ระบบบำบัดน้ำเสียของระบบหมุนเวียนน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (RAS) เป็นระบบที่สามารถนำน้ำกลับมาใช้ใหม่ ภายหลังจากการกรองชีวภาพ (biofiltration) โดยแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงจะเกาะอยู่บนวัสดุที่ใช้เป็นตัวกรองชีวภาพแบบไบโอฟิล์ม (biofilm) แล้วทำหน้าที่ลดปริมาณแอมโมเนียและไนไตรต์ที่พบในน้ำเสียอย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงส่วนใหญ่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (uncultured bacteria) ดังนั้นจุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้ คือการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงและคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงจากตัวกรองชีวภาพของระบบ RAS ที่มาจากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในขั้นแรกเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงเบื้องต้นเป็นเวลา 3 เดือน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ประกอบด้วยแอมโมเนีย 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารกุ้ง 90 มิลลิกรัมต่อลิตร พร้อมทั้งใส่ตัวกลาง BCN-009 เพื่อเพิ่มพื้นที่ให้แบคทีเรียยึดเกาะ ผลการศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่ามีเซลล์เกาะบนตัวกลางหลายกลุ่ม ต่อมาถ่ายตัวกลางที่มีแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม แต่เติมแอมโมเนียความเข้มข้น 2, 5 หรือ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรทุกวัน พบว่าปริมาณแอมโมเนียทั้ง 3 ความเข้มข้นลดลงจนหมดทุกวัน จากการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรของแบคทีเรีย โดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ด้วยไพรเมอร์ CTO189f-gc และ CTO 654r พบว่าแถบโครงสร้างประชากรจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อตรงกันกับแบคทีเรียจากใยกรองของระบบ RAS และผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียเด่นบนตัวกลางและในใยกรอง คือ Uncultured *Nitrosomonas* sp. นอกจากนี้แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้สามารถลดแอมโมเนียที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งในน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียจริง ภายในเวลา 20 ชั่วโมง อัตราการย่อยสลายแอมโมเนียสูงสุดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้นี้ คือ 67.9 mg-N/m^2/h แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ยังมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณแอมโมเนีย หลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทั้งนี้สามารถเพาะเลี้ยงและรักษาสภาพของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า วิธีการเลี้ยงเชื้อนี้เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มไนทริฟายอิง ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการบำบัดน้ำเสียของระบบหมุนเวียนน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้

Recirculating Aquaculture System (RAS) allows the reuse of water after biofiltration. In this system, nitrifying bacteria attached on the biofilter material as biofilm could effectively eliminate ammonia and nitrite in the wastewater. Previous studies found that most nitrifying bacteria are unculturable. Thus, the purposes of this study were to develop a process for cultivation and isolation of the nitrifying bacteria from RAS biofilter obtained from the Center of Excellence for Marine Biotechnology, Chulalongkorn University. At first, nitrifying bacteria were pre-cultured for 3 months in a medium containing 90 mg/l shrimp food and 100 mg/l $(NH_4)_2SO_4$. Plastic matrices (BCN-009) were also added to increase the surface area for attachment by these bacteria. The result from scanning electron microscope (SEM) showed many groups of bacteria in these matrices. Then, the matrices with nitrifying bacteria were transferred daily into a similar medium but vary the amount of NH_4-N to 2, 5, and 10 ppm. The nitrifying activity could completely reduce NH_4-N concentrations within a day. Community of nitrifying bacteria was studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) with CTO189f-gc and CTO654r primers. DGGE profiles of the cultivated ammonia oxidizing bacteria were similar to the profile from the RAS biofilter sample. Nucleotide analysis identified the dominant populations in both samples as Uncultured *Nitrosomonas* sp. Moreover, these cultured bacteria could reduce ammonia at the initial concentration of 5 mg/l in both synthetic wastewater and real wastewater within 20 hours. The maximum rate of ammonia degradation from these cultured bacteria was 67.9 mg-N/m^2/h. In addition, these cultured bacteria were still effective for ammonia reduction after storage for 1 week at 4° C. The bacteria could be re-cultivated and maintained in the same medium. From the results, we can conclude that this process was suitable for the culture of nitrifying bacteria, which can be used as inoculum for wastewater treatment in the recirculating aquaculture system.