

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในเมือกชีวภาพของระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบน้ำหมุนเวียนที่มีปัญหาในตรทสะสม เริ่มต้นจากการติดตั้งถึงปฏิบัติการแบบกึ่งกะ (Semi-Batch Culture) สำหรับการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อแบคทีเรียในไตรฟองและแบคทีเรียในไตรฟองในระดับห้องปฏิบัติการ โดยทำการเก็บรวบรวมกล้าเชื้อจากงานวิจัยที่ผ่านมาของหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยทักษิณ โดยติดตามศึกษาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียในเมือกชีวภาพกับประสิทธิภาพการบำบัดในตรทภายในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในแต่ละช่วงเวลา โดยใช้เทคนิค FISH ร่วมกับเทคนิค DGGE ควบคู่กับการศึกษาลักษณะภายนอกของเมือกชีวภาพที่ขีดเกาะบนพื้นผิววัสดุตัวกลางที่เหมาะสมด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ CLSM และ กล้องจุลทรรศน์แบบ SEM ร่วมด้วยเทคนิค MPN แบบไมโครเทคนิค และตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมี เพื่อศึกษาบทบาทและหน้าที่ของกล้าเชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมคุณภาพน้ำในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบน้ำหมุนเวียน โดยเน้นการเกิดปัญหาในตรทสะสมในระบบ โดยมีรายละเอียดของผลการศึกษาดังนี้

4.1 การเพาะกล้าเชื้อแบคทีเรียสำหรับแก้ปัญหาในตรทสะสมจากระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบน้ำหมุนเวียนในระดับห้องปฏิบัติการ

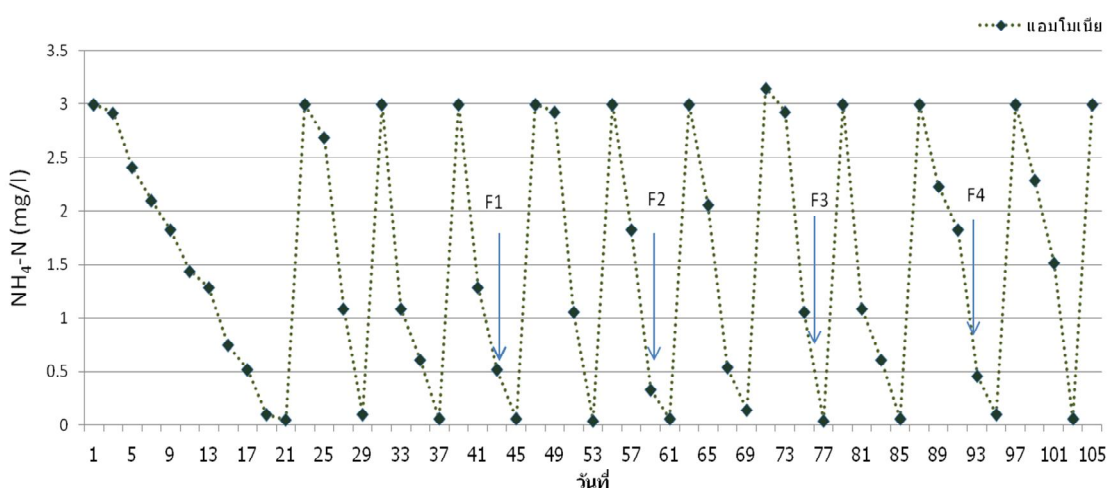
4.1.1 การศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดในโตรเจน

นำกล้าเชื้อแบคทีเรียในไตรฟองและแบคทีเรียในไตรฟอง จากงานวิจัยที่ผ่านมา และจากระบบบำบัดน้ำทิ้งที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งของนุกุล อินทระสังขา และคณะ (2550) สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง (NICA) และสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำสงขลา (Songkhla Aquarium) มาติดตั้งและเพาะขยายกล้าเชื้อแบบกึ่งกะในระดับห้องปฏิบัติการ ที่ระดับความเค็ม 15 ppt โดยได้ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 105 วัน โดยมีรายละเอียดของผลการศึกษาดังนี้

จากการตรวจสอบคุณภาพทางเคมีภายในถัง Single Tank NB ซึ่งเป็นระบบที่ต้องการเพิ่มขยายกล้าเชื้อแบคทีเรียในไตรฟอง พบว่าในช่วงแรกปริมาณความเข้มข้นแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ($\text{NH}_4\text{-N}$) มีปริมาณเฉลี่ย 3 มก./ล. และลดลงเหลือปริมาณเฉลี่ย 0.10 มก./ล.

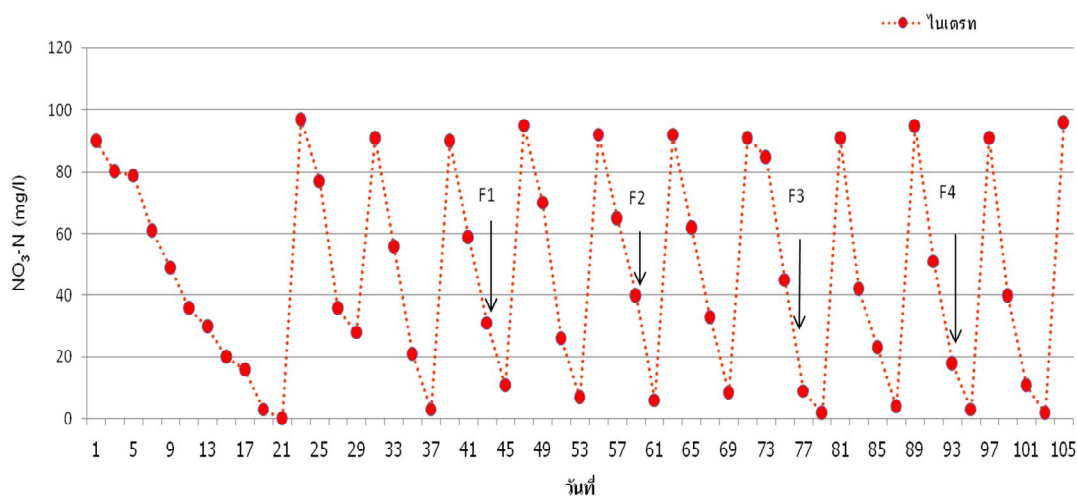
โดยใช้เวลาประมาณ 21 วัน และเมื่อเชื้อแบคทีเรียปรับสภาพให้เข้ากับการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ พบว่ามีปริมาณความเข้มข้นแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ($\text{NH}_4\text{-N}$) ที่เติมลงไปจนถึง Single Tank NB มีการลดลงจากความเข้มข้นเฉลี่ย 3 มก./ล. และลดลงเหลือปริมาณเฉลี่ย 0.06 มก./ล. โดยใช้เวลาประมาณ 7 วัน และมีรูปแบบการลดลงตามระยะเวลาที่เติมน้ำทิ้งเข้าไปใหม่ และภายในระบบมี ระยะเวลาพักทางชลศาสตร์ (Hydraulic Retention Time : HRT) เท่ากับ 9.3 วัน (ภาพที่ 8)

ส่วนในถัง Single Tank DNB ซึ่งเป็นระบบที่ต้องการเพาะขยายกล้ำ เชื้อแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง พบว่าในช่วงแรกมีปริมาณความเข้มข้นไนเตรท-ไนโตรเจน ($\text{NO}_3\text{-N}$) เริ่มต้นมีปริมาณเฉลี่ย 90.96 มก./ล. และลดลงเหลือปริมาณเฉลี่ย 0.02 มก./ล. โดยใช้เวลาประมาณ 21 วัน และเมื่อเชื้อแบคทีเรียสามารถปรับสภาพให้เข้ากับการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ พบว่ามีปริมาณความเข้มข้นไนเตรท-ไนโตรเจน ($\text{NO}_3\text{-N}$) ที่เติมลงไปจนถึง Single Tank DNB มีการลดปริมาณลงจากความเข้มข้นเฉลี่ยที่ประมาณ 90.83 มก./ล. และลดลงเหลือน้อยกว่าปริมาณเฉลี่ย 0.02 มก./ล. ภายในระยะเวลา 7 วัน และมีรูปแบบการลดลงตามระยะเวลาที่เติมน้ำทิ้งถังเคราะห์เข้าไปใหม่ และภายในระบบมีระยะเวลาพักทางชลศาสตร์ (Hydraulic Retention Time : HRT) เท่ากับ 9.3 วัน (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 8 การติดตามประสิทธิภาพการบำบัดแอมโมเนียในถัง Single Tank NB (ระดับความเค็ม 15 ppt)

ลูกศร (↓) แสดงจุดเก็บตัวอย่างมาศึกษาแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH (F1, F2, F3 และ F4)



ภาพที่ 9 การติดตามประสิทธิภาพการบำบัดไนเตรทในถัง Single Tank DNB (ระดับความเต็ม 15 ppt) ลูกศร (↓) แสดงจุดเก็บตัวอย่างมาศึกษาแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH (F1, F2, F3 และ F4)

4.1.2 การศึกษาทางจุลชีววิทยาของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะบนผิวตัวกลาง

4.1.2.1 การหาปริมาณแบคทีเรียไนไตรไฟอิงและแบคทีเรียดีไนไตรไฟอิงใน

ระบบการทดลองแบบกึ่งกะ

ผลการตรวจนับแบคทีเรียไนไตรไฟอิงและแบคทีเรียดีไนไตรไฟอิง ด้วยเทคนิค MPN พบแบคทีเรียไนไตรไฟอิง กลุ่ม Ammonium Oxidizing Bacteria (AOB) เท่ากับ 3.4×10^4 เอ็มพีเอ็น/มล. และ กลุ่ม Nitrite Oxidizing Bacteria (NOB) เท่ากับ 5.4×10^4 เอ็มพีเอ็น/มล. ซึ่งจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มมีจำนวนมากซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีภายในถัง Single Tank NB ที่สามารถบำบัดแอมโมเนียได้เกือบสมบูรณ์ และแบคทีเรียดีไนไตรไฟอิงกลุ่ม Denitrifying Bacteria (DB) เท่ากับ 7.6×10^6 เอ็มพีเอ็น/มล. และกลุ่ม Nitrate Reducing Bacteria (NRB) เท่ากับ 7.8×10^5 เอ็มพีเอ็น/มล. ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีภายในถัง Single tank DNB ที่สามารถบำบัดไนเตรทได้เกือบสมบูรณ์

นอกจากนั้นได้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในระบบจากปริมาณของแข็งแขวนลอยที่ระเหยง่าย (Volatile Suspended Solids : VSS) และนำมาวิเคราะห์หาผลผลิตของน้ำหนักแห้งมวลชีวภาพที่ได้ต่อปริมาณแอมโมเนียที่ใช้ไป (Yield) จากถัง Single Tank NB พบค่า VSS เท่ากับ 152 มก./ล. และ ค่า Yield เท่ากับ 1.027 กรัมเซลล์/กรัมซับสเตรท ตามลำดับ ส่วนในถัง Single Tank DNB ได้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในระบบจากปริมาณของแข็งแขวนลอยที่ระเหยง่าย (Volatile Suspended Solids : VSS) และนำมาวิเคราะห์หาผลผลิตของน้ำหนัก

แห้งมวลชีวภาพที่ได้ต่อปริมาณไนเตรทที่ใช้ไป (Yield) พบค่า VSS เท่ากับ 307.5 มก./ล. และ ค่า Yield เท่ากับ 1.59 กรัมเซลล์/กรัมซับสเตรท ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าถุงที่ใส่เปลือกหอยนางรมมีค่า VSS และค่า Yield มากที่สุด เท่ากับ 95.5 มก./ล. และ 0.49 กรัมเซลล์/กรัมซับสเตรท ตามลำดับ รองลงมาคือถุงที่ใส่หินภูเขาไฟ มีค่า VSS และค่า Yield เท่ากับ 94 มก./ล. และ 0.49 กรัมเซลล์/กรัมซับสเตรท ถุงที่ใส่แผ่นอวนในลอนชนิดทอไม่มีปม ขนาด 1×1 นิ้ว มีค่า VSS และค่า Yield เท่ากับ 60.5 มก./ล. และ 0.31 กรัมเซลล์/กรัมซับสเตรท ตามลำดับ และถุงที่ใส่ Bioball ที่ทำจากพลาสติก มีค่า VSS และค่า Yield เท่ากับ 43.5 มก./ล. และ 0.22 กรัมเซลล์/กรัมซับสเตรท ตามลำดับ

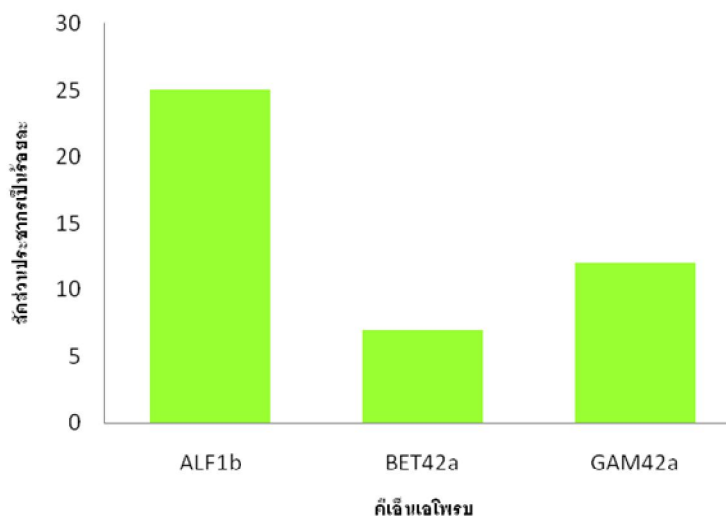
4.1.2.2 ศึกษาโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียจากระบบการเพาะแบบกึ่งกะ

(Semi-Batch Culture)

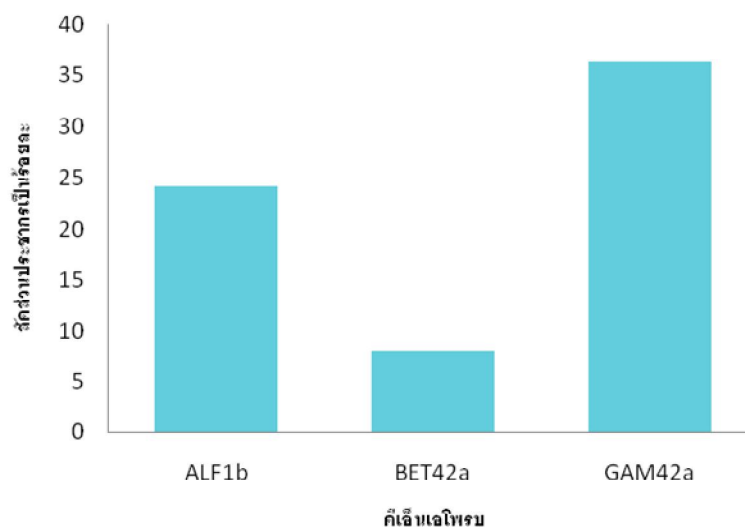
ผลการศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในไตรฟอิงและแบคทีเรียดีไนไตรฟอิงในกระบวนการไนตริฟิเคชันและกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน ด้วยเทคนิค FISH จากถัง Single Tank DNB และ ถัง Single Tank NB โดยใช้ดีเอ็นเอโพรบ ALF1b, BET42a และ GAM42a เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียไฟลัม *Proteobacteria* โดยดีเอ็นเอโพรบทั้ง 3 ชนิด เป็นดีเอ็นเอโพรบที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับแบคทีเรียในกระบวนการไนตริฟิเคชัน และกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน โดยมีรายละเอียดของผลการศึกษาดังนี้

ถัง Single Tank NB พบแบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* โดยเฉพาะกลุ่มย่อยคลาส *Alphaproteobacteria* พบว่าเป็นกลุ่มเด่นซึ่งพบมากถึงร้อยละ 25 ของแบคทีเรียทั้งหมด รองลงมาคือ คลาส *Gammaproteobacteria* ร้อยละ 12 ของแบคทีเรียทั้งหมด และคลาส *Betaproteobacteria* ที่พบเพียงร้อยละ 7 ของแบคทีเรียทั้งหมด (ภาพที่ 10)

ส่วนในถัง Single Tank DNB พบว่ามีแบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* โดยเฉพาะกลุ่มย่อยคลาส *Gammaproteobacteria* พบว่าเป็นกลุ่มเด่นซึ่งพบมากถึงร้อยละ 36.4 ของแบคทีเรียทั้งหมด รองลงมาคือ คลาส *Alphaproteobacteria* ร้อยละ 24.2 ของแบคทีเรียทั้งหมด และคลาส *Betaproteobacteria* ที่พบเพียงร้อยละ 8 ของแบคทีเรียทั้งหมด (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 10 โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่พบในถัง Single Tank NB จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH โดยมีสัดส่วนเป็นร้อยละของแบคทีเรียระดับไฟลัมไปจนถึงระดับสปีชีส์เมื่อเทียบกับคัสเตอโรพอร์บ EUB ซึ่งเป็นคัสเตอโรพอร์บที่จำเพาะต่อแบคทีเรียทั้งหมด



ภาพที่ 11 โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่พบในถัง Single Tank DNB จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH โดยมีสัดส่วนเป็นร้อยละของแบคทีเรียระดับไฟลัมไปจนถึงระดับสปีชีส์เมื่อเทียบกับคัสเตอโรพอร์บ EUB ซึ่งเป็นคัสเตอโรพอร์บที่จำเพาะต่อแบคทีเรียทั้งหมด

4.2 การศึกษาเพื่อแก้ไขในเตรทสะสมจากการเลี้ยงสัตว์น้ำด้วยระบบน้ำหมุนเวียน

การทดลองครั้งนี้ได้จำลองสถานการณ์ของการเกิดปัญหาการสะสมของไนเตรทในระบบ โดยติดตั้งระบบการทดลองแบบกะ (Batch Culture System) ประกอบด้วย 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ 1 เพื่อคัดเลือกตัวกลาง (Substrate) ที่เหมาะสมในการใช้ในระบบจุลินทรีย์ยัดเกาะในการกำจัดไนเตรทจากเมือกชีวภาพ (Biofilm) ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียกลุ่มดีไนทรีไฟอิง และชุดการทดลองที่ 2 ทำการจำลองสภาพของระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบน้ำหมุนเวียนที่เกิดปัญหาไนเตรทสะสม เพื่อศึกษาและแก้ปัญหานี้ของไนเตรทสะสม โดยมีรายละเอียดของผลการศึกษา ดังนี้

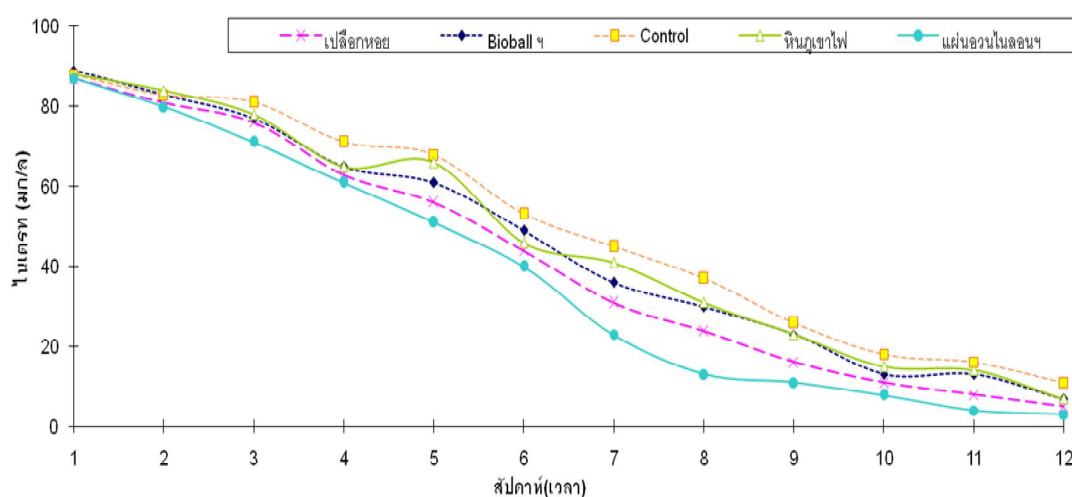
4.2.1 การคัดเลือกตัวกลางที่เหมาะสมในการใช้ระบบจุลินทรีย์ยัดเกาะในการกำจัดไนเตรท

4.2.1.1 ศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดไนเตรทจากเมือกชีวภาพของแบคทีเรียกลุ่มดีไนทรีไฟอิง

นำกล้าเชื้อแบคทีเรียดีไนทรีไฟอิงจากการเพาะขยายกล้าเชื้อแบบกึ่งกะมาศึกษาประสิทธิภาพของชนิดตัวกลางต่อการบำบัดไนเตรทจากเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียที่เข้ามายัดเกาะบนตัวกลาง โดยใช้ตัวกลาง 4 ชนิดคือ 1) แผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1x1 นิ้ว 2) เปลือกหอยนางรม 3) Bioball ที่ทำจากพลาสติก และ 4) หินภูเขาไฟ ซึ่งจะมีการแยกดูไล่ตัวกลางแต่ละชนิดนำไปใส่ในถังแต่ละถังปฏิบัติการ เทียบกับถังปฏิบัติการควบคุม ประกอบด้วย 5 ถังปฏิบัติการภายในห้องปฏิบัติการ ซึ่งทำการศึกษาเป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยมีรายละเอียดของผลการศึกษา ดังนี้

จากการตรวจสอบคุณภาพทางเคมีภายในถังปฏิบัติการ ทั้ง 5 ถังปฏิบัติการพบว่า ตัวกลางที่เหมาะสมต่อการบำบัดไนเตรทได้ดีที่สุด คือ ถังปฏิบัติการที่มีแผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1x1 นิ้ว เป็นตัวกลางที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรทได้ดีที่สุด คิดเป็นร้อยละ 85 รองลงมาคือ ถังปฏิบัติการที่มีเปลือกหอยนางรมเป็นตัวกลางที่มีประสิทธิภาพการบำบัดไนเตรท คิดเป็นร้อยละ 79 ถังปฏิบัติการที่มี Bioball ที่ทำจากพลาสติกเป็นตัวกลาง ที่มีประสิทธิภาพการบำบัดไนเตรท คิดเป็นร้อยละ 75 และถังปฏิบัติการที่มีหินภูเขาไฟเป็นตัวกลาง ที่มีประสิทธิภาพการบำบัดไนเตรทคิดเป็นร้อยละ 73 เมื่อเปรียบเทียบกับถังปฏิบัติการควบคุมที่มีประสิทธิภาพการบำบัดไนเตรทเพียงร้อยละ 68 ตามลำดับ โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนเตรทภายในถังปฏิบัติการที่บรรจุตัวกลางแต่ละชนิดเทียบกับถังปฏิบัติการ

ควบคุม ซึ่งพบว่าในสัปดาห์ที่ 7 ของการทดลอง ถึงปฏิกิริยาที่มีแผ่นอวนในลอนชนิดทอไม่มี
ปมตัดเป็นชั้นสี่เหลี่ยมขนาด 1×1 นิ้ว เป็นตัวกลางมีปริมาณไนเตรทลดลงได้เร็วกว่าถึงปฏิกิริยาที่
บรรจุตัวกลางชนิดอื่นเมื่อเทียบกับถึงปฏิกิริยาควบคุม และเมื่อสิ้นสุดการทดลองภายในถึงปฏิกิริยา
ดังกล่าวเหลือปริมาณไนเตรทน้อยกว่าถึงปฏิกิริยาที่บรรจุตัวกลางชนิดอื่น เมื่อเทียบกับถึง
ปฏิกิริยาควบคุม และภายในระบบมีระยะเวลาการกักทางชลศาสตร์ (Hydraulic Retention
Time (HRT)) จากทั้ง 5 ถึงปฏิกิริยา ได้ประมาณ 8.7 วัน



ภาพที่ 12 ติดตามการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตรทจากถึงปฏิกิริยาที่บรรจุตัวกลาง 4 ชนิด
เปรียบเทียบกับถึงปฏิกิริยาควบคุม ที่มีความเข้มข้นของ $\text{NO}_3\text{-N}$ 100 มก/ล. ที่ระดับ
ความเค็ม 15 ppt

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบคุณลักษณะตัวกลางจากถังปฏิริยาที่บรรจุตัวกลาง และถังปฏิริยาควบคุม

ประเด็น	ชนิดตัวกลาง				
	ถังปฏิริยาควบคุม	Bioball ที่ทำจากพลาสติก	เปลือกหอยนางรม	แผ่นอวนไนลอนฯ	หินภูเขาไฟ
ขนาด (กxย)	-	-	3×2 ตร.นิ้ว	1×1 ตร.นิ้ว	1×0.7 ตร.นิ้ว
พื้นที่ผิวจำเพาะ (m ² /L)	-	0.018	0.008	0.5	-
ประเภทของวัสดุ	-	พลาสติก	ธรรมชาติ	พลาสติก	ธรรมชาติ
ประสิทธิภาพการบำบัดในเตรท (%)	68	75	79	85	73
ประสิทธิภาพของการยึดเกาะของเมือกชีวภาพ	-	ยึดเกาะได้เล็กน้อย	ยึดเกาะได้ปานกลาง	ยึดเกาะได้มากที่สุด	ยึดเกาะได้ปานกลาง
ปริมาณตัวกลาง (ชิ้น/ถัง)	-	10 ชิ้น	10 ชิ้น	10 ชิ้น	10 ชิ้น

4.2.1.2 ศึกษาทางกายภาพของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะของตัวกลางภายใน

ระบบการทดลองแบบกะ (Batch Culture System)

4.2.1.2.1 ศึกษาลักษณะทั่วไปของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะของ

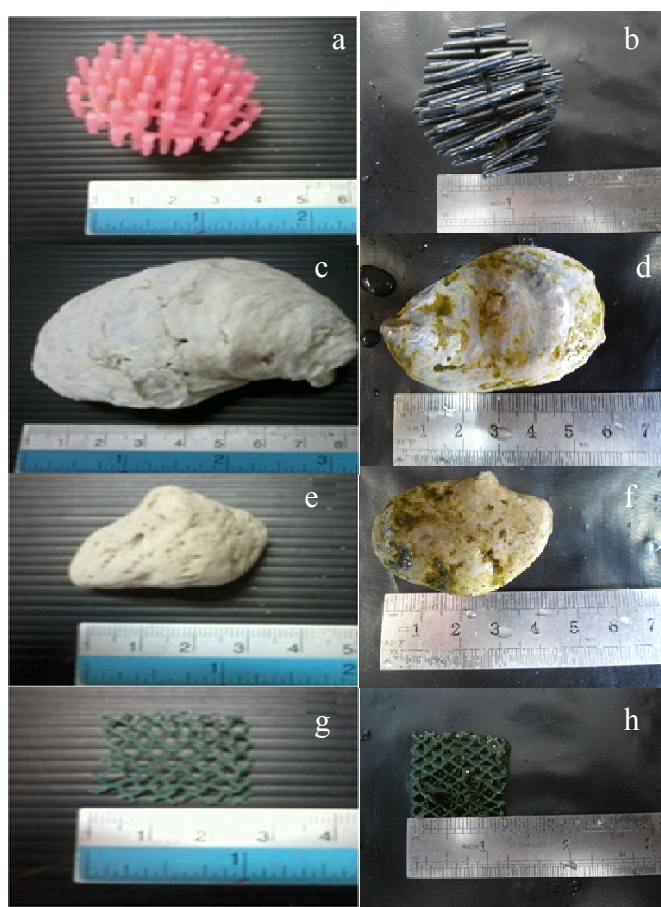
ตัวกลาง

ผลการศึกษาลักษณะทั่วไปของเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียดีไนทรีไฟอิง จากทั้ง 5 ถังปฏิริยา ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฉากสว่างที่กำลังขยาย 1,500 เท่า โดยทำการย้อมแบบเปียก (Wet Mount) พบว่าเมือกชีวภาพมีลักษณะเป็นแผ่นบาง มีสีน้ำตาล นอกจากนั้นยังพบว่า ถังปฏิริยาที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดในเตรทได้ดีที่สุด บนพื้นผิวของตัวกลางมีการเกิดเมือกชีวภาพมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการเปรียบเทียบตัวกลางแต่ละชนิดข้างต้น (ภาพที่ 13) นอกจากนั้นได้ศึกษาเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียดีไนทรีไฟอิงบนแผ่นสไลด์ที่มีการปรับผิวให้มีความหยาบด้านหนึ่ง พบว่าในวันที่ 4 บนผิวสไลด์เริ่มมีการสร้างเมือกชีวภาพโดยเซลล์แบคทีเรียบนผิวสไลด์ แต่เมื่อสัมผัสเมือกชีวภาพบนผิวสไลด์ดังกล่าวด้วยมือ พบว่ามี

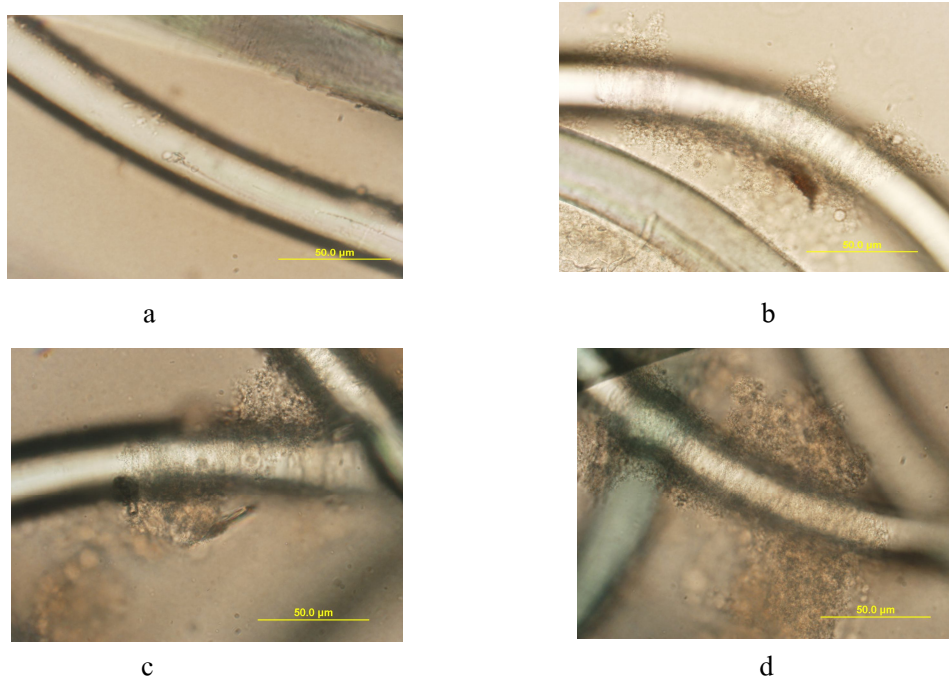
ลักษณะอื่น นอกจากนั้นได้นำตัวกลางจากถังปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรทได้ดีที่สุด มาศึกษาเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง ที่กำลังขยาย 1,500 เท่า ได้ทำการศึกษาใน วันที่ 0, 30, 60 และ 120 โดยทำการย้อมแบบเปียกเพื่อดูลักษณะของการเกาะของเมือกชีวภาพบน ตัวกลาง พบว่า วันที่ 0 ของการทดลองบนผิวตัวกลางนั้นไม่มีเมือกชีวภาพเกิดขึ้น วันที่ 30 ของการ ทดลอง พบว่าบนผิวตัวกลางเริ่มมีการเกิดเมือกชีวภาพ วันที่ 60 ของการทดลอง พบว่าบนผิวของ ตัวกลางเริ่มมีการเกิดเมือกชีวภาพหนาขึ้น และวันที่ 120 ของการทดลอง พบว่าบนผิวของตัวกลาง มีการเกิดเมือกชีวภาพเป็นชั้นหนา ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาโครงสร้างเมือกชีวภาพจากการ ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบบ SEM ที่พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปจนถึงวันที่ 120 ของการทดลอง บนผิวตัวกลางมีการเกิดเมือกชีวภาพเกาะกันค่อนข้างที่จะอยู่กันหนาแน่นเป็นกระจุก มีการกระจายตัว ค่อนข้างต่ำ (ภาพที่ 14 และตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 การวัดขนาดของตัวกลางและความหนาของเมือกชีวภาพจากพื้นผิวตัวกลางด้วย Ocular Micrometer โดยทำการย้อมแบบเปียกเพื่อดูลักษณะของการเกาะของเมือกชีวภาพบน ตัวกลาง

วันที่	ความหนาของเมือกชีวภาพ(ไมโครเมตร)
0	-
30	12.85 $\pm$ 3.8
60	14.72 $\pm$ 3.04
120	18.57 $\pm$ 3.00



ภาพที่ 13 ลักษณะของผิวตัวกลางแต่ละชนิดก่อนและหลังการเกิดเมือกชีวภาพ โดยกำหนดให้
 a - b : Bioball ที่ทำจากพลาสติก, c-d: เปลือกหอยนางรม, e-f: หินภูเขาไฟ และ
 g-h : แผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1×1 นิ้ว



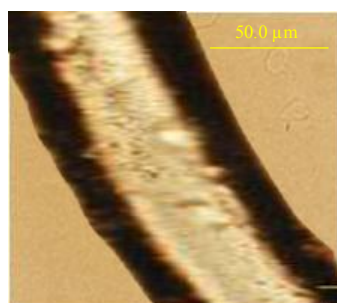
ภาพที่ 14 การศึกษาลักษณะของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะตัวกลางจากถังปฏิกรณ์ที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรทได้ดีที่สุด มาตรวจสอบด้วยเทคนิคการย้อมแบบเปียก ที่กำลังขยาย 1500 เท่า a : วันที่ 0 b : วันที่ 30 c : วันที่ 60 และ d : วันที่ 120

4.2.1.2.2 ศึกษาลักษณะพื้นผิวภายนอกของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะบนตัวกลาง

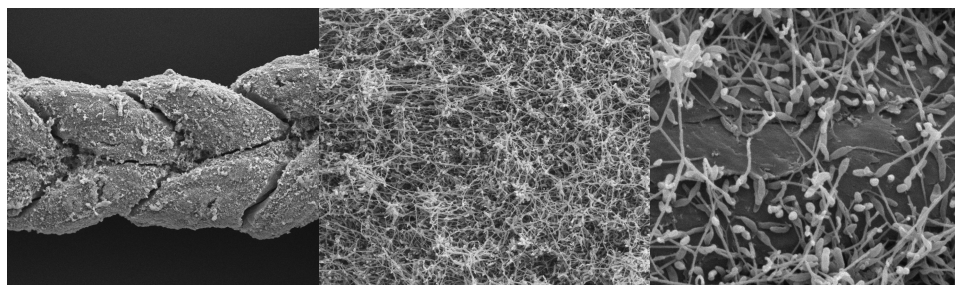
การตรวจสอบลักษณะของเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียบนพื้นผิวของตัวกลาง ที่ 30 วัน 60 วัน และ 120 วัน จากถังปฏิกรณ์ที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรทได้ดีที่สุด โดยนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบบ SEM ที่ระดับ กำลังขยาย 100 เท่า 3,000 เท่า และ 10,000 เท่า ตามลำดับ ซึ่งการเพิ่มกำลังขยายให้สูงขึ้นทำให้สามารถเห็นลักษณะของแบคทีเรียที่ยึดเกาะบนพื้นผิวตัวกลาง และตัวกลางที่ 0 วัน ที่กำลังขยาย 1,500 เท่า โดยนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฉากสว่าง โดยมีรายละเอียดของผลการศึกษาดังนี้

ผลการศึกษาพบว่า วันที่ 0 ของการทดลอง พบว่าพื้นผิวตัวกลางนั้นมีลักษณะขรุขระและไม่ลื่น (ภาพที่ 15a) วันที่ 30 ของการทดลอง ที่กำลังขยาย 100 เท่า พบว่าบนพื้นผิวของตัวกลางนั้นเริ่มมีการสร้างเมือกชีวภาพ โดยเซลล์แบคทีเรียสร้างสารพอลิเมอร์ที่เรียกว่า “Extracellular Polymer Substance (EPS)” ซึ่งเป็นสารที่ใช้ยึดเกาะเซลล์แบคทีเรียต่างๆ เข้าด้วยกันจนกลายเป็นเมือกชีวภาพ (ภาพที่ 15b) ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า สังเกตเห็นว่าภายในชั้น

เมื่อฉีดชีวภาพนี้แบคทีเรียมีการเกาะรวมกัน และกระจายตัว โดยไม่เกาะกันแน่น (ภาพที่ 15c) และที่ระดับกำลังขยาย 10,000 เท่า พบว่าภายในชั้นเมื่อฉีดชีวภาพนั้นมีแบคทีเรียส่วนใหญ่มีรูปร่างท่อนสั้น กลม ท่อนยาว และรูปร่างเป็นเส้นใย ซึ่งเกาะรวมกันอยู่บนพื้นผิวของตัวกลาง (ภาพที่ 15d) วันที่ 60 ของการทดลองที่ กำลังขยาย 100 เท่า สังเกตเห็นว่าบนพื้นผิวตัวกลางนั้นเริ่มมีการเกิดสาร “ EPS ” เพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 15e) ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า พบว่าภายในของชั้นเมื่อฉีดชีวภาพเซลล์แบคทีเรียเริ่มมีการเกาะพันกันจนกลายเป็นกลุ่มก้อนหนาขึ้น และกระจายตัวโดยเกาะกันแน่น (ภาพที่ 15f) ที่ระดับกำลังขยาย 10,000 เท่า พบว่าภายในชั้นเมื่อฉีดชีวภาพแบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่มีรูปร่างท่อนสั้น กลม ท่อนยาว ซึ่งเกาะพันกับแบคทีเรียที่เป็นเส้นใย อยู่บนพื้นผิวของตัวกลาง (ภาพที่ 15g) วันที่ 120 ของการทดลองที่ กำลังขยาย 100 เท่า พบว่าพื้นผิวของตัวกลางนั้นมีการเกิดของแผ่นเมื่อฉีดชีวภาพหนามาก (ภาพที่ 15h) ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า สังเกตเห็นว่าภายในชั้นเมื่อฉีดชีวภาพเซลล์แบคทีเรียอยู่รวมกันอย่างหนาแน่น ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นของชั้นเมื่อฉีดชีวภาพมีลักษณะเป็นแผ่นหนา และมีการกระจายตัวที่ต่ำ (ภาพที่ 15i) ที่ระดับกำลังขยาย 10,000 เท่า พบว่าภายในชั้นเมื่อฉีดชีวภาพที่มีลักษณะหนา เซลล์แบคทีเรียส่วนใหญ่มีรูปร่างท่อนสั้น กลม ท่อนยาว ซึ่งเกาะพันกับแบคทีเรียรูปร่างเป็นเส้นใย อยู่บนพื้นผิวของตัวกลาง และกระจายตัวโดยเกาะกันแน่น (ภาพที่ 15j)



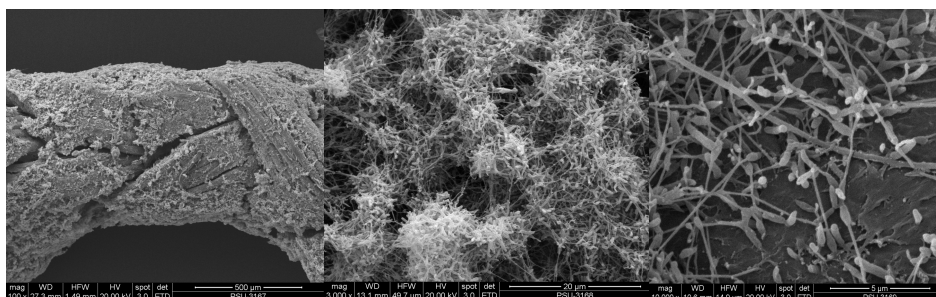
a



b

c

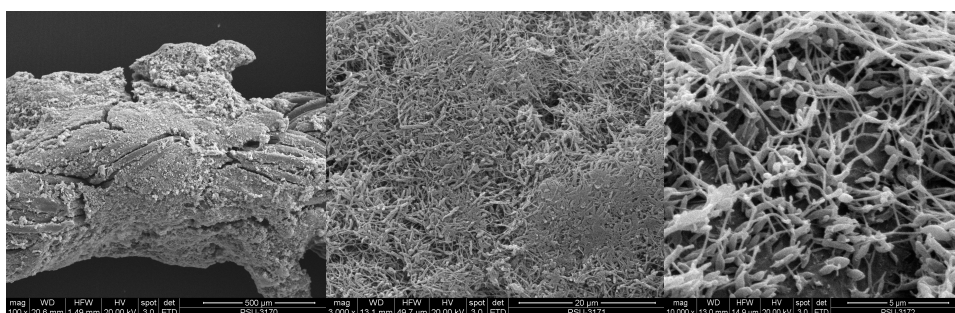
d



e

f

g



h

i

j

ภาพที่ 15 แสดงการเกาะของแบคทีเรียบนตัวกลางชนิดแผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1×1 นิ้ว โดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบบ SEM ที่กำลังขยายแตกต่างกันคือ 100 เท่า 3,000 เท่า และ 10,000 เท่า ตามลำดับ กำหนดให้คือ b - d เมื่อชีวภาพที่อายุ 30 วัน ; e - g เมื่อชีวภาพที่อายุ 60 วัน และ h - j เมื่อชีวภาพที่อายุ 120 วัน และตัวกลางที่ 0 วัน ที่กำลังขยาย 1,500 เท่า ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ Differential Interference Contrast Microscopy (DIC) กำหนดให้คือ a

4.2.1.4 การศึกษาทางจุลชีววิทยาของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะบนผิวตัวกลาง

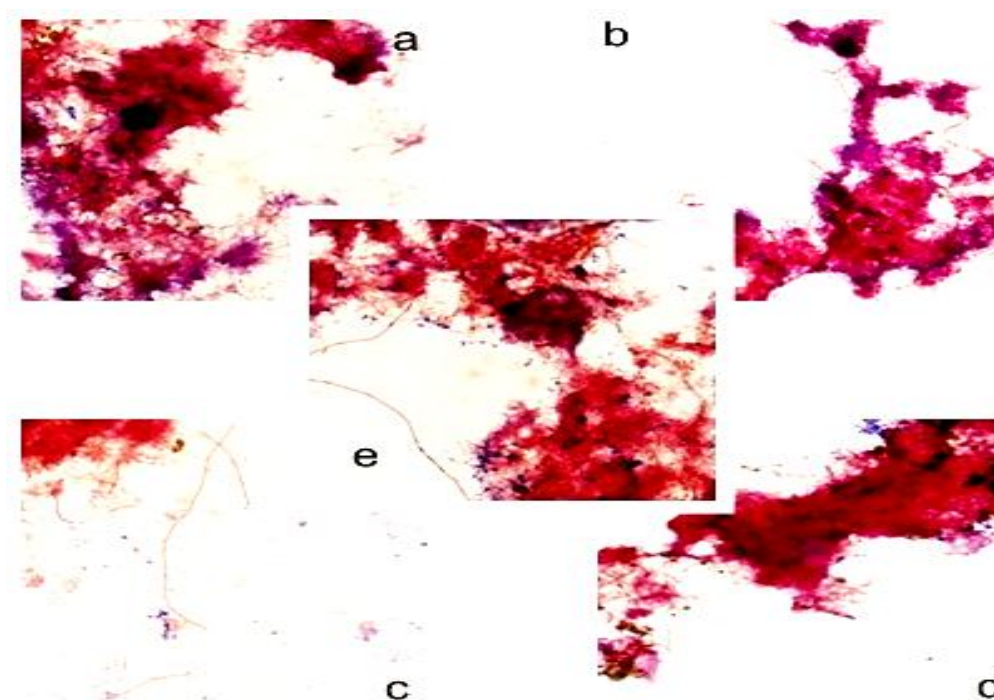
4.2.1.4.1 การหาปริมาณแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงจากเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะบนพื้นผิวของตัวกลางในระบบการทดลองแบบกะ

การนับจำนวนแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงจากตัวอย่างเมือกชีวภาพ ซึ่งประกอบไปด้วยแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง กลุ่ม Denitrifying Bacteria (DB) และกลุ่ม Nitrate Reducing Bacteria (NRB) ด้วยเทคนิค MPN แบบไมโครเทคนิค โดยทำการคัดเลือกตัวกลางแต่ละชุดการทดลองจำนวน 10 ชิ้นต่อชุดการทดลอง จาก 4 ถึงปฏิบัติการที่บรรจุตัวกลางเปรียบเทียบกับถึงปฏิบัติการควบคุม พบว่าถึงปฏิบัติการที่บรรจุแผ่นอะวนในลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1×1 นิ้ว พบแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงทั้ง 2 กลุ่มมากที่สุด คือ 409×10^7 เอ็มพีเอ็น/ตร.ม. และ 301×10^7 เอ็มพีเอ็น/ตร.ม. ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องผลการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีที่บ่งบอกว่าถึงปฏิบัติการดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรทได้ดีที่สุด

นอกจากนั้นได้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในระบบจากปริมาณของแข็งแขวนลอยที่ระเหยง่าย (VSS : Volatile Suspended Solids) และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณของเมือกชีวภาพที่ผลิตได้ต่อซับเตรทที่ใช้ไป (Yield) จากถึงปฏิบัติการที่บรรจุตัวกลาง โดยเปรียบเทียบกับถึงปฏิบัติการควบคุม พบว่าถึงปฏิบัติการที่บรรจุแผ่นอะวนในลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1×1 นิ้ว มีปริมาณจุลินทรีย์ในระบบมากที่สุด คือ ค่า VSS เท่ากับ 140×10^{14} มก./ตร.ม. และค่า Yield 202×10^8 กรัมเซลล์/กรัมซับเตรท/ตร.ม.

4.2.1.4.2 การศึกษาลักษณะทางชีวภาพจากเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะบนผิวตัวกลาง

ผลการศึกษาลักษณะทั่วไปของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะบนผิวตัวกลางจากทั้ง 5 ถึงปฏิบัติการ มาตรวจสอบด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบแกรม ที่กำลังขยาย 1,500 เท่า จากเมือกชีวภาพที่มีอายุ 24 วัน พบว่าเซลล์แบคทีเรียภายในเมือกชีวภาพที่มีการติดสีย้อมทั้งแกรมบวกและแกรมลบซึ่งอยู่ปะปนกัน แบคทีเรียที่ติดสีแบบแกรมลบ ได้แก่ เซลล์แบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น กลม และรูปร่างเป็นเส้นใย ส่วนเซลล์แบคทีเรียที่ติดสีย้อมแบบแกรมบวก คือ เซลล์แบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อนยาว (ภาพที่ 16)



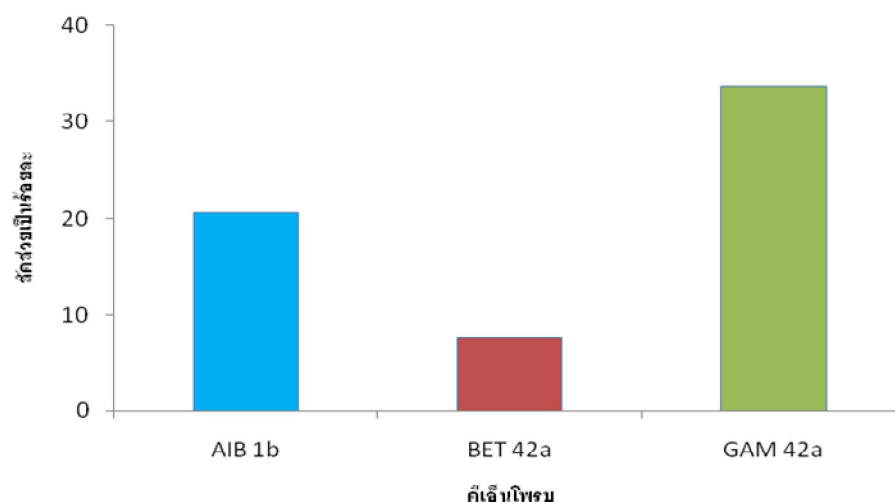
ภาพที่ 16 การศึกษาลักษณะทั่วไปของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะตัวกลางจากทั้ง 5 ถึงปฏิกิริยา จากเมือกชีวภาพที่มีอายุ 24 วันมาตรวจสอบด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบแกรม ที่กำลังขยาย 1,500 เท่า กำหนดให้ a : ถึงปฏิกิริยาที่บรรจุตัวกลางหอยนางรม; b : ถึงปฏิกิริยาที่บรรจุตัวกลางแผ่นอวนในลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1×1 นิ้ว; c : ถึงปฏิกิริยาที่บรรจุตัวกลางหินภูเขาไฟ; d : ถึงปฏิกิริยาที่บรรจุตัวกลาง Bioball ที่ทำมาจากพลาสติก และ e : ถึงปฏิกิริยาที่ไม่บรรจุตัวกลาง

4.2.1.4.3 ศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียดีในไตรฟองจากเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะบนผิวของตัวกลาง

การตรวจสอบโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียดีในไตรฟองจากเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียที่เข้าไปยึดเกาะบนพื้นผิวของตัวกลางด้วยเทคนิค FISH จากถึงปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดในเตรทได้ดีที่สุด โดยใช้ดีเอ็นเอโพรบ ALF1b, BET42a และ GAM42a เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียไฟลัม *Proteobacteria* โดยดีเอ็นเอโพรบทั้ง 3 ชนิด เป็นดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะกับแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน โดยมีรายละเอียดของผลการศึกษาดังนี้

ผลปรากฏว่าพบแบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* โดยเฉพาะกลุ่มย่อยคลาส *Gammaproteobacteria* โดยพบว่าเป็นกลุ่มเด่นซึ่งพบมากถึงร้อยละ

33.6 ของแบคทีเรียทั้งหมด รองลงมาคือ คลาส *Alphaproteobacteria* ร้อยละ 20.6 ของแบคทีเรียทั้งหมด และคลาส *Betaproteobacteria* ที่พบเพียงร้อยละ 7.7 ของแบคทีเรียทั้งหมด (ภาพที่ 17)



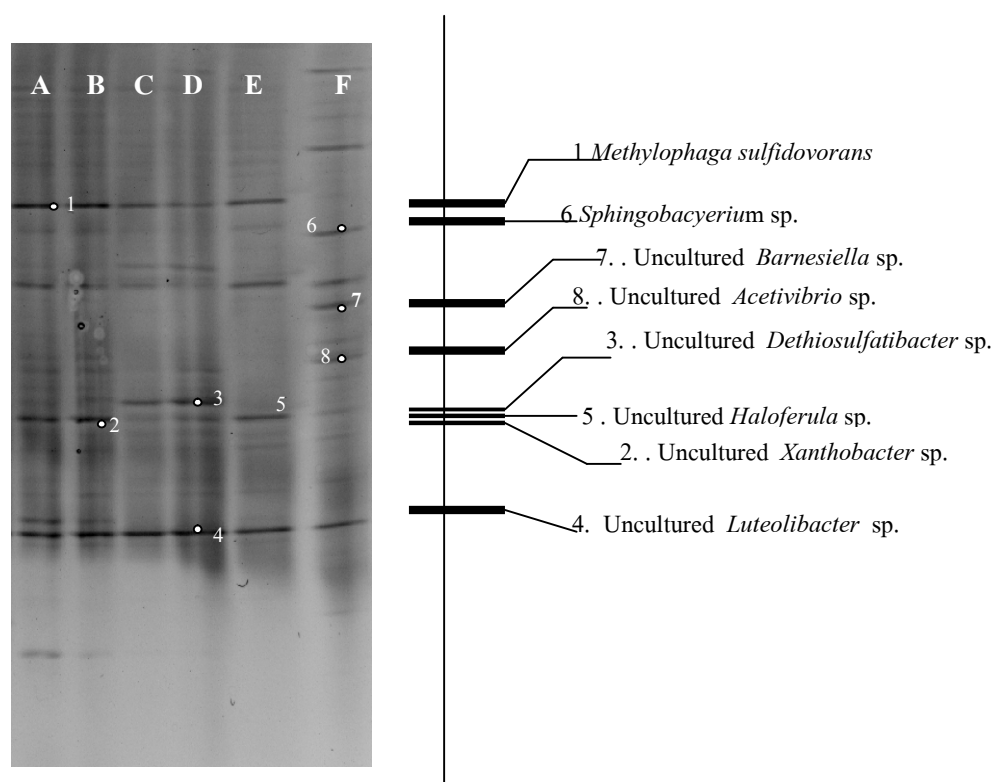
ภาพที่ 17 ตรวจสอบโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงจากเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียที่เข้าไปยึดเกาะบนพื้นผิวของตัวกลาง จากถึงปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรทได้ดีที่สุด ด้วยเทคนิค FISH โดยมีสัดส่วนเป็นร้อยละของแบคทีเรียระดับไฟลัมไปจนถึงระดับสปีชีส์ เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอโพรบ EUB ซึ่งเป็นดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะต่อแบคทีเรียทั้งหมด

4.2.1.5.3 ศึกษาความหลากหลายจากเมือกชีวภาพในระบบแบบต่อเนื่องด้วยเทคนิค DGGE

การศึกษความหลากหลายของแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงจากตัวอย่างเมือกชีวภาพ ในระบบการทดลองแบบกะ (ระดับความเต็ม 15 ppt) จากทั้ง 5 ถึงปฏิกิริยาและกล้าเชื้อแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง (ระดับความเต็ม 15 ppt) ด้วยเทคนิค DGGE มีรายละเอียดของผลการศึกษาดังนี้

ผลการศึกษาจากการหาลำดับเบสจากแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเด่นของยีน 16S rDNA ผลการ BLAST ในถึงปฏิกิริยาที่มีแผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มียึดติดเป็นชั้นที่เหลื่อมขนาด 1×1 นิ้ว ซึ่งเป็นถึงปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรทดีที่สุด (ภาพที่ 18 แถบ E) พบแบคทีเรียคาดว่าเป็นจีโนส *Haloferula* เป็นกลุ่มเด่น รองลงมาคือ *Methylophaga sulfidovorans* และแบคทีเรียคาดว่าเป็นจีโนส *Luteolibacter* ตามลำดับ

ถึงปฏิกิริยาควบคุม (ภาพที่ 18 แถบ A) และถึงปฏิกิริยาที่มี Bioball ที่ทำมาจากพลาสติก (ภาพที่ 18 แถบ B) พบ *Methylophaga sulfidovorans* ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยในคลาส *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มเด่น รองลงมาคือ แบคทีเรียคาดว่าเป็นจีส *Xanthobacter* และ *Luteolibacter* ตามลำดับ ในถึงปฏิกิริยาที่มีเปลือกหอยนางรม (ภาพที่ 18 แถบ C) และถึงปฏิกิริยาที่มีหินภูเขาไฟ (ภาพที่ 18 แถบ D) เป็นตัวกลาง พบแบคทีเรียคาดว่าเป็นจีส *Luteolibacter* ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยในคลาส *Verrucomicrobiae* เป็นกลุ่มเด่น รองลงมาคือ *Dethiosulfatibacter* *Xanthobacter* และ *Methylophaga sulfidovorans* ส่วนในตัวอย่างกล้าเชื้อแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง พบแบคทีเรียคาดว่าเป็นจีส *Barnesiella* *Acetivibrios* *Sphingobacterium* และ *Luteolibacter* ตามลำดับ



ภาพที่ 18 การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง 16S rDNA ด้วยเทคนิค DGGE จากตัวอย่างเมือกชีวภาพในระบบการทดลองแบบกะ (ระดับความเค็ม 15 ppt) และกล้าเชื้อแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง (ระดับความเค็ม 15 ppt) โดยกำหนดให้ A คือ ถึงปฏิกิริยาควบคุม; B คือถึงปฏิกิริยาที่มี Bioball ที่ทำจากพลาสติก; C คือถึงปฏิกิริยาที่มีหินภูเขาไฟ; D คือถึงปฏิกิริยาที่มีเปลือกหอยนางรม; E คือถึงปฏิกิริยาที่มีแผ่นอวน ในตอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1×1 นิ้ว และ F คือตัวอย่างกล้าเชื้อแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง ตามลำดับ

4.2.2 การติดตามประสิทธิภาพการควบคุมคุณภาพน้ำของระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง (Continuous Reactor)

4.2.2.1 ศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบไนโตรเจนภายในระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง

นำตัวกลางที่เหมาะสมต่อการบำบัดไนเตรทที่ได้จากการคัดเลือกด้วยระบบการทดลองแบบกะ (Batch Culture System) โดยมีการเติมเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน มาติดตั้งในระบบการทดลอง เพื่อศึกษาและแก้ปัญหาของไนเตรทสะสม โดยทำการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบไนโตรเจน ด้วยวิธีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมี โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ช่วงการทดลองคือ

- ช่วงที่ 1 ระบบการทดลองแบบต่อเนื่องก่อนการเติมกล้าเชื้อในชุดการทดลอง ทั้ง 2 ชุดคือ ชุดการทดลองที่ 1 (ไม่เติมปลา) และชุดการทดลองที่ 2 เติมปลาทับทิม จำนวน 15 ตัว/ตู้ ระหว่างวันที่ 1-15
 - ช่วงที่ 2 ระบบการทดลองแบบต่อเนื่องหลังเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียและเติมปลาทับทิมในชุดการทดลองที่ 2 เติมปลาทับทิม จำนวน 15 ตัว/ตู้ ควบคุมชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งไม่มีการเติมปลา ระหว่างวันที่ 16-87
 - ช่วงที่ 3 ระบบการทดลองแบบต่อเนื่องเพื่อตรวจยืนยันประสิทธิภาพของระบบบำบัดจากชุดการทดลอง ระหว่างวันที่ 88-113
- โดยมีรายละเอียดของผลการทดลองดังนี้

4.2.2.1.1 ระบบการทดลองแบบต่อเนื่องก่อนการเติมกล้าในชุดการทดลอง

การติดตามประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบไนโตรเจนก่อนการเติมกล้าเชื้อในชุดการทดลอง ทั้ง 2 ชุด คือชุดการทดลองที่ 1 (ไม่เติมปลา) และชุดการทดลองที่ 2 เติมปลาทับทิม จำนวน 15 ตัว/ตู้ โดยมีรายละเอียดของผลการศึกษาดังนี้

ในช่วงแรกของการดำเนินระบบเพื่อปรับสภาพระบบ ผลการศึกษาพบว่า โดยเริ่มแรกพบว่ามีปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท เริ่มต้นภายในระบบจากชุดการทดลองที่ 1 (ไม่เติมปลา) เท่ากับ 2.5 มก./ล. 0.24 มก./ล. และ 60.65 มก./ล. ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่ 2 (เติมปลาทับทิม) จำนวน 15 ตัว/ตู้ โดยเริ่มแรกพบว่ามีปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท เริ่มต้นภายในระบบ เท่ากับ 2.52 มก./ล. 0.24 มก./ล. และ 71.2 มก./ล.

ตามลำดับ แต่พอดำเนินระบบการทดลองต่อไป พบว่าภายในระบบชุดการทดลองที่ 1 (ไม่เติมปลา) พบว่ามีปริมาณ แอมโมเนีย ไนโตรท์ และไนเตรท คงเหลือมีค่าไม่เกิน 0.60 มก./ล. 0.03 มก./ล. และ 1.91 มก./ล. ส่วนชุดการทดลองที่ 2 (เติมปลาทั้งหมึก) พบว่ามีปริมาณ แอมโมเนีย ไนโตรท์ และไนเตรท คงเหลือ มีค่าไม่เกิน 0.6 มก./ล. 0.02 มก./ล. และ 2.26 มก./ล. ตามลำดับ ซึ่งใช้ระยะเวลาในการจัดการสารประกอบไนโตรเจนในระบบช่วงแรกประมาณ 15 วัน ตลอดระยะเวลาของการดำเนินระบบ (ภาพที่ 19-20)

4.2.2.1.2 ระบบการทดลองแบบต่อเนื่องหลังการเติมกล้าเชื้อในหลังเติมปลาทั้งหมึก ในชุดการทดลองที่ 2

การติดตามประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบไนโตรเจนในชุดการทดลองที่ 1 (ไม่เติมปลา) ที่มีการเติมกล้าเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อแบคทีเรียจากระบบแบบกึ่งกะ และชุดการทดลองที่ 2 เติมน้ำทะเลลงไปในถังหมัก จำนวน 15 ตัว/ตู้ และเติมกล้าเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อแบคทีเรียจากระบบแบบกึ่งกะ โดยมีรายละเอียดของผลการศึกษาดังนี้

ในชุดการทดลองที่ 1 พบว่า หลังจากมีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียจากระบบแบบกึ่งกะและเติมน้ำทะเลลงไปในถังหมักประมาณ 10 ลิตร เพื่อให้ระบบสามารถดำเนินต่อไปได้ตลอดการทดลอง ส่งผลให้ภายในระบบค่อย ๆ มีการสะสมปริมาณแอมโมเนีย ไนโตรท์ และไนเตรทเพิ่มขึ้น จนมีความเข้มข้นสูงสุดในวันที่ 31 ของการทดลอง โดยพบว่ามีปริมาณแอมโมเนีย ไนโตรท์ และไนเตรท เท่ากับ 0.70 มก./ล. 1.82 มก./ล. และ 197.46 มก./ล. ตามลำดับ จากนั้นก็ทำการดำเนินระบบต่อไปพบว่าในวันที่ 71 ของการทดลองพบว่าระบบเริ่มเข้าสู่สภาวะคงที่ เนื่องจากในระยะหลังการทดลองมีการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันและการระบวณดีไนตริฟิเคชันภายในระบบได้ดีขึ้น และพบว่าในวันที่ 85 ของการทดลองมีปริมาณแอมโมเนียมีค่าไม่เกิน 0.6 มก./ล. และมีปริมาณไนโตรท์และไนเตรท มีค่าไม่เกิน 0.00 มก./ล. (ภาพที่ 19)

ในชุดการทดลองที่ 2 พบว่า หลังจากมีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียจากระบบแบบกึ่งกะ เติมน้ำทะเลลงไปในถังหมัก จำนวน 15 ตัว/ตู้ และเติมน้ำทะเลลงไปในถังหมักประมาณ 10 ลิตร เพื่อให้ระบบสามารถดำเนินต่อไปได้ตลอดการทดลอง ส่งผลให้ภายในระบบค่อย ๆ มีการสะสมปริมาณแอมโมเนีย ไนโตรท์ และไนเตรทเพิ่มขึ้น จนมีความเข้มข้นสูงสุดในวันที่ 31 ของการทดลอง ซึ่งพบว่ามีปริมาณแอมโมเนีย ไนโตรท์ และไนเตรท เท่ากับ 0.6 มก./ล. 2.13 มก./ล. และ 226.98 มก./ล. ตามลำดับ จากนั้นก็ทำการดำเนินระบบต่อไปเรื่อยๆ พบว่าใน

วันที่ 71 ของการดำเนินระบบเริ่มเข้าสู่สภาวะคง ซึ่งพบว่ามีเกิดการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชัน และกระบวนการดีไนตริฟิเคชันภายในระบบได้ดีขึ้น และพบว่าในวันที่ 85 ของการทดลอง พบว่ามีปริมาณแอมโมเนียมีค่าไม่เกิน 0.6 มก./ล. และมีปริมาณไนไตรท์ และไนเตรท มีค่าไม่เกิน 0.00 มก./ล. (ภาพที่ 20)

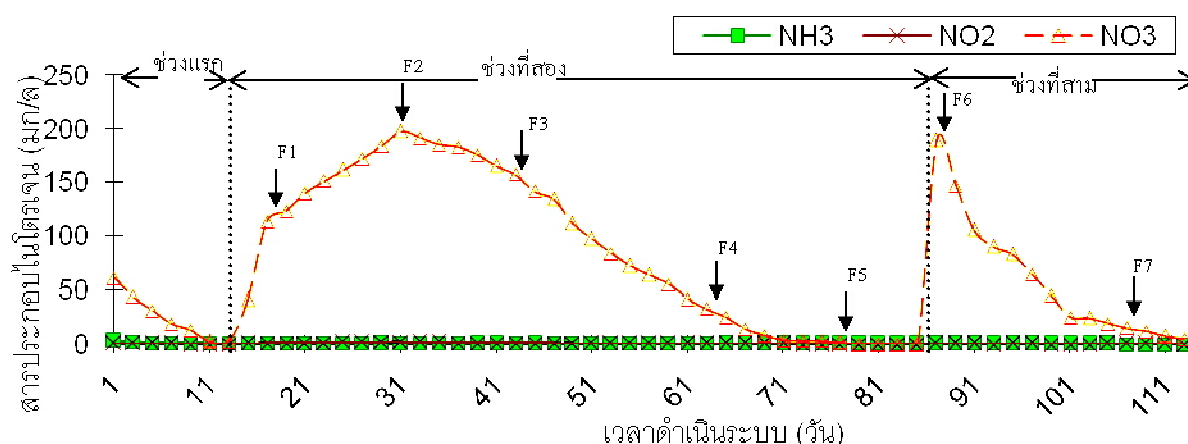
4.2.2.1.3 การตรวจยืนยันประสิทธิภาพของระบบบำบัดจากจากระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง

การศึกษาเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของระบบบำบัดสารประกอบไนโตรเจนจากระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง ในระบบการทดลองทั้ง 2 ชุดการทดลอง เนื่องจากการทดลองที่ผ่านมาประสิทธิภาพในการบำบัดแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทที่เกิดขึ้นทั้ง 2 ชุดนั้น มีประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบไนโตรเจนใกล้เคียงกัน เพื่อตรวจสอบและยืนยันประสิทธิภาพของการบำบัดภายในระบบการทดลองอีกครั้งจึงได้มีการเติมไนเตรทลงภายในระบบการทดลองลงไปในชุดการทดลองที่ 1 ที่ไม่มีการเติมปลาทับทิม และชุดการทดลองที่ 2 ที่เติมปลาทับทิมลง จำนวน 15 ตัว/ตู้ เป็นระยะเวลา 1 เดือน โดยมีรายละเอียดของผลการศึกษาดังนี้

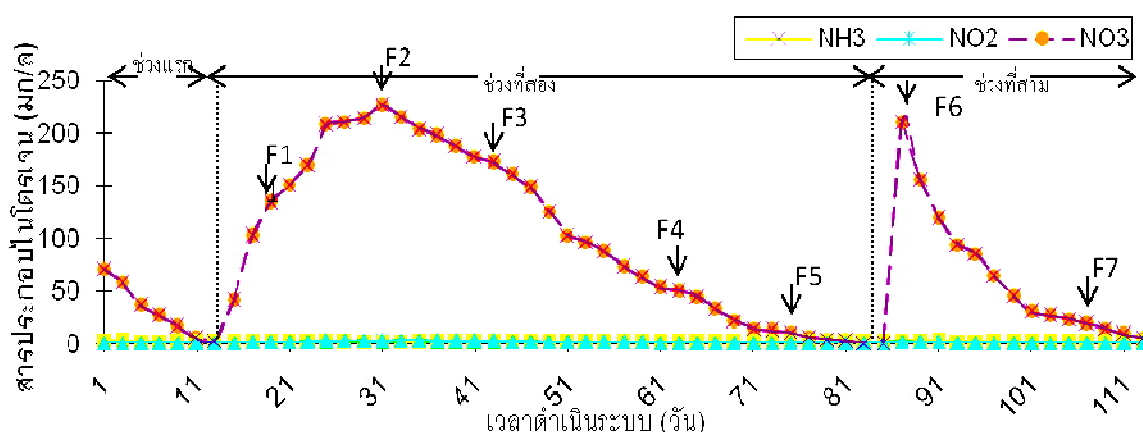
ในชุดการทดลองที่ 1 หลังจากการเติมไนเตรทลงภายในระบบการทดลองไปในระบบการทดลอง พบว่ามีปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท เพิ่มขึ้น โดยในวันที่ 89 ของการทดลอง พบว่ามีปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท เท่ากับ 0.52 มก./ล. 1.15 มก./ล. และ 189.18 มก./ล. ตามลำดับ เนื่องจากการเติมไนเตรทลงภายในระบบตลอดจนการสะสมของตะกอนของเศษซากอินทรีย์ของสิ่งมีชีวิตที่ตายแล้วสะสมภายในระบบบำบัด เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ามีปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท ลดลงเล็กน้อยกว่า 0.60 มก./ล. 0.02 มก./ล. และ 4.48 มก./ล. ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าภายในระบบการทดลองที่ดำเนินการอยู่มีการบำบัดสารประกอบไนโตรเจน ที่เกิดจากกระบวนการไนตริฟิเคชัน และกระบวนการดีไนตริฟิเคชันได้อย่างเกือบสมบูรณ์ (ภาพที่ 19)

ในชุดการทดลองที่ 2 หลังจากการเติมไนเตรทลงภายในระบบการทดลอง พบว่าภายในระบบเริ่มมีปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท เพิ่มขึ้น โดยในวันที่ 89 ของการทดลอง พบว่ามีปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท เท่ากับ 2.25 มก./ล. 1.05 มก./ล. และ 210.19 มก./ล. ตามลำดับ เนื่องจากการเติมไนเตรทลงภายในระบบการสะสมของเศษอาหารที่เหลือจากการกิน สิ่งขับถ่ายของสัตว์น้ำ ตลอดจนการสะสมจากตะกอนของเศษซากอินทรีย์ของสิ่งมีชีวิตที่ตายแล้วสะสมภายในระบบบำบัด และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

พบว่า มีปริมาณแอมโมเนีย ในไตรท์ และไนเตรท ลดลงเหลือน้อยกว่า 0.6 มก./ล. 0.02 มก./ล. และ 4.99 มก./ล. ตามลำดับ โดยพบว่าตลอดระยะเวลาในการตรวจสอบยืนยันประสิทธิภาพการทำงานของระบบสารประกอบไนโตรเจนได้อย่างเกือบสมบูรณ์ แสดงให้เห็นว่าในระบบการเพาะเลี้ยงที่ดำเนินการอยู่เกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันและกระบวนการดีไนตริฟิเคชันอย่างสมบูรณ์ (ภาพที่ 20) นอกจากนั้นได้หลังสิ้นสุดกระบวนการทดลองได้ทำการวัดอัตราการรอดของปลาทับบิม คิดเป็นร้อยละ 46.67



ภาพที่ 19 การติดตามประสิทธิภาพการสารประกอบไนโตรเจนของชุดการทดลองที่ 1 (ไม่เติมปลาทับบิม) (ระดับความเค็ม 15%) ลูกศร (↓) แสดงจุดเก็บตัวอย่างมาศึกษาแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH (F1, F2, F3, F4, F5, F6 และ F7)

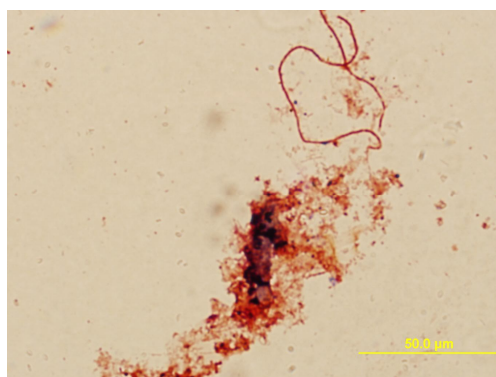


ภาพที่ 20 การติดตามประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบไนโตรเจนของชุดการทดลองที่ 2 (เติมปลาทับบิม) (ระดับความเค็ม 15%) ลูกศร (↓) แสดงจุดเก็บตัวอย่างมาศึกษาแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH (F1, F2, F3, F4, F5, F6 และ F7)

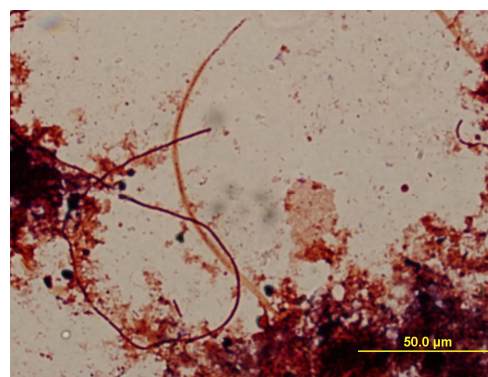
4.2.2.2 ศึกษาทางกายภาพของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะตัวกลางภายในระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง (Continuous reactor)

4.2.2.2.1 ศึกษาลักษณะทั่วไปของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะตัวกลาง

ผลการศึกษาลักษณะทั่วไปของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะตัวกลางภายในถังบำบัดจากระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง จากระบบจากชุดการทดลองที่ 1 (ไม่เติมปลา) และชุดการทดลองที่ 2 (เติมปลาทับทิม) นำมาศึกษาด้วยเทคนิคย้อมสีแบบแกรม ที่กำลังขยาย 1,500 เท่า พบแบคทีเรียรูปร่างท่อนยาว ดิคส์แกรมบวก และแบคทีเรียท่อนสั้น และรูปร่างกลม ดิคส์แกรมลบ และพบแบคทีเรียท่อนยาวมีการเรียงตัวต่อกันเป็นเส้นใยดิคส์แกรมลบ นอกจากนั้นยังพบว่าแบคทีเรียแกรมบวกและลบอยู่ปะปนกัน (ภาพที่ 21) หลังสิ้นสุดการทดลองได้มีการขูดเอาเมือกชีวภาพที่เกาะบนตัวกลางที่เป็นแผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1x1 นิ้ว ที่กำลังขยาย 600 เท่า จากชุดการทดลองที่ 1 (ไม่เติมปลา) และชุดการทดลองที่ 2 (เติมปลาทับทิม) โดยทำการย้อมแบบเปียกเพื่อดูลักษณะของการเกาะของเมือกชีวภาพบนตัวกลาง พบว่าเมือกชีวภาพมีลักษณะเป็นแผ่นบาง มีสีน้ำตาล (ภาพที่ 22)

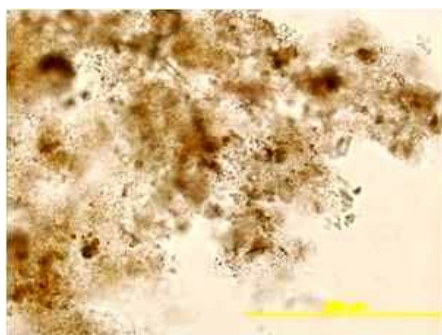


a

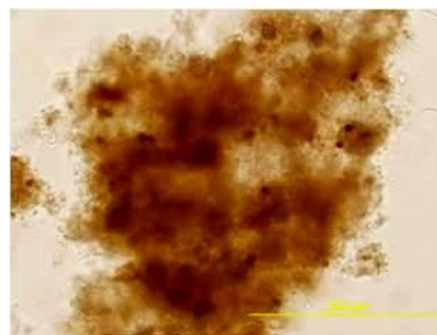


b

ภาพที่ 21 ลักษณะทั่วไปของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะตัวกลางจากระบบภายในระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง โดยทำการขูดและเขย่าเมือกชีวภาพจากตัวกลางมาตรวจสอบด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบแกรม ที่กำลังขยาย 1500 เท่า กำหนดให้ a : ชุดการทดลองที่ 1 (ไม่เติมปลา) และ b : ชุดการทดลองที่ 2 (เติมปลาทับทิม)



a



b

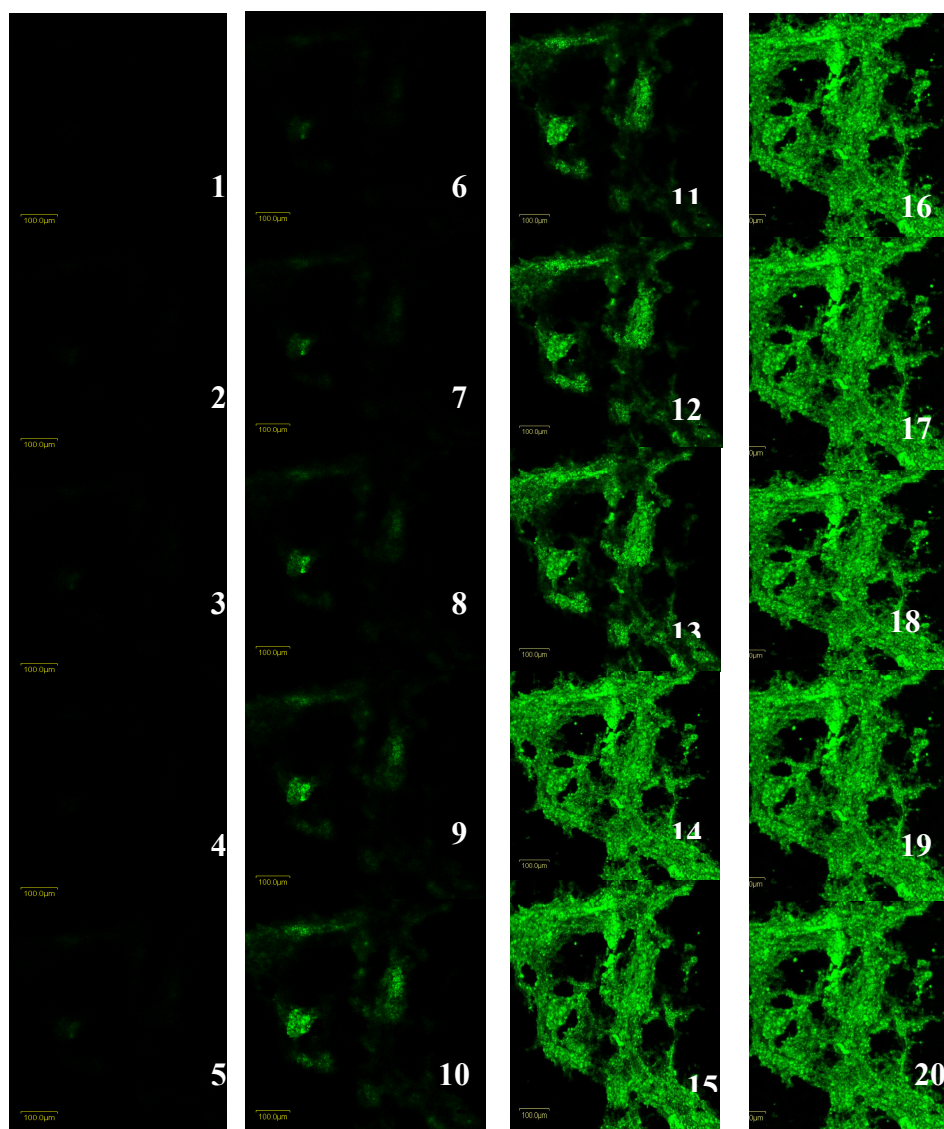
ภาพที่ 22 ลักษณะทั่วไปของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะตัวกลางจากระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง ที่กำลังขยาย 600 เท่า กำหนดให้ a : ชุดการทดลองที่1 (ไม่เติมปลา) และ b : ชุดการทดลองที่2 (เติมปลาทั้งหม)

4.2.2.2.1 ศึกษาลักษณะของชั้นเมือกชีวภาพจากแบคทีเรียที่ยึดเกาะ

บนผิวของตัวกลาง

การตรวจสอบลักษณะของเมือกชีวภาพที่เกิดจากแบคทีเรียที่เข้าไปยึดเกาะบนพื้นผิวของตัวกลางเมือกชีวภาพโดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ Confocal laser scanning microscopy (CLSM) ที่กำลังขยาย 200 เท่า โดยทำการศึกษาจากระดับล่างสุดที่ยึดติดกับพื้นผิวดังกล่าวขึ้นมาถึงส่วนชั้นบนสุด โดยทำการเพิ่มระดับครั้งละ 5 ไมครอน โดยมีรายละเอียดของผลการศึกษาดังนี้

ผลการศึกษาพบว่า พบว่าชั้นล่างสุดของไม่มีการติดสีย้อมเรืองแสงของแบคทีเรียที่เกาะบนพื้นผิวดังกล่าว แต่เมื่อเพิ่มระดับขึ้นไปทีละ 5 ไมครอน ผลปรากฏว่า การติดสีย้อมเรืองแสงของเซลล์แบคทีเรียภายในเมือกชีวภาพ ค่อยๆ มีการติดสีย้อมเรืองแสงเพิ่มมากขึ้น โดยพบว่าชั้นบนสุดของชั้นเมือกชีวภาพพบว่าการติดสีที่ย้อมเรืองแสงมากที่สุด เนื่องจากชั้นเมือกชีวภาพด้านล่างเป็นเซลล์แบคทีเรียส่วนใหญ่มีอายุมากกว่าอายุเซลล์ที่อยู่ด้านบนทำให้มีการติดสีย้อมน้อยหรือไม่ติดสีย้อมเรืองแสงเลย นอกจากนั้นการแทรกตัวของสีย้อมเรืองแสงยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งในการติดสีย้อมของชั้นเมือกชีวภาพ โดยพบว่าชั้นเมือกชีวภาพด้านล่างมีแทรกตัวได้ยากกว่าชั้นบน เนื่องจากชั้นล่างนั้นจะมีความหนาของแผ่นเมือกชีวภาพหนามากกว่าชั้นบนสุดของชั้นเมือกชีวภาพ เป็นต้น (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 ตรวจสอบลักษณะของเมือกชีวภาพที่เกิดจากแบคทีเรียที่เข้าไปยึดเกาะบนพื้นผิวของตัวกลางเมือกชีวภาพโดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบบ CLSM ที่กำลังขยาย 200 เท่า

4.2.3 ศึกษาจุลวิทยาของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะของตัวกลางภายในระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง (Continuous reactor)

4.2.3.1 การหาปริมาณแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงในระบบการทดลองแบบกะ

ผลการตรวจนับแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงจากระบบการทดลองแบบต่อเนื่องด้วยเทคนิค MPN พบแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง กลุ่ม Denitrifying Bacteria (DB) เท่ากับ 930×10^9 เอ็มพีเอ็น/มล./ตร.ม. และแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง กลุ่ม Nitrate Reducing Bacteria (NRB)

เท่ากับ 580×10^9 เอ็มพีเอ็น/มล./ตร.ม. ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี ที่บ่งบอกว่าระบบสามารถบำบัดสารประกอบไนเตรทอยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อปลา แสดงให้เห็นว่าในระบบการเพาะเลี้ยงที่ดำเนินการอยู่เกิดกระบวนการดีไนริฟิเคชันได้ดี ส่งผลให้ภายในระบบมีการบำบัดไนเตรทได้อย่างสมบูรณ์

นอกจากนั้นได้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในระบบจากปริมาณของแข็งแขวนลอยที่ระเหยง่าย (VSS : Volatile suspended solids) และนำมาวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งมวลชีวภาพที่ผลิตได้ต่อซับเตรทที่ใช้ไป (Yield) จากชุดการทดลองที่ 1 (ไม่เติมปลา) และ ชุดการทดลองที่ 2 (เติมปลาทั้งหมึก) ตามลำดับ จากระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง (Continuous Reactor) พบว่าชุดการทดลองที่ 1 (ไม่เติมปลา) พบว่าภายในถังบำบัด และ ภายในระบบ มีค่า VSS เท่ากับ 287×10^6 มก./ตร.ม. และ 362×10^6 มก./ตร.ม. ตามลำดับ และมีค่า Yield เท่ากับ 186×10^3 กรัมเซลล์/กรัมซับเตรท/ตร.ม. และ 148×10^3 กรัมเซลล์/กรัมซับเตรท/ตร.ม. ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่ 2 (เติมปลาทั้งหมึก) ภายในถังบำบัด และภายในระบบ พบว่ามีค่า VSS เท่ากับ 590×10^6 มก./ตร.ม. และ 480×10^6 มก./ตร.ม. ตามลำดับ และมีค่า Yield 246×10^3 กรัมเซลล์/กรัมซับเตรท/ตร.ม. และ 306×10^3 กรัมเซลล์/กรัมซับเตรท/ตร.ม. ตามลำดับ ผลที่ได้ทำให้ทราบถึงปริมาณจุลินทรีย์ภายในระบบพบว่ามีปริมาณที่สูง ส่งผลให้เกิดการบำบัดไนโตรเจนที่สมบูรณ์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

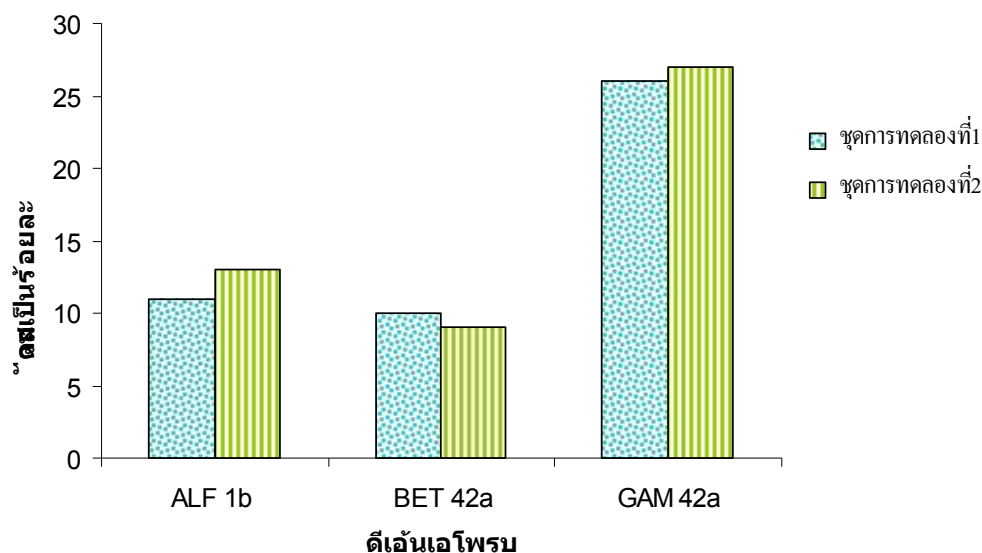
4.2.3.2 ศึกษาโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียจากเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะบน

ผิวของตัวกลาง

การตรวจสอบโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH เป็นการศึกษาโครงสร้างของจุลินทรีย์จากเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะบนผิวตัวกลางจากชุดการทดลองที่ 1 (ไม่เติมปลา) และชุดการทดลองที่ 2 (เติมปลาทั้งหมึก) โดยมีรายละเอียดของผลการศึกษาดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 (ไม่เติมปลา) พบแบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* โดยเฉพาะกลุ่มย่อย *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* และ *Gammaproteobacteria* ร้อยละ 11, 10 และ 26 ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่ 2 (เติมปลาทั้งหมึก) พบแบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* โดยเฉพาะกลุ่มย่อย *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* และ *Gammaproteobacteria* ร้อยละ 13, 9 และ 27 ตามลำดับ (ภาพที่ 24) ซึ่งเทคนิคดังกล่าวพบว่า ดีเอ็นเอโพรบที่ใช้ในการทดลองที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ไม่ครอบคลุมต่อกลุ่มแบคทีเรียภายในระบบการทดลอง จึงได้นำเอาเทคนิค DGGE มาศึกษาควบคู่ไปกับเทคนิค

FISH ดังกล่าว เพื่อให้ทราบถึงความหลากหลายของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในเมือกชีวภาพภายในระบบการทดลอง



ภาพที่ 24 การตรวจสอบโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH โดยมีสัดส่วนเป็นร้อยละของแบคทีเรียระดับไฟลัมไปจนถึงระดับสปีชีส์ เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอโพรบ EUB ซึ่งเป็นดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะต่อแบคทีเรียทั้งหมด กำหนดให้ชุดการทดลองที่ 1 คือชุดการทดลองที่ไม่เติมปลา และชุดการทดลองที่ 2 คือ ชุดการทดลองที่มีการเติมปลา ทับทิม จำนวน 15 ตัว/ตู้

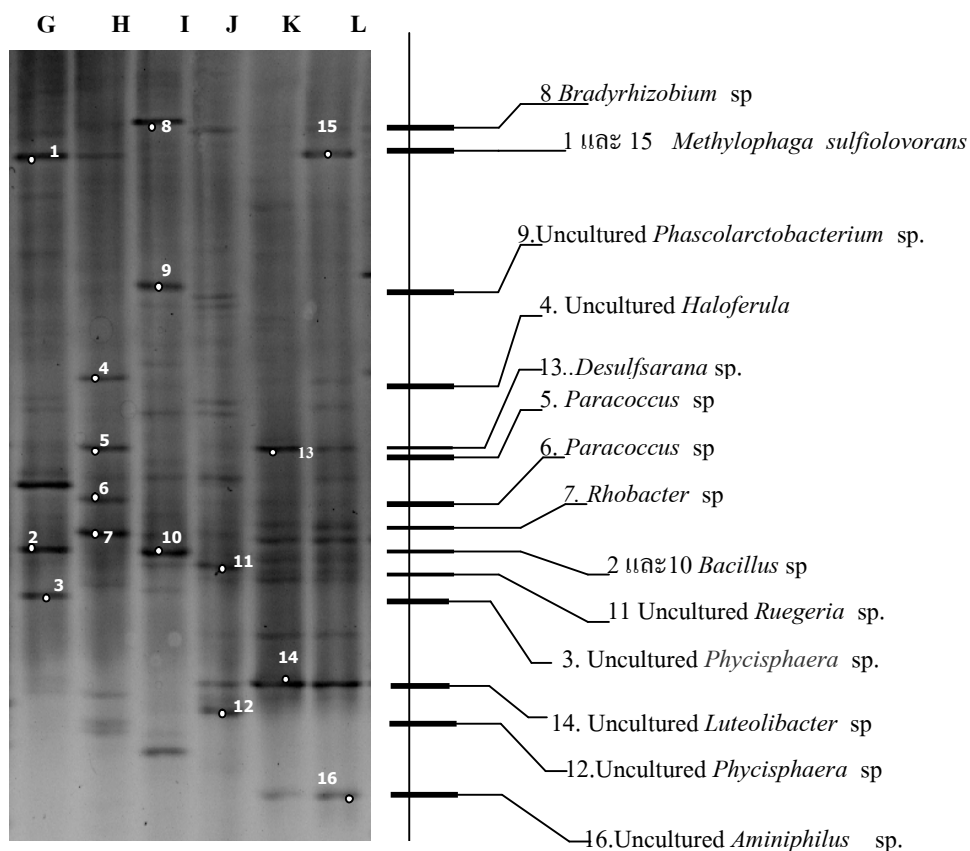
4.2.3.3 ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียจากเมือกชีวภาพในระบบการเลี้ยงปลาทับทิมแบบต่อเนื่องด้วยเทคนิค DGGE

การศึกษความหลากหลายของแบคทีเรียดีในไตรฟองจากเมือกชีวภาพ ภายในถังบำบัดจากระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง จากระบบจากชุดการทดลองที่ 1 (ไม่เติมปลา) และชุดการทดลองที่ 2 (เติมปลาทับทิม) นำมาศึกษาด้วยเทคนิค DGGE ซึ่งเป็นการศึกษาควบคู่ไปกับเทคนิค FISH เพื่อให้ทราบถึงความหลากหลายของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในเมือกชีวภาพภายในระบบการทดลอง โดยมีรายละเอียดของผลการศึกษา ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ในช่วงเริ่มการทดลองที่ 2 (ภาพที่ 25 แบบ L) พบแบคทีเรียที่มีลักษณะเด่น คือแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Methylophaga sulfidovorans* ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยในคลาส *Gammaproteobacteria* นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียที่คาดว่าจีโนส *Luteolibacter*, *Paracoccus*, *Bacillus* และ *Aminiphilus* ตามลำดับ ส่วนในช่วงสิ้นสุดการทดลองในช่วงการ

ทดลองที่ 2 (ภาพที่ 25 แบบ J) พบแบคทีเรียที่มีลักษณะเด่น คือแบคทีเรียที่คาดว่าจีโนม *Phycisphaera* นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียที่คาดว่าจีโนม *Ruegeria* และส่วนในช่วงการทดลองที่ 3 ซึ่งเป็นช่วงยืนยันทะสิทธิภาพของระบบ (ภาพที่ 25 แบบ G) พบแบคทีเรียที่มีลักษณะเด่น คือแบคทีเรียที่คาดว่าจีโนม *Methylophaga sulfidovorans* นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียที่คาดว่าจีโนม *Phycisphaera* และ *Bacillus* ตามลำดับ

ส่วนในชุดการทดลองที่ 2 ในช่วงเริ่มการทดลองที่ 2 (ภาพที่ 25 แบบ K) ของระบบการทดลองแบบต่อเนื่องในช่วงเริ่มระบบ พบแบคทีเรียที่มีลักษณะเด่น คือแบคทีเรียที่คาดว่าจีโนม *Luteolibacter* นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียที่คาดว่าจีโนม *Paracoccus*, *Bacillus* และ *Rhobacter* และเชื้อ *Desulfsarana* sp. ในช่วงสิ้นสุดการทดลองในช่วงการทดลองที่ 2 (ภาพที่ 25 แบบ I) พบแบคทีเรียที่มีลักษณะเด่น คือ พบแบคทีเรียที่คาดว่าจีโนม *Bradyrhizobium* นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียที่คาดว่าจีโนม *Phascolarctobacterium* และ *Rhobacter* และส่วนในช่วงการทดลองที่ 3 ซึ่งเป็นช่วงยืนยันทะสิทธิภาพของระบบ (ภาพที่ 25 แบบ H) พบแบคทีเรียที่มีลักษณะเด่น คือแบคทีเรียที่คาดว่าจีโนม *Haloferula* นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียที่คาดว่าจีโนม *Paracoccus* และ *Rhobacter*



ภาพที่ 25 การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในไตรฟองจีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค DGGE จากตัวอย่างเมือกชีวภาพ ภายในระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง (ระดับความเค็ม 15 ppt) โดยกำหนดให้ช่วงทดสอบประสิทธิภาพหลังเติมปลาทับทิมของชุดการทดลองที่ 1 (ไม่เติมปลา) คือ L ช่วง และ J คือช่วงเริ่มต้นของระบบการทดลอง และสิ้นสุดระบบของการทดลองส่วนในชุดการทดลองที่ 2 (เติมปลาทับทิม) คือ K และ I คือ ช่วงเริ่มต้นของระบบการทดลอง และสิ้นสุดระบบของการทดลอง และช่วงยืนยันประสิทธิภาพของระบบการทดลองแบบต่อเนื่องของชุดการทดลองที่ 1 (ไม่เติมปลา) คือ G และส่วนในชุดการทดลองที่ 2 (เติมปลาทับทิม) คือ H