

บทที่ 5

บทย่อ สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 บทย่อ

งานวิจัยครั้งนี้เน้นการติดตามการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ในเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะบนผิวดักกลาง จากแบบจำลองสภาพการสะสมของไนเตรทภายในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยทำการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ เริ่มต้นจากการติดตั้งถังปฏิริยาแบบกึ่งกะ (Semi-Batch Culture) โดยทำการเก็บรวบรวมกล้าเชื้อที่จากงานวิจัยที่ผ่านมาของหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยทักษิณ โดยติดตามศึกษาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียในเมือกชีวภาพกับประสิทธิภาพการบำบัดไนเตรทภายในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในแต่ละช่วงเวลา ด้วยเทคนิค FISH ร่วมกับเทคนิค DGGE เป็นการนำเอาเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ภายในเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง ภายในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบน้ำหมุนเวียน ควบคู่กับการศึกษาลักษณะภายนอกของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะบนพื้นผิวดักกลางที่เหมาะสม ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ CLSM และ กล้องจุลทรรศน์แบบ SEM เพื่อใช้เป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนางานด้านกระบวนการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบน้ำหมุนเวียน หรือระบบใกล้เคียงอื่นๆ เช่น การเลี้ยงปลาในกระชัง หรือการเลี้ยงปลาสวยงาม เป็นต้น ควบคู่กับการใช้วิธีบำบัดน้ำทิ้งทางชีวภาพ ผลการศึกษา พบว่าแผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1×1 นิ้ว เป็นตัวกลางที่มีประสิทธิภาพการบำบัดไนเตรทได้ดีที่สุด และเมื่อการตรวจสอบโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียภายในเมือกชีวภาพด้วยเทคนิค FISH มีการตรวจพบปริมาณแบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* คลาส *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มเด่น จากทั้ง 2 ชุดการทดลอง แต่จากเทคนิค DGGE พบว่าทั้ง 2 ชุดการทดลองนั้นพบว่า ในชุดการทดลองที่ 1 พบแบคทีเรีย *Methylophaga sulfidovorans* ซึ่งเป็นสมาชิกในคลาส *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มเด่น และชุดทดลองที่ 2 พบแบคทีเรียคาดว่าป็น *Luteolibacter* ซึ่งเป็นสมาชิกในคลาส *Verrucomicrobiae* เป็นกลุ่มเด่น คาดว่าน่าเป็นกลุ่มที่มีบทบาทในการรีดิวซ์ไนเตรทให้กลายเป็นก๊าซไนโตรเจน ดังนั้นในการออกแบบระบบบำบัดไนเตรทจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบน้ำหมุนเวียนนั้นแบบยึดเกาะกับตัวกลาง (Attached-Growth System) จะต้องคำนึงถึงหลายปัจจัยในด้านต่างๆ เพื่อสามารถเพิ่มผลผลิตได้สูงสุดแล้วเกิดความมั่นคงและยั่งยืน เพื่อใช้เป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนางานด้านกระบวนการบำบัดน้ำเสียจากการ

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบน้ำหมุนเวียน หรือระบบใกล้เคียงอื่นๆ เช่น การเลี้ยงปลาในกระชัง หรือ การเลี้ยงปลาสวยงาม เป็นต้น

5.2 สรุปผลการศึกษา

5.2.1 การเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อแบคทีเรียในไตรฟองและแบคทีเรียดีไนไตรฟองแบบ กึ่งกะ เป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการเพาะขยายกล้าเชื้อที่ต้องการปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น แต่มีข้อเสีย คือ เมื่อเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อแบคทีเรียแบบกึ่งกะเป็นเวลานานๆ ประสิทธิภาพของระบบ ในการบำบัดในเตรลดน้อยลง เนื่องจากไม่มีการควบคุมอายุตะกอนจุลินทรีย์โดยการระบาย ตะกอนส่วนเกินออกไปอย่างเหมาะสม จึงมีปริมาณตะกอนจุลินทรีย์แก่และตายเพิ่มมากขึ้น ทำให้ ระบบมีประสิทธิภาพต่ำลง นอกจากนั้นการตรวจสอบโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค FISH ของแบคทีเรียในไตรฟอง พบว่าแบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* โดยเฉพาะคลาส *Alphaproteobacteria* โดยพบว่าเป็นกลุ่มเด่น และกลุ่มแบคทีเรียดีไนไตรฟอง พบแบคทีเรียใน ไฟลัม *Proteobacteria* โดยเฉพาะคลาส *Gammaproteobacteria* พบว่าเป็นกลุ่มเด่น

5.2.2 จากการตรวจสอบโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ภายในเมือกชีวภาพที่เกิดจาก กลุ่มแบคทีเรียดีไนไตรฟอง ด้วยเทคนิค FISH จากการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ ระบบการทดลอง แบบกะ (ถึงปฏิกิริยาที่มีการบำบัดในเตรที่ได้ดีที่สุด) และระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง พบ แบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* โดยเฉพาะคลาส *Gammaproteobacteria* โดยพบว่าเป็นกลุ่มเด่น ซึ่งข้อดีของเทคนิค FISH คือ สามารถตรวจสอบแบคทีเรียที่มีอยู่จริงในสภาวะแวดล้อมตามธรรมชาติ หรือระบบที่ติดตั้งขึ้น แต่เทคนิคดังกล่าวมีข้อจำกัดในการศึกษาความหลากหลายต่อ กลุ่มแบคทีเรีย และดีเอ็นเอโพรบที่ใช้ในเทคนิค FISH ภายในห้องปฏิบัติการมีข้อจำกัดเรื่อง ดีเอ็นเอโพรบที่ใช้ในการทดลอง จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิค DGGE ทำการศึกษาควบคู่กับการศึกษา โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH เพื่อให้ทราบถึงความหลากหลายของกลุ่ม ประชากรแบคทีเรียในเมือกชีวภาพภายในระบบการทดลอง

5.1.3 จากการศึกษาความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ภายในเมือกชีวภาพ ที่เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียดีไนไตรฟองภายในระบบการทดลองแบบกะ และระบบการทดลอง แบบต่อเนื่อง ด้วยเทคนิค DGGE พบว่าในระบบการทดลองแบบกะ พบแบคทีเรีย *Methylophaga sulfidovorans* ซึ่งเป็นสมาชิกในคลาส *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มเด่น นอกจากนั้นยังพบ แบคทีเรียในคลาส *Alphaproteobacteria*, *Synergistia*, *Deltaproteobacter*, *Bacteriodia*, *Clostridia* และ *Sphingobacteria* ส่วนในระบบการทดลองแบบต่อเนื่องในช่วงการทดลองที่ 2 ของชุด

ควบคุม พบแบคทีเรียในคลาส *Gammaproteobacteria*, *Verrucomicrobiae*, *Phycisphaerales*, *Bacillales*, *Alphaproteobacteria* และ *Synergistia* ส่วนในชุดทดลอง พบแบคทีเรียที่มีความคล้ายกับจีโนส *Luteolibacter*, *Paracoccus*, *Bacillus*, *Rhobacter*, *Bradyrhizobium* และ *Phascolarctobacterium* ส่วนในช่วงการทดลองที่ 3 ในชุดควบคุม พบแบคทีเรียในคลาส *Phycisphaerales* และ *Bacillales* ส่วนชุดการทดลอง พบแบคทีเรียในคลาส *Verrucomicrobiae* *Alphaproteobacteria* และ *Rhobacteria*

5.1.4 การแก้ไขปัญหานาโนเมตรสะสมโดยการคัดเลือกตัวกลางที่เหมาะสมต่อการยึดเกาะของกล้าเชื้อแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงเพื่อเร่งกระบวนการการบำบัดในนาโนเมตรในระบบการทดลองแบบกะ พบว่าตัวกลางที่เหมาะสมต่อการบำบัดในนาโนเมตรได้ดีที่สุด คือ แผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1×1 นิ้ว เป็นตัวกลางที่มีประสิทธิภาพการบำบัดในนาโนเมตรได้ดีที่สุด เนื่องด้วยแผ่นอวนไนลอนมีลักษณะโครงสร้างทางกายภาพเป็นเส้นใยที่นำมาทอเป็นเส้นสายแบบตาข่าย และลักษณะพื้นผิวของแต่ละเส้นนั้นมีลักษณะผิวหยาบและไม่ลื่น ทำให้มีพื้นที่เหมาะสมต่อการเข้าไปยึดเกาะของกล้าเชื้อจุลินทรีย์ แล้วพัฒนากลายเป็นเมือกชีวภาพได้ดีที่สุด

5.1.5 การติดตามประสิทธิภาพการควบคุมคุณภาพน้ำของระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง พบว่าในช่วงการทดลองที่ 2 ของระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง พบว่าในชุดควบคุมและชุดทดลองมีผลคล้ายกัน ซึ่งประสิทธิภาพการบำบัดในนาโนเมตรได้สมบูรณ์ ส่วนในช่วงการทดลองที่ 3 ซึ่งเป็นการศึกษาเพื่อยืนยันประสิทธิภาพการบำบัดในนาโนเมตรของระบบ พบว่าในชุดควบคุมและชุดทดลองมีผลคล้ายกัน ซึ่งประสิทธิภาพการบำบัดในนาโนเมตร คิดเป็นร้อยละ 97

5.1.6 ผลการศึกษาทางจุลชีววิทยาของเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มจุลินทรีย์ต่างๆจากระบบการทดลอง ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบต่างๆ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์แบบฉากสว่างแบบ CLSM และแบบ SEM พบว่าภายในเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะบนผิวดักกลางที่เป็นแผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1×1 นิ้ว ประกอบไปด้วยแบคทีเรียรูปร่างท่อนสั้น ท่อนยาว กลม และเป็นเส้นใย อยู่ปะปนกัน แล้วเข้ามายึดเกาะและสร้างสารพอลิเมอร์ที่เรียกว่า Extracellular Polymer Substance (EPS) ซึ่งเป็นสารที่แบคทีเรียใช้ในการยึดเกาะกัน และเกาะบนพื้นผิวดักกลางมากขึ้น พบว่าในช่วงแรกของการทดลองพบการเกิดเมือกชีวภาพบางๆ แต่เมื่อระบบดำเนินไปอย่างต่อเนื่อง พบว่าเมือกชีวภาพเริ่มหนาและจับเกาะตัวกันเป็นกลุ่ม เป็นผลทำให้มีการติดสีของสีย้อมเรืองแสงแต่ละชั้นแตกต่างกัน และพบว่าชั้นบนสุดมีการติดสีของสีย้อมเรืองแสงมากที่สุด

5.1.7 เทคนิค FISH และเทคนิค DGGE เป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ใช้ในการตรวจสอบจุลินทรีย์ที่มีอยู่จริงในสถานะแวดล้อมตามธรรมชาติ เนื่องจากจุลินทรีย์บางกลุ่มนั้นไม่

สามารถนำมาตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อได้ แต่อย่างไรก็ตามเทคนิค FISH ก็ยังมีข้อจำกัด คือ ดีเอ็นเอโพรบที่ใช้ในการทดลองมีข้อจำกัดในการศึกษาความหลากหลายต่อกลุ่มแบคทีเรียในระบบการทดลอง ต้องมีการออกแบบใหม่ซึ่งเป็นเหตุให้อาจต้องเลือกเทคนิคทางด้าน 16S rRNA อื่นเข้ามาช่วย เช่น Clone Library Analysis หรือ DGGE ก่อน ดังนั้นจึงได้นำเอาเทคนิค DGGE มาศึกษาควบคู่ไปกับเทคนิค FISH เพื่อลดข้อจำกัดของเทคนิค FISH และเพื่อให้ทราบถึงหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในเมือกชีวภาพจากระบบการทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่เทคนิค DGGE ก็ยังมีข้อจำกัด คือ ศึกษาได้ในยีนที่มีขนาดประมาณ 200 bp สูงสุดไม่เกิน 500 bp เท่านั้น

5.3 อภิปรายผลการทดลอง

5.3.1 การเพิ่มขยายกล้าเชื้อแบคทีเรียในไตรโฟอิงและแบคทีเรียดีในไตรโฟอิงด้วยระบบการทดลองแบบกึ่งกะ

ผลการตรวจสอบทางเคมีเห็นได้ชัดเจนว่าในช่วงแรกภายในถัง Single Tank NB และ ถัง Single Tank DNB ในช่วงแรก มีการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชัน และกระบวนการดีไนตริฟิเคชันที่สมบูรณ์นั้นต้องใช้ระยะเวลามากกว่า 21 วัน เหตุผลเนื่องจากเป็นช่วงปรับตัวของแบคทีเรียในไตรโฟอิงและแบคทีเรียดีในไตรโฟอิง ที่มีการเปลี่ยนรูปแบบการเพาะเลี้ยงจากแบบต่างๆไปเป็นแบบกึ่งกะ ซึ่งมีลักษณะการเติมน้ำทิ้งสังเคราะห์ใหม่เมื่อมีการบำบัดในเตรทอย่างสมบูรณ์ ต่อมาเมื่อแบคทีเรียในไตรโฟอิงและแบคทีเรียดีในไตรโฟอิงปรับสภาพให้เข้ากับการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ พบว่าภายในถัง Single Tank NB มีการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันที่สมบูรณ์ขึ้นจากการทำงานของแบคทีเรียในไตรโฟอิงที่อยู่ในระบบทั้งสองกลุ่มคือ AOB ซึ่งออกซิไดส์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์ และ NOB ออกซิไดส์ไนไตรท์เป็นไนเตรท (Sofia et al. 2003 : 19-23) และ ถัง Single Tank DNB มีการเกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันที่สมบูรณ์ขึ้น จากการทำงานของแบคทีเรียดีในไตรโฟอิงที่อยู่ในระบบทั้งสองกลุ่มคือ NRB ซึ่งรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ และ DB รีดิวซ์ไนไตรท์ให้เป็นก๊าซไนโตรเจน (เกตุร คำคง. 2550 : 22) โดยพบว่าใช้ระยะเวลากระบวนการดังกล่าวเพียง 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับในช่วงเริ่มแรกของการทดลองเพาะขยายกล้าเชื้อแบคทีเรียในไตรโฟอิงและแบคทีเรียดีในไตรโฟอิง แสดงว่าเมื่อมีการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อในระยะเวลานานส่งผลให้มีจุลินทรีย์ที่แก่และตายเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากไม่ได้มีการควบคุมอายุตะกอนจุลินทรีย์ทำให้เกิดการย่อยสลายที่ไม่สมบูรณ์ จึงมีการปรับระยะเวลาของการเติมแอมโมเนียและไนเตรทลงไปในถังเพาะขยายกล้าเชื้อแบคทีเรียในการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับผลการ

ตรวจนับแบคทีเรียไนโตรไฟอิงและแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิง ด้วยเทคนิค MPN แบบไมโครเทคนิค พบแบคทีเรียกลุ่ม Ammonium Oxidizing Bacteria (AOB) และแบคทีเรียไนโตรไฟอิงกลุ่ม Nitrite Oxidizing Bacteria (NOB) มีจำนวนเพิ่มขึ้น และแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิงพบแบคทีเรียกลุ่ม Denitrifying Bacteria (DB) และแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิงกลุ่ม Nitrate Reducing Bacteria (NRB) ก็พบว่ามีจำนวนเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับแบคทีเรียไนโตรไฟอิง ที่พบว่ามีกระบวนการไนโตรฟิเคชันและกระบวนการดีไนโตรฟิเคชันที่สมบูรณ์

การตรวจสอบโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียไนโตรไฟอิงและแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิง ด้วยเทคนิค FISH ภายในถัง Single Tank NB และ ถัง Single tank DNB เพื่อยืนยันว่าในระบบมีแบคทีเรียไนโตรไฟอิงและแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิงอยู่ในระบบจริง โดยใช้ดีเอ็นเอโพรบ ALF1b, BET42a และ GAM42a เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* พบว่าใน Single Tank NB ที่มีการบำบัดแอมโมเนียเกือบสมบูรณ์ พบแบคทีเรียคลาส *Alphaproteobacteria* ในปริมาณมาก และในถัง Single Tank DNB ที่มีการบำบัดไนเตรทเกือบสมบูรณ์ พบแบคทีเรียคลาส *Gammaproteobacteria* ซึ่งพบมากที่สุด ซึ่งเป็นเซลล์แบคทีเรียที่ติดดีเอ็นเอโพรบ GAM42a ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นรูปท่อน และกระจายตัวโดยเกาะกันไม่แน่นซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของเกอูรคาคอง (2550) ได้ตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียไนโตรไฟอิงและดีไนโตรไฟอิงในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบน้ำหมุนเวียน พบแบคทีเรียไนโตรไฟอิงคลาส *Alphaproteobacteria* ที่พบในปริมาณมาก และแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิงคลาส *Gammaproteobacteria* ซึ่งพบมากที่สุด

5.3.2 การคัดเลือกตัวกลางที่เหมาะสมในการใช้ระบบจุลินทรีย์ยึดเกาะกับตัวกลางในการกำจัดไนเตรท

การคัดเลือกชนิดของตัวกลางที่มีความเหมาะสมต่อการใช้ในระบบจุลินทรีย์ยึดเกาะกับตัวกลางในการบำบัดไนเตรท ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้เลือกใช้ตัวกลางที่เป็นที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจำนวน 4 ชนิด เปรียบเทียบกับถังปฏิริยาควบคุมพบว่า แผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1×1 นิ้ว เป็นตัวกลางที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรทได้ดีที่สุด โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนเตรทภายในถังปฏิริยาที่บรรจุตัวกลางแต่ละชนิดเทียบกับถังปฏิริยาควบคุม โดยพบว่าในช่วงแรกของระบบแต่ละถังปฏิริยามีปริมาณไนเตรทเริ่มต้นใกล้เคียงกัน คือถังปฏิริยาที่บรรจุตัวกลางทั้ง 4 ชนิด คือ 1) แผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1×1 นิ้ว 2) เปลือกหอยนางรม 3) Bioball ที่ทำจากพลาสติก และ 4) หินภูเขาไฟ เทียบกับถังปฏิริยาควบคุม มีปริมาณความ

เข้มข้นในเตรท-ไนโตรเจน ($\text{NO}_3\text{-N}$) เริ่มต้นมีปริมาณเฉลี่ย 93.95 มก./ล. 89.96 มก./ล. 89.96 มก./ล. 89.96 มก./ล. และ 98.90 มก./ล. ตามลำดับ แต่เมื่อระบบดำเนินไปอย่างต่อเนื่องในสัปดาห์ที่ 7 ของการทดลอง ระบบภายในถังปฏิริยาดังกล่าวมีปริมาณไนเตรทลดลงได้เร็วกว่าถังปฏิริยาที่บรรจุตัวกลางชนิดอื่นเมื่อเทียบกับถังปฏิริยาควบคุม นอกจากนั้นยังพบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองภายในถังปฏิริยาดังกล่าวเหลือปริมาณไนเตรทน้อยกว่าถังปฏิริยาที่บรรจุตัวกลางชนิดอื่น เมื่อเทียบกับถังปฏิริยาควบคุม เนื่องด้วยแผ่นอวนไนลอนมีลักษณะโครงสร้างทางกายภาพเป็นเส้นใยของไนลอนที่มีการนำมาทอเป็นเส้นสายแบบตาข่าย และลักษณะพื้นผิวของแต่ละเส้นใยนั้นมีลักษณะผิวหยาบและไม่ลื่น ทำให้มีพื้นที่เหมาะสมต่อการเข้าไปยึดเกาะของกล้าเชื้อจุลินทรีย์ แล้วพัฒนากลายเป็นเมือกชีวภาพได้ดีที่สุด และตัวกลางดังกล่าวมีพื้นที่ผิวจำเพาะสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่ผิวจำเพาะของตัวกลางที่เป็น Bioball ที่ทำจากพลาสติก เปลือกหอยนางรม และหินภูเขาไฟ ที่พบว่าพื้นผิวมีลักษณะลื่นและหยาบน้อยกว่าแผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมดัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1x1 นิ้ว ทำให้ยากต่อการเข้าไปยึดเกาะของกล้าเชื้อจุลินทรีย์แล้วพัฒนาไปเป็นเมือกชีวภาพ

นอกจากนั้นเมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของตัวกลางแต่ละตัวกลางพบว่า ตัวกลางที่เป็นแผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมดัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1x1 นิ้ว เป็นตัวกลางที่มีพื้นที่ผิวมากที่สุด ทำให้สามารถรองของเสียได้ประสิทธิภาพดี มีน้ำหนักเบาสามารถกระจายตัวได้อย่างทั่วถึง ตะกอนไม่อุดตันง่าย สามารถรื้อเอามาล้างทำความสะอาดได้ง่าย และมีความคงทน สามารถดัดแปลงให้เข้ากับระบบปฏิริยาดังกล่าว (สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง สืบค้นเมื่อ 3 ธันวาคม 2555, จาก <http://www.coastalaqua.com>) ส่วนตัวกลางอีก 3 ชนิดคือ Bioball ที่ทำจากพลาสติก เปลือกหอยนางรม และหินภูเขาไฟ นั้นพบว่ามีน้ำหนักมากกว่า และเมื่อดำเนินการทดลองต่อไปนานๆ จะทำให้ตัวกลางดังกล่าวมีความหนัก ไม่สามารถกระจายตัวได้อย่างทั่วถึงภายในถังบำบัด ไม่สะดวกในการเคลื่อนย้ายเวลาล้างทำความสะอาด และเมื่อนำตัวกลางแต่ละชนิดมาหาพื้นที่ผิวจำเพาะก็พบว่า แผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมดัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1x1 นิ้ว มีพื้นที่ผิวจำเพาะสูงกว่าตัวกลาง Bioball ที่ทำจากพลาสติก เปลือกหอยนางรม และหินภูเขาไฟ จึงทำให้ถังปฏิริยาที่มีตัวกลางเป็นแผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมดัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1x1 นิ้ว มีประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรทภายในระบบการทดลองได้ดีกว่าถังปฏิริยาที่บรรจุตัวกลางอื่น นอกจากข้อดีของตัวกลางที่เป็นแผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมดัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1x1 นิ้ว จากที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นนั้น ยังพบว่าตัวกลางดังกล่าวยังสามารถหาได้ง่าย มีราคาถูก สามารถทำความสะอาดง่าย มีความคงทน น้ำไหลผ่านได้ทั่วถึง และยังเป็นการนำวัสดุที่ไม่ใช่ทำอย่างอื่นแล้วกลับมาใช้ใหม่ ซึ่งเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายของเกษตรกรได้อีกด้วย (สำนักวิจัย

และพัฒนาประมงชายฝั่ง. สืบค้นเมื่อ 4 มกราคม 2556, จาก <http://www.coastalaqua.com>) ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงด้วยเทคนิค MPN แบบไมโครเทคนิค ปริมาณของแฉ่งแขวนลอยที่ระเหยง่าย และการวิเคราะห์หามวลชีวภาพที่ผลิตได้ต่อซับเตรทที่ใช้ไป (Yield) แสดงให้เห็นว่าในระบบการทดลองมีแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงมากเพียงพอต่อการบำบัดในเตรท ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณในเตรทที่สามารถบำบัดได้เกือบสมบูรณ์ แสดงให้เห็นว่าจำนวนแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงมีปริมาณเพียงพอที่จะรีดิวซ์ไนเตรทที่มีในระบบอย่างสมบูรณ์ เช่นเดียวกับกับงานวิจัยของ Nam, Timmons, Montemagno and Tsukuda (2000 : 213–224) ที่พบว่าลักษณะพื้นผิวของวัสดุที่ขรุขระ หยาบ ไม่ลื่น เหมาะต่อการเกาะของจุลินทรีย์และพัฒนา กลายเป็นเมือกชีวภาพ และงานวิจัยของ กษิตศ หนูทอง (2551 : 11-22) ที่ทำการศึกษาการบำบัดไนโตรเจนจากระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบปิด โดยใช้ระบบเทคโนโลยีไบโอฟลอค พบว่า ภายในระบบการทดลองมีปริมาณมวลชีวภาพสูงทำให้กระบวนการย่อยสลายไนเตรทภายในระบบ ซึ่งเกิดจากกระบวนการดีไนตริฟิเคชันจะสามารถเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนั้น ยังได้มีการคำนวณหาระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ (Hydraulic Retention Time (HRT) จากทั้ง 5 ถึงปฏิบัติการ สามารถคำนวณหาค่า HRT ได้ประมาณ 8.7 วัน ตามลำดับ โดยพบว่าถ้า ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ในระบบนาน ทำให้แบคทีเรียภายในถังปฏิบัติการมีเวลาสัมผัสกับน้ำเสียได้นานขึ้น และโอกาสการย่อยสลายมีมากขึ้นทำให้ประสิทธิภาพของการบำบัดสารประกอบไนโตรเจนมีประสิทธิภาพสูง ซึ่งระยะเวลากักพักน้ำทางชลศาสตร์จะมีช่วงเวลาที่เหมาะสมของ ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์นั้นพบว่าจะขึ้นอยู่กับกรออกแบบระบบการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีที่พบว่าสามารถบำบัดสารประกอบไนโตรเจนได้เกือบสมบูรณ์ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Farajzadehha, Mirbagheri, Farajzadehha and Shayegan (2012 : 90 – 95) ที่ตรวจสอบค่า HRT ที่เหมาะสมในถังปฏิบัติการแบบ UASB ต่อการบำบัดน้ำเสีย พบว่าค่า HRT ที่เหมาะสมภายในถังปฏิบัติการแบบ UASB คือ 4 ชั่วโมง ส่งผลให้ภายในระบบบำบัดประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรทสูง คิดเป็นร้อยละ 80 ของประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรททั้งหมด แต่ ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์นานก็มีข้อเสียอยู่ คือทำให้เชื้อแบคทีเรียภายในถังปฏิบัติการมีปริมาณตะกอนจุลินทรีย์แก่และตายเพิ่มมากขึ้น ทำให้ระบบมีประสิทธิภาพต่ำลง

นอกจากนั้นยังได้มีการศึกษาลักษณะทั่วไปของเมือกชีวภาพบนตัวกลางแต่ละ ชนิดพบว่า การเกิดเมือกชีวภาพบนตัวกลางที่เป็นแผ่นอ่อนในลอนชนิดทอไม่มีปมดัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1x1 นิ้ว พบว่ามีการเกิดเมือกชีวภาพบนตัวกลางดังกล่าวมากที่สุด เนื่องจากลักษณะพื้นผิวของตัวกลางดังกล่าวมีลักษณะพื้นผิวขรุขระ ไม่ลื่น เมื่อเทียบกับพื้นผิวของตัวกลางที่เป็น Bioball ที่ทำจากพลาสติก เปลือกหอยนางรม และหินภูเขาไฟ ที่พบว่าพื้นผิวของตัวกลาง

นั้นมีความลื่น ทำให้การเกิดเมือกชีวภาพบนตัวกลางน้อย และต้องใช้ระยะเวลาในการเกิดเมือกชีวภาพนานกว่าตัวกลางที่พื้นผิวขรุขระ ไม่ลื่น ซึ่งเหมาะแก่การยึดเกาะของกล้าเชื้อจุลินทรีย์ แล้วพัฒนา กลายเป็นเมือกชีวภาพได้ดีที่สุดและมีพื้นที่ผิวจำเพาะสูง และพบว่าเมือกชีวภาพที่เกาะบนผิวตัวกลาง มีลักษณะเป็นแผ่นบาง สีน้ำตาล และยังพบว่าส่วนใหญ่รูปร่างของแบคทีเรียภายในเมือกชีวภาพ ที่พบนั้นมีรูปร่างลักษณะเป็นรูปท่อนสั้น ดิสคัสเกรมลบ และมีลักษณะเป็นเส้นใยปะปนกันภายใน แผ่นเมือกชีวภาพ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mohan, Mohanakrishna, Raghavulu and Sarma (2007 : 3284 – 3292) ศึกษาเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียที่เข้าไปยึดเกาะบนพื้นผิวของ ตัวกลางจากระบบ AnSBBR ตรวจสอบพบว่าแบคทีเรียมีรูปร่างท่อนยาว และแบคทีเรียที่เป็นเส้นใย และ งานวิจัยของ Mohan, Rao and Sarma (2007 : 108–117) ศึกษาเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่ม แบคทีเรียที่เข้าไปยึดเกาะบนพื้นผิวของตัวกลางจากระบบ SBBR พบว่าภายในเมือกชีวภาพจาก กลุ่มแบคทีเรียที่เข้าไปยึดเกาะบนพื้นผิวของตัวกลาง ตรวจพบทั้งแบคทีเรียเกรมลบจะอยู่รวมกัน เป็นกลุ่มก้อน และแบคทีเรียเกรมลบส่วนใหญ่เป็นรูปทรงกลม และพบการเรียงตัวแบบ Diplococci อยู่ปะปนกัน

การศึกษาลักษณะของเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียดีในτριไฟอิง ด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบบ SEM จากถึงปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดในเตรทได้ดีที่สุด พบว่าตัวอย่างเมือกชีวภาพในวันที่ 30 ของการทดลอง บนตัวกลางเริ่มมีแบคทีเรียมายึดเกาะบน พื้นผิวตัวกลาง โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะยึดเกาะกันอย่างหลวมๆ และใช้สารจากเซลล์แบคทีเรียที่ ปล่อยออกมาเรียกว่า “ Extracellular Polymer (EPS) ” ซึ่งมีส่วนประกอบหลักเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ ใช้ในการยึดเกาะบนพื้นผิวตัวกลาง และเซลล์แบคทีเรียเข้าด้วยกัน (Dreeszen, 2003 : 1-20) ซึ่ง เมื่อเพิ่มระดับกำลังขยายให้มีความละเอียดสูงขึ้นพบว่าภายในแผ่นเมือกชีวภาพนั้น แบคทีเรียมีการจับ ตัวกันโดยเกาะกันค่อนข้างกระจาย และเมื่อเพิ่มระดับกำลังขยายสูงขึ้นก็พบว่าแบคทีเรียที่เกาะตัว กันเป็นกลุ่มก้อนนั้น ส่วนใหญ่มีรูปร่างท่อนสั้น ท่อนยาว กลม และเป็นเส้นใย เกาะพันกัน ในวันที่ 60 ของการทดลอง พบว่าพื้นผิวตัวกลางมีการเกิดเมือกชีวภาพจากแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น และมีการจับตัวกันกลุ่มก้อนซึ่งแบคทีเรียที่ก่อตัวเป็นเมือกชีวภาพซึ่งเซลล์แบคทีเรียภายใน เมือกชีวภาพนั้นส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็น ท่อนสั้นปะปนอยู่กับ แบคทีเรียที่เป็นแบบเส้นใยที่เกาะ พันกันกลายเป็นกลุ่มก้อน มีการกระจายตัวค่อนข้างต่ำ และอยู่กันค่อนข้างหนาแน่น และวันที่ 120 ของการทดลอง พบว่าบนพื้นผิวของตัวกลางมีการเกิดเมือกชีวภาพมีความหนาแน่น โดย พบว่ามีแบคทีเรียหลากหลายชนิดเกาะอยู่รวมกัน ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะอยู่รวมกับแบคทีเรียที่มี ลักษณะเป็นเส้นใยเกาะพันกันไปมากกลายเป็นแผ่นหนา เป็นผลทำให้มีการกระจายตัวต่ำและอยู่กัน อย่างแออัด ซึ่งการเกิดเมือกชีวภาพค่อนข้างหนาแบบนี้แสดงให้เห็นว่าในระบบการเพาะเลี้ยง

แบคทีเรียดีไนตริไฟอิงมีการเจริญเติบโตที่ดี ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียที่เข้าไปยึดเกาะบนพื้นผิวของตัวกลางแบบข้อมเปียก และงานวิจัยของ Dazhuang, Zhihui, Rowan, Liku, Ren and Peiling (2009 : 834-841) โดยทำการศึกษาลักษณะของเมือกชีวภาพ และการอุดตันภายในท่อขนส่งน้ำ พบว่ามีการเกิดเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียที่เข้าไปยึดเกาะบนพื้นผิวของตัวกลาง เป็นผลทำให้เกิดการอุดตันของท่อในระบบบำบัดน้ำเสีย และงานวิจัยของ Mohan et al. (2007 : 3284 – 3292) ศึกษาเมือกชีวภาพจากระบบ AnSBBR พบแบคทีเรียเป็นรูปท่อนยาว และแบคทีเรียที่เป็นเส้นใยอยู่กันหนาแน่น เป็นผลทำให้มีการกระจายตัวต่ำ และพบว่าเมื่อดำเนินระบบไปนานๆ ภายในระบบมีการเกิดเมือกชีวภาพที่หนา

การศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงจากเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียที่เข้าไปยึดเกาะบนพื้นผิวของตัวกลางด้วยเทคนิค FISH จากถึงปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรทได้ดีที่สุด โดยตรวจสอบแบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* พบแบคทีเรียในคลาส *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มเด่น ซึ่งคาดว่าเป็นแบคทีเรียในจิ้นัส *Methalophaga* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ เกตุร คำคง (2550) ได้ตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงที่ใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบแบคทีเรียจิ้นัส *Methalophaga* ที่ติดดีเอ็นเอโพรบ MPH730 และแบคทีเรีย *M. marina* ที่ติดดีเอ็นเอโพรบ MPHm 994 ซึ่งทั้งหมดเป็นกลุ่มย่อยในคลาส *Gammaproteobacteria* และสอดคล้องกับงานวิจัยของคอร์กัก ชัยสาร และคณะ (2550) ได้ตรวจสอบแบคทีเรียด้วยเทคนิค Clone Library จากตะกอนจุลินทรีย์ในกระบวนการดีไนตริไฟเคชัน พบแบคทีเรียจิ้นัส *Methylophaga* ซึ่งเป็นสมาชิกในคลาส *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มเด่น และน่าจะมีความสำคัญในกระบวนการดีไนตริไฟเคชันในน้ำที่มีความเค็มที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Labbe' et al. (2007 : 621-630) ได้ศึกษาโครงสร้างชุมชนจากเมือกชีวภาพที่ใช้เมทานอลและอาหารปลาหมักเป็นคาร์บอนในกระบวนการดีไนตริไฟเคชันทางทะเล และตรวจสอบจุลินทรีย์จำเพาะที่ใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบแบคทีเรียจิ้นัส *Methalophaga* ที่ติดดีเอ็นเอโพรบ MPH730 ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยในคลาส *Gammaproteobacteria* จากผลการศึกษาโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง จากเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียที่เข้าไปยึดเกาะบนพื้นผิวของตัวกลาง ยืนยันได้ว่ามีแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงอยู่จริงภายในระบบ ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการตรวจสอบทางเคมี และประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรท ตัวกลางดังกล่าวจะนำไปใช้ในระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง เพื่อศึกษาและแก้ปัญหาของไนเตรทสะสมต่อไป จะเห็นได้ว่าดีเอ็นเอโพรบที่ใช้ในเทคนิค FISH ภายในห้องปฏิบัติการมีข้อจำกัดเรื่องดีเอ็นเอโพรบที่ใช้ในการทดลองไม่ครอบคลุมต่อกลุ่มแบคทีเรียภายในระบบการทดลอง จึงได้นำเอาเทคนิค

DGGE มาศึกษาควบคู่ไปกับเทคนิค FISH ดังกล่าว เพื่อให้ทราบถึงความหลากหลายของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในเมือกชีวภาพภายในระบบการทดลองจึงได้นำเอาเทคนิค DGGE มาทำการศึกษาควบคู่กับเทคนิค FISH

จากการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียดีในไตรโฟอิงจากตัวอย่างเมือกชีวภาพ จากการเปรียบเทียบภายในถึงปฏิกิริยาทั้ง 5 ถึงปฏิกิริยา ด้วยเทคนิค DGGE พบว่าในถึงปฏิกิริยาที่มีแผ่นอะนในลอนชนิดท่อไม่มีปม ขนาด 1×1 นิ้ว ซึ่งเป็นถึงปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดในกรณีที่สุด จากการเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอภายในถึงปฏิกิริยาดังกล่าว พบแบคทีเรียคาดว่าเป็นจิ้นัส *Aminiphilus* มีแถบดีเอ็นเอเข้มมากที่สุด เมื่อเทียบถึงปฏิกิริยาที่บรรจุตัวกลางชนิดอื่นและถึงปฏิกิริยาควบคุมดังกล่าว รองลงมาคือ แบคทีเรียคาดว่าเป็นจิ้นัส *Dethiosulfatibacter* และเชื้อ *Methylophaga sulfidovorans* พบว่ามีแถบดีเอ็นเอเข้มปานกลาง และแบคทีเรียคาดว่าเป็นจิ้นัส *Xanthobacter* โดยพบว่ามีแถบดีเอ็นเอเข้มน้อยที่สุดตามลำดับ ส่วนในถึงปฏิกิริยาควบคุม และถึงปฏิกิริยาที่มี Bioball ที่ทำจากพลาสติก พบเชื้อ *Methylophaga sulfidovorans* ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยในคลาส *Gammaproteobacteria* มีแถบดีเอ็นเอเข้มมากที่สุดเมื่อเทียบถึงปฏิกิริยาที่บรรจุตัวกลางชนิดอื่น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Auclair, Parent and Villemur (2012 : 726–735) ที่ทำการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียภายในเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียดีในไตรโฟอิงที่ใช้เมทานอล และอาหารปลาหมักเป็นแหล่งคาร์บอน พบแบคทีเรียจิ้นัส *Methylophaga* ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยในคลาส *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มเด่น และแบคทีเรียจิ้นัส *Hyphomicrobium* และแบคทีเรียในคลาส *Alphaproteobacteria* จากตัวอย่างเมือกชีวภาพ นอกจากนั้นภายในถึงปฏิกิริยาดังกล่าวยังพบแบคทีเรียคาดว่าเป็นจิ้นัส *Aminiphilus* และ *Xanthobacter* โดยพบว่าทั้ง 2 จิ้นัสนี้มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอปานกลาง ในถึงปฏิกิริยาที่มีเปลือกหอยนางรม และถึงปฏิกิริยาที่มีหินภูเขาไฟเป็นตัวกลาง พบแบคทีเรียคาดว่าเป็นจิ้นัส *Aminiphilus* พบว่ามีแถบดีเอ็นเอเข้มเมื่อเทียบกับแบคทีเรียคาดว่าเป็นจิ้นัส *Dethiosulfatibacter* *Xanthobacter* และเชื้อ *Methylophaga sulfidovorans* โดยพบว่ามีแถบดีเอ็นเอเข้มปานกลาง ส่วนในตัวอย่างกล้าเชื้อแบคทีเรียดีในไตรโฟอิง พบแบคทีเรียคาดว่าเป็นจิ้นัส *Aminiphilus* พบว่ามีแถบดีเอ็นเอเข้มเมื่อเทียบกับแบคทีเรียคาดว่าเป็นจิ้นัส *Bacnesiella* *Acetivibrios* และ *Sphingobacterium* ที่พบว่าแต่ละจิ้นัสนั้นมีความเข้มของแถบดีเอ็นเอน้อยตามลำดับ นอกจากนั้นแบคทีเรียในจิ้นัส *Sphingobacterium* มีบทบาทสำคัญในการรีดิวซ์ไนเตรท (Boone, Castenholz and Garrity. 2001 : 331) จะเห็นได้ว่าเทคนิค DGGE ที่นำมาศึกษาควบคู่กับการตรวจสอบโครงสร้างแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH นั้น แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของกลุ่มแบคทีเรียในจิ้นัสต่างๆที่พบได้แต่ละถังซึ่งเป็นเชื้อกลุ่มเดียวกัน และเชื้อแตกต่างกัน ซึ่งจาก

การตรวจสอบความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงภายในเมือกชีวภาพ พบว่าแบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มย่อย *Gammaproteobacteria* มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลจากการทดลองพบที่มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาโครงสร้างชุมชนด้วยเทคนิค FISH ที่พบว่าแบคทีเรียในคลาส *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มจะเด่น เนื่องจากปัจจัยของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนั้นยังพบอีกว่าเทคนิค DGGE ที่ได้นำมาศึกษาควบคู่กับการศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH เนื่องจากดีเอ็นเอโพรบที่ใช้ในเทคนิค FISH ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีความหลากหลายไม่ครอบคลุมต่อกลุ่มแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องต่อการบำบัดสารประกอบไนโตรเจน จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิค DGGE ร่วมกับเทคนิค FISH เพื่อให้ทราบถึงความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียภายในเมือกชีวภาพที่เกิดจากแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงภายในระบบการทดลองแบบกะ จากทั้ง 5 ถึงปฏิบัติการ โดยพบว่าภายในเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียเข้าไปยึดเกาะและรวมตัวกันนั้น ประกอบไปด้วยแบคทีเรียมากมายหลายกลุ่ม โดยความสัมพันธ์ของกลุ่มแบคทีเรียเหล่านี้มีทั้งการพึ่งพาอาศัยกัน และการแข่งขันกัน โดยพบว่านอกจากแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถย่อยสลายไนเตรทได้ ซึ่งจัดว่าเป็นกลุ่มที่มีความโดดเด่นที่สุดในระบบการทดลอง แล้วยังพบแบคทีเรียกลุ่มอื่น เช่น แบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสารพวกไทโอซัลเฟต ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ย่อยสลายซัลเฟต ซึ่งแบคทีเรียจำพวกนี้สามารถเจริญเติบโตได้โดยการย่อยสลายไนเตรท เช่นแบคทีเรียในจีนัส *Dethiosulfatibacter* เจริญเติบโตภายในระบบการทดลอง ซึ่งเป็นระบบที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการทดลอง (กรมควบคุมมลพิษ, มปป)

5.3.3 การติดตามประสิทธิภาพการควบคุมคุณภาพน้ำของระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง (Continuous Reactor)

การติดตามประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรทจากระบบการทดลองแบบต่อเนื่องซึ่งแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ช่วงการทดลอง โดยในช่วงแรกเป็นการติดตั้งระบบการทดลองของชุดการทดลองที่ 1 (ไม่เติมปลา) และชุดการทดลองที่ 2 เติมปลาทับทิม จำนวน 15 ตัว/ตู้ นั้น พบว่าใน 15 วันแรกของระบบ ประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรทยังอยู่ในทิศทางที่ดี เนื่องจากยังไม่มีภาระของสารประกอบไนโตรเจนในปริมาณที่มาก ส่วนในช่วงที่สองซึ่งเป็นช่วงหลังเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียพร้อมน้ำทะเลสังเคราะห์ลงในชุดการทดลองที่ 1 และเติมปลาทับทิม 15 ตัว/ตู้ พร้อมทั้งกล้าเชื้อแบคทีเรียและน้ำทะเลสังเคราะห์ลงในชุดการทดลองที่ 2 พบว่าทั้ง 2 ชุดการทดลอง เริ่มมีการสะสมของสารประกอบไนโตรเจน และค่อยๆมีการเกิดขึ้นภายในชุดการทดลอง ทั้ง 2 ชุดการทดลอง และพบว่ามีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 31 ของการทดลอง

สาเหตุเนื่องมาจากในช่วงแรกที่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ 1 และ ปลาทับบิทิมในชุดการทดลองที่ 2 นั้น ภายในระบบยังไม่มีเกิดการกระบวนการไนตริฟิเคชัน และกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน เนื่องจากช่วงแรกมีปริมาณแบคทีเรียภายในระบบน้อยไม่เพียงพอต่อปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่เกิดขึ้น ทำให้กระบวนการย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจนภายในระบบเกิดขึ้นน้อย (สถาบันทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมฝั่งอันดามัน, 2551) หลังจากนั้นเมื่อผ่านการทดลองไป 33 วันของการทั้ง 2 ชุดการทดลอง เริ่มมีการลดลงของปริมาณสารไนเตรทซึ่งมีแนวโน้มในการลดลงที่ต่อเนื่อง โดยพบว่าภายในระบบมีการเกิดการกระบวนการดีไนตริฟิเคชันเพิ่มสูงขึ้น เช่นเดียวกับผลการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่พบในระบบมีมากขึ้น (สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง, สืบค้นเมื่อ 3 ธันวาคม 2555 จาก, <http://www.nicaonline.com>) หลังจากระบบเข้าสู่ภาวะสมดุลวันที่ 71 ของการทดลอง และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (การทดลองผ่านไป 85 วัน) พบว่าภายในระบบการทดลองมีปริมาณแอมโมเนียที่เหลือภายในไม่เกิด 0.6 มก./ล. ส่วนปริมาณไนโตรท์ และไนเตรทของทั้ง 2 ชุดการทดลองนั้น พบว่ามีการบำบัดได้อย่างสมบูรณ์ หลังจากสิ้นสุดการทดลองพบว่าอัตราการรอดตายของปลาทับบิทิมนั้นต่ำมาก ซึ่งแตกต่างกับประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบไนโตรเจน ที่พบว่าหลังสิ้นสุดการทดลองระบบการทดลองสามารถบำบัดสารประกอบไนโตรเจนได้อย่างสมบูรณ์ สาเหตุเนื่องมาจากในระหว่างการทดลองนั้นผู้ทำการทดลองได้ให้อาหารมากเกินไปความต้องการของสัตว์ทดลอง ทำให้เหลืออาหารในตู้ทดลองมากเกินไป และขนาดของตู้ไม่พอเหมาะกับขนาดสัตว์ทดลอง โดยพบว่าเมื่อทำการเลี้ยงปลาทับบิทิมไปในช่วงเวลานาน ขนาดของตัวปลาแต่ละตัวนั้นมีขนาดเพิ่มมากขึ้น ทำให้อยู่กันอย่างแออัด เป็นผลทำให้ปลาทับบิทิมเกิดความเครียด และเกิดการตาย เมื่อสิ้นสุดการทดลองจึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ปลาทับบิทิม มีอัตราการรอดตายต่ำมาก ซึ่งผลจากการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีสอดคล้องกับผลการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นผลทำให้มีปริมาณเพียงพอต่อการบำบัดสารประกอบไนโตรเจนที่เกิดมาจากการสะสมของตะกอนของเศษซากอินทรีย์ของสิ่งมีชีวิตที่ตาย และสะสมภายในระบบบำบัดภายในชุดการทดลองที่ 1 และจากการสะสมของเศษอาหารที่เหลือจากการกินและสิ่งขับถ่ายของสัตว์น้ำ ตลอดจนการสะสมจากตะกอนของเศษซากอินทรีย์ของสิ่งมีชีวิตที่ตาย และสะสมภายในระบบบำบัดภายในชุดการทดลองที่ 2 (กษิติน หนูทอง, 2551 : 11-22) ที่พบว่าหลังสิ้นสุดการทดลองสามารถบำบัดไนเตรทได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนั้นยังแสดงให้เห็นว่าระบบการเพาะเลี้ยงแบบจุลินทรีย์ยึดเกาะบนตัวกลาง ซึ่งเกิดจากการที่จุลินทรีย์เข้าไปยึดเกาะ แล้วพัฒนาเป็นเมือกชีวภาพบนตัวกลาง ทำให้เกิดกระบวนการดังกล่าวได้อย่างสมบูรณ์ โดยน้ำเสียจะไหลผ่านชั้นเมือกชีวภาพทำให้จุลินทรีย์ทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ไปทีละน้อยเปรียบเสมือนการกรอง ทำให้ระยะเวลาในการสัมผัสกับน้ำเสียของ

จุลินทรีย์มีระยะนานกว่าระบบแขวนลอย ทำให้ภายในระบบมีประสิทธิภาพบำบัดในเตรทได้สูงขึ้น และภายในมีปริมาณสารชีวมวลสูงขึ้นด้วย (Yeon, Chang, Kim, Kim, Choi, Lim, Yoon, Son and Kim. 2011 : 649-651; Lee, Ahn and Lee. 2001 : 2435-2445; Khan, Llyas, Javid, Visvanthan and Jegatheesa. 2011 : 5331-5336) ซึ่งผลจากการตรวจสอบคุณภาพทางเคมีของชุดการทดลองทั้ง 2 ชุด ในช่วงที่ 2 นั้นพบว่าประสิทธิภาพการบำบัดในเตรททั้ง 2 ชุดการทดลองมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน จึงได้มีการทดลองในช่วงที่ 3 โดยการเติมในเตรทลงไปในระบบการทดลองของทั้ง 2 ชุดการทดลอง พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองในช่วงที่ 3 ทั้ง 2 ชุดการทดลอง มีประสิทธิภาพในการบำบัดที่ใกล้เคียงกันเหมือนกับการทดลองในช่วงที่ 2 ของระบบ ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการนำเอาเมือกชีวภาพจากถังปฏิกรณ์ในไตรโฟอิง จากทั้ง 2 ชุดการทดลองมาตรวจสอบโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH และตรวจสอบความหลากหลายของแบคทีเรียภายในเมือกชีวภาพด้วยเทคนิค DGGE เพื่อช่วยทำให้ทราบถึงความหลากหลายของกลุ่มแบคทีเรียในแต่ละชุดการทดลอง ที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดที่ใกล้เคียงกัน นอกจากนั้นยังได้นำตัวกลางมาชุดและเขย่า เพื่อตรวจสอบลักษณะทั่วไปของเมือกชีวภาพ พบว่าลักษณะทั่วไปของเมือกชีวภาพมีลักษณะเป็นแผ่นบาง มีสีน้ำตาล และภายในเมือกชีวภาพยังประกอบไปด้วยกลุ่มแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่างท่อนสั้น ท่อนยาว กลมดิดสี่แตรมลบ ท่อนสั้นดิดสี่แตรมบวก และแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นใยดิดสี่แตรมลบอยู่ปะปนกัน ซึ่งสอดคล้องกับ Khan et al. (2011 : 5331-5336) ศึกษาประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสียจากน้ำทะเลสังเคราะห์ พบว่าระบบบำบัดน้ำเสียแบบจุลินทรีย์ยัดติดตัวกลางสามารถบำบัดสารประกอบไนโตรเจนได้สูงถึง ร้อยละ 89 และงานวิจัยของ Putnam, Gambrell, Rusch and White (2012 : 1739-1748) ศึกษาการบำบัดไนโตรเจนที่ราบลุ่มพบว่า ช่วงเริ่มแรกของระบบการทดลองมีปริมาณไนโตรเจนได้น้อยมาก แต่เมื่อการทดลองผ่านไปประมาณ 84 วัน พบว่าภายในระบบมีประสิทธิภาพในการบำบัดสารประกอบไนโตรเจนคิดเป็นร้อยละ 99 ของประสิทธิภาพในการบำบัดในเตรททั้งหมดภายในระบบการทดลองทั้ง 2 ชุดการทดลอง

ผลการทดสอบของเมือกชีวภาพที่เกิดจากแบคทีเรียที่เข้าไปยึดเกาะบนพื้นผิวของตัวกลางเมือกชีวภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบบ CLSM โดยทำการศึกษาจากระดับล่างสุดถึงชั้นบนสุด พบว่าชั้นล่างสุดของเมือกชีวภาพที่ยึดติดกับพื้นผิวดังกล่าวไม่พบการเรืองแสงของแบคทีเรียที่ติดสีย้อมเรืองแสง เมื่อเพิ่มระดับขึ้นพบว่าเริ่มมีเซลล์แบคทีเรียที่ติดสีย้อมเรืองแสง (Tetramethyl Rhodamine) และชั้นบนสุดของชั้นเมือกชีวภาพ พบว่ามีการติดสีย้อมเรืองแสง (Tetramethyl Rhodamine) มาก สาเหตุที่ชั้นล่างมีการติดสีย้อมเรืองแสงน้อยกว่าชั้นบนเนื่องจากอายุของเซลล์แบคทีเรียบริเวณชั้นล่างของชั้นเมือกชีวภาพมีอายุเซลล์มากกว่าเซลล์แบคทีเรียที่อยู่

ชั้นบนของเมือกชีวภาพ ทำให้การติดสีย้อมเรืองแสงของเซลล์แบคทีเรียภายในเมือกชีวภาพมีการติดสีน้อยหรือไม่ติดสีเลย นอกจากนั้นยังพบว่าชั้นล่างของเมือกชีวภาพอาจมีความหนาแน่นมากกว่าชั้นบนของชั้นเมือกชีวภาพ ทำให้การแทรกตัวของสีย้อมเรืองแสงนั้นมีการแทรกเข้าไปน้อยหรือไม่สามารถแทรกตัวลงไปยังชั้นล่างของชั้นเมือกชีวภาพได้ ดังนั้นจึงทำให้เห็นว่าการติดสีย้อมเรืองแสงของเซลล์แบคทีเรียบริเวณชั้นล่างนั้นอาจจะน้อยหรือไม่ติดสีย้อมเลย แต่ในการทดลองครั้งนี้เกิดข้อผิดพลาด คือ การติดสีย้อมสีเรืองแสง ควรจะต้องติดสีย้อมเรืองแสงสีแดง (Tetramethyl Rhodamine) แต่เมื่อนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ CLSM ปรากฏว่าเซลล์แบคทีเรียที่ติดสีย้อมเรืองแสงเป็นสีเขียว อาจเนื่องมาจากช่วงการดูดกลืนแสงของสีย้อมเรืองแสงออกมาเป็นสีแดง (Tetramethyl Rhodamine) ซึ่งอยู่ในช่วง 599-670 nm (Al-Ahmad, Follo, Selzer, Hellwig, Hannig and Hannig. 2009 : 1359-1366) เมื่อนำไปดูผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบ CLSM ช่วงค่าการดูดกลืนแสงของแสง Tetramethyl Rhodamine ในช่วงดังกล่าวไม่สามารถดูได้เนื่องจากภายในกล้องจุลทรรศน์แบบ CLSM ไม่มีช่วงของแสงสีแดงกล่าว จึงทำการตรวจดูในช่วงของแสงสี Cy3 ซึ่งจะถูกระตุ้นของคลื่นแสงเลเซอร์ที่มีความยาวคลื่น 543 nm แต่จะเปล่งแสงออกมาในช่วง 550-610 nm และ Cy5 จะถูกระตุ้นของคลื่นแสงเลเซอร์ที่มีความยาวคลื่น 633 nm แต่จะเปล่งแสงออกมาในช่วง 635-700 nm (Malic, Hill, Hayes, Percival, Thomas and Williams. 2009 : 2603-2611) จึงทำให้มองเห็นตัวอย่างติดสีแดงแทนที่จะเป็นสีแดง อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวทำให้สามารถมองเห็นลักษณะของโครงสร้างของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะบนผิวดวงกลางที่เกิดจากสาร EPS แต่ละชั้น ซึ่งกล้องจุลทรรศน์ดังกล่าวจะใช้แสงเลเซอร์ในเครื่องจะถูกระตุ้นของคลื่นแสงเลเซอร์ที่มีความยาวคลื่นที่กำหนด แล้วส่งไปยังตัวประมวลผลแล้วคำนวณออกมาเป็นประมวลผลว่าชั้นเหล่านี้มีการแสดงออกของยีนที่ติดสีเขียว (Claxton, Fellers and Davidson. 2005 : 1-37; Lawrence, Swerhone, Leppard, Araki, Zhang, West and Hitchcock. 2003 : 5543-5554) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lupini, Proia, Maio, Amalfitano and Fazi (2011 : 248-251) ศึกษาแบคทีเรียในเมือกชีวภาพด้วยเทคนิค CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence *In Situ* Hybridization) โดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ CLAM พบว่า ภายในแผ่นเมือกชีวภาพแต่ละชั้นจะมีแบคทีเรียที่ติดสีย้อมแตกต่างกัน โดยพบว่าด้านล่างของแผ่นเมือกชีวภาพจะมีการติดสีย้อมที่น้อย เมื่อเทียบกับผิวด้านบนของแผ่นเมือกชีวภาพ เนื่องจากชั้นล่างของเมือกชีวภาพมีอายุเซลล์แบคทีเรียมากเป็นผลทำให้การติดสีย้อมของเซลล์น้อยกว่าชั้นบน

การตรวจสอบโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH เป็นการศึกษาโครงสร้างของจุลินทรีย์จากเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะบนผิวดวงกลางจากชุดการทดลองที่ 1

(ไม่เติมปลา) และ ชุดการทดลองที่ 2 (เติมปลาทับทิม) จากระบบภายในระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง (Continuous Reactor) มาทำการศึกษาโครงสร้างเมือกชีวภาพ พบว่า ในชุดการทดลองที่ 1 และชุดการทดลองที่ 2 พบแบคทีเรียในฟิล์ม *Proteobacteria* โดยเฉพาะกลุ่มย่อยคลาส *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มเด่น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของเกยูร คำคง (2550) ได้ตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงที่ใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบแบคทีเรียกลุ่มย่อย *Gammaproteobacteria* มากที่สุด และพบแบคทีเรียจีโนส *Methalophaga* ที่ดัดดีเอ็นเอโพรบ MPH730 และแบคทีเรีย *M. marina* ที่ดัดดีเอ็นเอโพรบ MPHm 994 ซึ่งทั้งหมดเป็นกลุ่มย่อยในคลาส *Gammaproteobacteria* และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Auclair, Lépine, Parent and Villemur (2010 : 1302–1313) จากแบคทีเรียภายในเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงที่บำบัดไนเตรทจากน้ำทะเลภายในถังปฏิกิริยาที่ใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบแบคทีเรียจีโนส *Methylophaga* ซึ่งเป็นสมาชิกในคลาส *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มเด่น จากผลการศึกษาโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียของกล้ำเชื้อแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง ด้วยเทคนิค FISH ยืนยันได้ว่ามีแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงอยู่จริงภายในระบบ ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการตรวจสอบทางเคมี และประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรท ตัวอย่างดังกล่าวจะนำไปใช้ในการหาสถานะที่เหมาะสมในการบำบัดไนเตรทโดยใช้เทคนิค DGGE ต่อไป

การศึกษาคความหลากหลายของแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงจากเมือกชีวภาพภายในถังบำบัดจากระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง จากระบบจากชุดการทดลองที่ 1 (ไม่เติมปลา) และชุดการทดลองที่ 2 (เติมปลาทับทิม) นำมาศึกษาด้วยเทคนิค DGGE ซึ่งเป็นการศึกษาควบคุมไปกับเทคนิค FISH ทำให้ทราบถึงความหลากหลายของโครงสร้าง ชนิด และปริมาณของแบคทีเรียในเมือกชีวภาพภายในระบบการทดลอง เนื่องจากดีเอ็นเอโพรบที่ใช้ในเทคนิค FISH ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีความหลากหลายไม่ครอบคลุมต่อกลุ่มแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องต่อการบำบัดสารประกอบไนโตรเจน จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิค DGGE ร่วมกับเทคนิค FISH เพื่อทำให้ทราบถึงความหลากหลายของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในเมือกชีวภาพภายในระบบการทดลอง โดยพบว่า ในชุดการทดลองที่ 1 (ไม่มีการเติมปลา) และชุดการทดลองที่ 2 (เติมปลาทับทิม 15 ตัว/ตู้) ทั้ง 2 ชุดการทดลองนั้น พบแบคทีเรียที่เหมือนกัน และแตกต่างกัน กล่าวคือ แบคทีเรียที่พบได้ทั้งชุดการทดลองที่ 1 (ไม่มีการเติมปลา) และชุดการทดลองที่ 2 (เติมปลาทับทิม 15 ตัว/ตู้) ในช่วงเริ่มการทดลองช่วงที่ 2 ของระบบ คือ แบคทีเรียคาดว่าเป็นจีโนส *Paracoccus*, *Luteolibacter* และ *Bacillus* ซึ่งแบคทีเรียในจีโนส *Bacillus* พบว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีความสำคัญต่อกระบวนการไนโตรเจนซึ่งส่วนใหญ่เป็นสิ่งมีชีวิตจำพวก Heterotrophic (Vos, Garrity, Jones, Kring, Ludwig, Rainey, Schleifer and Whitman. 2009 : 48) ซึ่งจากการที่ทั้ง 2 ชุดการทดลอง พบแบคทีเรีย

จีโนมเหมือนกันจึงทำให้ประสิทธิภาพการบำบัดในเตรท ทั้ง 2 ชุดการทดลองมีความใกล้เคียงกัน นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียคาดว่าเป็นจีโนม *Aminiphilus* ซึ่งพบได้ในการชุดการทดลองที่ 1 เช่นกัน และช่วงสิ้นสุดการทดลองในช่วงที่ 2 ของชุดการทดลองที่ 1 พบ แบคทีเรียคาดว่าเป็น จีโนม *Phycisphaera* และ *Ruegeria* พบว่าแถบดีเอ็นเอมีความเข้มมาก ที่พบว่ามีลักษณะของแถบ ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างจากการทดลองในช่วงที่เริ่มระบบ และช่วงสิ้นสุดระบบพบแถบดีเอ็นเอ ในช่วงสิ้นสุดระบบ จะมีความเข้มของแถบดีเอ็นเอมากกว่าช่วงเริ่มต้นของระบบ แสดงว่ามีการ เจริญของเชื้อจุลินทรีย์จำนวนมากในระบบ ส่งผลให้ระบบมีประสิทธิภาพในการบำบัดในเตรท ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมี ส่วนในชุดการทดลองที่ 2 นั้นยังพบ แบคทีเรียคาดว่าเป็นจีโนม *Rhobacter* และ *Desulfsarana* ส่วนช่วงสิ้นสุดการทดลองในช่วงที่ 2 ของชุดการทดลองที่ 2 พบแบคทีเรียคาดว่าเป็นจีโนม *Bradyrhizobium* นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรีย คาดว่าเป็นจีโนม *Rhobacter* และ *Phascolarctobacterium* ซึ่งพบว่าลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่มีความ เข้มมาก ส่วนในช่วงสิ้นสุดการทดลองพบว่าแถบดีเอ็นเอที่มีความเข้มมาก แสดงว่ามีการ เจริญของเชื้อจุลินทรีย์จำนวนมากในระบบ ส่งผลให้ระบบมีประสิทธิภาพในการบำบัดในเตรท

ส่วนในช่วงการทดลองที่ 3 ของชุดการทดลองที่ 1 ส่วนในช่วงการยืนยัน ประสิทธิภาพของระบบบำบัดในเตรท พบแบคทีเรียที่มีลักษณะเด่น คือ เชื้อ *Methylophaga sulfidovorans* โดยพบว่าแถบดีเอ็นเอมีความเข้มมาก นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียคาดว่าเป็น จีโนม *Phycisphaera* และ *Bacillus* ตามลำดับ ซึ่งแต่ละแถบดีเอ็นเอนั้นมีปริมาณความเข้มของ แถบดีเอ็นเอปานกลาง แสดงให้เห็นว่าภายในระบบมีปริมาณจุลินทรีย์มาก เพียงพอต่อการบำบัด ในเตรท ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมี ส่วนในช่วงการยืนยัน ประสิทธิภาพของระบบบำบัดในเตรทของชุดการทดลองที่ 2 พบแบคทีเรียที่มีลักษณะเด่น คือ แบคทีเรียคาดว่าเป็นจีโนม *Haloferula* ซึ่งพบมากในของระบบบำบัดน้ำเสีย โดยพบว่าแถบดีเอ็นเอมี ความเข้มมาก นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียคาดว่าเป็นจีโนม *Paracoccus* และ *Rhobacter* ที่พบว่าเป็นแบคทีเรียในแฟมิลี *Rhobacteraceae* ในกลุ่มย่อย *Alphaproteobacteria*

จะเห็นได้ว่าการตรวจสอบความหลากหลายของเมือกชีวภาพที่เกิด จากกลุ่มแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงจากชุดการทดลองที่ 1 (ไม่มีการเติมปลา) และชุดการทดลองที่ 2 (เติมปลาหับทิม 15 ตัว/ตู้) พบว่าทั้ง 2 ชุดการทดลอง พบทั้งกลุ่มแบคทีเรียจีโนมเดียวกันคือ แบคทีเรียคาดว่าเป็นจีโนม *Paracoccus Luteolibacter* และ *Bacillus* และกลุ่มแบคทีเรียจีโนมต่างกัน คือแบคทีเรียจีโนม *Aminiphilus* *Phycisphaera* *Ruegeria* และ *Methylophaga sulfidovorans* ซึ่ง พบได้ในชุดการทดลองที่ 1 และแบคทีเรียในจีโนม *Rhobacter* *Desulfsarana* *Bradyrhizobium* *Haloferula* *Paracoccus* และ *Phascolarctobacterium* ซึ่งพบได้ในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งจากการ

ที่ทั้ง 2 ชุดการทดลอง พบแบคทีเรียกลุ่มที่เหมือนกัน และต่างกันนั้นเป็นผลทำให้ประสิทธิภาพในการบำบัด ทั้ง 2 ชุดมีความใกล้เคียงกัน นอกจากนั้นยังพบอีกว่า เทคนิค DGGE ที่นำมาศึกษาควบคู่ไปกับการศึกษาโครงสร้างชุมชนด้วยเทคนิค FISH นั้น ทำให้ทราบว่าภายในเมือกชีวภาพประกอบไปด้วยกลุ่มแบคทีเรียชนิดต่างๆ ทั้งที่เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายในเตรทได้ เช่น แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* และ *Paracoccus* ที่สามารถบำบัดในเตรท (Staley, Boone, Brenner, Vos, Goodfellow, Krieg, Rainey, Garrity, Schleifer and Garrity. 2005 : 1994; Vos et al. 2009 : 48; Dworkin, Falkow, Rosenberg, Schleifer and Stackebrand. 2006 : 233) กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายซัลเฟตได้ เช่นแบคทีเรียกลุ่ม *Desulfosarana* สามารถดำรงชีวิตในสภาพไร้อากาศ แบคทีเรียสายพันธุ์ *Luteolibacter* เป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถรีดิวซ์ในเตรท ซึ่งอยู่ในคลาส *Verrucomicrobiae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่มีดำรงอยู่ได้ในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจนในกระบวนการบำบัด (Staley, Boone, Brenner, Vos, Goodfellow, Krieg, Rainey, Garrity, Schleifer and Garrity. 2005 : 959; Krieg, Staley, Hedlund, Paster, Ward, Ludwig and Whitman. 2011 : 803) โดยความสัมพันธ์ของแบคทีเรียแต่ละกลุ่มภายในเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียเข้าไปยึดเกาะและรวมตัวกันนั้น จะความสัมพันธ์ของกลุ่มแบคทีเรียทั้งการพึ่งพาอาศัยกัน และการแข่งขันกัน ซึ่งสารอินทรีย์ที่เข้าสู่ระบบจะถูกเปลี่ยนรูปไปเนื่องจากการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรียหลายกลุ่ม เกิดเป็นความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกัน ภายใต้กระบวนการดีไนตริฟิเคชัน ซึ่งพบว่ากลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายในเตรท ได้จัดเป็นกลุ่มที่มีความโดดเด่นที่สุดในระบบการทดลองแล้วยังพบแบคทีเรียกลุ่มอื่น ดังนั้นพื้นฐานของการบำบัดน้ำเสียด้วยกระบวนการไม่ใช้อากาศภายในถังปฏิกรณ์ชีวเคมีในดีไนตริฟิเคชัน เป็นการเปลี่ยนรูปสารอินทรีย์ด้วยปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox Reaction) โดยแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ใช้อากาศ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ก็จะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับสภาพของน้ำเสียกับปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในระบบ (กรมควบคุมมลพิษ, มปป) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Auclair et al. (2012 : 1302–1313) ที่พบว่าแบคทีเรียในแฟมิลี *Rhodobacteraceae* ในกลุ่มย่อย *Alphaproteobacteria* ภายในเมือกชีวภาพสามารถพบได้ในเมือกชีวภาพที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่มดีไนตริฟิเคชัน ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลสังเคราะห์ และงานวิจัยของ Gusmao, Martins, Chinalia, Sakamoto, Thiemann, MBernadete and Varesche (2006 : 1391–1400) ทำการตรวจสอบเมือกชีวภาพจากแบคทีเรียดีไนตริฟิเคชันในระบบการบำบัดน้ำเสีย พบแบคทีเรียจีโนส *Pseudomonas* *Paracoccus* และ *Bacteroides* โดยพบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 จีโนส ดังกล่ามีความสามารถในการบำบัดในเตรทจากระบบบำบัดน้ำเสีย เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Neufeld et al. (2007 : 480–491) ที่ทำการศึกษาแบคทีเรียจีโนส *Methylophaga* ในน้ำทะเลที่มีเมทานอล พบแบคทีเรีย *Methylophaga sulfilovorans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในจีโนส *Methylophaga* ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยในคลาส *Gammaproteobacteria* นอกจากนั้นยัง

พบอีกว่าแบคทีเรียในแฟมิลี *Rhobacteraceae* นั้นพบได้ตามแหล่งน้ำที่มีความเค็มตามธรรมชาติ (Staley, Boone, Brenner, Vos, Goodfellow, Krieg, Rainey, Garrity, Schleifer, and Garrity. 2005 : 161-167, 197-204) แต่ตะกอนดีเอ็นเอนั้นมีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอปานกลาง แสดงให้เห็นว่าภายในระบบมีปริมาณจุลินทรีย์มากเพียงพอต่อการบำบัดในเตรท ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมี

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ควรตรวจวัดค่า pH, Dissolved Oxygen (DO), Biochemical Oxygen Demand (BOD) และ Chemical Oxygen Demand, (COD) นอกจากตรวจหาสารประกอบไนโตรเจน และตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ เพราะจะทำให้สามารถอธิบายผลการทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าการตรวจวิเคราะห์แค่สารประกอบไนโตรเจน
2. ควรใช้ขนาดของตู้ทดลองให้พอดีกับขนาดของสัตว์ทดลอง เพื่อลดความเครียดของสัตว์ทดลอง
3. ควรเลือกใช้ตัวกลางจากธรรมชาติที่มีลักษณะเบามาใช้ นอกจากวัสดุธรรมชาติที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ เช่น เศษปะการัง