



ประสิทธิภาพของแบคทีเรียฮาซิลัสทนเค็มสำหรับบำบัดอนินทรีย์ไนโตรเจน
ในน้ำเลี้ยงกุ้งทะเล

**Efficiency of Halo-tolerant *Bacillus* for Treating Inorganic Nitrogen in
Marine Shrimp Cultured Water**

ทศพร เพชรทองเกลี้ยง

Thossaporn Phatthongkleang

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

Master of Science in Aquatic Science

Prince of Songkla University

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



ประสิทธิภาพของแบคทีเรียฮาโลฟิลล์สทนเค็มสำหรับบำบัดอนินทรีย์ไนโตรเจน
ในน้ำเลี้ยงกุ้งทะเล

**Efficiency of Halo-tolerant *Bacillus* for Treating Inorganic Nitrogen in
Marine Shrimp Cultured Water**

ทศพร เพชรทองเกลี้ยง

Thossaporn Phatthongkleang

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

Master of Science in Aquatic Science

Prince of Songkla University

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ประสิทธิภาพของแบคทีเรียบาซิลลัสทนเค็มสำหรับบำบัดนินทรีย์ไนโตรเจนใน
น้ำเลี้ยงกุ้งทะเล

ผู้เขียน นางสาวทศพร เพชรทองเกลี้ยง

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยุทธพงษ์ สังข์น้อย)

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมหมาย เขียววารีสัจจะ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(ดร. พุทธ ส่องแสงจินดา)

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมพงษ์ โอทอง)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยุทธพงษ์ สังข์น้อย)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมพงษ์ โอทอง)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

.....
(ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงค์ดี ฟ้ารุ่งสว่าง)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยุทธพงษ์ สังข์น้อย)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมพงษ์ โอทอง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ

(นางสาวทศพร เพชรทองเกลี้ยง)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ

(นางสาวทศพร เพชรทองเกลี้ยง)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียบาซิลลัสทนเค็มสำหรับบำบัดอนินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำเลี้ยงกุ้งทะเล
ผู้เขียน	นางสาวทศพร เพชรทองเกลี้ยง
สาขาวิชา	วาริชศาสตร์
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

น้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งมักมีสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ไนโตรเจนปะปนมาในปริมาณสูง โดยที่แอมโมเนีย-ไนโตรเจนมีความเป็นพิษสูงต่อกุ้ง ฉะนั้น การกำจัดแอมโมเนียจึงมีความสำคัญมากต่อการปรับปรุงคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้ง ทั้งนี้ แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียด้วยกระบวนการ Nitrification-denitrification ในสภาพมีอากาศ การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและจัดจำแนกชนิดของ *Bacillus* ทนเค็ม และศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำเลี้ยงกุ้งทะเล พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ TS23, TW24, TW31, TW34, BR001 และ BR002 ที่คัดแยกจากตัวอย่างตะกอนดิน และน้ำเสีย มีคุณสมบัติเป็น Heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria ที่มีประสิทธิภาพในการออกซิไดซ์แอมโมเนียได้มากกว่า 90% สามารถทำงานในกระบวนการออกซิไดซ์ไนโตรทรีต และรีดิวซ์ไนเตรทได้ดีประมาณ 25-50% จากการศึกษา ยีน 16S rDNA และแผนภูมิวิวัฒนาการของแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่า มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus pumilus* (TS23), *B. cereus* (TW31), *B. subtilis* (TW24 และ TW34) และ *B. tequilensis* (BR001 และ BR002) ความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus* spp. อยู่ที่ 0.5-3% NaCl และ pH อยู่ในช่วง 7-7.5 สายพันธุ์ TW24, TW31, TW34, BR001 และ BR002 ปริมาณเซลล์ 1% มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำเสียสังเคราะห์ในเวลา 7 วันมากที่สุด ทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถลดแอมโมเนียไนโตรทรีต และไนเตรทได้เท่ากับ 84.7-86.5%, 78.8-83.1% และ 66.2-73.3% ตามลำดับ สายพันธุ์ TS23, BR001 และ BR002 สามารถกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่าน และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อได้มากที่สุด ตั้งแต่วันที่ 4 ถึงวันที่ 7 โดยลดแอมโมเนียได้เฉลี่ย 63.5, 64.1 และ 63.4% ตามลำดับ ลดไนโตรทรีตได้เฉลี่ย 66.0, 71.8 และ 63.4% ตามลำดับ และลดไนเตรทได้เฉลี่ย 69.1, 62.5 และ 45.6% ตามลำดับ นอกจากนี้ ทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถทำให้ปริมาณออร์โทฟอสเฟตมีแนวโน้มลดลงเฉลี่ยอยู่ในช่วง 45.5-69.1% และปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดลดลงเฉลี่ย 46.1-52.9%

Thesis Title	Efficiency of Halo-tolerant <i>Bacillus</i> for Treating Inorganic Nitrogen in Marine Shrimp Cultured Water
Author	Miss Thossaporn Phatthongkleang
Major Program	Aquatic Science
Academic Year	2018

ABSTRACT

Effluent water from shrimp aquaculture usually contains high organic matters and inorganic nitrogen, especially ammonia-nitrogen which is highly toxic to shrimp. Removal of ammonia is therefore important for improving water quality in shrimp culture. *Bacilli* are group of bacteria that could remove ammonia in nitrification and aerobic denitrification process. The objectives of this study aimed to isolate and identify halo-tolerant *Bacillus* and to determine the efficiency of improvement inorganic nitrogen in marine shrimp cultured water. *Bacillus* strains TS23, TW24, TW31, TW34, BR001, and BR002 were isolated from sediment and water samples. They have the characteristic of heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria. All strains showed high ammonium oxidizing removal more than 90% and showed the capability of nitrite-oxidizing and nitrate-reducing from 25 to 50%. Based on 16S rDNA gene sequencing data and phylogenetic analysis, 6 strains were identified as *Bacillus pumilus* (TS23), *B. cereus* (TS31), *B. subtilis* (TW24 and TW34) and *B. tequilensis* (BR001 and BR002). The optimal salinity and pH for growth of isolated *Bacillus* were in the range of 0.5–3% NaCl and 7–7.5, respectively. Applied density of 1% cell suspension of TW24, TW31, TW34, BR001, and BR002 has presented maximal removal of inorganic nitrogen in synthetic wastewater at 7 days. These 5 strains have the capability to remove ammonia, nitrite, and nitrate in the range of 84.7–86.5%, 78.8–83.1% and 66.2–73.3%, respectively. Strains TS23, BR001 and BR002 provided high removal inorganic nitrogen in sterile and non-sterile shrimp cultured water during day 4 to day 7. Ammonium removal ability of TS23, BR001 and BR002 were 63.5, 64.1, and 63.4% respectively; nitrite removal were 66.0%, 71.8% and 63.4%, respectively and nitrate removal were 69.1%, 62.5% and 45.6%, respectively. The proficiency of 3 isolates has decreased the amount of orthophosphate in the range of 45.5–69.1% as well as 46.1–52.9% of total suspended solids.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษพงษ์ สังข์น้อย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ช่วยเหลือในการวางแผนการทดลอง แนะนำ รวมถึงคอยให้คำปรึกษา สนับสนุน และแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมพงศ์ โอิทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ ให้ข้อคิดที่เป็นประโยชน์ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สมหมาย เขียววารีสังจะ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.พุทธ ส่องแสงจินดา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่องเพิ่มเติมอันทำให้วิทยานิพนธ์สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณดารุณี สงหนู เจ้าของฟาร์มเลี้ยงกุ้ง ต.หน้าสดน อ.หัวไทร จ.นครศรีธรรมราช ที่อนุเคราะห์และคอยอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ และบุคลากรภาควิชาวาริชศาสตร์ ที่คอยให้คำปรึกษาและสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ

ขอขอบคุณ คุณพัชรี ฤกษ์งานดี ที่คอยให้คำปรึกษาตลอดจนให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ขอขอบคุณ คุณณัฐวุฒิ จันทร์เหล็ก ที่คอยช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง ขอขอบคุณพี่ ๆ และเพื่อน ๆ นักศึกษาปริญญาโทที่ไม่ได้กล่าวนาม ที่คอยช่วยเหลือในการวิจัยและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา เป็นอย่างสูงที่ให้พื้นฐานทางด้านการศึกษา อีกทั้งเป็นผู้ให้การสนับสนุนช่วยเหลือทั้งด้านทุนทรัพย์ กำลังใจ กำลังความรู้ สติปัญญา และส่งเสริมการศึกษาของผู้วิจัยตลอดมาจนถึงการศึกษาในระดับปริญญาโท และทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ทศพร เพชรทองเกลี้ยง

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
ABSTRACT	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(10)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา	29
บทที่ 3 ผลการศึกษา	43
บทที่ 4 วิจัยผลการศึกษา	92
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา และข้อเสนอแนะ	116
บรรณานุกรม	118
ประวัติผู้เขียน	139

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำในช่วงสุดท้ายของการเลี้ยงกุ้งทะเล	4
2 ปริมาณมลพิษที่เกิดจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา	5
3 มาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง	6
4 ปริมาณของเสียที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลบริเวณชายฝั่งของไทย	6
5 ลักษณะของน้ำทิ้งที่ปล่อยจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ	7
6 ค่าคงที่ของปริมาณมลพิษจากการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล	7
7 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มที่ตรึงก๊าซไนโตรเจนแบบอิสระที่สำคัญ	12
8 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i>	18
9 วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี	37
10 วิธีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ	41
11 ผลการวิเคราะห์และเทียบเคียงความคล้ายคลึง (Similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA gene sequence ของแบคทีเรีย	48
12 รหัสนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA (Accession numbers) ในฐานะข้อมูล DNA Data Bank of Japan (DDBJ) ของ <i>Bacillus</i> spp. ที่ได้จากการคัดแยก	48

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	กรอบแนวความคิดการวิจัย	3
2	วัฏจักรไนโตรเจนในแหล่งน้ำ	12
3	เอนไซม์ที่มีส่วนในกระบวนการ Heterotrophic nitrification และ Aerobic denitrification	15
4	ลักษณะสปอร์ของ <i>Bacillus megaterium</i>	16
5	แผนภาพขั้นตอนการทดลอง	33
6	ผลการทดสอบด้วย Nitrite reagent เมื่อแสดงผลเป็นลบ (ไม่มีการเปลี่ยนเป็นสีแดง) แสดงผลเป็นบวก (มีการเปลี่ยนเป็นสีแดง)	36
7	ชุดการทดลองทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนของ <i>Bacillus</i> (a) ชุดทดลองแบบไม่ให้อากาศ (b) ชุดทดลองแบบให้อากาศ ในน้ำเสียสังเคราะห์	40
8	การทดสอบประสิทธิภาพของ <i>Bacillus</i> ในการบำบัดน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงกุ้งขาว (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	42
9	จำนวนไอโซเลท และผลการคัดแยกเชื้อ <i>Bacillus</i> ด้วยวิธี Serial dilution, Heat treatment และ Enrichment and heat treatment	43
10	การออกซิไดซ์แอมโมเนียและไนไตรท์ของเชื้อ <i>Bacillus</i> โดยวิธี Griess-Ilosvay method	44
11	ความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย ไนไตรท์ และรีดิวซ์ไนเตรทของเชื้อ <i>Bacillus</i> จำนวน 24 ไอโซเลท	46
12	แผนภูมิวิวัฒนาการของ <i>Bacillus</i> spp. ที่คัดแยกได้โดยศึกษาจากยีน 16S rDNA (Bar=0.02)	49
13	ความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ <i>Bacillus</i>	51
14	pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ <i>Bacillus</i>	52
15	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอมโมเนียหลังการใช้ <i>Bacillus</i> ในชุดทดลองน้ำเสียสังเคราะห์	55

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนโตรเจนหลังการใช้ <i>Bacillus</i> ใน ชุดทดลองน้ำเสียสังเคราะห์	58
17	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนเตรทหลังการใช้ <i>Bacillus</i> ใน ชุดทดลองน้ำเสียสังเคราะห์	61
18	ประสิทธิภาพของ <i>Bacillus</i> ในการกำจัดแอมโมเนีย ใน ไนโตรเจน และไนเตรทในน้ำเสียสังเคราะห์ในระยะเวลา 7 วัน	62
19	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอมโมเนียหลังการใช้ <i>Bacillus</i> ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	65
20	ประสิทธิภาพของ <i>Bacillus</i> ปริมาณ 1% และ 5% ในการลด แอมโมเนียในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	66
21	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนโตรเจนหลังการใช้ <i>Bacillus</i> ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	69
22	ประสิทธิภาพของ <i>Bacillus</i> ปริมาณ 1% และ 5% ในการลด ไนโตรเจนในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	70
23	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนเตรทหลังการใช้ <i>Bacillus</i> ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	73
24	ประสิทธิภาพของ <i>Bacillus</i> ปริมาณ 1% และ 5% ในการลด ไนเตรทในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	74

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
25	การเปลี่ยนแปลงของออร์โทฟอสเฟตหลังการใช้ <i>Bacillus</i> ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	77
26	ประสิทธิภาพของ <i>Bacillus</i> ปริมาณ 1% และ 5% ต่อการเปลี่ยนแปลงในออร์โทฟอสเฟตในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	78
27	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดหลังการใช้ <i>Bacillus</i> ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	81
28	การเปลี่ยนแปลง pH หลังการใช้ <i>Bacillus</i> ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	83
29	การเปลี่ยนแปลงค่าออกซิเจนละลายน้ำหลังการใช้ <i>Bacillus</i> ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	85
30	การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหลังการใช้ <i>Bacillus</i> ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	87
31	การเปลี่ยนแปลงค่า Conductivity หลังการใช้ <i>Bacillus</i> ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	89
32	การเปลี่ยนแปลงค่าความเค็มหลังการใช้ <i>Bacillus</i> ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	91

บทที่ 1

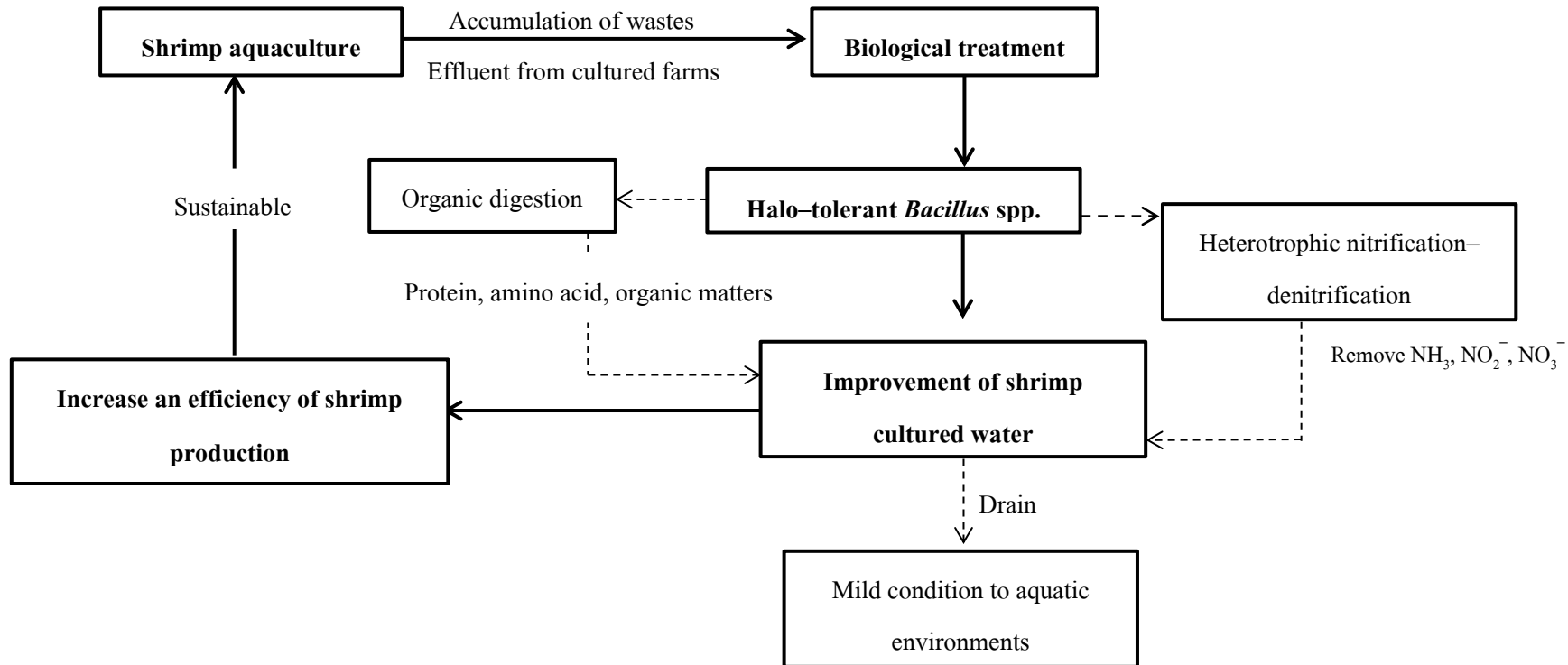
บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง โดยเฉพาะการเลี้ยงกุ้งเป็นรูปแบบการเลี้ยงแบบพัฒนา เพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูง จึงมีการเพิ่มปัจจัยต่าง ๆ ในการผลิต เช่น เพิ่มความหนาแน่นในการเพาะเลี้ยง เพิ่มปริมาณอาหาร โดยใช้อาหารสำเร็จรูปเป็นหลัก มีการให้อาหารเสริม และใช้สารเคมีในช่วงการเลี้ยง เป็นต้น ซึ่งการเพิ่มปัจจัยการผลิตดังกล่าว ทำให้เกิดของเสียจำพวกสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในบ่อมากขึ้น น้ำทิ้งที่มีการปล่อยออกมาจึงมีมวลสารปะปนอยู่ในปริมาณมาก การเลี้ยงสัตว์น้ำในลักษณะเช่นนี้ส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำบริเวณพื้นที่ใกล้เคียง (กษิตศ, 2551) ก่อให้เกิดความเสื่อมโทรมกับระบบนิเวศธรรมชาติ แหล่งเกษตรกรรม และแหล่งประมง

การเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนามีทั้งระบบปิดที่ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำจากแหล่งน้ำอื่น ๆ ภายนอก แต่มีการเพิ่มเครื่องตีน้ำ ให้อากาศตลอดเวลา เกษตรกรมีการสร้างบ่อพักน้ำ บ่อตกตะกอน มีการเติมสารเคมีบางชนิด เพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำจนสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ และกึ่งปิดที่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ โดยมีปัจจัยของคุณภาพน้ำในการกำหนดการเปลี่ยนถ่ายของน้ำ หากคุณภาพน้ำภายในบ่อเสื่อมลงก็จะเติมน้ำเข้ามา ซึ่งมีเพียงเกษตรกรส่วนน้อยที่มีระบบบำบัดน้ำก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ไม่มีการจัดการน้ำทิ้ง มักจะส่งผลกลับมาสู่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ เช่น ของเสียที่อยู่ในรูปสารอนินทรีย์ไนโตรเจนจะเป็นพิษต่อกุ้ง โดยที่แอมโมเนีย และไนไตรท์ที่มีความเข้มข้นสูง ทำให้กุ้งตายได้ ส่วนไนเตรทแม้ว่าจะมีความเป็นพิษกับกุ้งน้อยเมื่อเทียบกับแอมโมเนีย และไนไตรท์ แต่หากมีปริมาณสะสมอยู่มากก็อาจส่งผลเสียต่อกุ้งได้ (นิคม และคณะ, 2547) น้ำทิ้งที่ปล่อยออกมามักมีสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ปะปนมาในปริมาณสูง (นิคม และคณะ, 2549) ซึ่งสารเหล่านี้ยังส่งผลให้การเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชเพิ่มขึ้น เป็นเหตุให้เกิดปรากฏการณ์ยูโทรฟิเคชัน (Eutrophication) และสารประกอบไนโตรเจนที่อยู่ในแหล่งน้ำ หากมีปริมาณที่ไม่เหมาะสมจะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ

ด้วยสาเหตุดังกล่าว การจัดการสิ่งแวดล้อมในการเลี้ยงให้เกิดสภาพสมดุล โดยมีการจัดการที่ผสมผสานการบำบัดทางชีวภาพ หรือการใช้จุลินทรีย์ในการกำจัดสิ่งปนเปื้อนในน้ำ เพื่อลดการใช้สารเคมีในระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้ง และพัฒนาระบบการเลี้ยงในรูปแบบยั่งยืน โดยใช้แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* เพื่อนำมากำจัดแอมโมเนียในน้ำซึ่งจะเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหาคุณภาพน้ำ และการสะสมสารพิษในบ่อเลี้ยงกุ้งได้ ซึ่ง *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนีย โดยบางสายพันธุ์ได้นำไปใช้ในการควบคุมสิ่งแวดล้อมทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (สุวรรณ, 2549) ตัวอย่างเช่น *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* และ *B. coagulans* (Song *et al.*, 2011) โดย *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มเฮเทอโรโทรฟิก (Heterotrophic) มีความสามารถในการกระบวนการ Nitrification–denitrification ในสภาวะมีอากาศ (Aerobic) นั่นคือ สามารถกำจัดแอมโมเนียและเปลี่ยนเป็นก๊าซไนโตรเจนได้ในขั้นตอนสุดท้าย เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนน้อยกว่าแบคทีเรียกลุ่มออโตโทรฟ (Autotroph) (Kim *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2012) นอกจากนี้กลุ่มเฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรียยังเจริญเติบโตได้ดี มีความสามารถในการแข่งขันสูง ทนต่อสภาวะแอมโมเนียที่มีความเข้มข้นสูง และบางชนิดทนเค็มได้ดี ดังนั้น การคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มในกลุ่ม *Bacillus* เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการบำบัดน้ำจากการเพาะเลี้ยงกุ้งที่มีแอมโมเนียจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ เพราะจะช่วยพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงกุ้ง และส่งเสริมอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นต่อไป



ภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดการวิจัย

1.2 การตรวจเอกสาร

1.2.1 น้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

พื้นที่การเลี้ยงกุ้งทะเลจะนิยมเลี้ยงมากในเขตชายฝั่งทะเล กุ้งที่นิยมเลี้ยงมากที่สุดคือ กุ้งขาวแวนนาไม และกุ้งกุลาดำ ผลผลิตจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมีมากที่สุดถึง 97% ของปริมาณผลผลิตทั้งหมด รองลงมาเป็นกุ้งกุลาดำมีปริมาณผลผลิตประมาณ 2.83% และกุ้งอื่น ๆ มีปริมาณผลผลิตประมาณ 0.17% ตามลำดับ การเลี้ยงกุ้งทะเลก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ความเสื่อมโทรมของคุณภาพน้ำ และระบบนิเวศชายฝั่ง สาเหตุมาจากการระบายน้ำทิ้งที่มีของเสียจำนวนมาก ซึ่งเป็นของเสียที่เกิดจากกุ้งขับถ่ายออกมาและเศษอาหารที่เหลือภายในบ่อ (ชลธิชา และคณะ, 2552; Musig *et al.*, 1995) โดยส่วนใหญ่จะระบายออกสู่สิ่งแวดล้อมในช่วงจับสัตว์น้ำ เนื่องจากเกษตรกรจะพยายามควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งตลอดเวลา มีค่าของเสียเฉลี่ยดังตารางที่ 1 และ 2 คุณภาพน้ำที่ระบายทิ้งในช่วงการจับกุ้งมีคุณภาพน้ำต่ำลงเรื่อย ๆ ตามปริมาณเปอร์เซ็นต์การถ่ายเทน้ำ จากปริมาณ 25% ไปจนถึง 100% (กรมควบคุมมลพิษ, 2539)

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำในช่วงสุดท้ายของการเลี้ยงกุ้งทะเล

พารามิเตอร์	ค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำ (mg/L)	
	กุ้งกุลาดำ	กุ้งขาวแวนนาไม
บีโอดี	38.20	64.00
สารแขวนลอย	132.60	116.00
แอมโมเนีย-ไนโตรเจน	0.33	0.60
ไนโตรเจนรวม	11.96	7.00
ฟอสฟอรัสรวม	0.23	16.70

ที่มา: ชลธิชา และคณะ (2552); Musig และคณะ (1995)

ตารางที่ 2 ปริมาณมลพิษที่เกิดจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาคำแบบพัฒนา

พารามิเตอร์	ระหว่างการเลี้ยง (ตัน/ปี)	ระหว่างการจับ (ตัน/ปี)
บีโอดี	4,675.5	9,544.7
ไนโตรเจนรวม	1,273.9	7,643.4
แอมโมเนีย-ไนโตรเจน	299.5	1,093.3
ไนไตรท์-ไนโตรเจน	50.5	206.4
ไนเตรท-ไนโตรเจน	30.8	350.0
ฟอสฟอรัสรวม	50.8	417.8

ที่มา: คัดแปลงจาก กรมควบคุมมลพิษ (2545ก)

1.2.2 น้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

คณิต และขงยุทธ (2537) กล่าวว่า น้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้ง เป็นน้ำที่ได้จากการใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ของการเลี้ยงกุ้ง มีส่วนประกอบ คือ ตะกอน และน้ำทิ้งจากการเปลี่ยนถ่ายระหว่างเลี้ยงกุ้ง ที่มีคุณสมบัติของน้ำทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพที่เปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปที่ไม่เหมาะสมต่อการปล่อยลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะ มวลน้ำอาจมีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ เช่น การขยายตัวของแร่ธาตุ และอาหารในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ในพื้นที่บริเวณที่มีแหล่งน้ำจืดในรูปบีโอดี สารแขวนลอย แอมโมเนียไนโตรเจน ไนโตรเจนรวม และฟอสฟอรัส ต่อรอบการเลี้ยงประมาณ 38.20, 132.60, 0.33, 11.96, 0.23 mg/L ตามลำดับ เป็นต้น ซึ่งน้ำทิ้งแต่ละประเภทจะต้องมีค่ามาตรฐานควบคุมน้ำทิ้ง ดังตัวอย่างมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง (กรมควบคุมมลพิษ, 2545ข) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 มาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง

ดัชนีคุณภาพน้ำ	ค่ามาตรฐาน
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	6.5–9.0
บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand; BOD)	ไม่เกิน 20 mg/L
สารแขวนลอย (Suspended Solids, SS)	ไม่เกิน 70 mg/L
แอมโมเนีย (NH ₃ -N)	ไม่เกิน 1.1 mg-N/L
ฟอสฟอรัสรวม (Total Phosphorus)	ไม่เกิน 0.4 mg-P/L
ไนโตรเจนรวม (Total Nitrogen)	ไม่เกิน 4.0 mg-N/L

ที่มา: ดัดแปลงจากกรมควบคุมมลพิษ (2549ก)

ซึ่งการเกิดกระบวนการในวัฏจักรธาตุอาหารต่าง ๆ ที่มีความสำคัญอันเกิดจากกิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์ต่อการเปลี่ยนแปลงสารต่าง ๆ เป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยให้มีการปรับสภาพน้ำเสียจากกิจกรรมต่าง ๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้นให้มีคุณภาพที่ดีขึ้น

ลักษณะน้ำทิ้งที่ปล่อยจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

การถ่ายเทน้ำจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลพบทั่วไปบริเวณป่าชายเลน ปากแม่น้ำ และคลองต่าง ๆ ที่ติดกับชายฝั่งทะเล การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลในประเทศไทยสามารถพบได้ทั้งบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย และอันดามัน (ตารางที่ 4) ยกตัวอย่างลักษณะน้ำทิ้งที่ปล่อยออกมาจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ปริมาณของเสียที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลบริเวณชายฝั่งของไทย

พื้นที่เพาะเลี้ยง กุ้งชายฝั่ง	ปริมาณน้ำทิ้ง ลบ.ม./ไร่/วัน	บีโอดี กก./ไร่/วัน	ไนโตรเจน กก./ไร่/วัน	ฟอสฟอรัส กก./ไร่/วัน
ทะเลอ่าวไทย	28.15	0.234	0.19	0.007
ทะเลอันดามัน	20.8	0.139	0.057	0.004

ที่มา: ดัดแปลงจากกรมควบคุมมลพิษ (2549ข)

ตารางที่ 5 ลักษณะของน้ำทิ้งที่ปล่อยจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

พารามิเตอร์	ช่วงค่า	ค่าเฉลี่ย
พีเอช (pH)	6.28–8.80	7.54
อุณหภูมิ (°C)	31.06–31.57	31.19
ความเค็ม (ppt)	–	0.80
บีโอดี (mg/L)	4.62–7.51	7.35
แอมโมเนีย (mg/L)	–	0.09
ไนโตรเจน (mg/L)	1.98–2.43	2.16
ไนเตรท (mg/L)	–	0.01
ฟอสเฟต (mg/L)	0.003–0.05	0.04

ที่มา: สุบัณฑิต (2548)

ปริมาณมลพิษที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง เกิดจากผลรวมของปริมาณมลพิษจากการเลี้ยงกุ้งแต่ละชนิด เช่น กุ้งกุลาดำ กุ้งขาวแวนนาไม เป็นต้น มีค่ารายละเอียดดังตารางที่ 6 โดยปริมาณอยู่ในรูปบีโอดี สารแขวนลอย แอมโมเนียไนโตรเจน ไนโตรเจนรวม และฟอสฟอรัสรวม

ตารางที่ 6 ค่าคงที่ของปริมาณมลพิษจากการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

พารามิเตอร์	ค่าคงที่ของปริมาณมลพิษ (กก./ตันผลผลิต)	
	กุ้งกุลาดำ	กุ้งขาวแวนนาไม
บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand; BOD)	68.33	41.00
สารแขวนลอย (Suspended Solids, SS)	237.18	142.31
แอมโมเนีย (NH ₃ -N)	0.60	0.36
ฟอสฟอรัสรวม (Total Phosphorus)	0.43	0.26
ไนโตรเจนรวม (Total Nitrogen)	21.4	12.84

ที่มา: ดัดแปลงจากกรมควบคุมมลพิษ (2554)

1.2.3 ผลกระทบของน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง (กุ้งทะเล)

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ไม่มีการจัดการน้ำทิ้ง และการใช้น้ำในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทำให้เกิดปัญหาของน้ำทิ้ง และน้ำเสียได้ ซึ่งการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลสามารถสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรและประเทศได้ปีละจำนวนมากได้มีการพัฒนาและขยายตัวอย่างต่อเนื่อง (วลีรัตน์ และ พุทธร, 2551) การเลี้ยงกุ้งทะเลแบบพัฒนามีความหนาแน่นสูง เพื่อให้สามารถเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่เลี้ยง ส่งผลให้เกิดปัญหาน้ำ และพื้นที่บ่อเน่าเสีย สภาพแวดล้อมเสื่อมลง โดยมีปัจจัยที่เป็นสาเหตุ คือ เศษอาหารที่เหลือจากการกิน การให้อาหารที่มากเกินไป ซากของสิ่งมีชีวิตในน้ำ สารเคมีบางส่วนที่เหลืออยู่บริเวณพื้นที่บ่อ รวมทั้งของเสียที่ถูกขับออกมาจากตัวกุ้ง โดยในสภาวะปกติการขับถ่ายของกุ้ง และการตายของแพลงก์ตอนภายในบ่อจะมีปริมาณค่อนข้างสูง (คณิต และ คุสิต, 2535) ซึ่งจะเกิดการสะสมและเน่าสลายขึ้น ของเสียส่วนใหญ่เป็นสารประกอบพวกโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ทำให้ลักษณะของน้ำทิ้งที่ปล่อยออกมามีไนโตรเจน และฟอสฟอรัสปะปนมาในปริมาณสูงมีค่าประมาณของคาร์บอน 75–85% ไนโตรเจน 40–80% ฟอสฟอรัส 65–73% จากระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งสารเหล่านี้ไม่เพียงแต่ทำให้คุณภาพน้ำเสื่อมไม่เหมาะต่อการเพาะเลี้ยง ยังส่งผลให้การเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชเพิ่มขึ้น มีผลต่อแหล่งรองรับน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยง เช่น คลองปากกระวะ อำเภอระโนด คลองคูหยง อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา และแหล่งน้ำเปิด เช่น ชายฝั่งทะเล อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช (นิคม และ คณะ, 2547) ทำให้เกิดปรากฏการณ์ยูโทรฟิเคชันขึ้นในแหล่งน้ำธรรมชาติ เมื่อมีการเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นทำให้เกิดมลภาวะสิ่งแวดล้อม และส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำในพื้นที่ใกล้เคียงเพิ่มมากขึ้นหลายประการ

1) ผลกระทบต่อแหล่งน้ำธรรมชาติ

น้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งทะเลส่งผลกระทบต่อแหล่งน้ำจืด เนื่องจากน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้ง และขี้เลนที่มีความเค็ม ส่งผลให้แหล่งน้ำจืด หรือแหล่งน้ำผิวดินไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ โดยขี้เลนมักถูกนำออกจากพื้นที่บ่อในระหว่างการสูบน้ำทิ้ง หรือการฉีดเลนทำให้เกิดการสะสมของขี้เลนเหล่านี้ในแม่น้ำ ลำคลอง ปากแม่น้ำ และทะเลจนเกิดมลภาวะเป็นพิษ (Avnimelech and Ritvo, 2003) นอกจากความเค็มที่จะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมแล้ว ยาปฏิชีวนะที่นำมาใช้ในบ่อเพาะเลี้ยงก็สามารถส่งผลกระทบต่อมนุษย์และสัตว์น้ำต่อไปได้

2) ผลกระทบต่อพื้นที่เกษตรกรรม

น้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งหากไม่มีการจัดการที่ดีและมีการปล่อยน้ำลงสู่ลำคลอง สาธารณะที่มีการระบายต่ำ จะส่งผลให้น้ำ และดินบริเวณใกล้เคียงเปลี่ยนสภาพเป็นความเค็ม ซึ่งจะส่งผลให้คุณภาพของน้ำ และดินไม่เหมาะแก่การทำเกษตรกรรม เป็นต้น

3) ผลกระทบต่อพื้นที่ป่าชายเลน

สุบันจิต และวีระพงษ์ (2552) กล่าวว่า ป่าชายเลนที่ถูกแทนที่ด้วยบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล ส่งผลต่อดินทำให้มีสภาพเป็นกรด แบนทีเรียในดินเสียสมดุล ประสิทธิภาพการหมุนเวียนแร่ธาตุต่ำลง ดินตะกอนจากการเลี้ยงยังมีผลกระทบต่อโครงสร้าง และการเจริญเติบโตของไม้ป่าชายเลนของเสียที่ถูกปล่อยออกมามีสารอาหาร แร่ธาตุมากเกินกว่าที่ป่าชายเลน และทะเลบริเวณชายฝั่งจะรับไว้ จนเป็นสาเหตุทำให้แพลงก์ตอนเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ออกซิเจนในบริเวณนั้นไม่เพียงพอจากกระบวนการหายใจในเวลากลางคืน ทำให้เกิดปรากฏการณ์ขึ้นปลาวาฬ (Red tide) ซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่บริเวณใกล้เคียง (Robertson and Phillips, 1995)

4) ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรธรรมชาติชายฝั่งทะเล

การปล่อยน้ำทิ้ง และตะกอนดินเลน ลงสู่บริเวณที่ใกล้กับแนวปะการัง ส่งผลกระทบต่อปะการัง และหญ้าทะเล เนื่องจากในบริเวณดังกล่าวมีอัตราการแลกเปลี่ยนน้ำอย่างจำกัด จึงเป็นสาเหตุส่งเสริมให้เกิดปรากฏการณ์ยูโทรฟิเคชัน โดยสาหร่ายจะเจริญเพิ่มมากขึ้นจนเกิดแนวเงา และการแย่งพื้นที่ของสิ่งมีชีวิต (Herbeck *et al.*, 2013) สารอาหาร และธาตุอาหารที่มากเกินไปบริเวณชายฝั่งจะรับไว้ได้ เป็นอีกสาเหตุที่ทำให้แพลงก์ตอนเกิดการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว และเกิดการตายในปริมาณมาก ส่งผลให้ออกซิเจนในน้ำมีปริมาณที่ลดต่ำลง เกิดการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนในบริเวณพื้นที่ทะเลที่สามารถเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (สุบันจิต และวีระพงษ์, 2552)

1.2.4 วัฏจักรไนโตรเจน

วัฏจักรไนโตรเจนส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ อัตราการสร้างระบบนิเวศต่าง ๆ ถูกจำกัดด้วยไนโตรเจนที่ถูกตรึง กระบวนการตรึงก๊าซไนโตรเจนเป็นการเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนีย หรือสารอินทรีย์ในโตรเจน โดยจุลินทรีย์เพียงไม่กี่กลุ่ม ซึ่งพืช และสัตว์ไม่สามารถใช้ไนโตรเจนจากบรรยากาศได้โดยตรง จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ต่างก็ใช้ในโตรเจนในรูปที่ถูกตรึงเพื่อสร้างส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ ประมาณ 85% ของการตรึงก๊าซไนโตรเจนเกิดจากจุลินทรีย์ (ดวงพร, 2545) หลังจากทีไนโตรเจนได้ถูกตรึงมาแล้วนั้นสามารถเปลี่ยนรูปเป็นหลายรูปในวัฏจักร เช่น ไนโตรเจนแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท เป็นต้น ซึ่งในแต่ละรูปนั้นจะมีความเป็นพิษที่แตกต่างกัน

1) ความเป็นพิษของแอมโมเนีย

แอมโมเนีย (NH_3 , NH_4^+) เป็นสารอนินทรีย์ในโตรเจนที่เกิดจากการขับถ่ายของสัตว์น้ำ และการย่อยของอาหารสัตว์ที่เหลือจากการบริโภค ซึ่งมีปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นหรือน้อยลงขึ้นอยู่กับค่าพีเอช (pH) เมื่อค่า pH เพิ่มขึ้น ปริมาณของแอมโมเนีย (NH_3) จะเพิ่มขึ้น เมื่อค่า pH ลดลง ปริมาณของแอมโมเนียไอออนจะเพิ่มขึ้น ซึ่งแอมโมเนียมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำมากกว่าแอมโมเนียไอออน (Spotte, 1979) NH_4^+ ไม่สามารถระเหยไปในอากาศได้ หาก pH สูงขึ้นจะส่งผลต่อสัดส่วนของ NH_3 เพิ่มขึ้น ความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำก็เพิ่มสูงขึ้น และสามารถระเหยไปในอากาศได้ (Boyd and Tucker, 1998)

การสะสมแอมโมเนียในน้ำเพียง 0.1 mg-N/L ทำให้สัตว์น้ำมีอาการเครียด มีการขับถ่าย ต้องการออกซิเจนสูงขึ้น ส่งผลให้เสี่ยงต่อการติดโรค (กษิตศ, 2551) แอมโมเนียอิสระความเข้มข้น 0.1–0.4 mg-N/L จะส่งผลให้กุ้งเจริญเติบโตช้า ส่วนแอมโมเนียที่มากกว่า 0.4 mg-N/L กุ้งจะกินอาหารน้อยลง เครียด หรือตายได้ ระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ปลอดภัยสำหรับการเลี้ยงสัตว์น้ำควรต่ำกว่า 0.2–3 mg-N/L สำหรับสัตว์อื่น ๆ เช่น ปลา แอมโมเนียที่มีความเข้มข้นสูงจะส่งผลให้การฟักไข่ลดลง ลดอัตราการเจริญเติบโต เกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณเนื้อเยื่อของเหงือก ตับ และไต (สุบฉินจิต และวีระพงศ์, 2552) เมื่อในน้ำมีค่า pH สูงขึ้นจะเพิ่มระดับความเป็นพิษของแอมโมเนียเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่มีปริมาณของแอมโมเนียรวมในน้ำเท่าเดิม (ชลอ และพรเลิศ, 2547) ตามปกติแอมโมเนียในน้ำจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไนไตรท์ (NO_2^-) และไนเตรท (NO_3^-) โดยกระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification) ด้วยแบคทีเรียในแหล่งน้ำ

2) ความเป็นพิษของไนไตรท์ (Nitrite: NO_2^-)

ไนไตรท์เป็นสารตัวกลางที่พบได้ในระหว่างกระบวนการ Nitrification และกระบวนการ Denitrification การสะสมของไนไตรท์อาจเกิดจากปริมาณอากาศภายในบ่อไม่เหมาะสม โดยการเพิ่มขึ้นของไนไตรท์จะเป็นตัวบ่งบอกให้เห็นว่า ภายในระบบมีการเติมอากาศไม่เพียงพอ (Rittmann and McCarty, 2001) หากมีการสะสมในบ่อเพียงมากกว่า 1 mg-N/L จะทำให้ความสามารถในการรับออกซิเจนของสัตว์น้ำต่ำกว่าปกติ ซึ่งจะมีผลเสียอย่างมาก หากสภาพภายในบ่อมีออกซิเจนต่ำ และอุณหภูมิสูง (กษิตศ, 2551) ไนไตรท์ก่อให้เกิดการรบกวนทางสรีรวิทยา และภาวะภูมิคุ้มกัน เนื่องจากไนไตรท์จะรวมตัวกับฮีโมโกลบินในเลือดกลายเป็นเมทาโมโกลบิน ซึ่งไม่มีความสามารถในการลำเลียงออกซิเจนไปสู่เซลล์ และกล้ามเนื้อ (Song *et al.*, 2011) สำหรับในกุ้ง ไนไตรท์ในเลือดจะทำให้ระดับโปรตีน และค่าความเป็นกรด-ด่างของเลือดกึ่งเปลี่ยนแปลงไป กระบวนการเผาผลาญอาหารภายในร่างกายมีประสิทธิภาพลดลงทำให้การเจริญเติบโตของกุ้งลดลง เกิดการสะสมของยูเรียในเลือดกึ่ง และมีการดูดซึมน้ำมาก ทำให้สมดุลเกลือแร่เปลี่ยนแปลง (พุทธ

และคณะ, 2546) ส่งผลให้การหายใจของกุ้งผิดปกติ และไม่สามารถลอกคราบ เปลือกนึ่ม มีการกินกันเอง น้ำที่มีไนโตรเจนสูงกว่า 0.15 mg-N/L จะทำให้กุ้งป่วย อ่อนแอ ติดเชื้อโรคได้ง่าย และตายในที่สุด (สุบัตติ และวีระพงษ์, 2552) ซึ่งไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเลจะมีความเป็นพิษน้อยกว่าน้ำกร่อย เนื่องจากปริมาณคลอไรด์ในน้ำทะเลจะมีสูงกว่าน้ำกร่อย ทำให้คลอไรด์ และไนโตรเจนมีการซึมเข้าสู่ร่างกายของสัตว์น้ำในเวลาเดียวกัน ทำให้ความเป็นพิษของไนโตรเจนลดลง (Crab *et al.*, 2007)

3) ความเป็นพิษของไนเตรท (Nitrate: NO_3^-)

ไนเตรทเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) จากไนโตรเจนเป็นไนเตรท ไนเตรทจะไม่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลัน มีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำน้อยกว่าแอมโมเนีย และไนโตรเจนมาก ทำให้สามารถสะสมอยู่ในบ่อเลี้ยงได้นาน ส่งผลต่อสุขภาพของสัตว์น้ำโดยทำให้เกิดความอ่อนแอ กินอาหารน้อยลง และทำให้เกิดโอกาสติดเชื้อได้ง่าย ไนเตรทจะมีความเป็นพิษมากขึ้นถ้าสัตว์น้ำอาศัยอยู่ในน้ำที่มีระดับของไนเตรทสูงเป็นเวลานาน ซึ่งระดับสูงสุดของไนเตรทที่ยอมรับได้ในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำได้ คือ 50 mg-N/L (กษิตศ, 2551) หากสูงกว่านี้ควรมีการบำบัด หรือการเปลี่ยนถ่ายน้ำในบ่อ ซึ่งการปล่อยน้ำทิ้งที่มีปริมาณไนเตรทสูงจะกระตุ้นการเกิดปรากฏการณ์ยูโทรฟิเคชัน ทำให้พืชน้ำ และสาหร่ายเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนปริมาณออกซิเจนในน้ำมีไม่เพียงพอ และทำให้เกิดความตื้นเขินได้ในระยะยาว (สุบัตติ และวีระพงษ์, 2552)

1.2.5 กระบวนการทางชีวภาพในการกำจัดไนโตรเจน

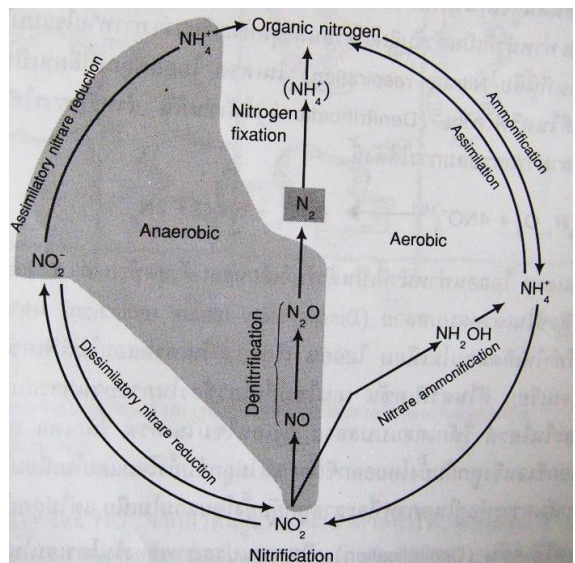
ไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของอินทรีย์สารหลายชนิดที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิต เช่น เป็นส่วนประกอบของโปรตีน และนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีความสำคัญต่อระบบนิเวศของแหล่งน้ำ ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสารอนินทรีย์ไนโตรเจนจะอยู่ในรูปสารประกอบหลายประเภท ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นของไนโตรเจนเกิดขึ้นกับสัตว์น้ำทุกระบบ โดยการเพิ่มขึ้นจะขึ้นอยู่กับน้ำหนักของสัตว์น้ำและอาหารที่ให้ (สุชาติ, 2560) โดยไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่มาจากอาหาร ซึ่งกุ้งสามารถที่จะเก็บไนโตรเจนไว้ได้ในเนื้อกุ้งได้เพียง 21.8% (พุทธ และคณะ, 2546) การกำจัดหรือเปลี่ยนรูปแบบไนโตรเจนที่เป็นพิษจึงมีความสำคัญมากในระบบการเพาะเลี้ยงแบบหนาแน่น

วิธีการบำบัดทางชีวภาพ อาศัยกระบวนการทำงานของจุลินทรีย์หลากหลายชนิด การลดปริมาณแอมโมเนียในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำจะมีความเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในน้ำ และดินตะกอนก้นบ่อ มีกระบวนการบำบัดที่นำไนโตรเจนเข้าสู่เซลล์ (Assimilation) และการบำบัดโดยการย่อยสลาย หรือเปลี่ยนรูป (Dissimilation) จากสารอินทรีย์ไนโตรเจนให้ไปอยู่ในรูปของสารอนินทรีย์ไนโตรเจน ซึ่งผลสุดท้ายที่ได้คือ ก๊าซไนโตรเจนที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (มะลิวัลย์ และสรวิศ, 2555)

ในวัฏจักรไนโตรเจนจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงสารประกอบไนโตรเจนที่เกิดขึ้นแตกต่างกันออกไป (ภาพที่ 2) กระบวนการที่สำคัญ ได้แก่

1) การตรึงก๊าซไนโตรเจนในแหล่งน้ำ

เป็นการตรึงก๊าซไนโตรเจนจากบรรยากาศลงสู่แหล่งน้ำ โดยจุลินทรีย์ให้อยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน โดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ (Non-symbiotic nitrogen fixation) (ตารางที่ 7) และกลุ่มจุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนแบบพึ่งพา (Symbiotic nitrogen fixation) (พรหมศรี และคณะ, 2548)



ภาพที่ 2 วัฏจักรไนโตรเจนในแหล่งน้ำ

ที่มา: ดวงพร (2545)

ตารางที่ 7 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มที่ตรึงก๊าซไนโตรเจนแบบอิสระที่สำคัญ

กลุ่มของแบคทีเรีย	แบคทีเรียที่ตรึงก๊าซไนโตรเจนแบบอิสระ
กลุ่มใช้ออกซิเจน (Aerobe)	<i>Azotobacter</i> sp., <i>Beijerinckia</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.
กลุ่มที่ใช้ออกซิเจนหรือไม่ใช้	<i>Bacillus</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp., <i>Rhodospirillum</i> sp.
ออกซิเจน (Facultative anaerobe)	
กลุ่มที่ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (Microaerophile)	<i>Azospirillum</i> sp., <i>Xanthobacter</i> sp.
กลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจน (Strict anaerobe)	<i>Chlorobium</i> sp., <i>Chromatium</i> sp., <i>Clostridium</i> sp., <i>Desulfovibrio</i> sp., <i>Thiobacillus</i> sp.

ที่มา: สุบัณฑิต และวีระพงศ์ (2552)

2) แอมโมนิฟิเคชัน (Ammonification)

เป็นการเปลี่ยนสภาพสารอินทรีย์ในโตรเจนให้เป็นสารอนินทรีย์ในโตรเจนในรูปแอมโมเนีย เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนภายในระบบนิเวศที่เป็นน้ำ และดิน (ดวงพร, 2545) จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้เรียกว่า Ammonifiers ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp., *Clostridium* sp. และ *Proteus* sp. (พรพรรณศรี และคณะ, 2548)

3) ไนตริฟิเคชัน (Nitrification)

การเปลี่ยนแอมโมเนีย หรือแอมโมเนียมไอออนเป็นไนเตรท ประกอบด้วย 2 กระบวนการ คือ กระบวนการที่ 1 การเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียมไอออน หรือก๊าซแอมโมเนีย (NH_3 , NH_4^+) ให้เป็นไนไตรท์ (NO_2^-) เรียกว่า แอมโมเนียมออกซิเดชัน (Ammonium oxidation) ยกตัวอย่างแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้ เช่น *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus* และ *Nitrosogloea* สุบัณฑิต และวีระพงศ์ (2552) กล่าวว่า แบคทีเรียกลุ่มนี้จะไวต่อสิ่งแวดล้อม โดย pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.6–8 หากต่ำกว่า 6 ปฏิกริยาจะเกิดช้าลง และหากต่ำกว่า 4.5 ปฏิกริยาจะถูกยับยั้งทันที กระบวนการที่ 2 การเปลี่ยนแปลงไนไตรท์ (NO_2^-) ให้เป็นไนเตรท (NO_3^-) เรียกว่า ไนไตรท์ออกซิเดชัน (Nitrite oxidation) ยกตัวอย่างแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้เช่น *Nitrobacter winogradskyi*, *N. agilis*, *Nitrospira gracilis* และ *Nitrococcus mobilis* (Zhang *et al.*, 2012; Chankaew *et al.*, 2018) ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มเป็นแบคทีเรียที่ใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งพลังงาน และ CO_2 เป็นแหล่งคาร์บอน เรียกโดยรวมว่า Nitrifying bacteria นอกจากนี้ ยังมีกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกระบวนการ Nitrification ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งของคาร์บอน และพลังงาน (Heterotroph) ได้ เช่น *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Shewanella* และ *Alcaligenes* (พรพรรณศรี และคณะ, 2548; สุบัณฑิต และวีระพงศ์, 2552) ชงชัย (2544) กล่าวว่า ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved oxygen) ค่าพีเอช (pH) อุณหภูมิ (Temperature) และค่าความเค็ม (Salinity) เป็นส่วนที่มีผลต่อการเกิดปฏิกริยา Nitrification ทั้งนี้ กระบวนการ Nitrification มีความสำคัญมากในแหล่งน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในฟาร์มสัตว์น้ำ เพราะแอมโมเนีย และไนไตรท์ที่เกิดจากสิ่งขับถ่าย และเศษอาหารส่วนเหลือ มีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำค่อนข้างสูง ส่วนไนเตรทมีความเป็นพิษต่ำสุด ดังนั้น ถ้าแอมโมเนียสามารถเปลี่ยนไปเป็นไนเตรทได้ดี สัตว์น้ำก็จะมีสุขภาพดีไปด้วย (ยุทธพงษ์, 2558)

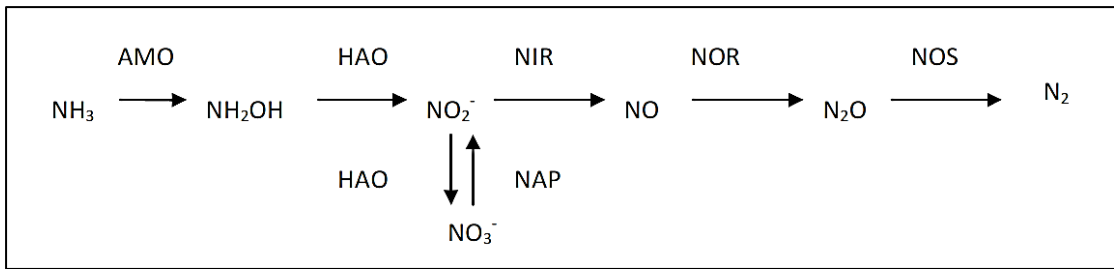
4) ดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification)

ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่มีไนเตรท แบคทีเรียกลุ่มดีไนตริไฟเออร์ (Denitrifier) สามารถใช้ในเตรทในการหายใจแทนออกซิเจนได้ โดยปฏิกิริยา Denitrification ซึ่งจะเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นสารตัวกลางหลายชนิด เช่น ไนไตรท์ (NO_2^-) ไนตริกออกไซด์ (NO) ไนตรัสออกไซด์ (N_2O) และก๊าซไนโตรเจน (N_2) แบคทีเรียบางชนิด เช่น *E. coli* มีความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ แต่แบคทีเรียอื่น ๆ สามารถทำขั้นตอนต่อไปอีก 2 ขั้นตอนของการหายใจแบบไร้อากาศ คือ การรีดิวซ์ไนไตรท์ให้เป็นก๊าซไนตรัสออกไซด์ และรีดิวซ์ต่อเป็นก๊าซไนโตรเจน ซึ่งแบคทีเรียที่พบบ่อยและมีบทบาทสำคัญได้แก่ *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Flavobacterium* sp., *Moraxella* sp., *Thiobacillus* sp. และ *Bacillus* sp. เป็นต้น การที่ไนโตรเจนคืนสู่บรรยากาศโดยกระบวนการ Denitrification นับว่าเป็นการครบวงจรของวัฏจักรไนโตรเจน (ดวงพร, 2545; พรรณศรี และคณะ, 2548; สุบัญญัติ และวีระพงษ์, 2552)

5) ไนไตรท์แอมโมนิฟิเคชัน (Nitrite ammonification)

เป็นปฏิกิริยาการรีดิวซ์ไนไตรท์ให้เป็นแอมโมเนียมไอออนภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ยกตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ เช่น *Clostridium* sp., *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Staphylococcus* sp. และ *Vibrio* sp. เป็นต้น ซึ่งมีเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาคือ Cytochrome c nitrite reductase (ccNiR) (ดวงพร, 2545; สุบัญญัติ และวีระพงษ์, 2552)

สำหรับกระบวนการ Heterotrophic nitrification และ Aerobic denitrification ที่เกิดจากแบคทีเรีย ยกตัวอย่างเช่น *Thiosphaera pantotropha*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus* sp. (Su *et al.*, 2001; Ahn, 2006) อรวรรณ และคณะ (2556) กล่าวว่า *B. coagulans* สามารถย่อยสลาย NO_2^- , NO_3^- , NO และ N_2O ได้เป็น N_2 และ O_2 เป็นต้น แบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีการผลิตเอนไซม์ ซึ่งมีกระบวนการทำงาน 4 กระบวนการหลัก (Heylen and Keltjens, 2012) ซึ่งมีเอนไซม์ Ammonia monooxygenase (AMO) และ Hydroxylamine oxidase (HAO) ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงจาก NH_3 เป็น NO_2^- ขณะที่เอนไซม์ Periplasmic nitrate reductases (Nap) เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลง NO_2^- ไปเป็น NO_3^- ที่สามารถเปลี่ยนรูปกลับไปเป็น NO_2^- ได้ จากนั้นเอนไซม์ Nitrite reductases (NiR) จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงจาก NO_2^- เป็น NO และการเปลี่ยนไนตริกออกไซด์ (NO) ให้เป็นไนตรัสออกไซด์ (N_2O) เกิดจากเอนไซม์ Nitric oxide reductase (N_2OR) ที่เร่งปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้าย N_2O จะถูกเปลี่ยนไปเป็น N_2 โดยเอนไซม์ Nitrous oxide reductase (NOS) (Rasmussen *et al.*, 2002) (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 เอนไซม์ที่มีส่วนในกระบวนการ Heterotrophic nitrification และ Aerobic denitrification
ที่มา: Wen และ Wei (2011)

1.2.6 แบคทีเรียที่พบในแหล่งน้ำทะเล

สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจน กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ใช้ออกซิเจน กลุ่มที่ 3 กลุ่มที่ใช้และไม่ใช้ออกซิเจน โดยที่แบคทีเรียในกลุ่มที่ 3 เป็นแกรมบวก รูปร่างท่อน ได้แก่ *Bacillus* (Avnimelech and Ritvo, 2003) ซึ่งการพบเชื้อแบคทีเรียต่าง ๆ นั้นมาจาก ทั้งที่เป็นแบคทีเรียที่เจริญอยู่ในสภาวะแวดล้อมธรรมชาติ และอาจเจริญในน้ำที่มีการปนเปื้อนมลภาวะ หรือน้ำที่ทิ้งจากแหล่งชุมชน โรงงาน หรือแม้กระทั่งสถานที่ที่เป็นแหล่งน้ำเสีย เป็นต้น แบคทีเรียมีชนิด และปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ความเค็ม ความลึก pH สารอาหารในน้ำทะเล เป็นต้น สำหรับแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ที่พบในทะเล เช่น *B. idosus* และ *B. catenula* เป็นต้น (บัญญัติ, 2534)

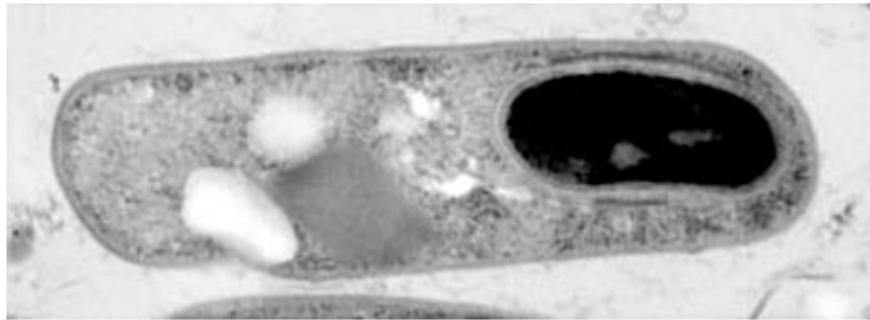
1.2.7 บาซิลลัส (*Bacillus*)

แบคทีเรีย *Bacillus* เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่สร้างเอนโดสปอร์ (Endospore) แกรมบวก รูปร่างแบบแท่งหรือกลม *Bacillus* มีคุณสมบัติแตกต่างกันมาก เช่น ในการหมักน้ำตาลกลูโคส *B. coagulans* จะสร้างกรดแลกติกเพียงอย่างเดียว ขณะที่ *B. subtilis*, *B. licheniformis* และ *B. cereus* สร้าง 2, 3 butanediol และ Glycerol เป็นส่วนใหญ่ และมีบางชนิดที่ดำรงชีวิตแบบ Facultative chemolithotroph ใช้ไฮโดรเจนเป็นแหล่งของพลังงานได้ มีความต้องการอาหารแตกต่างกัน อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 25–75 °C ทนเกลือได้อยู่ในช่วง 2–25% (ดวงพร, 2537)

1) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของ *Bacillus*

เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งตรง หรือเกือบตรง ขนาดประมาณ 0.5x1.2 μm ไปจนถึงขนาดใหญ่ประมาณ 2.5x10 μm บางสปีชีส์อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือเซลล์จะต่อกันเป็นสายโซ่ ส่วนใหญ่มีการเคลื่อนที่ โดยใช้ Lateral flagella มีการสร้างเอนโดสปอร์ภายในเซลล์โดยมี 1 อันต่อ 1 เซลล์

เซลล์ โดยสปอร์อยู่ใน Sporangium (ภาพที่ 4) ซึ่งบริเวณที่พบสปอร์มีทั้งบริเวณกลางเซลล์ (Central) ก่อนข้างกลาง (Paracentral) เกือบปลาย (Subterminal) หรือปลายเซลล์ (Terminal) ย้อมติดสีแกรมบวกในช่วงระยะแรกของการเจริญ และเมื่อเซลล์แก่จะเปลี่ยนเป็นติดสีแกรมลบ เรียก Gram variable ดำรงชีวิตแบบ Chemoorganotroph เมทาบอลิซึมเป็นแบบ Respiration หรือ Fermentation หรือทั้งสองอย่างจะขึ้นอยู่กับชนิด ใช้อาหารได้ต่าง ๆ กัน ส่วนใหญ่สร้าง Catalase เป็นพวก Strict aerobe หรือ Facultative



ภาพที่ 4 ลักษณะสปอร์ของ *Bacillus megaterium*

ที่มา: Kenneth (2012)

เซลล์ของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ประกอบด้วย Cytoplasmic membrane และ Cell wall ไม่มีชั้น Outer membranes ซึ่งต่างจากแบคทีเรียแกรมลบ ส่วน Cell wall ประกอบด้วย Peptidoglycan หลายชั้น ส่วน Anionic polymers ทำให้ผนังเซลล์มีความเหนียว บริเวณผิวหน้าของ Cell wall เป็นชั้นของ Paracrystalline cell wall surface layers (S layer) ประกอบด้วยโปรตีน หรือ Glycoprotein หลายชนิดสร้าง Carbohydrate capsules การสร้างสปอร์เป็นกลไกเพื่อการอยู่รอด ซึ่งขึ้นอยู่กับพันธุกรรม และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม สิ่งแวดล้อมมีทั้งภายนอก และภายในที่จำเป็นในการสร้างสปอร์ เช่น สภาพทางกายภาพ ได้แก่ ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ ปกติ ช่วงของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมกับการเจริญของเซลล์ปกติ และออกซิเจนที่เพิ่มขึ้น (Manzo *et al.*, 2013) *Bacillus* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยากว้าง ลักษณะโคโลนีมีความแปรปรวนมากขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม คุณภาพ และปริมาณอาหาร และอายุโคโลนี อย่างไรก็ตามในสภาพแวดล้อมเดียวกันลักษณะโคโลนีสามารถใช้จำแนกชนิดได้เบื้องต้น (Rosovitz *et al.*, 1998)

2) คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Bacillus*

คุณสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญอย่างหนึ่งของ *Bacillus* คือ สามารถสร้างเอนไซม์ Catalase ซึ่งส่วนใหญ่ให้ผลเป็นบวก จึงทำให้สามารถแยกความแตกต่างจากแบคทีเรียสกุล *Clostridium* และ *Sporolactobacillus* ได้ กฤษณา และคณะ (2557) กล่าวว่า *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถจัดอยู่ในกลุ่ม Ammonifiers เนื่องจากสามารถผลิต Extracellular enzyme พวก Proteolytic enzyme เพื่อย่อยโปรตีนให้มีอนุเล็กลง โดยเอนไซม์ชนิดนี้ ถ้าย่อยโปรตีนในสภาวะที่มีอากาศเพียงพอ (Aerobic proteolysis) จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ แอมโมเนีย ซัลเฟต และน้ำ (Harmsen and Schreven, 1995) และหากการย่อยสลายโปรตีนเกิดขึ้นในสภาวะที่ออกซิเจนไม่เพียงพอ หรือไม่มีออกซิเจน จะเกิดผลิตภัณฑ์ เอมีน คาร์บอนไดออกไซด์ กรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนซัลไฟด์เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นสารก่อให้เกิดกลิ่นเหม็น

Bacillus subtilis สามารถผลิต Polypeptide antibiotics ได้แก่ Bacitracin (Kenneth, 2006) ที่เป็นประโยชน์ต่อกุ้ง สอดคล้องกับการรายงานของ Suharti และ Vries (2004) พบว่า *Bacillus* สามารถผลิตเอนไซม์ที่คล้ายกับเอนไซม์ Protease, Amylase และ Lipase ที่สามารถช่วยย่อยสลายของเสียที่เป็นสารอินทรีย์ แต่ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้นาน หากไม่ได้รับปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสม ด้วยสาเหตุดังกล่าวนี้สามารถส่งผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิด และการเปลี่ยนไนโตรเจนไปเป็นไนโตรเจน โดยกระบวนการ Nitrification จากรายงานของ Zhang และคณะ (2012) พบว่า *B. methylotrophicus* สามารถผลิตเอนไซม์ Ammonia monooxygenase (AMO) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เชื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยากำจัดแอมโมเนียได้เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Suharti และ Vries (2005) พบว่า *B. azotoformans* LMG9581^T และ *B. bataviensis* LMG21833^T สามารถผลิตเอนไซม์ Nitric oxide reductase (NOR) ได้

ซึ่งความต้องการอาหาร และสภาพแวดล้อมของ *Bacillus* ในการเจริญเติบโตสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ต้องการอาหารธรรมดาทั่วไปที่มีส่วนประกอบไม่ซับซ้อน กลุ่มที่ 2 ต้องการอาหารที่มีส่วนประกอบซับซ้อน กลุ่มที่ 3 ต้องการอาหารเฉพาะสำหรับการเจริญเติบโต *Bacillus* สามารถจัดจำแนกในระดับจีโนมได้ โดยอาศัยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Navin *et al.*, 2014) ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Bacillus*

Biochemical test	Result
Morphology	Rod
Gram staining	+
Motility	+
Spore formation	+
Citrate utilization	+
Catalase	+
Gelatin hydrolysis	+
Starch hydrolysis	+
Iodole	-
Oxidase	-
Voges – proskauere	+
Nitrate reduction	+
Glucose	+
Fructose	+
Ribose	+
Maltose	+
Sorbitol	-
Mannitol	-
Sucrose	+
Lactose	-
Xylose	-
Trehalose	+

ที่มา: Navin และคณะ (2014)

1.2.8. *Bacillus* กับการปรับปรุงคุณภาพน้ำ

การใช้แบคทีเรียในการปรับปรุงคุณภาพน้ำสามารถใช้แบคทีเรียได้หลายกลุ่ม และหนึ่งในนั้นคือแบคทีเรีย *Bacillus* เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการย่อยสารอินทรีย์ในการบำบัดพื้นบ่อ และควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสมต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งบางสายพันธุ์ถูกนำมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยใช้เป็นตัวควบคุมสิ่งแวดล้อม (Biological control หรือ Biocontrol) (สุวรรณ, 2549)

การศึกษาผลของการใช้ *Bacillus* ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อดินของ เจริญ และ ชรินทร์ (2552) พบว่า คุณภาพน้ำระหว่างการทดลอง ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ความโปร่งใส ความเป็นกรด-ด่าง ความเป็นด่าง และปริมาณไนโตรเจนรวม อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานสำหรับการเลี้ยงสัตว์น้ำ หลังการใช้ *Bacillus* บำบัดน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง ปริมาณแอมโมเนียรวม และปริมาณไนโตรเจนที่ต่ำกว่าบ่อที่ไม่ใช้ *Bacillus* นอกจากนี้ *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. firmus*, *B. lentus* และ *B. marinus* มีผลต่อการย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา พบว่า แบคทีเรียเหล่านี้สามารถย่อยสลายชีวมวล เศษอาหาร และสารอินทรีย์ในบ่อ รวมถึงทำให้กุ้งมีอัตราการรอดเพิ่มมากขึ้น (สุบัตินิต และวีระพงศ์, 2552) สอดคล้องกับการศึกษาของ สรรเสริญ และทวี (2539) ที่ศึกษาการเจริญเติบโต และผลผลิตของการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อดิน โดยใช้ *B. subtilis* พบว่า *Bacillus* ทำให้ปริมาณแอมโมเนียรวมลดลงได้ถึง 32.18% และไนโตรเจนที่ลดลง 9.31% โดยน้ำหนัก ส่งผลให้ระดับความเป็นพิษจากแอมโมเนีย และไนโตรเจนในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งอยู่ในระดับต่ำ

กฤษณา และคณะ (2557) ศึกษาผลของระดับกากน้ำตาด จุลินทรีย์ *Bacillus* และ *Vibrio* ต่อคุณภาพน้ำ และอัตราการรอดของลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะวัยอ่อน (*Litopenaeus vannamei*) พบว่า การทดลองเลี้ยงกุ้งขาวกับจุลินทรีย์ที่มีการใช้ระดับกากน้ำตาดในความเข้มข้น 0.05% โดยน้ำหนัก พบว่า จุลินทรีย์มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของระดับน้ำตาด ทั้งนี้ *Bacillus* มีการเจริญเติบโตที่มากขึ้นตามปริมาณที่มากขึ้นของกากน้ำตาด และทำให้กลุ่ม *Vibrio* sp. มีแนวโน้มในทิศทางที่ลดน้อยลง โดยใช้เชื้อที่ระดับความหนาแน่น 10^3 CFU/mL ส่วน Karunasagar และ Iddya (2006) รายงานว่า *Bacillus* ในหลายสปีชีส์มีความสามารถในการยับยั้ง *Vibrio* spp. โดยสามารถสร้างสาร Subtilin และ Bacitracin ซึ่งเป็นปฏิชีวนะแบคทีเรียโอซิน (Bacteriocin) ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก

นอกจากนี้ Zokaefar และคณะ (2014) ศึกษาการใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ L10 และ G1 มีความสามารถในการรักษาความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนโตรเจน และไนเตรท ให้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

ได้สำหรับการเลี้ยงกึ่งภายในในเวลา 8 สัปดาห์ ซึ่งใช้แบคทีเรียที่มีความเข้มข้น 10^8 CFU/mL มีผลให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในระหว่างการทดลอง ช่วงสัปดาห์ที่ 5 ความเข้มข้นของแอมโมเนียมีค่าเฉลี่ย 0.22 ถึง 0.78 mg-N/L ในขณะที่สัปดาห์ที่ 6, 7 และ 8 ค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนลดลงเฉลี่ยเหลือ 0.007 ถึง 0.0007 mg-N/L รวมถึงความเข้มข้นของไนเตรตเหลือเฉลี่ย 3.72 ถึง 4.00 mg-N/L

1.2.9 *Bacillus* ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Nitrification–denitrification

แบคทีเรีย *Bacillus* มีคุณสมบัติในการย่อยสลายสารอินทรีย์ สามารถทำให้เกิดการย่อยกากอาหารได้ โดยเฉพาะในการเลี้ยงสัตว์น้ำ และมีการดำรงชีวิตแบบเฮเทอโรโทรป (Heterotroph) (สุวรรณ, 2549) สามารถก่อให้เกิดกระบวนการ Nitrification โดยได้รับพลังงานจากการเพิ่มออกซิเจนให้กับอินทรีย์สาร ซึ่งผลที่ได้จากกระบวนการ คือ ไนโตรเจน และสารอินทรีย์ไนโตรเจนบางชนิด (Meikle, 1953) แล้วแปรสภาพจากไนโตรเจน หรือ ไนเตรตเป็นก๊าซในกระบวนการ Denitrification ยกตัวอย่างเช่น *Bacillus pycocyanaeus* และ *B. subtilis* เป็นต้น

จากการศึกษาของ Zhang และคณะ (2012) พบว่า *B. methylotrophicus* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Heterotrophic มีความสามารถในการกระบวนการ Nitrification–denitrification ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (Aerobic) ทั้งนี้ ประสิทธิภาพการลดแอมโมเนียของ Heterotrophic *Bacillus* sp. มีกระบวนการที่ซับซ้อนน้อยกว่าแบคทีเรีย Autotroph (นฤมล และคณะ, 2556; Kim *et al.*, 2005) ซึ่งกระบวนการเกิด Nitrification และ Denitrification อาจเกิดขึ้นได้พร้อมกัน ซึ่งกระบวนการนี้เรียกว่า Simultaneous nitrification and denitrification (SND)

Zheng และคณะ (2012) และ Sun และคณะ (2016) กล่าวว่า ความหลากหลายของการลดไนเตรตเป็นไนโตรเจนอิสระของ *B. subtilis* ใช้ยีน Cytoplasmic nitrate reductase NarGHI และใช้ยีน Nitrite reductase NirBD ขณะที่ *B. selenitireducens* ผลิตแอมโมเนียผ่านการใช้ยีน Periplasmic nitrite reductase NrfA ซึ่งปฏิกิริยา Nitricoxide reductase (NOR) ถูกตรวจพบใน *B. licheniformis* ATCC14580^T (Rey *et al.*, 2004) และ *B. coagulans* XZL4 (Su *et al.*, 2011)

กระบวนการ Denitrification เกิดจากแบคทีเรียในกลุ่ม Denitrifier ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีการใช้ไนโตรเจน หรือไนเตรตเปลี่ยนสภาพไปเป็นก๊าซไนโตรเจน (Zheng *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2016) โดยแบคทีเรียเหล่านี้ถือเป็นพวก Aerobic หรือ Facultative anaerobic เพราะสามารถใช้ไนโตรเจน หรือไนเตรต เป็นตัวรับอิเล็กตรอนเมื่อขาดออกซิเจน เจริญได้เมื่อมีออกซิเจนเท่านั้น หรือมีแต่ไนโตรเจน หรือไนเตรตเท่านั้น แล้วแต่กรณี และเจริญอยู่ได้เมื่อมีทั้งออกซิเจน และไนเตรตรวมกัน (Bremner and Shaw, 1958)

ส่วน Verbaendert และคณะ (2011) รายงานว่า *Bacillus* สามารถใช้ในเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอนได้ถึง 70.5% ใช้ในไตรท์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนได้ 45.5% และอาจใช้ทั้งในไตรท์และในเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (Anaerobic respiration) ได้ 18.2% ซึ่ง *Bacillus* ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. azotoformans* และ *B. halodenitrificans* เป็นต้น เช่นเดียวกับ Sun และคณะ (2016) ที่ระบุว่า *B. licheniformis* สามารถในการผลิตก๊าซไนโตรเจนจากในเตรทในสถานะที่ไม่ใช้ออกซิเจน นั่นคือ *B. licheniformis* สามารถใช้ในไตรท์ หรือในเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอนเมื่อขาดออกซิเจนได้ ฉะนั้น จึงเจริญได้เมื่อมีออกซิเจน หรือมีแต่ในไตรท์ หรือในเตรทเท่านั้น และสามารถเจริญอยู่ได้เมื่อมีทั้งออกซิเจน และในเตรทรวมกัน โดยแบคทีเรียจะอาศัยสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน (Seenivasagan *et al.*, 2017)

1.2.10 การคัดเลือก *Bacillus* และประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนีย

Bacillus เป็นหนึ่งในแบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์น้ำ ควบคุมคุณภาพน้ำ เสริมการเจริญเติบโต และป้องกันโรค เนื่องจาก *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว สร้างเอนโดสปอร์ได้ คุณสมบัติดังกล่าวนี้สามารถทำให้แบคทีเรียสามารถมีชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลายได้มากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น (Kutako *et al.*, 2009) ปาจริย์ และคณะ (2554) พบว่า *Bacillus* สามารถใช้ขยับยั้ง หรือแย่งอาหาร และที่อยู่ของเชื้อ *Vibrio* sp. ในการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ในห้องปฏิบัติการได้ และมีการใช้ *Bacillus* เพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำจากการเลี้ยงกุ้ง ยกตัวอย่างเช่น *B. subtilis*, *B. licheniformis* และ *B. coagulans* เป็นต้น (Song *et al.*, 2011) ซึ่งการคัดเลือกเชื้อที่มีปัจจัยของสภาพแวดล้อมในการเก็บตัวอย่าง การคัดเลือกเชื้อ การเลี้ยงเชื้อ และการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อเป็นส่วนสำคัญโดยแบ่งได้ ดังนี้

1) การคัดเลือก *Bacillus* ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนีย

Bacillus พบได้ในตะกอนดิน น้ำ หรือสภาพแวดล้อมทางทะเล และสภาพแวดล้อมทั่วไป (Irianto and Austin, 2002) ดังนั้น การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถนำมาใช้ในการกำจัดแอมโมเนียในน้ำเสีย ควรคัดเลือกมาจากแหล่งน้ำเสีย หรือในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ซึ่งจะมีแนวโน้มในการพบ *Bacillus* ที่มีคุณสมบัติที่ต้องการมากกว่าคัดเลือกแบคทีเรียจากสภาพแวดล้อมในสถานะอื่น ๆ เนื่องจากมีปัจจัยของสิ่งแวดล้อมที่อาจส่งผลทำให้ *Bacillus* มีคุณสมบัติในการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพในการลดแอมโมเนียได้ดี และนำแบคทีเรียมาใช้ในการบำบัดแบบชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพ ยกตัวอย่างเช่น

การศึกษาของ Kim และคณะ (2005) พบว่า *Bacillus* sp. มีส่วนในกระบวนการ Nitrification–denitrification ในสภาวะมีอากาศ คัดแยกได้จากตัวอย่างดินในระบบบำบัดน้ำเสีย สามารถกำจัด NH_4^+ สูงสุด และมีผลผลิตของเซลล์ที่ค่า Dissolved oxygen 30% (ปริมาณ 8 mg/L) และ C/N ratio เท่ากับ 8 มี *Bacillus* 5 สายพันธุ์ที่โดดเด่นจากการศึกษา ได้แก่ *B. cereus* PK5, *B. subtilis* PK8, PK11, PK15 และ *B. licheniformis* PK16 โดย *B. subtilis* มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการ Nitrification (กำจัด NH_4^+) ขณะที่ *B. cereus* และ *B. licheniformis* มีผลต่อกระบวนการ Denitrification (ในระหว่างการเปลี่ยน NO_3^- เป็น N_2) ในเวลา 1 ชม. ความเข้มข้นของ NH_4^+ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับ TN (Total nitrogen) และปริมาณ COD ในโตรเจนที่หายไปมีประมาณ 33% ซึ่งคาดว่าเปลี่ยนไปเป็นก๊าซไนโตรเจน ประสิทธิภาพในการกำจัด NH_4^+ , TN, COD และ TP ในเวลา 4 ชม. คือ 72, 57.6, 89.5 และ 21.4% ตามลำดับ

Rajakumar และคณะ (2008) ศึกษาประสิทธิภาพของ *Pseudomonas* sp. KW1 และ *Bacillus* sp. YW4 ในการกำจัดไนเตรทในอาหารที่มีไนเตรทสังเคราะห์ พบว่า แหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดไนเตรท การเจริญเติบโต การแสดงออกของยีน และการใช้ไนโตรเจนของแบคทีเรีย Denitrifier โดยที่ *Pseudomonas* sp. KW1 และ *Bacillus* sp. YW4 ลดปริมาณไนเตรทได้สูงสุด 99.4 % ที่ pH 7 ในเวลา 48 ชม. ซึ่งมีแป้ง (Starch) ปริมาณ 1% ที่ผสมในอาหารที่มีไนเตรทสังเคราะห์เป็นแหล่งคาร์บอน ตามด้วยการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถลดปริมาณไนเตรทได้ 81.7% เกิดไนไตรท์ระหว่างการเลี้ยงเชื้อ 0.81 g/L และที่ pH 6, 7 และ 9 เกิดการสะสมของ NH_4^+ น้อยมาก อุณหภูมิที่ทำให้มีการเจริญเติบโตมากที่สุด คือ 30°C สามารถเจริญเติบโตได้ 8.4×10^5 CFU/mL ตามด้วยที่ 35°C เจริญเติบโตได้ 7.8×10^5 CFU/mL ซึ่ง pH ที่เหมาะสมในการกำจัดไนเตรทเท่ากับ 7.5 โดยกระบวนการกำจัดไนเตรทเกิดอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการเจริญเติบโตของเชื้อที่ใช้ไนเตรทเป็นแหล่งอาหาร เช่นเดียวกับรายงานของ Seenivasagan และคณะ (2017) ที่ศึกษาผลกระทบของแหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ และ pH ต่อประสิทธิภาพการลดไนเตรทของ *B. weinstephnisis* (DS45) ในอาหาร Mineral salt medium (MSM) ที่มีการผสมแป้ง 0.5% โดยคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างน้ำ และดินในบริเวณที่มีการปนเปื้อนไนเตรท พบว่า มีการลดของไนเตรทอย่างรวดเร็ว (83.05%) ที่ 35°C pH 7 ในเวลา 48 ชม. และมีการเกิดไนไตรท์ และ NH_4^+ ที่ pH 6–9 ซึ่งแบคทีเรีย Denitrifier จะมีความไวต่อค่า pH ที่ต่ำ

นอกจากนี้ Song และคณะ (2011) คัดแยก และจัดจำแนก Denitrifying *Bacillus* sp. YX-6 จากตัวอย่างน้ำ และตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้ง พบว่า *Bacillus* sp. YX-6 มีความคล้ายคลึงกับ *B. coagulans* และในการเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหนาแน่น ค่า DO และความเค็มเป็นปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดไนไตรท์ของ *Bacillus* เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตสามารถลดไนไตรท์จาก

10 mg–N/L เป็น 0 mg–/L ภายใน 14 ชม. ความสัมพันธ์ของ DO กับอัตราการย่อยสลายของไนโตรที่เพิ่มขึ้นจนถึง DO 5.8 mg/L หลังจากนั้นก็ค่อย ๆ ลดลง โดยมีอัตราการย่อยสลายสูงสุดที่ pH เท่ากับ 7 ซึ่งค่า pH ในช่วงกว้างจะส่งผลต่ออัตราการย่อยสลายไนโตรที่ได้ถึง 100% ที่ pH อยู่ในช่วง 5–9 ที่ 30°C และมีค่าความเค็มตั้งแต่ 0–15 ppt และอัตราการย่อยสลายไนโตรที่ลดลงเมื่อความเค็มเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ ความเค็มที่ความเข้มข้น 30 ppt ทำให้ *B. cereus* มีอัตราการย่อยเป็น 0 เมื่อเทียบกับ *Bacillus* sp. YX–6 ยังคงมีการย่อยได้ถึง 30% ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำทั้งในน้ำทะเลและน้ำจืด

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากสิ่งแวดล้อมที่เป็นแหล่งน้ำเสีย หรือระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำจะมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารภายในบ่อ พื้นดินตะกอน ซึ่งอาจจะเป็นส่วนอาหารที่เหลือจากสัตว์น้ำ สิ่งขับถ่าย หรือของเสียจากสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณดินพื้นบ่อจะมีปริมาณ และกิจกรรมของแบคทีเรียค่อนข้างสูง

2) การเพาะเลี้ยง และการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* ในการกำจัดแอมโมเนีย

เนื่องจาก *Bacillus* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Heterotroph ที่ต้องการอินทรีย์สารเป็นแหล่งของคาร์บอน และพลังงาน การเลี้ยงเชื้อจึงจำเป็นต้องหาแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบหลักให้เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ Kumari และ Kapoor (2008) กล่าวว่า อัตราส่วนของคาร์บอน และไนโตรเจน (C/N ratio) ตามปกติ เชลล์จุลินทรีย์มีค่า C/N ratio ประมาณ 10–15 นั่นคือเมื่อจุลินทรีย์ดูดสารอินทรีย์คาร์บอนเข้าไปใช้ในเซลล์ 10–15 หน่วย จะต้องใช้สารประกอบไนโตรเจน 1 หน่วย ซึ่งสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสำหรับการเจริญของ *Bacillus* ที่เหมาะสมโดยทั่วไปในสูตรอาหารเลี้ยงเชื่อนั้นมีส่วนประกอบ เช่น Beef extract และ Yeast extract เป็นต้น ที่เป็นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน

O-Thong และคณะ (2003) กล่าวว่า อาหารกึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ไนโตรในบ่อเลี้ยงกึ่งแบบหนาแน่นเสียได้ ซึ่งไนโตรเจนที่อยู่ในอาหารกึ่งมีมากถึง 81% แต่มีเพียง 21% เปลี่ยนไปเป็นเนื้อกึ่ง และอีกประมาณ 31% ยังคงตกค้างภายในบ่อเลี้ยง เมื่อมีการย่อยสลายเกิดขึ้นทำให้มีการปล่อยสารประกอบไนโตรเจน และฟอสฟอรัสออกมาเป็นจำนวนมาก (McIntosh *et al.*, 2001) เพื่อให้ได้แบคทีเรีย *Bacillus* ที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงคุณภาพน้ำ การนำมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์หรือน้ำเสียสังเคราะห์ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ เพราะทำให้ทราบถึงข้อมูลประสิทธิภาพของ *Bacillus* ในการกำจัดแอมโมเนียในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ซึ่งอาหารสังเคราะห์ และน้ำเสียสังเคราะห์สามารถกำหนดค่าสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) และ

ปริมาณของแอมโมเนีย ไนโตรที่ ไนเตรท และพารามิเตอร์อื่น ๆ ได้ (Chun *et al.*, 2012)

โดย Konohana และคณะ (2000) ได้ศึกษาการดูดซับเกลือแอมโมเนียม และไนเตรท ในสภาวะมีอากาศของ *B. licheniformis* No. 40-2 พบว่า *B. licheniformis* No. 40-2 การเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้น และเซลล์หยุดการเจริญเติบโตเมื่อไนเตรท และ NH_4^+ หายไปจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วน Lin และคณะ (2007) ได้คัดแยกเชื้อ Heterotrophic nitrifying *Bacillus* sp. strain 1 จากถังปฏิกรณ์ชีวภาพในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ พบว่า *Bacillus* sp. LY ที่คัดแยกได้มีประสิทธิภาพในการกำจัดไนโตรเจนทั้งหมด (TN) ได้ 80% (TN ในน้ำทิ้งประมาณ 9.41 mg-N /L) กำจัด COD ได้ 71.7% (COD ในน้ำทิ้งประมาณ 21.6 mg/L) และมีอัตราการกำจัด NH_4^+ ได้ 74.7% (NH_4^+ -N ในน้ำทิ้งประมาณ 45 mg-N /L)

Yang และคณะ (2011) คัดแยก *Bacillus subtilis* A1 ที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิด Enrichment ที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.7 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g และ สารละลาย Trace mineral 1 mL ในน้ำกลั่น 1 L (pH 7) พบว่า สามารถกำจัด NH_4^+ ในน้ำเสียระบบเปิดที่อัตราการกำจัด NH_4^+ เฉลี่ย 3.52 mg/L มี NH_4^+ เริ่มต้นที่ 104.12 ± 1.27 mg-N/L ซึ่งกำจัด NH_4^+ ได้ $20.4 \pm 2.7\%$ และพบการเกิดไนไตรท์ 0.003 ± 0.001 mg-N/L และไนเตรท 3.100 ± 0.085 mg-N/L เป็นเวลา 120 ชม. ส่วนการกำจัด NH_4^+ ภายใน 60 ชม. *B. subtilis* A1 สามารถกำจัดได้ $58.4 \pm 4.3\%$ ในขณะที่ Zhang และคณะ (2012) ศึกษากระบวนการ Heterotrophic nitrification-denitrification ภายใต้สภาวะมีอากาศของแบคทีเรีย L7 โดยแยกบนอาหาร 4 ชนิด ได้แก่ อาหาร Heterotrophic nitrification (HNM), Denitrification (DM), Nitrite denitrification (NDM) และ Hydroxylamine oxidation (HO) ที่มีการเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , NaNO_2 และ KH_2PO_4 ตามลำดับ พบว่า *B. methylotrophicus* L7 มีความสามารถในการลด NH_4^+ -N และ NO_2^- -N เฉลี่ย 51.58 mg/L/Day และ 5.81 mg/L/Day ตามลำดับ

Sheela และคณะ (2015) ศึกษาการเกิดปฏิกิริยา Simultaneous nitrification และ denitrification ในน้ำเสียของ *Bacillus* sp. SB1 ที่แยกได้จากน้ำเสียชุมชน พบว่า *Bacillus* sp. SB1 กำจัดแอมโมเนียได้ 72.7% ที่อุณหภูมิ 30°C และ pH 8 โดยมีความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นที่ 860 mg-N/L ซึ่ง *Bacillus* sp. SB1 สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นตั้งแต่ 10 g/mL และสามารถมีชีวิตอยู่ได้ถึง 96 ชม. โดยในการทดสอบการกำจัดแอมโมเนียใน Basal inorganic medium ที่มี Glucose เป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญ พบว่า *Bacillus* sp. SB1 กำจัดแอมโมเนียได้ 66.9% ในสัดส่วน C/N ratio เท่ากับ 10 ในเวลา 48 ชม. และใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน

ขณะที่ Huang และคณะ (2017) ศึกษาประสิทธิภาพของ *Bacillus* strain N31 ที่คัดแยกได้ในน้ำจากการเพาะเลี้ยงทางทะเลต่อการเป็น Halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification พบว่า มีประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนีย ไนโตรที่ และไนเตรทได้เท่ากับ 86.3%, 89.3% และ 89.4% ตามลำดับ (ปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 10–250 mg-N/L) ในเวลา 48 ชม. และนำ *Bacillus* N31 ไปใช้ในการเลี้ยงกุ้ง เพื่อทดสอบความเป็นโปรไบโอติกของเชื้อในปริมาณ 10^5 และ 10^8 CFU/mL ตามลำดับ ในไฟเบอร์กลาสก์ทรงคylinder ขนาด 80 L ที่มีความหนาแน่นของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) 30 ตัว เป็นเวลา 14 วัน พบว่า *Bacillus* N31 ไม่มีการสร้างสารพิษต่อกุ้ง สามารถหลั่งสาร Exoenzymes และสารต้านจุลชีพอื่นออกมาได้ (Liang *et al.*, 2015)

1.2.11 ปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของ *Bacillus*

การจัดการคุณภาพน้ำ และสิ่งแวดล้อมให้เหมาะสมเพื่อให้เกิดสภาพที่สมดุล ส่วนใหญ่มักใช้ในการจัดการบ่อเลี้ยง ได้แก่ ปรับสภาพดิน และน้ำ ลดแอมโมเนีย ไนโตรที่ และไนเตรท ในสภาวะต่าง ๆ ของแหล่งน้ำ ซึ่งเป็นของเสียที่มีความสำคัญ และส่งผลกระทบต่อสัตว์น้ำ ลดก๊าซที่เป็นพิษในน้ำ ซึ่งเป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสารอินทรีย์ตกค้างที่ต้องการกำจัดให้ลดน้อยลง (ชงชัย, 2544; สุวรรณ, 2549) โดยมีปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของ *Bacillus* ดังนี้

1) ค่าสัดส่วนไนโตรเจนต่อคาร์บอน (C/N ratio)

ค่า C/N ratio ทำให้ความสามารถในการเจริญเติบโต และการกำจัดแอมโมเนียของ *Bacillus* แตกต่างกัน โดยในอาหารเลี้ยงเชื่อนั้น สัดส่วน C/N ratio จะอยู่ในช่วงประมาณ 4–8 (Kim *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2012) โดยแหล่งคาร์บอนมีผลต่อกระบวนการ Heterotrophic nitrification แหล่งคาร์บอนที่สำคัญในอาหารสังเคราะห์ (Synthetic medium) คือ Sodium succinate และ Glucose (Rajakumar *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012) นอกจากนี้ยังมีแหล่งคาร์บอนอินทรีย์ที่สามารถหาได้ง่าย ราคาถูก เช่น น้ำตาล กากน้ำตาล หรือแป้ง นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และมีออกซิเจนที่เพียงพอ ก็จะสามารกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ Kutako และคณะ (2009) กล่าวว่า *Bacillus* ที่มีการเพิ่มจำนวนในช่วงของการเจริญเติบโต ส่งผลให้เกิดการลดลงของแอมโมเนียในน้ำได้ โดยการนำแอมโมเนีย-ไนโตรเจนเข้าไปสะสมเป็นส่วนประกอบของเซลล์ (Nitrogen assimilation) จากการศึกษาของ Chen และคณะ (2003) และ Khardenavis และคณะ (2007) พบว่า ประสิทธิภาพของแบคทีเรียจะแปรผัน หรือแปรผกผันตามอัตราส่วนของ C/N ที่เพิ่มขึ้น โดยประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูงสุด เมื่อมีอัตราส่วน C/N น้อยกว่า 10 อุณหภูมิที่ 25–35 °C และภายใต้ค่า pH 6–8

2) ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved Oxygen)

ออกซิเจนละลายน้ำแปรผันตรงกับอัตราการย่อยสลายสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ รวมถึงความสามารถในการลดแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทของเชื้อ ทั้งนี้ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่เหมาะสมควรมากกว่า 5 mg/L (Song *et al.*, 2011; Rout *et al.*, 2017) Song และคณะ (2011) พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างค่า DO กับไนไตรท์ ของ Aerobic denitrifying *Bacillus* sp. สายพันธุ์ YX-6 จะเพิ่มมากขึ้น เมื่อมีค่า DO อยู่ในช่วง 5.8 mg/L และหลังจากนั้นค่อย ๆ ลดลงใน 14 ชม. สอดคล้องกับการรายงานของ Rout และคณะ (2017) ที่ทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* GS-5 พบว่า ความเข้มข้นของ DO ที่เพิ่มขึ้น ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus cereus* GS-5 และการกำจัดแอมโมเนียมีค่าเพิ่มขึ้น 60–96% สามารถลดไนไตรท์ได้ 82% และสามารถลดไนเตรทได้ 94% เมื่อเพิ่มความเร็วในการเขย่าอาหารเลี้ยงเชื้อ

3) ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

กรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus* อยู่ในช่วง 5–7 โดยพบว่า *Bacillus weinstephnisis* (DS45) ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH 7 มีการเจริญเติบโตสูงสุด และมีการเจริญเติบโตต่ำสุดที่ pH 9 ในเวลา 84 ชม. และที่ pH 7 อุณหภูมิ 35 °C พบว่า *Bacillus* DS45 สามารถลดไนเตรทจาก 100 mg-N /L เหลือ 16.23 mg-N /L (83.77%) ส่วนในกรณีที่มีค่า pH 5, 6, 8 และ 9 การลดลงของไนเตรทเท่ากับ 58.54%, 56.90%, 68.42% และ 55.25% ตามลำดับ โดยไนไตรท์ (0.918 mg/L) และ NH_4^+ (7.82 mg/L) ถูกตรวจพบที่ pH 7 หลังจาก 24 ชม. (Seenivasagan *et al.*, 2017)

4) ความเค็ม (Salinity)

ความเค็มช่วง 0–30 ppt เป็นช่วงที่ *Bacillus* สายพันธุ์ทนเค็มสามารถเจริญเติบโต และลดแอมโมเนียได้ดี Zhang และคณะ (2012) อ้างถึง Mevel และ Prieur (2000) ว่า *B. methylotrophicus* สายพันธุ์ L7 ที่เป็น Halotolerant bacteria มีความสามารถในการลดแอมโมเนียได้มากกว่า 58.70% โดยมีความเค็มอยู่ในช่วง 0–30 g/L NaCl (0–30 ppt) ซึ่งคุณลักษณะในการทนเค็มนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการบำบัดน้ำเสียที่มีความเค็มต่ำ หรือน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงที่มีความเค็มสูงได้

5) อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 25–30°C (Rajakumar *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Seenivasagan *et al.*, 2017) จากการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดไนเตรทของกลุ่มแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. KW1 และ *Bacillus* sp. YW4 พบว่า แบคทีเรียสามารถลดไนเตรทได้ 99.4% ที่อุณหภูมิ 30°C ที่ 48 ชม. และที่อุณหภูมิ 25, 35, 40 และ 45°C การลดไนเตรทมีเพียงประมาณ 48.2, 65, 34 และ 30% ตามลำดับ (Rajakumar *et al.*, 2008)

6) ความเข้มข้นของไนไตรท์ และแอมโมเนีย

ความเข้มข้นของไนไตรท์ และแอมโมเนีย หากมีปริมาณสูงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Bacillus* ได้ เช่นเดียวกับความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียที่สูงในน้ำเสีย ทั้งนี้ ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียเป็นสิ่งที่เลี่ยงไม่ได้ที่จะเจอไนไตรท์ที่สะสมอยู่ในน้ำ หรือแม้แต่ค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียอิสระที่สูง ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานในกระบวนการ Oxidation ของจุลินทรีย์ (Zhang *et al.*, 2012)

7) ความเข้มข้นของเซลล์ต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ความเข้มข้นของเซลล์มีผลต่อการลดแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทที่ต่างกัน (Zokaeifar *et al.*, 2014; Sheela *et al.*, 2015) การใช้ *Bacillus* ในระบบการเลี้ยงจะต้องควบคุมการเจริญเติบโตของ *Bacillus* เนื่องจากการเพิ่มจำนวน และการตายอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียในน้ำเพิ่มขึ้น และเป็นพิษต่อสัตว์น้ำที่เลี้ยง เซลล์ *Bacillus* ที่มีปริมาณเกินไปทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดต่ำลงได้ (กฤษณา และคณะ, 2557)

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. คัดแยก และจัดจำแนกชนิดของ *Bacillus* ทนเค็มที่มีความสามารถในการบำบัดสารอนินทรีย์ในโตรเจน
2. ศึกษาประสิทธิภาพของ *Bacillus* ในการบำบัดสารอนินทรีย์ในโตรเจนในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งทะเล

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

2.1 วัสดุ

2.1.1 ตัวอย่างดิน และตัวอย่างน้ำ

1. ตัวอย่างดิน และตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำเสียจากชุมชนหาดปากเมง ตำบลไม้ฝาด อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง
2. ตัวอย่างดิน และตัวอย่างน้ำจากป่าชายเลนบริเวณหาดปากเมง ตำบลไม้ฝาด อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง
3. ตัวอย่างดิน และตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง ตรัง
4. ตัวอย่างดิน และตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง ตรัง
5. ตัวอย่างน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) อำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช

2.1.2 สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และชีวเคมีของแบคทีเรีย
3. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบคทีเรียด้วยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุล
3. สารเคมีสำหรับทดสอบการออกซิโดซ์แอมโมเนีย และการย่อยไนโตรเจน
4. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์แอมโมเนีย
5. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ไนโตรเจน
6. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ไนเตรต
7. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ออร์โธโรฟอสเฟต

2.1.2 วัสดุสำหรับเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์

1. อาหารเม็ดสำเร็จรูปแบบจมสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ยี่ห้อ NANAMI3 (Thai Union Feedmill CO., LTD) ประกอบด้วย ปลาป่น ทุ่นา เพสท์ แป้งข้าวสาลี ปลายข้าว กากถั่วเหลือง น้ำมันปลา เรซินดิน วิตามิน แร่ธาตุ และสารถนอมคุณภาพอาหารสัตว์ คุณค่าทางด้านอาหารของกุ้ง ได้แก่ โปรตีนไม่น้อยกว่า 35% ไขมันไม่น้อยกว่า 5% กากไม่มากกว่า 4% และความชื้นไม่มากกว่า 11% เหมาะสำหรับกุ้งขนาด 1–3 g ใช้อาหารกุ้งปริมาณ 1.164 g/L (องค์ประกอบของปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.065%) มาละลายในน้ำทะเลต่อปริมาตร 1 L
2. น้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 20 L สำหรับผสมในการทำน้ำเสียสังเคราะห์

2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร NB (Nutrient broth)
2. อาหาร NA (Nutrient agar)
3. อาหาร HNM (Heterotrophic nitrification medium)
4. อาหาร NDM (Nitrite denitrification medium)
5. อาหาร DM (Denitrification medium)

2.2 อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างน้ำและดิน
ได้แก่ ถุงซิปลสำหรับเก็บตัวอย่าง กระบอกเก็บตัวอย่างน้ำ ท่อพีวีซี (Core) สำหรับเก็บตัวอย่างดิน และขวดเก็บตัวอย่างน้ำ ขนาด 1,000 mL
2. อุปกรณ์เตรียมอาหาร และการคัดแยกเชื้อ *Bacillus*
ได้แก่ ตู้เย็น ตู้อบ (Hot air oven, Binder, FED 53, USA) หม้อนึ่งแรงดันไอ (Autoclave) ตู้บ่ม (Incubator) ตู้บ่มแบบเขย่า (Incubator shaker) ปิเปตอัตโนมัติ (Automatic pipette, Repetman[®] Gilson, Inc; USA, Eppendorf Research[®] plus, Eppendorf AG; USA) ขนาด 1,000 และ 200 μ L ไมโครปิเปตทิป (Micropipette Tip) ขนาด 10, 200 และ 1,000 μ l เครื่องชั่งน้ำหนัก 2 ตำแหน่ง (AND, FX-2000i) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) และอุปกรณ์เครื่องแก้ว เช่น ขวด Duran ขนาด 500 mL กระบอกตวง ขนาด 500 mL จานเพาะเชื้อ ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 mL หลอดทดลอง ขนาด 15 และ 27 mL เป็นต้น

3. อุปกรณ์ทดสอบเชื้อทางกายภาพและชีวเคมี

ได้แก่ ปากกิบ ห่วงเขี่ยเชื้อ แผ่นสไลด์ ตะเกียงแอลกอฮอล์ กระจาดยกรอง หลอดทดลอง ขวดรูปชมพู่ หลอดหยด (Dropper) กล้องจุลทรรศน์แบบประกอบ (Compound microscope) และตู้บ่มแบบเขย่า (Incubator shaker)

4. อุปกรณ์สำหรับทดสอบประสิทธิภาพการออกซิไดซ์แอมโมเนีย การออกซิไดซ์ไนไตรท์ และรีดิวซ์ไนเตรท

ได้แก่ อุปกรณ์สำหรับเลี้ยงเชื้อ เช่น จานเพาะเชื้อ หลอดทดลอง ขวดรูปชมพู่ ขวดแก้ว บีกเกอร์ และกระบอกตวง เป็นต้น สายยางออกซิเจน ซิลิโคน เครื่องซั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ Denver instrument) และปั๊มออกซิเจน (Air pump)

5. อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

ได้แก่ เครื่องผสมสาร (Vortex mixer, Vertex genie-2™, USA) หลอดพลาสติก (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 และ 50 mL ปิเปตอัตโนมติ ปริมาตร 20 100 200 และ 1,000 μ L เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Beckman, Avanti™ 30 centrifuge, USA) เครื่อง DNA thermal cycle (PTC 1148C, MJ Mini™ Thermal, USA) เครื่องอิมัลชัน โคร โพรซิส (Mupid® -exu, Japan) เครื่อง Geldoc (Molecular Imager® Gel Doc™ XR⁺ with Image Lab™ Software; BioRed, USA) และอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

6. อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ และตรวจวัดคุณภาพน้ำ

ได้แก่ เครื่องมือวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO meter, Cyber scan, Waterproof series®) เครื่องวัดความเค็ม (Salinometer, ATAGO, MASTER-S/MillM) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, EUTECH, Cyber scan pH 1500) เครื่องวัดความนำไฟฟ้า (Conductivity Meter, HANNA, Dist 3) เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer) เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge, Hettich, Universal 32 R) เครื่องซั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ตู้อบ (Hot air oven) เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Shimadzu UV-1201™) โถดูดความชื้น (Desiccator) คอลัมน์สำหรับการวิเคราะห์ไนเตรท พร้อมขวดตั้ง ปิเปต ขนาด 1 2 5 และ 10 mL ขวดรูปชมพู่ ขนาด 150 และ 250 mL ขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 100 500 และ 1,000 mL กระบอกตวง ขนาด 10 25 50 และ 100 mL หลอดทดลองแบบฝาเกลียว ขนาด 27 mL และแบบมีฝาปิด ขนาด 10 mL บีกเกอร์ ขนาด 50 100 250 600 และ 1,000 mL และกระจาดยกรอง Whatman GF/C

7. อุปกรณ์สำหรับเก็บ และปัมน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งทะเล

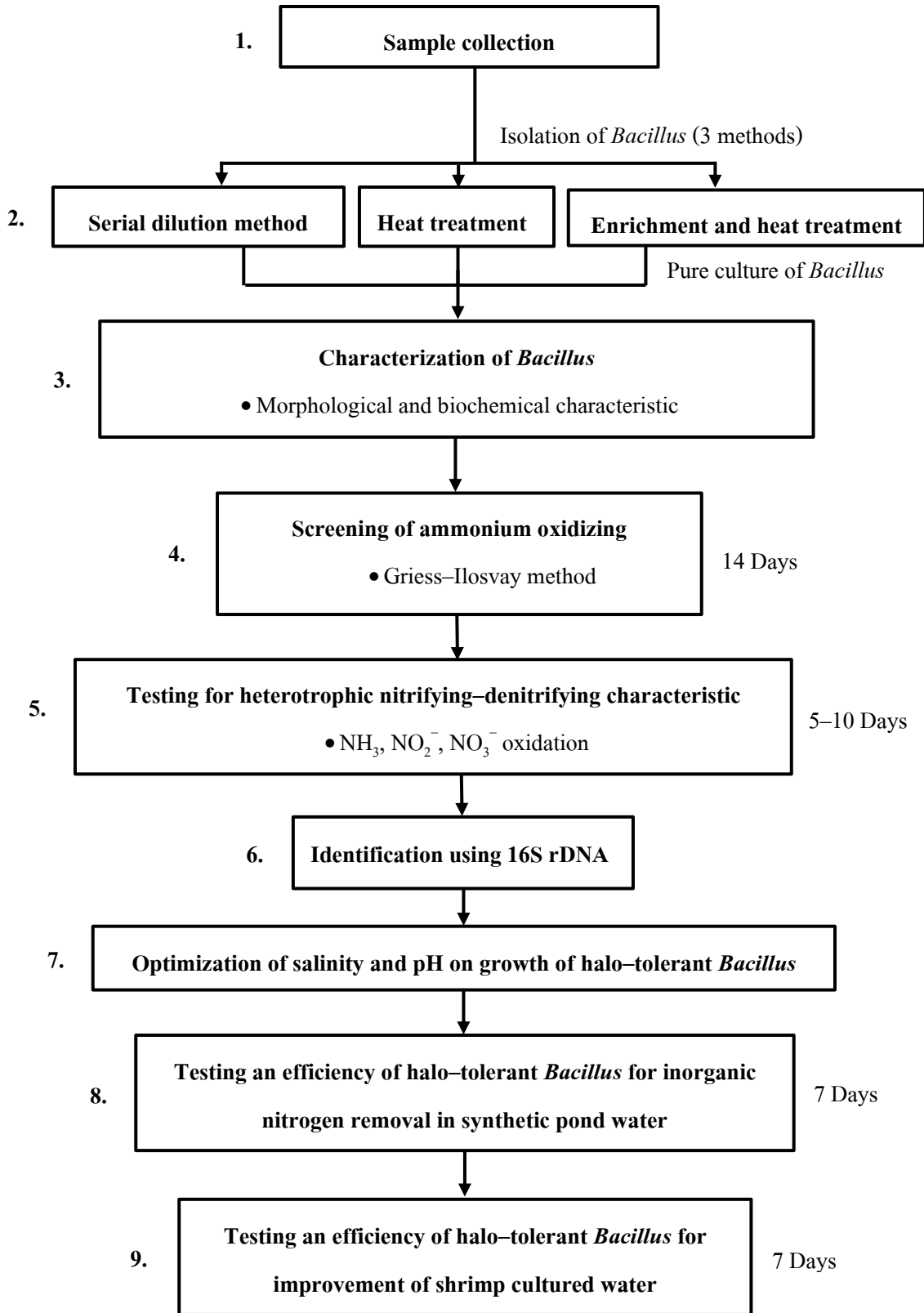
ได้แก่ ปั๊มออกซิเจน (Air pump) สายยางออกซิเจน ท่อลม หัวทราย ถังน้ำ ถังไฟเบอร์กลาสก์ขนาด 500 mL ขวดโหล ขนาด 5 L และถังน้ำพลาสติกมีฝาปิด ขนาด 100 L

2.3 วิธีการศึกษา

ระเบียบวิธีการศึกษา

ทำการศึกษาใน 9 ขั้นตอน (ภาพที่ 5) คือ

1. การเก็บตัวอย่างดิน และตัวอย่างน้ำ
2. นำตัวอย่างที่ได้มาคัดแยกด้วย 3 วิธี คือ Serial dilution method, Heat treatment และ Enrichment and heat treatment
3. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อเป็นการคัดแยกแบคทีเรียที่ไม่ใช่ *Bacillus* ออกไป
4. ทดสอบการออกซิไดซ์แอมโมเนีย และการย่อยไนโตรที่เบื้องต้น โดยวิธี Griess-Ilosvay method
5. ทดสอบคุณสมบัติของ *Bacillus* ต่อการเป็น Heterotrophic nitrifying–denitrifying bacteria
6. นำ *Bacillus* ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวมาจัดจำแนกชนิดด้วยเทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุล
7. ศึกษาผลของความเค็ม และ pH เพื่อให้ได้ *Bacillus* ทนเค็ม เหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงกุ้งทะเล
8. นำไปทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนินทรีย์ในโตรเจนในน้ำเสียสังเคราะห์ เพื่อให้ได้ *Bacillus* ที่มีประสิทธิภาพสูงต่อการบำบัดสารอนินทรีย์ในโตรเจน
9. นำไปทดสอบประสิทธิภาพสำหรับการบำบัดสารอนินทรีย์ในโตรเจนในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งทะเล



ภาพที่ 5 แผนภาพขั้นตอนการทดลอง

2.3.1 การเก็บตัวอย่าง และการคัดแยก *Bacillus*

เก็บตัวอย่างน้ำ และดินบริเวณแหล่งน้ำเสียชุมชนหาดปากเมง ป่าชายเลนหาดปากเมง บ่อเลี้ยงปลากระพง และบ่อเลี้ยงกุ้งขาว ตำบลไม้ฝาด อำเภอเสเกา จังหวัดตรัง ซึ่งตัวอย่างน้ำเก็บด้วยกระบอกที่ระดับความลึก 25 cm และใส่ลงในขวดบรรจุขนาด 1 L ส่วนตัวอย่างดิน ทำการเก็บตัวอย่างโดยใช้ท่อพีวีซี (Corer) ที่ระดับความลึก 5 cm จากพื้นผิว (Donio *et al.*, 2013) และเก็บในถุงซิปล็อก เก็บรักษาตัวอย่างน้ำ และดินลงในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็ง เพื่อนำมาคัดแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ

2.3.2 การคัดแยก *Bacillus*

การคัดแยก *Bacillus* ได้คัดแยก 3 วิธี ดังนี้

1) วิธีเจือจางตัวอย่าง (Serial dilution method)

นำตัวอย่างดิน 1 g หรือตัวอย่างน้ำ 1 mL ของแต่ละที่มาเจือจางในน้ำเกลือ (2% NaCl) ปริมาตร 9 mL ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-1} – 10^{-6} แล้วนำสารละลายตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.1 mL มา spread บนอาหารแข็ง NA (2% NaCl) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24–48 ชม. คัดเลือกโคโลนีเพื่อทำการแยก *Bacillus* ต่อไป

2) วิธีให้ความร้อน (Heat treatment) (Zhao *et al.*, 2017)

นำตัวอย่างดิน 1 g หรือตัวอย่างน้ำ 1 mL ของแต่ละที่มาเจือจางในน้ำเกลือ (2% NaCl) ปริมาตร 9 mL ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-1} – 10^{-6} นำหลอดทดลองตัวอย่างมาแช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80°C ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ นาน 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำอุณหภูมิห้องทันที แล้วนำสารละลายตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นมา spread บนอาหารแข็ง NA (2% NaCl) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24–48 ชม. คัดเลือกโคโลนีเพื่อทำการแยก *Bacillus* ต่อไป

3) วิธีเพิ่มจำนวนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อและให้ความร้อน (Enrichment and heat treatment)

นำตัวอย่างดิน 1 g หรือตัวอย่างน้ำ 1 mL ของแต่ละที่มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB (2% NaCl) ปริมาตร 100 mL บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อ นาที นาน 4 วัน เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ จากนั้นนำมาเจือจางในน้ำเกลือ (2% NaCl) ปริมาตร 9 mL ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-1} – 10^{-6} นำหลอดทดลองที่เจือจางตัวอย่างมาแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 80°C ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ นาน 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำอุณหภูมิห้องทันที แล้วนำ

สารละลายตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นมา spread บนอาหารแข็ง NA (2% NaCl) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24–48 ชม. คัดเลือกโคโลนีเพื่อทำการแยก *Bacillus* ต่อไป

2.3.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี

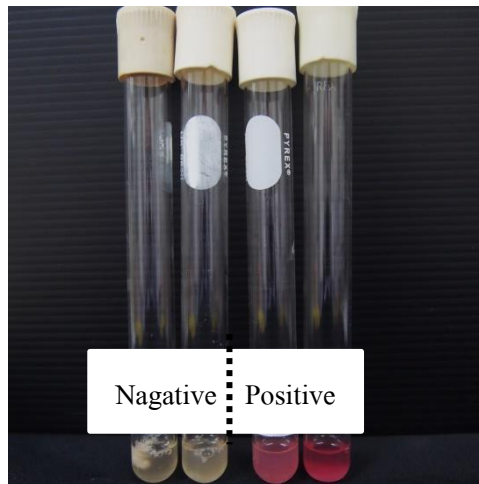
แยก *Bacillus* จากโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จากการคัดแยกแบคทีเรียทั้ง 3 วิธีจากหัวข้อ 2.3.2 ข้างต้น โดยแยกโคโลนีที่มีลักษณะที่แตกต่างกัน เช่น ขอบหยัก นูน มีความหนืด สีขาวครีม ผิวหน้ามันวาว เป็นต้น (Zhao *et al.*, 2017) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (2% NaCl) ด้วยวิธีการ Streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24–48 ชม. ทำการ Streak plate ซ้ำจนได้เป็นโคโลนีเดี่ยว ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อด้วยการย้อมสีแกรม เพื่อศึกษารูปร่างของเซลล์ โดยใช้ชุดย้อมแกรม ศึกษาการสร้างเอนโดสปอร์ โดยใช้ชุดสีย้อมสปอร์ และนำเฉพาะแบคทีเรียที่เป็นแกรมบวกทั้งที่เห็นและไม่เห็นการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ไปทำการทดสอบทางชีวเคมี โดยการทดสอบหลัก ๆ คือ Catalase test ต้องให้ผลเป็นบวก ส่วน Oxidase test ต้องให้ผลเป็นลบ (ดวงพร, 2537)

การเลี้ยงเชื้อให้บริสุทธิ์และการเก็บ Stock เชื้อที่คัดแยกได้

นำเชื้อที่ได้หลังจากศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี เก็บเป็น Stock เชื้อ โดยแยกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหาร NB (2% NaCl) ปริมาตร 5 mL ต่อหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าเป็นวงกลม ด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที นาน 16–18 ชม. จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 600 μ L ใส่ลงหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 mL ผสมกับ 50% กลีเซอรอลปราศจากเชื้อปริมาตร 400 μ L เก็บที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อเก็บรักษาเซลล์ไว้ศึกษาต่อไป

2.3.4 การทดสอบการออกซิไดซ์แอมโมเนียและการย่อยไนไตรท์ โดยวิธี Griess–Ilosvay method

นำเชื้อที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2% แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5% ปริมาตร 50 mL ต่อพลาสติก บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที นาน 14 วัน ทำการทดสอบการออกซิไดซ์แอมโมเนีย และไนไตรท์ทุก ๆ วัน ด้วยวิธี Griess–Ilosvay method (Lin *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012) โดยนำเชื้อที่เลี้ยงข้างต้นมาใส่ในหลอดทดลองใหม่ปริมาตร 2 mL ต่อหลอดทดลอง แล้วจึงหยด Nitrite reagent จำนวน 5–7 หยดลงในตัวอย่าง หากให้ผลเป็นสีแดงภายใน 1 นาที แสดงผลเป็นบวก แปลความได้ว่ามีกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนีย และไนไตรท์ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ผลการทดสอบด้วย Nitrite reagent เมื่อแสดงผลเป็นลบ (ไม่มีการเปลี่ยนเป็นสีแดง) แสดงผลเป็นบวก (มีการเปลี่ยนเป็นสีแดง)

2.3.5 การทดสอบคุณสมบัติของ *Bacillus* ต่อการเป็น Heterotrophic nitrifying–denitrifying bacteria

นำเชื้อที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB (2% NaCl) ปริมาตร 10 mL ต่อหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที นาน 24 ชม.

1) การทดสอบความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย

ถ่ายเชื้อปริมาตร 1.8 mL ที่เลี้ยงในอาหาร NB (2% NaCl) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ HNM ((NH₄)₂SO₄ 0.66 g, Sodium succinate 4.72 g, KH₂PO₄ 0.50 g, Na₂HPO₄ 0.50 g, MgSO₄·7H₂O 0.20 g, NaCl 30 g) pH 7.5 ปริมาตร 180 mL (จำนวน 3 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที นาน 5 วัน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปตกตะกอนเซลล์ ด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที (Zhang *et al.*, 2012) และเก็บเฉพาะของเหลวส่วนใสไปวิเคราะห์ทางเคมีดังตารางที่ 9

2) การทดสอบความสามารถในการออกซิไดซ์ไนไตรท์

ถ่ายเชื้อปริมาตร 1.8 mL ที่เลี้ยงในอาหาร NB (2% NaCl) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NDM (NaNO₂ 0.28 g, Sodium succinate 3.16 g, MgSO₄·7H₂O 0.20 g, CaCl₂ 0.01 g, EDTA 0.07 g, KH₂PO₄ 0.50 g, Na₂HPO₄ 0.50 g, FeSO₄ 0.01 g) pH 7.5 ปริมาตร 180 mL (จำนวน 3 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที นาน 5 วัน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

(Zhang *et al.*, 2012) และเก็บเฉพาะของเหลวส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนและไนเตรต ดังตารางที่ 9

3) การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรต

ถ่ายเชื้อปริมาตร 1.8 mL ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงใน NB (2% NaCl) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ DM (KNO₃ 1.00 g, Sodium succinate 4.68 g, MgSO₄·7H₂O 0.20 g, CaCl₂ 0.01 g, EDTA 0.07 g, KH₂PO₄ 0.50 g, Na₂HPO₄ 0.50 g, FeSO₄ 0.01 g) pH 7.5 ปริมาตร 180 mL (จำนวน 3 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที นาน 5 วัน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปตกตะกอนเซลล์ ด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที (Rajakumar *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012) และเก็บเฉพาะของเหลวส่วนใสไปวิเคราะห์หาไนเตรตและไนโตรเจน ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี

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

2.3.6 การจัดจำแนกชนิดของ *Bacillus* ด้วยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุล

สกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ด้วย Genomic DNA minikit (Geneaid) และทำการศึกษาลำดับของแบคทีเรียโดยใช้ยีน 16S rDNA โดยใช้ primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') ในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ จากนั้นทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์โดยใช้ GF-1 AmbiClean Kit (PCR/Gel) (Vivantis) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการส่งวิเคราะห์ที่สถานวิจัยจีโนม และชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับค่าความคล้ายคลึงด้วย BLAST program ในฐานข้อมูล GenBank/EMBL/DDBJ database (Altschul *et al.*, 1990) ถ้าค่าความคล้ายคลึงอยู่ในช่วง 93–98% เป็นไปได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นั้นอาจเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ (New species) หากค่าความคล้ายคลึงมีค่าต่ำกว่า 92% มีความเป็นไปได้สูงกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นั้นอาจจะเป็นแบคทีเรียสกุลใหม่ (Novel genus) (Stackebrandt and Goebel, 1994) จากนั้นวิเคราะห์ลำดับวิวัฒนาการของเชื้อจากแผนภูมิวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013)

2.3.7 การศึกษาความเค็ม และ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus*

นำเชื้อ *Bacillus* ที่มีคุณสมบัติเป็น Heterotrophic nitrifying–denitrifying bacteria มาศึกษาความเค็ม และ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

1) การศึกษาความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4% ตามลำดับ ปริมาตร 50 mL ต่อฟลasks บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที นาน 24 ชม. จากนั้นนำมาวัดค่าการเจริญเติบโตของเชื้อที่ OD 600_{nm} ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

2) การศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ (จากผลการศึกษาในวงเล็บ 1) พร้อมปรับ pH ให้มีค่า 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10 และ 10.5 ตามลำดับ (Song *et al.*, 2011; Seenivasagan *et al.*, 2017) ปริมาตร 50 ml ต่อฟลasks บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที นาน 24 ชม. จากนั้นนำมาวัดค่าการเจริญเติบโตของเชื้อที่ OD 600_{nm} ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

3) กราฟการเจริญเติบโตของ *Bacillus* (Calibration Curve)

นำ *Bacillus* แต่ละชนิด (เชื้อที่มีประสิทธิภาพดีในกระบวนการ Nitrification–denitrification) มาสร้างกราฟมาตรฐานการเจริญเติบโต โดยเลี้ยง *Bacillus* ในอาหาร NB (2% NaCl) ปริมาตร 50 mL ต่อฟลasks บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที นาน 24 ชม. ทำ 10–fold dilution ด้วยน้ำกลั่นที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2% จากนั้นนำมาวัดค่าการเจริญเติบโตของเชื้อที่ OD 600_{nm} ด้วยเครื่อง Spectrophotometer และนำเชื้อในแต่ละความเข้มข้นมา spread ให้ทั่วผิวน้ำอาหาร NA ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บ่มที่ 24 ชม. นับจำนวนและคำนวณโคโลนี (วารกรณ์ และสุตฤดี, 2553)

2.3.8 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* ในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำเสียสังเคราะห์

1) การเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ (Synthetic wastewater)

เตรียมน้ำเสียสังเคราะห์จากการเลี้ยงกึ่งทะเลให้มียังค์ประกอบคล้ายกับน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกึ่งทะเลจริงที่ได้มีการตรวจวิเคราะห์ และทำการดัดแปลงจากวิธีของ O-Thong และคณะ (2003) และ Zokaifar และคณะ (2014) โดยใช้ น้ำทะเลที่มีการเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05 g/L, KNO_3 0.00203 g/L, NaNO_2 0.026 g/L และอาหารเม็ดสำเร็จรูปแบบจมสำหรับเลี้ยงกุ้ง 1.164 g/L (ไนโตรเจนเท่ากับ 0.065%) ในปริมาตรน้ำทะเล 1 L ทำการปรับ pH ให้มีค่า 7.0 (Rajakumar *et al.*, 2008)

2) การเตรียมกล้าเชื้อ *Bacillus*

นำ *Bacillus* ที่มีคุณสมบัติเป็น Heterotrophic nitrifying–denitrifying มาเลี้ยงในอาหาร NB (2% NaCl) ปริมาตร 10 mL ต่อหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที นาน 24 ชม. ทำการขยายเชื้อที่มีปริมาณเชื้อ 10^8 CFU/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 500 mL

3) การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus*

ทำการฆ่าเชื้อน้ำเสียสังเคราะห์ ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาทีด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอ (Autoclave) แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง จำนวน 3 ซ้ำ คือ ชุดทดลองแบบไม่ให้อากาศ (ทำในพลาสติก เขย่าด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที) และชุดทดลองแบบให้อากาศ (ทำในขวดแก้วสำหรับทดลองให้อากาศด้วยการเติมอากาศจากท่อลม) (ภาพที่ 7)

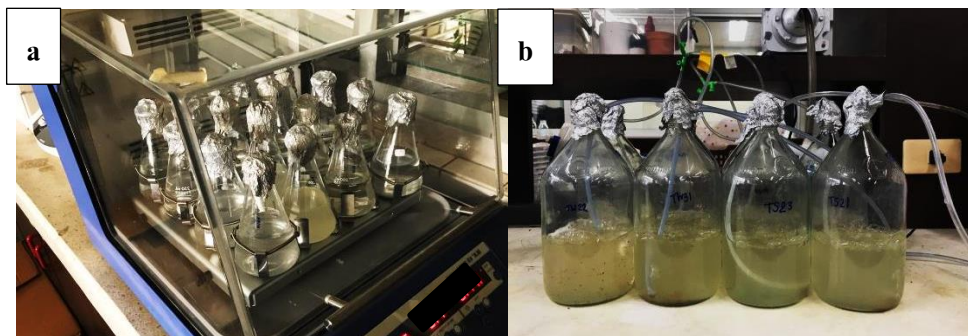
ชุดควบคุมในชุดทดลองแบบไม่ให้อากาศ ประกอบด้วย น้ำเสียสังเคราะห์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 160 mL/พลาสติก และไม่มีการกล้าเติมเชื้อ *Bacillus*

ชุดทดลองแบบไม่ให้อากาศ ประกอบด้วย น้ำเสียสังเคราะห์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 160 mL/พลาสติก และกล้าเชื้อ *Bacillus* อัตราส่วน 1% (1.6 mL) และ 5% (8 mL) (v/v)

ชุดควบคุมในชุดทดลองแบบให้อากาศ ประกอบด้วย น้ำเสียสังเคราะห์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 600 mL/ขวดแก้ว และไม่มีการกล้าเติมเชื้อ *Bacillus*

ชุดทดลองแบบให้อากาศ ประกอบด้วย น้ำเสียสังเคราะห์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 600 mL/ขวดแก้ว และกล้าเชื้อ *Bacillus* อัตราส่วน 1% (6 mL) และ 5% (30 mL) (v/v)

โดยทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน ซึ่งจะแบ่งทำการทดสอบโดยเริ่มจากทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* ในชุดทดลองแบบไม่ให้อากาศก่อน ตามด้วยทำการทดสอบในชุดทดลองแบบให้อากาศ โดยเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ในวันที่ 0 ของการทดลอง ในอัตราส่วน (v/v) สำหรับทดสอบปริมาณที่เหมาะสมในการใช้ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ (Sangnoi *et al.*, 2017) และทำการศึกษาประสิทธิภาพของ *Bacillus* ในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์โดยวิเคราะห์ค่าแอมโมเนีย ไนโตรท์ และไนเตรทในวันที่ 0, 4 และ 7 ดังตารางที่ 9



ภาพที่ 7 ชุดการทดลองทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนของ *Bacillus* (a) ชุดทดลองแบบไม่ให้อากาศ (b) ชุดทดลองแบบให้อากาศ ในน้ำเสียสังเคราะห์

2.3.9 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* สำหรับการบำบัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งทะเล

1) การเตรียมกล้าเชื้อ *Bacillus*

นำ *Bacillus* จากการทดลองในข้อ 2.3.8 ที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนมาเลี้ยงในอาหาร NB (2% NaCl) ปริมาตร 10 mL ต่อหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที นาน 24 ชม. ปิเปิดกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาตร 5 ml ที่มีปริมาณเชื้อ 10^8 CFU/ml มาขยายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 500 mL

2) การเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งทะเล

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เฉพาะบ่อที่มีการเลี้ยงกุ้งในระยะสุดท้ายก่อนจับเพื่อจำหน่าย โดยใช้ถังเก็บน้ำที่มีฝาปิดขนาด 40 L รองรับน้ำทิ้งผ่านท่อระบายน้ำบริเวณข้างบ่อเลี้ยงให้เต็มภาชนะ ปิดฝาให้สนิท และนำน้ำมาทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำในพารามิเตอร์ แอมโมเนีย ไนโตรท์ และไนเตรท ในห้องปฏิบัติการทันที เพื่อให้ทราบถึงข้อมูลของค่าแอมโมเนีย ไนโตรท์ และไนเตรทในน้ำทิ้งเริ่มต้น ดังตารางที่ 9

3) การเตรียมน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งทะเล

นำน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) (จากในวงเล็บ 2) มาทำการพักเป็นเวลา 3 วัน พร้อมทั้งให้อากาศตลอดระยะเวลาการบ่ม เนื่องจากต้องการให้คุณภาพน้ำ โดยเฉพาะค่าแอมโมเนีย และไนโตรเจน มีปริมาณความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น และทำให้คุณภาพน้ำทิ้งต่ำลง ซึ่งจะมีค่าเกินมาตรฐานของคุณภาพน้ำในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ก่อนนำไปทำการทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์ในโตรเจนของ *Bacillus*

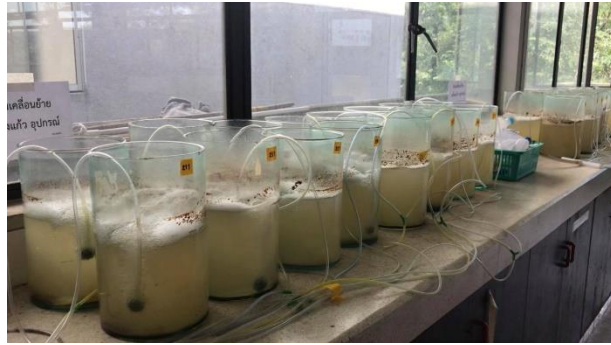
4) การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งทะเล

นำน้ำทิ้งที่ได้จากการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ทำให้ปราศจากเชื้อ 1 ชุด และชุดการทดลองที่ไม่ได้รับการทำให้ปราศจากเชื้อ 1 ชุด ดังนี้

ชุดการทดลองที่ทำให้ปราศจากเชื้อ ประกอบด้วย น้ำทิ้งที่ได้จากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 2 L/ขวดโหล และกล้าเชื้อ *Bacillus* อัตราส่วน 1% (20 mL) และ 5% (100 mL) (v/v) สำหรับชุดควบคุมนั้นจะใช้น้ำทิ้งที่ได้จากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 2 L/ขวดโหล และไม่มีการเติมกล้าเชื้อ *Bacillus*

ชุดการทดลองที่ไม่ได้รับการทำให้ปราศจากเชื้อ ประกอบด้วย น้ำทิ้งที่ได้จากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 2 L/ขวดโหล และกล้าเชื้อ *Bacillus* อัตราส่วน 1% (20 mL) และ 5% (100 mL) (v/v) สำหรับชุดควบคุม ใช้น้ำทิ้งที่ได้จากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 2 L/ขวดโหล และไม่มีการเติมกล้าเชื้อ *Bacillus*

โดยในแต่ละชุดการทดลองแบ่งเป็นชุดควบคุมจำนวน 2 ใบ (ชุดควบคุมของความเข้มข้นของกล้าเชื้อ อย่างละ 1 ซ้ำ) และชุดทดสอบความเข้มข้นของกล้าเชื้อ อย่างละ 3 ซ้ำ (ภาพที่ 8) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน ซึ่งแบ่งทำการทดสอบ โดยเริ่มจากทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* ในชุดทดลองน้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อก่อน ตามด้วยทำการทดสอบในชุดทดลองน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ในทุก ๆ วันที่ 0, 4 และ 7 ของการทดลอง นำน้ำทิ้ง 2 ชุดการทดลองไปวิเคราะห์คุณภาพน้ำตามตารางที่ 10



ภาพที่ 8 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* ในการบำบัดน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

ตารางที่ 10 วิธีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

Parameter	Method	Reference
Ammonia (mg-N/L)	Phenol-hypochlorite method	Strickland and Parsons (1972)
Nitrite (mg-N/L)	Colorimetric method	Strickland and Parsons (1972)
Nitrate (mg-N/L)	Cadmium reduction method	Strickland and Parsons (1972)
Orthophosphate (mg-P/L)	Ascorbic acid	Strickland and Parsons (1972)
Total suspended solid (mg/L)	Gravimetric method	กรมประมง (2546ข)
Dissolved oxygen (mg/L)	Dissolved oxygen Meter	–
pH	pH meter	–
Temperature (°C)	Thermometer	–
Salinity (ppt)	Salinity refractometer	–
Conductivity (µs/cm)	Conductivity meter	–

2.3.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

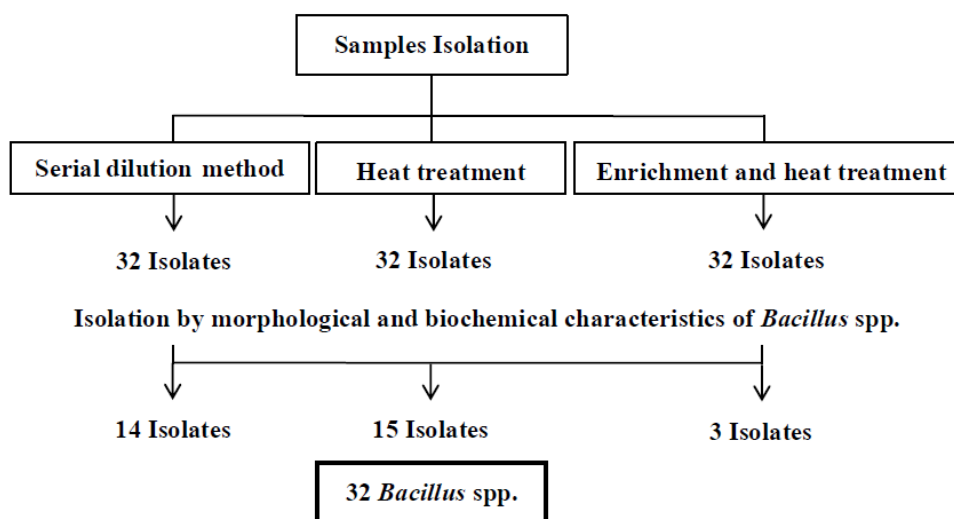
วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One way analysis of variance, ANOVA) โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าพารามิเตอร์คุณภาพน้ำ ได้แก่ Ammonia, Nitrite, Nitrate, Orthophosphate, Total suspended solid, Salinity, Dissolved oxygen, pH, Temperature และ Conductivity วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ (SPSS)

บทที่ 3

ผลการศึกษา

3.1 การคัดแยก *Bacillus* ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี

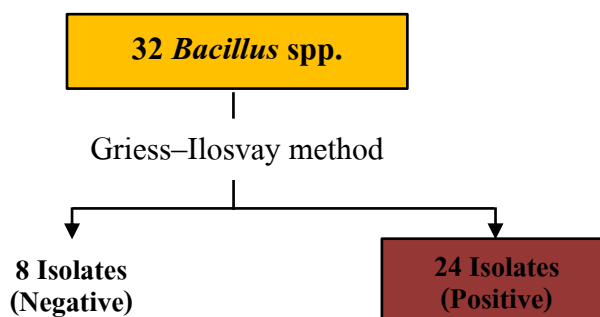
แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำ และตัวอย่างดินทั้งหมดจำนวน 96 ไอโซเลท ซึ่งมาจากการคัดแยกเชื้อ 3 วิธี ได้แก่ 1) วิธีเจือจางตัวอย่าง (Serial dilution method) ได้จำนวน 32 ไอโซเลท 2) วิธีให้ความร้อน (Heat treatment) ได้จำนวน 32 ไอโซเลท และ 3) วิธีเพิ่มจำนวนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ และให้ความร้อน (Enrichment and heat treatment) ได้จำนวน 32 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมดมาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่า ลักษณะโคโลนีที่ผ่านการบ่มเป็นเวลา 24–48 ชม. ที่อุณหภูมิ 35°C ส่วนใหญ่มีลักษณะโคโลนีกลมขอบหยัก มีสีขาว สีครีม สีส้ม ครีมน และสีเหลืองครีม เมื่อทำการย้อมแกรม พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง มีโครงสร้างของเอนโดสปอร์ จำนวน 50 ไอโซเลท และทดสอบทางชีวเคมีของกลุ่ม *Bacillus* พบว่า การทดสอบ Catalase และการทดสอบ Oxidase ให้ผลบวก จำนวน 32 ไอโซเลท ซึ่งวิธีการคัดแยกเชื้อแบบให้ความร้อน (Heat treatment) คัดแยกเชื้อ *Bacillus* ได้สูงสุด จำนวน 15 ไอโซเลท วิธี Serial dilution method จำนวน 14 ไอโซเลท และ วิธี Enrichment and heat treatment จำนวน 3 ไอโซเลท ตามลำดับ (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 จำนวนไอโซเลท และผลการคัดแยกเชื้อ *Bacillus* ด้วยวิธี Serial dilution, Heat treatment และ Enrichment and heat treatment

3.2 การทดสอบการออกซิไดซ์แอมโมเนีย และการย่อยไนโตรที่

จากการคัดแยกเชื้อ *Bacillus* จากตัวอย่างน้ำ และดินทั้งหมด จำนวน 32 ตัวอย่าง เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี Griess-Ilosvay method พบว่ามี 24 ตัวอย่าง (ภาพที่ 10) ที่ให้ผลทดสอบเป็นบวกด้วย Nitrite reagent จากการคัดแยกได้ดังกล่าว มี 16 ไอโซเลทที่เริ่มแสดงผลบวกตั้งแต่วันที่ 1 ของการทดลองจนถึงวันที่ 11 ของการทดลอง คือ *Bacillus* TS24, TW24, BR001, TW34, HS12, HS21, HS41, HS42, HS44, HW24, HW31, HW32, HW33, HW34, HW44 และ EW24 มี 4 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกหลังจากวันที่ 7 ไปจนถึงวันที่ 11 ของการทดสอบคือ TS21, TW31, TW32 และ BR002 ในขณะที่ *Bacillus* TS23, TS41, ES33 และ EW23 ให้ผลเป็นบวกของการทดสอบจากวันแรกไปจนถึงวันที่ 14 และมี 8 ไอโซเลทที่มีผลการทดสอบเป็นลบ (ไม่มีการเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อทดสอบด้วย Nitrite reagent)



ภาพที่ 10 การออกซิไดซ์แอมโมเนียและไนโตรที่ของเชื้อ *Bacillus* โดยวิธี Griess-Ilosvay method

3.3 การทดสอบคุณสมบัติของ *Bacillus* ต่อการเป็น Heterotrophic nitrifying–denitrifying bacteria

3.3.1 การทดสอบความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย

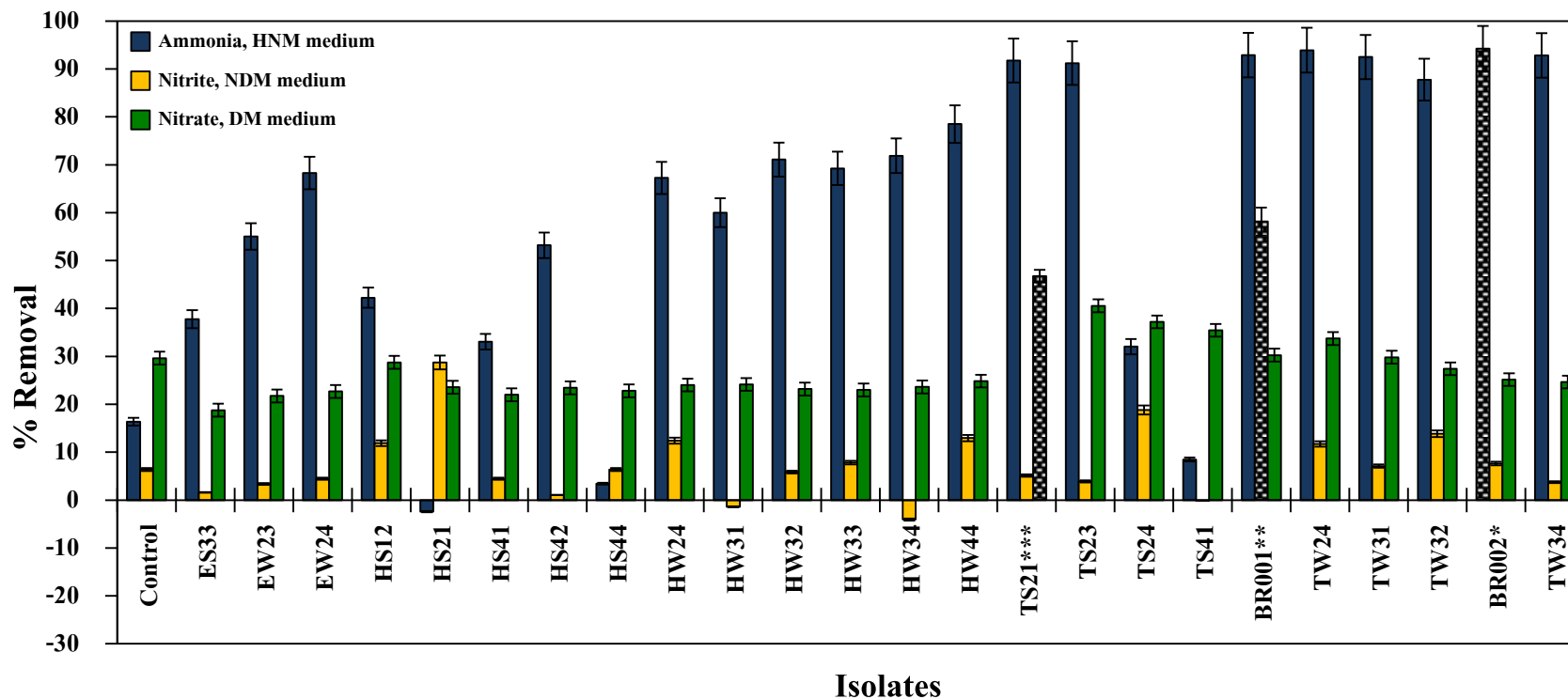
หลังจากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร Heterotrophic nitrification medium ที่มีปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้นเท่ากับ 378.29 ± 24.31 mg-N/L พบว่า *Bacillus* ที่มีความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนียได้มากกว่า 80% จำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ TW32, TS23, TS21, TW31, TW34, BR001, TW24 และ BR002 ที่มีค่า 87.78 ± 13.74 , 91.21 ± 10.03 , 91.77 ± 13.90 , 92.49 ± 6.78 , 92.81 ± 5.33 , 92.92 ± 9.88 , 93.93 ± 7.45 และ $94.25 \pm 4.74\%$ ตามลำดับ (ภาพที่ 11)

3.3.2 การทดสอบความสามารถในการออกซิไดซ์ไนไตรท์

Bacillus ที่มีความสามารถในการออกซิไดซ์ไนไตรท์จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร Nitrite denitrification medium ได้มากกว่า 20% จำนวน 2 ไอโซเลท โดยมีปริมาณไนไตรท์เริ่มต้น 102.42 ± 2.74 mg-N/L ได้แก่ HS21 สามารถออกซิไดซ์ไนไตรท์ได้ $28.72 \pm 2.73\%$ และ BR001 สามารถออกซิไดซ์ไนไตรท์ได้มากที่สุด คือ $58.15 \pm 4.17\%$ (ภาพที่ 11)

3.3.3 การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท

หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหาร Denitrification medium ที่มีปริมาณไนเตรทเริ่มต้น 384.90 ± 0.49 mg-N/L พบว่ามี *Bacillus* จำนวน 6 ไอโซเลท ที่สามารถรีดิวซ์ได้มากกว่า 30% คือ BR001, TW24, TS41, TS24, TS23 และ TS21 มีค่าเท่ากับ 30.26 ± 1.29 , 33.73 ± 0.37 , 35.44 ± 1.62 , 37.21 ± 0.71 และ 40.55 ± 0.76 ตามลำดับ โดยที่ *Bacillus* TS21 สามารถรีดิวซ์ไนเตรทได้มากที่สุดเท่ากับ $46.75 \pm 1.19\%$ (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 ความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย ไนไตรท์ และรีดิวซ์ไนเตรทของเชื้อ *Bacillus* จำนวน 24 ไอโซเลท

หมายเหตุ แท่งกราฟที่แสดงสัญลักษณ์  คือ เชื้อ *Bacillus* ไอโซเลทที่สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนีย ไนไตรท์ และรีดิวซ์ไนเตรทได้มากที่สุด

- * คือสายพันธุ์ *Bacillus* ที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ HNМ
- ** คือสายพันธุ์ *Bacillus* ที่ออกซิไดซ์ไนไตรท์ได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ NDM
- *** คือสายพันธุ์ *Bacillus* ที่รีดิวซ์ไนเตรทได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ DM

3.4 การจัดจำแนกชนิดของ *Bacillus* ด้วยเทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุล

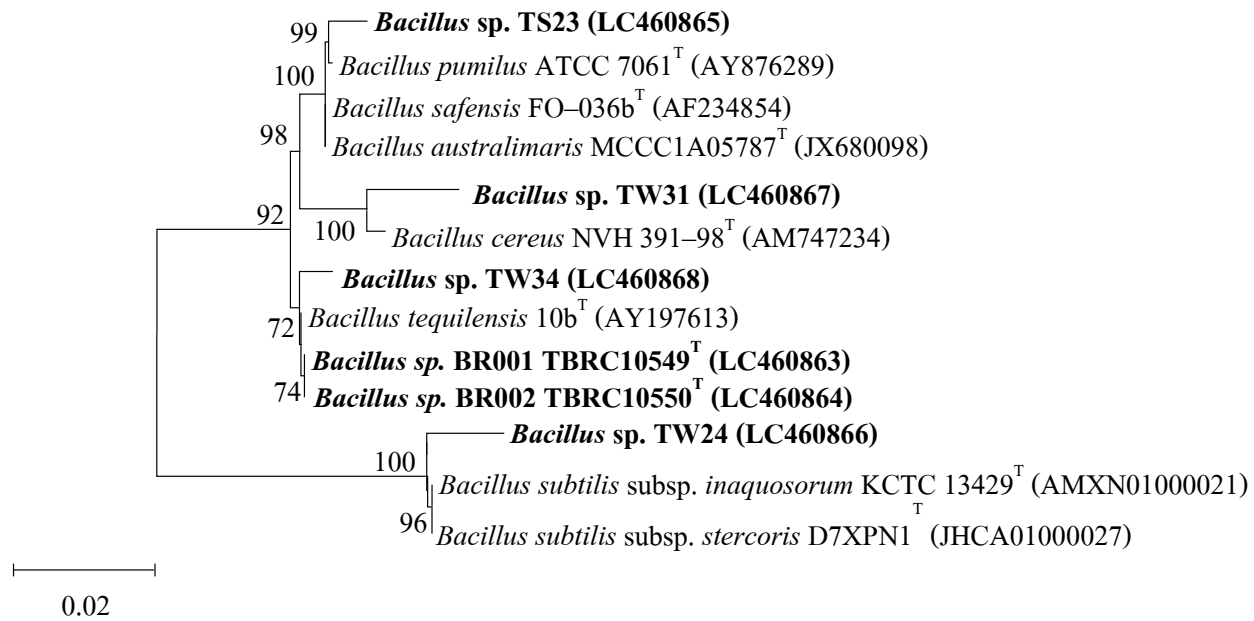
จากการคัดเลือก *Bacillus* 7 ไอโซเลท ได้แก่ TS21, TS23, BR001, TW24, TW31, BR002 และ TW34 ที่มีประสิทธิภาพมากกว่า 90% ในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย และสามารถทำงานในกระบวนการออกซิไดซ์ไนโตรที่ และรีดิวซ์ไนเตรทได้ดี มาศึกษาชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ยีน 16S rDNA และเทียบเคียงความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank/EMBL/DDBJ พบว่า TS23 มีค่าความคล้ายคลึงกับ *Bacillus pumilus* และ *B. australimaris* ที่ระดับ 97 และ 97% ตามลำดับ TW24 และ TW34 มีค่าความคล้ายคลึงกับ *B. subtilis* ที่ระดับ 99 และ 96% และ TW31 มีค่าความคล้ายคลึงกับ *B. cereus* ที่ระดับ 96% ในขณะที่ BR001 และ BR002 มีค่าความคล้ายคลึงกับ *B. tequilensis* ที่ระดับ 99 และ 99% ตามลำดับ (ตารางที่ 11) สำหรับ TS21 ไม่สามารถระบุชนิดของ *Bacillus* ได้ เนื่องจากในขั้นตอนของการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อให้บริสุทธิ์ การเพิ่มปริมาณ DNA รวมถึงการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์นั้น ไม่พบผลการแสดงแถบแบนของ DNA ของเชื้อ แต่ยังสามารถนำเชื้อ *Bacillus* sp. TS21 ไปทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อในขั้นตอนต่อไปได้ ซึ่งผลการเทียบเคียงความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Bacillus* TS23, TW24, TW31, TW34 BR002 และ BR001 สอดคล้องกับภาพแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ดังแสดงในภาพที่ 12 ทั้งนี้ *Bacillus* spp. ได้ทำการ Submitted นิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ไปที่ฐานข้อมูล DNA Data Bank of Japan (DDBJ) และได้ทำการฝากเก็บ (Deposited) เชื้อ *Bacillus* BR001 และ *Bacillus* BR002 ที่ Thailand Bioresource Research Center (TBRC) ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์และเทียบเคียงความคล้ายคลึง (Similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA gene sequence ของแบคทีเรีย

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

ตารางที่ 12 รหัสนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA (Accession numbers) ในฐานะข้อมูล DNA Data Bank of Japan (DDBJ) ของ *Bacillus* spp. ที่ได้จากการคัดแยก

Isolate	Accession number	Deposit number
TS23	LC460865	–
TW24	LC460866	–
BR001	LC460863	TBRC 10549
TW31	LC460867	–
BR002	LC460864	TBRC 10550
TW34	LC460868	–



ภาพที่ 12 แผนภูมิวิวัฒนาการของ *Bacillus* spp. ที่ตัดแยกได้โดยศึกษาจากยีน 16S rDNA (Bar=0.02)

3.5 การศึกษาความเค็ม และ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus*

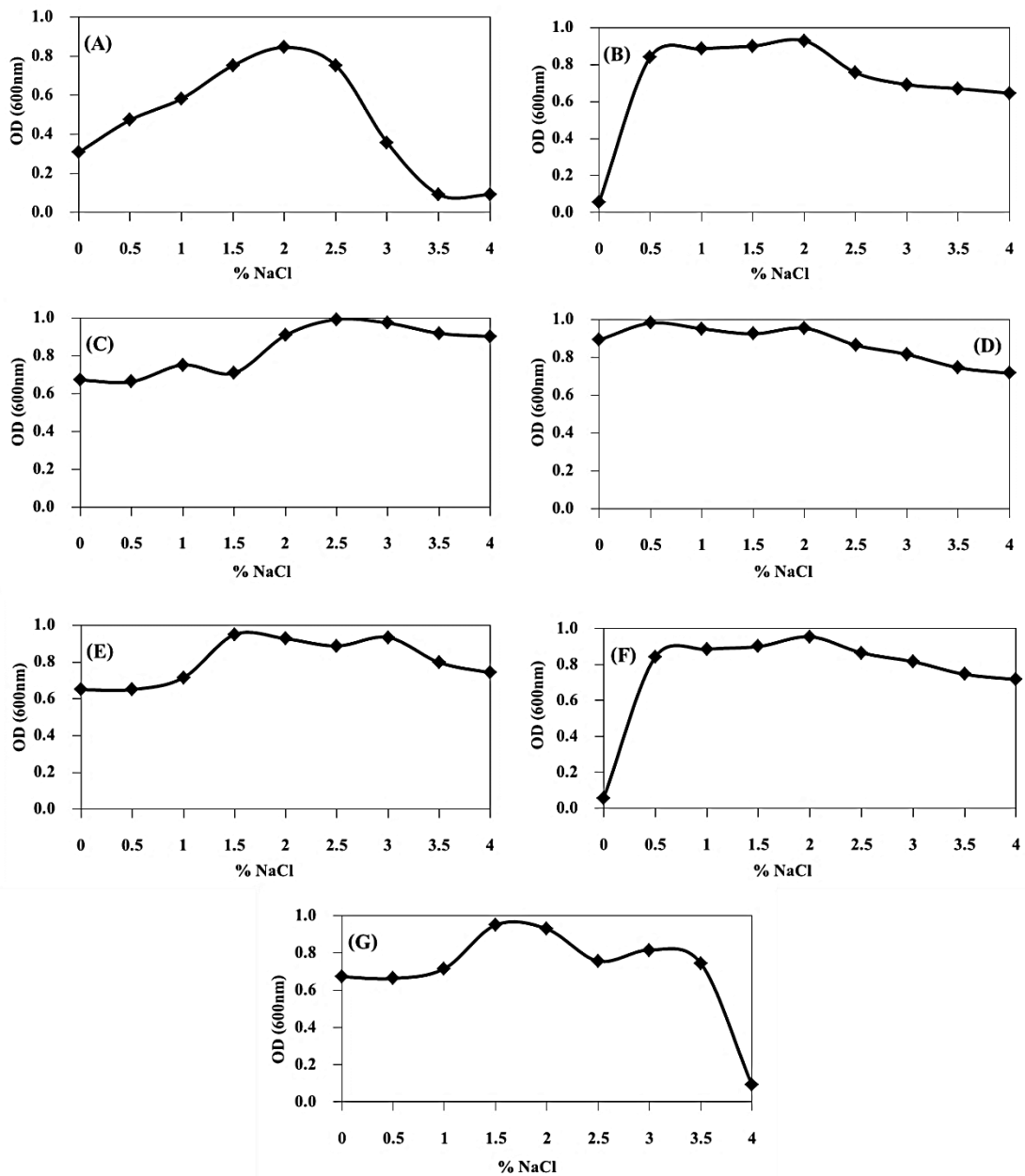
การศึกษากกราฟการเจริญเติบโตของ *Bacillus* spp. ในกราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของ *Bacillus* (ภาพที่ 13, 14) แสดงให้เห็นว่า *Bacillus* มีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น และลดลงในการทดสอบหาค่าความเค็ม และ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ซึ่งการเพิ่มขึ้นของกราฟ และจุดสูงสุดของกราฟ ณ ค่า Optical density ต่าง ๆ พบว่า เป็นช่วงของการเจริญเติบโตของเชื้อที่ดีที่สุด หลังจากนั้นกราฟมีการเปลี่ยนแปลง โดยค่อย ๆ ลดลง พบว่า เป็นการเจริญเติบโตของ *Bacillus* ที่ลดลงในระหว่างทำการทดลอง

3.5.1 การศึกษาความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

ความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus* 7 ไอโซเลท โดยพิจารณาจากประสิทธิภาพการออกซิไดซ์แอมโมเนียได้มากกว่า 90% จากการทดสอบคุณสมบัติต่อการเป็น Heterotrophic nitrifying–denitrifying bacteria พบว่า *Bacillus* TS23 และ TW24 (ภาพที่ 13 B, D) มีช่วงการเจริญเติบโตได้ดีที่ความเค็ม 0.5–2.5% (5–25 ppt) ที่ OD₆₀₀ 1.0 *Bacillus* TS21 และ TW34 มีช่วงการเจริญเติบโตได้ดีที่ความเค็ม 1.5–2.5% (15–25 ppt) ที่ OD₆₀₀ 0.8–1.0 (ภาพที่ 13 A, G) ขณะที่ *Bacillus* BR002 มีช่วงการเจริญเติบโตได้ดีที่ความเค็ม 0.5–4% (5–40 ppt) ที่ OD₆₀₀ 1.0 (ภาพที่ 13 F) *Bacillus* TW31 มีช่วงการเจริญเติบโตได้ดีที่ความเค็ม 1.5–4% (15–40 ppt) ที่ OD₆₀₀ 1.0 (ภาพที่ 13 E) และ *Bacillus* BR001 มีช่วงการเจริญเติบโตได้ดีที่ความเค็ม 2–4% (20–40 ppt) ที่ OD₆₀₀ 1.0 (ภาพที่ 13 C) นั้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ที่คัดแยกได้สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีความเค็ม และเป็นช่วงความเค็มที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง

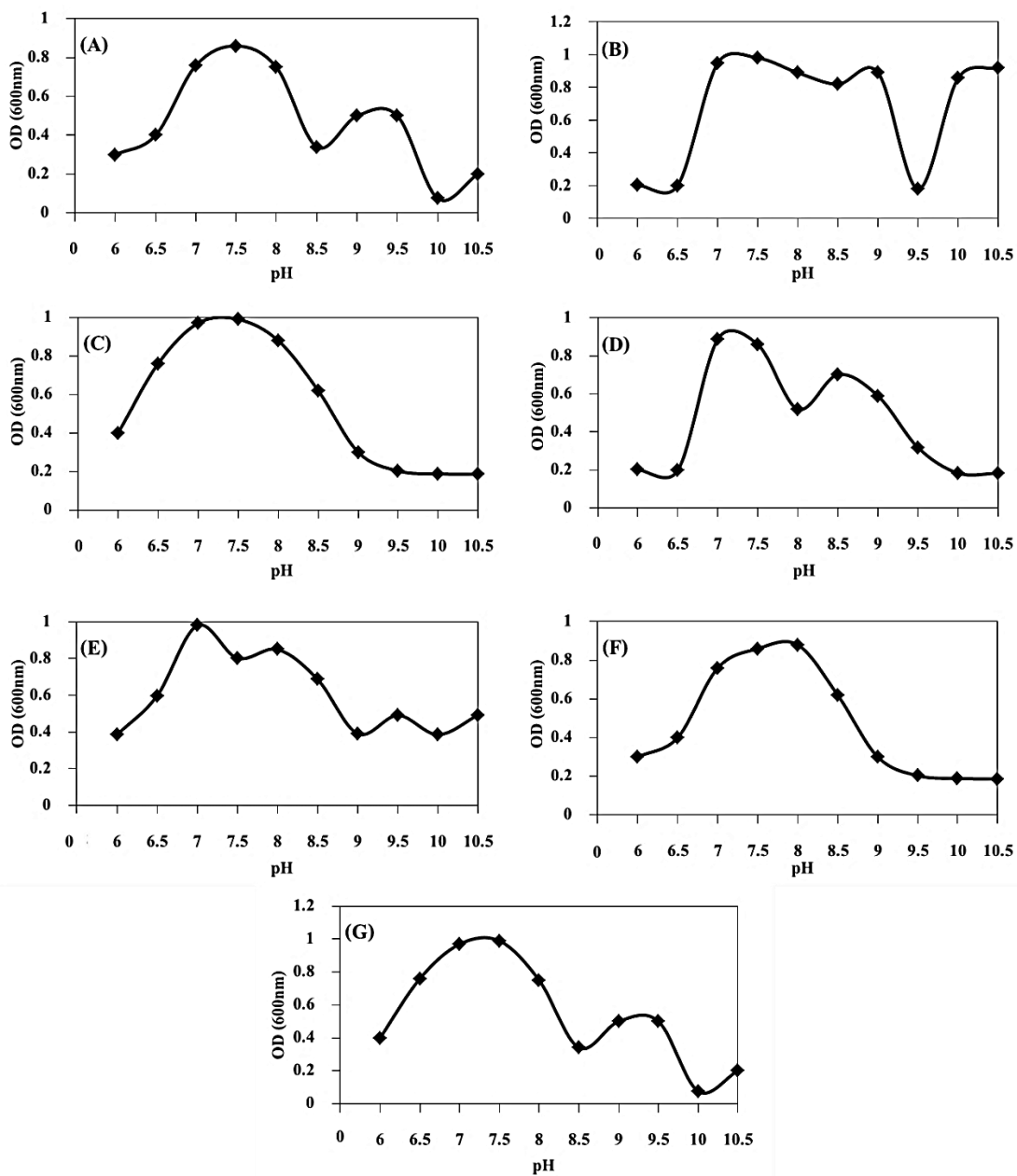
3.5.2 การศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

จากผลในภาพที่ 14 (A, B) pH 7.5 เป็นค่าที่ *Bacillus* TS21 และ TS23 มีค่าการเจริญเติบโตที่สูงที่สุด และ *Bacillus* TW24 และ TW31 มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ pH 7 (ภาพที่ 14 D, E) โดยเริ่มมีค่าการเจริญเติบโตในช่วง pH 7–8 จากนั้นค่าการเจริญเติบโตค่อย ๆ ลดลง ในขณะที่ BR002 มีค่าการเจริญเติบโตสูงสุดที่ pH 8 (ภาพที่ 14 F) BR001 และ TW34 มีค่าการเจริญเติบโตสูงสุดที่ pH 7.5 (ภาพที่ 14 C, G) ซึ่งช่วงการเจริญเติบโตอยู่ที่ pH เท่ากับ 6.5–8 และลดลงในช่วง pH 8.5–10.5



ภาพที่ 13 ความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus*

หมายเหตุ สัญลักษณ์ (A), (B), (C), (D), (E), (F) และ (G) คือ การเจริญเติบโตของ *Bacillus* TS21, TS23, BR001, TW24, TW31, BR002 และ TW34 ตามลำดับ



ภาพที่ 14 pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus*

หมายเหตุ สัญลักษณ์ (A), (B), (C), (D), (E), (F) และ (G) คือ การเจริญเติบโตของ *Bacillus*

TS21, TS23, BR001, TW24, TW31, BR002 และ TW34 ตามลำดับ

3.6 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* ในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำเสียสังเคราะห์

3.6.1 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียในระหว่างการทดลอง

ในการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* ต่อการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำเสียสังเคราะห์เป็นเวลา 7 วัน พบว่า *Bacillus* จำนวน 7 ไอโซเลท ในปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ 1% และ 5% สามารถลดปริมาณแอมโมเนียในน้ำเสียสังเคราะห์ทั้ง 2 ชุดการทดลองได้ตั้งแต่วันที่ 4 และมีการลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 15)

1) ชุดการทดลองแบบไม่ให้อากาศ

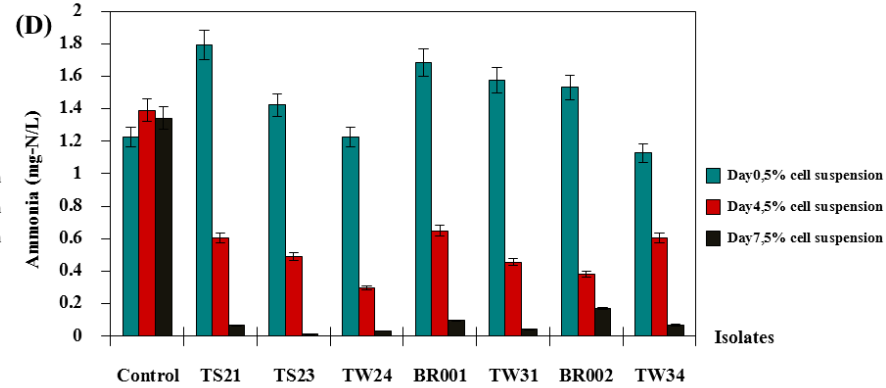
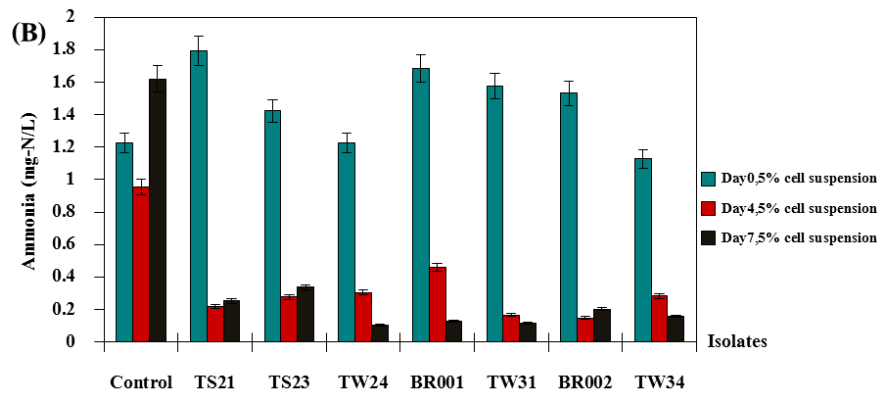
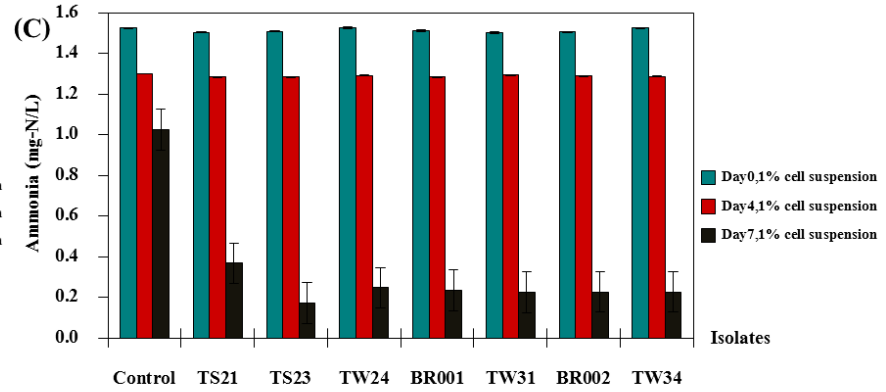
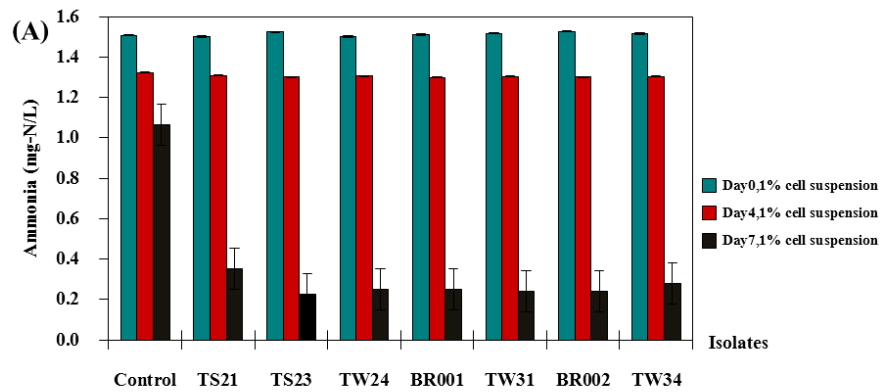
ชุดการทดลองแบบไม่ให้อากาศที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 1% มีความสามารถในการลดแอมโมเนีย พบว่า ในวันที่ 7 ของการทดลอง *Bacillus* TS21, TS23, BR001, TW24, TW31, BR002 และ TW34 สามารถลดแอมโมเนียได้ 76.60, 85.20, 83.42, 83.38, 84.22, 84.22 และ 81.58% ตามลำดับ (ปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้นเท่ากับ $1.50 \pm 0.03 - 1.53 \pm 0.04$ mg-N/L) (ภาพที่ 15 A) และชุดทดลองแบบไม่ให้อากาศที่เติมปริมาณกล้าเชื้อ *Bacillus* 5% พบว่า *Bacillus* TS21, TS23, BR001, TW24, TW31, BR002 และ TW34 มีความสามารถในการลดแอมโมเนียได้ 81.18, 92.72, 93.19, 89.36, 87.14, 89.71 และ 86.02% ตามลำดับ (ปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้นเท่ากับ $1.13 \pm 0.05 - 1.79 \pm 0.03$ mg-N/L) (ภาพที่ 15 B) ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองความเข้มข้นลดได้ดีกว่าชุดควบคุม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยชุดควบคุมสามารถลดแอมโมเนียได้เพียง 22.34% (ชุดควบคุมของการใช้กล้าเชื้อปริมาณ 1%) และมีการเพิ่มขึ้นของแอมโมเนีย 32.26% ในชุดควบคุมของการใช้กล้าเชื้อปริมาณ 5%

2) ชุดการทดลองแบบให้อากาศ

ชุดการทดลองแบบให้อากาศที่เติมปริมาณกล้าเชื้อ *Bacillus* 1% พบว่า *Bacillus* TS21, TS23, BR001, TW24, TW31, BR002 และ TW34 สามารถลดแอมโมเนียได้ 75.59, 88.66, 84.49, 83.82, 85.00, 85.00 และ 85.30% ตามลำดับ (ปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้นเท่ากับ $1.50 \pm 0.03 - 1.53 \pm 0.04$ mg-N/L) (ภาพที่ 15 C) ในขณะที่ชุดการทดลองแบบให้อากาศ เมื่อเติมปริมาณกล้าเชื้อ *Bacillus* 5% มีการลดลงของแอมโมเนีย โดย *Bacillus* TS21, TS23, BR001, TW24, TW31, BR002 และ TW34 เท่ากับ 96.34, 99.23, 94.29, 97.50, 97.36, 88.86 และ 93.98% ตามลำดับ (ปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้นเท่ากับ $1.13 \pm 0.05 - 1.79 \pm 0.03$ mg-N/L) (ภาพที่ 15 D) โดยมีความแตกต่างกับชุด

ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งชุดควบคุมสามารถลดแอมโมเนียได้เพียง 33.35% (ชุดควบคุมของการใช้กล้าเชื้อปริมาณ 1%) และมีการเพิ่มขึ้นของแอมโมเนีย 9.64% ในชุดควบคุมของการใช้กล้าเชื้อปริมาณ 5%

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้ปริมาณกล้าเชื้อ *Bacillus* 1% และ 5% ในชุดการทดลองแบบไม่ให้อากาศมีแนวโน้มที่ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 18 A, 18 B) ในขณะที่ชุดการทดลองแบบให้อากาศ การเติมปริมาณกล้าเชื้อ *Bacillus* 5% มีแนวโน้มที่สามารถลดแอมโมเนียได้สูงกว่าปริมาณกล้าเชื้อ *Bacillus* 1% (ภาพที่ 18 C, 18 D)



ภาพที่ 15 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอมโมเนียหลังการใช้ *Bacillus* ในชุดทดลองน้ำเสียสังเคราะห์

หมายเหตุ (A, B) คือ ชุดการทดลองแบบไม่ให้อากาศ, (C, D) คือ ชุดการทดลองแบบให้อากาศ ด้วยปริมาณกล้าเชื้อ *Bacillus* 1% และ 5% ตามลำดับ

3.6.2 การเปลี่ยนแปลงของไนโตรเจนในระหว่างการทดลอง

ในการทดลองทั้ง 2 ชุดการทดลองกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% สามารถลดปริมาณไนโตรเจนที่ได้ตั้งแต่วันที่ 4 ต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 16)

1) ชุดการทดลองแบบไม่ให้อากาศ

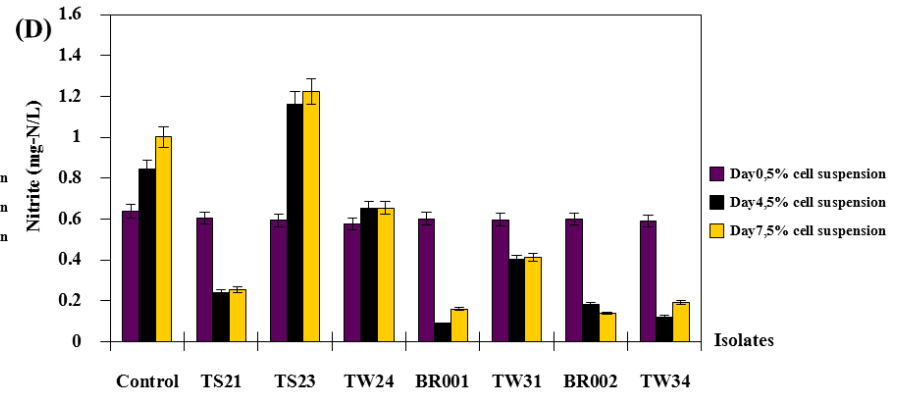
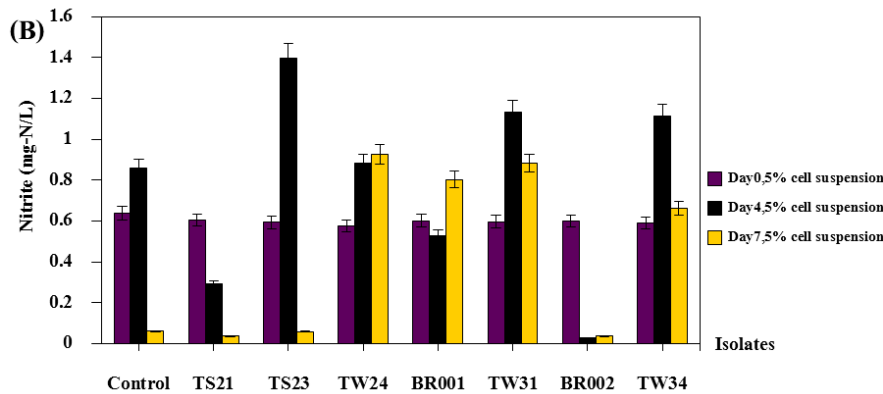
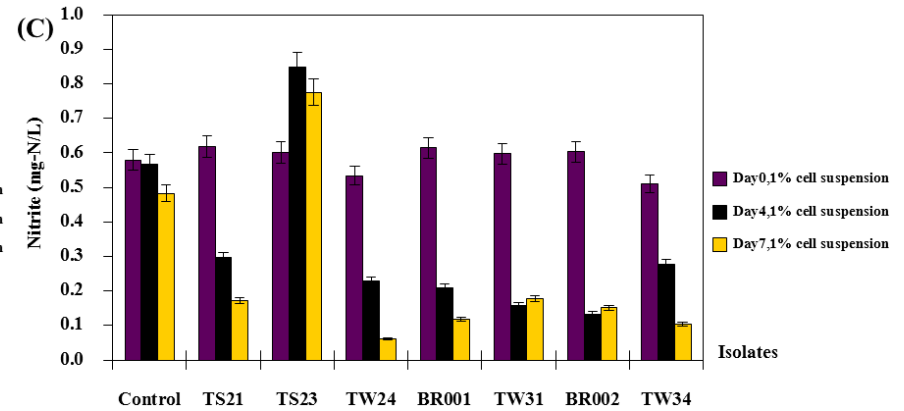
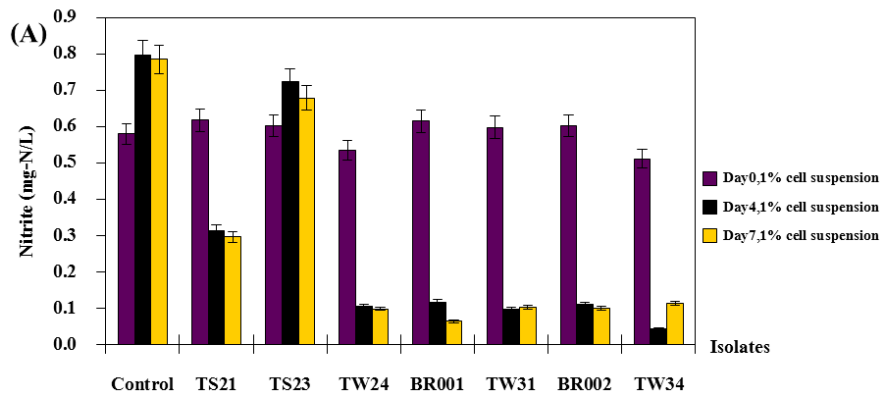
เมื่อเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 1% มีการลดลงของไนโตรเจนในระหว่างการทดลอง ยกเว้นชุดการทดลองที่เติม *Bacillus* TS23 และชุดควบคุมมีปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 เท่ากับ 0.12 ± 0.01 และ 0.22 ± 0.04 mg-N/L นั่นคือ มีไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 20.32 และ 37.55% ตามลำดับ ในวันที่ 7 *Bacillus* BR001 สามารถลดไนโตรเจนได้มากที่สุด 0.55 ± 0.01 mg-N/L หรือ 89.66% โดยมีปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 0.61 ± 0.01 mg-N/L (ภาพที่ 16 A) ชุดการทดลองแบบไม่ให้อากาศที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 5% มีการลดลงของไนโตรเจนในระหว่างการทดลอง พบว่า *Bacillus* TS21, BR002, ชุดควบคุม และ TS23 สามารถลดไนโตรเจนได้ 94.08, 94.03, 90.57 และ 90.12% ตามลำดับ ในชุดการทดลองที่เติม *Bacillus* TW24, TW31 และ TW34 มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณไนโตรเจนตั้งแต่วันที่ 4 และมีการลดลงแต่ยังคงมีปริมาณที่สูงกว่าวันเริ่มต้นจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง (ปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 0.57 ± 0.05 – 0.64 ± 0.04 mg-N/L) (ภาพที่ 16 B)

2) ชุดการทดลองแบบให้อากาศ

ชุดการทดลองแบบให้อากาศที่มีการเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 1% สามารถลดปริมาณของไนโตรเจนที่ได้ ยกเว้นชุดการทดลองที่เติม *Bacillus* TS23 มีปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 เท่ากับ 0.25 ± 0.02 mg-N/L หรือ 41.02% และ พบว่า *Bacillus* TW24 สามารถลดไนโตรเจนได้มากที่สุด เท่ากับ 88.70% คงเหลือปริมาณไนโตรเจน 0.06 ± 0.06 mg-N/L จากปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้น 0.53 ± 0.05 mg-N/L (ภาพที่ 16 C) และในชุดการทดลองที่มีการเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 5% พบว่า *Bacillus* BR002, BR001, TW34, TS21 และ TW31 สามารถลดไนโตรเจนได้ 76.92, 73.46, 67.47, 58.05 และ 31.03% ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติม *Bacillus* TS23, ชุดควบคุม และ TW24 มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณไนโตรเจนตั้งแต่วันที่ 4 เท่ากับ 1.16 ± 0.01 , 0.85 ± 0.01 และ 0.65 ± 0.01 mg-N/L (หรือคิดเป็น 96.17, 32.32 และ 13.60% ตามลำดับ) (ภาพที่ 16 D)

จากผลการทดลองการเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 1% ในชุดการทดลองแบบไม่ให้อากาศ และให้อากาศ มีประสิทธิภาพในการลดไนโตรเจนได้ในวันที่ 7 ของการทดลอง (ภาพที่ 18 A, 18 C) ซึ่งกล้าเชื้อ *Bacillus* 1% ทั้ง 2 ชุดการทดลองสามารถลดไนโตรเจนได้ดีสูงกว่าชุดควบคุม (ภาพที่ 18 A, 18 C) ส่วนประสิทธิภาพการลดไนโตรเจนของการกล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 5% ในชุดการทดลองแบบให้อากาศมีผลให้ปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงได้ดีกว่าชุดควบคุม (ภาพที่ 18 B, 18 D) และจากผลการทดลองทั้ง 2 แบบ พบว่า ในชุดการทดลองแบบไม่ให้อากาศ กล้าเชื้อ *Bacillus* มีแนวโน้มสามารถลดไนโตรเจนได้ดีกว่าในชุดทดลองแบบให้อากาศ (ภาพที่ 16) ซึ่งปริมาณไนโตรเจนมีแนวโน้มลดลงในปริมาณที่มากกว่าชุดทดลองแบบให้อากาศในวันที่ 4 และมีการลดลงเพิ่มขึ้นในวันที่ 7 อย่างต่อเนื่อง

กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% มีแนวโน้มสามารถลดไนโตรเจนได้ดีกว่ากล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% ทั้งนี้ยังมีผลต่อการสะสมปริมาณไนโตรเจนในระบบได้น้อยกว่าการใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% ซึ่งในชุดการทดลองที่มีการใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% มีเพียง *Bacillus* TS23 ที่มีการสะสมไนโตรเจนหลงเหลือภายในระบบ (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนไตรท์หลังการใช้ *Bacillus* ในชุดทดลองน้ำเสียสังเคราะห์

หมายเหตุ (A, B) คือ ชุดการทดลองแบบไม่ให้อากาศ, (C, D) คือ ชุดการทดลองแบบให้อากาศ ด้วยปริมาณกล้าเชื้อ *Bacillus* 1% และ 5% ตามลำดับ

3.6.3 การเปลี่ยนแปลงของไนเตรทในระหว่างการทดลอง

ในการทดลองทั้ง 2 ชุดการทดลองกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% สามารถลดปริมาณไนเตรทได้ตั้งแต่วันที่ 4 ต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 17)

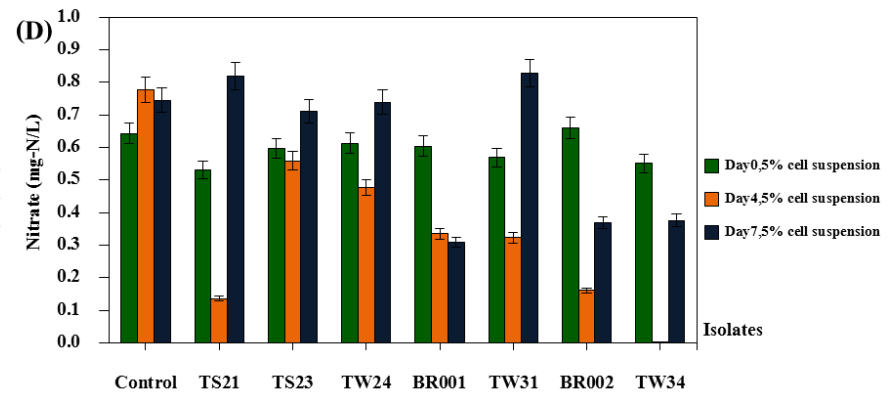
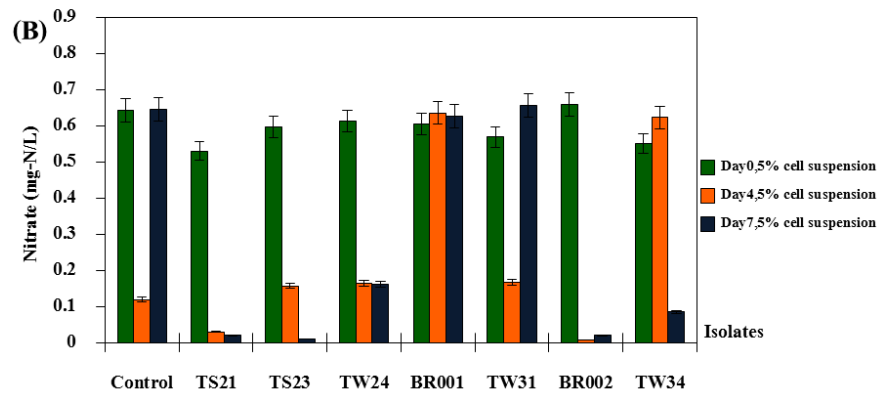
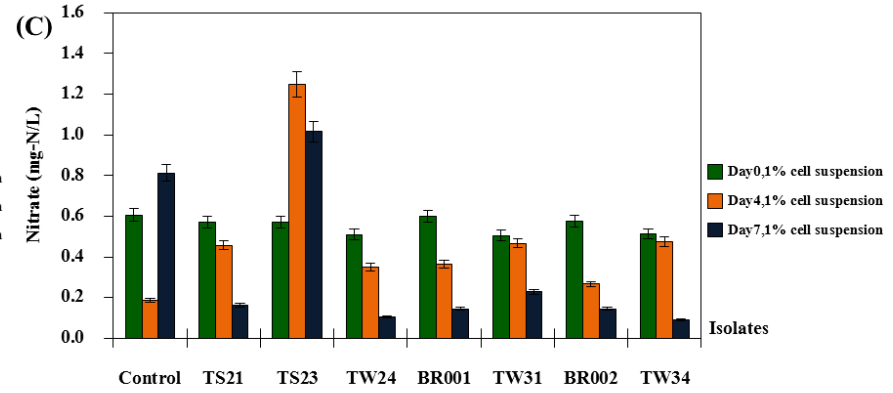
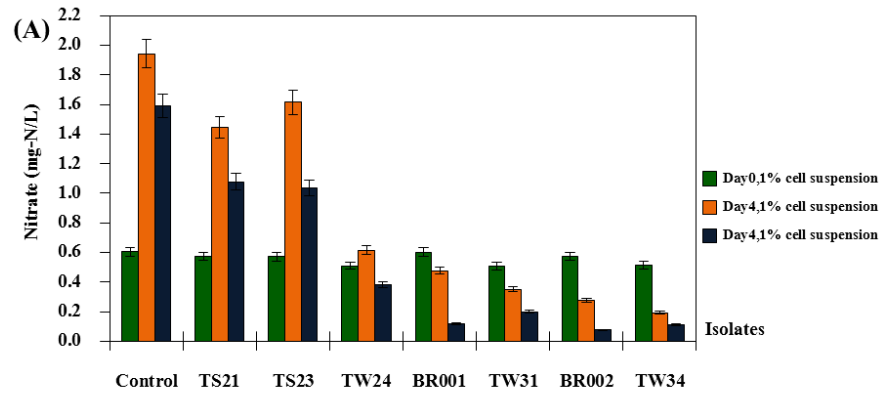
1) ชุดการทดลองแบบไม่ให้อากาศ

จากการทดลอง พบว่า การเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* BR002, BR001, TW34, TW31 และ TW24 ปริมาณ 1% มีการลดลงของไนเตรทเท่ากับ 86.91, 80.23, 78.28, 60.69 และ 24.99% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยชุดทดลองที่เติม *Bacillus* TS21, TS23 และชุดควบคุมมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณไนเตรท 88.25, 81.60 และ 72.88% ตามลำดับ โดยในการทดลองมีปริมาณไนเตรทเริ่มต้นเท่ากับ $0.51 \pm 0.01 - 0.61 \pm 0.03$ mg-N/L (ภาพที่ 17 A) สำหรับชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 5% พบว่า *Bacillus* TS23, BR002, TS21, TW34 และ TW24 มีความสามารถในการลดไนเตรทได้เท่ากับ 98.37, 96.87, 96.25, 84.60 และ 73.60% ตามลำดับ โดย *Bacillus* TW23 สามารถลดไนเตรทจาก 0.60 ± 0.06 mg-N/L เหลือเพียง 0.01 ± 0.07 mg-N/L (ภาพที่ 17 B)

2) ชุดการทดลองแบบให้อากาศ

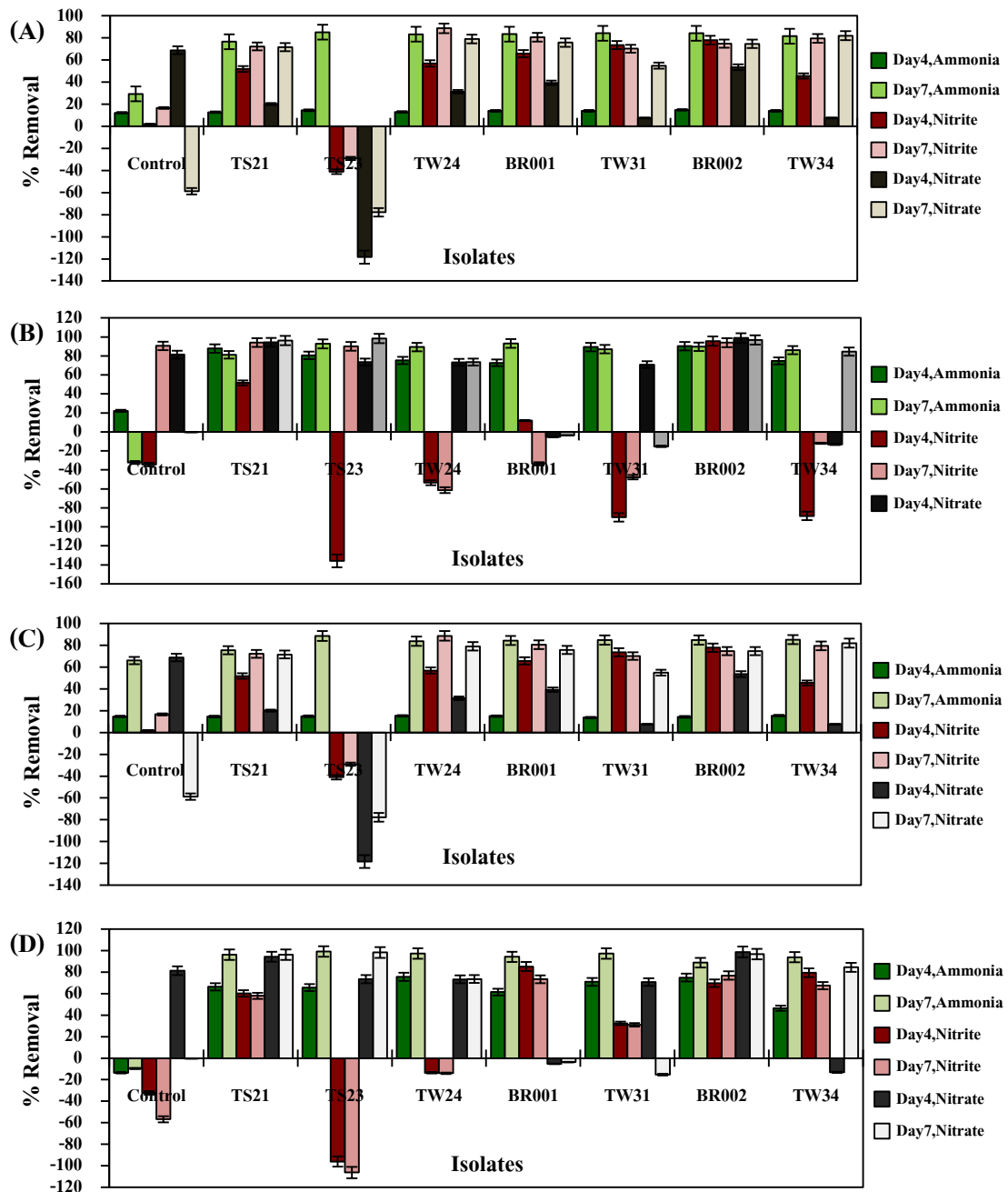
หลังจากเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* 1% ชุดการทดลองที่เติม *Bacillus* TS23 มีปริมาณไนเตรทเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 แล้วลดลงในวันที่ 7 ขณะที่ชุดควบคุม ปริมาณไนเตรทได้เพิ่มขึ้นในวันที่ 7 เท่ากับ 58.80% ชุดการทดลองที่เติม *Bacillus* TW34, TW24, BR002, BR001, TS21 และ TW31 สามารถลดไนเตรทได้เท่ากับ 82.06, 79.11, 74.66, 75.79, 71.66 และ 54.93% ตามลำดับ (ภาพที่ 17 C) ปริมาณไนเตรทมีการลดต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 4 ถึงวันที่ 7 ของการทดลอง ปริมาณไนเตรทเริ่มต้นเท่ากับ $0.51 \pm 0.01 - 0.61 \pm 0.03$ mg-N/L และชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* 5% ของ *Bacillus* BR001, BR002, TW34 สามารถลดไนเตรทในวันที่ 7 ได้เท่ากับ 49.08, 44.10 และ 31.80% ตามลำดับ โดยการเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 5% สามารถทำให้ปริมาณไนเตรทลดลงได้ดีตั้งแต่วันที่ 4 ของการทดลองต่างกับชุดควบคุม ที่มีการเพิ่มขึ้นของไนเตรท 20.68% ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และ *Bacillus* TW34 สามารถลดไนเตรทจากปริมาณเริ่มต้น 0.55 ± 0.06 mg-N/L เหลือเพียง 0.00 ± 0.01 mg-N/L (99.56%) (ภาพที่ 17 D)

การใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ทั้ง 2 แบบของชุดการทดลองมี แนวโน้มที่แตกต่างกัน โดยกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% มีแนวโน้มสามารถลดไนเตรทได้ดีกว่า การใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% และยังส่งผลทำให้ปริมาณการสะสมไนเตรทในระบบมีน้อยกว่าปริมาณไนเตรทเริ่มต้น (ภาพที่ 18) ซึ่งการทดสอบการใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 7 ไอโซเลท ในปริมาณ 1% มีเพียงกล้าเชื้อ *Bacillus* TS21 และ TS23 ที่ส่งผลทำให้มีการสะสมไนเตรทในระหว่างการทดลอง ซึ่งแตกต่างกับการใช้ *Bacillus* ในปริมาณ 5% ถึงแม้ในวันที่ 4 ของการทดลองการจะสามารถทำให้ไนเตรทลดลงได้ดี แต่ก็ส่งผลให้มีการสะสมไนเตรทในวันที่ 7 ของการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* TS21, TS23, TW24 และ TW31 (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนเตรทหลังการใช้ *Bacillus* ในชุดทดลองน้ำเสียสังเคราะห์

หมายเหตุ (A, B) คือ ชุดการทดลองแบบไม่ให้อากาศ, (C, D) คือ ชุดการทดลองแบบให้อากาศ ด้วยปริมาณกล้าเชื้อ *Bacillus* 1% และ 5% ตามลำดับ



ภาพที่ 18 ประสิทธิภาพของ *Bacillus* ในการกำจัดแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทในน้ำเสีย
สังเคราะห์ในระยะเวลา 7 วัน

- หมายเหตุ (A) คือ ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (ไม่ให้อากาศ)
 (B) คือ ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% (ไม่ให้อากาศ)
 (C) คือ ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% (ให้อากาศ)
 (D) คือ ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% (ให้อากาศ)

3.7 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* ในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งทะเล

3.7.1 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียในระหว่างการทดลอง

จากการทดลองกล้าเชื้อปริมาณ *Bacillus* 1% และ 5% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่าน และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ แอมโมเนียมีการลดลงได้ตั้งแต่วันที่ 4 ของการทดลอง ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

1) การทดลองในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

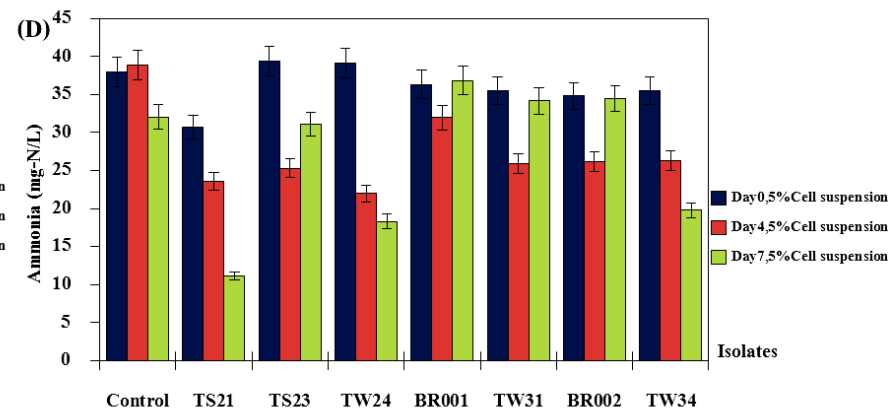
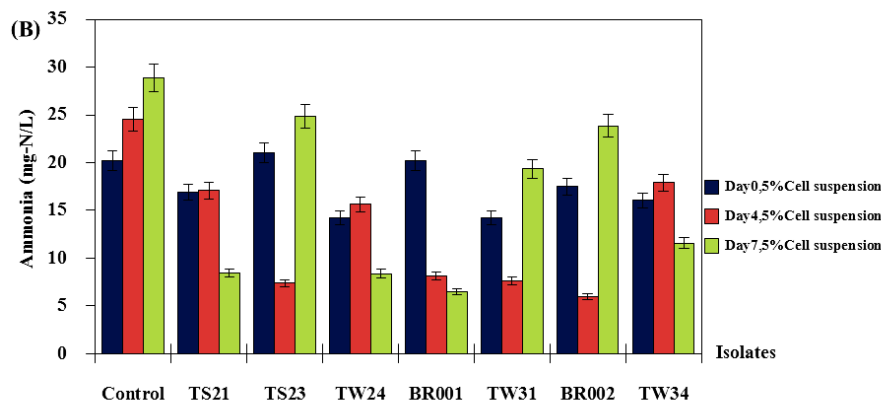
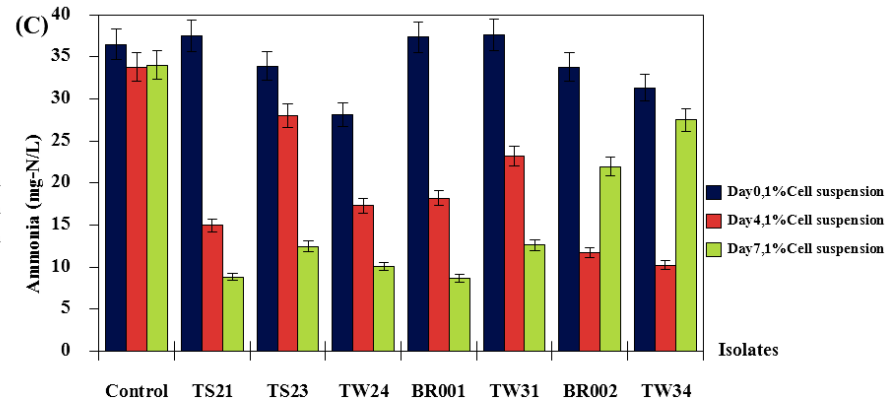
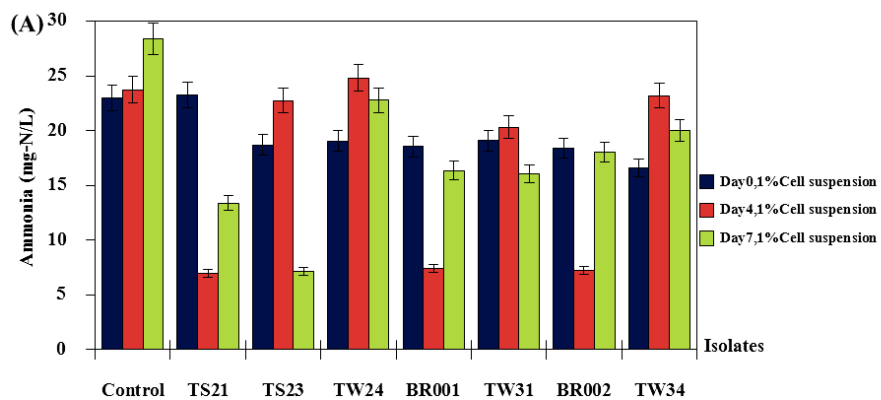
การเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* TS21, BR002 และ BR001 ในปริมาณ 1% ส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียลดลงจากแอมโมเนียเริ่มต้น $16.57 \pm 2.37 - 23.22 \pm 6.05$ mg-N/L เหลือปริมาณ $6.98 \pm 1.90 - 7.39 \pm 1.85$ mg-N/L (ภาพที่ 19 A) หรือเท่ากับ 69.93, 60.57 และ 60.10% ตามลำดับ (ภาพที่ 20 A) หลังจากวันที่ 4 จนถึงวันที่ 7 ปริมาณแอมโมเนียมีการเพิ่มขึ้น แต่ *Bacillus* ทั้ง 3 ไอโซเลท ยังคงมีประสิทธิภาพในการลดแอมโมเนีย โดย *Bacillus* TS23 สามารถลดแอมโมเนียได้ 62.03% ในวันที่ 7 ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมที่มีการเพิ่มขึ้น 23.47% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับการเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% ส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียลดลงได้ดีในวันที่ 4 *Bacillus* BR002, TS23, BR001 และ TW31 ลดแอมโมเนียได้ 66.10, 64.92, 59.78 และ 46.42% ตามลำดับ (ภาพที่ 20 A) และ *Bacillus* BR001 สามารถลดแอมโมเนียได้ต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 แอมโมเนียจาก 20.24 ± 4.33 mg-N/L เหลือ 6.46 ± 1.52 mg-N/L (ลดลง 68.06%) (ภาพที่ 19 B)

2) การทดลองในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

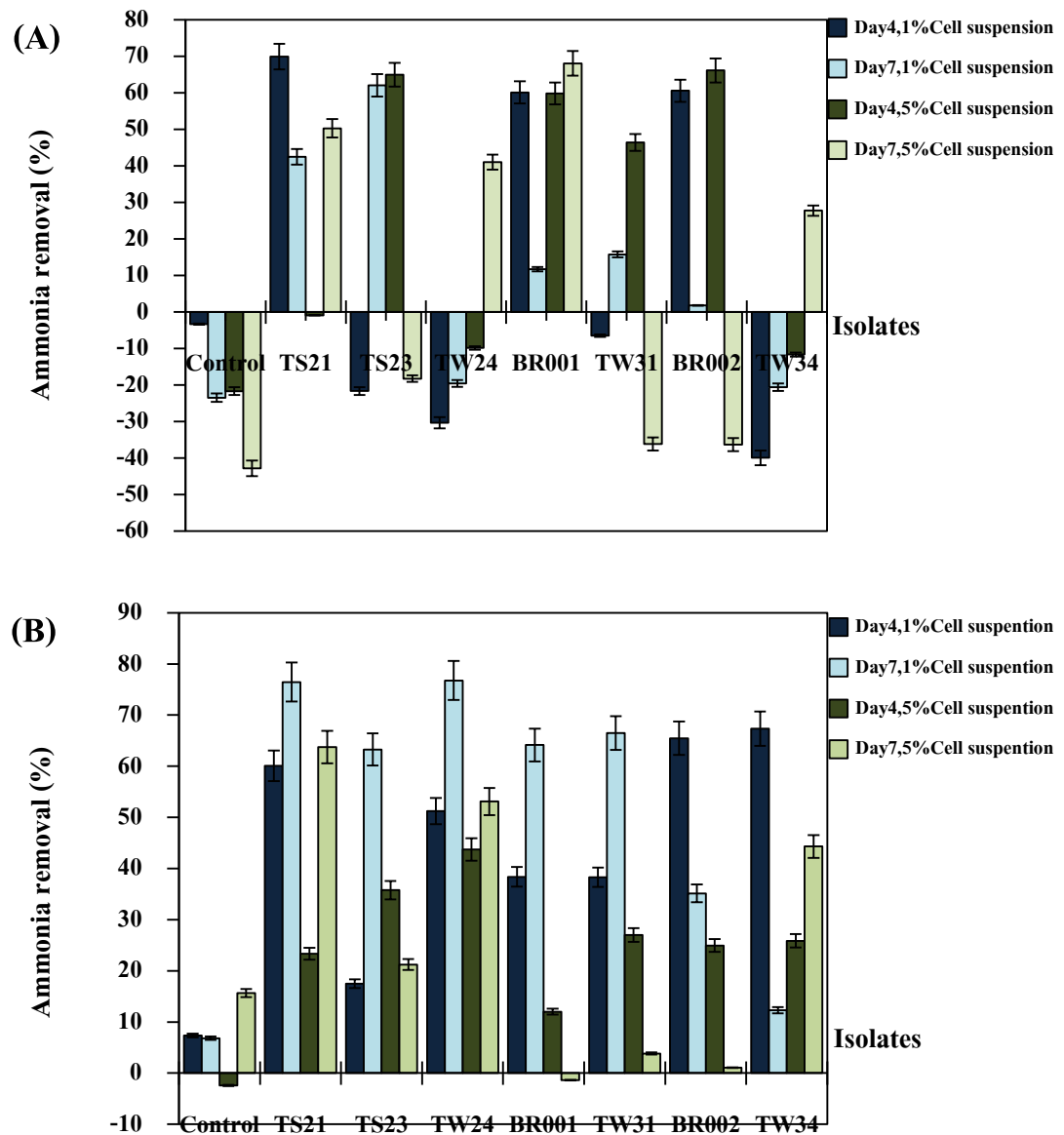
กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% มีประสิทธิภาพในการลดแอมโมเนียได้ต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 4 และลดลงได้ดีในวันที่ 7 *Bacillus* BR001, TS21, TW31, TW24 และ TS23 มีผลทำให้แอมโมเนียเริ่มต้นจาก $28.08 \pm 8.45 - 36.49 \pm 1.23$ mg-N/L เหลือ $8.67 \pm 0.38 - 12.60 \pm 3.67$ mg-N/L (ภาพที่ 19 C) โดยคิดเป็น 76.77, 76.45, 66.49, 64.16 และ 63.28% ตามลำดับ ในขณะที่ *Bacillus* TW34 และ BR002 สามารถลดแอมโมเนียในวันที่ 4 ได้ดีกว่าวันที่ 7 เท่ากับ 67.36 และ 65.46% ตามลำดับ (ภาพที่ 20 B) ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมที่แอมโมเนียมีการลดลงเพียง 6.82% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับ *Bacillus* TS23, TW31, BR002 และ BR001 ปริมาณ 5% สามารถลดแอมโมเนียได้ 35.76, 27.00, 24.95 และ 12.01% (ภาพที่ 20 B) ตามลำดับ ซึ่งระหว่างวันที่ 5 ถึง 7 มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอมโมเนีย (ภาพที่ 19 D) *Bacillus* TS21, TW24 และ TW34 สามารถลดแอมโมเนียได้ต่อเนื่องจากวันที่ 4 จนถึงสิ้นสุดการทดลองลดลงได้ 44.31–63.74% ตามลำดับ (ภาพที่ 20 B)

การใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพในการลดแอมโมเนียได้ดีในวันที่ 4 และลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง โดยการลดลงของแอมโมเนียในวันที่ 4 ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อมีแนวโน้มลดลงดีกว่าในชุดทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (ภาพที่ 19 A, 19 C) ขณะที่การใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% ทั้ง 2 ชุดการทดลองสามารถลดแอมโมเนียได้ดีในวันที่ 4 โดยในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ กล้าเชื้อ *Bacillus* 5% ยังคงมีแนวโน้มในการลดแอมโมเนียได้ดีกว่าในชุดทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (ภาพที่ 19 B, 19 D, 20)

กล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 1% และ 5% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ สามารถลดแอมโมเนียได้ดีในวันที่ 4 จนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง โดยประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* มีแนวโน้มที่แตกต่างกัน พบว่า กล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 1% มีการลดแอมโมเนียในระบบได้ดีกว่าการใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 5% (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 19 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอมโมเนียหลังการใช้ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)
 หมายเหตุ (A, B) คือ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ, (C, D) คือ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 20 ประสิทธิภาพของ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ในการลดแอมโมเนียในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

หมายเหตุ (A) คือ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

(B) คือ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

3.7.2 การเปลี่ยนแปลงของไนโตรเจนในระหว่างการศึกษาทดลอง

จากการทดลองปริมาณกล้าเชื้อ *Bacillus* 1% และ 5% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่าน และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ มีการลดลงของไนโตรเจนที่ได้ตั้งแต่วันที่ 4 และ 7 ของการทดลอง ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

1) การทดลองในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

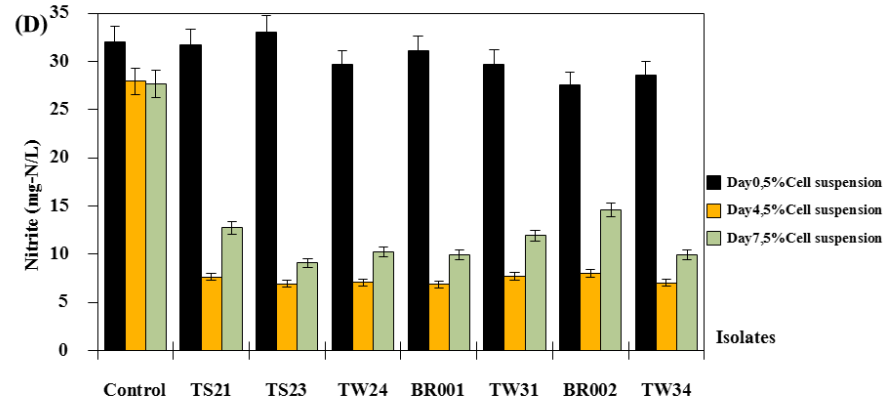
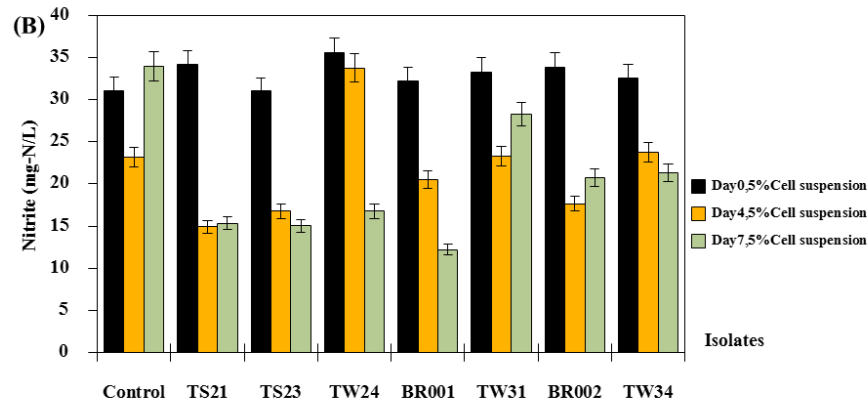
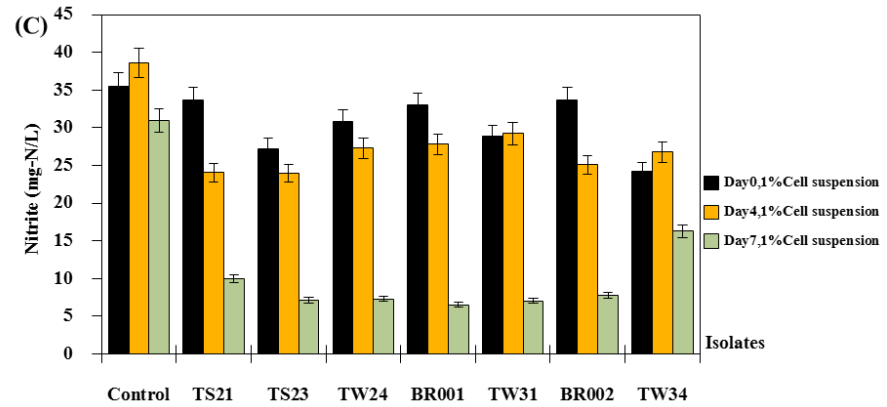
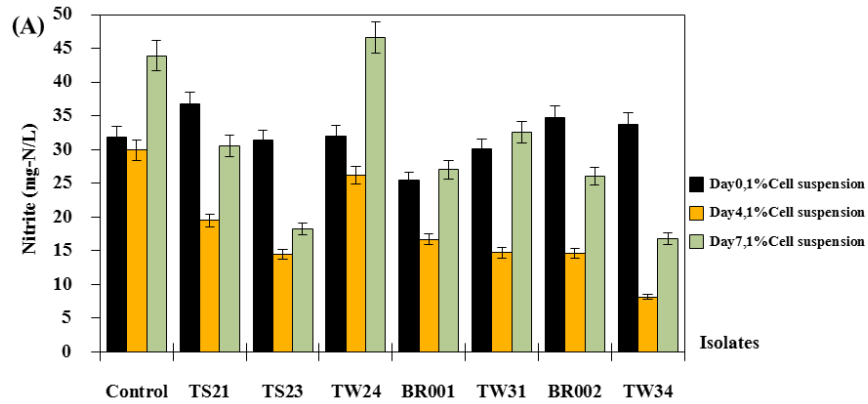
กล้าเชื้อ *Bacillus* TW34, BR002, TS23, TW31, TS21, BR001 และ TW24 ปริมาณ 1% ส่งผลทำให้ปริมาณไนโตรเจนลดลงได้ดีตั้งแต่ 34.36–75.82% ในวันที่ 4 โดยมีปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้น 30.09 ± 3.49 ถึง 36.74 ± 12.95 mg-N/L (ภาพที่ 21 A) หลังจากนั้นปริมาณไนโตรเจนมีการเพิ่มขึ้นระหว่างการศึกษาทดลอง *Bacillus* TW34 สามารถลดไนโตรเจนได้ดีที่สุดในวันที่ 4 และ 7 เท่ากับ 75.82 และ 50.24% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุม ที่มีไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 37.84% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 22 A) ในชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* TS21, BR002 และ T23 ปริมาณ 5% มีปริมาณการลดลงได้ดีในวันที่ 4 เท่ากับ 46.04–56.32% และในชุดการทดลองที่เติม *Bacillus* BR001, TW24, TS23 และ TW34 สามารถลดปริมาณไนโตรเจนได้ต่อเนื่องจากวันที่ 4 จนถึงวันที่ 7 เท่ากับ 62.14, 52.88, 51.65 และ 34.71% ตามลำดับ (ภาพที่ 22 A) ปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นเฉลี่ย 32.48 ± 7.10 mg-N/L ลดปริมาณไนโตรเจนเฉลี่ย 16.31 ± 1.04 mg-N/L (ภาพที่ 21 B)

2) การทดลองในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

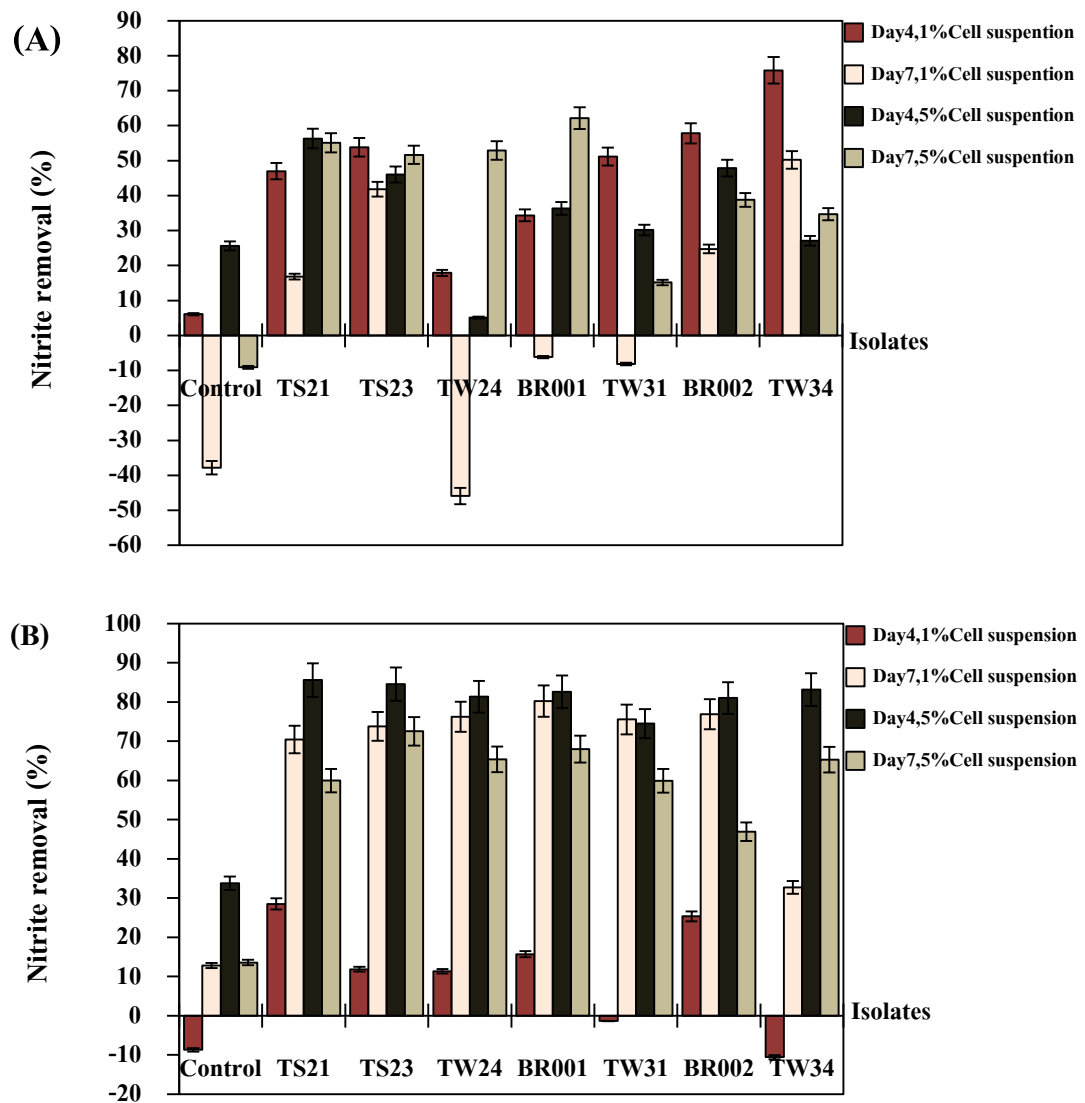
ภาพที่ 21 C พบว่า การเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% ส่งผลทำให้ไนโตรเจนลดลงได้ดีตั้งแต่วันที่ 4 และลดได้ดีในวันที่ 7 ของการทดลองซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นเฉลี่ย 30.68 ± 8.69 mg-N/L ลดเหลือเพียง 8.86 ± 1.35 mg-N/L ในวันที่ 7 โดย *Bacillus* BR001, BR002, TW24, TW31, TS23 และ TS21 มีประสิทธิภาพในการลดไนโตรเจนได้ 80.25, 76.89, 76.24, 75.54, 73.79 และ 70.44% ตามลำดับ (ภาพที่ 22 B) ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% ส่งผลทำให้ปริมาณไนโตรเจนลดลงได้ดีในวันที่ 4 และไนโตรเจนมีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 7 ปริมาณไนโตรเจนในวันเริ่มต้นการทดลองเท่ากับ 30.44 ± 7.90 mg-N/L ลดเหลือเฉลี่ย 7.31 ± 3.60 mg-N/L ในวันที่ 4 (ภาพที่ 21 D) จากประสิทธิภาพการลดไนโตรเจนของ *Bacillus* TS21, TS23, TW34, BR001, TW24, BR002 และ TW31 เท่ากับ 85.58, 84.54, 83.18, 82.60, 81.34, 81.01 และ 74.49% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมที่มีการลดลงของไนโตรเจนเพียง 13.58% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 22 B)

การใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ มีแนวโน้มที่แตกต่างกัน พบว่า ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ *Bacillus* 1% ส่งผลให้ปริมาณไนโตรเจนลดลงได้ดีในวันที่ 4 และในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ *Bacillus* 1% ทำให้ไนโตรเจนลดลงได้ตั้งแต่วันที่ 4 และลดได้ดีในวันที่ 7 ขณะที่การใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงทั้ง 2 ชุดการทดลองมีแนวโน้มที่ไม่แตกต่างกัน นั่นคือ *Bacillus* มีประสิทธิภาพทำให้ไนโตรเจนลดลงได้ตั้งแต่วันที่ 4 และ 7 ของการทดลอง

กล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 1% และ 5% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ สามารถลดปริมาณไนโตรเจนได้ดีในวันที่ 4 และวันที่ 7 ซึ่งประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* มีแนวโน้มแตกต่างกัน โดยกล้าเชื้อ *Bacillus* 5% มีการลดไนโตรเจนได้ดีกว่าการใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 1% (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 21 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนไตรท์หลังการใช้ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)
 หมายเหตุ (A, B) คือ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ, (C, D) คือ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 22 ประสิทธิภาพของ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ในการลดไนไตรท์ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

หมายเหตุ (A) คือ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
(B) คือ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

3.7.3 การเปลี่ยนแปลงของไนเตรทในระหว่างการทดลอง

จากการทดลองปริมาณกล้าเชื้อ *Bacillus* 1% และ 5% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่าน และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมีการลดลงของไนเตรทตั้งแต่วันที่ 4 และ 7 ของการทดลอง ดังนี้

1) การทดลองในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

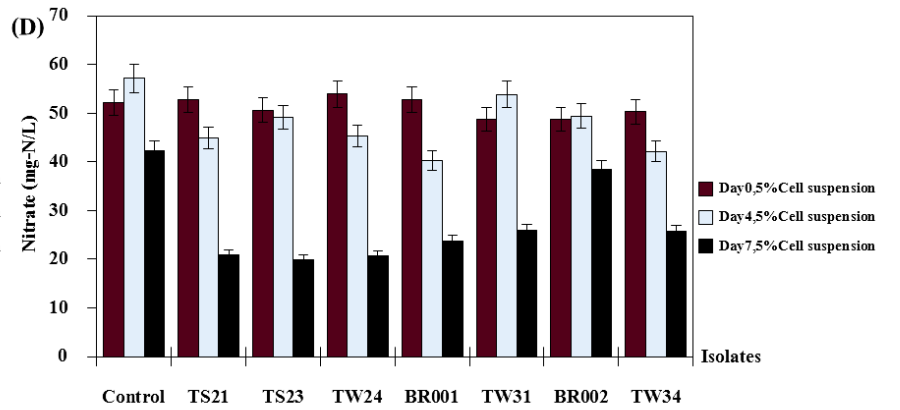
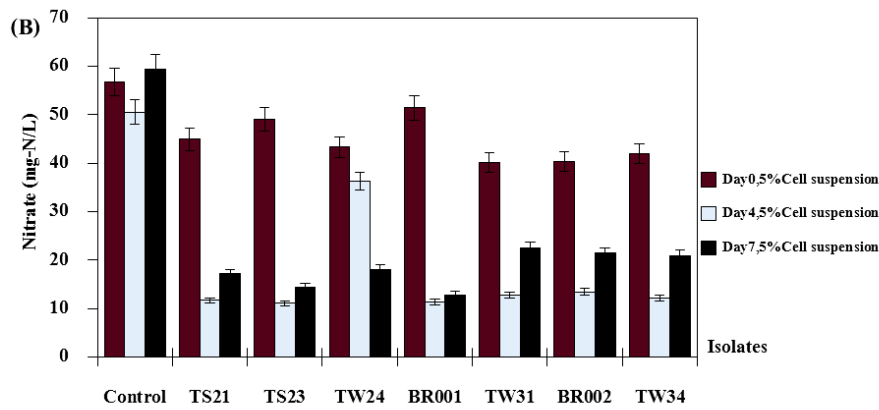
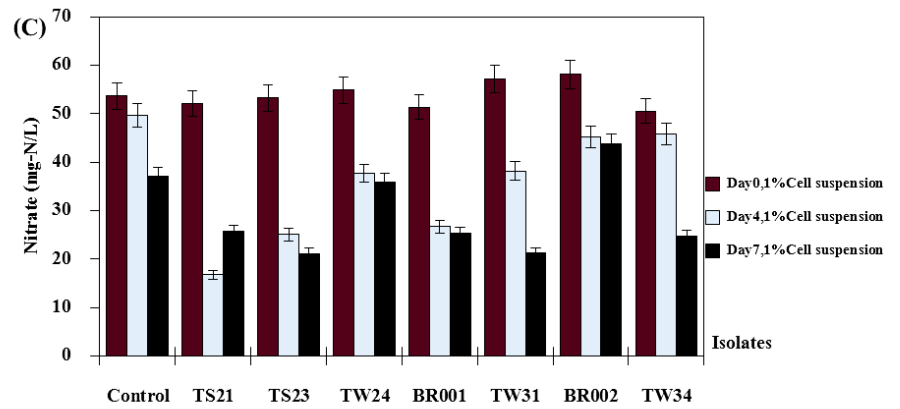
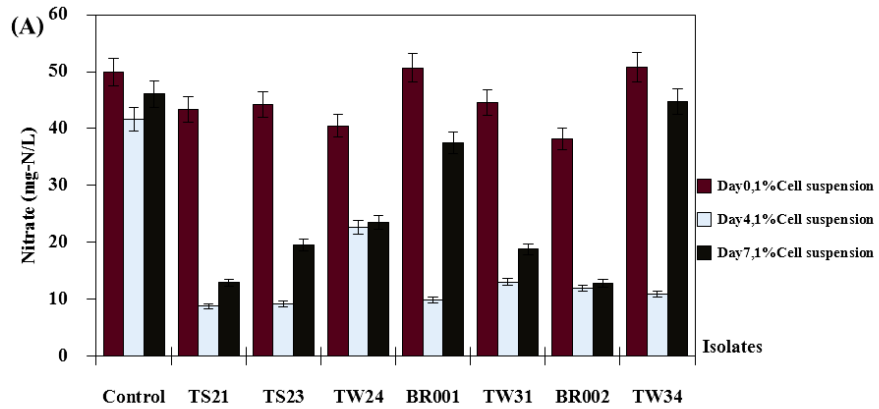
จากการทดลอง พบว่า การเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% ส่งผลทำให้ไนเตรทลดลงได้ดีตั้งแต่วันที่ 4 ของการทดลอง ซึ่งสามารถลดปริมาณไนเตรทได้เฉลี่ย 64.81% (ภาพที่ 24 A) โดยมีปริมาณไนเตรทเริ่มต้นเฉลี่ย 45.27 ± 12.01 mg-N/L และลดลงต่ำสุดเหลือ 9.86 ± 0.11 mg-N/L ในวันที่ 4 ของชุดการทดลองที่เติม *Bacillus* BR001 (ภาพที่ 23 A) หลังจากวันที่ 4 ในระหว่างการทดลองจนถึงวันที่ 7 ปริมาณไนเตรทมีการเพิ่มขึ้น ซึ่ง *Bacillus* TS21 และ BR002 มีประสิทธิภาพในการลดไนเตรทได้ดีทั้งในวันที่ 4 (ลดไนเตรทได้ 79.83 และ 68.70% ตามลำดับ) และวันที่ 7 สามารถลดไนเตรทได้ 70.28 และ 66.46% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมที่มีการลดลงของไนเตรทเพียง 7.66% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% ปริมาณไนเตรทลดลงได้ดีตั้งแต่วันที่ 4 เฉลี่ย 16.24–77.92% และ 43.95–74.99% ในวันที่ 7 (ภาพที่ 23 A) โดย *Bacillus* BR001 มีประสิทธิภาพในการลดไนเตรทได้มากที่สุด จากปริมาณไนเตรทเริ่มต้น 51.44 ± 16.07 mg-N/L ลดลงได้ 40.08 ± 6.00 mg-N/L ในวันที่ 4 และมีปริมาณไนเตรทเหลือ 12.87 ± 0.09 mg-N/L ในวันที่ 7 ของการทดลอง (ภาพที่ 23 B)

2) การทดลองในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

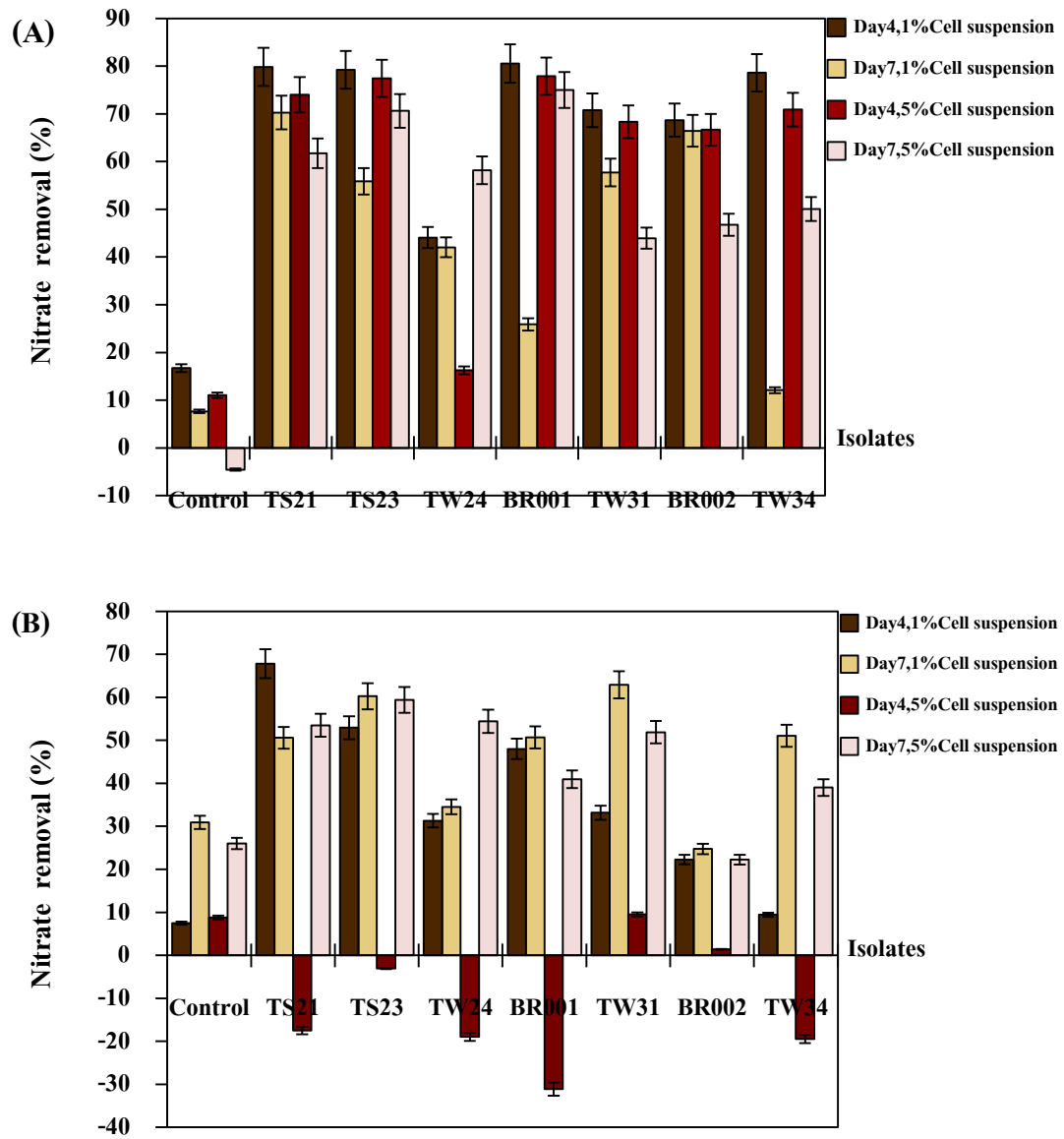
จากภาพที่ 23 C พบว่า การเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% สามารถลดไนเตรทได้ในวันที่ 4 ต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 *Bacillus* TS23, BR001, TW31, TW24, BR002 และ TW34 สามารถลดปริมาณไนเตรทในวันที่ 4 ได้ 52.93, 48.01, 33.15, 31.30, 22.26 และ 9.42% ตามลำดับ (ภาพที่ 24 B) จากปริมาณไนเตรทเริ่มต้นเฉลี่ย 53.87 ± 15.85 mg-N/L ลดลงเฉลี่ยเหลือ 29.36 ± 2.79 mg-N/L ในวันที่ 7 ซึ่ง *Bacillus* ทั้ง 6 ไอโซเลท ลดไนเตรทได้เฉลี่ย 47.35% (วันที่ 7) เช่นเดียวกับชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% สามารถลดไนเตรทได้ต่อเนื่องจากวันเริ่มต้นถึงวันที่ 4 และลดลงได้ดีในวันที่ 7 จากปริมาณไนเตรทเริ่มต้นเท่ากับ 48.72 ± 6.73 ถึง 53.92 ± 6.55 mg-N/L ลดลงเฉลี่ยเหลือ 27.20 ± 0.31 mg-N/L ในวันที่ 7 (ภาพที่ 23 D) โดยกล้าเชื้อ *Bacillus* TS23, TW24, TS21, BR001 และ TW34 สามารถลดไนเตรทได้ 59.40, 54.44, 53.48, 40.92 และ 39.03% ตามลำดับ (ภาพที่ 24 B)

การใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* 1% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ มีแนวโน้มที่แตกต่างกัน พบว่า ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ กล้าเชื้อ *Bacillus* 1% ทำให้ปริมาณไนเตรทลดลงได้ดีในวันที่ 4 ขณะที่ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ กล้าเชื้อ *Bacillus* 1% ลดไนเตรทได้ในวันที่ 4 ต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง และจากผลการทดสอบการใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% ส่งผลต่อเปลี่ยนแปลงของไนเตรทในระหว่างการทดลอง โดยมีแนวโน้มในลักษณะเดียวกันกับการใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* 1% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

กล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 1% และ 5% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ สามารถลดไนเตรทได้ดีตั้งแต่วันที่ 4 และวันที่ 7 ซึ่งประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* มีแนวโน้มที่แตกต่างกัน โดยการลดลงของไนเตรทในวันที่ 4 เชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 1% มีประสิทธิภาพในการลดไนเตรทได้ดีกว่ากล้าเชื้อ *Bacillus* 5%



ภาพที่ 23 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนเตรทหลังการใช้ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)
 หมายเหตุ (A, B) คือ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ, (C, D) คือ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 24 ประสิทธิภาพของ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ในการลดไนเตรทในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

หมายเหตุ (A) คือ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
(B) คือ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

3.7.4 การเปลี่ยนแปลงของออร์โทฟอสเฟตในระหว่างการทดลอง

จากการทดลองปริมาณกล้าเชื้อ *Bacillus* 1% และ 5% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่าน และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ มีการลดลงของออร์โทฟอสเฟตได้ต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 4 จนถึง 7 ของการทดลอง ดังนี้

1) การทดลองในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

หลังจากเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* 1% ในชุดการทดลองพบว่า ปริมาณออร์โทฟอสเฟตมีการลดลงต่อเนื่องจากวันเริ่มต้นจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งลดได้ดีในวันที่ 7 โดยมีปริมาณออร์โทฟอสเฟตเริ่มต้นเฉลี่ย 7.86 ± 0.29 mg-P/L ลดลงในวันที่ 4 เฉลี่ยเหลือ 5.42 ± 0.04 และวันที่ 7 ลดเหลือ 2.18 ± 0.19 mg-P/L ตามลำดับ (ภาพที่ 25 A) ซึ่งชุดการทดลองที่เติม *Bacillus* TW34 ส่งผลให้ปริมาณออร์โทฟอสเฟตลดลงมากที่สุดในวันที่ 4 มีค่า 0.30 ± 0.00 mg-P/L (95.80%) และวันที่ 7 *Bacillus* TW34, BR001 และ BR002 มีผลทำให้ลดลงเหลือเฉลี่ย 1.36 ± 0.00 mg-P/L (84.20, 84.00 และ 83.90% ตามลำดับ) (ภาพที่ 26 A) ชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* 5% ปริมาณออร์โทฟอสเฟตมีการลดลงต่อเนื่องเช่นเดียวกัน โดย *Bacillus* BR002 มีประสิทธิภาพทำให้ออร์โทฟอสเฟตลดลงในวันที่ 4 มากที่สุดเท่ากับ 79.27% (ปริมาณออร์โทฟอสเฟตเริ่มต้นเฉลี่ย 9.64 ± 0.05 mg-P/L) และ *Bacillus* 31 ทำให้ออร์โทฟอสเฟตลดลงมากที่สุดในวันที่ 7 เท่ากับ 88.89% (ภาพที่ 26 A) และมีออร์โทฟอสเฟตเหลืออยู่ในระบบเท่ากับ 1.34 ± 0.00 mg-P/L (ภาพที่ 25 B) ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมที่มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณออร์โทฟอสเฟต 14.20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

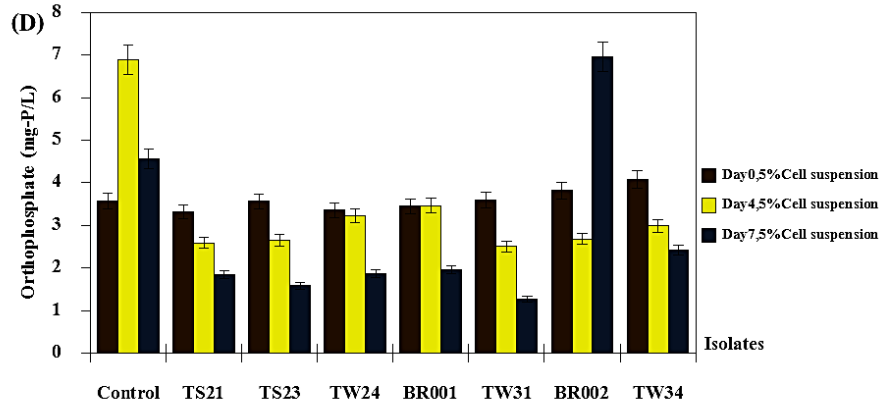
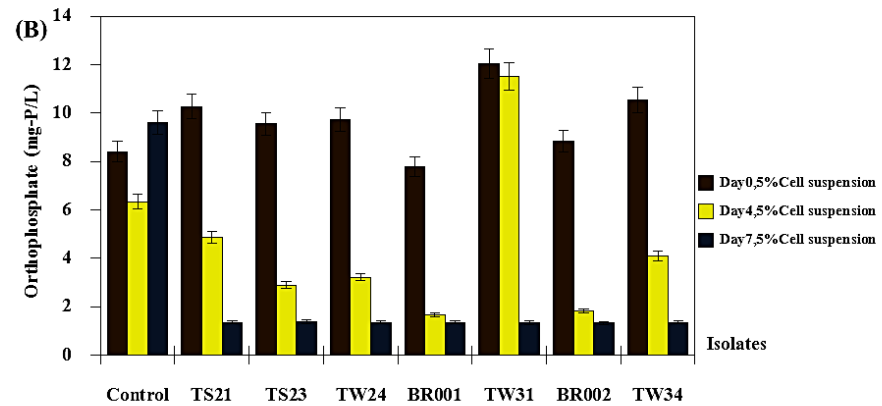
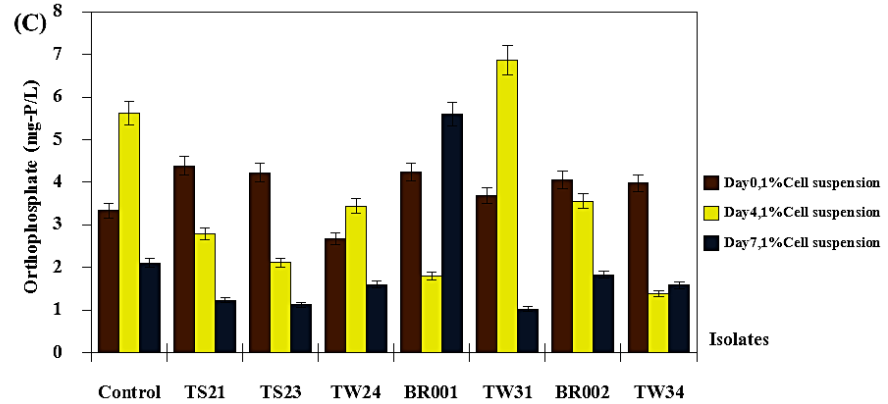
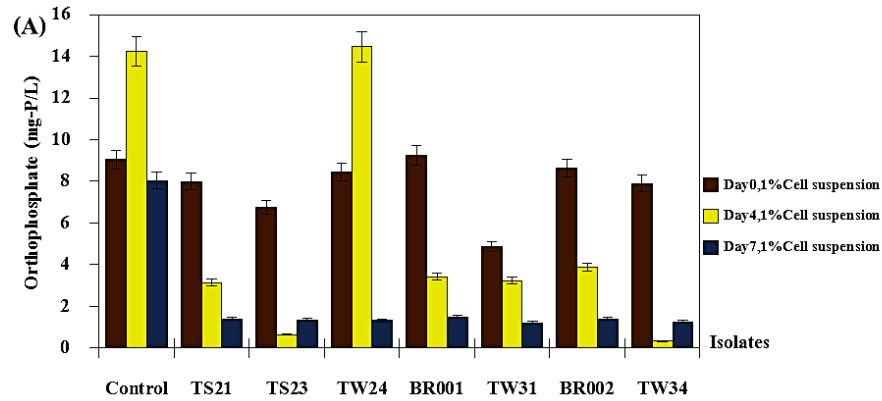
2) การทดลองในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

ภาพที่ 25 C พบว่า ปริมาณออร์โทฟอสเฟตลดลงในวันที่ 4 ถึงวันที่ 7 ชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* TW34, BR001, TS23, TS21 และ BR002 ปริมาณ 1% ทำให้ออร์โทฟอสเฟตลดลงได้ดีในวันที่ 4 เท่ากับ 65.81, 57.66, 49.98, 36.42 และ 12.27% ตามลำดับ จากปริมาณออร์โทฟอสเฟตเริ่มต้นเฉลี่ย 3.82 ± 0.04 mg-P/L ลดเหลือเฉลี่ย 2.33 ± 0.03 mg-P/L ซึ่งในชุดการทดลองที่เติม *Bacillus* TS23, TS21, TW34 และ BR002 มีการลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 เหลือปริมาณออร์โทฟอสเฟตในระบบเฉลี่ย 1.45 ± 0.07 mg-P/L คิดเป็น 73.33, 71.89, 60.05 และ 54.77% ตามลำดับ (ภาพที่ 26 B) หลังจากเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* 5% ในชุดการทดลอง พบว่า ปริมาณออร์โทฟอสเฟตมีการลดลงต่อเนื่อง *Bacillus* BR002 มีผลให้ปริมาณออร์โทฟอสเฟตลดลงมากที่สุด

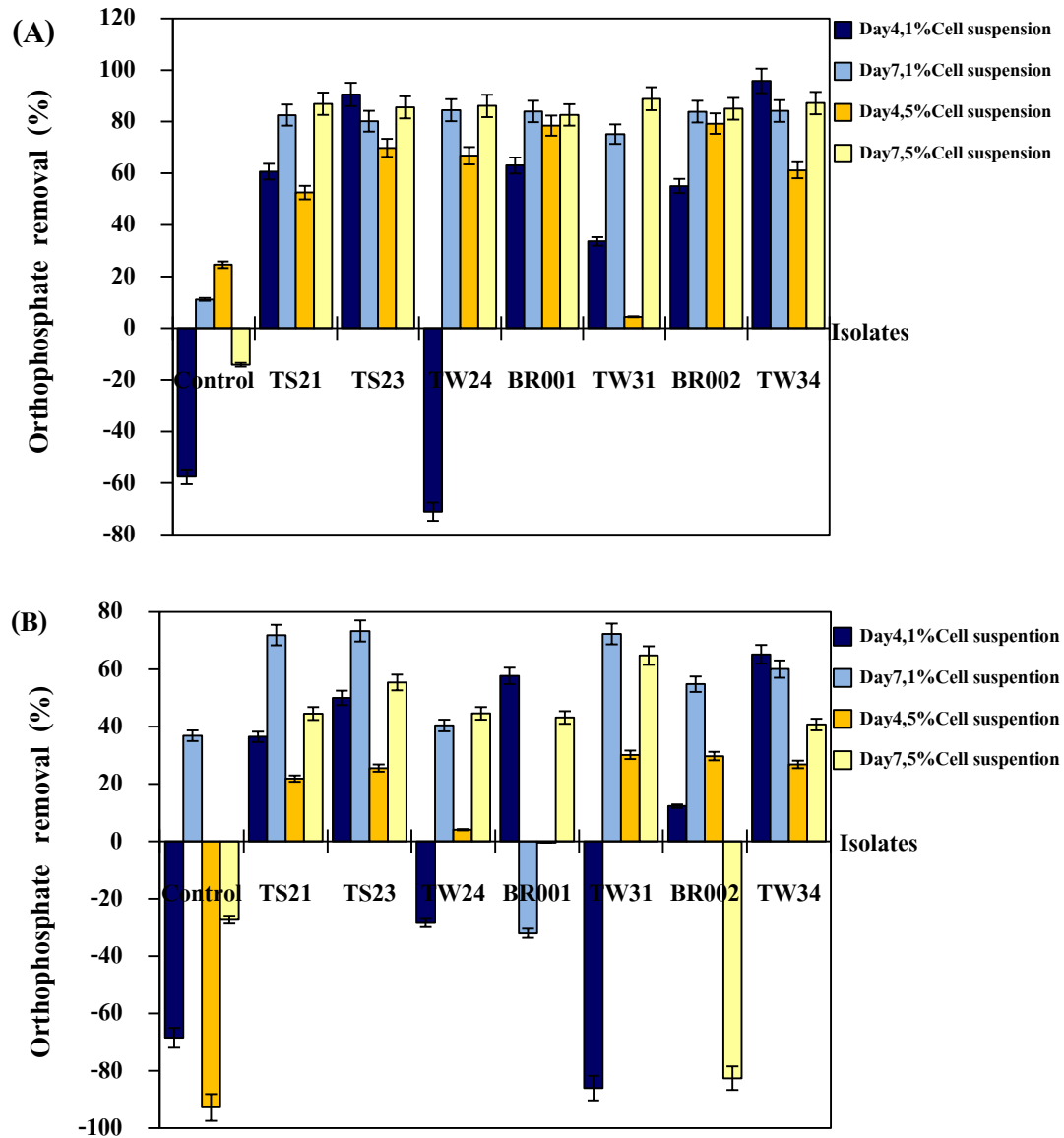
ในวันที่ 4 เท่ากับ 29.66% (ภาพที่ 26 B) และในวันที่ 7 ชุดการทดลองที่เติม *Bacillus* TW31, TS23, TW24, TS21, BR001 และ TW34 มีปริมาณออร์โทฟอสเฟตลดลงมากที่สุดเหลือ $1.26 \pm 0.1 - 2.42 \pm 0.01$ mg-P/L (หรือคิดเป็น 64.80, 55.39, 44.60, 44.55, 43.16 และ 40.75% ตามลำดับ) (ภาพที่ 25 D)

การใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 1% และ 5% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ มีผลต่อการลดของปริมาณออร์โทฟอสเฟตตั้งแต่วันที่ 4 และวันที่ 7 ของการทดลอง

ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ *Bacillus* มีแนวโน้มที่แตกต่างกัน โดยการลดลงของปริมาณออร์โทฟอสเฟตในวันที่ 4 การใช้ปริมาณกล้าเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 2 ความเข้มข้นมีแนวโน้มที่ไม่แตกต่างกัน ขณะที่ในวันที่ 7 ของการทดลอง กล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 1% มีผลต่อการลดของปริมาณออร์โทฟอสเฟตมากกว่าการใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* 5% เล็กน้อย



ภาพที่ 25 การเปลี่ยนแปลงของออร์โธฟอสเฟตหลังการใช้ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)
 หมายเหตุ (A, B) คือ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ, (C, D) คือ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 26 ประสิทธิภาพของ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ต่อการเปลี่ยนแปลงในออร์โธฟอสเฟต ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

หมายเหตุ (A) คือ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
(B) คือ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

3.7.5 การเปลี่ยนแปลงของสารแขวนลอยทั้งหมดในระหว่างการทดลอง

หลังจากทดลองเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่าน และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ มีการเปลี่ยนแปลงลดลงของสารแขวนลอยทั้งหมดในระหว่างการทดลองตั้งแต่วันที่ 4 ต่อเนื่องจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

1) การทดลองในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

ในการทดลองปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดอยู่ในช่วง 12.93 ± 0.20 ถึง 36.07 ± 1.87 mg/L หลังจากเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% มีประสิทธิภาพทำให้ปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดลดลงในวันที่ 4 จนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง *Bacillus* BR001 สามารถลดปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดในวันที่ 4 ได้มากที่สุดเท่ากับ 57.44% (จากปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดเริ่มต้น 33.37 ± 0.43 เหลือ 14.20 ± 0.10 mg/L) และในวันที่ 7 *Bacillus* TW24 สามารถลดปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดได้มากที่สุดเท่ากับ 63.12% สำหรับ *Bacillus* TS21, TS23, TW24, BR001, TW31, BR002 และ TW34 มีประสิทธิภาพทำให้ปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดลดลงจากวันเริ่มต้นจนถึงวันที่ 4 ถึงวันที่ 7 ของการทดลองเฉลี่ย 41.02 ถึง 55.17% ตามลำดับ (ภาพที่ 27 A) เช่นเดียวกับผลการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 7 ไอโซเลท ปริมาณ 5% มีประสิทธิภาพส่งผลให้ปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดลดลงจากวันเริ่มต้นจนถึงวันที่ 7 ของการทดลองเฉลี่ย 27.74 ถึง 55.70% ตามลำดับ ระหว่างวันที่ 4 ถึงวันที่ 7 *Bacillus* TS21 สามารถลดปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดได้มากที่สุดเท่ากับ 52.47% และ 71.74% ตามลำดับ (จากปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดเริ่มต้น 41.87 ± 0.67 เหลือ 11.83 ± 0.41 mg/L) ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมที่มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด 47.94% จนถึงสิ้นสุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 27 B)

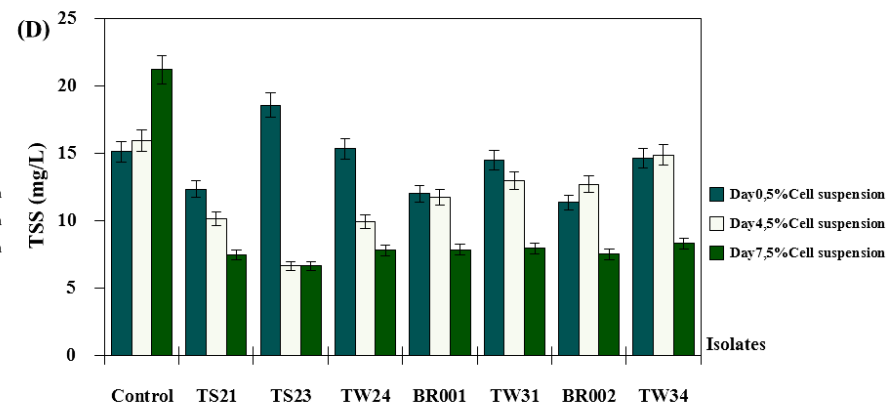
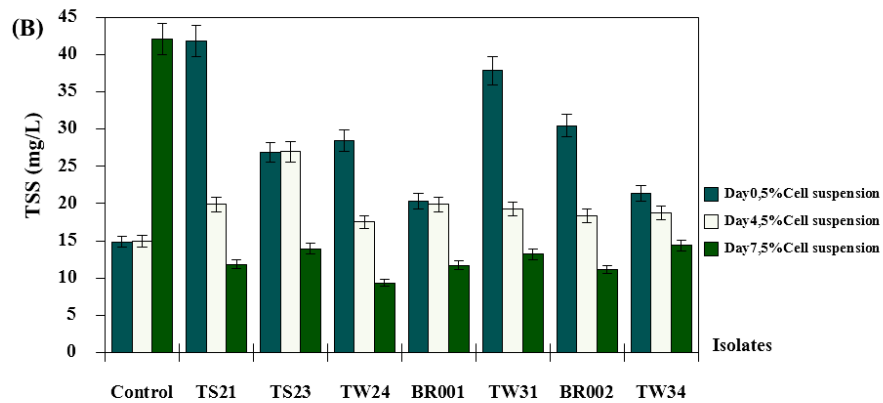
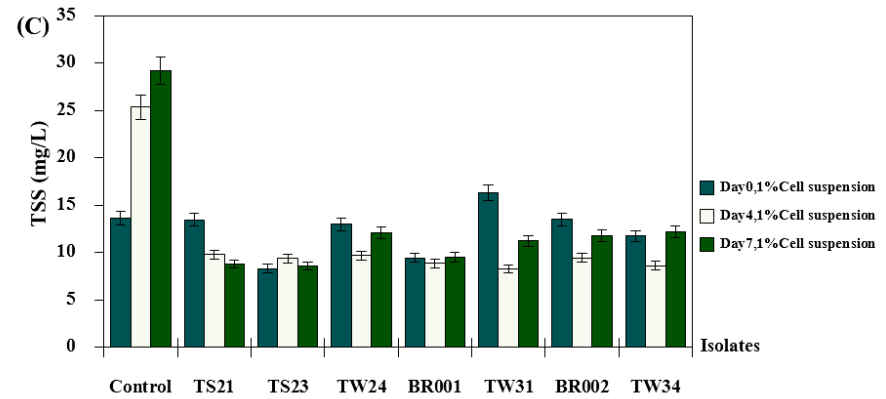
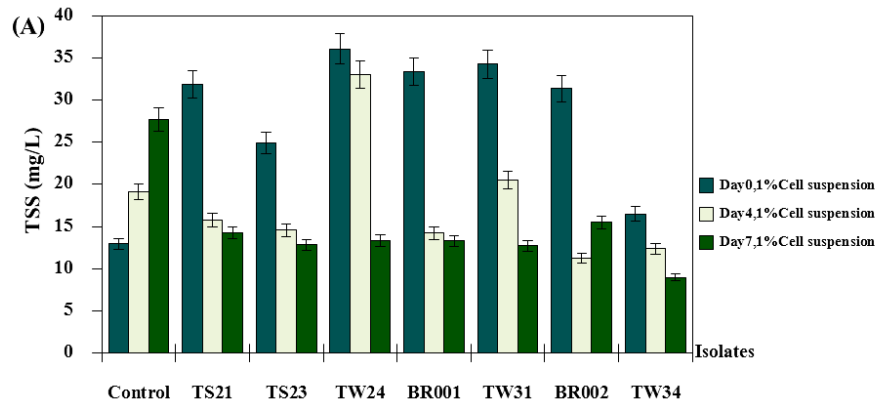
2) การทดลองในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

กล้าเชื้อ *Bacillus* 1% ทั้ง 7 ไอโซเลท สามารถทำให้ปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดลดลงในวันที่ 4 เฉลี่ย 27.43% โดย *Bacillus* TW31 สามารถลดปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดได้มากที่สุดเท่ากับ 49.18% จากปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดเริ่มต้น 16.33 ± 0.48 เหลือ 8.30 ± 0.35 mg/L หลังจากวันที่ 4 มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดระหว่างการทดลองในวันที่ 7 สำหรับ *Bacillus* TS21 สามารถลดปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดได้มากที่สุดเท่ากับ 34.65% (ภาพที่ 27 C) ในขณะที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* 5% ทำให้ปริมาณของสารแขวนลอย

ทั้งหมดลดลงในวันที่ 4 จนถึงวันที่ 7 จากปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 14.09 ± 0.33 mg/L ซึ่งลดลงเฉลี่ยเหลือ 10.30 ± 0.24 mg/L ในวันที่ 4 และลดลงเฉลี่ยเหลือ 7.63 ± 0.23 mg/L ในวันที่ 7 *Bacillus* TS23 สามารถลดปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดได้มากที่สุดเท่ากับ 64.27% จากปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดเริ่มต้น 18.57 ± 0.49 mg/L เหลือ 6.63 ± 0.12 mg/L ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมที่มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมด 40.40% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 27 D)

การใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ สามารถทำให้ปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดลดลงต่อเนื่องไปจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง ในขณะที่ชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% ทำให้ปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดลดลงในวันที่ 4 และมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดในวันที่ 7 ในชุดการทดลองที่เติมเชื้อ *Bacillus* TW24, BR001, TW31, BR002 และ TW34 สำหรับการใส่ *Bacillus* ปริมาณ 5% ทั้ง 2 ชุดการทดลองสามารถทำให้ปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดลดลงในวันที่ 4 ต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7

กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% สามารถลดปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดได้ดีทั้งในวันที่ 4 และวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมที่มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมด



ภาพที่ 27 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดหลังการใช้ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

หมายเหตุ (A, B) คือ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ, (C, D) คือ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

3.7.6 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ในระหว่างการทดลอง

ค่า pH มีการเปลี่ยนแปลงทั้งชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่าน และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ดังนี้

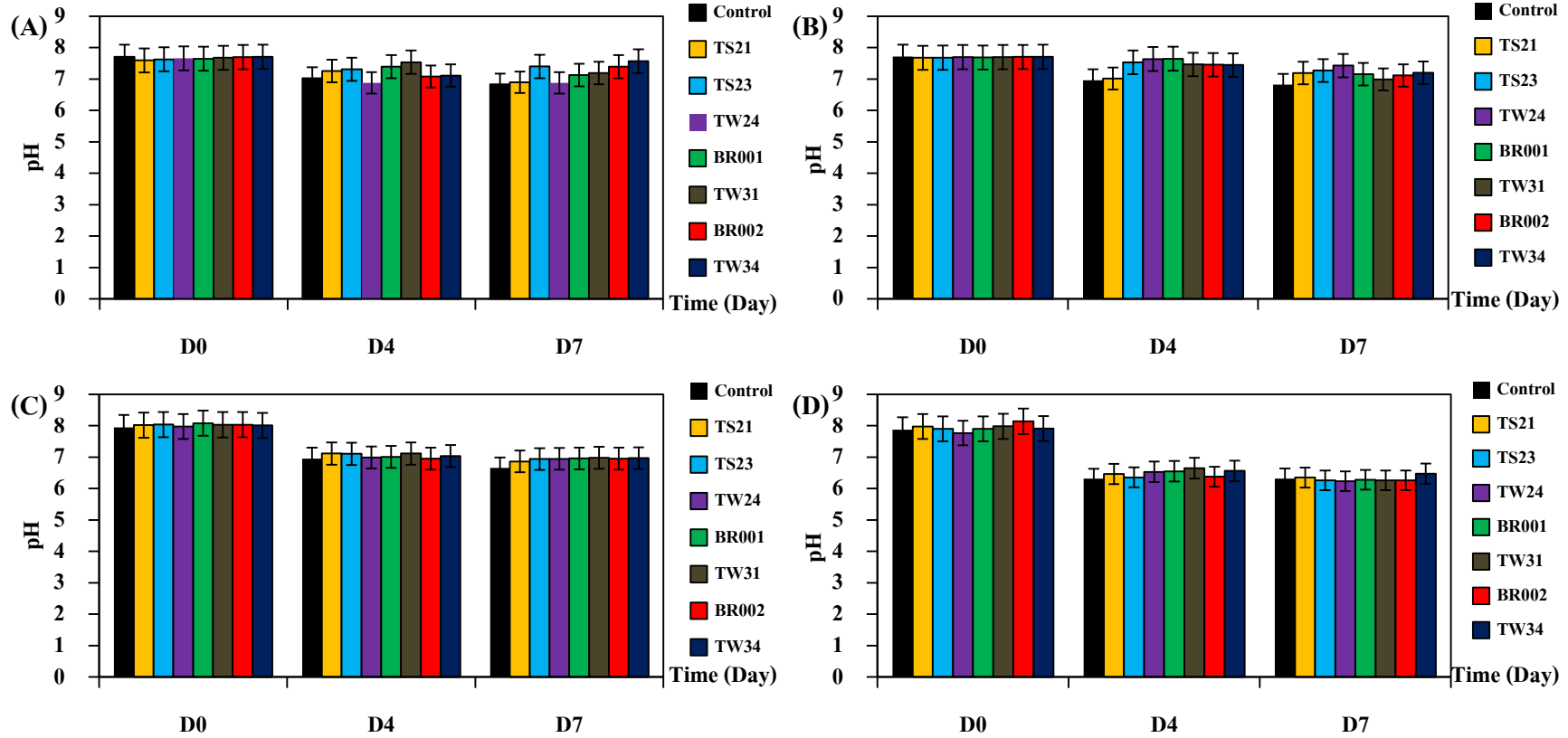
1) การทดลองในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

ค่า pH เริ่มต้นของชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% รวมถึงชุดควบคุม เฉลี่ยเท่ากับ 7.68 ± 0.01 มีการลดลงต่อเนื่องจากวันที่ 4 (pH เฉลี่ยเฉลี่ย 7.30 ± 0.38) และวันที่ 7 (pH เฉลี่ยเฉลี่ย 7.15 ± 0.48) ของการทดลอง ยกเว้นชุดการทดลองของกล้าเชื้อ *Bacillus* TS23, BR002 และ TW34 ปริมาณ 1% มีการเพิ่มขึ้นของค่า pH เล็กน้อยในวันที่ 7 เท่ากับ 7.40 ± 0.47 , 7.39 ± 0.47 และ 7.57 ± 0.47 ตามลำดับ และ TS21 ปริมาณ 5% มีค่า pH เท่ากับ 7.19 ± 0.47 (ภาพที่ 28 A, 28 B)

2) การทดลองในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

ชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% และชุดควบคุมมีการลดลงของค่า pH ตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 ลดลงจาก pH เริ่มต้นเฉลี่ย 7.97 ± 0.01 เฉลี่ยเหลือ 6.75 ± 0.24 ในวันที่ 4 และลดลงเหลือเฉลี่ย 6.61 ± 0.24 ในวันที่ 7 (ภาพที่ 28 C, D) โดยการลดของค่า pH ในชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อปริมาณ *Bacillus* 1% ไม่มีความแตกต่างกัน และค่า pH ที่ลดลงมากที่สุด คือ ชุดการทดลองที่เติมเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% มีค่า 6.23 ± 0.02

pH ในชุดทดลองที่เติมเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้ออยู่ในช่วง 7.6 ± 7.7 ซึ่งต่ำกว่าค่า pH เริ่มต้นของชุดทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้ออยู่ในช่วง 7.9 ± 8.0 และชุดทดลองที่เติมเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% ค่า pH มีการลดลงเล็กน้อยจากวันที่ 4 ไปจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง



ภาพที่ 28 การเปลี่ยนแปลง pH หลังการใช้ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)
 หมายเหตุ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ; (A) กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1%, (B) กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5%
 ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ; (C) กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1%, (D) กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5%

3.7.7 การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนละลายน้ำในระหว่างการทดลอง

ค่าออกซิเจนละลายน้ำมีการเปลี่ยนแปลงทั้งชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อปริมาณ *Bacillus* 1% และ 5% ในชุดการทดลองน้ำทั้งจากการเลี้ยงกึ่งที่ผ่าน และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ดังนี้

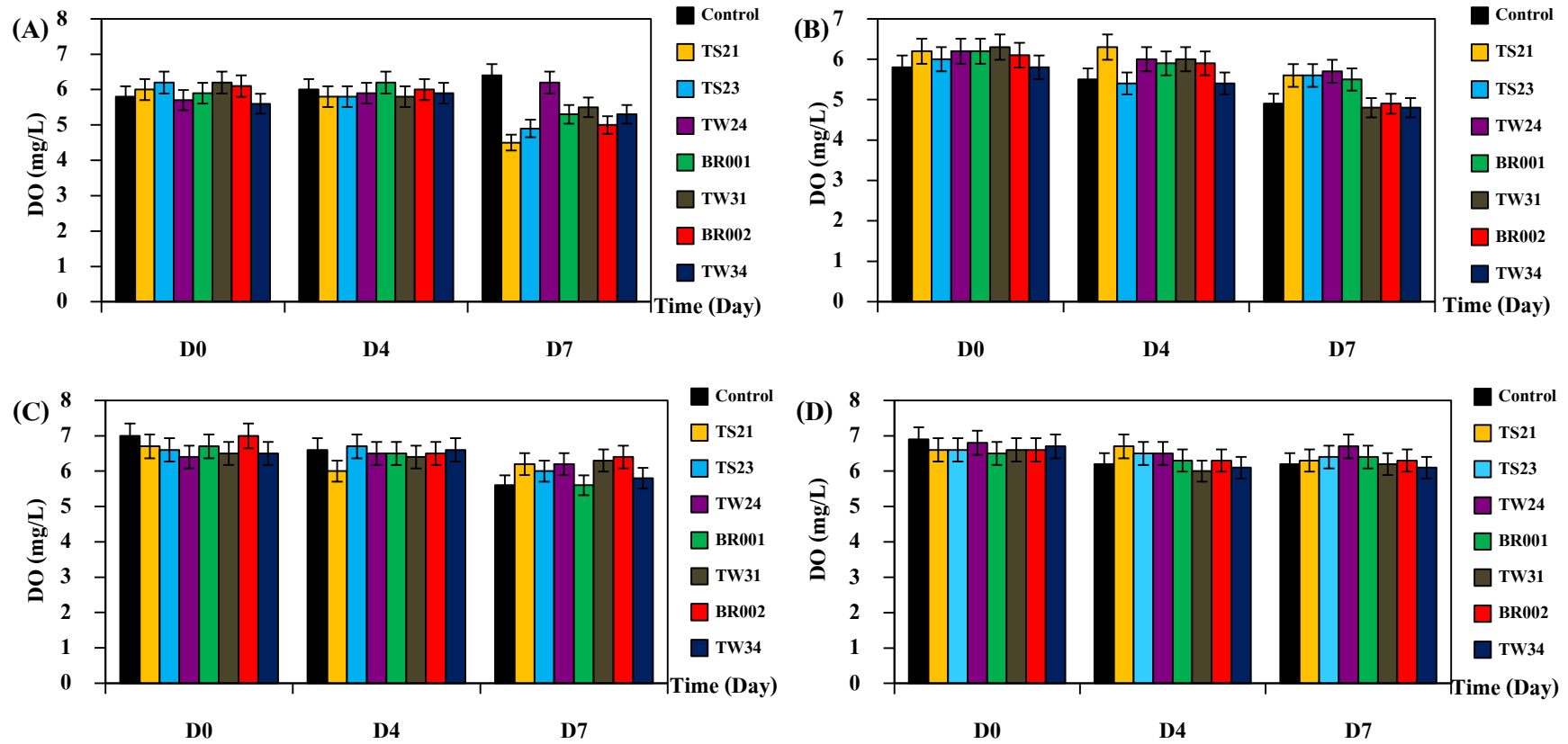
1) การทดลองในน้ำทั้งจากการเลี้ยงกึ่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

ในชุดการทดลองเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% รวมถึงชุดควบคุม มีค่าออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ยเริ่มต้น 5.80 ± 0.01 mg/L ชุดทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* 1% มีการเพิ่มขึ้นของออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ยเป็น 5.93 ± 0.02 mg/L ในขณะที่ชุดทดลองเติมเชื้อ *Bacillus* 5% มีการเพิ่มขึ้นของออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ย 5.88 ± 0.02 mg/L และทั้ง 2 ชุดการทดลองมีการลดลงในวันที่ 7 เฉลี่ยเหลือ 4.80 ± 0.01 mg/L (ภาพที่ 29 A, 29 B)

2) การทดลองในน้ำทั้งจากการเลี้ยงกึ่งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

ในชุดการทดลองเติมเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% รวมถึงชุดควบคุมค่าออกซิเจนละลายน้ำมีการลดลง โดยมีค่าออกซิเจนละลายน้ำเริ่มต้นเฉลี่ย 6.67 ± 0.02 mg/L ยกเว้นในชุดการทดลองเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* TS23, TW24, TW34 (ปริมาณ 1%) และ TS21 (ปริมาณ 5%) มีค่าออกซิเจนละลายน้ำเท่ากับ 6.70 ± 0.01 , 6.50 ± 0.01 , 6.60 ± 0.01 และ 6.70 ± 0.01 mg/L ตามลำดับ ในวันที่ 4 หลังจากนั้นปริมาณออกซิเจนละลายน้ำทั้งชุดการทดลองเติมเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% มีการลดลงเฉลี่ยเหลือ 6.17 ± 0.01 mg/L (ภาพที่ 29 C, 29 D)

ค่าออกซิเจนละลายน้ำในชุดทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% ในชุดการทดลองน้ำทั้งจากการเลี้ยงกึ่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อมีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 และลดลงในวันที่ 7 ต่างกับชุดการทดลองน้ำทั้งจากการเลี้ยงกึ่งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำลดลงในวันสุดท้ายของการทดลอง ในขณะที่ชุดทดลองที่เติมเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% ทั้ง 2 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งจากการทดลองค่าออกซิเจนละลายน้ำเริ่มต้นของทั้ง 2 ชุดทดลองในน้ำทั้งจากการเลี้ยงกึ่งไม่มีความแตกต่างกัน



ภาพที่ 29 การเปลี่ยนแปลงค่าออกซิเจนละลายน้ำหลังการใช้ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)
 หมายเหตุ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ; (A) กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1%, (B) กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5%
 ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ; (C) กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1%, (D) กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5%

3.7.8 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการทดลอง

อุณหภูมิในระหว่างการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงทั้งชุดการทดลองที่เดิมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่าน และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ดังนี้

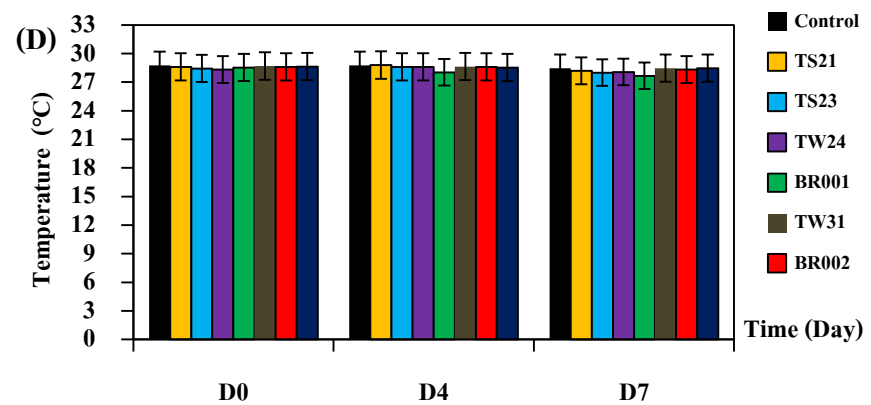
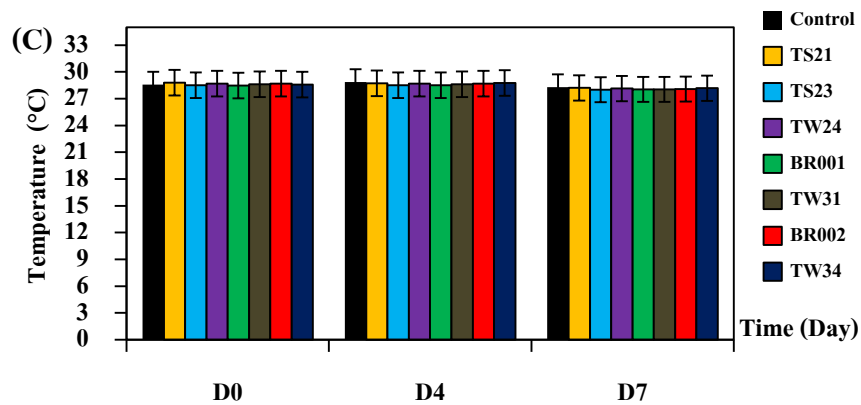
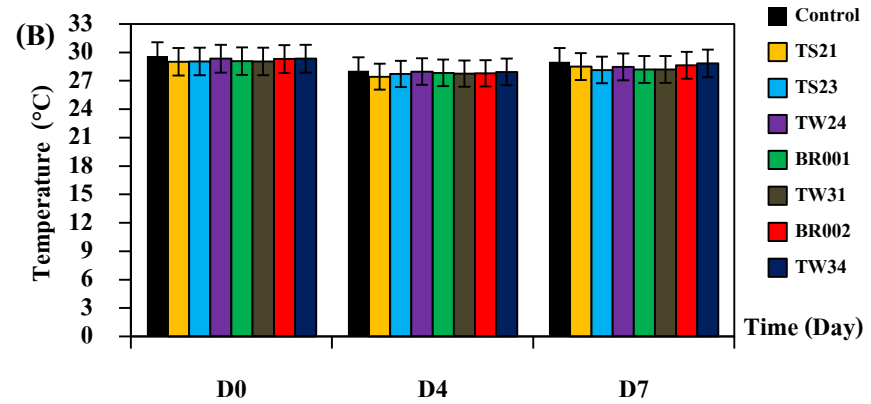
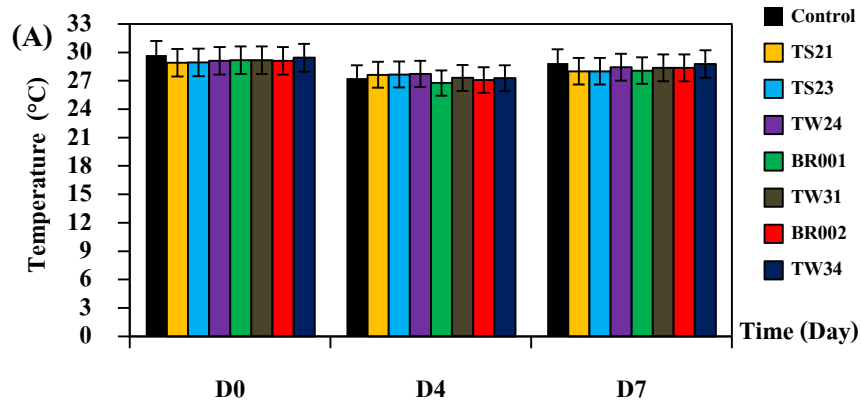
1) การทดลองในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

ชุดการทดลองที่เดิมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% อุณหภูมิในการทดลอง เริ่มต้นการทดลองจนถึงวันที่ 7 ของการทดลองอยู่ในช่วงเฉลี่ย 28.43 ± 0.73 ถึง $29.20 \pm 0.44^{\circ}\text{C}$ โดยมีการลดลงเล็กน้อยในวันที่ 4 เฉลี่ย $27.58 \pm 0.53^{\circ}\text{C}$ ในทุกชุดการทดลองรวมถึงชุดควบคุม (ภาพที่ 30 A, 30 B)

2) การทดลองในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

ชุดการทดลองที่เดิมกล้าเชื้อปริมาณ *Bacillus* 1% และ 5% อุณหภูมิในการทดลอง อยู่ในช่วงเฉลี่ย $28.59 \pm 1.00^{\circ}\text{C}$ ถึง $28.16 \pm 0.91^{\circ}\text{C}$ โดยมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 4 เฉลี่ย $28.87 \pm 1.55^{\circ}\text{C}$ ในทุกชุดการทดลองรวมถึงชุดควบคุม (ภาพที่ 30 C, 30 D)

จากการทดลอง พบว่า อุณหภูมิในระหว่างการทดลองของชุดทดลองที่เดิมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ทั้งในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ไม่มีความแตกต่างกัน โดยอุณหภูมิในการทดลองเฉลี่ยอยู่ในช่วง $27-29^{\circ}\text{C}$ ซึ่ง อุณหภูมิในชุดทดลองที่เดิมกล้าเชื้อ *Bacillus* ตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนถึงวันที่ 7 ไม่แตกต่างกัน



ภาพที่ 30 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหลังการใช้ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

หมายเหตุ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ; (A) กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1%, (B) กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5%

ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ; (C) กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1%, (D) กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5%

3.7.9 การเปลี่ยนแปลงของค่า Conductivity ในระหว่างการทดลอง

ค่า Conductivity มีการเปลี่ยนแปลงทั้งชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดการทดลองน้ำที่จากการเลี้ยงกึ่งที่ผ่าน และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ดังนี้

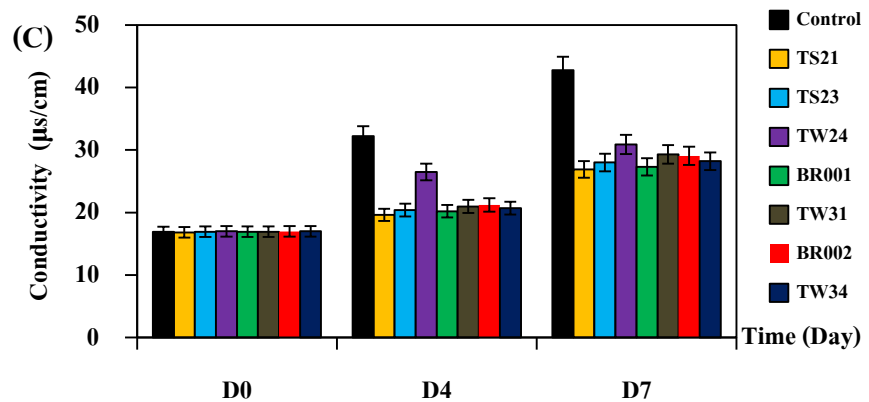
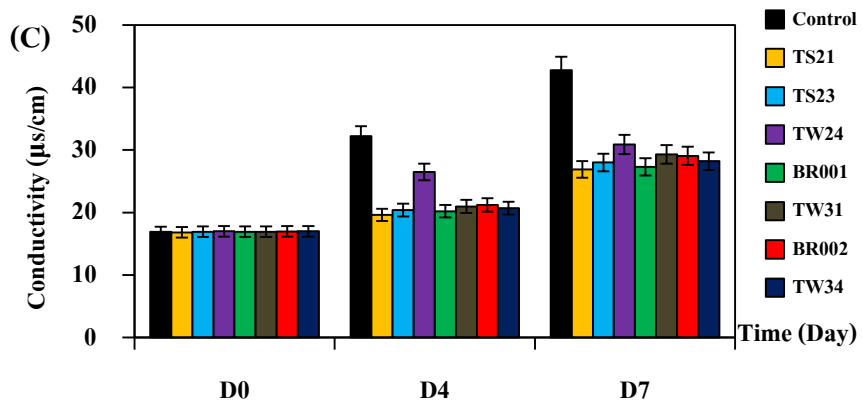
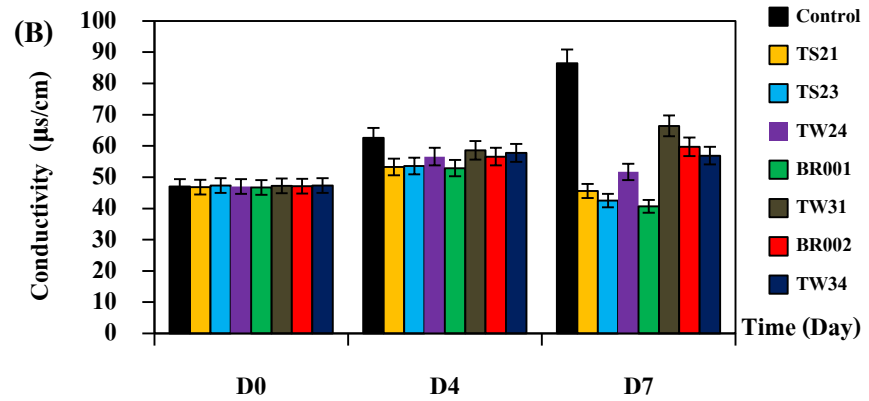
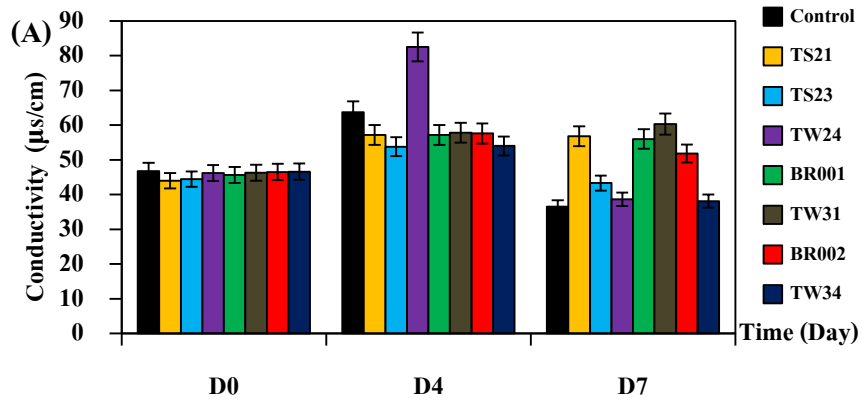
1) การทดลองในน้ำที่จากการเลี้ยงกึ่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

ในชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อปริมาณ *Bacillus* 1% และ 5% รวมถึงชุดควบคุม มีค่า Conductivity เฉลี่ย 46.43 ± 0.08 $\mu\text{s/cm}$ (วันที่ 0) มีการเพิ่มขึ้นเป็น 58.49 ± 0.06 $\mu\text{s/cm}$ ในวันที่ 4 และลดลงเหลือปริมาณเฉลี่ย 51.96 ± 0.06 $\mu\text{s/cm}$ ขณะที่ชุดการทดลองของกล้าเชื้อ *Bacillus* TW31 (ปริมาณ 1%) มีการเพิ่มขึ้นของค่า Conductivity จากวันที่ 4 ถึงวันที่ 7 เท่ากับ 60.30 ± 0.06 $\mu\text{s/cm}$ รวมถึงชุดควบคุม, TW31, BR002 และ TW34 (ปริมาณ 5%) มีการเพิ่มขึ้นของค่า Conductivity จากวันที่ 4 ถึงวันที่ 7 เท่ากับ 86.50 ± 0.01 , 66.40 ± 0.01 , 59.70 ± 0.01 และ 56.90 ± 0.01 ตามลำดับ (ภาพที่ 31 A, 31 B)

2) การทดลองในน้ำที่จากการเลี้ยงกึ่งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

ในชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% รวมถึงชุดควบคุม มีค่า Conductivity เฉลี่ยเริ่มต้น 16.99 ± 0.02 $\mu\text{s/cm}$ มีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 และวันที่ 7 เฉลี่ย 21.98 ± 0.01 และ 25.18 ± 0.03 $\mu\text{s/cm}$ ตามลำดับ ชุดการทดลองเติมเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% มีการเพิ่มขึ้นของค่า Conductivity อย่างต่อเนื่องจนถึงสิ้นสุดการทดลอง ชุดควบคุมมีการเพิ่มขึ้นมากที่สุดเท่ากับ 32.20 ± 0.01 $\mu\text{s/cm}$ (วันที่ 4) และ 42.77 ± 0.04 $\mu\text{s/cm}$ (วันที่ 7) ในขณะที่ชุดการทดลองของกล้าเชื้อ *Bacillus* 5% ค่า Conductivity ลดลงในวันที่ 7 (ภาพที่ 31 C, 31 D) ซึ่งในชุดการทดลองของกล้าเชื้อ *Bacillus* TW24 มีการลดลงมากที่สุดเท่ากับ 20.90 ± 0.01 $\mu\text{s/cm}$

ค่า Conductivity ในชุดทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% ในชุดการทดลองน้ำที่จากการเลี้ยงกึ่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อมีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 และลดลงในวันที่ 7 ในขณะที่ชุดการทดลองน้ำที่จากการเลี้ยงกึ่งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ค่า Conductivity เพิ่มขึ้นในวันที่ 4 จนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง และชุดทดลองที่เติมเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% ในการทดลองน้ำที่จากการเลี้ยงกึ่งทั้ง 2 ชุดการทดลอง ค่า Conductivity เพิ่มขึ้นในวันที่ 4 และลดลงในวันที่ 7 ซึ่งค่า Conductivity เริ่มต้นในชุดการทดลองน้ำที่จากการเลี้ยงกึ่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อมีค่าที่สูงกว่าในชุดการทดลองน้ำที่จากการเลี้ยงกึ่งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 31 การเปลี่ยนแปลงค่า Conductivity หลังการใช้ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

หมายเหตุ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ; (A) กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1%, (B) กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5%

ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ; (C) กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1%, (D) กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5%

3.7.10 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเค็มในระหว่างการทดลอง

ค่าความเค็มมีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 ของการทดลองและเปลี่ยนแปลงในระหว่างการทดลองทั้งชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อปริมาณ *Bacillus* 1% และ 5% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่าน และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ดังนี้

1) การทดลองในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

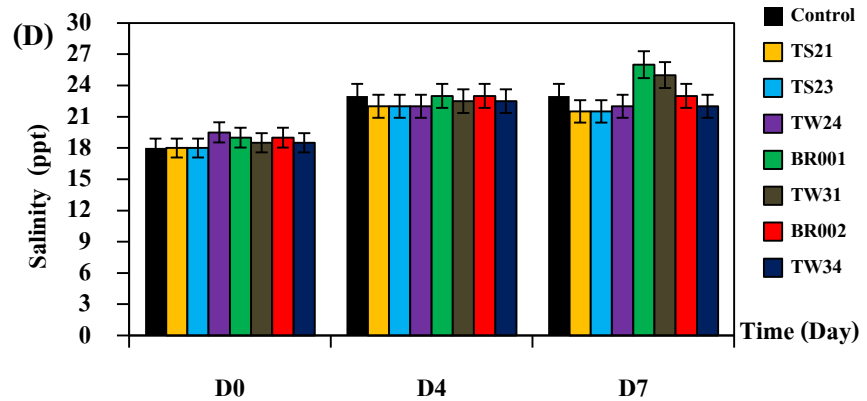
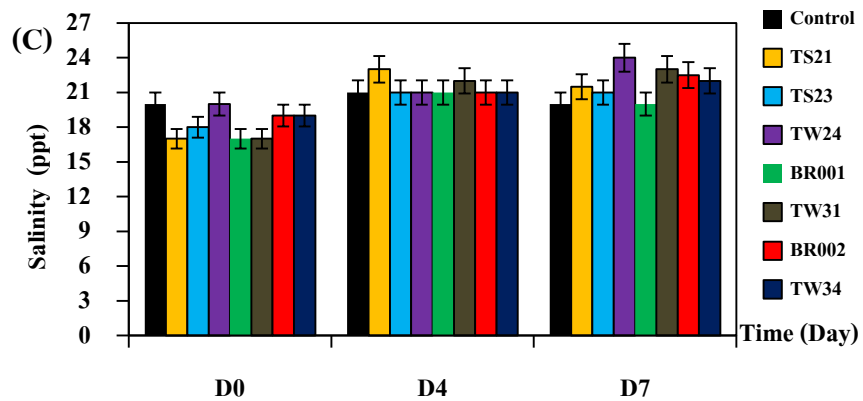
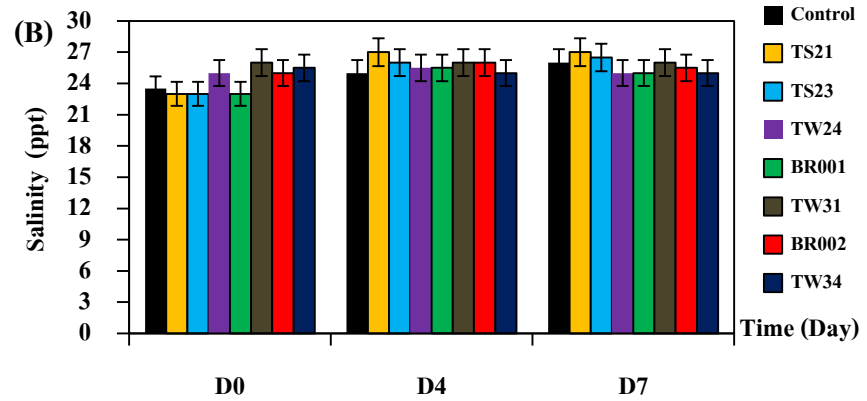
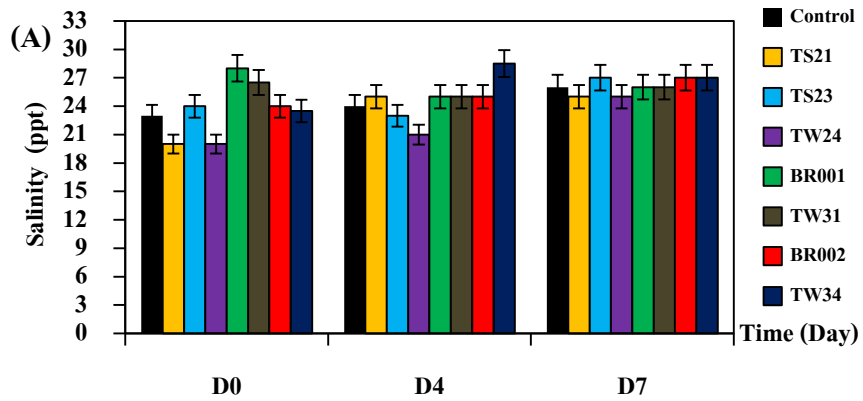
ชุดการทดลองของกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% ความเค็มมีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 และวันที่ 7 โดยความเค็มเริ่มต้นเฉลี่ย 23.63 ± 0.04 ppt เพิ่มขึ้นเป็น 24.56 ± 0.04 ppt (วันที่ 4) และ 26.13 ± 0.04 ppt (วันที่ 7) ตามลำดับ ชุดการทดลองของกล้าเชื้อปริมาณ *Bacillus* 5% ความเค็มมีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 และวันที่ 7 โดยความเค็มเริ่มต้นเฉลี่ย 24.25 ± 0.04 ppt เพิ่มขึ้นเป็น 25.75 ± 0.04 ppt วันที่ 7 ของการทดลอง (ภาพที่ 32 A, 32 B)

2) การทดลองในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

ชุดการทดลองของกล้าเชื้อปริมาณ *Bacillus* 1% และ 5% ความเค็มมีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 โดยความเค็มเริ่มต้นเฉลี่ย 18.47 ± 0.04 ppt เพิ่มขึ้นเป็น 21.94 ± 0.04 ppt ซึ่งชุดการทดลองของกล้าเชื้อปริมาณ *Bacillus* 1% และ 5% มีความเค็มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 ของการทดลองเฉลี่ย 22.38 ± 0.04 ppt (ภาพที่ 32 C, 32 D)

จากการทดลอง พบว่า ค่าความเค็มในชุดทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ มีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 และวันที่ 7 เช่นเดียวกับชุดทดลองของกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% ความเค็มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งค่าความเค็มในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อต่ำกว่าความเค็มในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

ค่าความเค็มในชุดทดลองของกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนถึงวันที่ 7 ไม่แตกต่างกัน โดยค่าความเค็มเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 และวันที่ 7 ของการทดลอง



ภาพที่ 32 การเปลี่ยนแปลงค่าความเค็มหลังการใช้ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

หมายเหตุ ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ; (A) กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1%, (B) กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5%

ชุดการทดลองน้ำจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ; (C) กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1%, (D) กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5%

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการศึกษา

4.1 การคัดแยก *Bacillus* และลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี

การศึกษาค้นคว้าคัดแยกแบคทีเรียโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถคัดแยกได้เบื้องต้น จำนวน 32 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ รูปร่าง สามารถสร้างเอนไซม์ Catalase และ Oxidase ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำ และตัวอย่างดิน สอดคล้องกับการรายงานของ Liu และคณะ (2013) ที่ศึกษาการวิเคราะห์ความหลากหลายทางสายวิวัฒนาการของกลุ่ม *Bacillus pumilus* จากความหลากหลายของสิ่งแวดล้อมทางทะเล พบว่า การคัดแยกเชื้อจำนวน 79 ไอโซเลท ส่วนใหญ่เชื้อแบคทีเรียที่พบจะเจอในตะกอนดิน และผิวน้ำ รวมถึงมีการระบุพบในลำไส้ของปลา และกุ้งเช่นกัน Boeyé และ Herts (1976) พบว่าสามารถพบ *Bacillus* ได้แก่ *B. licheniformis*, *B. subtilis* และ *B. pumilus* เป็นกลุ่มหลัก รองลงมาคือ *B. firmus* และ *B. sphaericus* ได้ทั้งตะกอนดินในทะเล และน้ำทะเล ทำให้เห็นได้ว่า ในสิ่งแวดล้อมทางทะเลมีความหลากหลายของเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* และสามารถพบได้มากกว่า 20% ของจุลินทรีย์จำพวก Heterotrophic flora บริเวณใกล้ฝั่ง และลดลงเมื่อห่างจากฝั่ง

จากผลการคัดแยกเชื้อทั้ง 3 วิธี พบว่า วิธีการคัดแยกเชื้อแบบให้ความร้อน (Heat treatment) สามารถคัดแยกเชื้อ *Bacillus* ได้สูงสุดจำนวน 15 ไอโซเลท ซึ่งการใช้วิธี Heat shock แยกแบคทีเรียที่สร้างสปอร์จากแบคทีเรียอื่น ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (พรรณศรี และคณะ, 2548) เนื่องจากการให้ความร้อน 80°C นาน 10 นาที และช็อคด้วยน้ำอุณหภูมิห้องทันที (ณัฐนิชา และคณะ, 2560; Loncar *et al.*, 2013) เป็นวิธีที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ได้ดี โดย *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม สามารถสร้างเอนโดสปอร์ภายในเซลล์เมื่อสภาพแวดล้อมมีความร้อนที่เพิ่มขึ้น และมีชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมได้นาน (Purivirojkul *et al.*, 2005; Azzouz *et al.*, 2014) รองลงมาได้จากวิธี Serial dilution method จำนวน 14 ไอโซเลท ซึ่งเป็นการคัดแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ที่มีส่วนผสมของ NaCl มีความเค็มใกล้เคียงกับตัวอย่างน้ำ และตัวอย่างดินที่ได้นำมาคัดแยกแบคทีเรีย โดยความเค็มมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus* ซึ่งในการทดลองได้ใช้ความเค็ม 20 ppt (NaCl 2%) สำหรับการคัดแยก *Bacillus* ทนเค็มเบื้องต้นทำให้ได้เชื้อที่เจริญเติบโตได้ดี สามารถใช้สารอินทรีย์ และทนเค็มจึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง เช่น

บ่อเลี้ยงกุ้งมีค่าความเค็มประมาณ 1–2.5% NaCl (10–25 ppt) และคัดแยก *Bacillus* โดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบ Enrichment and heat treatment ที่มีการบ่มเชื้อก่อนนำมาทำการเจือจางเชื้อเป็นเวลา 4 วัน เพื่อให้ได้เชื้อที่มีการใช้แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างเต็มที่แล้วนำมาทำการ Heat shock ในการคัดแยกเชื้อต่อไปซึ่งสามารถคัดแยกเชื้อ *Bacillus* ได้ 3 ไอโซเลท

4.2 การทดสอบการออกซิไดซ์แอมโมเนียและการย่อยไนไตรท์ โดยวิธี Griess–Ilosvay method

Bacillus 24 ไอโซเลท ที่ให้ผลเป็นบวก เมื่อนำมาทดสอบการออกซิไดซ์แอมโมเนีย และไนไตรท์ด้วยวิธี Griess–Ilosvay method โดยทดสอบด้วย Nitrite reagent พบว่าให้ผลการทดลองสอดคล้องกับศึกษาของ Lin และคณะ (2007) ที่ทำการคัดแยก และศึกษาคุณสมบัติของ Heterotrophic nitrifying–*Bacillus* sp. ที่ให้ผลบวกเมื่อหยด Nitrite reagent แสดงให้เห็นว่า เชื้อสามารถออกซิไดซ์ไนไตรท์ หรือไนเตรทได้ ซึ่งในการทดลองใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ที่เติม NaCl 2% และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5% เพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ ซึ่ง *Bacillus* ทั้ง 24 ไอโซเลท มีคุณสมบัติการออกซิไดซ์แอมโมเนียเบื้องต้นที่เป็นส่วนหนึ่งในกระบวนการ Nitrification (Zhang *et al.*, 2012; Chankaew *et al.*, 2018)

4.3 การทดสอบคุณสมบัติของ *Bacillus* ต่อการเป็น Heterotrophic nitrifying–denitrifying bacteria

เนื่องจากเฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรียเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีกว่ากลุ่มออโตโทรฟิกไนโตรฟีคไนโตรฟีคไนโตรฟีคแบคทีเรีย (Autotrophic nitrifying bacteria) (Kim *et al.*, 2005) และประสิทธิภาพการลดแอมโมเนียของ Heterotrophic *Bacillus* มีกระบวนการที่ซับซ้อนน้อยกว่าแบคทีเรีย Autotroph (นฤมล และคณะ, 2556) จึงได้นำ *Bacillus* ที่ได้จากการคัดแยก ทำการทดสอบคุณสมบัติการย่อยแอมโมเนีย และการย่อยไนไตรท์เบื้องต้น มาทำการศึกษาต่อในคุณสมบัติการเป็น Heterotrophic nitrifying–denitrifying bacteria

4.3.1 การทดสอบความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย

จากการทดลองการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ *Bacillus* spp. ในสูตรอาหาร HNM ที่มีส่วนผสมของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ซึ่งเป็นแหล่งสารอนินทรีย์ไนโตรเจนของเชื้อ (Sangnoi *et al.*, 2017) สอดคล้องกับสูตรอาหารในการศึกษาของ Huang และคณะ (2017) ที่คัดแยก *B. litoralis* N31 ได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งที่เลี้ยงแบบหนาแน่น โดยใช้ Basic screening medium (BSM) ที่มีส่วนผสมของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 g/L นอกจากนี้ Sheela และคณะ (2015) ได้ใช้อาหาร Ammonium enrich medium

ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Zhang และคณะ (2012) ที่ได้ทำแยกเชื้อโพรท็อกแบคทีเรีย โดยใช้อาหาร HNM ที่มีส่วนผสมของ Sodium succinate และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.66 g/L จะเห็นได้ว่าการเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นส่วนช่วยในการคัดเลือก และเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้ หรือกำจัดแอมโมเนียได้ และทำให้แบคทีเรียที่ไม่สามารถเจริญในสภาวะที่มีแอมโมเนียได้ หรือไม่สามารถใช้แอมโมเนียได้ลดลง

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า *Bacillus* spp. ที่มีความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนียได้มากกว่า 80% จำนวน 8 ไอโซเลท (ปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้น 378.29 ± 24.31 mg-N/L) ทำการทดสอบ 5 วัน *Bacillus* BR002 สามารถลดแอมโมเนียได้สูงสุดเท่ากับ 21.75 ± 7.04 รองลงมาคือ *Bacillus* TW24 และ BR001 มีปริมาณแอมโมเนียคงเหลือ 22.96 ± 32.94 และ 26.80 ± 23.30 mg-N/L ตามลำดับ ซึ่งประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในการลดแอมโมเนียนั้นสามารถลดได้ดีกว่าผลการศึกษาของ Yang และคณะ (2011) ที่ได้ทดสอบการลดแอมโมเนียของ *B. subtilis* A1 ที่มีปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้น 257.23 ± 1.97 mg-N/L สามารถลดได้ $19.5 \pm 1.6\%$ และทดสอบที่ระดับปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้นเท่ากับ 104.12 ± 1.27 mg-N/L ลดลงเหลือ 69.23 ± 2.06 mg-N/L ภายในเวลา 120 ชม. รวมถึงจากการศึกษาของ Zhang และคณะ (2012) ที่ได้ทดสอบประสิทธิภาพในกระบวนการ Nitrification ของ *B. methylotrophicus* L7 ในอาหาร HNM พบว่า ชุดทดลองที่มีแอมโมเนียเริ่มต้นเฉลี่ย $78.75-427.44$ mg-N/L เชื้อ *B. methylotrophicus* L7 ลดแอมโมเนียได้ $11.08-41.02\%$ ซึ่งในเวลา 9 วัน *B. methylotrophicus* L7 ลดแอมโมเนียจาก 146.71 mg-N/L เหลือ 38.29 mg-N/L จากการทดสอบความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ *Bacillus* spp. ในครั้งนี้ความเข้มข้นของแอมโมเนียอยู่ในระดับปานกลาง โดยประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในการทดสอบมีประสิทธิภาพสูงกว่าการรายงานผลการลดแอมโมเนียของ Heterotrophic nitrifier สายพันธุ์อื่น เช่น *Providencia rettger* YL ที่ลดแอมโมเนียได้ในช่วง 300 mg/L (Taylor *et al.*, 2009) เป็นต้น โดยประสิทธิภาพการลดแอมโมเนียที่เกิดขึ้นภายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้ *Bacillus* สามารถใช้เพื่อการเจริญเติบโต (Brierley and Wood, 2001)

4.3.2 การทดสอบความสามารถในการออกซิไดซ์ไนโตรที่

จากการทดสอบพบว่า *Bacillus* spp. ที่มีความสามารถในการออกซิไดซ์ไนโตรที่ จากการเลี้ยงในอาหาร NDM ได้มากกว่า 20% ได้แก่ *Bacillus* BR001 สามารถออกซิไดซ์ไนโตรที่ ได้มากที่สุดเท่ากับ $58.15 \pm 4.17\%$ มีปริมาณไนโตรที่เริ่มต้นเท่ากับ 102.42 ± 2.74 mg-N/L เหลือเพียง 42.85 ± 1.55 mg-N/L โดยกระบวนการที่เกิดขึ้นเป็นกระบวนการ Nitrification เป็นการเปลี่ยนไนโตรที่ให้เป็นไนเตรท (พรรณศรี และคณะ, 2548; สุบัณฑิต และวีระพงศ์, 2552; Zhang *et al.*, 2012; Chankaew *et al.*, 2018) *Bacillus* ใช้ NaNO_2 เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของสูตรอาหารที่สอดคล้องกับการศึกษาของ Song และคณะ (2011) และ Zhang และคณะ (2012) ที่สามารถนำมาทำการทดสอบกระบวนการ Denitrification ของ *B. coagulans* และ *B. methylotrophicus* L7 ได้

จากผลการทดลองพบว่า *Bacillus* ทั้ง 24 ไอโซเลท ที่นำมาทำการทดสอบสามารถออกซิไดซ์ไนโตรที่ได้ในปริมาณที่น้อย โดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 10–25% อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียจะถูกยับยั้ง เมื่อความเข้มข้นของไนโตรที่สูง โดยความเข้มข้นของไนโตรที่มากกว่า 20 mg-N/L เป็นค่าที่สำคัญต่อการลดปริมาณแบคทีเรีย (Song *et al.*, 2011) นอกจากนี้ยังสามารถส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน *nirS* และ *nirK* ทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดไนโตรที่ของแบคทีเรียลดลง (Yu *et al.*, 2005) เช่น *B. methylotrophicus* L7 สามารถกำจัดไนโตรที่ได้เฉลี่ยอัตราวันละ 5.81 mg-N/L ภายใน 7 วัน โดยมีไนโตรที่เริ่มต้น 55–65 mg-N/L (Zhang *et al.*, 2012) ซึ่งไนโตรที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นได้ในกระบวนการของ Heterotrophic nitrification ส่วนใหญ่จะกำจัดได้จากแบคทีเรียเพียงไม่กี่ชนิด (Joo *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2011)

4.3.3 การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท

หลังจากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร DM ที่มีปริมาณไนเตรทเริ่มต้น 384.90 ± 0.49 mg-N/L *Bacillus* spp. มีความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรทได้เฉลี่ย 25–46% จำนวน 6 ไอโซเลท ซึ่ง *Bacillus* BR001, TW24, TS41, TS24 และ TS23 สามารถรีดิวซ์ไนเตรทได้ 30–40% และ *Bacillus* TS21 สามารถรีดิวซ์ไนเตรทได้มากที่สุด คือ $46.75 \pm 1.19\%$ ประสิทธิภาพของ *Bacillus* ทั้ง 24 ไอโซเลทสามารถรีดิวซ์ไนเตรทได้ไม่สูงมากนัก เนื่องจากเมื่อ *Bacillus* มีการใช้ KNO_3 ในกระบวนการ Denitrification ในสภาวะที่มีอากาศ ไนเตรทสามารถเปลี่ยนกลับไปเป็นไนโตรที่ และเปลี่ยนกลับมาเป็นไนเตรทในกระบวนการ Nitrification ก่อนถูกรีดิวซ์ได้ (Wen and Wei, 2011)

ซึ่งการลดลงของปริมาณไนเตรทในการทดลองสอดคล้องกับการรายงานผลของ Zhang และคณะ (2012) ที่พบว่าหลังจากไนเตรทถูกใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหาร DM จะมีการผลิตไนไตรท์เกิดขึ้น ซึ่งบ่งชี้ว่า *B. methylophilicus* L7 สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ หรือก๊าซไนโตรเจนได้ตามกระบวนการ Denitrification

การเปลี่ยนแปลงของไนเตรทในระบบที่มีการใช้ *Bacillus* spp. สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ หรือก๊าซไนโตรเจนในกระบวนการ Denitrification ในการทดลองครั้งนี้ได้มีการทดสอบเพิ่มเติมด้วยวิธีการ Nitrate reduction test (Knapp and Clark, 1984) พบว่า *Bacillus* spp. ที่นำมาเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร DM และ Nitrate broth เมื่อหยดสาร Sulfanilic acid และ N,N-Dimethyl-1-Naphthylamine ให้ผลไม่เปลี่ยนสี แสดงให้เห็นว่า ภายในระบบมีการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์เกิดขึ้นด้วยปฏิกิริยาจาก Periplasmic nitrate oxidase (NAP) ก่อนจะถูกรีดิวซ์ต่อไป และเมื่อเติม Zinc powder ให้ผลไม่เปลี่ยนสี นั่นคือ อาจเป็นไปได้ว่าไนไตรท์ที่เกิดขึ้นในระบบสามารถเปลี่ยนไปเป็นไนตริกออกไซด์ด้วยปฏิกิริยาจากเอนไซม์ Nitrite reductase ที่สามารถเปลี่ยนไปเป็นไนตริกออกไซด์ และก๊าซไนโตรเจนในขั้นตอนต่อไป (Nimrat *et al.*, 2004) ซึ่ง *Bacillus* บางสายพันธุ์ถูกระบุว่าสามารถทำให้เกิดกระบวนการ Denitrification ในสภาพมีอากาศได้ (Kim *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Navin *et al.*, 2014; Sheela *et al.*, 2015; Rout *et al.*, 2017) โดยทำให้ไนเตรทถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรท์ ไนตริกออกไซด์ และก๊าซไนโตรเจน ตามลำดับ (Ai *et al.*, 2011)

จากการศึกษาคุณสมบัติของ *Bacillus* ต่อการเป็น Heterotrophic nitrifying-denitrifying bacteria พบว่า *Bacillus* spp. สามารถออกซิไดซ์ปริมาณแอมโมเนียได้ดี ซึ่งอาจเนื่องจากปฏิกิริยา Hydroxylamine oxidase (HAO) ที่เร่งการเปลี่ยนแปลงจาก NH_3 เป็น NO_2^- ที่เป็นเอนไซม์ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์ (Krishnani, 2010; Pal *et al.*, 2012) และความสามารถในการออกซิไดซ์ไนไตรท์ และรีดิวซ์ไนเตรทได้ หรืออาจเปลี่ยนได้ในปริมาณที่ไม่มากเกิดจากปริมาณไนไตรท์ และไนเตรทที่เป็นสารอนินทรีย์ในไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณที่เข้มข้นมาก ส่งผลต่อการลดปริมาณของเซลล์ ชัยยังการเจริญเติบโตของเชื้อ และสามารถยับยั้งการทำงานในกระบวนการ Oxidation ของแบคทีเรีย (Yu *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012) ซึ่งปริมาณความเข้มข้นของเซลล์จะมีผลต่อการลดแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทที่ต่างกันด้วย (Zokaifar *et al.*, 2014; Sheela *et al.*, 2015) หลังจากการทดลองใช้ *Bacillus* ทั้ง 24 ไอโซเลท พบว่า *Bacillus* TS21, TS23, TW24, BR001, TW31, BR002 และ TW34 ที่มีประสิทธิภาพมากกว่า 90% ในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย และออกซิไดซ์ไนไตรท์ และรีดิวซ์ไนเตรทได้ดี นั่นคือ เชื้อมีคุณสมบัติเป็น Heterotrophic nitrifying-denitrifying bacteria

4.4 การจัดจำแนกชนิดของ *Bacillus* ด้วยเทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุล

จากการศึกษาชนิดของ *Bacillus* ที่คัดแยกได้โดยใช้ยีน 16S rDNA แสดงให้เห็นว่ามีกลุ่มของ *Bacillus* 4 สายพันธุ์ คือ *B. pumilus*, *B. tequilensis*, *B. subtilis* และ *B. cereus* โดย *Bacillus* สามารถพบได้ทั่วไปในสภาพแวดล้อมธรรมชาติ ในสิ่งแวดล้อมทางทะเล และจากสัตว์บริเวณผิวน้ำดิน นอกจากนี้ยังถูกพบจากการคัดแยกในปลา สัตว์ในกลุ่มครึ่งเตี้น บริเวณพื้นที่ด้านล่างของบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ (วรุฒิ และชาคริยา, 2558; Hill *et al.*, 2009) และสามารถคัดแยกได้ที่เหงือก ผิวหนัง ทางเดินอาหารของกุ้ง (Hong *et al.*, 2004) มีการรายงานคุณสมบัติของ *Bacillus* ที่มีความสามารถในการทนต่อเกลือ รวมถึงมีคุณสมบัติในการเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนโตรทในกระบวนการ Denitrification ในสภาพที่มีอากาศ โดยการเปลี่ยนผลิตภัณฑ์ไนเตรทเป็นก๊าซไนโตรเจนอิสระ หรือเปลี่ยนไนเตรทกลับเป็นไนโตรท (ศิริลักษณ์, 2553; Liu *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2012a) การศึกษาชนิดและการเทียบเคียงชนิดของ *Bacillus* ในครั้งนี้ใช้ยีน 16S rDNA ที่เป็นยีนอนุรักษ์ และมีหลายรายงานที่สามารถใช้ยีนอื่นเข้ามาช่วยในการจัดจำแนก และเทียบเคียงคุณสมบัติของแบคทีเรียได้ เช่น สามารถใช้ยีน *hao* ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ Hydroxylamine oxidase สามารถออกซิไดซ์ Hydroxylamine ไปเป็นไนโตรท ในปฏิกิริยา HAO ซึ่งเป็น Marker gene ของกระบวนการ Nitrification โดยใช้ Primer *haoF1* และ *haoR3* (Padhi *et al.*, 2013) ยีน *napA* ที่เป็นยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ Nitrate reductase ที่รีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนโตรท (Shih *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2015) ส่วนยีน *nirK* และ *nirS* จะเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ Nitrite reductase ที่สามารถรีดิวซ์ไนโตรทเป็นไนตริกออกไซด์ในปฏิกิริยา NIR ในกระบวนการ Denitrification (Braker *et al.*, 2000) การศึกษาของ Huang และคณะ (2017) พบว่า *Bacillus* N31 สามารถเทียบเคียงชนิดได้เป็น *B. litoralis* ที่มีคุณสมบัติเป็น Halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification สอดคล้องกับการศึกษาของ Song และคณะ (2011) และ Yang และคณะ (2015) ที่ใช้ยีน 16S rDNA และยีน *nirK* และ *nirS* ใช้ Primer *nirK1F/nirK5R* และ *nirS1F/nirS6R* ในการศึกษาพบ *Bacillus* sp. YX-6 มีความคล้ายคลึง 98% กับ *B. coagulans* ที่ผลิตเอนไซม์ Nitrite reductase ซึ่งยีน 3 ตัวนี้จะเป็ยีนที่สามารถใช้ตรวจสอบคุณสมบัติการเป็น Heterotrophic nitrifying-denitrifying bacteria ได้ และ *B. cereus* GS-5 สามารถสร้างเอนไซม์ Poly phosphate kinase ทำให้ PO_4^{3-} ลดลงได้ จากกระบวนการ Intracellular phosphorous ได้ถึง 60% ซึ่งตรวจสอบได้จากการใช้ยีน *ppk* ขนาด 630 คู่เบส (Rout *et al.*, 2017) ทั้งนี้ การประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งทะเลจำเป็นต้องแยก *Bacillus* ที่ไม่เพียงแต่ปรับปรุงคุณภาพน้ำได้ แต่ต้องมีคุณสมบัติที่ทนเค็มด้วย โดยสายพันธุ์ของ *Bacillus* ที่คัดแยกได้ครั้งนี้ คือ *B. pumilus*, *B. tequilensis*, *B. subtilis* และ *B. cereus* สามารถปรับปรุงคุณภาพน้ำและย่อยสลายอินทรีย์สารในการเลี้ยงกุ้งได้

4.5 การศึกษาความเค็ม และ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus*

4.5.1 ความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

จากผลการทดลองพบว่า *Bacillus* spp. เจริญเติบโตได้ดีในช่วงความเค็ม 0.5–2.5% NaCl (5–25 ppt) และสามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงความเค็ม 0–4% NaCl สอดคล้องกับการทดลองของ Song และคณะ (2011) ซึ่งทำการทดสอบผลของความเค็มที่แตกต่างกันมีผลต่อการลดไนโตรเจนของ *Bacillus* สายพันธุ์ YX-6 พบว่า *Bacillus* YX-6 สามารถเจริญเติบโต และมีประสิทธิภาพดีที่ความเค็ม 0–1.5% NaCl และยังสามารถลดไนโตรเจนได้ที่ความเค็ม 3% NaCl ซึ่งแตกต่างกับ *B. cereus* เมื่อความเค็มเพิ่มขึ้นมากกว่า 1.5% NaCl การเจริญเติบโต และประสิทธิภาพก็ลดลง Huang และคณะ (2017) พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ 31 สามารถเจริญเติบโต และมีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียได้ดีในช่วงความเค็ม 2–4% NaCl *B. methylotrophicus* L7 มีความสามารถในการลดแอมโมเนียได้มากกว่า 58.70% โดยมีความเค็มอยู่ในช่วง 0–3% NaCl (Zhang *et al.*, 2012) ซึ่งความเค็มเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียในกลุ่ม Heterotrophic nitrifying ทางทะเล (Zheng *et al.*, 2012; Duan *et al.*, 2015)

จากการทดลอง พบว่า *Bacillus* ทั้ง 7 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Slightly halophilic bacteria ที่เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ 0.5–3% ซึ่งมี *Bacillus* หลายชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ที่ความเค็มดังกล่าว ยกตัวอย่างเช่น *B. circulans*, *B. stearothermophilus* และ *B. alvei* เป็นต้น และบางสายพันธุ์ก็สามารถเจริญได้ที่มีเกลือ 5–7% NaCl เช่น *B. firmus* เป็นต้น (ศิริลักษณ์, 2553)

4.5.2 pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

Bacillus ทั้ง 7 ไอโซเลท มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในช่วง pH เท่ากับ 7-7.5 และจากนั้นการเจริญเติบโตค่อย ๆ ลดลงเมื่อ pH มีค่าเพิ่มขึ้นจาก pH 8.5 จนถึง pH 10.5 ซึ่งการเจริญเติบโตที่ค่อย ๆ ลดลง สอดคล้องกับการเจริญเติบโตของ *B. weinstephensis* (DS45) ในการศึกษาของ Seenivasagan และคณะ (2017) พบว่า ที่ pH 9 เชื้อมีการเจริญเติบโตที่ต่ำที่สุด และสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่ pH เท่ากับ 7 สอดคล้องกับการเจริญเติบโต *Bacillus* YX-6 ที่ pH เท่ากับ 7 มีความสามารถในการกำจัดไนโตรเจนได้มากที่สุด (Song *et al.*, 2011) รวมถึง Thermophilic *Bacillus* MS 30 มีความสามารถในการกระบวนการ Nitrification ดีที่สุดที่ pH 7.5-8 มีสภาพเป็นด่างเล็กน้อย ในขณะที่การเติบโตดีที่สุดคือ pH 6-6.5 (Mevel and Prieur, 2000) ซึ่งจากการทดลอง pH 6.5 เป็นช่วงที่ *Bacillus* ทั้ง 7 ไอโซเลท เริ่มมีการเจริญเติบโตที่สูงขึ้น ขณะที่ช่วง pH 5-6 หรือ 9-10 จะเป็นอันตรายต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในกลุ่ม Heterotrophic nitrifying ทั้งนี้ สภาพวะที่เป็นด่างเล็กน้อยจะเอื้อต่อกระบวนการ Heterotrophic nitrification เนื่องจากมีแอมโมเนียอิสระอยู่มาก และอาจส่งผลต่อกระบวนการ Denitrification ให้ลดลง หาก pH เปลี่ยนไปจากสภาพเป็นกลาง หรือเป็นด่างเล็กน้อย (Gupta, 1997)

ความเค็ม และ pH เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และความสามารถในการลดแอมโมเนียของ *Bacillus* โดย pH ที่เหมาะสมต่อ Heterotrophic nitrifying bacteria จะอยู่ในช่วง 6-9 (ธงชัย, 2544) และมีค่าความเค็มในช่วงที่เหมาะสมของเชื้อ *Bacillus* ทนเค็มอยู่ในช่วง 0-30 g/L NaCl (0-30 ppt)

ดังนั้นการศึกษาคความเค็ม และ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus* ครั้งนี้ทำให้ได้ *Bacillus* spp. ที่เจริญเติบโตดี สามารถใช้สารอินทรีย์ และทนเค็ม มีความเหมาะสมสามารถนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล ซึ่งโดยทั่วไปแล้วความเค็มที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งทะเลมีค่าประมาณ 1-2.5 % NaCl หรือ 10-25 ppt โดยมี pH ในช่วงที่เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งอยู่ที่ 8-9 (ธงชัย, 2544)

4.6 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* ในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำเสียสังเคราะห์

การคัดแยก Heterotrophic *Bacillus* ส่วนใหญ่มุ่งเน้นไปที่การกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนในการปรับปรุงคุณภาพน้ำเสีย (Yang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Yao *et al.*, 2013) โดยการศึกษาประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในน้ำเสียสังเคราะห์ สามารถกำหนดค่าสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ปริมาณของแอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท และพารามิเตอร์อื่น ๆ ได้ (Chun *et al.*, 2012) ทำให้ได้ทราบถึงประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนทั้งกระบวนการ ในการทดลองครั้งนี้ใช้น้ำทะเล (NH₄)₂SO₄, NaNO₂, KNO₃ และอาหารเม็ดสำเร็จรูปแบบจุ่มสำหรับการเลี้ยงกึ่ง เป็นส่วนประกอบ ปรับ pH ที่ 7.0 เพื่อให้ได้สารอินทรีย์ สารประกอบไนโตรเจน ได้แก่ ปริมาณแอมโมเนียให้อยู่ในช่วง 1–2 mg-N/L ไนไตรท์ และไนเตรทอยู่ในช่วง 0.5–1 mg-N/L ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ในช่วงของน้ำทิ้งที่ได้จากการเลี้ยงกึ่งทะเล และเกณฑ์มาตรฐานน้ำทิ้งจากบ่อเพาะเลี้ยงชายฝั่ง (สิริ และคณะ, 2548; กรมควบคุมมลพิษ, 2554) สอดคล้องกับการรายงานของ Shan และ Obbard (2001) ที่มีการใช้อาหารกึ่งเป็นส่วนประกอบ 0.44 g/L เพื่อเป็นส่วนทดแทนของค่า COD และสูตรน้ำเสียสังเคราะห์ของ O-Thong และคณะ (2003) ที่ใช้อาหารกึ่ง 1.5 g/L และ (NH₄)₂SO₄ 0.024 g/L (มีค่าเท่ากับ 5 mg NH₄⁺-N/L) เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 7–8 สำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และกระบวนการ Denitrification ในน้ำเสียสังเคราะห์ (Yoo *et al.*, 1999) และในการทดลองมีการขยายเชื้อมาใช้ในปริมาณ 10⁸ CFU/mL และทดสอบความสามารถในปริมาณ 1% และ 5% เนื่องจากเป็นความเข้มข้นของ *Bacillus* ที่มีความสม่ำเสมอ และกระจายตัวได้ดี เมื่อเซลล์เข้าสู่ช่วงอัตราการเจริญคงที่ (Stationary phase) ทำให้ได้ความเข้มข้นสปอร์ได้ถึง 10⁸–10⁹ CFU/mL ที่ 24–48 ชม. ซึ่งเป็นช่วงที่สามารถนำเชื้อไปใช้เพิ่มปริมาณ และมีประสิทธิภาพมากที่สุด (ไวรุจน์ และคณะ, 2550; Dulmage *et al.*, 1990; Kulpreecha *et al.*, 2009)

จากผลการทดลอง พบว่า แอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทลดลงได้ตั้งแต่วันที่ 4 ต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 ประสิทธิภาพของการใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% สามารถลดแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทได้ดีกว่ากล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% เมื่อพิจารณาจากการลดลงของคุณภาพน้ำทิ้ง 3 พารามิเตอร์ สอดคล้องกับการทดลองของ Rajakumar และคณะ (2008) ที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ *Pseudomonas* sp. KW1 และ *Bacillus* sp. YW4 ในการกำจัดไนเตรทในน้ำเสียไนเตรทสังเคราะห์ พบว่า ปริมาณเชื้อ 1% (1x10⁶ CFU/mL) สามารถลดไนเตรทได้ 99.3% มีปริมาณไนเตรทเริ่มต้นที่ 45 mg-N/L ในเวลา 7 วัน (Patureau *et al.*, 1994) และ *B. subtilis* AYC

สามารถลด NH_4^+-N ได้ 84.61–96.19% ในเวลา 14 วัน โดยแอมโมเนียเริ่มต้นเฉลี่ยอยู่ในช่วง 8–16 mg-N/L (Xiao *et al.*, 2011)

ทั้งนี้ ในการทดลองใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% มีการสะสมไนโตรเจนในไตรท์และไนเตรทในระบบน้อยกว่าการใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% โดยการสะสมไนโตรเจนในไตรท์และไนเตรทพบได้ในระบบการปรับปรุงคุณภาพน้ำ เนื่องจากไนโตรเจนที่เกิดขึ้นในระบบเป็นสารที่ไม่คงตัวที่สามารถเปลี่ยนรูปไปเป็นไนเตรทได้ โดยแบคทีเรียใช้แอมโมเนียในน้ำเป็นแหล่งอาหาร และเปลี่ยนรูปแอมโมเนียไปเป็นไนโตรเจน สอดคล้องกับการศึกษาของ Yao และคณะ (2013) ซึ่งรายงานว่า การใช้ *B. methylotrophicus* L7 สามารถกำจัดแอมโมเนีย และ TN ได้ 77.5% และ 53% ตามลำดับ ในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปริมาณ NH_4^+ เริ่มต้นในช่วง 59.2–120 mg-N/L ส่งผลให้มีการสะสมของไนโตรเจนในระบบ ซึ่งจากการรายงานของ Zhang และคณะ (2012) พบว่า *Bacillus* L7 สามารถกำจัดไนโตรเจนได้ดีในสถานะที่มีไนโตรเจนเริ่มต้น 55–65 mg-N/L และเกิดไนเตรทในระบบปริมาณ 13–35 mg-N/L นอกจากนี้ *Rhodococcus* sp. CPZ24 ที่เป็นเฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรียเช่นเดียวกับ *Bacillus* มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้ 86% และเกิดไนโตรเจนในระบบ 48.2 mg-N/L และไนเตรท 13.4 mg-N/L ตามลำดับ (Chen *et al.*, 2012)

การทดลองระบบแบบให้อากาศ มีการให้อากาศอย่างเต็มที่ด้วยเครื่องปั๊มลม ทำให้มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำมากพอต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และการเกิดปฏิกิริยา Nitrification (Chankaew *et al.*, 2018) แตกต่างกับการทดลองแบบไม่ให้อากาศในขวดรูปชมพู่ อากาศที่ได้ในระบบเกิดจากการเขย่า มีผลให้ออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจำกัด และมีปริมาณน้อยกว่า ซึ่งในสถานะที่ออกซิเจนมีปริมาณที่จำกัดนั้น *Bacillus* สามารถทำให้เกิดกระบวนการ Nitrogen assimilation ที่มีการใช้สารอนินทรีย์ไนโตรเจนเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโต (Kutako *et al.*, 2009) โดย Patureau และ Bernet (2000) และ Kim และคณะ (2005) กล่าวว่า ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำมากจะไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนีย แต่เมื่อปริมาณลดลงครั้งหนึ่งจะส่งผลต่อการผลิต และการทำงานของเซลล์ในกระบวนการ Nitrification และ Denitrification ภายใต้สถานะที่มีอากาศ โดย *Bacillus* spp. ในการทดลองทั้ง 2 ระบบสามารถลดแอมโมเนียในไตรท์และไนเตรทได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากการทดลองพบว่า *Bacillus* TW24, BR002, TW31, BR001 และ TW34 ปริมาณ 1% มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนได้ดีที่สุดในระบบการทดลองที่ไม่ให้อากาศ และให้อากาศ มีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียเฉลี่ยอยู่ในช่วง 84.73–86.45% ซึ่ง

ดีกว่าผลจากการทดลองของ Laloo และคณะ (2007) ที่ศึกษาคุณสมบัติของ *B. subtilis* B001, *B. cereus* B002 และ *B. licheniformis* B003 ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำในการเลี้ยงปลาสวยงาม พบว่า *Bacillus* B002, B001 และ B003 สามารถลดแอมโมเนียได้มากที่สุดเท่ากับ 77, 74 และ 72% ตามลำดับ ในเวลา 7 วัน ที่ความเข้มข้นเชื้อ 1×10^5 CFU/mL ในขณะที่ในการทดลองครั้งนี้ ประสิทธิภาพในการกำจัดไนโตรเจนไนเตรทและไนเตรทเกิดขึ้นในช่วง 78.83–83.08% และ 66.22–73.31% ตามลำดับ โดยมีไนโตรเจนไนเตรทและไนเตรทเริ่มต้นอยู่ในช่วง 0.57 ± 0.05 – 0.64 ± 0.04 mg-N/L และ 0.51 ± 0.01 – 0.61 ± 0.03 mg-N/L ตามลำดับ อาจเนื่องจาก *Bacillus* สามารถลดแอมโมเนียให้อยู่ในระดับต่ำ ส่งผลต่อปริมาณไนโตรเจนไนเตรทที่เกิดขึ้นลดลงตามไปด้วย และเปลี่ยนเป็นไนเตรทได้ต่อเนื่อง รวมถึงปริมาณความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ในปริมาณ 10^8 CFU/mL สอดคล้องกับการรายงานของ Kulpreecha และคณะ (2009) และ Menasveta และคณะ (2001) ซึ่งกล่าวว่า ความเข้มข้นของเชื้อที่ 10^8 CFU/mL เป็นความเข้มข้นของ *Bacillus* ที่มีประสิทธิภาพที่สุด ทำให้ปริมาณของแอมโมเนียไนโตรเจนไนเตรทอยู่ในปริมาณน้อย โดยในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระบบปิดที่หมุนเวียนน้ำกลับมาใช้ใหม่จะมีปริมาณการสะสมไนเตรทได้มากถึง 50 mg-N/L ในระยะเวลา 40 วัน

การลดลงของแอมโมเนียไนโตรเจนไนเตรทที่เกิดขึ้น *Bacillus* spp. มีความสามารถในการใช้สารอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยนำแอมโมเนียไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อสร้างเซลล์และเจริญเติบโต สำหรับการลดลงของปริมาณไนโตรเจนไนเตรทในระบบ มีผลมาจากการ oxidation แอมโมเนียของเชื้อที่เชื่อมต่อไปยังกระบวนการ Denitrification ซึ่งอาจเปลี่ยนไปเป็นไนเตรทและก๊าซไนโตรเจนได้ (Sakai *et al.*, 1997) ส่งผลให้เกิดการสะสมไนโตรเจนไนเตรทในระบบได้น้อย (Xiao *et al.*, 2011) ส่วน Lu และคณะ (2012b) กล่าวว่า Heterotrophic nitrifying bacteria บางชนิด สามารถกำจัดไนเตรทในระบบให้กลายเป็นก๊าซไนโตรเจนอิสระได้ในกระบวนการ Denitrification แบบใช้อากาศ ทั้งนี้ ในการทดลองพบว่า การใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* TW34, BR002, TW31, BR001 และ TW34 ปริมาณ 1% ประสบความสำเร็จในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนไปพร้อม ๆ กันในน้ำเสียสังเคราะห์

4.7 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* ในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำจากการเลี้ยงกุ้งทะเล

4.7.1 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียในระหว่างการทดลอง

จากการทดลอง พบว่า การใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 1% และ 5% สามารถลดแอมโมเนียได้ดีในวันที่ 4 ต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 โดยน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อมีแอมโมเนียเริ่มต้นอยู่ในช่วงเฉลี่ย 16.57–36.49 mg-N/L หลังจากเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* TS21, TS23, BR002 และ BR001 สามารถลดแอมโมเนียได้ 59.94–69.93% เหลือแอมโมเนียปริมาณ 6.98–7.39 mg-N/L ส่วนในระบบที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อสามารถลดแอมโมเนียได้ 31.63–48.42% เหลือแอมโมเนียปริมาณ 8.67–12.60 mg-N/L จะเห็นได้ว่า ปริมาณคงเหลือของแอมโมเนียในระบบที่ผ่านการฆ่าเชื้อมีแนวโน้มในปริมาณที่น้อยกว่าระบบที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ เนื่องจากในระบบน้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนั้นจะมีปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้นภายในระบบที่น้อยกว่า เกิดจากการที่นำน้ำทิ้งไปผ่านการฆ่าเชื้อเป็นการทำให้ปราศจากเชื้อ มวลชีวภาพ และจุลินทรีย์ตัวอื่น ทำให้ระบบการย่อยสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ภายในระบบหยุดลง (Shan and Obbard, 2001) มีเพียงความสามารถของ *Bacillus* spp. ที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อ สามารถย่อยสลายสารอนินทรีย์ในระบบ ซึ่งแตกต่างกับชุดการทดลองน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่มีปริมาณแอมโมเนียที่มากกว่า เนื่องจากมีการทำงานของจุลินทรีย์อยู่ตลอดเวลา ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่มีการเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* TS21, TS23, BR002 และ BR001 สามารถลดแอมโมเนียได้ต่อเนื่องจากวันที่ 4 และมีแนวโน้มการลดแอมโมเนียได้มากกว่าในชุดการทดลองในน้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อเล็กน้อยเฉลี่ยในช่วง 48.56–63.74% ในวันที่ 7 สอดคล้องกับการรายงานของ Boopathy และคณะ (2015) ซึ่งศึกษากลุ่มเชื้อ *Bacillus* ที่ประกอบด้วย *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, และ *B. cereus* ที่ 10^6 CFU/mL ในการบำบัดน้ำในการเลี้ยงกุ้ง พบว่า ในน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อกลุ่มเชื้อ *Bacillus* สามารถกำจัดแอมโมเนียได้ 95% ขณะที่น้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อสามารถกำจัดแอมโมเนียได้ 85% ในเวลา 8 วัน เนื่องจากการเติม *Bacillus* ลงไปมีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนีย และมีส่วนช่วยส่งเสริมกลุ่มจุลินทรีย์ในน้ำให้สามารถกำจัดแอมโมเนียได้มากขึ้น และส่งผลให้ไนโตรเจนและไนเตรตลดลงได้

4.7.2 การเปลี่ยนแปลงของไนโตรเจนในระหว่างการทดลอง

เช่นเดียวกับผลการทดลองของแอมโมเนียหลังจากเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 1% และ 5% ไนโตรเจนที่มีการลดลงได้ตั้งแต่วันที่ 4 และ 7 ของการทดลอง ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) หลังจากเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* TS21, TS23, BR002 และ BR001 ทำให้ปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นเฉลี่ย 32.48 mg-N/L ลดเหลือเฉลี่ย 16.31 mg-N/L ลดลงได้ดีในวันที่ 4 ในชุดการทดลองน้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ขณะที่ชุดการทดลองน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นเฉลี่ย 30.68 mg-N/L ลดเหลือ 7.31–8.86 mg-N/L ในวันที่ 7 จะเห็นได้ว่า ในชุดการทดลองน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาณไนโตรเจนจะเพิ่มขึ้น และลดลงได้ทั้งวันที่ 4 และ 7 เนื่องจากเมื่อมีการลดลงของแอมโมเนียก็จะส่งผลทำให้ปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณการเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียในระหว่างการทดลอง แอมโมเนียจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไนโตรเจนในกระบวนการ Nitritification โดยแบคทีเรียในกลุ่ม Ammonium oxidizing และ pH จะมีส่วนสำคัญที่มีผลต่อเวลาในการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งช่วง pH 6 มีผลทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นช้าลง (สุบันจิต และวีระพงศ์, 2552; Rajakumar *et al.*, 2008) สอดคล้องกับผลการเปลี่ยนแปลง pH ในระหว่างการทดลองที่มีการลดลง โดย *Bacillus* spp. มีประสิทธิภาพในการลดไนโตรเจนได้เฉลี่ย 37–75% สอดคล้องกับประสิทธิภาพของ *B. cereus* PB88 ในการจัดการคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งได้ 98.51% ในเวลา 7 วัน (Barman *et al.*, 2017)

4.7.3 การเปลี่ยนแปลงของไนเตรทในระหว่างการทดลอง

หลังจากแอมโมเนียถูกเปลี่ยนเป็นไนโตรเจน และไนโตรเจนสามารถเปลี่ยนเป็นไนเตรทในกระบวนการ Nitritification นั้น ระหว่างการทดลองมีการลดลงของไนเตรทตั้งแต่วันที่ 4 และ 7 ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่าน และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ มีปริมาณไนเตรทอยู่ในช่วงค่อนข้างสูงเฉลี่ย 40–60 mg-N/L หลังจากเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ทำให้ไนเตรทลดลงเหลือปริมาณ 15–30 mg-N/L โดย *Bacillus* TS23, BR001 และ BR002 สามารถลดไนเตรทได้เฉลี่ย 15–50% การลดลงของไนเตรทในระหว่างการทดลองในเวลา 7 วันสอดคล้องกับการศึกษาของ Saïd และคณะ (2014) พบว่า *B. tequilensis* และ *B. cereus* สามารถลดไนเตรทได้เท่ากับ 37.4 และ 80% ในเวลา 6 วัน ทั้งนี้ ปริมาณไนเตรทที่สูงในการทดลองครั้งนี้ อาจเกิดจากการออกซิไดซ์ไนโตรเจนเป็นไนเตรทของเชื้อ *Bacillus* spp. และการลดลงของไนเตรทในระหว่างการ

ทดลอง และการใช้ไนโตรเจนหรือไนเตรทในการเจริญเติบโต โดย Ahn (2006) กล่าวว่า *B. subtilis* เป็นพวกที่เจริญได้เมื่อมีออกซิเจน หรือมีแต่ไนโตรเจน หรือไนเตรท และเจริญอยู่ได้เมื่อมีทั้งออกซิเจน และไนเตรทรวมกัน สอดคล้องกับผลการทดลองของออกซิเจนละลายน้ำที่ลดต่ำลงในระหว่างการทดลอง ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า *Bacillus* spp. จะมีการใช้ไนเตรท และออกซิเจนเพื่อการเจริญเติบโตในระหว่างการทดลอง อย่างไรก็ตาม ไนเตรทก็สามารถเปลี่ยนเป็นก๊าซไนโตรเจนอิสระในกระบวนการ Denitrification ในสภาพที่มีอากาศได้ (Yang *et al.*, 2011) ซึ่งภายในระบบหากมีการขาดออกซิเจน และไปคาร์บอนेट ก็จะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้แบคทีเรียเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนเตรทไม่สมบูรณ์ (พุทธ, 2562)

สำหรับชุดควบคุมในระบบที่ผ่านการฆ่าเชื้อจะมีการเพิ่มขึ้นของสารอนินทรีย์ไนโตรเจน เนื่องจากภายในระบบปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย หรือกำจัดสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ไนโตรเจนเหล่านั้นได้ ขณะที่ชุดควบคุมในระบบน้ำเสียที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อจะยังคงมีกระบวนการย่อยสลายที่เกิดจากจุลินทรีย์ในน้ำ รวมถึงยังคงมีการทำงานของแบคทีเรียในกลุ่ม Nitrifiers–denitrifiers ชนิดอื่นอยู่ (Boopathy *et al.*, 2005) ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนเล็กน้อย แต่ยังคงมีสารอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ตกค้างในระบบมากกว่าชุดทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* spp. โดยการเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* TS23, BR002 และ BR001 มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยการใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 1% มีการลดแอมโมเนีย ไนโตรเจน และไนเตรทในระบบได้สูงกว่าการใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 5% และเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของเชื้อในระบบน้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่า *Bacillus* TS23, BR002 และ BR001 ยังคงมีประสิทธิภาพที่มีแนวโน้มสูงกว่าในระบบน้ำทิ้งจากการเลี้ยงที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดย *Bacillus* ทั้ง 3 โยโซเลท เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Heterotroph ที่มีกระบวนการ Nitrification–denitrification ในสภาพที่มีอากาศ สอดคล้องกับการรายงานของ Lu และคณะ (2012a) ซึ่งศึกษาประสิทธิภาพ *B. subtilis* ในการกำจัดสารประกอบไนโตรเจนในน้ำจากการเลี้ยงปลาที่มีของเสียจากปลาเป็นอินทรีย์วัตถุที่ทำให้จุลินทรีย์เกิดการย่อย เช่นเดียวกับของเสียที่มาจากก้นในการเลี้ยงกุ้งทำให้มีสารประกอบไนโตรเจนเพิ่มขึ้น (สุบัตินิต และวีระพงศ์, 2552) โดยใช้เชื้อ 2×10^{11} CFU/mL พบว่า เมื่อ *B. subtilis* มีปริมาณที่เพิ่มขึ้น แอมโมเนียมีการลดลงในเวลา 10 วัน สามารถลดไนโตรเจนได้อายุในช่วง 0.25–0.50 mg–N/L และลดไนเตรทได้อายุในช่วง 2.0–2.5 mg–N/L

สำหรับประสิทธิภาพในการลดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนได้ตั้งแต่วันที่ 4 และวันที่ 7 ของการทดลองครั้งนี้ สอดคล้องกับการรายงานของ Zokaefar และคณะ (2014) และ He และคณะ (2016) พบว่า แบคทีเรีย Heterotrophic-denitrification มีประสิทธิภาพที่เสถียรในช่วง 4 วันแรก และมีการเปลี่ยนแปลงในวันที่ 7-8 ของการทดลอง Yan และคณะ (2006) พบว่า *Bacillus* sp. LY สามารถลดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนได้ตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง และลดได้มากที่สุดเท่ากับ 74.7% ในวันที่ 4 หลังจากนั้นประสิทธิภาพมีการลดลงอีก 2 วันถัดมา โดยมีแอมโมเนียเริ่มต้นในช่วง 45 mg-N/L รวมถึงผลการทดลองของ Lin และคณะ (2007) พบว่า *Bacillus* sp. LY สามารถลดอนินทรีย์ไนโตรเจนได้ 39.9% ในวันที่ 5 และเหลือเพียง 38.3% ในวันที่ 7

การลดลงของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในระหว่างการทดลองในช่วง 4 วันแรกนั้น อาจเกิดหลังจากเติมเชื้อ *Bacillus* spp. ลงไป เชื้อสามารถดูดซึมสารอนินทรีย์ไนโตรเจนบางส่วนเข้าไปในกระบวนการเจริญเติบโต (Assimilation) (มะลิวัลย์ และสรวิศ, 2555) และเชื้อสามารถใช้สารอนินทรีย์ที่มีอยู่เดิมจากกระบวนการย่อยของจุลินทรีย์อื่น ๆ ทำให้ปริมาณแอมโมเนียลดน้อยลง เพราะการลดโปรตีนลงมากขึ้น เมื่อสารอนินทรีย์ในระบบมีปริมาณลดน้อยลง การย่อยสารอินทรีย์อื่น ๆ จึงเกิดขึ้น รวมถึงการเจริญเติบโตของเชื้อจะชะลอช้าลง เนื่องจากต้องการแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนเพื่อการเพิ่มจำนวน (Yan *et al.*, 2006; Chanpun *et al.*, 2007) ทำให้แบคทีเรียต้องมีการย่อยโปรตีนในอาหารกึ่งเพิ่มขึ้น ส่งผลต่อแอมโมเนียมีปริมาณสูงขึ้นอีกครั้ง ซึ่ง *Bacillus* ต้องใช้แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เป็นส่วนสำคัญทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตที่มากพอ และพร้อมที่จะกลับทำงานอีก โดยในการทดลองครั้งนี้ใช้น้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่มีสารอินทรีย์ และอนินทรีย์ไนโตรเจนที่มาจากของเสียของกุ้งที่ขับถ่ายออกมา รวมถึงเศษอาหารที่เหลือภายในบ่อเลี้ยงจะสามารถละลายอยู่ในน้ำภายในเวลา 3-4 วัน (พุทธ, 2562)

อย่างไรก็ตาม น้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งจะมีปริมาณแอมโมเนียที่สูงอยู่แล้ว เนื่องจากปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำ และตะกอนดินที่ปะปนมาในปริมาณสูง ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของแอมโมเนียอีกครั้งในวันที่ 5 ถึง 7 ของการทดลอง สอดคล้องกับการรายงานของ Chanpun และคณะ (2007) พบว่า การทดลองในน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ *B. cereus* S1 มีกิจกรรมการย่อยที่ใช้เอนไซม์ Protease ในอาหารกึ่งปริมาณ 57.1 mg/L สามารถทำให้แอมโมเนียลดลงเหลือ 5 mg-N/L ในวันที่ 3 และสามารถลดค่า COD ในน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งได้ 15.8% ขณะที่การย่อยสารอินทรีย์ในชุดการทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาณแอมโมเนียจะเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 5 เมื่อ *Bacillus* S1 มีแนวโน้มปริมาณที่ลดลง

จากผลการทดลองการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอมโมเนีย ไนโตรที่ และไนเตรท ที่เพิ่มขึ้นในระหว่างวันที่ 5 ถึง 7 ของการทดลองนั้น เกิดจากสารอินทรีย์ไนโตรเจนจะถูกแบคทีเรียย่อย และปล่อยแอมโมเนียออกมาอยู่ในน้ำ รวมถึงอาหารเหลือที่สะสมอยู่ในน้ำมีส่วนที่ทำให้เกิดปัญหาแอมโมเนียได้นานถึงประมาณ 1 เดือน หลังจากแอมโมเนียเพิ่มปริมาณมากขึ้น ไนโตรที่ จะเกิดขึ้นตามมา (พุทธ, 2562) นอกจากนี้ แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพที่ลดลงเกิดการตายก็จะส่งผลทำให้มีการปลดปล่อยสารจำพวกสารอนินทรีย์ไนโตรเจนกลับเข้าสู่ระบบได้อีกครั้ง และแบคทีเรียที่ยังคงมีประสิทธิภาพ สามารถทำงานภายในระบบก็จะใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน หรือแอมโมเนียอาจจะหายออกจากระบบในขณะที่ทำการทดลองทำให้แอมโมเนียมีการลดลง สำหรับการเปลี่ยนแปลงของไนโตรที่ และไนเตรท อาจเกิดจากกิจกรรมที่แบคทีเรียสามารถใช้แอมโมเนียเปลี่ยนไปเป็นไนเตรท หรือแบคทีเรียที่เปลี่ยนไนเตรทเป็นไนโตรที่ การเพิ่มขึ้นของไนโตรที่ และไนเตรทเกิดจาก *Bacillus* จะเลือกรับออกซิเจนมาเป็นตัวรับอิเล็กตรอนมากกว่าการใช้ NO_3^- ในสถานะที่ค่า DO มีปริมาณมาก (ธงชัย, 2544) ทั้งนี้ จากการรายงานของ Boopathy และคณะ (2015) กล่าวว่า *Bacillus* จะเริ่มมีการใช้คาร์บอน และไนโตรเจนในช่วง 3-4 วันแรกในน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้ง โดยผ่านกระบวนการ Nitrification-denitrification การเติมแหล่งคาร์บอนให้ *Bacillus* ในการบำบัดน้ำเสียมีส่วนช่วยทำให้เชื่อมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนได้มากขึ้น (Zhao, 2009; Luo *et al.*, 2016) และกระบวนการ Denitrification ที่เกิดขึ้นโดย *Bacillus* มีปัจจัยสำคัญ คือ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ และค่า pH (Barman *et al.*, 2017) ซึ่งอัตราเร็วของการเกิดการเปลี่ยนแปลงสารประกอบไนโตรเจนขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมในระหว่างเกิดการย่อยสลายของอาหาร (Zhao *et al.*, 2009)

4.7.4 การเปลี่ยนแปลงของออร์โทฟอสเฟตในระหว่างการทดลอง

Muthuwani และ Lin (1996) รายงานว่า การถ่ายน้ำจากการเลี้ยงกุ้งทำให้ธาตุไนโตรเจน และฟอสฟอรัสถูกปลดปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติเฉลี่ยร้อยละ 45 และ 26 ตามลำดับ ซึ่งออร์โทฟอสเฟตเป็นฟอสฟอรัสอนินทรีย์ที่ละลายน้ำ จากการทดลองเดิมกล้าเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณ 1% และ 5% มีผลต่อการลดลงของปริมาณออร์โทฟอสเฟตตั้งแต่วันที่ 4 และวันที่ 7 ซึ่งประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ปริมาณ 1% มีผลต่อการลดของปริมาณออร์โทฟอสเฟตมากกว่ากล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% ในวันที่ 7 เล็กน้อย สอดคล้องกับการศึกษาของ Fushs และคณะ (1972) ที่รายงานว่า *Bacillus* sp. สามารถดูดซับสารอนินทรีย์ฟอสฟอรัสได้ดีกว่าพืชน้ำ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% สามารถควบคุมปริมาณสารอนินทรีย์ฟอสเฟตได้ดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ *Bacillus* spp. และการลดลงในวันที่ 4 การใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* TW34, BR001, TS23, TS21 และ BR002 สามารถเปลี่ยนแปลงปริมาณออร์โทฟอสเฟตในระบบมีแนวโน้มลดลงเฉลี่ยอยู่ในช่วง 50–75% โดยในการทดลองปริมาณออร์โทฟอสเฟตเริ่มต้นเฉลี่ยอยู่ในช่วง 3.8–8.0 mg-P/L ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานน้ำทิ้งจากการเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง มีผลมาจากอาหาร ซึ่งสูตรอาหารเม็ดสำเร็จรูปจะมีฟอสฟอรัสจากวัตถุดิบเป็นส่วนประกอบถึง 51% (จوزهดี และพัชรี, 2553; พุทธ และวลีรัตน์, 2547) โดยออร์โทฟอสเฟตที่ละลายอยู่ในน้ำ ส่วนหนึ่งเกิดจากฟอสฟอรัสที่เหลือจากการดูดซึมเพื่อนำไปใช้ของกุ้ง หลังจากถูกบริโภค เผาผลาญ และขับถ่ายออกมาจากตัวกุ้งอยู่ในรูปตะกอนอินทรีย์สิ่งขับถ่าย และละลายน้ำ (นิคม และคณะ, 2549; พงศ์ศักดิ์ และรัฐชา, 2557) และเกิดจากกิจกรรมการย่อยเศษอาหารที่เหลือของแบคทีเรีย (สมหมาย, 2539)

ในชุดทดลองระบบน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อมีปริมาณออร์โทฟอสเฟตที่สูงกว่าชุดทดลองระบบน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ เนื่องจากฟอสฟอรัสอินทรีย์ที่อยู่ในน้ำมากกว่า 90% สามารถถูกปลดปล่อยละลายกลับสู่ระบบ (สมหมาย, 2539) ยังคงสะสม และไม่ถูกย่อยสลาย เนื่องจากในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อปราศจากจุลินทรีย์อื่นๆ ซึ่งหลังจากการเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* แบคทีเรียก็สามารถนำไปใช้ต่อไปได้ โดยมีแนวโน้มนำปริมาณลดลงไปในทิศทางเดียวกันกับ ปริมาณสารอนินทรีย์ไนโตรเจน และปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดในระหว่างการทดลอง

ปริมาณออร์โทฟอสเฟตที่มีการเพิ่มขึ้น เนื่องจากภายในระบบมีกระบวนการที่เกิดจากจุลินทรีย์ที่มีการหลั่งกรดอินทรีย์ (Organic acid) และกรดอนินทรีย์ (Inorganic acid) ออกมา ย่อยสารอินทรีย์ฟอสเฟต (ศิริพรรณ, 2550) รวมถึงการย่อยสลายเซลล์ของแบคทีเรียที่มีการดูดซับออร์โทฟอสเฟตไว้ภายในสามารถปลดปล่อยออร์โทฟอสเฟตกลับสู่ระบบได้ และส่วนหนึ่งอาจเกิดจากอุณหภูมิเพิ่มขึ้น หรือ pH ลดลง ทำให้ฟอสฟอรัสอนินทรีย์ละลายได้น้อยลง (สมหมาย, 2539) โดย pH 7.5 และค่าความเค็มที่ 25 ppt เป็นสภาวะที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงกุ้งทะเลแก่แบคทีเรีย ขณะเดียวกันจากการทดลอง พบว่า ปริมาณออร์โทฟอสเฟตในวันที่ 4 ลดลงเฉลี่ยเหลือ 2.5–5.5 mg-P/L และวันที่ 7 ลดลงเฉลี่ยมากที่สุดเหลือ 1.26–2.42 mg-P/L เนื่องจากเกิดกระบวนการ Intracellular phosphorus เกิดขึ้น ซึ่ง *Bacillus* spp. สามารถสร้างเอนไซม์ Poly phosphate kinase ที่สามารถดูดซับออร์โทฟอสเฟตเข้าสู่เซลล์ได้ โดยใช้เป็นแหล่งพลังงาน องค์ประกอบในการสร้างเซลล์ใหม่ และสะสมไว้ในเซลล์อยู่ในรูป Poly phosphate (ธงชัย, 2544; Rout *et al.*, 2017)

ทั้งนี้ หลังจากทดลองการใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* 1% และ 5% ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 7 วัน มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณออร์โทฟอสเฟตที่ทำให้ปริมาณลดลงส่งผลให้ปริมาณฟอสฟอรัสรวมมีปริมาณอยู่ในช่วงค่ามาตรฐานน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งปริมาณ 0.4 mg/L (กรมประมง, 2546ก)

4.7. 5 การเปลี่ยนแปลงของสารแขวนลอยทั้งหมดในระหว่างการทดลอง

จากการทดลองเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่าน และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ มีคุณสมบัติในการลดสารแขวนลอยทั้งหมด (TSS) สอดคล้องกับการรายงานของ ประสิทธิ์ และคณะ (2554) ที่ศึกษาการบำบัดตะกอนเลนจากบ่อเลี้ยงกุ้งแบบไร้ออกซิเจน เพื่อผลิตก๊าซชีวภาพที่มีการใช้จุลินทรีย์ EM ในการทดลอง 31 วัน พบว่า จุลินทรีย์ EM สามารถลด TSS ในตะกอนเลนได้ 99% จากปริมาณ TSS เริ่มต้น 75,200 mg/L เหลือ 675 mg/L โดย Zakaria และคณะ (2010) รายงานว่า EM ประกอบด้วยจุลินทรีย์มากกว่า 80 สายพันธุ์ ซึ่ง *Bacillus* spp. เป็นส่วนผสมของกลุ่มจุลินทรีย์นั้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ วรวิติ และชาคริยา (2558) และ Dalmin *et al.*, (2001) ที่รายงานว่า แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ช่วยในการปรับปรุงคุณภาพน้ำ ซึ่งสามารถลดปริมาณ TSS, TVS และ BOD ได้

สำหรับชุดทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% ทำให้ TSS ลดลงวันที่ 4 และ 7 เฉลี่ย 41.02 และ 55.17% ตามลำดับ และการใช้กล้าเชื้อปริมาณ 5% ทำให้ TSS ลดลงเฉลี่ยเท่ากับ 27.74 (วันที่ 4) และ 55.70% (วันที่ 7) ตามลำดับ ในขณะที่ชุดทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ การเติมกล้าเชื้อปริมาณ 1% ทำให้มีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยของ TSS ในวันที่ 7 และการใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 5% สามารถลด TSS ได้ดีในวันที่ 4 ถึงวันที่ 7 ซึ่ง *Bacillus* ทั้ง 7 ไอโซเลท สามารถลด TSS ได้เฉลี่ยอยู่ในช่วง $33.82 \pm 0.08 - 64.27 \pm 0.99\%$ โดยประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในการลด TSS สอดคล้องกับประสิทธิภาพของ *B. subtilis* ในการบำบัดน้ำเสียที่ลด TSS ได้ 91.7% (เริ่มต้นจาก 876 mg/L ลดเหลือ 73 mg/L) ในเวลา 84 ชม. (Yusuf *et al.*, 2013)

การเพิ่มขึ้นของ TSS ในระหว่างการทดลองส่วนหนึ่งเกิดจากปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่อยู่ในปริมาณที่เหมาะสมทำให้ตะกอน หรือสารอินทรีย์มีการตกตะกอนได้น้อยลงส่งผลให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายตะกอนอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (ประสิทธิภาพ และคณะ, 2554; Allgredge and Silver, 2003) และการลดลงของ TSS ในระหว่างการทดลองเกิดจากจุลินทรีย์ตามธรรมชาติที่มีน้ำอยู่แล้ว (ประสิทธิภาพ และคณะ, 2554) ทำให้ TSS มีการเปลี่ยนแปลงได้ โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสามารถสังเกตเห็นจากการเปลี่ยนแปลงของความขุ่นของน้ำที่ลดลงในระหว่างการทดลอง หลังจากเติมเชื้อ *Bacillus* spp. ลงไป ซึ่งเกิดจากการที่ตะกอนจุลินทรีย์มีการตกตะกอนที่เป็นลักษณะ Biofloc โดยที่จุลินทรีย์สร้างสารประเภท Extracellular polymer ที่มีลักษณะเป็นเมือกบาง ๆ ทำหน้าที่ยึดสารอินทรีย์แขวนลอยเข้ากับแบคทีเรีย (สุชาติ 2560; Suharti and Vries, 2004) ทำให้มีกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์เกิดขึ้น

จากการศึกษาของ สุชาติ (2560) กล่าวว่า การเติมอากาศเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำจากการเลี้ยงกุ้งมีส่วนช่วยสนับสนุนส่งเสริมกิจกรรม และการเจริญเติบโตของ Heterotrophic bacteria ให้ลดการสะสมของกากตะกอน ทำให้ปริมาณออกซิเจนอยู่ในระดับสูงกว่า 4 mg/L และสามารถควบคุมปริมาณ TSS ให้คงที่ และปัจจัยของความเค็ม หรือความเข้มข้นเกลือที่เพิ่มมากขึ้นจะสามารถเหนี่ยวนำให้การรวมตัวของกลุ่ม Biofloc มากขึ้น (Schryver *et al.*, 2008) หลังจากทดลองการใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* 1% และ 5% ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 7 วัน สามารถลด TSS ให้อยู่ในช่วง 5–15 mg/L ซึ่งยังคงมีปริมาณอยู่ในช่วงสำหรับเกณฑ์คุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำปริมาณของสารแขวนลอยทั้งหมดในน้ำที่ไม่ควรสูงเกิน 25 mg/L (นิคม และยงยุทธ, 2546)

4.7.6 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างการทดลอง

ในระหว่างการทดลอง พบว่า ค่า pH ลดลงในชุดทดลองน้ำที่จากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ มีค่า pH เริ่มต้นของการทดลองเฉลี่ยเท่ากับ 7.68 ± 0.01 มีการลดลงต่อเนื่องจากวันที่ 4 (pH เหลือเฉลี่ย 7.30 ± 0.38) และวันที่ 7 pH เหลือเฉลี่ย 7.15 ± 0.48 เช่นเดียวกับชุดทดลองน้ำที่จากการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ มีการลดลงของค่า pH ตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองต่อเนื่องจาก pH เท่ากับ 7.97 ± 0.01 เหลือเหลือ 6.75 ± 0.24 ในวันที่ 4 และลดลงเหลือเหลือ 6.61 ± 0.24 ในวันที่ 7 ซึ่งการลดลงของ pH ที่เกิดขึ้น เนื่องจากกิจกรรมของ *Bacillus* ที่เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Heterotroph ที่มีการปลดปล่อยไฮโดรเจนไอออน (H^+) ออกมา ในกระบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolism) (เจริญ และชนินทร์, 2552) ที่เป็นกิจกรรมในกระบวนการ Nitrification–denitrification ในสภาวะที่มีอากาศของ *Bacillus* ระหว่างการทดลอง และเมื่อ *Bacillus* มีการเพิ่มจำนวนทำให้คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้น้ำมีค่า pH ที่ต่ำลงได้ ซึ่งส่งผลทำให้ความต้องการออกซิเจนเพิ่มมากขึ้นด้วย (พุทธ และวลิรัตน์, 2547; พุทธ และคณะ, 2554)

การลดลงของสารอนินทรีย์ใน ไตรเจนที่เกิดจากประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในกระบวนการ Denitrification ในการทดลองครั้งนี้เกิดขึ้นในช่วงที่มีค่า pH เฉลี่ย 7–8 ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ ธนิต (2536) กษิตศ (2551) และ Song และคณะ (2011) ที่กล่าวว่า สภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการ Nitrification–denitrification มีค่า pH ระหว่าง 7–8.5 ซึ่งสภาพความเป็นกลางถึงด่างเล็กน้อยจะทำให้การย่อยสลายของแบคทีเรีย และการใช้ธาตุอาหารมีประสิทธิภาพมากขึ้น (สมหมาย, 2539; เกรียงศักดิ์, 2545) ส่วนการลดต่ำลงของ pH ในระหว่างการทดลองเหลือเฉลี่ย 6.5–7 นั้น *Bacillus* spp. ยังคงสามารถเจริญได้ เนื่องจากค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจะอยู่ในช่วง 6–9 (ชงชัย, 2544) โดยการลดลงของ pH ส่งผลต่อประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในการลดสารอนินทรีย์ใน ไตรเจนในน้ำที่จากการเลี้ยงกุ้งทะเล เนื่องจากเมื่อน้ำที่มีค่า pH ที่ลดต่ำลงจะมีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของ NH_4^+ ไปเป็นแอมโมเนียอิสระ (NH_3) เพิ่มมากขึ้น (Chankaew *et al.*, 2018) โดย pH ที่เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งทะเลอยู่ที่ 8–9 เนื่องจากแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) มากกว่า แอมโมเนียอิสระ (NH_3) ซึ่งมีความเป็นพิษน้อยกว่า

หลังจากทดลองใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* 1% และ 5% ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำที่จากการเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 7 วัน มีค่า pH อยู่ในช่วง 7–8 ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานน้ำที่จากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งที่มีค่า pH อยู่ในช่วง 6.5–9.0 (กรมควบคุมมลพิษ, 2554)

4.7.7 การเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์อื่น ๆ ในระหว่างการทดลอง

ในการทดลองทั้ง 2 ระบบมีค่าออกซิเจนละลายน้ำเพิ่มขึ้น และลดลงไปในทิศทางเดียวกัน โดยมีการลดลงเล็กน้อยในวันที่ 7 เหลือจากปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ $5.80 \pm 0.01 - 6.67 \pm 0.02$ mg/L ลดลงเหลือเหลือ $4.80 \pm 0.01 - 6.17 \pm 0.01$ mg/L ซึ่งในทุกชุดการทดลองมีการให้อากาศด้วยเครื่องปั๊มลม ทำให้มีออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ยประมาณ 5.5–6.5 mg/L ที่มากพอต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus* spp. (Chankaew *et al.*, 2018; Sonune and Garodeb, 2018) ซึ่งปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่เหมาะสมต่อกระบวนการ Nitrification ที่มีความคล้ายคลึงกับสภาพแวดล้อมจริงในการเลี้ยงสัตว์น้ำต้องมากกว่า 4 mg/L (กษิตศ, 2551) ทำให้ *Bacillus* สามารถจับออกซิเจนได้ดี และเจริญเติบโตได้ดีขึ้นที่ โดยออกซิเจนละลายน้ำแปรผันตรงต่ออัตราการย่อยสลายความสามารถในการลดแอมโมเนีย ไนโตรที่ และไนเตรท (Song *et al.*, 2011; Rout *et al.*, 2017) หลังจากทดลองการใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* 1% และ 5% ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 7 วัน มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่อยู่ในช่วงการเลี้ยงกุ้งทะเลมีความต้องการออกซิเจนที่ละลายในน้ำตั้งแต่ 5 mg/L ขึ้นไป (ชลอ, 2555)

อุณหภูมิในระหว่างการทดลองของชุดทดลองที่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus* ปริมาณ 1% และ 5% ทั้งในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และไม่ฆ่าเชื้อเฉลี่ย $28.51 \pm 0.86 - 28.68 \pm 0.68$ °C ซึ่งส่งผลทำให้แอมโมเนียมีการลดลงในวันที่ 4 และต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งมีการเปลี่ยนรูปของแอมโมเนีย โดยผ่านกระบวนการ Nitrification ที่มีอุณหภูมิเหมาะสมอยู่ในช่วง 20–30°C และกระบวนการ Denitrification (อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 25–35°C) (กษิตศ, 2551) ซึ่งช่วงอุณหภูมิที่ 22–37°C เป็นช่วงที่มีการย่อยสลายสารอินทรีย์และสารอาหารในน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Fontenot *et al.*, 2006) หลังจากการทดลองผลของอุณหภูมิในการทดลองทั้ง 2 ระบบเฉลี่ยอยู่ในช่วง 27–29°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิในสภาพแวดล้อมของการทดลองที่ทำให้ *Bacillus* spp. มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจน และเป็นช่วงอุณหภูมิในน้ำที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งทะเลที่ 28–33°C (พุทธ และคณะ, 2554; ชลอ, 2555)

หลังจากเติมกล้าเชื้อปริมาณ *Bacillus* 1% และ 5% ในชุดการทดลองน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่าน และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ค่า Conductivity มีการเปลี่ยนแปลงในวันที่ 4 และ 7 เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของของแข็งที่ละลายน้ำลดลง และปริมาณสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่มีการลดลงในวันที่ 4 และ 7 รวมทั้งอุณหภูมิของน้ำส่งผลต่อสภาพการนำไฟฟ้าของน้ำที่ลดลงในวันที่ 4 และเพิ่มในวันที่ 7 ซึ่งหากอุณหภูมิสูงค่าการนำไฟฟ้าก็จะมากขึ้นด้วย (กมลกาญจน์ และคณะ, 2545)

นอกจากนี้ Conductivity ที่เพิ่มขึ้นจะมีความสัมพันธ์กับกระบวนการย่อยสลายสารอนินทรีย์ไนโตรเจนของแบคทีเรียที่ส่งผลให้มีปริมาณประจุไอออนมาก (ชโล, 2555) ทำให้ความเข้มข้นของสารประกอบอนินทรีย์ เช่น PO_4^{3-} , NO_3^- สามารถส่งผลต่อความเปลี่ยนแปลงของค่า Conductivity ได้ (ธงชัย และวิบูลลักษณ์, 2540) ซึ่งจากการทดลองค่า Conductivity มีการเปลี่ยนแปลงโดยมีการเพิ่มขึ้นต่อเนื่องในวันที่ 4 และในวันที่ 7 มีผลการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกันกับค่าความเค็มในระหว่างการทดลอง

ค่าความเค็มที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 4 ถึงวันที่ 7 ของการทดลองมีความเค็มเริ่มต้นในช่วงเฉลี่ย 18.47 ± 0.04 ppt เพิ่มขึ้นเป็น 26.13 ± 0.04 ppt โดยความเค็มที่เพิ่มขึ้นมีผลส่วนหนึ่งมาจากการระเหยของน้ำในระหว่างการทดลอง เนื่องจากการทดลองทำในระบบเปิด และมีการให้อากาศอยู่ตลอดเวลา น้ำจึงสามารถระเหยได้ ความเค็มที่เพิ่มขึ้นจะมีผลต่อประสิทธิภาพการลดแอมโมเนียไนไตรท์ และไนเตรทของ *Bacillus* เนื่องจากความเค็มเป็นตัวแปรสำคัญที่มีผลต่อการเกิดกระบวนการ Nitrification (Mevel and Prieur, 2000) นางนุช และ กฤษดา (2553) กล่าวว่า ความเค็มที่ต่ำจะมีผลทำให้แอมโมเนียสามารถเปลี่ยนรูปเป็นไนไตรท์ และไนเตรทได้มากขึ้น ทั้งนี้ *Bacillus* แต่ละชนิดชอบ หรือมีความสามารถในการทนเค็มที่แตกต่างกัน เมื่อความเค็มเพิ่มขึ้นก็จะส่งผลต่อการเจริญเติบโต และส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ของ *Bacillus* นอกจากนี้ Huang และคณะ (2017) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการลดแอมโมเนียของ *Bacillus* N31 พบว่า *Bacillus* N31 สามารถลดแอมโมเนียได้อย่างมีนัยสำคัญที่ความเค็มในช่วง 5–30 ppt (ลดแอมโมเนียได้ 61.23–80.17%) และประสิทธิภาพลดลงที่ความเค็มเพิ่มขึ้นในช่วง 40–50 ppt สอดคล้องกับการทดลองครั้งนี้ที่มีความเค็มเฉลี่ยในช่วง 15–25 ppt ในระหว่างการทดลอง ซึ่งจะเป็นช่วงที่ส่งผลให้ *Bacillus* มีประสิทธิภาพในกระบวนการ Denitrification มากขึ้น และผลทดลอง *Bacillus* spp. ซึ่งสามารถเจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือ ซึ่งศิริลักษณ์ (2553) กล่าวว่า แบคทีเรียทนเค็ม และแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสามารถเปลี่ยนสารตกค้างในน้ำเสียไปเป็นแหล่งพลังงานได้ ซึ่งเหมาะสำหรับนำมาใช้สำหรับการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย เช่น *B. cereus* สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือ 0–20% (w/v) และเจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของเกลือ 0–10% (w/v) (Kubo et al., 2001)

ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งทะเล อาหารกุ้งที่เหลืออยู่ในน้ำจะมีการย่อยสลาย เกิดการเปลี่ยนแปลง และปล่อยสารอินทรีย์ไนโตรเจนในรูปที่ละลายน้ำได้ออกมา จากนั้นเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นแอมโมเนียรวม ไนไตรท์ และไนเตรท โดยอัตราเร็วของการเปลี่ยนแปลงสารประกอบ

ไนโตรเจนขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมในระหว่างเกิดการย่อยสลายของอาหาร (Widanarni *et al.*, 2010) ซึ่งจากการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนของ *Bacillus* spp. ในน้ำเสียสังเคราะห์ และน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งทะเลนั้น ยังคงมีการทำงานของจุลินทรีย์ และแบคทีเรียในกลุ่ม Heterotroph โดยเห็นได้จากการเพิ่มขึ้น และลดลงของปริมาณของสารอินทรีย์ และสารอินทรีย์สูงขึ้นไปในระบบ (Shan and Obbard, 2001) ซึ่งไม่สามารถควบคุมปริมาณสารอินทรีย์ สารอินทรีย์ไนโตรเจน สารอินทรีย์ฟอสเฟตที่ละลายน้ำ และปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดได้ แต่หลังจากมีการเติมเชื้อ *Bacillus* spp. ลงในระบบ เชื้อมีการทำงานในการย่อยสลาย (Decomposition) โปรตีน สารอินทรีย์ ส่งผลทำให้ปริมาณสารอินทรีย์ไนโตรเจนเพิ่มขึ้น (Widanarni *et al.*, 2010) ในขณะเดียวกัน *Bacillus* ก็สามารถนำสารอินทรีย์ไนโตรเจน และสารอินทรีย์ฟอสเฟตที่ละลายน้ำที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายจากจุลินทรีย์ในกลุ่มอื่น เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต (Assimilation) ทำให้สารอินทรีย์ไนโตรเจน และปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดลดลง (Visvanathan *et al.*, 2008) จึงเกิดการหมุนเวียนของสารอินทรีย์ และสารอินทรีย์ไนโตรเจนในระหว่างทำการทดลอง

การใช้ *Bacillus* spp. ทั้ง 7 ไอโซเลท ในการทดสอบการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล มี *Bacillus* TS23, BR002 และ BR001 ที่สามารถกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนได้มากที่สุด ซึ่งคุณภาพน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่นำมาทำการทดลองมีคุณภาพที่ต่ำ และมีปริมาณสารอินทรีย์ สารอินทรีย์ค่อนข้างสูง โดย *Bacillus* spp. สามารถลดแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทลงเหลือในระบบ 7.0–12.6 mg-N/L, 7.3–8.8 mg-N/L และ 15.0–30.0 mg-N/L ตามลำดับ รวมถึง *Bacillus* spp. สามารถย่อยสลายตะกอนอินทรีย์ที่อยู่ภายในระบบได้ ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของปริมาณออร์โธฟอสเฟตลงเหลือเฉลี่ย 1.2–2.4 mg-P/L และปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดได้คงเหลือเฉลี่ย 6.6–14.4 mg/L

การเติมเชื้อ *Bacillus* ในปริมาณเชื้อ 1% ที่ความเข้มข้น 1×10^8 CFU/mL ส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนีย ไนเตรท และออร์โธฟอสเฟต ลดลงได้ดีกว่าการใช้ *Bacillus* ปริมาณ 5% สอดคล้องกับการศึกษาของ Zokaefar และคณะ (2014) และ Luo และคณะ (2016) พบว่า การใช้ *B. subtilis* L10, G1 และ *B. megaterium* SP1 ที่ความเข้มข้น 10^7 – 10^8 CFU/mL สามารถลดแอมโมเนียได้ 63.61% จากปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้น 6.34 mg-N/L คงเหลือ 2.34 mg-N/L และในความเข้มข้นแอมโมเนียที่ 0.044 mg-N/L *Bacillus* L10, G1 และ SP1 สามารถเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ และไนเตรทได้ 0.53 mg-N/L และ 3.82 mg-N/L ตามลำดับ และยังส่งผลทำให้สารแขวนลอยทั้งหมดลดลงได้ 70% ซึ่งเชื้อในปริมาณ 1% มีประสิทธิภาพสูง เนื่องมาจากการใช้กล้าเชื้อในปริมาณที่น้อย

จะส่งผลทำให้แบคทีเรียมีการเกิดการแข่งชันการดูดซับสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ในระบบมากขึ้น สามารถใช้แอมโมเนีย ไนเตรท และสารอนินทรีย์ฟอสเฟตเพื่อในการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนเซลล์ได้อย่างเต็มที่ เมื่อสารเหล่านี้ถูกกำจัดไปในระยะเวลาหนึ่งจะเกิดกระบวนการย่อยสลาย และปลดปล่อยกลับสู่ระบบอีกครั้ง (สุวรรณ, 2549) ซึ่งมีผลสะสมในระบบปริมาณที่น้อย ยกตัวอย่างจากการรายงานของ Rajakumar และคณะ (2008) พบว่า ปริมาณเชื้อ 1% ที่ความเข้มข้น 1×10^6 CFU/mL ของ *Bacillus* YW 4 ส่งผลในการลดไนเตรทให้เหลือ 0.9 mg-N/L ไนเตรทเริ่มต้นเฉลี่ย 45 mg-N/L ในเวลา 7 วัน และการใช้ *B. cereus* B002 ปริมาณ 1% ที่ความเข้มข้น 1×10^5 CFU/mL สามารถลดแอมโมเนียได้ 77% ในเวลา 7 วัน (Laloo *et al.*, 2007) ในขณะที่ความสามารถในการลดไนไตรท์ และปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดของ *Bacillus* ปริมาณ 5% ดีกว่าการใช้ *Bacillus* ปริมาณ 1% อาจเนื่องมาจากในระหว่างการเกิดกระบวนการ Denitrification ไนไตรท์เป็นสารที่ไม่คงตัว สามารถเปลี่ยนรูปได้ การใช้กล้าเชื้อปริมาณในปริมาณมากอาจมีส่วนช่วยในการกำจัดไนไตรท์ได้มากขึ้น ทำให้การเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์เป็นไนเตรทน้อยลง ส่งผลให้การสะสมที่เกิดขึ้นภายในระบบลดลงตามไปด้วย รวมถึงการลดลงของปริมาณ TSS ที่สอดคล้องกับการรายงานของ Safitri และคณะ (2015) พบว่า กลุ่มแบคทีเรีย *B. pumilus*, *B. subtilis* และ *B. coagulans* สามารถลด TSS ในการบำบัดทางชีวภาพของน้ำเสียได้ 94.85% ในการเติมเชื้อปริมาณ 5% (10^8 CFU/mL) ภายใน 240 ชม. (ค่าเริ่มต้นของ TSS 60 mg/L)

นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของสารอนินทรีย์ และสารอินทรีย์ที่เกิดขึ้นภายในระบบหลังจากการเติมกล้าเชื้อ *Bacillus* spp. จะมีการลดลงได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุดในช่วง 4 วันแรกของการทดลอง และประสิทธิภาพลดลงช่วงวันที่ 5-7 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าปัจจัยอื่น ๆ เช่น อุณหภูมิ pH ความเค็ม ปริมาณออกซิเจนในน้ำ ปริมาณของสารอินทรีย์เริ่มต้น และความเข้มข้นของสารอนินทรีย์ในโตรเจน มีส่วนส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ในโตรเจนของเชื้อได้ (วิจิตพล และคณะ, 2553) ดังนั้น เพื่อให้เชื้อ *Bacillus* spp. มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนินทรีย์ในโตรเจนได้มากขึ้น การเติมเชื้อในทุก ๆ วันที่ 7 รวมถึงการใช้เชื้อผสมอาจมีส่วนช่วยเสริมประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนินทรีย์ในโตรเจนได้ Wu และคณะ (2012) กล่าวว่า การใช้แบคทีเรียผสมกลุ่ม *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus* sp. สามารถช่วยลดปริมาณมลพิษในน้ำเสีย ทำให้ระบบมีความเสถียรได้มากขึ้น ซึ่ง *Bacillus* sp. มีความสามารถกำจัดโลหะหนัก ไนโตรเจน และฟอสเฟตได้ดี โดยแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนก็มีส่วนสำคัญที่ทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตมากพอ และพร้อมที่จะทำงาน (Fontenot *et al.*, 2006) ซึ่งในการทดลองได้กำจัดสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งทะเล

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษา และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการศึกษา

จากการคัดแยก *Bacillus* จากตัวอย่างน้ำ และดิน บริเวณแหล่งน้ำเสียชุมชนหาดปากเมง ป่าชายเลนหาดปากเมง บ่อเลี้ยงปลากระพงขาว และบ่อเลี้ยงกุ้งขาว อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง ได้จำนวน 32 ไอโซเลท นำมาทดสอบการออกซิไดซ์แอมโมเนีย และการย่อยไนโตรเจน พบว่า มี 24 ไอโซเลทที่ให้ผลเป็นบวก และทดสอบคุณสมบัติของ *Bacillus* ต่อการเป็น Heterotrophic nitrifying–denitrifying bacteria ในอาหารเลี้ยงเชื้อ HNM NDM และ DM พบว่า *Bacillus* 7 ไอโซเลท ได้แก่ TS21, TS23, TW24, BR001, TW31, BR002 และ TW34 มีประสิทธิภาพการออกซิไดซ์แอมโมเนียได้มากกว่า 90% สามารถออกซิไดซ์ไนโตรเจน และรีดิวซ์ไนเตรทได้ดีอยู่ในช่วง 25–50% หลังจากจัดจำแนกชนิดของ *Bacillus* ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล พบว่า TS23 เป็นเชื้อ *Bacillus pumilus* (97% similarity), TW24 และ TW34 เป็นเชื้อ *B. subtilis* (99% และ 96% similarity ตามลำดับ) และ TW31 เป็นเชื้อ *B. cereus* (96% similarity) ในขณะที่ BR001 และ BR002 เป็นเชื้อ *B. tequilensis* (99% similarity) ซึ่งความเค็ม และ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus* spp. ทั้ง 7 ไอโซเลทอยู่ที่ 0.5–3.0% NaCl และ pH อยู่ในช่วง 7.0–7.5

กล้าเชื้อ *Bacillus* TW24, TW31, TW34, BR001 และ BR002 ปริมาณ 1% มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนได้ดีที่สุดในการทดสอบในน้ำเสียสังเคราะห์ สามารถลดปริมาณแอมโมเนีย ไนโตรเจน และไนเตรทเหลือเฉลี่ย 0.23–0.25 mg–N/L, 0.10–0.12 mg–N/L และ 0.14–0.18 mg–N/L ตามลำดับ และเมื่อศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งทะเลที่ผ่าน และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่า การใช้กล้าเชื้อ *B. pumilus* TS23, *B. tequilensis* BR002 และ *B. tequilensis* BR001 มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด ซึ่งสามารถลดได้ตั้งแต่วันที่ 4 ถึงวันที่ 7 ของการทดลอง และ *Bacillus* spp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถทำให้ปริมาณออร์โทฟอสเฟตมีแนวโน้มลดลง รวมถึงทำให้ปริมาณสารแขวนลอยทั้งหมดลดลงด้วย นอกจากนี้ การใช้กล้าเชื้อ *Bacillus* 1% สามารถปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งทะเลที่มีแอมโมเนียได้ดี

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษายีน *hao*, *napA* และ *nirK* ของ *Bacillus* spp. ที่คัดแยกได้ เพื่อยืนยันกระบวนการ Nitrifying–denitrifying ในสภาวะที่มีอากาศได้สมบูรณ์ รวมถึงศึกษายีน *ppk* ที่มีผลทำให้ออร์โทฟอสเฟตลดลง
2. ควรทำการทดสอบเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนแบบผสม เพื่อเปรียบเทียบการลดลงของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในการใช้เชื้อเดี่ยว และเชื้อผสม
3. ควรทำการทดสอบการเติมเชื้อทุก ๆ 7 วัน เพื่อศึกษาความถี่ที่เหมาะสมในการเติมเชื้อ

บรรณานุกรม

- กมลกาญจน์ ลักขณา, กานดา มานัสทน, เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และณัชพล เจียรสำราญ. 2545. การหาเวลาที่เหมาะสมในการปรับปรุงคุณภาพน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำอายุ 1-3 เดือนด้วยโอโซน. วิศวกรรมสาร มก 45: 16-25.
- กรมควบคุมมลพิษ. 2539. นโยบายและแผนจัดการมลพิษ พ.ศ. 2539-2549. กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพมหานคร. 8 หน้า.
- กรมควบคุมมลพิษ. 2545ก. การจัดการและแก้ไขปัญหาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพมหานคร. 31 หน้า.
- กรมควบคุมมลพิษ. 2545ข. น้ำเสียชุมชนและระบบบำบัดน้ำเสีย. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว. กรุงเทพมหานคร. หน้า 1-8.
- กรมควบคุมมลพิษ. 2549ก. ประเภทการใช้ประโยชน์คุณภาพน้ำทะเล. ใน มาตรฐานคุณภาพน้ำทะเล. หน้า 1. ส่วนแหล่งน้ำทะเล สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพมหานคร.
- กรมควบคุมมลพิษ. 2549ข. มลพิษทางทะเลและแนวทางแก้ไขในประเทศไทย. ส่วนแหล่งน้ำทะเล สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 10 หน้า.
- กรมควบคุมมลพิษ. 2554. คู่มือการประเมินปริมาณน้ำทิ้งและปริมาณมลพิษจากกิจกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. หน้า 3-11.
- กรมประมง. 2546ก. ค่ามาตรฐานน้ำทิ้งจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 96 หน้า.
- กรมประมง. 2546ข. วิธีวิเคราะห์เพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 68-70.

- กฤษณา จันทรแก้ว, สมพิศ เข้มเกษม, สุชาติพิทย์ เถิดจันน์ และวาริช ตัญญูภทรสรณ์. 2557. ผลของระดับกาบน้ำตาล จุลินทรีย์บาซิลลัส และวิตามินโอ ต่อคุณภาพน้ำและอัตราการรอดของลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะวัยอ่อน (*Penaeus vannamei* Boone, 1931). ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง ระยอง. 38 หน้า.
- กษิตศ หนูทอง. 2551. การบำบัดไนโตรเจนในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบปิด. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง 16: 11–22.
- เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน. 2545. คุณภาพน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Water Qualities for Aquaculture). เข้าถึงได้จาก <https://aqua.club.net/forum/index.php?topic=19106.0;wap2>. [12 กุมภาพันธ์ 2562].
- คณิต ไชยาคำ และคุณิต ตันวิไลย. 2535. การทดลองหอยแมลงภู่มะพร้าวและสาหร่ายผสมนางบำบัดน้ำทิ้งทางชีวภาพจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 6/2535. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 15 หน้า.
- คณิต ไชยาคำ และยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตร. 2537. แนวทางการป้องกันเพื่อลดผลกระทบที่มีต่อสิ่งแวดล้อมจากการพัฒนาการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 17–26.
- จوزهดี พงศ์มณีรัตน์ และพัชรี ชุ่นสั้น. 2553. การสะสมและการขับทิ้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสของปลากระพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch, 1790) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดแห้งและอาหารปลาสด. วารสารการประมง 63: 487–501.
- เจริญ เริงหทัยธรรม และชนินทร์ แสงรุ่งเรือง. 2552. ผลของการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* spp. ต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius, 1798) ในบ่อดิน. เอกสารวิชาการฉบับที่ 11/2552. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง. หน้า 1–29.
- ชลธิชา สืบวัฒนพงษ์กุล, ธวัชชัย ศุภดิษฐ์, วิสาข่า ภูจินดา และภักพงค์ ปวงสุข. 2552. การศึกษาความเป็นไปได้ในการบำบัดคุณภาพน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมโดยใช้สาหร่ายสาไปรูไลนา. วารสารการจัดการสิ่งแวดล้อม 5: 1–11.

- ชลอ ลิมสุวรรณ. 2555. การจัดการคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง. เข้าถึงได้จาก <http://www.nicaonline.com/kungthai1.htm>. [28 ธันวาคม 2561].
- ชลอ ลิมสุวรรณ และพรเลิศ จันทร์รัชชกุล. 2547. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพมหานคร. 206 หน้า.
- ณัฐนิชา สุขไชยพร, ศศิมันต์ อุณจักร์, ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภาภูมิ และนนทวิทย์ อารีรัชช. 2560. การคัดเลือก *Bacillus* spp. จากปลานิลเพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53 สาขาประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 3-6 กุมภาพันธ์ 2560. หน้า 1055-1064.
- ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพมหานคร. หน้า 94-182.
- ดวงพร คันธโชติ. 2545. นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพมหานคร. หน้า 17-83.
- ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2544. การกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทางชีวภาพ. สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร. 703 หน้า.
- ธงชัย พรรณสวัสดิ์ และวิบูลย์ลักษณ์ วิสุทธีศักดิ์. 2540. คู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย. สมาคมวิศวกรสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย. โรงพิมพ์เรือนแก้วการพิมพ์. กรุงเทพมหานคร. 379 หน้า.
- ชนิด พิวนันท์. 2536. คุณประโยชน์จุลินทรีย์ชนิดน้ำและจุลินทรีย์ชนิดผงในการเพาะเลี้ยงกุ้ง. วารสารสัตว์น้ำ 42: 94-99.
- นงนุช ตั้งกรีกโอพาร์ และกฤษดา ทองเทียม. 2553. ผลของความเค็มและไนไตรท์ต่อค่าออกซิเจนละลายของเลือด และการดูดซึมไนไตรท์เข้าสู่กระแสเลือดของกุ้งขาวแวนนาไม. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 15: 20-28.
- นฤมล รัตนขันแสง, ชลอ ลิมสุวรรณ และนิติ ชูเชิด. 2556. ผลของโปรไบโอติก (*Bacillus* spp.) และคุณสมบัติของน้ำต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vanamei*). การประชุมทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 5-7 กุมภาพันธ์ 2556. หน้า 285-293.

- นิคม ละอองศิริวงศ์ และยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตร. 2546. วิธีวิเคราะห์น้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงชายฝั่ง. กลุ่มงานวิจัยระบบและการจัดการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สำนักงานวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง. 211 หน้า.
- นิคม ละอองศิริวงศ์, ยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตร และทองเพชร สันนุกา. 2549. การทดลองใช้สาหร่ายหนาม (*Najas indica* (Willd) Chane) กำจัดสารประกอบไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 27/2549. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา. 21 หน้า.
- นิคม ละอองศิริวงศ์, ภาสกร ถมพลกรัง, ลักขณา ละอองศิริวงศ์ และทองเพชร สันนุกา. 2547. ยูโทรฟิเคชัน: ผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการประมงในทะเลสาบสงขลา. กลุ่มงานวิจัยระบบและการจัดการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สำนักงานวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง. 40 หน้า.
- บัญญัติ สุขศรีงาม. 2534. จุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพมหานคร. 507 หน้า.
- ประสิทธิ์ ศรีนคร, ขวัญตา ตันติกำธน, อรรณวิโรจน์ เขียวนาค, จิระพล ศรีเสริฐผล และกนต์ธร ชำนิประศาสน์. 2554. การบำบัดตะกอนเลนในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเลโดยกระบวนการย่อยสลายแบบไร้ออกซิเจน. วารสารการจัดการสิ่งแวดล้อม 2: 10–21.
- ปาจริย์ จื่อเหลียง, ชลอ ลี้มสุวรรณ, นิตี ชูเชิด, วัชรียา ภูริวิโรจน์กุล และพรเลิศ จันทร์รัชชกุล. 2554. ผลของแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสในการควบคุม *Vibrio harveyi* และอัตราการรอดในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ในห้องปฏิบัติการ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 1–4 กุมภาพันธ์ 2554. หน้า 27–34.
- พงศ์ศักดิ์ หนูพันธ์ และรัฐชา ชัยชนะ. 2557. ผลกระทบของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อการเกิดยูโทรฟิเคชันในแหล่งน้ำและการกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส. วิศวกรรมสาร มก 88: 57–67.
- พรรณศรี จริโมภาส, สนธิพันธ์ ผาสุกดี และวรรณภา ถวิลวรรณ. 2548. การใช้จุลินทรีย์ทดแทนการใช้ยาออกซิเตตราไซคลินในการอนุบาลกุ้งก้ามกราม. รายงานการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. หน้า 9–54.

- พุทธ ส่องแสงจินดา. 2562. การจัดการสารประกอบไนโตรเจน ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งระบบปิด. กลุ่มวิจัย
วิศวกรรมการเพาะเลี้ยงและสิ่งแวดล้อม ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล ฟังอ่าว
ไทย กรมประมง. เข้าถึงได้จาก <https://www.shrimpcenter.com/t-shrimp007.html>. [21
กุมภาพันธ์ 2562].
- พุทธ ส่องแสงจินดา และวสิรัตน์ มุสิกะสังข์. 2547. คุณภาพน้ำและการเปลี่ยนแปลงปริมาณ
แบคทีเรียในระบบการจัดการเลี้ยงกุ้งกุลาดำวิธีต่าง ๆ กัน. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์
น้ำชายฝั่ง สำนักงานวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง. 16 หน้า.
- พุทธ ส่องแสงจินดา, จุฑารัตน์ กิจดิวานิช และเพ็ญศรี เมืองเยาว์. 2554. การประยุกต์ใช้แบบจำลอง
คณิตศาสตร์ทำนายผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศต่อผลผลิตและระบบ
นิเวศบ่อเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) แบบพัฒนา. สำนักวิจัยและ
พัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง. 135 หน้า.
- พุทธ ส่องแสงจินดา, ลักษณ์ ละอองศิริวงศ์ และชัชวาล อินทรมนตรี. 2546. ฟลักซ์ของ
สารประกอบไนโตรเจนที่ผิวสัมผัสของน้ำ-ตะกอนดินในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล. ศูนย์วิจัยและ
พัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฟังอ่าวไทย. 13 หน้า.
- มะลิวัลย์ คู่ตะโค และสรวิศ เผ่าทองสุข. 2555. บทบาทของกระบวนการทางชีวภาพต่อการ
เปลี่ยนแปลงสารประกอบไนโตรเจนในบ่อดินสำหรับเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. วารสารเกษตร
พระจอมเกล้า 30: 103–112.
- ยุทธพงษ์ สังข์น้อย. 2558. เอกสารประกอบการสอนรายวิชา 530–307 นิเวศวิทยาจุลินทรีย์ในแหล่ง
น้ำ. สงขลา. ภาควิชาวริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วิทยาเขตหาดใหญ่. หน้า 92–93.
- รวุฒิ เกิดปราง และชาครียา ฉลาด. 2558. จุลินทรีย์ท้องถิ่นในพื้นที่เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อการ
เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำตามหลักเกษตรธรรมชาติ กรณีศึกษา: ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด คณะ
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยา
เขตตรัง. วารสารวิจัย 8: 52–27.

- วราภรณ์ ภูักดีพันธ์ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2553. การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรีย
ปฏิชีวนะสายพันธุ์ใหม่และประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขอบใบแห้งข้าว. การประชุม
ทางวิชาการ ของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 สาขาพืช .
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 3-5 กุมภาพันธ์ 2554. หน้า 1-8.
- วลีรัตน์ มุสิกะสังข์ และพุทธ ส่องแสงจินดา. 2551. ผลของชนิดอาหารและการเปลี่ยนแปลงตาม
ฤดูกาลต่อคุณภาพน้ำ และดินใต้กระชังปลากระพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch, 1970) ใน
ทะเลสาบสงขลาตอนนอก. ใน สัมมนาวิชาการด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ประจำปี
2551. หน้า 5-6. กรุงเทพมหานคร. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง.
- วิจิตพล มีแก้ว, ณัฐพล ขนขปราบ และสุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. 2553. การปรับตัวของพืชภายใต้ ภาวะที่
มีความเค็ม. ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์ 2: 28-37.
- ไวรุจน์ เดชมหิตกุล, จันท์จิรา อยู่คง, กนกวรรณ พุ่มพุทรา, แสงชัย เอกประทุมชัย และเพ็ญจันทร์
เมฆวิจิตรแสง. 2550. การศึกษาสูตรอาหารและกระบวนการผลิตสปอร์ *Bacillus subtilis*
เพื่อเป็นโปรไบโอติกในสัตว์. วารสารวิจัยและพัฒนา มจร 2: 251-259.
- ศิริลักษณ์ นามวงษ์. 2553. ศักยภาพของแบคทีเรียทนเค็ม และแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง ทาง
เทคโนโลยีชีวภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 15: 122-132.
- ศิริพรรณ สารินทร์. 2550. จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม. โรงพิมพ์ห้างหุ้นส่วนจำกัดสามลดดา.
กรุงเทพมหานคร. 310 หน้า.
- สมหมาย เชี่ยววารีสัจจะ. 2539. เอกสารประกอบการสอนรายวิชา 530-441 การจัดการคุณภาพน้ำ.
สงขลา. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วิทยาเขตหาดใหญ่. หน้า 1-119.
- สรรเสริญ ช่อเจียง และทวี โรจนสารัมภกิจ. 2539. การศึกษาการเจริญเติบโตและผลผลิตของการ
เลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อดิน โดยใช้จุลินทรีย์ (*Bacillus subtilis*). เอกสารวิชาการฉบับที่
11/2539. กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง. 16 หน้า.

- ศิริ เอกมหาราช, ก่อเกียรติ กุลแก้ว, พุทธ ส่องแสงจินดา, จุฬิรัตน์ พรหมสุด, นิคม ละอองศิริวงศ์ และวลีรัตน์ มุสิกะสังข์. 2548. การศึกษาน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลเพื่อการประเมินผลกระทบต่อระบบนิเวศในทะเลสาบสงขลา. รายงานการประชุมวิชาการประมงประจำปี 2548 กรมประมง. หน้า 601–617.
- สุชาติ อิงธรรมจิตร. 2560. เทคโนโลยีไบโอฟลอค หนังสือแนะนำการปฏิบัติ. โรงพิมพ์สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร. หน้า 43–50.
- สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2548. จุลชีววิทยาของน้ำเสีย. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร. หน้า 48–49.
- สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีระพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2552. การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน บทบาทของจุลินทรีย์และการประยุกต์ใช้. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร. หน้า 29–221.
- สุวรรณา วรสิงห์. 2549. การตรวจหาแบคทีเรียบาซิลลัสและแลคโตบาซิลลัสในดิน น้ำ และเนื้อกุ้งของบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจังหวัดตราด. เอกสารวิชาการฉบับที่ 4/2549. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จันทบุรี. หน้า 3–16.
- อรรวรรณ บุตรดี, พรพรรณ อุสุวรรณ และกัญญา สอนสนิท. 2556. การคัดเลือกและการจำแนกชนิดแบคทีเรียที่แยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) Screening and Identification of Bacteria Isolated from Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man). วารสารวิทยาศาสตร์ มข 41: 404–413.
- Ahn, Y. H. 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies. Process Biochem 41: 1709–1721.
- Ai, G. M., Zheng, H. Y., Zhang, M. and Liu, Z. P. 2011. Isotopic confirmation of occurrence of microbial denitrification based on N_2 and N_2O production monitored by gas chromatography/isotopic ratio mass spectrometry and gas spectrometry/mass spectrometry. Chinese Journal of Analytical Chemistry 39: 1141–1146.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, W. E. and Lipman, J. D. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215: 403–410.

- Allgredge, A. L. and Silver, M. V. 2003. Characteristics, dynamics and significance of marine snow. *Progress in Oceanography* 20: 41–82.
- Avnimelech, Y. and Ritvo, G. 2003. Shrimp and fish pond soils: processes and management. *Aquaculture* 220: 549–567.
- Azzouz, H., Daoud, F., Touzri, B. D. and Tounsi, S. 2014. Selection and characterization of *B. thuringiensis* mutants over-producing \hat{O} -endotoxins. *Journal of Stored Products Research*. 59: 82–87.
- Barman, P., Bandyopadhyay, P., Kati, A., Paul, T., Mandal, K. A., Mondal, C. K. and Mohapatra, D. K. P. 2017. Characterization and strain improvement of aerobic denitrifying producing bacterium *Bacillus cereus* PB88 for shrimp water quality management. *Waste and Biomass Valorization* 9: 1319–1330.
- Boeyé, A. and Herts, M. 1976. Numerical taxonomy of *Bacillus* isolates from North Sea sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 26: 427–441.
- Boopathy, R., Fontenet, Q. and Kilgen, M., 2005. Biological treatment of sludge from a recirculating aquaculture system using a sequencing batch reactor. *Journal of the World Aquaculture Society* 36: 542–545.
- Boopathy, R., Kern, C. and Corbin, A. 2015. Use of *Bacillus* consortium in waste digestion and pathogen control in shrimp aquaculture. *International Biodeterioration and Biodegradation* 102: 159–164.
- Boyd, C. E. and Tucker, V. S. 1998. Pond aquaculture water quality management. Kluwer Academic Publication, Boston. 700 pp.
- Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Shou, J. Z. and Allan, H. 2000. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2096–2104.

- Bremner, J. M. and Shaw, K. 1958. Denitrification in soil I. methods of investigation. *Journal of Agricultural Science* 51: 22–39.
- Brierley, E. D. R. and Wood, M. 2001. Heterotrophic nitrification in an acid forest soil: isolation and characterization of a nitrifying bacterium. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1403–1409.
- Chankaew, S., O-Thong, S. and Sangnoi, Y. 2018. Nitrogen removal efficiency of salt-tolerant heterotrophic nitrifying bacteria. *Chiang Mai Journal of Science* 45: 11–20.
- Chanpun, K., Powtongsook, S. and Suntornsuk, W. 2007. Bacterial selection from shrimp ponds for degradation of organic matters. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 29: 89–99.
- Chen, F., Xia, Q. and Ju, L. K. 2003. Aerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H fluorescence. *Applied and Environmental Microbiology* 11: 6715–6722.
- 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. *Bioresource Technology* 116: 266–270.
- Chun, D. J., Zhi, X., Qing, Z. F. and Hai, Y. G. 2012. Treatment of synthetic wastewater in a pre-denitrification biofilm reactor packed with polyurethane media. *Energy Procedia* 16: 1642–1649.
- Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P. and Verstaete, W. 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for sustainable production. *Aquaculture* 270: 1–14.
- Dalmin, G., Kathiresan, K. and Purushothaman, A. 2001. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian Journal of Experimental Biology* 39: 939–942.

- Donio, M. S., Ronica, S. V., Thanga, V., Velmurugan, S. J., Adlin, J., Michaelbabu, M. and Citarasu, T. 2013. Isolation and characterization of halophilic *Bacillus* sp. BS3 able to produce pharmacologically important biosurfactants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 6: 876–883.
- Duan, J., Fang, H., Su, B., Chen, J. and Lin, J. 2015. Characterization of a halophilic heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater. *Bioresource Technology* 179: 421–428.
- Dulmage, H. T., Yousten, A. A., Singer, S. and Lacey, L. A. 1990. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. UNDP/World Bank/WHO Special Program me for Research and Training in Tropical Diseases, New York. p. 42.
- Fontenot, Q., Bonvillain, C., Kilgen, M. and Boopathy, R. 2006. Effects of temperature, salinity and carbon: nitrogen ratio on sequencing batch reactor treating shrimp aquaculture wastewater. *Bioresource Technology* 98: 1700–1703.
- Fushs, G. W., Demmerle, S. D., Canelli, E. and Chen, E. 1972. Nutrients and eutrophication. *Limnology and Oceanography* 11: 505–514.
- Gupta, A. B. 1997. *Thiosphaera pantotropha* a sulphur bacterium capable of simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Enzyme and Microbial Technology* 21: 589–595.
- Harmsen, G. W. and Schreven, V. 1995. Mineralization of organic nitrogen in soil. *Advances in Agronomy* 7: 299–398.
- He, T., Li, Z., Sun, O., Xua, Y. and Ye, H. 2016. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Pseudomonas tolaasii* Y-11 without nitrite accumulation during nitrogen conversion. *Bioresource Technology* 200: 493–499.
- Herbeck, L. S., Unger, D., Wu, Y. and Jennerjahn, T. C. 2013. Effluent nutrient and organic matter export from shrimp and fish ponds causing eutrophication in coastal and back-reef waters of NE Hainan, tropical China. *Continental Shelf Research* 57: 92–104.

- Heylen, K. and Keltjens, J. 2012. Redundancy and modularity in membrane associated dissimilatory nitrate reduction in *Bacillus*. *Journal of Microbiology* 3: 371–397.
- Hill, J. E., Baiano, J. C. F. and Barnes, A. C. 2009. Isolation of a novel strain of *B. pumilus* from penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens. *Fish diseases* 10: 1–10.
- Hong, H. A., Duc, L. H. and Cutting, S. M. 2004. The use of bacteria spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Review* 29: 813–835.
- Huang, F., Pan, L., Na, L. and Tang, X. 2017. Characterization of novel *Bacillus* strain N31 from mariculture water capable of halophilic heterotrophic nitrification aerobic denitrification. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 124: 1–8.
- Irianto, A. and Austin, B. 2002. Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases* 25: 633–642.
- Joo, H. S., Hirai, M. and Shoda, M. 2005. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification–aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100: 184–191.
- Karunasagar, I. and Iddya, K. 2006. Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries. เข้าถึงได้จาก http://textbookofbacteriology.net/kt_toc.html. [13 มกราคม 2562].
- Kenneth, T. 2006. Antimicrobial agents used in treatment of infectious disease. เข้าถึงได้จาก <http://www.aquaculture.ugent.be/larvi/larvi05/presentations/Karunasagar.pdf>.
- Kenneth, T. 2012. The genus *Bacillus*. เข้าถึงได้จาก <http://textbookofbacteriology.net/Bacillus.html>. [8 พฤศจิกายน 2560].
- Khardenavis, A. A., Kapley, A. and Purohit, H. J. 2007. Simultaneous nitrification and denitrification by diverse *Diaphorobacter* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77: 403–409.
- Kim, J. K., Park, K. J., Cho, K. S., Nam, S. W., Park, T. J. and Rakesh, B. 2005. Aerobic nitrification–denitrification by heterotrophic *Bacillus* Strains. *Bioresource Technology* 96: 1897–1906.

- Knapp, J. S. and Clark, V. L. 1984. Anaerobic growth of *Neisseria gonorrhoeae* coupled to nitrite reduction. *Infection and Immunity* 46: 176–181.
- Konohana, T., Aoki, K., Nanmori, T. and Yasuda, T. 2000. Simultaneous uptake of ammonium and nitrate salts by an aerobic culture of *Bacillus licheniformis* No. 40–2. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89: 210–211.
- Krishnani, K. K. 2010. Detection and diversity of nitrifying and denitrifying functional genes in coastal aquaculture. *Aquaculture* 302: 57–70.
- Kubo, M., Hiroe, J., Murakami, M., Fukami, H. and Tachiki, T. 2001. Treatment of hypersaline-containing wastewater with salt-tolerant microorganisms. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91: 222–224.
- Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B. and Thongchul, N. 2009. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly (3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107: 240–245.
- Kumari, A. and Kapoor, K. K. 2008. Identification of organic acids produced during rice straw decomposition and their role in rock phosphate solubilization. *Plant Soil and Environment (PSE)* 54: 72–77.
- Kutako, M., Limpiyakorn, T., Luepromchai, E., Powtongsook, S. and Menasveta, P. 2009. Inorganic nitrogen conversion and change of bacterial community in sediment from shrimp pond after methanol addition. *Journal of Applied Sciences* 9: 2907–2915.
- Laloo, R., Ramchuran, S., Ramduth, D., Go, J. and Gardiner, N. 2007. Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1471–1479.
- Liang, Q., Zhang, X. P., Lee, K. H., Wang, Y. B., Yu, K. and Shen, W. Y. 2015. Nitrogen removal and water microbiota in grass carp culture following supplementation with *Bacillus licheniformis*, BSK-4. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31: 1711–1718.

- Lin, Y., Kong, H. N., He, Y. L., Liu, B. B., Inamori, Y. and Yan, L. 2007. Isolation and characterization of a new heterotrophic nitrifying *Bacillus* sp. strain 1. *Biomedical and Environmental Sciences* 20: 450–455.
- Liu, B., Xie, J., Liu, W., Wang, T., Wang, H. and Du, W. 2006. Effects of *Bacillus licheniformis* on digestive performance and growth of allo gynogenetic crucian carp. *Journal of Dalian Fisheries University* 21: 336–340.
- Liu, Y., Lai, Q., Dong, C., Sun, F., Wang, L., Li, G. and Shao, Z. 2013. Phylogenetic diversity of the *B. pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. *Plos One* 8: 1–11.
- Loncar, N., Bozic, N., Santin, J. L. and Vujcic, Z. 2013. *Bacillus amyloliquefaciens* laccase—from soil bacteria to recombinant enzyme for wastewater decolonization. *Bioresource Technology* 147: 177–183.
- Lu, L., Hongxin, T., Guozhi, L. and Wenyan, L. 2012a. The effects of *Bacillus subtilis* on nitrogen recycling from aquaculture solid waste using heterotrophic nitrogen assimilation in sequencing batch reactors. *Bioresource Technology* 124: 180–185.
- Lu, Z. T., Wang, J. L., Lin, S. X. and Zhang, Y. T. 2012b. Degradation of rut in into isoquercitrin by *Bacillus litoralis* strain C44. *Journal of Electrical and Electronics Engineering* 2: 1154–1161.
- Luo, L., Zhao, Z., Huang, X., Du, X., Wang, C., Li, J., Wang, L. and Xu, O. 2016. Isolation identification and optimization of culture conditions of a biofloculant-producing bacterium *Bacillus megaterium* SP1 and its application in aquaculture wastewater treatment. *BioMed Research International* 2: 1–9.
- Manzo, N., Luccia, D. B., Isticato, R., Apuzzo, D. E., Felice, D. M. and Ric, E. 2013. Pigmentation and sporulation are alternative cell fates in *B. pumilus* SF214. *Plos One* 8: 1–12.

- McIntosh, D., Samocha, T. M., Jones, E. R., Lawrence, A. L., Horowitz, S. and Horowitz, A. 2001. Effects of two commercially available low-protein diets (21% and 3%) on water and sediment quality on the production *Litopenaeus vannamei* in an outdoor tank system with limited water discharge. *Aquaculture Engineering* 25: 69–82.
- Meikle, J. J. 1953. The nitrifying bacteria. *European Journal of Soil Science* 4: 59–68.
- Menasveta, P., Panritdam, T., Sihanonth, P., Powtongsook, S., Chuntapa, B. and Lee, P. 2001. Design and function of a closed, recirculating seawater system with denitrification for the culture of black tiger shrimp broodstock. *Aquacultural Engineering* 25: 35–49.
- Mevel, G. and Prieur, D. 2000. Heterotrophic nitrification by a thermophilic *Bacillus* species as influence by different culture conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 46: 465–473.
- Musig, Y., Ruttanagosrigit, W., Sumpawapool, S. and Boyd, E. C. 1995. Effluents from intensive culture ponds of tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius). *Kasetsart University Fisheries Bulletin* 21: 17–27.
- Muthuwani, U. and Lin, C. K. 1996. Water quality and nutrient budget in intensive shrimp culture ponds. Book of abstracts, The 1996 Annual Meeting of the World Aquaculture Society. Bangkok Thailand. 29 January–2 February. p. 270.
- Navin, C. M., Iyapparaj, P., Moovendhan, S., Ramasubburayan, R., Prakash, S., Immanuel, G. and Palavesam, A. 2014. Influence of probiotic bacterium *B. cereus* isolated from the gut of wild shrimp *P. monodon* in turn as a potent growth promoter and immune enhancer in *P. monodon*. *Fish and Shellfish Immunology* 36: 38–45.
- Nimrat, S., Sawangchit, P. and Vuthiphandchai, V. 2004. Removal of malachite green employing physical and biological processes. *Science Asia* 30: 351–357.
- O-Thong, S., Jiapakdee, R. and Intrasungkha, N. 2003. Wastewater generated from marine shrimp feed and its treatment potential by internal filter system. *Thaksin University Journal* 6: 41–53.

- Padhi, S. K., Tripathy, S., Sen, R., Mahapatra, A. S., Mohanty, S. and Maiti, N. K. 2013. Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation* 78: 67–73.
- Pal, L., Kraigher, B., Humar, B. B., Levstek, M. and Mulec, M. I. 2012. Total bacterial and ammonia-oxidizer community structure in moving bed biofilm reactors treating municipal wastewater and inorganic synthetic wastewater. *Bioresource Technology* 110: 135–143.
- Patureau, D. and Bernet, N. 2000. Effect of dissolved oxygen and carbon nitrogen loads on denitrification by an aerobic consortium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54: 535–542.
- Patureau, D., Davison, J., Bernet, N. and Moletta, R. 1994. Denitrification under various aeration conditions in *Comomonas* sp., strain SGLY2. *FEMS Microbiology Ecology* 14: 71–78.
- Purivirojkul, W., Maketon, M. and Areechon, N. 2005. Probiotic properties of *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis* in Black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) culture. *Kasetsart Journal* 39: 262–273.
- Rajakumar, S., Ayyasamy, P. M., Shanthi, K., Thavamani, P., Velmurugan, P., Songa, Y. C. and Lakshmanaperumalsamy, P. 2008. Nitrate removal efficiency of bacterial consortium (*Pseudomonas* sp. KW1 and *Bacillus* sp. YW4) in synthetic nitrate-rich water. *Journal of Hazardous Materials* 157: 553–563.
- Rasmussen, T., Berks, B. C., Butt, J. N. and Thomson, A. J. 2002. Multiple forms of the catalytic centre, CuZ *Paracoccus pantotrophus*. *Biochemical Journal* 364: 807–815.
- Rey, M. W., Ramaiya, P., Nelson, B. A., Brody, K. S. D., Zaretsky, E. J. and Tang, M. 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparison with closely related *Bacillus* species. *Genome Biology* 5: 1–77.
- Rittmann, B. E. and McCarty, P. L. 2001. *Environmental biotechnology—principle and applications*. McGraw–Hill International Edition, Singapore. 754 pp.

- Robertson, A. L. and Philips, M. J. 1995. Mangrove as filters of shrimp pond effluent: predictions and biogeochemical researched. *Hydrobiologia* 295: 311–321.
- Rosovitz, M. J., Voskuil, M. I. and Chambliss, G. H. 1998. *Bacillus*. *Microbiology and Microbial Infections Systematic Bacteriology* 2: 709–729.
- Rout, P. R., Bhunia, P. and Dash, R. R. 2017. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous from domestic wastewater using *Bacillus cereus* GS-5 strain exhibiting heterotrophic nitrification, aerobic denitrification and denitrifying phosphorous removal. *Bioresource Technology* 244: 484–495.
- Safitri, R., Priadie, R., Miranti, M. and Astut, W. A. 2015. Ability of bacterial consortium: *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Nitrosomonas* sp. and *Pseudomonas putida* in bioremediation of waste water in cisiring waste water treatment plant. *Agrolife Scientific Journal* 4: 146–152.
- Saïd, M., Ezzahra, F. A., Jamal, A., Mohammed, R. and Omar, A. 2014. Heterotrophic denitrification by gram-positive bacteria: *Bacillus cereus* and *Bacillus tequilensis*. *International Journal of Scientific and Research Publications* 4: 1–4.
- Sakai, K., Nakamura, K., Wakayama, M. and Moriguchi, M. 1997. change in nitrite conversion direction from oxidation to reduction in heterotrophic bacteria depending on the aeration conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84: 47–52.
- Sangnoi, Y., Chankaew, S. and O-Thong, S. 2017. Indigenous *Halomonas* spp., the potential nitrifying bacteria for saline ammonium waste water treatment. *Pakistan Journal of Biological Science* 20: 52–58.
- Schryver, P. D., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N. and Verstraete, W. 2008. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture* 277: 125–137.

- 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). *Groundwater for Sustainable Development* 5: 21–27.
- Shan, H. and Obbard, J. P. 2001. Ammonia removal from prawn aquaculture water using immobilized nitrifying bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 791–798.
- Sheela, B., Khasim, S. B. and Yellaji, O. R. 2015. Simultaneous nitrification and denitrification of ammonical wastewaters using *Bacillus* species SB1 isolated from domestic sewage. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research* 4: 7–21.
- Shih, I. L., Pei, J., Wu, S. and Chwen, J. 2005. Microbial production of a poly (C–glutamic acid) derivative by *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry* 40: 2827–2832.
- 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.
- Sonune, N. and Garodeb, A. 2018. Isolation, characterization and identification of extracellular enzyme producer *Bacillus licheniformis* from municipal wastewater and evaluation of their biodegradability. *Biotechnology Research and Innovation* 2: 37–44.
- Spotte, S. 1979. *Seawater aquariums: the captive environment*. John Wiley and Sons, New York. 413 pp.
- Stackebrandt, E. and Goebel, B. M. 1994. Taxonomic note: A place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44: 846–849.
- Strickland, J. D. H. and Parsons, T. R. 1972. *A practical handbook of seawater analysis*. Fishery Research Board, Canada. 310 pp.
- Su, F., Xu, K., Zhao, B., Tai, C., Tao, F. and Tang, H. 2011. Genome sequence of the thermophilic strain *Bacillus coagulans* XZL4, an efficient pentose–utilizing producer of chemicals. *Journal of Bacteriology* 193: 6398–6399.

- Su, J. J., Liu, B. Y. and Liu, C. Y. 2001. Comparison of aerobic denitrification under high oxygen atmosphere by *Thiosphaera pantotropha* ATCC35512 and *Pseudomonas stutzeri* SU2 newly isolated from the activated sludge of a piggery wastewater treatment system. *Journal of Applied Microbiology* 90: 457–462.
- Suharti, H. A. and Vries, S. 2004. NO reductase from *Bacillus azotoformans* is a bifunctional enzyme accepting electrons from menaquinol and a specific endogenous membrane-bound cytochrome C 551. *Biochemistry* 43: 13487–13495.
- Suharti, H. A. and Vries, S. 2005. Membrane-bound denitrification in the gram-positive bacterium *Bacillus azotoformans*. *Biochemical Society Transactions* 33: 130–133.
- Sun, Y., Paul, D. V. and Heylen, K. 2016. Nitrous oxide emission by the non-denitrifying nitrate ammonifier *Bacillus licheniformis*. *BMC Genomics* 17: 1–11.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- Taylor, S. M., He, Y., Zhao, B. and Huang, J. 2009. Heterotrophic ammonium removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying–denitrifying bacterium, *Providencia rettgeri* YL. *Journal of Environmental Sciences* 21: 1336–1341.
- Verbaendert, I., Boon, N., Vos, D. P. and Heylen, K. 2011. Denitrification is a common feature among members of the genus *Bacillus*. *Systematic and Applied Microbiology* 34: 385–391.
- Visvanathan, C., Hung, N. Q. and Jegatheesan, V. 2008. Hydrogenotrophic denitrification of synthetic aquaculture wastewater using membrane bioreactor. *Process Biochemistry* 43: 673–682.
- Wen, Y. and Wei, C. H. 2011. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacterium isolated from anaerobic/anoxic/oxic treatment system. *African Journal of Biotechnology* 10: 6985–6990.

- Widanarni, D., Sukenda, Y. and Ekasari, J. 2010. Nursery culture performance of *Litopenaeus vannamei* with probiotics addition and different C/N ratio under laboratory condition. HAYATI Journal of Biosciences 17: 115–119.
- Wu, Y., Li, T. and Yang, L. 2012. Mechanisms of removing pollutants from aqueous solutions by microorganisms and their aggregates. Bioresource Technology 107: 10–18.
- Xiao, J., Zhu, C., Sun, D., Guo, P. and Tian, Y. 2011. Removal of ammonium–N from ammonium–rich sewage using an immobilized *Bacillus subtilis* AYC bioreactor system. Journal of Environmental Sciences 23: 1279–1285.
- Yan, L., He, L. Y., Kong, N. H., Tanaka, S. and Lin, Y. 2006. Isolation of a new heterotrophic nitrifying *Bacillus* sp. strain. Journal of Environmental Biology 27: 323–326.
- Yang, L., Ren, Y. X., Liang, X., Zhao, S. Q., Wang, J. P. and Xia, Z. H. 2015. Nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifier *Acinetobacter junii* YB and its potential application for the treatment of high–strength nitrogenous wastewater. Bioresource Technology 193: 227–233.
- Yang, X. P., Wang, S. M., Zhang, D. W. and Zhou, L. X. 2011. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying–denitrifying bacterium *Bacillus subtilis* A1. Bioresource Technology 102: 854–862.
- Yao, Y. C., Zhang, Q. L., Liu, Y. and Liu, Z. P. 2013. Simultaneous removal of organic matter and nitrogen by a heterotrophic nitrifying–aerobic denitrifying bacterial strain in a membrane bioreactor. Bioresource Technology 143: 83–87.
- Yoo, S. H., Ahn, H. K., Lee, J. H., Lee, H. K., Kwak, J. Y. and Song, G. K. 1999. Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SND) via nitrite in an intermittently–aerated reactor. Water Research 33: 145–154.
- Yu, A. R., Li, Y. and Yu, J. A. 2005. Denitrification of a newly isolated *Bacillus* strain W2 and its application in aquaculture. Journal of Microbiology 25: 77–81.

- Yusuf, O. R., Noor, Z. Z., Hassan, M. A., Agarry, E. S. and Solomon, O. B. 2013. A comparison of the efficacy of two strains of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fragii* in the treatment of tannery wastewater. *Desalination and Water Treatment* 51: 3189–3195.
- Zakaria, Z., Gairola, S. and Sharif, M. N. 2010. Effective microorganisms (EM) technology for water quality restoration and potential for sustainable water resources and management. *International Congress on Environmental Modelling and Software* 142: 1–9.
- Zhang, Q. L., Liu, Y., Ai, G. M., Miao, L. L., Zheng, H. Y. and Liu, Z. P. 2012. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7. *Bioresource Technology* 108: 35–44.
- Zhao, B. 2009. Nitrogen removal through heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by heterotrophic nitrifier of *Bacillus* sp. LY. *Environmental Science and Engineering* 10: 1–4.
- Zhao, C., Yan, X., Yang, S. and Chen, F. 2017. Screening of *Bacillus* strains from luzhou–flavor liquor making for high–yield ethyl hexanoate and low–yield propanol. *Food Science and Technology* 77: 60–66.
- Zhao, S., Hu, N., Chen, Z., Zhao, B. and Liang, Y. 2009. Bioremediation of reclaimed wastewater used as landscape water by using the denitrifying bacterium *Bacillus cereus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 83: 337–340.
- Zheng, H. Y., Liu, Y., Gao, X. Y., Ai, G. M., Miao, L. L. and Liu, Z. P. 2012. Characterization of a marine origin aerobic nitrifying–denitrifying bacterium. *Bioscience and Bioengineering* 114: 33–37.
- Zhu, W., Liu, Y., Cao, X., Zhang, S., Wang, C., and Lin, X. 2015. Recovering organic matters and ions from wastewater by genetically engineered *Bacillus subtilis* biomass. *Journal of Environmental Management* 161: 402–407.

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

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวทศพร เพชรทองเกลี้ยง

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5910620027

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (สาขา วิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยีการเกษตร)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2558

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

1. ทุนวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ปี 2562 (สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ: วช.) Government Budget Grant (NAT620128S)
2. ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2562

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

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

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