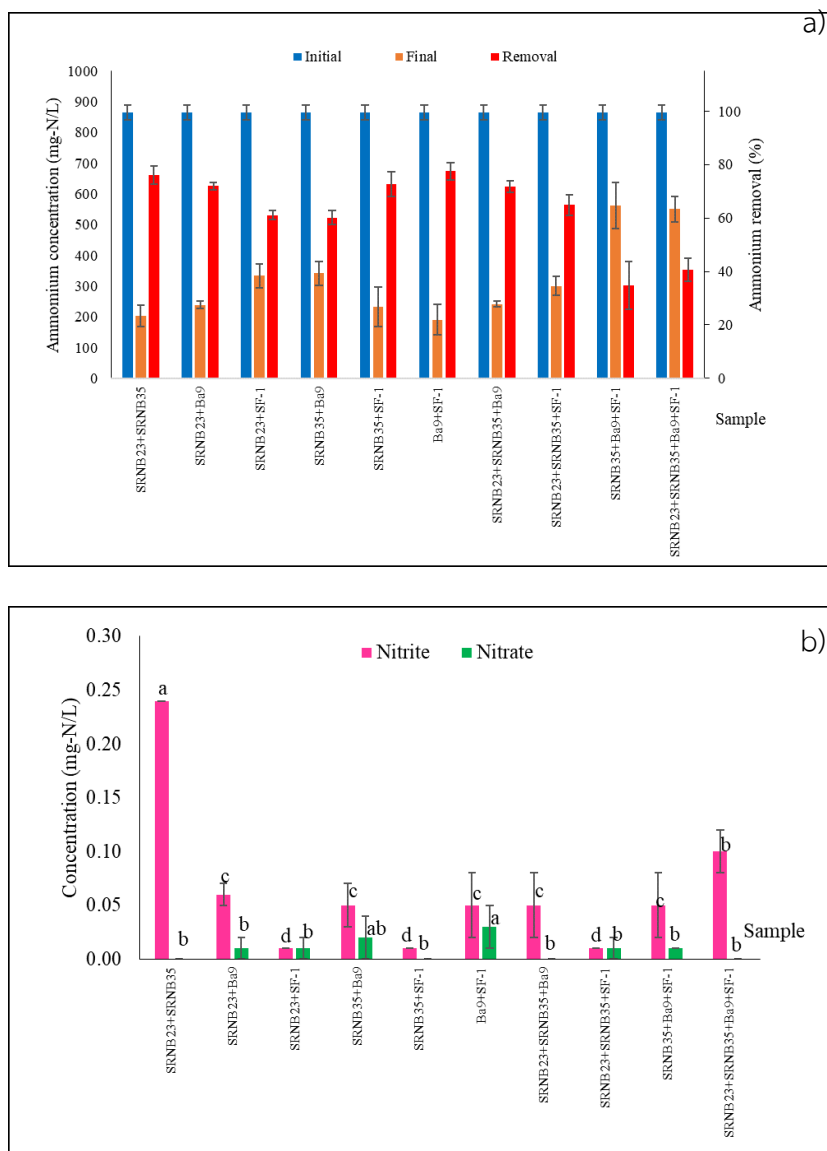
เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 28 a)) มีปริมาณไนโตรท์เพิ่มขึ้น 0.01, 0.24 และ 0.01 มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ และมีปริมาณไนเตรท 0.08, 0.14 และ 0.05 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 28 b))



ภาพที่ 28 ความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนของเชื้อเดี่ยวเฮเทอโรโทรฟิกไนไตรไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์: a) ประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนีย; b) ปริมาณไนโตรท์และไนเตรทที่เกิดขึ้น

ในส่วนของการศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบไนโตรเจนของกล้ำเชื้อผสมเฮเทอโรโทรฟิกไนไตรไฟอิงแบคทีเรียหนเค้มในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified high ammonium medium พบว่ากล้ำเชื้อผสมระหว่าง *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียสูงสุดโดยสามารถกำจัดแอมโมเนียได้ 77.92 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 29 a)) มีปริมาณไนโตรท์ 0.05 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และไนเตรท 0.03 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (ภาพที่ 29 b)) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับสูตรเชื้อผสมที่เหลือ นอกจากนี้กล้ำเชื้อผสมระหว่าง *A. faecalis* SRNB35, *B. oceanisediminis* Ba9 และ

B. vietnamensis SF-1 มีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียต่ำที่สุดเท่ากับ 34.95 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 29 a))



ภาพที่ 29 ความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนของเชื้อผสมเฮเทอโรโทรฟิก ไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์: a) ประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนีย; b) ปริมาณไนไตรท์และไนเตรทที่เกิดขึ้น

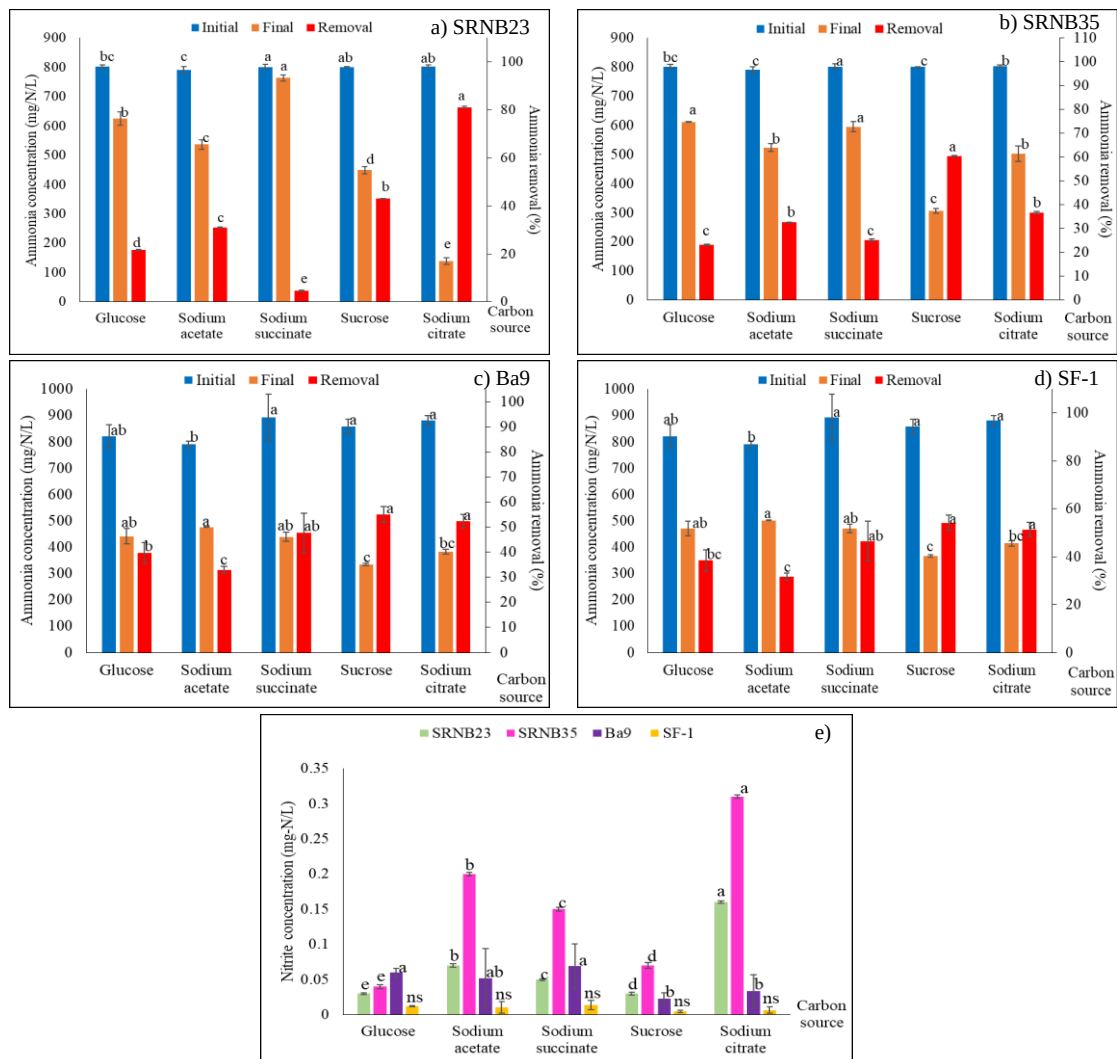
โดยทั่วไปเฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรียสามารถทำงานได้ดีที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ เช่น *Bacillus subtilis* มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้ 58 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 5 วัน เมื่อมีปริมาณของแอมโมเนียเริ่มต้นอยู่ที่ 104 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (Yang *et al.*, 2011) ส่วนเฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรีย *Alcaligenes* sp. มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้ 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้นที่ 434.47 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ภายในเวลา 4 วัน (Lu *et al.*, 2012)

แต่มีเฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถกำจัดแอมโมเนียได้ดีเมื่อมีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงถึง 1,200 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เช่น *Alcaligenes faecalis* (Joo et al., 2005) เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรียสามารถลดปริมาณแอมโมเนียความเข้มข้นสูงได้ดีเช่นกัน โดยอาหารเหลว modified Pep-Beef-AOM มีปริมาณของแอมโมเนียเริ่มต้นอยู่ในช่วง 825.16 – 864.79 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ถึงแม้ว่าจะมีประสิทธิภาพในการลดแอมโมเนียได้ แต่ไม่สามารถที่จะเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนไตรท์และเปลี่ยนไนไตรท์เป็นไนเตรทได้ หรืออาจเปลี่ยนได้เพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตาม เฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะโดดเด่น คือ สามารถกำจัดแอมโมเนียที่มีความเข้มข้นสูงในสภาวะเค็มได้ นอกจากนี้ Guo et al. (2013) ได้รายงานประสิทธิภาพของ *Halomonas campisalis* ha3 ในน้ำเสียที่มีความเค็ม โดยสามารถลดแอมโมเนียได้ 71 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมง (แอมโมเนียเริ่มต้น 140 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ลดไนไตรท์และไนเตรทได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 12 และ 8 ชั่วโมงตามลำดับ รวมถึงเกิดอัตราดีไนตริฟิเคชันที่มีอากาศ 87.5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง

3. สภาวะที่เหมาะสมของกล้าเชื้อในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจน

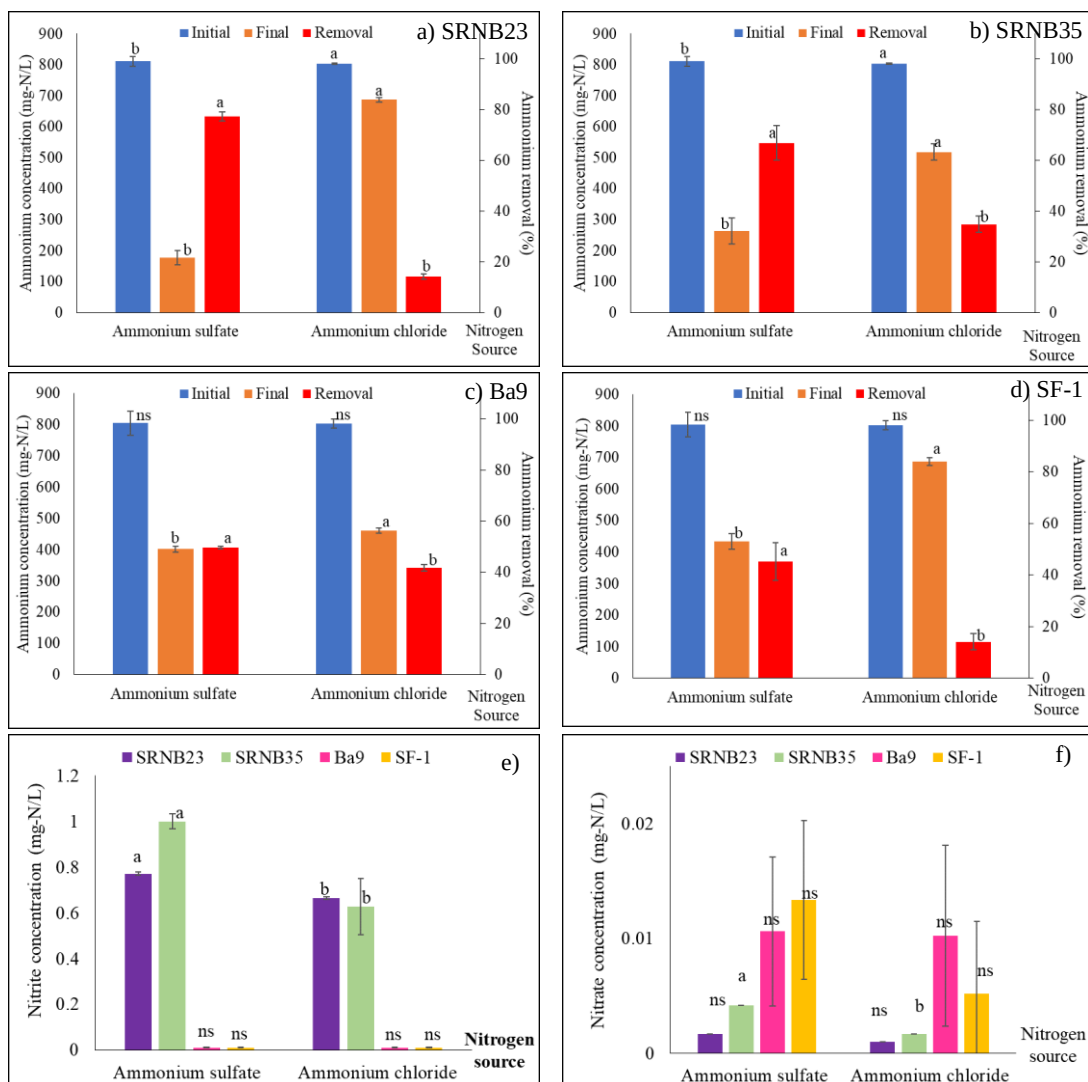
1) แหล่งคาร์บอน (Carbon source) และแหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source) ที่เหมาะสม

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *A. faecalis* SRNB23, *A. faecalis* SRNB35, *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงสายพันธุ์ *A. faecalis* SRNB23 คือ sodium citrate ซึ่งสามารถกำจัดแอมโมเนียได้ 82.47 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 30 a)) และพบไนไตรท์ 0.16 ± 0.00 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (ภาพที่ 30 e)) ในขณะที่แหล่งคาร์บอนอื่นให้ผลการกำจัดแอมโมเนียต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดย sodium succinate ให้ผลในการกำจัดแอมโมเนียน้อยที่สุดเพียง 4.67 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ส่วนแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดของสายพันธุ์ *A. faecalis* SRNB35, *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 คือ sucrose ซึ่งสามารถกำจัดแอมโมเนียได้เท่ากับ 60.60, 61.05 และ 57.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 30 b)-d)) และเกิดไนไตรท์ 0.07 ± 0.00 , 0.02 ± 0.01 และ 0.00 ± 0.00 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 30, ตารางที่ 11-14) ทั้งนี้ในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถตรวจพบปริมาณของไนเตรท



ภาพที่ 30 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์: a) แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของ *A. faecalis* SRNB23; b) แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของ *A. faecalis* SRNB35; c) แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของ *B. oceanisediminis* Ba9; d) แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของ *B. vietnamensis* SF-1; e) ปริมาณไนโตรเจนที่เกิดขึ้น

สำหรับการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์นั้น ใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ กล่าวคือ ใช้ sodium citrate เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อสายพันธุ์ *A. faecalis* SRNB23 และ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อสายพันธุ์ *A. faecalis* SRNB35, *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 จากผลการศึกษาพบว่า ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์และมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยที่ *A. faecalis* SRNB23 สามารถลดแอมโมเนียได้ 78.13 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 31 a)) และ *A. faecalis* SRNB35 สามารถลดแอมโมเนียได้ 56.58 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 31 b)) เกิดไนไตรท์ 0.77 ± 0.00 และ 0.10 ± 0.00 (ภาพที่ 31 e)) มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรตามลำดับ และไม่สามารถตรวจพบปริมาณไนเตรท ในขณะที่ *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 สามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้ 50.53 และ 46.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 31 c) - d)) พบปริมาณไนไตรท์ 0.01 ± 0.00 และ 0.00 ± 0.00 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรตามลำดับ (ภาพที่ 31 e)) และพบปริมาณไนเตรท 0.01 ± 0.00 และ 0.01 ± 0.00 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (ภาพที่ 31 f))



ภาพที่ 31 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์: a) แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมของ *A. faecalis* SRNB23; b) แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมของ *A. faecalis* SRNB35; c) แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมของ *B. oceanisediminis* Ba9; d) แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมของ *B. vietnamensis* SF-1; e) ปริมาณไนไตรท์ที่เกิดขึ้น; f) ปริมาณไนเตรทที่เกิดขึ้น

2) สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสม

จากผลการศึกษาสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่แตกต่างกันในการทดลองที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน โดย *A. faecalis* SRNB23 ใช้ sodium citrate เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าค่า C/N ratio ที่เหมาะสมที่สุดเท่ากับ 4 ซึ่งสามารถกำจัดแอมโมเนียได้สูงที่สุดเท่ากับ 75.28 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 32 a)) พบปริมาณไนโตรเจน 0.03±0.00 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และไนเตรท 0.01±0.00 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (ภาพที่ 32 e, f) รองลงมาคือ C/N ratio เท่ากับ 8 สามารถกำจัดแอมโมเนียได้ 71 เปอร์เซ็นต์ พบปริมาณไนโตรเจน 0.03±0.00 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และไนเตรท 0.01±0.00 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ขณะที่ C/N ratio เท่ากับ 0 สามารถกำจัดแอมโมเนียได้น้อยที่สุดเท่ากับ 26.06 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 32 a)) ส่วนสายพันธุ์ *A. faecalis* SRNB35, *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 ใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าค่า C/N ratio ที่เหมาะสมที่สุดเท่ากับ 2 สำหรับสายพันธุ์ *A. faecalis* SRNB35 ซึ่งสามารถกำจัดแอมโมเนียได้สูงที่สุดเท่ากับ 52 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 32 b)) พบปริมาณไนโตรเจน 0.07±0.03 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และไนเตรท 0.00±0.00 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (ภาพที่ 32 e, f) ขณะที่ค่า C/N ratio สัดส่วนอื่นสามารถกำจัดแอมโมเนียได้น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 32 b)) และค่า C/N ratio ที่เหมาะสมที่สุดของเชื้อสายพันธุ์ *B. oceanisediminis* Ba9 มีค่าเท่ากับ 4 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการบำบัดแอมโมเนียสูงสุดเท่ากับ 42.55 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 32 c)) พบปริมาณไนโตรเจน 0.01±0.00 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และไนเตรท 0.01±0.00 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (ภาพที่ 32 e, f) ขณะที่ค่า C/N ratio เท่ากับ 0 มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียต่ำที่สุด 19.94 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 32 c)) สำหรับค่า C/N ratio ที่เหมาะสมที่สุดของเชื้อสายพันธุ์ *B. vietnamensis* SF-1 มีค่าเท่ากับ 8 ซึ่งสามารถกำจัดแอมโมเนียได้สูงถึง 71.15 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 32 d)) พบปริมาณไนโตรเจน 0.03±0.00 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และไนเตรท 0.02 ±0.00 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (ภาพที่ 32 e, f) สัดส่วนที่ค่า C/N ratio เท่ากับ 0 พบว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียต่ำสุดเท่ากับ 44.41 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 32 d))

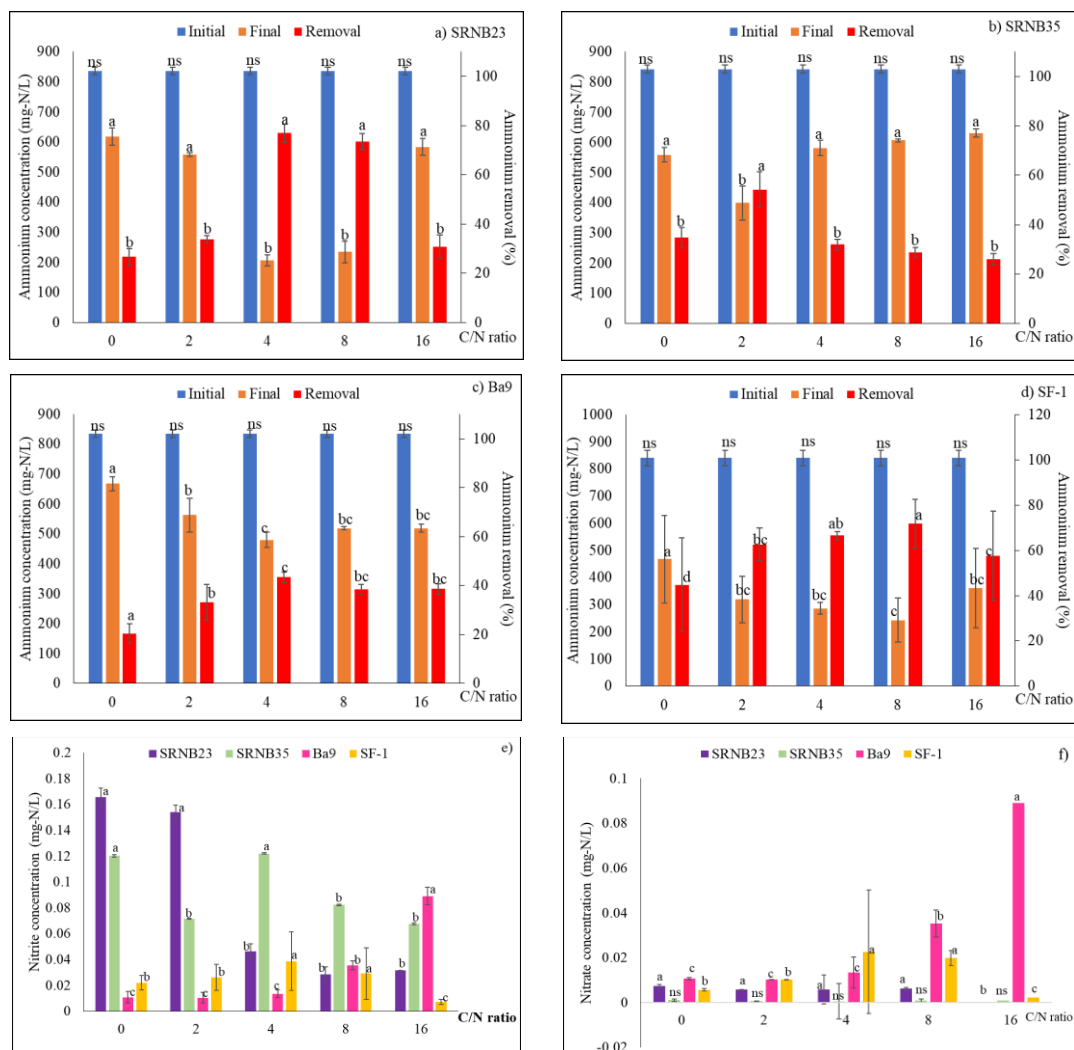
จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *A. faecalis* SRNB23 และ *A. faecalis* SRNB 35 พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *A. faecalis* SRNB23 คือ sodium citrate และแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดของสายพันธุ์ *A. faecalis* SRNB35, *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 คือ sucrose สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์นั้น คือ ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Lu et al. (2012) ที่รายงานว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรีย *Alcaligenes* sp. W1 คือ sodium citrate และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด คือ ammonium sulfate โดยเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *Alcaligenes* sp. SRNB23 ที่ใช้ใน

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ sodium citrate เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม และมี ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมด้วยเช่นกัน

ในขณะที่ Yang *et al.* (2011) รายงานว่าประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของ *Bacillus subtilis* A1 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่ acetate, glucose, sodium acetate และ succinate และมี ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจน

สำหรับสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ พบว่า *A. faecalis* SRNB23 และ *B. oceanisediminis* Ba9 มี C/N ratio ที่เหมาะสมที่สุดเท่ากับ 4 ซึ่งสามารถกำจัดแอมโมเนียได้สูงที่สุดเท่ากับ 75.28 เปอร์เซ็นต์ และ 42.55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สายพันธุ์ *A. faecalis* SRNB35 มีค่า C/N ratio ที่เหมาะสมที่สุดเท่ากับ 2 ซึ่งสามารถกำจัดแอมโมเนียได้สูงที่สุดเท่ากับ 52 เปอร์เซ็นต์ และ ค่า C/N ratio ที่เหมาะสมที่สุดของเชื้อสายพันธุ์ *B. vietnamensis* SF-1 เท่ากับ 8 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kim *et al.* (2005) ที่ระบุว่าค่า C/N ratio ที่เหมาะสมที่สุดของ *Bacillus* โดยมี glucose เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจน ว่ามีค่า C/N ratio เท่ากับ 8 ซึ่งเป็นสัดส่วนที่สามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้สูงที่สุด ในขณะที่ Hu *et al.* (2009) รายงานว่าเมื่อใช้ sodium acetate เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับไนตริไฟอิงแบคทีเรีย *Nitrosomonas europaea* และ *Nitrobacter* sp. พบว่าเมื่อค่า C/N ratio เพิ่มขึ้นจาก 0.5, 1, 2, 4, 8, และ 16 จะสามารถกำจัดปริมาณแอมโมเนียได้มากขึ้นตามลำดับ ในขณะที่ Yang *et al.* (2011) ได้รายงานไว้ที่ค่า C/N ratio เท่ากับ 2 แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* A1 สามารถลดแอมโมเนียได้ต่ำสุด ในขณะที่สามารถลดแอมโมเนียได้สูงสุดที่ค่า C/N ratio เท่ากับ 6 ส่วน Lu *et al.* (2012) รายงานว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรีย *Alcaligenes* sp. W1 คือ sodium citrate ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาค้นคว้าที่เฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *Alcaligenes* sp. SRNB23 ที่มี sodium citrate เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมด้วยเช่นกัน ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดของ *Alcaligenes* sp. W1 คือ ammonium sulfate ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองครั้งนี้ที่ ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมของเฮเทอโรโทรฟิคทั้ง 4 สายพันธุ์ สำหรับค่า C/N ratio พบว่าที่ค่าเท่ากับ 12 ทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของ *Alcaligenes* sp. W1 ดีที่สุด ขณะที่ค่า C/N ratio เท่ากับ 0.5 มีประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียต่ำที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ค่า C/N ratio เท่ากับ 0 คือไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน มีประสิทธิภาพต่ำสุด เนื่องด้วยแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์เป็นเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรีย จึงจำเป็นต้องใช้คาร์บอนเป็นสารอาหารด้วย ในทางตรงข้ามกันเมื่อค่า C/N ratio มากกว่า 10 แบคทีเรียจะเปลี่ยนกลไกจากกระบวนการไนตริฟิเคชันเป็นแอสซิมิเลชัน (assimilation) ทำให้เกิดตะกอนเซลล์ เรียกว่าไบโอฟล็อก (biofloc) ซึ่งแอมโมเนียจะถูกนำมาใช้ในการสร้างเซลล์แทนการเปลี่ยนเป็นไนไตรท์และไนเตรท

ทั้งนี้นักวิจัยกล่าวว่าปริมาณคาร์บอนเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการกำจัดแอมโมเนีย เพราะเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียจำเป็นต้องใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต เมื่อมีการเจริญเติบโตดี จะส่งผลให้ความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียดีไปด้วย (Bernat and Wojnowska-Baryła, 2007)

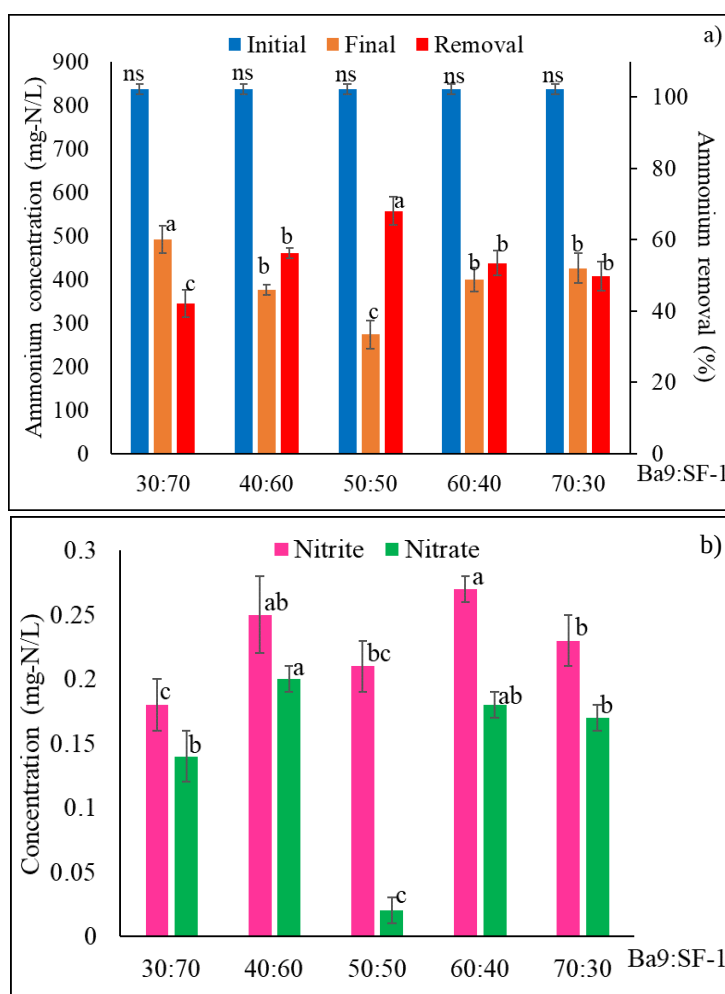


ภาพที่ 32 สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์: a) *A. faecalis* SRNB23; b) *A. faecalis* SRNB35; c) *B. oceanisediminis* Ba9; d) *B. vietnamensis* SF-1; e) ปริมาณไนไตรท์ที่เกิดขึ้น; f) ปริมาณไนเตรทที่เกิดขึ้น

4. สัดส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อผสม

เมื่อได้กล้าเชื้อผสมที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียมากที่สุด คือ *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 นำมาศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมที่ 30:70, 40:60, 50:50, 60:40 และ 70:30 พบว่า สัดส่วนระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 ที่ 50:50 สามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้สูงที่สุดเท่ากับ 66.59 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ สัดส่วน 40:60, 60:40, 70:30 และ 30:70 มีประสิทธิภาพลดปริมาณแอมโมเนียได้ 55.02, 52.27, 49.09 และ 41.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 33 a) พบปริมาณไนไตรท์และไนเตรทที่สัดส่วน 50:50 เท่ากับ 0.21 ± 0.02 และ 0.02 ± 0.01 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

ตามลำดับ ในขณะที่สัดส่วน 40:60, 60:40, 70:30 และ 30:70 มีปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 0.25 ± 0.03 , 0.27 ± 0.01 , 0.23 ± 0.02 และ 0.18 ± 0.02 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ ในส่วนของไนเตรทมีปริมาณ 0.20 ± 0.01 , 0.18 ± 0.01 , 0.17 ± 0.01 และ 0.14 ± 0.02 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 33 b)) ซึ่งได้นำกล้าเชื้อผสมระหว่าง *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 ในสัดส่วน 50:50 ไปผลิตเป็นกล้าเชื้อสูตรผงและสูตรน้ำสำหรับการบำบัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งต่อไป จากการทดลองพบว่ามีผลแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลองที่มีสัดส่วนของกล้าเชื้อผสมที่สัดส่วนแตกต่างกัน



ภาพที่ 33 การทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนของสัดส่วนเชื้อผสมสายพันธุ์ *B. oceanisediminis* Ba9 ต่อ *B. vietnamensis* SF-1: a) ประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนีย; b) ปริมาณไนโตรเจนและไนเตรทที่เกิดขึ้น

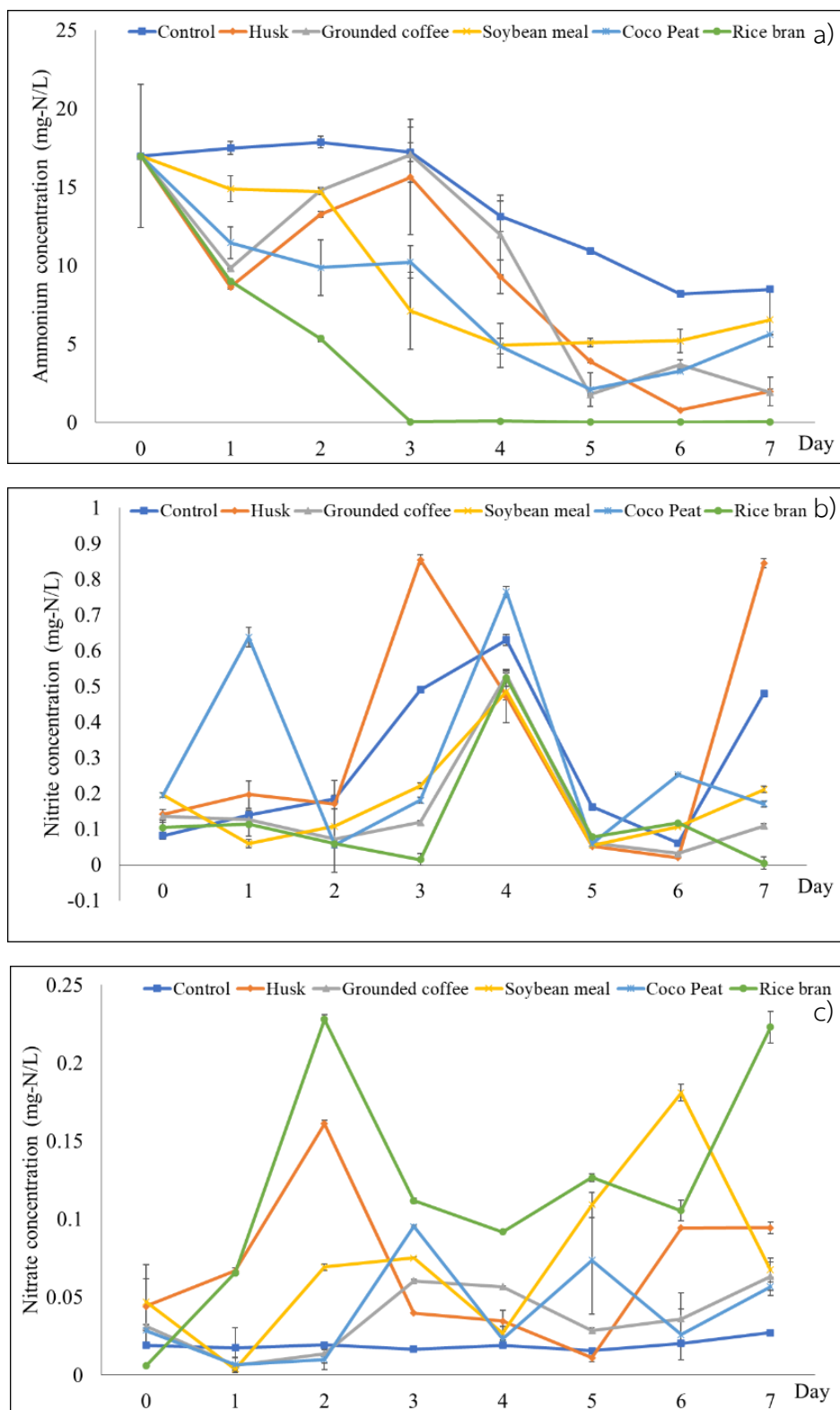
5. การศึกษาวัสดุยัดเกาะที่เหมาะสมและเปรียบเทียบประสิทธิภาพสูตรผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเห็ดเหอโรโทรฟิคในไตรฟองแบคทีเรียสูตรผง

จากการศึกษาวัสดุยัดเกาะที่เหมาะสมจากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรจำนวน 5 ชนิด คือ แกลบละเอียด (husk) กาแฟ (grounded coffee) ถั่วเหลือง (soybean meal) ขุยมะพร้าว (coco peat) และรำข้าว (rice bran) โดยที่ตลอด 7 วันของการทดลองได้ให้อากาศตลอดเวลา จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนีย พบว่าในชุดการทดลองที่ใช้รำข้าวเป็นวัสดุยัดเกาะมีประสิทธิภาพในการลดแอมโมเนียได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับทุกชุดการทดลอง โดยสามารถลดแอมโมเนียความเข้มข้น 16.96 ± 4.56 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในวันที่ 0 เหลือ 0.04 ± 0.01 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรในวันที่ 3 ของการทดลอง และมีความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 ± 0.01 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรในวันสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่ชุดการทดลองที่ใช้แกลบละเอียดและกาแฟจะลดลงวันที่ 1 และเพิ่มขึ้นในอีกครั้งจนถึงวันที่ 3 ของการทดลอง หลังจากนั้นก็มีแนวโน้มลดลงจนสิ้นสุดการทดลอง (ภาพที่ 34 a))

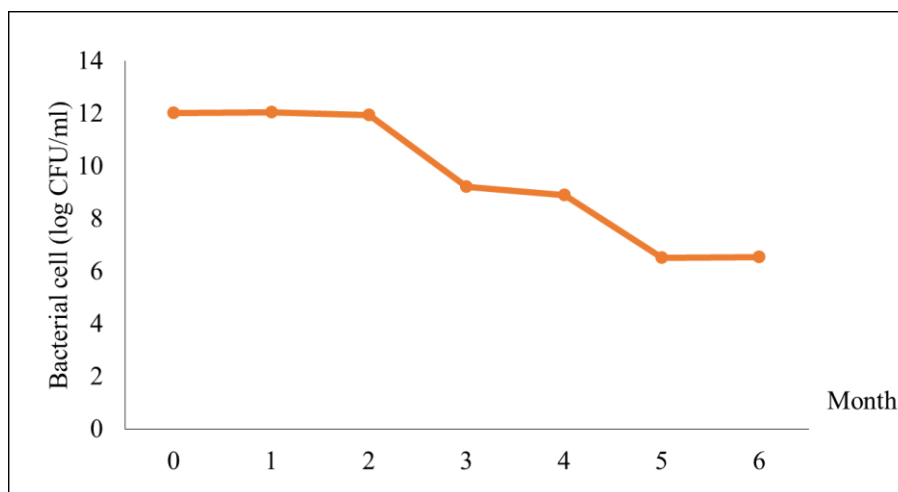
จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน พบว่าทุกชุดการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงของไนโตรเจนตลอดการทดลอง โดยชุดการทดลองที่ใช้แกลบละเอียดเป็นวัสดุยัดเกาะมีปริมาณไนโตรเจนเพิ่มสูงสุดในวันที่ 3 (0.85 ± 0.12 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) หลังจากนั้นลดลงและเพิ่มขึ้นในวันที่ 7 ของการทดลอง (0.84 ± 0.01 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) เช่นเดียวกับชุดควบคุมที่มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของปริมาณไนโตรเจนในวันที่ 4 จากนั้นลดลงและเพิ่มขึ้นสูงอีกครั้งในวันที่ 7 (0.63 ± 0.02 และ 0.48 ± 0.00 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ) ในขณะที่ชุดการทดลองที่ใช้รำข้าวเป็นวัสดุยัดเกาะพบว่าปริมาณไนโตรเจนลดลงเล็กน้อยในช่วงต้นของการทดลองและเพิ่มสูงในวันที่ 4 ของการทดลองเท่ากับ 0.47 ± 0.02 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และมีแนวโน้มลดลงจนวันสุดท้ายสอดคล้องกับปริมาณแอมโมเนียที่ลดลงด้วยเช่นกัน (ภาพที่ 34 b))

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตรต พบว่าชุดการทดลองที่ใช้รำข้าวเป็นวัสดุยัดเกาะมีปริมาณของไนเตรตสูงกว่าทุกชุดการทดลอง โดยที่ความเข้มข้นของไนเตรตเพิ่มขึ้นสูงในวันที่ 2 (0.23 ± 0.00 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) จากนั้นลดลง และเพิ่มขึ้นสูงอีกครั้งในวันที่ 7 ของการทดลอง (0.22 ± 0.01 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของปริมาณแอมโมเนียและไนโตรเจน ในขณะที่ชุดการทดลองอื่น ๆ มีการเปลี่ยนแปลงตลอดการทดลอง ยกเว้นชุดควบคุมที่ปริมาณของไนเตรตไม่เปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 34 c))

จากผลการศึกษาความมีชีวิตของเซลล์ของกล้าเชื้อที่มีรำข้าวเป็นสารพา และโซเดียมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเป็นสารเชื่อม พบว่าระหว่างการเก็บรักษาในระยะเวลา 6 เดือน ปริมาณเชื้อเริ่มต้นสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อสูตรผงอยู่ในช่วง 10^{14} CFU/g ทำการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มลดลง ในเดือนที่ 0 ถึง 2 ความมีชีวิตของแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อสูตรผงอยู่ในช่วง 1.94×10^{12} ถึง 2.03×10^{12} CFU/g ในเดือนที่ 3 มีจำนวนเชื้อลดลงอยู่ที่ 2.30×10^9 CFU/g เดือนที่ 4 มีจำนวน 2.91×10^8 CFU/g ในเดือนที่ 5 และ 6 มีจำนวนเชื้อเหลือ 2.51×10^6 และ 2.55×10^6 CFU/g ตามลำดับ (ภาพที่ 35)



ภาพที่ 34 ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อสูตรผงโดยใช้วัสดุยัดเกาะจากเศษเหลือทางการเกษตร: a) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนียระหว่างการทดลอง; b) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนไตรท์ระหว่างการทดลอง; c) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตรทระหว่างการทดลอง



ภาพที่ 35 ความมีชีวิตเชื้อระหว่างการเก็บรักษาในระยะเวลา 6 เดือน ของกล้าเชื้อสูตรผงที่มีรำข้าวเป็นสารพา

ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของกมลรัตน์ และคณะ (2563) ที่ได้ศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ *Bacillus* spp. โดยใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรมาเป็นตัวยัดเกาะในการบำบัดน้ำจากการเลี้ยงปลานิล พบว่า กล้าเชื้อ *B. safensis* ที่ผสมกับรำข้าวสามารถลดปริมาณแอมโมเนีย จาก 2.0 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรเหลือ 1.6 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ลดไนไตรท์ จาก 1.9 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรเหลือ 1.6 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และพบปริมาณไนเตรทในวันที่ 15 ของการทดลองที่ 1.6 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ทั้งนี้รำข้าวมีปริมาณสารอาหารและแร่ธาตุในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน เช่น เฮมิเซลลูโลส มีส่วนประกอบของน้ำตาล เช่น กลูโคส และซูโครส มีความชื้น 8-12 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 12-16 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 17-22 เปอร์เซ็นต์ และเยื่อใย 8-12 เปอร์เซ็นต์เป็นส่วนประกอบ (Caroll, 1990) ซึ่งเป็นสารอาหารที่ *Bacillus* สามารถย่อยได้โดยใช้ Extracellular enzyme กลุ่ม Proteolytic enzyme และผลิตเอนไซม์ที่คล้ายกับเอนไซม์ Protease, Amylase และ Lipase ที่สามารถช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ (กฤษณา และคณะ, 2557; Suharti and Vries, 2004) ทำให้ *Bacillus* สามารถใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนและสามารถเปลี่ยนสารอินทรีย์ไปเป็นสารอนินทรีย์ในการบำบัดคุณภาพน้ำได้ง่ายกว่าวัสดุเศษเหลือชนิดอื่น

6. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มในการบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งในท้องปฏิบัติการ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของกล้าเชื้อผสมเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็ม *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 (สัดส่วน 50:50) ทั้งสูตรน้ำและสูตรผงที่ใช้รำข้าวเป็นวัสดุยัดเกาะ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม Control คือ ชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งและไม่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ, Negative คือ ชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียปราศจากเชื้อจากการเลี้ยงกุ้งและไม่เติมกล้าเชื้อ, Positive คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ ปม.1, LQ คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ และ PD คือ ชุด

การทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรผง เป็นระยะเวลา 7 วัน มีผลคุณภาพน้ำบางประการ ดังนี้

1) การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช (pH) ในระหว่างการทดลอง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงพีเอช พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยทั้ง 5 ชุดการทดลอง (ภาพที่ 36 a)) กล่าวคือ ชุดควบคุมมีค่าพีเอชเฉลี่ยตลอดการทดลอง 8.16 ± 0.16 ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ ปม.1 มีค่าพีเอชเฉลี่ยตลอดการทดลอง 8.14 ± 0.06 ชุดการทดลองที่ฆ่าเชื้อมีค่าพีเอชเฉลี่ยตลอดการทดลอง 8.33 ± 0.24 ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ มีค่าพีเอชเฉลี่ยตลอดการทดลอง 8.12 ± 0.06 และชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรผง มีค่าพีเอชเฉลี่ยตลอดการทดลอง 8.03 ± 0.07 (ตารางที่ 27)

2) การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างการทดลอง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (ภาพที่ 36 b)) และตารางที่ 28 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย โดยในชุดควบคุม มีอุณหภูมิเฉลี่ยตลอดการทดลอง 29.00 ± 1.17 องศาเซลเซียส ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ ปม.1 มีอุณหภูมิเฉลี่ยตลอดการทดลอง 28.67 ± 0.51 องศาเซลเซียส ชุดการทดลองที่ฆ่าเชื้อมีอุณหภูมิเฉลี่ยตลอดการทดลอง 29.09 ± 0.40 องศาเซลเซียส ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำมีอุณหภูมิเฉลี่ยตลอดการทดลอง 28.91 ± 0.41 องศาเซลเซียส และชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรผงมีอุณหภูมิเฉลี่ยตลอดการทดลอง 29.31 ± 0.37 องศาเซลเซียส

3) การเปลี่ยนแปลงออกซิเจนละลายน้ำระหว่างการทดลอง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงออกซิเจนละลายน้ำ (ภาพที่ 36 c)) และตารางที่ 29 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย โดยในชุดควบคุม มีออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ยตลอดการทดลอง 6.68 ± 0.11 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ ปม.1 มีออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ยตลอดการทดลอง 6.59 ± 0.12 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดการทดลองที่ฆ่าเชื้อมีออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ยตลอดการทดลอง 6.42 ± 0.12 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำมีออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ยตลอดการทดลอง 6.47 ± 0.17 มิลลิกรัมต่อลิตร และชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรผงมีออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ยตลอดการทดลอง 6.50 ± 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร

4) การเปลี่ยนแปลงความเค็มระหว่างการทดลอง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเค็ม (ภาพที่ 36 d)) และตารางที่ 30 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเช่นกัน โดยในชุดควบคุมมีความเค็มเฉลี่ยตลอดการทดลอง 21.10 ± 0.84 ppt ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ ปม.1 มีความเค็มเฉลี่ยตลอดการทดลอง 20.38 ± 0.13 ppt ชุดการทดลองที่ฆ่าเชื้อมีความเค็มเฉลี่ย 21.50 ± 0.23 ppt ตลอดการทดลอง ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำมีความเค็ม

เฉลี่ยตลอดการทดลอง 20.54 ± 0.40 ppt และชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเห็ดเหอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรผงมีความเค็มเฉลี่ยตลอดการทดลอง 20.13 ± 0.22 ppt

5) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนียระหว่างการทดลอง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนีย (ภาพที่ 36 e) และตารางที่ 31 พบว่าในชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเห็ดเหอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ และสูตรผง สามารถลดแอมโมเนียได้สูงสุดที่ 96.24 ± 1.47 และ 98.07 ± 0.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 1.86 ± 0.01 เหลือ 0.07 ± 0.03 และ ความเข้มข้นเริ่มต้น 1.85 ± 0.02 เหลือ 0.04 ± 0.01 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ) ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ ปม.1 สามารถลดแอมโมเนียได้ 72.20 ± 0.27 เปอร์เซ็นต์ ชุดควบคุมสามารถลดแอมโมเนียได้ 66.50 ± 7.48 เปอร์เซ็นต์ และชุดการทดลองที่ทำการฆ่าเชื้อสามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้ต่ำสุดที่ 50.02 ± 0.83 เปอร์เซ็นต์

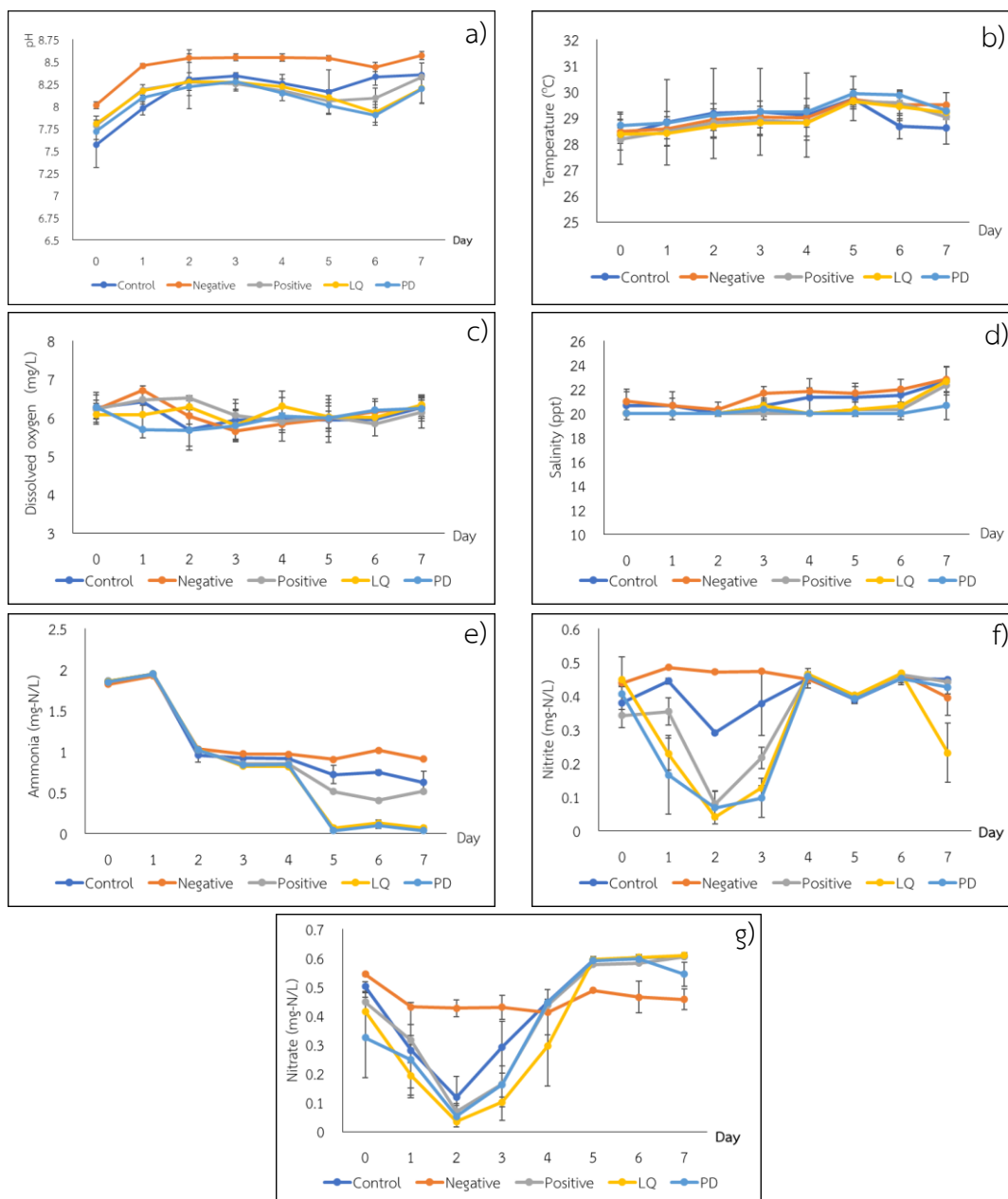
6) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรที่ระหว่างการทดลอง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตร (ภาพที่ 36 f) และตารางที่ 32 พบว่าทุกชุดการทดลอง ยกเว้นชุดการทดลองที่ทำการฆ่าเชื้อมีการลดลงของไนโตรที่ต่ำสุดในวันที่ 2 แล้วจึงเพิ่มขึ้น และลดลงอีกเล็กน้อยในวันที่ 5 เมื่อครบ 7 วัน พบว่าชุดการทดลองที่มีค่าไนโตรที่ลดลงคือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเห็ดเหอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำมีการลดลงของไนโตรที่สูงสุดถึง 47.58 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.45 ± 0.07 เหลือ 0.23 ± 0.09 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการทดลอง) และชุดการทดลองที่ฆ่าเชื้อมีปริมาณไนโตรที่ลดลง 10 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.44 ± 0.01 เหลือ 0.40 ± 0.05 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการทดลอง) ในขณะที่ชุดควบคุม ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ ปม.1 และชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเห็ดเหอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรผงมีปริมาณไนโตรที่เพิ่มขึ้น 18.44 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.38 ± 0.02 เพิ่มขึ้น 0.45 ± 0.00 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) 30.13 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.34 ± 0.04 เพิ่มขึ้น 0.44 ± 0.01 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) และ 5.28 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.41 ± 0.02 เพิ่มขึ้น 0.43 ± 0.02 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ตามลำดับ

7) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตรที่ระหว่างการทดลอง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตร (ภาพที่ 36 g) และตารางที่ 33 พบว่าในชุดควบคุม ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ ปม.1 ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเห็ดเหอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ และชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเห็ดเหอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรผง มีการลดลงของปริมาณไนเตรในวันที่ 2 แล้วจึงเพิ่มขึ้น เมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 7 พบว่าชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเห็ดเหอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรผงมีปริมาณไนเตรที่สูงที่สุด โดยเพิ่มขึ้น 67.47 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับวันที่ 0 (ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจาก 0.33 ± 0.14 เป็น 0.54 ± 0.04 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ตามด้วยชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเห็ดเหอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ ชุดการ

ทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ ปม.1 และชุดควบคุมโดยมีปริมาณไนเตรทเพิ่มขึ้น 46.87, 35.53 และ 20.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในส่วนของชุดการทดลองที่ฆ่าเชื้อพบว่าการลดลงของปริมาณไนเตรท 16.04 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นลดลงจาก 0.54 ± 0.01 เหลือ 0.46 ± 0.04 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)



ภาพที่ 36 ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรผงและสูตรน้ำในการบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งในห้องปฏิบัติการ: a) การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช (pH); b) การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ; c) การเปลี่ยนแปลงออกซิเจนละลายน้ำ; d) การเปลี่ยนแปลงความเค็ม; e) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนีย; f) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนไตรท์; g) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตรท

ระหว่างการทดลองพบว่าค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย โดยค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียจะอยู่ในช่วง 6-9 ซึ่งมีรายงานว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของ *Nitrosomonas* spp. อยู่ในช่วงระหว่าง 7.2-8.8 และพีเอชที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของ *Nitrobacter* spp. อยู่ในช่วง 7.2-9.0 ซึ่งค่าพีเอช 8.5 จะเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันได้ดีที่สุด (ธงชัย, 2544; Chena *et al.* 2006)

ความเค็มระหว่างการทดลองพบว่าการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยซึ่งอาจเกิดจากการระเหยของน้ำ โดยปกติแล้วความเค็มส่งผลในทางลบต่อไนตริไฟอิงแบคทีเรีย หากมีการเปลี่ยนแปลงของความเค็มอย่างกะทันหัน จะทำให้อัตราการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันลดลง และหากมีการเปลี่ยนแปลงมากกว่า 5 ppt จะทำให้อัตราการกำจัดแอมโมเนียและไนไตรท์ลดลง (ธงชัย, 2544)

ตลอดการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในระดับฟลาสก์ มีค่าออกซิเจนละลายน้ำที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ในทุกชุดการทดลอง แม้ว่าออกซิเจนจะมีบทบาทที่สำคัญมากต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมหรือไนตริฟิเคชัน แต่ในการทดลองครั้งนี้การให้อากาศอย่างเต็มที่ด้วยเครื่องปั๊มลม ทำให้มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำมากเกินไปพอเฉลี่ยประมาณ 6.08 - 6.99 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมากพอต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และต่อการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน จากการทดลองพบว่า ในชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อสูตรน้ำและสูตรผง สามารถลดแอมโมเนียได้สูงสุด และมีปริมาณไนไตรท์และไนเตรทสูงกว่าชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่น ๆ ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนรูปของสารอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยการเปลี่ยนจากแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ และเปลี่ยนต่อไปเป็นไนเตรทตามกระบวนการไนตริฟิเคชัน ที่โดยทั่วไปแล้วไนตริไฟอิงแบคทีเรียในกลุ่มของออโตโทรบ เช่น *Nitrosomonas* และ *Nitrosospira* สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียได้ดีที่ระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ ๆ (ธงชัย, 2544; Bitton, 1994) อย่างไรก็ตาม ไนเตรทยังสามารถเปลี่ยนเป็นแก๊สไนโตรเจนอิสระด้วยปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันแบบใช้อากาศ โดยเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Bacillus subtilis* ได้อีกด้วย (Yang *et al.*, 2011)

จากการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมในระดับฟลาสก์ เนื่องจากอาหาร modified high ammonium medium มีสารอาหารมากเพียงพอ ส่งผลให้เชื้อเจริญเติบโต จึงกำจัดแอมโมเนียได้ดี ในขณะที่การทดลองด้วยน้ำเสียจริงซึ่งมีสารอาหารน้อยกว่า การศึกษาในระดับฟลาสก์ ส่งผลให้กล้าเชื้อผสมจะช่วยกันในการใช้สารอาหารที่มีอยู่ในน้ำเสีย เช่น สารอินทรีย์ ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และสารอนินทรีย์ ได้แก่ อนินทรีย์ไนโตรเจนและฟอสเฟต เป็นต้น ทำให้โตดีกว่า จึงสามารถเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันได้ดี ทำให้ลดแอมโมเนียได้มากกว่า สอดคล้องกับ Dhanasiri *et al.* (2011) ได้รายงานถึงการใช้เชื้อรวม (consortia) ของไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้งกลุ่ม AOB และ NOB ว่าทำให้มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมระดับแอมโมเนียในบ่อเพาะเลี้ยงปลาหมอสี (zebrafish) นอกจากนี้ Suantika *et al.* (2013) ได้รายงานถึงการใช้เชื้อเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียผสมระหว่าง *Halomonas aquamarina* และ *Shewanella algae* ในการเป็นโปรไบโอติก (probiotic) ในบ่อเพาะฟักลูกกุ้งขาว พบว่าเชื้อผสมทั้งสองชนิดนี้มีความสามารถ

ในการเพิ่มอัตราการรอดของลูกกุ้ง ทำให้ลูกกุ้งมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น และยังช่วยต่อต้านแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในกุ้งได้

7. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มในการบำบัดน้ำเสียในการเพาะเลี้ยงกุ้ง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มในการบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้ง ณ ดำรงศักดิ์ฟาร์ม อ.สิงหนคร จ.สงขลา โดยบ่อควบคุมใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า และบ่อทดลองใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ (กล้าเชื้อผสมระหว่าง *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 สัดส่วน 50:50) ผลการศึกษามีดังนี้

1) การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างการทดลอง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในบ่อทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าและบ่อทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (ภาพที่ 37 a)) โดยบ่อทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้ามีอุณหภูมิเฉลี่ย 28.08 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 34) ส่วนในบ่อทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำมีอุณหภูมิเฉลี่ย 27.99 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 36)

2) การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช (pH) ในระหว่างการทดลอง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงพีเอชบ่อทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าและบ่อทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 37 b)) โดยบ่อทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 7.47 - 8.33 (ตารางที่ 34) และค่าพีเอชของบ่อทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำอยู่ในช่วง 7.9-8.35 (ตารางที่ 36)

3) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นออกซิเจนละลายน้ำระหว่างการทดลอง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นออกซิเจนละลายน้ำตลอดการเลี้ยง พบว่าบ่อทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า และบ่อทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยบ่อทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้ามีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ย 5.76 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 34) บ่อทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำมีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ย 5.76 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 37 c) และตารางที่ 36)

4) การเปลี่ยนแปลงความเค็มระหว่างการผลิต

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเค็มตลอดการเลี้ยง พบว่าบ่อทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า และบ่อทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนทรีย์ไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยบ่อทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า มีความเค็มเฉลี่ย 7.91 ppt (ตารางที่ 34) บ่อทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนทรีย์ไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ มีความเค็มเฉลี่ย 8.15 ppt (ภาพที่ 37 d) และตารางที่ 36))

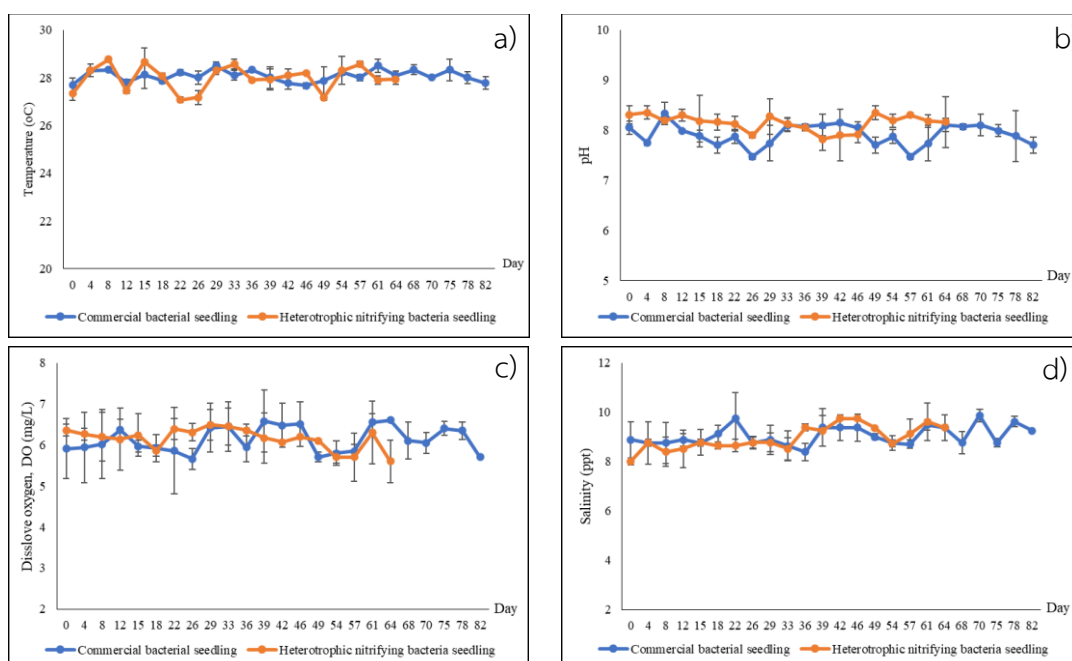
5) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของอนินทรีย์ไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงกุ้ง (แอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทในบ่อทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า และบ่อทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนทรีย์ไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ โดยเกษตรกรเดิมเชื้อเข้าบ่อเลี้ยงพร้อมกับการนำน้ำเค็มเข้าสู่บ่อเลี้ยง และมีการเติมเชื้อลงสู่บ่อเลี้ยงทุก ๆ วันจนสิ้นสุดการเลี้ยง พบว่าปริมาณแอมโมเนียมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างวันที่เลี้ยง พบว่าในบ่อที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า (commercial product) มีปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้น 0.33 ± 0.03 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการเลี้ยงพบค่าแอมโมเนียลดต่ำลงเหลือ 0.09 ± 0.04 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และรักษาระดับของแอมโมเนียจนเพิ่มขึ้นในวันที่ 36 ของการเลี้ยงและลดลงอีกครั้งในวันที่ 42 จากนั้นปริมาณของแอมโมเนียเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 54 (1.15 ± 0.11 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) และเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 1.76 ± 0.02 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในวันที่ 57 หลังจากนั้นแอมโมเนียลดลงในวันที่ 75 และเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 78 (1.25 ± 0.0 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) และเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 82 มีปริมาณแอมโมเนียเท่ากับ 1.17 ± 0.06 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ปริมาณไนไตรท์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในวันที่ 54 และมีปริมาณไนไตรท์สูงสุดวันที่ 64 จากนั้นมีการลดลงและเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 78 จนสิ้นสุดในวันที่ 82 นอกจากนี้พบว่าแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของไนเตรทจะคล้ายคลึงกับปริมาณไนไตรท์ กล่าวคือ ปริมาณไนเตรทเพิ่มขึ้นในวันที่ 54 (0.19 ± 0.07 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรต่อลิตร) จากนั้นลดลงอีกครั้งและค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจากวันที่ 61 (0.03 ± 0.12 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรต่อลิตร) จนสิ้นสุดการเลี้ยงในวันที่ 82 (0.34 ± 0.00 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรต่อลิตร) (ภาพที่ 38 a))

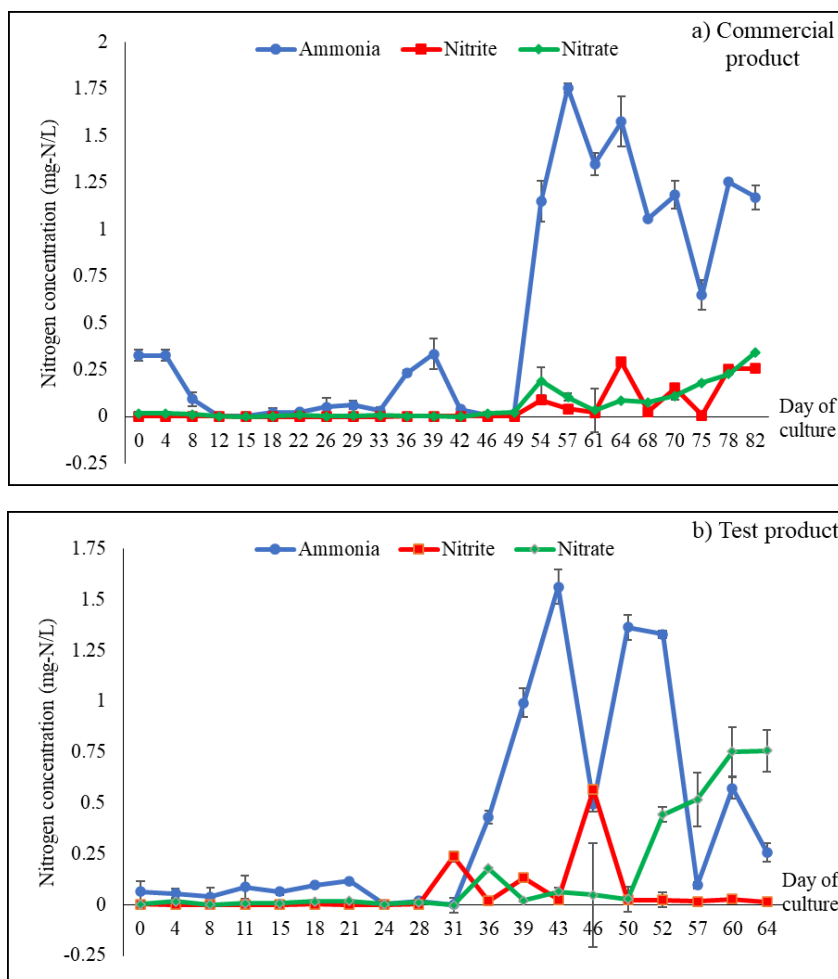
ในขณะที่บ่อที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนทรีย์ไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ (test product) มีปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้นที่ 0.06 ± 0.05 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และแอมโมเนียเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในวันที่ 36, 39 และสูงสุดในวันที่ 43 (0.43 ± 0.03 , 0.99 ± 0.07 และ 1.56 ± 0.08 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ) และลดลงในวันที่ 46 และเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 50 และมีแนวโน้มลดลงจนถึงวันสิ้นสุดในวันที่ 64 มีปริมาณแอมโมเนียสะสมในบ่อเท่ากับ 0.26 ± 0.05 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ปริมาณไนไตรท์ตั้งแต่วันแรกจนถึงวันที่ 28 ไม่มีการเพิ่มหรือลดของไนไตรท์ (0.00 ± 0.00 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) จากนั้นปริมาณไนไตรท์มีการเพิ่มขึ้นและลดลงตลอดจนถึงวันที่ 43 และเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 46 เท่ากับ 0.57 ± 0.01 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร หลังจากนั้น

แนวโน้มลดต่ำลงจนสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 64 โดยมีปริมาณ 0.01 ± 0.00 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เช่นเดียวกับปริมาณไนเตรทที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 36 (0.18 ± 0.01 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) จากนั้นลดลงอีกครั้งและค่อยๆเพิ่มขึ้นจากวันที่ 50 (0.03 ± 0.06 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) จนสิ้นสุดการเลี้ยงในวันที่ 64 (0.76 ± 0.10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ซึ่งจะเห็นได้ว่าแนวโน้มของปริมาณไนเตรทจากการใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทั้งสองชนิดมีทิศทางเดียวกัน (ภาพที่ 38 b))

จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำการเลี้ยงกุ้งของบ่อที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า และบ่อทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็ม สูตรน้ำมีจำนวนวันเลี้ยงกุ้งที่แตกต่างกัน (82 และ 64 วัน ตามลำดับ) เนื่องจากเกษตรกรปล่อยกุ้งไม่พร้อมกัน แต่มีการจับกุ้งพร้อมกัน เพราะขนาดของกุ้งทั้ง 2 บ่อเลี้ยงเป็นที่พอใจของเกษตรกร



ภาพที่ 37 คุณภาพน้ำบางประการในบ่อเลี้ยงกุ้ง ณ ดำรงศักดิ์ฟาร์ม อ.สิงหนคร จ.สงขลา: a) การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ; b) การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช (pH); c) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำ; d) การเปลี่ยนแปลงความเค็ม



ภาพที่ 38 ความเข้มข้นของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในการเลี้ยงกุ้ง ณ ดำรงศักดิ์ฟาร์ม อ.สิงหนคร จ.สงขลา: a) บ่อที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า (commercial); b) บ่อที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ (test product)

จากการศึกษาประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มในการบำบัดน้ำเสียในการเลี้ยงกุ้งจริง โดยเปรียบเทียบระหว่างบ่อทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์ทางการค้า และผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ โดยทำการทดลองทั้งสิ้นเป็นระยะเวลา 82 และ 64 วันตามลำดับ พบว่า การเปลี่ยนแปลงของพีเอชไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ระหว่างบ่อทดลองทั้งสอง ซึ่งมีพีเอชอยู่ระหว่าง 7.5 – 8.4 ซึ่งเป็นช่วงพีเอชที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การเจริญเติบโตของไนตริไฟอิงแบคทีเรีย และการเกิดปฏิกิริยานิตริฟิเคชัน (รังชัย, 2544)

ปริมาณออกซิเจนระหว่างบ่อทดลองพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยบ่อทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้ามีอุณหภูมิเฉลี่ย 28.08 องศาเซลเซียส และบ่อทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำมีอุณหภูมิเฉลี่ย 27.99 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับการรายงานที่กล่าวว่าปริมาณของออกซิเจนละลายน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งไม่ควรต่ำกว่า 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (สิริ และคณะ, 2548) ในขณะที่ไนตริ

ไฟอิงแบคทีเรียต้องการปริมาณของออกซิเจนละลายน้ำ 4.57 มิลลิกรัมต่อลิตร และปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันจะเกิดได้ควรมีระดับของออกซิเจนละลายน้ำเท่ากับ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร แต่หากมีปริมาณของออกซิเจนมากไปจะทำให้เปลืองพลังงาน และถ้าในแหล่งน้ำมีค่าออกซิเจนอยู่ในช่วง 0.2-0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันพร้อมกัน เรียกว่า SND (Simultaneous Nitrification-Denitrification) (Tchobanoglous *et al.*, 2004)

ในระหว่างที่ทดลองพบว่าความเค็มเฉลี่ยของน้ำในบ่อที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า ค่อย ๆ ลดลง เมื่อระยะเวลาการเลี้ยงมากขึ้น เนื่องจากปริมาณน้ำฝนที่ตกลงมา ในขณะที่ความเค็มเฉลี่ยของบ่อที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำค่อนข้างคงที่ ทั้งนี้มีการรายงานว่าการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมสามารถที่จะเจริญเติบโตได้ในช่วงความเค็มกว้าง ตั้งแต่ 0 – 35 ppt (กรมประมง, 2547) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของความเค็มไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต แต่ความเค็มส่งผลในทางลบต่อไนตริไฟอิงแบคทีเรีย แต่แบคทีเรีย *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 มีความสามารถในการทนเค็มในช่วงกว้าง (Noorak *et al.*, 2018; Chankaew and Sangnoi, 2023) จึงไม่ส่งผลต่อการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชัน

จากการศึกษาการลดแอมโมเนียด้วยเฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรีย พบว่าบ่อทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าและบ่อทดลองที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำมีปริมาณของแอมโมเนียเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 36 ของการทดลอง เนื่องจากเริ่มมีการให้อาหาร และเกิดการขับถ่ายของกุ้งมากขึ้น โดย ประมินทร์ (2548) รายงานว่าโปรตีนจากเศษอาหาร และสิ่งขับถ่ายจะเกิดการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ในบ่อเป็นกรดอะมิโน โดยอาศัยกระบวนการแอมโมนิเซชัน (ammonization) ที่เปลี่ยนสารประกอบเอมีนหรือกรดอะมิโนให้กลายเป็นแอมโมเนียหรือแอมโมเนียม เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยอาศัย Ammonifying bacteria เช่น *Bacillus* spp., *Proteus* spp. และ *Pseudomonas* spp. ในกระบวนการดังกล่าว จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการไนตริฟิเคชัน ที่เปลี่ยนแอมโมเนียให้กลายเป็นไนไตรท์ และเปลี่ยนจากไนไตรท์ให้กลายเป็นไนเตรทตามลำดับ ทั้งนี้ปริมาณของแอมโมเนียมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเลี้ยง เนื่องจากมีการขับถ่ายของกุ้ง การให้อาหารที่เพิ่มขึ้น รวมถึงการปรับเปลี่ยนสูตรอาหารที่มีเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนเพิ่มขึ้นตามขนาดของกุ้ง ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ปริมาณแอมโมเนียในบ่อที่มีการเติมผลิตภัณฑ์ทางการค้า มีการเพิ่มขึ้นและลดลงสลับกันไปมา โดยมีปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นสูงสุด ตั้งแต่วันที่ 57 เท่ากับ 1.76 ± 0.02 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และมีแนวโน้มลดลงจนวันที่ 68 ซึ่งปริมาณแอมโมเนียมีปริมาณมากกว่า 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เกษตรกรจึงทำการเปลี่ยนน้ำประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลทำให้แอมโมเนียลดลงในวันที่ 70 และสูงอีกครั้งจนสิ้นสุดการทดลอง โดยมีปริมาณแอมโมเนีย 1.17 ± 0.06 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในขณะที่บ่อที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ พบปริมาณแอมโมเนียมากกว่า 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในวันที่ 39 จนเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 43 เท่ากับ 1.56 ± 0.08 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร แม้จะมีแนวโน้มลดลงในวันที่ 50 และ 52 (1.36 ± 0.06 และ 1.33 ± 0.02 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) แต่ยังมีปริมาณค่อนข้างสูง ทั้งนี้เกิดจากการให้อาหารในปริมาณที่มากขึ้น จากนั้นเกษตรกรจึงทำการเปลี่ยนน้ำ

ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้แอมโมเนียลดลงในวันที่ 64 มีปริมาณแอมโมเนีย 0.26 ± 0.05 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ฉะนั้นจะเห็นได้ว่า ผลผลิตกัลล้าเชื้อเหเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสามารถควบคุมปริมาณแอมโมเนียได้ดีกว่าผลิตภัณฑ์ทางการค้า จากการรายงานของ Ip *et al.* (2001) กล่าวว่าเกณฑ์คุณภาพน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ไม่ควรมีแอมโมเนีย (total ammonia) เกิน 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งในบ่อที่ใช้กัลล้าเชื้อทางการค้ามีปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียสะสมในช่วงท้ายของการเลี้ยงมากกว่า 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ขณะที่บ่อที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กัลล้าเชื้อเหเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทดแทนเคมีสูตรน้ำพบความเข้มข้นของแอมโมเนียมากกว่า 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรในช่วงท้ายเช่นกันแต่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรในวันสุดท้ายของการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับ พุทธ และคณะ (2546) รายงานว่า ความเข้มข้นของแอมโมเนียน้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร มีความปลอดภัยต่อการเลี้ยงกุ้ง ความเข้มข้นของแอมโมเนียอยู่ในช่วง 0.1 - 0.4 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรส่งผลให้กุ้งโตช้า แต่หากมีความเข้มข้นมากกว่า 0.4 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรจะทำให้กุ้งโตช้า กินอาหารน้อยลงเครียดหรือตาย นอกจากนี้ Boopathy *et al.* (2005) รายงานถึงประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียของ *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* และ *B. cereus* ในการเลี้ยงกุ้ง พบว่า กลุ่ม *Bacillus* มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้ สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 8 วัน

จากการศึกษาพบว่า ปริมาณไนโตรเจนของบ่อทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กัลล้าเชื้อเหเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทดแทนเคมีสูตรน้ำมีแนวโน้มสูงและลดลง ทั้งนี้ในกระบวนการไนตริฟิเคชันมี 2 ขั้นตอนย่อย ซึ่งขั้นตอนย่อยที่ 1 คือ กระบวนการไนตริเตชัน (nitritation) หรือไนตริติฟิเคชัน (nitrification) ซึ่งเป็นขั้นตอนการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้กลายเป็นไนไตรท์ โดยมีแบคทีเรียในกลุ่ม ammonium oxidizing bacteria (AOB) เปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนไตรท์ (ธงชัย, 2544; Yanagita, 1990; Bitton, 1994) จากการทดลองพบว่าในบ่อที่มีการเติมผลิตภัณฑ์ทางการค้า มีไนไตรท์สูงในวันที่ 64, 78 และ 82 ในขณะที่บ่อที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กัลล้าเชื้อเหเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทดแทนเคมีสูตรน้ำ มีปริมาณไนไตรท์ต่ำตั้งแต่วันแรก จากนั้นปริมาณไนไตรท์มีแนวโน้มสูงในวันที่ 46 และลดต่ำลง จนสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 64 สอดคล้องกับการทดลองของ Yang *et al.* (2011) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ *B. subtilis* A1 ในน้ำเสีย พบว่าปริมาณของแอมโมเนียลดลง ส่งผลทำให้มีปริมาณของไนไตรท์เพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 46 ของการทดลอง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lu *et al.* (2012) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ *Alcaligenes* sp. W1 ในการลดแอมโมเนียในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วพบว่าเมื่อแอมโมเนียมีแนวโน้มลดลงปริมาณของไนไตรท์จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นซึ่งสอดคล้องกัน จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ผลิตภัณฑ์กัลล้าเชื้อเหเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทดแทนเคมีสูตรน้ำ มีความสามารถในการทำให้เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันได้ดี

ส่วนไนเตรทเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ของไนไตรท์ไปเป็นไนเตรท ซึ่งเกิดในกระบวนการไนตริฟิเคชัน โดยเกิดขึ้นในขั้นตอนย่อยที่ 2 คือ กระบวนการไนเตรเตชัน (nitrataion) หรือไนเตรติเตชัน (nitratitation) เป็นขั้นตอนในการเปลี่ยนไนไตรท์ให้เป็นไนเตรท โดยไนเตรทถือว่าเป็นสารที่เป็นพิษน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับแอมโมเนียและไนไตรท์ ถ้าในน้ำเลี้ยงกุ้งมีปริมาณของไนเตรทเข้มข้น 15.4 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร จะส่งผลให้กุ้งประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ตายภายใน 90

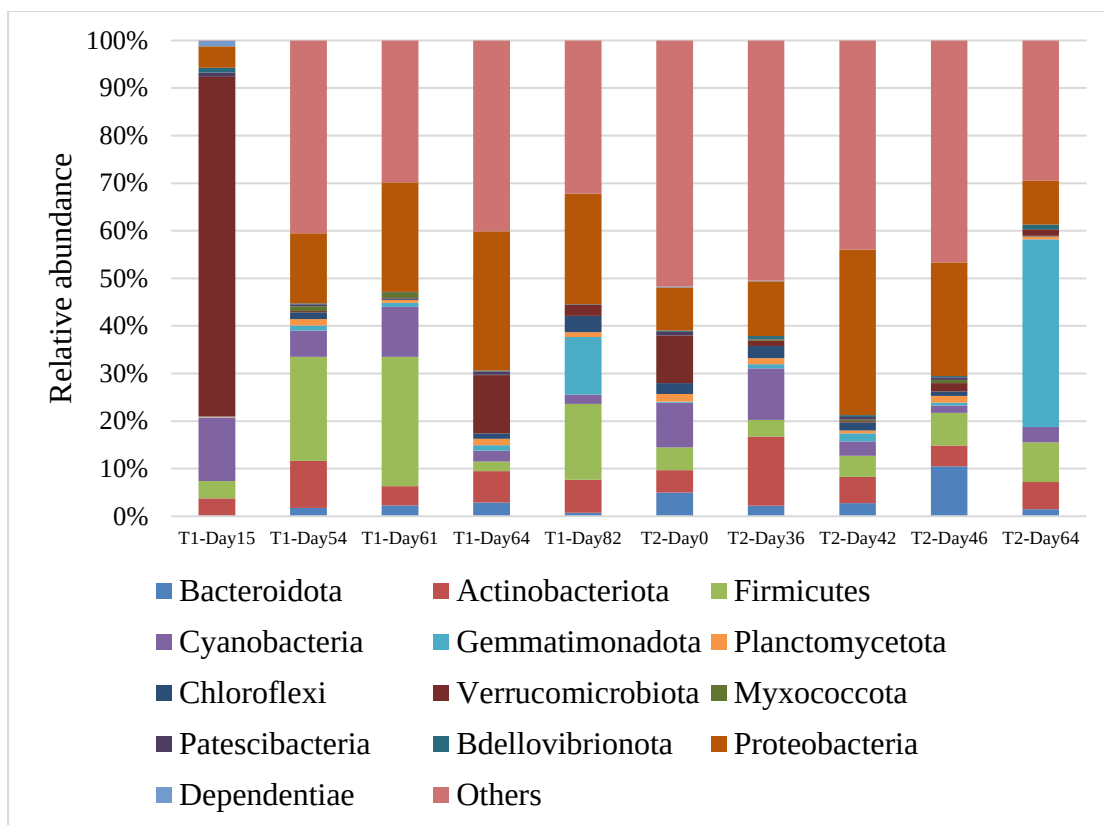
ข้าวโม่ และไม่ควรมีความเข้มข้นของไนเตรทสูงกว่า 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เพราะจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ (Hart and O'Sullivan, 1993) อย่างไรก็ตาม ไนเตรทยังสามารถเปลี่ยนเป็นแก๊สไนโตรเจนอิสระด้วยปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันแบบใช้อากาศโดยเฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Bacillus subtilis* เป็นต้น (Yang *et al.*, 2011) โดยในการศึกษารั้งนี้ ปริมาณไนเตรทของบ่อดทดลองทั้งสอง มีแนวโน้มเหมือนกัน กล่าวคือ บ่อที่ใช้ผลิตภัณฑ์ทางการค้า มีปริมาณไนเตรทค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 82 เช่นเดียวกับบ่อที่ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกในไตรฟองแบคทีเรียทเค็มสูตรน้ำที่มีปริมาณไนเตรทต่ำในช่วงแรกของการเลี้ยง จากนั้นปริมาณไนเตรทสูงขึ้นในช่วงหลังของการเลี้ยง มีลักษณะเป็นกราฟหงายขึ้น ทั้งนี้ปริมาณไนเตรทที่สูงขึ้นอาจเป็นเพราะเกิดจากปฏิกิริยาไนเตรติเตชัน ที่ไนโตรที่ถูกเปลี่ยนไปเป็นไนเตรท ซึ่งปริมาณไนเตรทที่เกิดขึ้นของบ่อดทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกในไตรฟองแบคทีเรียสูตรน้ำ แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกในไตรฟองแบคทีเรียทเค็มสูตรน้ำมีความสามารถในการเปลี่ยนไนโตรที่ให้เป็นไนเตรทได้ดี มีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันได้ดี ถึงแม้ว่าปริมาณไนโตรที่ยังสูงในตอนท้ายเช่นเดียวกับปริมาณไนเตรท อาจสามารถอธิบายได้ว่าเนื่องจากการให้อาหารกุ้งทุกวัน วันละ 5 มื้อ ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณแอมโมเนียทุกวัน แอมโมเนียนั้นถูกเปลี่ยนเป็นไนโตร และไนโตรก็ถูกเปลี่ยนเป็นไนเตรท จึงทำให้ค่าไนเตรทสูงขึ้น แต่ถึงแม้ว่ามีปริมาณไนโตรที่เกินค่ามาตรฐาน (0.01 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) แต่แอมโมเนียเป็นพิษต่อสัตว์น้ำมากกว่าไนโตร หากสามารถควบคุมปริมาณของแอมโมเนียให้ต่ำได้ ก็จะสามารถเลี้ยงกุ้งหรือสัตว์น้ำให้ประสบความสำเร็จได้

การวิจัยครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกในไตรฟองแบคทีเรียทเค็มสูตรน้ำ (*B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 สัดส่วน 50:50) มีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันได้ดี และมีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนีย แล้วเปลี่ยนไปเป็นไนโตร และไนเตรทได้ดี อีกทั้งยังมีความสามารถในการทนเค็ม ดังนั้นผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกในไตรฟองแบคทีเรียนี้ นับว่ามีศักยภาพในการพัฒนาต่อไปใช้ในการควบคุมคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งทะเลหรือกุ้งน้ำจืดได้ในอนาคต

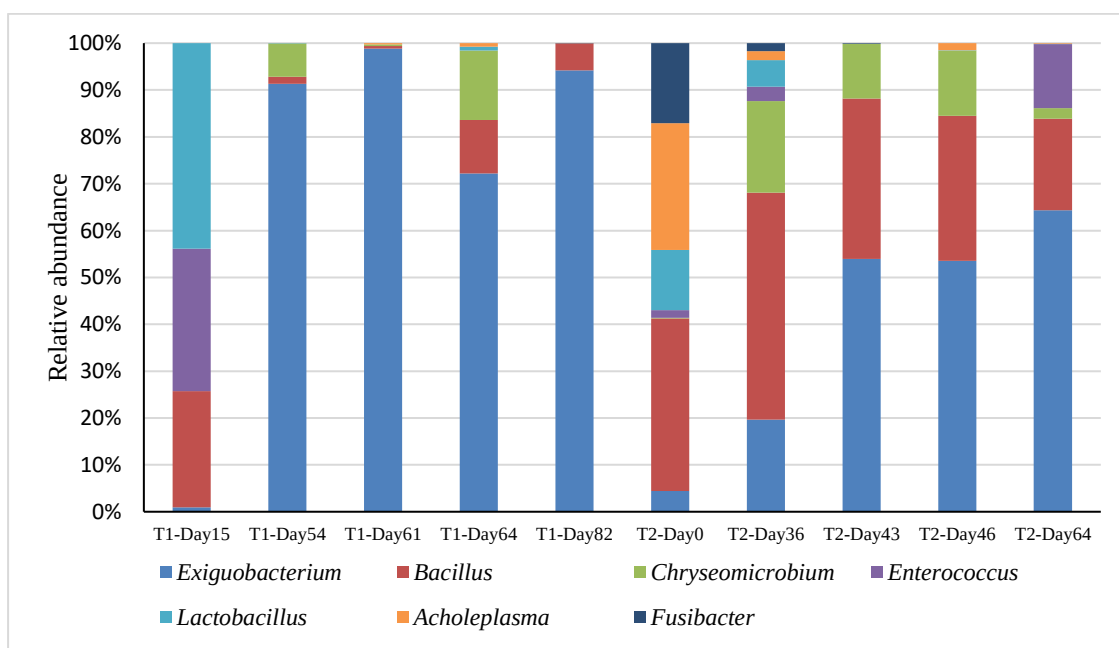
8. การศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียกับคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง ด้วยเทคนิค Next-Generation Sequencing (NGS)

จากการศึกษาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียพบว่าบ่อที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้า (T_1) และบ่อที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกในไตรฟองแบคทีเรียทเค็มสูตรน้ำ (T_2) พบแบคทีเรียทั้งหมด 15 ไฟลัม โดยทั้ง 2 ชุดการทดลองส่วนใหญ่พบ Proteobacteria (6.99-46.10 เปอร์เซ็นต์) Bacteroidota (6.50-46.10 เปอร์เซ็นต์) Actinobacteriota (10.77-73.68 เปอร์เซ็นต์) และ Firmicutes (4.82-29.81) เป็นไฟลัมหลัก (ภาพที่ 39) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานไว้ว่า Proteobacteria เป็นไฟลัมที่ใหญ่และมีความหลากหลายมากที่สุดในกลุ่มโปรคาริโอต (prokaryotes) นอกจากนี้ Bacteroidota, Actinobacteriota และ Planctomycetota เป็นไฟลัมที่สามารถพบได้ทั่วไปในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Michaud *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019;

Gupta, 2000; Satanwat *et al.*, 2020) ทั้งยังสอดคล้องกับ Burut-Archanai *et al.* (2021) ที่รายงานว่าไฟลัม Proteobacteria, Bacteroidota และ Actinobacteriota เป็นกลุ่มหลัก ขณะที่ Saijai *et al.* (2016) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของประชาคมไนตริไฟอิงแบคทีเรียกับคุณภาพน้ำในระบบไฮโดรโปนิก (hydroponic) ด้วยยีน 16S rRNA พบว่า *Bacillus* และ *Pseudomonas* เป็นกลุ่มหลัก และสามารถเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันได้อย่างสมบูรณ์ โดยตลอดการทดลองพบเชื้อ *B. cereus* และ *P. montelii* ทั้งนี้ผลิตภัณฑ์กล้ำเชื้อทางการค้าและผลิตภัณฑ์กล้ำเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำเป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. ซึ่งเป็นสมาชิกในไฟลัม Firmicutes โดยสามารถพบได้ 7 สกุล (Genus) และมี *Exiguobacterium* sp. และ *Bacillus* sp. เป็นกลุ่มหลัก (ภาพที่ 40) เมื่อเปรียบเทียบกับ การเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำพบว่าบ่อที่เติมผลิตภัณฑ์กล้ำเชื้อทางการค้า (T₁) พบ *Exiguobacterium* เป็นสกุลเด่น และพบสกุล *Bacillus* น้อยมาก ในวันที่ 54 และ 61 ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณแอมโมเนียที่เพิ่มสูงขึ้น จากนั้นพบสกุล *Bacillus* อีกครั้งในวันที่ 64 และวันที่ 82 ซึ่งค่าแอมโมเนียมีแนวโน้มลดลง สอดคล้องกับปริมาณไนโตรเจนและไนเตรตที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 61 จนถึงวันที่ 82 ซึ่งเป็นไปตามปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน ส่วนบ่อที่เติมผลิตภัณฑ์กล้ำเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ (T₂) พบแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นสกุลเด่นในทุกวันที่เก็บตัวอย่าง (วันที่ 0, 36, 43, 46 และ 64) ซึ่งน่าจะเป็นเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้งสองมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีและสามารถแข่งขันได้ดีกว่าเชื้อชนิดอื่นในสภาวะการเลี้ยง สำหรับสกุล *Exiguobacterium* ที่พบทั้ง T₁ และ T₂ อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อชนิดนี้เป็นเชื้อประจำถิ่น ซึ่งในบ่อที่ใช้กล้ำเชื้อทางการค้า (T₁) ไม่สามารถแข่งขันกับเชื้อ *Exiguobacterium* sp. ได้ ในขณะที่บ่อที่เติมกล้ำเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรีย *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 (T₂) นั้น สามารถเจริญเติบโตและแข่งขันกับเชื้อ *Exiguobacterium* sp. ได้ แม้จะมีรายงานเกี่ยวกับ *Exiguobacterium* sp. ว่ามีความสามารถในการลดไนโตรเจนในน้ำทะเลได้ แต่คงมีประสิทธิภาพไม่มากนัก สังเกตได้จากบ่อ T₁ ที่ยังคงมีปริมาณแอมโมเนียสูง (Cui *et al.* 2021; Kasana and Pandey, 2018) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 มีความสามารถในการแข่งขันกับ *Exiguobacterium* sp. ทำให้เชื้อนี้ถูกแทนที่และมีปริมาณลดลง ฉะนั้นถ้าต้องการลดเชื้อ *Exiguobacterium* sp. นี้ เกษตรกรควรเติมกล้ำเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทุกวัน และเมื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย พบว่าบ่อ T₂ แอมโมเนียเพิ่มขึ้นในวันที่ 36 ทั้งนี้เนื่องจากการกินอาหารของกุ้งที่เพิ่มมากขึ้น แต่ก็ถูกควบคุมโดยกระบวนการไนตริฟิเคชัน ทำให้ปริมาณแอมโมเนียไม่เกิน 1.56±0.08 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และมีแนวโน้มลดลงด้วยการถูกเปลี่ยนไปเป็นไนไตรท์ (วันที่ 43) และไนเตรตตั้งแต่วันที่ 50 จนถึง 64 มีปริมาณไนเตรตสูงสุด (ภาพที่ 40) พร้อมทั้งพบแบคทีเรียสกุล *Enterococcus* sp. เพิ่มขึ้นเช่นกัน



ภาพที่ 39 โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียระดับไฟลัม: บ่อที่เติมผลิตภัณฑ์ทางการค้า (T₁) และบ่อที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ (T₂)



ภาพที่ 40 โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียระดับสกุลในไฟลัม Firmicutes: บ่อที่เติมผลิตภัณฑ์ทางการค้า (T₁) และบ่อที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ (T₂)

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษา

1) งานวิจัยนี้สามารถคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มได้จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Alcaligenes faecalis* SRNB23, *A. faecalis* SRNB35, *Bacillus oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 พบว่า เฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียในอาหาร modified high ammonium medium ซึ่งสามารถลดแอมโมเนียได้สูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดย *A. faecalis* SRNB23 ลดแอมโมเนียได้ 72.79 เปอร์เซ็นต์ มีไนโตรทและไนเตรท เท่ากับ 0.01 และ 0.04 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ ตามมาด้วย *B. vietnamensis* SF-1, *A. faecalis* SRNB35 และ *B. oceanisediminis* Ba9 สามารถลดแอมโมเนียได้ 69.44, 66.21 และ 64.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2) ประสิทธิภาพการลดแอมโมเนียของเชื้อผสม พบว่า กล้าเชื้อผสมระหว่าง *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้ดีที่สุดเท่ากับ 77.92 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ กล้าเชื้อผสมระหว่าง *A. faecalis* SRNB35, *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 สามารถลดแอมโมเนียได้น้อยที่สุดเพียง 34.95 เปอร์เซ็นต์

3) แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์พบว่า sodium citrate เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดของ *A. faecalis* SRNB23 และ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดของ สายพันธุ์ *A. faecalis* SRNB35, *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 โดยทั้ง 4 สายพันธุ์มี ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด

4) สำหรับสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสมของเชื้อ *A. faecalis* SRNB23, *A. faecalis* SRNB35, *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 เท่ากับ 4, 2, 4 และ 8 ตามลำดับ

5) สัดส่วนเชื้อผสมที่เหมาะสมที่สุดระหว่าง *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 เมื่อใช้ sucrose และ ammonium sulfate เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ คือ 50:50

6) เมื่อนำกล้าเชื้อผสม *B. oceanisediminis* Ba9 และ *B. vietnamensis* SF-1 มาผสมในวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร พบว่ากล้าเชื้อที่ผสมกับรำข้าว มีประสิทธิภาพในการลดแอมโมเนียและไนโตรทสูงสุดและพบปริมาณไนเตรทสูงสุดเมื่อเทียบกับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรชนิดอื่น

7) ในการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียของกล้าเชื้อสูตรน้ำและสูตรผง โดยใช้รำข้าวเป็นวัสดุยัดเกาะ พบว่าผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรผง สามารถลดแอมโมเนียได้ 98.07 เปอร์เซ็นต์ เกิดไนโตรทและไนเตรท 5.28 และ 67.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำสามารถลดแอมโมเนียได้ 96.24 เปอร์เซ็นต์ ลดไนโตรทได้ 47.85 เปอร์เซ็นต์ และเกิดไนเตรท 46.87 เปอร์เซ็นต์

8) เมื่อเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์กล้ำเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนโตรไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ (T_2) กับผลิตภัณฑ์กล้ำเชื้อทางการค้า (T_1) ในการเลี้ยงกุ้ง พบว่าปริมาณแอมโมเนียในบ่อที่ใช้ผลิตภัณฑ์กล้ำเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนโตรไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ ลดลงมากกว่าบ่อที่เติมผลิตภัณฑ์กล้ำเชื้อทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ปริมาณไนไตรท์และไนเตรทในบ่อทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้ำเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนโตรไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ มีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วงท้ายของการทดลอง ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันที่เปลี่ยนรูปของแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์และไนเตรทตามลำดับ เมื่อศึกษาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียทั้ง 2 ชุดการทดลอง ส่วนใหญ่พบแบคทีเรีย Proteobacteria, Bacteroidota, Actinobacteriota และ Firmicutes เป็นไฟลัมหลัก โดยสมาชิกในไฟลัม Firmicutes สามารถพบแบคทีเรีย *Exiguobacterium* sp. และ *Bacillus* sp. เป็นกลุ่มหลักตลอดการเลี้ยง โดยบ่อที่มีการเติมผลิตภัณฑ์กล้ำเชื้อทางการค้าพบ *Exiguobacterium* sp. แต่พบ *Bacillus* sp. น้อยมาก ซึ่งแตกต่างกับบ่อทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้ำเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนโตรไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำที่พบ *Bacillus* sp. ทุกวันที่เก็บตัวอย่าง นี่อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้แอมโมเนียในบ่อ T_1 สูงกว่าบ่อ T_2 อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น ผลิตภัณฑ์กล้ำเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนโตรไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มในการศึกษาค้างนี้ นับว่ามีศักยภาพในการพัฒนาต่อยอดไปใช้ในการควบคุมคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งทะเลหรือกุ้งน้ำกร่อยได้ในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

- 1) การศึกษากระบวนการไนตริฟิเคชันที่สมบูรณ์ กระบวนการเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนไตรท์และไนเตรท รวมทั้งการใช้สารยับยั้ง (Inhibitors) ปฏิกิริยาการออกซิไดซ์แอมโมเนีย (ammonium oxidation) และไนไตรท์ (nitrite oxidation) เพื่อพิสูจน์กระบวนการไนตริฟิเคชัน
- 2) การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนตริฟิเคชันในกล้ำเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนโตรไฟอิงแบคทีเรียทนเค็ม เช่น *amoA*, *norB* และ *nirA* เป็นต้น
- 3) การศึกษาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งถึงระดับสกุล (genus) และชนิด (species)

บรรณานุกรม

- กมลรัตน์ แก้วสมนึก, กมลวรรณ หัสรังสี, คณินิตย์ ลิมจิรขจร, สุภาพร รักเขียว, อานนท์ อุบลปลั่ง, อธิญาภรณ์ แก้วทวี, นัท นันทพงศ์ และยุทธพงษ์ สังข์น้อย. 2563. วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรสำหรับผลิตกล้าเชื้อ *Bacillus* แบบผงในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 30 ประจำปี 2563 และการประชุมวิชาการระดับชาติ คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ ครั้งที่ 1 วันที่ 7-8 พฤษภาคม 2563. หน้า 1176-1183.
- กิตติชัย โสพัตนา, วิชชุดา ภาโสสม, กนกวรรณ วรดง และอนันต์สิทธิ์ไชยวังราช. 2558. การประดิษฐ์และสมบัติของกระถางชีวภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร, 2(2), 1-7.
- กรมประมง. 2566. สถิติผลผลิตการเลี้ยงกุ้งทะเลประจำปี 2565. กลุ่มสถิติการประมง กองนโยบายและแผนพัฒนาการประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. เอกสารฉบับที่ 7/2566.
- เกียรุ คำคง, ดอกกรัก ชัยสาร, ยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตร และนกุล อินทระสังขา. 2551. การตรวจสอบและติดตามแบคทีเรียกลุ่มไนตริฟายอิงและดีไนตริฟายอิงในระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียนด้วยเทคนิค Fluorescent *In Situ* Hybridization. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 31 มกราคม-2 กุมภาพันธ์ 2550. หน้า 424-431.
- กฤษณา จันทร์แก้ว, สมพิศ แยมเกษม, สุธาทิพย์ เจริญ และวาริช ตัญญุทธสรณ์. 2557. ผลของระดับกากน้ำตาล จุลินทรีย์บาซิลลัส และวิตามินต่อคุณภาพน้ำ และอัตราการรอดของลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะวัยอ่อน (*Penaeus vannamei* Boone, 1931). เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2557. 38 หน้า.
- จิตมนัส นิกากี้. 2559. การพัฒนาสูตรและวิธีการใช้ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เพื่อควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาพืชศาสตร์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ชัยวุฒิ สุตทองคง. มปป. การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ปม.1 สูตรน้ำ. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง เขต 2 (สมุทรสาคร). 7 หน้า.
- ชุมพล ศรีทอง, อัมพิกา แจ้งไพร และอรุณวรรณ หวังกอบเกียรติ. 2557. การใช้ไนตริฟายอิงแบคทีเรีย น้ำเค็มที่ตรึงบนเม็ดโพลีเอสเตอร์เพื่อเร่งการกำจัดแอมโมเนียและไนโตรเจนในบ่ออนุบาลลูกกุ้ง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52 4-7 กุมภาพันธ์ 2557. หน้า 201-209.
- ณัฐพงศ์ ตันติวัฒนพันธ์. 2562. กากกาแฟ จากแก้วกาแฟสู่แนวคิดเศรษฐกิจหมุนเวียนสำหรับผลิตพันธุ์ชีวภาพ. วารสารสิ่งแวดล้อม, ปีที่ 23 (ฉบับที่ 1). 8 หน้า.
- ดวงพร คันธโชติ. 2545. นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 216 หน้า.
- ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2544. การกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทางชีวภาพ. สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 703 หน้า.

- ปรมินทร์ สันใจ. 2548. การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียและไนโตรเจน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พุทธ ส่องแสงจินดา, ลักขณา ละอองศิริวงศ์ และชัชวาล อินทมนตรี. 2546. พลั๊กซ์ของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ผิวสัมผัสของน้ำ-ตะกอนดินในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย. 13 หน้า.
- วรารณณ์ ภูักัดพันธ์ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2553. การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ใหม่และประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขอบใบแห้งข้าว. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48: สาขาพืช 3-5 กุมภาพันธ์ 2553. หน้า 207-214.
- สัจจะชาญ พริตมะลิ ประชุม คำพุฒ ปราโมทย์ วีรานุกูล และเช็นนิตย์ งามมานะ. 2552. รายงานการวิจัยเรื่องการใช้ดินขาวผสม เส้นใยมะพร้าว ฟางข้าวและแกลบเพิ่มประสิทธิภาพ การป้องกันความร้อนในผนังคอนกรีตบล็อก. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร.
- สุชาดา เกาตระกุล, วิทยา สุริยาภณานนท์, เบญจมาศ ศิลาชัย และยงยุทธ โอสภสภา. 2526. การตอบสนองของบานขึ้นและแพร่เชื้องูเห่าที่ระดับต่าง ๆ ของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแตสเซียม ในวัสดุปลูกที่ผสมขุยมะพร้าวกับทราย 5 อัตรา. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 21 : สาขาพืช ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 31 มกราคม - 3 กุมภาพันธ์ 2526 กรุงเทพฯ. 252-266.
- สุนิภา จันทรแก้ว. 2560. ประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียโดยเฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรียที่คัดแยกจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุทัศน์ จันทรบัวลา. 2558. ผลของแกลบ เถ้าแกลบ ชานอ้อย และเถ้าชานอ้อยต่อสมบัติทางกายภาพของอิฐมวลเบา. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุบัณฑิต นิมรรัตน์ และวีระพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2552. การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน: บทบาทของจุลินทรีย์ และการประยุกต์ใช้. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 308 หน้า.
- สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2563. BCG in Action: สาขาเกษตร. กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม. 57 หน้า.
- อัญชลี อุษณาสุวรรณกุล และ กัญญ์วรา ทองกระจ่าง. 2565. การใช้ประโยชน์จากกากถั่วเหลือง. วารสารอาหาร, 52: 24-36.
- อาภาวรรณ พ่อคำ. 2556. การติดตามและศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในเมือกชีวภาพของระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียนที่มีปัญหาในตรกยะผสม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยทักษิณ.

- 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 J. Mar. Sci.* 35: 240–248.
- Banaszkiewicz, T. 2011. Nutritional value of soybean meal. *Soybean and Nutrition* 12: 1–20.
- Barber, S. and Benedito de Barber, C. 1980. Rice bran: Chemistry and Technology, *In* B.S. Luh(ed.). *Rice: Production and Utilization*. AVI Publ. Co., Inc., Westport. 791–862.
- Bernat, K. and Wojnowska-Baryła, I. 2007. Carbon source in aerobic denitrification. *Biochem. Eng. J.* 36: 116–122.
- Bernhard, A. 2010. The nitrogen cycle: Processes, players, and human impact. *Nat. Educ. Knowl.* 3: 25.
- Bitton, G. 1994. *Wastewater Microbiology*. Wiley-Liss, Inc. USA. 765 pp.
- Boopathy, R., Fontenet, Q. and Kilgen, M. B. 2005. Biological treatment of sludge from a recirculating aquaculture system using a sequencing batch reactor. *J. World Aquacult. Soc.* 36: 542–545.
- Bucci, P., Coppotelli, B., Morelli, I., Zaritzky, N. and Caravelli, A. 2020. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification of wastewater in granular reactor: Microbial composition by next generation sequencing analysis. *J. Water Process Eng.* 36: 101254.
- Burut-Archana, S., Ubertino, D., Chumtong, P., Mhuanthong, W., Powtongsook, S. and Piyapattanakorn, S. 2021. Dynamics of microbial community during nitrification biofilter acclimation with low and high ammonia. *Mar. Biotechnol.* 23: 671–681.
- Carroll, L. E. 1990. Function properties and applications of stabilized rice bran in bakery products. *J. Food Tech.* 44: 74–76.
- Chankaew, S. and Sangnoi, Y. 2023. Exploring the efficacy of *Bacillus oceanisediminis* Ba9 from Asian seabass cage sediment in saline wastewater treatment. *ASEAN J. Sci. Tech. Report* 26: 54–66.
- Chankaew, S., O-Thong, S. and Sangnoi, Y. 2018. Nitrogen removal efficiency of salt-tolerant heterotrophic nitrifying bacteria. *Chiang Mai J. Sci.* 45: 11–20.

- Chen, P., Li, J., Li, Q. X., Wang, Y., Li, S., Ren, T. and Wang, L. 2012. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24. *Bioresour. Technol.* 116: 266–270.
- Chena, S., Linga, J. and Blanchetonb, J. P. 2006. Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. *Aquacult. Eng.* 34: 179–197.
- Ciesielczuk, T., Rosik-Dulewska, C., Poluszyńska, J., Miłek, D., Szewczyk, A. and Sławińska, I. 2018. Acute toxicity of experimental fertilizers made of spent coffee grounds. *Waste Biomass Valor.* 9, 2157–2164.
- Cui, Y., Cui, Y. W. and Huang, J. L. 2021. A novel halophilic *Exiguobacterium mexicanum* strain removes nitrogen from saline wastewater via heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Bioresour. Technol.* 333: 125189.
- Dhanasiri, A. K. S., Kiron, V., Fernandes, J. M. O., Bergh, Ø. and Powell, M. D. 2011. Novel application of nitrifying bacterial consortia to ease ammonia toxicity in ornamental fish transport units: trials with zebrafish. *J. Appl. Microbiol.* 111: 278–292.
- Foesel, B. U., Gieseke, A., Schwermer, C., Stief, P., Koch, L., Cytryn, E., de la Torr´e, J. R., van Rijn, J., Minz, D., Drake, H. L. and Schramm, A. 2008. *Nitrosomonas* Nm143–like ammonia oxidizers and *Nitrospira marina*–like nitrite oxidizers dominate the nitrifier community in a marine aquaculture biofilm. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63: 192–204.
- Guo, Y., Zhou, X., Li, Y., Li, K., Wang, C., Liu, J., Yan, D., Liu, Y., Yang, D. and Xing, J. 2013. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Halomonas campisalis*. *Biotechnol. Lett.* 35: 2045–2049.
- Gupta, R. S. 2000. The phylogeny of Proteobacteria: Relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 367–402.
- Hargreaves, J. A. 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture pond. *Aquaculture.* 166: 181–212.
- Hu, J., Li, D., Liu, Q., Tao, Y., He, X., Wang, X., Li, X. and Gao, P. 2009. Effect of organic carbon on nitrification efficiency and community composition of nitrifying biofilms. *J. Environ. Sci.* 21: 387–394.
- Huang, F., Pan, L., Song, M., Tian, C. and Gao, S. 2018. Microbiota assemblages of water, sediment, and intestine and their associations with environmental factors and shrimp physiological health. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102: 8585–8598.

- Ip, Y. K., Chew, S. F. and Randall, D. J. 2001. Ammonia toxicity, tolerance, and excretion. *Fish Physiol.* 20: 109-148.
- Joo, H. S., Hirai, M. and Shoda, M. 2005. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4. *J. Biosci. Bioeng.* 100: 184-191.
- Kasana, R. C. and Pandey, C. B. 2018. *Exiguobacterium*: an overview of a versatile genus with potential in industry and agriculture. *Crit. Rev. Biotechnol.* 38: 141-156.
- Kim, J. K., Park, K. J., Cho, K. S., Nam, S., Park, T. and Bajpai, R. 2005. Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresour. Technol.* 96: 1897-1906.
- Koops, H. P., Bottcher, B., Moller, U. C., Pommerening-Roser, A. and Stehr, G. 1991. Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas ureae* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov., *Nitrosomonas eutropha* sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov. and *Nitrosomonas halophila* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* 137: 1689-1699.
- Rejish Kumar, V. J., Achuthan, C., Manju, N. J., Philip, R. and Bright Singh, I. S. 2009. Mass production of nitrifying bacterial consortia for the rapid establishment of nitrification in saline recirculating aquaculture systems. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 407-414.
- Rejish Kumar, V. J., Sukumaran, V., Achuthan, C., Joseph, V., Philip, R. and Bright Singh, I. S. 2013. Molecular characterization of the nitrifying bacterial consortia employed for the activation of bioreactors used in brackish and marine aquaculture systems. *Int. Biodeter. Biodegr.* 78: 74-81.
- Liang, S. C., Zhao, M., Lu, L., Wang, C., Zhao, L. and Liu, W. 2011. Isolation and characteristic of an aerobic denitrifier with high nitrogen removal efficiency. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 10648-10656.
- Linda, B. 2020. 14 Chemolithotrophy and Nitrogen Metabolism In *1st edition General Microbiology*. Linda, B. Editor. p. 122-128. Corvallis, OR.
- Lu, Y., Wang, X., Liu, B., Liu, Y. and Yang, X. 2012. Isolation and characterization of heterotrophic nitrifying strain W1. *Chinese J. Chem. Eng.* 20: 995-1002.
- Luh, B. S., Barber, S. and Benedito, de B. C. 1991. Rice volume ii: Utilization. 2nd. Van Nostrand Reinhold. New York, 414 pp.
- Michaud, L., Giudice, A. L., Interdonato, F., Triplet, S., Ying, L. and Blancheton, J. P. 2014. C/N ratio-induced structural shift of bacterial communities inside lab-scale aquaculture biofilters. *Aquac. Eng.* 58:77-87.

- Noorak, S., Rakkhiaw, S., Limjirakhajorn, K., Uppabullung, A., Keawtawee, T. and Sangnoi, Y. 2018. Nitrite oxidizing bacteria for water treatment in coastal aquaculture system. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 137: 012005.
- Osaka, T., Shirotani, K., Yoshie, S. and Tsuneda, S. 2008. Effects of carbon source on denitrification efficiency and microbial community structure in a saline wastewater treatment process. Water Res. 42: 3709–3718.
- 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 J. 38: 1–15.
- Rajakumar, S., Ayyasamy, P. M., Shanthi, K., Thavamani, P., Velmurugan, P., Song, Y. C. and Lakshmanaperumalsamy, P. 2008. Nitrate removal efficiency of bacterial consortium (*Pseudomonas* sp. KW1 and *Bacillus* sp. YW4) in synthetic nitrate-rich water. J. Hazard. Mater. 157: 553–563.
- Ronga, D., Pane, C., Zaccardelli, M. and Pecchioni, N. 2016. Use of spent coffee ground compost in peat-based growing media for the production of basil and tomato potting plants. Content courtesy of Springer Nature, terms of use apply. Commun. Soil Sci. Plan Anal. 47: 356–368.
- Sajjai, S., Ando, A., Inukai, R., Shinohara, M. and Ogawa, J. 2016. Analysis of microbial community and nitrogen transition with enriched nitrifying soil microbes for organic hydroponics. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2247–2254.
- Sangnoi, Y., Chankaew, S. and O-Thong, S. 2017. Indigenous *Halomonas* spp., the potential nitrifying bacteria for saline ammonium wastewater treatment. Pak. J. Biol. Sci. 20: 52–58.
- Satanwat, P., Tran, T. P., Hirakata, Y., Watari, T., Hatamoto, M., Yamaguchi, T., Pungrasmi, W. and Powtongsook, S. 2020. Use of an internal fibrous biofilter for intermittent nitrification and denitrification treatments in a zero-discharge shrimp culture tank. Aquac. Eng. 88: 102041.
- 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 weinstephensis* (DS45). Groundw. Sustain. Dev. 5: 21–27.
- 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.

- Sorokin, D. Y., Muyzer, G., Brinkhoff, T., Kuenen, J. G. and Jetten, M. S. M. 1998. Isolation and characterization of a novel facultatively alkaliphilic *Nitrobacter* species, *N. alkalicus* sp. nov. Arch. Microbiol. 170: 345–352.
- Strickland, J. D. H. and Parsons, T. R. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fishery Research Board, Canada. 310 pp.
- Su, J., Zhang, K., Huang, T., Wen, G., Guo, L. and Yang, S. 2015. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low nutrient conditions by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. SYF26. Microbiology 161: 829–837.
- Suharti, Heering, H. A. and de Vries, S. 2004. NO reductase from *Bacillus azotoformans* is a bifunctional enzyme accepting electrons from menaquinol and a specific endogenous membrane-bound cytochrome C551. Biochemistry. 43: 13487–13495.
- Tchobanoglous, G., Burton, F. L. and Stensel, H. D. 2004. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse, 4 edn., Metcalf and Eddy Inc., New York, McGraw Hill. 1819 pp.
- Tookwinas, S. 1996. Environmental impact assessment for intensive marine shrimp farming in Thailand. Thai Fish. Gaz. 49: 119–133.
- Wen, Y. and Wei, C. H. 2011. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacterium isolated from anaerobic/anoxic/oxic treatment system. Afr. J. Biotechnol. 10: 6985–6990.
- Yanagita, T. 1990. Nature Microbiology Communities: Ecological and Physiological Features. Tokyo Japan Scientific Societies Press, Japan. 485 pp.
- Yang, X. P., Wang, S. M., Zhang, D. W. and Zhou, L. X. 2011. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying–denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. Bioresour. Technol. 102: 854–862.
- Yao, S., Ni, J., Ma, T. and Li, C. 2013. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2. Bioresour. Technol. 139: 80–86.
- Zhang, J., Wu, P., Hao, B. and Yu, Z. 2011. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. Bioresour. Technol. 102: 9866–9869.
- Zhang, M., Pan, L., Huang, F., Gao, S., Su, C., Zhang, M. and He, Z. 2019. Metagenomic analysis of composition, function and cycling processes of microbial community in water, sediment and effluent of *Litopenaeus vannamei* farming environments under different culture modes. Aquaculture 506: 280–293.

- Zhang, Q. L., Liu, Y., Ai, G. M., Miao, L. L., Zheng, H. Y. and Liu, Z. P. 2012. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7. *Bioresour. Technol.* 108: 35–44.
- Ziembinska, A., Ciesielski, S. and Miksch, K. 2009. Ammonia oxidizing bacteria community in activated sludge monitored by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 55: 373–380.

ภาคผนวก

การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียด้วยวิธี Colorimetric method (Strickland and Parsons, 1972)

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์แอมโมเนีย

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

วิธีการวิเคราะห์แอมโมเนียจากตัวอย่างน้ำ

- ปิเปตตัวอย่างน้ำ 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด เพื่อป้องกันการระเหยของแอมโมเนีย
- เติม 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย phenol เขย่าให้เข้ากัน
- เติม 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย sodium nitroprusside และ 1 มิลลิลิตร ของสารละลาย oxidizing
- ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 640 นาโนเมตร

การเตรียมกราฟมาตรฐานแอมโมเนีย

- นำ 5 มิลลิลิตร ของสารละลายมาตรฐานมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีความเข้มข้น 0.35 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร
- ดูดสารละลายข้างต้นมา 5, 10, 20 และ 40 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลเทียม ส่วน blank ให้ใช้น้ำทะเลเทียม
- เติม 2.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย phenol เขย่าให้เข้ากัน
- เติม 2.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย sodium nitroprusside และ 5 มิลลิลิตร ของสารละลาย oxidizing
- ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 640 นาโนเมตร

- จัดบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับความเข้มข้นด้วยวิธี Linear regression

การวิเคราะห์ไนโตรเจนด้วยวิธี Colorimetric method (Strickland and Parsons, 1972)

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ไนโตรเจน

- สารละลาย sulfanilamide
ละลาย $C_6H_8N_2O_2S$ 5 กรัม ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร
- สารละลาย *N*-(1-Naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride
ละลาย $C_{10}H_7NHCH_2NH_2 \cdot 2HCl \cdot CH_3OH$ 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร
- สารละลายไนโตรเจนมาตรฐาน
ละลาย $NaNO_2$ (โดยผ่านการอบ 105-110 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง) 0.345 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร สารละลายจะมีความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชาและแช่เย็น

วิธีการวิเคราะห์ไนโตรเจนจากตัวอย่างน้ำ

- นำตัวอย่างน้ำ 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ 125 มิลลิลิตร
- เติมสารละลาย 1 มิลลิลิตร sulfanilamide ผสมและตั้งทิ้งไว้ 2-8 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
- เติม 1 มิลลิลิตร ของ *N*-(1-Naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride เขย่าตัวอย่างทันที ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร
- สำหรับ blank ให้ใช้น้ำทะเลเทียมแทนตัวอย่างน้ำ และทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับตัวอย่างน้ำ

การเตรียมกราฟมาตรฐานไนโตรเจน

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

การวิเคราะห์ไนเตรทด้วยวิธี Cadmium Reduction Column (Strickland and Parsons, 1972)

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ไนเตรท

- สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์เข้มข้น

ละลาย 125 กรัม NH_4Cl ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

- สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์เจือจาง

นำสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 2,000 มิลลิลิตร

- สารละลาย sulfanilamide

สามารถใช้สารร่วมกับการวิเคราะห์ไนไตรท์

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

สามารถใช้สารร่วมกับการวิเคราะห์ไนไตรท์

- สารละลาย 2 เปอร์เซนต์ (W/V) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

ละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

- สารละลายไนเตรทมาตรฐาน

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

การเตรียม Cadmium – copper column material

- ชั่งโลหะแคดเมียม 50 กรัม ผสมกับสารละลาย 2 เปอร์เซนต์ (W/V) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 250

มิลลิลิตร กวนแคดเมียมจนกว่าสารละลายสีฟ้าจะเริ่มจางหายไปและเกิดตะกอนสีแดงอิฐ จากนั้นให้ทำการล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 8-12 ครั้ง

- อุดด้านในของคอลัมน์ด้วยใยแก้ว เติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์เจือจางให้เต็มคอลัมน์

- บรรจุแคดเมียมลงในคอลัมน์ ระมัดระวังอย่าให้แคดเมียมสัมผัสกับอากาศ และทำการล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์เจือจาง 4-5 ครั้ง

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

วิธีการวิเคราะห์ไนเตรทจากตัวอย่างน้ำ

- เติม 2 มิลลิลิตร สารละลายแอมโมเนียมเข้มข้น ลงในตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร

- นำ 5 มิลลิลิตร ของสารละลายตัวอย่างน้ำข้างต้นไปใส่ในคอลัมน์ และปล่อยให้ผ่านสารละลายโดยมีอัตราการไหลผ่าน 8-12 มิลลิลิตร/นาที่

- เติมสารละลายตัวอย่างน้ำลงในคอลัมน์ โดยปล่อยให้สารละลาย 25 มิลลิลิตร ในช่วงแรก แล้วเก็บสารละลาย 50 มิลลิลิตร ในช่วงหลังเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อ

- เติม 1 มิลลิลิตร ของ sulfanilamide ตั้งทิ้งไว้ 2-8 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา

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

- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 543 นาโนเมตร

การเตรียมกราฟมาตรฐานไนเตรท

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

ความเข้มข้นของไนเตรทหาได้จาก

ความเข้มข้นของไนเตรทที่ผ่านคอลัมน์ – ความเข้มข้นของไนเตรทของตัวอย่างน้ำเดียวกัน

การวิเคราะห์ออกซิเจนละลายน้ำด้วยวิธี Titration Method (Strickland and Parsons, 1972)

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ออกซิเจนละลายน้ำ

- สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์
ละลายโปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 8.5 กรัม ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 21.75 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 33.5 กรัม และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 1.7 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร พีเอชของสารละลายนี้ควรจะประมาณ 7.2
- สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต
ละลายแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 22.5 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร
- สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์
ละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.25 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

- สารละลายแคลเซียมคลอไรด์

ละลายแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) 27.5 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

- สารละลายแมงกานีสซัลเฟตเตตราไฮเดรต

ละลายแมงกานีสซัลเฟตเตตราไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 480 กรัม หรือแมงกานีสซัลเฟตไดไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 400 กรัม หรือแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 364 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

- สารละลายอัลคาไลโอไอไดด์อะไซด์ (alkali-iodide-azide reagent; AIA)

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 500 กรัม (หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์, KOH) 700 กรัม และ โซเดียมไอโอไดด์ (NaI) 135 กรัม (หรือโพแทสเซียมไอโอไดด์, KI) 150 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร หลังจากนั้นจึงเติมโซเดียมอะไซด์ (NaN_3) 10 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลายข้างต้น

- กรดซัลฟูริกเข้มข้น กรดซัลฟูริกเข้มข้น (concentrated H_2SO_4) 1 มิลลิลิตร จะทำปฏิกิริยาสมดุลกับสารละลายอัลคาไลโอไอไดด์อะไซด์ (alkali-iodide-azide reagent) 3.0 มิลลิลิตร

- น้ำแป้ง

ละลายแป้ง (laboratory-grade soluble starch) 2-4 กรัม และสารละลายกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) 0.2 กรัม ในน้ำกลั่นที่ร้อน 100 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต

ละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 6.205 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 6 นอร์มอล จำนวน 1.5 มิลลิลิตร หรือ 0.4 กรัม จากนั้นเจือจางให้ได้ 1 ลิตร

- สารละลายมาตรฐานโซเดียมไดโครเมต 0.025 N

ละลาย $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0.6129 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร

- สารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์

ละลาย KI 2 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

วิเคราะห์หาออกซิเจนละลายในน้ำ

- ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งด้วยกระบอกเก็บน้ำ (water sampler) จากนั้นปล่อยน้ำตัวอย่างใส่ในขวด BOD โดยไม่ให้เกิดฟอง

- เติมสารละลายแมงกานีสซัลเฟต (MnSO_4) และสารละลายอัลคาไลโอไอไดด์อะไซด์ (AIA) อย่างละ 1 มิลลิลิตร โดยให้ปลายปิเปตจุ่มใต้ผิวน้ำตัวอย่าง ปิดจุกขวดโดยไม่ให้มีฟองอากาศเหลืออยู่ที่คอขวดปิโอติ เขย่าขวดโดยคว่ำขวดขึ้นลงประมาณ 15 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้ตะกอนตกตะกอนประมาณครึ่งขวด

- เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไป 1 มิลลิลิตร (ค่อย ๆ ปล่อย) ปิดจุกขวดปิโอติ แล้วเขย่าขวดปิโอติโดยคว่ำขวดขึ้นลงจนกระทั่งตะกอนละลายหมด

- ตวงสารละลายที่ได้มา 200 มิลลิลิตร แล้วไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต จนสีสารละลายจางลง หลังจากนั้นเติมน้ำแป้ง 2-3 หยด (สีสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน) แล้วไตเตรทต่อจนสารละลายกลายเป็นไม่มีสี แสดงว่าถึงจุดยุติ

- บันทึกปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ไป ในการณิใช้ ปริมาตรน้ำตัวอย่าง 200 มิลลิลิตร ไตรเทรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.0250 นอร์มอล 1 มิลลิลิตร เท่ากับ DO ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

- หาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต โดยเติมสารละลายมาตรฐาน โพแทสเซียมไดโครเมต 0.025 นอร์มอล 10 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ซึ่งบรรจุสารละลาย KI แล้วเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตรรวมประมาณ 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปไตรเทรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต เช่นเดียวกับการไตรเทรทหาความเข้มข้นของ DO ในน้ำ ตัวอย่าง คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต โดยใช้สูตรคำนวณ

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

คำนวณหาค่าออกซิเจนละลายน้ำได้ตามสูตรคำนวณ ดังนี้

$$DO \text{ (มก./ล.)} = \frac{\text{มล. ของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต}(N)(8)(1000)}{\text{มล. น้ำตัวอย่าง}}$$

เมื่อ N คือ นอร์มอลลิติ์ของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ไตรเทรท

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) ดัดแปลงจาก อาภาวรรณ (2556)

- ตัดกระดาษกรองน้ำหนัก 0.5 กรัม
- เติม 500 ไมโครลิตร 2x TENS buffer (50 มิลลิโมล Tris-HCl, 20 มิลลิโมล EDTA, 100 มิลลิโมล NaCl, 1 เปอร์เซ็นต์ SDS)
- นำไป homogenize ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที
- นำ 500 ไมโครลิตร ของสารละลายใส่หลอดใหม่ขนาด 2 มิลลิลิตร ผสมกับ 50 ไมโครลิตร ของ Lysozyme (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้วนำไปบ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที
- เติม 200 ไมโครลิตร ของ 1 เปอร์เซ็นต์ SDS และ 40 ไมโครลิตร ของ Proteinase K (20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) นำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- เติม 790 ไมโครลิตร phenol : chloroform : isoamyl (25:24:1 v/v)
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- ดูดส่วนใสประมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม 500 ไมโครลิตร chloroform : isoamyl (24:1 v/v)
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- ดูดส่วนใสประมาณ 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม 100 ไมโครลิตร 3 โมล CH₃COONa และเติม 500 ไมโครลิตร ของ cool absolute ethanol
- บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างด้วย cool 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- ทิ้งส่วนใส แล้วทำการตากแห้ง โดยทำการคว่ำหลอดไว้ในที่ที่สะอาด
- เติมสารละลาย 30-50 ไมโครลิตร ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หรือ TE buffer
- นำตัวอย่างเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง
- นำตัวอย่างมาตรวจสอบด้วย Gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel 1 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE buffer ที่ผ่านการทำละลายด้วยไมโครเวฟ แล้วตั้งเข็มให้เจลแข็งตัว
- นำเจลที่แข็งตัวแล้วมาวางในกล่อง agarose electrophoresis เท TBE buffer ให้ท่วมเจลพอดี
- ผสม 1 ไมโครลิตรของ loading dye กับ 5 ไมโครลิตรของตัวอย่างดีเอ็นเอ แล้วทำการโหลดลงในช่องว่างของเจล โดยรันเจลพร้อมกับ 1Kb DNA marker
- รันดีเอ็นเอโดยใช้กำลังไฟ 80 โวลต์ 40 นาที
- เมื่อครบเวลานำแผ่นเจลมาดูความเข้มของแถบดีเอ็นเอและถ่ายภาพภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลอิเล็กทรอนิกส์ (Gel-Documentation)
- นำตัวอย่างดีเอ็นเอไปตรวจความบริสุทธิ์ (DNA purity) ที่ A260/A280 จะต้องมีย่านค่ามากกว่า 1.7
- จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างที่ -20 องศาเซลเซียส และส่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ 16S rRNA ด้วยวิธี metagenome sequencing

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์

Strain	Ammonia		Ammonium Removal		Nitrite	Nitrate
	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	(mg-N/L)	(percent)	(mg-N/L)	(mg-N/L))
Ba9	825.16±11.22 ^{ns}	295.08±4.58 ^a	530.08±7.51 ^b	64.24±0.27 ^c	0.13±0.01 ^b	0.11±0.02 ^{ab}
SF1	825.16±11.22 ^{ns}	252.17±8.00 ^b	572.99±13.66 ^{ab}	69.44±1.06 ^{ab}	0.24±0.01 ^a	0.14±0.03 ^a
SRNB 23	825.16±11.22 ^{ns}	225.74±13.34 ^b	599.43±23.23 ^a	72.79±1.91 ^a	0.10±0.00 ^c	0.04±0.04 ^b
SRNB 35	825.16±11.22 ^{ns}	278.86±20.86 ^{ab}	546.36±23.00 ^b	66.21±2.56 ^b	0.10±0.00 ^c	0.05±0.03 ^b

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95

เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

หมายเหตุ	Ba9	คือ	<i>B. oceanisediminis</i> Ba9
	SF-1	คือ	<i>B. vietnamensis</i> SF-1
	SRNB 23	คือ	<i>A. faecalis</i> SRNB23
	SRNB 35	คือ	<i>A. faecalis</i> SRNB35

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของกล้าเชื้อผสมเห็ดไตรโคฟิคาไนตริไฟอิงแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ เมื่อศึกษาเป็นระยะเวลา 5 วัน¹

Strain	Ammonia		Ammonium removal		Nitrite	Nitrate
	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	(mg-N/L)	(percent)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
SRNB23+SRNB35	864.79±23.82 ^{ns}	202.95±34.25 ^b	661.84±29.54 ^a	76.53±3.42 ^a	0.24±0.00 ^a	0.00±0.00 ^b
SRNB23+Ba9	864.79±23.82 ^{ns}	239.17±12.95 ^b	625.63±11.12 ^{ab}	72.34±1.29 ^{ab}	0.06±0.01 ^c	0.01±0.01 ^b
SRNB23+SF-1	864.79±23.82 ^{ns}	333.30±37.90 ^b	531.49±14.60 ^c	61.46±1.69 ^c	0.01±0.00 ^d	0.01±0.01 ^b
SRNB35+Ba9	864.79±23.82 ^{ns}	341.50±39.01 ^b	523.29±23.36 ^c	60.51±2.70 ^c	0.05±0.02 ^c	0.02±0.02 ^{ab}
SRNB35+SF-1	864.79±23.82 ^{ns}	233.49±64.36 ^b	631.30±40.58 ^a	73.00±4.69 ^a	0.01±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b
Ba9+SF-1	864.79±23.82 ^{ns}	190.67±49.81 ^b	673.82±27.27 ^a	77.92±3.15 ^a	0.05±0.03 ^c	0.03±0.02 ^a
SRNB23+SRNB35+Ba9	864.79±23.82 ^{ns}	241.33±8.83 ^b	623.46±18.02 ^{ab}	72.09±2.09 ^{ab}	0.05±0.03 ^c	0.00±0.00 ^b
SRNB23+SRNB35+SF-1	864.79±23.82 ^{ns}	300.86±31.78 ^b	563.93±33.16 ^{bc}	65.21±3.83 ^{bc}	0.01±0.00 ^d	0.01±0.01 ^b
SRNB35+Ba9+SF-1	864.79±23.82 ^{ns}	562.51±76.05 ^a	302.29±76.83 ^d	34.95±8.88 ^d	0.05±0.03 ^c	0.01±0.00 ^b
SRNB23+SRNB35+Ba9+SF-1	864.79±23.82 ^{ns}	511.18±41.54 ^a	353.62±38.16 ^d	40.89±4.41 ^d	0.10±0.02 ^b	0.00±0.00 ^b

¹ ตัวเลขที่นำเสนอนี้เป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสตรัมที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสตรัม

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

หมายเหตุ	SRNB 23 คือ <i>A. faecalis</i>	SRNB 35 คือ <i>A. faecalis</i>
	Ba9 คือ <i>B. oceanisediminis</i>	SF-1 คือ <i>B. vietnamensis</i>

ตารางที่ 11 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเชื้อโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *A. faecalis* SRNB23 ระยะเวลา 5 วัน¹

Carbon source (0.6 M)	Ammonia		Ammonium removal		Nitrite	Nitrate
	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	(mg-N/L)	(percent)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
Glucose	701.87±6.85 ^{bc}	624.85±20.10 ^b	77.02±12.11 ^d	10.98±2.35 ^c	0.03±0.00 ^d	0.00±0.00 ^{ns}
Sodium acetate	690.99±12.99 ^c	537.39±15.76 ^c	153.60±16.81 ^c	22.22±2.25 ^c	0.07±0.00 ^b	0.00±0.00 ^{ns}
Sodium succinate	801.51±5.71 ^a	764.09±12.03 ^a	37.42±6.95 ^e	4.67±0.90 ^c	0.05±0.00 ^c	0.00±0.00 ^{ns}
Sucrose	781.06±32.62 ^{ab}	449.49±12.41 ^d	331.57±26.50 ^b	42.41±1.82 ^b	0.03±0.00 ^d	0.00±0.00 ^{ns}
Sodium citrate	786.28±11.41 ^{ab}	137.94±19.29 ^e	648.34±12.88 ^a	82.47±2.14 ^a	0.16±0.00 ^a	0.00±0.00 ^{ns}

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 12 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเชื้อโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *A. faecalis* SRNB35 ระยะเวลา 5 วัน¹

Carbon source (0.6 M)	Ammonia		Ammonium removal		Nitrite	Nitrate
	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	(mg-N/L)	(percent)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
Glucose	701.87±6.85 ^{bc}	611.80±9.73 ^a	90.07±9.32 ^e	12.83±1.29 ^c	0.04±0.00 ^e	0.00±0.00 ^{ns}
Sodium acetate	690.99±12.99 ^c	524.77±13.95 ^{ab}	166.22±14.46 ^d	24.05±1.89 ^{bc}	0.20±0.00 ^b	0.00±0.00 ^{ns}
Sodium succinate	801.51±5.71 ^a	596.57±17.31 ^a	204.95±11.64 ^c	25.58±1.64 ^{bc}	0.15±0.00 ^c	0.00±0.00 ^{ns}
Sucrose	781.06±32.62 ^{ab}	306.77±11.14 ^c	474.29±38.61 ^a	60.60±2.56 ^a	0.07±0.00 ^d	0.00±0.00 ^{ns}
Sodium citrate	786.28±11.41 ^{ab}	501.27±42.73 ^b	285.01±48.21 ^b	36.22±5.83 ^b	0.31±0.00 ^a	0.00±0.00 ^{ns}

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 13 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเชื้อราโพรทอปคไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. oceanisediminis* Ba9 ระยะเวลา 5 วัน¹

Carbon source (0.6 M)	Ammonia		Ammonium removal		Nitrite	Nitrate
	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	(mg-N/L)	(percent)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
Glucose	820.04±44.29 ^{ab}	441.70±28.11 ^{ab}	378.34±40.06 ^{bc}	46.14±4.89 ^{cd}	0.06±0.01 ^a	0.00±0.00 ^{ns}
Sodium acetate	789.99±13.16 ^b	478.88±1.11 ^a	314.11±12.98 ^c	39.76±1.64 ^d	0.05±0.04 ^{ab}	0.00±0.00 ^{ns}
Sodium succinate	893.44±88.42 ^a	439.28±16.98 ^{ab}	454.15±75.22 ^{ab}	50.83±8.42 ^{bc}	0.07±0.03 ^a	0.00±0.00 ^{ns}
Sucrose	858.47±27.58 ^{ab}	334.39±4.59 ^c	524.08±29.14 ^a	61.05±3.39 ^a	0.02±0.01 ^b	0.00±0.00 ^{ns}
Sodium citrate	881.59±18.02 ^{ab}	382.94±9.93 ^{bc}	498.65±26.54 ^a	56.56±3.01 ^{ab}	0.03±0.02 ^b	0.00±0.00 ^{ns}

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 14 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเชื้อราไตรโคเดอร์มาสายพันธุ์ *B. vietnamensis* SF-1 ระยะเวลา 5 วัน¹

Carbon source (0.6 M)	Ammonia		Ammonium removal		Nitrite	Nitrate
	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	(mg-N/L)	(percent)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
Glucose	820.04±44.29 ^{ab}	470.70±28.11 ^{ab}	349.34±40.06 ^{bc}	42.60±4.89 ^{cd}	0.01±0.00 ^{ns}	0.00±0.00 ^{ns}
Sodium acetate	789.99±13.16 ^b	501.91±1.11 ^a	288.08±12.98 ^c	36.47±1.64 ^d	0.01±0.01 ^{ns}	0.00±0.00 ^{ns}
Sodium succinate	893.44±88.42 ^a	470.70±16.98 ^{ab}	433.73±75.22 ^{ab}	47.32±8.42 ^{bc}	0.01±0.01 ^{ns}	0.00±0.00 ^{ns}
Sucrose	858.47±27.58 ^{ab}	367.81±4.59 ^c	493.66±29.14 ^a	57.39±3.39 ^a	0.00±0.00 ^{ns}	0.00±0.00 ^{ns}
Sodium citrate	881.59±18.02 ^{ab}	414.36±9.93 ^{bc}	467.23±26.54 ^a	52.99±3.01 ^{ab}	0.01±0.00 ^{ns}	0.00±0.00 ^{ns}

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสัปดาห์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสัปดาห์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 15 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *A. faecalis* SRNB23 โดยใช้ sodium citrate เป็นแหล่งคาร์บอน ระยะเวลา 5 วัน¹

Nitrogen source	Ammonia		Ammonium removal		Nitrite	Nitrate
	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	(mg-N/L)	(percent)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
Ammonium chloride	803.28±1.81 ^b	686.98±7.15 ^a	116.29±8.10 ^b	14.48±1.00 ^b	0.67±0.00 ^b	0.00±0.00 ^{ns}
Ammonium sulfate	810.87±16.20 ^a	177.54±23.01 ^b	633.33±35.15 ^a	78.13±2.54 ^a	0.77±0.00 ^a	0.00±0.00 ^{ns}

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสัปดาห์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสัปดาห์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 16 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *A. faecalis* SRNB35 โดยใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน ระยะเวลา 5 วัน¹

Nitrogen source	Ammonia		Ammonium removal		Nitrite	Nitrate
	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	(mg-N/L)	(percent)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
Ammonium chloride	846.91±27.97 ^a	387.12±40.37 ^a	459.76±8.20 ^b	54.16±6.14 ^b	0.63±0.01 ^a	0.00±0.00 ^{ns}
Ammonium sulfate	815.31±23.54 ^b	357.80±35.23 ^b	463.51±32.62 ^a	56.58±4.51 ^a	0.10±0.00 ^b	0.00±0.00 ^{ns}

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสัปดาห์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสัปดาห์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 17 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. oceanisediminis* Ba9 โดยใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน ระยะเวลา 5 วัน ¹

Nitrogen source	Ammonia		Ammonium removal		Nitrite	Nitrate
	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	(mg-N/L)	(percent)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
Ammonium chloride	803.05±14.53 ^{ns}	460.71±8.16 ^a	342.34±10.20 ^a	42.63±1.27 ^b	0.01±0.00 ^{ns}	0.01±0.01 ^{ns}
Ammonium sulfate	804.56±38.62 ^{ns}	398.04±9.39 ^b	406.52±4.46 ^b	50.53±0.55 ^a	0.01±0.00 ^{ns}	0.01±0.01 ^{ns}

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสัปดาห์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสัปดาห์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 18 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. vietnamensis* SF-1 โดยใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน ระยะเวลา 5 วัน ¹

Nitrogen source	Ammonia		Ammonium removal		Nitrite	Nitrate
	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	(mg-N/L)	(percent)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
Ammonium chloride	803.05±14.53 ^{ns}	687.04±11.86 ^a	116.01±24.89 ^b	14.45±3.10 ^b	0.00±0.00 ^{ns}	0.01±0.00 ^{ns}
Ammonium sulfate	804.56±38.62 ^{ns}	433.92±25.17 ^b	370.64±59.11 ^a	46.15±7.36 ^a	0.00±0.00 ^{ns}	0.01±0.00 ^{ns}

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสัปดาห์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสัปดาห์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 19 สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสมสำหรับเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *A. faecalis* SRNB23 โดยใช้ sodium citrate เป็นแหล่งคาร์บอน และ ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจน ¹

C/N ratio	Ammonia		Ammonium removal		Nitrite	Nitrate
	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	(mg-N/L)	(percent)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
0	835.8±11.50 ^{ns}	617.98±29.42 ^a	217.80±27.94 ^b	26.06±3.33 ^b	0.16±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a
2	835.8±11.50 ^{ns}	558.82±5.87 ^a	276.96±11.40 ^b	33.13±1.00 ^b	0.15±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a
4	835.8±11.50 ^{ns}	206.42±17.58 ^b	629.36±29.06 ^a	75.28±2.44 ^a	0.03±0.00 ^b	0.01±0.00 ^a
8	835.8±11.50 ^{ns}	234.60±36.62 ^b	601.17±27.08 ^a	71.96±4.02 ^a	0.03±0.00 ^b	0.01±0.00 ^a
16	835.8±11.50 ^{ns}	583.12±27.56 ^a	252.66±38.57 ^b	30.19±4.19 ^b	0.05±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 20 สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสมสำหรับเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *A. faecalis* SRNB35 โดยใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน และ ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจน ¹

C/N ratio	Ammonia		Ammonium removal		Nitrite	Nitrate
	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	(mg-N/L)	(percent)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
0	842.90±12.71 ^{ns}	559.11±23.58 ^a	283.79±33.08 ^b	33.64±3.54 ^b	0.12±0.00 ^a	0.00±0.00 ^{ns}
2	842.90±12.71 ^{ns}	399.57±56.40 ^b	443.33±58.74 ^a	52.58±6.80 ^a	0.07±0.03 ^b	0.00±0.00 ^{ns}
4	842.90±12.71 ^{ns}	581.70±25.69 ^a	261.20±17.45 ^b	31.00±2.33 ^b	0.12±0.00 ^a	0.00±0.00 ^{ns}
8	842.90±12.71 ^{ns}	607.11±4.85 ^a	235.79±14.48 ^b	27.96±1.55 ^b	0.08±0.00 ^b	0.00±0.00 ^{ns}
16	842.90±12.71 ^{ns}	630.80±13.16 ^a	212.10±18.30 ^b	25.15±1.94 ^b	0.07±0.00 ^b	0.00±0.00 ^{ns}

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 21 สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสมสำหรับเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. oceanisediminis* Ba9 โดยใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน และ ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจน ¹

C/N ratio	Ammonia		Ammonium removal		Nitrite	Nitrate
	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	(mg-N/L)	(percent)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
0	823.21±28.50 ^{ns}	667.83±18.58 ^a	166.38±24.16 ^c	19.94±2.89 ^c	0.01±0.00 ^b	0.01±0.01 ^c
2	823.21±28.50 ^{ns}	562.88±13.24 ^b	271.33±39.04 ^b	32.53±4.68 ^b	0.09±0.00 ^a	0.01±0.01 ^c
4	823.21±28.50 ^{ns}	479.24±7.99 ^c	354.97±36.41 ^a	42.55±4.36 ^a	0.01±0.00 ^b	0.01±0.01 ^c
8	823.21±28.50 ^{ns}	519.01±19.23 ^{bc}	315.20±45.55 ^{ab}	37.78±5.46 ^{ab}	0.00±0.00 ^c	0.04±0.03 ^b
12	823.21±28.50 ^{ns}	518.56±7.02 ^{bc}	315.65±21.89 ^{ab}	37.84±2.62 ^{ab}	0.01±0.00 ^b	0.09±0.03 ^a

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 22 สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสมสำหรับเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. vietnamensis* SF-1 โดยใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน และ ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจน ¹

C/N ratio	Ammonia		Ammonium removal		Nitrite	Nitrate
	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	(mg-N/L)	(percent)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
0	840.43±28.37 ^{ns}	467.16±30.68 ^a	373.27±53.14 ^d	44.41±6.32 ^d	0.02±0.00 ^b	0.01±0.00 ^b
2	840.43±28.37 ^{ns}	318.62±40.90 ^{bc}	521.81±12.69 ^{bc}	62.09±1.51 ^{bc}	0.03±0.00 ^b	0.01±0.00 ^b
4	840.43±28.37 ^{ns}	286.30±4.07 ^{bc}	554.13±39.33 ^{ab}	65.93±3.49 ^{ab}	0.04±0.01 ^a	0.02±0.01 ^a
8	840.43±28.37 ^{ns}	242.43±19.19 ^c	598.00±31.56 ^a	71.15±8.76 ^a	0.03±0.00 ^b	0.02±0.00 ^a
12	840.43±28.37 ^{ns}	360.18±31.10 ^b	480.25±11.55 ^c	54.14±1.37 ^c	0.01±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 23 สัดส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อผสมสายพันธุ์ *B. oceanisediminis* Ba9 ต่อ *B. vietnamensis* SF-1 ในการกำจัดแอมโมเนีย¹

Ratio of Ba9 : SF1	Ammonia		Ammonium removal		Nitrite	Nitrate
	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	(mg-N/L)	(percent)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
30 : 70	835.78±11.50 ^{ns}	491.42±31.32 ^a	344.34±31.32 ^c	41.20±3.75 ^c	0.18±0.02 ^c	0.14±0.02 ^c
40 : 60	835.78±11.50 ^{ns}	375.90±12.31 ^{bc}	459.88±12.31 ^b	55.02±1.47 ^b	0.25±0.03 ^{ab}	0.20±0.01 ^a
50 : 50	835.78±11.50 ^{ns}	273.21±32.40 ^c	556.57±32.04 ^a	67.31±3.83 ^a	0.21±0.02 ^{bc}	0.02±0.01 ^d
60 : 40	835.78±11.50 ^{ns}	398.51±27.71 ^{ab}	436.90±28.72 ^b	52.32±3.44 ^b	0.27±0.01 ^a	0.18±0.01 ^{ab}
70 : 30	835.78±11.50 ^{ns}	429.51±33.50 ^{ab}	406.27±33.50 ^b	49.09±4.01 ^c	0.23±0.02 ^{ab}	0.17±0.01 ^b

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสตมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสตมภ์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 24 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนียจากการใช้วัสดุยัดเกาะจากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรในการสร้างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อสูตรผง (มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร)¹

Treatment	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
Control	16.96±4.56 ^{ns}	17.49±0.40 ^a	17.85±0.60 ^a	17.21±0.60 ^a	13.14±0.95 ^a	10.94±0.03 ^a	8.20±0.06 ^a	8.49±0.07 ^a
Husk	16.96±4.56 ^{ns}	8.62±0.14 ^e	13.26±0.18 ^c	15.63±3.68 ^a	9.27±1.07 ^b	3.89±0.09 ^c	0.78±0.06 ^d	1.98±0.90 ^c
Ground coffee	16.96±4.56 ^{ns}	9.82±0.05 ^d	14.80±0.19 ^b	17.07±1.76 ^a	11.94±2.53 ^a	1.78±0.06 ^d	3.68±0.32 ^c	1.93±0.20 ^c
Soybean meal	16.96±4.56 ^{ns}	14.89±0.82 ^b	14.71±0.18 ^b	7.10±2.45 ^b	4.92±1.40 ^c	5.08±0.25 ^b	5.20±0.75 ^b	6.55±1.71 ^b
Coco Peat	16.96±4.56 ^{ns}	11.46±1.01 ^c	9.87±1.78 ^d	10.23±1.04 ^b	4.86±0.49 ^c	2.10±1.09 ^d	3.26±0.01 ^c	5.61±0.00 ^b
Rice bran	16.96±4.56 ^{ns}	8.99±0.06 ^{de}	5.35±0.19 ^e	0.04±0.01 ^c	0.09±0.01 ^d	0.02±0.01 ^e	0.03±0.00 ^d	0.05±0.01 ^d

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 25 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจนจากการใช้วัสดุยัดเกาะจากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรในการสร้างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อสูตรผง (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)¹

Treatment	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
Control	0.08±0.01 ^d	0.14±0.01 ^c	0.18±0.01 ^a	0.49±0.00 ^b	0.63±0.02 ^b	0.16±0.00 ^a	0.06±0.01 ^d	0.48±0.00 ^b
Husk	0.14±0.00 ^b	0.20±0.04 ^b	0.17±0.01 ^{ab}	0.84±0.12 ^a	0.47±0.07 ^c	0.05±0.00 ^d	0.02±0.00 ^f	0.84±0.01 ^a
Ground coffee	0.14±0.02 ^b	0.13±0.02 ^c	0.07±0.00 ^{bc}	0.12±0.01 ^e	0.53±0.01 ^c	0.06±0.00 ^c	0.03±0.00 ^e	0.11±0.01 ^e
Soybean meal	0.20±0.01 ^a	0.06±0.01 ^d	0.11±0.13 ^{abc}	0.22±0.01 ^c	0.49±0.02 ^c	0.05±0.00 ^d	0.11±0.00 ^c	0.21±0.01 ^c
Coco Peat	0.20±0.01 ^a	0.64±0.03 ^a	0.05±0.01 ^c	0.18±0.01 ^d	0.76±0.02 ^a	0.06±0.00 ^c	0.25±0.00 ^a	0.17±0.01 ^d
Rice bran	0.01±0.02 ^c	0.11±0.03 ^c	0.06±0.01 ^c	0.01±0.01 ^f	0.47±0.02 ^c	0.08±0.00 ^b	0.12±0.00 ^b	0.00±0.02 ^f

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 26 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตรทจากการใช้วัสดุยี้ดเกาะจากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรในการสร้างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อสูตรผง (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ¹

Treatment	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
Control	0.02±0.00 ^{bc}	0.02±0.01 ^b	0.02±0.00 ^c	0.02±0.00 ^f	0.02±0.00 ^d	0.02±0.00 ^c	0.02±0.00 ^c	0.03±0.00 ^d
Husk	0.04±0.00 ^a	0.07±0.00 ^a	0.16±0.00 ^b	0.04±0.00 ^e	0.03±0.00 ^c	0.01±0.00 ^c	0.09±0.00 ^b	0.09±0.00 ^b
Ground coffee	0.03±0.00 ^{ab}	0.01±0.00 ^c	0.01±0.01 ^d	0.06±0.00 ^d	0.06±0.00 ^b	0.03±0.00 ^c	0.04±0.02 ^c	0.06±0.01 ^c
Soybean meal	0.05±0.01 ^a	0.00±0.00 ^c	0.07±0.00 ^c	0.08±0.00 ^c	0.03±0.00 ^d	0.11±0.01 ^a	0.18±0.01 ^a	0.07±0.07 ^c
Coco Peat	0.03±0.00 ^{abc}	0.01±0.00 ^c	0.01±0.01 ^d	0.10±0.00 ^b	0.02±0.00 ^d	0.07±0.03 ^b	0.03±0.02 ^c	0.06±0.01 ^c
Rice bran	0.01±0.00 ^c	0.07±0.00 ^a	0.23±0.00 ^a	0.11±0.00 ^a	0.09±0.00 ^a	0.13±0.00 ^a	0.11±0.01 ^b	0.22±0.01 ^a

¹ ตัวเลขที่นำเสนมาเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 27 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช (pH) ระหว่างการทดลองประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มในการบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งในห้องปฏิบัติการ (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ¹

Treatment	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
Control	7.57±0.25 ^b	7.98±0.08 ^c	8.30±0.33 ^{ns}	8.34±0.04 ^b	8.26±0.10 ^b	8.16±0.25 ^b	8.33±0.10 ^a	8.35±0.13 ^b
Negative	8.01±0.04 ^a	8.46±0.03 ^a	8.54±0.05 ^{ns}	8.55±0.04 ^a	8.55±0.04 ^a	8.54±0.03 ^a	8.44±0.05 ^a	8.57±0.04 ^a
Positive	7.78±0.06 ^{ab}	8.19±0.06 ^b	8.27±0.06 ^{ns}	8.25±0.06 ^b	8.17±0.05 ^b	8.06±0.04 ^b	8.09±0.11 ^b	8.33±0.03 ^b
LQ	7.80±0.09 ^{ab}	8.17±0.04 ^b	8.27±0.08 ^{ns}	8.27±0.09 ^b	8.22±0.09 ^b	8.10±0.07 ^b	7.93±0.06 ^{bc}	8.20±0.12 ^b
PD	7.72±0.09 ^b	8.10±0.07 ^b	8.88±0.10 ^{ns}	8.28±0.10 ^b	8.15±0.08 ^b	8.01±0.04 ^b	7.90±0.12 ^c	8.20±0.17 ^b

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

Control	คือ ชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งและไม่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ
Negative	คือ ชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียปราศจากเชื้อจากการเลี้ยงกุ้งและไม่เติมกล้าเชื้อ
Positive	คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ ปม.1
LQ	คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ
PD	คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรผง

ตารางที่ 28 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิระหว่างการทดลองประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มในการบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งในห้องปฏิบัติการ (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ¹

Treatment	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
Control	28.33±0.58 ^{ns}	28.83±1.64 ^{ns}	28.17±1.72 ^{ns}	29.23±1.67 ^{ns}	29.10±1.61 ^{ns}	29.73±0.85 ^{ns}	28.67±0.49 ^b	28.60±0.61 ^b
Negative	28.47±0.46 ^{ns}	28.57±0.38 ^{ns}	28.93±0.42 ^{ns}	29.03±0.42 ^{ns}	29.00±0.36 ^{ns}	29.70±0.20 ^{ns}	29.50±0.53 ^{ab}	29.50±0.46 ^a
Positive	28.17±0.96 ^{ns}	28.47±0.57 ^{ns}	28.80±0.53 ^{ns}	28.90±0.53 ^{ns}	28.83±0.55 ^{ns}	29.63±0.23 ^{ns}	29.57±0.47 ^{ab}	29.03±0.06 ^{ab}
LQ	28.37±0.25 ^{ns}	28.40±0.46 ^{ns}	28.67±0.45 ^{ns}	28.80±0.50 ^{ns}	28.80±0.66 ^{ns}	29.63±0.31 ^{ns}	29.43±0.55 ^{ab}	29.20±0.26 ^{ab}
PD	28.70±0.50 ^{ns}	28.80±0.44 ^{ns}	29.10±0.44 ^{ns}	29.90±0.53 ^{ns}	29.23±0.49 ^{ns}	29.93±0.15 ^{ns}	29.87±0.21 ^a	29.27±0.15 ^{ab}

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

Control	คือ ชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งและไม่เติมผลิตภัณฑ์ล้าเชื้อ
Negative	คือ ชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียปราศจากเชื้อจากการเลี้ยงกุ้งและไม่เติมล้าเชื้อ
Positive	คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์ล้าเชื้อ ปม.1
LQ	คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์ล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ
PD	คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์ล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรผง

ตารางที่ 29 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำระหว่างการทดลองประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มในการบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งในหึ่งปฏิบัติการ (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ¹

Treatment	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
Control	6.27±0.40 ^{ns}	6.42±0.09 ^{ab}	5.68±0.53 ^b	5.94±0.53 ^{ns}	5.96±0.57 ^{ns}	5.94±0.23 ^{ns}	5.96±0.03 ^{ns}	6.27±0.28 ^{ns}
Negative	6.22±0.15 ^{ns}	6.72±0.01 ^a	6.04±0.22 ^{ab}	5.66±0.21 ^{ns}	5.83±0.23 ^{ns}	5.97±0.61 ^{ns}	6.15±0.27 ^{ns}	6.25±0.34 ^{ns}
Positive	6.23±0.24 ^{ns}	6.47±0.37 ^{ab}	6.51±0.07 ^a	6.06±0.32 ^{ns}	5.90±0.22 ^{ns}	6.02±0.37 ^{ns}	5.84±0.32 ^{ns}	6.14±0.41 ^{ns}
LQ	6.08±0.25 ^{ns}	6.08±0.60 ^{bc}	6.29±0.24 ^{ab}	5.80±0.42 ^{ns}	6.30±0.40 ^{ns}	6.02±0.29 ^{ns}	6.01±0.18 ^{ns}	6.33±0.17 ^{ns}
PD	6.28±0.31 ^{ns}	5.69±0.04 ^c	5.67±0.42 ^b	5.79±0.40 ^{ns}	6.05±0.24 ^{ns}	5.99±0.48 ^{ns}	6.20±0.30 ^{ns}	6.24±0.21 ^{ns}

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

Control	คือ ชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งและไม่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ
Negative	คือ ชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียปราศจากเชื้อจากการเลี้ยงกุ้งและไม่เติมกล้าเชื้อ
Positive	คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ ปม.1
LQ	คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ
PD	คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรผง

ตารางที่ 30 การเปลี่ยนแปลงความเค็มระหว่างการทดลองประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มในการบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งในหึ่งปฏิบัติการ (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ¹

Treatment	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
Control	20.67±1.15 ^{ns}	20.67±1.15 ^{ns}	20.00±0.00 ^{ns}	20.67±1.15 ^{ab}	21.33±1.53 ^a	21.33±1.15 ^{ab}	21.50±1.32 ^{ab}	22.67±1.15 ^{ab}
Negative	21.00±1.00 ^{ns}	20.67±0.58 ^{ns}	20.33±0.58 ^{ns}	21.67±0.58 ^a	21.83±0.29 ^a	21.67±0.58 ^a	22.00±0.00 ^a	22.83±1.04 ^a
Positive	20.00±0.00 ^{ns}	20.00±0.00 ^{ns}	20.00±0.00 ^{ns}	20.00±0.00 ^b	20.00±0.00 ^b	20.33±0.58 ^{bc}	20.33±0.58 ^b	22.33±0.58 ^{ab}
LQ	20.00±0.00 ^{ns}	20.00±0.00 ^{ns}	20.00±0.00 ^{ns}	20.67±0.58 ^{ab}	20.00±0.00 ^b	20.33±0.58 ^{bc}	20.67±1.15 ^{ab}	22.67±1.15 ^{ab}
PD	20.00±0.00 ^{ns}	20.00±0.00 ^{ns}	20.00±0.00 ^{ns}	20.33±0.58 ^b	20.00±0.00 ^b	20.00±0.00 ^c	20.00±0.00 ^b	20.67±1.15 ^b

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

Control	คือ ชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งและไม่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ
Negative	คือ ชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียปราศจากเชื้อจากการเลี้ยงกุ้งและไม่เติมกล้าเชื้อ
Positive	คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ ปม.1
LQ	คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ
PD	คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรผง

ตารางที่ 31 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนียระหว่างทดลองประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มในการบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งในท้องปฏิบัติการ (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ¹

Treatment	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
Control	1.86±0.01 ^a	1.94±0.01 ^{ab}	0.92±0.02 ^b	0.92±0.02 ^b	0.92±0.02 ^b	0.72±0.11 ^b	0.75±0.03 ^b	0.62±0.13 ^b
Negative	1.82±0.01 ^b	1.93±0.01 ^b	0.97±0.01 ^a	0.97±0.01 ^a	0.97±0.01 ^a	0.91±0.01 ^a	1.02±0.02 ^a	0.91±0.01 ^a
Positive	1.86±0.01 ^a	1.94±0.01 ^{ab}	0.85±0.01 ^c	0.86±0.01 ^c	0.86±0.01 ^c	0.52±0.00 ^c	0.41±0.01 ^c	0.52±0.00 ^b
LQ	1.86±0.01 ^a	1.95±0.01 ^a	0.82±0.01 ^d	0.82±0.02 ^d	0.82±0.02 ^d	0.07±0.03 ^d	0.13±0.03 ^d	0.07±0.03 ^c
PD	1.85±0.02 ^a	1.95±0.01 ^a	0.85±0.01 ^c	0.84±0.01 ^{cd}	0.84±0.01 ^{cd}	0.04±0.01 ^d	0.10±0.04 ^d	0.04±0.01 ^c

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

Control	คือ ชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งและไม่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ
Negative	คือ ชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียปราศจากเชื้อจากการเลี้ยงกุ้งและไม่เติมกล้าเชื้อ
Positive	คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ ปม.1
LQ	คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ
PD	คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรผง

ตารางที่ 32 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรที่ระหว่างการทดลองประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนโตรไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มในการบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งในห้วงปฏิบัติการ (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ¹

Treatment	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
Control	0.38±0.02 ^{ab}	0.46±0.02 ^{ab}	0.29±0.01 ^b	0.38±0.09 ^b	0.45±0.03 ^{ns}	0.39±0.01 ^{ns}	0.45±0.01 ^{ns}	0.45±0.00 ^a
Negative	0.44±0.01 ^a	0.48±0.00 ^a	0.47±0.01 ^a	0.47±0.00 ^a	0.45±0.01 ^{ns}	0.40±0.00 ^{ns}	0.46±0.00 ^{ns}	0.40±0.05 ^a
Positive	0.34±0.04 ^b	0.45±0.04 ^b	0.08±0.04 ^c	0.22±0.03 ^c	0.46±0.01 ^{ns}	0.40±0.00 ^{ns}	0.46±0.00 ^{ns}	0.44±0.01 ^a
LQ	0.45±0.07 ^a	0.23±0.05 ^c	0.04±0.01 ^c	0.13±0.01 ^{cd}	0.47±0.00 ^{ns}	0.40±0.01 ^{ns}	0.47±0.00 ^{ns}	0.23±0.09 ^b
PD	0.41±0.02 ^{ab}	0.17±0.12 ^c	0.07±0.05 ^c	0.10±0.06 ^d	0.46±0.01 ^{ns}	0.39±0.01 ^{ns}	0.45±0.02 ^{ns}	0.43±0.02 ^a

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

Control	คือ ชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งและไม่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ
Negative	คือ ชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียปราศจากเชื้อจากการเลี้ยงกุ้งและไม่เติมกล้าเชื้อ
Positive	คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ ปม.1
LQ	คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนโตรไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ
PD	คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนโตรไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรผง

ตารางที่ 33 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตรทระหว่างการทดลองประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มในการบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งในห้องปฏิบัติการ (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ¹

Treatment	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
Control	0.50±0.02 ^{ab}	0.28±0.16 ^{ab}	0.12±0.07 ^b	0.29±0.09 ^{ab}	0.44±0.01 ^a	0.59±0.01 ^a	0.60±0.01 ^a	0.60±0.01 ^a
Negative	0.54±0.01 ^a	0.43±0.00 ^a	0.43±0.03 ^a	0.43±0.04 ^a	0.42±0.08 ^{ab}	0.49±0.02 ^c	0.46±0.05 ^b	0.46±0.04 ^c
Positive	0.45±0.03 ^{ab}	0.32±0.01 ^{ab}	0.07±0.03 ^{bc}	0.16±0.06 ^{bc}	0.44±0.01 ^a	0.58±0.00 ^b	0.58±0.00 ^a	0.61±0.00 ^a
LQ	0.42±0.00 ^{bc}	0.19±0.04 ^b	0.03±0.01 ^c	0.10±0.02 ^c	0.30±0.14 ^b	0.59±0.00 ^a	0.60±0.00 ^a	0.61±0.01 ^a
PD	0.33±0.14 ^c	0.25±0.12 ^{ab}	0.05±0.04 ^{bc}	0.16±0.12 ^{bc}	0.45±0.01 ^a	0.59±0.00 ^a	0.60±0.00 ^a	0.54±0.04 ^b

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

Control	คือ ชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งและไม่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ
Negative	คือ ชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียปราศจากเชื้อจากการเลี้ยงกุ้งและไม่เติมกล้าเชื้อ
Positive	คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ ปม.1
LQ	คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำ
PD	คือ ชุดการทดลองที่เติมผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเหทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรผง

ตารางที่ 34 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ พีเอช ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำ และความเค็มของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าในการเพาะเลี้ยงกุ้ง¹

Day of culture	Temperature (°C)	pH	Dissolved oxygen (mg/L)	Salinity (ppt)
0	28.05±0.29 ^{ns}	8.60±0.23 ^{ab}	6.05±0.37 ^{ns}	8.05±0.13 ^{abcd}
4	28.14±0.24 ^{ns}	8.57±0.24 ^{abc}	5.67±0.17 ^{ns}	7.75±0.06 ^{cdef}
8	27.93±0.26 ^{ns}	8.38±0.09 ^{bc}	5.57±0.09 ^{ns}	8.33±0.22 ^a
12	28.23±0.20 ^{ns}	8.19±0.24 ^{abc}	5.78±0.22 ^{ns}	7.99±0.01 ^{bcde}
15	28.05±0.21 ^{ns}	8.42±0.22 ^{abc}	5.64±0.28 ^{ns}	7.88±0.12 ^{bcde}
18	28.14±0.24 ^{ns}	8.26±0.13 ^{bc}	5.66±0.23 ^{ns}	7.70±0.16 ^{ef}
22	28.09±0.24 ^{ns}	8.42±0.23 ^{abc}	5.64±0.19 ^{ns}	7.87±0.14 ^{bcde}
26	27.89±0.26 ^{ns}	8.41±0.24 ^{abc}	5.78±0.22 ^{ns}	7.47±0.05 ^f
29	28.15±0.24 ^{ns}	8.34±0.31 ^{bc}	5.65±0.32 ^{ns}	7.74±0.35 ^{def}
33	27.97±0.26 ^{ns}	8.54±0.27 ^{abc}	5.64±0.13 ^{ns}	8.10±0.13 ^{ab}
36	28.14±0.24 ^{ns}	8.75±0.24 ^a	5.83±0.25 ^{ns}	8.07±0.06 ^{abc}
39	28.09±0.19 ^{ns}	8.75±0.24 ^a	5.61±0.24 ^{ns}	8.10±0.22 ^{ab}
42	28.14±0.28 ^{ns}	8.35±0.51 ^{bc}	5.67±0.23 ^{ns}	8.15±0.01 ^{ab}
46	28.04±0.32 ^{ns}	8.35±0.16 ^{bc}	5.61±0.13 ^{ns}	8.05±0.21 ^{abcd}
49	28.02±0.22 ^{ns}	8.47±0.26 ^{abc}	5.61±0.14 ^{ns}	7.70±0.16 ^{ef}
54	28.23±0.20 ^{ns}	8.35±0.12 ^{abc}	5.68±0.15 ^{ns}	7.87±0.14 ^{bcde}
57	27.93±0.26 ^{ns}	8.49±0.24 ^{bc}	5.70±0.36 ^{ns}	7.47±0.05 ^f
61	28.01±0.18 ^{ns}	8.47±0.26 ^{abc}	5.77±0.11 ^{ns}	7.74±0.35 ^{def}
64	28.21±0.27 ^{ns}	8.6±0.14 ^{bc}	5.57±0.51 ^{ns}	8.10±0.13
68	28.15±0.24 ^{ns}	8.39±0.28 ^{abc}	5.68±0.15 ^{ns}	8.07±0.06 ^{abc}
70	27.97±0.26 ^{ns}	8.43±0.11 ^{abc}	5.71±0.34 ^{ns}	8.10±0.22 ^{ab}
75	28.14±0.24 ^{ns}	8.49±0.24 ^{abc}	5.57±0.17 ^{ns}	7.99±0.12 ^{bcde}
78	28.04±0.32 ^{ns}	8.47±0.26 ^{abc}	5.61±0.24 ^{ns}	7.88±0.51 ^{bcde}
82	28.09±0.24 ^{ns}	8.47±0.56 ^{abc}	5.70±0.13 ^{ns}	7.70±0.16 ^{ef}
เฉลี่ย	28.08±0.23	8.25±0.05	5.76±0.41	7.91±0.15

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสัปดาห์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสัปดาห์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 35 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของอนินทรีย์ไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงกุ้ง (แอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท) ของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อทางการค้าในการเพาะเลี้ยงกุ้ง

Day of culture	Ammonia (mg-N/L)	Nitrite (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)
0	0.33±0.03 ^c	0.00±0.00 ^c	0.02±0.01 ^c
4	0.33±0.03 ^c	0.00±0.00 ^c	0.02±0.01 ^c
8	0.09±0.04 ^c	0.00±0.00 ^c	0.01±0.00 ^c
12	0.00±0.01 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
15	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
18	0.02±0.02 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
22	0.02±0.01 ^c	0.00±0.00 ^c	0.01±0.00 ^c
26	0.05±0.05 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
29	0.06±0.02 ^c	0.00±0.00 ^c	0.01±0.00 ^c
33	0.03±0.02 ^c	0.00±0.00 ^c	0.01±0.00 ^c
36	0.23±0.02 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
39	0.33±0.08 ^c	0.00±0.01 ^c	0.00±0.00 ^c
42	0.04±0.01 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
46	0.01±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.02±0.00 ^c
49	0.01±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.02±0.00 ^c
54	1.15±0.11 ^{ab}	0.09±0.00 ^c	0.19±0.07 ^b
57	1.76±0.02 ^a	0.04±0.00 ^c	0.10±0.02 ^{bc}
61	1.35±0.06 ^{ab}	0.02±0.00 ^c	0.03±0.12 ^c
64	1.58±0.13 ^a	0.29±0.00 ^a	0.09±0.00 ^{bc}
68	1.06±0.01 ^{ab}	0.03±0.01 ^c	0.08±0.01 ^{bc}
70	0.18±0.07 ^c	0.15±0.00 ^b	0.11±0.02 ^{bc}
75	0.65±0.08 ^{bc}	0.01±0.00 ^c	0.18±0.01 ^b
78	1.25±0.00 ^{ab}	0.25±0.00 ^a	0.23±0.00 ^{ab}
82	1.17±0.06 ^{ab}	0.26±0.00 ^a	0.34±0.00 ^a

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสัปดาห์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P>0.05$)

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 36 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ พีเอช ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำ และความเค็มของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเห็ดออโรโทรฟิคไนโตรไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูตรน้ำในการเพาะเลี้ยงกุ้ง¹

Day of culture	Temperature (°C)	pH	Dissolved oxygen (mg/L)	Salinity (ppt)
0	28.15±0.17 ^{ns}	8.55±0.26 ^{abcd}	5.67±0.17 ^{ns}	8.31±0.18 ^a
4	28.00±0.19 ^{ns}	8.37±0.13 ^{bcd}	5.57±0.09 ^{ns}	8.35±0.13 ^a
8	28.14±0.28 ^{ns}	8.14±0.18 ^d	5.78±0.22 ^{ns}	8.19±0.04 ^{ab}
12	27.93±0.26 ^{ns}	8.38±0.28 ^{bcd}	5.64±0.28 ^{ns}	8.30±0.12 ^a
15	28.07±0.23 ^{ns}	8.30±0.10 ^{cd}	5.66±0.23 ^{ns}	8.18±0.51 ^{ab}
18	28.19±0.22 ^{ns}	8.42±0.24 ^{abcd}	5.64±0.19 ^{ns}	8.16±0.16 ^{ab}
22	27.91±0.22 ^{ns}	8.38±0.28 ^{abcd}	5.78±0.22 ^{ns}	8.13±0.14 ^{ab}
26	28.16±0.25 ^{ns}	8.46±0.29 ^{abcd}	5.66±0.23 ^{ns}	7.90±0.05 ^{cd}
29	28.23±0.20 ^{ns}	8.61±0.22 ^{abc}	5.59±0.20 ^{ns}	8.27±0.35 ^{ab}
33	27.91±0.22 ^{ns}	8.78±0.24 ^a	5.70±0.13 ^{ns}	8.12±0.13 ^{ab}
36	28.12±0.29 ^{ns}	8.74±0.28 ^{ab}	5.72±0.35 ^{ns}	8.05±0.06 ^{bc}
39	28.15±0.24 ^{ns}	8.32±0.50 ^{cd}	5.71±0.20 ^{ns}	7.82±0.22 ^d
42	28.14±0.28 ^{ns}	8.35±0.19 ^{bcd}	5.61±0.20 ^{ns}	7.90±0.51 ^{cd}
46	28.05±0.32 ^{ns}	8.39±0.28 ^{abcd}	5.68±0.15 ^{ns}	7.91±0.16 ^{cd}
49	28.15±0.17 ^{ns}	8.43±0.11 ^{abcd}	5.70±0.36 ^{ns}	8.35±0.14 ^a
54	28.0±0.19 ^{ns}	8.49±0.24 ^{abcd}	5.77±0.11 ^{ns}	8.19±0.13 ^{ab}
57	28.14±0.28 ^{ns}	8.39±0.28 ^{abcd}	5.69±0.24 ^{ns}	8.30±0.04 ^a
61	27.93±0.26 ^{ns}	8.51±0.22 ^{abcd}	5.55±0.12 ^{ns}	8.18±0.12 ^{ab}
64	28.07±0.23 ^{ns}	8.33±0.13 ^{cd}	5.59±0.20 ^{ns}	8.16±0.51 ^{ab}
เฉลี่ย	27.99±0.22	8.35±0.12	6.17±0.34	8.15±0.19

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสตมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสตมภ์

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 37 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของอนินทรีย์ไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงกุ้ง (แอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท) ของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเห็ดออโรโรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสูบน้ำในการเพาะเลี้ยงกุ้ง¹

Day of culture	Ammonia (mg-N/L)	Nitrite (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)
0	0.06±0.05 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
4	0.06±0.02 ^c	0.00±0.00 ^c	0.02±0.00 ^c
8	0.04±0.04 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
11	0.09±0.06 ^c	0.00±0.00 ^c	0.01±0.00 ^c
15	0.06±0.02 ^c	0.00±0.00 ^c	0.01±0.01 ^c
18	0.09±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.02±0.00 ^c
21	0.12±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.02±0.00 ^c
24	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
28	0.02±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.01±0.00 ^c
31	0.00±0.00 ^c	0.24±0.03 ^b	0.00±0.01 ^c
36	0.43±0.03 ^{bc}	0.02±0.01 ^c	0.18±0.01 ^c
39	0.99±0.07 ^{ab}	0.13±0.01 ^{bc}	0.02±0.01 ^c
43	1.56±0.08 ^a	0.03±0.00 ^c	0.06±0.02 ^c
46	0.49±0.04 ^{bc}	0.57±0.01 ^a	0.05±0.26 ^c
50	1.36±0.06 ^a	0.02±0.00 ^c	0.03±0.06 ^c
52	1.33±0.02 ^a	0.02±0.04 ^c	0.44±0.06 ^b
57	0.09±0.01 ^c	0.02±0.00 ^c	0.52±0.13 ^b
60	0.57±0.05 ^{bc}	0.03±0.00 ^c	0.75±0.12 ^a
64	0.26±0.05 ^c	0.01±0.00 ^c	0.76±0.10 ^a

¹ ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสัปดาห์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P>0.05$)

ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางสถิติ



ภาพที่ 41 ความเข้มข้นของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในการเลี้ยงกุ้ง ณ ดำรงค์ดีฟาร์ม อ.สิงหนคร จ.สงขลา: a) Commercial product 1; b) Test product 1; c) Commercial product 2; d) Test product 2, e) Commercial product 3; f) Test product 3

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวสุนิภา จันทร์แก้ว
รหัสประจำตัวนักศึกษา 6110630010

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วาริชศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2555
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วาริชศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2560

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการการศึกษา)

- Agricultural Research Development Agency (Public Organization)
(CRP6105020740)
- ทุนอุดหนุนการทำวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การเผยแพร่ผลงานผ่านการตีพิมพ์

Chankaew, S. and Sangnoi, Y. 2023. Exploring the efficacy of *Bacillus oceanisediminis* Ba9 from Asian seabass cage sediment in saline wastewater treatment. ASEAN J. Sci. Tech. Report 26: 54–66.

Chankaew, S., Sangnoi, Y. and O-Thong, S. 2024. Isolation and nitrogen removal efficiency of halophilic heterotrophic nitrifying bacteria, *Alcaligenes* strains SRNB23 and SRNB35. Asia Pac. J. Sci. Technol. (*In press*)

การเผยแพร่ผลงานผ่านงานประชุมวิชาการ

- สุนิภา จันทร์แก้ว, ธัญญเรศ ก้อนแก้ว, อนุสรา ทองสังข์ และ ยุทธพงษ์ สังข์น้อย. 2564. การคัดเลือกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียฮาโลฟิลิกที่ทนเค็มสองสายพันธุ์ในการบำบัดน้ำเสียที่มีความเค็ม. งานประชุมวิชาการนวัตกรรมการเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ครั้งที่ 1 ประจำปี 2565, 18-19 สิงหาคม 2565, ชั้น 8 สำนักการศึกษาและนวัตกรรมการเรียนรู้ (LRC) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่, จังหวัดสงขลา (นำเสนอภาคบรรยาย)

- **Chankaew, S.,** O-Thong, S. and Sangnoi, Y. 2020. *Alcaligenes* spp., a highly ammonium removal species isolated from saline environment. The 32nd Annual Meeting of Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2020), 26 November 2020, Online Conference, Bangkok, Thailand. (Oral presentation).
- **Chankaew, S.,** O-Thong, S. and Sangnoi, Y. 2021. Isolation and characterization of heterotrophic nitrifying bacteria *Alcaligenes faecalis* and efficiency on shrimp wastewater treatment. The 1st International Conference Sustainable Agriculture and Aquaculture for Well Being and Food Security, 11-12 January 2021, The 8th floor, LRC Building, Prince of Songkla University, Thailand. (Oral presentation).
- **Chankaew, S.,** Sangnoi, Y. and O-Thong, S. 2023. Isolation and nitrogen removal efficiency of halophilic heterotrophic nitrifying bacteria, *Alcaligenes* strains SRNB23 and SRNB35, The 1st International Conference on ASEAN Sustainable Development (ICASD 2023), 20-21 July 2023, Crystal hotel, Hatyai, Songkhla, Thailand. (Oral presentation; a very good presentation award).