

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง กลุ่มเชื้อแบคทีเรียในไตรฟอง และแบคทีเรียดีไนตริฟอง

3.2 วัสดุและอุปกรณ์

3.2.1 การศึกษาทางจุลชีววิทยา

3.2.1.1 ถึงปฏิกิริยาพลาสติกทรงกระบอก เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว สูง 12 นิ้ว

3.2.1.2 ถึงปฏิกิริยาพลาสติกทรงกระบอก เส้นผ่าศูนย์กลาง 20.5 นิ้ว สูง 28.4 นิ้ว

3.2.1.3 ตู้เลี้ยงปลาขนาด 24 x 12 x 15 นิ้ว

3.2.1.4 เครื่องวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (Spectroquant NOVA 60, Merck Ltd.,

Germany)

3.2.1.5 กล้องจุลทรรศน์แบบ Epifluorescence (Olympus BX51, Japan)

3.2.1.6 กล้องจุลทรรศน์แบบฉากสว่าง (Olympus CH30, Japan)

3.2.1.7 กล้องถ่ายภาพ CCD (Olympus DP70, Japan)

3.2.1.8 กล้องจุลทรรศน์แบบ Confocal Laser Scanning Microscopy

(CLSM) (Olympus Fluoview FV300)

3.2.1.9 กล้องจุลทรรศน์แบบ Scanning Electron Microscope (SEM)

(JEOL JSM-5800 LV (SEM5800))

3.2.1.10 เครื่องเขย่า (JKA Worhs, Malaysia)

3.2.1.11 เครื่องวัดค่า pH (Sartorius, PP50, Germany)

3.2.1.12 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (OHAUS, ARB120, USA)

3.2.1.13 ตู้บ่มเชื้อ (WTB Binder, Germany)

3.2.1. 14 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

3.2.1. 15 ชุดเครื่องแก้ว

3.2.1.16 กระดาษกรองใยแก้ว

3.2.1.17 กระบอกลีดยา

3.2.1.18 ไมโครปิเปต

3.2.1.19 Cadmium-Copper Reduction Column

3.2.1.20 ตัวกลางสำหรับการยึดเกาะของจุลินทรีย์ ได้แก่ 1) Bioball ที่ทำจากพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.25 นิ้ว และมีปริมาตรทรงกลมประมาณ 24 ซม. 2) แผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1×1 นิ้ว 3) เปลือกหอยนางรมขนาดเฉลี่ย 1.5×2.5 นิ้ว และ 4) หินภูเขาไฟ (Pumice Rock) ขนาด 3.5×3 นิ้ว

3.3 สารเคมี

3.3.1 สารเคมีทางจุลชีววิทยา

3.3.1.1 Gelatin

3.3.1.2 Chromium Potassium Sulfate

3.3.1.3 Paraformaldehyde (PFA)

3.3.1.4 Phosphate Buffered Saline (PBA)

3.3.1.5 Ethanol

3.3.1.6 DNA probes

3.3.1.7 Formamide

3.3.1.8 Sodium Chloride (NaCl)

3.3.1.9 Tris HCl

3.3.1.10 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

3.3.1.11 Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA)

3.3.1.12 Mounting Fluid (Anti-Fading Solution)

3.3.1.13 Diphenylamine Reagent

3.3.1.14 Griss-Ilosray Reagent

3.3.1.15 Nessler's Reagent

3.4 วิธีดำเนินการเก็บรวบรวมข้อมูล

3.4.1 แผนการทดลองภาพรวม

ศึกษาการเกิดเมือกชีวภาพสำหรับการบำบัดในเขตที่สะสมในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบน้ำหมุนเวียน ซึ่งเป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ โดยแบ่งแผนการทดลองออกเป็น 1) การออกแบบจำลองระบบการทดลองแบบกะ (Batch Culture System) และระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง (Continuous Reactor) ในระดับห้องปฏิบัติการ 2) ศึกษาการ

เปลี่ยนแปลงของโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียควบคู่กับการศึกษาลักษณะของชั้นเมือกชีวภาพ (Biofilm) บนผิวตัวกลางภายในระบบการทดลองแบบกะ (Batch Culture System) และระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง (Continuous Reactor) 3) ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดไนเตรทสะสมในระบบ ซึ่งการศึกษาทั้งหมดใช้เทคนิค Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) ร่วมกับ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) Technique ศึกษาลักษณะภายนอกของเมือกชีวภาพที่ติดเกาะบนพื้นผิววัสดุตัวกลางที่เหมาะสม ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) และ กล้องจุลทรรศน์แบบ Scanning Electron Microscope (SEM) ร่วมด้วยเทคนิค MPN ตามวิธีข้อ 3.5.5.1, 3.5.5.2, 3.5.5.3, 3.5.5.4 และ 3.5.5.5 และทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมีเพื่อติดตามบทบาทหน้าที่ของชุมชนจุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำเสียของระบบ ตามวิธีข้อ 3.5.1

3.4.2 กล้าเชื้อแบคทีเรีย

นำกล้าเชื้อแบคทีเรียไนโตรไฟอิงและแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิงจากงานวิจัยของสุกภา ศิริรัฐนิคม, สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง (NICA), สถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำสงขลา (Songkhla Aquarium) และจากงานวิจัยของ นุกุล อินทรสังขาและคณะ นำตะกอนจุลินทรีย์มาทำการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ (Semi-Batch Culture) โดยแต่ละถังจะเกิดปฏิกิริยาแยกจากกันและเสร็จสิ้นภายในแต่ละถัง ถังแรกเป็นถังเติมอากาศเพื่อให้เกิดกระบวนการไนโตรฟิเคชัน เพื่อให้เกิดการทำงานของแบคทีเรียไนโตรไฟอิง เรียกว่า “Single Tank NB” และภายในมีตัวกลางเพื่อใช้เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของกลุ่มจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง มีการเติมอากาศตลอดเวลาเพื่อให้ตะกอนเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณได้ดี ส่วนถังที่สองเป็นถังแบบไม่เติมอากาศเพื่อให้เกิดกระบวนการดีไนโตรฟิเคชัน โดยอาศัยการทำงานของแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิง เรียกว่า “Single Tank DNB” และเติมเมทานอลให้กับถัง “Single Tank DNB” เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิงเพื่อให้ตะกอนเชื้อสามารถเจริญเติบโต อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อไนเตรท (Methanol/NO₃⁻-N; M/N) ประมาณ 3 (w/w) เพื่อให้เพียงพอต่อการรีดิวซ์ไนเตรทของแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิง และภายในถัง Single Tank DNB มีตัวกลางซึ่งจะอยู่ในถุงตาข่าย 4 ถุง (แต่ละถุงจะใส่ตัวกลางที่แตกต่างกัน) เพื่อใช้เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของแบคทีเรีย และแต่ละถังปฏิกิริยานั้นจะเติมน้ำเสียสังเคราะห์ ปริมาตร 3 ลิตร ที่ระดับความเค็ม 15 ppt ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง 30±5 องศาเซลเซียส สำหรับแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ (Semi-Batch Culture) นั้นจะใช้เป็นกล้าเชื้อในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีไนเตรทสะสมที่มีความเค็ม 15 ppt ของระบบการทดลองแบบกะ (Batch Culture System) ตามวิธีการข้อ 3.4.4.1.1 และเก็บตัวอย่างน้ำ

และเมื่อพิจารณาภาพที่เกาะบนตัวกลางจากถัง Single Tank NB และถัง Single Tank DNB แล้วมาวิเคราะห์ตามข้อ 3.5.1, 3.5.2, 3.5.3, 3.5.5, 3.5.5.4 และ 3.5.5.5

3.4.3 น้ำเสียสังเคราะห์สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งเปลี่ยนถ่ายน้ำ

3.4.3.1 น้ำเสียสังเคราะห์สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในτριไฟอิง

น้ำเสียสังเคราะห์ที่เรียกว่า Artificial Saline Wastewater (ASW) มีความเข้มข้นของแอมโมเนียม - ไนโตรเจน ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) ประมาณ 100 มก./ล. ที่ระดับความเค็ม 15 ppt (2.5% NaCl) (ดอกรัก ชัยสาร, 2549 : 40) ดังแสดงตารางที่ 3

ตารางที่ 3 น้ำเสียสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงกล้าเชื้อแบคทีเรียในตรีไฟอิง

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ก./ล.)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5
KH_2PO_4	1
NaHCO_3	0.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
$\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2
เกลือทะเล (Sea Salt)	15
Trace Elements Solution 1 (มล./ล.)	1

3.4.3.2 น้ำเสียสังเคราะห์สำหรับการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อแบคทีเรียดีในตรีไฟอิง

น้ำทิ้ง ASW ที่มีความเข้มข้นของ $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ประมาณ 100 มก./ล. โดยมีการเติมเมทานอลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับแบคทีเรีย ซึ่งมีอัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อไนเตรท (Methanol/ $\text{NO}_3^-\text{-N}$; M/N) ประมาณ 3 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ที่ระดับความเค็ม 15 ppt (เกยูร คำคง, 2550 : 40) ดังแสดงตารางที่ 4

ตารางที่ 4 น้ำเสียสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงกล้าเชื้อแบคทีเรียดีในτριโฟอิง

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ก./ล.)
KH_2PO_4	1.5
KNO_3	1.442
NaHCO_3	1
เกลือทะเล (Sea Salt)	15
Methanol (ml/l)	2.7
Trace Elements Solution 2 (มล./ล.)	1

3.4.3.3 สารละลาย Trace elements

สารละลาย Trace Elements คัดแปลงจาก Liu, Jiang, Wan and Qu (2009 : 23-28) และ Labbé, Parent and Villemur (2003 : 914-920) ดังแสดงตารางที่ 5

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของสารละลาย Trace Elements

Components	Trace Elements Solution 1 (ก./ล.)	Trace Elements Solution 2 (ก./ล.)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.882	0.911
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.043	-
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.043	-
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.539	0.239
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.500	-

3.4.4 การศึกษาปัญหาในตรทสะสมจากการเลี้ยงสัตว์น้ำด้วยระบบน้ำหมุนเวียน

3.4.4.1 ติดตั้งระบบการทดลองแบบจำลอง

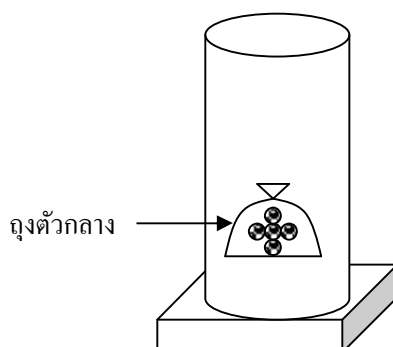
แบบจำลองของระบบการทดลองเพื่อแก้ปัญหาของในตรทสะสมนั้นในการทดลองครั้งนี้จะจำลองสถานการณ์ของในตรทสะสม โดยการดำเนินการติดตั้ง

ระบบการทดลอง 2 ชุดด้วยกันคือ ชุดการทดลองที่ 1 เป็นการทดลองระบบแบบกะ (Batch Culture System) เป็นการศึกษาเปรียบเทียบตัวกลาง (Substrate) เพื่อดูประสิทธิภาพการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันจากเมือกชีวภาพ (Biofilm) ที่เกิดจากของแบคทีเรียกลุ่มดีไนทริไฟอิง และชุดการทดลองชุดที่ 2 เป็นการทดลองระบบแบบต่อเนื่อง (Continuous Reactor) ซึ่งเป็นระบบที่มีการจำลองสภาพของระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบน้ำหมุนเวียนที่เกิดปัญหาในเตรทสะสม เพื่อศึกษาและแก้ปัญหของในเตรทสะสม โดยดำเนินการทดลองดังนี้

3.4.4.1.1 แผนผังระบบการทดลองแบบกะ(Batch Culture System)

ที่ใช้ในการศึกษา

ระบบการทดลองแบบกะที่ทำการศึกษาดังกล่าวสำหรับการยิดเกาะของจุลินทรีย์ต่อการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน และเป็นระบบที่ดำเนินการทดลองต่อการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ (Semi-Batch Culture) แต่ในระบบแบบกะจะมีการแยกถุงตัวกลางแต่ละชนิดนำไปใส่ในแต่ละถังปฏิกิริยา แต่ละถังปฏิกิริยาจะมีการทำอย่างละ 2 ซ้ำ ประกอบด้วย 5 ถังปฏิกิริยา คือ ถังปฏิกิริยาที่ 1 ถุงตัวกลางใส่ Bioball ที่ทำจากพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.25 นิ้ว, ถังปฏิกิริยาที่ 2 ถุงตัวกลางใส่เปลือกหอยนางรม ขนาดเฉลี่ย 1.5x2.5 นิ้ว, ถังปฏิกิริยาที่ 3 ถุงตัวกลางใส่แผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1x1 นิ้ว, ถังปฏิกิริยาที่ 4 ถุงตัวกลางใส่หินภูเขาไฟ (Pumice Rock) และถังปฏิกิริยาที่ 5 เป็นถังปฏิกิริยาควบคุม (ไม่มีการใส่ถุงตัวกลาง) โดยแต่ละถุงตัวกลางนั้นจะต้องมีปริมาณของตัวกลางภายในถุงเท่ากัน (ซึ่งแต่ละถุงจะบรรจุตัวกลางประมาณ 10-13 ชิ้น/ถุง) และแต่ละถังปฏิกิริยานั้นจะเติมน้ำเสียสังเคราะห์ ปริมาตร 3 ลิตร และเติมตะกอนแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงที่ได้จากข้อ 3.4.2 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และเติมเมทานอลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับแบคทีเรียดีไนทริไฟอิง อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อไนเตรท ($\text{Methanol/NO}_3^- \text{-N; M/N}$) ประมาณ 3 (w/w) เพื่อให้เพียงพอต่อการรีดิวซ์ไนเตรทของแบคทีเรียดีไนทริไฟอิง โดยแต่ละถังปฏิกิริยานั้นจะมีการกวนผสมภายใต้กระบวนการผลิตแบบกะ โดยใช้การกวนทางกลแบบใช้มือ เพื่อเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันอย่างสมบูรณ์ โดยการทดลองนี้ไม่มีการให้อากาศตลอดการทดลอง และทำการคัดเลือกชุดทดลองถังปฏิกิริยาที่เหมาะสมจาก 5 ชุดการทดลองเพื่อนำไปทดลองต่อในระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง โดยทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงด้วยการวิเคราะห์ตามวิธีข้อ 3.5 (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ระบบการทดลองแบบกะ (Batch Reactor)

3.4.4.1.2 แผนผังระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง (Continuous Reactor) ที่ใช้ในการศึกษา

ระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง (Continuous Reactor) ที่ใช้เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไนเตรทภายในระบบ และเป็นระบบที่ดำเนินการทดลองต่อจากระบบทดลองแบบกะ โดยระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง มีการแบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง (ภาพที่ 7) ดังนี้

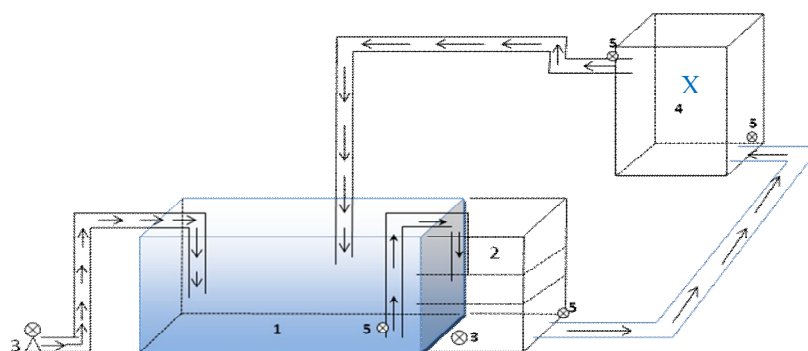
ชุดการทดลองที่ 1 การทดลองระบบที่มีการเติมน้ำที่สังเคราะห์เพียงอย่างเดียว

ชุดการทดลองที่ 2 การทดลองระบบที่มีการเลี้ยงปลาหมึก ในความหนาแน่น 15 ตัว/ตู้

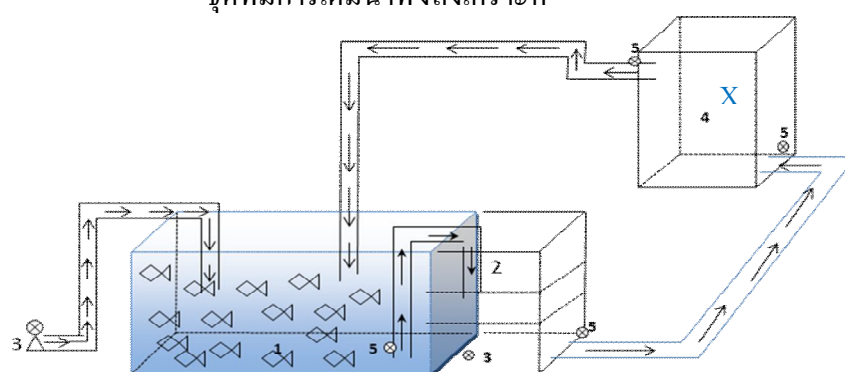
โดยมีรายละเอียดของการทดลองดังนี้

ตัวระบบการทดลองแบบต่อเนื่องประกอบด้วย 5 ส่วน คือ

1) ตู้ปลาขนาด 24 x 12 x 15 นิ้ว, 2) ถังปฏิกิริยาที่บรรจุตัวกลาง (Bioball เพื่อให้แบคทีเรียไนโตรฟิอิง ยึดเกาะอาศัย) 3) บั๊มเติมอากาศ และ 4) ถังปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน (ภาพที่ 7) เมื่อทำการติดตั้งระบบเรียบร้อยแล้วก็จะเติมน้ำทะเลเทียมปริมาตร 108 ลิตร ลงในตู้ปลา และเติมน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันที่บรรจุตัวกลาง ปริมาตร 97 ลิตร โดยจะทำการเติมทั้ง 2 ชุดการทดลอง ซึ่งในการดำเนินระบบจะมีอัตราการหมุนเวียนน้ำ 1.08 ลิตร/นาทิจากนั้นเติมน้ำเชื้อแบคทีเรียไนโตรฟิอิงจากข้อ 3.4.2 และ กล้าเชื้อแบคทีเรียดีไนตริฟิอิงที่ได้จากระบบการทดลองแบบกะ (Batch Culture System) จากข้อ 3.4.4.1.1 ปริมาตร อย่างละ 2-3 ลิตร และเติมเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับกล้ำเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในถังปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันที่บรรจุตัวกลาง โดยการทดลองนี้มีการให้อากาศเข้าสู่ปลาและถังปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันตลอดการทดลอง และทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงของไนเตรทสะสมในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบจำลองภายในห้องปฏิบัติการตามวิธีข้อ 3.5



ชุดที่มีการเติมน้ำทิ้งสังเคราะห์



ชุดการทดลองใส่ปลาทับทิม

ภาพที่ 7 แผนผังการทดลองระบบแบบต่อเนื่อง เพื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองที่มีการใส่ปลาทับทิมกับชุดที่มีการเติมน้ำทิ้งสังเคราะห์เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของไนเตรทสะสมในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ที่ทำการศึกษประกอบด้วย 5 ส่วนคือ (1) ตู้ปลา (2) ถังปฏิกิริยาที่บรรจุตัวกลาง (3) ปั๊มเติมอากาศ (4) ถังปฏิกิริยาดิโนทริฟิเคชัน และ (5) ปั๊ม จุด (X) แสดงจุดเก็บตัวอย่างเมือกชีวภาพที่นำไปตรวจสอบโครงสร้างแบคทีเรีย และตรวจสอบความหลากหลายของแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH และเทคนิค DGGE ควบคู่กับตรวจสอบลักษณะของชั้นเมือกด้วยเทคนิค CLSM การนับปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างเมือกชีวภาพ และ แสดงพื้นที่จุดเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมี

3.5 วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

3.5.1 การศึกษาประสิทธิภาพของการบำบัดไนเตรทด้วยการตรวจวิเคราะห์

คุณภาพน้ำ

หาปริมาณแอมโมเนียและไนโตรทโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Ammonium Test และ Nitrite Test ที่ใช้ร่วมกับเครื่อง Spectroquant NOVA 60 (Merck Ltd., Germany) วิเคราะห์

หาปริมาณไนเตรทด้วยวิธีการรีดิวซ์ด้วยแคดเมียม - คอปเปอร์ (Cadmium Copper reduction Method) ร่วมกับการใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Nitrite test ที่ใช้ร่วมกับ Spectroquant NOVA 60 (Merck Ltd Co, Germany) ตามกรรมวิธีดัดแปลงของนิแอ นิอะ, พีระศักดิ์ สิริวัฒน์, สมพงษ์ โอทอง, นพดล ศุภระกาญจน์ และ นฤกุล อินทรสังขา (2547 : 113-121)

3.5.2 การวิเคราะห์อัตราการเกิดดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification Rate: DNR)

วิเคราะห์อัตราดีไนตริฟิเคชัน โดยล้างตะกอนจุลินทรีย์ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 รอบ และผสมแร่ธาตุต่างๆ ตามลักษณะน้ำเสียสังเคราะห์ (ตารางที่ 4) ที่ปราศจากการเติม KNO_3 เป่าก๊าซไนโตรเจนเพื่อไล่ออกซิเจนออกจากน้ำซึ่งปรับค่าพีเอชให้อยู่ในช่วง 7.5 ± 0.2 เติม KNO_3 ให้มีความเข้มข้นประมาณ 20 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร วิเคราะห์หาปริมาณไนเตรท คำนวณอัตราการเกิดดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification Rate, DNR) จากอัตราการใช้ในเตรท (Nitrate Utilization Rate: NUR) โดยคำนวณจากสมการที่ 3

$$\text{NUR} = (\text{N}_1 - \text{N}_2) / (t_2 - t_1) \text{ ณ อุณหภูมิ T องศาเซลเซียส} \quad \text{สมการที่ 3}$$

โดยที่

NUR = Nitrate Uptake Rate (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร-ชั่วโมง)

N_1 = ไนเตรทไนโตรเจนที่เวลา t_1 (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)

N_2 = ไนเตรทไนโตรเจนที่เวลา t_2 (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)

t_1, t_2 = เวลาใดๆ ณ การทดลอง (ชั่วโมง)

ที่มา: ชงชัย พรรณสวัสดิ์ (2545 : 611)

3.5.3 ประสิทธิภาพการบำบัด (Removal Efficiency)

ประสิทธิภาพการบำบัดในระบบ สามารถคำนวณได้จากความแตกต่างระหว่างคุณภาพน้ำที่เข้าและออกจากระบบบำบัด ตามสมการที่ 4

$$\text{Removal Efficiency (\%)} = \{(\text{N})_{\text{in}} - (\text{N})_{\text{out}}\} / (\text{N})_{\text{in}} \times 100 \quad \text{สมการที่ 4}$$

โดยที่

(N) = ความเข้มข้นของสารหรือค่าของตัวแปรที่สนใจ

in = ความเข้มข้นของสารที่ไหลเข้าสู่ระบบ

out = ความเข้มข้นของสารที่ไหลออกจากระบบ

ที่มา: จามรี รักษ์บางแหลม และพุทธ ส่องแสงจินดา (2548:1-16)

3.5.4 การหาปริมาณของแข็งแขวนลอยระเหยง่าย (Volatile Suspended Solids, VSS)

หาปริมาณของแข็งแขวนลอยระเหยง่าย โดยการนำตะกอนที่กรองได้จาก การทดสอบหาค่าของแข็งแขวนลอย นำไปอบที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส ประมาณ 1-2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหาค่าน้ำหนักที่หายไปซึ่งนั่นก็คือค่าของแข็งแขวนลอยระเหยง่าย (Volatile Suspended Solids , VSS) ตามวิธีมาตรฐาน (APHA. 1992 :1-46)

3.5.5 การศึกษาลักษณะทางจุลชีววิทยา

3.5.5.1 การนับจำนวนแบคทีเรียด้วยเทคนิค MPN แบบ Microtechnique

3.5.5.1.1 การนับจำนวนแบคทีเรียในทรีไฟอิง

เก็บตัวอย่างเมือกชีวภาพจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในระบบการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ และระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง (Continuous Reactor) ด้วยวิธีการขูดและเขย่าจากเมือกชีวภาพที่เกิดบนพื้นผิวดักกลาง แล้วนับจำนวนแบคทีเรียในทรีไฟอิง ในถังบรรจุตัวกลางชีวภาพในระบบการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ และระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง ด้วยเทคนิคเอ็มพีเอ็นแบบไมโครเทคนิค (Rowe, Todd and Waide. 1977 : 675-680) ใช้อาหาร Watson's Mmedium (Jones and Hood. 1980 : 339-347) สำหรับแบคทีเรียกลุ่ม AOB และส่วนแบคทีเรียกลุ่ม NOB ใช้อาหาร Alexander and Clark's Medium (Alexander and Clark. 1965 : 1477-1483) โดยเติมอาหารลงใน Microtiter Plate ทั้ง 96 หลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร เจือจางตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ในน้ำทะเลสังเคราะห์ 45 มิลลิลิตร แล้วดูดใส่ใน Microtiter Plates ที่เติมอาหารแล้วแถว A ถึง H หลุมๆละ 100 ไมโครลิตร เจือจางตัวอย่าง 2 เท่าจากแถว A1 ไปจนถึง A12 และทำเช่นเดียวกันในแถว B-H ปิดฉนวนฝาด้วยพาราฟิล์มแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน แบคทีเรียกลุ่ม AOB ทดสอบการออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์ด้วยสารละลาย Diphenylamine ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม NOB ทดสอบการออกซิไดส์ไนไตรท์เป็นไนเตรทด้วยสารละลาย Griess-Ilosvay's การบันทึกค่าให้แถวที่มีหลุมผลบวกครบทั้งแถว A ถึง H ที่มีความเจือจางน้อยที่สุดเป็น P1 แถวถัดไปเป็น P2 และ P3 ตามลำดับ นำค่าเทียบกับตารางเพื่อคำนวณหาค่าเอ็มพีเอ็น

3.5.5.1.2 การนับจำนวนแบคทีเรียดีในไตรฟอง

เก็บตัวอย่างเมือกชีวภาพจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในระบบการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ ระบบการทดลองแบบกะ (Batch Culture System) และระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง (Continuous Reactor) ด้วยวิธีการชูดและเขย่าจากเมือกชีวภาพที่เกิดขึ้นบนพื้นผิวดักกลาง แล้วนับจำนวนแบคทีเรียดีในไตรฟองกลุ่ม NRB และ DB ในถังปฏิริยาดีในไตรฟิเคชันในระบบการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ ระบบการทดลองแบบกะ และระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง ด้วยเทคนิคเอ็มพีเอ็นแบบไมโครเทคนิคโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Soto et al. (2002 : 1173-1176) โดยใช้อาหาร Saline DB ทำเช่นเดียวกับการนับจำนวนแบคทีเรียดีในไตรฟอง แต่ใช้ระยะเวลาในการบ่มเพียง 14 วัน ตรวจผลการเหลืออยู่ของไนโตรที่และไนเตรทด้วยสารละลาย Griess-Ilosvay's reagent (Alexander and Clark. 1965 : 1477-1483) และสารละลาย Morgan

3.5.5.2 ตรวจสอบคุณลักษณะของเมือกชีวภาพ (Biofilm) ที่เกาะบนผิวดักกลางด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

เก็บตัวอย่างเมือกชีวภาพจากระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง (Continuous reactor) ซึ่งภายในถังปฏิริยาดีในไตรฟิเคชันจะบรรจุตัวกลางเพื่อเป็นตัวกลางให้เกิดเมือกชีวภาพซึ่งจะทำการเก็บในเวลาต่างกัน การเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบคุณลักษณะของเมือกชีวภาพเมื่อสิ้นสุดการทดลองในระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง (Continuous Reactor) โดยการนำตัวอย่างเมือกชีวภาพเกาะบนผิวดักกลางมาแช่ในน้ำยาบูเออ (Bouin's Fluid) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงเปลี่ยนมาเป็นแอลกอฮอล์ 70 % ก่อนนำไปผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออก (Dehydration) และฝังตัวอย่าง (Embedding) ก่อนที่จะตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนาประมาณ 5-7 ไมโครเมตร เตรียมเป็นสไลด์ จากนั้นก็นำไปทำตามขั้นตอนของเทคนิค FISH แล้วส่งตัวอย่างไปตรวจสอบคุณลักษณะของเมือกชีวภาพที่เกาะบนผิวดักกลาง ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) ที่ความยาวคลื่น 488 nm (Argon LASER) และ 543 nm (He-Ne LASER) ณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3.5.5.3 ตรวจสอบลักษณะของโครงสร้างพื้นผิวภายนอกของเมือกชีวภาพ

ที่เกาะบนผิวดักกลาง (Biofilm) ที่เกาะบนผิวดักกลางด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ SEM

เก็บตัวอย่างเมือกชีวภาพจากระบบการทดลองแบบกะ (Batch Culture System) จากถังปฏิริยาที่เกิดกระบวนการดีไนโตรฟิเคชันดีที่สุด โดยเก็บตัวอย่างในเวลา

ที่แตกต่างกัน เพื่อนำมาตรวจดูลักษณะของโครงสร้างทางพื้นผิวภายนอกของเมือกชีวภาพ โดยใช้วิธีการชุบและเขย่าจากตัวกลาง แล้วนำตัวอย่างมาตรึงด้วยสารละลาย 4% Glutaraldehyde ใน 0.5 ml (Al-bayaty, Taiyeb-ali, Abdulla and Hashim. 2010 : 1525-1531) แล้วส่งตัวอย่างไปตรวจสอบลักษณะของโครงสร้างพื้นผิวภายนอกของเมือกชีวภาพที่เกาะบนผิวดักกลาง ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ Scanning Electron Microscope (SEM) ณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3.5.5.4 การศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียภายในเมือกชีวภาพด้วย

เทคนิค FISH

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียภายในเมือกชีวภาพด้วยเทคนิค FISH โดยอาศัยข้อมูลจากโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นสายดีเอ็นเอโพรบที่มีลำดับเบสจะจับกับกลุ่มหรือชนิดของจุลินทรีย์ซึ่งติดฉลากด้วยสารเรืองแสง โดยดีเอ็นเอโพรบจะมีความจำเพาะกับแบคทีเรียในแต่ละกลุ่มตั้งแต่โดเมนไปจนถึงระดับสปีชีส์ มีวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Amann, Ludwig and Schleifer (1995 : 143-169) ดังนี้

3.5.5.4.1 การเคลือบสไลด์ (Treatment of Slides)

ล้างสไลด์ (Teflon-Coated Slides) เคลือบเทฟลอน (Teflon Slide) ด้วยการต้มใน Teepol ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาดทิ้งไว้แห้ง เคลือบด้วยสารละลายเจลาตินร้อยละ 1 และโครเมียมโพแทสเซียมซัลเฟต ร้อยละ 0.1 และทิ้งไว้แห้ง

3.5.5.4.2 การเตรียมตัวอย่างเมือกจุลินทรีย์ให้คงสภาพ (Sample

Fixation)

โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วนเพื่อตรึงแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยนำตัวอย่าง 2 มล. ปั่นตกตะกอน 1,000×g ล้างเซลล์ด้วย Phosphate Buffered Saline (PBA) สำหรับแบคทีเรียแกรมลบแช่ใน Para Formaldehyde (PFA) ร้อยละ 4 (ใน PBS) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 ชม. ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกแช่ใน เอทานอล ร้อยละ 50 เป็นเวลา 4-16 ชม. แล้วล้างเซลล์ออกจากด้วย PBS แล้วเก็บไว้ในเอทานอล/ PBS อัตราส่วน 1:1 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

3.5.5.4.3 การดึงน้ำออกจากตัวอย่าง (Dehydration)

นำตะกอนจุลินทรีย์ประมาณ 1-5 ไมโครลิตร กระจายลงบนสไลด์ขนาด 10 หลุม ดึงน้ำออกจากเซลล์ ด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50, 80 และ 100 ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 3 นาที

3.5.5.4.4 การเติมดีเอ็นเอโพรบ (Probe Hybridization)

ทำการ Hybridization ด้วยดีเอ็นเอโพรบความเข้มข้น 5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ใน Probe Hybridization Buffer (NaCl 0.9 M, Tris/HCl 20 mM, SDS 0.01 %, Formamide) ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชม.

3.5.5.4.5 การล้าง (Washing)

ล้างด้วย Wash Buffer (Tris/HCl 20 mM, SDS 0.01 %, NaCl) ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จำนวน 1 ครั้ง แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องเป่าผม (Hair Dryer)

3.5.5.4.5 การตรวจสอบ (Detection)

ย้อมสไลด์ (Mounting Slides) ด้วย Anti-Fading Solution โดยหยดกระจายทั่วสไลด์ วาง Cover slips ปิดทับโดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ นำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบบ 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) โดยนับจำนวนแบคทีเรียที่ติดดีเอ็นเอโพรบ ALF1b, BET42a และ GAM42a เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียในฟิล์ม *Proteobacteria* เปรียบเทียบกับจำนวนแบคทีเรียที่ติดโพรบสำหรับแบคทีเรียทั้งหมด คำนวณค่าสัดส่วนต่อแบคทีเรียทั้งหมดโดยมีค่าเป็นร้อยละ ส่วนดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะต่อกลุ่มแบคทีเรียไนตริไฟอิง และแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง และฟิล์มอื่นๆ คำนวณในลักษณะเดียวกัน

ตารางที่ 6 ดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะต่อกลุ่มแบคทีเรียระดับโดเมน ไฟล์ม และคลาสที่ใช้ในการศึกษา

PROBES	%FA**	PROBES 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	35	CGTTCGYTCTGAGCCAG	<i>Alphaproteobacteria</i> , some <i>Deltaproteobacteria</i> , <i>Spirochaetales</i>	Manz et al. 1992
BET42a	35	GCCTTCCCACCTTCGTTT	<i>Betaproteobacteria</i>	Manz et al. 1992
GAM42a	35	GCCTTCCCACATCGTTT	<i>Gammaproteobacteria</i>	Manz et al. 1992

หมายเหตุ * ใช้ EUB338, EUB338-II และ EUB338-III รวมกันในส่วนเท่ากันสำหรับตรวจสอบแบคทีเรียทั้งหมดเรียกว่า EUBmixed และ LGC354A, LGC354B และ LGC354C รวมกันในส่วนเท่ากันสำหรับตรวจสอบแบคทีเรียทั้งหมดเรียกว่า LGC354mixed **ความเข้มข้นของ Formamide สำหรับ Hybridization buffer

ตารางที่ 7 ดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะต่อกลุ่มแบคทีเรียดีไนทรีไฟอิง

PROBES	%FA**	PROBES SEQUENCE (5'-3')	SPECIFICITY	REFERENCES
MPH730	25	CAGTAATGGCCCAGTGAGTCG	<i>Methylophaga</i> spp.	Janvier et al. 2003
MPHm 944	45	CC	<i>Methylophaga marina</i>	Janvier et al. 2003

หมายเหตุ**ความเข้มข้นของ Formamide สำหรับ Hybridization

