

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันนี้พบว่าส่วนใหญ่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยยังคงเป็นการเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิม เกษตรกรมักจะประสบปัญหาต่างๆ จากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น ปัญหาโรคระบาด ปัญหาน้ำเน่าเสียส่งผลให้สัตว์น้ำมีอัตราการตายเพิ่มมากขึ้น และการเกิดภาวะมลพิษในแหล่งน้ำธรรมชาติ เป็นต้น ต่อมาได้มีการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมาเป็นระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบน้ำหมุนเวียน ซึ่งเป็นระบบที่มีการผนวกกับเทคโนโลยีการบำบัดน้ำทั้งทางกายภาพ และการบำบัดทางชีวภาพ โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ เพื่อลดต้นทุนด้านการเพาะเลี้ยง และนำน้ำที่ใช้แล้วกลับมาใช้ใหม่ แต่ระบบดังกล่าวพบว่ายังประสบปัญหาการสะสมของสารประกอบไนโตรเจน โดยเฉพาะในรูปของไนเตรทในปริมาณที่สูงเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปในระยะเวลานาน แม้ว่าไนเตรทจะไม่มีพิษโดยตรงต่อสัตว์น้ำเหมือนกับแอมโมเนีย หรือไนไตรท์ก็ตาม แต่ไนเตรทในปริมาณสูงจะส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ อย่างไรก็ตามมีความต้องการแก้ปัญหาไนเตรทสะสมภายในระบบโดยอาศัยจุลินทรีย์ภายในระบบบำบัดน้ำเสีย ที่มีการพัฒนาไปเป็นเมือกชีวภาพ (Biofilm) เมื่อน้ำเสียถูกป้อนเข้าสู่ระบบสารอินทรีย์จะเคลื่อนตัวไหลผ่านชั้นเมือกชีวภาพแต่ละชั้น ทำให้จุลินทรีย์ทำการย่อยสลายไปทีละน้อยเหมือนผ่านการกรอง รวมถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรของจุลินทรีย์ควบคู่กับการเกิดขึ้นเมือกชีวภาพเพื่อให้ระบบมีประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรทสะสมอย่างสมบูรณ์ต่อไป

2.1 น้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

กิจกรรมด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจัดเป็นเกษตรกรรมที่มีความสำคัญและได้รับการพัฒนาขึ้นเป็นลำดับ ซึ่งมีพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงมากและสร้างผลตอบแทนกลับคืนอย่างรวดเร็ว ปัจจุบันมีพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงมาก โดยเฉพาะพื้นที่ชายฝั่งทะเลที่มีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงกุ้งทะเลมีพื้นที่ประมาณ 423,523 ไร่ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกร่อยมีพื้นที่ประมาณ 4,589.1 ไร่ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในกระชัง มีประมาณ 874 ไร่ ส่วนพื้นที่สำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดมีประมาณ 815,977 ไร่ (กรมควบคุมมลพิษ, 2555 : 7) มีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทำให้เกิดน้ำทิ้งที่มีความสกปรกไม่สูงมากนัก แต่ปริมาณน้ำทิ้งดังกล่าวทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้หลายรูปแบบ เช่น ทำให้คุณภาพน้ำของแหล่งรองรับน้ำทิ้งอยู่ในเกณฑ์ต่ำ ทำให้

ความอุดมสมบูรณ์ของดินลดลง และรวมถึงการเกิดปัญหาทุพภิกขภัย ซึ่งพบว่าในปี พ.ศ. 2541 กรมควบคุมมลพิษได้รายงานผลสำรวจและการประเมินปริมาณของเสียในพื้นที่เพาะเลี้ยงกุ้งชายฝั่งบริเวณทะเลอ่าวไทยและทะเลอันดามัน ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณของเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งชายฝั่ง

พื้นที่เพาะเลี้ยง นากุ้งชายฝั่ง	ปริมาณน้ำทิ้ง ลบ.ม./ไร่/วัน	บีโอดี กก./ไร่/วัน	ไนโตรเจน กก./ไร่/วัน	ฟอสฟอรัส กก./ไร่/วัน
ทะเลอ่าวไทย	28.15	0.234	0.19	0.007
ทะเลอันดามัน	20.8	0.139	0.57	0.004

ที่มา: กรมควบคุมมลพิษ (2541:4)

2.2 การบำบัดน้ำเสีย

การบำบัดน้ำเสีย หมายถึง การกำจัดหรือทำลายสิ่งปนเปื้อนในน้ำเสียให้หมดไป หรือเหลือน้อยที่สุดให้ได้มาตรฐานที่กำหนดและไม่ทำให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม น้ำเสียจากแหล่งต่างกันจะมีคุณสมบัติไม่เหมือนกัน ดังนั้นกระบวนการบำบัดน้ำเสียจึงมีหลายวิธี โดยวิธีการบำบัดน้ำเสียทั่วไปมี 3 วิธีคือ

2.2.1 วิธีการทางกายภาพ (Physical Treatment) เป็นวิธีการแยกเอาสิ่งเจือปนออกจากน้ำเสีย เช่น ของแข็งขนาดใหญ่ กระดาษ พลาสติก เศษอาหาร กรวด ทราย ไขมัน และน้ำมัน โดยใช้อุปกรณ์ในการบำบัดทางกายภาพ คือ ตะแกรงคัดขยะ ถังดักกรวดทราย ถังดักไขมัน และน้ำมัน และถังตกตะกอน ซึ่งจะเป็นการลดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่มีในน้ำเสียเป็นหลัก (กรมควบคุมมลพิษ. 2555 :24)

2.2.2 วิธีการทางเคมี (Chemical Treatment) เป็นวิธีการบำบัดน้ำเสียโดยใช้กระบวนการทางเคมี เพื่อทำปฏิกิริยากับสิ่งเจือปนในน้ำเสีย เช่น ค่าพีเอชสูงหรือต่ำเกินไป มีสารพิษ มีโลหะหนัก เป็นต้น (กรมควบคุมมลพิษ. 2555 : 25)

2.2.3 วิธีการทางชีวภาพ (Biological Treatment) เป็นวิธีการบำบัดน้ำเสียโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพหรือจุลินทรีย์ในการกำจัดสิ่งเจือปนในน้ำเสีย โดยเฉพาะสารอินทรีย์ ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส โดยความสกปรกเหล่านี้จะถูกใช้เป็นอาหารและเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ในการเจริญเติบโตทำให้น้ำเสียมีค่าความสกปรกลดลง โดยจุลินทรีย์เหล่านี้อาจเป็นแบบ

ใช้ออกซิเจนหรือไม่ใช้ออกซิเจน ระบบบำบัดน้ำเสียที่อาศัยหลักการทางชีวภาพ (กรมควบคุมมลพิษ. 2555 : 25) โดยการแบ่งระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ ถ้าพิจารณาจากลักษณะของการอยู่ของจุลินทรีย์ มี 2 แบบ คือ

2.2.3.1 แบบจุลินทรีย์แขวนลอย (Suspended System) ระบบแขวนลอยคือระบบที่มีตะกอนจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียลอยปะปนกับน้ำเสีย และกำจัดหรือบำบัดสิ่งสกปรก (สารอินทรีย์) ในน้ำเสียข้อดีของระบบนี้ได้แก่ ใช้พื้นที่น้อย เวลาบำบัดสั้น ไม่มีกลิ่น เป็นต้น ข้อเสียของระบบนี้ได้แก่ เป็นระบบที่ใช้พลังงานสูง จุลินทรีย์ไวต่อการเปลี่ยนแปลง ระบบล้มเหลวได้ง่าย และมักมีปัญหาเรื่องตะกอนลอยตัว เป็นต้น (สันทนต์ ศิริอนันต์ไพบูลย์. 2552 : 259) ระบบแบบจุลินทรีย์แขวนลอย ได้แก่

- ระบบตะกอนเร่ง (Activated-Sludge Process) เป็นระบบที่อาศัยจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย และนิยมใช้บำบัดน้ำเสียจากชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรม โดยทั่วไประบบนี้มีการเติมน้ำเสียเข้าสู่ถังบำบัดที่มีเชื้อจุลินทรีย์อยู่ในรูปของสารแขวนลอย และกวนผสมให้เข้ากันและปล่อยน้ำเสียออกจากถังบำบัดเข้าสู่ถังตกตะกอนเพื่อแยกเซลล์ของแบคทีเรียออกจากน้ำเสีย จากนั้นก็ปล่อยน้ำเสียออกสู่สิ่งแวดล้อม (Nguyena, Hilal, Hankins and Novakc. 2008 : 103-110)

- ระบบบำบัดน้ำเสียแบบบ่อปรับเสถียร (Stabilization Pond) เป็นระบบบำบัดน้ำเสียที่อาศัยธรรมชาติในการบำบัดสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ซึ่งแบ่งตามลักษณะการทำงานได้ 3 รูปแบบ คือ บ่อแอนแอโรบิก (Anaerobic Pond) บ่อแฟคัลทีทีฟ (Facultative Pond) บ่อแอโรบิก (Aerobic Pond) และหากมีบ่อหลายบ่อต่อเนื่องกัน บ่อสุดท้ายจะทำหน้าที่เป็นบ่อบ่ม (Maturation Pond) เพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งก่อนระบายออกสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งโดยปกติระบบบ่อปรับเสถียรจะมีการต่อกันแบบอนุกรมอย่างน้อย 3 บ่อ (กรมควบคุมมลพิษ. 2555 : 62)

- ระบบบำบัดน้ำเสียแบบบ่อเติมอากาศ (Aerated Lagoon, AL) เป็นระบบบำบัดน้ำเสียที่อาศัยหลักการทำงานของจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งตัวระบบจะมีการเติมออกซิเจนจากเครื่องเติมอากาศที่ติดตั้งแบบทุ่นลอยหรือยึดติดกับแท่นก็ได้ เพื่อเพิ่มออกซิเจนในน้ำให้มีปริมาณเพียงพอ สำหรับจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ทำให้สามารถลดปริมาณความสกปรกของน้ำเสียในรูปของค่าบีโอดี ได้ร้อยละ 80-95 (กรมควบคุมมลพิษ. 2555 : 70)

2.2.3.2 แบบจุลินทรีย์ยึดเกาะกับตัวกลาง (Attached-Growth System) เป็นระบบที่จุลินทรีย์จะเข้าไปยึดเกาะกับตัวกลางแล้วพัฒนากลายเป็นเมือกชีวภาพบนพื้นผิวตัวกลางภายในระบบการบำบัดน้ำ โดยตัวกลางดังกล่าวอาจจะถูกยึดอยู่กับที่ คือ เคลื่อนที่ไม่ได้ภายใน

ถึงบำบัด (Fixed bed) หรือ ตัวกลั่นนั้นสามารถเคลื่อนที่ได้ในถึงบำบัด(Moving bed) (สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์. 2552 : 347) ซึ่งเมื่อน้ำเสียถูกป้อนเข้าสู่ระบบสารอินทรีย์จะเคลื่อนตัวไหลผ่านชั้นเมือกชีวภาพแต่ละชั้น ทำให้จุลินทรีย์ทำการย่อยสลายไปที่ละน้อยเหมือนผ่านการกรอง ข้อดีของระบบนี้ ได้แก่ บำบัดน้ำเสียที่มีความเข้มข้นสูงหรือบำบัดยาก ไม่ทำให้ระบบล้มเหลว เนื่องจากการสัมผัสระหว่างน้ำเสียและจุลินทรีย์เป็นเวลานาน ๆ มวลจุลินทรีย์หนัก ตกตะกอนง่าย ไม่มีปัญหาการลอยตัว เป็นต้น ข้อเสียของระบบนี้ ได้แก่ ในบางครั้งจะมีกลิ่น ตะกอนจุลินทรีย์ หนาตกแข็งได้ช้า ท่อกระจายน้ำเสียอุดตันได้ง่าย อากาศและอาหารเป็นข้อจำกัดการเจริญของ จุลินทรีย์ที่อยู่ด้านในติดกับตัวกลั่น เป็นต้น ระบบแบบจุลินทรีย์ยึดเกาะกับตัวกลั่น ได้แก่

- ระบบโปรยกรอง (Trickling Filter) เป็นระบบบำบัดน้ำเสียที่ใช้ จุลินทรีย์ที่ยึดเกาะบนวัสดุตัวกลั่น โดยน้ำเสียจะถูกโปรยกระจายไปทั่วบนพื้นผิวของถังภายใน ระบบหลังจากนั้นก็ปล่อยน้ำเสียออกและสูบน้ำกลับเข้าระบบใหม่ (กรมโรงงานอุตสาหกรรม. 2545 : 36) ปัจจุบันระบบโปรยกรองมีตัวกลั่นเป็นแบบที่มีช่องว่างเพื่อให้มีความแข็งแรง และ น้ำหนักเบา

- ระบบแผ่นหมุนชีวภาพ (Rotating Biological Contactor : RBC) เป็นระบบที่อาศัยจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจน จุลินทรีย์จะยึดเกาะที่ผิวตัวกลั่นที่ทำจากพลาสติก PF (Phenol – Formaldehyde) หรือ HDPE (Polyethylene High-Density) เรียงซ้อนกันในขณะที่ ตัวกลั่นหมุน จุลินทรีย์ที่เกาะผิวตัวกลั่นจะรับออกซิเจน และช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ตลอด ระยะเวลาที่ตัวกลั่นหมุน (กรมโรงงานอุตสาหกรรม. 2545 : 36)

- Anaerobic Filter Process (AF) เป็นระบบเชื้อจุลินทรีย์จะอยู่ใน ลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มอยู่บนผิวตัวกลั่น หรือช่องว่างระหว่างตัวกลั่นที่อยู่กับที่ เช่น ก้อนหิน พลาสติก อิฐ ฯลฯ น้ำเสียจะสัมผัสกับจุลินทรีย์โดยการไหลขึ้น (Up Flow) หรือ ไหลลง (Down Flow) ผ่านถึงบำบัดซึ่งมีตัวกลั่นบรรจุอยู่ น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วจะไหลออกทางด้านตรงข้ามกับ น้ำเสียที่ไหลเข้าถึงบำบัด

- Anaerobic Fluidized Bed Process (AFB) เป็นระบบดัดแปลงใช้ ตัวกลั่นที่มีพื้นที่ผิวมากๆ เพื่อลดปัญหาการอุดตัน โดยเชื้อจุลินทรีย์จะอยู่บนเม็ดตัวกลั่น อัตราการ ไหลต้องมีขนาดพอเหมาะที่จะยกเม็ดตัวกลั่นให้ลอยขึ้น แต่ก็ไม่มากพอที่จะทำให้เม็ดจุลินทรีย์ หลุดออกจากระบบ

- Upflow Anaerobic Sludge Blanket Process (UASB) เป็น ระบบที่มีทิศทางการไหลของน้ำเสียจากข้างล่างขึ้นข้างบน (Up Flow) ทำให้น้ำเสียเข้าสัมผัสกับชั้น ตะกอนของกลุ่มจุลินทรีย์ทางด้านล่าง (Chong, Sen, Kayaalp and An . 2012 : 3434-3470) ซึ่ง

จุลินทรีย์จะคอยทำหน้าที่ย่อยสลายของเสียที่อยู่ในรูปสารอินทรีย์ ทำให้ปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียลดลงได้ร้อยละ 90-95 และเปลี่ยนไปเป็นก๊าซชีวภาพ ซึ่งประกอบด้วยก๊าซมีเทนในอัตราส่วนร้อยละ 60-65

2.3 เมื่อกชีวภาพ (Biofilm)

2.3.1 ความหมาย

เมื่อกชีวภาพ (Biofilm) เป็นชั้นของจุลินทรีย์ที่เกิดจากการรวมกันของเซลล์จุลินทรีย์ที่ไปเข้ายึดเกาะบนพื้นผิวตัวกลาง ภายในระบบการบำบัดน้ำหรือระบบกรองน้ำ ซึ่งเซลล์แบคทีเรียเหล่านี้จะสร้างสารผลิตภัณฑ์ในกลุ่มสารพอลิเมอร์ที่มีชื่อเรียกโดยทั่วไปว่า “Extracellular Polymer Substance (EPS)” ซึ่งจะเป็นสารที่ยึดเกาะจุลินทรีย์ต่างๆ ที่อาศัยในชั้นเมื่อกชีวภาพเข้าด้วยกัน ซึ่งสารพอลิเมอร์นี้จะมีลักษณะคล้ายกับวุ้นและมีลักษณะลื่น รูปแบบการเจริญเติบโตในแต่ละขั้นตอนของจุลินทรีย์ที่กลายไปเป็นเมื่อกชีวภาพ พบว่าในแต่ละสภาพแวดล้อมจะมีความแตกต่างกัน เช่น ชนิดของชุมชนแบคทีเรียภายในเมื่อกชีวภาพ ประสิทธิภาพการทำงาน ปริมาณของชุมชนแบคทีเรียภายในเมื่อกชีวภาพ เป็นต้น

2.3.2 ขั้นตอนการเกิดเมื่อกชีวภาพ

การเกิดของเมื่อกชีวภาพ เป็นผลรวมสุทธิของกระบวนการทางกายภาพทางเคมี และทางชีวภาพ ที่มีขั้นตอนการเกิดตามลำดับดังนี้ (ภาพที่ 1)

ระยะที่ 1 การทำให้สภาพพื้นผิวเหมาะต่อการยึดเกาะ (Surface Conditioning) ในขั้นแรกนี้พบว่าการเคลื่อนย้ายสารอินทรีย์ และจุลินทรีย์จะไหลมาพร้อมกับน้ำ แล้วบางส่วนก็ตกลงไปสัมผัสพื้นผิวของท่อและสร้างเป็นแผ่นฟิล์มบางคลุมผิวอยู่ เรียกว่า “Conditioning Film” นอกจากนั้นยังพบว่าสารอินทรีย์ที่ไหลมาพร้อมน้ำนั้น แบคทีเรียภายในเมื่อกชีวภาพใช้สารอินทรีย์เหล่านี้เป็นแหล่งอาหาร (Dreeszen, 2003 : 1-20)

ระยะที่ 2 การยึดเกาะของแบคทีเรีย (Adhesion of “Pioneer” Bacteria) เป็นระยะที่เซลล์จำนวนหนึ่งที่กระจายอยู่ในน้ำ และต้องลอยไปมาอย่างอิสระตามความแรงของน้ำ เซลล์จำนวนหนึ่งที่เกาะติดอยู่บนผนังของผิวของวัสดุตัวกลางได้ชั่วขณะหนึ่ง และบางส่วนที่หลุดออกมาจากผนังของผิวตัวกลาง ขั้นตอนนี้เรียกว่า “Reversible Absorption” (Dreeszen, 2003 : 1-20) การหลุดจากเซลล์อาจเกิดจากแรงดัน (Shear Force) ของของไหล นอกจากนั้นเซลล์แบคทีเรีย

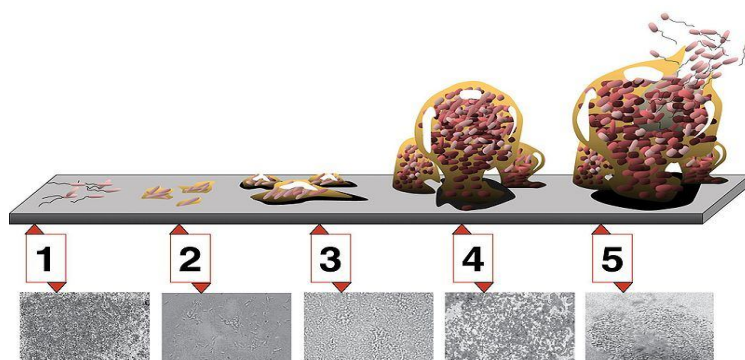
บางส่วนจะเคลื่อนที่เข้าไปเกาะติดอยู่กับ “Conditioning Film” บนผิวของท่อกลายเป็นเมือกชีวภาพชั้นสอง (boundary layer)

ระยะที่ 3 การสร้างเมือก (Glycocalyx or ‘Slime’ Formation) ในขั้นนี้เซลล์แบคทีเรียจะผลิตกันท์อย่างหนึ่ง คือสารพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า “ Extracellular Polymer Substance (EPS)” ซึ่งจะเป็นสารที่จับเมือกชีวภาพเข้าด้วยกัน ซึ่งเซลล์ของแบคทีเรียที่รวมตัวกันจนกลายเป็นเมือกชีวภาพนี้จะถูกดูดซับแบบถาวร และมีการแพร่ขยายไปตามผนังของผิวของตัวกลาง และใช้สารอาหารที่อยู่โดยรอบเป็นแหล่งอาหารเพื่อเพิ่มจำนวน และเมือกชีวภาพจะมีลักษณะคล้ายกับวุ้นมีลักษณะลื่นๆหยาบ (Dreeszen. 2003 : 1-20)

ระยะที่ 4 การรวมกลุ่มขั้นที่สอง (Secondary Colonizers) การรวมกลุ่มขั้นที่สองของการเกิดเมือกชีวภาพนั้นนอกจากโมเลกุลของสารอาหารแล้วยังมีพวก Exopolymer ที่ทำให้เกิดเส้นใยหรือเกิดการจับกันเป็นกลุ่มก้อน ซึ่งเกิดจากเซลล์ของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยผ่านทางกระบวนการทางกายภาพ และกระบวนการเกิดไฟฟ้าสถิต ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะมีการผลิตสารจากกระบวนการเมทาบอลิซึม โดยใช้พลังงานจากสารอาหารในน้ำและสารบางอย่างจะถูกกำจัดออกจากเซลล์ (Dreeszen. 2003 : 1-20)

ระยะที่ 5 เจริญเติบโตเต็มที่และการกระจาย (Fully Functioning Biofilm) เป็นขั้นที่เมือกชีวภาพมีการเจริญเติบโตเต็มที่ซึ่งจะมีลักษณะเป็นก้อนๆซึ่งจะประกอบไปด้วยชุมชนแบคทีเรียชนิดต่างๆ ซึ่งพบว่าภายในของชั้นเมือกชีวภาพจะเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ชอบออกซิเจน (Dreeszen. 2003 : 1-20) และชั้นนอกของชั้นเมือกชีวภาพจะเป็นพวกที่ชอบออกซิเจน นอกจากนั้นยังพบว่าไนโตรเจนและไนเตรตยังเป็นผลผลิตในกระบวนการเผาผลาญในสภาวะไม่มีอากาศภายในชั้นกลางของเมือกชีวภาพ (Wiesmann, Choi and Dombrowsk. 2007 : 240-241) นอกจากนี้พบว่าเซลล์บางส่วนจะหลุดออกและไหลไปตามการไหลของน้ำ และสารอินทรีย์ที่ไหลไปตามกระแสน้ำจะเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญเติบโตของเมือกชีวภาพ (Dreeszen. 2003 :1-20)

มีรายงานว่าได้มีการนำเอาแนวทางชีวโมเลกุล มาศึกษาการก่อตัวของเมือกชีวภาพจากจุลินทรีย์ต่างๆ หรือแม้กระทั่งจากเชื้อรา และการศึกษาการก่อตัวของเมือกชีวภาพนั้นยังสะท้อนให้เห็นถึงลักษณะของเซลล์ และการตอบสนองต่อความหลากหลายสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการพัฒนาแบคทีเรียไปเป็นเมือกชีวภาพ (O'Toole, Kaplan and Kolter. 2000 : 49-79) นอกจากนั้นยังพบอีกว่าการเกิดเมือกชีวภาพสามารถเกิดได้ในทุกที่ นอกจากนี้พบว่าอิทธิพลทางสิ่งแวดล้อมเป็นตัวแปรสำคัญของการเกิดเมือกชีวภาพ (Lindsay and Von. 2006 : 313-325)



ภาพที่ 1 ระยะการเกิดBiofilm (1) ระยะที่ 1 Surface conditioning (2) ระยะที่ 2 Adhesion of “Pioneer” of “Pioneer” Pacteria (3) ระยะที่ 3 Glycocalyx or ‘Slime’ Formation (4) ระยะที่ 4 Secondary Colonizers และ (5) ระยะที่ 5 Fully Functioning Biofilm (ที่มา:<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Biofilm.jpg>)

2.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาและการเจริญเติบโตของเมือกชีวภาพ

ปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาและการเจริญเติบโตของเมือกชีวภาพ ประกอบด้วย (Dreeszen, 2003 : 1-20)

2.3.3.1 พื้นที่ผิว (Surface Area) พบว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อการพัฒนาและการเจริญเติบโตของเมือกชีวภาพในระบบการบำบัดน้ำเสีย ซึ่งสภาพพื้นผิวนั้นปรากฏว่ามีผลต่อการเพิ่มการเกาะติดของเมือกชีวภาพเช่น Reverse Osmosis Membranes (RO Membranes), DI Resins, Storage Tanks, Cartridge Filters และ Piping Systems เป็นต้น ซึ่งพื้นที่ผิวนั้นจะเป็นตัวกำหนดความเหมาะสมต่อการเกาะติด และการเจริญเติบโตสำหรับเซลล์แบคทีเรีย รวมทั้งสิ่งมีชีวิตเล็กๆที่ลอยอยู่ในน้ำ

2.3.3.2 ความลื่นของพื้นผิว (Surface Smoothness) เป็นปัจจัยปัจจัยหนึ่งต่อการยึดเกาะของเมือกชีวภาพบนพื้นผิว และถ้าพื้นผิวมีลักษณะลื่นจะพบว่าการเกาะตัวของเซลล์แบคทีเรียและพัฒนาไปเป็นเมือกชีวภาพนั้นมีลักษณะบางและมีการก่อตัวเป็นเมือกชีวภาพช้า แต่เมื่อเวลาผ่านไปพื้นผิวที่มีลักษณะลื่นนี้จะไม่มีผลกระทบต่อการเกิดเมือกชีวภาพ

2.3.3.3 ความเร็วของการไหลของน้ำเสีย (Flow Velocity) พบว่าไม่เป็นอุปสรรคต่อการยึดติดของเซลล์แบคทีเรีย แต่จะเป็นตัวกำหนดความหนาของเมือกชีวภาพ

2.3.3.4 สารอาหารจำกัด (Limited Nutrients) พบว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆ รวมทั้งจุลินทรีย์ ซึ่งพบว่าการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ต้องการสารอาหารเพื่อ

การเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ (สำหรับสัตว์หรือคน) หรือการจำลองตัวเอง (สำหรับแบคทีเรีย) นอกจากนี้ยังพบว่าสารอินทรีย์แม้เพียงเล็กน้อยก็มีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย

2.3.4 เมื่อพิจารณาภาพกับการบำบัดน้ำเสีย

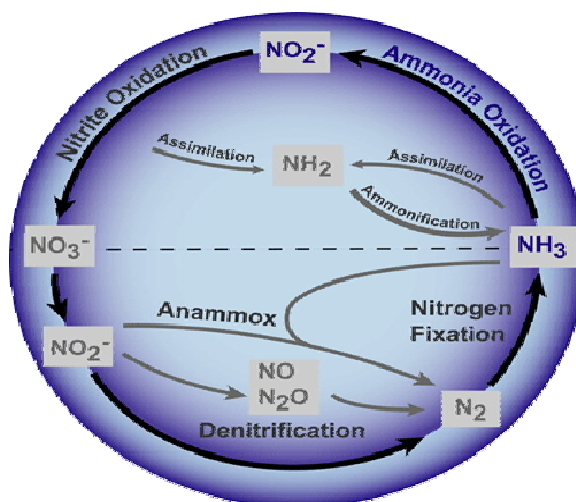
เมื่อพิจารณาภาพเป็นตะกอนของเซลล์แบคทีเรียที่มากเกาะรวมกันจนกลายมาเป็นเมื่อพิจารณาภาพที่อยู่ในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ในระบบบำบัดน้ำเสียทั่วไป เครื่องมือการแพทย์ทั่วไป ในสภาพแวดล้อมทั่วไปที่มีความชื้น เป็นต้น ซึ่งเมื่อพิจารณาภาพที่อยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียส่วนใหญ่ พบว่าเป็นกลุ่มแบคทีเรียในไตรฟองที่ทำหน้าที่บำบัดแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ด้านบน ส่วนเมื่อพิจารณาภาพด้านล่างพบว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่มดีไนไตรฟองที่ทำหน้าที่บำบัดไนเตรทและไนไตรท์ไปเป็นก๊าซไนโตรเจน ซึ่งในระบบจะมีการเติมออกซิเจนเพื่อเป็นการเพิ่มออกซิเจนให้แก่ระบบ ซึ่งเมื่อน้ำเสียถูกป้อนเข้าสู่ระบบสารอินทรีย์จะเคลื่อนตัวไหลผ่านชั้นเมื่อพิจารณาภาพแต่ละชั้น โดยอาศัยจุลินทรีย์ภายในระบบบำบัดน้ำเสีย ที่มีการพัฒนาไปเป็นเมื่อพิจารณาภาพ เมื่อน้ำเสียถูกป้อนเข้าสู่ระบบสารอินทรีย์จะเคลื่อนตัวไหลผ่านชั้นเมื่อพิจารณาภาพแต่ละชั้น ทำให้จุลินทรีย์ทำการย่อยสลายไปทีละน้อยเหมือนผ่านการกรอง รวมถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรของจุลินทรีย์ควบคู่กับการเกิดขึ้นเมื่อพิจารณาภาพ เพื่อให้ระบบมีประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรทสะสมอย่างสมบูรณ์ต่อไป (Andersson, 2009 : 7-18)

2.4 วัฏจักรของไนโตรเจน (Nitrogen Cycle)

ไนโตรเจนมีความสำคัญต่อระบบนิเวศวิทยาของแหล่งน้ำมาก เพราะเป็นส่วนประกอบของอินทรีย์สารหลายชนิดที่มีความสำคัญต่อความเป็นอยู่ของพืชและสัตว์ โดยสารประกอบไนโตรเจนที่เกี่ยวข้องกับน้ำเสียนั้นประมาณ 60 % มาจากสารอินทรีย์ เช่น โปรตีน, กรดนิวคลีอิก, ATP/ADP และยูเรีย ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ตั้งต้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (Wiesmann, Choi and Dombrowski, 2007 : 227) ซึ่งสารเหล่านี้เป็นส่วนประกอบของร่างกายพืชและสัตว์ เป็นต้น (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2545 : 50) และอีก 40% นั้นมาจากสารอนินทรีย์ (Wiesmann et al. 2007 : 227) เช่น แอมโมเนีย (NH_3) ไนไตรท์ (NO_2^-) และ ไนเตรท (NO_3^-) ซึ่งสารพวกนี้จะอยู่ในรูปของปุ๋ย หรืออยู่ในรูปของเกลือในปัสสาวะ (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2545 : 50)

การเปลี่ยนรูปของไนโตรเจนจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาทางชีวภาพ โดยมีสภาพแวดล้อมเป็นตัวกำหนด ถ้าอยู่ในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงพอ ปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายของการเปลี่ยนรูปของไนโตรเจนจะได้ไนเตรท เรียกว่า กระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification) แต่ถ้า

สภาพแวดล้อมนั้นไม่มีออกซิเจน ก็จะเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification) ซึ่งได้ผลผลิตเป็นก๊าซไนโตรเจน (ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2545 : 50) ซึ่งกระบวนการทั้ง 2 กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นโดยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำเสียตามธรรมชาติ (Wiesmann et al. 2007 : 227) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 วงจรของไนโตรเจน (ที่มา: <http://stahl.ce.washington.edu/projects/ammox.html>)

วัฏจักรไนโตรเจนเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบไนโตรเจนตั้งแต่การอยู่ในรูปก๊าซ สารอินทรีย์ หรือสารอนินทรีย์ โดยกระบวนการที่หลากหลายและส่วนมากจะมีจุลินทรีย์เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย ได้แก่

2.4.1 กระบวนการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen Fixation)

เป็นการรีดิวซ์ก๊าซไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียม (NH_4) แล้วเปลี่ยนแอมโมเนียให้อยู่ในรูปสารอินทรีย์ แม้ว่าในบรรยากาศของโลกจะประกอบไปด้วยก๊าซไนโตรเจนเป็นหลัก แต่สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ไม่สามารถรีดิวซ์ก๊าซไนโตรเจนได้ เนื่องจากใช้พลังงานอย่างมากในการสลายพันธะไนโตรเจน มีเพียงแบคทีเรียไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถทำได้ (Madigan, Martinko and Parker. 2003 : 67) การตรึงไนโตรเจนแบ่งออกเป็น 2 แบบคือ การตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ (Nonsymbiotic Nitrogen Fixation) จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง เช่น *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Anabaena* และ *Noctoc* และการตรึงไนโตรเจนแบบพึ่งพาสีมีชีวิตร่วมกัน (Symbiotic Nitrogen Fixation) จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง เช่น *Rhizobium* เป็นต้น เอนไซม์ที่มีบทบาทในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเหล่านี้เรียกว่า เอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase) ประกอบไปด้วยเอนไซม์

ย่อยสองส่วนคือ เอนไซม์ไดไนโตรจีเนส (Dinitrogenase) และ เอนไซม์ไดไนโตรจีเนสรีดักเตส (Dinitrogenase Reductase) ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน *nif* (Bitton, 1994 : 54-56 ; Madigan et al. 2003 : 67)

2.4.2 กระบวนการแอสสิมิชัน (Assimilation)

เป็นการนำเอาไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียไปใช้ในการสร้างเซลล์เพื่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต โดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม Heterotrophic และกลุ่ม Autotrophic สามารถนำเอาทั้งแอมโมเนียและไนเตรทไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิกเพื่อสร้างเซลล์ซึ่งไนโตรเจนในรูปที่เหมาะสมที่สุดสำหรับจุลินทรีย์ คือ แอมโมเนีย แต่ถ้าไม่มีแอมโมเนียจุลินทรีย์สามารถใช้เอนไซม์ไนเตรทรีดักเตส (Nitrate Reductase) รีดิวซ์ไนเตรทไปเป็นไนตรัท แล้วใช้เอนไซม์ไนไตรท์รีดักเตส (Nitrite Reductase) รีดิวซ์ไนไตรท์เป็นแอมโมเนีย แล้วจึงนำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2545 : 65)

2.4.3 กระบวนการแอมโมนิฟิเคชัน (Ammonification)

แอมโมนิฟิเคชันเป็นการเปลี่ยนสารประกอบอินทรีย์ในไนโตรเจนให้อยู่ในรูปสารอินทรีย์ในไนโตรเจนหรือเรียกอีกอย่างว่า “ การเปลี่ยนแปลงแร่ธาตุ ” (Nitrogen Mineralization) แบคทีเรียที่มีบทบาทในขั้นตอนนี้ ส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์พวกเฮเทอโรโทรฟ (Heterotroph) เช่น แบคทีเรียพวก Ammonifying Bacteria เช่น *Bacillus* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp. เป็นต้น แอคติโนมัยซีตีส และเชื้อเห็ดรา (Fungi) เป็นต้น ซึ่งพบได้ในชั้นน้ำและดินตะกอนก้นบ่อ กระบวนการดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจน และสภาวะไร้ออกซิเจน ซึ่งกระบวนการดังกล่าวพบว่าสามารถเกิดขึ้นได้ดีในบริเวณผิวชั้นดินตะกอนใต้น้ำ ซึ่งเป็นบริเวณที่มีสารอินทรีย์มากที่สุดซึ่งบทบาทในกระบวนการสารอินทรีย์ในไนโตรเจนหรือโปรตีนจะถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียได้จะต้องการลดรูปเป็นเปปไทด์ (Peptides) หรือกรดอะมิโนก่อนด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน แล้วจากนั้นจะถูกลดเอมีน (Deamination) เป็นแอมโมเนีย (NH_3) แอมโมเนียที่เกิดขึ้นมักไม่อยู่ในรูปแอมโมเนียอิสระ (NH_3) ในน้ำเสียทั่วไปพีเอช (pH) เป็นกรดหรือเป็นกลางแอมโมเนียจึงอยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียม (NH_4^+) แต่หากพีเอชสูงขึ้นแอมโมเนียมจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของแอมโมเนีย (NH_3) ซึ่งอาจถูกปล่อยขึ้นสู่บรรยากาศได้ (Bitton, 1994 : 54)

2.4.4 กระบวนการไนตริฟิเคชัน(Nitrification)

ไนตริฟิเคชันเป็นการออกซิไดส์แอมโมเนียให้เป็นไนเตรท โดยอาศัยการทำงานของแบคทีเรียที่เรียกว่า “แบคทีเรียไนตริไฟอิง” (Nitrifying Bacteria) มีสองขั้นตอนหลักคือ เปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนไตรท์ และเปลี่ยนจากไนไตรท์เป็นไนเตรท (van Loosdrecht and Jetten. 1998 : 1-7) ขั้นตอนแรกเป็นการออกซิไดส์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์เกิดจากแบคทีเรียกลุ่ม AOB (Ammonia Oxidizing Bacteria) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์สองชนิดคือ แอมโมโนออกซิจีเนส (Ammonia Monooxygenase) (Hooper, Vannelli, Bergmann and Arciero. 1997 : 59-67) ออกซิไดส์ให้กลายเป็นไฮดรอกซิลามีน (Hydroxylamine, NH_2OH) และเอนไซม์ไฮดรอกซิลามีนออกซิโดรีดักเตส (Hydroxylamine Oxidoreductase) (Bergmann, Arciero and Hooper. 1994 : 3148-3153) ทำการออกซิไดส์ไฮดรอกซิลามีนให้กลายเป็นไนไตรท์ ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนนี้เช่น *Nitrosomonas* sp., *Nitrospira* sp., *Nitrosococcus* sp. และ *Nitrosolobus* sp. เป็นต้น

ขั้นตอนที่สองของกระบวนการไนตริฟิเคชัน คือการเปลี่ยนจากไนไตรท์ให้เป็นไนเตรท โดยการทำงานของแบคทีเรียกลุ่ม NOB (Nitrite Oxidizing Bacteria) อาศัยการทำงานของเอนไซม์ไนไตรท์ออกซิโดรีดักเตส (Nitrite Oxidoreductase) ออกซิไดส์ไนไตรท์ให้เป็นไนเตรท แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนนี้เช่น *Nitrospira* sp., *Nitrobacter* sp., *Nitrosococcus* sp. เป็นต้น

แหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียไนตริไฟอิงได้จากหลายแหล่ง เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbondioxide) ไบคาร์บอเนต (Bicarbonate) และคาร์บอเนต (Carbonate) เป็นต้น ผลของการเกิดไนตริฟิเคชันมีผลทำให้เกิดกรดซึ่งอาจมีผลต่อค่าพีเอชในน้ำเสียลดลงได้ อัตราการเจริญเติบโตของ *Nitrobacter* sp. พบว่าสูงกว่า *Nitrosomonas* sp. ดังนั้นข้อจำกัดของการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชัน คือการเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ของ *Nitrosomonas* sp. แม้ว่าในธรรมชาติส่วนใหญ่จะพบแบคทีเรียไนตริไฟอิง แบบ Autotroph แต่ในบางครั้งกระบวนการไนตริฟิเคชันอาจเกิดจากแบคทีเรียกลุ่ม Heterotrophic เช่น *Arthrobacter* หรือเชื้อเห็ดราบางชนิดเช่น *Aspergillus* โดยกลุ่มนี้จะใช้สารอินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอน อย่างไรก็ตามกระบวนการไนตริฟิเคชันจากจุลินทรีย์แบบ Heterotroph เกิดได้ช้ากว่าจุลินทรีย์แบบ Autotroph (Bitton. 1994 : 54-55)

2.4.5 กระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification)

กระบวนการดีไนตริฟิเคชันเป็นการรีดิวซ์ไนเตรทให้เป็นก๊าซไนโตรเจน โดยผ่านสารตัวกลางหลายตัว คือ ไนไตรท์ (NO_2^-) ไนตริกออกไซด์ (NO) และไนตรัสออกไซด์ (N_2O) (van Loosdrecht and Jetten. 1998 : 1-7) โดยกระบวนการดังกล่าวอาศัยการทำงานของ

เอนไซม์หลายชนิด (Bothe, Jost, Schlöter, Ward and Witzel, 2000 : 673-690) กลไกที่สำคัญในการรีดิวซ์ไนเตรทมีสองแบบ คือ การรีดิวซ์ไนเตรทแบบแอสสิมิเลชัน (Assimilatory Nitrate Reduction : ANR) และการรีดิวซ์ไนเตรทแบบดิสสิมิเลชัน (Dissimilatory Nitrate Reduction : DNR) (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2545 : 102) โดย ANR เป็นการนำแอมโมเนีย (NH_3) ไปใช้ในการสร้างเซลล์ของแบคทีเรียจึงไม่ค่อยมีบทบาทในการบำบัดน้ำเสียมากนัก ส่วน DNR เป็นการหายใจแบบไร้อากาศของแบคทีเรียโดยใช้ไนเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ไนเตรท (NO_3^-) จะถูกรีดิวซ์เป็นไนตรัสออกไซด์ (NO) และก๊าซไนโตรเจน (N_2) ตามลำดับ

โดยแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงมีทั้งแบบ Heterotroph และ Autotroph เช่นเดียวกับแบคทีเรียไนตริไฟอิง แต่แบบ Heterotroph จะมีบทบาทในการบำบัดน้ำเสียมากกว่า (Bothe et al. 2000 : 673-690) แบคทีเรียดีไนตริไฟอิง (Denitrifying Bacteria) แบบที่เป็น Heterotroph นี้จะใช้สารอินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนในการลดรูปไนโตรเจนทุกขั้นตอน สำหรับน้ำทิ้งที่มีแหล่งคาร์บอนน้อยจำเป็นต้องมีการเติมแหล่งคาร์บอนจากภายนอกเข้าไปเพื่อให้เกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันได้อย่างสมบูรณ์ (van Loosdrecht and Jetten, 1998 : 1-7) แหล่งคาร์บอนที่มีการนำมาใช้ เช่น เมทานอล (Methanol) อะซิเตท (Acetate) เอทานอล (Ethanol) แลคเตท (Lactate) และกลูโคส (Glucose) เป็นต้น (Khin and Annachhatre, 2004 : 519-532)

2.4.5.1 ปัจจัยที่ควบคุมการเกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน

กระบวนการดีไนตริฟิเคชันมีปัจจัยการควบคุมดังนี้

2.4.5.1.1 พีเอช (pH) พีเอชที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงอยู่ในช่วง 6.5-8.5 (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2545 : 103) ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียด้วยกระบวนการดีไนตริฟิเคชันพีเอชที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 7.0-7.5 และพบว่าช่วงพีเอชดังกล่าวมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ของกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Wiesmann et al. 2007 : 240-241)

2.4.5.1.2 ออกซิเจน ออกซิเจนที่มีผลต่อกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน โดยจะส่งผลให้อัตราเร็วของการเกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันลดลง เพราะในกระบวนการถ่ายเทออกซิเจน ก็สามารถรับอิเล็กตรอนได้เช่นเดียวกับไนเตรท โดยค่าออกซิเจนละลายน้ำหากมีค่ามากกว่า 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2545 : 104)

2.4.5.1.3 แหล่งคาร์บอน ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในกระบวนการดีไนตริฟิเคชันมีความสำคัญมาก ผลจากการใช้แหล่งคาร์บอนส่งผลให้เกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน 2 สภาวะ ได้แก่ ภายใต้ออกซิเจนที่ต่ำและไม่มีคาร์บอน และภายใต้ออกซิเจนที่มีคาร์บอน (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2545 : 155)

2.4.5.1.4 ความเค็ม ความเค็มในรูปของโซเดียมคลอไรด์จะมีผลต่อกระบวนการดีไนตริฟิเคชันอยู่บ้าง เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงคลอไรด์อย่างรวดเร็ว (ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2545 : 110)

2.4.5.1.5. อุณหภูมิ กระบวนการดีไนตริฟิเคชันในกระบวนการบำบัดน้ำเสียที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส พบว่ามีการเกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันต่ำ เพราะว่ากระบวนการเมทาบอลิซึมเกิดขึ้นได้น้อย แต่กระบวนการดีไนตริฟิเคชันเกิดได้ดีเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 35 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นอุณหภูมิยังมีส่วนต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตและมีผลต่ออัตราการบำบัดไนเตรท (Wiesmann et al. 2007 : 240-241)

2.4.6 กระบวนการแอมโมนิออกซ์ (ANAMMOX Process)

กระบวนการแอมโมนิออกซ์ หรือ ANAMMOX Process (Anaerobic Ammonium Oxidation) เป็นกระบวนการที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นก๊าซไนโตรเจนในสภาวะไร้อากาศ โดยจะใช้ไนโตรเจนเป็นตัวรับออกซิเจนในสภาวะไร้อากาศ (Wiesmann et al. 2007: 243) โดยมีไนโตรเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ซึ่งไม่จำเป็นต้องใช้แหล่งคาร์บอนจากอินทรีย์ ในการเริ่มต้นของกระบวนการดังกล่าว ซึ่งอาจพบกระบวนการนี้ในระบบตะกอน ระบบบำบัดน้ำเสียแบบจุลินทรีย์ยัดเกาะกับตัวกลาง โดยจะพบแบคทีเรียเหล่านี้ในสภาพแวดล้อมทางทะเล หรือปากแม่น้ำแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกลุ่ม Autotrophic ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่ม AOB (Ammonia oxidizing bacteria) เช่น *Candidatus Brocadia anammoxas* และ *Candidatus kuenenia* เป็นต้น แบคทีเรียกลุ่ม *Planctomycetales* เช่น *Plantomyces* และ *Pirellula* ซึ่งพบว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่มสำคัญในกระบวนการดังกล่าว (Bitton. 2011 : 305; Wiesmann et al. 2007 : 243)

2.5 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดทางไนโตรเจนทางชีวภาพ

การบำบัดไนโตรเจนทางชีวภาพ มีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดสารอินทรีย์ในโตรเจนที่ละลายในน้ำเสียออก เพื่อป้องกันน้ำเสียไหลออกสู่แหล่งรองรับน้ำธรรมชาติไม่ให้เกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนที่ละลายในน้ำให้มีปริมาณน้อยลงจนการดำรงชีวิตของพืชและสัตว์น้ำเกิดอันตราย ซึ่งการบำบัดวิธีนี้อาศัยการทำงานของจุลินทรีย์หลายชนิดย่อยสลายสารอินทรีย์ให้เหลือน้อยลงในระดับที่ต้องการ

2.5.1 แบคทีเรียไนตริไฟอิง (Nitrifying Bacteria)

แบคทีเรียไนตริไฟอิงจัดอยู่ในกลุ่ม Chemoautotrophic หรือ Chemolithotroph ซึ่งได้รับพลังงานจากการออกซิไดส์สารอนินทรีย์ (Oxidation Reaction) คือ แอมโมเนีย และไนเตรท และใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เป็นแหล่งคาร์บอน สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ มีค่าพีเอช ในช่วง 5.8-8.5 (Wiesmann, Choi and Dombrowsk. 2007 : 229) แบคทีเรียไนตริไฟอิงที่มีบทบาทต่อการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันมี 2 กลุ่มหลักคือ แบคทีเรียกลุ่ม Ammonia Oxidizing Bacteria (AOB) ที่เป็นพวก Autotroph มีหน้าที่ออกซิไดส์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์ (Sofia, Liu, Ongand, and Ng. 2003 : 19-23) แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Nitrosomonas* sp. สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ มีค่า พีเอช อยู่ในช่วง 5.8-8.5 และเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 5-30 องศาเซลเซียส (Wiesmann et al. 2007 : 229) และแบคทีเรียกลุ่ม Nitrite oxidizing bacteria (NOB) เป็นแบคทีเรียที่ออกซิไดส์ไนไตรท์ให้เป็นไนเตรท (Sofia et al. 2003 : 19-23) แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Nitrobacter* sp. สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ มีค่าพีเอช อยู่ในช่วง 6.8-8.5 และเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 5-40 องศาเซลเซียส (Wiesmann et al. 2007 : 229) จากการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียกลุ่ม AOB และ NOB ในระบบไนตริฟิเคชันพบว่า AOB เป็นกลุ่มของ *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus* ส่วน NOB เป็นกลุ่มของ *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus* (Bitton. 1994 : 54-55)

แบคทีเรียไนตริไฟอิงเดิมจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ และอยู่ใน Family Nitrobacteraceae แต่ในปัจจุบันได้มีการวิเคราะห์ทาง 16S rRNA ทำให้ได้รับความชัดเจนในการจัดลำดับชั้นความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการที่มีความซับซ้อนของ AOB และ NOB โดยกลุ่มของ AOB ที่เป็น Autotroph แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต อยู่ใน Subclass α -Proteobacteria และ Subclass β -Proteobacteria กลุ่มสุดท้ายคือ Anaerobic Planctomycetales (Pollet, Tadonl  k   and Humbert. 2011 : 254-261)

2.5.2 แบคทีเรียดีไนตริไฟอิง (Denitrifying bacteria)

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดีไนตริฟิเคชันมีอยู่ 4 กลุ่มหลัก คือ Heterotroph, Autotroph, Facultative และ Aerobic แต่จุลินทรีย์กลุ่ม Heterotroph มีบทบาทมากกว่าในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน

2.5.2.1 Heterotrophic denitrifying bacteria (HDB)

HDB เป็นแบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ไนเตรท และไนไตรท์ เป็นก๊าซไนโตรเจน หรือใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนก๊าซออกซิเจนอิสระในสถานะแอนอกซิก (Anoxic) โดยมีเอนไซม์ที่กระตุ้นการลดรูปของไนโตรเจน ดังตารางที่ 2 และใช้สารประกอบอินทรีย์คาร์บอนเป็นตัวให้อิเล็กตรอน เช่น เมทานอล เอทานอล กากน้ำตาล เป็นต้น เรียกปฏิกิริยานี้ว่า Heterotrophic Denitrification Reaction (HDR) จัดเป็นกระบวนการเกิดดีไนตริฟิเคชันที่มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เข้มข้น (Action Denitrification) และพบได้โดยทั่วไปในสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะในระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ (Lee, Lea, Dohmann, Prebilsky, Turk, Ying and Whitson. 2000 : 37-59)

ตารางที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์และปฏิกิริยาในการรีดิวซ์สารประกอบไนโตรเจน (คัดแปลงมาจาก Miguel , Juan, Ernesto, and Jesus. 2003 : 254-251)

เอนไซม์	ปฏิกิริยา
Nitrate Reductase (NR)	$\text{NO}_3^- + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \text{ ----} \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$
Nitrite Reductase (NiR)	$\text{NO}_2^- + \text{e}^- + \text{H}^+ \text{ ----} \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$
Nitrite Oxide Reductase (NOR)	$2\text{NO} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \text{ ----} \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$
Nitrous Oxide Reductase (NOR)	$\text{N}_2\text{O} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \text{ ----} \rightarrow \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$

2.5.2.2 Autotrophic Denitrifying Bacteria (ADB)

ADB เป็นแบคทีเรียที่สามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท โดยใช้สารประกอบซัลเฟอร์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน โดยไม่ใช้สารอินทรีย์ เช่น Thiosulfate (S_2O_3) และ Sulfur (S) แต่ใช้สารอนินทรีย์ที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ แบคทีเรียพวกนี้เรียกว่า Chemoautotrophic และเรียกปฏิกิริยาที่เกิดจากแบคทีเรียนี้ว่า Autotrophic Denitrification Reaction (ADR) แบคทีเรียประเภทนี้มักพบในสภาพที่มีออกซิเจนน้อย จึงดึงออกซิเจนจากไนเตรทเพื่อการหายใจ (Respiration) เช่น *Thiobacillus denitrificans* (เกยู คำคง. 2550 : 21)

2.5.2.3 Facultative Autotrophic Denitrifying Bacteria

เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนใช้ในเครทเป็นตัวรับอิเล็กตรอนใช้สารประกอบอนินทรีย์ หรือสารประกอบอินทรีย์ที่มีคาร์บอนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน เช่น *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Agrobacterium* sp. และ *Thiobacillus denitrificans* (เกยูร คำคง. 2550 : 22)

2.5.2.4 Aerobic Denitrifying Bacteria

เป็นแบคทีเรียที่เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนอิสระ ก็สามารถใช้ออกซิเจนอิสระเป็นตัวรับอิเล็กตรอนได้ เนื่องจากมีเอนไซม์ Nitrogen Reductases ที่ทนอยู่ได้ในสภาพที่มีก๊าซออกซิเจนอิสระ หากไร้ออกซิเจนก็จะเลือกใช้ในเครทเป็นตัวรับอิเล็กตรอนเช่นกัน เช่น *Paracoccus pantotrophus*, *Thiosphaera pantotrohu*, *Alcaligenes faecalis*, *Microvirgula aerodenitrifican*, *Thauere mechernichensis* และ *Nitrosomonas eutropha* (Otani, Hasegawa and Hanaki. 2004 : 15-22)

2.6 เทคนิคที่ใช้ศึกษานิวเคลียสในระบบบำบัดน้ำเสีย

การศึกษานิวเคลียสในระบบบำบัดน้ำเสียจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคต่างๆที่สามารถตรวจสอบ จัดจำแนกตลอดไปจนการนับปริมาณจุลินทรีย์ เทคนิคต่างๆที่มีการนำมาใช้ เช่น การเพาะเลี้ยงอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนหรือพลังงานที่แตกต่างกัน การศึกษาข้อมูลด้านสรีรวิทยาของเซลล์ เทคนิคเหล่านี้ล้วนแต่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ และการคัดแยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ จึงเรียกเทคนิคเหล่านี้ว่า “เทคนิคที่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ” (Culture Dependent Techniques) ส่วน “เทคนิคที่ไม่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ” (Culture Independent Techniques) เป็นการศึกษาจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมโดยตรง (*In Situ*) โดยไม่พึ่งพาการเพาะเลี้ยงเชื้อ (นุฏลอินทรเสงขา. 2547 : 1-10)

2.6.1 เทคนิคที่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ

การศึกษานิวเคลียสด้วยเทคนิคที่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ เช่น เทคนิคที่ต้องอาศัยการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เทคนิคการนับจำนวนที่เป็นไปได้ทั้งหมด (Most Probable Number, MPN) ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาพบว่าเทคนิคต่างๆ เหล่านี้ได้มีข้อจำกัดหลายประการ ทั้งในเรื่องของตัววิธีการเอง และลักษณะเฉพาะของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

(บุญถวิล อธิษฐานสงฆ์. 2547 : 1-10) เช่น เชื้อบางชนิดต้องใช้เวลาในการบ่มเชื้อนานเกินไป และการนับจำนวนแบคทีเรียไม่แม่นยำ เพราะเป็นการนับจำนวนโดยการหาค่าเฉลี่ย (Roszak and Colwe. 1987 : 367-379) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้โดยทั่วไปไม่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไม่อยู่ในสภาวะที่สามารถเจริญได้

2.6.1.1 เทคนิคเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture Media Techniques)

ปัจจุบันเทคนิคเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื่อนั้นไม่ค่อยได้รับความนิยมมากนัก เนื่องจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ไม่เข้าใจถึงกระบวนการทางชีวภาพในการบำบัดในโตรเจนของจุลินทรีย์ได้อย่างสมบูรณ์ เพราะจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ในสิ่งแวดล้อมไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (Amann, Glockner and Neef. 1997 : 191-200)

2.6.1.2 เทคนิคMPN (Most Probable Number Techniques)

เทคนิค Most Probable Number (MPN) เป็นวิธีการประมาณจำนวนแบคทีเรียที่เป็นไปได้มากที่สุด โดยอาศัยการคำนวณทางสถิติค่าที่ได้เป็นค่าประมาณโดยเฉลี่ย (Estimate of the Mean Density) ซึ่งตัวอย่างที่นิยมนำมาวิเคราะห์ คือ น้ำ อาหาร และผลิตภัณฑ์การเกษตร โดยมีหลักการคือ เพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ โดยทำการเจือจางตัวอย่าง (Serial Dilution) โดยทั่วไปนิยมใช้อยู่ 2 ระบบ คือ ระบบ 3 หลอด ซึ่งมีข้อดีด้านการประหยัดเวลาแต่มีโอกาสผิดพลาดมาก และระบบ 5 หลอด ที่ใช้เวลานานแต่มีโอกาสผิดพลาดน้อยกว่า ส่วนใหญ่นิยมใช้ในการตรวจสอบปริมาณ Total Coliform, Faecal Coliform และ *E.coli* ที่ปะปนอยู่ในตัวอย่างนั้นๆ ปัจจุบันมีผู้วิจัยหลายกลุ่มได้นำเทคนิค MPN มาใช้ตรวจสอบและนับจำนวนแบคทีเรียในτριไฟอิง และแบคทีเรียในตริไฟอิงภายในระบบการบำบัดน้ำเสีย จากการเพาะเลี้ยงสัณฐานแบบน้ำหมุนเวียน (เกษร คำคง. 2550) จากระบบบำบัดน้ำทิ้งที่เน้นการบำบัดในโตรเจน (Paungfoo, Prasertsan, Burrell, Intrasingkha and Blackall.2003) ซึ่งเป็นการตรวจสอบเชิงปริมาณเบื้องต้นทำให้ทราบถึงปริมาณของแบคทีเรียภายในระบบว่ามีอยู่มากน้อยเพียงใด โดยพัฒนาเป็นระบบไมโครเทคนิค (Microtechnique for MPN Analysis) ซึ่งทดสอบในไมโครเพลท (96 Well Microplates) เนื่องจากวิธีเดิมต้องใช้เวลาในการทดลองนาน ใช้อุปกรณ์ และสารละลายทดสอบปริมาณมากซึ่งไม่เหมาะสมกับการทดลองที่มีตัวอย่างจำนวนมาก (Soto, Sanche, Aspe and Roeckel. 2002 : 1173-11756)

นอกจากนี้ยังใช้ผลการทดลองที่แม่นยำกว่า แต่ยังคงใช้หลักการเดิม และอาศัยการทำงานทางสถิติโดยใช้ตารางค่าดัชนี MPN

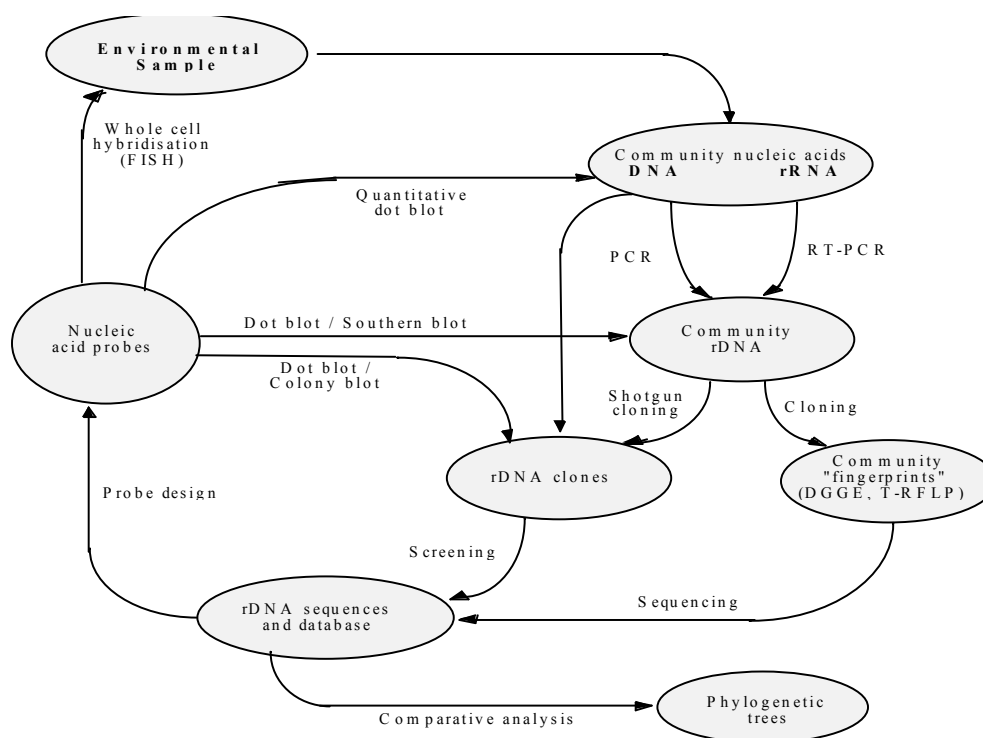
2.6.2 เทคนิคที่ไม่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ

เทคนิคการศึกษาจุลินทรีย์ที่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ ได้รับการพิสูจน์ถึงข้อจำกัด และการเบี่ยงเบนข้อเท็จจริงของนิเวศวิทยาในระบบบำบัดน้ำเสีย ในขณะที่เทคนิคที่ไม่ต้องใช้การเพาะเลี้ยงเชื้อได้รับการยอมรับมากยิ่งขึ้น ตัวอย่างเทคนิคดังกล่าวได้แก่การศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้สีเรืองแสง การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยเฉพาะที่เน้นการตรวจหา RNA เช่น Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH), Clone Library Analysis, Microautoradiography และ Immunofluorescent Techniques เป็นต้น (นุกูล อินทรธำรง และคณะ. 2548 : 17-18)

2.6.2.1 เทคนิคด้าน 16 rRNA

เทคนิคการทำ 16S rDNA Clone Library เป็นวิธีการหนึ่งในการตรวจหาความหลากหลายของจุลินทรีย์ โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับของยีน 16S rDNA ซึ่งเป็นยีนที่บันทึกการสังเคราะห์โมเลกุลของ 16S rRNA เริ่มจากการสกัดเอาดีเอ็นเอจากกลุ่มชุมชนจุลินทรีย์ในแหล่งที่ต้องการศึกษา จากนั้นทำการตัดยีนดังกล่าวไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะแล้วนำเข้าไปในแบคทีเรียเพื่อให้เพิ่มจำนวนยีนดังกล่าว เรียกว่า Cloning เมื่อนำยีนที่ได้ไปหาลำดับของเบสและนำมาเปรียบเทียบกัน เรียกวิธีการนี้ว่า Clone Library Analysis จากนั้นนำมาหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ หรือที่เรียกว่า Phylogenetic Analysis ข้อมูลลำดับเบสจากตัวอย่าง Clone ต่างๆ ที่ได้สามารถนำมาใช้ในการออกแบบหา DNA Probe ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับจุลินทรีย์เป้าหมายได้อีกด้วย ซึ่งสามารถนำไปใช้ในกระบวนการตรวจหาและนับปริมาณจุลินทรีย์ในธรรมชาติด้วยเทคนิค FISH หรือ PCR ต่อไปได้ ปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายที่ได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ของจุลินทรีย์ในสภาพแวดล้อมต่างๆ ทั้งจากในธรรมชาติ เช่น จากน้ำทะเล (Brown, Schwalbach, Hewson and Fuhrman. 2005 : 1466–1479) จากน้ำบาดาล (DeSantis, Brodie, Moberg, Zubietta, Piceno and Andersen. 2007 : 371-383; Yang, Ma, Chen, Mao, He, Xi, Yang, He, and Deng. 2010 : 2063-2073) จากระบบทางดินอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Mieszkina, Yala, Joubrel and Gourmelon. 2010 : 974 - 984) และจากสภาพแวดล้อมที่มนุษย์สร้างขึ้น เช่น ระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบตะกอนเร่งที่เน้นบำบัดฟอสฟอรัส (นุกูล อินทรธำรง, ลินดา แบสค็อก, ฟิลิป บอนด์ และ เบิร์ก เคลเลอร์. 2542 : 22-31) ระบบบำบัดน้ำทิ้งที่เน้นการบำบัด

ไนโตรเจน (Stephen, McCaig, Smith, Prosser and Embley. 1996 : 4147-4154; Burrell, Keller and Blackall. 1998 : 1873-1883; Paungfoo et al. 2003) ระบบระบบบำบัดน้ำทิ้งที่เน้นการบำบัดไนโตรท (Yamashita, Yokoyama, Kanafusa, Ogino, Ishida, Osada และ Tanaka. 2011 : 578-581) (ภาพที่ 3)



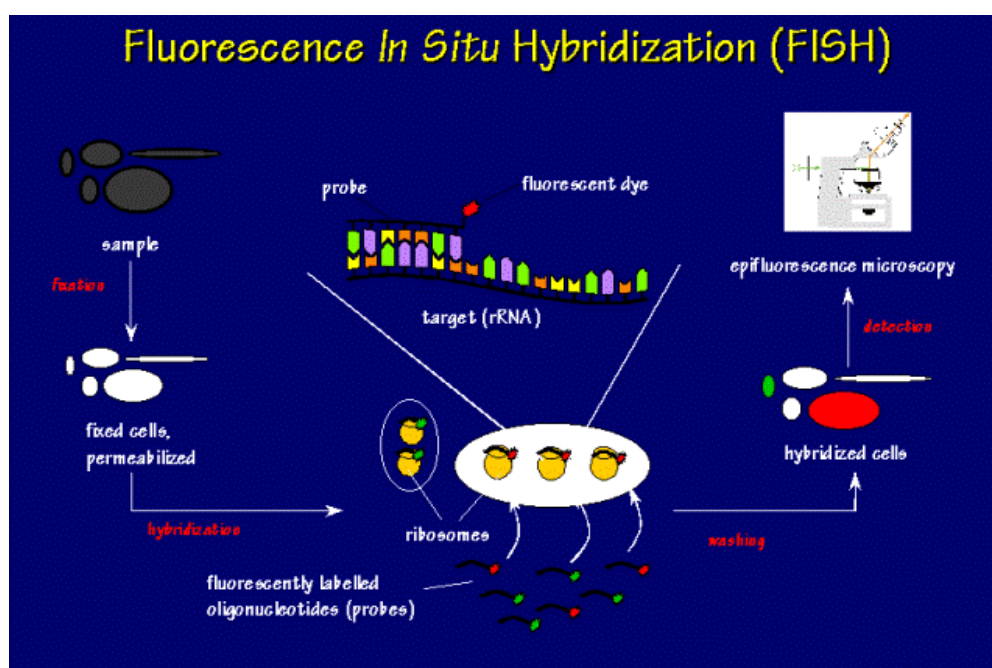
ภาพที่ 3 ขั้นตอนต่างๆ ที่สำคัญของเทคนิค rRNA approach (ดัดแปลงจากAmann, Glockner and Neef. 1997:191-200)

2.6.2.2 Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) Technique

เทคนิค Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) เป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุลวิธีหนึ่งที่สามารถจำแนกชนิด รวมทั้งนับจำนวนจุลินทรีย์โดยตรง (*In Situ*) ในตัวอย่างได้ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็ว โดยไม่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร (Culture Independent Technique) ซึ่งวิธีดังกล่าวมีข้อจำกัดหลายประการ (Roszak and Colwell. 1987 : 365-379) เทคนิค Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) อาศัยข้อมูลของ rRNA จากฐานข้อมูลเช่น Ribosomal Database Project (RDP) มาใช้ในการออกแบบ Oligonucleotide Probes ความยาวประมาณ 20 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งใช้เป็นตัวตรวจที่มีลำดับเบสที่คล่องจองกันกับลำดับเบสบน rRNA ที่พบในไรโบโซมของเซลล์แบคทีเรีย จึงสามารถจับคู่ (Hybridize) กับ RNA ในไรโบโซม (rRNA) ให้มีความจำเพาะกับแบคทีเรียตั้งแต่ระดับชนิดไปจนถึงไฟลัมตามความต้องการ แล้วติด

ฉลากด้วยสารเรืองแสง (Fluorochrome) เรียกว่า โพรบ (Probe) แล้วนำมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ Epifluorescence โดยโพรบจะมีเป้าหมายอยู่ที่ 16S rRNA ซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมากในเซลล์ของจุลินทรีย์ จึงถูกเลือกมาใช้เป็น Marker Gene ดังนั้นการศึกษาโครงสร้างนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ โดยใช้เทคนิคดังกล่าวจะทำให้ทราบถึงชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ในที่อยู่อาศัยอย่างแท้จริงและแม่นยำ (เกตุร คำคง. 2550 : 30)

ปัจจุบันมีการนำเอาเทคนิค FISH มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสีย การติดตามและตรวจสอบจุลินทรีย์ในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (ภาพที่ 4)

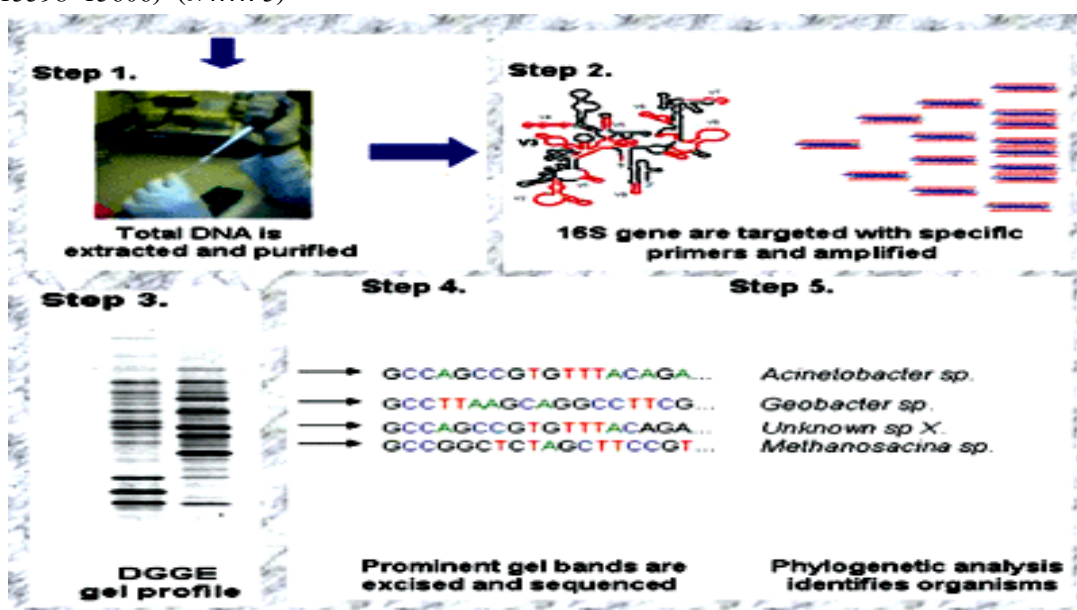


ภาพที่ 4 ขั้นตอน Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Technique analysis
(ที่มา: www.bioc.rice.edu/bios576/immuno/FISH.gif)

2.6.2.3 Denaturing Gradient Gel electrophoresis (DGGE) Technique

เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) เป็นเทคนิคที่แยกความแตกต่างของโปรตีน หรือดีเอ็นเอ ซึ่งการแยกความแตกต่างนั้นสามารถแยกโดยอาศัยความแตกต่างของความเข้มข้นของเจล หรือ อุณหภูมิที่ต่างกัน ซึ่งจากหลักการดังกล่าวทำให้สามารถนำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย ได้แก่ การแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตด้วยยีน

โดยยีนหนึ่ง หรือการใช้แยกสิ่งมีชีวิตเป็นระดับกลุ่มประชากร เป็นต้น โดยอาศัยหลักการที่ว่าดีเอ็นเอที่มีความยาวเท่ากัน สามารถแยกออกจากกันได้โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปจะเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ได้เพียงบางส่วน โดยใช้เทคนิคทางด้าน PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่มีเบส GC ยาว 40 เบสที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์เพียงเส้นเดียว เมื่อแยกบน Polyacrylamide Gel ที่มีความเข้มข้นของสารที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ ยีนที่เพิ่มจำนวนนี้จะเปลี่ยนสภาพจากดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวเพียงบางส่วนแต่ไม่หลุดจากกัน ซึ่งเทคนิค DGGE มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ขนาดยีนที่เพิ่มจำนวนต้องไม่ยาวกว่า 500 เบส จึงสามารถแยกบน Polyacrylamide Gel ได้ (Schramm and Amann. 2000 : 86-104) ปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายที่ได้ทำการศึกษาความหลากหลายโครงสร้าง ชนิด และปริมาณของแบคทีเรียในสภาพแวดล้อมต่างๆ ทั้งจากในธรรมชาติ เช่น จากน้ำพุร้อน (Hniman, O-Thong and Prasertsan. 2011 : 8785–8793; Hniman, Prasertsan and O -Thong. 2011 : 14217-14226; Hasyim, Imai, O-Thong and Sulistyowati. 2011 : 14162–14171) จากทะเลสาบ (Jaspers, Nauhaus, Cypionka and Overmann. 2006 : 10) จากดิน (Chong, Tan, Wong, Riddle and Tan. 2009 : 856-860) และสภาพแวดล้อมที่มนุษย์สร้างขึ้น เช่น ระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบตะกอนเร่งที่เน้นบำบัดแอมโมเนีย (Limpiyakorn, Shinohara, Kurisu and Yagi. 2006 : 205-217) ระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบตะกอนเร่งที่เน้นบำบัดฟอสเฟส (Seviour, Mino and Onuki. 2006 : 99-127) ระบบบำบัดน้ำเสียภายในโรงงานผลิตน้ำมัน (Mamimin, Thongdumyu, Hniman, Prasertsan, Imai and O-Thong. 2012 : 15598–15606) (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ขั้นตอน DGGE analysis (ที่มา : www.thaiscience.com/lab_vol/p23/prcdgge/prc5.jpg)

2.6.2.4 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM or LSCM)

Technique

เทคนิค Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM or LSCM) เป็นเทคนิคสำคัญที่ใช้ศึกษาในทางชีววิทยาและวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อศึกษาภาพที่มีความละเอียดสูงและภาพที่มีความลึก ซึ่งคุณลักษณะสำคัญของเทคนิคนี้ จะมีความสามารถในการเลือกการโฟกัสภาพที่มีความลึกที่ระยะแตกต่างกัน และภาพที่ได้ออกมาจะมีความคมชัดสามมิติ ซึ่งต่างกับภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์แบบ Epifluorescence ที่ไม่สามารถบอกความละเอียดของภาพที่มีความหนาได้

หลักการของเทคนิค Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM or LSCM) ลำแสง laser ผ่านกระจกกรองแสงที่เรียกว่า Diachronic Mirror เข้าสู่ Galvanometer แล้วผ่านเข้าสู่ Objective Lens เข้าสู่ตัวอย่าง แสงจะสะท้อนกลับมาจากตัวอย่าง ย้อนกลับขึ้นมายัง Diachronic Mirror และ Galvanometer แล้วผ่านเข้าสู่ Confocal Pinhole เข้าสู่ Detector สัญญาณแสงจะถูกเปลี่ยนเป็นสัญญาณดิจิทัล โดย Photomultiplier tube (PMT) สัญญาณดิจิทัลที่ได้จะถูกนำมาประมวลผลด้วยคอมพิวเตอร์ แสดงผลด้วยภาพบนจอคอมพิวเตอร์ (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. ม.ป.ป : 5)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.7.1 การศึกษานิเวศวิทยาของแบคทีเรียดีไนตริฟิอิง

เกตุร คำคง (2550 : 8) ตรวจสอบและติดตามแบคทีเรียดีไนตริฟิอิงและไนตริฟิอิงในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียนด้วยเทคนิค Fluorescent *In Situ* hybridization (FISH) ผลการศึกษาพบแบคทีเรียคลาส *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* และกลุ่ม NOB ในไฟลัม *Nitrospira* ที่ออกซิไดส์ไนโตรทำให้เป็นไนเตรตเป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่น

Vrtovšek and Roš (2006 : 396-400) ศึกษากระบวนการดีไนตริฟิเคชันจากน้ำผิวดิน โดยศึกษาภายในถังปฏิกริยาชีวภาพ บริเวณที่มีความจำเพาะของวัสดุ ผลการศึกษาพบว่าภายในถังปฏิกริยามีอัตราการเกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน $1.3 \text{ กรัม NO}_3 - \text{N} \cdot \text{m}^{-2}$ นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของ $\text{NO}_3 - \text{N}$ เพิ่มขึ้นจาก 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 16 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมต่อการเกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน

Liang, Zhao, Lu, Wang, Zhao and Liu (2011 : 10648-10656) ทำการแยกและศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียดีไนตริฟิอิงในภาวะที่มีอากาศในการบำบัดไนเตรตสูง โดยทำการแยกจากตะกอนในสภาวะมีอากาศ ผลการศึกษาพบไอโซเลต DL-23 คือ เชื้อ

Paracoccus denitrificans เป็นกลุ่มเด่น และพบว่าไอโซเลตดังกล่าว มีประสิทธิภาพในการบำบัดไนโตรเจนได้สูงสุด คือ 30.3 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Isaka, Kimura, Osaka and Tsuneda (2012 : 4948-4948) ศึกษาอัตราการเกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันสูงจากการใช้ Polyethylene Glycol (PEG) Gel ต่อแบคทีเรียดีไนตริฟิอิง กลุ่ม Heterotrophic Denitrifying Bacteria ในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อบำบัดไนเตรทในน้ำเสีย ผลการศึกษาพบว่าสามารถบำบัดไนเตรทได้ ภายใน 16 วัน โดยมีไนเตรท คงเหลือในถังปฏิกรณ์ ประมาณ 4.4 kg N m^{-3} ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพบำบัดไนโตรเจน ถึงร้อยละ 92 นอกจากนั้น การวิเคราะห์โครงสร้างชุมชนโดยใช้ยีน 16S rRNA พบ *Hyphomicrobium* sp. ในถังปฏิกรณ์ ดีไนตริฟิเคชันที่ใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน

Wang, Yuan, Li, Yang, Zheng, He, Geng, Xiong and Liu (2012 : 1-6) ทำการคัดแยกแบคทีเรียดีไนตริฟิอิงในสภาวะที่มีอากาศ โดยใช้เทคนิคแยกเชื้อและศึกษายีน 16S rRNA โดยวิเคราะห์ลำดับแยก HS-N2, HSN25 และ HS-N62 ผลการศึกษาพบว่า เชื้อ *Salmonella* sp., *Bacillus cereus* และ *Pseudomonas* sp. ตามลำดับ และพบว่า HS-N62 มีประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรทได้สูงสุด คือ ในเวลา 12 ชั่วโมง สามารถบำบัดไนเตรทได้ถึงร้อยละ 96

2.7.2 นิเวศวิทยาของแบคทีเรียไนตริฟิอิง

Chae, Rameshwar, Jang, Kim และ Kim (2008 : 1426-1435) วิเคราะห์ชุมชนของแบคทีเรียไนตริฟิอิง ใน BioCube Sponge Media โดยใช้เทคนิค Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) ดำเนินการทดลองจากถังปฏิกรณ์ขนาด 4 ลิตร ผลการศึกษาพบว่า สามารถบำบัดซีโอดีได้สูงถึงร้อยละ 95 และมีประสิทธิภาพการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันถึงร้อยละ 99 จากการวัดด้วย Microelectrode พบว่า ความเข้มข้นของแอมโมเนียมีการลดลงอย่างรวดเร็วที่ความลึก 2 มม. และตรวจพบแบคทีเรียกลุ่ม AOB มากกว่าแบคทีเรียกลุ่ม NOB

Chang, Tanong, Xu และ Shon (2011 : 5337-5344) การวิเคราะห์โครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียไนตริฟิอิงและแบคทีเรียดีไนตริฟิอิงในระบบบำบัดน้ำเสียที่ใช้เมมเบรน (Membrane Bioreactor, MBR) จากการบำบัดเสียปนเปื้อนน้ำมัน ผลการศึกษาพบว่ากระบวนการไนตริฟิเคชัน ในภาวะที่มีอากาศในระบบ MBR มีประสิทธิภาพกำจัดไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ และแอมโมเนียไนโตรเจน (Total Kjeldahl Nitrogen : TKN) สูงสุด คือ ร้อยละ 90 และมีระยะเวลาพักน้ำ (HRT) 18 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าในกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน สามารถบำบัดไนโตรเจนทั้งหมด (Total Nitrogen : TN) อยู่ในช่วง ร้อยละ 8.7-19.8 นอกจากนั้นยังวิเคราะห์ประชากรจุลินทรีย์จาก 16S rDNA พบกลุ่ม Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB) ซึ่งที่ใช้แอมโมเนียจากสารอินทรีย์

ในน้ำเสียเป็นกลุ่มเด่น และกลุ่ม Heterotrophic Denitrifying Bacteria (HDB) พบเชื้อ *Thauera mechernichensis*

Whang, Wua, Lee, Chen, Fukushima, Chang, Cheng, Hsu, Chang, Shen, Huang, Fu และ Chang (2012 : 70–77) ศึกษาประสิทธิภาพของกระบวนการไนตริฟิเคชันและนิเวศวิทยาของแบคทีเรียไนตริไฟอิง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเมมเบรนเต็มรูปแบบ (TFT-LCD) ในระบบบำบัดน้ำเสีย ผลการศึกษาพบว่าภายในถังปฏิกรณ์มีการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันเกือบสมบูรณ์ และตรวจสอบประชากรแบคทีเรียไนตริไฟอิงด้วยเทคนิค Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) พบเชื้อ *Nitrosomonas oligotropha* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม AOB นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียในกลุ่ม NOB พบเชื้อ *Nitrobacter* sp. และ *Nitrospira* sp. ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวพบว่ามีผลสำคัญต่อกระบวนการไนตริฟิเคชันภายในถังปฏิกรณ์

2.7.3 การศึกษาการบำบัดในเตรท

Foglar, Briški, Sipos and Vuković (2005 : 879-888) ศึกษาการบำบัดในเตรทจากน้ำเสียสังเคราะห์โดยใช้กล้ำเชื้อจุลินทรีย์ผสม คือ แบคทีเรียที่ใช้อากาศและไม่ใช้อากาศในน้ำเสีย ผลการศึกษาพบว่ากล้ำเชื้อจุลินทรีย์ผสมมีประสิทธิภาพในการบำบัดในเตรทได้สมบูรณ์ โดยพบว่าการสะสมของในเตรทภายในน้ำเสียสังเคราะห์ ต่ำกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบ *Pseudomonas* sp. และ *Paracoccus* sp. เป็นกลุ่มเด่นจากกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสม

Cho และ Cho (2008 : 327-330) ศึกษาความเป็นไปได้ต่อการบำบัดในเตรทด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้ตะกอนจีเถ้า ผลการศึกษาพบว่าเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ตะกอนจีเถ้าที่เผาด้วยอุณหภูมิ 900 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการบำบัดในเตรทได้สูงสุด และพบว่าฟิเอชของตะกอน เท่ากับ 7.0 โดยสามารถบำบัดในเตรทได้ภายใน 10 ชั่วโมง คิดเป็นร้อยละ 42 ของการบำบัดในเตรททั้งหมด

Cho, Takahashi, Fujii, Yamada, Satoh and Okabe (2010 : 1129-1135) ศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดในโตรเจนและการวิเคราะห์ชุมชนจุลินทรีย์ของเครื่องปฏิกรณ์แบบไหลขึ้น ด้วยกระบวนการ ANAMMOX ผลการศึกษาพบแบคทีเรีย Anammox กลุ่ม *Candidatus Brocadia*-like species และพบว่ากิจกรรมของกระบวนการ ANAMMOX พบมากที่สุดบริเวณผิวของ granules และประชากรที่พบใน granules มีมากถึงร้อยละ 80 ของแบคทีเรียทั้งหมดเมื่อย้อมด้วยสี 4,6 - Diamidino - 2 - Phenyindol (DAPI)

Zhou, Sun, Wu, Zhang, Huang, Miyanaga and Zhang (2011 : 1761–1769) ศึกษาแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง กลุ่ม Autotrophic สำหรับการบำบัดในเตรทและไนโตรท์ โดยใช้

กัมมะถันหินปูนในน้ำเสียสังเคราะห์ ที่ระดับ คือ 10, 40, 70 และ 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าที่น้ำเสียสังเคราะห์ระดับ 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร พบว่าสามารถบำบัดไนเตรทและไนไตรท์ได้ถึงร้อยละ 90 และระยะเวลากักพักน้ำ (HRT) เท่ากับ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิของ 20-25 องศาเซลเซียส ส่วนในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ระดับ คือ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และ 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร สามารถบำบัดไนเตรทและไนไตรท์ได้ถึงร้อยละ 50 และระยะเวลากักพักน้ำ (HRT) เท่ากับ 3 ชั่วโมง อุณหภูมิต่ำ 5-10 องศาเซลเซียสจากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของกัมมะถันหินปูน และอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน

Zhao, Feng, Wang, Yang, Zhang และ Sugiura (2011 : 1033-1039) การบำบัดไนเตรทจากน้ำบาดาล โดยอาศัยแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง กลุ่ม Heterotrophic และ Autotrophic ในถังปฏิกริยาชีวภาพอิเล็กโทรด การทดลองในครั้งนี้เป็นการพัฒนาระบบการบำบัดน้ำบาดาล โดยทำการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการบำบัดไนเตรท ระยะเวลากักพักน้ำ (HRT) อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) และกระแสไฟฟ้า (I) ผลการศึกษาพบว่า ภายในถังบำบัดมีประสิทธิภาพการบำบัดไนเตรทได้สมบูรณ์ ส่วนค่า $C / N = 1$ ค่า $HRT = 8$ ชั่วโมง และ ค่า $I = 10 \text{ mA}$ ตามลำดับ

2.7.4 เทคนิคที่ศึกษาเมือกชีวภาพ

Cytryn, Minz, Gieseke and Rijn (2006 : 22-29) ได้ใช้เทคนิคทาง Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) และการใช้กล้องจุลทรรศน์ศึกษาลักษณะของเส้นใยสีขาวที่เกิดขึ้นในถังปฏิกริยาฟลูอิดไคซ์เบด (Fluidized Bed Reactor) ที่ใช้บำบัดสารไนเตรทในระบบการเพาะเลี้ยงปลาทะเล โดยภายในถังปฏิกริยามีเกร็ดซัลเฟอร์ (Sulfur Granules) ใช้ในการกรองน้ำเพื่อกำจัดสารอินทรีย์ ผลการศึกษาพบว่าภายในระบบมีแบคทีเรียกลุ่มเด่นคือ แบคทีเรียแบบเส้นสาย (Filamentous Bacteria) แกรมลบ พบเชื้อกลุ่ม *Thiothrix* มีความหนาแน่นอยู่บริเวณภายในผลึกซัลเฟอร์ และมีลักษณะทางสัณฐานเป็นรูปแฉก (Rosette-Shaped)

Satoh, Yamakawa, Kindaichi, Ito and Okabe (2006 : 762-772) ศึกษาโครงสร้างชุมชนและกิจกรรมของแบคทีเรียไนตริไฟอิง และแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงจากเมือกชีวภาพในน้ำเสียอุตสาหกรรม ด้วยเทคนิค 16S rRNA และเทคนิค Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) ผลการศึกษาพบแบคทีเรียคลาส *Alphaproteobacteria* และ *Betaproteobacteria* และตรวจพบว่า *Nitrosomonas europaea* และ *N. marina* เป็นกลุ่มที่สามารถ

บำบัดแอมโมเนีย และมีความเกี่ยวข้องกับ *Betaproteobacteria* และพบว่าปัจจุบัน N - PD - Biofilms มีการใช้งานเพื่อศึกษาเมือกชีวภาพที่เกิดจากแบคทีเรียไนโตรไฟอิงและแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิง

Ivanovo, Stabnikova, Sihanonth and Menasveta (2006 : 807-812) ศึกษาประชากรของแบคทีเรียกลุ่ม Ammonia Oxidizing Bacteria (AOB) จากเมือกชีวภาพที่ยึดติดบริเวณผิวของเปลือกหอยนางรมที่ใช้เป็นตัวกลางชีวภาพในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ด้วยเทคนิค Confocal Laser Scanning Microscopy และเทคนิค Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) ด้วย Oligonucleotide Probes ที่จำเพาะต่อแบคทีเรียทั้งหมดและ *Nitrosomonas* spp. ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม AOB (*Nitrosomonas* spp.) ถูกตรึงอยู่ในเมือกชีวภาพ และมีแบคทีเรียชนิดอื่นปกคลุมอยู่ภายนอก

Tal, Watts and Schreier (2006 : 2896-2904) ศึกษาชุมชนแบคทีเรียกลุ่มที่เกิดกระบวนการ Anaerobic Ammonium Oxidation (ANAMMOX) ที่ยึดติดกับตัวกลางชีวภาพในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเค็มแบบน้ำหมุนเวียนด้วยเทคนิค DGGE โดยศึกษาจากแหล่ง Aerobic Fixed-Film, Anaerobic Fixed-Film และ Anaerobic Sludge Waste ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียในไฟลัม *Planctomycetales* อยู่ทั้ง 3 แหล่ง เมื่อยืนยันด้วยเทคนิค Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) โดยใช้ Oligonucleotide probes ที่จำเพาะต่อแบคทีเรียในกลุ่ม ANAMMOX ก็ให้ผลสอดคล้องกันว่ามีแบคทีเรีย *Planctomycetales* ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจสอบการใช้แอมโมเนียที่ถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์

Labbé, Laurin, Juteau, Parent and Villemur (2007: 621-630) ศึกษาโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ในเมือกชีวภาพที่อยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีระบบดีไนโตรฟิเคชัน ที่มีการเติมเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยเทคนิค Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) ผลการศึกษาพบแบคทีเรียในคลาส *Gammaproteobacteria* (ส่วนใหญ่อยู่ในจีโนส *Methylophaga*) ร้อยละ 79 ของประชากรแบคทีเรียทั้งหมด ส่วน *Alphaproteobacteria* พบร้อยละ 27-57 รวมทั้งจีโนส *Hyphomicrobium* ที่พบร้อยละ 7-8 ตรวจสอบด้วย Microautoradiography ร่วมกับ Fluorescence *In Situ* Hybridization (MAR-FISH) ตรวจสอบแบคทีเรียในกลุ่ม *Methylotroph* พบว่าคลาส *Alphaproteobacteria* สามารถใช้เมทานอลที่ติดฉลากด้วย C_{14} แล้วเปลี่ยนเป็นไนเตรทได้ ส่วนแบคทีเรียจีโนส *Methylophaga* ถึงแม้ว่าจะพบเป็นจำนวนมากแต่ไม่สามารถใช้เมทานอลในการสร้างเซลล์

Xia, Li, Wang, Li และ Zhang (2010 : 370-378) ทำการศึกษาองค์ประกอบและความเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์ภายในกระบวนการไนโตรฟิเคชันและกระบวนการดีไนโตรฟิเคชันจากถังปฏิกรณ์เมือกชีวภาพ ด้วยเทคนิค PCR-DGGE และเทคนิค Fluorescence *In*

Situ Hybridization-Flow Cytometry (FISH FCM) ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียไนตริไฟอิง และแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง มีความสามารถในการบำบัดสารประกอบไนโตรเจน ได้ถึงร้อยละ 83.3 และ 90 ตามลำดับ และตรวจสอบความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในระบบด้วย เทคนิค PCR-DGGE พบ กลุ่ม Ammonia - oxidizing bacteria (AOB) ซึ่งเป็นสมาชิกในคลาส *Betaproteobacteria* พบเชื้อกลุ่ม *Nitrosomonas* sp. เป็นกลุ่มเด่นในเมือกชีวภาพ นอกจากนี้เทคนิค FISH-FCM พบว่า *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* และ *Gammaproteobacteria* คิดเป็นร้อยละ 50 ของเซลล์ทั้งหมดในเมือกชีวภาพ และพบ *Nitrosomonas* sp., *Nitrospira* sp., *Nitrobacter* sp. และ *Nitrospira* sp. ประมาณร้อยละ 5-12 ของเซลล์ทั้งหมด

Yamashita et al. (2011 : 578-581) การบำบัดไนเตรทโดยอาศัยเมือกชีวภาพโดยใช้เพอร์ไลต์เป็นตัวกลางสำหรับการยึดเกาะและพัฒนาไปเป็นเมือกชีวภาพในสถานะที่มีการเติมอากาศตลอดเวลา ผลการศึกษาพบว่ามีประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรทเท่ากับ 114.4 mg·N–kg⁻¹·perlite/h ในน้ำเสียจากโรงงานผลิตนมและโรงงานทำปุ๋ย นอกจากนั้นยังใช้เทคนิค Clone Library ในการตรวจสอบโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียจากเมือกชีวภาพ พบเชื้อกลุ่ม *Thauera* spp. ซึ่งจัดเป็นเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง

Srinandan, D'souza, Srivastava, Nayak และ Nerurkar (2012 : 292–299) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีอิทธิพลต่อการบำบัดไนโตรเจน โครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ และการเกิดเมือกชีวภาพ ซึ่งเป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ ผลการศึกษาพบว่าแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพบำบัดไนเตรทดีที่สุดคือ อะซีเตท รองลงมาคือ กลูโคส เมทานอล เอทานอล และอะซิโตน ตามลำดับ โดยสามารถบำบัดไนเตรทได้เกือบร้อยละ 100 และพบว่ามีแอมโมเนียและไนไตรท์เหลือเล็กน้อย นอกจากนั้นยังพบ เชื้อ *Pseudomonas* sp. ในถังปฏิกริยาที่ใช้กลูโคส และเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน และพบเชื้อ *Enterobacter* sp. และ *Methylobacillus* sp. จากถังปฏิกริยาที่ใช้อะซีเตท และ เอทานอล เป็นแหล่งคาร์บอน และถังปฏิกริยาที่เกิดเมือกชีวภาพเกิดค่อนข้างสูง คือ ถังปฏิกริยาที่ใช้ อะซีเตท และ เอทานอล เป็นแหล่งคาร์บอน รองลงมาคือ ถังปฏิกริยาที่ใช้ กลูโคส และเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ