



E46978



SELECTION OF BACILLI CAPABLE OF REMOVING  
AMMONIA, NITRITE AND NITRATE

MISS TIPPAPORN SOPHONPATTANAKIT

A SPECIAL PROJECT STUDY SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)  
SCHOOL OF BIORESOURCES AND TECHNOLOGY  
KING MONGKUT'S UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THONBURI

2010





E46978

# Selection of Bacilli capable of removing ammonia, nitrite and nitrate

Miss Tippaporn Sophonpattanakit B.Sc. (Biotechnology)

A Special Project Study Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the  
Degree of Master of Science (Biotechnology)  
School of Bioresources and Technology  
King Mongkut's University of Technology Thonburi  
2010



## Project Committee

*Saengchai Akeprathumchai*  
.....  
(Lect. Saengchai Akeprathumchai, Ph.D.)

Chairman of project committee

*Yuwapin Dandusitapunth*  
.....  
(Assoc. Prof. Yuwapin Dandusitapunth, Ph.D.)

Member and project advisor

*Pairat Thitisak*  
.....  
(Mr. Pairat Thitisak, D.V.M., M.B.A.)

Member

*T. Chalermchaikit*  
.....  
(Assoc. Prof. Thongchai Chalermchaikit, D.V.M., Ph.D.)

Member

Special Project Study Title	Selection of Bacilli Capable of Removing Ammonia, Nitrite and Nitrate
Credits	6
Candidate	Miss Tippaporn Sophonpattanakit
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Yuwapin Dandusitapunth
Program	Master of Science
Field of Study	Biotechnology (Biotechnology Practice School)
Division	Biotechnology
Faculty	School of Bioresources and Technology
B.E.	2553

## Abstract

**E46978**

The objective of this research was to test the effectiveness of ammonia, nitrite and nitrate reduction by *Bacillus* in ammonia synthetic medium and nitrate synthetic medium. Then, strains with high potential were employed to further investigate their efficiency in mud medium for product development in industry.

The 10 strains of *Bacillus*; 6 strains of *B. subtilis*; KMP-BCD-1, KMP-BCI-1, KMP-BCI-2, KMP-BCP-1, KMP-CU4 and KMP-N001, 2 strains of *B. licheniformis*; KMP9 and KMP-N5001, *B. polymyxa* KBS9 and *B. pumilus* KMP-T061, were tested for efficacy to reduce  $\text{NH}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  and  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  in synthetic medium. *B. polymyxa* KBS9 and *B. subtilis* KMP-CU4 were identified as the best candidate for  $\text{NH}_3\text{-N}$  and  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  reductions.  $\text{NH}_3\text{-N}$  and  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  present in the medium was reduced from initial concentration of  $491.1 \pm 0.002$  and  $68.1 \pm 1.0$  mg/L to  $214.6 \pm 0.003$  and  $25.2 \pm 1.0$  mg/L, or about 56 and 63% removal efficiency, respectively. However, all tested strains of *Bacillus* were incapable of removing  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  and  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  when cultivated in ammonia synthetic medium.

The reductions of  $\text{NH}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  and  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  by *B. polymyxa* KBS9 and *B. subtilis* KMP-CU4 were, subsequently, investigated in mud medium (model pond) whose initial concentration of ammonia and inoculums were at 10 ppm and  $10^4$  cfu/ml final cell concentration in mud medium. The experiments were set on 2 conditions: (1) sterilized mud medium and (2) non-sterilized mud medium. The removal efficiency of  $\text{NH}_3\text{-N}$  in sterile mud medium by *B. polymyxa* KBS9 and *B. subtilis* KMP-CU4 was found to be only 25 and 37%, respectively. However, it was interesting to note that in non-sterile mud medium, both strains totally removed 10 ppm ammonia from the medium within 30 hrs. However, ammonia was also removed by the natural strains in non-sterile mud medium (control; no culture added); however, at slower rate than that observed with medium supplemented with the selected strain, approximately 12 hrs longer. The accumulation of nitrate and nitrite at the unharmed level to shrimp, only 0.013 mg/L of  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  and 10.93 mg/L  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  was noted which may be due to nitrification and de-nitrification reaction taking place in the system.

Keywords: Ammonia/ Nitrite/ Nitrate/ *B. polymyxa*/ *B. subtilis*

หัวข้อโครงการวิจัย	การคัดเลือกแบซิลลัสที่มีความสามารถในการลดแอมโมเนีย, ไนไตรท์ และไนเตรท
หน่วยกิต	6
ผู้เขียน	นางสาวทิพภาพร โสภณพัฒน์กิจ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ยุกพิน คำนาคิตาพันธ์
หลักสูตร	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ (ทักษะเทคโนโลยีชีวภาพ)
สายวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
คณะ	ทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
พ.ศ.	2553

บทคัดย่อ

**E46978**

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการลดปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท โดยแบซิลลัสในอาหารสังเคราะห์แอมโมเนียและอาหารสังเคราะห์ไนเตรท จากนั้นนำสายพันธุ์ที่มีศักยภาพมาศึกษาประสิทธิภาพต่อใน Mud medium เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ของโรงงานต่อไป

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการลดปริมาณ  $\text{NH}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  และ  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  ในอาหารสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์กลุ่มแบซิลลัส จำนวน 10 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วย *Bacillus subtilis* 6 สายพันธุ์ คือ KMP-BCD-1, KMP-BCI-1, KMP-BCI-2, KMP-BCP-1, KMP-CU4 และ KMP-N001, *B. licheniformis* 2 สายพันธุ์ คือ KMP9 และ KMP-N5001, *B. polymyxa* KBS9 และ *B. pumilus* KMP-T061 พบว่า *B. polymyxa* KBS9 และ *B. subtilis* KMP-CU4 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการลด  $\text{NH}_3\text{-N}$  และ  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  ออกจากระบบได้สูงสุด ตามลำดับ โดยสามารถลด  $\text{NH}_3\text{-N}$  และ  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  จากความเข้มข้นเริ่มต้น  $491.1 \pm 0.002$  และ  $68.1 \pm 1.0$  mg/L ลงเหลือ  $214.6 \pm 0.003$  และ  $25.2 \pm 1.0$  mg/L หรือคิดเป็นประสิทธิภาพการกำจัดเท่ากับ 56 และ 63% ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าแบซิลลัสทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบไม่สามารถลดปริมาณ  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  และ  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  ได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์แอมโมเนีย

การทดสอบประสิทธิภาพการกำจัด  $\text{NH}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  และ  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  โดย *B. polymyxa* KBS9 และ *B. subtilis* KMP-CU4 ได้ศึกษาในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ดินที่นำมาจากบ่อเลี้ยงกุ้ง เป็นแหล่งของแอมโมเนียในการศึกษาการกำจัด หรือเรียกว่า “mud medium” ในการทดลอง โดยศึกษาที่ความ

เข้มข้นเริ่มต้นของ  $\text{NH}_3\text{-N}$  ที่ 10 ppm และมีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นใน mud medium เท่ากับ  $10^4$  cfu/ml ศึกษาที่ 2 สภาวะคือ (1) ดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (2) ดินที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งพบประสิทธิภาพการกำจัด  $\text{NH}_3\text{-N}$  ใน ดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเมื่อเติม *B. polymyxa* KBS9 และ *B. subtilis* KMP-CU4 เพียง 25 และ 37% ตามลำดับ ส่วนในสภาวะที่เป็นดินที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ และเติม *B. polymyxa* KBS9 และ *B. subtilis* KMP-CU4 เช่นเดิม พบว่า ทั้งสองสายพันธุ์สามารถกำจัด  $\text{NH}_3\text{-N}$  ได้หมด 10 ppm ภายในเวลา 30 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตาม ในชุดควบคุม ที่ไม่เติมจุลินทรีย์ (เป็นดินเปล่าที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อและไม่เติมจุลินทรีย์เพิ่มเติม) พบว่าจุลินทรีย์ธรรมชาติ ยังคงมีความสามารถในการกำจัด  $\text{NH}_3\text{-N}$  ออกจากระบบได้เช่นกัน แต่จะเกิดขึ้นช้ากว่าชุดที่มีการเติม *B. polymyxa* KBS9 และ *B. subtilis* KMP-CU4 ประมาณ 12 ชั่วโมง ในทุกชุดการทดลองยังพบการสะสมของ  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  และ  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  ซึ่งอาจมาจากปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันที่เกิดขึ้นในระบบ แต่อยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อกุ้ง โดยพบปริมาณของไนไตรท์ 0.013 mg/L และไนเตรท 10.93 mg/L เท่านั้น

คำสำคัญ: Ammonia/ Nitrite/ Nitrate/ *B. polymyxa*/ *B. subtilis*

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest sincere gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Yuwapin Dandusitapunth, for all her guidance and support and for providing me with the opportunity to learn.

I also wish to express my advisory committee, Dr. Saengchai Akeprathumchai at KMUTT and Assoc. Prof. Dr. Thongchai Chalermchaikit (D.V.M., Ph.D.) from Chulalongkorn University for their approach for the teaching, helpful comment and support this work.

I appreciate to my industry advisors, Mr. Pairat Thitisak (D.V.M.), Ms. Sarocha Jirawatthanapong, Ms. Nongnuch Sirisukhodom and Mr. Anurak Roopchom for their constructive comments and helpful suggestion in experimental work. My sincere thankfulness is also to all staff in K.M.P. BIOTECH CO., LTD for their technical support, help, suggestion and enjoyment during my study.

I am very thankful to my friends at King Mongkut's University of Technology Thonburi, particularly at Microbial Fermentation Technology Laboratory and Mammalian Cell Culture Laboratory for their kindness and support in helping me so much.

My deepest appreciation goes to the "Partnership of Innovation and Knowledge Project" Scholarship provided by Bangkok Bank Public Company Limited and The Thailand Research Fund for financial support during my study.

Finally, my profound gratitude and love to my family, especially my parents and my sisters, who always support me in all possible means.

# CONTENTS

	PAGE
ENGLISH ABSTRACT	ii
THAI ABSTRACT	iii
ACKNOWLEDGEMENTS	v
CONTENTS	vi
LIST OF TABLES	viii
LIST OF FIGURES	x
LIST OF SYMBOLS AND ABBREVIATIONS	xi
 <b>CHAPTER</b>	
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
1.1 Research Background	1
1.2 Objectives	2
1.3 Scope of work	2
1.4 Expected outcome	2
<b>2. LITERATURE REVIEW</b>	<b>3</b>
2.1 Shrimp aquaculture	3
2.2 Biology of shrimp	3
2.3 Factor affecting the growth of shrimp	4
2.3.1 pH	4
2.3.2 Salinity	4
2.3.3 Temperature	4
2.3.4 Dissolved oxygen (DO)	5
2.3.5 Hydrogen sulfide	5
2.3.6 Ammonia	5
2.3.7 Nitrite	5
2.4 Nitrogen cycle	6
2.4.1 Nitrogen fixation	6
2.4.2 Assimilation	6
2.4.3 Nitrogen mineralization	6
2.4.4 Nitrification	7
2.4.5 De-nitrification	7
2.4.5.1 Assimilatory nitrate reduction	7
2.4.5.2 Dissimilatory nitrate reduction	8
2.4.6 Anaerobic ammonium oxidation (Anammox)	8
2.5 Application of probiotic in aquaculture	9
<b>3. MATERIALS AND METHODS</b>	<b>10</b>
3.1 Equipments	10
3.2 Chemical agents	10
3.3 Biological medium	11
3.4 Microorganisms	11
3.4.1 <i>Bacillus licheniformis</i>	11
3.4.2 <i>Bacillus polymyxa</i>	11
3.4.3 <i>Bacillus pumilus</i>	11
3.4.4 <i>Bacillus subtilis</i>	11
3.5 Preparation of Bacillus inoculums	11
3.5.1 Inoculum preparation for synthetic medium	11
3.5.2 Inoculum preparation for mud medium	11



3.6	Ammonia synthetic medium preparation	12
3.7	Nitrate synthetic medium preparation	12
3.8	Mud medium preparation	13
3.8.1	Sterile mud medium	14
3.8.2	Non-sterile mud medium	14
3.9	Analytical methods	14
3.9.1	Determination of ammonia	14
3.9.2	Determination of nitrite	16
3.9.3	Determination of nitrate	17
<b>4.</b>	<b>RESULTS AND DISCUSSION</b>	<b>19</b>
4.1	Selection of <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. polymyxa</i> and <i>B. pumilus</i> for ammonia, nitrite and nitrate reduction	19
4.1.1	The removal efficiency of ammonia, nitrite and nitrate from 9 strains of <i>Bacillus</i> in ammonia synthetic medium	19
4.1.2	The nitrate removal efficiency of 9 strains of <i>Bacillus</i> in nitrate synthetic medium	26
4.2	Ammonia, nitrite and nitrate reduction in mud medium (model pond)	33
4.2.1	The ammonia, nitrite and nitrate removal efficiency in sterile mud medium by <i>B. polymyxa</i> KBS9 and <i>B. subtilis</i> KMP-CU4	33
4.2.2	The ammonia, nitrite and nitrate removal efficiency in non-sterile mud medium by <i>B. polymyxa</i> KBS9 and <i>B. subtilis</i> KMP-CU4	37
<b>5.</b>	<b>CONCLUSION AND SUGGESTION</b>	<b>42</b>
5.1	Conclusion	42
5.1.1	Selection of <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. pumilus</i> and <i>B. polymyxa</i> strains for ammonia, nitrite and nitrate reductions	42
5.1.2	Ammonia, nitrite and nitrate reductions in mud medium by <i>B. polymyxa</i> KBS9 and <i>B. subtilis</i> KMP-CU4	42
5.2	Suggestion	42
	<b>REFERENCES</b>	<b>43</b>
	<b>APPENDICES</b>	<b>48</b>
	<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>68</b>

## LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
1.1	Removal efficiency of ammonia (NH <sub>3</sub> ), nitrite (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) and nitrate (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) by <i>B. subtilis</i> KMP-N001 and <i>B. licheniformis</i> KMP9 in feces medium incubated 37°C	1
1.2	The newly isolated 5 strains of Bacillus at K.M.P. Biotech Co., Ltd for ammonia, nitrite and nitrate removal efficiency test	2
3.1	Composition of Ammonia synthetic medium	12
3.2	Composition of Nitrate synthetic medium	13
4.1	The highest removal efficiencies (%) of NH <sub>3</sub> -N by <i>B. subtilis</i> (6 strains), <i>B. licheniformis</i> (2 strains) and <i>B. polymyxa</i> KBS9 in ammonia synthetic medium	24
4.2	The highest removal efficiencies (%) of NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N by <i>B. subtilis</i> (6 strains), <i>B. licheniformis</i> (2 strains) and <i>B. pumilus</i> KMP-T061 in nitrate synthetic medium	31
4.3	The removal efficiencies (%) of NH <sub>3</sub> -N by <i>B. polymyxa</i> KBS9 and <i>B. subtilis</i> KMP-CU4 in sterile mud medium	35
4.4	Concentrations of NH <sub>3</sub> -N, NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N and NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N in control set of sterile mud medium (no added culture)	35
4.5	The removal efficiencies (%) of NH <sub>3</sub> -N by <i>B. polymyxa</i> KBS9 and <i>B. subtilis</i> KMP-CU4 in non-sterile mud medium	40
B1.1	Time course of cell growth (OD <sub>660</sub> ) and ammonia, nitrite and nitrate reductions by <i>B. subtilis</i> KMP-BCD-1 grown in ammonia synthetic Medium	51
B1.2	Time course of cell growth (OD <sub>660</sub> ) and ammonia, nitrite and nitrate reductions by <i>B. subtilis</i> KMP-BCI-1 grown in ammonia synthetic medium	52
B1.3	Time course of cell growth (OD <sub>660</sub> ) and ammonia, nitrite and nitrate reductions by <i>B. subtilis</i> KMP-BCI-2 grown in ammonia synthetic medium	52
B1.4	Time course of cell growth (OD <sub>660</sub> ) and ammonia, nitrite and nitrate reductions by <i>B. subtilis</i> KMP-BCP-1 grown in ammonia synthetic medium	53
B1.5	Time course of cell growth (OD <sub>660</sub> ) and ammonia, nitrite and nitrate reductions by <i>B. subtilis</i> KMP-CU4 grown in ammonia synthetic Medium	53
B1.6	Time course of cell growth (OD <sub>660</sub> ) and ammonia, nitrite and nitrate reductions by <i>B. subtilis</i> KMP-N001 grown in ammonia synthetic medium	54
B1.7	Time course of cell growth (OD <sub>660</sub> ) and ammonia, nitrite and nitrate reductions by <i>B. licheniformis</i> KMP9 grown in ammonia synthetic medium	54
B1.8	Time course of cell growth (OD <sub>660</sub> ) and ammonia, nitrite and nitrate reductions by <i>B. licheniformis</i> KMP-N5001 grown in ammonia synthetic medium	55
B1.9	Time course of cell growth (OD <sub>660</sub> ) and ammonia, nitrite and nitrate reductions by <i>B. polymyxa</i> KBS9 grown in ammonia synthetic medium	56

B2.1	Time course of cell growth (OD <sub>660</sub> ) and nitrate reductions by <i>B. subtilis</i> KMP-BCD-1 grown in nitrate synthetic medium	57
B2.2	Time course of cell growth (OD <sub>660</sub> ) and nitrate reductions by <i>B. subtilis</i> KMP-BCI-1 grown in nitrate synthetic medium	57
B2.3	Time course of cell growth (OD <sub>660</sub> ) and nitrate reductions by <i>B. subtilis</i> KMP-BCI-2 grown in nitrate synthetic medium	58
B2.4	Time course of cell growth (OD <sub>660</sub> ) and nitrate reductions by <i>B. subtilis</i> KMP-BCP-1 grown in nitrate synthetic medium	58
B2.5	Time course of cell growth (OD <sub>660</sub> ) and nitrate reductions by <i>B. subtilis</i> KMP-BCP-1 grown in nitrate synthetic medium	59
B2.6	Time course of cell growth (OD <sub>660</sub> ) and nitrate reductions by <i>B. subtilis</i> KMP-N001 grown in nitrate synthetic medium	59
B2.7	Time course of cell growth (OD <sub>660</sub> ) and nitrate reductions by <i>B. licheniformis</i> KMP9 grown in nitrate synthetic medium	60
B2.8	Time course of cell growth (OD <sub>660</sub> ) and nitrate reductions by <i>B. licheniformis</i> KMP-N5001 grown in nitrate synthetic medium	61
B2.9	Time course of cell growth (OD <sub>660</sub> ) and nitrate reductions by <i>B. pumilus</i> KMP-T061 grown in nitrate synthetic medium	61
B3.1	Time course of cell growth (viable cells) and ammonia, nitrite and nitrate reductions by <i>B. polymyxa</i> KBS9 grown in sterile mud medium	62
B3.2	Time course of cell growth (viable cells) and ammonia, nitrite and nitrate reductions by <i>B. subtilis</i> KMP-CU4 grown in sterile mud medium	63
B3.3	Concentrations of ammonia, nitrite and nitrate in control set of sterile mud medium (no added culture)	63
B4.1	Time course of cell growth (viable cells) and ammonia, nitrite and nitrate reductions by <i>B. polymyxa</i> KBS9 grown in non-sterile mud medium	64
B4.2	Time course of cell growth (viable cells) and ammonia, nitrite and nitrate reductions in control set of <i>B. polymyxa</i> KBS9 (no added culture)	65
B4.3	Time course of cell growth (viable cells) and ammonia, nitrite and nitrate reductions by <i>B. subtilis</i> KMP-CU4 grown in non-sterile mud medium	66
B4.4	Time course of cell growth (viable cells) and ammonia, nitrite and nitrate reductions in control set of <i>B. subtilis</i> KMP-CU4 (no added culture)	67

## LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
2.1	The life cycle of penaeid shrimp	3
3.1	The reaction of ammonia, hypochlorite and phenol catalyzed by sodium nitroprusside	14
3.2	Standard curve of ammonia-nitrogen concentration (mg/L) at optical density 640 nm	15
3.3	The reaction of nitrite, sulfanilamide and N-(1-Naphthyl)-ethylenediamine- dihydrochloride	16
3.4	Standard curve of nitrite-nitrogen concentration (mg/L) at optical density 540 nm	17
3.5	Standard curve of nitrate-nitrogen concentration (mg/L) at optical density 540 nm	18
4.1	Time courses of cell growth, total sugar and $\text{NH}_3\text{-N}$ , $\text{NO}_2^-\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ reductions by <i>B. subtilis</i> (a) KMP-BCD-1, (b) KMP-BCI-1, (c) KMP-BCI-2, (d) KMP-BCP-1, (e) KMP-CU4 and (f) KMP-N001 in ammonia synthetic medium	20
4.2	Time courses of cell growth, total sugar and $\text{NH}_3\text{-N}$ , $\text{NO}_2^-\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ reductions by <i>B. licheniformis</i> (a) KMP9 and (b) KMP-N5001 in ammonia synthetic medium	22
4.3	Time courses of cell growth, total sugar and $\text{NH}_3\text{-N}$ , $\text{NO}_2^-\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ reductions by <i>B. polymyxa</i> KBS9 in ammonia synthetic medium	23
4.4	Time courses of cell growth, total sugar and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ reductions by <i>B. subtilis</i> (a) KMP-BCD-1, (b) KMP-BCI-1, (c) KMP-BCI-2, (d) KMP-BCP-1, (e) KMP-CU4 and (f) KMP-N001 in nitrate synthetic medium	27
4.5	Time courses of cell growth, total sugar and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ reductions by <i>B. licheniformis</i> (a) KMP9 and (b) KMP-N5001 in nitrate synthetic medium	29
4.6	Time courses of cell growth, total sugar and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ reductions by <i>B. pumilus</i> KMP-T061 in nitrate synthetic medium	30
4.7	Time course of cell growth and $\text{NH}_3\text{-N}$ , $\text{NO}_2^-\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ reductions by (a) <i>B. polymyxa</i> KBS9, (b) <i>B. subtilis</i> KMP-CU4 and (c) control set, in sterile mud medium	34
4.8	Time course of cell growth and reductions of $\text{NH}_3\text{-N}$ , $\text{NO}_2^-\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ by (a) <i>B. polymyxa</i> KBS9 and (b) control set (no added culture), in non-sterile mud medium	38
4.9	Time course of cell growth and reductions of $\text{NH}_3\text{-N}$ , $\text{NO}_2^-\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ by (a) <i>B. subtilis</i> KMP-CU4 and (b) control set (no added culture), in non-sterile mud medium	39

LIST OF SYMBOLS AND ABBREVIATIONS

cfu	=	Colony forming unit
°C	=	Degree Celsius
g	=	Gram
hrs	=	Hours
kg	=	Kilogram
L	=	Liter
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
min	=	Minute
M	=	Molar
nm	=	Nanometer
N	=	Normal
ppm	=	Parts per million
ppt	=	Parts per thousand
v/v	=	Volume by volume ratio
w/v	=	Weight by volume ratio
%	=	Percent