

การศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่บำบัดสารอินทรีย์ในโตรเจน  
ในน้ำทิ้งที่มีความเค็มด้วยระบบเอสบีอาร์แบบสองขั้นตอน  
โดยใช้เทคนิคด้าน 16S rRNA

ดอกรัก ชัยसार

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา  
มหาวิทยาลัยทักษิณ

2549

ISBN 974 - 451 - 651 - 8

การศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่บำบัดสารอนินทรีย์ในโตรเจน  
ในน้ำทิ้งที่มีความเค็มด้วยระบบเอสปีอาร์แบบสองขั้นตอน  
โดยใช้เทคนิคด้าน 16S rRNA

Bacterial Communities Structure Analysis in 2-step Sequencing Batch  
Reactors System Treating Inorganic Nitrogen from Saline Wastewater  
using 16S rRNA Approach

ดอกรัก ชัยसार

Dorkrak Chaisarn

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา  
มหาวิทยาลัยทักษิณ

2549

Presented in partial fulfillment of the requirements for the  
Master of Science degree in Biology at Thaksin University

March 2006

ISBN 974 - 451 - 651 - 8



**ใบรับรองวิทยานิพนธ์**  
**ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา**  
**มหาวิทยาลัยทักษิณ**

ชื่อวิทยานิพนธ์ : การศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่บำบัดสารอินทรีย์ในโตรเจนในน้ำทิ้งที่มี  
 ความเค็มด้วยระบบเอสปีอาร์แบบสองขั้นตอนโดยใช้เทคนิคด้าน 16S rRNA

ชื่อ-ชื่อสกุลผู้ทำวิทยานิพนธ์ : นายดอกกรัก ชัยसार

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.....ประธานที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นฤกุล อินทรระสังขา)

.....กรรมการที่ปรึกษา

(อาจารย์ นพดล ศุภระกาญจน์)

.....กรรมการที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร.ประดิษฐ์ ตั้งสกุล)

มหาวิทยาลัยทักษิณอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
 หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยทักษิณ

.....

(อาจารย์ ดร.สมศักดิ์ โชคนฤกุล)

รักษาการในตำแหน่ง คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

สำเร็จการศึกษาเมื่อวันที่..... เดือน..... พ.ศ. 2549

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยทักษิณ

## บทคัดย่อ

น้ำทิ้งที่มีความเค็มมีที่มาจากแหล่งอุตสาหกรรมและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งเป็นส่วนใหญ่มีการปนเปื้อนสารประกอบไนโตรเจนในปริมาณสูง การศึกษานิเวศวิทยาของแบคทีเรียไนโตริฟิเคชันและดีไนโตริฟิเคชันมีประโยชน์ในการควบคุมการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสียให้เกิดกระบวนการไนโตริฟิเคชันและดีไนโตริฟิเคชันอย่างมีประสิทธิภาพ การศึกษานี้ได้ทดลองบำบัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำทิ้งความเค็ม 25 พีพีทีด้วยระบบเอสบีอาร์แบบสองขั้นตอน โดยป้อนน้ำเสียในถังเติมอากาศด้วยน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแอมโมเนีย-ไนโตรเจน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (Nitrifying sequencing batch reactor ; NSBR) นำน้ำปล่อยทิ้งจาก NSBR ซึ่งมีในเตรทเป็นผลผลิตมาเติมเมทานอลด้วยอัตราส่วนเมทานอลต่อ ไนเตรทเท่ากับ 3:1 แล้วส่งต่อไปกับถังที่สองซึ่งเป็นถังไร้ออกซิเจนอิสระ (Denitrifying sequencing batch reactor; DSBR) ดำเนินระบบด้วยอายุตะกอน 60 วัน ระยะเวลาพักน้ำ 1.75 วัน พบว่า NSBR มีสมรรถนะในการบำบัดแอมโมเนียร้อยละ 99.9 DSBR มีสมรรถนะในการบำบัดไนเตรทร้อยละ 99.3 อัตราการเกิดกระบวนการไนโตริฟิเคชันจำเพาะของ NSBR เท่ากับ  $0.20 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N mgMLVSS}^{-1} \text{d}^{-1}$  อัตราการเกิดกระบวนการดีไนโตริฟิเคชันจำเพาะของ DSBR เท่ากับ  $0.15 \text{ mgNO}_3\text{-N mgMLVSS}^{-1} \text{d}^{-1}$  การนับจำนวนด้วยเทคนิค MPN (Most probable number) พบ AOB (Ammonia oxidizing bacteria) NOB (Nitrite oxidizing bacteria) NRB (Nitrate reducing bacteria) และ DB (Denitrifying bacteria) ในปริมาณต่างกัน การศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library ใน NSBR พบกลุ่มแบคทีเรียแท้จริงที่ยังจำแนกชนิดไม่ได้ (Unidentified Eubacterium) เป็นกลุ่มเด่นร้อยละ 39 ของจำนวน Clone ทั้งหมด พบ *Nitrosococcus oceani* ร้อยละ 4 คาดว่าเป็น AOB ที่มีบทบาทในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย แต่ไม่พบแบคทีเรียที่เคยมีรายงานว่าเป็น NOB คาดว่าน่าจะเป็น NOB ชนิดใหม่ ส่วน DSBR พบ *Methylophaga marina* ซึ่งเป็นสมาชิกของคลาส *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มเด่นคิดเป็นร้อยละ 56.6 ของจำนวน Clone ทั้งหมด คาดว่าน่าจะเป็นกลุ่มที่มีบทบาทในการรีดิวซ์ไนเตรท เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) โดยการใส่ DNA probe ที่จำเพาะกับ AOB และ NOB จากงานวิจัยอื่นพบว่าใน NSBR ไม่พบทั้ง AOB และ NOB ส่วนใน DSBR พบ *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มเด่นสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library ผลการศึกษาแสดงว่าใน NSBR พบแบคทีเรียกลุ่มใหม่ที่มีลักษณะเฉพาะซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม ส่วนใน DSBR นั้น *Methylophaga* น่าจะเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทในกระบวนการดีไนโตริฟิเคชันในน้ำทิ้งที่มีความเค็มโดยใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน

## Abstract

The saline wastewater generated from various industrial activities and coastal aquaculture usually contains high concentration of nitrogen compounds. It is important to understand the ecology of nitrifying and denitrifying bacterial communities to obtain high efficiency of nitrification and denitrification processes in biological wastewater treatment system. The microbial community composition in nitrification and denitrification activated sludge from 2-step sequencing batch reactors was investigated with most probable number (MPN) enumeration, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and 16S rRNA characterization. The first reactor, nitrifying sequencing batch reactor (NSBR), was fed with artificial wastewater containing 100 mg/l  $\text{NH}_4^+$ -N with 2.5% NaCl. The second reactor, denitrifying sequencing batch reactor (DSBR), was fed with effluent from NSBR. Methanol was used as external carbon source supplied for DSBR with a methanol to  $\text{NO}_3^-$ -N (M/N) ratio in excess of 3:1 to ensure unlimited carbon substrate. The results showed that this system could obtain high nitrogen removal efficiencies both for ammonia (99.9%) and nitrate (99.3%). The specific nitrification rate and specific denitrification rate were found at  $0.20 \text{ mgNH}_4^+\text{-N mgMLVSS}^{-1}\text{d}^{-1}$  in NSBR and  $0.15 \text{ mgNO}_3^-\text{-N mgMLVSS}^{-1}\text{d}^{-1}$  in DSBR, respectively. Unidentified bacteria were found abundantly (39% of total clones) and *Nitrosococcus oceanus* was found (4 % of total clones) as a candidate of AOB in the NSBR. NOB clone was not detected. Chemical analyses and MPN results showed that ammonia oxidizing bacteria (AOB) and nitrite oxidizing bacteria (NOB) certainly existed in the NSBR. However, both of them were not detected by FISH technique using known AOB or NOB oligonucleotide probes. *Methylophaga marina* was found as a dominant group (56.6 % of total clones) in the DSBR. The copiously existence of *Methylophaga* also indicated by FISH result as *Gammaproteobacteria* were found profusely. These results suggested that *Methylophaga* may play the important role of saline denitrification in DSBR with methanol as carbon source.

## ประกาศขอบคุณการ

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นฤกุล อินทระสังขา ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่ให้ความช่วยเหลือข้าพเจ้าในทุกๆ ด้านในการทำวิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษาทั้ง 4 ปี รวมทั้งขอขอบคุณ อาจารย์นพดล ศุภระภาญจน์ และ อาจารย์ ดร.ประดิษฐ์ ตั้งสกุล กรรมการที่ปรึกษาที่ให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขเพิ่มเติมเพื่อความสมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมภพ อินทสุวรรณ และอาจารย์ ดร.เป็ลียง สุวรรณมณี กรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์เพิ่มเติม ที่ให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขเพิ่มเติมเพื่อความสมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ Dr. Chanyarat Paungfoo-Lonhienne แห่ง School of Integrative Biology, The University of Queensland, Australia ที่ให้ความช่วยเหลือด้านเทคนิคทางชีวโมเลกุล

ขอขอบคุณ คุณมาณี แก้วชนิด และสมาชิก Environmental Microbiology and Biotechnology Group (EMBG) ทุกท่านได้แก่ คุณกรวิภา ศรีวัฒนวรัญญู คุณขวัญตา ตันติกำธน คุณเวลาวี ไชยพันธุ์ คุณลัดดาวรรณ จันทโหม คุณเกษุร คำคง และคุณดาริกา วสุนธรากุล ที่ให้ความช่วยเหลือและแลกเปลี่ยนความคิดเห็น โดยเฉพาะคุณวีณา จิรัฏฐิวิรุฒม์กุล ที่ให้ความช่วยเหลือทั้งร่างกายและแรงใจในการทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณบิดามารดา และผู้มีพระคุณทุกท่าน

ดอกกรัก ชัยसार

มีนาคม 2549

## สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ.....	1
	ภูมิหลัง.....	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
	ขอบเขตการวิจัย.....	3
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
	ปัญหาน้ำเสียและน้ำเสียที่มีความเค็ม.....	4
	การบำบัดน้ำเสีย.....	6
	วัฏจักรไนโตรเจน.....	10
	การบำบัดไนโตรเจนทางชีวภาพ.....	14
	เทคนิคการศึกษาชุมชนจุลินทรีย์.....	18
	เทคนิคด้าน 16S rRNA.....	20
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	24
3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	28
	อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	28
	วัสดุ.....	29
	วิธีการทดลอง.....	31
4	ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	38
	ประสิทธิภาพการบำบัดสารอินทรีย์ไนโตรเจน.....	38
	การศึกษาลักษณะทั่วไปของตะกอนจุลินทรีย์.....	45
	การศึกษาจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค MPN.....	47
	การศึกษาโครงสร้างแบคทีเรียด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library.....	48
	การศึกษาจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค FISH.....	54
5	สรุปผลและข้อเสนอแนะ.....	61
	สรุปผล.....	61
	ข้อเสนอแนะ.....	62
	บรรณานุกรม.....	63
	ภาคผนวก.....	79
	ประวัติย่อผู้วิจัย.....	89

## สารบัญญัตราสาร

ตารางที่	หน้า
1 แสดงระดับของการบำบัดน้ำเสีย.....	7
2 แสดงเอนไซม์ที่พบมากในกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน.....	13
3 แสดงองค์ประกอบของสารละลาย Trace element.....	30
4 แสดงระยะเวลาการทำงานของระบบเอสปีอาร์แบบสองขั้นตอนใน 1 รอบการทำงาน.....	32
5 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา.....	36
6 แสดงดีเอ็นเอโพรบที่ใช้สำหรับเทคนิค FISH.....	37
7 แสดงอัตราการบรรทุกของแอมโมเนียม-ไนโตรเจนและไนเตรท-ไนโตรเจนที่ เข้าสู่ถัง NSBR และ DSBR.....	42
8 แสดงเปรียบเทียบค่า Specific denitrification rate โดยใช้เมทานอลเป็น แหล่งคาร์บอนกับงานวิจัยอื่น.....	45
9 แสดงผลการ BLAST กลุ่มแบคทีเรียที่พบใน NSBR clone library.....	50
10 แสดงผลการ BLAST กลุ่มแบคทีเรียที่พบใน DSBR clone library.....	51
11 แสดงโครงสร้างของประชากรแบคทีเรียใน Clone library ของตัวอย่าง NSBR และ DSBR .....	52
12 แสดงผลการตรวจสอบแบคทีเรียไนตริไฟอิงด้วยเทคนิค FISH ใน NSBR.....	56
13 แสดงค่าเอ็มพีเอ็น.....	80
14 แสดงส่วนประกอบของ Formamide และน้ำสำหรับเตรียม Hybridization buffer.....	82
15 แสดงส่วนประกอบของ NaCl และ EDTA สำหรับเตรียม Wash buffer.....	82
16 แสดงจำนวนและสมาชิกใน OTU ของ Clone library ตัวอย่าง NSBR.....	83
17 แสดงจำนวนและสมาชิกใน OTU ของ Clone library ตัวอย่าง DSBR.....	85



## สารบัญภาพประกอบ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงสัดส่วนปริมาณของไนโตรเจนในรูปแบบต่างๆ ที่เข้าสู่บ่อ และหลังเข้าไป ในบ่อจากการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนา.....	5
2 แสดงแผนผังระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอเอสโดยทั่วไป.....	8
3 แสดงแผนผังระยะการทำงานใน 1 รอบของระบบเอสปีอาร์โดยทั่วไป.....	9
4 แสดงวัฏจักรของไนโตรเจน.....	10
5 การบำบัดไนโตรเจนโดยการอาศัยกระบวนการไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน แบบทางลัดผ่านการสะสมไนโตรท.....	15
6 แสดงการใช้เทคนิค Full-cycle rRNA approach ในการศึกษาโครงสร้าง จุลินทรีย์ในธรรมชาติ.....	21
7 แสดงหลักการของเทคนิค FISH.....	24
8 แสดงแผนผังระบบเอสปีอาร์แบบสองขั้นตอน.....	31
9 แสดงระบบเอสปีอาร์แบบสองขั้นตอนที่ใช้ในการศึกษา.....	32
10 แสดงค่าแอมโมเนียม ไนโตรท และไนเตรท ในน้ำที่ผ่านการบำบัดจาก NSBR ที่ดำเนินระบบด้วยระยะเวลาพักน้ำ 1.75 วัน.....	39
11 แสดงค่าแอมโมเนียม ไนโตรท และไนเตรท ในน้ำที่ผ่านการบำบัดจาก DSBR ที่ดำเนินระบบด้วยระยะเวลาพักน้ำ 1.75 วัน.....	40
12 แสดงประสิทธิภาพของการบำบัดแอมโมเนียและไนเตรทของ NSBR และ DSBR ที่ดำเนินระบบด้วยระยะเวลาพักน้ำที่แตกต่างกัน.....	42
13 แสดงภาพถ่ายลักษณะตะกอนจุลินทรีย์จาก NSBR ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง ในช่วงที่ระบบยังไม่เข้าสู่ภาวะคงที่.....	46
14 แสดงภาพถ่ายลักษณะตะกอนจุลินทรีย์ใน DSBR ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง ในช่วงที่ระบบเข้าสู่ภาวะคงที่.....	47
15 แสดงจำนวนแบคทีเรียไนตริไฟอิงและดีไนตริไฟอิงใน NSBR และ DSBR ที่นับ ด้วยเทคนิค MPN แบบไมโครเทคนิคในวันที่ 70 ของการดำเนินระบบ.....	48
16 แสดงจำนวน OTU ใน NSBR clone library ที่ได้ทั้งหมดหลังแบ่งกลุ่มด้วย เทคนิค REA.....	49

## สารบัญภาพประกอบ (ต่อ)

17	แสดงจำนวน OTU ใน DSBR clone library ที่ได้ทั้งหมดหลังแบ่งกลุ่มด้วยเทคนิค REA.....	51
18	แสดงสัดส่วนเป็นร้อยละของแบคทีเรียไฟลัม <i>Proteobacteria</i> เมื่อเทียบกับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH ในตัวอย่าง NSBR.....	55
19	แสดงภาพถ่ายเซลล์แบคทีเรียจากตัวอย่าง NSBR จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ดีเอ็นเอโพรบ ALF1b, GAM42a และ EUBmixed.....	57
20	แสดงภาพถ่ายตะกอนจุลินทรีย์จาก NSBR ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ดีเอ็นเอโพรบ EUBmixed และ Hlm747.....	58
21	แสดงสัดส่วนเป็นร้อยละของแบคทีเรียไฟลัม <i>Proteobacteria</i> เมื่อเทียบกับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH ในตัวอย่าง DSBR.....	59
22	แสดงภาพถ่ายตะกอนจุลินทรีย์จาก DSBR ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ดีเอ็นเอโพรบ EUBmixed และ GAM42a.....	60
23	แสดงดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ใน NSBR และ DSBR.....	87
24	แสดง PCR product ที่ได้รับจากการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR จากตัวอย่างดีเอ็นเอของ NSBR.....	87
25	แสดงรูปแบบแบนด์ของ OTU D1 จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค REA โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HinP1I และ Msp1.....	87
26	แสดง Chromatogram จากการหาลำดับเบสยีน 16S rRNA ของ OTU N1 ....	88

# บทที่ 1

## บทนำ

### ภูมิหลัง

ธาตุอาหาร (Nutrient) โดยเฉพาะสารประกอบไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเป็นสาเหตุหลักของปัญหายูโทรฟิเคชัน (Eutrophication) ส่งผลกระทบต่อทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ (ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2544) มีต้นกำเนิดจากกิจกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรม แหล่งชุมชน เกษตรกรรม โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งเป็นแหล่งกำเนิดหลักของน้ำเสียที่มีความเค็ม (Saline wastewater) ซึ่งนอกจากจะมีความสกปรกในรูปของสารอินทรีย์คาร์บอนแล้วยังมีความสกปรกในรูปของธาตุอาหารโดยเฉพาะไนโตรเจนเป็นอย่างมาก (Briggs and Funge-Smith. 1994 ; Tookvinas et al. 2001) แม้ว่าการบำบัดน้ำเสียในขั้นที่สาม (Tertiary treatment) ซึ่งเป็นการบำบัดธาตุอาหารจะได้รับการยอมรับในประเทศที่พัฒนาแล้ว โดยมีการพัฒนาและออกแบบระบบบำบัดแบบแอกทีฟเต็ดสลัดจ์ (Activated sludge ; AS) ให้มีความสามารถในการบำบัดธาตุอาหารทางชีวภาพ (Biological nutrient removal ; BNR) ได้มากขึ้นนอกเหนือจากการบำบัดคาร์บอนเพียงอย่างเดียว (นุกูล อินทระสังขา. 2547) สำหรับในประเทศไทยการบำบัดน้ำเสียในขั้นที่สามยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนัก เนื่องจากทำให้ค่าใช้จ่ายเพิ่มสูงขึ้นและยังขาดมาตรการบังคับใช้ทางกฎหมาย

การบำบัดไนโตรเจนทางชีวภาพ (Biological nitrogen removal) เป็นการอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงรูปสารประกอบไนโตรเจน ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการสารอาหารและสภาวะในการเจริญที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะลักษณะชุมชนจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียนั้นมีความซับซ้อน ประกอบไปด้วยจุลินทรีย์หลายกลุ่มอาศัยอยู่ร่วมกันและมีความสัมพันธ์ระหว่างกันและกัน (Bitton. 1994) ดังนั้นความรู้ความเข้าใจการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์จึงมีความจำเป็นสำหรับเป็นข้อมูลในการสร้างสภาวะที่เหมาะสมตลอดจนการควบคุมดูแลระบบบำบัดน้ำเสียให้มีประสิทธิภาพ สำหรับน้ำเสียที่มีความเค็มมีลักษณะจำเพาะไม่เหมือนน้ำเสียทั่วไป ความเข้มข้นของเกลือโดยเฉพาะจาก NaCl มีผลโดยตรงต่อการเจริญและชนิดของจุลินทรีย์ จึงส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของระบบในการบำบัดธาตุอาหารด้วย (Uygur. 2006 ; Nugul Intrasungkha. 1998) ซึ่งปัจจุบันประเทศไทยมีงานวิจัยเกี่ยวกับการบำบัดไนโตรเจนในน้ำเค็มและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องไม่มาก

การศึกษาจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการบำบัดน้ำเสียที่ผ่านมาอาศัยเทคนิคที่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture-dependent method) ทำให้ไม่สามารถเข้าใจถึงกระบวนการทางชีวภาพในการบำบัดไนโตรเจนของจุลินทรีย์ได้อย่างสมบูรณ์เนื่องจากจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (Amann, Ludwig and Schleifer. 1995) เทคนิคทางชีวโมเลกุลจึงถูกพัฒนาอย่างรวดเร็วในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา โดยเฉพาะเทคนิคที่อาศัยไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (Ribosomal ribonucleic acid ; rRNA) ซึ่งเป็นการศึกษาจุลินทรีย์โดยตรง ในที่อยู่อาศัย (*in situ*) โดยไม่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture-independent method) แต่เป็นเทคนิคที่อาศัยข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA มาใช้ในการเปรียบเทียบและจำแนกสิ่งมีชีวิตแทนซึ่งศึกษาได้ทั้งชนิดและปริมาณ ทำให้ช่วยลดข้อจำกัดของเทคนิคการศึกษาจุลินทรีย์แบบดั้งเดิมได้ และสามารถศึกษาจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในระบบบำบัดน้ำเสียได้อย่างแม่นยำมากยิ่งขึ้น (Scharmm and Amann. 2000)

การศึกษารุ่นนี้ได้ทดลองบำบัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำทิ้งที่มีความเค็มระดับ 25 พีพีทีด้วยระบบเอสปีอาร์แบบสองขั้นตอน โดยถึงแรกเป็นถังเติมอากาศเพื่อทำให้เกิดการบำบัดแอมโมเนียโดยกระบวนการไนตริฟิเคชันของกลุ่มแบคทีเรียไนตริไฟอิง จากนั้นน้ำทิ้งซึ่งมีไนเตรทในถังแรกจะถูกส่งต่อไปถึงที่สองซึ่งเป็นถังไร้ออกซิเจนอิสระเพื่อบำบัดไนเตรทโดยอาศัยกระบวนการดีไนตริฟิเคชันของกลุ่มแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง ซึ่งถือเป็นการบำบัดไนโตรเจนในน้ำทิ้งอย่างสมบูรณ์ จากนั้นทำการศึกษาโครงสร้างแบคทีเรียไนตริไฟอิงและแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงในระบบด้วยเทคนิคที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อคือเทคนิคด้านไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA approach) ได้แก่เทคนิค 16S rRNA Clone library และเทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนแบบสมบูรณ์ในน้ำทิ้งที่มีความเค็มด้วยระบบเอสปีอาร์แบบสองขั้นตอน
2. เพื่อศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีความเค็มด้วยระบบเอสปีอาร์แบบสองขั้นตอนโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. ทราบถึงโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องหรือมีบทบาทในกระบวนการไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันในน้ำที่มีความเค็ม
2. เป็นข้อมูลสำหรับการออกแบบตัวติดตามทางชีวภาพ เพื่อนำไปใช้ตรวจสอบติดตามแบคทีเรียไนตริฟิอิงและดีไนตริฟิอิงในสิ่งแวดล้อม
3. เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการออกแบบและควบคุมระบบบำบัดน้ำเสียเพื่อให้ระบบมีประสิทธิภาพในการบำบัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำเสียที่มีความเค็ม
4. ได้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มไนตริฟิอิงและดีไนตริฟิอิงซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งในสภาพแวดล้อมจริงต่อไปได้

### ขอบเขตการวิจัย

1. ศึกษาประสิทธิภาพและอัตราการบำบัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำทิ้งที่มีความเค็มร้อยละ 2.5 (NaCl) ด้วยระบบเอสปีอาร์แบบสองขั้นตอน
2. ศึกษาโครงสร้างของกลุ่มแบคทีเรียในระบบเอสปีอาร์แบบสองขั้นตอนที่บำบัดสารแอมโมเนียไนโตรเจนจากน้ำทิ้งที่มีความเค็มด้วยกระบวนการไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน ด้วยเทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)
3. ศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library ในระบบเอสปีอาร์แบบสองขั้นตอนที่บำบัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนจากน้ำทิ้งที่มีความเค็มด้วยกระบวนการไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

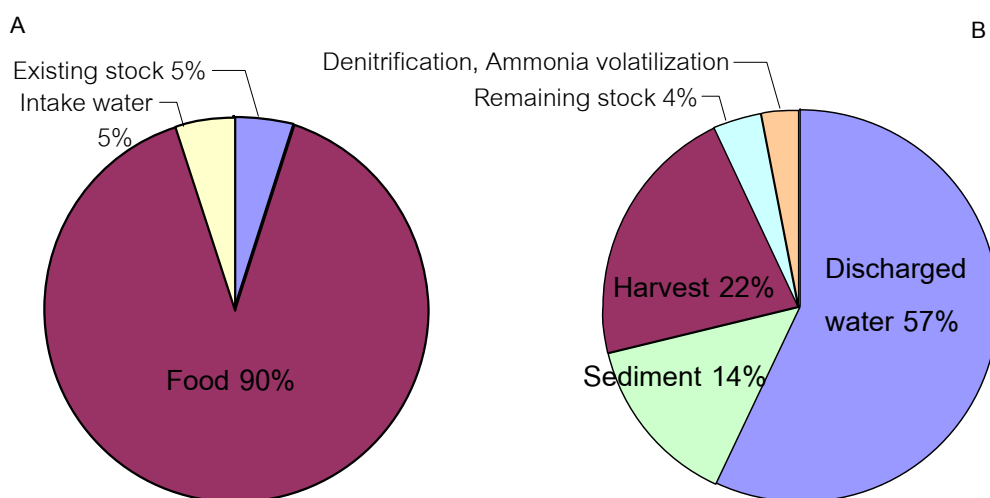
การเจริญเติบโตและขยายตัวอย่างรวดเร็วของเศรษฐกิจและการเพิ่มจำนวนประชากรมนุษย์อย่างรวดเร็วได้ก่อให้เกิดมลพิษจากกิจกรรมต่างๆ เพิ่มมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะปัญหาน้ำเสียซึ่งก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและส่งผลกระทบต่อเนื่องมาถึงมนุษย์ การจัดการน้ำเสียจึงเป็นเรื่องสำคัญที่จะช่วยปกป้องสิ่งแวดล้อมให้คงอยู่อย่างยั่งยืนตลอดไป

#### 1. ปัญหาน้ำเสียและน้ำเสียที่มีความเค็ม

“น้ำเสีย” หมายถึง น้ำที่มีสิ่งเจือปนจนกระทั่งกลายเป็นน้ำที่ไม่ต้องการ และน่ารังเกียจของคนทั่วไป ไม่เหมาะสมสำหรับใช้ประโยชน์อีกต่อไป หรือถ้าปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติก็จะทำให้คุณภาพน้ำของธรรมชาติเสียหายได้ (กรมควบคุมมลพิษ, 2547) แหล่งกำเนิดน้ำเสียมาจากกิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ เช่น อุตสาหกรรม แหล่งชุมชน เกษตรกรรม ลักษณะของน้ำเสียนอกจากจะมีความสกปรกในรูปของสารอินทรีย์แล้วยังมีความสกปรกในรูปของสารอนินทรีย์ด้วย โดยเฉพาะธาตุอาหาร (Nutrient) ที่สำคัญอย่างเช่นไนโตรเจนและฟอสฟอรัส เมื่อมีปริมาณสูงในแหล่งน้ำจะทำให้เกิดการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วของสาหร่ายและพืชน้ำ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ระดับออกซิเจนในน้ำลดลงต่ำมากทั้งในช่วงที่สาหร่ายและพืชน้ำมีการเติบโตอย่างรวดเร็วและหลังจากตายแล้ว ทั้งนี้เนื่องจากการปลดปล่อยสารอินทรีย์สู่แหล่งน้ำ (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2544) นอกจากนี้ยังทำให้เกิดวัชพืชน้ำซึ่งเป็นปัญหาแก่การสัญจรทางน้ำด้วย สำหรับน้ำเสียที่มีความเค็มส่วนใหญ่มีแหล่งที่มาจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งและอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง โดยพบว่าน้ำเสียที่ถูกปล่อยออกจากการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลโดยไม่ผ่านการบำบัดมีความสกปรกในรูปสารอินทรีย์และธาตุอาหารโดยเฉพาะแอมโมเนีย-ไนโตรเจนในปริมาณที่สูงมาก (Funge-Smith and Briggs, 1998 ; Tookvinas et al. 2001) ดังนั้นการบำบัดน้ำเสียที่เกิดจากกิจกรรมดังกล่าวก่อนปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมจึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง

ในทวีปเอเชียการเพาะเลี้ยงกุ้งถือเป็นกิจกรรมหลักของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยมีการส่งออกกุ้งมากถึงร้อยละ 91 ของผลผลิตกุ้งทั่วโลก (FAO, 2003) สำหรับประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงกุ้งตลอดแนวชายฝั่งทะเลของไทยทั้งฝั่งอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามัน ของเสียจากการเลี้ยงกุ้งซึ่งเกิดจากอาหารที่กุ้งกินไม่หมดและสิ่งขับถ่ายของกุ้งเมื่อสะสมอยู่ก้นบ่อจะถูกย่อยสลายด้วย จุลินทรีย์ในสภาวะไร้อากาศทำให้เกิดสารพิษคือแอมโมเนียและไนไตรท์ซึ่งเป็นพิษโดยตรงต่อสัตว์น้ำ (Avnimelech and Ritvo, 2003) นอกจากนี้หากมีการปลดปล่อยน้ำจากการเลี้ยงซึ่งอุดม

ไปด้วยธาตุอาหารออกสู่แหล่งน้ำชายฝั่งก็จะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก (Shang, Leung and Ling. 1998) ในการเพาะเลี้ยงกุ้งมีการใช้อาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงมาก จากการศึกษาการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาบริเวณชายฝั่งทะเลของประเทศออสเตรเลียพบว่าสารไนโตรเจนที่เข้าสู่บ่อกุ้งส่วนใหญ่ (ร้อยละ 90) มาจากอาหารกุ้ง แต่มีไนโตรเจนเพียงร้อยละ 22 เท่านั้นที่ถูกนำไปใช้สร้างเป็นเนื้อกุ้ง ที่เหลือจะกลายเป็นมลพิษทั้งในบ่อเลี้ยงและปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกโดยไนโตรเจนร้อยละ 57 จะถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม (ภาพที่ 1) ส่วนอีกร้อยละ 14 จะอยู่ในเลนกันบ่อ (Jackson et al. 2003) สอดคล้องกับการศึกษาการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาในประเทศไทยซึ่งพบว่ามีไนโตรเจนเพียงร้อยละ 21 ของอาหารกุ้งเท่านั้นที่ถูกเปลี่ยนไปเป็นเนื้อกุ้ง ส่วนที่เหลืออีกประมาณร้อยละ 35 ถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม (Briggs and Funge-Smith. 1994) ส่วนในการเลี้ยงกุ้งแบบกึ่งพัฒนาพบว่าไนโตรเจนส่วนใหญ่คือร้อยละ 72 ของไนโตรเจนที่เข้าไปในบ่อจะถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมด้วยการเปลี่ยนถ่ายน้ำ (Teichert-Coddington, Martinez and Ramirez. 2000)



ภาพที่ 1 สัดส่วนปริมาณของไนโตรเจนในรูปแบบต่างๆ ที่เข้าสู่บ่อ (A) และหลังเข้าไปในบ่อ (B) จากการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนา (Jackson et al. 2003)

นอกจากการเลี้ยงกุ้งในบ่อดินแล้วการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในกระชังก็ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของไนโตรเจนในปริมาณสูงเช่นกันซึ่งเป็นการปลดปล่อยมลพิษลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ

โดยตรง โดยการเลี้ยงปลาในกระชังมีการใช้ในโตรเจนในอาหารปลาสูงตั้งแต่ 47.3 - 320.6 กิโลกรัมต่อตันของผลผลิตปลาขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ทั้งนี้ปลาแต่ละชนิดมีความแตกต่างด้านพฤติกรรมการกินอาหารและมีความสามารถในการนำไนโตรเจนไปสร้างเนื้อหรืออัตรากแลกเนื้อได้ต่างกัน จากการศึกษาโดย Islam (2005) พบว่าโดยเฉลี่ยการเลี้ยงปลาในกระชังจะมีการปลดปล่อยไนโตรเจน 132.5 กิโลกรัม และฟอสฟอรัส 25 กิโลกรัม ออกสู่สิ่งแวดล้อมต่อผลผลิตปลา 1 ตัน หรือหากมีผลผลิตปลา 10,000 ตันจะมีการปลดปล่อยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสสูงถึง 1,325 ตัน และ 250 ตัน ตามลำดับ

จะเห็นได้ว่าทั้งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั้งในบ่อดินและในกระชังนั้นเกิดการปลดปล่อยไนโตรเจนออกสู่สิ่งแวดล้อมอย่างมหาศาล ดังนั้นหน่วยงานที่รับผิดชอบด้านสิ่งแวดล้อมในประเทศไทยได้กำหนดมาตรฐานเพื่อควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง โดยกำหนดให้ค่าไนโตรเจนรวม (Total nitrogen) ซึ่งเป็นผลรวมระหว่างไนโตรเจนละลาย (Total dissolved nitrogen) กับไนโตรเจนแขวนลอย (Total particulate nitrogen) ในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้วจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจะต้องมีค่าไม่เกิน 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนค่าแอมโมเนีย ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) จะต้องไม่เกิน 1.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีผลบังคับใช้กับบ่อขนาด 10 ไร่ขึ้นไป (กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2547)

## 2. การบำบัดน้ำเสีย

เพื่อป้องกันและควบคุมไม่ให้น้ำเสียสร้างผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจำเป็นต้องมีการบำบัดน้ำเสียก่อนถูกปลดปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม การเลือกระบบบำบัดน้ำเสียขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ลักษณะของน้ำเสีย ระดับการบำบัดน้ำเสียที่ต้องการ ค่าก่อสร้าง ค่าดำเนินการดูแลและบำรุงรักษา และขนาดของพื้นที่สำหรับใช้ในการก่อสร้าง เป็นต้น สามารถแบ่งการบำบัดน้ำเสียได้สามแบบตามกลไกที่ใช้ในการกำจัดสิ่งเจือปน แบบที่หนึ่งคือการบำบัดทางกายภาพ (Physical treatment) เป็นการใช้อุปกรณ์เพื่อแยกเอาสิ่งเจือปนออกจากน้ำเสีย เช่น ของแข็งขนาดใหญ่ พลาสติก กรวด ไขมัน เป็นต้น แบบที่สองคือการบำบัดทางเคมี (Chemical treatment) เป็นการใช้กระบวนการทางเคมีเพื่อทำปฏิกิริยากับสิ่งเจือปนในน้ำเสีย ใช้สำหรับน้ำเสียที่มีส่วนประกอบอย่างใดอย่างหนึ่งเช่น สารพิษ โลหะหนัก เป็นต้น และแบบที่สามคือ การบำบัดทางชีวภาพ (Biological treatment) เป็นการบำบัดโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพหรือเป็นการอาศัยจุลินทรีย์ในการกำจัดสิ่งเจือปนในน้ำเสียโดยเฉพาะสารอินทรีย์คาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส โดยสารเหล่านี้จะถูกใช้เป็นอาหารและเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ในถังเลี้ยงเชื้อเพื่อการเจริญเติบโต ทำให้น้ำเสียมีค่าความสกปรกลดลง (กรมควบคุมมลพิษ. 2547) การบำบัดน้ำเสีย



สามารถแบ่งตามลำดับขั้นตอนเป็นระดับต่างๆ ของการบำบัดได้ 3 ระดับคือ การบำบัดขั้นที่หนึ่ง การบำบัดขั้นที่สอง และการบำบัดขั้นที่สาม ซึ่งในแต่ละระดับสามารถแบ่งเป็นระดับย่อยได้อีก รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ระดับของการบำบัดน้ำเสีย (Tchobanoglous, Burton and Stensel. 2002)

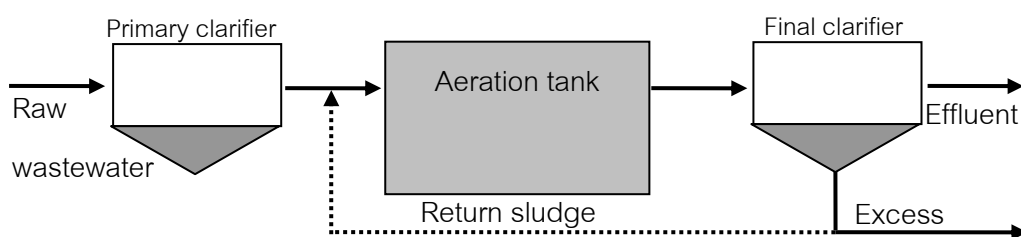
ระดับการบำบัด	รายละเอียดการบำบัด
การบำบัดขั้นแรก (Preliminary treatment)	กำจัดสิ่งเจือปนที่อยู่ในน้ำเช่น เศษไม้ ไขมัน กรวด ที่อาจเป็นอุปสรรคต่อการบำบัดและดูแลระบบ
การบำบัดขั้นที่หนึ่ง (Primary treatment)	กำจัดสารอินทรีย์และของแข็งแขวนลอยบางส่วน
การบำบัดขั้นที่หนึ่งขั้นสูง (Advanced primary treatment)	กำจัดสารอินทรีย์และเพิ่มพูนการกำจัดของแข็งแขวนลอย โดยทั่วไปจะใช้การกรองหรือการเติมสารเคมี
การบำบัดขั้นที่สอง (Secondary treatment)	กำจัดสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้, ของแข็งแขวนลอย และรวมถึงการฆ่าเชื้อโรค (Disinfection) ด้วย
การบำบัดธาตุอาหารขั้นที่สอง (Secondary with nutrient removal)	กำจัดสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้, ของแข็งแขวนลอย และธาตุอาหาร (ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส หรือทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส)
การบำบัดขั้นที่สาม (Tertiary treatment)	กำจัดธาตุอาหาร การฆ่าเชื้อโรค และกำจัดของแข็งแขวนลอยที่เหลือหลังจากการบำบัดขั้นที่สองซึ่งโดยทั่วไปจะใช้การกรองด้วยตัวกลางที่มีลักษณะเป็นเม็ดหรือใช้ตะแกรงละเอียด (Microscreen)
การบำบัดขั้นสูง (Advanced treatment)	กำจัดสารที่ละลายหรือแขวนลอยอยู่ในน้ำที่เหลือจากการบำบัดธาตุอาหารทางชีวภาพแบบทั่วไปสำหรับกรณีที่ต้องการนำน้ำกลับไปใช้ใหม่

ระบบบำบัดน้ำเสียที่อาศัยหลักการทางชีวภาพมีหลายรูปแบบ เช่น ระบบเอเอส (Activated sludge, AS) ระบบแผ่นจานหมุนชีวภาพ (Rotating biological contactor, RBC) ระบบคลองวนเวียน (Oxidation ditch, OD) ระบบบ่อเติมอากาศ (Aerated lagoon, AL) ระบบ

โปรยกรอง (Trickling filter) ระบบยูเอเอสบี (Upflow anaerobic sludge blanket, UASB) ระบบกรองไร้อากาศ (Anaerobic filter, AF) เป็นต้น (Bitton. 1994) การเลือกใช้ระบบใดนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ลักษณะของน้ำเสีย สภาพของพื้นที่ เป็นต้น ในที่นี้จะกล่าวถึงระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอเอสซึ่งได้รับความนิยมใช้ในการบำบัดน้ำเสียอย่างแพร่หลาย

## 2.1 ระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอเอส

ปัจจุบันระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอเอสเป็นที่นิยมใช้กันแพร่หลาย สามารถบำบัดได้ทั้งน้ำเสียชุมชนและน้ำเสียอุตสาหกรรมโดยอาศัยการย่อยสลายสารอินทรีย์ด้วยแบคทีเรียแอโรบิกหรือใช้ออกซิเจน (Aerobic bacteria) เป็นหลัก ระบบประกอบไปด้วยถังเติมอากาศ (Aeration tank) และถังตกตะกอน (Sedimentation tank) โดยเติมน้ำเสียเข้าถังเติมอากาศซึ่งมีตะกอนจุลินทรีย์หรือเรียกว่า “สลัดจ์” (Sludge) อยู่เป็นจำนวนมากด้วยสภาวะภายในถังที่เอื้อต่อการเจริญเติบโต จุลินทรีย์เหล่านี้จะย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียให้อยู่ในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) และน้ำในขั้นสุดท้าย (Bitton. 1994) หลังผ่านการบำบัดน้ำเสียจะไหลต่อไปยังถังตกตะกอนเพื่อแยกสลัดจ์ออก สลัดจ์ที่แยกตัวอยู่ที่ก้นถังตกตะกอนส่วนหนึ่งจะถูกสูบกลับเข้าไปในถังเติมอากาศอีกครั้งเพื่อรักษาความเข้มข้นของสลัดจ์ในถังเติมอากาศให้ได้ตามที่กำหนด (ภาพที่ 2) และอีกส่วนหนึ่งจะเป็นสลัดจ์ส่วนเกิน (Excess sludge) ที่ต้องนำไปกำจัดต่อไป ส่วนน้ำใสส่วนบนจะเป็นน้ำทิ้งที่สามารถระบายออกสู่สิ่งแวดล้อมได้ (Tchobanoglous, Burton and Stensel. 2002)



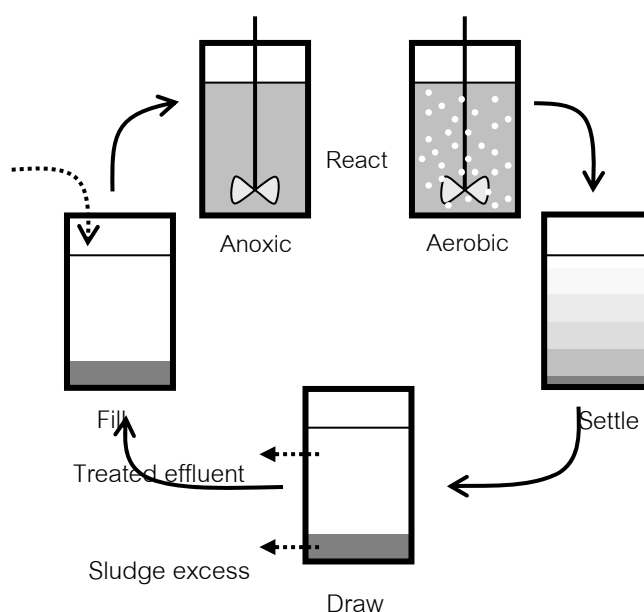
ภาพที่ 2 แผนผังระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอเอสโดยทั่วไป

ปัจจุบันมีการพัฒนาใช้งานระบบเอเอสหลายรูปแบบ เช่น ระบบแบบกวนผสมบูรณ์ (Completely mixed system) กระบวนการปรับเสถียรสัมผัส (Contact stabilization process) หรือระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอสบีอาร์ (Sequencing batch reactor, SBR) เป็นต้น (กรมควบคุมมลพิษ. 2547) โดยในประเทศไทยที่พัฒนาแล้วได้มีการออกแบบระบบเอเอสให้มีความสามารถในการบำบัดธาตุอาหารได้มากขึ้นนอกเหนือจากการบำบัดสารอินทรีย์คาร์บอนเพียงอย่างเดียว สำหรับ

ประเทศไทยการบำบัดธาตุอาหารยังไม่เป็นที่ยอมรับมากนัก เนื่องจากทำให้ค่าใช้จ่ายสูงขึ้นและขาดมาตรการบังคับใช้ทางกฎหมาย รวมทั้งต้องอาศัยผู้ที่มีความรู้ความเข้าใจในกระบวนการบำบัดเป็นอย่างดีด้วย

## 2.2 ระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอสบีอาร์

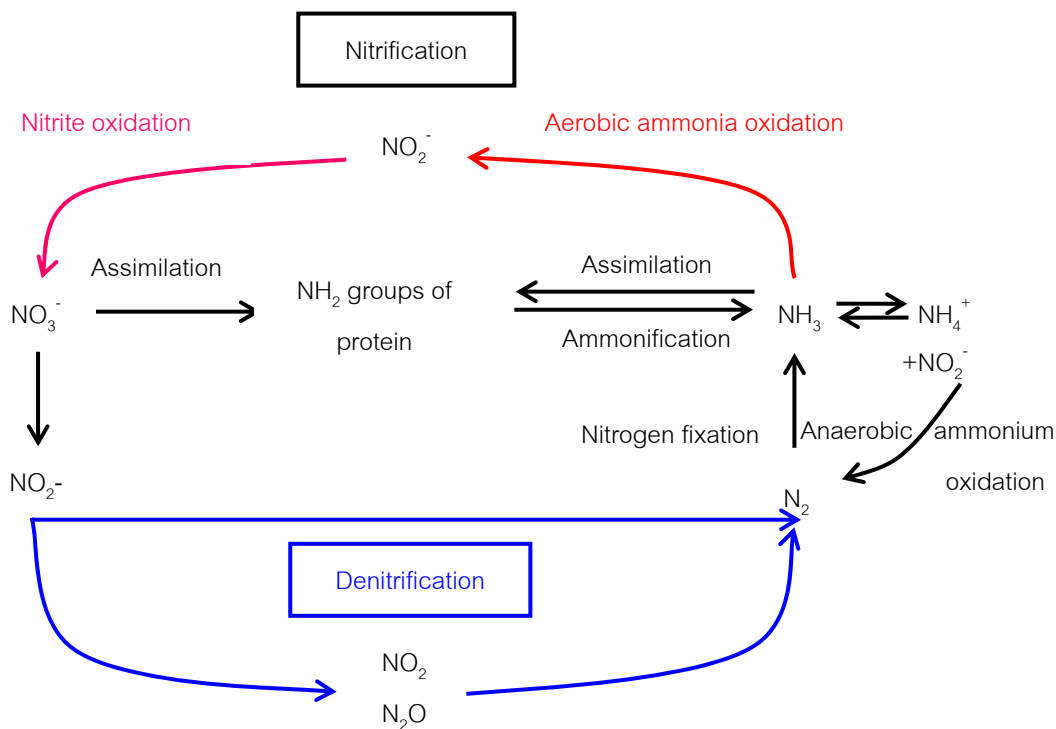
ระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอสบีอาร์เป็นการพัฒนาจากระบบเอเอส จัดเป็นระบบเอเอสประเภท “เติมเข้า-ถ่ายออก” (Fill and draw activated sludge) โดยได้รวมเอาถังเติมอากาศและถังตกตะกอนเข้าด้วยกันเพียงถังเดียวมีรอบการทำงาน (Cycle) ดังนี้ ระยะเวลาเติมน้ำเสีย (Fill) ระยะเวลาทำปฏิกิริยา (React) ระยะเวลาตกตะกอน (Settle) ระยะเวลาระบายน้ำทิ้ง (Draw) และระยะเวลาพักระบบ (Idle) (ภาพที่ 3) ข้อดีของระบบนี้คือสะดวกในการควบคุมดูแลและประหยัดพื้นที่ในการติดตั้งดำเนินการ (Rim et al. 1997) สามารถปรับยืดหยุ่นช่วงเวลาต่างๆ ของแต่ละระยะได้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดให้สูงขึ้น พบว่าสามารถนำระบบเอสบีอาร์มาประยุกต์ใช้ในการบำบัดธาตุอาหารในน้ำทิ้งหลากหลายลักษณะได้ดี (EPA. 1999) เช่น มีการใช้ระบบเอสบีอาร์บำบัดธาตุอาหารในน้ำทิ้งที่มีความเค็มสูงถึงร้อยละ 3.5 ของ NaCl (Intrasungkha, Keller and Blackall. 1999) นอกจากนี้มีการใช้เทคโนโลยีขั้นสูงเข้ามาปรับใช้กับระบบเอสบีอาร์แบบธรรมดาทำให้เป็นระบบที่มีสมรรถนะสูงขึ้น เช่น มีการเติมน้ำเสียเข้าถังแบบต่อเนื่องเข้าที่ก้นถัง (Continuous flow sequencing batch reactor) แล้วปรับลดช่วงเวลาให้เหลือเพียง 3 ระยะคือ ระยะเวลาทำปฏิกิริยา ระยะเวลาตกตะกอน และระยะเวลาปล่อยน้ำทิ้ง (Mahvi, Mesdaghinia and Karakani. 2004)



ภาพที่ 3 แผนผังระยะการทำงานใน 1 รอบของระบบเอสบีอาร์โดยทั่วไป

### 3. วงจรไนโตรเจน (Nitrogen cycle)

ธาตุไนโตรเจน (N) เป็นส่วนประกอบของโปรตีนและกรดนิวคลีอิกในเซลล์จุลินทรีย์ พืช และสัตว์จึงเป็นธาตุที่มีความจำเป็นต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิด โดยไนโตรเจนในรูปก๊าซ ( $N_2$ ) เป็นส่วนประกอบหลักในบรรยากาศของโลก (ร้อยละ 79) เนื่องจากเป็นรูปที่คงตัวที่สุด แต่สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้ไนโตรเจนในรูปก๊าซได้หากยังไม่มี การเปลี่ยนไปอยู่ในรูปแอมโมเนียเสียก่อน (Bitton. 1994) ไนโตรเจนมีการเปลี่ยนแปลงเป็นรูปแบบต่างๆ ทั้งในรูปของสารอินทรีย์ ไนโตรเจนและสารอินทรีย์ไนโตรเจนในสิ่งแวดล้อมต่างๆ บนโลกเรียกว่าเป็น “วงจรไนโตรเจน” ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 วงจรของไนโตรเจน (ดัดแปลงจาก Madigan, Martinko and Parker. 2003)

#### 3.1 การตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation)

เป็นการรีดิวซ์ก๊าซไนโตรเจนเป็นแอมโมเนีย แล้วเปลี่ยนแอมโมเนียให้อยู่ในรูปสารอินทรีย์ แม้ว่าในบรรยากาศของโลกจะประกอบไปด้วยก๊าซไนโตรเจนเป็นหลัก แต่สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ไม่สามารถรีดิวซ์ก๊าซไนโตรเจนได้ เนื่องจากต้องอาศัยพลังงานอย่างมากในการสลายพันธะไนโตรเจน มีเพียงแบคทีเรียไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถทำได้ (Madigan, Martinko and

Parker. 2003) การตรึงไนโตรเจนแบ่งออกเป็น 2 แบบคือ การตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ (Nonsymbiotic nitrogen fixation) จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง เช่น *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Anabaena* และ *Nostoc* เป็นต้น และการตรึงไนโตรเจนแบบพึ่งพาสีชีวิตอื่น (Symbiotic nitrogen fixation) จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องเช่น *Rhizobium* เป็นต้น เอนไซม์ที่มีบทบาทในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเหล่านี้เรียกว่าเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase) ประกอบไปด้วยเอนไซม์ย่อยสองส่วนคือ เอนไซม์ไดไนโตรจีเนส (Dinitrogenase) และเอนไซม์ไดไนโตรจีเนสรีดักเตส (Dinitrogenase reductase) ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน *nif* (Bitton. 1994 ; Madigan, Martinko and Parker. 2003)

### 3.2 แอสสิมิเลชัน (Assimilation)

เป็นการนำเอาไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียไปใช้ในการสร้างเซลล์เพื่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต โดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม Heterotroph และกลุ่ม Autotroph สามารถนำเอาทั้งแอมโมเนียและไนเตรทไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิกเพื่อการสร้างเซลล์ ซึ่งไนโตรเจนในรูปที่เหมาะสมที่สุดสำหรับจุลินทรีย์คือแอมโมเนีย แต่ถ้าไม่มีแอมโมเนียจุลินทรีย์สามารถใช้เอนไซม์ไนเตรทรีดักเตส (Nitrate reductase) รีดิวซ์ไนเตรทไปเป็นไนไตรท์แล้วใช้เอนไซม์ไนไตรท์รีดักเตส (Nitrite reductase) รีดิวซ์ไนไตรท์ให้เป็นแอมโมเนียแล้วจึงนำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน (ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2544)

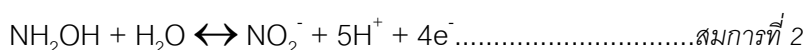
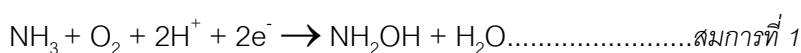
### 3.3 แอมโมนิฟิเคชัน (Ammonification)

แอมโมนิฟิเคชันเป็นการเปลี่ยนสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนให้อยู่ในรูปอนินทรีย์ไนโตรเจน หรือเรียกอีกชื่อว่า “การเปลี่ยนแปลงแร่ธาตุไนโตรเจน” (Nitrogen mineralization) โดยมีจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรียและเชื้อเห็ดรา (Fungi) ที่มีบทบาทในกระบวนการนี้ สารอินทรีย์ไนโตรเจนหรือโปรตีนจะถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียได้จะต้องผ่านการลดรูปเป็นเปปไทด์ (Peptides) หรือกรดอะมิโนก่อนด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน แล้วจากนั้นจะถูกลดเอมีน (Deamination) เป็นแอมโมเนีย ( $\text{NH}_3$ ) แอมโมเนียที่เกิดขึ้นมักไม่อยู่ในรูปแอมโมเนียอิสระ ในน้ำเสียทั่วไปมักมีพีเอช (pH) เป็นกรดหรือเป็นกลางแอมโมเนียจึงอยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียม ( $\text{NH}_4^+$ ) แต่หากพีเอชสูงขึ้นแอมโมเนียมจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปแอมโมเนียซึ่งอาจถูกปล่อยขึ้นสู่บรรยากาศได้ (Bitton. 1994)

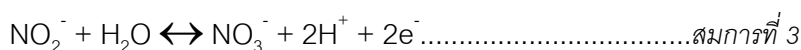
### 3.4 ไนตริฟิเคชัน (Nitrification)

ไนตริฟิเคชันเป็นการออกซิไดส์แอมโมเนียให้เป็นไนเตรท โดยอาศัยการทำงานของแบคทีเรียที่เรียกว่า “แบคทีเรียไนตริไฟอิง” (Nitrifying bacteria) มีสองขั้นตอนหลักคือเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนไตรท์ และเปลี่ยนจากไนไตรท์เป็นไนเตรท (Van Loosdrecht and Jetten.

1998) ขั้นตอนแรกเป็นการออกซิไดส์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์เกิดจากแบคทีเรียกลุ่ม AOB (Ammonia-oxidizing bacteria) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์สองชนิดคือแอมโมเนียโมโนออกซิจีเนส (Ammonia monooxygenase) (Hooper et al. 1997) ออกซิไดซ์แอมโมเนียให้กลายเป็นไฮดรอกซิลามีน (Hydroxylamine,  $\text{NH}_2\text{OH}$ ) (สมการที่ 1) และเอนไซม์ไฮดรอกซิลามีนออกซิโดรีดักเตส (Hydroxylamine oxidoreductase) (Bergmann, Arciero and Hooper. 1994) ทำการออกซิไดซ์ไฮดรอกซิลามีนให้กลายเป็นไนไตรท์ (สมการที่ 2) ภายใต้สภาวะที่มีอากาศแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนนี้เช่น *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus* และ *Nitrosolobus* เป็นต้น



ขั้นตอนที่สองของกระบวนการไนตริฟิเคชันคือการเปลี่ยนจากไนไตรท์ให้เป็นไนเตรท โดยการทำงานของแบคทีเรียกลุ่ม NOB (Nitrite oxidizing bacteria) อาศัยการทำงานของเอนไซม์ไนไตรท์ออกซิโดรีดักเตส (Nitrite oxidoreductase) ออกซิไดซ์ไนไตรท์ให้กลายเป็นไนเตรท (สมการที่ 3) แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนนี้เช่น *Nitrospira*, *Nitrobacter* และ *Nitrococcus* เป็นต้น



แหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียไนตริฟิเคชันได้จากหลายแหล่งเช่น คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbondioxide) ไบคาร์บอเนต (Bicarbonate) และคาร์บอเนต (Carbonate) เป็นต้น ผลของการเกิดไนตริฟิเคชันทำให้เกิดกรดซึ่งอาจมีผลต่อค่าพีเอชในน้ำเสียได้ อัตราการเจริญเติบโตของ *Nitrobacter* พบว่าสูงกว่าของ *Nitrosomonas* ดังนั้นข้อจำกัดของการเกิดไนตริฟิเคชันอย่างหนึ่งคือการเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ของ *Nitrosomonas* แม้ว่าในธรรมชาติส่วนใหญ่จะพบแบคทีเรียไนตริฟิเคชันแบบ Autotroph แต่บางครั้งไนตริฟิเคชันอาจเกิดจากแบคทีเรียกลุ่ม Heterotroph ได้เช่น *Arthrobacter* หรือเชื้อเห็ดราบางชนิดเช่น *Aspergillus* โดยกลุ่มนี้จะใช้สารอินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอน อย่างไรก็ตามไนตริฟิเคชันจากจุลินทรีย์แบบ Heterotroph เกิดได้ช้ากว่าจุลินทรีย์แบบ Autotroph มาก (Bitton. 1994)

### 3.5 ดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification)

ดีไนตริฟิเคชันเป็นการรีดิวซ์ไนเตรทให้เป็นก๊าซไนโตรเจนโดยผ่านสารตัวกลางหลายตัวคือ ไนไตรท์ ( $\text{NO}_2^-$ ) ไนตริกออกไซด์ (NO) และ ไนตรัสออกไซด์ ( $\text{N}_2\text{O}$ ) (Van Loosdrecht and

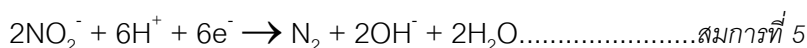
Jetten. 1998) ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นดังแสดงในสมการที่ 4 และ 5 โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 2 (Bothe et al. 2000) กลไกที่สำคัญในการรีดิวซ์ไนเตรทมีสองแบบ คือ การรีดิวซ์ไนเตรทแบบแอสสิมิเลชัน (Assimilatory nitrate reduction, ANR) และการรีดิวซ์ไนเตรทแบบดิสสิมิเลชัน (Dissimilatory nitrate reduction, DNR) (ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2544) โดย ANR เป็นการนำแอมโมเนียมไปใช้ในการสร้างเซลล์ของแบคทีเรียจึงไม่ค่อยมีบทบาทในการบำบัดน้ำเสียมากนัก ส่วน DNR เป็นการหายใจแบบไร้อากาศของแบคทีเรียโดยใช้ไนเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ไนเตรทจะถูกรีดิวซ์เป็นไนตรัสออกไซด์ และก๊าซไนโตรเจนตามลำดับ

ตารางที่ 2 เอนไซม์ที่มีบทบาทในกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Bothe et al. 2000)

เอนไซม์	ขนาดยีน (bp)	ชื่อยีน	ปฏิกิริยา
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> reductase	3588-3786	<i>narG</i>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 2e <sup>-</sup> + 2H <sup>+</sup> → NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + H <sub>2</sub> O
	1464-1677	<i>narH</i>	
	516-741	<i>narJ</i>	
	672-741	<i>narI</i>	
Heme NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> reductase	1665-1791	<i>nirS</i>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + e <sup>-</sup> + 2H <sup>+</sup> → NO + H <sub>2</sub> O
Cu NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> reductase	1092-1140	<i>nirK</i>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + e <sup>-</sup> + 2H <sup>+</sup> → NO + H <sub>2</sub> O
NO reductase	1341-1542	<i>norB</i>	2NO + 2e <sup>-</sup> + 2H <sup>+</sup> → N <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub> O
	441-453	<i>norC</i>	
N <sub>2</sub> O reductase	1905-1959	<i>nosZ</i>	N <sub>2</sub> O + 2e <sup>-</sup> + 2H <sup>+</sup> → N <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O

โดยแบคทีเรียดีไนตริฟิเคชันมีทั้งแบบ Heterotroph และ Autotroph เช่นเดียวกับแบคทีเรียไนตริฟิเคชันแต่แบบ Heterotroph จะมีบทบาทในการบำบัดน้ำเสียมากกว่า (Bitton. 1994) แบคทีเรียดีไนตริฟิเคชัน (Denitrifying bacteria) แบบที่เป็น Heterotroph นี้จะใช้สารอินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนในการลดรูปไนโตรเจนทุกขั้นตอน สำหรับน้ำทิ้งที่มีแหล่งคาร์บอนน้อยจำเป็นต้องมีการเติมแหล่งคาร์บอนจากภายนอกเข้าไปเพื่อให้เกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันได้อย่างสมบูรณ์ (Van Loosdrecht and Jetten. 1998) แหล่งคาร์บอนที่มีการนำมาใช้ อาทิเช่น เมทานอล (Methanol) อะซิเตท (Acetate) เอทานอล (Ethanol) แลคเตท (Lactate) และกลูโคส

(Glucose) เป็นต้น (Khin and Annachhatre. 2004) จากการคัดแยกแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงจากระบบบำบัดน้ำเสียด้วยเทคนิคที่อาศัยอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า เป็นจิ้นส์เหล่านี้คือ *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Bacillus*, *Paracoccus* และ *Hyphomicrobium*



#### 4. การบำบัดไนโตรเจนทางชีวภาพ

การบำบัดไนโตรเจนทางชีวภาพเป็นการอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ต้นทุนต่ำหากเปรียบเทียบกับวิธีการทางเคมีและกายภาพ (EPA. 1993) โดยเป็นการอาศัยกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารประกอบไนโตรเจนต่างๆ ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติจากกระบวนการทำงานของจุลินทรีย์หลากหลายชนิด โดยจะเน้นการเปลี่ยนรูปจากสารอินทรีย์ไนโตรเจนให้ไปอยู่ในรูปสารอนินทรีย์ไนโตรเจนโดยขั้นสุดท้ายจะได้เป็นก๊าซไนโตรเจน ( $\text{N}_2$ ) (Van Loosdrecht and Jetten. 1998)

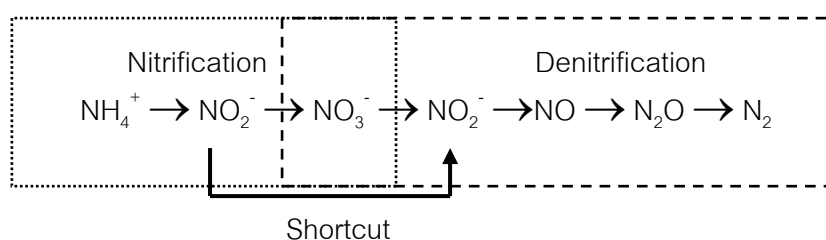
##### 4.1 การบำบัดไนโตรเจนแบบดั้งเดิมด้วยกระบวนการไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน

การบำบัดไนโตรเจนทางชีวภาพด้วยกระบวนการดั้งเดิมอาศัยสองกระบวนการหลักคือ ไนตริฟิเคชันด้วยจุลินทรีย์แบบ Autotroph และดีไนตริฟิเคชันด้วยจุลินทรีย์แบบ Heterotroph โดยทั้งสองกระบวนการเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่ต่างกันคือมีออกซิเจนอิสระและปราศจากออกซิเจนอิสระ และยังเกิดขึ้นจากการทำงานของจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน ดังนั้นการแยกสถานที่และแยกเวลาจากกันจะทำให้เกิดประสิทธิภาพการบำบัดดีกว่า ไนตริฟิเคชันต้องการออกซิเจน 4.2 กรัมต่อแอมโมเนียม 1 กรัม (Khin and Annachhatre. 2004) ส่วนดีไนตริฟิเคชันต้องการสารอินทรีย์คาร์บอนเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์เช่น ต้องใช้เมทานอล 2.47 กรัมต่อไนเตรท 1 กรัม (McCarty, Beck and Amann. 1969) ปกติแล้วในน้ำเสียจะมีสารอินทรีย์คาร์บอนไม่เพียงพอต่อการเกิดดีไนตริฟิเคชัน ดังนั้นในการบำบัดไนโตรเจนที่มีปริมาณสูงในน้ำเสียให้สมบูรณ์จึงต้องมีการเติมแหล่งคาร์บอนมหาศาลเช่นกัน (van Dongen, Jetten and van Loosdrecht. 2001) ยิ่งไปกว่านั้นระบบบำบัดน้ำเสียส่วนใหญ่ไม่ได้ออกแบบมาเพื่อการบำบัดไนโตรเจนจึงเป็นเรื่องยากที่จะทำให้เกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน จึงพบว่าระบบบำบัดน้ำเสียส่วนใหญ่จะมีไนเตรทหลงเหลือในน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (Jetten et al. 2002) อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีการออกแบบระบบเอเอสให้มีการบำบัดไนโตรเจนได้มากขึ้นเนื่องจากมีการ



ให้ความสำคัญกับธาตุอาหารในน้ำเสีย เช่น การนำเอาระบบเอสปีอาร์มาประยุกต์ใช้ในการบำบัดไนโตรเจน ซึ่งเป็นการรวมเอาถังเติมอากาศและถังตกตะกอนไว้ในถังเดียว ปัจจัยที่ใช้ควบคุมการบำบัดไนโตรเจนด้วยระบบเอสปีอาร์ เช่น ระยะเวลาพักน้ำหรือ HRT (Hydraulic retention time) อายุตะกอนจุลินทรีย์ หรือ SRT (Sludge retention time) อัตราส่วนของช่วงเวลาไร้ออกซิเจนอิสระต่อมีออกซิเจนอิสระ (Anoxic/aerobic) ช่วงเวลาไร้ออกซิเจนอิสระ และช่วงเวลามีออกซิเจนอิสระ เป็นต้น

นอกจากนี้มีความต้องการลดต้นทุนที่เกิดจากการเติมออกซิเจนในถังเติมอากาศเพื่อให้เกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันและจากแหล่งสารอินทรีย์คาร์บอนที่ต้องเติมให้กับถังไร้อากาศเพื่อให้เกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน จึงมีการออกแบบและควบคุมระบบบำบัดน้ำเสียให้เกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันแบบทางลัด (Shortcut) โดยผ่านการสะสมไนโตรท (Ruiz et al. 2006) วิธีการนี้อาศัยหลักการว่าไนโตรทเป็นสารตัวกลางที่เกิดขึ้นทั้งในกระบวนการไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน ดังนั้นจึงทำให้ไนโตรทไม่ถูกเปลี่ยนไปเป็นไนเตรทในขั้นตอนที่สองของไนตริฟิเคชันโดยควบคุม NOB ให้หายไปจากระบบแบบไม่ให้กระทบต่อ AOB และไนโตรทที่เกิดขึ้นจะถูกรีดิวซ์ต่อด้วยแบคทีเรียดีไนตริฟิเคชัน วิธีการทำให้ NOB ไม่ทำงานมีหลายวิธี ได้แก่ การจำกัดปริมาณออกซิเจน การควบคุมค่าพีเอช และการควบคุมอุณหภูมิ (Ruiz et al. 2006) ด้วยวิธีการนี้ทำให้ประหยัดต้นทุนการบำบัดน้ำเสียทั้งค่าเติมอากาศและค่าเติมแหล่งสารอินทรีย์คาร์บอนแต่เหมาะสำหรับน้ำทิ้งที่มีแอมโมเนียไม่สูงเท่านั้น ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงไนโตรเจนของวิธีการนี้ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 การบำบัดไนโตรเจนโดยการอาศัยกระบวนการไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันแบบทางลัด (Shortcut) ผ่านการสะสมไนโตรท

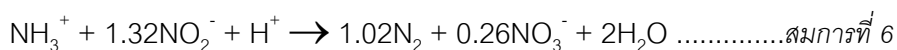
#### 4.2 เอสเอ็นดี (Simultaneous nitrification and denitrification, SND)

โดยทั่วไปการบำบัดไนโตรเจนให้สมบูรณ์จะต้องใช้ถังปฏิกรณ์สองถังแยกขาดจากกัน ในสภาวะที่มีออกซิเจนละลายต่ำ 0.5-2 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่าจะยับยั้งการเกิดไนตริฟิเคชัน (EPA. 1993) อย่างไรก็ตามการเกิดไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันสามารถเกิดขึ้นในสภาวะ

เดียวกันภายใต้ถังปฏิกรณ์เดียวกันได้โดยอาศัยการควบคุมค่าออกซิเจนละลายต่ำเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.5-1 มิลลิกรัมต่อลิตร เรียกปรากฏการณ์นี้ว่าเอสเอ็นดี (Simultaneous nitrification and denitrification ; SND) (Hibiya et al. 2003) โดยพบว่ามีเกิดการเกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันขึ้นในระหว่างการเติมอากาศในถังปฏิกรณ์ ทำให้ลบล้างข้อมูลเดิมที่เชื่อว่ากระบวนการดีไนตริฟิเคชันสามารถเกิดได้เฉพาะในสถานะที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น ซึ่งการบำบัดไนโตรเจนแบบเอสเอ็นดีด้วยระบบเอสปีอาร์มีประโยชน์อย่างยิ่งในการลดเวลาและลดค่าใช้จ่ายในการเติมอากาศ (Munch, Lant and Keller. 1996) กลไกการเกิดเอสเอ็นดีสามารถอธิบายได้จากเหตุผลสองข้อคือ ข้อแรกมีการเกิดบริเวณที่มีและไม่มีออกซิเจนอิสระขึ้นในบริเวณแตกต่างกันภายในกลุ่มก้อนจุลินทรีย์ที่เรียกว่า “ฟล็อก” (Floc) โดยแบคทีเรียไนตริไฟอิงและแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงอาจจะอาศัยอยู่ฟล็อกก้อนเดียวกันตามลักษณะการแพร่กระจายของปริมาณออกซิเจน เมื่อมีปริมาณออกซิเจนจำกัดก็เกิดสถานะไร้ออกซิเจนอิสระขึ้นภายในฟล็อกทำให้แบคทีเรียดีไนตริไฟอิงทำงานได้ ส่วนบริเวณรอบนอกของฟล็อกก็จะเป็นที่อาศัยของแบคทีเรียไนตริไฟอิงเนื่องจากมีปริมาณออกซิเจนเพียงพอ (Daigger and Littleton. 2000) ข้อที่สองคืออาจจะเกิดจากการทำงานของแบคทีเรียไนตริไฟอิงในกลุ่ม Heterotroph และแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงในกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน (Aerobic denitrifying bacteria) เช่น *Pseudomonas* sp. (Takaya et al. 2003), *Paracoccus denitrificans* (Baumann et al. 1996), *Microvirgula aerodenitrificans* (Patureau et al. 1998) และ *Thaurea mechernichensis* (Scholten et al. 1999) เป็นต้น

#### 4.3 กระบวนการแอนนามมอกซ์ (ANAMMOX process)

กระบวนการแอนนามมอกซ์หรือ ANAMMOX (Anoxic ammonium oxidation) ค้นพบโดย Mulder และคณะ (1995) เป็นกระบวนการออกซิเดชันแอมโมเนียในสถานะไร้อากาศให้กลายเป็นแก๊สไนโตรเจน (Schmid et al. 2000) โดยมีการใช้ไนโตรเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ผลิตภัณฑ์หลักของกระบวนการแอนนามมอกซ์คือแก๊สไนโตรเจน แต่มีไนโตรเจนร้อยละ 10 ถูกเปลี่ยนไปเป็นไนเตรท (สมการ 6)



มีรายงานว่าแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแอนนามมอกซ์อยู่ในกลุ่ม Planctomycetes โดยได้เรียกแบคทีเรียที่ค้นพบว่า *Brocadia anammoxidans* (Candidate) และ *Kuenenia stuttgartiensis* (Candidate) ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิด Autotroph ที่ไม่ต้องการสารอินทรีย์คาร์บอนสำหรับเจริญเติบโต (Kuenen and Jetten. 2001) และแม้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้

จะเจริญในสภาวะไร้อากาศก็ตามแต่ก็สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยออกซิเจนและปริมาณไนโตรเจนที่ความเข้มข้นสูง (Strous, Kuenen and Jetten. 1999)

#### 4.4 กระบวนการซารอน (SHARON process)

กระบวนการซารอน (Single reactor system for high ammonia removal over nitrite, SHARON) เป็นการอาศัยไนตริฟิเคชันเพียงบางส่วน (Partial nitrification) ผ่านตัวกลางคือไนโตรเจนก่อนจะถูกรีดิวซ์เป็นก๊าซไนโตรเจน โดยดำเนินระบบในถังเติมอากาศเพียงถังเดียวไม่มีการกักตะกอนที่ระดับอุณหภูมิสูง (35 องศาเซลเซียส) และพีเอชสูงกว่า 7 (Hellings, van Loosdrecht and Heijnen. 1997) การควบคุมอุณหภูมิและพีเอชเพื่อคัดเลือกให้มีเฉพาะ AOB และขั้ว NOB ออกจากระบบ ปกติแล้ว AOB เจริญเติบโตเร็วกว่า NOB ที่อุณหภูมิมากกว่า 15 องศาเซลเซียส หากดำเนินระบบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสอัตราการเติบโตสูงสุดของ NOB จะเท่ากับครึ่งเดียวของ AOB เท่านั้น และที่อุณหภูมิมากกว่า 20 องศาเซลเซียส AOB จะมีอายุตะกอนน้อยซึ่งควบคุมได้โดยเวลากักน้ำ หากควบคุมเวลากักน้ำให้สั้น NOB ก็จะถูกชะออกไปจากระบบ ส่วนการควบคุมพีเอชนั้นเนื่องจากการออกซิไดส์แอมโมเนียมันทำให้เกิดกรด การควบคุมพีเอชทำให้ป้องกันการถูกยับยั้งได้

กระบวนการซารอนเหมาะสำหรับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียสูง (มากกว่า 5 กรัมต่อลิตร) (Jetten, Horn and van Loosdrecht. 1997) เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการบำบัดแบบไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันแบบดั้งเดิมกระบวนการซารอนจะประหยัดพลังงานในการเติมอากาศร้อยละ 25 และประหยัดแหล่งคาร์บอนถึงร้อยละ 40 (Khin and Annachhatre. 2004)

#### 4.5 กระบวนการแคนนอน (CANON process)

สำหรับการบำบัดแอมโมเนียในน้ำเสียด้วยการใช้แบคทีเรียแอนาโมกซ์นั้นจะต้องใช้ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสม ซึ่งอนุมูลไนโตรเจนผลิตมาจากการออกซิไดส์แอมโมเนียของ AOB ในขั้นตอนแรกของกระบวนการไนตริฟิเคชัน แต่อย่างไรก็ตาม AOB มีความต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ตรงกันข้ามกับแบคทีเรียแอนาโมกซ์ที่ต้องการสภาวะไร้อากาศในการเจริญเติบโต จึงมีการทำให้แบคทีเรียทั้งสองอยู่ทำงานร่วมกันในถังปฏิกรณ์เพียงถังเดียวโดยมีการให้ออกซิเจนในปริมาณที่จำกัด เรียกกระบวนการดังกล่าวว่า “แคนนอน” (Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite, CANON) (Third et al. 2001 ; Sliemers et al. 2002) กระบวนการแคนนอนนี้จึงเหมาะสมสำหรับการบำบัดน้ำเสียที่มีปริมาณแอมโมเนียสูง และมีปริมาณสารอินทรีย์ต่ำ ซึ่งไม่เพียงพอดต่อกระบวนการไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันแบบเดิมได้

## 5. เทคนิคการศึกษาชุมชนจุลินทรีย์

การศึกษาชุมชนจุลินทรีย์ในธรรมชาติหรือในระบบต่างๆ ที่มนุษย์สร้างขึ้น โดยเฉพาะในระบบบำบัดน้ำเสียจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคที่สามารถตรวจสอบ จัดจำแนก ตลอดจนการนับปริมาณจุลินทรีย์ เพื่อทราบถึงองค์ประกอบของโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ เทคนิคต่างๆ ที่มีการนำมาใช้ เช่น การเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนหรือแหล่งพลังงานที่แตกต่างกัน การศึกษาองค์ประกอบของเบสในดีเอ็นเอ (DNA) การศึกษาองค์ประกอบของผนังเซลล์ รวมทั้งข้อมูลด้านสรีรวิทยาของเซลล์ โดยเทคนิคเหล่านี้ล้วนต้องการการเพาะเลี้ยงเชื้อและการคัดแยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์จึงเรียกเทคนิคเหล่านี้ว่า “เทคนิคที่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ” (Culture dependent methods) ตรงกันข้ามกับ “เทคนิคที่ไม่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ” (Culture-independent methods) ซึ่งศึกษาจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมโดยตรง (*in situ*) โดยไม่พึ่งพาการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Schramm and Amann. 2000)

สำหรับระบบบำบัดน้ำเสียนั้นเป็นกระบวนการทางชีวภาพที่มีความสำคัญในการกำจัดมลพิษเพื่อปกป้องสิ่งแวดล้อมไม่ให้ถูกทำลาย แม้ว่าจะมีการประยุกต์ใช้การบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพมานานนับร้อยปีแล้วแต่ด้วยขาดความรู้ความเข้าใจทางด้านจุลชีววิทยาของกระบวนการที่เกิดขึ้นในระบบทำให้ถูกเปรียบเทียบว่าเป็น “กล่องดำ” (Black box) (Loy, Daims and Wagner. 2002) โดยการวิจัยให้ความสำคัญเฉพาะด้านวิศวกรรมคือการออกแบบและการควบคุมระบบเท่านั้น แต่หลังจากที่มีการประยุกต์ใช้เทคนิคด้านชีวโมเลกุลในการศึกษานิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา ทำให้สามารถเข้าใจถึงชนิดและบทบาทของจุลินทรีย์ในการทำหน้าที่บำบัดน้ำเสียได้มากขึ้น

### 5.1 เทคนิคที่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคการที่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ เช่น วิธีนับจำนวนที่เป็นไปได้ทั้งหมดหรือเอ็มพีเอ็น (Most probable number, MPN) วิธีนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Viable plate count) เป็นต้น ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาพบว่าเทคนิคนี้มีข้อจำกัดหลายประการทั้งในตัวยุทธวิธีและการเองและลักษณะเฉพาะของจุลินทรีย์แต่ละชนิด (นุกูลอินทระสังขา. 2547) โดยจากการศึกษาเปรียบเทียบการนับจำนวนจุลินทรีย์โดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์กับวิธีที่ต้องมีการเพาะเลี้ยงเชื้อในตัวอย่างธรรมชาติ พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงหรือเจริญบนอาหารได้มีน้อยมาก โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ในธรรมชาติไม่ถึงร้อยละ 1 เท่านั้นที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (Amann, Ludwig and Schleifer. 1995) เช่น ในตัวอย่างน้ำทะเลมีเพียงร้อยละ 0.1 (Ferguson, Buckley and Palumbo. 1984) ในน้ำจืดร้อยละ

0.25 (Jones. 1977) ในดินร้อยละ 0.5 (Torsvik et al. 1990) และในสลัดจ์ของระบบบำบัดน้ำเสีย หากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเหมาะสมอาจมีประมาณร้อยละ 15 (Wagner et al. 1993) ปรัชญาการณนี้เป็นที่ทราบกันดีว่าอาจเกิดจากสภาวะสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยง ขึ้นมานั้นไม่ดีพอสำหรับจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ นอกจากนี้แล้วในธรรมชาติจริงๆ อาจไม่พบแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้เลย ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านั้นกำลังเข้าสู่สภาวะที่เรียกว่า Viable-but-nonculturable (VBNC) โดยเกิดจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและตัวแบคทีเรียเองที่ไม่พร้อม สำหรับการเจริญเติบโต (Roszak and Colwell. 1987)

## 5.2 เทคนิคที่ไม่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ

เพื่อแก้ไขข้อจำกัดของเทคนิคที่ต้องอาศัยการเลี้ยงเชื้อ ในช่วง 15 ปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาชุมชนจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วและหลากหลายวิธี โดยได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาประชากรจุลินทรีย์มากกว่าวิธีการที่ต้องขึ้นอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ เช่น เทคนิคการวิเคราะห์โครงสร้างจุลินทรีย์โดยอาศัยข้อมูลจาก rRNA (rRNA approach) ซึ่งทำให้สามารถจำแนกและหาปริมาณของแบคทีเรียในธรรมชาติได้โดยใช้ยีน 16S rRNA เป็นยีนเครื่องหมาย (Marker gene) ในการศึกษา เทคนิค Microautoradiography (MAR) เทคนิค Immunofluorescence เทคนิค Microarray หรือ DNA chip เป็นต้น (Manz et al. 1994 ; Amann Ludwig and Schleifer. 1995 ; Schramm and Amann. 2000) โดยเทคนิคที่ไม่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบ่งเป็นสองประเภทคือ เทคนิคที่ศึกษาด้านองค์ประกอบหรือโครงสร้างของประชากรจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้น และเทคนิคที่ศึกษาหรือตรวจสอบการแสดงออกของยีนหรือผลผลิตของยีน ปัจจุบันได้เลือกโมเลกุล rRNA มาใช้เป็นโมเลกุลเครื่องหมายในการศึกษาและจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต โดยในยุคแรกนั้นใช้โมเลกุล 5S rRNA แต่เนื่องจากมีข้อมูลสำหรับเปรียบเทียบจำกัดภายหลังได้เปลี่ยนเป็นโมเลกุล 16S rRNA แทน อย่างไรก็ตามในอนาคตมีแนวโน้มที่จะเปลี่ยนไปใช้โมเลกุล 23S rRNA เนื่องจากมีรายละเอียดของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า สำหรับเหตุผลที่เลือกโมเลกุล rRNA มีหลายประการด้วยกัน ได้แก่

5.2.1 พบไรโบโซม และ rRNA ได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และเนื่องจากเป็นโมเลกุลที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีน ดังนั้นสิ่งมีชีวิตจึงมีต้นกำเนิดที่เหมือนกันเพื่อแสดงหน้าที่ได้อย่างคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยังไม่มี การพบการถ่ายโอนยีน (Lateral gene transfer) ในโมเลกุลของ rRNA ด้วย ดังนั้นจึงคาดว่า การสร้าง Phylogenetic tree ของสิ่งมีชีวิต น่าจะถูกต้องที่สุด (Woese. 1987)

5.2.2 บางตำแหน่งของโมเลกุล rRNA พบว่ามีการอนุรักษ์ไว้เป็นอย่างดี แม้ว่าจะผ่านกระบวนการวิวัฒนาการมาเป็นเวลานานก็ตาม ซึ่งบริเวณที่แตกต่างกันนี้พบว่ามี ความแตกต่างกันตั้งแต่ระดับสปีชีส์ไปจนถึงระดับโดเมน (Woese. 1987)

5.2.3 เซลล์สิ่งมีชีวิตสามารถเพิ่มจำนวนโมเลกุลของ rRNA ได้ภายในเซลล์ โดยทั่วไปพบมากกว่า 1,000 หน่วย บางครั้งอาจพบมากกว่า 10,000 หน่วย ทำให้ง่ายและไวต่อการตรวจสอบโมเลกุล rRNA ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะใช้เทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (Amann, Glöckner and Neef. 1997)

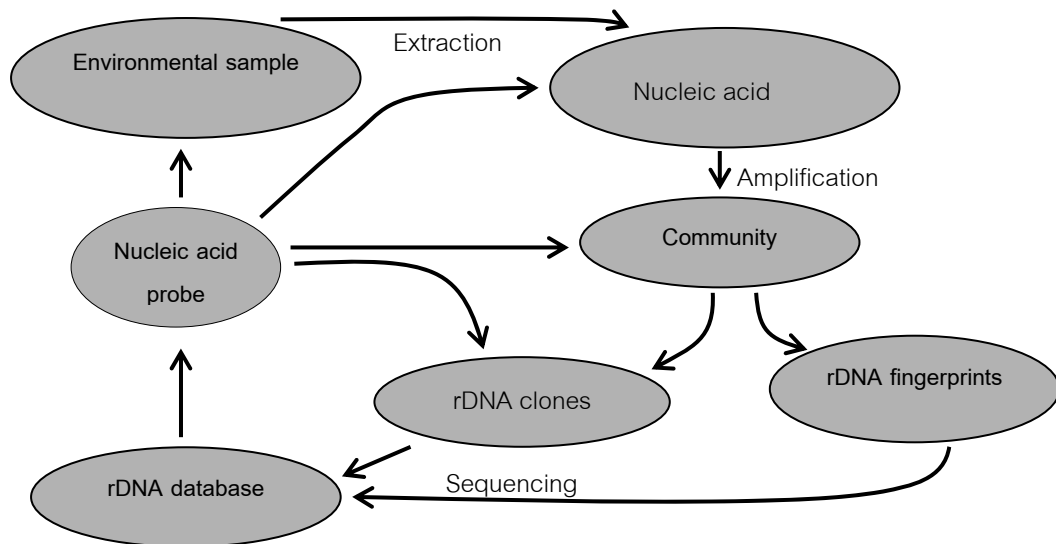
5.2.4 การมีจำนวนไรโบโซมอย่างหนาแน่นในเซลล์เป็นตัวบ่งชี้เป็นอย่างดีว่า เซลล์กำลังมีชีวิตอยู่และมีกระบวนการเมแทบอลิซึมขั้นพื้นฐานโดยทั่วไป หรืออย่างน้อยก็อาจจะมี กระบวนการเมแทบอลิซึมบ้าง ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดเจนคือ เซลล์ของแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่ กำลังเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วพบว่าเซลล์จะมีความต้องการและมีปริมาณไรโบโซมในเซลล์สูงกว่า เซลล์ *E.coli* ที่กำลังเจริญเติบโตอย่างช้าๆ (Woese. 1987)

ปัจจุบันมีการหาลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียอย่างแพร่หลายและรวดเร็วซึ่งมีการเผยแพร่ในฐานข้อมูลสาธารณะผ่านทางอินเทอร์เน็ตทำให้สะดวกรวดเร็วในการศึกษาวิจัย โดยจากรายงานนับถึงวันที่ 1 กุมภาพันธ์ 2549 พบว่ามีข้อมูล 16S rDNA อยู่ใน ฐานข้อมูล Ribosomal Database Project-II (Release 9.32) มากถึง 205,165 sequences (Cole et al. 2005)

## 6. เทคนิคด้าน 16S rRNA

เทคนิคด้าน 16S rRNA เริ่มจากการสกัดกรดนิวคลีอิกของตัวอย่างออกมาซึ่งอาจจะเป็น ดีเอ็นเอ (DNA) หรืออาร์เอ็นเอ (RNA) แล้วนำมาเพิ่มจำนวนยีนของ 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR หรือ RT-PCR แล้วทำการเพิ่มจำนวนยีนเหล่านั้นที่เรียกว่า “Cloning” จะได้เป็น 16S rRNA gene library เมื่อหาลำดับยีนเหล่านั้นและนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสาธารณะก็จะทราบว่า แบคทีเรียที่พบเป็นชนิดหรือกลุ่มใดบ้าง สำหรับข้อมูลที่ได้นี้สามารถนำไปใช้ในการออกแบบเป็น Oligodeoxynucleotide probe ที่มีความจำเพาะกับแบคทีเรียในระดับต่างๆ เรียกสั้นๆ ว่า “ดีเอ็นเอโพรบ” (DNA probe) ทำให้สามารถนำไปตรวจสอบแบคทีเรียชนิดต่างๆ ตามความสนใจใน แหล่งเดิมของตัวอย่างนั้นได้ เรียกการศึกษาแบบนี้ว่า Full-cycle rRNA approach ดังภาพที่ 6 ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคนิคด้าน 16S rRNA ในการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียอย่างแพร่หลาย (Schramm and Amann. 2000 ; Loy et al. 2002) โดยสามารถแบ่งเทคนิคด้าน 16S rRNA ออกตามเป้าหมายของการศึกษาได้ดังนี้คือ การจำแนก

แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ ศึกษาความหลากหลายและการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรีย และการศึกษาด้านโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย



ภาพที่ 6 การใช้เทคนิค Full-cycle rRNA approach ในการศึกษาโครงสร้างจุลินทรีย์ในธรรมชาติ (ดัดแปลงจาก Amann, Ludwig and Schleifer. 1995)

### 6.1 การจำแนกเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้

แม้ว่าเทคนิคทางชีวโมเลกุลจะช่วยให้ศึกษาจุลินทรีย์ได้ดีแต่เทคนิคดั้งเดิมอย่างการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ยังคงมีความสำคัญและจำเป็นอยู่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากต้องการศึกษากระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ โดยเทคนิคด้านชีวโมเลกุลจะเป็นส่วนช่วยสนับสนุนเทคนิคดั้งเดิมให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นโดยเฉพาะการคัดเลือกเชื้อเบื้องต้นและการจัดประเภทหรือการจำแนกชนิดเชื้อที่คัดแยกได้ เทคนิคที่นำมาใช้เช่น เทคนิค RFLP (Restriction fragment length polymorphism) และเทคนิค ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis) อาจเรียกได้อีกอย่างหนึ่งว่าเป็นเทคนิค “ลายพิมพ์พันธุกรรม” (Genetic fingerprints) โดยเทคนิค RFLP เป็นการนำดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตมาตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) จะทำให้ได้ชิ้นส่วนที่มีขนาดแตกต่างกันเมื่อนำมาแยกด้วยเทคนิค Pulsed-field gel electrophoresis สิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันจะมีความยาวของชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างกันเพราะเกิดจากกลายพันธุ์ของบริเวณตำแหน่งตัดของเอนไซม์ จึงสามารถใช้เทคนิค RFLP ในการเปรียบเทียบจุลินทรีย์ที่คัดแยกมาได้ เนื่องจากการศึกษาด้วยเทคนิค RFLP นั้นต้องทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิต ดีเอ็นเอที่

จะนำมาทำการศึกษานั้นต้องมีความบริสุทธิ์สูง นอกจากนี้เทคนิค RFLP ยังใช้เวลามาก และยุ่งยากในการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ด้วยเทคนิค Pulsed-field gel electrophoresis ปัจจุบันจึงได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิค RFLP กับชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนของจีโนมเท่านั้น เช่น เทคนิค ARDRA โดยเทคนิคนี้จะทำการเพิ่มจำนวนชิ้นยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR ขึ้นมาก่อนแล้วนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นก็สามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Gel electrophoresis ธรรมดาได้ โดยรูปแบบของ ARDRA ที่ได้สามารถที่จะเปรียบเทียบรูปแบบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงได้ ทำให้สามารถวิเคราะห์แบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามเทคนิค ARDRA นี้ต้องใช้รูปแบบของ ARDRA อ้างอิงจำนวนมากเพื่อมาเปรียบเทียบกับเชื้อไม่ทราบชนิด (Unknown) ซึ่งปัจจุบันยังมีข้อมูลน้อย (Schramm and Amann, 2000) นอกเหนือจากเทคนิค ARDRA แล้ว เทคนิคอื่นๆ ก็สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกจุลินทรีย์ที่สนใจได้ เช่น เทคนิค DGGE และ FISH ซึ่งจะกล่าวถึงต่อไป

## 6.2 การศึกษาความหลากหลายและการเปลี่ยนแปลงของชุมชนจุลินทรีย์

การศึกษาความหลากหลายและการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์สามารถทำได้อย่างรวดเร็วด้วยการใช้เทคนิคด้านลายพิมพ์พันธุกรรมที่อาศัย rRNA โดยเริ่มจากการสกัดกรดนิวคลีอิกอาจเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอจากตัวอย่างธรรมชาติออกมา แล้วเพิ่มจำนวนบางส่วนของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำไปแยกชิ้นยีนบนเจล (Gel) ก็จะทำให้ได้รูปแบบหรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ในตัวอย่าง เทคนิคที่มีการใช้คือ เทคนิค DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) และเทคนิค T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphisms) (Schramm and Amann, 2000)

สำหรับเทคนิค DGGE เป็นการอาศัยหลักการที่ว่าชิ้นดีเอ็นเอที่มีความยาวเท่ากันสามารถแยกออกจากกันได้โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปจะเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA เพียงบางส่วนยาว 200 ถึง 500 เบสด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีเบส GC ยาว 40 เบสที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์เพียงเส้นเดียว เมื่อแยกบน Polyacrylamide gel ที่มีความเข้มข้นของสารทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ (ยูเรียและฟอร์มาไมด์) ยีนที่เพิ่มจำนวนมานี้จะเปลี่ยนสภาพจากดีเอ็นเอเกลียวสายคู่แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวเพียงบางส่วนแต่ไม่หลุดจากกัน อย่างไรก็ตามเทคนิค DGGE มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ขนาดยีนที่เพิ่มจำนวนขึ้นมานั้นต้องไม่เกิน 500 เบสจึงจะสามารถแยกบนเจลได้ อาจทำให้เมื่อหาลำดับเบสออกมาแล้วข้อมูลไม่เพียงพอสำหรับจำแนกชนิดอย่างละเอียดได้ เป็นการยากที่จะอธิบายสมมุติฐาน “One band-one species” เพราะในชุมชนจุลินทรีย์ที่มีความซับซ้อนนั้น แบนด์ (Band) ที่ปรากฏเป็นลายพิมพ์พันธุกรรม



อาจจะเกิดจากชั้นยีนเดียวกันหรือต่างชั้นยีนกันก็ได้ นอกจากนี้สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันอาจจะเกิดแบบดีซิงสองแบนด์หรือมากกว่าก็ได้ (Schramm and Amann. 2000)

ส่วนเทคนิค T-RFLP เป็นการประยุกต์ใช้เทคนิค RFLP ในการศึกษาชุมชนจุลินทรีย์ โดยหลังจากสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแล้ว ทำการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR โดยไพรเมอร์เส้นหนึ่งติดฉลากด้วยสารเรืองแสง จากนั้นนำ PCR product ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วแยกด้วยเทคนิค Gel electrophoresis ซึ่งอาศัยเครื่อง Automated sequencer ในการอ่านปริมาณสารเรืองแสงที่ติดอยู่บนชั้นยีนที่ถูกตัด (Schramm and Amann. 2000)

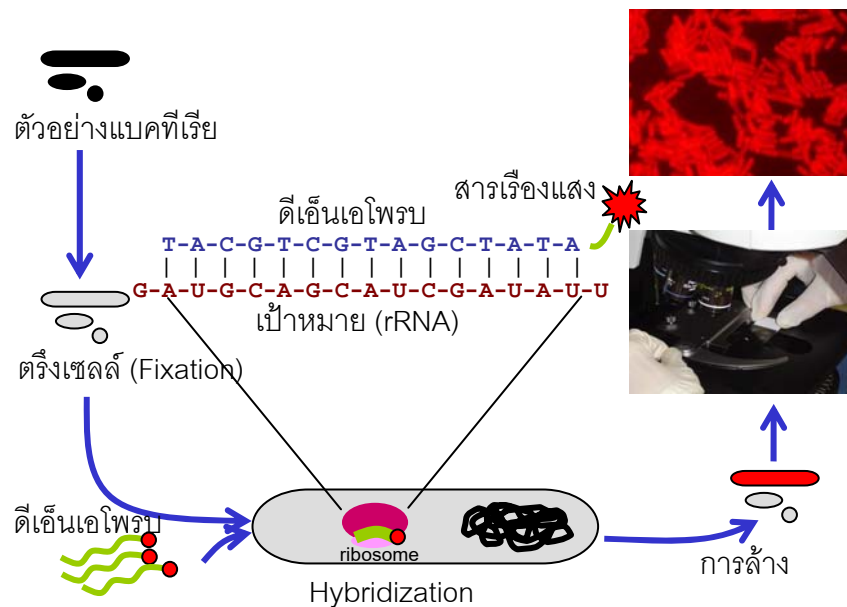
### 6.3 การศึกษาโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์

การศึกษาโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์เป็นการศึกษาสองพารามิเตอร์หลักคือ ชนิดของจุลินทรีย์ และความหนาแน่นหรือปริมาณของจุลินทรีย์ที่พบ เมื่อเทคนิคด้านลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการเพาะเลี้ยงเชื้อไม่สามารถศึกษาชุมชนจุลินทรีย์ที่ซับซ้อนในตัวอย่างธรรมชาติได้ เทคนิค *in situ* hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะกับ rRNA จึงถูกพัฒนาขึ้น (Amann, Ludwig and Schleifer. 1995) โดยทั่วไปดีเอ็นเอโพรบจะเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวมีความยาวประมาณ 15-25 นิวคลีโอไทด์ ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีหรือสารเรืองแสง (Fluorochrome) (Schramm and Amann. 2000) หากดีเอ็นเอโพรบติดฉลากด้วยสารเรืองแสงก็จะเรียกว่าเทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) หลักการของเทคนิค FISH ดังแสดงในภาพที่ 7

## 7. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 7.1 แบคทีเรียไนตริไฟอิง

จากการศึกษาที่อาศัยเทคนิคการแยกเชื้อบนอาหารในตัวอย่างจากระบบเอเอสหลายแห่งพบว่า *Nitrosomonas* และ *Nitrobacter* เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการไนตริฟิเคชันในระบบบำบัดน้ำเสีย (Henze et al. 1997) แต่ต่อมา Hovanec และ DeLong (1996) ได้ใช้เทคนิค Dot blot hybridization เพื่อหาจำนวนของแบคทีเรียไนตริไฟอิงในเมือกจุลินทรีย์จากตู้ปลาพบว่าตรวจไม่พบแบคทีเรียไนตริไฟอิง *Nitrobacter* เลย นอกจากนี้จากการศึกษาของ Wagner และคณะ (1996) ได้ใช้เทคนิค FISH ตรวจสอบ *Nitrobacter* ในตะกอนจุลินทรีย์ในระบบเอเอสด้วยดีเอ็นเอโพรบที่มีเป้าหมายจำเพาะกับ *Nitrobacter* ก็ตรวจไม่พบ *Nitrobacter* เช่นเดียวกัน จากผลการศึกษานี้จึงทำให้มีการตั้งสมมุติฐานว่าในระบบบำบัดน้ำเสียอาจจะมี NOB ชนิดอื่นที่มีบทบาทต่อกระบวนการไนตริฟิเคชันก็ได้



ภาพที่ 7 หลักการของเทคนิค FISH ดีเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงจะเข้าไปจับกับ rRNA ที่อยู่ในเซลล์แบคทีเรียทำให้มองเห็นเซลล์เรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Epifluorescence

ปัจจุบันสมมุติฐานดังกล่าวได้รับการยืนยันแล้ว หลังจากมีการศึกษาจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคด้าน rRNA ในถังปฏิกรณ์ที่บำบัดไนโตรที่ในห้องปฏิบัติการ พบว่าแบคทีเรียที่พบในถังดังกล่าวเป็นแบคทีเรียในจีนัส *Nitrospira* (Burrell, Keller and Blackall. 1998) ซึ่งจากการศึกษาในเวลาต่อมาด้วยเทคนิค Dot blot hybridization (Hovanec et al. 1998) และเทคนิค FISH (Juretschko et al. 1998) ก็พบเหมือนเดิมว่ามี *Nitrospira* เป็นกลุ่มเด่น อย่างไรก็ตามในตัวอย่างเดียวกันนี้ แม้ว่าจะมีการใช้เทคนิค FISH แล้วตรวจสอบ *Nitrobacter* ไม่พบ แต่หากนำมาแยกเชื้อบนอาหารก็จะพบ *Nitrobacter* (Juretschko et al. 1998) และถึงแม้ว่าจะมีความพยายามในการแยกเชื้อ *Nitrospira* ให้บริสุทธิ์ แต่ก็ไม่สามารถประสบความสำเร็จ (Juretschko et al. 1998) ทำให้ไม่สามารถศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของ *Nitrospira* ได้มากนัก หลักฐานที่ยืนยันว่า *Nitrospira* เป็นตัวออกซิไดส์ไนโตรที่เป็นไนเตรตคือการศึกษาด้วยเทคนิค Full-cycle 16S rRNA approach และเทคนิค Microautoradiography-fluorescence *in situ* hybridization (FISH/MAR) (Daims. 2001)

เป็นที่ยอมรับว่าในระบบบำบัดน้ำเสียนั้น *Nitrospira* มีบทบาทในการออกซิไดส์ไนโตรที่มากกว่า *Nitrobacter* ในบางระบบอาจจะพบเฉพาะ *Nitrospira* เท่านั้น (Burrell, Keller

and Blackall. 1998) แต่บางระบบก็พบ *Nitrobacter* แต่ก็พบน้อยมาก (Chanyarat Paungfoo. 2003) ส่วน AOB นั้นบางครั้งพบว่าแบคทีเรียในจีนัส *Nitrosospira* เป็นกลุ่มเด่นกว่า *Nitrosomonas* ทั้งที่ก่อนหน้านี้มักจะพบว่า *Nitrosomonas* เป็น AOB ที่มีบทบาทมากกว่า (Coskuner and Curtis. 2002) สำหรับเหตุผลที่พบ *Nitrosospira* เป็นกลุ่มเด่นมากกว่า *Nitrobacter* นั้นเนื่องจากวิธีการในการกินอาหารที่แตกต่างกันของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม อาจอธิบายได้โดยสมมุติฐาน K และ R strategy โดย *Nitrosospira* นั้นเป็นกลุ่มที่เจริญเติบโตช้า สามารถปรับตัวกับปริมาณไนโตรเจนและออกซิเจนที่มีอยู่อย่างจำกัดได้ดี (K-strategist) ตรงกันข้ามกับ *Nitrobacter* ที่เจริญเติบโตได้เร็ว (R-strategist) (Schramm et al. 1999) ดังนั้นหากปริมาณไนโตรเจนในระบบต่ำ *Nitrosospira* ก็จะเด่นกว่า *Nitrobacter*

สำหรับในน้ำทิ้งที่มีความเค็มมีการศึกษาแบคทีเรียไนโตรไฟอิงในระบบบำบัดแบบเอสปีอาร์ในระดับห้องปฏิบัติการโดยการใช้เทคนิคทางด้าน 16S rRNA พบ *Nitrosomonas nitrosa* และ *Nitrosomonas communis* เป็นกลุ่มเด่นของ AOB ส่วน NOB นั้นไม่พบ *Nitrosospira* แต่พบ *Nitrobacter* เพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยพบแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่เป็นกลุ่มเด่นอยู่ใน *Alphaproteobacteria* ซึ่งมีลำดับของยีนไม่ตรงกับเชื้อใดในฐานข้อมูล จึงสันนิษฐานได้ว่าอาจจะเป็นเชื้อ NOB ชนิดใหม่ (Chanyarat Paungfoo. 2003)

## 7.2 แบคทีเรียดีไนโตรไฟอิง

ในอดีตการนับจำนวนและจำแนกชนิดแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิงในระบบบำบัดน้ำเสียโดยอาศัยเทคนิคที่ขึ้นกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ มักจะพบว่าแบคทีเรียที่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการดีไนโตรฟิเคชันหรือเป็นแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิงคือจีนัส *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Bacillus*, *Paracoccus* และ *Hyphomicrobium* (Wagner et al., 2002) แต่อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลที่จะยืนยันว่าแบคทีเรียดังกล่าวมานี้เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทจริงหรือไม่ในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย Neef และคณะ (1996) ได้ใช้เทคนิค FISH ศึกษาแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิงในระบบบำบัดแบบทรายกรองพบว่าถึงที่เดิมเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนพบแบคทีเรีย *Paracoccus* spp. และ *Hyphomicrobium* spp. เป็นกลุ่มเด่น ตรงข้ามกับอีกถังที่ไม่ได้เติมเมทานอลซึ่งพบแบคทีเรียทั้งสองจีนัสนี้ไม่ถึงร้อยละ 0.1 ของปริมาณเซลล์ทั้งหมดเท่านั้น ซึ่งก็ยืนยันได้ระดับหนึ่งว่าแบคทีเรียทั้งสองจีนัสเกี่ยวข้องและมีบทบาทในการรีดิวซ์ไนเตรทในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย แต่จากตรวจสอบด้วยเทคนิค Full-cycle rRNA approach ในระบบบำบัดน้ำเสียที่บำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมพบว่าจีนัส *Azoarcus*, *Thauera* และ *Zoogloea* น่าจะเป็นแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิงเนื่องจากมีจำนวนมากในระบบ (Juretschko et al.

2002) สอดคล้องกับการศึกษาของ Thomsen และคณะ (2004) ที่รายงานว่าพบจีโนส *Thauera* และ *Zoogloea* เป็นกลุ่มเด่น ส่วนในระบบบำบัดน้ำเสียที่บำบัดน้ำทิ้งจากชุมชนกลับพบว่าจีโนส *Aquaspirillum* เป็นกลุ่มเด่นโดยมีมากถึงร้อยละ 30 ของแบคทีเรียทั้งหมด (Thomsen et al. 2004)

สำหรับแบคทีเรียในจีโนส *Aquaspirillum* นั้นพบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่มหลักของ *Betaproteobacteria* ที่เป็นต้นเหตุในการทำให้เกิดโฟม (Foaming) (Nielsen et al. 2004) ส่วนจีโนส *Thauera* และ *Zoogloea* นั้นพบว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้มีปริมาณโพลีเมอร์ในน้ำสูงขึ้นจนมีผลต่อการตกตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำในระบบ (Lajoie et al. 2000) ล่าสุดมีการใช้เทคนิค Stable-isotope probing (SIP) ร่วมกับเทคนิค Full-cycle rRNA approach ทำให้ได้หลักฐานที่ยืนยันได้ว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *Methylobacillus* และ *Methylophilus* อยู่ในกลุ่มของ *Betaproteobacteria* เป็นแบคทีเรียดีไนโตรฟิอิงที่ใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนในระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอสปีอาร์ในระดับน้องปฏิบัติการ (Ginige et al. 2004) ดังนั้นจะเห็นว่าการประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลรวมทั้งเทคนิคอื่นๆ ช่วยให้มีการตรวจสอบแบคทีเรียที่มีบทบาทและหน้าที่ในสิ่งแวดล้อมจริงๆ ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ

สำหรับในน้ำทิ้งที่มีความเค็มนั้นมีการศึกษาจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดีไนโตรฟิเคชัน โดยทดลองบำบัดน้ำทิ้งที่มีไนเตรทเข้มข้นประมาณ 8,800 มิลลิกรัม/ลิตร ความเค็มสูงถึงร้อยละ 5.5 ซึ่งมีแหล่งกำเนิดมาจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีโลหะหนักปนเปื้อน ใช้กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นใช้เทคนิค DGGE ตรวจสอบจุลินทรีย์ในระบบซึ่งมีประสิทธิภาพการบำบัดทั้งไนโตรทและไนเตรทมากถึงร้อยละ 97 ก็พบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Halomonadaceae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Gammaproteobacteria* (Yoshie et al. 2001) ต่อมาก็มีการออกแบบดีเอ็นเอโพรบสำหรับตรวจสอบแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวนี้ให้จำเพาะลงไปอีกโดยใช้เทคนิค FISH แล้วนำไปตรวจสอบในระบบดังกล่าวอีกครั้งก็พบว่าแบคทีเรียจีโนส *Halomonas* เป็นกลุ่มเด่นมากกว่า *Pseudomonas* spp. และ *Colwellia* spp. (Yoshie et al. 2004)

การศึกษาแบคทีเรียที่มีบทบาทในกระบวนการไนโตรฟิเคชันและดีไนโตรฟิเคชันในกระบวนการบำบัดน้ำทิ้งที่มีความเค็ม ในระยะแรกเริ่มได้มีการใช้ระบบเอสปีอาร์บำบัดแอมโมเนียในน้ำทิ้งที่มีความเค็มร้อยละ 2.5 เพื่อศึกษากลุ่มแบคทีเรียไนโตรฟิอิงโดยใช้เชื้อเริ่มต้นจากผลิตภัณฑ์ทางการค้าและจากแหล่งธรรมชาติ (Chanyarat Puangfoo. 2003 ; ดอกรัก ชัยสาร. 2545) ขณะเดียวกันได้ใช้ระบบเอสปีอาร์ศึกษาการบำบัดไนเตรทโดยอาศัยกลุ่มแบคทีเรียดีไนโตรฟิอิง (กวีศักดิ์ สมจิตร. 2545) ต่อมาได้มีการเชื่อมต่อระบบทั้งสองเข้าด้วยกันโดยนำน้ำทิ้งที่ผ่าน

การบำบัดจากถัง NSBR ซึ่งมีไนเตรทสูงเป็นอาหารสำหรับแบคทีเรียดีในไตรฟองโดยเติมให้กับถัง DSBR พร้อมทั้งเติมเมทานอลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้เกิดการบำบัดไนโตรเจนอย่างสมบูรณ์ เรียกระบบดังกล่าวว่า “ระบบเอสปีอาร์แบบสองขั้นตอน” (พีระศักดิ์ ศิริวัฒน์. 2546) แม้ในช่วงแรกของการเชื่อมต่อบนระบบเข้าด้วยกันจะมีประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรทต่ำ แต่ภายหลังได้มีการปรับอัตราส่วนของเมทานอลและปริมาณของแร่ธาตุที่จำเป็นสำหรับแบคทีเรียดีในไตรฟองใหม่ จึงทำให้มีระบบมีการบำบัดไนเตรทอย่างมีประสิทธิภาพ จึงทำให้สามารถบำบัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนได้อย่างสมบูรณ์ (นุกูล อินทระสังขา และคณะ. 2547)

การศึกษาโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในระบบดังกล่าวก็จะทำให้ทราบคำตอบว่า ประชากรแบคทีเรียในระบบที่มีกระบวนการไนโตรฟิเคชันและดีไนโตรฟิเคชันในน้ำทิ้งที่มีความเค็ม ประกอบไปด้วยแบคทีเรียกลุ่มใดบ้าง ซึ่งมีประโยชน์สำหรับการออกแบบและควบคุมระบบบำบัดน้ำเสียให้สามารถบำบัดไนโตรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ข้อมูลที่ได้ยังสามารถนำไปใช้ออกแบบเป็นเครื่องหมายติดตามทางชีวภาพเพื่อใช้ตรวจสอบติดตามกลุ่มเชื้อดังกล่าว แม้ว่าปัจจุบันจะมีระบบบำบัดน้ำทิ้งที่สามารถบำบัดได้ทั้งแอมโมเนียและไนเตรทได้ในถังเดียวกันก็ตาม แต่การแยกกระบวนการไนโตรฟิเคชันและดีไนโตรฟิเคชันออกจากกันเป็นสองระบบนี้ก็เพื่อสร้างสภาวะจำเพาะสำหรับเชื้อแต่ละกลุ่มทำให้สามารถศึกษารายละเอียดทางนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องได้อย่างสะดวก ตลอดจนสามารถนำกลุ่มเชื้อที่ได้ไปทำการเพาะขยายเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในสิ่งแวดล้อมจริงด้วย

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

##### 1.1 การติดตั้งระบบเอสปีอาร์

- 1.1.1 ถังปฏิกริยาทำจากพลาสติกอะคริลิคทรงกระบอก สูง 13.19 นิ้ว เส้นผ่านศูนย์กลาง 5.28 นิ้ว
- 1.1.2 Peristaltic pump (Watson Marlow 505S, UK)
- 1.1.3 เครื่องกวนแม่เหล็ก (Cerastir, Clifton, UK)
- 1.1.4 วาล์วโซลินอยด์ (Solenoid valve)
- 1.1.5 หัวทราย (Air diffuser)
- 1.1.6 เครื่องเติมอากาศ (Air pump)
- 1.1.7 เครื่องตั้งเวลาอัตโนมัติ (Timer)
- 1.1.8 ตู้เย็น

##### 1.2 การศึกษาทางจุลชีววิทยา

- 1.2.1 Ultrasonicator (Kubota, Insonator 201M, Japan)
- 1.2.2 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath) (Optima, WB-710M, USA)
- 1.2.3 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (WTB binder, Germany)
- 1.2.4 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Hybridiser HB-1D, UK)
- 1.2.5 กล้องจุลทรรศน์แบบ Epifluorescence (Olympus, BX51, Japan)  
พร้อมกล้องถ่ายภาพแบบ CCD (Olympus DP50, Japan)
- 1.2.6 สไลด์เคลือบ Teflon
- 1.2.7 หลอดฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร
- 1.3.8 Micropipetter
- 1.3.9 Thermocycler (GeneAmp PCR System 9700)
- 1.3.10 UV trans-illuminator (Bio-Rad, USA)
- 1.3.11 pH meter (Sartorius, PP50, Germany)
- 1.3.12 Centrifuge (Jouan, B4i, Germany)
- 1.3.13 Gel electrophoresis system (Maxicell Primo, EC340, USA)
- 1.3.14 Laminar air flow (Faster, BHA48, Italy)

### 1.3 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

- 1.3.1 เครื่อง Spectroquant NOVA 60 (Merck Ltd., Germany)
- 1.3.2 เครื่องวัดคุณภาพน้ำแบบหลายพารามิเตอร์ (YSI-650MDS, Germany)
- 1.3.3 Cadmium-Copper reduction column
- 1.3.4 เครื่องสูบลูซิฟิเคชัน
- 1.3.5 เยื่อกรองใยแก้ว (GF/C) (Whatman)
- 1.3.6 บีกเกอร์
- 1.3.7 ขวดวัดปริมาตร
- 1.3.8 เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter)

## 2. วัสดุ

### 2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 2.1.1 อาหาร Alexander and Clark's medium

ประกอบด้วย  $\text{KNO}_3$  0.006 กรัม/ลิตร  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 กรัม/ลิตร  $\text{NaCl}$  0.3 กรัม/ลิตร  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 กรัม/ลิตร  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03 กรัม/ลิตร  $\text{CaCO}_3$  1 กรัม/ลิตร  $\text{CaCl}_2$  0.3 กรัม/ลิตร (Alexander and Clark. 1965)

#### 2.1.2 อาหาร Watson's medium

ประกอบด้วย  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.5 กรัม/ลิตร  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 กรัม/ลิตร  $\text{CaCl}_2$  0.02 กรัม/ลิตร  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.114 กรัม/ลิตร Fe-EDTA (ละลาย  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  77 มิลลิกรัมและ NaEDTA 103 มิลลิกรัมในน้ำ 50 มิลลิลิตร) 1 มิลลิลิตร/ลิตร  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1 ไมโครกรัม/ลิตร  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2 ไมโครกรัม/ลิตร  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2 ไมโครกรัม/ลิตร  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  20 ไมโครกรัม/ลิตร  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  100 ไมโครกรัม/ลิตร  $\text{CaCO}_3$  2 กรัม/ลิตร และ Phenol red 0.5 กรัม/ลิตร (Jones and Hood. 1980)

#### 2.1.3 น้ำทะเลเทียม

ประกอบด้วย  $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 กรัม/ลิตร  $\text{CaCl}_2$  1 กรัม/ลิตร  $\text{KCl}$  1 กรัม/ลิตร และ  $\text{NaCl}$  25 กรัม/ลิตร (Stephen et al. 1996)

#### 2.1.4 อาหาร Saline DB

ประกอบด้วย  $\text{KNO}_3$  0.772 กรัม/ลิตร  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 กรัม/ลิตร  $\text{NaHCO}_3$  1 กรัม/ลิตร  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 กรัม/ลิตร  $\text{NaCl}$  25 กรัม/ลิตร Methanol 2.7 มิลลิลิตร/ลิตร และ สารละลาย Trace element 1 (ตารางที่ 3) 1 มิลลิลิตร/ลิตร

## 2.2 กล้าเชื้อ

กล้าเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นได้มาจากหลายแหล่งได้แก่ น้ำและดินจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ทางการค้าสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล และตะกอนจุลินทรีย์หรือสลัดจ์จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานแปรรูปอาหารทะเลในเขตจังหวัดสงขลา โดยมีการคัดเลือกเชื้อแล้วใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการดำเนินระบบมานานกว่า 4 ปี

## 2.3 น้ำเสียสังเคราะห์สำหรับระบบเอสปีอาร์

### 2.3.1 น้ำเสียสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไนตริไฟอิง

น้ำเสียสังเคราะห์เรียกว่า ASW (Artificial saline wastewater) มีความเข้มข้นของแอมโมเนียม-ไนโตรเจน ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) ประมาณ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ระดับความเค็ม 25 พีพีที (2.5% NaCl) (ดัดแปลงจาก Liu et al. 2000) ประกอบด้วย ( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 กรัม/ลิตร KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 กรัม/ลิตร NaHCO<sub>3</sub> 0.5 กรัม/ลิตร MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 กรัม/ลิตร NaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 2 กรัม/ลิตร เกลือทะเล 25 กรัม/ลิตร และสารละลาย Trace element 2 (ตารางที่ 3) 1 มิลลิกรัม/ลิตร

### 2.3.2 น้ำเสียสังเคราะห์สำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง

ใช้น้ำทิ้ง ASW ที่ผ่านการบำบัดโดยแบคทีเรียไนตริไฟอิงซึ่งมีในธรรมชาติมาเป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง โดยมีการเติมเมทานอลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนอัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อไนเตรท (Methanol/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N; M/N) เท่ากับ 3 (น้ำหนัก/น้ำหนัก)

### 2.3.3 สารละลาย Trace element

สารละลาย Trace element ดัดแปลงจาก Liu และคณะ (2000) และ Labbé และคณะ (2003) องค์ประกอบดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของสารละลาย Trace element

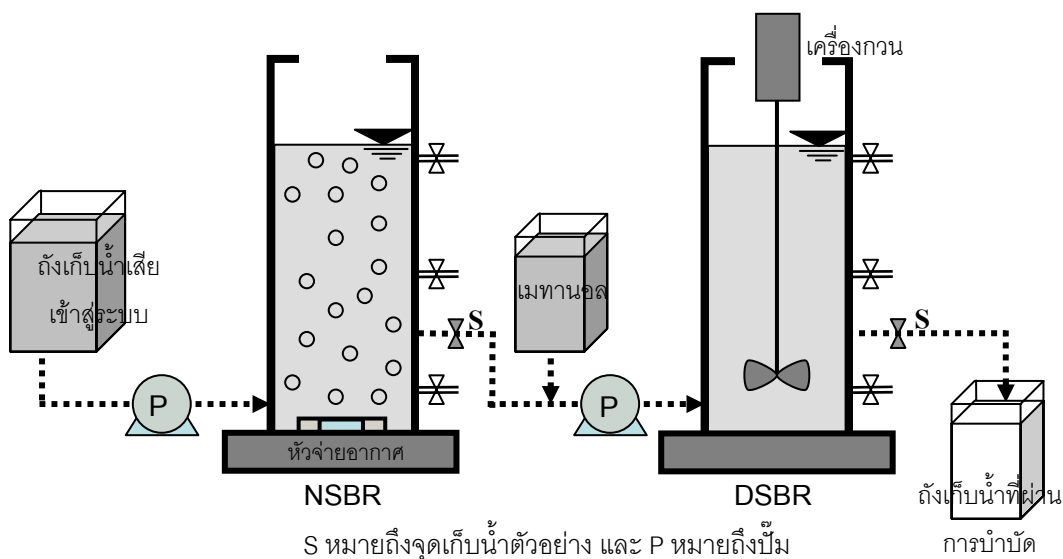
Components	Trace element solution 1 (g/l)	Trace element solution 2 (g/l)
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.911	1.882
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-	0.043
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	-	0.043
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.239	0.539
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	-	0.500



### 3. วิธีการทดลอง

#### 3.1 การติดตั้งและดำเนินระบบเอสบีอาร์แบบสองขั้นตอน

ใช้ระบบจำลองการบำบัดน้ำเสียแบบเอสบีอาร์ระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งดำเนินการทดลองต่อจากงานวิจัยของ นุกุล อินทร์สังขา และคณะ (2004) โดยมีการดัดแปลงระบบจากเดิมเล็กน้อย เรียกว่า “ระบบเอสบีอาร์แบบสองขั้นตอน” ใช้ถังปฏิกรณ์สองถังต่อกันแบบอนุกรม ตั้งแต่แรกเป็นถังเติมอากาศเพื่อให้เกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันโดยอาศัยการทำงานของแบคทีเรียไนตริฟิอิงเรียกว่า “NSBR” (Nitrifying SBR) ส่วนถังที่สองเป็นถังไม่เติมอากาศเพื่อให้เกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันโดยอาศัยการทำงานของแบคทีเรียดีไนตริฟิอิงเรียกว่า “DSBR” (Denitrifying SBR) ถัง NSBR ป้อนด้วยน้ำเสีย ASW น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดจากถัง NSBR จะถูกส่งต่อไปให้กับถัง DSBR เพื่อบำบัดไนเตรทให้สมบูรณ์ ซึ่งเติมเมทานอลด้วยการต่อเข้ากับท่อน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดจากถัง NSBR ก่อนเข้าถัง DSBR แบบตัวที (T-connection) (ภาพที่ 8) เพื่อให้มีการผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาตรทำงานทั้งสองถังเท่ากับ 3 ลิตร ทดลองที่อุณหภูมิห้อง 25-30 องศาเซลเซียส อายุตะกอน (Sludge retention time ; SRT) เท่ากับ 60 วัน ค่าระยะเวลาที่กักน้ำ (Hydraulic retention time ; HRT) เท่ากับ 1.75 วัน



ภาพที่ 8 แผนผังระบบเอสบีอาร์แบบสองขั้นตอน

รอบการทำงานของการระบบเอสบีอาร์แบบสองขั้นตอนเท่ากับ 12 ชั่วโมง ควบคุมการทำงานด้วยเครื่องควบคุมเวลาอัตโนมัติ รายละเอียดระยะเวลาการทำงานของระบบดังแสดง

ในตารางที่ 4 โดยในถัง DSBR มีการเติมอากาศ 1 นาทีก่อนตกตะกอนเพื่อให้มีการตกตะกอนได้ดีขึ้น และในนาที่สุดท้ายของการตกตะกอนจะเป็นการปล่อยน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้ว โดยใช้วาล์วโซลินอยด์และปั๊มแบบลูกคลื่นควบคุมการเข้าออกของน้ำทิ้ง หุ้มถังปฏิกิริยาทั้งสองด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium foil) เพื่อป้องกันการเจริญของสาหร่ายสังเคราะห์แสง (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ระบบเอสบีอาร์แบบสองขั้นตอนที่ใช้ในการศึกษา

ตารางที่ 4 ระยะเวลาการทำงานของระบบเอสบีอาร์แบบสองขั้นตอนใน 1 รอบการทำงาน

ลำดับขั้นตอนการทำงาน	NSBR	DSBR
เติมน้ำเสียเข้าสู่ระบบ	10 นาที	10 นาที
กวน (Anoxic)	-	10 ชั่วโมง
เติมออกซิเจน (Aeration)	10 ชั่วโมง	1 นาที
ตกตะกอนและปล่อยน้ำทิ้ง	1 ชั่วโมง 50 นาที	1 ชั่วโมง 49 นาที

### 3.2 การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำทางเคมี

หาปริมาณแอมโมเนียและไนไตรท์โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Ammonium test และ Nitrite test ที่ใช้ร่วมกับเครื่อง Spectroquant NOVA 60 (Merck Ltd., Germany) วิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทด้วยวิธีการรีดิวซ์ด้วยแคดเมียม (Cadmium copper reduction method)

ร่วมกับการใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Nitrite test ที่ใช้ร่วมกับ Spectroquant NOVA 60 (Merck Ltd Co, Germany) ตามวิธีของ นิแอ นิฮะ และคณะ (2547) และหาปริมาณของแข็งแขวนลอยระเหยง่าย (Mixed liquor volatile suspended solids, MLVSS) ตามวิธีมาตรฐาน (APHA. 1992)

### 3.3 การศึกษาทางจุลชีววิทยา

เก็บตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์จาก NSBR และ DSBR ในช่วงที่ระบบมีประสิทธิภาพในการบำบัดคั่งที่นำไปตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียไนตริไฟอิงและดีไนตริไฟอิงด้วยวิธีเอ็มพีเอ็นตามวิธีการข้อ 3.3.2 ทำการตรวจสอบโครงสร้างประชากรแบคทีเรียด้วยเทคนิค 16S rRNA Clone library และเทคนิค FISH ตามวิธีการข้อ 3.3.3 และ 3.3.4 ตามลำดับ

#### 3.3.1 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของตะกอนจุลินทรีย์

ศึกษาลักษณะทางกายภาพของลักษณะตะกอนจุลินทรีย์ในถังทั้งสองโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus BX51, Japan) ถ่ายภาพด้วยกล้องถ่ายภาพแบบ CCD (Olympus DP50, Japan) และโปรแกรมบันทึกภาพ Viewfinder Lite (Olympus, Japan)

#### 3.3.2 การนับจำนวนแบคทีเรียด้วยเทคนิค MPN (Most probable number)

3.3.2.1 การนับจำนวนแบคทีเรียไนตริไฟอิง นับจำนวนแบคทีเรียไนตริไฟอิงในถัง NSBR ด้วยเทคนิคเอ็มพีเอ็นแบบไมโครเทคนิค (Rowe, Todd and Waide. 1977) ใช้อาหาร Watson's medium (Jones and Hood. 1980) สำหรับ AOB และอาหาร Alexander and Clark's medium (Alexander and Clark. 1965) สำหรับ NOB โดยเติมอาหารลงใน Microtiter plate ทั้ง 96 หลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร เจือจางตัวอย่าง 5 มิลลิลิตรในน้ำทะเลสังเคราะห์ 45 มิลลิลิตร แล้วดูตใส่ใน Microtiter plates ที่เติมอาหารแล้วแถว A ถึง H หลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร เจือจางตัวอย่าง 2 เท่าจากแถว A<sub>1</sub> ไปจนถึง A<sub>12</sub> และทำเช่นกันนี้ในแถว B-H ปิดฝาแล้วนำไปบ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน สำหรับ AOB ทดสอบการออกซิไดส์แอมโมเนียเป็นไนโตรต์ด้วยสารละลาย Diphenylamine ส่วน NOB ทดสอบการออกซิไดส์ไนโตรต์เป็นไนเตรตด้วยสารละลาย Griess-Ilosvay การบันทึกค่าให้แถวที่มีหลุมผลบวกครบทั้งแถว A ถึง H ที่มีความเจือจางน้อยที่สุดเป็น P1 แถวถัดไปเป็น P2 และ P3 ตามลำดับ นำค่าไปเทียบกับตารางเพื่อคำนวณหาค่าเอ็มพีเอ็น (ภาคผนวก ก)

3.3.2.1 การนับจำนวนแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง นับจำนวนแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงคือ NRB (Nitrate reducing bacteria) และ DB (Denitrifying bacteria) ในถัง DSBR ด้วยเทคนิคเอ็มพีเอ็นแบบไมโครเทคนิคโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Soto และคณะ (2002) โดยใช้อาหาร Saline DB และทำเช่นเดียวกับการนับจำนวนแบคทีเรียไนตริไฟอิง แต่บ่ม

เพียง 14 วัน ส่วนการเช็คผลทดสอบการเหลืออยู่ของไนโตรท์และ ในเตรทด้วยสารละลาย Griess-Ilosvay (Alexander and Clark. 1965) และสารละลาย Morgan

### 3.3.3 การศึกษาโครงสร้างแบคทีเรียด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library

**3.3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ** ทำตามวิธีการของ Burrell และคณะ (1998) วิธีการโดยย่อคือ นำตัวอย่าง 2 มิลลิลิตรมาปั่นตกตะกอนเซลล์ 12,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนเซลล์ใน Saline-EDTA (150 mM NaCl, 100 mM EDTA , pH 8.0) 500 ไมโครลิตร เติม Lysozyme (100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่เตรียมใหม่ 20 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที และละลายน้ำแข็งที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 3 นาทีอย่างรวดเร็วจำนวน 4 รอบ (Freeze and thaw) เติม Sodium dodecyl sulfate (ร้อยละ 25 w/v) 100 ไมโครลิตรและ Proteinase K (ร้อยละ 2 w/v) 50 ไมโครลิตรแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นสกัดด้วยวิธี Phenol-chloroform extraction ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Sodium acetate (3 M) 0.12 ml และเอทานอล 1 มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ค้างคืน ตกตะกอน 12,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างดีเอ็นเอด้วยเอทานอล (ร้อยละ 70) ละลายตะกอน DNA ในน้ำบริสุทธิ์ กำจัดอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ RNase (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณด้วยเทคนิค Electrophoresis โดยใช้ Agarose gel ร้อยละ 1 ใน Tris-acetate (TAE; 0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA) ย้อมด้วย Ethidium bromide แล้วตรวจสอบด้วยเครื่อง UV trans-illuminator

**3.3.3.2 การเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA** เพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 27f และ 1492r (Lane. 1991) ใช้ DNA ต้นแบบ 10-100 นาโนกรัม MgCl<sub>2</sub> 1.5 มิลลิโมลาร์ dNTPs 200 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ 0.45 ไมโครโมลาร์ และเอนไซม์ Taq DNA polymerase 1 ยูนิต โดยใช้เครื่อง Thermocycler (GeneAmp PCR System 9700) ด้วยรอบการทำงาน (Cycle) 30 รอบ แต่ละ Cycle ประกอบไปด้วย Denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที Annealing 48 องศาเซลเซียส 1 นาที Elongation 72 องศาเซลเซียส 2 นาที โดยรอบสุดท้ายเพิ่ม Elongation 72 องศาเซลเซียส เป็น 5 นาที (Burrell, Keller and Blackall. 1998) ตรวจสอบขนาดของ PCR product โดยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ทำความสะอาด PCR product ด้วยชุด QIAquick PCR Purification Kit (USA) ตามวิธีการของกลุ่มผลิตภัณฑ์

**3.3.3.3 การโคลนยีน 16S rRNA** โคลนยีนด้วยชุด TOPO TA Cloning kit (Invitrogen, USA) โดยนำ PCR product ที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 มาเชื่อมต่อเข้าพลาสมิด pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> จากนั้นเคลื่อนย้าย (Transformation) เข้าใน Competent cell แล้ว Spread บนอาหารแข็ง LB (Luria-Bertani) ที่มี X-Gal (5-brom-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) และ Ampicillin (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18 ชั่วโมง เลือกลโคไลที่มีสีขาวหรือมี Insert gene เก็บในอาหาร LB ที่มี glycerol ร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ส่วนหนึ่งนำไป Lysis โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ M13 Forward และ M13 reverse ตัด Clone ที่มีขนาดของ Insert gene ต่ำกว่า 1,500 bp ออกไป

**3.3.3.4 การจัดกลุ่มโคลนด้วยเทคนิค REA (Restriction enzymes analysis)** นำ PCR product ที่ได้จากข้อ 3.3.3.4 มาตัดชิ้นยีนโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinP1I* และ *Msp1* (BioLabs) ตามวิธีการของคู่มือผลิตภัณฑ์ ตรวจสอบ PCR product ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์โดยใช้เทคนิค Electrophoresis ด้วย Agarose gel ร้อยละ 3 (Sambrook, 2001) แล้วจัดกลุ่ม Clone ที่มีรูปแบบเหมือนกันให้เป็น Operational taxonomic units (OTUs) เดียวกัน จากนั้นทำการเลือกตัวอย่าง Clone ในแต่ละ OTU เพื่อเป็นตัวแทนสำหรับนำไปหาลำดับเบสของยีนต่อไป

**3.3.3.5 การหาลำดับเบสยีน 16S rRNA** หาลำดับเบสของยีน 16S rRNA เพียงบางส่วน (Partial sequencing) โดยเพิ่มจำนวนยีนของตัวแทนแต่ละ OTU ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ M13 forward และ M13 reverse ทำความสะอาด PCR product ด้วยชุด QIAquick PCR Purification Kit (USA) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะส่งไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง DNA sequencer (ABI, Prism377) ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**3.3.3.6 การวิเคราะห์ลำดับเบส** ตรวจสอบหาชนิดของจุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสาธารณะ GenBank โดยใช้วิธี Basic local alignment search tool (BLAST) (Altschul et al. 1990)

### 3.3.4 การศึกษาโครงสร้างของกลุ่มแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH

ใช้ดีเอ็นเอโพรบที่มีความจำเพาะกับแบคทีเรียแต่ละกลุ่มตั้งแต่ระดับจีโนมไปจนถึงโดเมน (Domain) มีวิธีการเตรียมตัวอย่างหรือตรึงตัวอย่าง (Fixation) ดังนี้แบ่งตัวอย่างเป็น 2 ส่วนเพื่อตรึงแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยนำตัวอย่าง 2 มิลลิลิตรใส่หลอดขนาด 2 มิลลิลิตรปั่นตกตะกอน 10,000x g ล้างเซลล์ด้วย Phosphate buffer saline (PBS) สำหรับ

แบคทีเรียแกรมลบให้แช่ใน Paraformaldehyde ร้อยละ 4 (ใน PBS) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกให้แช่ในเอทานอลร้อยละ 50 เป็นเวลา 4-16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำตัวอย่าง 2 ส่วนไปล้างเซลล์ด้วย PBS แล้วเก็บในเอทานอล/PBS อัตราส่วน 1:1 ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FISH ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Amann (1995) วิธีการโดยย่อดังนี้ ดูดตัวอย่างประมาณ 1-5 ไมโครลิตรกระจายลงบนสไลด์ เคลือบเทฟลอน (Teflon slide) ขนาด 10 หลุมที่เคลือบด้วยเจลาตินร้อยละ 1 ทิ้งให้แห้ง ติ่งน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration) ด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50, 80 และ 100 ตามลำดับ จากนั้น Hybridization ด้วยดีเอ็นเอโพรบความเข้มข้น 5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ใน Hybridization buffer (NaCl 0.9 M, Tris/HCl 20 mM, SDS 0.01%, Formamide ดูภาคผนวก ข) ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดีเอ็นเอโพรบที่ใช้ดังแสดงในตารางที่ 6 จากนั้นล้างด้วย Wash buffer (Tris/HCl 20 mM, SDS 0.01%, NaCl ดูภาคผนวก ข) ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และล้างอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อแล้วทำให้แห้ง ย้อมสไลด์ด้วย Anti-fading solution นำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ Epifluorescence (Olympus BX51, Japan) ถ่ายภาพด้วยกล้องถ่ายภาพแบบ CCD (Olympus DP50, Japan) และโปรแกรมบันทึกภาพ Viewfinder Lite (Olympus, Japan) นับจำนวนแบคทีเรียโดยใช้โปรแกรม Image Tool 3.0 (University of Texas Health Science Center at San Antonio, USA)

ตารางที่ 5 โพรบเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

Name	<i>E. coli</i> rRNA position	Sequence 5'-3'
27f	8-27	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
530f	515-530	GTGCCAGCMGCCGCGG
1492r	1492-1513	TACGGYTACCTTGTTACGACTT
M13 forward	-	GTAAAACGACGGCCAG
M13 reverse	-	CAGGAAACAGCTATGAC

M=C:A, Y=C:T

ตารางที่ 6 ดีเอ็นเอโพรบที่ใช้สำหรับการศึกษาแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH

Probe	%FA**	Probe sequence (5'-3')	Specificity	References
EUB338*	0-50	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Most Bacteria	Amann et al. 1990
EUB338-II*	0-50	GCAGCCACCCGTAGGAGT	<i>Planctomycetales</i>	Daims. 2001
EUB338-III*	0-50	GCTGCCACCCGTAGGAGT	<i>Verrucomicrobiales</i>	Daims. 2001
ALF1b	20	CGTTCGCTCTGAGCCAG	<i>Alphaproteobacteria</i> , some <i>Deltaproteobacteria</i> , <i>Spirochaetales</i>	Manz et al. 1992
BET42a	35	GCCTTCCCCTTCGTTT	<i>Betaproteobacteria</i>	Manz et al. 1992
cBET42a	35	GCCTTCCCACATCGTTT	Competitor to BET42a	Manz et al. 1992
GAM42a	35	GCCTTCCCACATCGTTT	<i>Gammaproteobacteria</i>	Manz et al. 1992
cGAM42a	35	GCCTTCCCCTTCGTTT	Competitor to GAM42a	Manz et al. 1992
NIT3	40	CCTGTGCTCCATGCTCCG	<i>Nitrobacter</i> spp.	Wagner et al. 1996
cNIT3	40	CCTGTGCTCCAGGCTCCG	Competitor to NIT3	Wagner et al. 1996
NTSPA714	55	CCTTCGCCACCGGCCTTC	Phylum <i>Nitrospira</i> , not <i>Thermodesulfovibrio islandicus</i>	Daims et al. 2001
NEU	40	CCCCTCTGCTGCACTCTA	Most halophilic and halotolerant <i>Nitrosomonas</i> spp.	Wagner et al. 1995
CTE	40	TTCCATCCCCCTCTGCCG	Competitor to NEU	Wagner et al. 1995
NSO190	55	CGATCCCCTGCTTTTCTCC	Betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria	Mobarry et al. 1996
NSO1225	35	CGCCATTGTATTACGTGT GA	Betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria	Mobarry et al. 1996
Hlm747	45	CTGTGGGTGATGTCCTTCCT	Several members of <i>Halomonas</i> sp.	Yoshie et al. 2004

หมายเหตุ \* ใช้ EUB338, EUB338-II และ EUB338-III รวมกันในสัดส่วนเท่ากันสำหรับตรวจสอบแบคทีเรียทั้งหมดเรียกว่า EUBmixed

\*\*ความเข้มข้นของ Formamide สำหรับ Hybridization

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ทำการทดลองดำเนินระบบเอสบีอาร์แบบสองขั้นต่อนต่อจากงานวิจัยของ นุกุล อินทร์สังขา และคณะ (2547) ซึ่งได้ดำเนินระบบมาก่อนหน้านั้นเป็นเวลามากกว่า 4 ปี ในช่วงหลังสุดดำเนินระบบด้วยเวลากักน้ำ 7 วัน และ 3 วัน การศึกษาครั้งนี้ได้ปรับลดค่าเวลากักน้ำลงมาเป็น 1.75 วัน การตรวจสอบการเกิดไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันด้วยการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย ไนโตรท์และไนเตรทในน้ำที่ผ่านการบำบัดของทั้ง NSBR และ DSBR หลังจากระบบมีประสิทธิภาพในการบำบัดหรือเข้าสู่สภาวะคงที่ (Steady state) จึงเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนจุลินทรีย์ไปตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียไนตริฟิอิงและดีไนตริฟิอิงด้วยเทคนิคเอ็มพีเอ็น และตรวจสอบชนิดแบคทีเรียโดยเทคนิคที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อคือเทคนิค 16S rRNA clone library และเทคนิค FISH เพื่อทราบถึงชนิดของแบคทีเรียที่น่าจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีความเค็ม NaCl 25 กรัม/ลิตร ปรากฏผลการศึกษาดังนี้

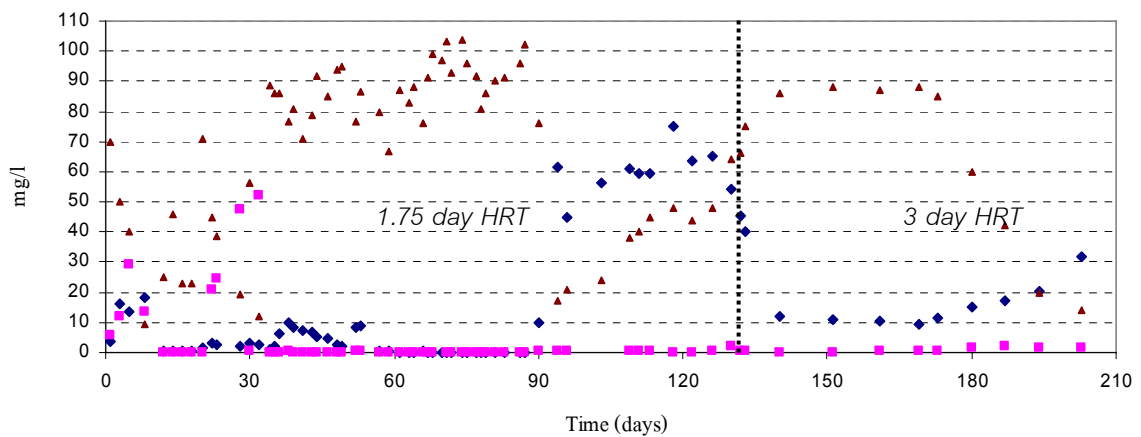
#### 1. ประสิทธิภาพการบำบัดสารอินทรีย์ไนโตรเจน

##### 1.1 การบำบัดแอมโมเนียของ NSBR

การนับวันที่ดำเนินระบบเริ่มจากวันที่เปลี่ยนเวลากักน้ำจาก 3 วันเป็น 1.75 วัน โดยให้ในวันที่ 1 หรือวันแรกของการดำเนินระบบบำบัด จากผลการศึกษาพบว่าในการดำเนินระบบช่วงแรกหลังจากที่มีการปรับลดเวลากักน้ำในระบบเป็น 1.75 วันนั้น ระบบได้ล้มเหลวไม่สามารถบำบัดแอมโมเนียไนโตรเจนได้อย่างคงที่ โดยค่าแอมโมเนียเพิ่มสูงขึ้นและค่าไนเตรทมีการลดลงอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากการลดค่าเวลากักน้ำในระบบเท่ากับเป็นการเพิ่มภาระบรรทุกแอมโมเนียของระบบโดยเพิ่มจากเดิม  $33 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$  ที่ค่าเวลากักน้ำ 3 วัน เป็น  $56.16 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$  ที่ค่าเวลากักน้ำ 1.75 วัน ดังนั้นระบบซึ่งทำงานโดยอาศัยจุลินทรีย์จึงต้องใช้เวลาในการปรับตัว จากภาพที่ 9 จะเห็นได้ว่าหลังจากผ่านวันที่ 30 ของการดำเนินระบบไปแล้วระบบเริ่มมีประสิทธิภาพในการบำบัดดีขึ้นหรือเริ่มเข้าสู่สภาวะคงที่ (ภาพที่ 10) โดยน้ำที่ผ่านการบำบัดจาก NSBR มีปริมาณแอมโมเนียลดลงเรื่อยๆ เฉลี่ยคงเหลือประมาณ 2.17 มิลลิกรัม/ลิตร จากปริมาณแอมโมเนียที่เข้าสู่ NSBR เฉลี่ย 98.53 มิลลิกรัม/ลิตร และมีปริมาณไนเตรทสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องเฉลี่ย 87.82 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาณ  $\text{NO}_x\text{-N}$  ( $\text{NO}_2\text{-N}$  รวมกับ  $\text{NO}_3\text{-N}$ ) ที่ออกจาก NSBR มีค่าเฉลี่ย 92.28 มิลลิกรัม/ลิตร



ผลการตรวจสอบทางเคมีเห็นได้ชัดเจนว่าใน NSBR น่าจะเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันที่สมบูรณ์ขึ้นจากการทำงานของแบคทีเรียไนตริไฟอิงที่อยู่ในระบบทั้งสองกลุ่มคือ AOB ซึ่งออกซิไดส์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์และ NOB ออกซิไดส์ไนไตรท์เป็นไนเตรท (Bitton, 1994) แต่อาจมีบางส่วน of แอมโมเนียที่ไม่ได้ถูกเปลี่ยนไปเป็นไนเตรทคือมีการเปลี่ยนรูปจากแอมโมเนียม ( $\text{NH}_4$ ) เป็นแอมโมเนียอิสระ ( $\text{NH}_3$ ) ในสภาวะที่เป็นต่างโดยถูกปลดปล่อยขึ้นสู่บรรยากาศด้วยกระบวนการที่เรียกว่า Ammonia stripping (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2544) หรือมีบางส่วนถูกดูดซึมเข้าไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ (Assimilation)

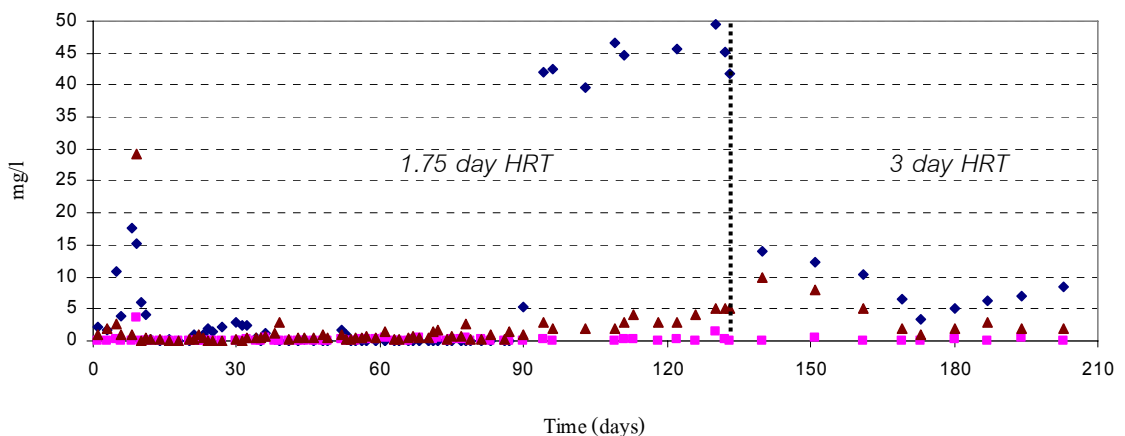


ภาพที่ 10 ค่าแอมโมเนียม (◆) ไนไตรท์ (■) และไนเตรท (▲) ในน้ำที่ผ่านการบำบัดจาก NSBR ที่ดำเนินระบบด้วยระยะเวลาพักน้ำ 1.75 วัน

ในช่วงวันที่ 90 ของการดำเนินระบบได้เกิดปัญหาทางเทคนิคเกี่ยวกับระบบเติมอากาศ โดยเครื่องเติมอากาศเกิดการไหม้ และมีควันบางส่วนที่เกิดจากการไหม้เข้าไปในระบบ ทำให้ประสิทธิภาพการบำบัดแอมโมเนียของ NSBR ล้มเหลว จึงได้แก้ไขโดยเพิ่มเวลาพักน้ำเป็น 3 วัน ประสิทธิภาพการบำบัดของ NSBR จึงเริ่มดีขึ้นตามลำดับ อย่างไรก็ตามก่อนหน้านี้ได้มีการเก็บตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์จาก NSBR ไว้แล้วในช่วงที่ระบบมีประสิทธิภาพในการบำบัดคงที่คือวันที่ 70 ของการดำเนินระบบ เพื่อนำไปศึกษาลักษณะโครงสร้างของชุมชนจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคด้าน 16S rRNA clone library และเทคนิค FISH ต่อไป เพื่อที่จะได้ทราบศึกษาถึงกลุ่มแบคทีเรียที่น่าจะเกี่ยวข้องกับไนตริฟิเคชันในน้ำเค็ม

## 1.2 การบำบัดไนเตรทของ DSBR

สำหรับ DSBR เป็นถังไร้ออกซิเจนอิสระที่ป้อนด้วยน้ำปλύยทิ้งจาก NSBR ซึ่งมีไนเตรทที่เกิดจากปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน โดยมีการเติมเมทานอลเพื่อให้เป็นแหล่งคาร์บอนเข้าในท่อจ่ายน้ำก่อนเข้าสู่ DSBR โดยหลังจากเริ่มต้นการบำบัดหรือดำเนินระบบในช่วง 10 วันแรก (ภาพที่ 11) ระบบแปรปรวนเล็กน้อยเท่านั้น แต่หลังจากนั้นระบบก็สามารถบำบัดไนเตรทและไนเตรทได้อย่างคงที่ ถือได้ว่าระบบค่อนข้างมีประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรทได้อย่างรวดเร็วและสม่ำเสมอ เพราะไม่ว่าค่าไนเตรทและไนเตรทที่เข้าสู่ระบบจะมีค่าสูงหรือต่ำน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดจาก DSBR ก็จะมีค่า  $\text{NO}_x\text{-N}$  เฉลี่ยไม่เกิน 0.77 มิลลิกรัม/ลิตร จากปริมาณ  $\text{NO}_x\text{-N}$  ที่เข้าสู่ DSBR เฉลี่ย 92.28 มิลลิกรัม/ลิตร โดยในช่วงที่ระบบคงที่นี้ น้ำทิ้งที่เข้าสู่ DSBR จะมีปริมาณแอมโมเนียปนมาด้วยเฉลี่ย 2.17 มิลลิกรัม/ลิตร เนื่องจากเหลือมาจากการเกิดไนตริฟิเคชันที่ไม่สมบูรณ์ใน NSBR แต่แอมโมเนียที่เข้ามาในระบบก็ไม่ส่งผลกระทบต่อเกิดไนตริฟิเคชันแต่อย่างใด การหายไปของ  $\text{NO}_x\text{-N}$  ใน DSBR แสดงให้เห็นว่ามีการเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันขึ้นภายในถัง ซึ่งไม่ใช่เกิดจากการเติบโตของสาหร่ายสังเคราะห์แสงเนื่องจากมีการป้องกันด้วยการหุ้มถังด้วยอะลูมิเนียมพอยล์ ปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันที่เกิดขึ้นน่าจะเกิดจากกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนไนเตรทและไนเตรทเป็นก๊าซไนโตรเจนในสภาวะไร้ออกซิเจนอิสระ โดยเป็นกลุ่มที่ใช้เมทานอลที่มีการเติมเข้าไปในระบบเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการสร้างพลังงาน (Purtschert and Gujer, 1999)



ภาพที่ 11 แสดงค่าแอมโมเนีย (◆) ไนเตรท (■) และไนเตรท (▲) ในน้ำที่ผ่านการบำบัดจาก DSBR ที่ดำเนินระบบด้วยระยะเวลาพักน้ำ 1.75 วัน

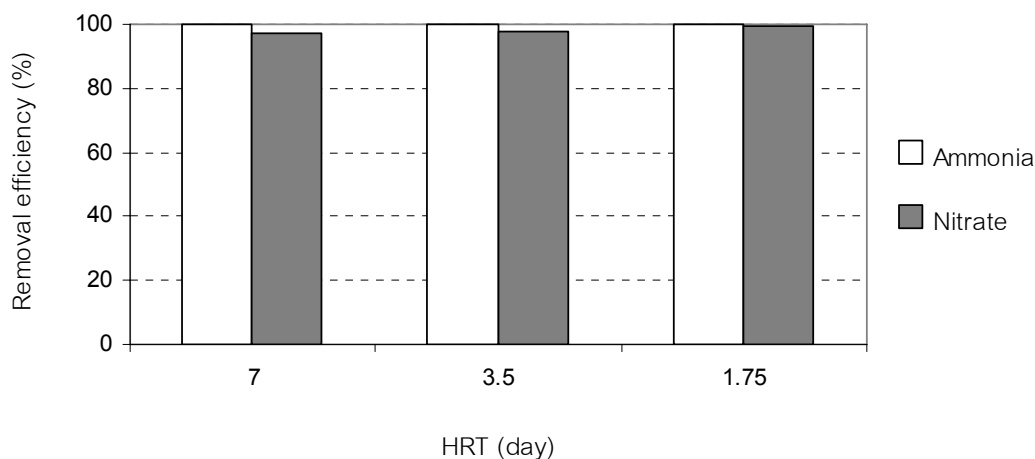
หลังจากช่วงวันที่ 90 ของการดำเนินระบบที่เกิดปัญหาทางเทคนิคเกี่ยวกับระบบเติมอากาศของ NSBR นั้น ได้ส่งผลกระทบต่อ DSBR เช่นกัน โดยในภาพที่ 11 จะเห็นว่าปริมาณแอมโมเนียที่ออกจาก DSBR นั้นมีปริมาณสูง เนื่องจากเป็นแอมโมเนียที่เหลือจากการบำบัดใน NSBR แล้วถูกส่งต่อมายัง DSBR นอกจากนี้การล้มเหลวของ NSBR ในการบำบัดแอมโมเนียก็ส่งผลกระทบต่อปริมาณของไนเตรทที่จะเข้าสู่ DSBR อย่างไรก็ตามแม้ปริมาณไนเตรทที่เข้าสู่ DSBR จะน้อยแต่ระบบก็ยังสามารถบำบัดไนเตรทและไนไตรท์ได้เป็นอย่างดี หลังจากวันที่ 120 ของการดำเนินระบบซึ่งได้ปรับเพิ่มค่าระยะเวลาพักน้ำเป็น 3 วันแล้วระบบก็เริ่มเข้าสู่สภาวะคงที่ตามลำดับ ปริมาณแอมโมเนียเริ่มลดลงตามประสิทธิภาพการบำบัดของ NSBR และช่วง 10 วันแรกของการเพิ่มค่าระยะเวลาพักน้ำการทำงานของระบบจะแปรปรวนเล็กน้อย โดยไนเตรทที่ผ่านการบำบัดนั้นมีค่าเพิ่มสูงขึ้นกว่าเดิม หลังจากนั้นจึงค่อยลดลงมาที่เล็กน้อย

สำหรับเมทานอลที่เติมเข้า DSBR ใช้อัตราส่วน M/N เท่ากับ 3:1 เพื่อให้แน่ใจว่าเพียงพอต่อการเกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันจนสมบูรณ์ (Foglar and Briški, 2003) โดยมีการเสนอไว้ที่อัตราส่วนเท่ากับ 2.47:1 (McCarthy et al. 1969) และ 2.87:1 สำหรับน้ำทะเล (Catalan-Sakairi et al. 1997) เมทานอลถือเป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่มีราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น เช่น เอทานอล กรดอะซิติก และ กลูโคส เป็นต้น ดังนั้นจึงถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลายในการบำบัดน้ำไนโตรเจนทางชีวภาพที่อาศัยกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Bilanovic et al. 1999)

อย่างไรก็ตามในโรงงานบำบัดน้ำเสียขนาดใหญ่ อาจจะต้องใช้เมทานอลในปริมาณมหาศาลทำให้เพิ่มค่าใช้จ่ายในการบำบัดให้สูงขึ้นได้ แนวทางอื่นคืออาจใช้คาร์บอนจากแหล่งอื่นที่ช่วยลดต้นทุน เช่น กรดไขมันระเหยได้หรือวีเอฟเอ (Volatile fatty acid; VFA) ที่พบมากในน้ำเสียจากชุมชนหรือน้ำเสียจากเกษตรกรรมสามารถนำมาเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับดีไนตริฟิเคชันโดยไม่ต้องมีค่าใช้จ่าย โดยเฉพาะน้ำที่เหลือจากการหมักขยะชุมชนแบบไร้อากาศมีวีเอฟเอสูงถึง 25,000 มิลลิกรัม/ลิตร (Sans et al. 1995) ซึ่งมีค่าเท่ากับใช้เมทานอล 35,000 มิลลิกรัม/ลิตร หรือคาร์บอนแหล่งอื่นที่มีค่าใช้จ่ายไม่สูงคือ กากน้ำตาล (Molasses) (Quan et al. 2005) อย่างไรก็ตามกากน้ำตาลประกอบไปด้วยน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ (Polysaccharide) เป็นองค์ประกอบหลัก จึงจำเป็นต้องย่อยโมเลกุลน้ำตาลเหล่านี้ให้เล็กลงเป็น ซูโครส กลูโคส หรือ ฟรุคโตส เพื่อให้แบคทีเรียดีไนตริฟิเคชันนำไปใช้ได้อย่างรวดเร็ว (Najafpour and Shan, 2003)

### 1.3 ประสิทธิภาพโดยรวมของระบบ

จากผลการดำเนินระบบเอสบีอาร์แบบสองขั้นตอนอย่างต่อเนื่องด้วยเวลากักน้ำ 1.75 วัน โดยมีค่าภาระบรรทุกแอมโมเนียไนโตรเจนเท่ากับ เป็น  $56.16 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$  และภาระบรรทุกไนโตรเจนไนโตรเจนเท่ากับ เป็น  $50 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (ตารางที่ 7) เมื่อระบบมีประสิทธิภาพในการบำบัดคือช่วงวันที่ 30 ถึง 90 ของการบำบัดพบว่า NSBR มีประสิทธิภาพการบำบัดแอมโมเนียร้อยละ 99.86 ส่วน DSBR มีประสิทธิภาพการบำบัดไนเตรทร้อยละ 99.31 เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาของนุกุล อินทระสังขา และคณะ (2547) ที่ดำเนินระบบด้วยค่าเวลากักน้ำ 7 วันและ 3 วันดังภาพที่ 12 พบว่าประสิทธิภาพการบำบัดแอมโมเนียลดลงเพียงเล็กน้อย จากเดิมร้อยละ 100 ที่ระยะกักน้ำ 7 วัน และ 3 วัน ในขณะที่ประสิทธิภาพการบำบัดไนเตรทเพิ่มขึ้นเล็กน้อย จากเดิมร้อยละ 97 ที่ระยะกักน้ำ 7 วัน และร้อยละ 98 ที่ระยะกักน้ำ 3.5 วัน



ภาพที่ 12 แสดงประสิทธิภาพของการบำบัดแอมโมเนียและไนเตรทของ NSBR และ DSBR ที่ดำเนินระบบด้วยค่าระยะเวลาที่ต่างกัน

ตารางที่ 7 ค่าอัตราภาระบรรทุกของแอมโมเนีย-ไนโตรเจนและไนเตรท-ไนโตรเจนที่เข้าสู่ถัง NSBR และ DSBR

เวลากักน้ำ	$\text{NH}_4^+\text{-N loading rate}$ ( $\text{mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-\text{-N loading rate}$ ( $\text{mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )	อ้างอิง
7	17	13	นุกุลและคณะ (2547)
3.5	33	26	นุกุลและคณะ (2547)
1.75	56	50	การศึกษานี้

สำหรับน้ำทิ้งที่มีความเค็มโดยเฉพาะคลอไรด์ไอออน (Cl) มักจะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของกระบวนการไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน โดยประสิทธิภาพของไนตริฟิเคชันจะลดลงหากความเข้มข้นของคลอไรด์สูงขึ้น Pansawad และ Anan (1999) รายงานว่าที่ความเค็มของ NaCl 30 กรัม/ลิตร จะยับยั้งไนตริฟิเคชันร้อยละ 55 นอกจากนี้จากการใช้ระบบแผ่นจานหมุนชีวภาพบำบัดแอมโมเนียด้วยกระบวนการ "OLAND" (Oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification) พบว่าระบบต้องใช้เวลาจนถึง 178 วันในการปรับตัวหลังเพิ่มความเค็มของ NaCl ในน้ำทิ้งเป็น 30 กรัม/ลิตร โดยอัตราไนตริฟิเคชันลดลงร้อยละ 43 (Windey, De Bo and Verstraete. 2005) ส่วนประสิทธิภาพดีไนตริฟิเคชันลดลงจากความเข้มข้นของคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามการบำบัดไนโตรเจนทางชีวภาพด้วยกระบวนการดีไนตริฟิเคชันสามารถเกิดได้ในน้ำที่มีคลอไรด์สูงถึง 96.7 กรัม/ลิตรได้ (Ucisik and Henze. 2004) สำหรับระบบเอสปีอาร์แบบสองขั้นตอนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองบำบัดน้ำทิ้งที่มีความเค็มของ NaCl 25 กรัม/ลิตร มีการดำเนินระบบมานานทำให้ระบบสามารถปรับตัวอย่างได้รวดเร็วหลังจากการปรับเปลี่ยนค่าระยะกักน้ำและมีประสิทธิภาพในการบำบัดแอมโมเนียและไนเตรทคงที่

#### 1.4 อัตราการเกิดไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน

ได้ทำการหาอัตราการเกิดไนตริฟิเคชันจำเพาะ (Specific ammonification rate) ใน NSBR ที่ดำเนินระบบแบบต่อเนื่องได้โดยใช้สมการดังต่อไปนี้ (ดัดแปลงจาก Foglar and Briški. 2003)

$$\text{NH}_4^+ \text{-N load} = \frac{[\text{NH}_4^+ \text{-N}]_{\text{in}} \times R}{V} \quad (\text{mgNH}_4^+ \text{-N l}^{-1} \text{ h}^{-1}) \quad \text{สมการที่ 7}$$

$$\text{Volumetric nitrification rate} = \frac{\{[\text{NH}_4^+ \text{-N}]_{\text{in}} - [\text{NH}_4^+ \text{-N}]_{\text{eff}}\} \times R}{V} \quad (\text{mgNH}_4^+ \text{-N l}^{-1} \text{ h}^{-1}) \quad \text{สมการที่ 8}$$

$$\text{Specific nitrification rate} = \frac{\text{Volumetric nitrification rate}}{[X]} \quad (\text{mgNH}_4^+ \text{-N gVSS}^{-1} \text{ h}^{-1}) \quad \text{สมการที่ 9}$$

โดยที่

$[\text{NH}_4^+ \text{-N}]_{\text{in}}$  = ปริมาณแอมโมเนียในน้ำเข้า (mg/l)

$[\text{NH}_4^+ \text{-N}]_{\text{eff}}$  = ปริมาณแอมโมเนียในน้ำออก (mg/l)

X = ความเข้มข้นของมวลชีวภาพ (gVSS/l)

V = ปริมาตรถัง (l)

R = อัตราไหลของน้ำเข้า (l/h)

จากผลการดำเนินระบบเอสปีอาร์แบบสองขั้นตอนนี้ด้วยเวลากักน้ำเท่ากับ 1.75 วัน ในช่วงที่ระบบมีประสิทธิภาพการบำบัดคงที่ สามารถหาอัตราไนตริฟิเคชันจำเพาะของ NSBR ได้ ดังนี้ จากสมการที่ 7 สามารถหาค่าอัตราการระบรทุกแอมโมเนียมไนโตรเจน ( $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  loading rate) ได้เท่ากับ  $2.34 \text{ mgNH}_4^+ - \text{N l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  จากสมการที่ 8 หาค่า Volumetric nitrification rate ได้เท่ากับ  $2.29 \text{ mgNH}_4^+ - \text{N l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  และจากสมการที่ 9 หาค่าอัตราไนตริฟิเคชันจำเพาะได้เท่ากับ  $2.42 \text{ mgNH}_4^+ - \text{N gVSS}^{-1} \text{ h}^{-1}$  หรือเท่ากับ  $0.20 \text{ mgNH}_4^+ - \text{N mgMLVSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$

การหาอัตราดีไนตริฟิเคชันจำเพาะในระหว่างกระบวนการดีไนตริฟิเคชันของ DSBR ที่ดำเนินระบบแบบต่อเนื่องได้โดยใช้สมการจากงานวิจัยของ Foglar และ Briški (2003) ดังต่อไปนี้

$$\text{NO}_3^- - \text{N load} = \frac{[\text{NO}_3^- - \text{N}]_{\text{in}} \times R}{V} \quad (\text{mgNO}_3^- - \text{N l}^{-1} \text{ h}^{-1}) \quad \text{สมการที่ 10}$$

$$\text{Volumetric denitrification rate} = \frac{\{[\text{NO}_3^- - \text{N}]_{\text{in}} - [\text{NO}_3^- - \text{N}]_{\text{eff}}\} \times R}{V} \quad (\text{mgNO}_3^- - \text{N l}^{-1} \text{ h}^{-1}) \quad \text{สมการที่ 11}$$

$$\text{Specific denitrification rate} = \frac{\text{volumetric nitrification rate}}{[X]} \quad (\text{mgNO}_3^- - \text{N gVSS}^{-1} \text{ h}^{-1}) \quad \text{สมการที่ 12}$$

โดยที่

$[\text{NO}_3^- - \text{N}]_{\text{in}}$  = ปริมาณไนเตรทในน้ำเข้า (mg/l)

$[\text{NO}_3^- - \text{N}]_{\text{eff}}$  = ปริมาณไนเตรทในน้ำออก (mg/l)

$X$  = ความเข้มข้นของมวลชีวภาพ (gVSS/l)

$V$  = ปริมาตรถัง (l)

$R$  = อัตราไหลของน้ำเข้า (l/h)

จากผลการดำเนินระบบเอสปีอาร์แบบสองขั้นตอนนี้ด้วยค่าระยะเวลาการกักน้ำเท่ากับ 1.75 วัน ในช่วงที่ระบบมีประสิทธิภาพการบำบัดคงที่ สามารถหาค่าอัตราดีไนตริฟิเคชันจำเพาะ (Specific denitrification rate) ของ DSBR ได้ดังนี้ จากสมการที่ 10 สามารถหาค่าอัตราการระบรทุก ไนเตรทไนโตรเจน ( $\text{NO}_3^- - \text{N}$  loading rate) ได้เท่ากับ  $2.09 \text{ mgNO}_3^- - \text{N l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  จากสมการที่ 11 หาค่า Volumetric denitrification rate ได้เท่ากับ  $2.08 \text{ mgNO}_3^- - \text{N l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  และจากสมการที่ 12 หาค่าอัตราดีไนตริฟิเคชันจำเพาะได้เท่ากับ  $1.84 \text{ mgNO}_3^- - \text{N gVSS}^{-1} \text{ h}^{-1}$  หรือเท่ากับ  $0.15 \text{ mgNO}_3^- - \text{N mgMLVSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$  สามารถเปรียบเทียบดีไนตริฟิเคชันจำเพาะกับงานวิจัยอื่นซึ่งมีการใช้ เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนเหมือนกันดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบอัตราดีไนตริฟิเคชันจำเพาะโดยใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนกับงานวิจัยอื่น

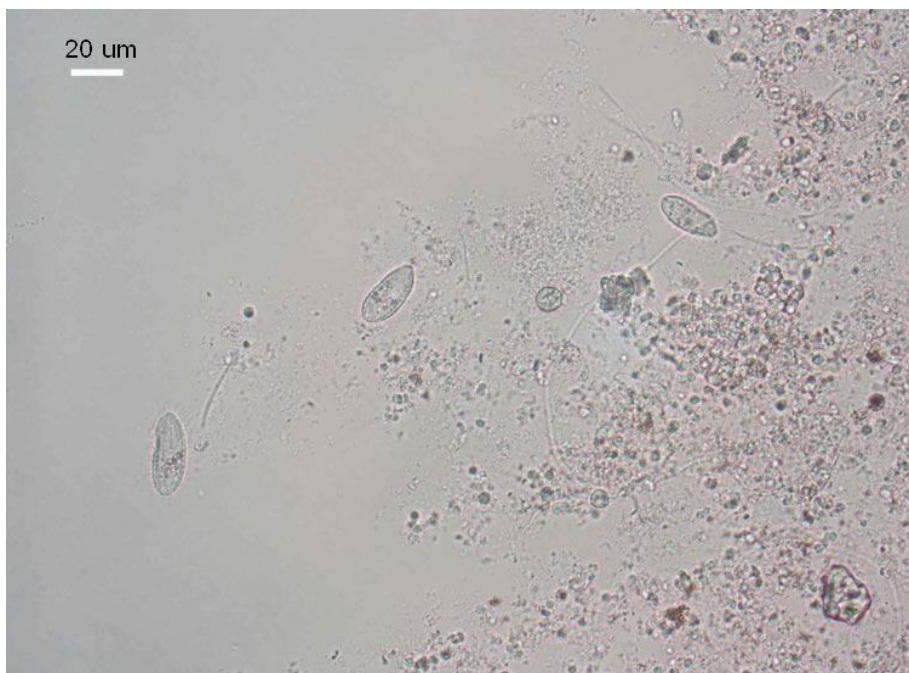
กระบวนการบำบัด	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อัตราดีไนตริฟิเคชันจำเพาะ ( $\text{mgNO}_3^- \text{-N mgMLVSS}^{-1} \text{d}^{-1}$ )	อ้างอิง
Continuous	-	0.03	Bailey et al. 1998
Continuous	12	0.06	Nyberg et al. 1992
Continuous	-	0.06	Kang et al. 1992
Continuous	30	0.14	Teichgrber and Stein. 1994
Batch	23±3	0.13	Bilanovic. 1999
Fed batch	22±2	0.16	Doyle et al. 2001
Batch	25	2.2	Christensson et al. 1994
Continuous	22±2	1.44	Ginige et al. 2004
Continuous	30±5	0.15	การศึกษาคั้งนี้

## 2. การศึกษาลักษณะทั่วไปของตะกอนจุลินทรีย์

### 2.1 ตะกอนจุลินทรีย์ของ NSBR

ผลการศึกษาลักษณะทั่วไปของตะกอนจุลินทรีย์ใน NSBR พบว่าตะกอนจุลินทรีย์มีเนื้อค่อนข้างละเอียด มีสีน้ำตาลอ่อนชุ่มละลายเป็นเนื้อเดียวกับน้ำในระบบ จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์พบจุลินทรีย์อาศัยอยู่หลายกลุ่ม รูปร่างแตกต่างกัน คือโปรโตซัวกลุ่มว่ายน้ำอิสระแบบที่เรียเส้นใย แบบที่เรียรูปกลม รูปท่อน ลักษณะตะกอนจุลินทรีย์ในช่วงที่ระบบยังไม่มีประสิทธิภาพในการบำบัดคั้งนั้น ตะกอนจุลินทรีย์จะจับกันเป็นกลุ่มก้อนหรือฟล็อกไม่หนาแน่นมาก พบโปรโตซัวกลุ่มว่ายน้ำอิสระที่มีซีเลีย (Free swimming ciliated protozoa) จำนวนมาก (ภาพที่ 13) แต่หลังจากที่ระบบเริ่มเข้าสู่สภาวะคงที่หรือมีประสิทธิภาพในการบำบัดแอมโมเนียแล้วพบว่าตะกอนมีการจับเป็นฟล็อกหนาแน่นขึ้น ภายในฟล็อกจะมองเห็นกลุ่มเซลล์จับกันเป็นก้อนๆ หรือคลัสเตอร์ (Cluster) กระจายอยู่ภายใน โดยอาจจะเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในกระบวนการไนตริฟิเคชัน ส่วนโปรโตซัวกลุ่มว่ายน้ำอิสระที่มีซีเลียซึ่งเคยพบจำนวนมากนั้นหายไป

และพบโปรโตซัวกลุ่มที่มีแฟลกเจลลา (Flagellated protozoa) เป็นกลุ่มเด่นขึ้นมาแทน ซึ่งการพบโปรโตซัวชนิดต่างๆ ในระบบบำบัดน้ำเสียนั้นสามารถนำมาใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันได้ (De A. Cybis and Horan. 1997) อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาชนิดของโปรโตซัวอย่างละเอียดเป็นเพียงการสังเกตเบื้องต้นเท่านั้น

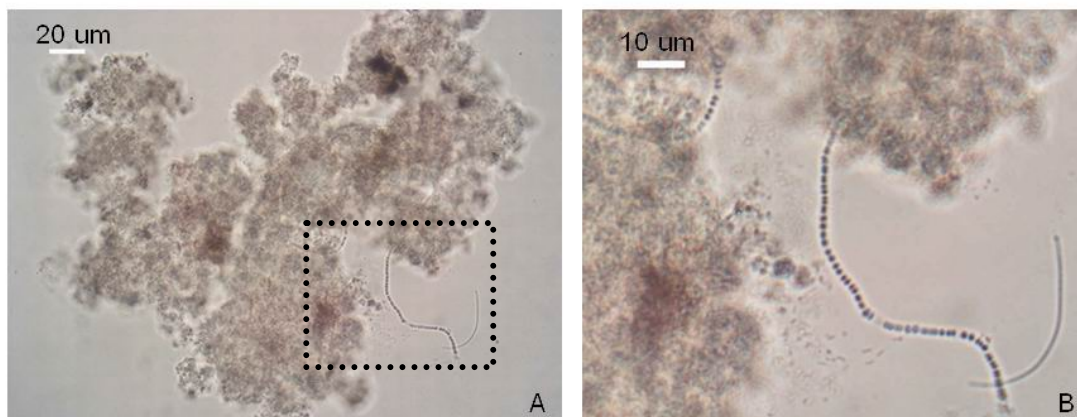


ภาพที่ 13 ภาพถ่ายลักษณะตะกอนจุลินทรีย์จาก NSBR ด้วยกล้องจุลทรรศน์ในช่วงที่ระบบยังไม่เข้าสู่ภาวะคงที่

## 2.2 ตะกอนจุลินทรีย์ของ DSBR

ผลการศึกษาพบว่าลักษณะตะกอนจุลินทรีย์ของ DSBR มีสีดำเข้มเกาะกันเป็นก้อน ก่อนระบบมีประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรทพบโปรโตซัวกลุ่มที่ว่ายน้ำอิสระเป็นจำนวนมาก และหลังจากระบบมีประสิทธิภาพในการบำบัดคงที่แล้วไม่พบโปรโตซัวกลุ่มดังกล่าว แต่ก็ไม่พบว่า มีโปรโตซัวกลุ่มใดเด่นขึ้นมาแทนที่ นอกจากนี้ก่อนระบบมีประสิทธิภาพในการบำบัดลักษณะฟล็อกเกาะเป็นเป็นก้อนใหญ่และหนาแน่น แต่หลังจากระบบเริ่มมีประสิทธิภาพในการบำบัดลักษณะตะกอนมีการจับกันไม่แน่น และพบว่า มีแบคทีเรียเส้นใยหลายชนิดอาศัยภายในฟล็อก ดังภาพที่ 14





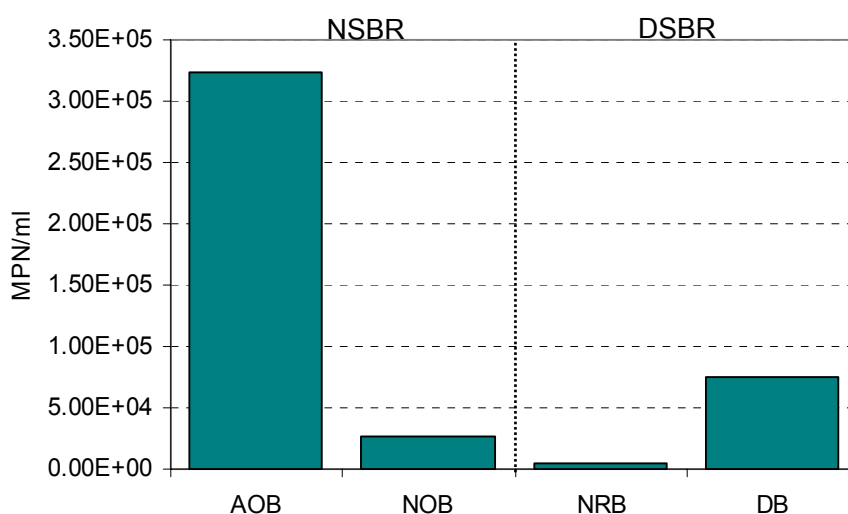
ภาพที่ 14 ภาพถ่ายลักษณะตะกอนจุลินทรีย์ใน DSRB ด้วยกล้องจุลทรรศน์ในช่วงที่ระบบเข้าสู่สภาวะคงที่ (A) และลักษณะเซลล์แบคทีเรียเส้นใยที่พบ (B) โดยขยายจากภาพ A (ในพื้นที่เส้นประ)

### 3. การศึกษาจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค MPN

ผลการตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันด้วยวิธีการทางเคมีพบว่าเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันเกือบสมบูรณ์ทั้งใน NSBR และ DSRB เพื่อหาจำนวนกลุ่มแบคทีเรียไนตริไฟอิงและแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงจึงเก็บตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ทั้งจาก NSBR และ DSRB มาตรวจสอบจำนวนด้วยเทคนิค MPN โดยเก็บตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์จากช่วงที่ระบบมีประสิทธิภาพในการบำบัดคั่งคือวันที่ 70 ของการดำเนินระบบ แล้วนับจำนวนแบคทีเรียไนตริไฟอิงคือ AOB และ NOB และนับจำนวนแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงคือ NRB และ DB ผลการศึกษาพบว่ามี AOB เท่ากับ  $3.2 \times 10^5$  MPN/ml พบ NOB เท่ากับ  $2.6 \times 10^4$  MPN/ml ส่วนการนับจำนวนแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงในถัง DSRB พบ NRB เท่ากับ  $5.3 \times 10^3$  MPN/ml และ DB พบเท่ากับ  $7.4 \times 10^4$  MPN/ml

จากภาพที่ 15 ยืนยันได้ว่ามีเชื้อแบคทีเรียไนตริไฟอิงและดีไนตริไฟอิงอยู่ในระบบจริงสอดคล้องกับผลการตรวจวัดทางเคมี แต่จำนวน NOB ที่ได้จากการนับจำนวนด้วยเทคนิค MPN มีน้อยกว่า AOB หลายเท่าตัว สาเหตุเนื่องจากปกติแล้ว NOB มีอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่า AOB และสาเหตุที่สำคัญขึ้นอยู่กับการใช้เทคนิคที่ใช้ในการนับจำนวนด้วย โดยเทคนิคที่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างเทคนิค MPN มีข้อจำกัดด้านเวลาที่ต้องใช้ในการบ่มเชื้อนานเกินไป และการนับจำนวนแบคทีเรียที่ไม่แม่นยำ โดยเฉพาะแบคทีเรียไนตริไฟอิงนั้นเซลล์มักจะมีการเกาะเป็นกลุ่มก้อน จึงยากที่จะกระจายเซลล์ให้ดีก่อนทำการนับจำนวน ทำให้จำนวนแบคทีเรียที่ได้อาจจะไม่ตรง

กับความเป็นจริง เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวเทคนิคเบื้องต้นที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ คือการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonication) ก่อนนำตัวอย่างไปนับจำนวนแบคทีเรีย เพื่อกระจายเซลล์ที่จับกันเป็นก้อนให้หลุดออกจากกัน แต่เพื่อให้ได้ผลการศึกษาที่แม่นยำกว่า ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้เทคนิคที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อคือเทคนิค FISH และเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA เข้ามาตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม



ภาพที่ 15 จำนวนแบคทีเรียไนโตรไฟอิงและดีไนโตรไฟอิงใน NSBR และ DSBR ที่นับด้วยเทคนิค MPNแบบไมโครเทคนิคในวันที่ 70 ของการดำเนินระบบ

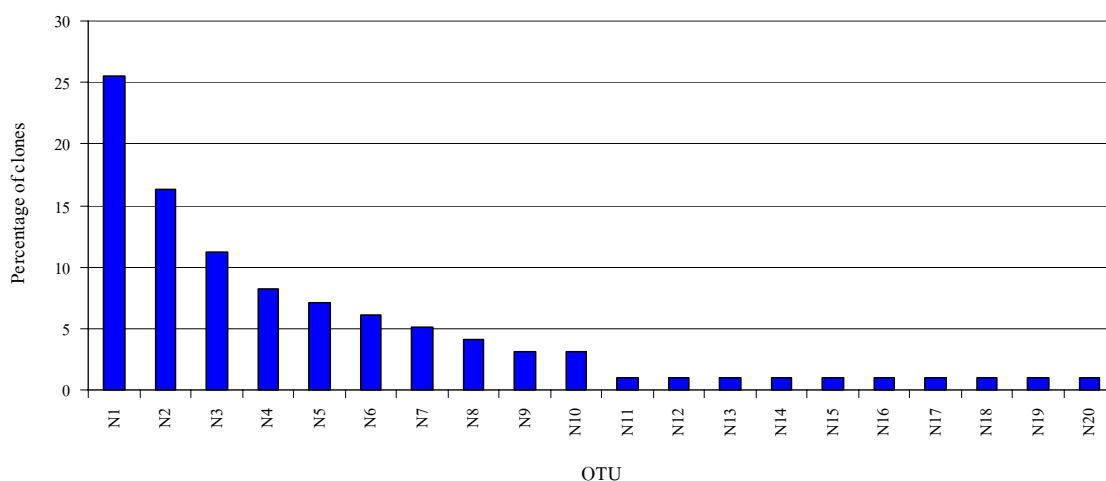
#### 4. การศึกษาโครงสร้างแบคทีเรียด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library

ผลการเก็บตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ระบบเอสปีอาร์แบบสองชั้นตอนในช่วงที่ระบบมีประสิทธิภาพการบำบัดทั้งแอมโมเนียและไนเตรทคงที่คือวันที่ 70 ของการบำบัด นำมาศึกษาโครงสร้างประชากรแบคทีเรียด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library ได้ผลดังนี้

##### 4.1 Clone library ของ NSBR

ผลการศึกษาโครงสร้างประชากรแบคทีเรียด้วยเทคนิค Clone library ของตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ NSBR พบว่าได้รับ Clone ทั้งหมด 98 Clone (ตารางที่ 9) จากการจัดกลุ่ม Clone ทั้งหมดโดยอาศัยเทคนิค REA ซึ่งเป็นการตัดชิ้นยีน 16S rRNA ด้วยเอนไซม์เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinP1I* และ *Msp1* แล้วแยกชิ้นยีนที่ถูกตัดด้วยเทคนิค Gel electrophoresis จะเห็นเป็นรูปแบบหรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันตามชนิดของแบคทีเรีย ทำให้สามารถจัดกลุ่ม Clone ที่

มีรูปแบบดีเอ็นเอที่เหมือนกันโดยจัดเป็น OTU (Operational taxonomic unit) เดียวกัน โดยตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ NSBR จัดกลุ่มได้เป็น 20 OTU (ภาพที่ 16) โดยพบ OTU N1 เป็นกลุ่มเด่นคิดเป็นร้อยละ 25.5 ของจำนวน Clone ทั้งหมด รองลงมาเป็น OTU N2 พบร้อยละ 16.3, OTU N3 พบร้อยละ 11.2, OTU N4 พบร้อยละ 8.16, OTU N5 พบร้อยละ 7.14, OTU N6 พบร้อยละ 6.12, OTU N7 พบร้อยละ 5.1, OTU N8 พบร้อยละ 4.08, OTU N9 และ N10 พบร้อยละ 3.06 ส่วนที่เหลือคือตั้งแต่ OTU N11 ถึง OTU N20 พบว่ามีรูปแบบของ REA ที่แตกต่างกันไม่สามารถจัดกลุ่มได้ และพบเพียง OTU ละ 1 Clone เท่านั้น



ภาพที่ 16 จำนวน OTU ใน NSBR clone library ที่ได้ทั้งหมดหลังแบ่งกลุ่มด้วยเทคนิค REA

หลังจากเลือกตัวแทนของแต่ละ OTU ไปหาลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rRNA แล้วนำไปทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสาธารณะโดยใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA เพียงบางส่วนด้วยโปรแกรม Basic local alignment search tool ผลการ BLAST พบว่า OTU N1 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียแท้จริงที่จำแนกชนิดไม่ได้ (Unidentified Eubacterium) รวมทั้ง OTU อื่นๆ ก็พบว่าเป็นแบคทีเรียแท้จริงที่จำแนกชนิดไม่ได้เช่นกัน โดยรวมแล้วพบแบคทีเรียแท้จริงที่จำแนกชนิดไม่ได้เป็นกลุ่มเด่นใน NSBR มากถึงร้อยละ 38.77 ส่วนแบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* พบเพียง *Alphaproteobacteria* และ *Gammaproteobacteria* เท่านั้น โดยพบร้อยละ 26.53 และร้อยละ 11.22 ตามลำดับ (ตารางที่ 9) สำหรับแบคทีเรียในไฟลัม *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteriodes* (CFB) พบเพียงร้อยละ 3.06 เท่านั้น อย่างไรก็ตามไม่มีรายงานว่ามีแบคทีเรียในกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียไนโตรไฟอิงทั้งในกลุ่ม AOB และ NOB

สำหรับแบคทีเรียกลุ่ม AOB พบว่า Clone CN2, CN98, CN99 และ CN 107 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ใกล้เคียงกับ *Nitrosococcus oceani* (ร้อยละ 96 จากผลการ BLAST) โดยคิดเป็นร้อยละ 4 ของจำนวน Clone ทั้งหมด และไม่พบว่ามี Clone ใดใน NSBR นี้มีลำดับใกล้เคียงกับ NOB ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลเลย ทั้งที่จากการตรวจสอบทางเคมีและนับจำนวนด้วย MPN ก็พบว่ามีการตรึงไนโตรเจนเกิดขึ้น จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่าการศึกษารังนี้ อาจพบเชื้อแบคทีเรียกลุ่มใหม่อีกเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะแบคทีเรียแท้จริงที่จำแนกชนิดไม่ได้ ซึ่งจำเป็นต้องศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมในอนาคต

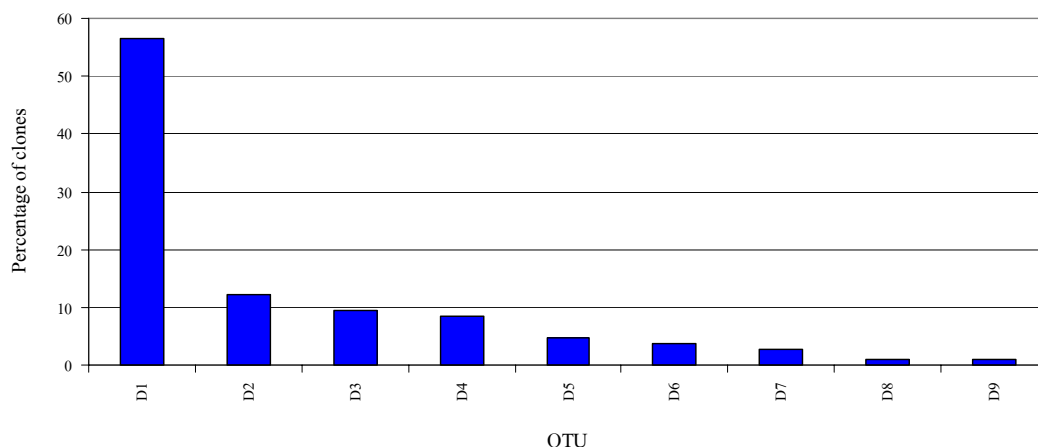
ตารางที่ 9 ผลการ BLAST กลุ่มแบคทีเรียที่พบใน NSBR clone library

Phylogenetic group	Relative abundance (%)
Unidentified Eubacterium	38.7
<i>Alphaproteobacteria</i>	26.5
<i>Gammaproteobacteria</i>	11.2
<i>Actinobacteria</i>	10.2
Deinococcus-Thermus	7.1
<i>Denitromonas</i>	3.0
CFB Phylum	3.0

#### 4.2 Clone library ของ DSBR

ผลการศึกษาโครงสร้างประชากรในตะกอนจุลินทรีย์ของ DSBR ด้วยเทคนิค Clone library พบว่าได้รับจำนวน Clone ทั้งหมด 106 Clone สามารถจัดกลุ่ม Clone ด้วยเทคนิค REA ได้เป็น 9 OTU (ภาพที่ 17) โดยพบ OTU D1 เป็นกลุ่มเด่นซึ่งพบมากถึงร้อยละ 56.6 ของจำนวน Clone ทั้งหมด ผลจากการ BLAST พบว่า OTU D1 มีความใกล้เคียงกับ *Methylophaga marina* (ร้อยละ 97) ซึ่งเป็นสมาชิกของคลาส *Gammaproteobacteria* ไฟลัม *Proteobacteria* (Janvier and Grimont. 1995) นอกจากนี้ยังพบว่า OTU D3 มีความใกล้เคียงกับ *Methylophaga thalassica* (ร้อยละ 98) โดยพบร้อยละ 9.4 ของจำนวน Clone ทั้งหมด ดังนั้นโดยรวมแล้วใน DSBR พบแบคทีเรียในคลาส *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มเด่นร้อยละ 66.98 ของจำนวน Clone ทั้งหมด ส่วนแบคทีเรียในคลาส *Alphaproteobacteria* พบเพียงเล็กน้อยไม่ถึงร้อยละ 1

และคลาส *Betaproteobacteria* ไม่พบเลย นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียแท้จริงที่ยังจำแนกไม่ได้ถึงร้อยละ 20.7 (ตารางที่ 10)



ภาพที่ 17 จำนวน OTU ใน DSBF clone library ที่ได้ทั้งหมดหลังแบ่งกลุ่มด้วยเทคนิค REA

ตารางที่ 10 แสดงผลการ BLAST กลุ่มแบคทีเรียที่พบใน DSBF clone library

Phylogenetic group	Relative abundance (%)
<i>Gammaproteobacteria</i>	66.9
Unidentified Eubacterium	20.7
CFB Phylum	11.3
<i>Alphaproteobacteria</i>	0.9

ทั้งนี้คาดว่าแบคทีเรียในจีนัส *Methylophaga* อาจจะมีบทบาทในกระบวนการดีไนตริฟิเคชันในน้ำทิ้งที่มีความเค็มโดยใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งพบว่าบางสปีชีส์ของจีนัสนี้คือ *Methylophaga alcalica* สามารถที่จะรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ (Doronina et al. 2003) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อกลุ่มนี้ในด้านการเป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มดีไนตริฟิอิง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องแยกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อนำมาศึกษารายละเอียดทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียในจีนัส *Methylophaga* ต่อไป

สำหรับแบคทีเรียในจีโนม *Methylophaga* จัดว่าเป็นแบคทีเรียที่อาศัยพลังงานจากสารคาร์บอนในหมู่เมทิล (Methylotrophic bacteria) กลุ่มที่มีวิถี RuMP (RuMP pathway) ในการย่อยสลายคาร์บอน 1 อะตอม เรียกว่าแบคทีเรียเมทิลโลโทรบ RuMP (RuMP-pathway methylotrophic bacteria) โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้มีหลายจีโนม เช่น *Methylobacillus*, *Methylovorus* และ *Methylophaga* เป็นต้น (Hanson and Hanson. 1996) แต่จีโนม *Methylophaga* นั้นแตกต่างจากแบคทีเรียเมทิลโลโทรบ RuMP จีโนมอื่นอย่างชัดเจน โดยแบคทีเรียในจีโนม *Methylophaga* ต้องการ  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  และ วิตามิน  $\text{B}_{12}$  ในการเจริญเติบโต มีความทนทานต่อความเค็มสูง มีปริมาณเบส G และ C ในดีเอ็นเอต่ำ (ประมาณ 38-49 mol%) (Janvier et al. 1985)

การศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดีไนตริฟิเคชันในน้ำที่มีความเค็มมีน้อยมาก (Labbe et al. 2003 ; Yoshie et al. 2001 ; Yoshie et al. 2004) ส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาด้วยเทคนิคอื่นในด้านการตรวจสอบยีนที่แสดงออก เช่น การใช้เทคนิค PCR โดยมีการออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน เช่น ยีน *nirK* (Braker et al., 1998) และยีน *nirS* (Hallin et al., 1999) เป็นต้น โดยจากการศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดีไนตริฟิเคชันในน้ำทั้งที่มีความเค็มโดยอาศัยเทคนิคด้าน 16S rRNA พบแบคทีเรียในคลาส *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มเด่นสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้

ตารางที่ 11 โครงสร้างของประชากรแบคทีเรียใน Clone library ของตัวอย่าง NSBR และ DSBR

Phylogenetic Affiliation	Related species	Accession no.	Similarity (%)	Clones from (number)	
				NSBR	DSBR
<i>Alpha proteobacteria</i>	Uncultured clone HPDOMI2C10	AY851902	96	25	0
	Uncultured clone 131637	AY922203	97	1	0
	Endosymbiont of <i>Acanthamoeba</i> sp. UWC9	AF132137	97	0	1

## ตารางที่ 11 (ต่อ)

Unidentified	Uncultured clone AKAU3728	DQ125662	83	16	0
	Uncultured clone nsmplVI08	AB213564	97	11	0
	Uncultured clone HP1B89	AF502234	96	5	0
	Uncultured clone KD4- 19	AY218629	92	1	0
	Uncultured clone ELB25-087	DQ015772	97	1	0
	Uncultured clone KD6- 102	AY218746	94	1	0
	Uncultured clone ELB16-189	DQ015797	94	1	0
	Uncultured clone 4RHU22	AJ863332	96	1	0
	Unidentified	AJ786810	96	1	0
	Uncultured clone SSE5	AY228697	95	0	13
	Uncultured clone nsmplVI14	AB212891	97	0	9
<i>Actinobacteria</i>	Actinobacterium PB90-5	AJ229241	98	8	0
	Subtercola frigoramans	AF224723	96	1	0
	Uncultured <i>Actinobacteria</i> sp. clone AKYH1051	AY922090	97	1	0
Deinococcus- Thermus	Uncultured Deinococci bacterium	DQ028374	93	7	0

ตารางที่ 11 (ต่อ)

<i>Gamma proteobacteria</i>	<i>Methylophaga marina</i>	X95459	97	6	60
	<i>Nitrosococcus oceani</i>	CP000127	96	4	0
	Xanthomonas like sp. V4.BO.41	AJ244722	95	1	0
	<i>Methylophaga thalassica</i>	X95460	98	0	10
	Bacterium PV-4	AF387348	97	0	1
<i>Denitromonas</i>	<i>Denitromonas indolicum</i>	AY972852	98	3	0
CFB Phylum	<i>Cryomopha ignava</i>	AF170738	91	3	0
	<i>Vitellibacter viladivostokensis</i>	AB071382	97	0	5
	Uncultured clone Nubeena269	AY500034	93	0	4
	Uncultured clone ccslm285	AY133094	95	0	3
Total				98	106

## 5. การศึกษาจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค FISH

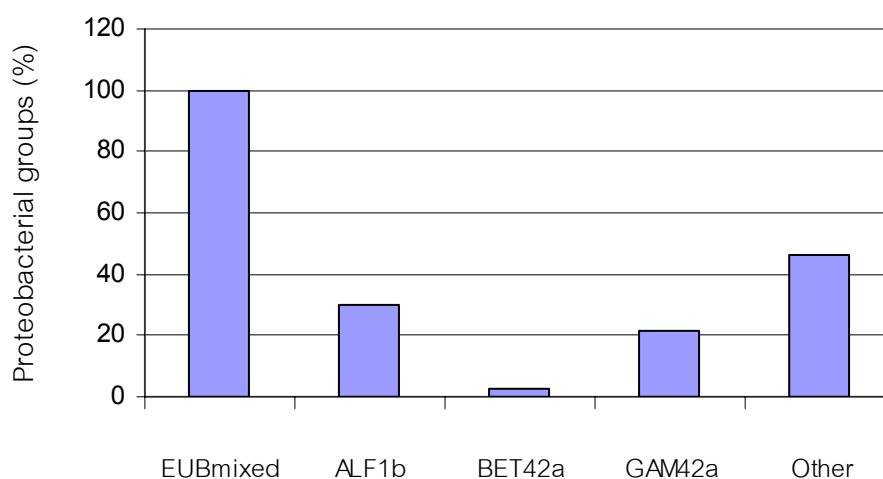
เก็บตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ในช่วงเดียวกับที่นำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค Clone library เพื่อนำมาตรวจสอบกลุ่มจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ดีเอ็นเอโพรบที่ได้จากงานวิจัยอื่นคือ ดีเอ็นเอโพรบ GAM42a, BET42a และ ALF1b ตลอดจนดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะกับกลุ่มแบคทีเรียไนตริไฟอิงและดีไนตริไฟอิงที่ได้จากงานวิจัยอื่น โดยการนับจำนวนของทุกดีเอ็นเอโพรบนั้นจะเปรียบเทียบกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดซึ่งใช้โพรบ EUBmixed จะทำให้ได้จำนวนแบคทีเรียเฉพาะกลุ่มเทียบเป็นสัดส่วนต่อแบคทีเรียทั้งหมด

### 5.1 การตรวจสอบตะกอนจุลินทรีย์ใน NSBR ด้วยเทคนิค FISH

ผลการตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียใน NSBR ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ดีเอ็นเอโพรบ GAM42a, BET42a และ ALF1b เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* โดยนับจำนวนกลุ่มแบคทีเรียด้วยดีเอ็นเอโพรบดังกล่าวเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอโพรบ EUBmixed ซึ่งเป็น



ดีเอ็นเอโพรบสำหรับแบคทีเรียทั้งหมด พบว่าแบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* มีกลุ่มแบคทีเรียในคลาส *Alphaproteobacteria* เป็นกลุ่มเด่นร้อยละ 29.7 ของแบคทีเรียทั้งหมด รองลงมาคือคลาส *Gammaproteobacteria* ร้อยละ 21.5 ของแบคทีเรียทั้งหมด และคลาส *Betaproteobacteria* พบน้อยมากเพียงร้อยละ 2.4 ของแบคทีเรียทั้งหมดเท่านั้น ส่วนที่เหลือเป็นแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 สัดส่วนเป็นร้อยละของแบคทีเรียไฟลัม *Proteobacteria* เมื่อเทียบกับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH ใน NSBR

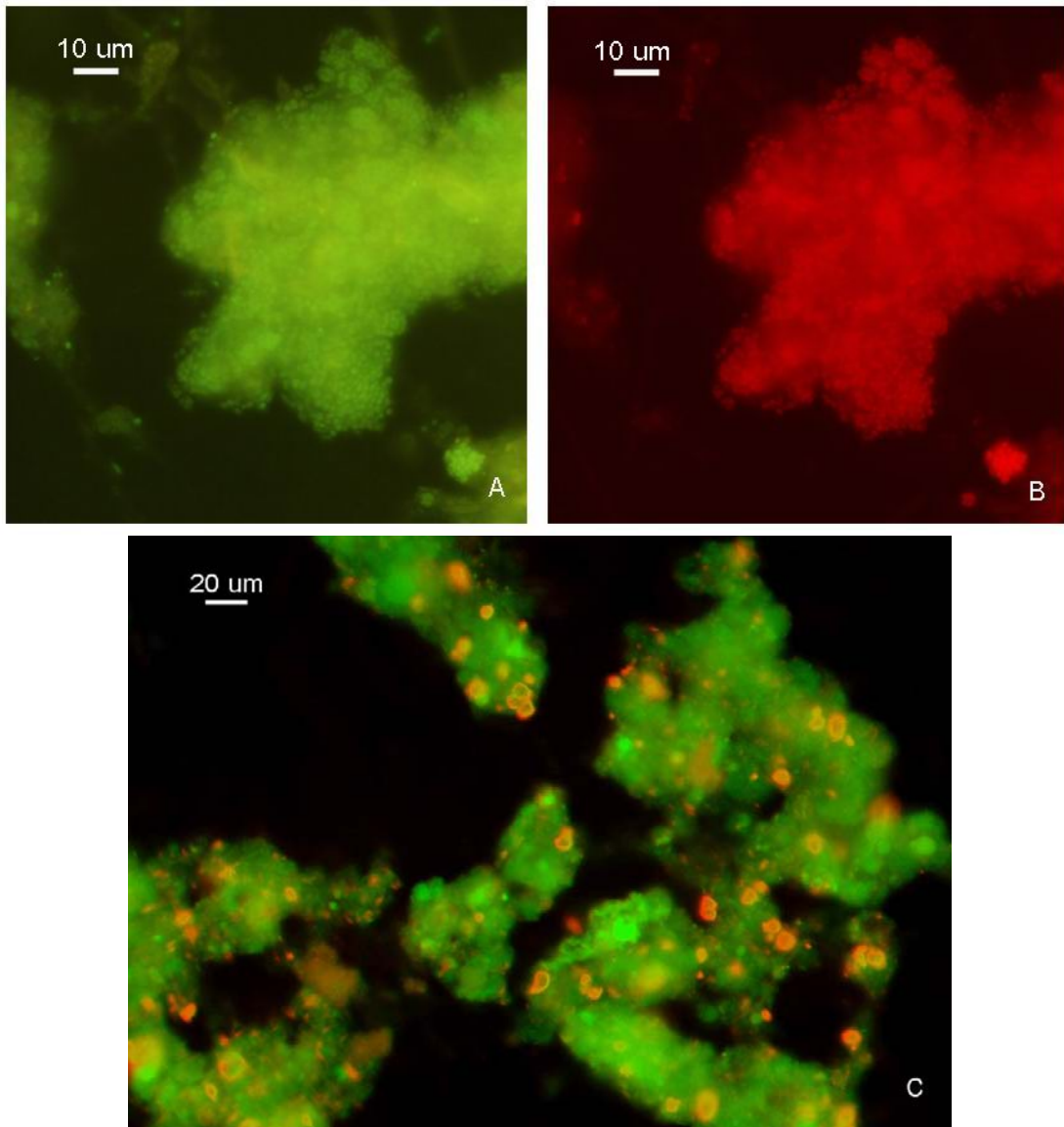
ผลการตรวจสอบตัวอย่าง NSBR ด้วยเทคนิค FISH เพื่อตรวจแบคทีเรียไนตริไฟอิง โดยใช้ดีเอ็นเอโพรบสำหรับไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่ได้จากงานวิจัยอื่นๆ ดังนี้คือ กลุ่ม AOB ใช้ดีเอ็นเอโพรบ NEU, NSO190 และ NSO1225 ส่วนกลุ่ม NOB ใช้ดีเอ็นเอโพรบ NIT3 และ NTSPA714 พบว่าตรวจไม่แบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ด้วยดีเอ็นเอโพรบที่มีอยู่เลย การตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอโพรบ NEU, NSO190 และ NSO1225 ไม่พบสอดคล้องกับผลการตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอโพรบ BET42a เนื่องจากทั้งดีเอ็นเอโพรบ NEU, NSO190 และ NSO1225 ต่างเป็นดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะกับ AOB ที่อยู่ในคลาส *Betaproteobacteria* ซึ่งก็ตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอโพรบ BET42a พบแบคทีเรียในกลุ่มนี้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 แสดงผลการตรวจสอบแบคทีเรียไนโตรไฟอิงด้วยเทคนิค FISH ใน NSBR

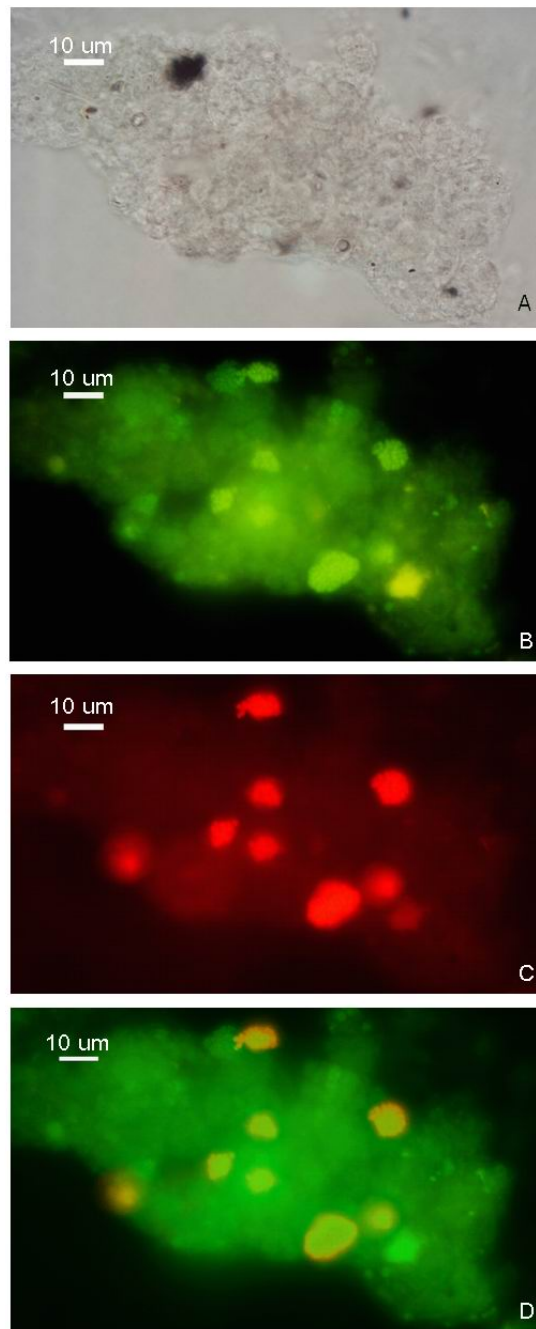
Bacterial groups	Probes	Specificity	Result
AOB	NEU	Most halophilic and halotolerant <i>Nitrosomonas</i> spp.	-
	NSO190	Betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria	-
	NSO1225	Betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria	-
NOB	NIT3	<i>Nitrobacter</i> spp.	-
	NTSPA714	Phylum <i>Nitrospira</i> , not <i>Thermodesulfovibrio islandicus</i>	-
DB	Hlm747	Several members of <i>Halomonas</i> sp.	+

จากการตรวจสอบตะกอนจุลินทรีย์ใน NSBR ด้วยโดยเทคนิค FISH โดยใช้ดีเอ็นเอ โพรบ Hlm747 ซึ่งมีความจำเพาะกับแบคทีเรียในจีนัส *Halomonas* พบว่าตรวจพบเชื้อมีชื่อว่าใน ตะกอนจุลินทรีย์ของ NSBR ซึ่งมีออกซิเจนละลายอยู่ในช่วง 5.7-6.9 มิลลิกรัม/ลิตร ทั้งที่เชื้อ *Halomonas* เป็นเชื้อในกลุ่มที่พบในสภาวะไร้ออกซิเจนอิสระที่มีบทบาทในกระบวนการดีไนโตรฟิเคชันโดยเฉพาะในสภาพที่มีความเค็ม โดยมีรายงานว่า *Halomonas* sp. สามารถรื้อชีวิตในเตรทไนท์ที่มีความเค็ม (NaCl) สูงถึงร้อยละ 12.5 (Peyton et al. 2001) และยังมีรายงานว่าพบเชื้อในจีนัส *Halomonas* เป็นกลุ่มเด่นและน่าจะมีส่วนร่วมในกระบวนการดีไนโตรฟิเคชันในถังไร้ออกซิเจนอิสระของระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีความเค็มร้อยละ 1.5-3.5 (Yoshie et al. 2004)

โดยลักษณะเซลล์ที่ติดโพรบ Hlm747 พบว่าเซลล์เป็นรูปท่อน เกาะเป็นก้อนหรือเป็นคลัสเตอร์กระจายอยู่ภายในฟล็อก (ภาพที่ 20) จึงน่าจะเป็นสาเหตุที่เชื้อกลุ่มนี้สามารถอาศัยอยู่ในถังเติมอากาศได้ เพราะภายในฟล็อกยิ่งลึกเข้าไปด้านในจะเป็นบริเวณที่ขาดหรือมีปริมาณออกซิเจนจำกัด (Bitton. 1994) ทั้งนี้เชื้อ *Halomonas* อาจจะมีบทบาทในการรื้อชีวิตในเตรทบางส่วนใน NSBR ให้เป็นก๊าซไนโตรเจนด้วย สำหรับ *Halomonas* sp. มีรายงานว่าแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดีไนโตรฟิเคชันที่เกิดขึ้นในน้ำเค็มซึ่งมีการเติมอะซีเตทเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะไร้ออกซิเจนอิสระ แต่การศึกษานี้กลับพบเชื้อ *Halomonas* ในถังเติมอากาศซึ่งมีออกซิเจนละลายอยู่ประมาณ 5.7-6.9 มิลลิกรัม/ลิตร สาเหตุที่เชื้อกลุ่มนี้อาศัยอยู่ในถังเติมอากาศได้อาจเนื่องจากเชื้อกลุ่มนี้มีการเกาะเป็นคลัสเตอร์แล้วอยู่ด้านในของฟล็อก (ภาพ 20D) ซึ่งภายในฟล็อกเป็นบริเวณที่มีออกซิเจนละลายจำกัดตามความลึกของฟล็อก



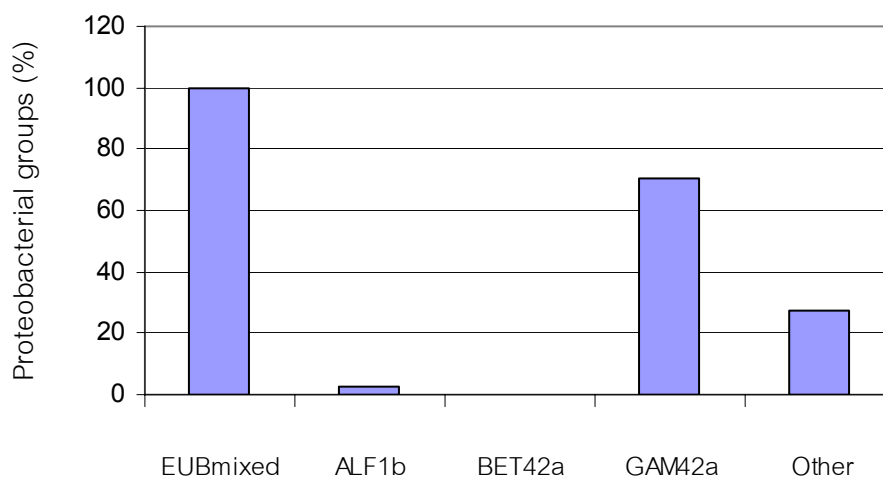
ภาพที่ 19 ภาพถ่ายเซลล์แบคทีเรียจากตัวอย่าง NSBR จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ดีเอ็นเอโพรบ ALF1b, GAM42a และ EUBmixed ภาพ A ใช้ดีเอ็นเอโพรบ EUBmixed ซึ่งจำเพาะกับโดเมนแบคทีเรียมองเห็นเซลล์ที่ติดดีเอ็นเอโพรบเป็นสีเขียวจาก Fluorescein ภาพ B ใช้ดีเอ็นเอโพรบ ALF1b มองเห็นเซลล์ที่ติดดีเอ็นเอโพรบเป็นสีแดงจาก Indocarbocyanine (Cy3) และภาพ C เซลล์ที่ติดสีเขียวเกิดจากการติดดีเอ็นเอโพรบ EUBmixed ส่วนเซลล์ที่ติดสีเหลืองเกิดจากการซ้อนภาพเซลล์ที่ติดดีเอ็นเอโพรบ GAM42a (สีแดง) กับเซลล์ที่ติดดีเอ็นเอโพรบ EUBmixed (สีเขียว) ทำให้มองเห็นเซลล์ที่ติดดีเอ็นเอโพรบ GAM42a เป็นสีเหลืองส่วนแบคทีเรียชนิดอื่นจะเห็นเป็นสีเขียว



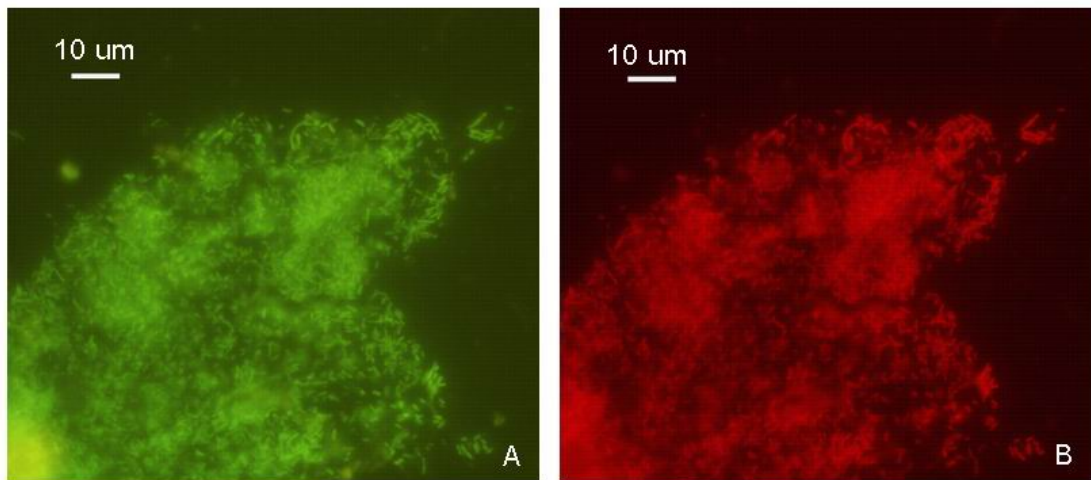
ภาพที่ 20 ภาพถ่ายตะกอนจุลินทรีย์จาก NSBR ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH ภาพ A เป็นภาพถ่ายแบบ Bright field ภาพ B เซลล์ติดดีเอ็นเอโพรบ EUBmixed มองเห็นเป็นสีเขียวจาก Fluorescein ภาพ C เซลล์ติดดีเอ็นเอโพรบ Hlm747 มองเห็นเป็นสีแดงจาก Cy3 และภาพ D เป็นภาพซ้อนกันระหว่าง B และ C ทำให้มองเห็นเซลล์ที่ติดดีเอ็นเอโพรบทั้งสองเป็นสีเหลือง ส่วนแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ซึ่งติดเฉพาะดีเอ็นเอโพรบ EUBmixed จึงมองเห็นเป็นสีเขียว

## 5.2 การตรวจสอบตะกอนจุลินทรีย์ใน DSBR ด้วยเทคนิค FISH

ผลการตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียใน DSBR ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ดีเอ็นเอโพรบ GAM42a, BET42a และ ALF1b เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* โดยนับจำนวนกลุ่มแบคทีเรียด้วยดีเอ็นเอโพรบดังกล่าวเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอโพรบ EUBmixed ซึ่งเป็นดีเอ็นเอโพรบจำเพาะกับแบคทีเรียทั้งหมด พบว่าแบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* มีกลุ่มแบคทีเรียคลาส *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มเด่นมากถึงร้อยละ 70.3 ของแบคทีเรียทั้งหมด ส่วนคลาส *Alphaproteobacteria* พบน้อยมากเพียงร้อยละ 2.5 คลาส *Betaproteobacteria* ไม่พบเลย และที่เหลือเป็นแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (ภาพที่ 21) โดยผลการนับจำนวนด้วยเทคนิค FISH พบแบคทีเรียในคลาส *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มเด่นสอดคล้องกับผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค Clone library เซลล์ที่ติดดีเอ็นเอโพรบ GAM42a ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นรูปท่อน และกระจายตัวโดยเกาะกันไม่แน่น (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 21 สัดส่วนเป็นร้อยละของแบคทีเรียไฟลัม *Proteobacteria* เมื่อเทียบกับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH ใน DSBR



ภาพที่ 22 ภาพถ่ายตะกอนจุลินทรีย์จากตัวอย่าง DSBR ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ ดีเอ็นเอโพรบ EUBmixed และ GAM42a ภาพ A เป็นจุลินทรีย์ที่ติดดีเอ็นเอโพรบ EUBmixed มองเห็นเซลล์เป็นสีเขียวจาก Fluorescein ภาพ B เป็นตะกอนจุลินทรีย์ที่ติดดีเอ็นเอโพรบ GAM42a มองเห็นเซลล์เป็นสีแดงจาก Cy3

## บทที่ 5

### สรุปผลและข้อเสนอแนะ

#### สรุปผล

จากการทดลองบำบัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนแบบสมบูรณ์ในน้ำทิ้งที่มีความเค็มด้วยระบบเอสปีอาร์แบบสองขั้นตอน โดยอาศัยกระบวนการไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันแยกสองถัง โดยการเพิ่มภาวะบรรทุทุกของทั้งแอมโมเนียม-ไนโตรเจนและไนเตรท-ไนโตรเจน (ลดเวลากักน้ำ) พบว่าทั้ง NSBR และ DSBR มีสมรรถนะในการบำบัดแอมโมเนียม-ไนโตรเจนและไนเตรท-ไนโตรเจนสูง จากการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียด้วยเทคนิค MPN แบบไมโครเทคนิค พบการปรากฏของแบคทีเรียไนตริไฟอิงใน NSBR และแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงใน DSBR ผลการศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียด้วยเทคนิค 16S rRNA Clone library พบว่าใน NSBR มีแบคทีเรียแท้จริงที่ยังจำแนกชนิดไม่ได้เป็นกลุ่มเด่น พบแบคทีเรียที่คาดว่าจะมีบทบาทเป็น AOB คือ *Nitrosococcus oceani* เพียงเล็กน้อย ไม่พบแบคทีเรีย NOB เท่าที่มีรายงานการค้นพบมาก่อน แม้ว่าจากผลการติดตามด้วยวิธีอื่น (การวิเคราะห์ทางเคมีและวิธี MPN) จะพบการปรากฏของ NOB คาดว่าการออกซิไดส์ไนโตรที่ให้เป็นไนเตรทอาจจะเกิดจากแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่ไม่เคยมีรายงานว่า เป็น NOB ส่วนใน DSBR พบแบคทีเรียคลาส *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มเด่น และแบคทีเรียที่พบเป็นส่วนใหญ่คือ *Methylophaga marina* รองลงมาคือ *Methylophaga thalassica* คาดว่าแบคทีเรียจิ้นัส *Methylophaga* น่าจะเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทในกระบวนการดีไนตริฟิเคชันในน้ำที่มีความเค็มโดยใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน

การศึกษาตะกอนจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ดีเอ็นเอโพรบที่ได้จากงานวิจัยอื่นไม่พบแบคทีเรียกลุ่ม AOB และ NOB ใน NSBR คาดว่าพบแบคทีเรียกลุ่มใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน สอดคล้องกับผลการศึกษาด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library ที่ส่วนใหญ่พบแบคทีเรียแท้จริงที่ยังไม่สามารถจำแนกได้ ทั้งนี้ใน NSBR ไนเตรทบางส่วนอาจถูกรีดิวซ์ในสภาพที่มีออกซิเจนอิสระเนื่องจากตรวจพบแบคทีเรียในจิ้นัส *Halomonas* ซึ่งอาศัยอยู่ในฟล็อก สำหรับ DSBR พบว่า *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มเด่นสอดคล้องกับผลการศึกษาด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library เนื่องจากยังไม่มีดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะกับกลุ่มแบคทีเรียที่พบทั้งใน NSBR และ DSBR จึงจำเป็นต้องมีการออกแบบดีเอ็นเอโพรบที่มีความจำเพาะ เพื่อให้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อกลุ่มนี้ได้ กลุ่มแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ทั้งแบคทีเรียไนตริไฟอิงและดีไนตริไฟอิงเป็นกลุ่มที่มีความจำเพาะ จำเป็นต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติทางชีวเคมีเพิ่มเติม ตลอดจนการนำกลุ่มเชื้อแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้ในสภาพแวดล้อมจริง

### ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ไปใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับนำไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อกลุ่มที่สนใจในการศึกษาขั้นต่อไป
2. ควรมีการตัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ใน DSBR เพื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีอย่างละเอียด ซึ่งจะช่วยให้ยืนยันได้ว่าเชื้อดังกล่าวมีคุณสมบัติในการรื้อชีวิตในเตรทหรือไนโตรที่ได้หรือไม่
3. ควรมีการนำกลุ่มเชื้อที่ได้ไปศึกษาต่อเพื่อพัฒนาเป็นหัวเชื้อสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในสภาพแวดล้อมจริง



**บรรณานุกรม**

## บรรณานุกรม

- กรมควบคุมมลพิษ. (2547). การบำบัดน้ำเสีย. สืบค้นเมื่อ 20 มกราคม 2549, จาก <http://pcdv1.pcd.go.th/WaterQuality/WasteWT/menu.htm>
- กวีศักดิ์ สมจิตร. (2545). การบำบัดไนเตรทในน้ำทิ้งที่มีความเค็มโดยใช้กระบวนการดีไนตริฟิเคชันในระบบบำบัดแบบ SBR. ปัญหาพิเศษทางชีววิทยา วิทยาศาสตร์บัณฑิต สงขลา : มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- ดอกรัก ชัยสาร. (2545). การศึกษาประสิทธิภาพของการบำบัดแอมโมเนียในน้ำทิ้งที่มีความเค็มโดยระบบ SBR และการศึกษาประชากรแบคทีเรียเบื้องต้นด้วยเทคนิค FISH. ปัญหาพิเศษทางชีววิทยา วิทยาศาสตร์บัณฑิต สงขลา : มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- ธงชัย พรธณสวัสดิ์. (2544). การกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทางชีวภาพ. กรุงเทพฯ : สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย.
- นิแอ นิสะ พิระศักดิ์ ศิริวัฒน์ สมพงศ์ โอทอง นพดล ศุภระกาญจน์ และ นุกุล อินทระสังขา. (2548). “การประยุกต์การวิเคราะห์ไนเตรทในน้ำเสียที่มีความเค็มโดยวิธี Copper-Cadmium Reduction Column และการใช้ชุดวิเคราะห์ไนโตรทสำเร็จรูปของ Merck Ltd.” วิศวกรรมสิ่งแวดล้อมไทย. 19 (1), 113-121.
- นุกุล อินทระสังขา. (2547). “เทคนิคการศึกษานิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ,” ใน การประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 3, (หน้า 1-10) 28-30 มกราคม 2547. ณ โรงแรมบีพีแกรนด์ทาวเวอร์ จังหวัดสงขลา.
- นุกุล อินทระสังขา นิแอ นิสะ พิระศักดิ์ ศิริวัฒน์ สุนันท์ พันภัย และ สมพงศ์ โอทอง. (2547). “การบำบัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนแบบสมบูรณ์ในน้ำทิ้งที่มีความเค็มโดยกระบวนการให้อากาศและไม่ให้อากาศด้วยระบบเอสบีอาร์แบบสองขั้นตอน,” ใน การประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 3, (หน้า 91-98). 28-30 มกราคม 2547 ณ โรงแรมบีพีแกรนด์ทาวเวอร์ จังหวัดสงขลา.
- ประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม พ.ศ. 2547. (2547, 1 พฤษภาคม). ราชกิจจานุเบกษา, เล่ม 121 ตอนพิเศษ 49 ง, หน้า 1-4.
- พิระศักดิ์ ศิริวัฒน์. (2546). การพัฒนากระบวนการบำบัดไนโตรเจนแบบสมบูรณ์ในน้ำทิ้งที่มีความเค็มจากการเพาะเลี้ยงกึ่งทะเลโดยใช้ระบบ Sequencing Batch Reactor (SBR). ปัญหาพิเศษทางชีววิทยา วิทยาศาสตร์บัณฑิต สงขลา : มหาวิทยาลัยทักษิณ.

- Alexander, M. and Clark, F. E. (1965). "Nitrifying bacteria," Methods of soil analysis, (pp. 1477-1483). Madison: Wis.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). "Basic local alignment search tool," Journal of Molecular Biology. 15, 403-410.
- Amann, R. (1995). "*In situ* identification of micro-organism by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic probe," Molecular Microbial Ecology Manual, Dordrecht : Kluwer Academic Publishers.
- Amann, R., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R. and Stahl, D. A. (1990). "Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations," Applied and Environmental Microbiology. 56, 1919-1925.
- Amann, R., Glöckner, F. O. and Neef, A. (1997). "Modern methods in subsurface microbiology: *in situ* identification of microorganisms with nucleic acid probes," FEMS Microbiology Reviews. 20, 191-200.
- Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K. H. (1995). "Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation," Microbiology Reviews. 59, 143-169.
- APHA. (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington, DC: American Public Health Association.
- Avnimelech, Y. and Ritvo, G. (2003). "Shrimp and fishpond soils: processes and management," Aquaculture. 220, 549-567.
- Bailey, W., Tesfaye, A., Dakita, J., McGrath, M., Daigger, G., Benjamin, A. and Sadick, T. (1998). "Large-scale nitrogen removal demonstration at the Blue plains wastewater treatment plant using post-denitrification with methanol," Water Science and Technology. 38(1), 79-86.
- Baumann, B., Snozzi, M., Zehnder, A. J. B., and van der Meer. J. R. (1996). "Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes," Journal of Bacteriology. 178, 4367-4374.

- Bergmann, D. J., Arciero, D. M. and Hooper, A. B. (1994). "Organization of the *hao* gene cluster of *Nitrosomonas europaea*: Genes for two tetraheme C cytochromes," Journal of Bacteriology. 176, 3148-3153.
- Bitton, G. (1994). Wastewater Microbiology. New York : Wiley-IEEE.
- Bilanovic, D., Battistoni, P., Cecchi, F., Pavan, P. and Mata-Alvarez, J. (1999). "Denitrification under high nitrate concentration and alternating anoxic conditions," Water Research. 33(15), 3311-3320.
- Bothe, H., Jost, G., Schloter, M., Ward, B. B. and Witzel, K. P. (2000). "Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments," FEMS Microbiology Reviews. 24(5), 673-90.
- Braker, G., Fesefeldt, A., and Witzel, K. P. (1998). "Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples," Applied and Environmental Microbiology 64, 3769-3775.
- Briggs, M. R. P. and Funge-Smith, S. J. (1994). "Nutrient budget of some intensive marine shrimp ponds in Thailand," Aquaculture and Fisheries Management. 25, 789-811.
- Burrell, P. C., Keller, J., and Blackall, L. L. (1998). "Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor," Applied and Environmental Microbiology. 64, 1878-1883.
- Campos, J. L., Mosquera-Corral, A., Sánchez, M., Méndez, R. and Lema, J. M. "Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit," Water Research. 36, 2555-2560.
- Cannavo, P., Richaume, A., Renault, P., Emblanch, C., Bertuzzi, P. and Lafolie, F. (2002). "Denitrification in the upper vadose zone layers: a comparison between a fluvic hypercalcaric cambisol and haplic calcisol," Agronomie. 22, 479-488.
- Catalan-Sakairi, M. A., Wang, P. C. and Matsumura, M. (1997). "High-rate seawater denitrification utilizing a macro-porous cellulose carrier," Journal of Fermentation Bioengineering. 83(1), 102-108.

- Chanyarat Paungfoo. (2003). Use of molecular biology techniques in studying the nitrifying bacteria community from shrimp farming system. Doctoral Dissertation, Prince of Songkla University, Thailand.
- Christensson, M., Lie, E. and Welander, T. (1994). "A comparison between ethanol and methanol as carbon sources for denitrification," Water Science and Technology. 30(6), 83-90.
- Cole, J. R., Chai, B., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., McGarrell, D. M., Garrity, G. M. and Tiedje, J. M. (2005). "The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis," Nucleic Acids Research. 33, 294-296.
- Coskuner, G. and Curtis, T. P. (2002). "*In situ* characterization of nitrifiers in an activated sludge plant: detection of *Nitrobacter* spp." Journal of Applied Microbiology. 93(3), 431-437.
- Dabert, P., Delgenes, J. P., Moletta, R. and Godon, J. J. (2002). "Contribution of molecular microbiology to study in water pollution removal of microbial community dynamics," Reviews in Environmental Science and Biotechnology. 1, 39-49.
- Daigger, G. T. and Littleton, H. X. (2000). "Characterization of Simultaneous Nutrient Removal in Staged, Closed-Loop Bioreactors," Water Environment Research. 72, 330-339.
- Daims, H. (2001). Population Structure and Functional Analyses, by In Situ Techniques, of Nitrifying Bacteria in Wastewater Treatment Plants. Doctoral dissertation, The Technical University of Munich, Germany.
- De A. Cybis, L. F. and Horan, N. J. (1997). "Protozoan and metazoan populations in sequencing batch reactors operated for nitrification and/or denitrification," Water Science and Technology. 35(1), 81-86.

- Doronina, N. V., Darmaeva, T. D and Trotsenko, Y. A. (2003). "*Methylophaga alcalica* sp. nov., a novel alkaliphilic and moderately halophilic, obligately methylotrophic bacterium from an East Mongolian saline soda lake," International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53, 223-229.
- Doyle, J., Watts, S., Solley, D. and Keller, J. (2001). "Exceptionally high-rate nitrification in sequencing batch reactors treating high ammonia landfill leachate," Water Science and Technology. 43(3), 315-322.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Glöckner, F. and Aman, R. (2000). "Culturability and *in situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea," Applied and Environmental Microbiology. 66, 3044-3051.
- EPA. (1993). Nitrogen control. United States Environmental Protection Agency.
- EPA. (1999). Sequencing batch reactors. United States Environmental Protection Agency, EPA 832-F-99-073.
- FAO. (2003). Year book of fisheries statistics summary table. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved January 20, 2006, from <http://www.fao.org/fi/statist/summtab/default.asp>.
- Ferguson, R. L., Buckley, E. N. and Palumbo, A.V. (1984). "Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement," Applied and Environmental Microbiology. 47, 49-55.
- Foglar, L. and Briški, F. (2003). "Wastewater denitrification process-the influence of methanol and kinetic analysis," Process Biochemistry. 39, 95-103.
- Freitag, T. E. and Prosser, J. I. (2003). "Community structure of ammonia-oxidizing bacteria within anoxic marine sediments," Applied and Environmental Microbiology. 69, 1359-1371.
- Funge-Smith, S. J., Briggs, M. R. P. (1998). "Nutrient budgets in intensive shrimp ponds: implications for sustainability," Aquaculture. 164, 117-133.

- Ginige, M. P., Hugenholtz, P., Daims, H., Wagner, M., Keller, J., Blackall, L. (2004). "Use of stable-isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescence *in situ* hybridization-microautoradiography to study a methanol-fed denitrifying microbial community," Applied and Environmental Microbiology. 70, 588-596.
- Hallin, S. and Lindgren, E. (1999). "PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria," Applied and Environmental Microbiology. 65, 1652-1657.
- Hanson, R. S. and Hanson, T. E. (1996). "Methanotrophic bacteria," Microbiological Reviews. 60(2), 439-471.
- Hellinga, C., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1997). "Model based design of a novel process for ammonia removal from concentrated flows," In Proceeding 2<sup>nd</sup> Mathmod Symposium, (pp. 865–870) February 5–7, Technical University of Vienna, Austria.
- Henze, M., Harremoës, P., la Cour Jansen, J. and Arvin, E. (1997). Wastewater treatment. Berlin : Springer-Verlag.
- Hibiya, K., Terada, A., Tsuneda, S. and Hirata, A. (2003). "Simultaneous nitrification and denitrification by controlling vertical and horizontal microenvironment in a membrane-aerated biofilm reactor," Journal of Biotechnology. 100(1), 23-32.
- Hooper, A. B., Vannelli, T., Bergmann, D. J. and Arciero, D. M. (1997). "Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria," Antonie Van Leeuwenhoek. 71, 59-67.
- Hovanec, T. A., and DeLong, E. F. (1996). "Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria," Applied and Environmental Microbiology. 62, 2888-2896.
- Hovanec, T. A., Taylor, L. T., Blakis, A. and DeLong, E. F. (1998). "*Nitrospira*-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria," Applied and Environmental Microbiology. 64, 258-264.
- Intrasungkha, N., Keller, J. and Blackall, L. L. (1999). "Biological nutrient removal efficiency in treatment of saline wastewater," Water Science and Technology. 39(6), 183-190.

- Islam, S. (2005). "Nitrogen and phosphorus budget in coastal and marine cage aquaculture and impacts of effluent loading on ecosystem: review and analysis towards model development," Marine Pollution Bulletin. 50(1), 48-61.
- Jackson, C., Peterson, N. P., Thompson, J. and Burford, M. (2003). "Nitrogen budget and effluent nitrogen components at an intensive shrimp farm," Aquaculture 218, 397–411.
- Janvier, M. and Grimont, P. A. D. (1995). "The genus *Methylophaga*, a new line of descent within phylogenetic branch  $\gamma$  of proteobacteria," Research in Microbiology, 146(7), 543-550.
- Janvier, M., Frehel, C., Grimont, F. and Gasser, F. (1985). "*Methylophaga marina* gen. nov., sp. nov. and *Methylophaga thalassica* sp. nov., marine methylotrophs," International Journal Systematic Bacteriology. 35(2), 131-139.
- Jetten, M. S. M., Horn, S. J. and van Loosdrecht, M. C. M. (1997). "Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system," Water Science and Technology. 35, 171–180.
- Jetten, M. S. M., Wagner, M., Fuerst, J., van Loosdrecht, M., Kuenen, G. and Strous, M. (2001). "Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process," Current Opinion in Biotechnology. 12, 283–288.
- Jetten, M. S. M., Schmid, M., Schmidt, I., Wubben, M. A., Dongen, L.G.J.M., Abma, W., Slijkers, A. O. , Revsbech, N. P., Beaumont, H. J. E., Ottosen, L., Volcke, E. I. P., Laanbroek, H. J., Campos-Gomez, J. L., Cole, J. A., Loosdrecht, M. C. M. van, Mulder, J. W., Fuerst, J., Richardson, D., Pas, K. van de, Mendez-Pampin, R., Third, K. A., Cirpus, I. E. Y. , Spanning, R. van, Bollmann, A., Nielsen, L. P., Camp, H. Op den, Schultz, C., Gundersen, J., Vanrolleghem, P. A., Strous, M., Wagner, M. and Kuenen, J. G. (2002). "Implementation of EU guidelines for nitrogen removal by improved control and application of new nitrogen-cycle bacteria," Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 1, 51-63.



- Jones, R. D., and Hood, M. A. (1980). "Effects of temperature, pH, salinity, and inorganic nitrogen on the rate of ammonium oxidation by nitrifiers isolated from wetland environments," Microbiology Ecology. 6,339-347.
- Jones, J. G. (1977). "The effect of environmental factors on estimated viable and total populations of planktonic bacteria in lakes and experimental enclosures," Marine and Freshwater Biology. 7, 67-91.
- Juretschko, S., Loy, A., Lehner, A. and Wagner, M. (2002). "The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach," Systematic Applied Microbiology. 25(1), 84-99.
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K. -H., Pommerening-Röser, A., Koops, H. -P. and Wagner, M. (1998). "Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations," Applied and Environmental Microbiology. 64, 3042-3051.
- Kang, S. J., Bailey, W. F. and Jenkins, D. (1992). "Biological nutrient removal at the Blue plains wastewater treatment plant in Washington, DC," Water Science and Technology. 26, 2233-2236.
- Khin, T. and Annachhatre, A. P. (2004). "Novel microbial nitrogen removal processes," Biotechnology Advances. 22(7), 519-532.
- Kogure, K., Simidu, U. and Taga, N. (1979). "A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria," Canadian Journal of Microbiology. 25, 415-420.
- Kuenen, J. G. and Jetten, M. S. M. (2001). "Extraordinary anaerobic ammonium oxidizing bacteria," Journals American Society for Microbiology. 67, 456-463.
- Labbé, N., Parent, S. and Villemur, R. (2003). "Addition of trace metals increases denitrification rate in closed marine systems," Water Research. 37(4), 914-920.

- Lajoie, C. A., Layton, A. C., Gregory, I. R., Sayler, G. S., Taylor, D. E. and Meyers, A. J. (2000). "Zoogeal clusters and sludge dewatering potential in an industrial activated-sludge wastewater treatment plant," Water Environment Research. 72, 56-64.
- Lane, D. J. (1991). "16S/23S rRNA sequencing" Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. (pp. 115-175), Chichester, United Kingdom : Academic Press.
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H. and Forney, L. J. (1997). "Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rRNA," Applied and Environmental Microbiology. 63, 4516-4522.
- Loy, A., Daims, H. and Wagner, M. (2002). "Activated sludge-Molecular techniques for determining community composition," Encyclopedia of Environmental Microbiology. New York : John Wiley & Sons.
- Loy, A., Horn, M. and Wagner, M. (2003). "ProbeBase: an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes," Nucleic Acids Research. 31(1), 514-516.
- Loy, A., Lehner, A., Lee, N., Adamczyk, J., Meier, H., Ernst, J., Schleifer, K. -H. and Wagner, M. (2002). "Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment," Applied and Environmental Microbiology. 68, 5064-5081.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J. (2003). Brock Biology of Microorganisms. New Jersey: Prentice Hall.
- Mahvi, A. H., Mesdaghinia, A. R. and Karakani, F. (2004). "Nitrogen removal from wastewater in a continuous flow sequencing batch reactor," Journal Biological Science. 7(11), 1880-1883.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M. and Schleifer, K. -H. (1996). "Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment," Microbiology. 142, 1097-1106.

- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer, K. -H. (1992). "Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions," Systematic Applied Microbiology. 15, 593 - 600.
- Manz, W., Wagner, M., Amann, R. and Schleifer, K. -H. (1994). "*In situ* characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants," Water Research. 28, 1715-1723.
- McCarthy, P. L., Beck, L., Amann, P. S., (1969). "Biological denitrification of wastewaters by addition of organic materials," The 24<sup>th</sup> of Industrial Waste Conference (1271–1285). Purdue University, Lafayette.
- Meier, H., Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K -H. (1999). "Specific oligonucleotide probes for *in situ* detection of a major group of Gram-positive bacteria with low DNA G+C content," Systematic Applied Microbiology. 22, 186-196.
- Mobarry, B. K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B. E. and Stahl, D. A. (1996). "Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria," Applied and Environmental Microbiology. 62, 2156-2162.
- Mulder, A., van de Graaf, A.A., Robertson, L.A. and Kuenen, J. G. (1995). "Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor," FEMS Microbiology Ecology. 16(3), 177-183.
- Munch, E.V., Lant, P., and Keller, J. (1996). "Simultaneous Nitrification and Denitrification in Bench-Scale Sequencing Batch Reactors," Water Research. 30, 277-284.
- Muyzer, G., deWaal, E. C. and Uitterlinden, A. G. (1993). "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified gene coding for 16S rRNA," Applied Environmental Microbiology. 56, 695-700.
- Najafpour, G. D. and Shan, C. P. (2003). "Enzymatic hydrolysis of molasses," Bioresource Technology. 86, 91–94.

- Neef, A., Zaglauer, A., Meier, H., Amann, R., Lemmer, H. and Schleifer, K. H. (1996). "Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and *in situ* identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms," Applied and Environmental Microbiology. 62, 4329-4339.
- Nielsen, P. H., Thomsen, T. R. and Nielsen, J. L. (2004). "Bacterial composition of activated sludge-importance for floc and sludge properties," Water Science and Technology. 49(10), 51-58.
- Nugul Intrasungkha. (1998). A suitable technology for the treatment of seafood processing wastewater. Doctoral Dissertation, The University of Queensland, Australia.
- Nyberg, U., Aspergren, H., Andersson, B., Jansen, J. la C. and Villadsen, I. S. (1992). "Full-scale application of nitrogen removal with methanol as carbon source," Water Science and Technology. 26(5-6), 1077-1086.
- O`Sullivan, L. A., Weightman, A. J. and Fry, J. C. (2001). "New degenerate *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*-specific 16S ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probes reveal high bacterial diversity in river Taff Epilithon," Applied and Environmental Microbiology. 68, 201-210.
- Panswad, T. and Anan, C. (1999). "Specific oxygen, and nitrate uptake rates of a biological nutrient removal process treating elevated salinity wastewater," Bioresource Technology. 70, 237-243.
- Patureau, D., Godon, J.-J., Dabert, P., Bouchez, T., Bernet, N., Delgenes, J. P., and Moletta, R. (1998). "*Microvirgula aerodenitrificans* gen. nov., sp. nov., a new gram-negative bacterium exhibiting co-respiration of oxygen and nitrogen oxides up to oxygen saturated conditions," International Journal of Systematic Bacteriology. 48, 775-782.
- Peyton, B. M., Mormile, M. R. and Petersen, J. N. (2001). "Nitrate Reduction with *Halomonas campisalis*: Kinetics of Denitrification at pH 9 and 12.5% NaCl," Water Research. 35(17), 4237-4242.

- Purtschert, I. and Gujer, W. (1999). "Population dynamics by methanol addition in denitrifying wastewater treatment plants," Water Science and Technology. 39(1)43-50.
- Quan, Z. X., Jin, Y. S., Yin, C. R., Lee, J. J. and Lee, S. T. (2005). "Hydrolyzed molasses as an external carbon source in biological nitrogen removal," Bioresource Technology. 96(15), 1690-1695.
- Rim, Y. -T., Yang, H. J., Yoon, C. -H., Kim, Y. -S., Seo, J. -B., Ryu, J. -K. and Shin, E. -B. (1997). "A full-scale test of a biological nutrients removal system using the sequencing batch reactor." Water Science and Technology. 35, 241-247.
- Roszak, D. B. and Colwell, R. R. (1987). "Survival strategies of bacteria in the natural environment," Microbiology Reviews. 51, 365-379.
- Rowe, R., Todd, R. and Waide, J. (1977). "Microtechnique for most-probable-number analysis," Applied and Environmental Microbiology. 33, 675-680.
- Ruiz, G., Jeison, D., Rubilar, O., Ciudad, G. and Chamy, R. (2006). "Nitrification–denitrification via nitrite accumulation for nitrogen removal from wastewaters," Bioresource Technology. 97(2), 330-335.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning: a laboratory manual, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- San, C., Mata-Alvarez, J., Cecchi, F. and Pavan, P., (1995). "Volatile fatty acids production by mesophilic fermentation of mechanically sorted urban organic waste in a plug flow reactor," Bioresource Technology. 51, 89–96.
- Schmid, M., Twachtmann, U., Klein, M., Strous, M., Juretschko, S., Jetten, M., Metzger, J. W., Schleifer, K. -H. and Wagner, M. (2000). "Molecular evidence for a genus-level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation," Systematic Applied Microbiology. 23, 93-106.
- Scholten, E., Lukow, T., Auling, G., Kroppenstedt, R.M., Rainey, F.A. and Dielmann, H. (1999). "*Thaurea mechamichensis* sp. nov., an aerobic denitrifier from a leachate treatment plant," International Journal of Systematic Bacteriology. 49, 1045-1051.

- Schramm, A., de Beer, D., van den Heuvel, J. C., Ottengraf, S., Amann, R. (1999). "Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: Quantification by *in situ* hybridization and the use of microsensors," Applied and Environmental Microbiology. 65, 3690-3696.
- Schramm, A. and Amann, R. (2000). "Nucleic acid-based techniques for analyzing the diversity, structure, and dynamics of microbial communities in wastewater treatment," Biotechnology-Environmental Processes, (pp. 86-104). Bremen : Wiley-VCH.
- Shang, Y. C., Leung, P. and Ling, B. H. (1998). "Comparative economics of shrimp farming in Asia," Aquaculture. 164, 183–200.
- Sliekers, A. O., Derwort, N., Campos Gomez, J. L., Strous, M., Kuenen, J. G. and Jetten, M. S. M. (2002). "Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor," Water Research. 36, 2475-2482.
- Soto, O., S´anchez, O., Asp´e, E. and Roeckel, M. (2002). "Denitrification kinetics of simulated fish processing wastewater at different ratios of nitrate to biomass," Biotechnology Letters. 24, 1173–1176.
- Stephen, J.R., McCaig, A.E., Smith, Z., Prosser, J.I. and Embley, T.M. (1996). "Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria," Applied and Environmental Microbiology. 62, 4147-4154.
- Strous, M., Kuenen, J. G. and Jetten, M. S. M. (1999). "Key physiology of anaerobic ammonium oxidation," Applied and Environmental Microbiology. 65, 3248-3250.
- Takaya, N., Catalan-Sakairi, B., Antonina, M., Sakaguchi, Y., Kato, I., Zhou, Z. and Shoun, H. (2003) "Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide," Applied and Environmental Microbiology. 69, 3152-3157.
- Tchobanoglous, G., Burton, F.L., Stensel, H.D. (2002). Wastewater Engineering. New York : McGraw-Hill Professional.

- Teichert-Coddington, R., Martinez, D. and Ramirez, E. (2000). "Partial nutrient budgets for semi-intensive shrimp farms in Honduras," Aquaculture. 190, 139–145.
- Teichgrber, B. and Steina, A. (1994). "Nitrogen elimination from sludge treatment reject water-comparison of the steam-absorption and denitrification processes," Water Science and Technology. 30(6), 41-51.
- Third, K. A., Sliekers, A. O., Kuenen, J. G. and Jetten, M. S. M. (2001). "The CANON system (completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite) under ammonium limitation: Interaction and competition between three groups of bacteria," Systematic Applied Microbiology. 24,588-596.
- Thomsen, T. R., Nielsen, J. L., Ramsing, N. B., and Nielsen, P. H. (2004). "Micromanipulation and further identification of FISH-labelled microcolonies of a dominant denitrifying bacterium in activated sludge," Environmental Microbiology. 6(5), 470-479.
- Tookvinas, S. Songsangjinda, P., Matsuda, O., Na-anan, P. and Ekpanithanpong, U. (2001). "Experiment on integrated physical and biological treatment processes for treatment of intensive marine shrimp farming' s effluent," Proceedings of the JSPS-NRCT seminar on sustainable shrimp culture and health management diseases and environment. 12-16 April 2001. Tokyo University of Fisheries, Japan.
- Torsvik, V., Goksoyr, J. and Daae, F. L. (1990). "High diversity in DNA of soil bacteria," Applied and Environmental Microbiology. 56, 782-787.
- Ucisik, A. S. and Henze, M. (2004). "Biological denitrification of fertiliser wastewater at high chloride concentration," Water SA. 30(2), 191-195.
- Uygur, A. (2006). "Specific nutrient removal rates in saline wastewater treatment using sequencing batch reactor," Process Biochemistry. 41(1), 61-66.
- van Dongen, U., Jetten, M.S.M. and van Loosdrecht, M.C.M. (2001). "The SHARON-ANAMMOX process for treatment of ammonium rich wastewater," Water Science and Technology. 44, 153-160.

- van Loosdrecht, M. C. M. and Jetten, M. S. M. (1998). "Microbiological conversion in nitrogen removal," Water Science and Technology. 38(1), 1-7.
- Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H. and Schleifer, K. -H. (1993). "Probing activated sludge with oligonucleotides specific for *Proteobacteria*: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure," Applied and Environmental Microbiology. 59, 1520-1525.
- Wagner, M., Loy, A., Nogueira, R., Purkhold, U., Lee, N. and Daims, H. (2002). "Microbial community composition and function in wastewater treatment plants," Antonie Van Leeuwenhoek. 81(1-4), 665-680.
- Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H.-P. and Schleifer, K.-H. (1995). "*In situ* identification of ammonia-oxidizing bacteria," Systematic Applied Microbiology. 18, 251-264.
- Wagner, M., Rath, G., Koops, H. -P., Flood, J. and Amann, R. (1996). "*In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants," Water Science and Technology. 34, 237-244.
- Windey, K., DeBo, I. and Verstraete, W. (2005). "Oxygen-autotrophic nitrification-denitrification (OLAND) in a rotating biological contactor treating high-salinity wastewater," Water Research. 39, 4512-4520.
- Woese, C. R. (1987). "Bacterial evolution," Microbiological Reviews. 51, 221-271.
- Yoshie, S., Noda, N., Miyano, T., Tsuneda, S., Hirata, A. and Inamori, Y. (2001). "Microbial community analysis in the denitrifying process of saline-wastewater by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA and the cultivation method," Journal Bioscience Bioengineering. 92, 346-353.
- Yoshie, S., Noda, N., Tsuneda, S., Hirata, A. and Inamori, Y. (2004). "Design of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and microbial community analysis in the denitrification process of a saline industrial wastewater treatment system," FEMS Microbiology Letters. 235(1), 183-189.



ภาคผนวก

## ภาคผนวก

ภาคผนวก ก ค่าเอ็มพีเอ็นสำหรับนับจำนวนแบคทีเรียด้วยเทคนิคด้วยเอ็มพีเอ็น

ตารางที่ 13 ค่าเอ็มพีเอ็น (Rowe, Todd and Waide. 1977)

$p_1$	$p_2$	$p_3$	MPN	Standard error	$p_1$	$p_2$	$p_3$	MPN	Standard error
1	0	0	0.037	1.000	6	1	4	0.570	0.311
2	0	0	0.077	0.708	6	1	5	0.635	0.299
2	0	1	0.117	0.578	6	2	0	0.397	0.361
2	1	0	0.118	0.578	6	2	1	0.455	0.342
2	1	1	0.160	0.501	6	2	2	0.515	0.326
3	0	0	0.121	0.579	6	2	3	0.579	0.312
3	0	1	0.163	0.502	6	2	4	0.645	0.300
3	0	2	0.206	0.449	6	2	5	0.715	0.289
3	1	0	0.165	0.502	6	3	0	0.462	0.342
3	1	1	0.208	0.499	6	3	1	0.524	0.326
3	1	2	0.253	0.411	6	3	2	0.589	0.312
3	2	0	0.210	0.450	6	3	3	0.657	0.301
3	2	1	0.256	0.411	6	3	4	0.728	0.290
3	2	2	0.302	0.381	6	3	5	0.803	0.281
4	0	0	0.168	0.502	6	4	0	0.533	0.327
4	0	1	0.213	0.450	6	4	1	0.599	0.313
4	0	2	0.259	0.411	6	4	2	0.668	0.301
4	0	3	0.306	0.382	6	4	3	0.742	0.291
4	1	0	0.216	0.450	6	4	4	0.818	0.282
4	1	1	0.262	0.412	6	4	5	0.901	0.275
4	1	2	0.310	0.382	6	5	0	0.608	0.314
4	1	3	0.360	0.358	6	5	1	0.680	0.302
4	2	0	0.265	0.412	6	5	2	0.755	0.292
4	2	1	0.314	0.382	6	5	3	0.835	0.283
4	2	2	0.365	0.358	6	5	4	0.919	0.276
4	2	3	0.416	0.338	6	5	5	0.101	0.269
4	3	0	0.318	0.382	7	0	0	0.347	0.386
4	3	1	0.369	0.358	7	0	1	0.404	0.362
4	3	2	0.422	0.339	7	0	2	0.463	0.343
4	3	3	0.477	0.322	7	0	3	0.525	0.327
5	0	0	0.221	0.451	7	1	0	0.410	0.363
5	0	1	0.269	0.412	7	1	1	0.470	0.343
5	0	2	0.319	0.383	7	1	2	0.534	0.327
5	0	3	0.370	0.359	7	1	3	0.601	0.314
5	0	4	0.423	0.339	7	1	4	0.671	0.302
5	1	0	0.272	0.413	7	1	5	0.746	0.292
5	1	1	0.323	0.383	7	2	0	0.478	0.343
5	1	2	0.375	0.359	7	2	1	0.543	0.328
5	1	3	0.429	0.340	7	2	2	0.612	0.315
5	1	4	0.484	0.323	7	2	3	0.684	0.303
5	2	0	0.327	0.383	7	2	4	0.760	0.293
5	2	1	0.380	0.360	7	2	5	0.841	0.284
5	2	2	0.435	0.340	7	2	6	0.926	0.277
5	2	3	0.492	0.323	7	3	0	0.552	0.329
5	2	4	0.550	0.309	7	3	1	0.623	0.315
5	3	0	0.385	0.360	7	3	2	0.696	0.304
5	3	1	0.441	0.340	7	3	3	0.775	0.294
5	3	2	0.499	0.324	7	3	4	0.858	0.286
5	3	3	0.559	0.310	7	3	5	0.947	0.278
5	3	4	0.622	0.298	7	3	6	1.042	0.272
5	4	0	0.447	0.341	7	4	0	0.634	0.316
5	4	1	0.507	0.324	7	4	1	0.710	0.305
5	4	2	0.568	0.310	7	4	2	0.790	0.295
5	4	3	0.632	0.298	7	4	3	0.877	0.287
5	4	4	0.699	0.288	7	4	4	0.969	0.280
6	0	0	0.280	0.414	7	4	5	1.068	0.273
6	0	1	0.332	0.384	7	4	6	1.176	0.268
6	0	2	0.386	0.360	7	5	0	0.724	0.306
6	0	3	0.442	0.341	7	5	1	0.808	0.296
6	0	4	0.500	0.324	7	5	2	0.896	0.288
6	1	0	0.336	0.384	7	5	3	0.992	0.281
6	1	1	0.391	0.361	7	5	4	1.096	0.275
6	1	2	0.449	0.341	7	5	5	1.209	0.270
6	1	3	0.508	0.325	7	5	6	1.332	0.266

## ตารางที่ 13 (ต่อ)

7	6	0	0.825	0.298	8	4	3	1.054	0.287
7	6	1	0.917	0.290	8	4	4	1.171	0.282
7	6	2	1.018	0.283	8	4	5	1.301	0.278
7	6	3	1.126	0.278	8	4	6	1.444	0.274
7	6	4	1.244	0.273	8	4	7	1.607	0.272
7	6	5	1.376	0.269	8	5	0	0.870	0.302
7	6	6	1.523	0.266	8	5	1	0.972	0.295
8	1	0	0.495	0.346	8	5	2	1.085	0.289
8	1	1	0.564	0.330	8	5	3	1.208	0.284
8	1	2	0.637	0.317	8	5	4	1.346	0.281
8	1	3	0.714	0.306	8	5	5	1.500	0.278
8	1	4	0.796	0.296	8	5	6	1.679	0.277
8	2	0	0.574	0.331	8	5	7	1.886	0.277
8	2	1	0.648	0.318	8	6	0	0.999	0.297
8	2	2	0.728	0.307	8	6	1	1.117	0.292
8	2	3	0.812	0.297	8	6	2	1.248	0.288
8	2	4	0.903	0.289	8	6	3	1.396	0.285
8	2	5	1.001	0.283	8	6	4	1.565	0.283
8	2	6	1.106	0.277	8	6	5	1.760	0.283
8	3	0	0.662	0.319	8	6	6	1.993	0.285
8	3	1	0.744	0.308	8	6	7	2.279	0.288
8	3	2	0.831	0.299	8	7	0	1.153	0.295
8	3	3	0.925	0.291	8	7	1	1.293	0.291
8	3	4	1.027	0.285	8	7	2	1.452	0.289
8	3	5	1.138	0.279	8	7	3	1.636	0.289
8	3	6	1.259	0.275	8	7	4	1.855	0.291
8	3	7	1.395	0.271	8	7	5	2.124	0.294
8	4	0	0.759	0.310	8	7	6	2.465	0.301
8	4	1	0.850	0.301	8	7	7	2.921	0.312
8	4	2	0.947	0.293					

### ภาคผนวก ข ส่วนประกอบสำหรับเตรียมสารละลายที่ใช้กับเทคนิค FISH

ตารางที่ 14 ส่วนประกอบของ Formamide และน้ำสำหรับเตรียม Hybridization buffer

ปริมาณ Formamide (ไมโครลิตร)	ร้อยละ Formamide	ปริมาณน้ำ (ไมโครลิตร)
100	5	1498
200	10	1398
300	15	1298
400	20	1198
500	25	1098
600	30	998
700	35	898
800	40	798
900	45	698
1000	50	598

ตารางที่ 15 ส่วนประกอบของ NaCl สำหรับเตรียม Wash buffer

ร้อยละ Formamide	NaCl (M)	5M NaCl (ไมโครลิตร)	0.5 M EDTA (ไมโครลิตร)
5	0.636	6360	-
10	0.450	4500	-
15	0.318	3180	-
20	0.225	2250	500
25	0.159	1590	500
30	0.112	1120	500
35	0.080	800	500
40	0.056	560	500
45	0.040	400	500
50	0.028	280	500

### ภาคผนวก ค ข้อมูลเพิ่มเติมเทคนิค 16S rRNA clone library

ตารางที่ 16 จำนวนและสมาชิกใน OTU ของ Clone library ตัวอย่าง NSBR

OUT	Clone member	Total	BLAST %	BLAST identity
N1	CN10, CN54, CN56, CN9, CN3, CN31, CN134, CN135, CN125, CN115, CN25, CN11, CN23, CN85, CN131, CN118, CN79, CN101, CN75, CN12, CN114, CN69, CN67, CN, CN49, CN62	25	96	Uncultured Alphaproteobacteria bacterium clone HPDOMI2C10
N2	CN72, CN83, CN52, CN18, CN53, CN87, CN80, CN38, CN111, CN74, CN44, CN57, CN47, CN26, CN28, CN109	16	83	Uncultured bacterium clone AKAU3728
N3	CN129, CN112, CN20, CN6, CN27, CN106, CN63, CN4, CN14, CN21, CN34	11	97	Uncultured bacterium clone nsmpVI
N4	CN43, CN72, CN16, CN52, CN64, CN60, CN66, CN121	8	98	Actinobacteria
N5	CN22, CN42, CN82, CN34, CN33, CN35, CN41	7	93	Deinococci bacterium
N6	CN5, CN30, CN84, CN105, CN77, CN61	6	97	<i>M. marina</i>
N7	CN2, CN98, CN99, CN107, CN122	5	96	<i>Nitrosococcus oceani</i>
N8	CN40, CN89, CN19, CN119	4	96	Uncultured clone HP1B89
N9	CN15, CN7, CN13	3	98	<i>Denitromonas indolicum</i>

ตารางที่ 16 (ต่อ)

N10	CN68, CN81, CN90	3	91	<i>Cryomopha ignava</i>
N11	CN18	1	95	<i>Xanthomonas</i> like sp. V4.BO.41
N12	CN24	1	92	Uncultured clone KD4-19
N13	CN48	1	96	<i>Subtercola</i> <i>frigoramans</i>
N14	CN58	1	97	Uncultured clone ELB25-087
N15	CN78	1	94	Uncultured clone KD6-102
N16	CN93	1	84	Uncultured clone HP1B89
N17	CN97	1	97	Uncultured Actinobacteria bacterium clone AKYH1051
N18	CN100	1	94	Uncultured bacterium clone ELB16-189
N19	CN117	1	96	Uncultured bacterium clone 4RHU22
N20	CN132	1	97	Uncultured alpha proteobacterium clone 131637

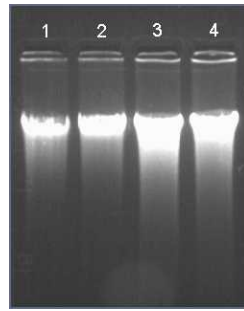
ตารางที่ 17 จำนวนและสมาชิกใน OTU ของ Clone library ตัวอย่าง DSBR

OTU	Clone member	Total	BLAST %	BLAST identity
D1	CD4, CD6, CD15, CD16, CD20, CD22, CD24, CD29, CD31, CD32, CD38, CD40, CD49, CD51, CD54, CD64, CD69, CD70, CD75, CD77, CD81, CD84, CD88, CD95, CD98, CD100, CD104, CD41, CD44, CD45, CD46, CD48, CD57, CD59, CD62, CD67, CD71, CD72, CD73, CD78, CD82, CD89, CD6, CD85, CD96, CD21, CD93, CD102, CD114, CD61, CD76, CD5, CD83, CD90, CD9, CD110, CD13, CD11, CD96, CD8	60	98	MM16S5989, <i>Methylophaga marina</i>
D2	CD3, CD12, CD10, CD30, CD55, CD80, CD112, CD50, CD39, CD79, CD91, CD113, CD115	13	95	AY228697.1, Uncultured clone SSE5
D3	CD27, CD28, CD34, CD66, CD86, CD99, CD107, CD119, CD121, CD116	10	98	MT16S5690, <i>Methylophaga thalassica</i>
D4	CD18, CD19, CD58, CD 109, CD92, CD101, CD23, CD37, CD94	9	97	AB212891.1, Uncultured clone nsmpVI14
D5	CD25, CD68, CD120, CD35, CD25	5		<i>Vitellibacter viladivostokensis</i>

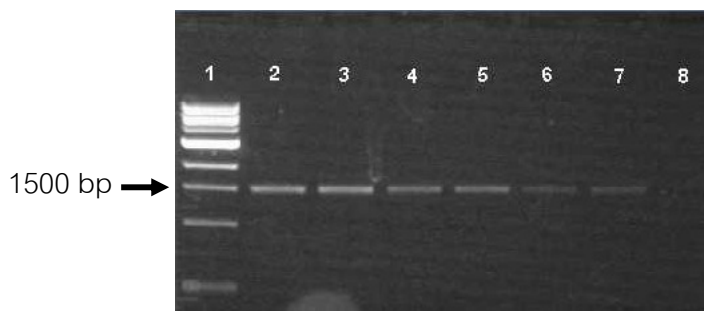
ตารางที่ 17 (ต่อ)

D6	CD36, CD87, CD108, CD63	4		Uncultured clone Nubeena269
D7	CD7, CD14, CD60	3		Uncultured clone ccslm285
D8	CD33	1	97	AF387348, Bacterium PV-4
D9	CD1	1	98	AF069496, <i>Trojanella</i> <i>thessalonices</i>

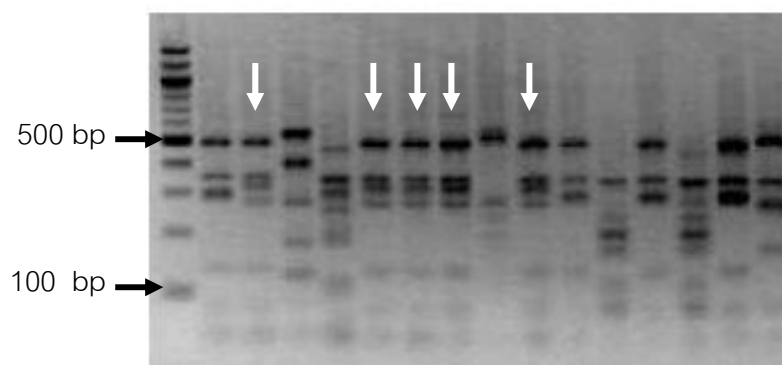




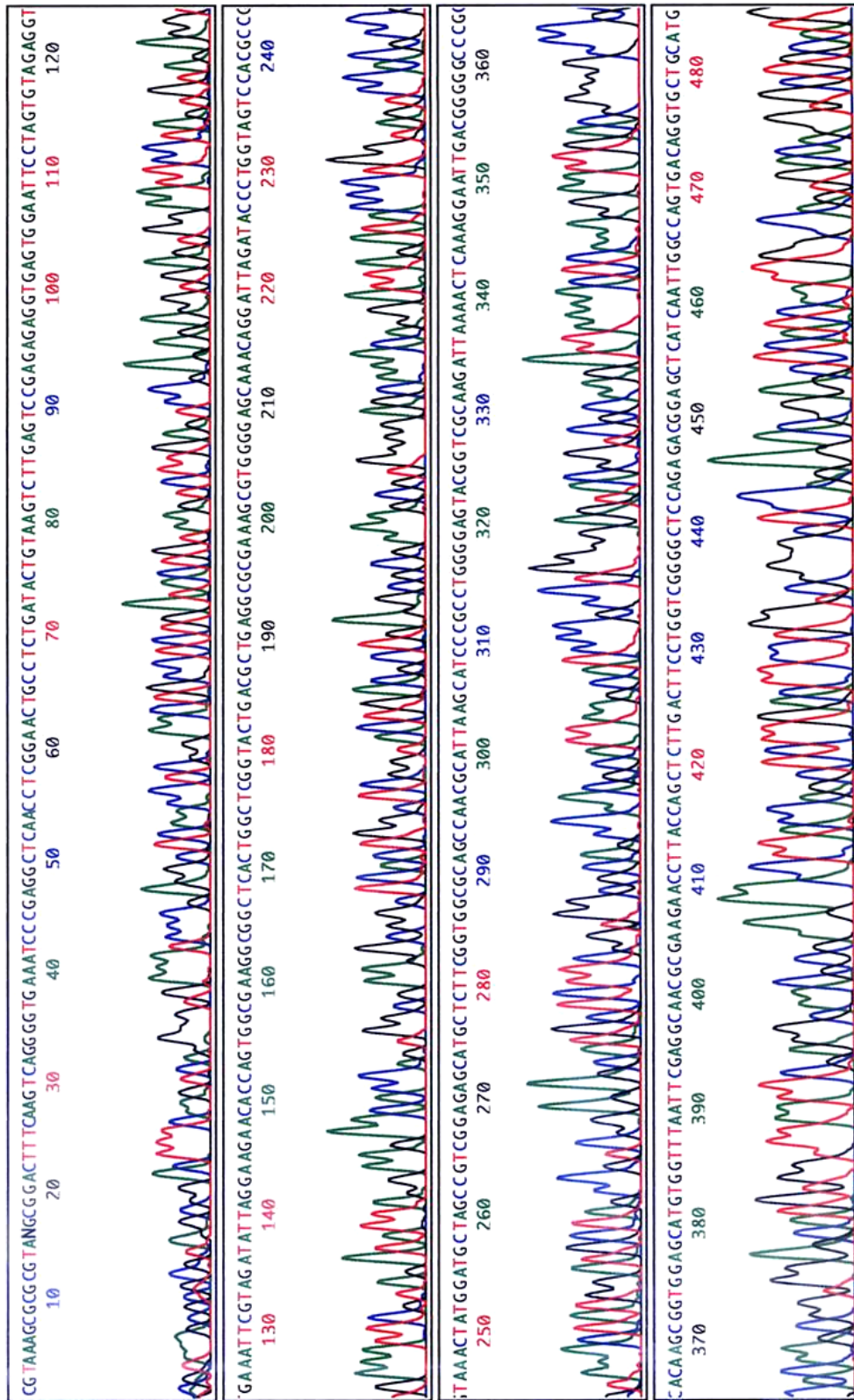
ภาพที่ 23 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ใน NSBR (หลุมที่ 1 และ 3) และ DSBR (หลุมที่ 2 และ 4)



ภาพที่ 24 PCR product ที่ได้รับจากการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR จากตัวอย่างดีเอ็นเอของ NSBR โดยหลุมที่ 2-7 ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ในปริมาณที่แตกต่างกัน ส่วนหลุมที่ 8 เป็น Negative control



ภาพที่ 25 รูปแบบของแบนด์ของ OTU D1 (ลูกศร) จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค REA โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinP1* และ *Msp1* แล้วแยกด้วย Gel electrophoresis ด้วย Agarose ร้อยละ 3



ภาพที่ 26 Chromatogram จากการหาลำดับเบสยีน 16S rRNA ของ OTU N1

## ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ นายดอกกรัก ชัยसार

เกิด 5 มิถุนายน 2522

สถานที่เกิด 112 ม.3 บ.แสนสนุก ต.พระแก้ว อ.สังขะ จ.สุรินทร์

ที่อยู่ปัจจุบัน 140 ม.4 ต.เขารูปช้าง อ.เมือง จ.สงขลา

อีเมลล์ chaisarn@gmail.com

## ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2545 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยทักษิณ

พ.ศ. 2549 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยทักษิณ

## ผลงานทางวิชาการ

**ดอกกรัก ชัยसार** ปาริตีสะ สาเหาะ ประดิษฐ์ ตั้งสกุล นพดล ศุกระกาญจน์ และนุกุล อินทระสังขา.

(2547). “การตรวจสอบแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล โดยใช้เทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)”. วารสารวิทยาศาสตร์ ทักษิณ. 1(1): 95-106.

บุญกอบ วิริยพงศ์สุธี **ดอกกรัก ชัยसार** สุภฎา ศิริรัฐนิคม นุกุล อินทระสังขา พูนสุข ประเสริฐสุวรรณ

และ กิจการ สุขมาตย์. (2548). “การใช้เทคนิค fluorescence *in situ* hybridization (FISH) เพื่อศึกษาจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*)”, วารสารสงขลานครินทร์. 27(1) : 275-282.

**ดอกกรัก ชัยसार** ปาริตีสะ สาเหาะ ประดิษฐ์ ตั้งสกุล นพดล ศุกระกาญจน์ และ นุกุล อินทระสังขา.

(2547). “การศึกษาประสิทธิภาพการใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกในการควบคุมคุณภาพน้ำในระบบการเลี้ยงกุ้งทะเล,” ใน รายงานการประชุมทางวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 3, (หน้า 481-488). 28 มกราคม - 29 มกราคม 2547. ณ โรงแรมบีพีแกรนด์ทาวเวอร์ จังหวัดสงขลา.

**ดอกกรัก ชัยसार** จรรย์รัตน์ พ่วงฟู และ นุกุล อินทระสังขา (2549). “การศึกษาโครงสร้าง

แบคทีเรียไนโตรไฟอิงและแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิงในระบบเอสปีอาร์ที่บำบัดน้ำทิ้งที่มีความเค็มด้วยเทคนิค 16S rRNA” ใน การประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 5. 8 มีนาคม -10 มีนาคม 2549. กรุงเทพฯ : สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย.