บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การศึกษาคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย

ทำการแยกคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียจากธรรมชาติโดยเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุดมสมบูรณ์และเหมาะสมต่อคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย และนำเชื้อบริสุทธิ์มาทดสอบความสามารถในการสร้างไนไตรท์เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์จำพวกคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย และคัดเลือกคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูง ตลอดจนหาผลกระทบของปัจจัยสภาวะแวดล้อมเช่น ปริมาณแอมโมเนีย ความเค็ม ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และอัตราการเขย่าที่มีผลต่อการสร้างไนไตรท์ของแบคทีเรียดังกล่าว ซึ่งได้ผลดังนี้

1.1 การแยกคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียจากธรรมชาติ

การแยกคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียจากธรรมชาติให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ได้ผลดังนี้

1.1.1 การเพิ่มจำนวนคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งมีทั้งส่วนที่เป็นน้ำ ส่วนตะกอน และเศษเปลือกหอย นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1 ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งเป็นอาหารเหลวที่เติมฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 8.5 ในสภาวะที่เป็นด่าง อินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีแดง เขย่าที่อัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 2 สัปดาห์ อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ดังรูปที่ 57 และ 58 ในภาคผนวก ง แสดงว่ามีการสร้างกรด ซึ่งกรดนี้เป็นกรดไนไตรท์ที่เกิดจากแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย ออกซิไดซ์แอมโมเนีย จากการทดลองพบว่าตัวอย่างที่มีการสร้างกรดคือ ตัวอย่างน้ำและตัวอย่างตะกอนที่เก็บจากบ่อกรองของบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเลจังหวัดชลบุรี ตัวอย่างน้ำและตัวอย่างตะกอนที่เก็บจากบ่อกรองของบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเลจากภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และตัวอย่างตะกอนที่เก็บจากบ่อกรองของบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเลจังหวัดสุราษฎร์ธานี

1.1.2 **การแยกแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียจากตัวอย่างในข้อ 1.1.1**

นำแบคทีเรียจากฟลาสก์ที่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองในข้อ 1.1.1 มาเขี่ยลากบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร 4 บ่มเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่ามีการสร้างโคโลนีเกิดขึ้น ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันได้แก่ โคโลนีสีแดงที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 ถึง 2.0 มิลลิเมตร โคโลนีสีเหลืองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 มิลลิเมตร และโคโลนีใสที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ถึง 1.0 มิลลิเมตร

1.1.3 **การทำเชื้อแบคทีเรียในข้อ 1.1.2 ให้บริสุทธิ์**

การทำแบคทีเรียที่แยกได้ให้บริสุทธิ์โดยการเขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะต่างกันจากข้อ 1.1.2 มาเขี่ยลากบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร 2 เพื่อให้ได้โคโลนีบริสุทธิ์ ตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยดูลักษณะรูปร่างของเซลล์ ที่ผ่านการย้อมสีแกรมและตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำให้แยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ได้ 9 สายพันธุ์ คือ A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8 และ A9 จากตัวอย่างและแหล่งตัวอย่าง ดังปรากฏในตารางที่ 4

1.1.4 **ความสามารถของแบคทีเรียในข้อ 1.1.3 ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์**

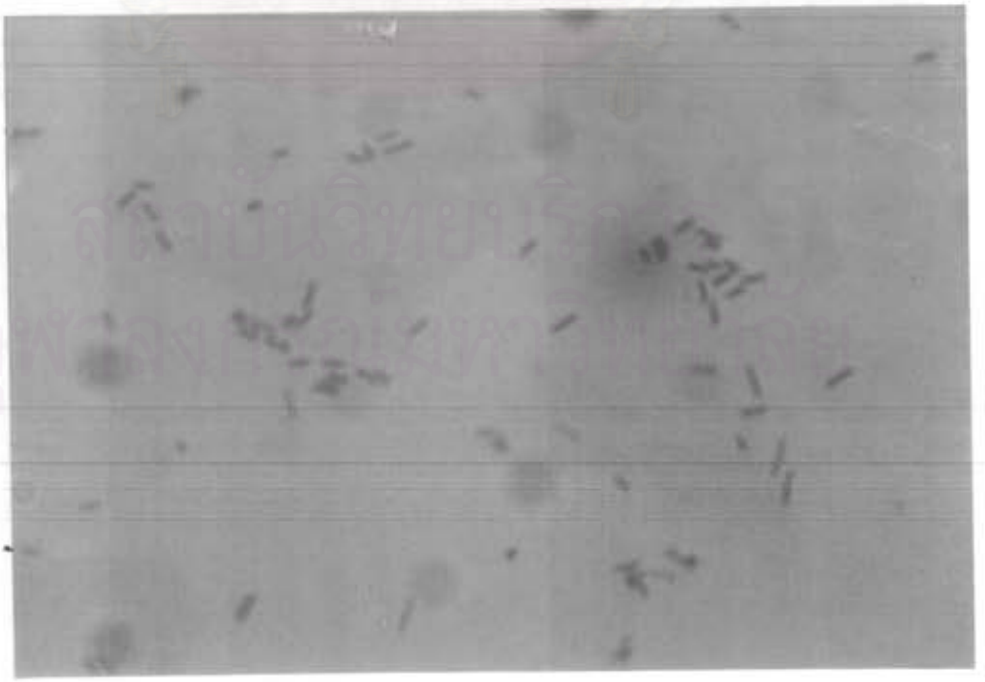
นำแบคทีเรียบริสุทธิ์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 1.1.3 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน ทดสอบโดยหยดสารละลาย Griess-Ilosvay regent ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าเชื้อมีการสร้างไนไตรท์จะมีสีชมพูเกิดขึ้น หากไม่มีการสร้างไนไตรท์จะไม่มีการเปลี่ยนสี ดังรูปที่ 52 (ภาคผนวก ง) จากการทดลอง พบว่า มี 4 สายพันธุ์ที่อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพู ดังตารางที่ 4 ได้แก่ A1 (รูปที่ 15), A3 (รูปที่ 16), A4 (รูปที่ 17) และ A7 (รูปที่ 18) ในขณะที่ 5 สายพันธุ์ได้แก่ A2, A5, A6, A8 และ A9 ไม่มีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 4 สายพันธุ์ของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียที่แยกจากแหล่งต่างๆ แสดงถึงโครงสร้าง การย้อมติดสีแกรม และ ความสามารถในการสร้างไนไตรท์

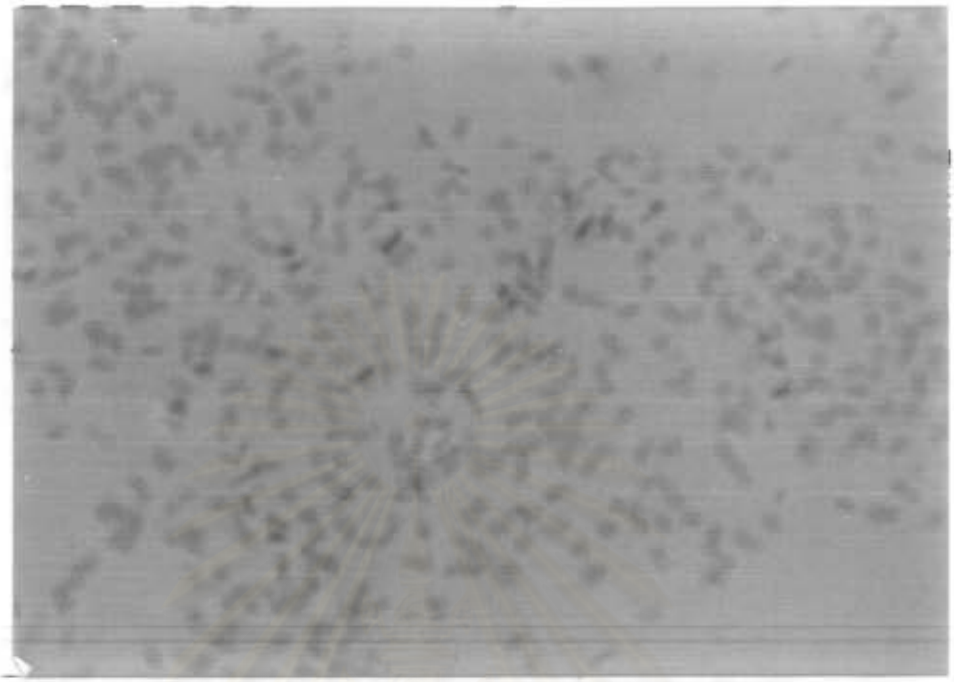
สายพันธุ์	แหล่งตัวอย่าง	ตัวอย่าง	รูปร่าง	การย้อมติดสี	การทดสอบด้วย Griess-Ilosvay
A1	ลิชัง	น้ำ	แท่ง	ลบ	+
A2	ลิชัง	ตะกอน	แท่ง	ลบ	-
A3	จุฬา	น้ำ	แท่ง	ลบ	+
A4	จุฬา	น้ำ	แท่ง	ลบ	+
A5	จุฬา	ตะกอน	กลม	ลบ	-
A6	จุฬา	ตะกอน	แท่ง	ลบ	-
A7	จุฬา	ตะกอน	แท่ง	ลบ	+
A8	สุราษฎร์ธานี	ตะกอน	แท่ง	ลบ	-
A9	สุราษฎร์ธานี	ตะกอน	แท่ง	ลบ	-

หมายเหตุ + มีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากไม่มีสีเป็นสีชมพู

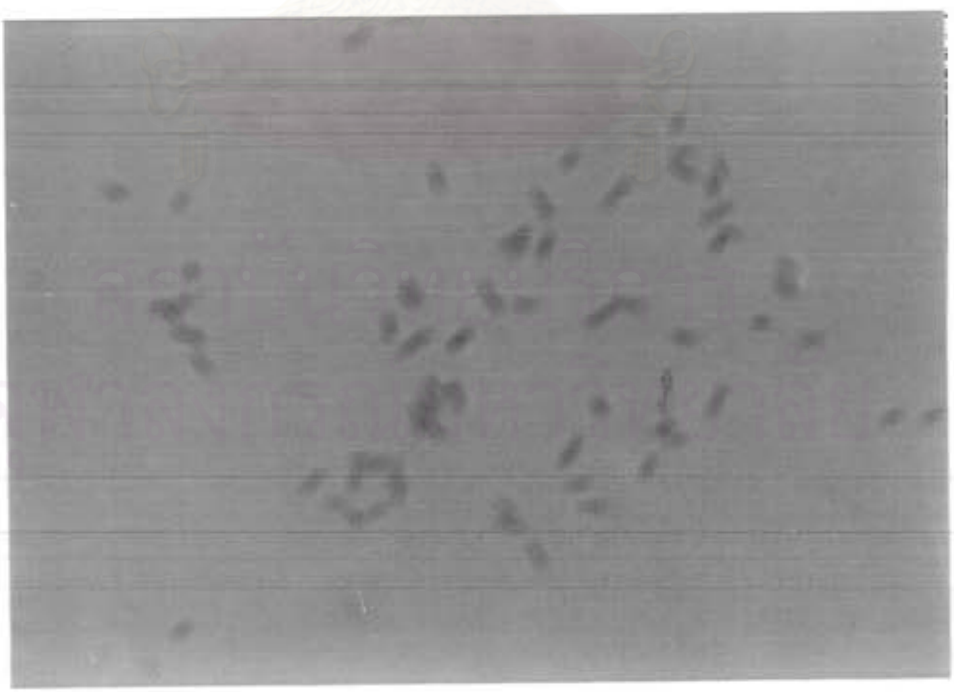
- ไม่มีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากไม่มีสีเป็นสีชมพู



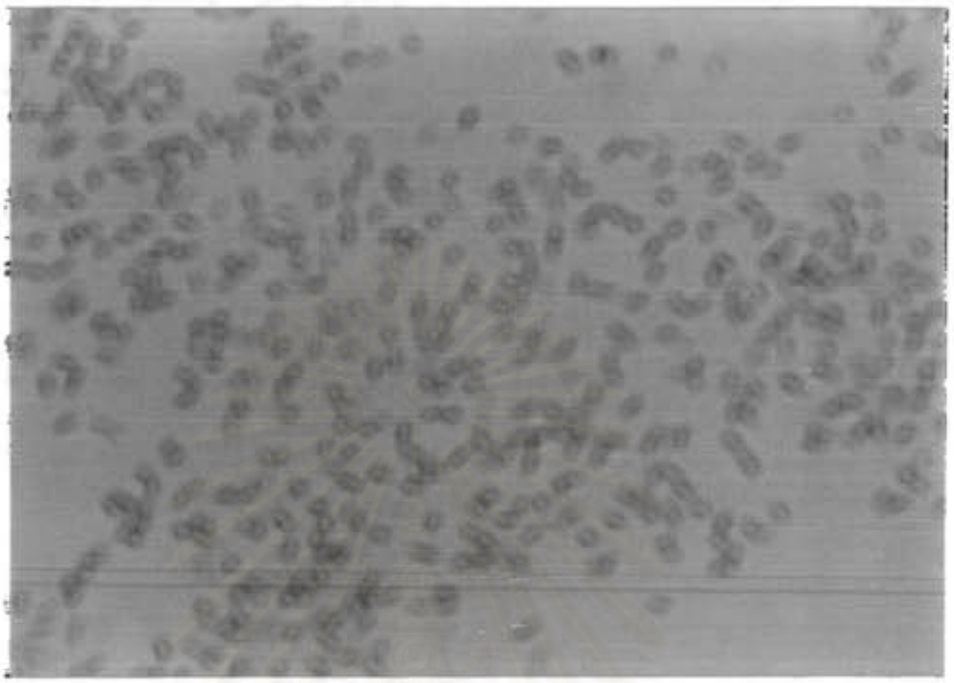
รูปที่ 15 ภาพถ่ายของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A1 จากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (กำลังขยาย 3388 X)



รูปที่ 16 ภาพถ่ายของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A3 จากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (กำลังขยาย 3388 X)



รูปที่ 17 ภาพถ่ายของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A4 จากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (กำลังขยาย 3388 X)



รูปที่ 18 ภาพถ่ายของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 จากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (กำลังขยาย 3388 X)

1.1.5 **คัดเลือกหาคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย**

การทดสอบคัดเลือกหาแบคทีเรียที่เป็นคีโมออโตโทรฟิคแบคทีเรียได้ผลดังนี้

1.1.5.1 **การทดสอบความเจริญของเชื้อในอาหารอินทรีย์**

นำแบคทีเรียที่สามารถสร้างไนไตรท์ได้จาก 1.1.4 ได้แก่แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A1 A3 A5 และ A7 ตามลำดับ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้ออินทรีย์เหลว นิวเตรียนท์ (nutrient broth) อาหารมารีน (marine broth) อาหารฟลูอิด ไธโอไกลคอลเลต (fluid thioglycollate broth) อาหารทริปติเคส ซอย (trypticase soy broth) และอาหารออร์แกนนิค (organic medium) บ่มเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน พบว่าแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A1 สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้ออินทรีย์ทดสอบทุกชนิด แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A3 สามารถเจริญได้ใน อาหารทริปติเคส ซอย อาหารฟลูอิด ไธโอไกลคอลเลต และอาหารออร์แกนนิค แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A4 สามารถเจริญได้ใน อาหารฟลูอิด ไธโอไกลคอลเลต และ อาหารทริปติเคส ซอย แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 สามารถเจริญได้ใน อาหารฟลูอิด ไธโอไกลคอลเลต และอาหารทริปติเคส ซอย ดังปรากฏในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ความสามารถในการเจริญของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A1 A3 A4 และ A7 ในอาหารเลี้ยงเชื้ออินทรีย์ชนิดต่างๆ

อาหารเลี้ยงเชื้ออินทรีย์เหลว	แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์			
	A1	A3	A4	A7
มารีน	+	-	-	-
ทริปติเคส ซอย	+	+	+	+
ฟลูอิด ไธโอไกลเลต	+	+	+	+
นิวเตรียนท์	+	-	-	-
ออร์แกนนิค	+	+	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย (อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น)

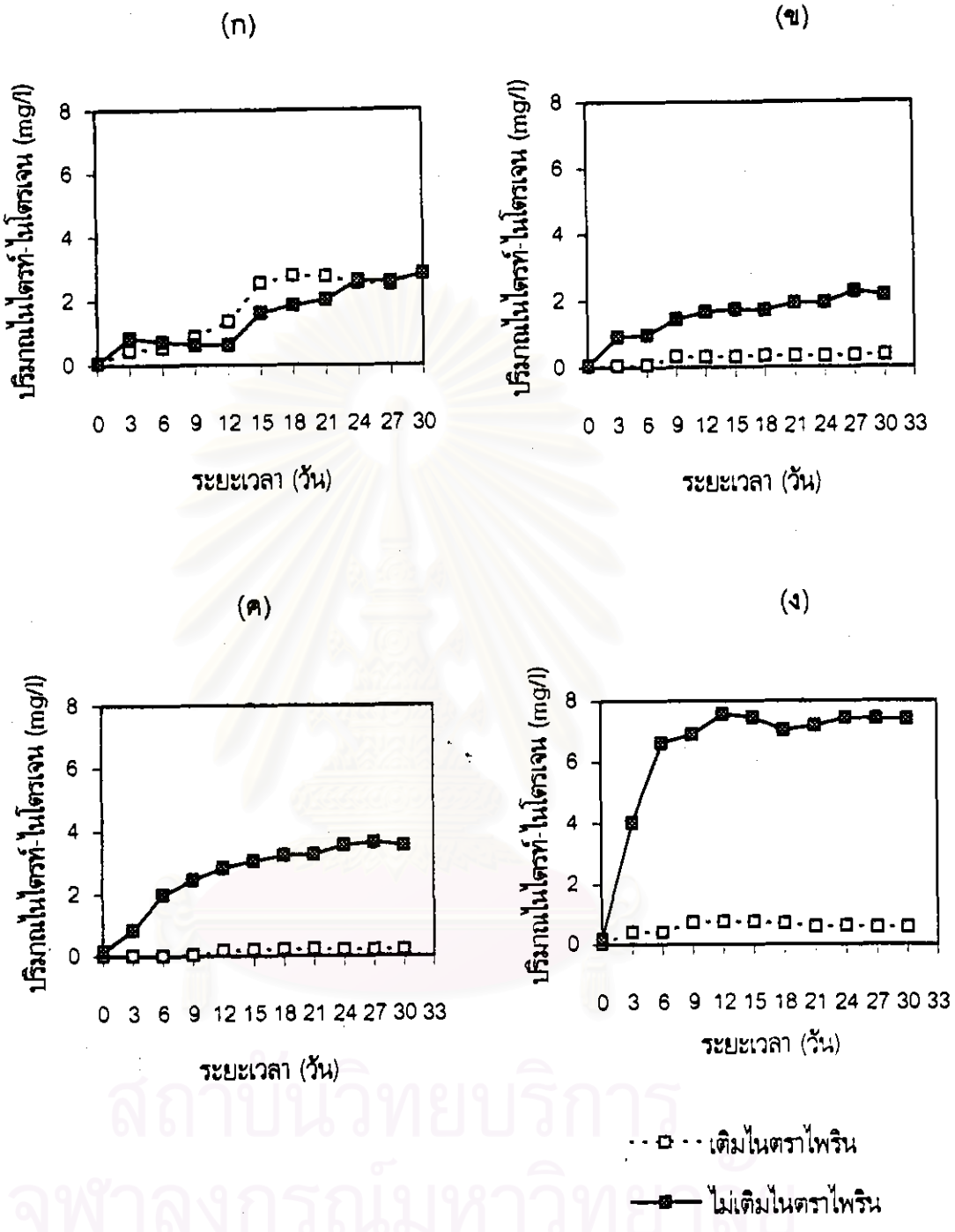
\+ หมายถึง มีการเจริญของแบคทีเรีย (อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น)

1.1.5.2 การทดสอบด้วยไนตราไพริน

นำแบคทีเรียที่สามารถสร้างไนไตรท์ได้จากข้อ 1.1.4 ได้แก่แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A1 A3 A5 และ A7 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 3 ที่เติมไนตราไพริน ความเข้มข้น 21.9 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตรต่อลิตร เปรียบเทียบกับในสภาวะที่ไม่เติมไนตราไพริน เลี้ยงเขย่าด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เมื่อวัดปริมาณไนไตรท์ที่เกิดขึ้น โดยวิธีไดอาโซไทเซชัน พบว่า แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการสร้างไนไตรท์คือสายพันธุ์ A3 A4 และ A7 ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่ถูกยับยั้งคือ A1 ผลการยับยั้งดังตารางที่ 6 และรูปที่ 19

ตารางที่ 6 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนไตรท์ - ไนโตรเจนของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A1 A3, A4 และ A7 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 4 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร เติมและไม่เติมไนตราไพรินความเข้มข้น 21.9 เปอร์เซ็นต์ปริมาณ 2 มิลลิลิตรต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 8.5 ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน

เวลา (วัน)	ปริมาณไนไตรท์ - ไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่สร้างโดยแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย							
	A1		**A3**		**A4**		**A7**	
	เติมไนตราไพริน	ไม่เติมไนตราไพริน	เติมไนตราไพริน	ไม่เติมไนตราไพริน	เติมไนตราไพริน	ไม่เติมไนตราไพริน	เติมไนตราไพริน	ไม่เติมไนตราไพริน
0	0.67	0.64	0.03	0.05	0.01	0.14	0.02	0.17
3	0.45	0.84	0.05	0.92	0.01	0.84	0.42	4.01
6	0.53	0.72	0.07	0.96	0.02	1.98	0.42	6.63
9	0.87	0.62	0.32	1.45	0.03	2.45	0.74	6.90
12	1.35	0.62	0.31	1.65	0.18	2.83	**0.77**	**7.56**
15	2.55	1.62	0.31	1.72	0.21	3.05	0.75	7.45
18	2.78	1.85	0.35	1.71	0.20	3.23	0.69	7.04
21	2.76	2.03	0.33	1.91	0.22	3.25	0.61	7.19
24	2.58	2.56	0.33	1.93	**0.21**	3.56	0.63	7.43
27	2.51	2.59	0.34	**2.26**	**0.21**	**3.65**	0.59	7.42
30	**2.86**	**2.84**	**0.36**	2.13	**0.21**	3.53	0.58	7.40



รูปที่ 19 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนไตรท์ของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A1(ก), A3 (ข), A4 (ค) และ A7 (ง) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 4 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร เติมและไม่เติมไนตราไพรินความเข้มข้น 21.9 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 2 มิลลิลิตรต่อลิตร ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน

1.2 คัดเลือกคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์

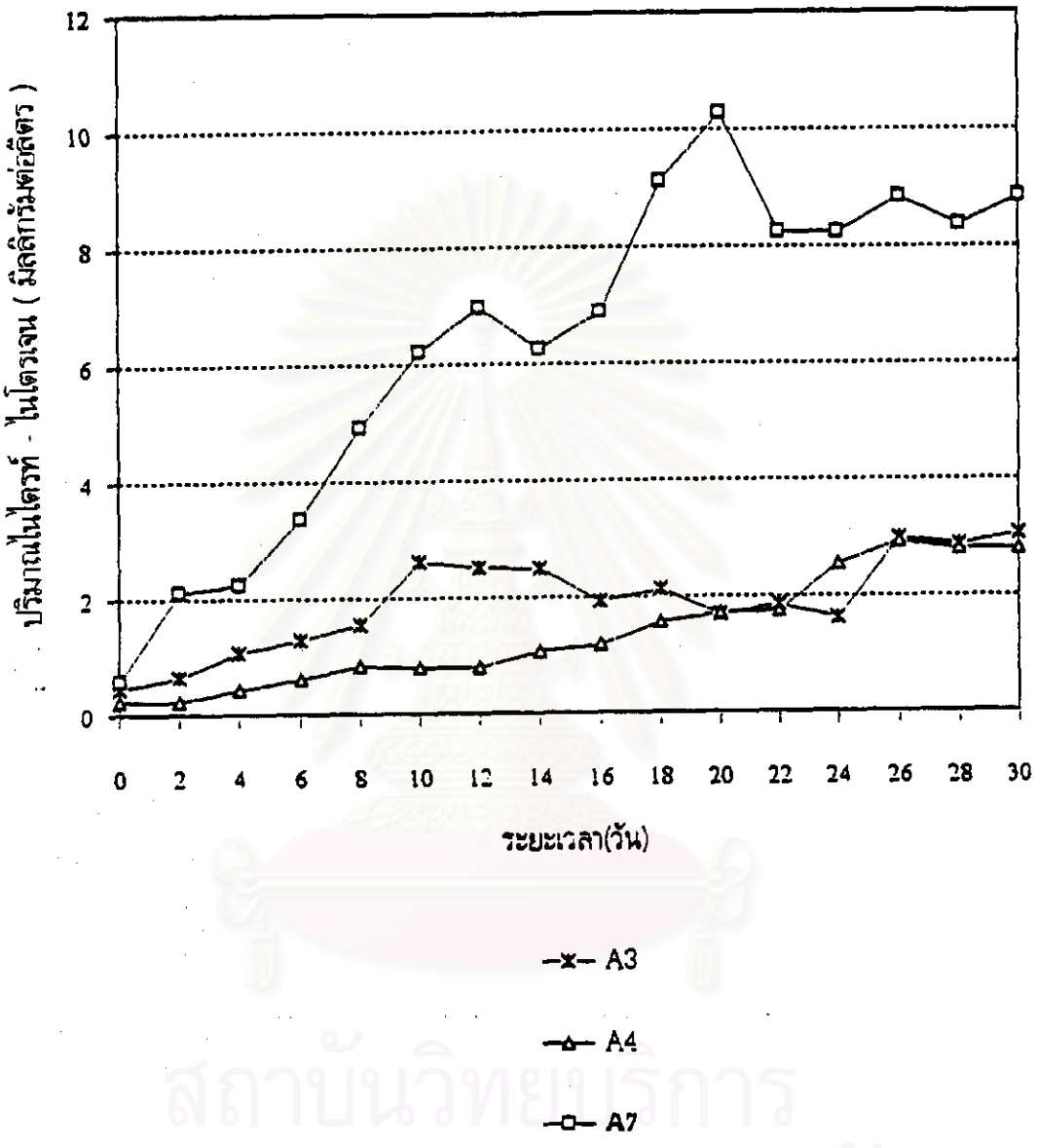
น่าคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A3 A4 และ A7 ที่ได้ทดสอบแล้วว่ามีความสามารถในการสร้างไนไตรท์จากแอมโมเนียและถูกยับยั้งการสร้างไนไตรท์ด้วยไนตราไพริน มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 3 (ภาคผนวก ก) 50 มิลลิลิตรบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 4 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดด่าง 8.5 เขย่าที่อัตรา 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 วัน โดยเก็บตัวอย่างมาทดสอบทุก 2 วัน เมื่อวัดปริมาณไนไตรท์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีไดอาโซไทเซชัน (ภาคผนวก ข) พบว่า A7 สร้างไนไตรท์ได้ดีที่สุดคือปริมาณ 10.27 มิลลิกรัมต่อลิตรในวันที่ 20 ของการทดลอง รองลงมาคือ A3 และ A4 ซึ่ง วัดปริมาณไนไตรท์ได้สูงสุดคือ 3.05 และ 2.92 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 30 และ วันที่ 26 ตามลำดับ ดังตารางที่ 7 และรูปที่ 20 ดังนั้นจึงเลือกคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนไตรท์ - ไนโตรเจนของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A3 A4 และ A7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 4 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 8.5 ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน

เวลา (วัน)	ปริมาณไนไตรท์ - ไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่สร้างโดยคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์		
	A3	**A4**	**A7**
0	0.46	0.24	0.59
2	0.66	0.23	2.10
4	1.08	0.44	2.23
6	1.25	0.61	3.36
8	1.54	0.84	4.92
10	1.61	0.79	6.20
12	2.51	0.79	6.97
14	2.48	1.08	6.25
16	1.93	1.18	6.88
18	2.12	1.56	7.12
20	1.65	1.71	7.27
22	1.85	1.74	8.25
24	1.61	2.54	8.24
26	2.97	**2.92**	8.84
28	2.87	2.79	8.34
30	**3.05**	2.79	**8.85**

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 20 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนไตรท์ของดีโมอยโตโทรพิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A3, A4 และ A7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 4 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 8.5 ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน

1.3 **ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด**

การนำคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุด คือสายพันธุ์ A7 มาศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์ โดยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 3 ที่แปรผันสภาวะต่างๆได้ผล ดังนี้

4.1.6.1 **ผลความเข้มข้นของปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีต่อการสร้างไนไตรท์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7**

เลี้ยง คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 3 ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ 4 มิลลิโมลาร์ และ 5 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 8.5 เขย่าที่อัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไนไตรท์ที่เกิดขึ้นพบว่าคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 มีการสร้างไนไตรท์สูงที่สุดในสภาวะที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 4 มิลลิโมลาร์ โดยวัดปริมาณไนไตรท์สูงสุดได้ 7.63 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 28 ของการทดลอง รองลงมาคือ ในสภาวะที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 5 มิลลิโมลาร์ และ 3 มิลลิโมลาร์ โดยวัดปริมาณไนไตรท์สูงสุดได้ 5.72 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 22 ของการทดลอง และ 4.83 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 22 ของการทดลองตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบการสร้างไนไตรท์ของแต่ละวัน พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 4 และ 5 มิลลิโมลาร์ จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 3 มิลลิโมลาร์ จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 4 และ 5 มิลลิโมลาร์ ดังตารางที่ 8 และ รูปที่ 21

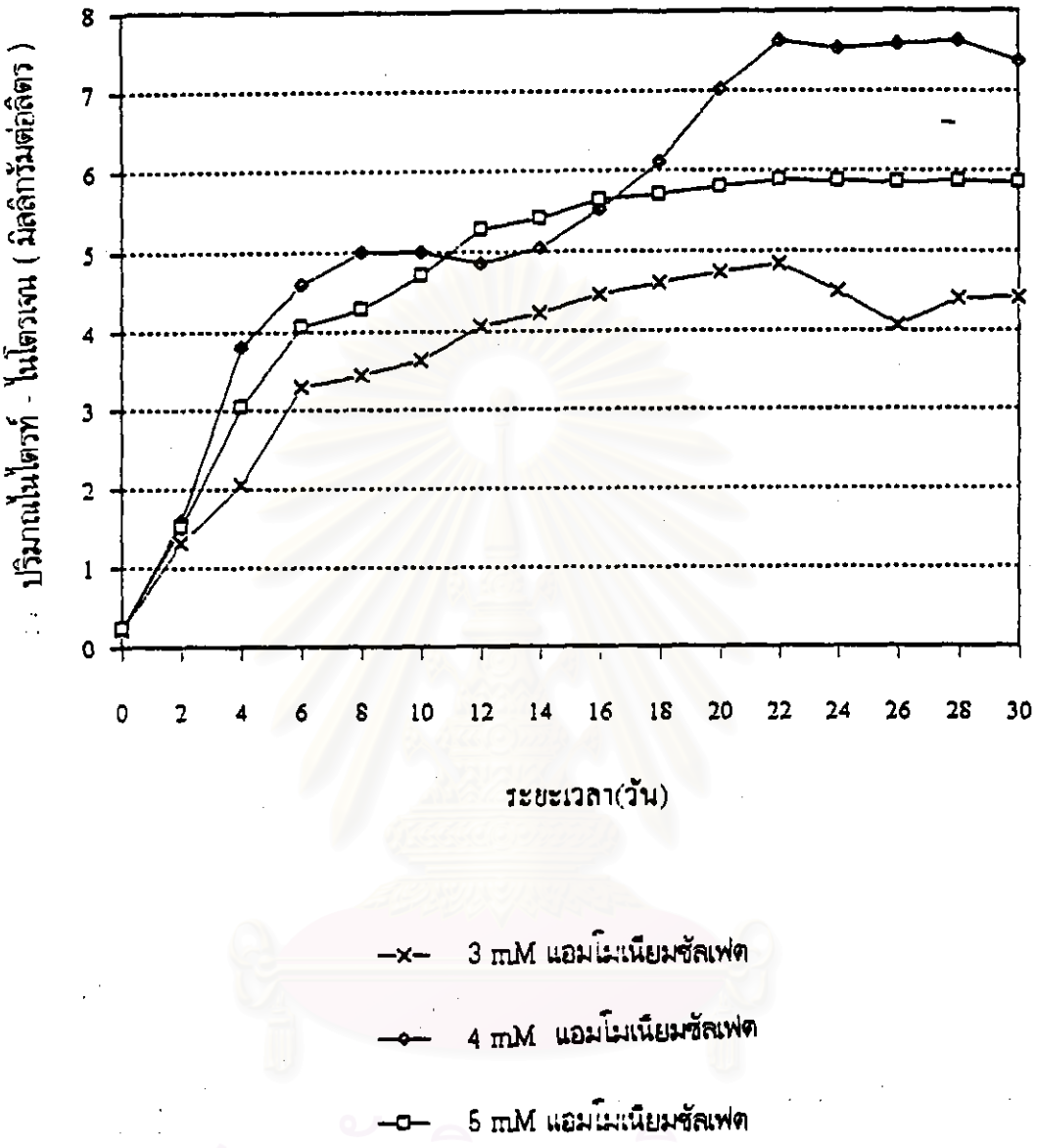
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนไตรท์ - ไนโตรเจนของดีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิง แบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 3 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 3 มิลลิโมลาร์ 4 มิลลิโมลาร์ และ 5 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.5 ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน

เวลา (วัน)	ปริมาณไนไตรท์ - ไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่สร้างโดยดีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต			cv (%)
	3 mM	**4 mM**	**5 mM**	
0	0.22a	0.25a	0.24a	19.26
2	1.31a	1.60a	1.52a	17.85
4	2.04b	3.80a	3.04a	9.82
6	3.30c	4.60a	4.06b	28.08
8	3.44c	5.00a	4.28b	17.42
10	3.64b	4.99a	4.70a	9.11
12	4.07b	4.85a	5.28a	16.94
14	4.22b	5.04a	5.42a	12.24
16	4.45b	5.53a	5.64a	13.53
18	4.60b	6.11a	5.70a	11.67
20	4.73b	7.02a	5.80b	12.74
22	**4.83c**	7.62a	**5.88b**	27.87
24	4.48c	6.85a	5.87b	28.51
26	4.06c	7.58a	5.86b	31.58
28	4.40c	**7.63a**	5.87b	27.82
30	4.41c	7.38a	5.87b	34.30

หมายเหตุ:เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน

: ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$



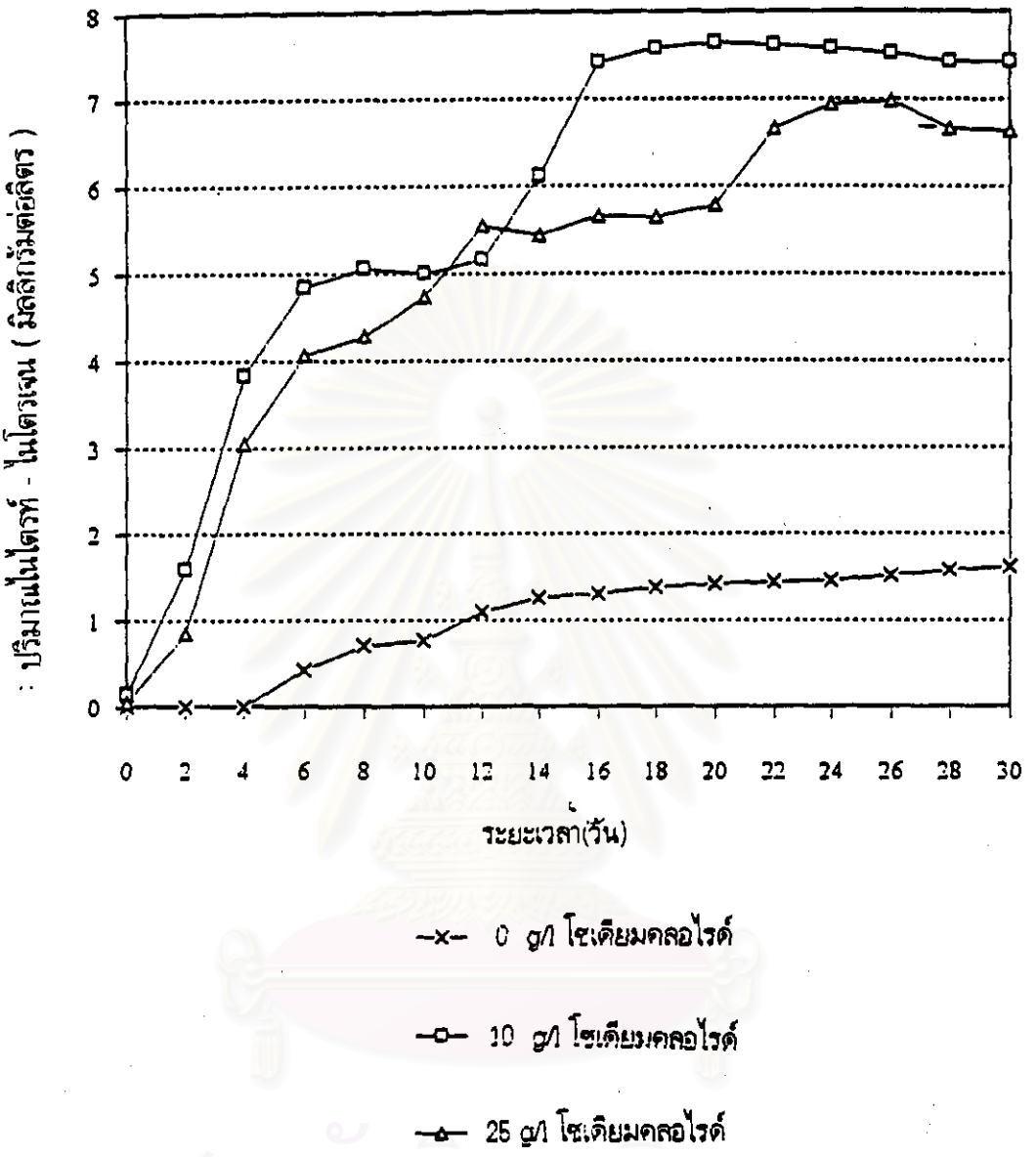
รูปที่ 21 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนไตรท์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 3 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร แปรผันแอมโมเนียมซัลเฟต 3 , 4 และ 5 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 8.5 ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

ตารางที่ 9 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนไตรท์ - ไนโตรเจน ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิง แบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 3 ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ แปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 0 กรัมต่อลิตร 10 กรัมต่อลิตร และ 25 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดด่าง 8.5 ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน

เวลา (วัน)	ปริมาณไนไตรท์ - ไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่สร้างโดยคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมด้วยที่ผสมด้วยโซเดียมคลอไรด์			cv (%)
	0 g/l	**10 g/l**	**25 g/l**	
0	0.00c	0.15a	0.05b	9.11
2	0.00c	1.58a	0.84b	11.84
4	0.00c	3.83a	3.04a	5.75
6	0.43b	4.84a	4.06a	14.03
8	0.70c	5.07a	4.28b	22.81
10	0.76b	4.99a	4.73a	17.56
12	1.09b	5.19a	5.55a	14.65
14	1.26c	6.11a	5.44b	21.80
16	1.30c	7.43a	5.66b	9.20
18	1.38c	7.58a	5.65b	17.83
20	1.42c	7.64a	5.78b	21.60
22	1.44b	7.61a	6.66a	8.93
24	1.45b	**7.58a**	6.94a	6.51
26	1.51b	7.52a	**6.97a**	7.92
28	1.58b	7.42a	6.65a	8.51
30	**1.60b**	7.43a	6.64a	14.13

หมายเหตุ : เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน

: ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$



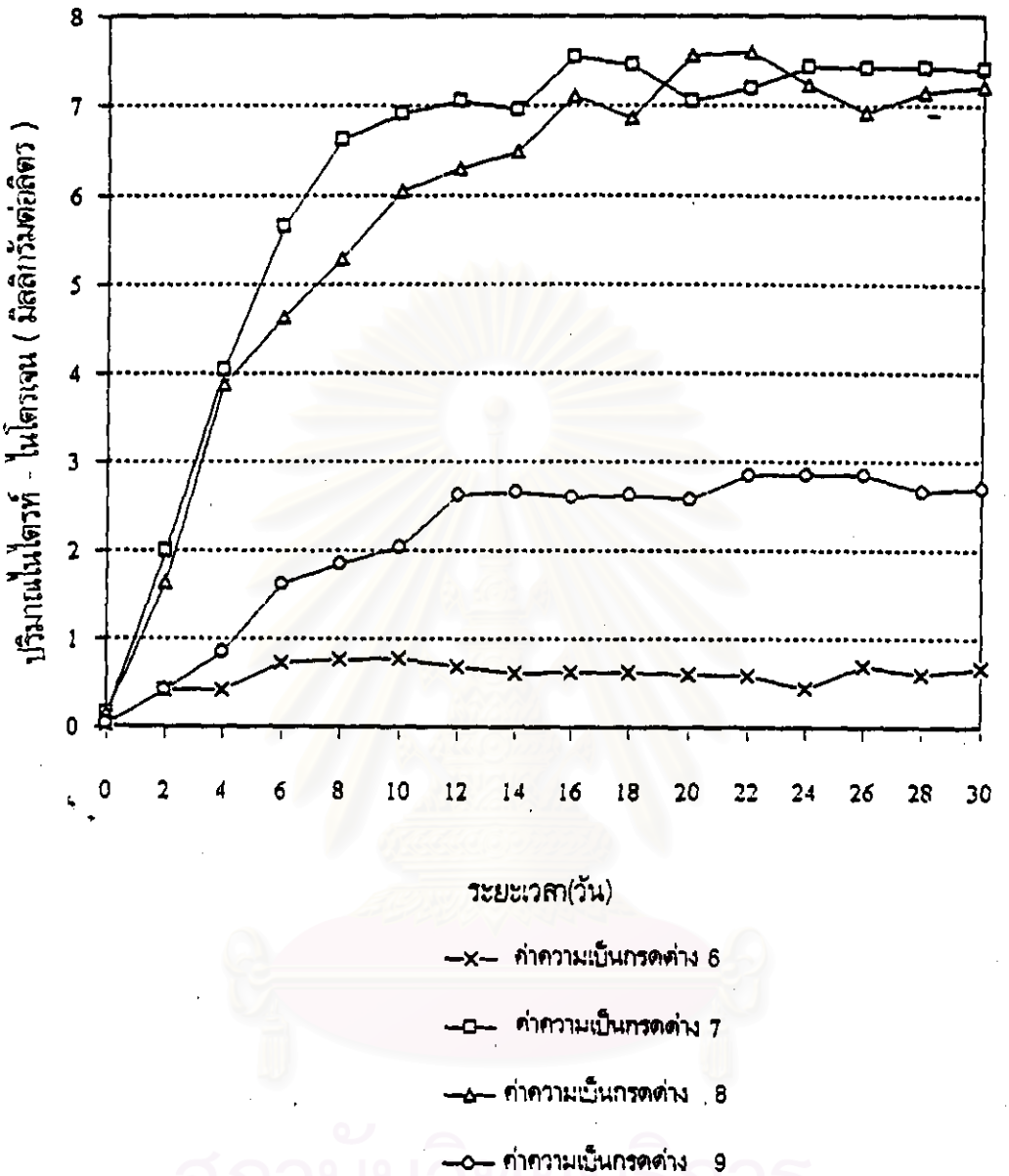
รูปที่ 22 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนไตรท์ของดีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 3 ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 4 มิลลิโมลาร์ แปรผันโซเดียมคลอไรด์ที่ 0 , 10 และ 25 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 8.5 ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน

ตารางที่ 10 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนไตรท์ - ไนโตรเจน ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิง แบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 3 ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 4 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร แปรผันค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 6 7 8 และ 9 ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน

เวลา (วัน)	ปริมาณไนไตรท์ - ไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่สร้างโดยคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันค่าความเป็นกรดด่าง				cv (%)
	pH 6	**pH 7**	**pH 8**	**pH 9**	
0	0.02c	0.16b	0.14b	0.64a	25.24
2	0.41b	1.98a	1.63a	0.42b	9.81
4	0.42b	4.03a	3.87a	0.84b	16.11
6	0.73c	5.65a	4.63a	1.62b	21.14
8	0.76c	6.62a	5.28a	1.85b	18.03
10	0.78c	6.90a	6.04a	2.03b	17.90
12	0.68c	7.04a	6.30a	2.62b	16.23
14	0.60c	6.96a	6.49a	2.65b	17.61
16	0.62c	7.54a	7.11a	2.59b	15.42
18	0.62c	7.45a	6.85a	2.62b	17.67
20	0.59c	7.04a	7.56a	2.57b	28.59
22	0.58c	7.19a	**7.59a**	2.48b	17.11
24	0.44c	**7.43a**	7.22a	**2.85b**	25.02
26	**0.69c**	7.42a	6.91a	2.84b	36.41
28	0.60c	7.41a	7.14a	2.65b	29.82
30	0.66c	7.40a	7.21a	2.70b	14.96

หมายเหตุ : เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน

: ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมี



รูปที่ 23 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนไตรท์ของดีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 3 ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 4 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร โดยแปรผันค่าความเป็นกรดด่าง 6 , 7 , 8 และ 9 ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน

1.3.4. **ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการสร้างไนไตรท์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7**

เลี้ยงคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 3 ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 4 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 8.5 เขย่าที่อัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 30 และ 40 องศาเซลเซียส และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วัน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไนไตรท์ที่เกิดขึ้น พบว่าที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 สร้างไนไตรท์ปริมาณสูงที่สุด รองลงมาคือที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัดปริมาณไนไตรท์สูงสุดได้ 7.70 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 6.65 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 20 และวันที่ 22 ของการทดลอง ตามลำดับ แต่ละวันของการสร้างไนไตรท์ที่อุณหภูมิทั้งสองจะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส วัดปริมาณไนไตรท์สูงสุดได้ 1.91 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2.28 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 28 และ 20 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการสร้างไนไตรท์ของแต่ละวันพบว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะแตกต่างจากการสร้างไนไตรท์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หรือ 32 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 11 และ รูปที่ 24

1.3.5 **ผลของอัตราการเขย่าที่มีต่อการสร้างไนไตรท์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7**

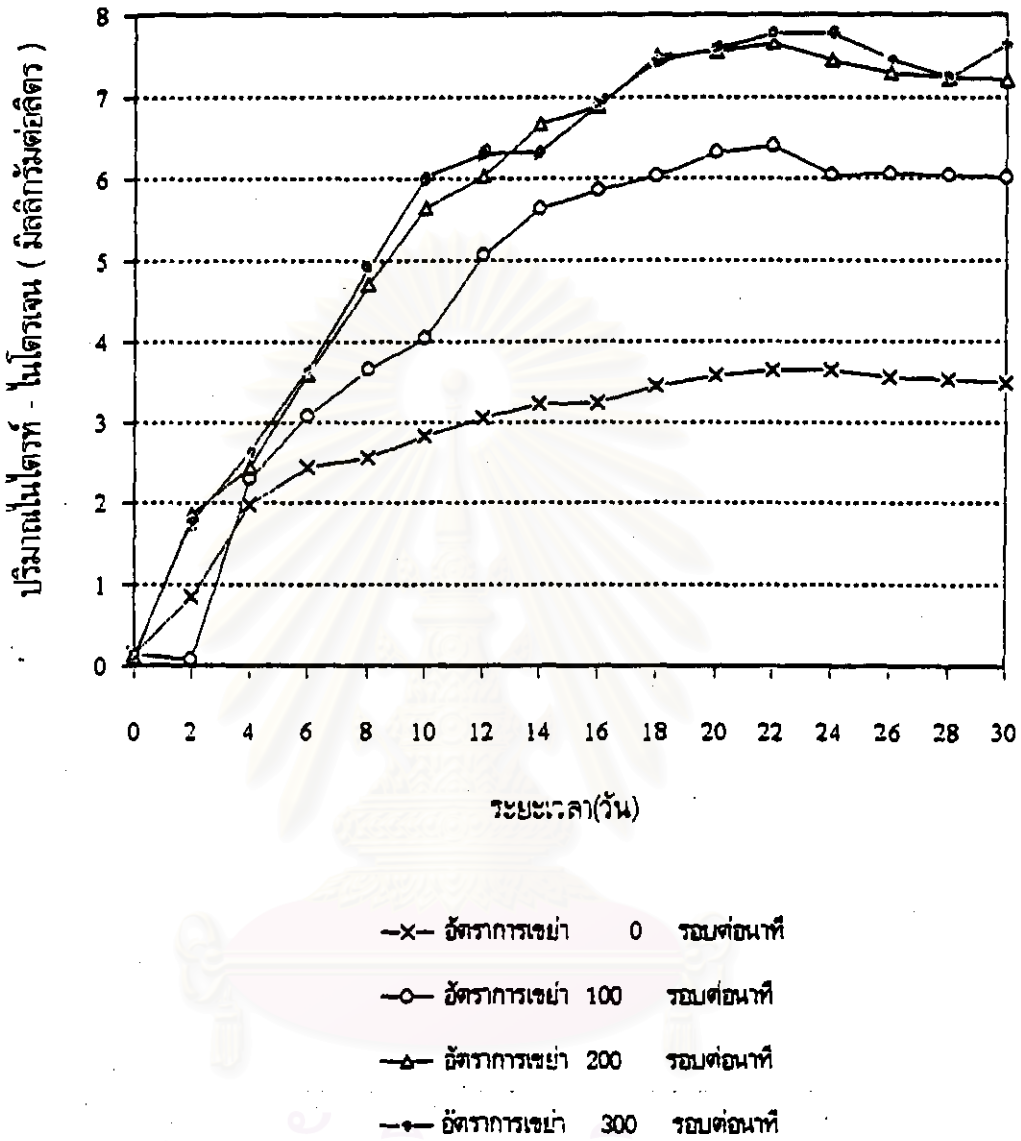
เลี้ยงคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 3 เติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 4 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 8.5 ในสภาวะที่มีอัตราการเขย่า 100, 200, 300 รอบต่อนาที และในภาวะที่ไม่มีการเขย่า บ่มเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไนไตรท์ที่เกิดขึ้น พบว่าอัตราการเขย่าที่ 300 รอบต่อนาทีมีการสร้างไนไตรท์สูงที่สุด รองลงมาคือที่อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่ 100 รอบต่อนาที และที่ไม่ได้เขย่า โดยวัดปริมาณไนไตรท์ สูงสุดได้ 7.78 มิลลิกรัมต่อลิตร 7.65 มิลลิกรัมต่อลิตร 6.32 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 3.65 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 24, 22, 22 และ 24 ตามลำดับ การสร้างไนไตรท์ในแต่ละวัน เมื่อให้อัตราการเขย่า 300 และ 200 รอบต่อนาที จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่จะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อให้อัตราการเขย่าที่ 0 และ 100 รอบต่อนาที ดังตารางที่ 12 และรูปที่ 25

ตารางที่ 11 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนไตรท์ - ไนโตรเจน ของดีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนีย แบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 4 มิลลิโมลาร์ เติมโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร แปรผันอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส 30 องศาเซลเซียส 40 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง (32 องศาเซลเซียส) ปรับค่าความเป็นกรดด่างที่ 8.5 ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นในระยะเวลา 30 วัน

เวลา (วัน)	ปริมาณไนไตรท์ - ไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่สร้างขึ้นโดยดีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ในสภาวะที่มีการแปรผันอุณหภูมิ				cv (%)
	20 °ซ	**30 °ซ**	**32 °ซ**	**40 °ซ**	
0	0.00b	0.14a	0.16a	0.05b	16.69
2	0.10b	1.63a	1.85a	0.92b	14.18
4	0.32c	2.82a	2.62a	1.18b	28.65
6	0.36c	4.04a	4.70a	1.45b	27.06
8	0.35c	4.25a	5.64a	1.65b	26.82
10	0.37c	5.82a	6.64a	1.73b	48.65
12	0.65c	6.04a	6.76a	1.76b	36.75
14	0.82c	6.18a	6.86a	1.95b	42.12
16	0.99b	6.20a	7.22a	1.02b	18.16
18	1.01c	6.24a	7.40a	2.16b	21.74
20	1.24b	6.48a	**7.70a**	**2.28b**	15.58
22	1.65c	**6.65a**	7.56a	2.21b	18.74
24	1.79b	6.44a	7.20a	2.27b	12.76
26	1.84b	6.43a	7.18a	2.04b	17.05
28	**1.91b**	6.04a	7.14a	2.11b	16.11
30	1.82b	5.97a	7.04a	2.17b	18.92

หมายเหตุ : เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน

: ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$



รูปที่ 25 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนไตรท์ของดีโมออโตโทรพิดแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 3 ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 4 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ที่แปรผันอัตราการเขย่าที่ 0 100 , 200 และ 300 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรดด่าง 8.5 ในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน

1.3.2 ผลความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อการสร้างไนไตรท์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7

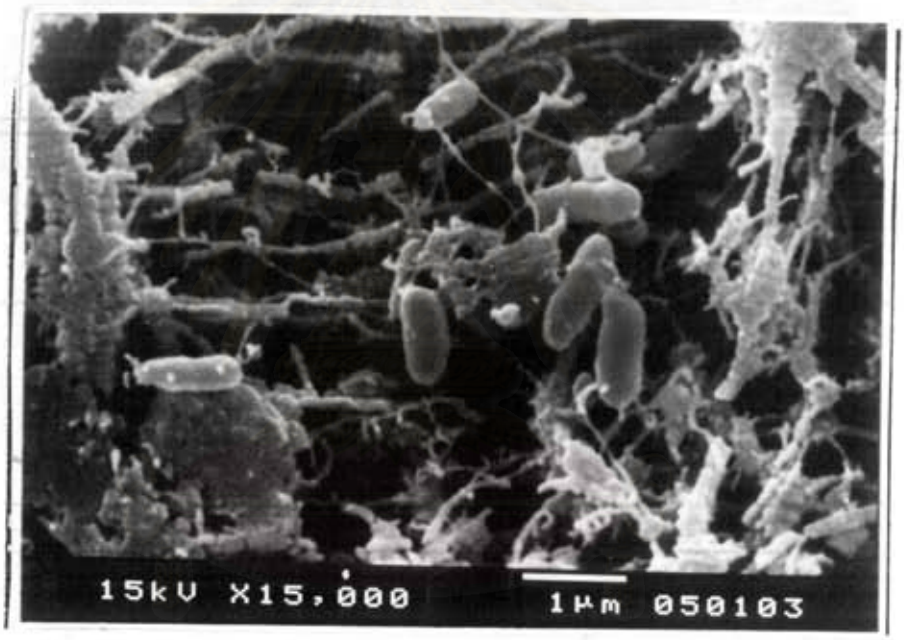
เลี้ยงคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 10, 25 กรัมต่อลิตร และ ในสภาวะที่ไม่ได้เติมโซเดียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต 4 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 8.6 เขย่าที่อัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วันเมื่อเปรียบเทียบปริมาณไนไตรท์ที่เกิดขึ้น พบว่าในสภาวะที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 สร้างไนไตรท์ในปริมาณสูงที่สุด โดยวัดปริมาณไนไตรท์ได้ 7.58 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ในสภาวะที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 25 กรัมต่อลิตร วัดปริมาณไนไตรท์สูงสุดได้ 6.97 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีการสร้างไนไตรท์ต่ำสุดคือในสภาวะที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ คือมีปริมาณ 1.60 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 20, 26 และ 30 ของการทดลองตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการสร้างไนไตรท์ของแต่ละวัน พบว่า ที่โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 และ 25 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างไนไตรท์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10 และ 25 กรัมต่อลิตร จะมีการสร้างไนไตรท์แตกต่างจากในสภาวะที่ไม่ได้เติมโซเดียมคลอไรด์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 9 และ รูปที่ 22

1.3.3 ผลของค่าความเป็นกรดด่างที่มีผลต่อการสร้างไนไตรท์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7

เลี้ยงคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 3 ปรับค่าความเป็นกรดด่างที่ 6, 7, 8 และ 9 แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 4 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร เขย่าที่อัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไนไตรท์ที่เกิดขึ้น พบว่ามีการสร้างไนไตรท์ได้สูงที่สุดในสภาวะ ที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 8 รองลงมาคือที่ค่าความเป็นกรดด่าง 7 แต่การสร้างไนไตรท์ที่ความเป็นกรดด่างทั้งสองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวัดปริมาณไนไตรท์สูงสุดได้ 7. 59 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดด่าง 8 และ 7.43 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดด่าง 7 ในวันที่ 22 และ 18 ของการทดลองตามลำดับ และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6 และ 9 วัดปริมาณไนไตรท์สูงสุดได้ 0.69 และ 2.85 มิลลิกรัมต่อลิตรในวันที่ 26 และ 24 ของการทดลอง ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบการสร้างไนไตรท์ของแต่ละวันพบว่าที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรดด่าง 7 และ 8 จะมีการสร้างไนไตรท์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จะแตกต่างกับการสร้างไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 9 และ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 10 และ รูปที่ 23

1.4 **ผลการศึกษาลักษณะเซลล์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด**

จากการศึกษารูปร่างของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน รุ่น JSM-T220A พบว่าคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นแท่งสั้นขนาด 0.5 x 1.0 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 26 และ 27



รูปที่ 26 ภาพถ่ายของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะของเซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง (กำลังขยาย 22388 X)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 27 ภาพถ่ายของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดแสดงลักษณะการแบ่งเซลล์ (กำลังขยาย 16418 X)

2 การศึกษาคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย

ทำการแยกคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียจากธรรมชาติโดยเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุดมสมบูรณ์และเหมาะสมต่อคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย และนำเชื้อบริสุทธิ์มาทดสอบความสามารถในการสร้างไนเตรท คัดเลือกจุลินทรีย์จำพวกคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย และคัดเลือกหาคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูง ตลอดจนหาผลกระทบของปัจจัยสภาวะแวดล้อมเช่น ปริมาณไนไตรท์ ความเค็ม ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และอัตราการเจือจางที่มีผลต่อการสร้างไนเตรทของแบคทีเรียดังกล่าว ซึ่งได้ผลดังนี้

2.1 **การแยกไนโตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียจากธรรมชาติ**

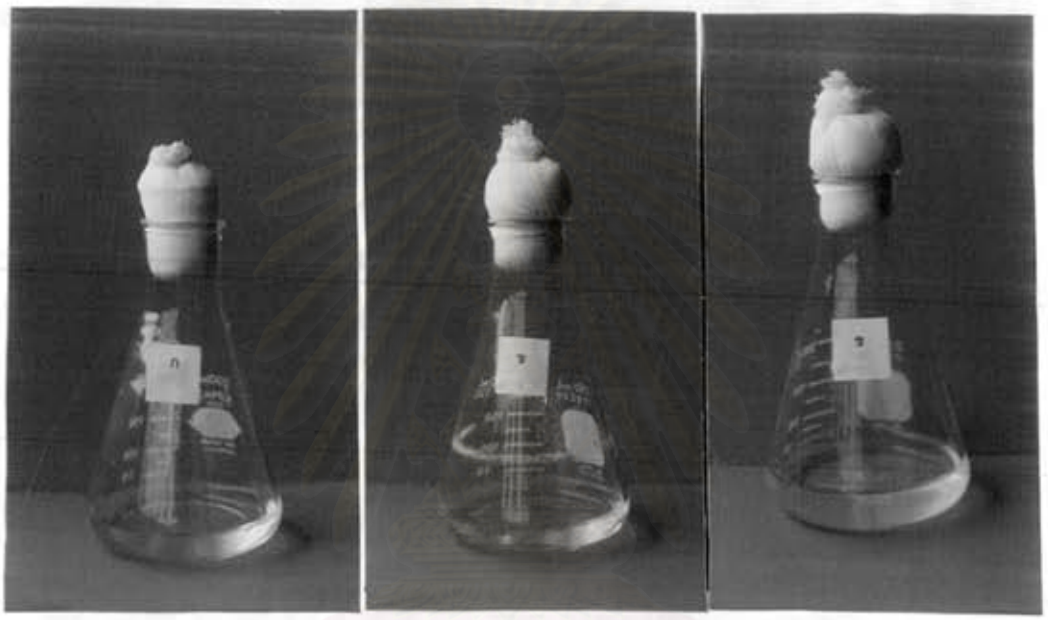
การแยกคิโมออโตโทรฟิคไนโตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียจากธรรมชาติให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ได้ผลดังนี้

2.1.1**การเพิ่มจำนวนไนโตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย**

นำตัวอย่างจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ ส่วนที่เป็นน้ำและตะกอน นำมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ที่มี โซเดียมไนโตรท์ปริมาณ 20 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งพลังงาน ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ 7.0 เขย่าที่อัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำไปเขี่ยลากในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร 4 พบว่า โคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ลักษณะโคโลนีขุ่น มีขนาด 0.5 ถึง 1.0 มิลลิเมตร

2.1.2 **การทำเชื้อแบคทีเรียในข้อ 2.1.1 ให้บริสุทธิ์**

เขี่ยโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งจากข้อ 2.1.1 มาเขี่ยลากบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 4 อีกครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ พบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างโคโลนีบนอาหารแข็งภายใน 7 ถึง 10 วัน ลักษณะโคโลนีมีสีขาวขุ่น ขนาด 0.5 ถึง 1.0 มิลลิเมตร และตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการย้อมสี แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งของภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คือ N1 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นรูปลูกแพร์ มีขนาดไม่แน่นอน พบว่าการขยายพันธุ์แบบแตกหน่อ ดังรูปที่ 29 และ สายพันธุ์ N2 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างกลม ดังรูปที่ 30 สำหรับการเจริญของแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งสองสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 เมื่อเขย่าในอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่ามีลักษณะการเจริญต่างกัน โดยการเจริญของ N2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะใส ส่วนการเจริญของ N1 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน พบว่ามีลักษณะใสและมีกลุ่มเซลล์เกาะติดบริเวณขอบผิวของภาชนะ ดังรูปที่ 28



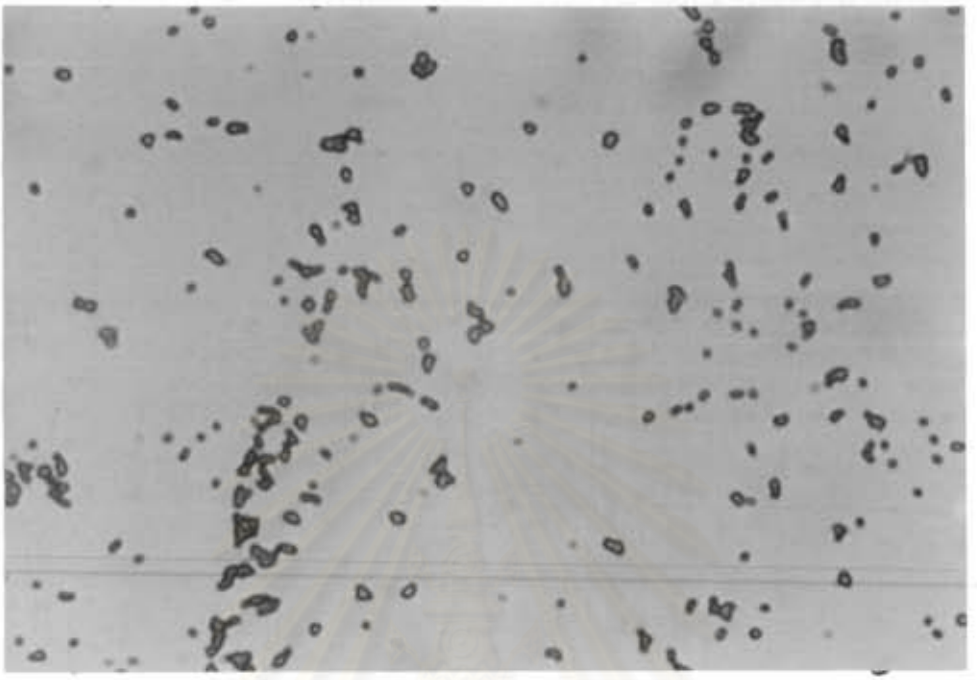
ก)　　ข)　　ค)

รูปที่ 28 การเจริญของไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 และ N2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4

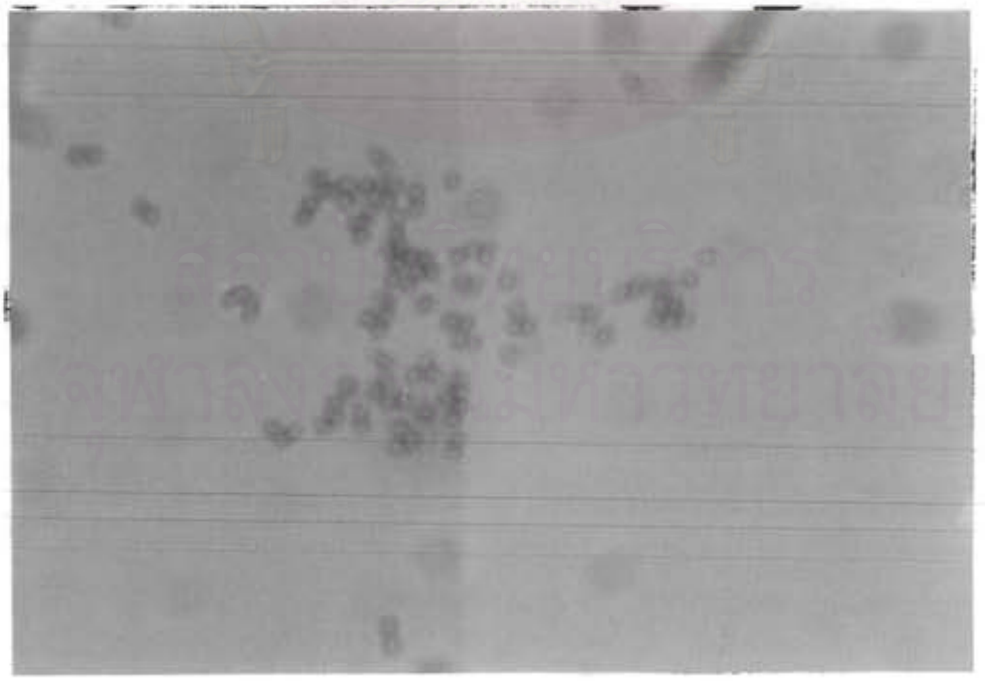
ก) อาหารควบคุมไม่ได้ใส่เชื้อ

ข) การเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 สังเกตกลุ่มเซลล์ที่เกาะบนขอบผิวของภาชนะ

ค) การเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ N2



รูปที่ 29 ภาพถ่ายของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 จากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (กำลังขยาย 3388 X)



รูปที่ 30 ภาพถ่ายของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N2 จากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (กำลังขยาย 3388 X)

2.2 **การตรวจสอบคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์ไนไตรท์ให้เป็นไนเตรท**

นำคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 และ N2 ที่แยกได้จากข้อ 4.2.1.2 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ที่เติมปริมาณโซเดียมไนไตรท์ 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ 7.0 เขย่าที่อัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เมื่อทดสอบโดยหยดไนเตรท สปอต เทสต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 และ N2 สามารถสร้างไนเตรทจากไนไตรท์ได้ โดยการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีน้ำเงิน (ภาคผนวก ช)

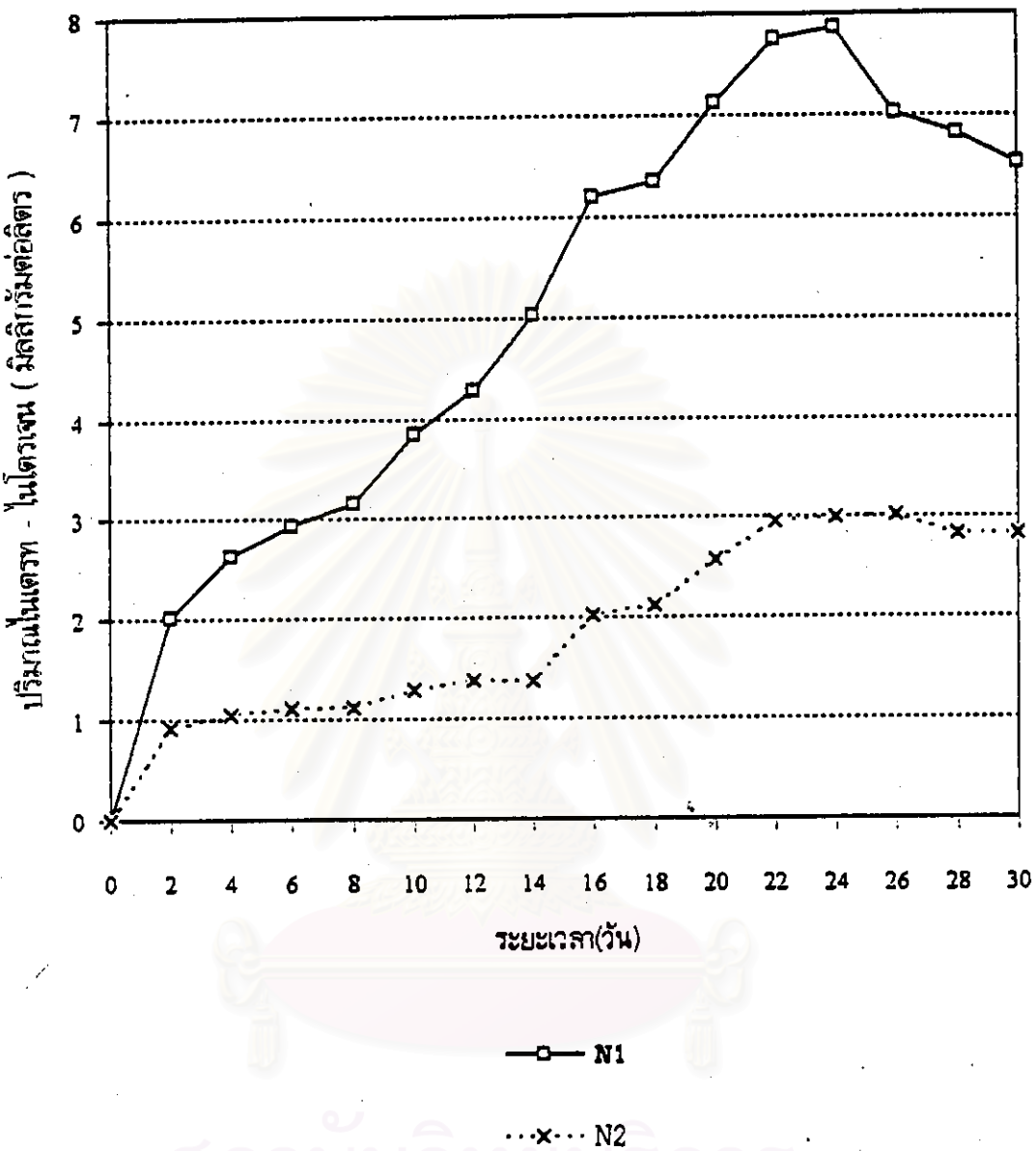
2.3 **คัดเลือกคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการออกซิไดซ์ไนไตรท์ให้เป็นไนเตรท**

นำคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 และ N2 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ที่เติมปริมาณโซเดียมไนไตรท์ 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ 7.0 เตรียมปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่อัตรา 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส การสร้างไนเตรทของแบคทีเรียทั้งสองชนิด จะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น จากการวัดปริมาณไนเตรทที่เกิดขึ้นโดยวิธีบรูซีนพบว่าคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 สามารถสร้างไนเตรทได้ปริมาณสูงกว่า คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N2 คือมีปริมาณ 7.86 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 3.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 24 และ 26 ของการทดลอง ตามลำดับ ดังตารางที่ 13 และรูปที่ 31 เมื่อเปรียบเทียบการสร้างไนเตรทของแต่ละวัน พบว่าคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 มีมากกว่า คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงคัดเลือกคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

ตารางที่ 13 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนเตรท-ไนโตรเจนของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 และ N2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ที่มีโซเดียมไนไตรท์ 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณไนเตรท - ไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่สร้างโดยคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์	
	N1	N2
0	0.00	0.00
2	2.01	0.92
4	2.62	1.04
6	2.93	1.11
8	3.15	1.12
10	3.85	1.29
12	4.28	1.38
14	5.03	1.37
16	6.20	2.02
18	6.34	2.12
20	7.12	2.57
22	7.76	2.95
24	**7.86**	2.99
26	7.02	**3.01**
28	6.82	2.82
30	6.52	2.82

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 31 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนเตรทของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 และ N2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ที่มีโซเดียมไนไตรท์ 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน

2.4 ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการออกซิไดซ์ไนไตรท์ให้เป็นไนเตรทของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด

การนำคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดคือสายพันธุ์ N1 มาศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์ไนไตรท์ให้เป็นไนเตรท โดยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 4 ที่แปรผันสภาวะต่างๆ ได้ผล ดังนี้

2.4.1 ผลความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ที่มีผลต่อการสร้างไนเตรทของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1

เลี้ยงคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร แปรผันปริมาณโซเดียมไนไตรท์ที่ 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ 7.0 เขย่าที่อัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 วัน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไนเตรทที่เกิดขึ้น พบว่าในสภาวะที่เติมโซเดียมไนไตรท์ปริมาณ 20 มิลลิโมลาร์ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 สร้างไนเตรทสูงที่สุด รองลงมาคือ ในสภาวะที่เติมโซเดียมไนไตรท์เข้มข้น 25, 15, 10 และ 30 มิลลิโมลาร์ โดยวัดปริมาณไนเตรท สูงสุดได้ 7.77, 5.13, 4.28 , 2.22 และ 2.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 22, 24, 26, 24 และ 26 ของการทดลองตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการสร้างไนเตรทในแต่ละวัน โดยคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันของโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นต่างกันดังกล่าว พบว่าแต่ละความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 14 และรูปที่ 32

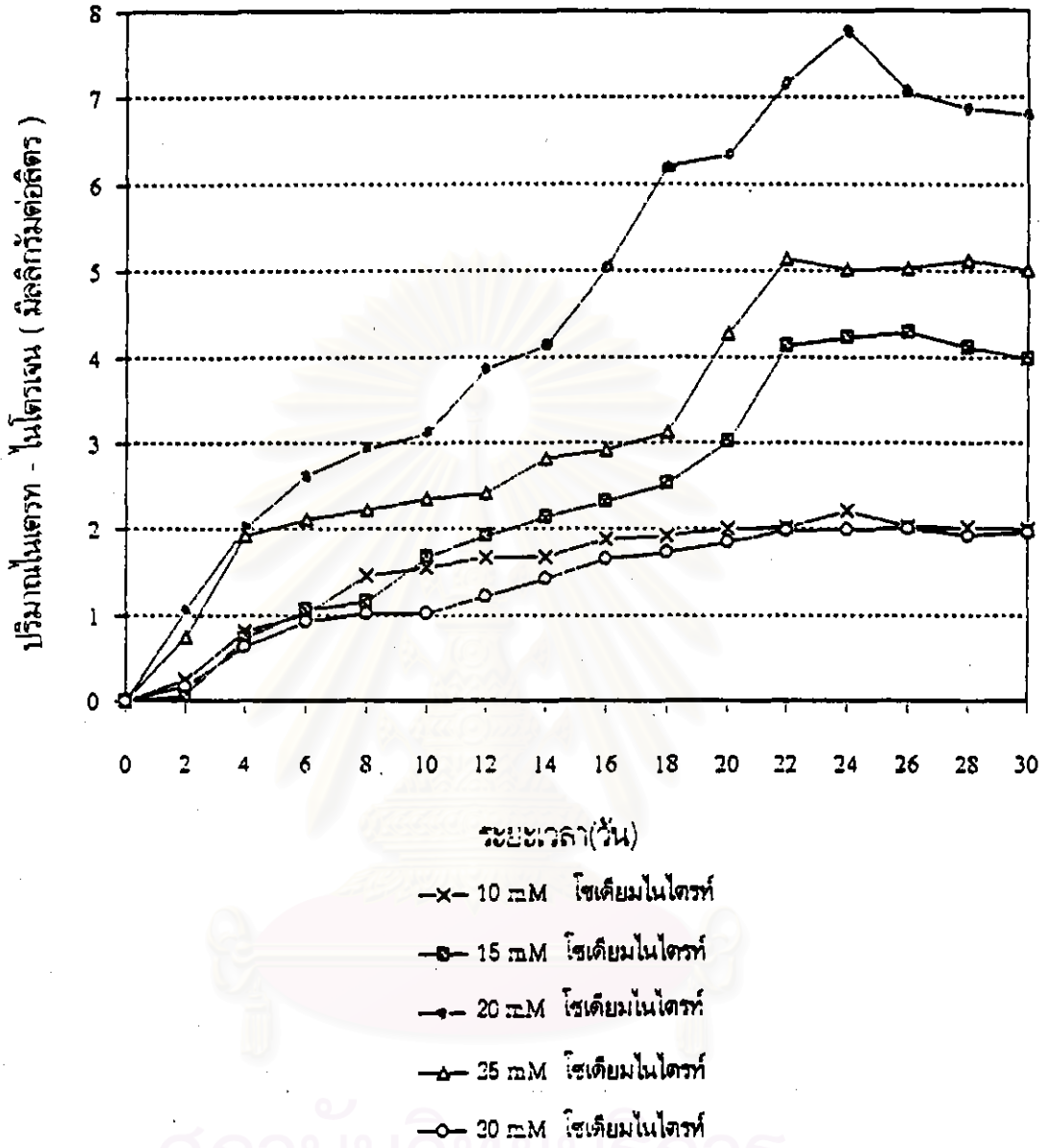
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนเตรท - ไนโตรเจน ของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร แปรผันปริมาณโซเดียมไนไตรท์ 10 15 20 25 และ 30 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาทีในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน

เวลา (วัน)	ปริมาณไนเตรท - ไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่สร้างโดยคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมด้วยโซเดียมไนไตรท์					cv (%)
	10 mM	**15 mM**	**20 mM**	**25 mM**	**30 mM**	
0	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	-
2	0.25c	0.56b	1.06a	0.75b	0.17c	36.87
4	0.82b	0.73b	2.02a	1.92a	0.63b	13.62
6	1.01b	1.05b	2.63a	2.11a	0.92b	12.27
8	1.45b	1.15b	2.92a	2.23a	1.02b	15.12
10	1.55c	1.67c	3.11a	2.36b	1.02b	29.95
12	1.66c	1.92c	3.95a	2.42b	1.22c	36.97
14	1.67c	2.13b	4.12a	2.82b	1.43c	48.67
16	1.88c	2.32b	5.03a	2.92b	1.65c	41.12
18	1.92c	2.52b	6.20a	3.12b	1.72c	52.63
20	2.01d	3.01c	6.34a	4.28b	1.85d	49.22
22	2.02d	4.13c	7.18a	5.13b	1.98d	52.11
24	**2.22d**	4.22c	**7.77a**	5.01b	1.99d	45.03
26	2.03c	**4.28b**	7.05a	**5.03b**	**2.01c**	37.63
28	2.01c	4.11b	6.87a	5.12b	1.92c	46.97
30	1.99d	3.99c	6.79	5.02b	1.95d	49.99

หมายเหตุ : เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน

: ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$



รูปที่ 32 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนเตรทของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 4 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร แปรผันโซเดียมไนไตรท์ที่ 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิโมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน

2.4.2 **ผลความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการสร้างไนเตรทของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1**

เลี้ยงคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ที่เติมโซเดียมไนไตรท์ปริมาณ 20 มิลลิโมลาร์ แปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร 25 กรัมต่อลิตร และ ในสภาวะที่ไม่ได้เติมโซเดียมคลอไรด์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 7.0 เขย่าที่อัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไนตรทที่เกิดขึ้น พบว่าในสภาวะที่ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร N1 สามารถสร้างไนเตรทได้สูงที่สุด รองลงมาคือที่ 25 กรัมต่อลิตร และ ในภาวะที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ โดยวัดปริมาณไนเตรท สูงสุดได้ 7.82, 6.01 และ 0.23 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 24, 24 และ 30 ของการทดลอง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไนเตรทในแต่ละวัน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 10 และ 25 กรัมต่อลิตร จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร และ 25 กรัมต่อลิตร จะสร้างไนเตรทแตกต่างจากความเข้มข้นที่ 0 มิลลิกรัมต่อลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 15 และ รูปที่ 33

2.4.3 **ผลของความเป็นกรดด่างที่มีผลต่อการสร้างไนเตรทของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1**

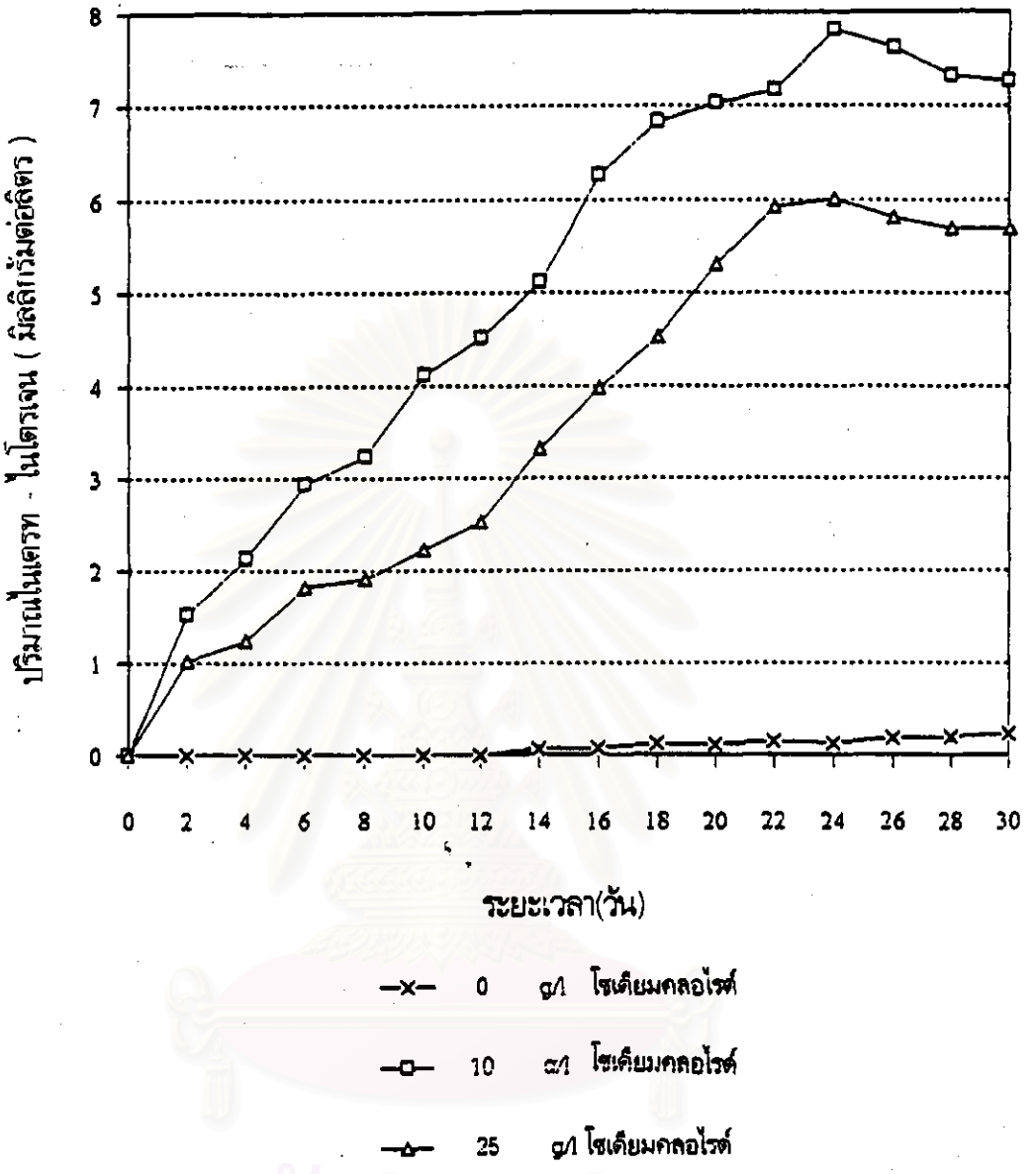
เลี้ยงคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ที่เติมโซเดียมไนไตรท์ปริมาณ 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างที่ 6, 7, 8 และ 9 เขย่าที่อัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไนเตรทที่เกิดขึ้น พบว่าในสภาวะที่ ค่าความเป็นกรดด่าง 7 คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 สามารถสร้างไนเตรทได้ดีที่สุด รองลงมาคือที่ค่าความเป็นกรดด่าง 8, 9, และ 6 โดยวัดปริมาณไนเตรทสูงสุดได้ 7.86, 7.22 2.22 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 24, 26, 30 และ 10 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการสร้างไนเตรทแต่ละวันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่าความเป็นกรดด่าง 7 และ 8 จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่จะแตกต่างกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6 และ 9 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 16 และ รูปที่ 34

ตารางที่ 15 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนเตรท - ไนโตรเจน ของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ที่มีโซเดียมไนไตรท์ 20 มิลลิโมลาร์ แปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ที่ 0 10 และ 25 กรัมต่อลิตร ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณไนเตรท- ไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่สร้างโดยคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในอาหารที่ผสมด้วยโซเดียมคลอไรด์			cv (%)
	0 g/l	**10 g/l**	**25 g/l**	
0	0.00a	0.00a	0.00a	-
2	0.00c	1.53a	1.02b	36.87
4	0.00c	2.13a	1.24b	13.62
6	0.00c	2.93a	1.82b	12.27
8	0.00c	3.23a	1.92b	15.12
10	0.00c	4.11a	2.22b	29.95
12	0.00c	4.51a	2.53b	36.97
14	0.07c	5.13a	3.32b	48.67
16	0.08c	6.27a	3.97b	41.12
18	0.12c	6.83a	4.53b	52.63
20	0.11c	7.03a	6.32a	49.22
22	0.16c	7.16a	6.92a	52.11
24	0.12c	**7.82a**	**7.01a**	45.03
26	0.19c	7.62a	6.81a	37.63
28	0.20c	7.32a	4.23b	46.97
30	**0.23c**	7.26a	4.23b	49.99

หมายเหตุ : เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน

: ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$



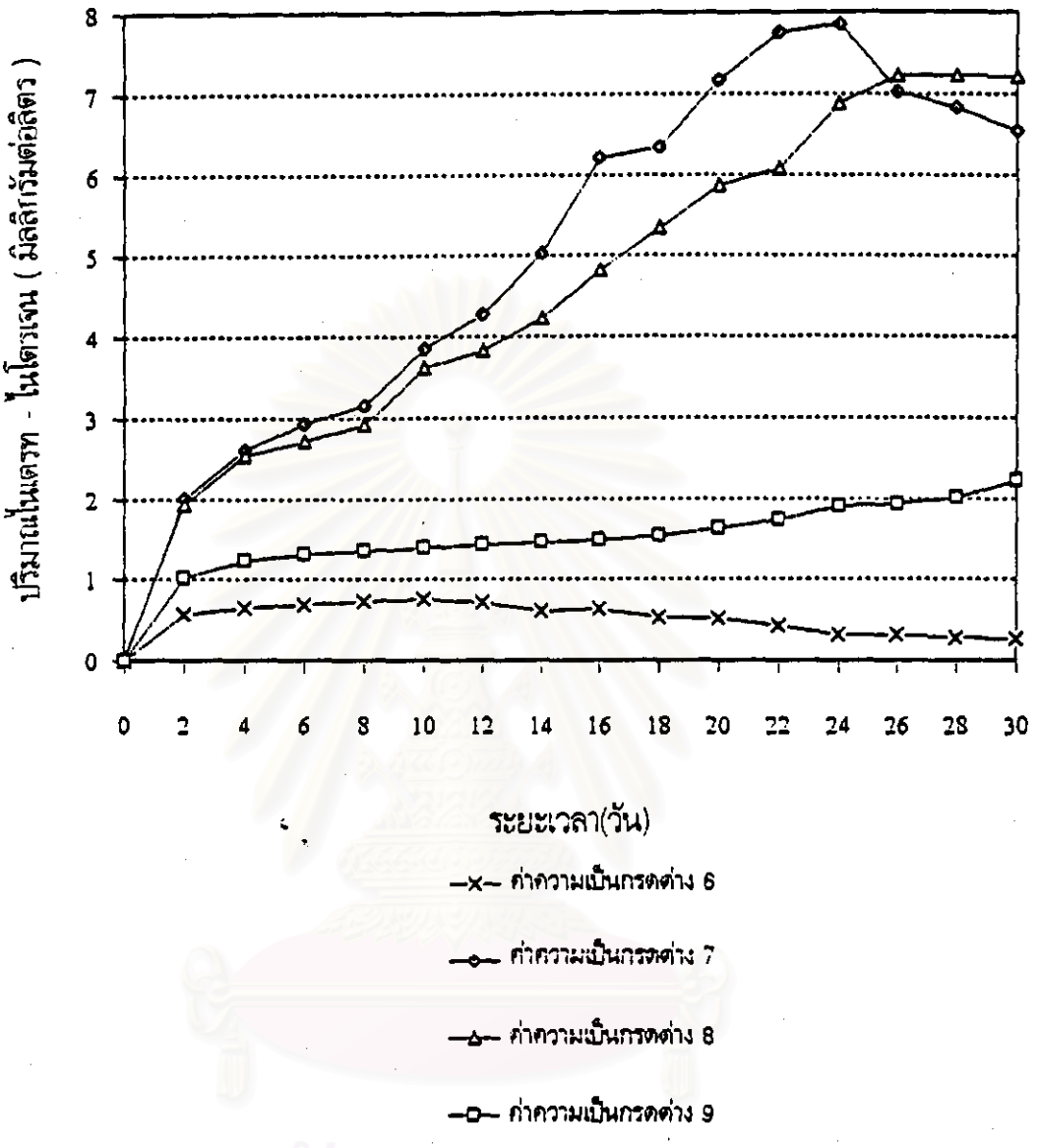
รูปที่ 33 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนเตรทของคิโมออโตโทรพิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 4 ที่มีโซเดียมไนไตรท์ 20 มิลลิโมลาร์ แปรผันโซเดียมคลอไรด์ที่ 0 , 10 และ 25 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน

ตารางที่ 16 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนเตรท - ไนโตรเจน ของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์แบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ที่มีโซเดียมไนไตรท์ 20 มิลลิโมลาร์ เติมโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร แปรผันค่าความเป็นกรดด่างที่ 6 7 8 และ 9 ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน

เวลา (วัน)	ปริมาณไนเตรท- ไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่สร้างโดยคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในสภาวะที่แปรผันความเป็นกรดด่าง				cv (%)
	pH 6	**pH 7**	**pH 8**	**pH 9**	
0	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	-
2	0.57c	2.01a	1.92a	1.01b	19.22
4	0.65c	2.62a	2.54a	1.22b	23.75
6	0.68c	2.93a	2.71a	1.31b	35.33
8	0.72c	3.15a	2.92a	1.35b	26.86
10	**0.75c**	3.86a	3.62a	1.38b	26.43
12	0.71c	4.28a	3.83a	1.42b	16.18
14	0.61c	5.03a	4.23a	1.45b	17.23
16	0.63d	6.02a	4.82b	1.48c	42.29
18	0.52d	6.34a	5.33b	1.53c	30.27
20	0.51d	7.12a	5.87b	1.62c	36.82
22	0.42c	**7.75a**	6.07a	1.73b	47.52
24	0.31c	7.86a	6.87a	1.89b	27.57
26	0.31c	7.02a	**7.22a**	1.93b	39.75
28	0.28c	6.82a	7.21a	2.01b	31.05
30	0.26c	6.53a	7.20a	**2.22b**	39.76

หมายเหตุ : เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน

: ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$



รูปที่ 34 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนเตรทของดีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 4 ที่มีโซเดียมไนไตรท์ 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร แปรผันค่าความเป็นกรดด่างที่ 6, 7, 8 และ 9 ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน

2.4.4 **ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการสร้างไนเตรทของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1**

เลี้ยงคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ที่เติมโซเดียมไนไตรท์ปริมาณ 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.0 เขย่าที่อัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มในตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิ 20, 30, 32 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไนเตรทที่เกิดขึ้น พบว่าที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส มีการสร้างไนเตรทได้สูงที่สุด รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 20 องศาเซลเซียส โดยวัดปริมาณไนเตรทสูงสุดได้ 7.81, 7.50, 3.80 และ 3.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 24 เปรียบเทียบปริมาณไนเตรทที่สร้างขึ้นในแต่ละวัน โดยคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 32 องศาเซลเซียส จะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 32 องศาเซลเซียส จะมีความแตกต่างกับการบ่มที่อุณหภูมิ 20 และ 40 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 17 และ รูปที่ 35

2.4.5 **ผลของอัตราการเขย่าที่มีต่อการสร้างไนเตรทของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1**

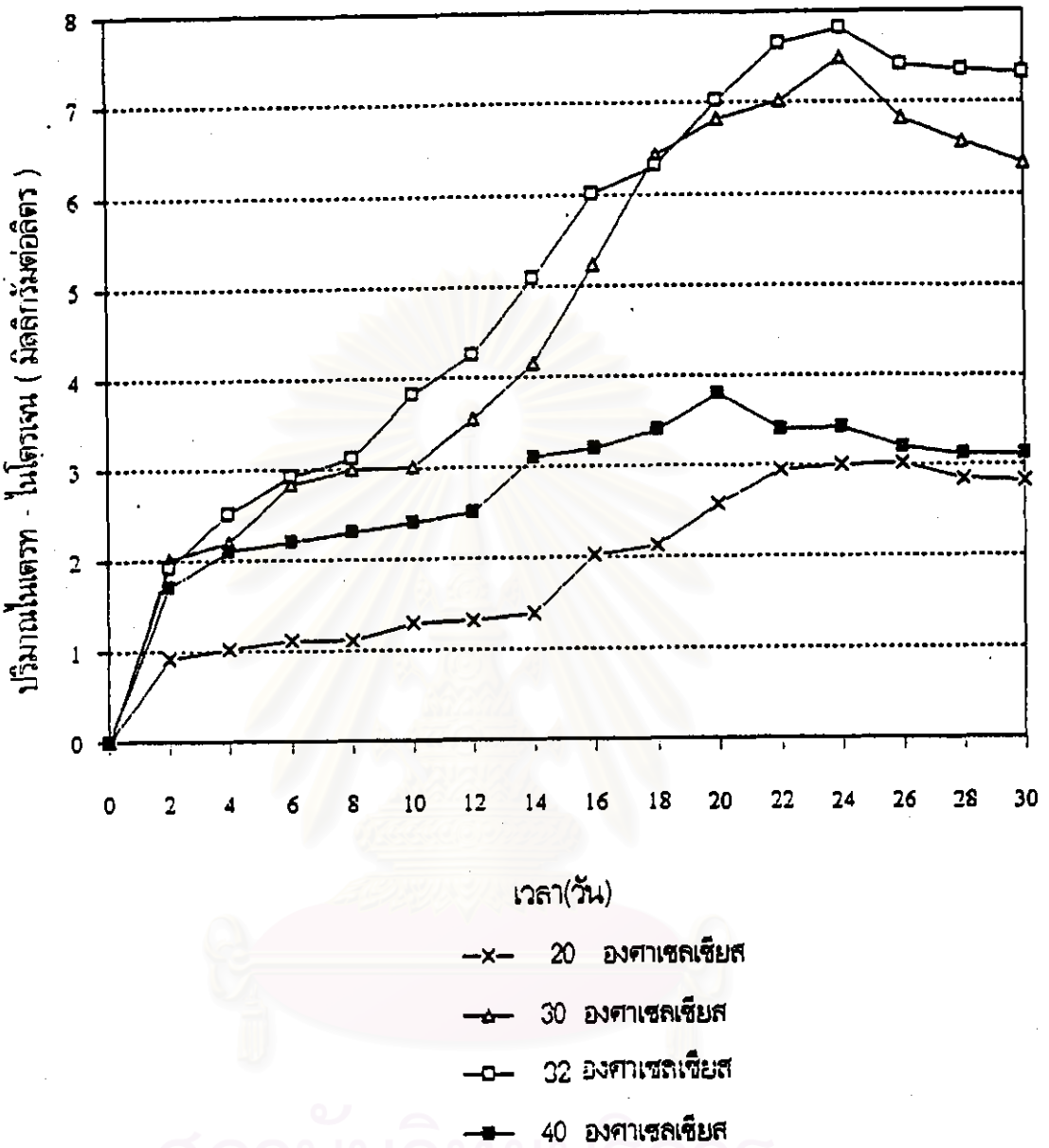
เลี้ยงคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในอาหารเลี้ยงสูตร 4 ที่เติมโซเดียมไนไตรท์ปริมาณ 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.0 ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ที่แปรผันอัตราการเขย่า ที่ 100 200 300 และในสภาวะที่ไม่ได้เขย่า เป็นเวลา 30 วัน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไนเตรทที่เกิดขึ้น พบว่าในสภาวะที่ อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที มีการสร้างไนเตรทได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ที่อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที และในภาวะที่ไม่ได้เขย่า วัดปริมาณไนเตรทสูงสุดได้ 7.84, 7.81, 5.81 และ 2.67 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 24 เปรียบเทียบปริมาณไนเตรทที่สร้างขึ้นในแต่ละวันโดยคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราความเร็วของการเขย่า 100 และ 200 รอบต่อนาที พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ที่อัตราการเขย่า 100 และ 200 รอบต่อนาที การสร้างไนไตรท์จะมีความแตกต่างกับ อัตราการเขย่าที่ 0 และ 300 รอบต่อนาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 18 และ รูปที่ 36

ตารางที่ 17 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนเตรท - ไนโตรเจน ของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ที่มีโซเดียมไนไตรท์ปริมาณ 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร แปรผันอุณหภูมิ ที่ 20 30 32 และ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ในระยะเวลา 30 วัน

เวลา (วัน)	ปริมาณไนเตรท- ไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร)ที่สร้างโดยคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในสภาวะที่มีการแปรผันอุณหภูมิ				cv (%)
	20 °ซ	**30 °ซ**	**32 °ซ**	**40 °ซ**	
0	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	-
2	0.92b	2.04a	1.92a	1.70a	23.30
4	1.02b	2.20a	2.51a	2.10a	19.27
6	1.11b	2.83a	2.93a	2.20a	23.47
8	1.12b	2.99a	3.12a	2.30a	17.20
10	1.29c	3.01a	3.82a	2.40b	28.96
12	1.32d	3.53b	4.24a	2.50c	41.15
14	1.38d	4.14b	5.09a	3.10c	45.30
16	2.02d	5.22b	6.01a	3.20c	33.02
18	2.12c	6.42a	6.31a	3.40b	42.65
20	2.57c	6.82a	7.02a	**3.80b**	51.14
22	2.95b	7.02a	7.65a	3.40b	14.28
24	2.99b	**7.50a**	**7.81a**	3.42b	11.29
26	**3.01b**	6.82a	7.41a	3.20b	26.57
28	2.84b	6.57a	7.36a	3.12b	27.15
30	2.82b	6.33a	7.32a	3.11b	37.97

หมายเหตุ : เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน

: ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$



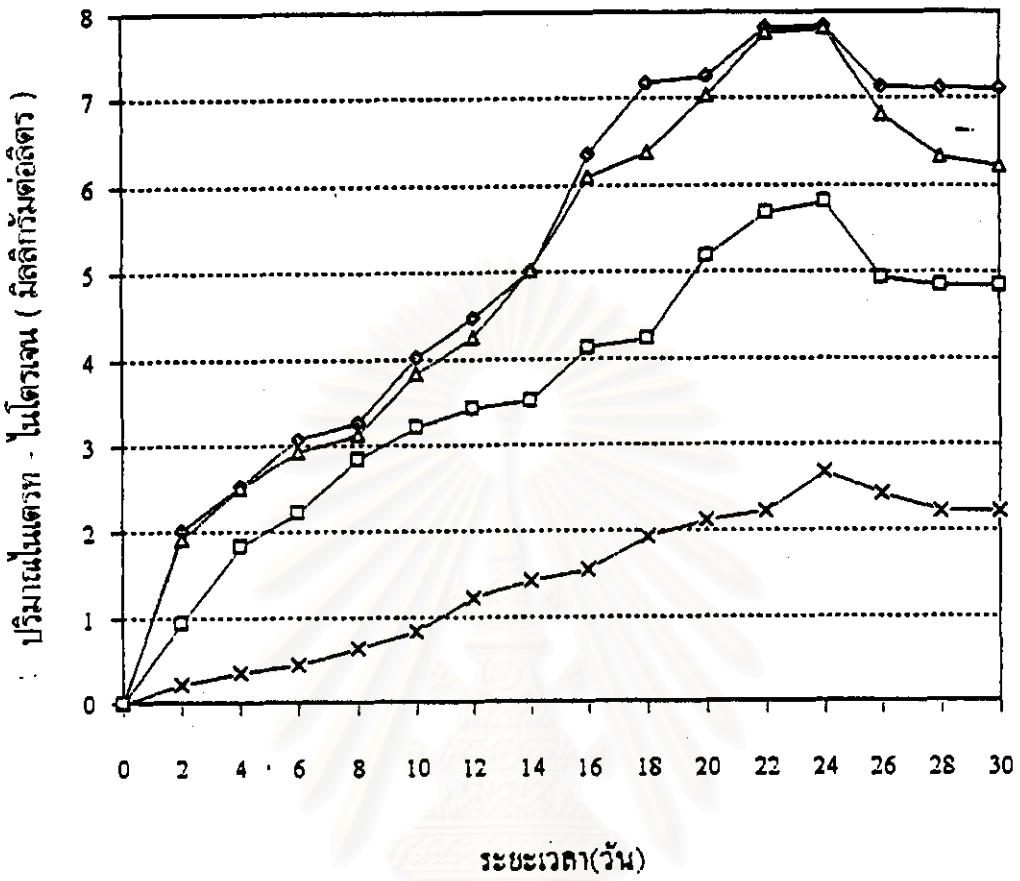
รูปที่ 35 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนเตรทของดีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 4 ที่มีโซเดียมไนไตรท์ 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร แปรผันอุณหภูมิที่ 20, 30, 32 และ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ในระยะเวลา 30 วัน

ตารางที่ 18 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนเตรท - ไนโตรเจน ของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์แบคทีเรียสายพันธุ์ N1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ที่โซเดียมไนไตรท์ 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร แปรผันอัตราการเขย่าที่ 0 100 200 และ 300 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน

เวลา (วัน)	ปริมาณไนเตรท- ไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่สร้างโดยคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 เมื่อแปรผันอัตราการเขย่า				cv (%)
	0 rpm	**100 rpm**	**200 rpm**	**300 rpm**	
0	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	-
2	0.21c	2.01a	1.92a	0.93b	42.11
4	0.36c	2.53a	2.51a	1.83b	38.18
6	0.44d	3.07a	2.93b	2.22c	38.49
8	0.63c	3.26a	3.12a	2.84b	26.13
10	0.83c	4.02a	3.83a	3.21b	37.14
12	1.22c	4.48a	4.24a	3.42b	45.61
14	1.42c	5.02a	5.02a	3.52b	27.17
16	1.55c	6.36a	6.10a	4.12b	31.98
18	1.93c	7.18a	6.37a	4.22b	22.30
20	2.11c	7.25a	7.03a	5.18b	27.20
22	2.22c	7.83a	7.76a	5.68b	35.83
24	**2.67c**	**7.84a**	**7.81a**	**5.81b**	36.68
26	2.42c	7.13a	6.82a	4.92b	34.22
28	2.22c	7.12a	6.33a	4.84b	35.84
30	2.21c	7.10a	6.23a	4.83b	29.32

หมายเหตุ : เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน

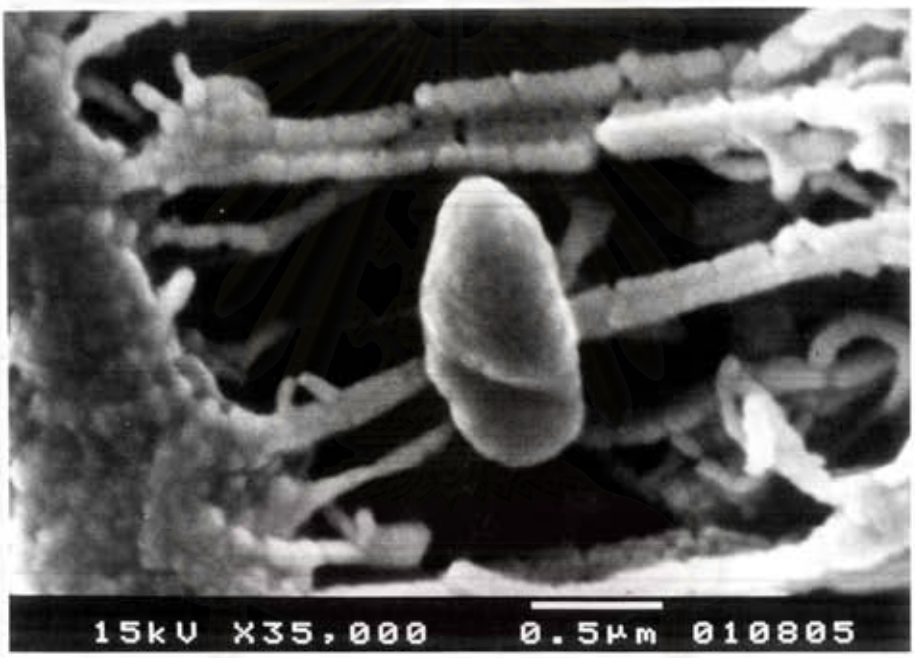
: ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$



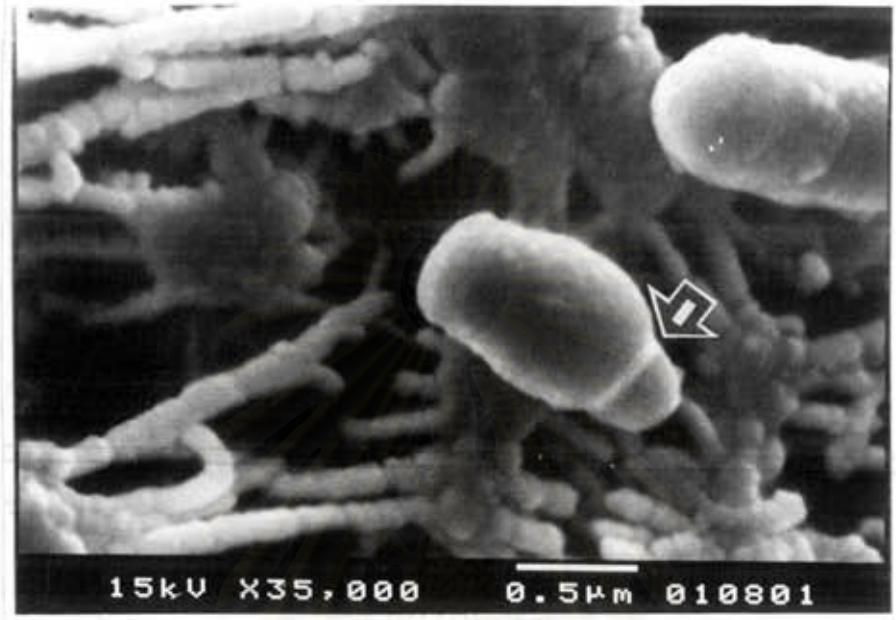
รูปที่ 36 การเปลี่ยนแปลงการสร้างไนเตรทของดีโมออโตโทรพิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 4 ที่มีโซเดียมไนไตรท์ 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร แปรผันอัตราการเขย่าที่ 0, 100, 200 และ 300 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 ในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน

2.5 **ศึกษาลักษณะเซลล์ของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 โดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด**

จากการศึกษาลักษณะรูปร่างของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนรุ่น JSM-T220A พบว่า มีรูปร่างเป็นรูปลูกแพร์ มีขนาดไม่แน่นอน ประมาณ 0.5 ถึง 0.8 x 0.2 ถึง 0.5 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 37 และมีลักษณะคล้ายการแตกหน่อของยีสต์ (budding) ดังรูปที่ 38



รูปที่ 37 ภาพถ่ายของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด แสดงโครงสร้างของเซลล์ (กำลังขยาย 57460 X)



รูปที่ 38 ภาพถ่ายของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะคล้ายการแตกหน่อของยีสต์ (กำลังขยาย 57460X)

3 การทดสอบประสิทธิภาพของคีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในระบบรีเซอคูเลชัน (re - circulation)

การนำคีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้และมีประสิทธิภาพสูง ได้แก่ คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 มาทดสอบในระบบรีเซอคูเลชัน ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้

3.1 **ทดสอบประสิทธิภาพของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ในระบบรีเซอคูเลชัน**

ผลของการศึกษาในเบื้องต้นพบว่าคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย สายพันธุ์ A7 เป็นสายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกว่ามีประสิทธิภาพดีที่สุด ในการเปลี่ยนแอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์ จึงนำมาทดลองในระบบรีเซอคูเลชัน โดยตรึงคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย สายพันธุ์ A7 ด้วยวัสดุตรึงซีโอไลท์ ทิ้งไว้ให้เชื้อเจริญเติบโตเป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้

แบคทีเรียยึดเกาะกับวัสดุตรึงซีโอไลท์ แล้วบรรจุลงในเครื่องกรองน้ำ EHIM รุ่น 2213 ซึ่งติดตั้งโดยการเชื่อมต่อกับถังพักน้ำทะเลที่มีอัตราส่วนของน้ำทะเลสังเคราะห์ต่อน้ำประปา 400 ต่อ 600 มิลลิลิตร ที่มีความเค็ม 10 กรัมต่อลิตร บรรจุน้ำที่เตรียมปริมาตร 40 ลิตร ลงในถังพักน้ำทะเลขนาดบรรจุ 52 ลิตร และ เติมแอมโมเนียซัลเฟต เข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 8.5 การไหลของน้ำในระบบจะไหลจากถังพักน้ำทะเลผ่านไปยังเครื่องกรองน้ำที่บรรจุวัสดุตรึงซีโอไลท์ที่ตรึงเชื้อคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และไหลกลับสู่ถังพักน้ำเป็นระบบหมุนเวียน ดังรูปที่ 14 น้ำที่ผ่านเครื่องกรองน้ำจะไหลสู่ถังพักน้ำทะเลโดยพ่นออกทางรูเล็กๆ บนท่อพลาสติกที่อยู่เหนือผิวน้ำ ทำให้น้ำในถังพักน้ำกร่อยได้สัมผัสอากาศ ซึ่งวัดการละลายของออกซิเจนเริ่มต้นการทดลอง ด้วย DO meter ได้ 7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง โดยอุณหภูมิอยู่ในช่วง 30 ถึง 32 องศาเซลเซียส ทดลองในระยะเวลา 30 วัน และติดตามความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์ โดยวัดปริมาณแอมโมเนียที่ลดลงโดยวิธี ฟีเนด วัดปริมาณไนไตรท์ที่เพิ่มขึ้นโดยวิธีไดอาโซไทเซชัน พร้อมกับเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ได้จัดระบบเหมือนกันเพียงแต่ไม่ได้ตรึงแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียกับวัสดุตรึงซีโอไลท์ในเครื่องกรองน้ำ EHIM รุ่น 2213 ทำการทดลองโดยเตรียมชุดทดลองและชุดควบคุม ในลักษณะเดียวกันชุดละ 2 ซ้ำ เป็นเวลา 30 วัน

จากการทดลอง เปรียบเทียบปริมาณแอมโมเนียระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลองในแต่ละวันตลอดระยะเวลา 30. วัน พบว่า วันที่มีปริมาณแอมโมเนียที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ ตั้งแต่วันที่ 6 ถึงวันที่ 30 โดยวันที่ 6 วัดปริมาณแอมโมเนียในชุดควบคุมได้ 31.40 มิลลิกรัมต่อลิตรในขณะที่วัดปริมาณแอมโมเนียในชุดทดลองได้ 24.85 มิลลิกรัมต่อลิตร และหลังจากนั้นปริมาณแอมโมเนียในชุดทดลองจะลดลงในปริมาณที่มีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจนถึงวันที่ 30 และเมื่อวัดปริมาณแอมโมเนียในวันที่ 30 ของการทดลอง พบว่ามีปริมาณแอมโมเนียในชุดทดลอง 7.69 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณแอมโมเนียในชุดควบคุม 15.90 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าแอมโมเนียในชุดทดลองมีปริมาณน้อยกว่าแอมโมเนียในชุดทดควบคุม 2 เท่า ดังตารางที่ 19 และรูปที่ 39

สำหรับการศึกษาดปรียบเทียบปริมาณไนไตรท์ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลองในแต่ละวัน ตลอดระยะเวลา 30 วัน พบว่าวันที่มีปริมาณไนไตรท์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ ตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 30 โดยวันที่ 2 วัดปริมาณไนไตรท์ในชุดทดลองได้ มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่วัดปริมาณไนไตรท์ในชุดควบคุมได้ 0.33 มิลลิกรัมต่อลิตร และหลังจากนั้นในชุด

ทดลองจะมีการสร้างไนไตรท์เพิ่มขึ้นในปริมาณที่มีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจนถึงวันที่ 30 และเมื่อวัดปริมาณไนไตรท์ในวันที่ 30 ของการทดลองพบว่ามีปริมาณไนไตรท์ในชุดทดลอง 11.15 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณไนไตรท์ในชุดควบคุม 3.17 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าไนไตรท์ในชุดทดลองมีปริมาณมากกว่าไนไตรท์ในชุดควบคุม 3.5 เท่า ดังตารางที่ 19 และรูปที่ 39

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอมโมเนียทั้งชุดทดลองและชุดควบคุมตลอดระยะเวลาทดลอง 30 วัน พบว่า ปริมาณแอมโมเนียในชุดทดลองจะลดลงโดยมีช่วงของความแตกต่าง แบ่งเป็น ช่วง 0 ถึง 10 วัน ปริมาณแอมโมเนียจะลดลงจาก 34.60 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 32.70 มิลลิกรัมต่อลิตร และในช่วง 12 ถึง 30 วัน ปริมาณแอมโมเนียลดลงจาก 14.85 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 7.69 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าแต่ละช่วงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 19 และรูปที่ 39 ส่วนการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนียในชุดควบคุม จะมีการลดลงเป็นช่วงของความแตกต่างเช่นเดียวกัน ซึ่งแบ่งเป็น ช่วง 0 ถึง 14 วัน ปริมาณแอมโมเนียลดลงจาก 34.60 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 32.70 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วง 16 ถึง 20 วัน ปริมาณแอมโมเนียลดลงจาก 25.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 22.62 มิลลิกรัมต่อลิตร และช่วง 22 ถึง 30 วัน ปริมาณแอมโมเนียลดลงจาก 19.10 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 15.90 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแต่ละช่วงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 19 และรูปที่ 39

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนไตรท์ทั้งชุดควบคุมและชุดทดลองตลอดระยะเวลา 30 วัน พบว่า ปริมาณไนไตรท์ในชุดทดลองจะเพิ่มขึ้นโดยมีช่วงของความแตกต่าง แบ่งเป็น ช่วง 0 ถึง 2 วัน จะมีการสร้างไนไตรท์จากปริมาณ 1.10 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 1.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วง 4 ถึง 12 วัน มีการสร้างไนไตรท์ปริมาณ 3.70 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 8.35 มิลลิกรัมต่อลิตร และช่วง 14 ถึง 30 วัน มีการสร้างไนไตรท์ปริมาณ 10.30 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 11.15 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าแต่ละช่วงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 19 และรูปที่ 39

ส่วนการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนไตรท์ในชุดควบคุม พบว่าการเพิ่มขึ้นในช่วงของความแตกต่างเช่นเดียวกับในชุดทดลอง โดยแบ่งเป็นช่วง 0 ถึง 14 วัน มีการสร้างไนไตรท์ปริมาณ 0.17 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 0.83 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วง 16 ถึง 20 วัน มีการสร้างไนไตรท์ปริมาณ 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 1.81 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วง 22 ถึง 26 วัน มีการสร้างไนไตรท์ปริมาณ 2.13 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 2.90 มิลลิกรัมต่อลิตร และช่วง 28 ถึง 30 วัน มีการสร้างไนไตรท์ปริมาณ 3.40 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 3.47 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแต่ละช่วงมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนไตรท์ ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 19 และรูปที่ 39

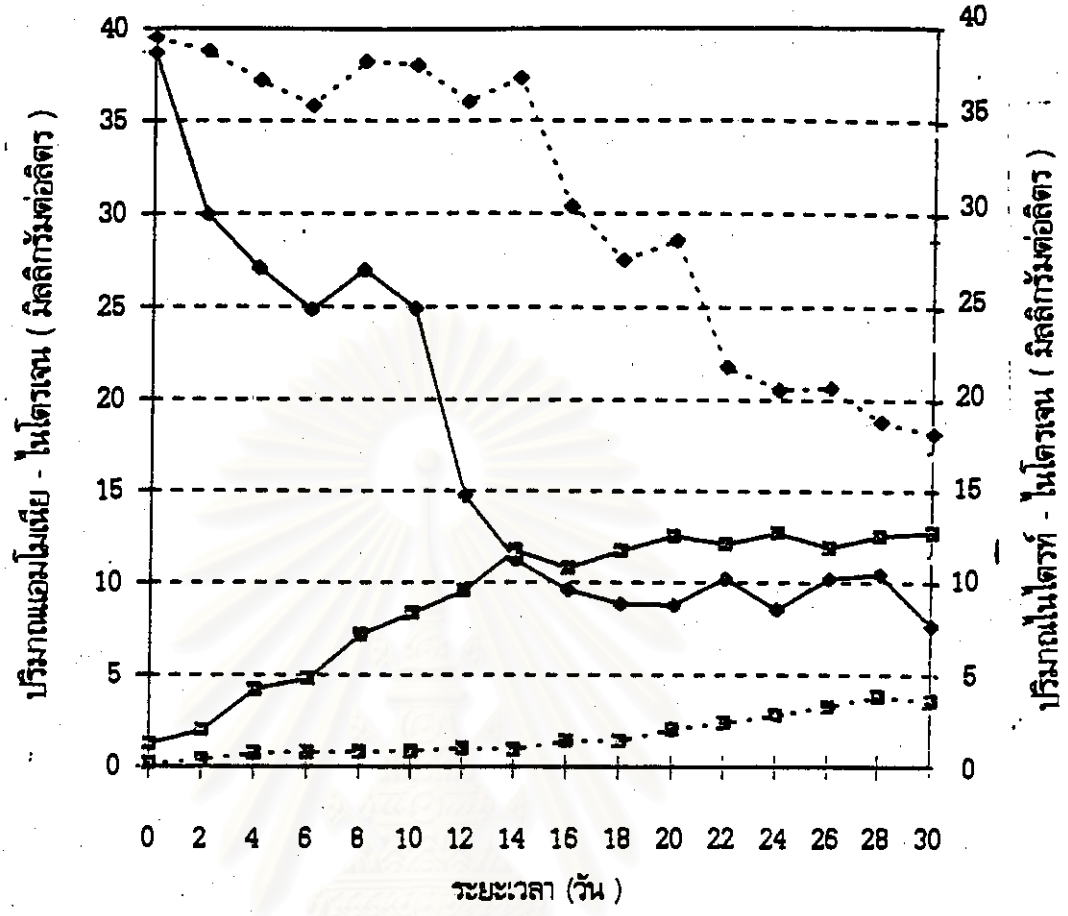
สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างในระบบบริเซอคูเลชัน ตลอดระยะเวลาทดลอง 30 วัน พบว่าทั้งในชุดทดลองและชุดควบคุม ค่าความเป็นกรดด่างลดลงอย่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในวันเริ่มต้นทดลองทั้งชุดทดลองและชุดควบคุม มีค่าความเป็นกรดด่าง 8.5 และในวันที่ 30 ของการทดลองจะมีค่าความเป็นกรดด่าง ของทั้งสองชุดจะลดลงเหลือ 7.3 ความแตกต่างของค่าความเป็นกรดด่างระหว่างชุดทดลองและชุดควบคุมในแต่ละวัน มีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับการละลายของออกซิเจนทั้งในชุดทดลองและชุดควบคุม ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอด 30 วัน โดยจะอยู่ในช่วง 7.4 ถึง 7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 20 และรูปที่ 40

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนีย - ไนโตรเจนและปริมาณไนไตรท์ - ไนโตรเจนในระบบบริเซอคูเลชัน ในชุดทดลองที่บรรจุด้วยวัสดุตรึงซีโอไลท์ที่ตรึงด้วยโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และชุดควบคุมที่ไม่ได้ตรึงด้วยโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 4 มิลลิโมลาร์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดด่าง 8.5 ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง (เฉลี่ย 32°ซ) ในระยะเวลา 30 วัน

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณแอมโมเนีย - ไนโตรเจน(mg/l) ในระบบบริเซอคูเลชัน		ปริมาณไนไตรท์ - ไนโตรเจน(mg/l) ในระบบบริเซอคูเลชัน	
	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
0	34.60a(a)	38.70a(a)	0.17d(a)	1.10c(a)
2	33.95a(a)	30.00a(a)	0.33d(b)	1.75c(a)
4	32.60a(a)	27.10a(a)	0.69d(b)	3.70b(a)
6	31.40a(a)	24.85a(b)	0.71d(b)	4.22b(a)
8	33.50a(a)	27.00a(b)	0.75d(b)	6.28b(a)
10	33.30a(a)	24.90a(b)	0.77d(b)	7.30b(a)
12	31.55a(a)	14.85b(b)	0.90d(b)	8.35b(a)
14	32.70a(a)	11.21b(b)	0.83d(b)	10.30a(a)
16	25.00b(a)	9.26b(b)	1.00c(b)	9.46b(a)
18	24.10b(a)	8.87b(b)	1.27c(b)	10.36a(a)
20	22.62b(a)	8.82b(b)	1.81c(b)	11.00a(a)
22	19.10c(a)	10.27b(b)	2.13b(b)	10.61a(a)
24	18.00c(a)	8.50b(b)	2.50b(b)	11.15a(a)
26	18.10c(a)	10.26b(b)	2.90b(b)	10.46a(a)
28	16.50c(a)	10.50b(b)	3.40a(b)	11.00a(a)
30	15.90c(a)	7.69b(b)	3.17a(b)	11.15a(a)
-	cv = 39.75%	cv = 28.82 %	cv = 45.92 %	cv = 31.15 %

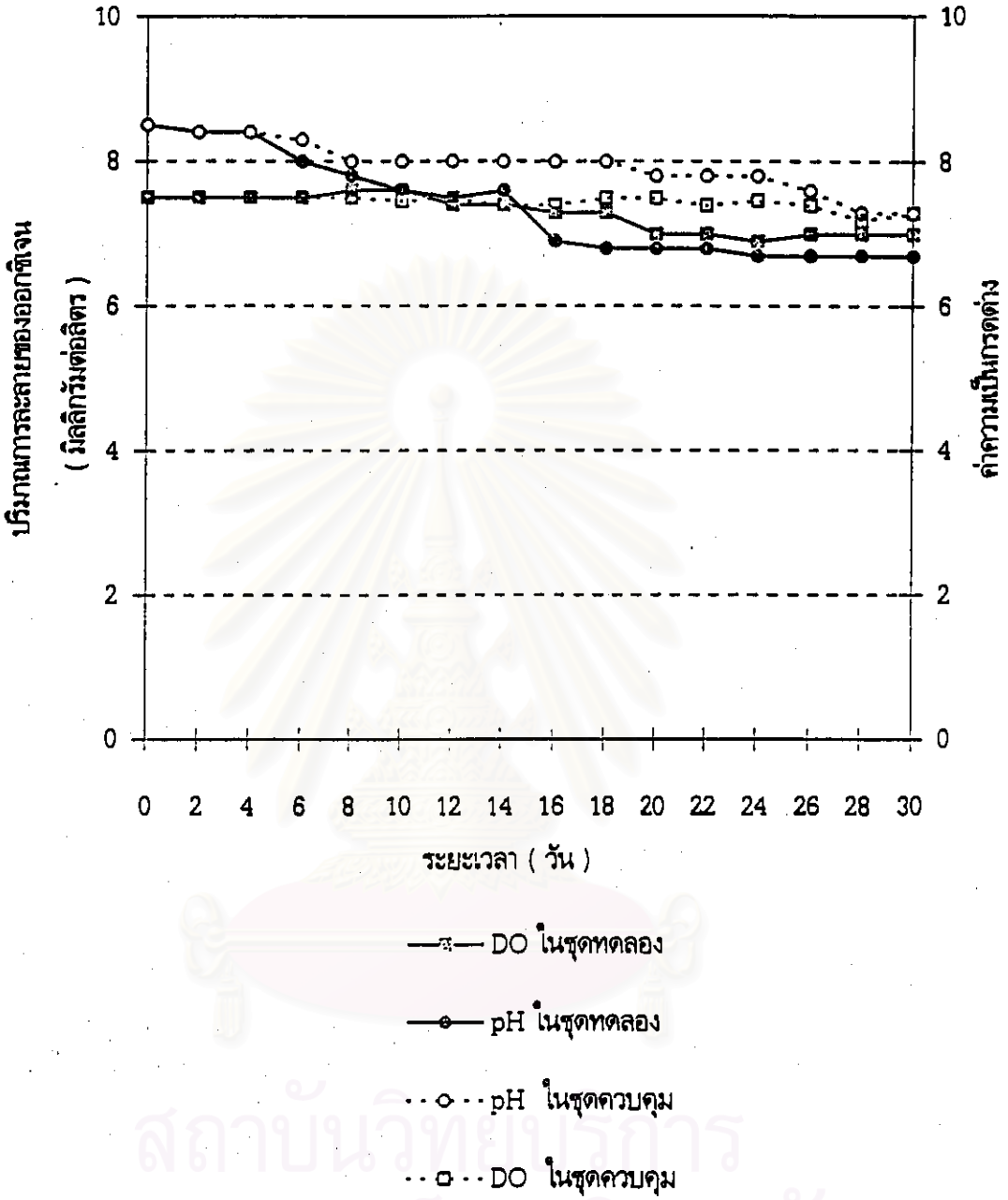
หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน (อักษรภาษาอังกฤษในวงเล็บ) วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยวิธี t - Test เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวตั้ง (อักษรภาษาอังกฤษนอกวงเล็บ) วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยวิธี CRD ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างชนิดต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$



รูปที่ 39 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนียและปริมาณไนไตรท์ในระบบรีเซอคูเลชัน ในชุดทดลองที่บรรจุด้วยวัสดุตรึงซีโอไลท์ที่ตรึงด้วยคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และ ชุดควบคุมที่ไม่ได้ตรึงด้วยคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 4 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 8.5 ในน้ำกร่อยที่ใช้ทมุนเวียน ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง ในระยะเวลา 30 วัน

ตารางที่ 20 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างและปริมาณออกซิเจนในระบบบริเซอคูเลชัน ในชุดทดลองที่บรรจุด้วยวัสดุตรึงซีโอไลท์ที่ตรึงคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และชุดควบคุมที่บรรจุซีโอไลท์ที่ไม่ได้ตรึง คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 4 มิลลิโมลาร์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดด่าง 8.5 ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง (เฉลี่ย 32° ซ)ในระยะเวลา 30 วัน

ระยะเวลา	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างในระบบบริเซอคูเลชัน		ปริมาณการละลายของออกซิเจนในระบบบริเซอคูเลชัน (mg/l)	
(วัน)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
0	8.5	8.5	7.5	7.5
2	8.4	8.4	7.5	7.5
4	8.4	8.4	7.5	7.5
6	8.0	8.0	7.5	7.5
8	7.8	7.8	7.5	7.4
10	7.6	7.6	7.5	7.4
12	7.5	7.5	7.5	7.4
14	7.5	7.5	7.5	7.4
16	7.5	7.5	7.4	7.4
18	7.4	7.4	7.4	7.4
20	7.5	7.3	7.4	7.4
22	7.5	7.3	7.5	7.4
24	7.5	7.3	7.5	7.4
26	7.5	7.2	7.5	7.4
28	7.5	7.3	7.5	7.5
30	7.3	7.3	7.5	7.5

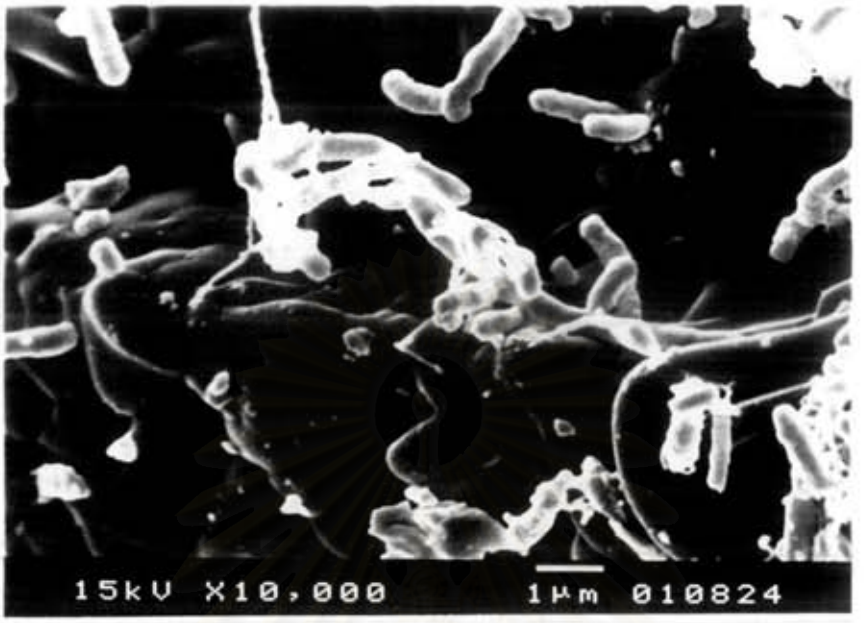


รูปที่ 40 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างและปริมาณการละลายของออกซิเจน ในระบบรีเซอคูเลชันในชุดทดลองที่บรรจุด้วยวัสดุตรึงซีโอไลท์ที่ตรึงคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และในชุดควบคุมที่ไม่ได้ตรึงคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 4 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 8.5 ในน้ำทะเลที่ใช้หมุนเวียน ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง ในระยะเวลา 30 วัน

ตรวจสอบลักษณะเซลล์แบคทีเรีย บนวัสดุตรึงซีโอไลท์ใน ระบบรีเซอคูเลชันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

ภายหลังจากสิ้นสุดการทดลอง นำวัสดุซีโอไลท์ทั้งในชุดควบคุมและชุดทดลองจากเครื่องกรองน้ำที่ผ่านกระบวนการทดลองในระบบรีเซอคูเลชัน เป็นเวลา 30 วัน มาตรวจสอบดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของเซลล์บนวัสดุตรึงซีโอไลท์ของชุดควบคุมและชุดทดลอง จะเห็นได้ว่า ส่วนในชุดควบคุมส่วนใหญ่จะพบเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นแท่งโค้งมีความยาวไม่แน่นอน ประมาณ 5 ถึง 10 ไมโครเมตร และพบ branching rod ในเซลล์ดังกล่าว ดังรูปที่ 41 ส่วนในชุดทดลองจะพบเซลล์ 2 แบบ คือ เซลล์ที่มีรูปร่างเป็นแท่งสั้นขนาด 1.0 ไมโครเมตร มีลักษณะคล้ายเซลล์บริสุทธิ์ของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย สายพันธุ์ A7 ในรูปที่ 26 นอกจากนี้ยังพบเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นแท่งโค้งมีขนาดไม่แน่นอน ประมาณ 5 ถึง 10 ไมโครเมตร ที่พบในลักษณะเดียวกับในชุดควบคุม ดังรูปที่ 42 นอกจากนี้ยังพบการกระจายของเซลล์แบคทีเรียในชุดควบคุมจะมีความหนาแน่นน้อยกว่าในชุดทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 41 ภาพถ่ายของเซลล์แบคทีเรียที่ยึดเกาะบนวัสดุตรึงซีโอไลท์ในชุดควบคุมในระบบริเซอคูเลชัน จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (กำลังขยาย 16420X)

รูปที่ 42 ภาพถ่ายของคิโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ที่ยึดเกาะบนวัสดุตรึงซีโอไลท์ในชุดทดลองในระบบริเซอคูเลชัน จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (กำลังขยาย16420X)

3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในระบบรีเซอคูเลชัน

ผลการศึกษาในเบื้องต้นพบว่าคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย สายพันธุ์ N1 ได้รับการคัดเลือกว่ามีประสิทธิภาพดีที่สุดในการเปลี่ยนไนไตรท์ให้เป็นไนเตรท จึงนำมาทดลองในระบบรีเซอคูเลชัน โดยตรึงคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย สายพันธุ์ N1 ด้วยวัสดุตรึงที่ปลอดเชื้อ เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้แบคทีเรียยึดเกาะกับวัสดุตรึงซีโอไลท์ แล้วบรรจุลงในถังกรองน้ำ EHIM รุ่น 2213 ซึ่งติดตั้งโดยการเชื่อมต่อกับถังพักน้ำกร่อยที่มีอัตราส่วนของน้ำทะเลสังเคราะห์ต่อน้ำประปา 400 ต่อ 600 มิลลิลิตร ทำให้มีความเค็มประมาณ 10 กรัมต่อลิตร บรรจุน้ำที่เตรียมปริมาตร 40 ลิตร ลงในถังพักน้ำขนาดบรรจุ 52 ลิตร และเติมโซเดียมไนไตรท์ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 7.0 การไหลของน้ำในระบบจะไหลจากถังพักน้ำกร่อยผ่านไปยังเครื่องกรองน้ำ ที่ตรึงคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียและไหลกลับสู่ถังพักน้ำเป็นระบบหมุนเวียน ดังรูปที่ 14 น้ำที่ผ่านเครื่องกรองน้ำจะไหลสู่ถังพักน้ำกร่อยโดยพ่นออกทางรูเล็กๆ บนท่อพลาสติกที่อยู่เหนือผิวน้ำ ทำให้น้ำในถังพักน้ำกร่อยได้สัมผัสอากาศ ซึ่งวัดการละลายของออกซิเจนเริ่มต้นด้วย DO meter ได้ 7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง โดยอุณหภูมิอยู่ในช่วง 30 ถึง 32 องศาเซลเซียส ทดลองเป็นเวลา 30 วัน และติดตามการออกซิไดซ์ไนไตรท์เป็นไนเตรทโดย วัดปริมาณไนไตรท์ด้วยวิธีไดอาโซไทเซชัน และวัดปริมาณไนเตรทด้วยวิธีบรูซิน พร้อมกับเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ได้จัดระบบเหมือนกันเพียงแต่ไม่ได้ตรึงคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียกับวัสดุตรึงซีโอไลท์ในเครื่องกรองน้ำ EHIM รุ่น 2213 ทำการทดลองโดยเตรียมชุดทดลองและชุดควบคุม ในลักษณะเดียวกันชุดละ 2 ซ้ำ เป็นเวลา 30 วัน

จากการทดลอง เปรียบเทียบปริมาณไนไตรท์ระหว่างชุดทดลองและชุดควบคุมในแต่ละวัน ตลอดระยะเวลา 30 วัน พบว่าวันที่มีปริมาณไนไตรท์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือตั้งแต่วันที่ 2 จนถึงวันที่ 30 ของการทดลอง โดยวัดปริมาณไนไตรท์ในชุดควบคุมได้ 107.40 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ วัดปริมาณไนไตรท์ในชุดทดลองได้ 90.32 มิลลิกรัมต่อลิตร และหลังจากนั้นปริมาณไนไตรท์ในชุดทดลอง จะลดลงในปริมาณที่มีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จนถึงวันที่ 30 ของการทดลอง เมื่อวัดปริมาณไนไตรท์ในวันที่ 30 ของการทดลอง พบว่าวัดปริมาณไนไตรท์ในชุดควบคุมที่ลดลงได้ 70.40 มิลลิกรัมต่อลิตร และ

วัดปริมาณไนไตรท์ในชุดทดลองได้ 29.95 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าไนไตรท์ที่พบในชุดทดลองมีปริมาณน้อยกว่าในชุดควบคุม 2 เท่า

จากการศึกษาปริมาณไนเตรทระหว่างชุดทดลองและชุดควบคุม ในแต่ละวันตลอดระยะเวลา 30 วัน พบว่าวันที่ปริมาณไนเตรทเริ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือตั้งแต่วันที่ 10 จนถึงวันที่ 30 ของการทดลองโดยวัดปริมาณไนเตรทในชุดทดลองได้ 2.44 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ในชุดควบคุมมีปริมาณไนเตรท 1.62 มิลลิกรัมต่อลิตร และหลังจากนั้นในชุดทดลองมีการสร้างไนเตรทเพิ่มขึ้นในปริมาณที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตลอดจนถึงวันที่ 30 ของการทดลอง และในชุดควบคุมไม่มีการสร้างไนเตรทเพิ่มขึ้น และเมื่อวัดปริมาณไนเตรทที่เกิดขึ้นในวันที่ 30 ของการทดลองพบว่าในชุดควบคุมมีการสร้างไนเตรทปริมาณ 1.67 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ในชุดทดลองมีไนเตรทเกิดขึ้นปริมาณ 13.30 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีไนเตรทเกิดขึ้นมากกว่าในชุดทดลอง 8 เท่า ดังตารางที่ 21 และรูปที่ 43

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนไตรท์ทั้งชุดทดลองและชุดควบคุมตลอดระยะเวลาทดลอง 30 วัน พบว่า ปริมาณไนไตรท์ในชุดทดลองจะลดลงจากโดยมีช่วงของความแตกต่าง แบ่งเป็น ช่วง 0 ถึง 2 วัน ปริมาณไนไตรท์จะลดลงจาก 105.15 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 90.32 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วง 2 ถึง 14 วัน ปริมาณไนไตรท์ลดลงจาก 90.32 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 59.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าแต่ละช่วงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนไตรท์ในชุดควบคุม จะมีการลดลงเป็นช่วงของความแตกต่างเช่นเดียวกัน ซึ่งแบ่งเป็น ช่วง 0 ถึง 4 วัน ปริมาณไนไตรท์ลดลงจาก 109.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 103.60 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วง 6 ถึง 14 วัน ปริมาณไนไตรท์ลดลงจาก 99.40 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 99.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และช่วง 16 ถึง 30 วัน ปริมาณไนไตรท์ลดลงจาก 91.20 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 70.40 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแต่ละช่วงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนเตรททั้งชุดทดลองและชุดควบคุมตลอดระยะเวลาทดลอง 30 วัน พบว่า ปริมาณไนเตรทในชุดทดลองจะเพิ่มขึ้นจากโดยมีช่วงของความแตกต่าง แบ่งเป็น ช่วง 0 ถึง 8 วัน ปริมาณไนเตรทจะเพิ่มขึ้นจาก 0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 1.73 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วง 10 ถึง 22 วัน ปริมาณไนเตรทเพิ่มขึ้นจาก 2.44 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 9.81 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ช่วง 24 ถึง 30 วัน ปริมาณไนเตรทลดลงจาก 17.10 มิลลิกรัม

ต่อลิตร ถึง 13.30 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าแต่ละช่วงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนเตรทในชุดควบคุม จะมีการเพิ่มขึ้นเป็นช่วงของความแตกต่างเช่นเดียวกัน ซึ่งแบ่งเป็น ช่วง 0 ถึง 4 วัน ปริมาณไนเตรทเพิ่มขึ้นจาก 0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 0.58 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วง 6 ถึง 30 วัน ปริมาณไนเตรทเพิ่มขึ้นจาก 1.20 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 1.67 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแต่ละช่วงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 21 และรูปที่ 43

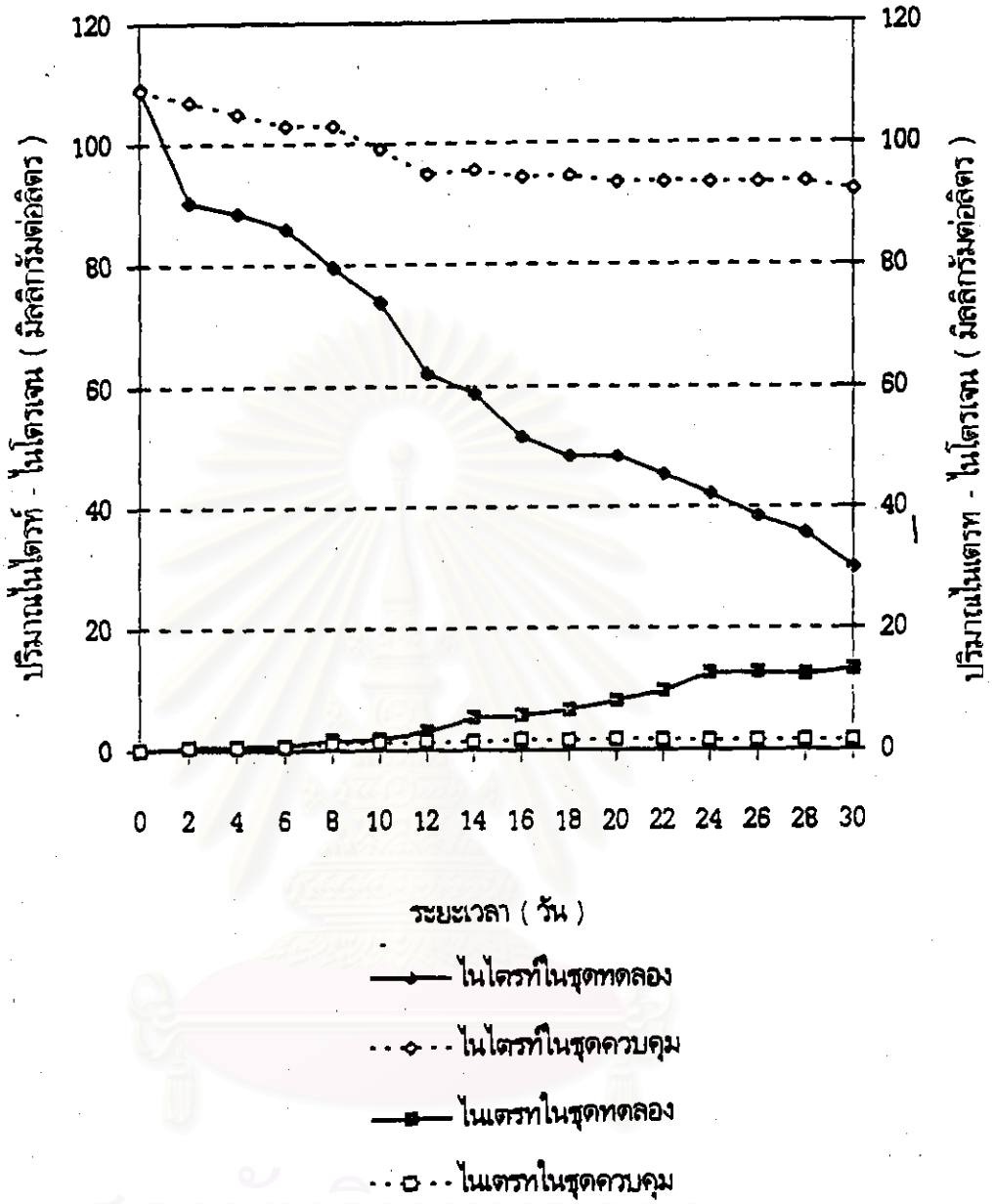
สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างในระบบบริเซอคูเลชัน ตลอดระยะเวลาทดลอง 30 วัน พบว่าทั้งในชุดทดลองและชุดควบคุม ค่าความเป็นกรดด่างลดลงอย่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในวันเริ่มต้นทดลองทั้งชุดทดลองและชุดควบคุม มีค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 และในวันที่ 30 ของการทดลองจะมีค่าความเป็นกรดด่าง ของทั้งสองชุดจะลดลงเหลือ 6.9 ความแตกต่างของค่าความเป็นกรดด่างระหว่างชุดทดลองและชุดควบคุมในแต่ละวัน มีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับการละลายของออกซิเจนทั้งในชุดทดลองและชุดควบคุม ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอด 30 วัน โดยจะอยู่ในช่วง 7.4 ถึง 7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 22 และรูปที่ 44

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 21 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไนไตรท์ - ไนโตรเจน และปริมาณไนเตรท - ไนโตรเจน ในระบบบริเซอคูเลชัน ในชุดทดลองที่บรรจุด้วยวัสดุตรึงซีโอไลท์ที่ตรึงคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 และชุดควบคุมที่ไม่ได้ตรึงคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย โดยเติมโซเดียมไนไตรท์ปริมาณ 4 มิลลิโมลาร์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดด่าง 7.0 ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง (32 °ซ) ในระยะเวลา 30 วัน

ระยะเวลา	ปริมาณไนไตรท์-ไนโตรเจน (mg/l) ในระบบบริเซอคูเลชัน		ปริมาณไนเตรท-ไนโตรเจน (mg/l) ในระบบบริเซอคูเลชัน	
(วัน)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
0	109.00a(a)	105.15a(a)	0.00b(a)	0.00c(a)
2	107.40a(a)	90.32b(b)	0.52b(a)	0.64c(a)
4	103.60a(a)	88.55b(b)	0.58b(a)	0.78c(a)
6	99.40b(a)	86.04b(b)	1.20a(a)	0.82c(a)
8	99.50b(a)	79.69b(b)	1.40a(a)	1.73c(a)
10	99.20b(a)	73.92b(b)	1.62a(b)	2.44b(a)
12	97.20b(a)	62.17b(b)	1.48a(b)	3.15b(a)
14	99.00b(a)	59.00b(b)	1.79a(b)	5.40b(a)
16	91.20c(a)	51.76c(b)	1.47a(b)	5.75b(a)
18	84.60c(a)	48.58c(b)	1.88a(b)	6.70b(a)
20	84.60c(a)	48.58c(b)	1.25a(b)	8.16b(a)
22	90.20c(a)	45.52c(b)	1.69a(b)	9.81b(a)
24	82.40c(a)	42.29c(b)	1.72a(b)	17.10a(a)
26	84.60c(a)	38.50c(b)	1.69a(b)	12.80a(a)
28	85.40c(a)	35.70c(b)	1.65a(b)	12.50a(a)
30	70.40c(a)	29.95c(b)	1.67a(b)	13.30a(a)
-	cv = 43.04 %	cv = 58.90 %	cv = 24.68 %	cv = 49.16 %

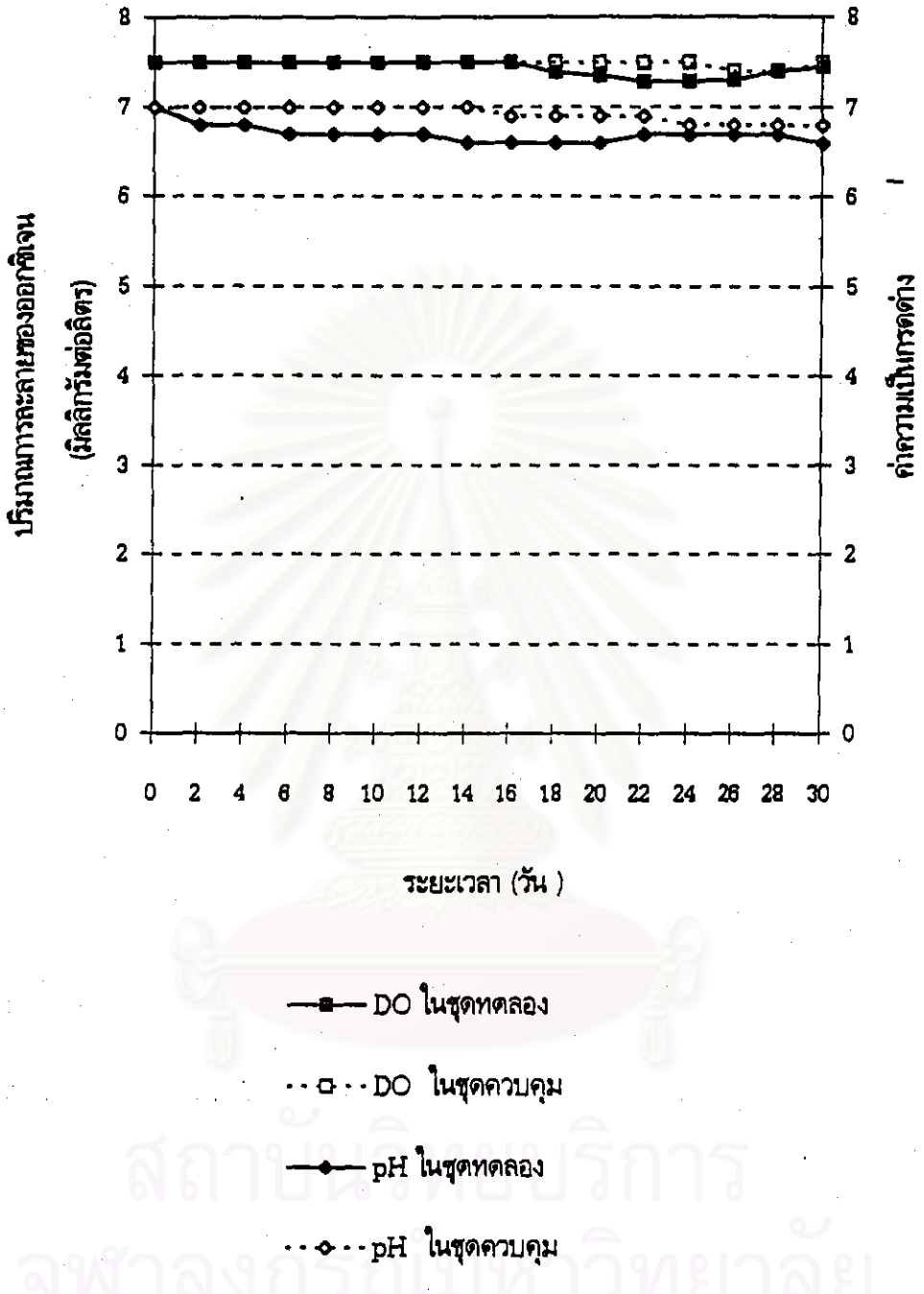
หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน (อักษรภาษาอังกฤษในวงเล็บ) วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยวิธี t - Test เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวตั้ง (อักษรภาษาอังกฤษนอกวงเล็บ) วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยวิธี CRD ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรด้านข้างต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$



รูปที่ 43 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไนไตรท์ และ ปริมาณไนเตรท ในระบบรีเซอคูเลชัน ในชุดทดลองที่บรรจุวัสดุตรึงซีโอไลท์ที่ตรึงด้วยคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 และชุดควบคุมที่ไม่ได้ตรึงด้วยคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย ที่มีโซเดียมไนไตรท์ปริมาณ 20 มิลลิโมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 ในน้ำกร่อยที่ใช้หมุนเวียน ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง ในระยะเวลา 30 วัน

ตารางที่ 22 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างและการละลายของออกซิเจนในระบบบริเซอคูเลชัน ในชุดทดลองที่บรรจุด้วยวัสดุตรึงซีโอไลท์ที่ตรึงคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 และชุดควบคุมที่บรรจุซีโอไลท์ที่ไม่ได้ตรึง คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย โดยเติมโซเดียมไนไตรท์ปริมาณ 4 มิลลิโมลาร์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดด่าง 7.0 ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง (เฉลี่ย 32 °ซ) ในระยะเวลา 30 วัน

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรดด่าง ในระบบบริเซอคูเลชัน		ปริมาณการละลายของออกซิเจน ในระบบบริเซอคูเลชัน (mg/l)	
	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
0	7.0	7.0	7.5	7.5
2	7.0	7.0	7.5	7.5
4	7.0	7.0	7.5	7.5
6	7.0	7.0	7.4	7.5
8	7.0	7.0	7.5	7.5
10	7.0	7.0	7.5	7.5
12	7.0	6.9	7.4	7.4
14	7.0	6.8	7.5	7.4
16	7.0	6.8	7.4	7.3
18	7.0	6.7	7.5	7.3
20	7.0	6.9	7.5	7.3
22	6.9	6.9	7.5	7.3
24	6.9	6.8	7.5	7.3
26	7.0	6.9	7.5	6.8
28	6.8	7.0	7.5	6.8
30	6.9	6.9	7.4	6.9

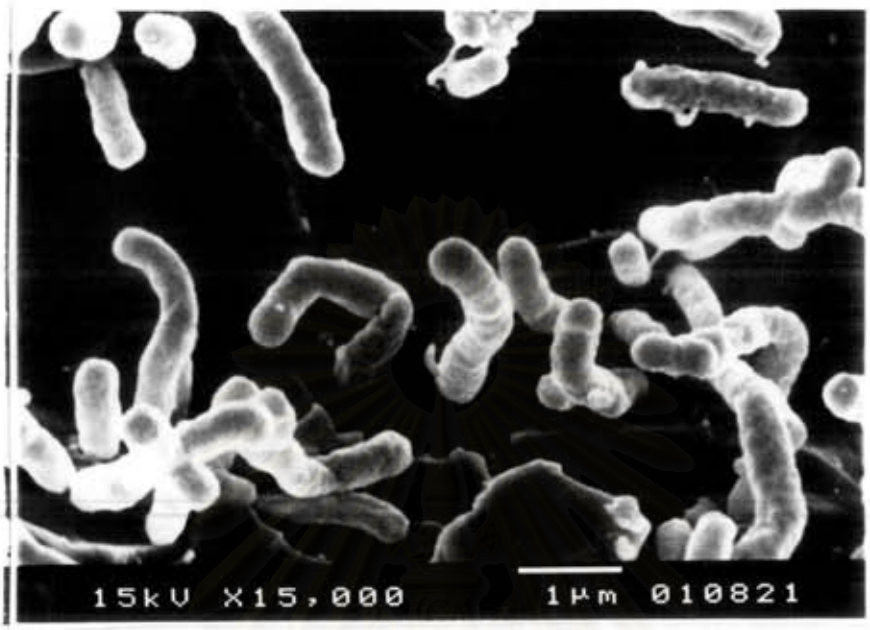


รูปที่ 44 การเปลี่ยนแปลงปริมาณการละลายของออกซิเจนและค่าความเป็นกรดด่างในระบบรีเซอคูเลชันในชุดทดลองที่บรรจุด้วยวัสดุตรึงชีโอไลท์ที่ตรึงด์โมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 และชุดควบคุมที่ไม่ได้ตรึงด้วยด์โมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย ที่มีโซเดียมไนไตรท์ 20 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 ในน้ำกร่อยที่ใช้หมุนเวียน ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง ในระยะเวลา 30 วัน

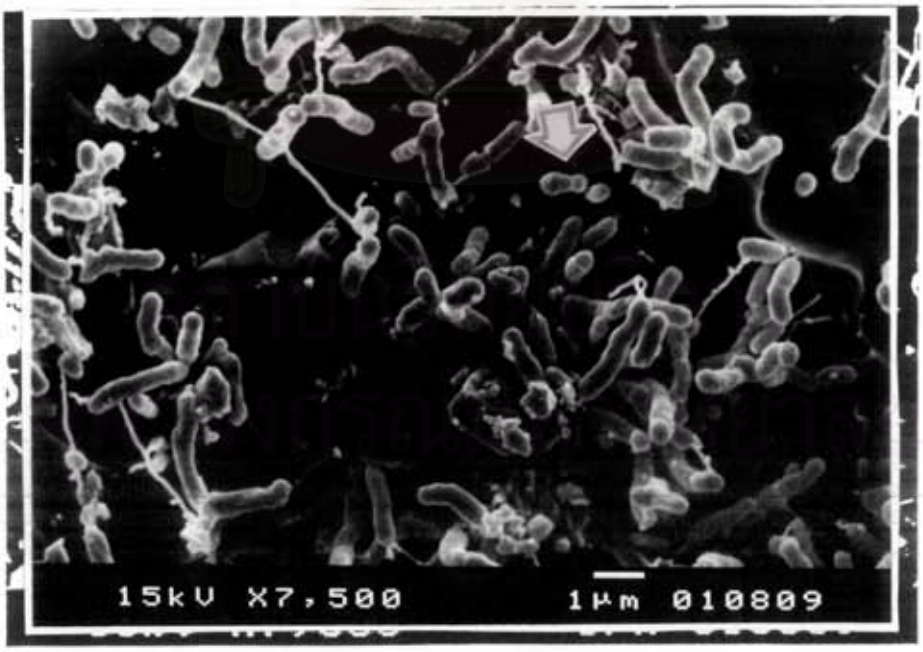
ตรวจสอบลักษณะของเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึงในระบบรีเซอคูเลชันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

ภายหลังจากสิ้นสุดการทดลอง นำวัสดุตรึงซีโอไลท์ที่ผ่านกระบวนการทดลองเป็นเวลา 30 วันในระบบรีเซอคูเลชันของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด โดยศึกษาทั้งวัสดุตรึงซีโอไลท์ทั้งในชุดทดลองและชุดควบคุม เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของเซลล์บนวัสดุตรึงซีโอไลท์ของชุดควบคุมและชุดทดลอง พบว่าในชุดควบคุมจะพบเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นแท่งโค้งมีขนาดไม่แน่นอน ประมาณ 5 ถึง 10 ไมโครเมตร และพบ branching rod เซลล์ดังกล่าว เป็นเซลล์ที่พบในลักษณะเดียวกับเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึงซีโอไลท์ในการทดลองของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย ดังรูปที่ 45 ส่วนในชุดทดลองพบเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นรูปลูกแพร์ที่มีลักษณะคล้ายการแตกหน่อของยีสต์ และเซลล์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน ซึ่งมีลักษณะคล้ายคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบริสุทธิ์ ในรูปที่ 37 และพบเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นแท่งโค้งมีขนาดไม่แน่นอน ประมาณ 5 ถึง 10 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 46 นอกจากนี้ยังพบการกระจายของเซลล์แบคทีเรียในชุดควบคุมจะมีความหนาแน่นน้อยกว่าในชุดทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 45 ภาพถ่ายของเซลล์แบคทีเรียที่ยึดเกาะบนวัสดุตรึงซีโอไลท์ในชุดควบคุมในระบบรีเซอคูเลชัน จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (กำลังขยาย 24626X)



รูปที่ 46 ภาพถ่ายของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ที่ยึดเกาะบนวัสดุตรึงซีโอไลท์ในชุดทดลองของระบบรีเซอคูเลชัน จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 12813X

3.3 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อผสมคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ที่คัดเลือกได้ ในระบบรีเซอคูเลชัน

ผลการศึกษาในเบื้องต้นพบว่าคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย สายพันธุ์ N1 ได้รับการคัดเลือกว่ามีประสิทธิภาพดีที่สุดในการเปลี่ยนไนไตรท์ให้เป็นไนเตรท จึงนำมาทดลองในระบบรีเซอคูเลชัน โดยตรึง ผลการศึกษาในเบื้องต้นพบว่าคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย สายพันธุ์ N1 ด้วยวัสดุตรึงซิโอไลท์ ที่ปลอดเชื้อ เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้แบคทีเรียยึดเกาะกับวัสดุตรึงซิโอไลท์ แล้วบรรจุลงในถังกรองน้ำ EHIM รุ่น 2213 ซึ่งติดตั้งโดยการเชื่อมต่อกับถังพักน้ำกร่อยที่มีอัตราส่วนของน้ำทะเลสังเคราะห์ต่อน้ำประปา 400 ต่อ 600 มิลลิลิตร ทำให้มีความเค็มประมาณ 10 กรัมต่อลิตร บรรจุน้ำที่เตรียมปริมาตร 40 ลิตร ลงในถังพักน้ำขนาดบรรจุ 52 ลิตร และเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 8.5 การไหลของน้ำในระบบจะไหลจากถังพักน้ำกร่อยผ่านไปยังเครื่องกรองน้ำที่ตรึงคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียและไหลกลับสู่ถังพักน้ำเป็นระบบหมุนเวียน ดังรูปที่ 14 น้ำที่ผ่านเครื่องกรองน้ำจะไหลสู่ถังพักน้ำกร่อยโดยพ่นออกทางรูเล็กๆ บนท่อพลาสติกที่อยู่เหนือผิวน้ำ ทำให้น้ำในถังพักน้ำกร่อยได้สัมผัสอากาศ ซึ่งวัดการละลายของออกซิเจนเริ่มต้นด้วย DO meter ได้ 7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง โดยอุณหภูมิอยู่ในช่วง 30 ถึง 32 องศาเซลเซียส ทดลองเป็นเวลา 60 วัน และติดตามการออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์ การออกซิไดซ์ไนไตรท์เป็นไนเตรท โดยวัดปริมาณแอมโมเนียด้วยวิธีฟีเนด วัดปริมาณไนไตรท์ด้วยวิธีไดอาโซไทเซชัน และวัดปริมาณไนเตรทด้วยวิธีบรูซิน พร้อมกับเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ได้จัดระบบเหมือนกัน เพียงแต่ไม่ได้ตรึงคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียกับวัสดุตรึงซิโอไลท์ในเครื่องกรองน้ำ EHIM รุ่น 2213 ทำการทดลองโดยเตรียมชุดทดลองและชุดควบคุม ในลักษณะเดียวกันชุดละ 2 ซ้ำ เป็นเวลา 60 วัน

จากการทดลอง เปรียบเทียบแอมโมเนียระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลองในแต่ละวันตลอดการทดลอง 60 วัน พบว่า วันที่มีปริมาณแอมโมเนียแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ ตั้งแต่วันที่ 14 ถึงวันที่ 60 โดยวันที่ 14 วัดปริมาณแอมโมเนียในชุดควบคุมได้ 39.60 มิลลิกรัมต่อลิตรในขณะที่วัดปริมาณแอมโมเนียในชุดทดลองได้ 26.80 มิลลิกรัมต่อลิตร

และหลังจากนั้นปริมาณแอมโมเนียในชุดทดลองจะลดลงในปริมาณที่มีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจนถึงวันที่ 60 และเมื่อวัดปริมาณแอมโมเนียในวันที่ 60 ของการทดลอง พบว่ามีปริมาณแอมโมเนียในชุดทดลอง 7.30 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณแอมโมเนียในชุดควบคุม 25.50 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าแอมโมเนียในชุดทดลองมีปริมาณน้อยกว่าแอมโมเนียในชุดควบคุม 3.5 เท่า ดังตารางที่ 23 และรูปที่ 47

สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณไนไตรท์ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลองในแต่ละวันตลอดการทดลอง 60 วัน พบว่า มีปริมาณไนไตรท์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าปริมาณไนไตรท์ในชุดทดลองและชุดควบคุม ในวันที่ 0 คือ 0.51 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.52 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนในวันที่ 60 คือ 0.76 มิลลกรัมต่อลิตร และ 0.68 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 23 และรูปที่ 47

สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนเตรทในชุดควบคุมและชุดทดลองในแต่ละวันตลอดการทดลอง 60 วัน พบว่ามีปริมาณไนเตรทที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่วันที่ 8 ถึงวันที่ 60 โดยวันที่ 8 วัดปริมาณไนเตรทในชุดทดลองได้ 1.69 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่วัดปริมาณไนเตรทในชุดควบคุมได้ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร และหลังจากนั้นในชุดทดลองจะมีการสร้างไนเตรทเพิ่มขึ้นในปริมาณที่มีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจนถึงวันที่ 60 และเมื่อวัดปริมาณไนเตรทในวันที่ 60 ของการทดลอง พบว่ามีปริมาณไนเตรทในชุดทดลอง 10.78 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณไนเตรทในชุดควบคุม 0.47 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าไนเตรทในชุดทดลองมีปริมาณมากกว่าไนเตรทในชุดควบคุม 23 เท่า ดังตารางที่ 23 และรูปที่ 47

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอมโมเนียทั้งชุดทดลองและชุดควบคุมตลอดระยะเวลาทดลอง 60 วัน พบว่า ปริมาณแอมโมเนียในชุดทดลองจะลดลง โดยมีช่วงของความแตกต่าง แบ่งเป็น ช่วง 0 ถึง 14 วัน ปริมาณแอมโมเนียจะลดลงจาก 39.30 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 26.80 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วง 16 ถึง 42 วัน ปริมาณแอมโมเนียลดลงจาก 17.10 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 11.40 มิลลิกรัมต่อลิตร และช่วง 44 ถึง 60 วัน ปริมาณแอมโมเนียลดลงจาก 8.40 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 7.30 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าแต่ละช่วงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 23 และรูปที่ 47 ส่วนการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอมโมเนียในชุดควบคุมตลอดระยะเวลาทดลอง 60 วัน พบว่า ปริมาณแอมโมเนียจะลด

ลงโดยมีช่วงของความแตกต่าง แบ่งเป็น ช่วง 0 ถึง 36 วัน ปริมาณแอมโมเนียจะลดลงจาก 39.35 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 26.70 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วง 38 ถึง 60 วัน ปริมาณแอมโมเนียลดลงจาก 26.70 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 25.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าแต่ละช่วงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 23 และรูปที่ 47

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนไตรท์ทั้งชุดทดลองและชุดควบคุมตลอดระยะเวลาทดลอง 60 วัน พบว่า ปริมาณไนไตรท์ในชุดทดลองจะเพิ่มขึ้น โดยมีช่วงของความแตกต่าง แบ่งเป็น ช่วง 0 ถึง 8 วัน ปริมาณไนไตรท์จะเพิ่มขึ้นจาก 0.51 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 0.99 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วง 10 ถึง 40 วัน ปริมาณไนไตรท์เพิ่มขึ้นจาก 1.18 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 1.04 มิลลิกรัมต่อลิตร และช่วง 42 ถึง 60 วัน ปริมาณไนไตรท์จะลดลงจาก 0.94 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 0.76 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าแต่ละช่วงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 23 และรูปที่ 47 ส่วนการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนไตรท์ในชุดควบคุมตลอดระยะเวลาทดลอง 60 วัน พบว่า ปริมาณไนไตรท์จะเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยมีช่วงของความแตกต่าง แบ่งเป็น ช่วง 0 ถึง 2 วัน ปริมาณไนไตรท์จะเพิ่มขึ้นจาก 0.52 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 0.69 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วง 4 ถึง 8 วัน ปริมาณไนไตรท์เพิ่มขึ้นจาก 0.95 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 0.98 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วง 10 ถึง 38 วัน ปริมาณไนไตรท์จะเพิ่มขึ้นจาก 1.09 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 1.03 มิลลิกรัมต่อลิตร และช่วง 40 ถึง 60 วัน ปริมาณไนไตรท์จะลดลงจาก 0.96 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็น 0.68 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าแต่ละช่วงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 23 และรูปที่ 47

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนเตรททั้งชุดทดลองและชุดควบคุมตลอดระยะเวลาทดลอง 60 วัน พบว่าปริมาณไนเตรทในชุดทดลองจะเพิ่มขึ้นโดยมีช่วงของความแตกต่างแบ่งเป็น ช่วง 0 ถึง 6 วัน ปริมาณไนเตรทจะเพิ่มขึ้นจาก 0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 0.17 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วง 8 ถึง 26 วัน ปริมาณไนเตรทเพิ่มขึ้นจาก 1.69 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 4.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วง 28 ถึง 30 วัน ปริมาณไนเตรทเพิ่มขึ้นจาก 7.21 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 8.55 มิลลิกรัมต่อลิตร และช่วง 30 ถึง 60 วันปริมาณไนเตรทจะเพิ่มขึ้นโดยมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 48 วัดปริมาณไนเตรทได้ 19.49 มิลลิกรัมต่อลิตร และหลังจากนั้นปริมาณไนเตรทจะลดลงในปริมาณที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จนถึงวันที่ 60 วัดปริมาณไนเตรทได้ 10.78 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าแต่ละช่วงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 23 และรูปที่ 47 ส่วนการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนเตรทในชุดควบคุม ปริมาณ

ไนเตรทจะเพิ่มขึ้นเช่นกันโดยมีช่วงของความแตกต่าง แบ่งเป็นช่วง 0 ถึง 12 วัน ปริมาณไนเตรทจะเพิ่มขึ้นจาก 0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วง 14 ถึง 22 วัน ปริมาณไนเตรทเพิ่มขึ้นจาก 0.11 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วง 24 ถึง 36 วัน ปริมาณไนเตรทเพิ่มขึ้นจาก 0.52 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 0.55 มิลลิกรัมต่อลิตร และช่วง 38 ถึง 60 วันปริมาณไนเตรทจะเพิ่มขึ้นจาก 0..80 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 0.47 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าแต่ละช่วงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 23 และรูปที่ 47

สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างในระบบบริเซอคูเลชัน ตลอดระยะเวลาทดลอง 60 วัน พบว่าทั้งในชุดทดลองและชุดควบคุม ค่าความเป็นกรดด่างลดลงอย่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในวันเริ่มต้นทดลองทั้งชุดทดลองและชุดควบคุม มีค่าความเป็นกรดด่าง 8.5 สำหรับในวันที่ 60 ของการทดลองในชุดทดลองจะมีค่าความเป็นกรดด่างลดลงเหลือ 6.8 ในขณะที่ในชุดควบคุมจะมีค่าความเป็นกรดด่างลดลงเหลือ 7.0 ความแตกต่างของค่าความเป็นกรดด่างระหว่างชุดทดลองและชุดควบคุมในแต่ละวัน มีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับการละลายของออกซิเจนทั้งในชุดทดลองและชุดควบคุม ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอด 60 วัน โดยจะอยู่ในช่วง 7.4 ถึง 7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 24 และรูปที่ 48

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 23 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนีย - ไนโตรเจน ปริมาณไนไตรท์ - ไนโตรเจน และปริมาณไนเตรท - ไนโตรเจน ในชุดทดลองที่บรรจุด้วยวัสดุตรึงซีโอไลท์ที่ตรึงเชื้อผสมของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 และชุดควบคุมที่บรรจุวัสดุตรึงที่ไม่ได้ตรึงคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียและคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 4 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 8.5 ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง (เฉลี่ย 32° ซ) ในระยะเวลา 60 วัน

ระยะเวลา	ปริมาณแอมโมเนีย - ไนโตรเจน (mg/l)ในระบบบริเซอคูเลชัน		ปริมาณไนไตรท์ - ไนโตรเจน (mg/l) ในระบบบริเซอคูเลชัน		ปริมาณไนเตรท - ไนโตรเจน (mg/l)ในระบบบริเซอคูเลชัน	
(วัน)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
0	39.35a(a)	39.30a(a)	0.52c(a)	0.51b(a)	0.00d(a)	0.00d(a)
2	39.35a(a)	38.20a(a)	0.69c(a)	0.69b(a)	0.00d(a)	0.12d(a)
4	36.70a(a)	36.40a(a)	0.95b(a)	0.94b(a)	0.00d(a)	0.15d(a)
6	38.45a(a)	32.50a(a)	0.99b(a)	0.98b(a)	0.04d(a)	0.17d(a)
8	38.70a(a)	35.50a(a)	0.98b(a)	0.99b(a)	0.08d(a)	1.69c(b)
10	39.80a(a)	34.60a(a)	1.09a(a)	1.18a(a)	0.09d(a)	1.82c(b)
12	39.50a(a)	37.60a(a)	1.21a(a)	1.27a(a)	0.08d(a)	2.45c(b)
14	39.60a(a)	26.80a(b)	1.04a(a)	1.04a(a)	0.11c(a)	2.44c(b)
16	37.10a(a)	17.10b(b)	1.02a(a)	1.32a(a)	0.13c(a)	4.35c(b)
18	34.70a(a)	18.90b(b)	1.10a(a)	1.18a(a)	0.13c(a)	2.72c(b)
20	39.85a(a)	19.10b(b)	1.15a(a)	1.18a(a)	0.17c(a)	4.44c(b)
22	34.50a(a)	15.40b(b)	1.21a(a)	1.24a(a)	0.25c(a)	3.26c(b)
24	33.60a(a)	14.80b(b)	1.21a(a)	1.20a(a)	0.52b(a)	3.34c(b)
26	35.40a(a)	14.40b(b)	1.18a(a)	1.19a(a)	0.55b(a)	4.75c(b)
28	34.00a(a)	12.00b(b)	1.12a(a)	1.12a(a)	0.61b(a)	7.21b(b)
30	31.20a(a)	14.80b(b)	1.18a(a)	1.18a(a)	0.44b(a)	8.55b(b)
32	30.10a(a)	15.00b(b)	1.11a(a)	1.11a(a)	0.50b(a)	10.56a(b)
34	30.60a(a)	11.10b(b)	1.03a(a)	1.13a(a)	0.44b(a)	11.02a(b)
36	29.60a(a)	11.00b(b)	1.05a(a)	1.25a(a)	0.56b(a)	12.05a(b)
38	26.70b(a)	11.70b(b)	1.03a(a)	1.13a(a)	0.80a(a)	8.74a(b)
40	26.90b(a)	12.80b(b)	0.96b(a)	1.04a(a)	0.49b(a)	13.03a(b)
42	26.20b(a)	11.40b(b)	0.79b(a)	0.94b(a)	0.46b(a)	14.65a(b)
44	26.30b(a)	8.40c(b)	0.79b(a)	0.79b(a)	0.56b(a)	16.76a(b)
46	22.50b(a)	8.42c(b)	0.75b(a)	0.75b(a)	0.95b(a)	18.62a(b)
48	24.70b(a)	7.51c(b)	0.79b(a)	0.79b(a)	0.57b(a)	19.49a(b)
50	26.70b(a)	8.55c(b)	0.76b(a)	0.76b(a)	0.65b(a)	16.31a(b)
52	24.70b(a)	10.83b(b)	0.75b(a)	0.75b(a)	0.59b(a)	11.16a(b)
54	24.70b(a)	10.26b(b)	0.74b(a)	0.74b(a)	0.56b(a)	12.59a(b)
56	25.20b(a)	8.75c(b)	0.66b(a)	0.74b(a)	0.47b(a)	11.95a(b)
58	24.80b(a)	7.34c(b)	0.67b(a)	0.76b(a)	0.56b(a)	13.81a(b)
60	25.00b(a)	7.30c(b)	0.68b(a)	0.76b(a)	0.47b(a)	10.78a(b)
cv	27.92 %	36.69 %	35.67 %	27.75 %	42.72 %	19.58 %

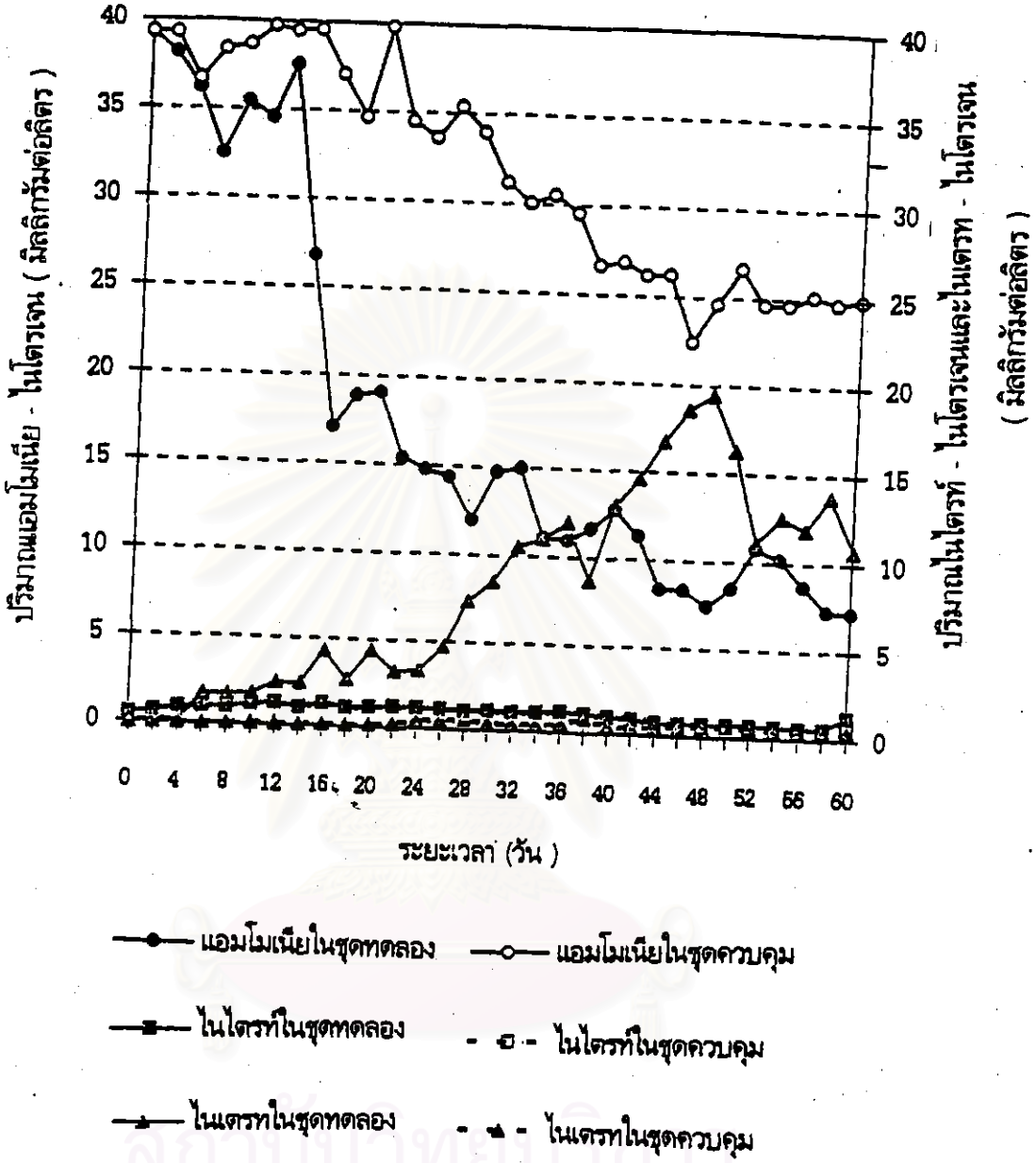
หมายเหตุ

อักษรนอกวงเล็บ คือ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามแนวตั้ง วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยวิธี CRD (ภาคผนวก ค)

อักษรในวงเล็บ คือ การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามแนวนอนวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยวิธี t - Test (ภาคผนวก ค)

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$

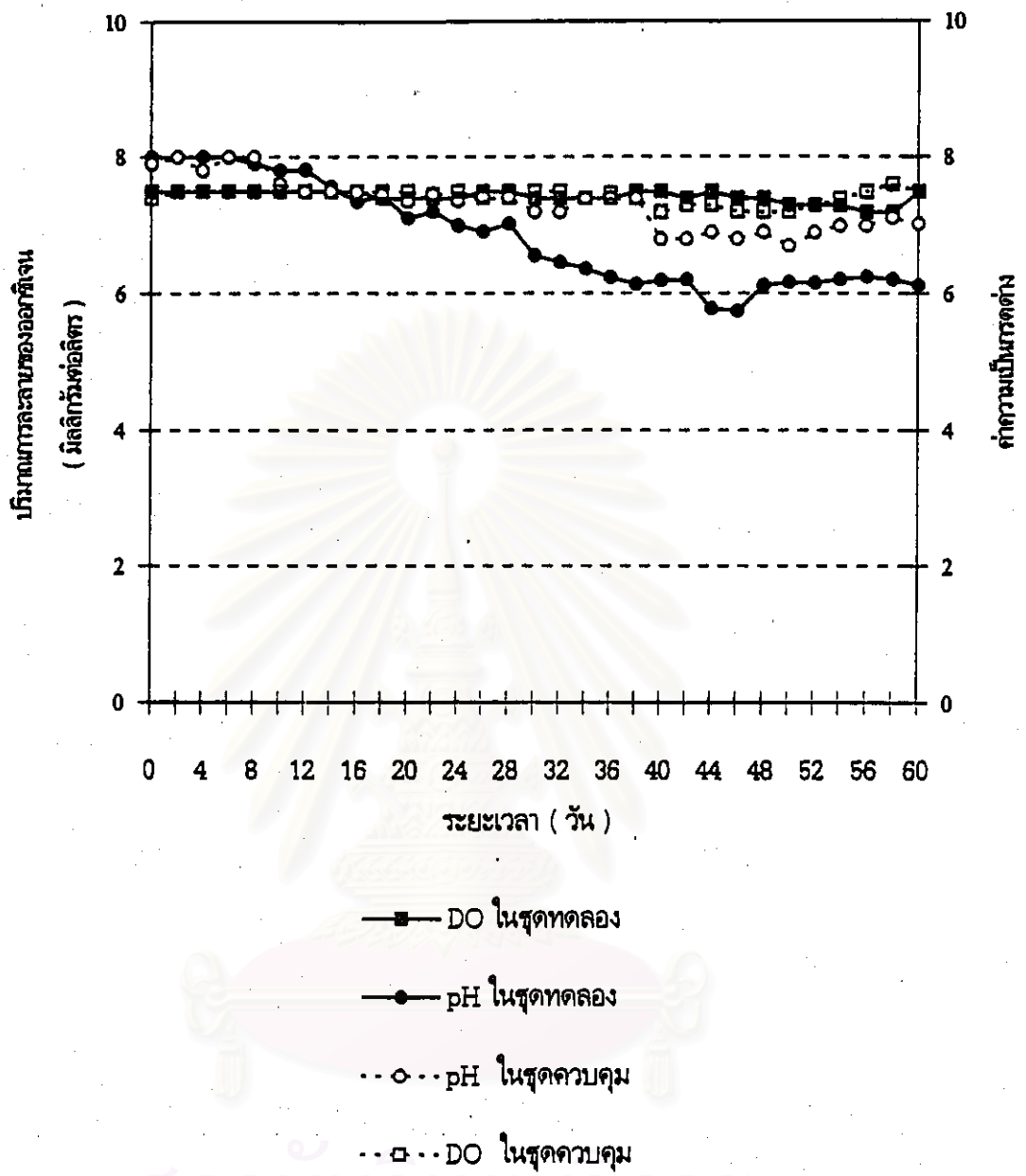
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 47 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนีย ปริมาณไนไตรท์ และปริมาณไนเตรทในระบบรีเซอคูเลชั่นในชุดทดลองที่บรรจุด้วยวัสดุตรึงซีโอไลท์ที่ตรึงคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 และชุดควบคุมที่ไม่ได้ตรึงคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย และ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 4 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 8.5 ในน้ำกร่อยที่ใช้หมุนเวียน ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง ในระยะเวลา 60 วัน

ตารางที่ 24 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างและปริมาณออกซิเจนในระบบบริเซอคูเลชันในชุดทดลองที่บรรจุด้วยวัสดุตรึงซีโอไลท์ที่ตรึงเชื้อผสมของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 และชุดควบคุมที่บรรจุวัสดุตรึงที่ไม่ได้ตรึงคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียและคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 4 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดด่าง 8.5 ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง (เฉลี่ย 32° ซ)ในระยะเวลา 60 วัน

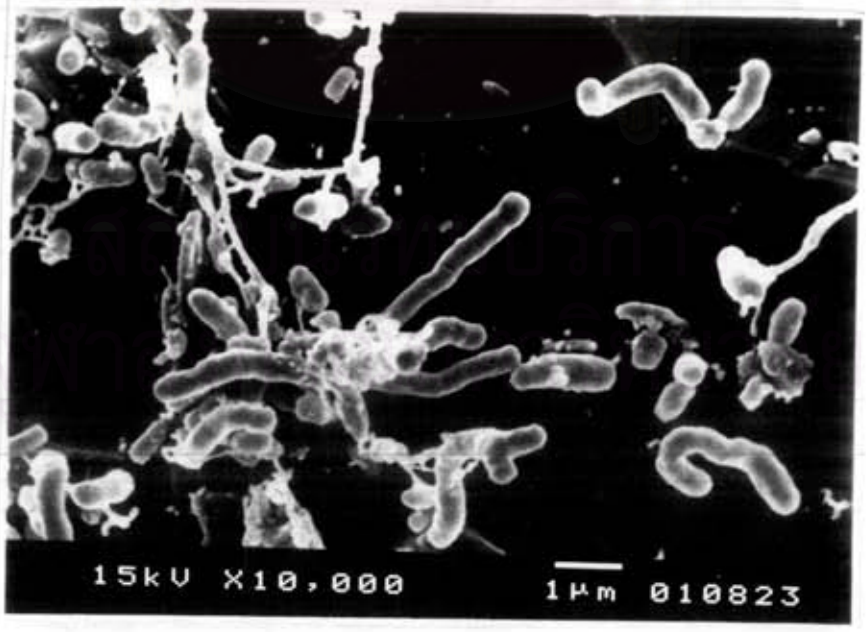
ระยะเวลา	ค่าความเป็นกรดด่าง		การละลายของออกซิเจน (mg/l)	
(วัน)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
0	8.5	8.5	7.5	7.5
2	8.5	8.5	7.5	7.5
4	8.5	8.5	7.5	7.5
6	8.5	8.3	7.5	7.5
8	8.5	8.4	7.5	7.5
10	8.4	8.4	7.5	7.4
12	8.5	8.4	7.5	7.3
14	8.4	8.0	7.5	7.3
16	8.5	7.8	7.5	7.2
18	8.3	7.6	7.5	7.4
20	8.3	7.6	7.4	7.4
22	8.4	7.4	7.4	7.4
24	8.4	7.4	7.4	7.4
26	8.4	7.4	7.5	7.5
28	8.3	7.2	7.4	7.5
30	7.8	7.3	7.4	7.4
32	7.8	7.3	7.4	7.5
34	7.8	7.1	7.4	7.5
36	7.8	7.1	7.4	7.4
38	7.5	7.1	7.4	7.5
40	7.5	7.2	7.4	7.5
42	7.4	7.1	7.4	7.5
44	7.4	6.9	7.4	7.5
46	7.4	6.9	7.4	7.5
48	7.4	6.8	7.3	7.5
50	7.3	6.9	7.4	7.5
52	7.2	6.9	7.4	7.5
54	7.0	6.5	7.4	7.4
56	7.1	6.9	7.4	7.4
58	7.1	6.7	7.4	7.4
60	7.0	6.8	7.4	7.4



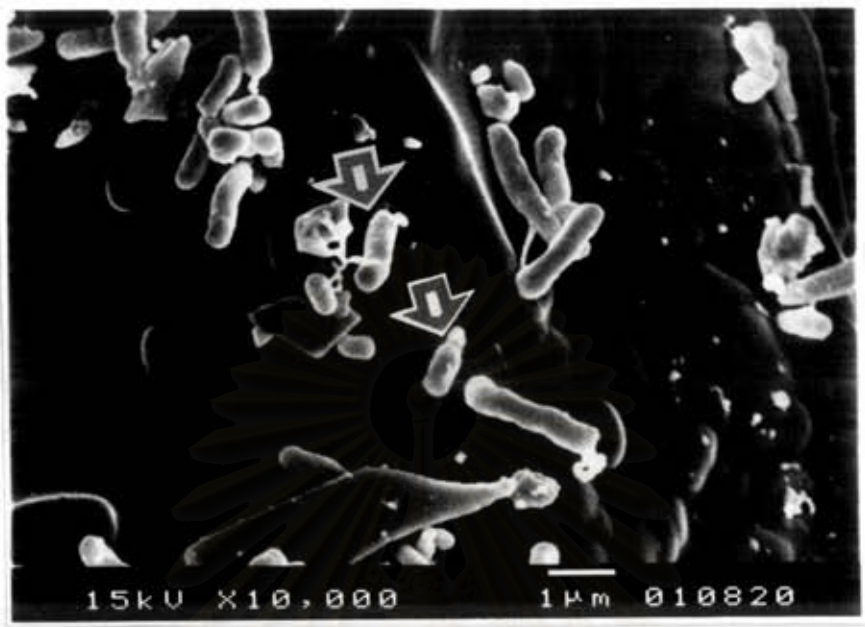
รูปที่ 48 การเปลี่ยนแปลงปริมาณการละลายของออกซิเจนค่าความเป็นกรดด่างในระบบรีเซอคูเลชันในชุดการทดลองบรรจุวัสดุตรึงซีโอไลท์ที่ตรึงคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 4 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 8.5 ในน้ำกร่อยที่ใช้หมุนเวียนทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง ในระยะเวลา 60 วัน

ตรวจสอบลักษณะของแบคทีเรียบนวัสดุตรึงชีโอไลท์ในระบบรีเซอคูเลชันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

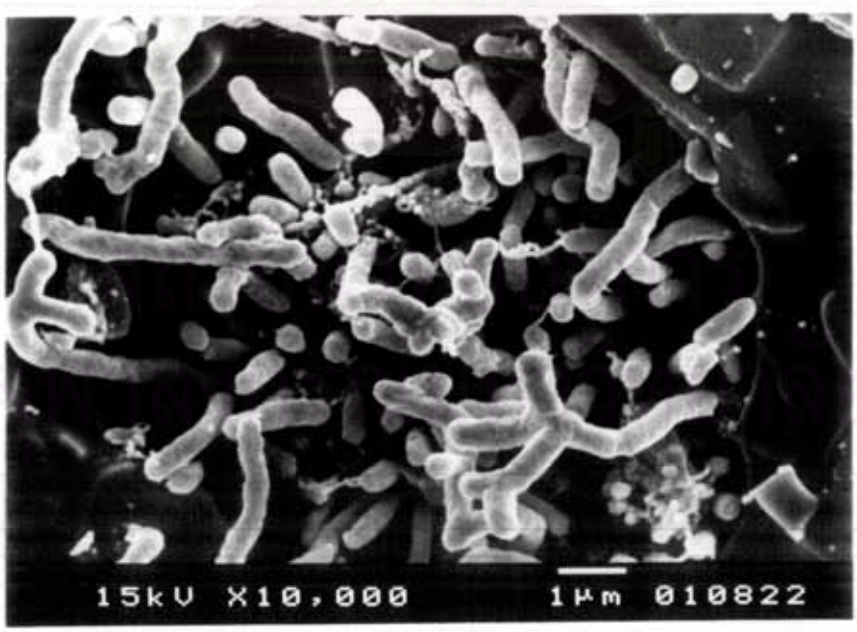
หลังจากสิ้นสุดการทดลอง จึงนำอิมโมบิไลซ์เซลล์ที่ผ่านกระบวนการทดลองเป็นเวลา 60 วันในระบบรีเซอคูเลชันของเชื้อผสมคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียและไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และ N1 ตามลำดับ มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด โดยศึกษาทั้งวัสดุตรึงชีโอไลท์ทั้งในชุดทดลองและชุดควบคุม เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของเซลล์บนวัสดุตรึงชีโอไลท์ของชุดทดลองและชุดควบคุม จะเห็นได้ว่าในชุดทดลองจะพบเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นรูปลูกแพร์ ขนาดประมาณ 0.5 ถึง 1.0 ไมโครเมตร ซึ่งมีลักษณะคล้ายคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบริสุทธิ์ ในรูปที่ 37 และพบเซลล์ที่มีรูปแท่ง ขนาดประมาณ 1.0 ไมโครเมตร เซลล์ที่มีรูปร่างกลม ขนาดแตกต่างกัน ซึ่งมีลักษณะคล้ายคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียบริสุทธิ์ ในรูปที่ 26 และเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นแท่งโค้งมีขนาดไม่แน่นอน ประมาณ 5 ถึง 10 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 51 ส่วนในชุดควบคุมส่วนใหญ่จะพบเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นแท่งโค้งมีขนาดไม่แน่นอน ประมาณ 5 ถึง 10 ไมโครเมตร และพบ branching rod ในเซลล์ดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่าการกระจายของเซลล์แบคทีเรียในชุดควบคุมจะมีความหนาแน่นน้อยกว่าในชุดทดลอง ดังรูปที่ 49 50 และ 51



รูปที่ 49 ภาพถ่ายของแบคทีเรียที่ยึดเกาะบนวัสดุตรึงชีโอไลท์ในชุดควบคุม ในการทดลองระบบรีเซอคูเลชัน จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (กำลังขยาย 17160X)



รูปที่ 50 ภาพถ่ายของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียและไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียของระบบรีเซอคูเลชัน แสดงลักษณะเซลล์ที่ยึดเกาะบนวัสดุตรึงชีโอไลท์ ในชุดทดลอง จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (กำลังขยาย 17160X)



รูปที่ 51 ภาพถ่ายของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียและไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียของระบบรีเซอคูเลชัน ที่ยึดเกาะในรูพรุนของวัสดุตรึงชีโอไลท์ในชุดทดลอง จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (กำลังขยาย 17160X)