

จลนพลศาสตร์และผลของแอมโมเนียต่อจำนวนยีน *amoA* ของแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงอาร์เคีย
และแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย

นางสาว กัทรพร คุณาพงษ์กิติ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

KINETICS AND EFFECT OF AMMONIA ON ABUNDANCES OF *amoA* GENES OF
AMMONIA-OXIDIZING ARCHAEA AND AMMONIA-OXIDIZING BACTERIA

Miss PattarapornKunapongkiti

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Environmental Engineering

Department of Environmental Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

จลนพลศาสตร์และผลของแอมโมเนียต่อจำนวนยีน
amoA ของแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงอาร์เคียและ
แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย

โดย

นางสาวภัทรพร คุณาพงษ์กิติ

สาขาวิชา

วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร. ตะวัน ลิ้มปิยากร

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบริหารธุรกิจ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. บุญสม เลิศหิรัญวงศ์)

คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ชรพร เขาวกิจเจริญ)

ประธานกรรมการ

.....
(อาจารย์ ดร. ตะวัน ลิ้มปิยากร)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศรัณย์ เตชะเสน)

กรรมการ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิบูลย์ลักษณ์ ฟังรัมย์)

กรรมการ

.....
(ดร. สรวิศ เผ่าทองสุข)

กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

ภัทรพร คุณาพงษ์กิติ : จลนพลศาสตร์และผลของแอมโมเนียต่อจำนวนยีน *amoA* ของ
 แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงอาร์เคียและแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย (KINETICS AND
 EFFECT OF AMMONIA ON ABUNDANCES OF *amoA* GENES OF AMMONIA-
 OXIDIZING ARCHAEA AND AMMONIA-OXIDIZING BACTERIA) อ.ที่ปรึกษา
 วิทยานิพนธ์หลัก : อ. ดร.ตะวัน ลิ้มปิยากร, 90 หน้า

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของแอมโมเนียที่มีต่อจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB และเพื่อ
 ศึกษาจลนพลศาสตร์ในการกำจัดแอมโมเนียของจุลินทรีย์ที่กำจัดแอมโมเนีย ในตะกอนจุลินทรีย์ที่มีกลุ่มประชากร
 จุลินทรีย์ที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียแตกต่างกัน โดยทำการเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์แบบเบทซ์ ซึ่งแบ่งถัง
 ปฏิกรณ์ออกเป็น 2 ชุด ชุดละ 5 ถัง ด้วยน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียแตกต่างกัน คือ 14 28 70 280
 และ 420 มก.ไนโตรเจน/ล. เติบโตถึงปฏิกรณ์ทั้ง 2 ชุดด้วยหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์และการเดินระบบแตกต่างกัน โดย
 ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1 ใช้หัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์ที่มีเฉพาะ AOB จากโรงบำบัดน้ำเสียหนองแขม มีระยะเวลาพักเก็บน้ำและ
 กักเก็บตะกอนจุลินทรีย์ 5 วัน ส่วนถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2 ใช้หัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์ที่มีทั้ง AOA และ AOB จากโรงบำบัดน้ำ
 เสียดินแดง มีระยะเวลาพักเก็บน้ำ 5 วัน และระยะเวลาพักเก็บตะกอนจุลินทรีย์ 15 วัน ระหว่างการเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์ได้
 ทำการเก็บตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์แต่ละถัง มานับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA AOB และ
Nitrosomonas oligotropha และยีน 16S rRNA ของ *Nitrosomonas europaea* ด้วยวิธีการ Real time PCR และเมื่อเดินระบบ
 เข้าสู่สภาวะคงที่ ได้เก็บตะกอนจุลินทรีย์ของทุกถังปฏิกรณ์ มาศึกษาค่า K_s ของจุลินทรีย์ที่ออกซิไดซ์แอมโมเนีย

ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนยีน *amoA* ของ AOA AOB
 และ *Nitrosomonas oligotropha* และจำนวนยีน 16S rRNA ของ *Nitrosomonas europaea* คือ ในถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้น
 แอมโมเนียต่ำ (ถังปฏิกรณ์ที่ทำการเก็บตัวอย่างน้ำ ณ วันที่เริ่มต้นเบทซ์ 14 และ 28 มก.ไนโตรเจน/ล.) พบยีน *amoA* ของ
 AOA และ AOB (ความเข้มข้นของแอมโมเนียเมื่อสิ้นสุดเบทซ์ 0.0 - 2.1 มิลลิกรัมไนโตรเจน) ส่วนถังปฏิกรณ์ที่มีความ
 เข้มข้นแอมโมเนียสูง (ถังปฏิกรณ์ที่ทำการเก็บตัวอย่างน้ำ วันที่เริ่มต้นเบทซ์ 70 280 และ 420) พบเฉพาะยีน *amoA* ของ
 AOB โดยไม่พบยีน *amoA* ของ AOA (ความเข้มข้นของแอมโมเนียเมื่อสิ้นสุดเบทซ์ 10-150 มก.ไนโตรเจน/ล.) และถึงแม้
 จะพบ AOB ในทุกถังปฏิกรณ์ สัดส่วนประชากรของ AOB ในแต่ละถังมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ
 แอมโมเนียในถัง กล่าวคือ ในถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ จะพบเฉพาะ *Nitrosomonas oligotropha*
 ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียสูง จะพบ *Nitrosomonas europaea* ในปริมาณสูง ทั้งนี้ การปรากฏของ
 กลุ่มจุลินทรีย์แต่ละชนิดในถังปฏิกรณ์จะสัมพันธ์กับค่า K_s ของจุลินทรีย์นั้นๆ และความเข้มข้นของแอมโมเนียในถัง
 ปฏิกรณ์ กล่าวคือ ค่า K_s ของตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์แต่ละถังมีค่าแตกต่างกัน โดยค่า K_s ที่พบจะสอดคล้องกับค่า
 K_s ของ AOB บริสุทธิ์ที่พบในถัง กล่าวคือ ถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ ที่พบเฉพาะ *Nitrosomonas*
oligotropha จะมีค่า K_s อยู่ในช่วง 0.6-3.3 มก.ไนโตรเจน/ล. และค่า K_s ของตะกอนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้น
 ของแอมโมเนียสูง จะอยู่ในช่วงเดียวกับ *Nitrosomonas europaea* ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 10.1-24.6 มก.ไนโตรเจน/ล.

ภาควิชา..... วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ลายมือชื่อนิติ.....

สาขาวิชา..... วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา..... 2553

5170417021 : MAJOR ENVIRONMETAL ENGINEERING

KEY WORDS : AMMONIA/ BATCH REACTOR/ REAL-TIME PCR/ RESPIROMETRIC
METHOD/ KINETICS

PATTARAPORN KUNAPONGKITI : KINETICS AND EFFECT OF AMMONIA ON
ABUNDANCES OF *amoA* GENES OF AMMONIA-OXIDIZING ARCHAEA AND
AMMONIA-OXIDIZING BACTERIA. THESIS ADVISOR : TAWAN
LIMPIYAKORN, Ph.D., 90 pp.

The objectives of this study are to investigate the effect of ammonia on abundance of *amoA* genes of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and the kinetics of ammonia oxidation in mixed nitrifying cultures that contained different groups of ammonia oxidizers. Enrichment of mixed nitrifying cultures was performed with two sets of experiments. Each set of experiment comprised of five batch reactors receiving influent with different ammonium concentrations (14 28 70 280 and 420 mg N l⁻¹). The first set of experiment used seed sludge from Nhong Kham wastewater treatment plant that contained only *amoA* genes of AOB, while the second set of experiment used seed sludge from Din Dang wastewater treatment plant that contained *amoA* genes of both AOA and AOB. During enrichment, sludge samples were taken from each reactor and analysed for abundance of *amoA* genes of AOA, AOB and *Nitrosomonas oligotropha* and 16S rRNA of *Nitrosomonas europaea* using qPCR technique. After steady state of operation, the K_s values of the sludge were determined.

The results showed that ammonium concentrations in the reactors affect the abundance of *amoA* genes of AOA, AOB and *Nitrosomonas oligotropha* and 16S rRNA of *Nitrosomonas europaea*. In the reactor with low ammonium levels *amoA* genes of AOA were found together with *amoA* genes of AOB (average ammonium concentrations at the end of cycle were 0-2.1 mg N l⁻¹), but in the reactors with high ammonia levels only *amoA* genes of AOB were found (average ammonium concentrations at the end of cycle were 10-150 mg N l⁻¹). In the reactors with low ammonium levels, only *Nitrosomonas oligotropha* were found, while in the reactors with high ammonium levels, *Nitrosomonas europaea* were found in high numbers. The results suggested that the occurrence of ammonia oxidizers in the reactors related to the K_s values of ammonia-oxidizing species and the ammonium levels in the reactors. The K_s values of mixed nitrifying cultures taken from different reactors varied depending on the AOB species found in the reactors. In the reactors with low ammonium levels where the K_s values of mixed nitrifying cultures was in the range of 0.6-3.3 mg N l⁻¹ and the K_s values from the reactors with high ammonium levels was 10.1-24.6 mg N l⁻¹. Although in some reactors with low ammonium levels both AOA and AOB (*Nitrosomonas oligotropha*) occurred, the K_s values fell in the range of *Nitrosomonas oligotropha*, not AOA.

Department:.....Environmental Engineering

Student's signature.....

Filed of study:..Environmental ..Engineering

Advisor's signature.....

Academic year: ..2010

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ตะวัน ลิ้มปิยากร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือตลอดทุกขั้นตอนในการทำวิจัยและตรวจทานแก้วิทยานิพนธ์ จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ชรพร เขาวกิจเจริญ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศรัณย์ เตชะเสน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิบูลย์ลักษณะ พิ้งรัมย์ ดร.สรวิศ เผ่าทองสุข กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และคณาจารย์ทุกท่านที่ได้กรุณามอบความรู้อันเป็นประโยชน์ คำแนะนำ และความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาในการศึกษา ณ ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและทุนอุดหนุนของภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่สำหรับการทำวิจัย

ขอขอบคุณศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ และสารเคมีในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับมิตรภาพ กำลังใจ ตลอดจนความช่วยเหลือทั้งในด้านการเรียนและการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่มอบความรัก กำลังใจ และสนับสนุนข้าพเจ้าในทุกๆด้าน ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญภาพ.....	ฑ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร.....	4
2.1 วัฏจักรไนโตรเจน.....	4
2.1.1 กระบวนการไนทริฟิเคชัน.....	5
2.1.2 กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน.....	5
2.2 แอมโมเนียออกซิโดซิงแบคทีเรีย.....	6
2.2.1 การจัดลำดับความคล้ายของ AOB.....	6
2.2.1.1 การแบ่งลำดับความคล้ายโดยใช้ยีน 16S rRNA.....	6
2.2.1.2 การจัดลำดับความคล้ายโดยใช้ยีน <i>amoA</i>	9
2.2.2 ลักษณะสมบัติและแหล่งที่พบ AOB.....	9
2.2.3 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลกระทบต่อประชากร AOB.....	11
2.2.3.1 ความเข้มข้นของแอมโมเนีย.....	11
2.2.3.2 ความสามารถในการใช้ยูเรีย.....	12
2.2.3.3 การทนต่อสภาพความเค็ม.....	12

2.3 แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงอาร์เคีย.....	13
2.3.1 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลกับ AOA.....	15
2.3.1.1 ฤดูกาล.....	15
2.2.3.2 ความสามารถในการใช้ยูเรีย	12
2.2.3.3 การทนต่อสภาพความเค็ม.....	12
2.3 แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงอาร์เคีย.....	13
2.3.1 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลกับ AOA.....	15
2.3.1.1 ฤดูกาล.....	15
2.3.1.2 อุณหภูมิ.....	15
2.3.1.3 ความเข้มข้นของแอมโมเนีย.....	16
2.3.1.4 ความเค็ม.....	16
2.3.1.5 ความเข้มข้นของออกซิเจน.....	17
2.3.1.6 แหล่งคาร์บอน	17
2.3.1.7 อินทรีย์วัตถุ.....	18
2.3.1.8 พีเอช	18
2.3.1.9 ระยะเวลาที่กักเก็บน้ำและระยะเวลาที่กักเก็บตะกอนจุลินทรีย์	18
2.3.1.10 ซัลไฟด์.....	19
2.3.1.11 ฟอสเฟต.....	19
2.4 ปริมาณสัมพันธ์และจลนพลศาสตร์ของแบคทีเรีย	20
2.4.1 สมการปริมาณสัมพันธ์สำหรับการเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ใน	
การบำบัดน้ำเสียชุมชนทางชีวภาพในรูปแบบใช้ออกซิเจน.....	20
2.4.2 สมการปริมาณสัมพันธ์ของแบคทีเรียกลุ่มออโตโทรป	20
2.4.3 จลนพลศาสตร์สำหรับการย่อยสลายสารและการเจริญเติบโต	
ของแบคทีเรียกลุ่มออโตโทรป.....	21
2.4.3.1 สมการของ Michaelis-Menten	21
2.4.3.2 สมการของ Monod	22

2.5 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสแบบเวลาจริง (Real-Time Polymerase Chain Reaction; Real-Time PCR).....	24
2.5.1 ส่วนประกอบของปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction; PCR).....	24
2.5.1.1 แม่พิมพ์	24
2.5.1.2 ไพร์เมอร์	24
2.5.1.3 Tag DNA polymerase.....	25
2.5.1.4 นิวคลีโอไทด์.....	25
2.5.1.5 เครื่องทำปฏิกริยา PCR	25
2.5.2 หลักการของปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)....	25
2.5.2.1 การทำให้สายดีเอ็นเอคลายเกลียว (Denaturing).....	25
2.5.2.2 การทำให้สายดีเอ็นเอเข้ากับไพร์เมอร์โดยใช้ความร้อน (Annealing).....	25
2.5.2.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (Extension).....	26
2.5.3 วิธีการติดตามการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ.....	26
2.5.3.1 สีเรืองแสง	26
2.5.3.2 การใช้โพรบ	26
2.5.4 ลักษณะการใช้งานเครื่อง Real-Time PCR.....	27
2.5.4.1 การใช้งานในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ.....	27
2.5.4.2 การวิเคราะห์ Melting Curve.....	28
2.6 วิธีเรสไปโรเมตริกและการหาค่าจลนพลศาสตร์.....	28
บทที่ 3 แผนการดำเนินงานและวิธีการวิจัย.....	30
3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย.....	30
3.2 ขั้นตอนการเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์.....	32
3.2.1 น้ำเสียตั้งเคราะห์.....	32
3.2.2 ถังปฏิกรณ์แบบเบทซ์.....	33

3.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของถังปฏิกรณ์ผสมแบบแบทช์.....	34
3.2.3.1 การเก็บตัวอย่างน้ำ.....	34
3.2.3.2 การเก็บตะกอนจุลินทรีย์.....	34
3.2.4 วิธีวิเคราะห์.....	35
3.2.4.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำก่อนการวัด.....	35
3.2.4.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นแอมโมเนีย.....	35
3.2.4.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นไนโตรต์.....	36
3.2.4.4 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นไนเตรต.....	36
3.2.4.5 การวัดค่าค่าออกซิเจนละลาย.....	36
3.2.4.6 การวัดค่าพีเอช.....	36
3.3 การศึกษาผลของแอมโมเนียที่มีต่อจำนวนยีน <i>amoA</i> ของ AOA และ ของ AOB โดยใช้เครื่อง Real-Time PCR ในการวัดจำนวนยีน <i>amoA</i>	36
3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ.....	36
3.3.2 การนับจำนวนยีน <i>amoA</i> และการเตรียมส่วนผสมสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาของ TaqDNA Polymerase.....	37
3.4 การศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของแอมโมเนีย ได้แก่ K_s และ μ_m ในการกำจัดแอมโมเนียด้วยจุลินทรีย์แบบผสมด้วยวิธีเรสไปโรเมตริก.....	39
3.5 ขั้นตอนการวิเคราะห์ผลการทดลอง ตอนที่ 2.....	40
3.5.1 จัดทำกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าออกซิเจนที่เหลือกับเวลา.....	41
3.5.2 การหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้ออกซิเจนเนื่องจากการใช้สารอาหารกับค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนีย.....	42
3.5.3 ทำการหาค่าคงที่ตามสมการ Monod หรือ ค่า K_s	42
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	43
4.1 หัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์.....	43
4.2 ความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนโตรต์ และไนเตรต ในถังปฏิกรณ์.....	44
4.2.1 ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1 (AOB).....	45

4.2.2	ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2 (AOA+AOB).....	47
4.3	ผลของแอมโมเนียต่อจำนวนยีน <i>amoA</i> ของ AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์.....	52
4.3.1	ผลของแอมโมเนียต่อจำนวนยีน <i>amoA</i> ของ AOA และ AOB ใน ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1.....	52
4.3.1.1	จำนวนยีน <i>amoA</i> ของ AOA และ AOB.....	53
4.3.1.2	จำนวนเซลล์ของ <i>Nitrosomonas oligotropha</i> และ <i>Nitrosomonas europaea</i>	53
4.3.2	ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2.....	56
4.3.2.1	จำนวนยีน <i>amoA</i> ของ AOA และ AOB.....	56
4.3.2.2	จำนวนเซลล์ของ <i>Nitrosomonas oligotropha</i> และ <i>Nitrosomonas europaea</i>	58
4.4	ผลการศึกษาค่า K_s ตามสมการ monod ด้วยวิธีเรสไปโรเมตริก.....	60
4.4.1	การยืนยันการหาค่า K_s ในถังปฏิกรณ์.....	60
4.4.2	ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1 (AOB).....	62
4.4.3	ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2 (AOA+AOB).....	64
4.4.4	การเปรียบเทียบค่า K_s ตามสมการ monod ของถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ชุด.....	67
บทที่ 5	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	71
5.1	สรุปผลการทดลอง.....	72
5.2	ข้อเสนอแนะ.....	73
	รายการอ้างอิง.....	79
	ภาคผนวก.....	80
	ภาคผนวก ก วิธีสกัดดีเอ็นเอจากตะกอนจุลินทรีย์.....	82

ภาคผนวก ข ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนไตรต์ และ ไนเตรต.....	83
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	90

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ลักษณะสมบัติและแหล่งที่พบ AOB กลุ่มต่างๆ.....	11
ตารางที่ 2.2 ค่า K_s ของจุลินทรีย์บริสุทธิ์.....	12
ตารางที่ 3.1 วิธีการตรวจวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ.....	35
ตารางที่ 3.2 ไพร้เมอร์สำหรับการนับจำนวนยีนของ AOA และ AOB.....	38
ตารางที่ 4.1 จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น.....	43
ตารางที่ 4.2 การเดินระบบของโรงบำบัดน้ำเสียหนองแขมและโรงบำบัดน้ำเสียดินแดง.....	44
ตารางที่ 4.3 ผลการเดินระบบและความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรตของ ถังปฏิกรณ์.....	51
ตารางที่ 4.4 สรุปค่า K_s และการมีอยู่ของ AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ชุด.....	68
ตารางที่ 4.5 ค่า K_s ของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ (pure culture) AOA สายพันธุ์ <i>N.maritimus</i> และ AOB สายพันธุ์ <i>N.europaea</i> และ <i>N.oligotropha</i>	69
ตารางที่ ข.1 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรต ของ ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1.....	83
ตารางที่ ข.2 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรต ของ ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2.....	85
ตารางที่ ข.3 ความเข้มข้นแอมโมเนีย ไนไตรต์ ไนเตรต และค่าออกซิเจนละลายต่อชั่วโมง ของการทดลองหาค่าจลนพลศาสตร์.....	87

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 วัฏจักรไนโตรเจน.....	4
ภาพที่ 2.2 กลุ่มสิ่งมีชีวิตประเภทออกโตโทรปที่ออกซิไดซ์แอมโมเนีย.....	5
ภาพที่ 2.3 การจัดลำดับความคล้ายโดยใช้ยีน 16S rRNA ของ AOB ประเภทเบต้าโปรทีโอแบคทีเรีย.....	7
ภาพที่ 2.4 การจัดลำดับความคล้ายโดยใช้ยีน 16S rRNA ของ AOB เฉพาะสกุล <i>Nitrosomonas</i>	8
ภาพที่ 2.5 การจัดลำดับความคล้ายโดยใช้ยีน <i>amoA</i> ของ AOB ประเภทเบต้าโปรทีโอแบคทีเรีย.....	10
ภาพที่ 2.6 ปัจจัยสิ่งแวดล้อมและสถานที่พบของ AOB	13
ภาพที่ 2.7 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการย่อยสลายสารตั้งต้นสูงสุดของจุลินทรีย์ต่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เปลี่ยนแปลงไป ตามสมการของ Michaelis–Menten.....	22
ภาพที่ 2.8 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดของจุลินทรีย์ต่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เปลี่ยนแปลงไป ตามสมการของ Monod.....	23
ภาพที่ 2.9 ขั้นตอนหลักการในการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณสัมพันธ์.....	28
ภาพที่ 2.10 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าออกซิเจนละลายที่เปลี่ยนแปลงไปต่อเวลา.....	29
ภาพที่ 3.1 แผนผังขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	31
ภาพที่ 3.2 ถึงปฏิกรณ์แบบเบทซ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	34
ภาพที่ 3.3 แผนผังการทดลอง ตอนที่ 2 ศึกษาค่า K_s ในการกำจัดแอมโมเนียของจุลินทรีย์แบบผสม ด้วยวิธีเรสไปโรเมตริก.....	41
ภาพที่ 3.4 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้ออกซิเจนเนื่องจากการใช้สารอาหาร (OUR) กับค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนีย.....	42
ภาพที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของแอมโมเนีย ในไทรต์ และไนเตรต ในถึงปฏิกรณ์ ณ วันที่เริ่มต้นเบทซ์และหลังจากสิ้นสุดเบทซ์ ต่อเวลา ของถึงปฏิกรณ์ชุดที่ 1.....	46
ภาพที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นแอมโมเนีย ในไทรต์ และไนเตรต ณ วันที่เริ่มต้นเบทซ์และหลังจากสิ้นสุดเบทซ์ ต่อเวลา ของถึงปฏิกรณ์ชุดที่ 2...	48

หน้า

ภาพที่ 4.3 จำนวนยีน <i>amoA</i> ของ AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1 ในแต่ละ ช่วงเวลา.....	52
ภาพที่ 4.4 จำนวนเซลล์ของ <i>Nitrosomonas oligotropha</i> และ <i>Nitrosomonas europaea</i> ใน ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1 ในแต่ละช่วงเวลา.....	54
ภาพที่ 4.5 จำนวนเซลล์ของ AOB กับจำนวนเซลล์ของ <i>Nitrosomonas oligotropha</i> รวม กับ <i>Nitrosomonas europaea</i> ในถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1 ในแต่ละช่วงเวลา.....	55
ภาพที่ 4.6 จำนวนยีน <i>amoA</i> ของ AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2 ในแต่ละ ช่วงเวลา.....	56
ภาพที่ 4.7 จำนวนเซลล์ ของ <i>Nitrosomonas oligotropha</i> และ <i>Nitrosomonas europaea</i> ในถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2 ในแต่ละช่วงเวลา.....	59
ภาพที่ 4.8 จำนวนเซลล์ของ AOB กับจำนวนเซลล์ <i>Nitrosomonas oligotropha</i> รวมกับ <i>Nitrosomonas europaea</i> ในถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2 ในแต่ละช่วงเวลา.....	60
ภาพที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างออกซิเจนที่ใช้ ต่อเวลา จากถังปฏิกรณ์ Set1-280 ของ ชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมแอมโมเนียและชุดการทดลองที่ความเข้มข้น ของแอมโมเนีย 49 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร.....	61
ภาพที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างออกซิเจนจำเพาะที่ใช้ ต่อความเข้มข้นแอมโมเนียของ ถังปฏิกรณ์ตัวอย่าง.....	62
ภาพที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างออกซิเจนที่ใช้ ต่อความเข้มข้นแอมโมเนียของ ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1.....	63
ภาพที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างออกซิเจนที่ใช้ ต่อความเข้มข้นแอมโมเนียของ ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2.....	65

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ยูโทรฟิเคชัน (eutrophication) เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นจากการที่แหล่งน้ำอุดมไปด้วยสารอาหาร โดยเฉพาะไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ซึ่งมาจากการปล่อยน้ำทิ้งจากเกษตรกรรม อุตสาหกรรมและชุมชนส่งผลให้พืชน้ำ เช่น สาหร่าย ในแหล่งน้ำสามารถเจริญเติบโตได้ดีและรวดเร็ว ทำให้น้ำเปลี่ยนเป็นสีเขียวหรือสีน้ำตาลตามชนิดของสาหร่าย เมื่อเกิดยูโทรฟิเคชัน ออกซิเจนในแหล่งน้ำจะลดลง นอกจากนี้ปริมาณสาหร่ายที่หนาแน่นจะไปกั้นแสงอาทิตย์ทำให้แสงส่องผ่านลงไปไม่ถึงใต้น้ำ พืชที่อยู่ใต้น้ำจึงไม่สามารถสังเคราะห์แสงและตายในที่สุด (วิลาลีนี ไตรยราช, 2553) การบำบัดไนโตรเจนในน้ำเสียก่อนที่จะลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ เป็นปัจจัยหลักในการควบคุมปัญหายูโทรฟิเคชัน โดยกระบวนการกำจัดไนโตรเจนในระบบบำบัดน้ำเสียโดยทั่วไปประกอบด้วย กระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification) และดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification) โดยในกระบวนการไนตริฟิเคชัน แบคทีเรียกลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งแบคทีเรีย (Ammonium-oxidizing bacteria; AOB) จะออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรต์ ต่อมาแบคทีเรียกลุ่มไนไตรต์ออกซิไดซ์ซึ่งแบคทีเรีย (Nitrite-oxidizing bacteria; NOB) จะออกซิไดซ์ไนไตรต์เป็นไนเตรต หลังจากนั้นแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปจะรีดิวซ์ไนไตรต์ไปเป็นก๊าซไนโตรเจนปล่อยออกสู่บรรยากาศในกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน

กระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน เป็นกระบวนการจำกัดอัตรา (rate limiting step) ของกระบวนการกำจัดไนโตรเจนในระบบบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากกลุ่มจุลินทรีย์ในกระบวนการนี้มีการเจริญเติบโตช้าและมีความอ่อนไหวต่อปัจจัยสิ่งแวดล้อม ซึ่งหากต้องการพัฒนากระบวนการกำจัดไนโตรเจนจะต้องพัฒนากระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชันก่อน กว่า 100 ปีที่ผ่านมา มีความเชื่อว่า AOB เป็นจุลินทรีย์หนึ่งเดียวในกระบวนการออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรต์ แต่เมื่อราวปี ค.ศ. 2004 พบว่าแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งอาร์เคีย ก็มีส่วนสำคัญต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรต์เช่นเดียวกับ AOB ทำให้แนวคิดเรื่องการออกซิไดซ์แอมโมเนียจึงเปลี่ยนไป โดยเริ่มจาก Venter และคณะ (2004) ค้นพบยีนที่ใช้อย่างแอมโมเนียในอาร์เคียที่อาศัยอยู่ในทะเลเป็นครั้งแรกของโลก จากนั้นในปี ค.ศ. 2005 Könneke และคณะ ได้ทำการคัดแยก AOA ในน้ำทะเลได้เป็นครั้งแรกและเป็นสายพันธุ์เดียวที่มีอยู่ในปัจจุบัน โดยตั้งชื่อว่า *Nitrosopumilus maritimus* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม I.1a ของ Crenarchaeota ต่อมา Leininger และคณะ (2006) พบว่ายีน *amoA* ของ AOA มีจำนวนมากกว่ายีน *amoA* ของ AOB ทั้งในดินธรรมดาและดินที่ใส่ปุ๋ย และต่อจากนั้นเรื่อยมา

นักวิทยาศาสตร์ได้เริ่มศึกษาเกี่ยวกับ AOA ในสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ไม่ว่าจะเป็นในดินตะกอนใต้ทะเล ระบบน้ำทะเลและดินตะกอนในเขตชายฝั่งทะเล ในระบบดินทั่วไป ซึ่งพบปริมาณยีน *amoA* ของ AOA มากกว่ายีน *amoA* ของ AOB

ในส่วนของระบบบำบัดน้ำเสีย มีการค้นพบยีน *amoA* ของ AOA ครั้งแรกในเชิงคุณภาพในตะกอนเร่ง โดย Park และคณะ (2006) บ่งชี้ว่า มักพบ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีระยะเวลา กักเก็บน้ำและระยะเวลา กักเก็บตะกอนจุลินทรีย์ที่ยาวนานมากกว่าปกติ ซึ่งต่อมา Zhang และคณะ (2009) ได้ทำการทดลองนี้ซ้ำอีกครั้ง พบว่า ระยะเวลา กักเก็บน้ำและระยะเวลา กักเก็บตะกอน จุลินทรีย์ที่ยาวนานมากกว่าปกติ ไม่ส่งผลต่อการดำรงชีวิตของ AOA ต่อจากนั้น Wells และคณะ (2009) ได้ทำการตรวจนับยีน *amoA* ของ AOA และยีน *amoA* ของ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียเป็น ครั้งแรกของโลก โดยปริมาณยีน *amoA* ของ AOB มากกว่าของ AOA ตลอดระยะเวลา 1 ปี ที่ทำการ เก็บตัวอย่าง โดยผลการทดลองล่าสุดในประเทศไทย Limpiyakorn และคณะ (2011) ค้นพบยีน *amoA* ของ AOA มากกว่ายีน *amoA* ของ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนของกรุงเทพมหานคร หลายระบบ แต่ไม่พบยีน *amoA* ของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมที่มีความเข้มข้น แอมโมเนียสูง

ในปี ค.ศ. 2009 Erguder และคณะ ได้รวบรวมและอภิปรายปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่ส่งเสริม การมีอยู่ AOA ในสิ่งแวดล้อมและสรุปว่า ในสิ่งแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำๆ จะพบ จำนวนประชากร AOA มากกว่า จำนวนประชากร AOB และในปีเดียวกัน Habbena และคณะ ได้ศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ ของ AOA ในถังน้ำทะเล (Aquarium tank) มีค่า Michaelis-Menten constant (K_m) ใกล้เคียงกันกับสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งในน้ำทะเลจริงที่ออกซิโดซ์แอมโมเนียให้เป็น ไนไตรต์ จึงแสดงให้เห็นว่าสิ่งมีชีวิตที่ทำหน้าที่ออกซิโดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรต์ในน้ำทะเลที่ แท้จริง น่าจะเป็น AOA มากกว่าที่จะเป็น AOB จากเหตุผลที่กล่าวมาในข้างต้น งานวิจัยครั้งนี้จึง มุ่งเน้นไปที่ผลความเข้มข้นของแอมโมเนียต่อจำนวนยีน *amoA* ของจุลินทรีย์ที่ออกซิโดซ์ แอมโมเนีย (ยีน *amoA* ของ AOA และยีน *amoA* ของ AOB) และค่าจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์ที่ กำจัดแอมโมเนียในตะกอนจุลินทรีย์แบบผสมที่มีกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่ออกซิโดซ์แอมโมเนีย แตกต่างกัน เพื่อการพัฒนาแบบและการควบคุมระบบบำบัดน้ำเสียให้เหมาะสมกับลักษณะ สมบัติของน้ำเสียที่เข้าระบบ รวมไปถึงการเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียให้มากขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของแอมโมเนียที่มีต่อจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์แบบแบทช์ (Batch reactor)

1.2.2 เพื่อศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ในการกำจัดแอมโมเนียของจุลินทรีย์ที่กำจัดแอมโมเนียในตะกอนจุลินทรีย์แบบผสมที่มีกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียแตกต่างกัน

1.3 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ ทำการทดลอง ณ อุณหภูมิห้อง ติดตั้งและเดินระบบที่ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนับจำนวน ยีน *amoA* ของ AOA และ ยีน *amoA* ของ AOB ในสภาวะที่มีปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียแตกต่างกัน รวมถึงการศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์ผสม ได้แก่ค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียที่จุลินทรีย์ใช้ไปทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนสูงสุดเปลี่ยนไปครั้งหนึ่ง (K_s) ณ ห้องปฏิบัติการ ศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์จากโรงบำบัดน้ำเสียหนองแขมและโรงบำบัดน้ำเสียดินแดง
- ใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่เตรียมจากโซเดียมคลอไรด์เป็นแหล่งแอมโมเนียและโซเดียมไบคาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์โดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบแบทช์
- ใช้เครื่อง Real-time PCR นับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB
- ใช้เครื่องวัดค่าออกซิเจนละลาย (DO meter) เพื่อวัดการใช้ออกซิเจนของจุลินทรีย์

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ

1.4.1 บทบาทของ AOA หรือ AOB ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียที่มีระดับความเข้มข้นแตกต่างกันโดยคำตอบที่ได้จะนำไปเป็นแนวทางในการพัฒนากลุ่มจุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับการบำบัดน้ำเสียลักษณะต่างๆ

1.4.2 เพื่อเสนอแนวคิดในเรื่องค่าจลนพลศาสตร์ของกลุ่มจุลินทรีย์ที่แท้จริงที่มีบทบาทในการออกซิไดซ์แอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสีย

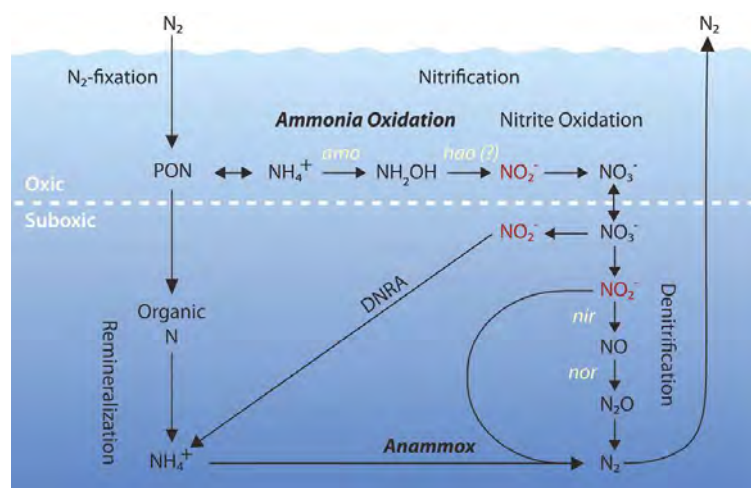
บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

2.1 วัฏจักรไนโตรเจน (Nitrogen cycle)

ในบรรยากาศมีก๊าซไนโตรเจนมีอยู่ร้อยละ 78 และเป็นธาตุที่มีอยู่ในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์และโปรตีน สิ่งมีชีวิตจะใช้ไนโตรเจนในรูปของโปรตีนแต่ไม่สามารถนำมาใช้ได้โดยตรง ซึ่งสิ่งมีชีวิตสามารถใช้ไนโตรเจนได้เมื่ออยู่ในสภาพของสารประกอบแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรต ดังนั้นก๊าซไนโตรเจนในบรรยากาศ จึงต้องเปลี่ยนรูปให้อยู่ในสภาพที่สิ่งมีชีวิตนำไปใช้ได้

วัฏจักรไนโตรเจนประกอบด้วยกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen Fixation) กระบวนการสร้างแอมโมเนีย (Ammonification) ซึ่งกระบวนการนี้จะเปลี่ยนสารอินทรีย์ไนโตรเจนเป็นแอมโมเนีย โดยแบคทีเรียกลุ่มแอมโมนิไฟเออร์แบคทีเรีย (Ammonifer bacteria) ต่อจากนั้นเข้าสู่กระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification) กระบวนการนี้สิ่งมีชีวิตจะเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนเตรต ด้วยสิ่งมีชีวิตที่เรียกว่า ไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Nitrifying Bacteria) และในขั้นสุดท้ายไนเตรตที่สะสมอยู่ในระบบเปลี่ยนเป็นก๊าซไนโตรเจนโดยการบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification) เวียนกันไปเรื่อยๆ จนเกิดเป็นวัฏจักร (ดังภาพที่ 2.1)

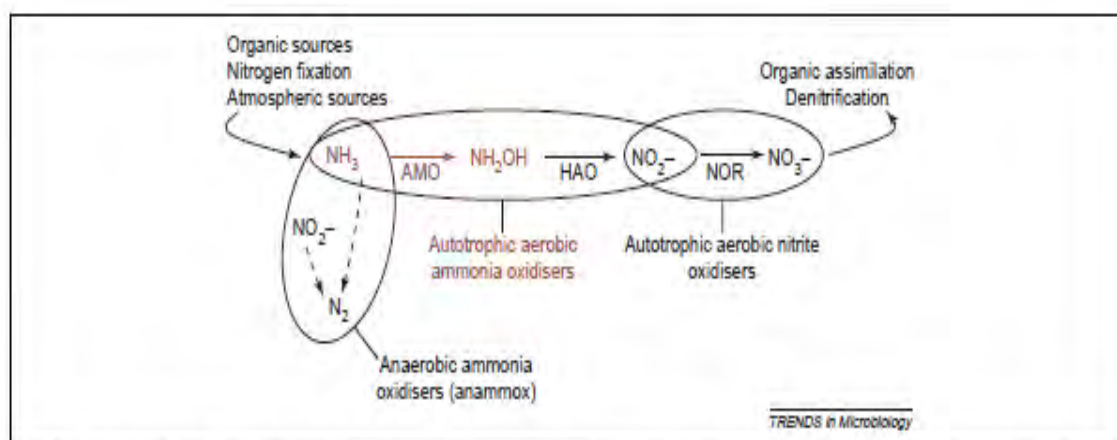


ภาพที่ 2.1 วัฏจักรไนโตรเจน (Francis และคณะ 2007)

2.1.1 กระบวนการไนทริฟิเคชัน

กระบวนการไนทริฟิเคชัน ถือเป็นศูนย์กลางของวัฏจักรไนโตรเจนในโลกและการออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนเตรต (ผ่านการเป็นไนไตรต์) ด้วย กลุ่มสิ่งมีชีวิต 2 ชนิดหลัก คือ สิ่งมีชีวิตที่ออกซิไดซ์แอมโมเนีย (Ammonia-oxidizer) และ สิ่งมีชีวิตที่เป็นตัวออกซิไดซ์ไนไตรต์ (Nitrite-oxidizer)

กลุ่มสิ่งมีชีวิตประเภทออโตโทรปที่ออกซิไดซ์แอมโมเนีย (Ammonia-oxidizing bacteria; AOB) จะใช้เอนไซม์แอมโมเนียโมโนออกซิจีเนส (ammonia monooxygenase; AMO) ย่อยแอมโมเนียให้เป็นไฮดรอกซิลามีน (NH_2OH) และใช้เอนไซม์ไฮดรอกซิลามีนออกซิโดรีดักเตส (hydroxylamine oxidoreductase; HAO) ย่อยไฮดรอกซิลามีนเป็นไนไตรต์ และกลุ่มสิ่งมีชีวิตประเภทออโตโทรปที่เป็นตัวออกซิไดซ์ไนไตรต์ (Nitrite-oxidizing bacteria; NOB) ใช้เอนไซม์ไนไตรต์ออกซิโดรีดักเตส (nitrite oxidoreductase; NOR) เปลี่ยนไนไตรต์เป็นไนเตรต เพื่อเข้าสู่กระบวนการดีไนทริฟิเคชันต่อไป (Nicol และ Schleper, 2006) (ดังภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 กลุ่มสิ่งมีชีวิตประเภทออโตโทรปที่ออกซิไดซ์แอมโมเนีย (Nicol และ Schleper, 2006)

2.1.2 กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน

กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน เป็นกระบวนการรีดิวซ์ไนเตรตให้อยู่ในรูปของก๊าซไนโตรเจน (Nitrogen gas) หรือบางทีมีก๊าซอื่น ๆ รวมทั้งไนตรัส (N_2O) เกิดขึ้นด้วยจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน ประกอบด้วยสองพวกใหญ่ ๆ ด้วยกันคือ พวกแรกเป็นพวกที่ไม่ขึ้นกับไนเตรตโดยสามารถเจริญอยู่ได้สถานะในที่ไม่มีไนเตรตหรืออาศัยกระบวนการสร้างแอมโมเนียหรือกระบวนการอื่นๆ พวกที่สองเป็นพวกที่มีชีวิตอยู่ได้โดยที่ต้องมี

ไนเตรต เช่น แบคทีเรียบางชนิด ในสกุล *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus* และ *Thiobacillus denitrificans* โดยส่วนใหญ่กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน ไนเตรตจะถูกเปลี่ยนให้เป็นก๊าซไนโตรเจนโดยกลุ่มจุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรปแบคทีเรียที่สามารถใช้ไนเตรตไนทริกออกไซด์ หรือซัลเฟต เป็นตัวรับอิเล็กตรอน แทนออกซิเจนอิสระในสภาวะแอน็อกซิก (Anoxic) ในปฏิกิริยาที่มีไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจนอิสระ กระบวนการดีไนทริฟิเคชันจะมีขั้นตอนสุดท้ายของปฏิกิริยาได้ก๊าซไนโตรเจนระเหยออกจากระบบ

2.2 แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Ammonia-oxidizing bacteria; AOB)

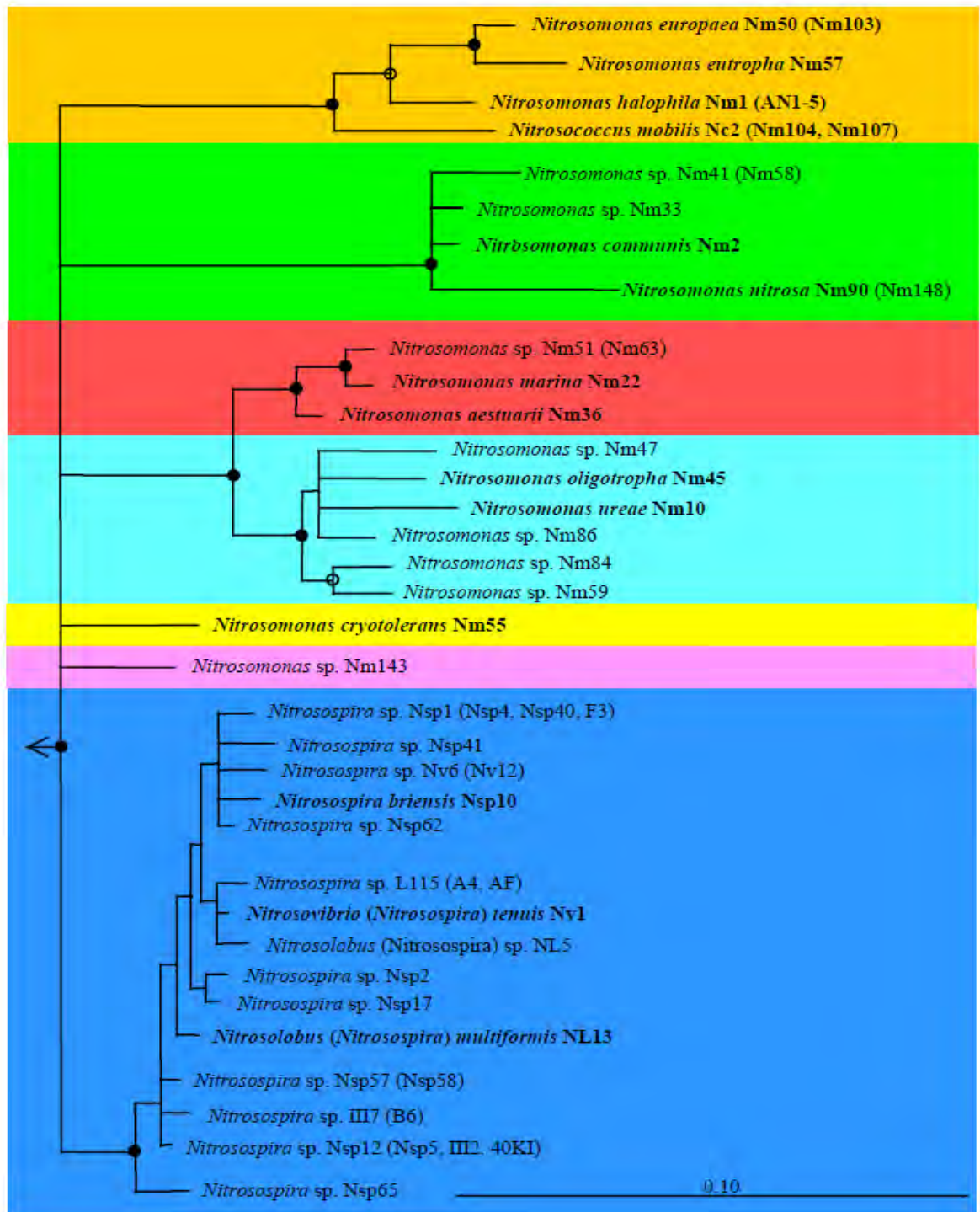
AOB เป็นแบคทีเรียประเภทออโตโทรป ซึ่งใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงานและใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ แบคทีเรียประเภทนี้มีหน้าที่เปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนไตรต์

2.2.1 การจัดลำดับความคล้ายของ AOB (Phylogenetic tree)

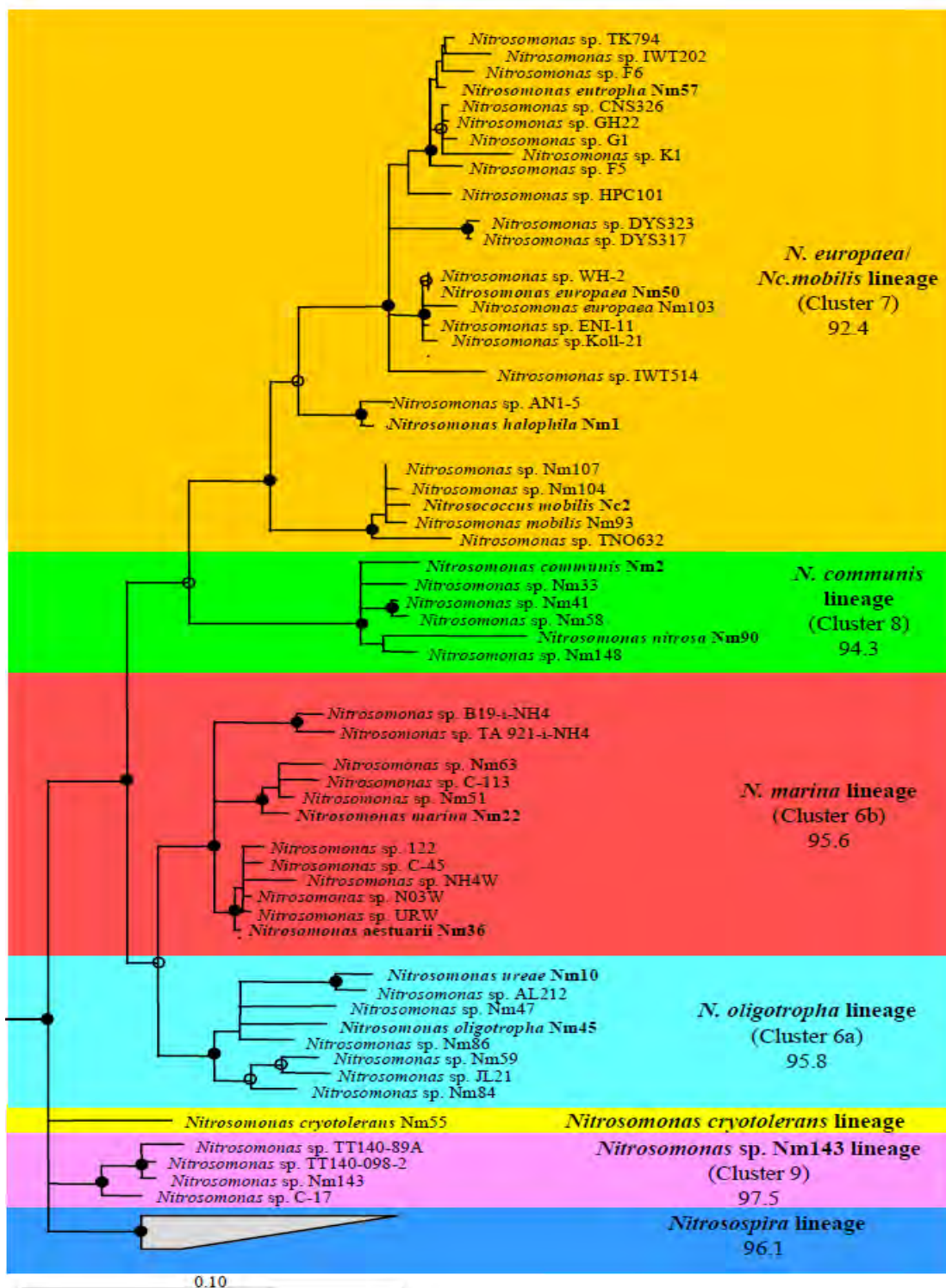
2.2.1.1 การแบ่งลำดับความคล้ายโดยใช้ยีน 16S rRNA (16S rRNA base on phylogenetic tree)

ในปี ค.ศ. 1978 Woese และคณะ อ้างถึงใน Koops และคณะ (2003) ได้วิเคราะห์ AOB โดยการจัดลำดับความคล้าย โดยใช้ 16S rRNA ได้เป็นครั้งแรก โดยแบ่ง AOB ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ได้ 2 ประเภท ได้แก่ ประเภทเบต้าโปรทีโอแบคทีเรีย (Betaproteobacteria) ได้แก่ สกุล *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio* และ *Nitrosolobus* (ดังภาพที่ 2.3) และประเภทแกมมาโปรทีโอแบคทีเรีย (Gammaproteobacteria) ได้แก่ สกุล *Nitrosococcus*

ส่วนสกุล *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio* และ *Nitrosolobus* เป็นสกุลที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ในการจัดลำดับความคล้ายโดยใช้ยีน 16S rRNA และยังไม่แน่ใจในการรองรับการจัดลำดับความคล้ายย่อย (Subdivision) ของแบคทีเรีย ใน 4 สกุลนี้ อย่างไรก็ตาม Koops และคณะ (2003) ได้เสนอให้แยกสกุล *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio* และ *Nitrosolobus* เพื่อแบ่งลำดับย่อยออกเป็นสกุลเดี่ยว แต่ในทางตรงกันข้าม *Nitrosomonas* ได้พัฒนาลำดับชั้นย่อยใน 6 สกุลที่มีความสัมพันธ์สอดคล้องกันซึ่งมีความแตกต่างกันโดยใช้วิธีแยกแบบกิ่งก้าน (Treeing methods) โดยใช้ความสัมพันธ์มากกว่าร้อยละ 90 ในการแบ่ง (ดังภาพที่ 2.4)



ภาพที่ 2.3 การจัดลำดับความคล้ายโดยใช้นิวคลีโอไทด์ 16S rRNA ของ AOB ประเภทเบต้าโปรทีโอแบคทีเรีย (Koops และคณะ, 2003)



ภาพที่ 2.4 การจัดลำดับความคล้ายโดยใช้ยีน 16S rRNA ของ AOB เฉพาะสกุล *Nitrosomonas*

(Koops และคณะ, 2003)

2.2.1.2 การจัดลำดับความคล้ายโดยใช้ยีน *amoA*

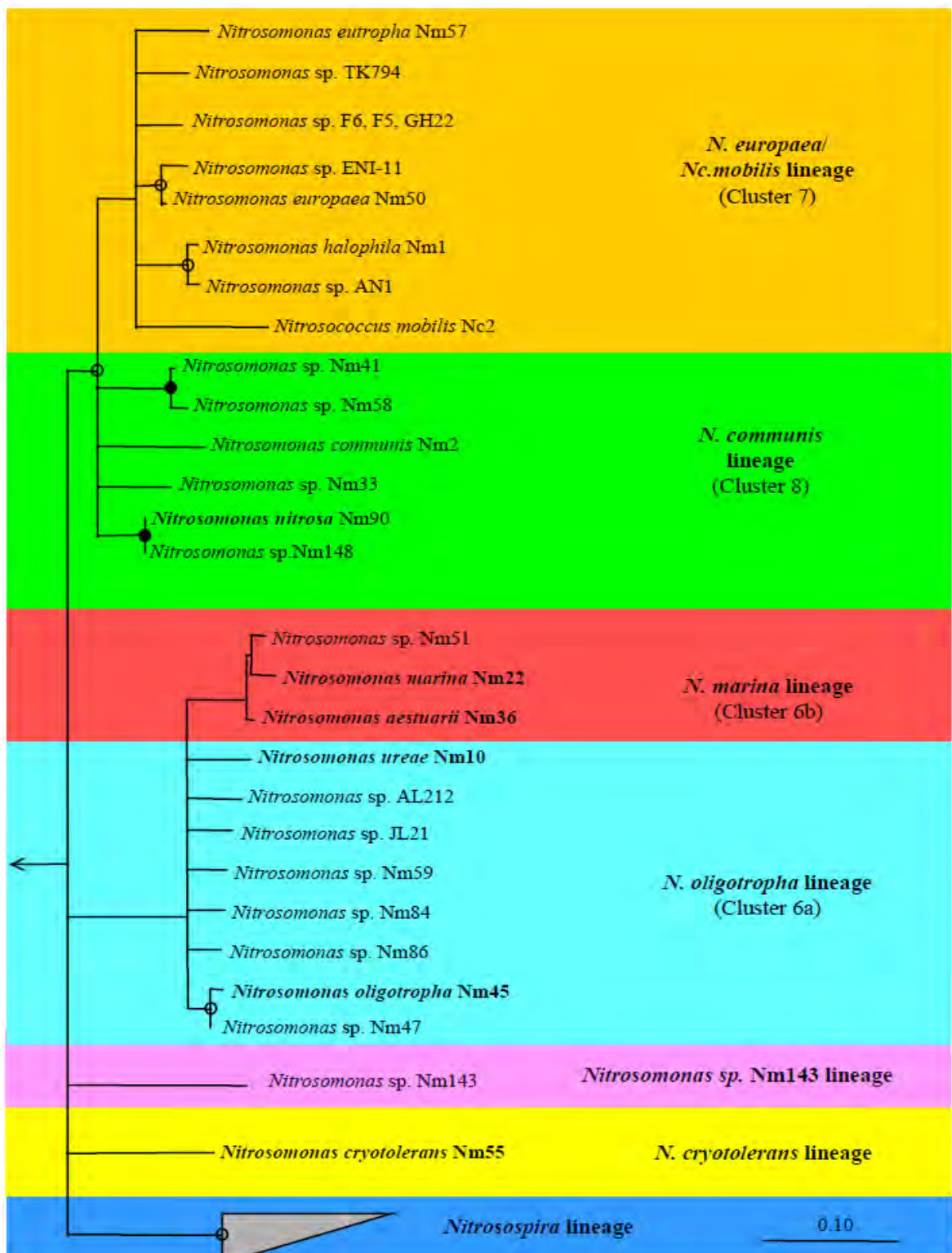
ยีน *amoA* (ammonia monooxygenase Subunit A) ในการสร้างเอ็นไซม์ “ammonia monooxygenase” ที่ใช้ย่อยแอมโมเนีย ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase chain reactions; PCR) มี 453 คู่เบส (Rotthauwe และคณะ, 1997 อ้างถึงใน Koops และคณะ, 2003) การจัดลำดับความคล้ายจัดได้ตามลำดับเบสของกรดอะมิโนของยีน *amoA* ที่ตัดออกมา ซึ่งได้ผลคล้ายกับการจัดลำดับความคล้ายโดยใช้ยีน 16S rRNA

กลุ่มสกุล *Nitrosospira Nitrosolobus* และ *Nitrosovibrio* โดยมีลักษณะทางสายสัมพันธ์ในเชิงเชื้อสายแบบเดี่ยว (monophyletic) แนบชิดเป็นกลุ่มเดียวกัน สำหรับแบคทีเรียกลุ่ม *Nitrosomonas* ชนิด *N. europaea/ Nc. Mobilis* และสกุล *N. marina* มักพบในวิธีแยกแบบกึ่งก้าน ขณะที่สกุล *N. communis* และสกุล *N. oligotropha* ไม่ได้มีลักษณะทางสายสัมพันธ์ในเชิงเชื้อสายแบบเดี่ยวแนบชิดกันเสมอไป (Koops และคณะ, 2003) (ดังภาพที่ 2.5)

2.2.2 ลักษณะสมบัติและแหล่งที่พบ AOB

การคัดแยกสกุลเป็นจุดเริ่มต้นของการจำแนกสิ่งมีชีวิตออกเป็นหมวดหมู่ โดยเริ่มจำแนกแบบรูปร่างเซลล์เป็นอย่างแรก หลังจากนั้นแยกแบบลักษณะสมบัติ (Characteristics) โดยใช้ข้อกำหนดในการแบ่งสกุล *Nitrosomonas Nitrosococcus Nitrosospira Nitrosolobus* และ *Nitrosovibrio* ตามลักษณะสมบัติ (ดังตารางที่ 2.1) ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็นกลุ่มตามความชอบในสภาวะแวดล้อมของที่อยู่อาศัย

กลุ่มประชากร AOB แต่ละกลุ่มพบได้ที่สภาวะแวดล้อมต่างกัน จากการคัดแยกเชื้อ พบว่าแบคทีเรียพวกแกมมาโพรทีโอแบคทีเรีย (Gammaproteobacterial AOB) พบในน้ำทะเล มหาสมุทร และแบคทีเรียประเภทเบต้าโพรทีโอแบคทีเรีย (Betaproteobacterial AOB) พวกทนต่อสภาวะแวดล้อมที่มีเกลือได้ ได้แก่ สกุล *N. europaea/ Nc. mobilis* และ *N. halophila* สกุลที่พบได้ในระบบบำบัดน้ำเสีย ได้แก่ สกุล *N. europaea/ Nc. mobilis* และ *N. oligotropha* ส่วนสกุลที่ไม่สามารถทนเกลือได้ พบได้ในดิน ได้แก่ สกุล *Nitrosospira* และ *N. communis* พบในน้ำจืด ได้แก่ สกุล *N. oligotropha* (ดังตารางที่ 2.1)



ภาพที่ 2.5 การจัดลำดับความคล้ายโดยใช้นิวคลีโอไทด์ *amoA* ของ AOB ประเภทเบต้าโพรทีโอแบคทีเรีย

(Koops และคณะ, 2003)

2.2.3 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลกระทบต่อประชากร AOB

2.2.3.1 ความเข้มข้นของแอมโมเนีย

AOB แต่ละสกุลเจริญเติบโตได้ดีที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียแตกต่างกัน ซึ่ง AOB ใช้แหล่งพลังงานจากแอมโมเนียและยูเรีย ในการสร้างเซลล์และ AOB แต่ละกลุ่มมีความต้องการแอมโมเนียในการสร้างเซลล์ไม่เท่ากัน เช่น ในการทดลองโดยใช้ตะกอนจุลินทรีย์แบบใช้สายพันธุ์บริสุทธิ์ (Pure culture) สกุล *N. europaea* *N. europaea* *N. europaea* และ *N. communis* เจริญได้ดีในสภาวะที่มีปริมาณแอมโมเนียสูง (ความเข้มข้นแอมโมเนียครึ่งหนึ่งที่ใช้ในการสร้างเซลล์ (K_s) ในช่วง 16.1-32.9 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ส่วนสกุล *N. oligotropha* เจริญได้ดีในสภาวะที่มีปริมาณแอมโมเนียต่ำ (ค่า K_s อยู่ในช่วง 0.4-2.1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) พบได้ในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำ เช่น ดินตะกอนน้ำจืด (Limpiyakorn และคณะ, 2007) เป็นต้น (Koops และคณะ, 2003) (ดังตารางที่ 2.1) และค่า K_s ของสายพันธุ์ *N. europaea* มีค่าในช่วง 12.3-27.4 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (Laanbroek และคณะ, 1994) และ 7.7 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (Habbena และคณะ, 2009) และสกุล *N. oligotropha* ค่า K_s อยู่ในช่วง 0.4-1.1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (Stech และคณะ, 1995) และ 0.7-1.4 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (Bollmann และคณะ, 2002) (ดังตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.1 ลักษณะสมบัติและแหล่งที่พบ AOB กลุ่มต่างๆ (Koops และคณะ, 2003)

Species	G+C (mol%)	Carboxy-somes	Urease activity	Substrate (NH ₃) affinity (K _s in μM)	Maximum ammonia tolerance NH ₄ Cl (in mM; pH 8.0)	Salt requirement	Maximum salt tolerance (in mM)	Preferred habitats
<i>Nitrosomonas europaea</i>	50.6-51.4	-	-		400	-	400	Sewage disposal plants, eutrophic freshwater and brackish water
<i>Nitrosomonas europaea</i>	47.9-48.5	+	-	30-61	600	-	400	
<i>Nitrosomonas halophila</i>	53.8	+	-		400	+	900	
<i>Nitrosococcus mobilis</i>	49.3	-	-		250	+	500	
<i>Nitrosomonas communis</i>	45.6-46.0	-	-	14-43	250	-	250	Soils (not acid) and eutrophic freshwater
<i>Nitrosomonas nitrosa</i>	47.9	+	+	19-46	100	-	300	
<i>Nitrosomonas ureae</i>	45.6-46.0	-	+		200	-	200	Oligotrophic freshwater and natural soils
<i>Nitrosomonas oligotropha</i>	49.4-50.0	-	+	1.9-4.2	50	-	150	
<i>Nitrosomonas marina</i>	47.4-48.0	-	+	50-52	200	+	800	Marine environments
<i>Nitrosomonas aestuarii</i>	45.7-46.3	-	+		400	+	600	
<i>Nitrosomonas cryotolerans</i>	45.5-46.1	-	+	42-59	400	+	550	Marine environments
<i>Nitrosolobus multiformis</i>	53.5	ND	+/-	ND	50	-	200	Soils (not acid)
<i>Nitrosovibrio tenuis</i>	53.9	ND	+/-	ND	100	-	100	Soils, rocks and freshwater
<i>Nitrospira briensis</i>	54	ND	+/-	ND	200	-	250	Soils, rocks and freshwater
<i>Nitrosococcus oceani</i>	50-51	ND	+	ND	1000	+	1100	Marine environments
<i>Nitrosococcus halophilus</i>	50-51	ND	-	ND	500	+	1800	Marine environments and salt lakes

Symbols and Abbreviations: +, present; -, not present; +/-, present in some strains; and ND, no data.

ตารางที่ 2.2 ค่า K_s ของจุลินทรีย์บริสุทธุ์

ชนิดพันธุ์	สายพันธุ์	จุลินทรีย์บริสุทธุ์	
		K_s (มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร)	อ้างอิง
AOB	<i>N. europaea</i>	12.3-27.4	Laanbroek และคณะ, 1994
		7.7	Habbena และคณะ, 2009
	<i>N. oligotropha</i>	0.4-1.1	Stech และคณะ, 1995
		0.7-1.4	Bollmann และคณะ, 2002

2.2.3.2 ความสามารถในการใช้ยูเรีย (Urea activity)

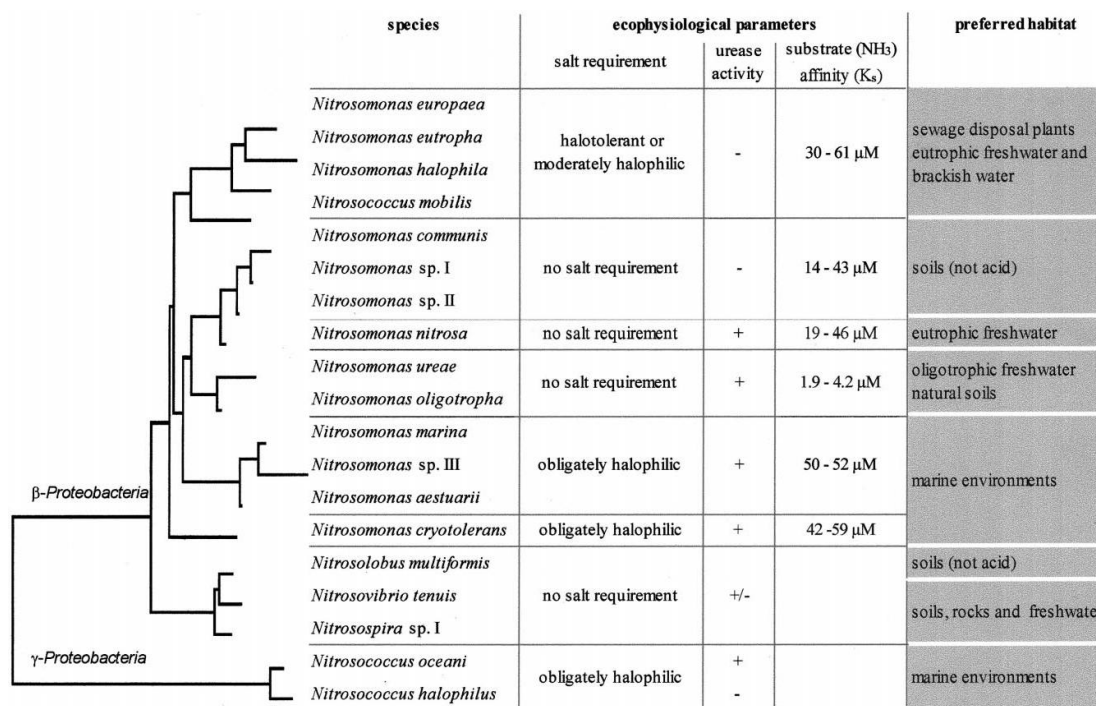
AOB ที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งภายใต้สภาวะที่มียูเรีย ได้แก่ สกุล

N. oligotropha *N. urea* *N. nitrosa* และ *N. marina* และภายใต้สภาวะไม่มียูเรีย ได้แก่ สกุล *N. europaea*

N. eutropha *Nc. mobilis* และ *N. communis* (Koops และคณะ, 2003) (ดังตารางที่ 2.1)

2.2.3.3 การทนต่อสภาพความเค็ม

AOB ประเภทแอมมาโพรทีโอแบคทีเรียทั้งหมดพบในน้ำทะเล ส่วน AOB ประเภทเบต้าโพรทีโอแบคทีเรียที่พบในน้ำทะเล ได้แก่ สกุล *N. marina* *N. aestuarii* และ *N. cryotolerans* และสกุลที่สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่มีเกลือได้ ได้แก่ *N. europaea* *N. eutropha* *N. halophila* และ *Nc. Mobilis* (ดังภาพที่ 2.6)



1%

ภาพที่ 2.6 ปังจัยสิ่งแวดลอมและสถานที่พบของ AOB (Koops และ Pommerening-Röser , 2001)

2.3 แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงอาร์เคีย (Ammonia oxidizing archaea; AOA)

ในอดีตเชื่อกันว่า AOB เป็นสิ่งมีชีวิตเดียวในการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรต์ ในวัฏจักรไนโตรเจน (Nitrogen cycle) แต่เมื่อเวลาไม่นานมานี้พบว่าสิ่งมีชีวิตอีกชนิดที่เรียกว่า อาร์เคีย (Archaea) สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรต์ได้เช่นกัน

เริ่มจาก ปี ค.ศ. 2004 Venter และคณะ ได้ทำ short gun sequence กับจุลินทรีย์ในทะเล Sargasso sea โดยพบยีน *amo* ในอาร์เคีย ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับ AOB การศึกษาในครั้งนี้เป็นครั้งแรกของโลกที่พบ AOA และถือได้ว่าเป็นจุดเปลี่ยนด้านแนวความคิดในการกำจัดแอมโมเนีย และในปีเดียวกันได้มีการศึกษาการกระจายตัวของอาร์เคียซึ่งเป็นโปรคาริโอตทั้งหมดในมหาสมุทรอาร์กติก (Herndl และคณะ, 2005) ต่อมา Treusch และคณะ (2005) พบ Crenarchaeota เป็นอาร์เคียกลุ่มออโตโทรป ที่ใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน (Euryarchaeota เป็นกลุ่มอาร์เคียประเภทเฮเทอโรโทรป ใช้สารอินทรีย์คาร์บอน (organic carbon) เป็นแหล่งคาร์บอน) โดยพบว่าในจุดสำรวจมีอาร์เคีย มากกว่า แบคทีเรีย และพบยีน *amo* ใน Crenarchaeota ในดินตะกอนมหาสมุทร และยืนยันว่าพบยีน *amo* ใน AOA ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Crenarchaeota

Könneke และคณะ (2005) ได้ทำการคัดแยก AOA ในทะเลใต้เป็นครั้งแรกของโลกและเป็น AOA ตัวเดียวที่มีอยู่ในปัจจุบัน โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิใกล้เคียงกับน้ำทะเลในสภาวะที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำและมีดี (โดยตั้งชื่อว่า *Nitrosopumilus maritimus*) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม I.1a และเมื่อนำอาร์เคียชนิดนี้ไปทดสอบว่าเป็น AOA จริงหรือไม่ พบว่าใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงาน เมื่อเวลาเปลี่ยนแปลงไป ความเข้มข้นของแอมโมเนียในน้ำทะเลลดลง แต่จำนวนเซลล์ของอาร์เคียกลับเพิ่มขึ้นและมีความเข้มข้นของไนโตรดักก็เพิ่มขึ้นด้วย และยืนยันว่าอาร์เคียที่แยกออกมาได้นั้นมียีนสำหรับย่อยแอมโมเนีย (ยีน *amo*) การศึกษาต่อมาในน้ำกร่อยก็พบว่ามียีน *amoA* ของ AOA มากกว่า ของ AOB และในปีเดียวกัน Francis และคณะ (2005) พบยีน *amoA* ของ AOA มากกว่ายีน *amoA* ของ AOB ในดินตะกอนทะเลจากทะเลดำและพบ AOA ใน Cluster A ในถังน้ำทะเล (Water column) ตลอดความลึกของน้ำ นอกจากนี้ Beman และ Francis (2006) พบว่า ฤดูกาลมีผลต่อความหลายของ AOA

จากการค้นพบ AOA ในน้ำเค็ม เป็นแนวทางให้เกิดการค้นหา AOA ในดินโดย Leininger และคณะ (2006) พบ AOA ในดินทั้งดินธรรมดาและดินที่ใช้ปุ๋ย ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้พบว่าในดินธรรมดาและดินที่ใช้ปุ๋ยมียีน *amoA* ของ AOA มากกว่ายีน *amoA* ของ AOB และที่ความลึกของชั้นดินทุกตัวอย่างยิ่งลึกลงไปเรื่อยๆ อัตราส่วนของจำนวนยีน *amoA* ของ AOA ต่อจำนวนยีน *amoA* ของ AOB เพิ่มขึ้น เนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องออกซิเจนในดินที่มีผลต่อการทำงานของ AOB Wuchter และคณะ (2006) พบจำนวนยีน *amoA* ของ Crenarchaeota มากกว่ายีน *amoA* ใน AOB ในชายฝั่ง North Sea ที่ความลึกมากกว่า 1,000 เมตร และ Beman และ Francis (2006) พบว่าในเขตปากอ่าวทะเล Behia del Tóbari ประเทศเม็กซิโก พบจำนวน ยีน *amoA* ของ AOA มากกว่า ยีน *amoA* ใน AOB และเมื่อไม่นานมานี้ Habbena และคณะ (2009) ได้ศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของ AOA ในถังน้ำทะเล (Aquarium tank) โดยมีค่า K_m ใกล้เคียงกันกับสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียในน้ำทะเล จึงแสดงให้เห็นว่าสิ่งมีชีวิตที่ทำหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนโตรดักในน้ำทะเลที่แท้จริงน่าจะเป็น AOA มากกว่าที่จะเป็น AOB

ต่อมามีการศึกษา AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียโดยเริ่มจาก Park และคณะ (2006) ได้ศึกษาการมีอยู่ของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง โดยศึกษาในระบบบำบัดน้ำเสียที่เก็บตะกอนจุลินทรีย์และระยะเวลาที่เก็บน้ำเป็นระยะเวลานาน AOA ที่พบนั้นอยู่ใน Cluster D ในสกุล Crenarchaeota ต่อมา Zhang และคณะ (2009) ศึกษาการปรากฏของ AOA ในระบบตะกอนเร่งในห้องปฏิบัติการและในระบบบำบัดน้ำเสียจริงในประเทศฮ่องกงเพื่อเป็นการยืนยันการพบ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง หลังจากเดินระบบ 30 วัน พบ AOA ทั้งในระบบบำบัดน้ำเสียจริงและระบบบำบัดน้ำเสียในห้องปฏิบัติการ และ Wells และคณะ (2009) ได้ศึกษาความสัมพันธ์

ของจุลินทรีย์ที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียกับแอมโมเนียที่ถูกกำจัดไปในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง โดยทำการนับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียระบบเดียว พบว่าจำนวน *amoA* ของ AOB มากกว่า AOA มาก ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า AOB มีผลต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนีย และ AOA ไม่มีผลต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนียแต่อย่างใด และผลการทดลองในประเทศไทย Limpiyakorn และคณะ (2011) ค้นพบยีน *amoA* ของ AOA มากกว่ายีน *amoA* ของ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนของกรุงเทพมหานครหลายระบบ แต่ไม่พบยีน *amoA* ของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียสูงเลย

2.3.1 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลกับ AOA

2.3.1.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมามีผลต่อจำนวน AOA ในน้ำทะเล โดยในฤดูหนาวทางตอนเหนือของชายฝั่ง North Sea พบว่ามี 16S rDNA ของ Crenarchaeota และยีน *amoA* ของ AOA ในฤดูหนาวมากกว่าฤดูร้อน (Wuchter และคณะ, 2006)

2.3.1.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิสูงหรือต่ำไม่มีผลกระทบต่อกลุ่มประชากร AOA โดย AOA สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 0.2-97 องศาเซลเซียส (Erguder และคณะ, 2009) ซึ่งค้นพบในสภาวะตั้งแต่ 4 องศาเซลเซียส (Non-Thermophilic) ในเขตปากอ่าวทะเล (Erguder และคณะ, 2009) และพบที่อุณหภูมิปกติ (Könneke และคณะ, 2005; Wuchter และคณะ, 2006 และ Zhang และคณะ, 2009) ต่อมาพบว่า AOA สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูง (Thermophilic) Hatzenpichler และคณะ (2008) พบ AOA ที่น้ำพุร้อน ซึ่งมีอุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส แต่ไม่พบ AOB ทั้งการตรวจวัดโดยวิธีการโคลนนิ่งและวิธี Fluorescence In Situ Hybridization และ De La Torre และคณะ (2008) พบ AOA ชนิดพันธุ์ *Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii* ที่บ่อน้ำร้อนในอุทยานแห่งชาติเยลโลสโตน ซึ่งมีอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เหตุที่เป็นเช่นนี้ อาจเป็นเพราะอาร์เคีย ซึ่งเป็นบรรพบุรุษของ AOA พบครั้งแรกที่บ่อน้ำร้อนในอุทยานแห่งชาติเยลโลสโตน (Woese และคณะ, 1978) ต่อมาได้วิวัฒนาการตามลำดับทำให้ AOA สามารถดำรงชีวิตได้ที่อุณหภูมิสูง

2.3.1.3 ความเข้มข้นของแอมโมเนีย

ความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำส่งผลให้การเจริญเติบโตของกลุ่มประชากร AOA ดีกว่าการเจริญเติบโตของกลุ่มประชากร AOB แต่ในสภาวะที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงส่งผลทำให้กลุ่มประชากร AOB สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่ากลุ่มประชากร AOA ดังนั้นความเข้มข้นของแอมโมเนียจัดเป็นปัจจัยจำกัด (Limiting Factor) ซึ่งในการเจริญเติบโตของ AOA ในน้ำเค็มหรือระบบนิเวศที่มีแอมโมเนียในระบบน้อยๆ (Könneke และคณะ, 2005) การศึกษาครั้งแรก Venter และคณะ (2004) พบยีน *amo* ในอาร์เคียจากการทำ short gun sequence จากน้ำตัวอย่างในทะเล Sargasso Sea จึงเป็นแนวความคิดให้เริ่มมีการศึกษา AOA ในสภาพแวดล้อมต่างๆ เริ่มจาก Könneke และคณะ (2005) ได้ทดลองคัดแยก AOA ในทะเล ซึ่งพบ AOA ในน้ำจากชายฝั่งทะเล ที่มีเข้มข้นของแอมโมเนียน้อยกว่า 0.00042–1.4 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และในทะเลเปิด ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียน้อยกว่า 0.42–14 ไมโครกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (Könneke และคณะ, 2005; Wuchter และคณะ, 2006 และ Beman และ Francis, 2008 อ้างถึงใน Erguder และคณะ, 2009) Beman และ Francis (2006) ศึกษาความหลากหลายของ AOA และ AOB ในดินตะกอนที่ปากอ่าวทะเลในประเทศเม็กซิโก พบว่า ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนีย 0.308-1.288 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร จำนวนยีน *amoA* ของ AOA มากกว่า จำนวนยีน *amoA* ของ AOB De La Torry และคณะ (2008) พบ AOA ที่บ่อน้ำร้อนในอุทยานแห่งชาติเยลโลสโตน ที่มีแอมโมเนีย 1.33 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และการศึกษาเรื่องจลนพลศาสตร์ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA และ AOB ในน้ำทะเล พบว่า AOA มีค่า K_m น้อยกว่า AOB และใกล้เคียงกับค่า K_m ในกระบวนการไนตริฟิเคชันในน้ำทะเลมากกว่า ค่า K_m ของ AOB ดังนั้น AOA น่าจะจึงเป็นตัวการสำคัญในกระบวนการออกซิไดซ์แอมโมเนียในน้ำทะเล (Habbena และคณะ, 2009)

2.3.1.4 ความเค็ม

ความเค็มส่งผลต่อสายพันธุ์ของกลุ่มประชากร AOB แต่ส่งผลไม่ชัดเจนต่อการดำรงชีวิตของ AOA ซึ่งพบกลุ่มประชากร AOA ในน้ำทะเล ดิน น้ำกร่อย และในถังเดิมอากาศของระบบบำบัดน้ำเสีย แต่ไม่มีรายงานที่พบ AOA ในแหล่งน้ำจืด AOA ค้นพบครั้งแรกในถังน้ำทะเลของทะเล Sargasso (Venter และคณะ, 2004) ต่อมา Könneke และคณะ (2005) ได้คัดแยก AOA ในทะเลได้เป็นครั้งแรกในโลกและเป็นชนิดพันธุ์เดียวที่มีอยู่ในปัจจุบัน โดย สามารถแยกอาร์เคียได้เพียงสกุลเดียว ตั้งชื่อว่า *Nitrosopumilus maritimus* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม I.1a และในปีเดียวกัน Francis และคณะ (2005) ศึกษา ยีน *amoA* ของ AOA ในดินตะกอนในทะเล และในถังน้ำทะเล จากทะเลดำ โดยในดินตะกอนทางตอนกลางของอ่าว San Francisco มีค่าความเค็ม 30.5 psu และในดินตะกอน

ทางตอนเหนือของอ่าว San Francisco มีค่าความเค็ม 0.5 psu พบว่า จากการโคลน Sequence มีจำนวน *amoA* ของอาร์เคียในตะกอนทางตอนเหนือมากกว่าตะกอนทางตอนกลางของอ่าว Beman และ Francis (2006) พบยีน *amoA* ของ AOA มากกว่า AOB ในเขตปากอ่าวทะเล Behia del Tabori ประเทศเม็กซิโก ซึ่งมีค่าความเค็มประมาณ 36 psu และ Wuchter และคณะ (2006) พบยีน *amoA* ของ Crenarchaeota ในชายฝั่ง North Sea ซึ่งเป็นทะเลเปิด (ค่าความเค็มมากกว่า 27 psu) และพบว่า Crenarchaeota มีความสำคัญต่อกระบวนการไนตริฟิเคชันในทะเลมากกว่าแบคทีเรีย (Bacterial Nitrifiers)

2.3.1.5 ความเข้มข้นของออกซิเจน

AOA สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาพที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนตั้งแต่ต่ำจนกระทั่งสูง ซึ่งในงานวิจัยของ Francis และคณะ (2005) พบ AOA ในถ้ำน้ำทะเล ในเขตที่มีออกซิเจนละลายที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 3.1 ไมโครกรัมต่อลิตร ต่อมา Park และคณะ (2006) พบว่าระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง ที่ควบคุมค่าความเข้มข้นของออกซิเจนละลายต่ำกว่า 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนของ AOA มากกว่า AOB ส่วนระบบบำบัดแบบตะกอนเร่งที่ควบคุมค่าความเข้มข้นของออกซิเจนละลายมากกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองไม่พบ AOA และจากงานวิจัยของ Wells และคณะ (2009) พบ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่ควบคุมความเข้มข้นของออกซิเจนในระดับ 3.1-4.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากงานวิจัยข้างต้นจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของออกซิเจนส่งผลไม่ชัดเจนต่อ AOA ในกระบวนการออกซิไดซ์แอมโมเนีย

2.3.1.6 แหล่งคาร์บอน (Carbon Source)

AOA จัดเป็นจุลินทรีย์ประเภทออโตโทรฟ โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน จากงานวิจัยของ Herndl และคณะ (2005) พบว่า Crenarchaeota ใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน และ Euryarchaeota ใช้คาร์บอนอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน และในงานวิจัยของ De La Torre และคณะ (2008) ได้ศึกษาอาร์เคียในบ่อน้ำร้อนในเขตอุทยานแห่งชาติเยลโลสโตน พบ *Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii* ใช้แหล่งคาร์บอน จากไบคาร์บอนเนตเพียงแหล่งเดียวในการกระบวนการออกซิไดซ์แอมโมเนีย

2.3.1.7 อินทรีย์วัตถุ (Organic matter)

อินทรีย์วัตถุเป็นตัวขัดขวางการเจริญเติบโตของกลุ่มประชากร AOA โดย Könneke และ คณะ (2005) ได้ทำการคัดแยก AOA โดยการเติมสารประกอบอินทรีย์ (Organic compound) ที่ความเข้มข้นน้อยๆ ลงไปในน้ำทะเลตัวอย่าง พบว่า อินทรีย์วัตถุเป็นตัวขัดขวางการเจริญเติบโตของ AOA และในงานวิจัยของ He และคณะ (2007) ได้ศึกษากลุ่มประชากร AOA ในดินปกติและดินที่มีการใส่ปุ๋ยชนิดต่างๆ พบว่า ในดินที่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและมีอินทรีย์วัตถุผสมอยู่ พบจำนวนยีน *amoA* ของ AOA ใกล้เคียงกับยีน *amoA* ของ AOB แต่ในตัวอย่างดินควบคุมที่ไม่ใส่ปุ๋ยและในดินที่ใส่ปุ๋ยชนิดต่างๆ แต่ไม่ใส่อินทรีย์วัตถุ พบจำนวนยีน *amoA* ของ AOA มากกว่า AOB

2.3.1.8 พีเอช (pH)

AOA สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ที่พีเอช 2.5-9.0 จากงานวิจัยของ De La Torre และ คณะ (2008) พบยีน *amoA* ของ AOA ในสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง (Thermophilic) และมีค่าพีเอช 9.0 นอกจากนี้ Nicol และ Schleper (2008) ยังพบจำนวนยีน *amoA* ของ AOA มากกว่าจำนวนยีน *amoA* ของ AOB ในดินที่มีค่าพีเอช 4.9-7.5 พบว่าค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้จำนวนยีน *amoA* ของกลุ่มประชากร AOA ลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น นอกจากนี้ช่วงพีเอชดังกล่าว พบว่า ในดินที่พีเอชต่ำกว่า 6.5 ทำให้ยีน *amoA* ของกลุ่มประชากร AOB ลดลงอย่างเห็นได้ชัด และจากการรวบรวมและอภิปรายของ Erguder และคณะ (2009) พบว่าในสิ่งแวดล้อมที่มีพีเอช ตั้งแต่ 3.7 จนถึง 8.6 และในสิ่งแวดล้อมที่มีพีเอชต่ำกว่า 6.5 ส่งผลให้กลุ่มประชากร AOB ลดลงอย่างชัดเจน ดังนั้นพีเอชต่ำและสูงเกินไปจึงมีผลทำให้จำนวนประชากร AOA ลดลง

2.3.1.9 ระยะเวลาที่กักเก็บน้ำและระยะเวลาที่กักเก็บตะกอนจุลินทรีย์

ระยะเวลาที่กักเก็บน้ำและระยะเวลาที่กักเก็บตะกอนจุลินทรีย์มีผลไม่ชัดเจนต่อกลุ่มประชากร AOA ในงานวิจัยของ Park และคณะ (2006) พบว่า ระยะเวลาที่กักเก็บน้ำและระยะเวลาที่กักเก็บตะกอน จุลินทรีย์โดยใช้เวลานาน คือ ใช้เวลามากกว่า 15 วัน และมากกว่า 24 ชั่วโมง ตามลำดับ พบ AOA อยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง ต่อมา Zhang และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาซ้ำอีกครั้ง แต่ในการศึกษารั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือ ในระบบบำบัดน้ำเสียที่ควบคุมระยะเวลาที่กักเก็บน้ำที่ 6.8 ชั่วโมง ที่ระยะเวลาที่กักเก็บตะกอนจุลินทรีย์ที่ 14.2 วัน และในระบบบำบัดน้ำเสียที่ควบคุมระยะเวลาที่กักเก็บน้ำ 22 ชั่วโมง ที่ระยะเวลาที่กักเก็บตะกอนจุลินทรีย์ที่ 11 วัน พบ ยีน *amoA* ของ AOA ทั้ง 2 ระบบ ดังนั้นระยะเวลาที่กักเก็บน้ำและระยะเวลา

กักเก็บตะกอนจุลินทรีย์จึงไม่มีข้อมูลชัดเจนว่าใช้ระยะเวลาานานหรือไม่ ในการพบกลุ่มประชากร AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง

2.3.1.10 ซัลไฟด์

ซัลไฟด์ขัดขวางการทำงานของยีน *amo* ใน AOB แต่ยังไม่มียารายงานถึงการขัดขวางการทำงานของยีน *amo* ใน AOA จากการศึกษา AOA ในสภาวะแอนีอ็อกซิกและในสภาวะไร้อากาศ (Anaerobic) มีไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) เกิดขึ้นและมีแอมโมเนีย ในทะเล Black Sea พบ AOA ในกลุ่ม I.1a ตามระดับความลึกลงไปของชั้นดินตะกอน ทั้งในการตรวจวัดยีน 16S rRNA และยีน *amoA* และไม่พบ AOB ในส่วนของผลกระทบของซัลไฟด์ต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนีย AOB (Coolen และคณะ, 2007) ซึ่งเป็นการทำซ้ำที่ก่อนหน้านี้ Kuypers และคณะ (2003) พบ anammox bacteria เป็นตัวออกซิไดซ์แอมโมเนีย ที่ความลึกของดินตะกอนที่สภาวะเกือบจะไร้ออกซิเจนในทะเล Black Sea ต่อมา Caffrey และคณะ (2007) พบ AOA ในน้ำทะเลที่มีซัลไฟด์ 0.1 ถึง 0.5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งโดยทั่วไปซัลไฟด์ถูกกำจัดโดยซัลไฟด์ออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย (Sulfide oxidizing bacteria) ในระบบไร้อากาศ ซึ่งในอดีตได้พบอาร์เคียแบคทีเรีย (Archaeobacteria) เป็นครั้งแรกในบ่อ น้ำร้อนในอุทยานแห่งชาติเยลโลสโตน ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่เจริญได้ดีในถิ่นที่มีกำมะถันสูง (Sulfolobus) (Woese และคณะ, 1978) ทำให้มีการวิเคราะห์หว่า AOA อาจมีเอนไซม์หรือยีนเฉพาะ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ *Sulfolobales* ที่ทำให้พวกมันสามารถเจริญเติบโตและออกซิไดซ์แอมโมเนียได้ในสภาวะที่มีซัลไฟด์ (Erguder และคณะ, 2009)

2.3.1.11 ฟอสเฟต

ฟอสเฟตไม่ส่งผลต่อการทำงานของกลุ่มประชากร AOA โดยปัจจุบันยังไม่พบงานวิจัยที่อธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างฟอสเฟตกับการทำงานของ AOA (Erguder และคณะ 2009) แต่ในขณะนี้พบเพียงว่า AOA สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำเค็มที่มีฟอสเฟต จากงานของ Köneke และ คณะ (2005) สามารถคัดแยกชนิดพันธุ์ AOA ได้จากตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของฟอสเฟต 0.29 ไมโครโมลาร์ ปนอยู่ในน้ำทะเล Erguder และคณะ (2009) ทำการรวบรวมและอภิปรายเรื่องศึกษากลุ่มประชากร AOA ในน้ำทะเลที่มีฟอสฟอรัสอินทรีย์ละลายน้ำ (Dissolve Organic Phosphorus; DOP) ในช่วงความเข้มข้น 0.01 ถึง 2.43 ไมโครโมลาร์ และฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.02 ถึง 0.85 ไมโครโมลาร์ พบยีน *amoA* ของ Crenarchaeota

2.4 ปริมาณสัมพันธ์และจลนพลศาสตร์ของแบคทีเรีย (Bacterial stoichiometry and kinetics)

การทบทวนเอกสารในงานวิจัยนี้จะกล่าวถึงปริมาณสัมพันธ์และจลนพลศาสตร์ของแบคทีเรียกลุ่มออโตโทรปเป็นส่วนใหญ่อันได้แก่ สมการปริมาณสัมพันธ์สำหรับการเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียชุมชนทางชีวภาพในรูปแบบใช้ออกซิเจน สมการปริมาณสัมพันธ์ของแบคทีเรียกลุ่มออโตโทรป สมการสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มออโตโทรป และสมการในการหาอายุตะกอน มีรายละเอียดดังนี้ (ชลธิพร สุทธิธรรม, 2549)

2.4.1 สมการปริมาณสัมพันธ์สำหรับการเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียชุมชนทางชีวภาพในรูปแบบใช้ออกซิเจน

สมการปริมาณสัมพันธ์สำหรับการเติบโตของจุลินทรีย์ทั้งหมดเกิดจาก 3 สมการย่อย คือ สมการแสดงปฏิกิริยาสังเคราะห์เซลล์ใหม่ (R_c) สมการแสดงปฏิกิริยาสำหรับตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor, R_a) และสมการแสดงปฏิกิริยาสำหรับตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor, R_d) ซึ่งสามารถรวมกันเป็นสมการปริมาณสัมพันธ์รวม (R) ดังนี้

$$R = R_d - f_c R_a - f_s R_c \quad (\text{Grady และคณะ, 1998}) \quad (2.1)$$

เมื่อ f_c = สัดส่วนของตัวให้อิเล็กตรอนที่ใช้ในการผลิตพลังงาน (ไม่มีหน่วย)

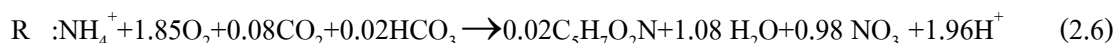
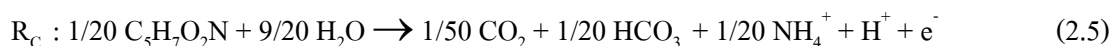
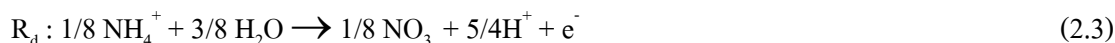
f_s = สัดส่วนของตัวให้อิเล็กตรอนที่ใช้สังเคราะห์เซลล์ (ไม่มีหน่วย)

$$\text{โดยที่} \quad f_c + f_s = 1.0 \quad (2.2)$$

และ $f_s = Y$ เมื่อหน่วยของค่าคงที่ของการเจริญเติบโต
g-CellCOD/g-SubstrateCOD

2.4.2 สมการปริมาณสัมพันธ์ของแบคทีเรียกลุ่มออโตโทรป (Autotrophs)

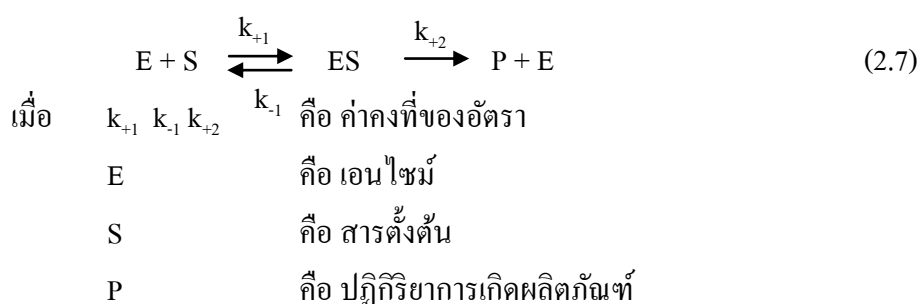
ในการสังเคราะห์เซลล์ ($C_5H_7O_2N$) ของแบคทีเรียกลุ่มออโตโทรปแบบใช้ออกซิเจนจะใช้แอมโมเนีย (NH_4^+) เป็นตัวให้อิเล็กตรอนและใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน โดยที่ใช้ค่าคงที่การเจริญเติบโต (yield) เท่ากับ 0.053 g-Cell COD/g-Substrate COD ซึ่งจะได้ค่า f_c เท่ากับ 0.947 และ f_s เท่ากับ 0.053 ซึ่งมาจาก AOB เป็นหลัก (Metcalf และ Eddy, 2003) ได้สมการปริมาณสัมพันธ์รวมของแบคทีเรียกลุ่มออโตโทรปเป็นดังนี้



2.4.3 จลนพลศาสตร์สำหรับการย่อยสลายสารและการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มอโอโตโทรป

2.4.3.1 สมการของ Michaelis-Menten (Michaelis-Menten enzyme kinetics)

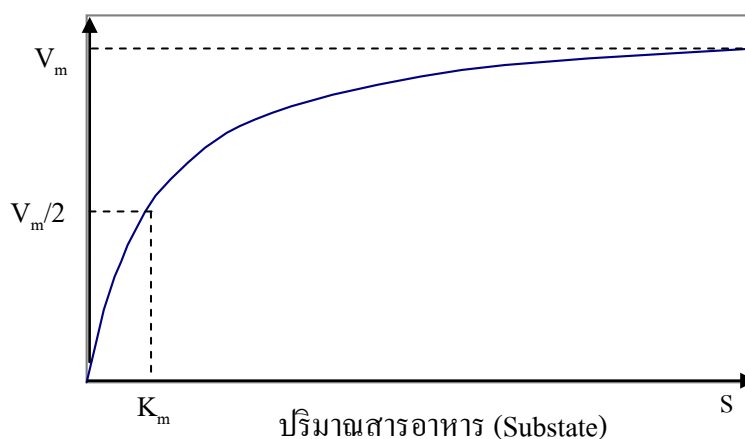
Michaelis และ Menten ได้เสนอจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งเอาไว้ว่า เอนไซม์ (E) รวมตัวกับสารตั้งต้นหรือสับสเตรต (S) เกิดเป็น ES คือ เอนไซม์-สารตั้งต้นเชิงซ้อน (enzyme-substrate complex) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาแบบย้อนกลับ มีค่าคงที่ของอัตราเท่ากับ k_{+1} และ k_{-1} สำหรับปฏิกิริยาไปข้างหน้า และปฏิกิริยาย้อนหลังตามลำดับ การแยกสลายตัว ES เป็นปฏิกิริยาของการเกิดผลิตภัณฑ์ (P) และเอนไซม์ (E) กลับคืนมา ซึ่งเป็นปฏิกิริยาแบบไม่ย้อนกลับที่มีค่าคงที่ของอัตราเท่ากับ k_{+2} ดังสมการ (2.7) (Goodman, 2010) เมื่ออธิบายเป็นอัตราเร็วในการใช้สารเพื่อย่อยสลายสารตั้งต้นแล้วจะได้ตามสมการ (2.8) และเมื่อนำสมการที่ (2.8) มาจัดทำการหาอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการย่อยสลายสารตั้งต้นสูงสุดของจุลินทรีย์ต่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เปลี่ยนแปลงไป ตามสมการของ Michaelis-Menten จะได้อัตราที่ 2.7



ซึ่งสรุปเป็นสมการของ Michaelis-Menten

$$V = \frac{V_m \cdot S}{K_m + S} \quad (2.8)$$

- เมื่อ V = อัตราเร็วในการย่อยสลายสารตั้งต้น, ความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่อเวลา
- V_m = อัตราเร็วสูงสุดในการย่อยสลายสารตั้งต้น, ความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่อเวลา
- K_m = ความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ต้องการสำหรับเอนไซม์เป็นครึ่งหนึ่งของความเร็วในการย่อยสลายสารสูงสุด, ความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่อปริมาณสารตั้งต้น
- S = ความเข้มข้นของสารตั้งต้น, ความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่อปริมาณของสารตั้งต้น



ภาพที่ 2.7 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการย่อยสลายสารตั้งต้นสูงสุดของจุลินทรีย์ต่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เปลี่ยนแปลงไป ตามสมการของ Michaelis-Menten

2.4.3.2 สมการของ Monod (Monod growth kinetics)

Monod ได้ศึกษาถึงจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ดังสมการ (2.9) ที่ปริมาณสารตั้งต้นต่าง ๆ กัน มีเส้นโค้งคล้ายกับลักษณะปฏิกิริยาชีวเคมีของเอนไซม์กับสารตั้งต้น ดังแสดงไว้ในสมการที่ (2.7) ซึ่งสมการที่แสดงปฏิกิริยาชีวเคมีดังกล่าวถูกสร้างโดย Michaelis-Menten ดังสมการ (2.8) ซึ่งเอนไซม์ในปฏิกิริยาชีวเคมี คือ ตัวแทนจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสีย (จารุณี, 2545) ซึ่งจากสมการ (2.9) สามารถนำมาจัดทำกราฟอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดของจุลินทรีย์ต่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เปลี่ยนแปลงไป ดังภาพที่ 2.8

$$\mu = R_S Y = \frac{\mu_m \cdot S}{K_S + S} \quad (2.9)$$

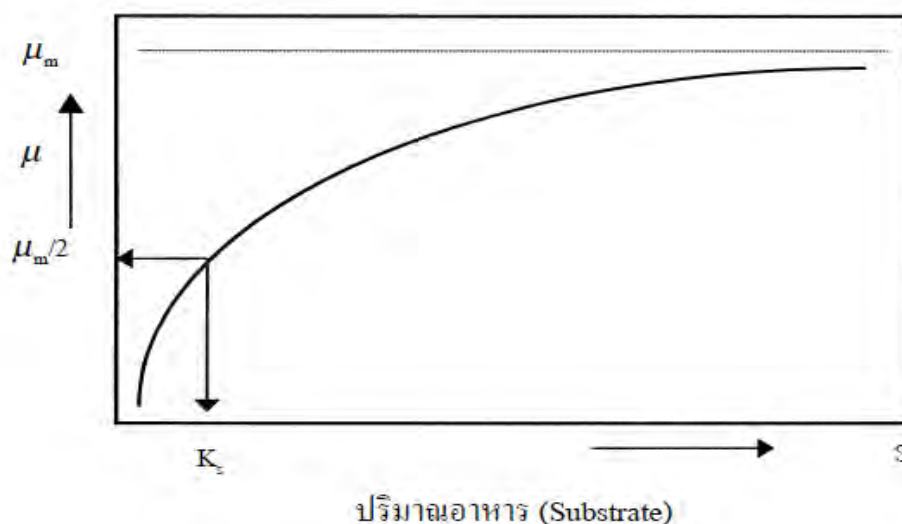
เมื่อ : μ = อัตราการเจริญเติบโต, 1/เวลา

R_S = อัตราการใช้สารตั้งต้น, มิลลิกรัมของสารตั้งต้นต่อมิลลิกรัมของจุลินทรีย์ต่อเวลา

Y = yield ของจุลินทรีย์, มิลลิกรัมของจุลินทรีย์ต่อมิลลิกรัมของสารตั้งต้น

μ_m = ค่าอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดของจุลินทรีย์, 1/เวลา

K_S = ค่าคงที่ตามสมการของ Monod หรือความเข้มข้นของสารตั้งต้น ณ จุดที่มีค่า μ เท่ากับ $0.5 \mu_m$, มิลลิกรัมของสารตั้งต้นต่อปริมาตรสารตั้งต้น



ภาพที่ 2.8 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดของจุลินทรีย์ต่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เปลี่ยนแปลงไปตามสมการของ Monod (จารุณี เรียมพิมพ์, 2545)

ดังนั้นความแตกต่างระหว่างสมการ Michaelis-Menten และ สมการ Monod คือ สมการ Michaelis-Menten เป็นการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้สารตั้งต้นเพื่อกระตุ้นเอนไซม์ของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารตั้งต้นและความเข้มข้นของสารตั้งต้น แต่สมการ Monod เป็นการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์และปริมาณสารตั้งต้นที่ใช้

2.4.4 ค่าจลนพลศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีววิทยา

ค่าจลนพลศาสตร์ของระบบบำบัดน้ำเสียทางชีววิทยาเกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับสารอาหารที่มีอยู่ในน้ำเสีย กล่าวคือจุลินทรีย์ใช้สารอาหารเหล่านี้ในการเจริญเติบโต โดยที่จุลินทรีย์แต่ละประเภทใช้สารอาหารที่แตกต่างกันไป เช่น จุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งแบคทีเรียใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงาน เป็นต้น

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า K_s ของจุลินทรีย์แต่ละประเภทกับปริมาณสารอาหารในน้ำเสีย (Limpiyakorn และคณะ, 2007) ในส่วนของการจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจน คือ เมื่อน้ำเสียมีปริมาณสารอาหารมากกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่มีค่า K_s สูงจะเจริญเติบโตได้ดี เนื่องจากต้องการสารอาหารเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตมากจึงมีจำนวนเพิ่มขึ้นจนแทนที่กลุ่มประชากรที่มีค่า K_s ต่ำ จนกลายเป็นประชากรเด่นในระบบบำบัดน้ำเสียนั้นๆ และในทางกลับกันกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่มีความต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโตต่ำ จะมีค่า K_s ต่ำ ดังนั้นในน้ำเสียที่มีสารอาหารต่ำกลุ่มประชากรจุลินทรีย์กลุ่มนี้จึงเป็นกลุ่มประชากรเด่น

2.5 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสแบบเวลาจริง (Real-Time Polymerase Chain Reaction; Real-Time PCR)

ปฏิกริยา Real-time PCR เป็นวิธีที่พัฒนามาจากปฏิกริยา PCR โดยอาศัยหลักการพื้นฐานเดียวกันในเรื่องการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมหรือยีนของสิ่งมีชีวิต แต่มีข้อแตกต่างกัน คือ ปฏิกริยา Real-time PCR ผลที่ได้ออกมาจะเป็นไปในเชิงปริมาณ กล่าวคือ ปฏิกริยานี้สามารถคำนวณจำนวนยีนที่ต้องการออกมาได้เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน แต่ผลของปฏิกริยา PCR จะเป็นไปในเชิงคุณภาพเนื่องไม่สามารถนับได้จึงต้องนำตัวอย่างที่ผ่านปฏิกริยานี้แล้วไปทำการต่อด้วยวิธีการโคลนนิ่ง (Clone Library) และ/หรือวิธีการ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ต่อจากนั้นทำการถอดรหัสพันธุกรรมต่อไปเพื่อให้ทราบสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ

2.5.1 ส่วนประกอบของปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

2.5.1.1 แม่พิมพ์ (Template)

แม่พิมพ์ คือแม่แบบของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน ซึ่งในที่นี้คือดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการศึกษา

2.5.1.2 ไพร์เมอร์ (Primer)

ไพร์เมอร์ คือ ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่จับคู่กับปลายของแม่พิมพ์ทั้ง 2 ด้าน คือ 3' เป็นหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) ที่สามารถต่อกับนิวคลีโอไทด์อื่นได้

2.5.1.3 Tag DNA polymerase

Tag DNA polymerase คือ เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ต่อสายดีเอ็นเอ ทนความร้อนสูง (93 ถึง 95 องศาเซลเซียส) ได้

2.5.1.4 นิวคลีโอไทด์

นิวคลีโอไทด์ มี 4 ชนิด คือ (A-adenine, C-cytosine, G-guanine และ T-thymine) ต่อกันเป็นดีเอ็นเอสายใหม่

2.5.1.5 เครื่องทำปฏิกิริยา PCR (Thermal cycler)

เครื่องทำปฏิกิริยา PCR เป็นเครื่องเปลี่ยนอุณหภูมิแบบอัตโนมัติ เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

2.5.2 หลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (PCR) คือ เทคนิคการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ โดยที่ปฏิกิริยาประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักของการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่วนไปวนมา 30 ถึง 40 รอบ ในเครื่อง thermal cycler (อโนทัย โภคาธิกรณ์, 2549)

2.5.2.1 การทำให้สายดีเอ็นเอคลายเกลียว (Denaturing)

สายดีเอ็นเอจะคลายเกลียวได้ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส โดยที่ความร้อนจะไปทำลายพันธะระหว่างนิวคลีโอไทด์ ทำให้สายพันธุกรรมที่ม้วนเกลียวอยู่เป็นสายคู่แยกออกจากกันเป็นเส้นเดี่ยว 2 เส้น และที่อุณหภูมินี้ปฏิกิริยาต่างๆจากเอนไซม์ในรอบก่อนหน้านั้นจะสิ้นสุดลง

2.5.2.2 การทำให้สายดีเอ็นเอเข้าคู่กับไพร์เมอร์โดยใช้ความร้อน (Annealing)

หลังจากดีเอ็นเอเปลี่ยนดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวแล้ว จากนั้นอุณหภูมิจะลดลงมาจนอยู่ที่ประมาณ 40-60 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะจับเข้าคู่ได้กับไพร์เมอร์ที่เข้าไปเกาะติดกับแม่พิมพ์และเตรียมเป็นตัวตั้งต้นต่อสายคู่ของแม่พิมพ์ต่อไป

2.5.2.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (Extension)

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเกิดขึ้นหลังจากดีเอ็นเอสายเดี่ยวจับคู่กับไพรเมอร์เรียบร้อยแล้ว โดยอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นจากเดิมเป็นอุณหภูมิ 68-72 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ทำให้มีการนำเบสต่างๆ มาต่อทางด้าน 3' ของไพรเมอร์ โดยต่อให้ครบถ้วนกับตอนหนึ่งของดีเอ็นเอบนแม่พิมพ์ที่ไพรเมอร์มาเกาะไว้ โดยอุณหภูมิที่ใช้เหมาะสมกับ Taq DNA Polymerase ต่อจากนั้นจะเข้าสู่กระบวนการในข้อ 2.5.2.1 จนถึงข้อ 2.5.2.3 วนเวียนไปหลายๆ รอบ จนกลายเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่

2.5.3 วิธีการติดตามการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ

2.5.3.1 สีเรืองแสง (Fluorescent dyes)

สารเปล่งแสง (Fluorochrome) สามารถซึมเข้าไปในดีเอ็นเอสายคู่ได้ในขั้นตอนการทำให้สายดีเอ็นเอเข้าคู่กับไพรเมอร์โดยใช้ความร้อน และสามารถตรวจจับสีเรืองแสงได้ที่ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ กล่าวคือ ในระหว่างขั้นตอนทำให้สายดีเอ็นเอคลายเกลียว ดีเอ็นเอทั้งหมดจะกลายเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ที่สถานะนั้นสารเรืองแสงจะอยู่อย่างอิสระในสารละลาย ต่อในระหว่างขั้นตอนการทำให้สายดีเอ็นเอเข้าคู่กับไพรเมอร์โดยใช้ความร้อน ไพรเมอร์จะผสมกับลำดับเบสเป้าหมายกลายเป็นดีเอ็นเอสายคู่ทำให้สารเรืองแสงสามารถซึมเข้าไปได้ และเมื่อสิ้นสุดขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ สีเรืองแสงซึมเข้าสู่ดีเอ็นเอสายคู่มากพอและเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอุลตราไวโอเลตเครื่อง Real-time PCR ก็สามารถตรวจนับจำนวนสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ได้ แต่ถ้าเดิมไพรเมอร์มากเกินไปจะเกิดการจับคู่กันเองระหว่างไพรเมอร์ หรือที่เรียกว่า Primer-dimer สีเรืองแสงก็จะซึมเข้าสู่ดีเอ็นเอสายคู่ต่างๆ ได้เช่นเดียวกัน ทำให้ค่าที่ได้ผิดพลาด

2.5.3.2 การใช้โพรบ (Probe)

การเปล่งแสงของโพรบเนื่องจากฉลากเรืองแสงที่ติดมา เมื่อโพรบเข้าไปเกาะติดกับไพรเมอร์ในขั้นตอนการทำให้สายดีเอ็นเอเข้าคู่กับไพรเมอร์ โพรบจะเปล่งแสงออกมา หลักการทำงานของโพรบโพรบ มีดังนี้ โพรบประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ตัวรายงานสัญญาณ (Reporter) และตัวเปล่งแสง (Quencher) เมื่อโพรบเข้าไปเกาะติดกับไพรเมอร์ในขั้นตอนการทำให้สายดีเอ็นเอเข้าคู่กับไพรเมอร์โดยใช้ความร้อน ฉลากเรืองแสงที่ติดไว้จะเปล่งแสงและส่งสัญญาณไปยังตัวรายงานสัญญาณภายในเครื่องปฏิกิริยา Real-time PCR การเรืองแสงของโพรบเกิดจากไพรเมอร์และลำดับเบสคู่สมยังเข้าคู่กัน ดังนั้นการใช้โพรบเป็นวิธีที่สามารถคำนวณค่าออกมาได้

แม่นยำมากกว่าการใช้สารเรืองแสง เนื่องจากโพรบไม่สามารถอ่านสัญญาณของดีเอ็นเอสายคู่ที่เกิดจากการจับคู่กันเองของไพร์เมอร์หรือดีเอ็นเอแม่แบบได้ เพราะขนาดเส้นของดีเอ็นเอสายคู่มีขนาดสั้นกว่าโพรบ ดังนั้นตัวส่งสัญญาณที่ติดมากับโพรบจึงไม่ทำงาน

ชนิดของ Hydrolysis probe เช่น Taqman probe และ Molecular Beacon

Taqman probe

โพรบมีตัวเปล่งแสง 2 แบบ ในส่วนการเรืองแสงของการรายงานโปรตีน (Green Fluorescent Protein; GFP) ขณะที่โพรบผูกติดหรือเป็นอิสระต่อแม่พิมพ์ดีเอ็นเอและก่อนการกระทำของพอลิเมอร์เรสส่วนที่ไม่เปล่งแสง ในด้านของตัวเปล่งแสง (โดยทั่วไปสีจะแสดงขึ้นที่ความยาวคลื่นยาว เช่น สีแดง) ลดลง การเรืองแสงจากตัวรายงาน ตัวเปล่งแสง (โดยทั่วไปสีจะแสดงเมื่อความยาวคลื่นสั้น เช่น สีเขียว) สีของตัวรายงานจะพบที่สิ้นสุด 5' และโพรบที่ไม่เปล่งแสงจะพบที่สิ้นสุด 3'

Molecular Beacons

Molecular Beacons คือ ดีเอ็นเอสายเดี่ยวโอลิโกนิวคลีโอไทด์จากโครงสร้างเป็นแบบห่วงและมีก้าน (stem-and-loop) ห่วงบรรจุโพรบ ลำดับเบสเหมาะสมต่อลำดับเบสเป้าหมาย และก้านเป็นรูปแบบทำให้ไพร์เมอร์จับกับสายดีเอ็นเอโดยใช้ความร้อน ความสมบูรณ์ของแขน ลำดับเบส นั่นคือแต่ละข้างของลำดับเบสของโพรบ molecular beacons จะไม่เรืองแสงในขณะที่โพรบเป็นอิสระในสารละลาย อย่างไรก็ตามโพรบจะผสมกับกรดนิวคลีอิกที่บรรจุลำดับเบสเป้าหมาย สอดคล้องกับการเปลี่ยนความสามารถของโพรบเองที่มีต่อความสว่างของสารเรืองแสง ถ้าไม่ใช่ดีเอ็นเอเป้าหมาย โพรบจะไม่เรืองแสง เพราะก้านที่มีตัวเปล่งแสงติดอยู่จะไม่เรืองแสง การเปล่งแสงของโพรบจะมีการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนแบบชั่วคราว (Tyagi และ Kramer, 1996)

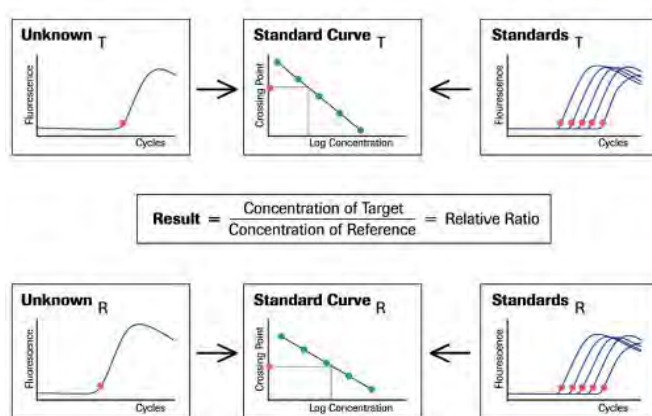
2.5.4 ลักษณะการใช้งานเครื่อง Real-Time PCR

การใช้งานเครื่อง Real-time PCR แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะใหญ่ คือ

2.5.4.1 การใช้งานในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

การวัดปริมาณสีเรืองแสงจากตัวเปล่งแสง (Fluorephore) ใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณเนื่องจากสามารถเห็นการเพิ่มของจำนวนดีเอ็นเอ เนื่องจากในระหว่างการเพิ่มจำนวนของ

ดีเอ็นเอในแต่ละรอบเครื่องปฏิบัติการ Real-time PCR มีการนับจำนวนดีเอ็นเอเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากจำนวนดีเอ็นเออ้างอิงที่ทราบจำนวน ตลอดเวลาที่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละรอบ ซึ่งจอบประมวลผลจะแสดงออกมาในรูปแบบกราฟเส้นรูปตัวเอส (S shape) และเป็นกราฟระหว่างสีเรืองแสงกับจำนวนรอบของการทำปฏิริยาถูโกโซ่ (ดังภาพที่ 2.9) (พัชนียา ธรรมวงศ์, 2551)



ภาพที่ 2.9 ขั้นตอนหลักการในการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณสัมพัทธ์ (พัชนียา ธรรมวงศ์, 2551)

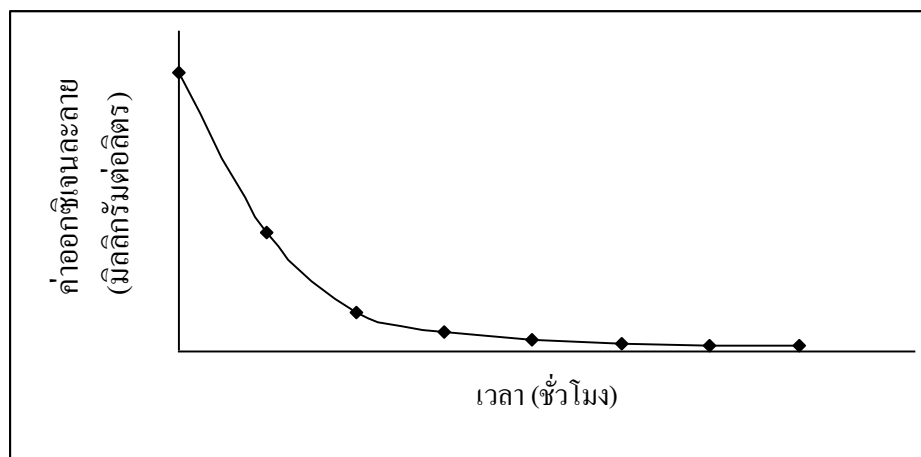
2.5.4.2 การวิเคราะห์ Melting Curve

ในการใช้สารเรืองแสงในปฏิบัติการ Real-time PCR สารเรืองแสงสามารถซึมเข้าสู่ดีเอ็นเอสายสั้นๆ ได้ ทำให้การนับจำนวนเกิดการผิดพลาดได้ ดังนั้นการวิเคราะห์ melting curve เป็นทำให้ดีเอ็นเอสายสั้นๆที่มีการซึมของสารเรืองแสงแยกออกจากกัน โดยเพิ่มอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 65-75 องศาเซลเซียส โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ประมวลผลแล้วทำเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสีเรืองแสงที่เปลี่ยนแปลงไปต่ออุณหภูมิ (dF/dT) กับอุณหภูมิ (T) โดยจะให้ค่าสูงสุดที่อุณหภูมิต่ำ

2.6 วิธีเรสไปโรเมตริกและการหาค่าจลนพลศาสตร์

วิธีเรสไปโรเมตริก เป็นวิธีการวัดการหายใจของจุลินทรีย์แบบใช้ออกซิเจน โดยควบคุมความเข้มข้นของออกซิเจนเริ่มต้นให้มากเกินพอสำหรับการหายใจของจุลินทรีย์ในระบบ จากนั้นศึกษาในระบบปิด โดยปิดฝาเพื่อไม่ให้ออกซิเจนจากภายนอกเข้าสู่ระบบและใช้เครื่องวัดค่า

การใช้ออกซิเจนละลาย วัดอัตราการใช้ออกซิเจนต่อระยะเวลาที่เปลี่ยนแปลงไปจนกว่าค่าออกซิเจนที่อยู่ในระบบลดลงจนกระทั่งคงที่ (ดังภาพที่ 2.10)



ภาพที่ 2.10 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าออกซิเจนละลายที่เปลี่ยนแปลงไปต่อเวลา

การหาค่าจลนพลศาสตร์ในการศึกษาจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียสามารถแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 กรณี คือ การศึกษาตามสมการ Michaelis-Menten และตามสมการ Monod การศึกษาโดยใช้วิธีเรสไปโรเมตริกนี้จะใช้การศึกษาตามสมการ Monod ซึ่งใช้หาความสัมพันธ์ของการใช้สารเพื่อกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เพื่อย่อยสลายสารตั้งต้นต่อการย่อยสลายสารตั้งต้น โดยในวิธีเรสไปโรเมตริกนี้ สารที่กระตุ้นเอนไซม์ของจุลินทรีย์คือ ออกซิเจน ดังนั้นจึงใช้ความสัมพันธ์ของกราฟความสัมพันธ์ของออกซิเจนต่อเวลาที่เปลี่ยนแปลงไป (ดังภาพที่ 2.10) และความเข้มข้นของแอมโมเนียที่เปลี่ยนแปลงไปในระบบ โดยการวัดแอมโมเนียขณะเริ่มต้นและ ณ เวลาที่สิ้นสุดการทดลอง จากนั้นนำค่าจากทั้ง 2 ส่วน มาทำกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วในการใช้ออกซิเจนต่อสารตั้งต้นที่เปลี่ยนแปลงไป (ดังภาพที่ 2.7) โดยการทดลอง 1 ชุด จะได้ 1 จุดบนเส้นกราฟ (Carvallo, 2002 และ Rongsayamanont, 2010)

บทที่ 3

แผนการดำเนินงานและวิธีการวิจัย

3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย

การทดลองนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ขั้นตอน ได้แก่

การทดลองตอนที่ 1 การเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์และนับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA AOB *N. oligotropha* และ 16S rRNA ของ *N. europaea*

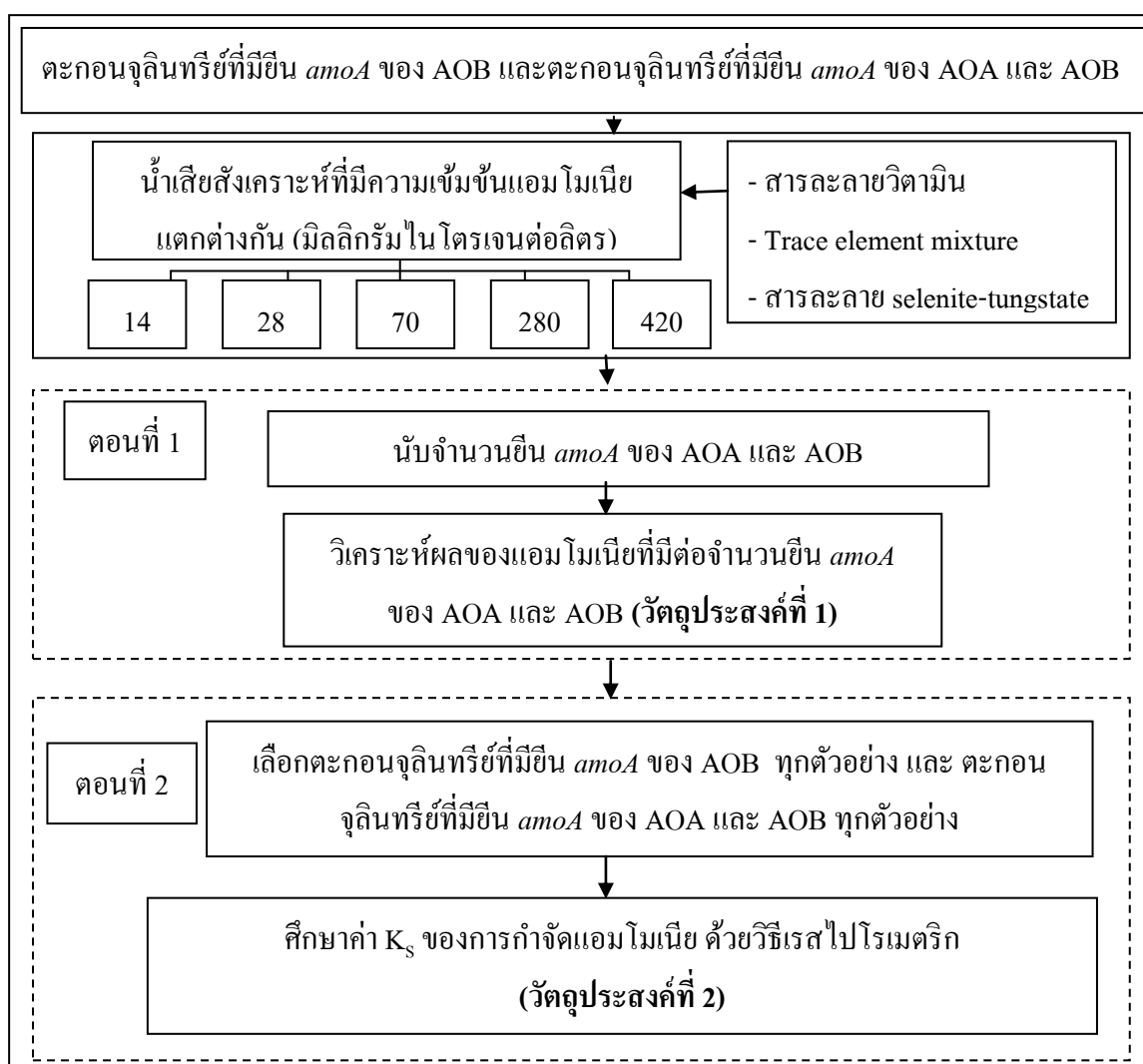
ศึกษาผลของแอมโมเนียที่มีต่อจำนวนยีน *amoA* ของ AOA AOB *N. oligotropha* และ 16S rRNA ของ *N. europaea* โดยใช้เครื่อง Real-Time PCR ซึ่งเลือกใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์จากโรงบำบัดน้ำเสียหนองแขมและโรงบำบัดน้ำเสียดินแดงเพื่อเป็นตัวแทนของหัวเชื้อจากระบบบำบัดน้ำเสียที่มีเฉพาะ AOB และมีทั้ง AOA และ AOB โดยจากการนับจำนวนยีนในเบื้องต้นพบว่า หัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์จากโรงบำบัดน้ำเสียหนองแขมมียีน *amoA* ของ AOB เพียงอย่างเดียว และหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์จากโรงบำบัดน้ำเสียดินแดงมีจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ใกล้เคียงกัน

หลังจากนั้นนำตะกอนจุลินทรีย์จากโรงบำบัดน้ำเสียทั้ง 2 โรงมาเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ผสมแบบแบทช์ โดยใช้ น้ำเสียสังเคราะห์จำนวน 5 ถึง จำนวน 2 ชุด โดยชุดการทดลองที่ 1 (Set1) นำหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์มาจากโรงบำบัดน้ำเสียหนองแขม และชุดการทดลองที่ 2 (Set2) นำหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์มาจากโรงบำบัดน้ำเสียดินแดง มาเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ที่มีค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียแตกต่างกัน คือ 14 28 70 280 และ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร จากนั้นดำเนินการเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ เติมสารอาหารจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของ AOA และ AOB ความคุมพีเอชที่ 7.0-7.5 และค่าออกซิเจนละลาย มากกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์จนกว่าจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB คงที่ในถังปฏิกรณ์ที่มีปริมาตรน้ำ 5 ลิตร (ดังภาพที่ 3.1) ในระหว่างการเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์จะเก็บตัวอย่างตะกอน จุลินทรีย์ไปนับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA AOB *N. oligotropha* และ 16S rRNA ของ *N. europaea* ในทุกถังปฏิกรณ์ ด้วยวิธี Real-time PCR กลุ่มประชากร AOB สายพันธุ์ *N. oligotropha* และ *N. europaea* เป็นสายพันธุ์เด่นที่อยู่ในระบบบำบัดน้ำเสีย (Koops และคณะ, 2003) โดยถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1 ทำการจำนวนยีนของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ในสัปดาห์ที่ 3 และ 5 ในส่วนของถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2 ทำการจำนวนยีนของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ในสัปดาห์ที่ 2 4 และ 6 และนำจำนวนยีน *amoA* ของ AOA AOB *N. oligotropha* และ 16S rRNA ของ *N. europaea* ที่นับได้มาเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นของ

แอมโมเนียในแต่ละถัง และเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ของ AOB รวมกับจำนวนรวมของ *N. oligotropha* กับ *N. europaea* เพื่อเป็นการตรวจสอบไพรเมอร์

การทดลองตอนที่ 2 การศึกษาค่าจลนพลศาสตร์

นำผลทดลองในตอนต้นที่ 1 มาศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ ในการกำจัดแอมโมเนียของจุลินทรีย์แบบผสมที่มีกลุ่มประชากร AOA และ AOB ที่แตกต่างกัน ด้วยวิธีการเรสไปโรเมตริก โดยการเลือกตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่มีจำนวนยีน *amoA* ของ AOB เพียงชนิดเดียว และในถังปฏิกรณ์ ที่มียีน *amoA* ของ AOA และ AOB อยู่ด้วยกัน (ดังภาพที่ 3.1) ซึ่งในส่วนของ การศึกษาค่าจลนพลศาสตร์นั้น จะทำการหาค่า K_s จากนั้นนำค่าที่ได้มาอธิบายความสัมพันธ์กับกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียโดยใช้สมการ Monod



ภาพที่ 3.1 แผนผังขั้นตอนการดำเนินงาน

3.2 ขั้นตอนการเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์

การเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์ ทำการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบแบทช์ ซึ่งน้ำเสียที่ใช้เป็นน้ำเสียสังเคราะห์ มีการเก็บตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์และตัวอย่างน้ำเพื่อวิเคราะห์พารามิเตอร์ที่สำคัญ โดยมีส่วนผสมและขั้นตอน ดังนี้

3.2.1 น้ำเสียสังเคราะห์

การเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์

1. สารละลายผสม nonchelated trace element ประกอบด้วย

น้ำกลั่นปราศจากไอออน	987	มิลลิลิตร
กรดไฮโดรคลอริก (HCl) 25%	12.5	มิลลิลิตร
สารละลายแมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2 \cdot 6H_2O$)	5	กรัม
สารละลายแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 7H_2O$)	40	มิลลิกรัม
นิกเกิลคลอไรด์ ($NiCl_2$)	24	มิลลิกรัม
คอปเปอร์คลอไรด์ ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$)	36	มิลลิกรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	2100	มิลลิกรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	30	มิลลิกรัม
โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	190	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	144	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	36	มิลลิกรัม
ส่วนผสมทุกองค์ประกอบต้องผ่านการฆ่าเชื้อเบื้องต้น ใช้ครั้งละปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่อลิตร		

2. สารละลายวิตามิน 1 มิลลิลิตรต่อลิตร ประกอบด้วย

โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Sodium phosphate buffer)	10	มิลลิโมลาร์
พีเอช 7.1–7.4		
อะมิโนเบนโซอิกแอซิด (4-aminobenzoic acid)	40	มิลลิกรัม
ดี-ไบโอติน (D-biotin)	10	มิลลิกรัม
นิโคตินิกแอซิด (nicotinic acid)	100	มิลลิกรัม
แคลเซียม-ดี เพนโทธีเนต (Calcium D-pantothenate)	50	มิลลิกรัม
พริดอกไซด์ ไดไฮโดรคลอไรด์ (pyridoxide dihydrochloride)	15	มิลลิกรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนจนได้ปริมาตร

1 ลิตร

3. สารละลายวิตามินบี 12 ประกอบด้วย

ไซยาโนโคบาลามิน (cyanocobalamin) 5 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายวิตามินบี 1 ประกอบด้วย

ไทอะมีน คลอไรด์ ไดไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine chloride dihydrochloride) 10 มิลลิกรัม
ละลายใน 100 มิลลิลิตรของโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Sodium phosphate buffer) 25 มิลลิโมลาร์
พีเอช 3.4 สารละลาย

5. สารละลายน้ำเสียสังเคราะห์พื้นฐาน ประกอบด้วย

น้ำกลั่นปราศจากไอออน	1	ลิตร
โปแตสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.05	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.4	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัม

6. สารละลายซีลีเนียมทั้งสเตท (selenite-tungstate) 1 มิลลิลิตรต่อลิตร ประกอบด้วย

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	400	มิลลิกรัม
โซเดียมเซเลไนท์ ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	6	มิลลิกรัม
โซเดียมทั้งสเตท ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	8	มิลลิกรัม

ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 1 ลิตร (Widdle และ Bak, 1992)

7. สารละลายไบคาร์บอเนตเข้มข้น 1 โมลาร์ ควบคุมค่าพีเอช 7.0 ถึง 7.5 โดยใช้ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaOH) และสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ปรับค่าพีเอช (Könneke และคณะ, 2005) และใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ความเข้มข้น 14 28 70 280 และ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (1.0 2.0 5.0 20.0 และ 30.0 โมลาร์) ตามลำดับ เป็นแอมโมเนีย

3.2.2 ถังปฏิกรณ์แบบแบทช์

การเตรียมถังปฏิกรณ์แบบแบทช์ทุกถัง มีขนาด 5 ลิตร (ดังภาพที่ 3.2) ควบคุมค่าพีเอช ที่ 7.0 ถึง 7.5 และค่าออกซิเจนละลายมากกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยถังปฏิกรณ์ทั้ง 5 ถัง มีความเข้มข้นแอมโมเนียแตกต่างกัน ระยะเวลาเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์น้อยกว่าจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์ถังที่ ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1 (AOB) ใช้ระยะเวลาการกักเก็บน้ำเท่ากับระยะเวลาการกักเก็บตะกอนจุลินทรีย์ 5 วัน และถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2 (AOA+AOB) ใช้ระยะเวลาการกักเก็บตะกอนจุลินทรีย์ 15 วัน และระยะเวลาการกักเก็บน้ำ 5 วัน



ภาพที่ 3.2 ถังปฏิกรณ์แบบแบทช์ที่ใช้ในการทดลอง

3.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของถังปฏิกรณ์ผสมแบบแบทช์

3.2.3.1 การเก็บตัวอย่างน้ำ

สุ่มตัวอย่างน้ำจากถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ชุด โดยเก็บตัวอย่างน้ำทุกๆ 5 วัน โดยถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ชุด นำน้ำออกจากถังปฏิกรณ์ปริมาตร 2.5 ลิตรในวันที่ 2 ของการเริ่มต้นแบทช์และวันที่ 5 ของการเริ่มต้นแบทช์ โดยเก็บตัวอย่างน้ำจากทุกถังปฏิกรณ์มาตรวจวัดปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรตที่เปลี่ยนแปลงไปโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ

3.2.3.2 การเก็บตะกอนจุลินทรีย์

สุ่มตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ชุด เพื่อนำมานับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA AOB *N. oligotropha* และยีน 16S rRNA ของ *N. europaea* โดยถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1 ทำการนับจำนวนยีนต่างๆในสัปดาห์ที่ 3 และ 5 ในส่วนของถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2 ทำการนับจำนวนยีนต่างๆในสัปดาห์ที่ 2 4 และ 6

3.2.4 วิธีการวิเคราะห์

3.2.4.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำก่อนการวัด

การเตรียมตัวอย่างน้ำสำหรับวัดความเข้มข้นแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรต ทำโดยนำตัวอย่างไปกรอง และใช้กระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำน้ำตัวอย่างที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองแล้วไปตรวจวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 วิธีการตรวจวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ

พารามิเตอร์	วิธีการตรวจวัด	ความถี่ในการวิเคราะห์
แอมโมเนีย	ฟินด	5 วันต่อครั้ง
ไนไตรต์	คัลเลอร์รีเมตริก	5 วันต่อครั้ง
ไนเตรต	อูลตราไวโอเลตสเปกโตรโฟโตเมตริกสกรีนิง	5 วันต่อครั้ง
ค่าออกซิเจนละลาย	เครื่องวัดค่าออกซิเจนละลาย (DO meter)	ทุกวัน
พีเอช	เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter)	ทุกวัน

3.2.4.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นแอมโมเนีย

ใช้น้ำตัวอย่างที่กรองแล้วตามข้อ 3.2.4.1 ตวงตัวอย่างน้ำที่ผ่านการกรองแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอลปริมาตร 40 ไมโครลิตร สารละลายโซเดียมไนโตรปริสต์ไฮดรอกไซด์ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และเติมสารละลายออกซิไดซ์ซิงรีเอเจนต์ (oxidizing reagent) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสีที่อุณหภูมิห้อง 22 – 27 องศาเซลเซียส ในที่ๆ แสงไม่จ้าอย่างน้อย 1 ชั่วโมง สีที่เกิดขึ้นจะอยู่ตัว 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร เตรียมแบลนค์ และสารละลายมาตรฐานอย่างน้อย 2 ความเข้มข้น ให้อยู่ในช่วงของเส้นตรงกราฟมาตรฐาน ของสารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย ในการวิเคราะห์ให้ทำทุกอย่างเหมือนตัวอย่าง (APHA และคณะ, 2005)

3.2.4.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นไนไตรต์

ใช้น้ำตัวอย่างที่กรองแล้วตามข้อ 3.2.4.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายซัลฟานิลาไมด์ (Sulfanilamide) 20 ไมโครลิตร และสารละลาย 1-naphthyl-ethylene diamine (NED) 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที สีที่ได้จะเป็นสีชมพู นำไปวัดค่าทรานสมิตแดนซ์ วัดด้วยเครื่องอูลตราไวโอเลต สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร เตรียมแบลนค์ และสารละลายมาตรฐานอย่างน้อย 2 ความเข้มข้น ให้อยู่ในช่วงของเส้นตรงกราฟมาตรฐาน ของสารละลายมาตรฐานไนไตรต์ ในการวิเคราะห์ให้ทำทุกอย่างเหมือนตัวอย่าง (APHA และคณะ, 2005)

3.2.4.4 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นไนเตรต

ใช้น้ำตัวอย่างที่กรองแล้วตามข้อ 3.2.4.1 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 220 นาโนเมตร และ 275 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอูลตราไวโอเลต สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เตรียมแบลนค์ และสารละลายมาตรฐานอย่างน้อย 2 ความเข้มข้น ให้อยู่ในช่วงของเส้นตรงกราฟมาตรฐาน ของสารละลายมาตรฐานไนเตรต ในการวิเคราะห์ให้ทำทุกอย่างเหมือนตัวอย่าง (APHA และคณะ, 2005)

3.2.4.5 การวัดค่าออกซิเจนละลาย

ใช้เครื่องวัดค่าออกซิเจนละลาย (Hanna instrument, Thailand) ในการวัดโดยนำโพรบจุ่มน้ำตัวอย่างแล้วอ่านค่าที่ได้

3.2.4.6 การวัดค่าพีเอช

ใช้เครื่องวัดค่าพีเอช (Eutech pH Testr 30, Singapore) ในการวัดโดยนำโพรบจุ่มน้ำตัวอย่างแล้วอ่านค่าที่ได้

3.3 การศึกษาผลของแอมโมเนียที่มีต่อจำนวนยีน amoA ของ AOA และ ของ AOB โดยใช้เครื่อง Real-Time PCR ในการนับจำนวนยีน amoA

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

ชั่งตะกอนจุลินทรีย์ตัวอย่าง 0.2 มิลลิกรัม MLSS ต่อลิตร ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร สกัดโดยใช้ Fast DNA SPIN Kit for soil (Sonthiphand และ Limpiyakorn, 2010)

ตรวจสอบตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis บน 2% Agarose gel (รายละเอียดวิธีสกัดแสดงในภาคผนวก ก)

3.3.2 การนับจำนวนยีน *amoA* และการเตรียมส่วนผสมสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาของ TaqDNA Polymerase

ใช้เครื่อง Real-Time PCR (Stratagene, USA รุ่น Mx3500) สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene, USA) (ประกอบด้วย QPCR master mix 12.5 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร ไพร์เมอร์ 0.4 ไมโครลิตร ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์สูง (ultra pure DI water) จนได้ปริมาตร 25 ไมโครลิตร) อุณหภูมิและเวลาของเครื่อง real-time PCR ที่ใช้ในการนับจำนวน *amoA* ของ AOA และ AOB คือ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที มีช่วง Denature ที่ 95 องศาเซลเซียส 60 วินาที ช่วง Annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที ช่วง Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 40 รอบ ทำการนับจำนวนที่ 78 องศาเซลเซียส 15 วินาที ในส่วนของ *Nitrosomonas oligotropha* คือ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที มีช่วง Denature ที่ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที ช่วง Annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส 60 วินาที ช่วง Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 35 รอบ ทำการนับจำนวนที่ 78 องศาเซลเซียส 15 วินาที (Harms และคณะ, 2003) และ *Nitrosomonas europaea* คือ 94 องศาเซลเซียส 10 นาที มีช่วง Denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที ช่วง Annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที ช่วง Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที จำนวน 35 รอบ ทำการนับจำนวนที่ 78 องศาเซลเซียส 15 วินาที (Lim และคณะ, 2008) โดยที่ดีเอ็นเอที่สกัดได้ จะถูกนับจำนวนด้วยเครื่อง real-time PCR ซึ่งไพร์เมอร์ที่เลือกใช้ (ดังตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2 ไพร์เมอร์สำหรับการนับจำนวนยีนของ AOA และ AOB

ชนิดพันธุ์	สายพันธุ์	ยีนเป้าหมาย	ชื่อไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	อ้างอิง
AOA	AOA ทั้งหมด	<i>amoA</i>	Arch-amoAF	STAATGGTCTG GCTTAGACG	Francis และคณะ (2005)
			Arch-amoAR	GCGGCCATCC ATCTGTATGT	Francis และคณะ (2005)
AOB	AOB ทั้งหมด	<i>amoA</i>	amoA-1F	GGGGTTTCTAC TGGTGGT	Rotthauwe และคณะ (1997)
			amoA-2R	CCCCTCKGSAA AGCCTTCTTC	Rotthauwe และคณะ (1997)
	<i>N. oligotropha</i>	<i>amoA</i>	amoNo550D2f	TCAGTAGCYG ACTACACMGG	Harms และคณะ (2003)
			amoNo754r	CTTTAACATAG TAGAAAGCGG	Harms และคณะ (2003)
	<i>N. europaea</i>	16S rRNA	NSMeur-828F	GTTGTTCGGATC TAATTAAG	Lim และคณะ (2008)
			NSMeur-1028R	TGTCTTGGCTC CCTTTC	Lim และคณะ (2008)

หมายเหตุ ลำดับนิวคลีโอไทด์ S คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ G หรือ C
 ลำดับนิวคลีโอไทด์ R คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ A หรือ G
 ลำดับนิวคลีโอไทด์ K คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ G หรือ T
 ลำดับนิวคลีโอไทด์ Y คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ C หรือ T
 ลำดับนิวคลีโอไทด์ M คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ A หรือ C

การเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐาน (Standard solution)

ดีเอ็นเอมาตรฐาน เตรียมขึ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายมาตรฐานที่ทราบจำนวน โดยเตรียม ดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีจำนวนดีเอ็นเอ สำหรับยีน *amoA* ของ AOA ใช้ AOA-S-4 (Acosson number) ในช่วง 2.7×10 ถึง 2.7×10^7 ตัวต่อมิลลิกรัมไมโครลิตร (Sonthiphand และ Limpiyakorn, 2010) ส่วนยีน *amoA* ของ AOB ใช้ AOB-NAS10-360-4 (Acosson number) ในช่วง 6.32×10 ถึง 6.32×10^7 ตัวต่อมิลลิกรัมไมโครลิตร ยีน 16SrRNA ของ *N. europaea* ใช้ 5.61×10 ถึง 5.61×10^7 และยีน *amoA* ของ *N. oligotropha* ในช่วง 2.09×10 ถึง 2.09×10^7 โดยที่ AOB 1 ตัว มียีน *amoA* เฉลี่ย 2.5 ยีน *N. oligotropha* 1 ตัว มียีน *amoA* เฉลี่ย 2 ยีน และ *N. europaea* 1 ตัว มีจำนวนยีน 16S rRNA เฉลี่ย 1 ยีน เท่ากับ 1 ตัว (Aakra และคณะ, 1999 และ Norton และคณะ, 2002)

3.4 การศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของแอมโมเนีย ได้แก่ K_s และ μ_m ในการกำจัดแอมโมเนียด้วย

จุลินทรีย์แบบผสมด้วยวิธีเรสไปโรเมตริก

มีอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลองดังนี้

อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องวัดออกซิเจนละลาย WTW รุ่น Oxi 730

ขวดแก้วรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

เครื่องคอมพิวเตอร์

โปรแกรม SIGMA PLOT V.11

เครื่องปั่นเหวี่ยง

สารละลาย ATU (Allylthiourea)

สารละลาย โซเดียมไนไตรด์ (NaN_3)

วิธีการทดลอง

การทดลองนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด ชุดการทดลองละ 2 ซ้ำ คือ ชุดที่ 1 ชุดการทดลองควบคุม (Control) ชุดการทดลองนี้ใช้ ATU ความเข้มข้น 86 ไมโครโมลาร์ เพื่อยับยั้งการทำงานของ AOB และ NaN_3 ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เพื่อยับยั้งการทำงานของ NOB ตามลำดับ (Ginestet และคณะ, 1998) และการทดลองชุดที่ 2 ยับยั้งการทำงานเฉพาะ NOB (เติมเฉพาะ NaN_3) ทั้ง 2 ซ้ำ

1. นำตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ปริมาณ 100 มิลลิกรัม MLSS ต่อลิตร ลงในขวดเพื่อนำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เเทน้ำใสทิ้งแล้วเติมด้วยน้ำเสียสังเคราะห์ที่ไม่มีแอมโมเนียและไนโตรเจนเป็นจำนวน 3 ครั้ง เพื่อล้างเอาแอมโมเนีย ไนโตรเจนและไนเตรตที่ติดมากับตะกอนจุลินทรีย์ออกไป

2. นำตะกอนจุลินทรีย์ที่ล้างเรียบร้อยแล้วมาใส่ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ไม่มีแอมโมเนีย เติม ATU และไนโตรเจนในชุดการทดลองควบคุม (ชุดการทดลองที่ 1) ในน้ำเสียสังเคราะห์ ปริมาตร 700 มิลลิลิตรแล้วเติมอากาศเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนมีปริมาณออกซิเจนที่มากเกินไป (ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 7-8 มิลลิกรัมต่อลิตร)

3. เติมแอมโมเนียจนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ ในการทดลองชุด 2 แล้วเทใส่ขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 250 มิลลิลิตรจนเต็มขวด แล้วปิดฝาขวด จากนั้นใช้เครื่องวัดค่าออกซิเจนละลาย วัดค่าออกซิเจนละลายที่เปลี่ยนแปลงไป โดยใช้เครื่องวัดออกซิเจนละลาย WTW รุ่น Oxi 730 ตรวจวัดค่าความเข้มข้นของออกซิเจนเริ่มต้น

4. วัดค่าความเข้มข้นออกซิเจนที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละขวดตลอดระยะเวลาทำการทดลอง

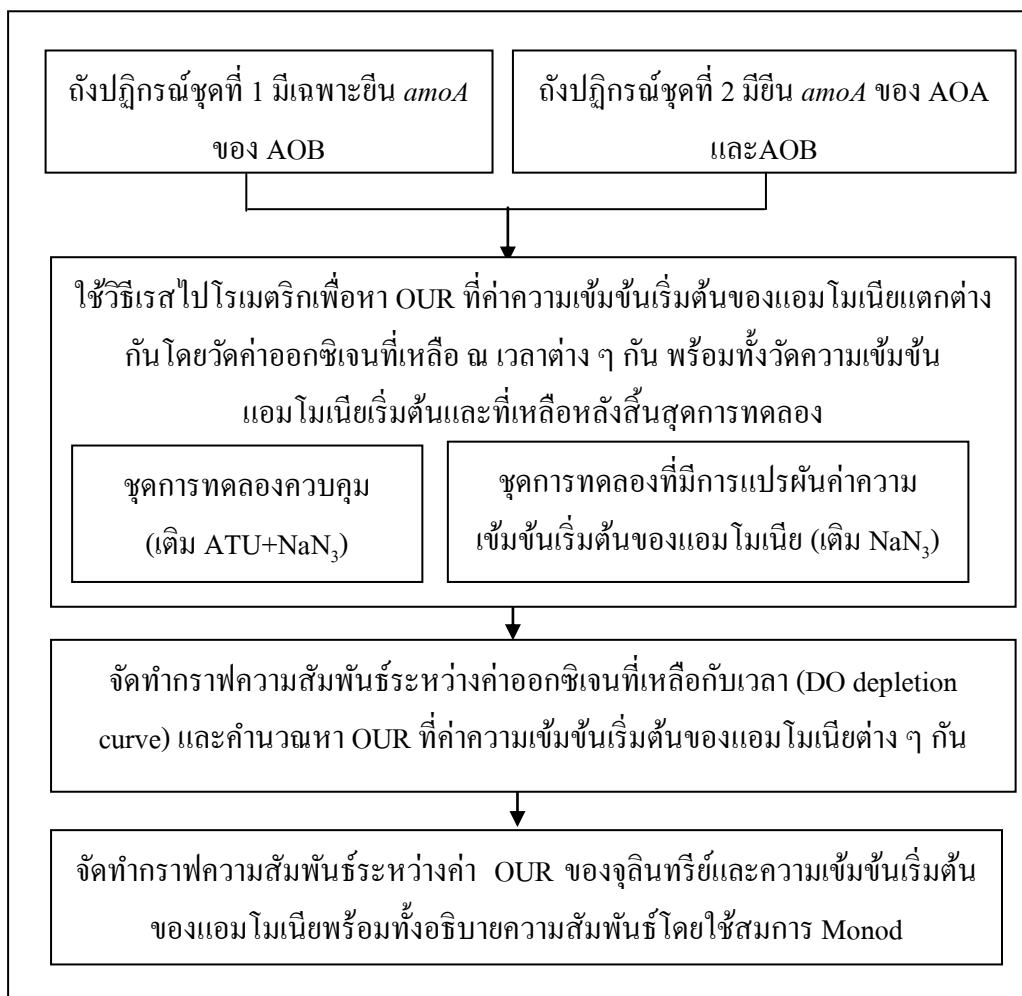
5. เมื่อสิ้นสุดการทดลองตรวจวัดค่าแอมโมเนีย ไนโตรเจนและไนเตรตที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละขวด เพื่อเป็นการยืนยันปฏิกิริยาออกซิไดซ์แอมโมเนียที่เกิดขึ้นในระบบ

6. จัดทำกราฟความเข้มข้นของออกซิเจนที่เปลี่ยนแปลงไปต่อเวลา

7. นำค่าจากกราฟในข้อที่ 6 โดยใช้ระยะเวลา 60 นาทีที่มีอัตราการใช้ออกซิเจนมากที่สุดมาจัดทำกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้ออกซิเจนสูงสุดของจุลินทรีย์ต่อความเข้มข้นของแอมโมเนีย โดยใช้โปรแกรม SIGMA PLOT V.11 ซึ่งกราฟที่ได้จะเป็นไปตามสมการ Monod

3.5 ขั้นตอนการวิเคราะห์ผลการทดลอง ตอนที่ 2

ศึกษาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ เช่น ค่าคงที่ตามสมการของ Monod (K_s) ในการกำจัดแอมโมเนียด้วยจุลินทรีย์แบบผสม (mixed culture) ด้วยวิธีเรสไปโรเมตริก (ดังภาพที่ 3.3)



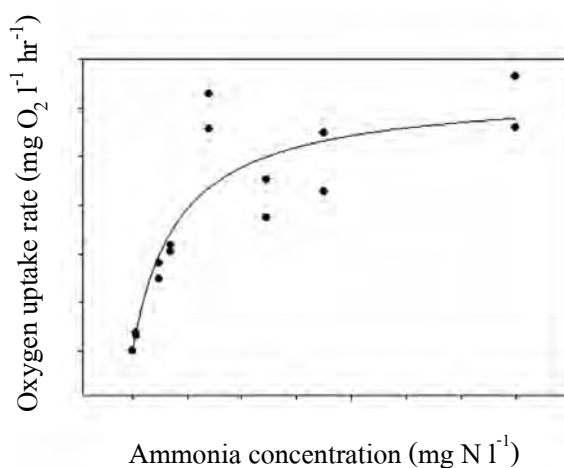
ภาพที่ 3.3 แผนผังการทดลอง ตอนที่ 2 ศึกษาค่า K_s ในการกำจัดแอมโมเนียของจุลินทรีย์แบบผสม ด้วยวิธีเรสไพโรเมตริก

3.5.1 จัดทำกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าออกซิเจนที่เหลือกับเวลา (DO depletion curve)

นำค่าออกซิเจนละลายที่เหลือจากการใช้ไปเนื่องจากการใช้สารอาหาร โดย จุลินทรีย์ (residual DO) ที่เวลาต่าง ๆ กัน ซึ่งเป็นค่าที่เก็บจากการทดลองด้วยวิธีเรสไพโรเมตริกมาจัดทำกราฟความสัมพันธ์กับเวลา อธิบายความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้น พร้อมทั้งทำการคำนวณหาอัตราการใช้ออกซิเจนเนื่องจากการใช้สารอาหาร (oxygen uptake rate, OUR) (ดังภาพที่ 2.10)

3.5.2 ทำการหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้ออกซิเจนเนื่องจากการใช้สารอาหาร (OUR) กับค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนีย

นำค่าอัตราการใช้ออกซิเจนเนื่องจากการใช้สารอาหาร (OUR) ในข้อที่ 3.5.1 มาจัดทำกราฟความสัมพันธ์ระหว่างกับค่า OUR กับความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนีย (ดังภาพที่ 3.4)



ภาพที่ 3.4 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้ออกซิเจนเนื่องจากการใช้สารอาหาร (OUR) กับค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนีย

3.5.3 ทำการหาค่าคงที่ตามสมการ Monod หรือ ค่า K_s

ทำการหาค่าคงที่ตามสมการ Monod หรือ K_s โดยใช้การ fit กับเส้นโค้งของความถดถอยแบบไม่เป็นเชิงเส้น (nonlinear regression) และใช้หลักการหาค่ากำลังสองน้อยที่สุด (least square method) เพื่อหาเส้นโค้งการทำนายที่เหมาะสม ด้วยโปรแกรม SIGMAPLOT V.11 จากนั้นนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการย่อยสลายสารสูงสุดของจุลินทรีย์ต่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เปลี่ยนแปลงไป ตามสมการของ Monod (ดังภาพที่ 2.8)

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

4.1 หัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์

การทดลองนี้ทำการเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์ โดยแบ่งการเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์ออกเป็น 2 ชุด ซึ่งมีแหล่งที่มาของหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์ต่างกัน ได้แก่ การทดลองชุดที่ 1 นำหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์จากโรงบำบัดน้ำเสียหนองแขม และการทดลองชุดที่ 2 ใช้หัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์มาจากโรงบำบัดน้ำเสียดินแดง ซึ่งมีจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 จำนวนจุลินทรีย์จากหัวเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นเริ่มต้น

ชุดถึง ปฏิกรณ์	จำนวนยีน <i>amoA</i> (ยีนต่อลิตรสลัดจ์)		จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อลิตรสลัดจ์)		
	AOA	AOB	AOB	<i>N. oligotropha</i>	<i>N. europaea</i>
1	0.00	$5.95 \times 10^8 \pm$	$2.38 \times 10^8 \pm$	$1.05 \times 10^7 \pm$	0.00
		1.01×10^8	0.40×10^8	0.76×10^7	
2	$9.05 \times 10^9 \pm$	$5.13 \times 10^9 \pm$	$1.39 \times 10^9 \pm$	$1.39 \times 10^9 \pm$	0.00
	8.27×10^9	2.68×10^9	0.36×10^9	0.35×10^9	

สาเหตุที่กลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซ์เซอร์ของตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียทั้ง 2 โรง มีความแตกต่างกัน เนื่องจากการเดินระบบในส่วนของ SRT ต่างกัน คือ ระบบบำบัดน้ำเสียดินแดง มีระยะเวลาที่กักเก็บตะกอนจุลินทรีย์ยาวนานกว่าระบบบำบัดน้ำเสียหนองแขม (ดังตารางที่ 4.2) ซึ่งจากงานวิจัยของ Park และคณะ (2006) พบยีน *amoA* ของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีการเดินระบบที่มีระยะเวลากักเก็บตะกอนจุลินทรีย์นานกว่า 7 วัน

ตารางที่ 4.2 การเดินระบบของโรงบำบัดน้ำเสียหนองแขมและโรงบำบัดน้ำเสียดินแดง

พารามิเตอร์	หน่วย	โรงบำบัดน้ำเสีย หนองแขม	โรงบำบัดน้ำเสีย ดินแดง
อัตราการไหล (Flow)	m ³ day ⁻¹	40117.5	218978.0
ความเข้มข้นบีโอดีน้ำเข้า	mg l ⁻¹	46.69	30.74
ความเข้มข้นบีโอดีน้ำออก	mg l ⁻¹	3.37	8.85
ความเข้มข้นแอมโมเนียไนโตรเจนน้ำเข้า	mg l ⁻¹	7.61	11.04
ความเข้มข้นแอมโมเนียไนโตรเจนน้ำเข้า	mg l ⁻¹	0.78	2.61
ขนาดถังเติมอากาศ	m ³	24888.0	89700.0
ระยะเวลาที่เก็บตะกอนจุลินทรีย์ (SRT)	day	8.5	30.0
ระยะเวลาที่เก็บน้ำ (HRT)	hr	3.8	7.0
MLSS	mg l ⁻¹	-	-
ค่าออกซิเจนละลาย	mg l ⁻¹	0.55	6.4

ที่มา: โรงบำบัดน้ำเสียหนองแขม กรุงเทพมหานคร. กรกฎาคม, 2551

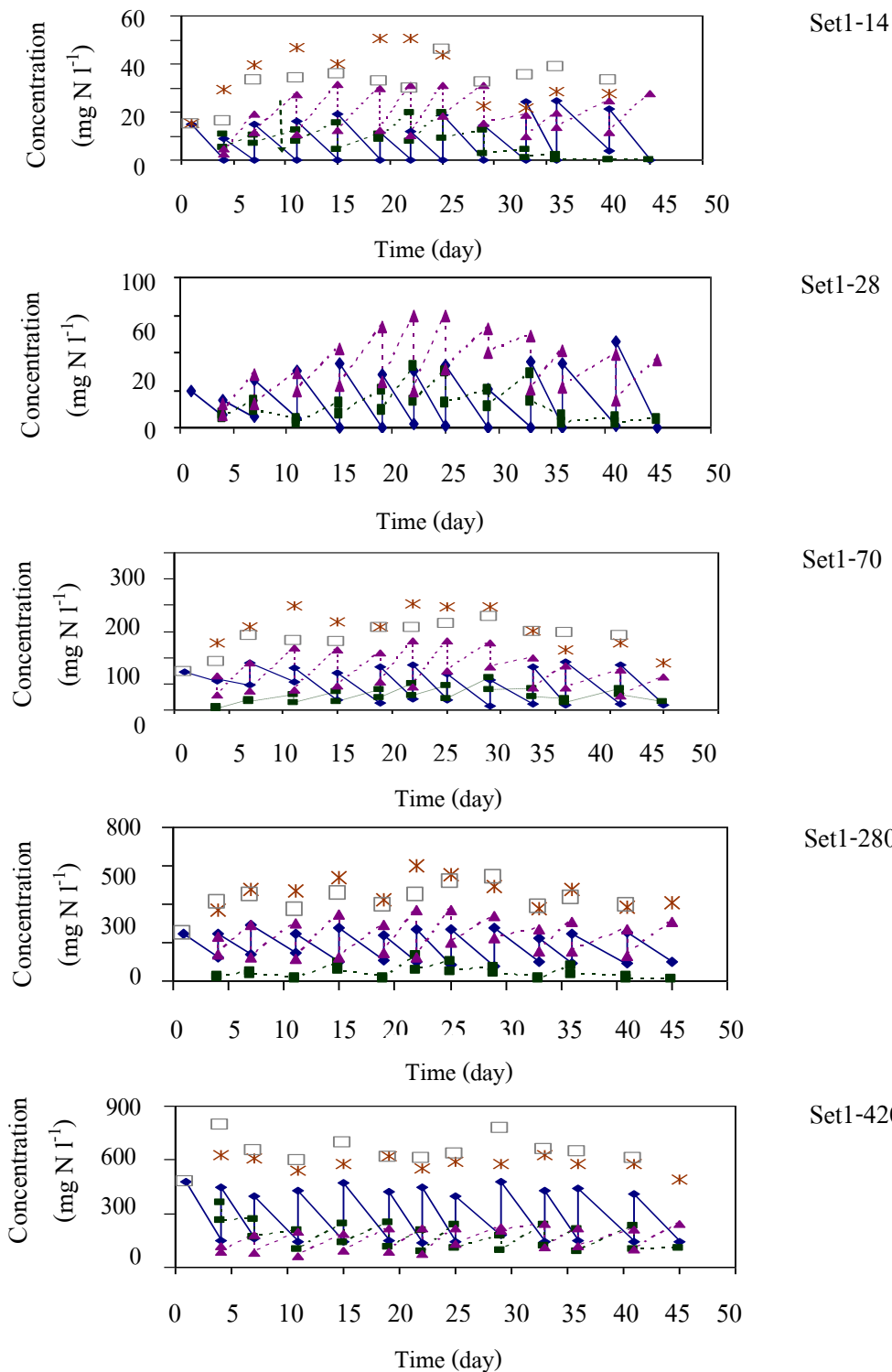
โรงบำบัดน้ำเสียดินแดง กรุงเทพมหานคร. พฤศจิกายน, 2551

4.2 ความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนโตรต์ และไนเตรต ในถังปฏิกรณ์

โดยทำการเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชุด ในถังปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตร ชุดการทดลองละ 5 ถัง ซึ่งแต่ละถังรับความเข้มข้นแอมโมเนียต่างกัน ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1 ได้แก่ ถังปฏิกรณ์ Set1-14 Set1-28 Set1-70 Set1-280 และ Set1-420 คือ ถังปฏิกรณ์ที่รับความเข้มข้นแอมโมเนียประมาณ 14 28 70 280 และ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์ที่ใช้มีเฉพาะ AOB และถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2 ได้แก่ ถังปฏิกรณ์ Set2-14 Set2-28 Set2-70 Set2-280 และ Set2-420 คือ ถังปฏิกรณ์ที่รับความเข้มข้นแอมโมเนียประมาณ 14 28 7 280 และ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ และใช้หัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์ที่มีทั้ง AOA และ AOB อยู่ด้วยกัน โดยทั้ง 2 ชุด การทดลอง มีการเดินระบบเป็นระยะเวลาประมาณ 45 วัน ซึ่งมีผลการเดินระบบ ดังนี้

4.2.1 ถึงปฏิกรณ์ชุดที่ 1 (AOB)

ถึงปฏิกรณ์ชุดที่ 1 เลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์ที่มีเฉพาะ AOB ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียแตกต่างกัน จำนวนเซลล์ 5 ถึง ซึ่งแต่ละถึงปฏิกรณ์มีความเข้มข้นของแอมโมเนียที่วัดหลังจากระยะเวลา กักเก็บน้ำเข้าสู่สภาวะคงที่ (Steady state) ซึ่งเลือกจากอัตราการบำบัดแอมโมเนียจากถึงปฏิกรณ์คงที่ ณ วันที่เริ่มต้นแบทช์และหลังจากวันที่สิ้นสุดแบทช์ ดังนี้ ถึงปฏิกรณ์ Set1-14 เริ่มคงที่ตั้งแต่วันที่ 1 ของการเดินระบบ ถึงปฏิกรณ์ Set1-28 เริ่มตั้งคงที่แต่วันที่ 13 ถึงปฏิกรณ์ Set1-70 เริ่มคงที่ตั้งแต่วันที่ 21 ถึงปฏิกรณ์ Set1-280 เริ่มคงที่ตั้งแต่วันที่ 19 และ ถึงปฏิกรณ์ Set1-420 เริ่มคงที่ตั้งแต่วันที่ 19 โดยแต่ละถึงปฏิกรณ์มีความเข้มข้นของแอมโมเนียในถึงปฏิกรณ์เฉลี่ย (ณ วันที่เริ่มต้นแบทช์เข้าสู่สภาวะคงที่) ได้แก่ ถึงปฏิกรณ์ Set1-14 คือ 16.8 ± 5.0 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร Set1-28 คือ 32.3 ± 6.9 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร Set1-70 คือ 77.0 ± 13.6 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร Set1-280 คือ 257.1 ± 20.3 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และ Set1-420 คือ 435.0 ± 28.8 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร มีความเข้มข้นของแอมโมเนียในถึงปฏิกรณ์ (หลังจากวันที่สิ้นสุดแบทช์เข้าสู่สภาวะคงที่) ได้แก่ ถึงปฏิกรณ์ Set1-14 คือ 0.0 ± 0.0 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร Set1-28 คือ 0.3 ± 0.4 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร Set1-70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร คือ 10.1 ± 1.2 Set1-280 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร คือ 90.0 ± 10.2 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และ Set1-420 คือ 149.7 ± 15.3 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (ดังภาพที่ 4.1)



◆ $[NH_4^+]$ ▲ $[NO_2^-]$ ■ $[NO_3^-]$ * $[NH_4^+]_{inf} + [NO_2^-]_{inf} + [NO_3^-]_{inf}$ □ $[NH_4^+]_{eff} + [NO_2^-]_{eff} + [NO_3^-]_{eff}$

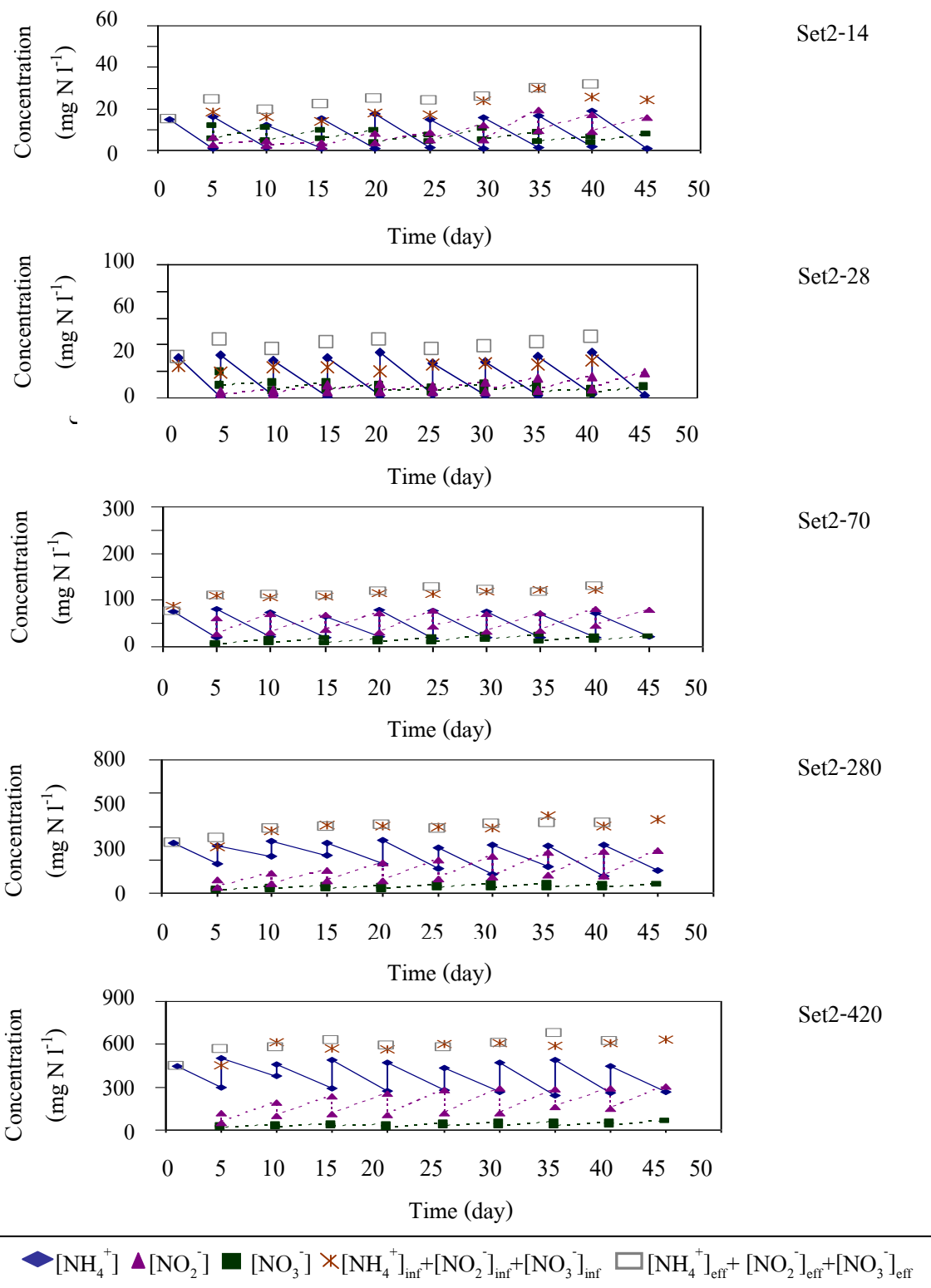
ภาพที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรด วันที่เริ่มต้น
แบทช์และหลังจากสิ้นสุดแบทช์ ต่อเวลา ของถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1

โดยคิดเป็นร้อยละของการบำบัดแอมโมเนียของแต่ละถังปฏิกรณ์ดังนี้ ถังปฏิกรณ์ Set1-14 คิดเป็นร้อยละ 99.8 ถังปฏิกรณ์ Set1-28 คิดเป็นร้อยละ 99.2 ถังปฏิกรณ์ Set1-70 คิดเป็นร้อยละ 86.9 ถังปฏิกรณ์ Set1-280 คิดเป็นร้อยละ 65.0 และถังปฏิกรณ์ Set1-420 คิดเป็นร้อยละ 65.6

การที่ถังปฏิกรณ์แต่ละถังมีความเข้มข้นของแอมโมเนียเข้าสู่สถานะคงที่ไม่เท่ากัน โดยสถานะคงที่หาได้จากประสิทธิภาพของการบำบัดแอมโมเนียจากถังปฏิกรณ์เริ่มคงที่ เนื่องจากความเข้มข้นของแอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนในเขตกรุงเทพมหานคร มีค่าความเข้มข้นแอมโมเนียน้ำเข้าสู่ระบบเฉลี่ย 10-20 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร จึงส่งผลให้ถังปฏิกรณ์ Set1-14 เข้าสู่สถานะที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียคงที่ตั้งแต่เริ่มเดินระบบ และถังปฏิกรณ์ Set1-28 เข้าสู่สถานะคงที่เร็วกว่า ถังปฏิกรณ์ Set1-70 ต่อจากนั้นถังปฏิกรณ์ Set1-280 และ Set1-420 จึงเข้าสู่สถานะคงที่

4.2.2 ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2 (AOA+AOB)

ถังปฏิกรณ์ชุดนี้ทำการเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์ที่มีทั้ง AOA และ AOB ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียแตกต่างกัน จำนวนเซลล์ 5 ถังซึ่งถังปฏิกรณ์แต่ละถังมีอัตราการบำบัดแอมโมเนียที่คงที่ระยะเวลาของการเดินระบบต่างกัน ได้แก่ ถังปฏิกรณ์ Set2-14 และ Set2-28 เริ่มคงที่ตั้งแต่วันแรกของการเดินระบบ ถังปฏิกรณ์ Set2-70 และ ถังปฏิกรณ์ Set2-280 เริ่มคงที่ตั้งแต่วันที่ 20 ถังปฏิกรณ์ Set2-420 เริ่มคงที่ตั้งแต่วันที่ 25 โดยแต่ละถังปฏิกรณ์มีความเข้มข้นของแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ (ณ วันที่เริ่มต้นแบบทซ์เข้าสู่สถานะคงที่) ได้แก่ ถังปฏิกรณ์ Set2-14 คือ 15.9 ± 1.9 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร Set2-28 คือ 30.6 ± 2.8 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร Set2-70 คือ 73.4 ± 4.6 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร Set2-280 คือ 295.3 ± 13.0 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และ Set2-420 คือ 466.7 ± 22.7 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร มีความเข้มข้นของแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ (หลังจากที่สิ้นสุดแบบทซ์เข้าสู่สถานะคงที่) ได้แก่ ถังปฏิกรณ์ Set2-14 คือ 1.1 ± 0.3 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร Set2-28 คือ 2.1 ± 0.7 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร Set2-70 คือ 9.2 ± 1.5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร Set2-280 คือ 103.9 ± 29.8 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และ Set2-420 คือ 161.4 ± 24.6 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (ดังภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรต วันที่เริ่มต้น
 แบทช์และหลังจากสิ้นสุดแบทช์ ต่อเวลา ของถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2

โดยคิดเป็นร้อยละของการบำบัดแอมโมเนียของแต่ละถังปฏิกรณ์ดังนี้ ถังปฏิกรณ์ Set2-14 คิดเป็นร้อยละ 92.9 ถังปฏิกรณ์ Set2-28 คิดเป็นร้อยละ 93.0 ถังปฏิกรณ์ Set2-70 คิดเป็นร้อยละ 87.4 ถังปฏิกรณ์ Set2-280 คิดเป็นร้อยละ 65.1 และ ถังปฏิกรณ์ Set2-420 คิดเป็นร้อยละ 65

ผลการเดินระบบของถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ชุด พบว่า เกิดกระบวนการ ไนทริฟิเคชันทุกถัง เนื่องจาก เมื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนไตรต์และไนเตรต จากน้ำในถังปฏิกรณ์เริ่มต้นแบทช์ ไนไตรต์มีความเข้มข้นลดลงจากการวิเคราะห์น้ำเมื่อสิ้นสุดแบทช์และมีการสะสมของไนเตรตเพิ่มขึ้น (ดังตารางที่ 4.3) เพราะการทดลองนี้ใช้ตะกอนจุลินทรีย์แบบผสม โดยในระบบมี จุลินทรีย์กลุ่มออกซิโททรอป 3 กลุ่ม คือ จุลินทรีย์กลุ่ม AOA และ AOB ทำหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรต์และจุลินทรีย์กลุ่ม NOB ทำหน้าที่ออกซิไดซ์ไนไตรต์เป็น ไนเตรตเพื่อเข้าสู่กระบวนการดีไนทริฟิเคชันต่อไป (Nicol และ Schleper, 2006) และในการเดินระบบมีการควบคุมค่าออกซิเจนละลายให้มีความมากกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Koops และ Pommerening-Röser, 2001) ส่วนค่า pH ใช้ในการเดินระบบที่ทำให้ AOA เจริญเติบโตได้ดีในช่วง 7.0-7.2 (Habbenha และคณะ, 2009)

ตารางที่ 4.3 ผลการเดินระบบและความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนโตรต์ และไนเตรตของถังปฏิกรณ์

ถังปฏิกรณ์	การเดินระบบ				[NH ₄ ⁺] ค่าความเข้มข้นเฉลี่ย± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)		[NO ₂ ⁻] ค่าความเข้มข้นเฉลี่ย± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)		[NO ₃ ⁻] ค่าความเข้มข้นเฉลี่ย± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	
	pH	ค่าออกซิเจนละลาย (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ระยะเวลา กักเก็บ ตะกอน จุลินทรีย์ (วัน)	ระยะเวลา กักเก็บน้ำ (วัน)	ณ วันที่เริ่มแบทช์	หลังจากสิ้นสุดแบทช์	ณ วันที่เริ่มแบทช์	หลังจากสิ้นสุดแบทช์	ณ วันที่เริ่มแบทช์	หลังจากสิ้นสุดแบทช์
Set1-14	7.0-7.5	>2	5	5	16.8 ± 5.0	0.0 ± 0.0	4.8 ± 3.5	10.6 ± 6.9	1.8 ± 8.0	11.7 ± 4.0
Set1-28					32.3 ± 6.9	0.3 ± 0.4	8.1 ± 5.0	19.0 ± 11.0	13.7 ± 8.9	23.8 ± 7.5
Set1-70					77.0 ± 13.6	10.1 ± 1.2	20.8 ± 9.2	40.4 ± 18.0	53.7 ± 23.9	91.0 ± 24.8
Set1-280					257.1 ± 20.3	90.0 ± 10.2	31.2 ± 19.5	57.3 ± 39.9	162.5 ± 40.4	309.3 ± 39.8
Set1-420					435.0 ± 28.8	149.7 ± 15.3	66.1 ± 39.9	110.05 ± 71.4	122.8 ± 44.7	226.4 ± 13.5

ตารางที่ 4.3 ผลการเดินระบบและความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนโตรต์ และไนเตรตของถังปฏิกรณ์ (ต่อ)

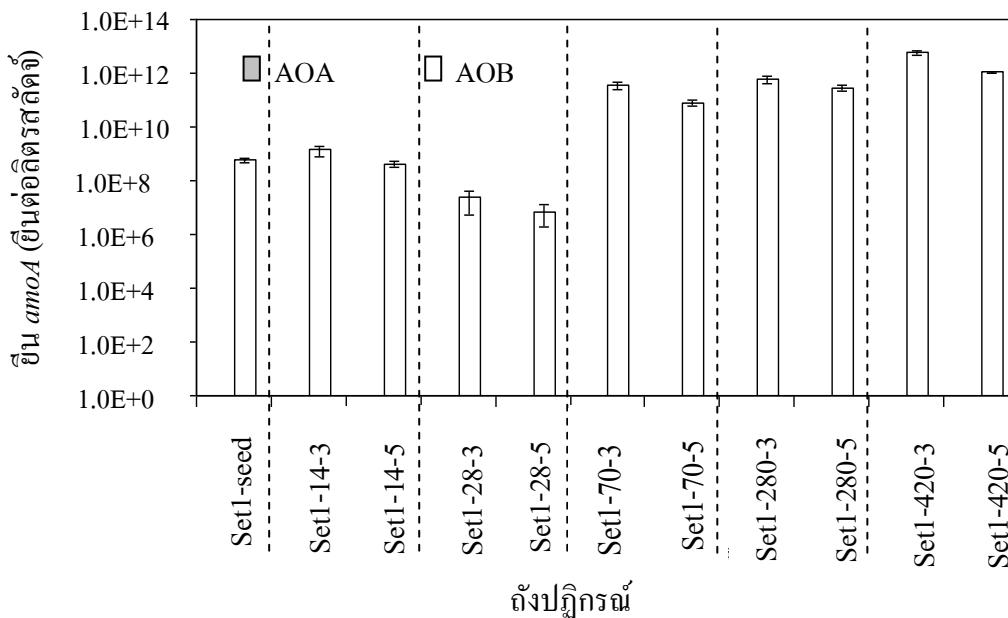
ถังปฏิกรณ์	การเดินระบบ				[NH ₄ ⁺] ค่าความเข้มข้นเฉลี่ย± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)		[NO ₂ ⁻] ค่าความเข้มข้นเฉลี่ย± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อ ลิตร)		[NO ₃ ⁻] ค่าความเข้มข้นเฉลี่ย± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	
	pH	ค่า ออกซิเจน ละลาย (มิลลิกรัม ต่อลิตร)	ระยะเวลา กักเก็บ ตะกอน จุลินทรีย์ (วัน)	ระยะเวลา กักเก็บน้ำ (วัน)	ณ วันที่เริ่ม แบทช์	หลังจาก สิ้นสุดแบทช์	ณ วันที่ เริ่มต้น แบทช์	หลังจาก สิ้นสุดแบทช์	ณ วันที่เริ่ม แบทช์	หลังจาก สิ้นสุดแบทช์
Set2-14	7.0-7.5	>2	15	5	15.9 ± 1.9	1.1 ± 0.3	4.0 ± 1.7	9.1 ± 1.7	4.2 ± 3.2	10.6 ± 5.8
Set2-28					30.6 ± 2.8	2.1 ± 0.7	4.5 ± 2.4	10.1 ± 3.6	4.5 ± 2.3	11.7 ± 4.7
Set2-70					73.4 ± 4.6	9.2 ± 1.5	8.4 ± 4.5	19.0 ± 5.5	30.7 ± 12.9	72.1 ± 6.0
Set2-280					295.3 ± 13.0	103.0 ± 29.8	23.7 ± 5.5	50.3 ± 6.1	84.1 ± 17.9	213.3 ± 43.3
Set2-420					466.7 ± 22.7	161.4 ± 24.6	24.3 ± 4.9	51.2 ± 8.4	126.1 ± 21.7	284.2 ± 16.6

4.3 ผลของแอมโมเนียต่อจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์

ในการศึกษาผลของแอมโมเนียต่อจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ได้ทำการนับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB โดยใช้เครื่อง Real-Time PCR โดยถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1 เริ่มทำการนับจำนวนเซลล์ที่สัปดาห์ที่ 3 และ 5 เนื่องจากในสัปดาห์ที่ 3 ค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ส่วนใหญ่ (ถังปฏิกรณ์ Set1-70 Set1-280 และ Set1-420) เข้าสู่สภาวะคงที่ สำหรับถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2 ทำการนับจำนวนเซลล์ *amoA* ของ AOA และ AOB ที่สัปดาห์ที่ 2 4 และ 6 เนื่องจากสัปดาห์ที่ 2 มีค่าความเข้มข้นแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ส่วนใหญ่ (ถังปฏิกรณ์ Set2-70 และ Set2-280) เข้าสู่สภาวะคงที่และทำการจะนับจำนวนเซลล์ต่อไปอีก 2 ครั้ง ในทุกๆ 2 สัปดาห์ เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ชุด

4.3.1 ผลของแอมโมเนียต่อจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1

ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1 นำหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์มาจากโรงบำบัดน้ำเสียหนองแขม ซึ่งจากการนับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB พบเฉพาะยีน *amoA* ของ AOB โดยไม่พบยีน *amoA* ของ AOA ซึ่งมีค่าเริ่มต้นที่ $5.95 \times 10^8 \pm 1.01 \times 10^8$ ยีนต่อลิตรสลัดจ์ (ดังภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.3 จำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1 ในแต่ละช่วงเวลา

4.3.1.1 จำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB

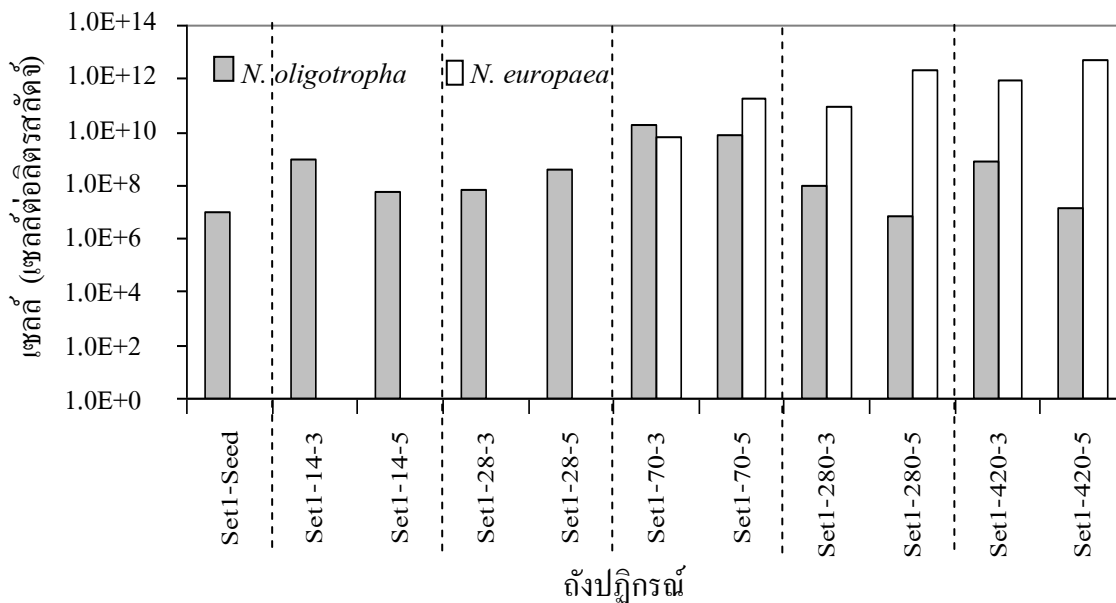
จากการนับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1 พบว่า ความเข้มข้นของแอมโมเนียมีผลต่อการเพิ่มจำนวนยีน *amoA* ของ AOB ซึ่งระบบที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียใกล้เคียงกับระบบบำบัดน้ำเสียเดิม หัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์ (ถังปฏิกรณ์ Set1-14 และ Set2-28) มีจำนวนยีน *amoA* ของ AOB ใกล้เคียงกับจำนวนยีน *amoA* ของ AOB เริ่มต้น (Set1-seed) และในระบบที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียสูง (ถังปฏิกรณ์ Set1-70 Set1-280 และ Set2-420) มีจำนวนยีน *amoA* ของ AOB เพิ่มขึ้นประมาณ 1,000 เท่า

การเพิ่มขึ้นของจำนวนยีน *amoA* ของ AOB มีผลมาจากความเข้มข้นของแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ จากการศึกษาของ Koops และคณะ (2003) กลุ่มประชากร AOB ต้องการแอมโมเนียในการดำรงชีวิต ซึ่งในระบบที่มีค่าความเข้มข้นแอมโมเนียสูง ทำให้กลุ่มประชากร AOB เจริญเติบโตได้ดี และเจริญเติบโตช้าในสภาพแวดล้อมที่มีค่าความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำกว่า โดยในส่วนของจำนวนยีน *amoA* ของ AOB จะเชื่อมโยงกับกลุ่มประชากร AOB ในแต่ละสายพันธุ์ (ดังตารางที่ 2.1) และอัตราเร็วในการใช้แอมโมเนียเพื่อดำรงชีวิต (ค่าจลนพลศาสตร์) ของกลุ่มประชากร AOB แต่ละสายพันธุ์ (Limpiyakorn และคณะ, 2007) ดังจะกล่าวในข้อ 4.3.1.2

4.3.1.2 จำนวนเซลล์ของ *Nitrosomonas oligotropha* และ *Nitrosomonas europaea*

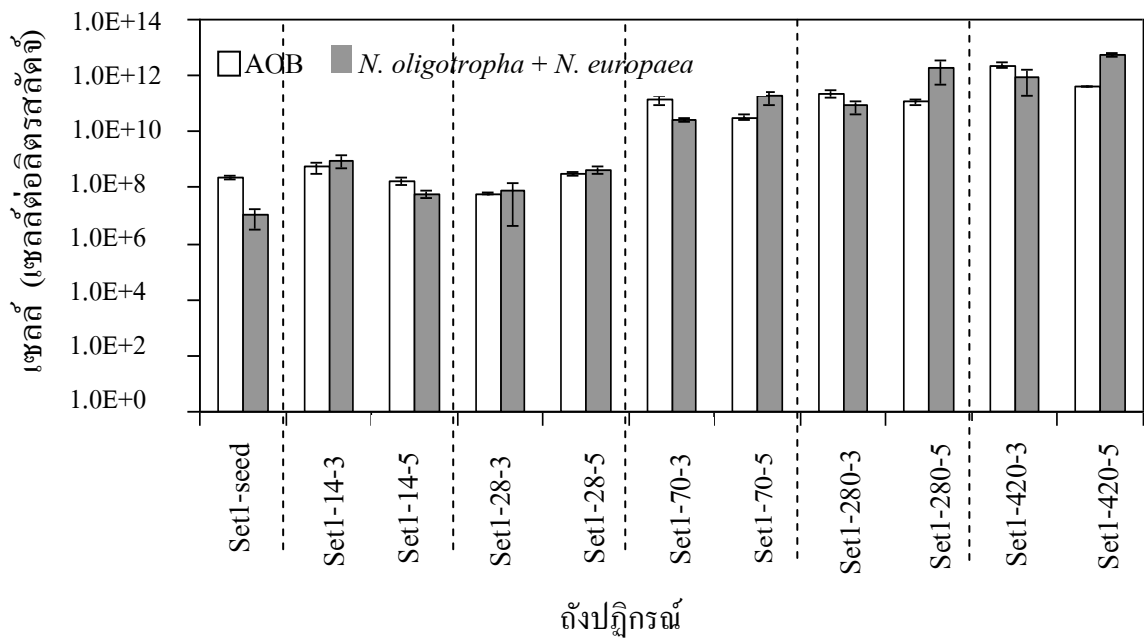
จากการนับจำนวนยีน *amoA* ของ *N. oligotropha* และยีน 16S rRNA ของ *N. europaea* จากหัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์เริ่มต้น (Set1-seed) พบเฉพาะ *N. oligotropha* ซึ่งมีจำนวนเซลล์เท่ากับ $1.05 \times 10^7 \pm 0.76 \times 10^7$ เซลล์ต่อลิตรสัปดาห์ และไม่สามารถนับจำนวนเซลล์ของ *N. europaea* ได้เนื่องจากมีจำนวนเซลล์น้อยกว่า 500 เซลล์ต่อตัวต่อลิตรสัปดาห์ และจากผลการนับจำนวนเซลล์จากถังปฏิกรณ์ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ (ถังปฏิกรณ์ Set1-14 และ Set1-28) พบเฉพาะ *N. oligotropha* เนื่องจากความเข้มข้นของแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ใกล้เคียงกับระบบบำบัดน้ำเสียหนองแวม และในส่วนของถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียสูง (ถังปฏิกรณ์ Set1-70 Set1-280 และ Set1-420) พบทั้ง *N. oligotropha* และ *N. europaea* ซึ่งจากการนับจำนวนเซลล์ของทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ จากถังปฏิกรณ์ Set1-70 มีจำนวนเซลล์ของ *N. europaea* เพิ่มสูงขึ้นและเท่ากับจำนวนเซลล์ของ *N. oligotropha* แต่จากถังปฏิกรณ์ Set1-280 และ Set1-420 มีจำนวนเซลล์ของ *N. oligotropha* ใกล้เคียงกับจำนวนเซลล์เริ่มต้น (Set1-seed) และมีจำนวนเซลล์ของ *N. europaea* เพิ่มขึ้นจนมากกว่าจำนวนเซลล์ของ *N. oligotropha* ประมาณ 10,000 เท่า ซึ่งในส่วนของ *N. europaea* มีจำนวนเซลล์มากขึ้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ กล่าวคือ ถังปฏิกรณ์ Set1-70 Set1-280 และ Set1-420 มีจำนวนเซลล์ของ *N. europaea* เพิ่มขึ้นโดย

เรียงตามจำนวนเซลล์น้อยไปมากตามลำดับ ดังนั้นความเข้มข้นของแอมโมเนียมีผลต่อการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ของ AOB (ดังภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 จำนวนเซลล์ของ *Nitrosomonas oligotropha* และ *Nitrosomonas europaea* ในถึงปฏิกรณ์ชุดที่ 1 ในแต่ละช่วงเวลา

หลังจากนั้นทำการรวมจำนวนเซลล์ *N. oligotropha* รวมกับ *N. europaea* ซึ่งเป็นสายพันธุ์หลักที่พบในระบบบำบัดน้ำเสีย (Koops และคณะ, 2003) เพื่อเป็นการยืนยันผลการนับจำนวนเซลล์ของ AOB จากตะกอนจุลินทรีย์เริ่มต้น (Set1-seed) และจากถึงปฏิกรณ์ ซึ่งจากผลการนับจำนวนเซลล์ของ AOB เทียบกับจำนวนเซลล์ *N. oligotropha* รวมกับ *N. europaea* พบว่าไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้มีความเหมาะสมกับ *N. oligotropha* และ *N. europaea* ซึ่งจำนวนเซลล์ของ *N. oligotropha* รวมกับ *N. europaea* มีค่าใกล้เคียงกับจำนวนเซลล์ของ AOB (ดังภาพที่ 4.5)



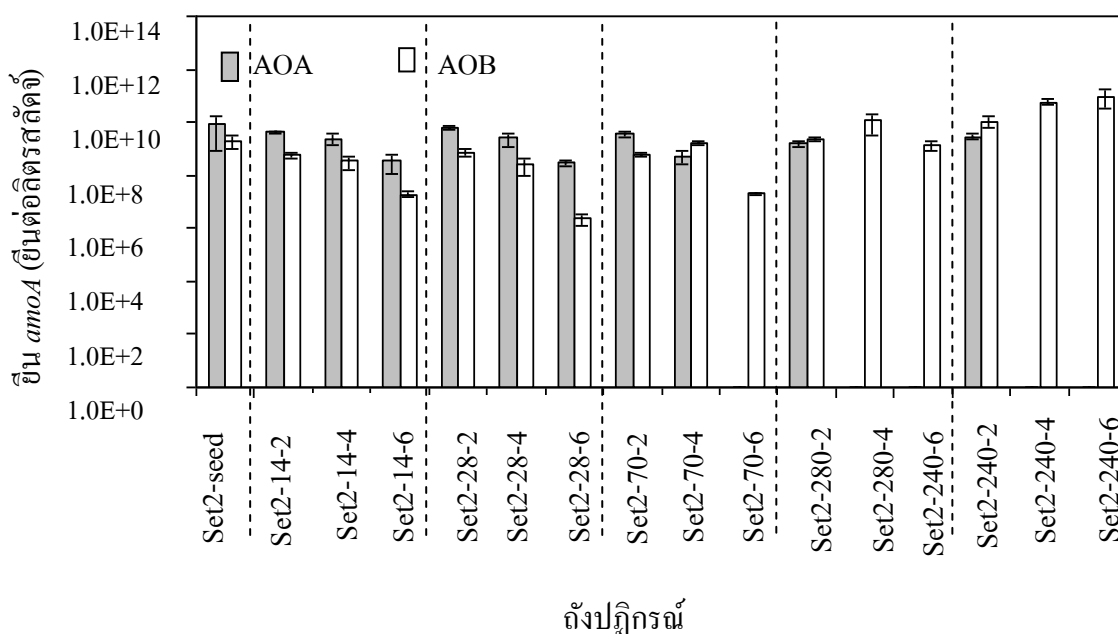
ภาพที่ 4.5 จำนวนเซลล์ของ AOB กับจำนวนเซลล์ของ *Nitrosomonas oligotropha* รวมกับ *Nitrosomonas europaea* ในถึงปฏิกรณ์ชุดที่ 1 ในแต่ละช่วงเวลา

การที่จำนวนเซลล์ของ AOB สายพันธุ์ *N. oligotropha* และ *N. europaea* เพิ่มหรือลดลง เนื่องจาก *N. oligotropha* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในระบอบน้ำเสียที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำ และ *N. europaea* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในระบอบน้ำเสียที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียสูง ซึ่งจากการรวมงานวิจัยของ Limpiyakorn และคณะ (2010) พบว่าจุลินทรีย์กลุ่ม *N. europaea* สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงมาก ซึ่งจากการศึกษาค่า K_s ของ *N. europaea* ในตะกอนจุลินทรีย์ผสม ของ Laanbroek และคณะ (1994) และ Habbena และคณะ (2009) มีค่า K_s เท่ากับ 12.3-27.4 และ 7.7 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ และ จุลินทรีย์กลุ่ม *N. oligotropha* สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ ซึ่งจากการศึกษาค่า K_s ของ *N. europaea* ในตะกอนจุลินทรีย์ผสม Bollmann และคณะ (2002) และ Stech และคณะ (1995) มีค่า K_s เท่ากับ 0.7-1.4 และ 0.4-1.1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับและจากงานวิจัยของ Limpiyakorn และคณะ (2007) ได้นับจำนวนยีน 16S rRNA ของ *N. oligotropha* พบว่า ในถึงปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียในระบบ เท่ากับ 28 และ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร พบ ยีน 16S rRNA ของ *N. oligotropha* ถึงปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียในระบบ เท่ากับ 140 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร มีจำนวนยีน 16S rRNA ของ *N. oligotropha* น้อยกว่า *N. europaea* และในถึงปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียในระบบ เท่ากับ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร มีจำนวนเซลล์ 16S rRNA ของ

N. europaea มากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในวันที่ 15 ของการเดินระบบและจำนวนเซลล์ของยีน 16S rRNA ของ *N. oligotropha* ลดลงเรื่อยๆ จนหายไปทีระยะเวลาเดินระบบที่ 25 วัน

4.3.2 ถึงปฏิบัติการชุดที่ 2

ถึงปฏิบัติการชุดที่ 2 ใช้หัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์มาจากโรงบำบัดน้ำเสียดินแดง ซึ่งจากการนับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB เริ่มต้น (Set2-seed) มีค่าใกล้เคียงกัน คือ จำนวนยีน *amoA* ของ AOA เท่ากับ $9.05 \times 10^9 \pm 8.27 \times 10^9$ ยีนต่อลิตรสลัดจ์ และจำนวนยีน *amoA* ของ AOB เท่ากับ $5.13 \times 10^9 \pm 2.68 \times 10^9$ ยีนต่อลิตรสลัดจ์ (ดังภาพที่ 4.6)



ภาพที่ 4.6 จำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ในถึงปฏิบัติการชุดที่ 2 ในแต่ละช่วงเวลา

4.3.2.1 จำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB

จากการนับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB จากถึงปฏิบัติการชุดที่ 2 ซึ่งให้เห็นว่า ความเข้มข้นของแอมโมเนียมีผลต่อการเพิ่มจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB คือ ผลการนับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA จากถึงปฏิบัติการที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ (ถึงปฏิบัติการ Set2-14 และ Set2-28) มีค่าใกล้เคียงกับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA เริ่มต้น (Set2-seed) เนื่องจากน้ำในถึงปฏิบัติการมีความเข้มข้นของแอมโมเนียใกล้เคียงกับระบบบำบัดน้ำเสียดินแดง แต่จากถึงปฏิบัติการที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียสูง (ถึงปฏิบัติการ Set2-70 Set2-280 และ Set2-420) ทำให้ยีน *amoA* ของ AOA หายไป โดยถึงปฏิบัติการ Set2-70 ไม่พบยีน *amoA* ของ AOA หลังจากหลังสัปดาห์ที่ 2 ถึงปฏิบัติการ Set2-280 และ Set2-420 ไม่พบยีน *amoA* ของ AOA หลังจากสัปดาห์ที่ 2 และ

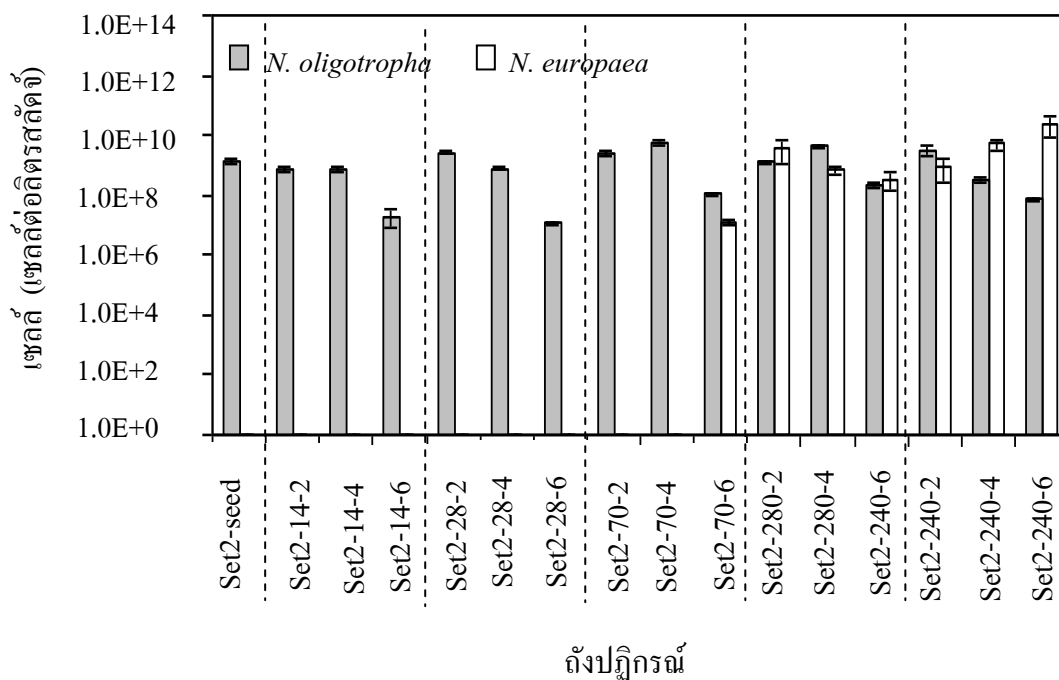
ผลการนับจำนวนยีน *amoA* ของ AOB จากถึงปฏิกรณ์ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ (ถึงปฏิกรณ์ Set2-14 และ Set2-28) มีจำนวนยีน *amoA* ของ AOB ใกล้เคียงกับจำนวนยีน *amoA* ของ AOB เริ่มต้น (Set2-seed) แต่จากถึงปฏิกรณ์ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียสูง (ถึงปฏิกรณ์ Set2-70 Set2-280 และ Set2-420) มีจำนวนยีน *amoA* ของ AOB เพิ่มมากขึ้น

การหายไปของจำนวนยีน *amoA* ของ AOA ในถึงปฏิกรณ์มีผลมาจากค่าความเข้มข้นของแอมโมเนีย เนื่องจากแอมโมเนียเป็นสารตั้งต้นหลักที่มีผลการดำรงชีวิตของ AOA ซึ่งผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ไม่พบ ยีน *amoA* ของ AOA หลังจากสัปดาห์ที่ 2 ถึงปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียสูง (ถึงปฏิกรณ์ Set2-280 และ Set2-420) และในช่วงที่หายไม่พบ ยีน *amoA* ของ AOA จากถึงปฏิกรณ์ Set2-70 ซึ่งจากการรวบรวมงานวิจัยของ Erguder และคณะ (2009) ได้รวบรวมไว้ว่า AOA เจริญเติบโตได้ดีในสถานะแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ โดยในน้ำเค็มหรือระบบนิเวศที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียในระบบน้อยกว่า 0.4–2.1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และในทะเลเปิด ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียน้อยกว่า 0.42–14 ไมโครกรัมไนโตรเจนต่อลิตร นอกจากนี้ Beman และ Francis (2006) พบ จำนวนยีน *amoA* ของ AOA มากกว่า AOB ในดินตะกอนที่ปากอ่าวทะเลของประเทศเม็กซิโก ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนีย 0.308-1.288 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ต่อจากนั้น De La Torry และคณะ (2008) พบ จำนวนยีน *amoA* ของ AOA มากกว่า จำนวนยีน *amoA* ของ AOB ที่บ่อน้ำร้อนในอุทยานแห่งชาติเยลโลสโตน ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนีย 1.33 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในส่วนของงานวิจัยในระบบบำบัดน้ำเสีย Park และคณะ (2006) รายงานว่า มักพบ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีระยะเวลาเก็บกักเก็บน้ำและระยะเวลาเก็บกักเก็บตะกอนจุลินทรีย์ที่ยาวนานมากกว่าปกติ ซึ่งต่อมา Zhang และคณะ (2009) ได้ทำการทดลองนี้ซ้ำอีกครั้ง พบว่า ระยะเวลาเก็บกักเก็บน้ำและระยะเวลาเก็บกักเก็บตะกอนจุลินทรีย์ที่ยาวนานมากกว่าปกติ ไม่ส่งผลต่อการดำรงชีวิตของ AOA ต่อจากนั้น Wells และคณะ (2009) ได้ทำการตรวจนับยีน *amoA* ของ AOA และยีน *amoA* ของ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียเป็นครั้งแรกของโลก พบว่า ปริมาณยีน *amoA* ของ AOB มากกว่าของ AOA ตลอดระยะเวลา 1 ปี ที่ทำการเก็บตัวอย่างและจากงานวิจัยของ Limpiyakorn และคณะ (2011) ได้นับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB จากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนในเขตกรุงเทพมหานครจำนวน 5 โรง ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียเข้าระบบในช่วง 5.6-11.0 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร มีความเข้มข้นของแอมโมเนียออกจากระบบในช่วง 0.3-3.0 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และจากระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมจำนวน 3 โรง ซึ่งมีค่าความเข้มข้นแอมโมเนียในระบบในช่วง 36.1-422.3 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร มีความเข้มข้นของแอมโมเนียออกจากระบบในช่วง 5.3-29.2 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร พบยีน *amoA* ของ AOA มากกว่ายีน *amoA* ของ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนของกรุงเทพมหานครหลายระบบ แต่ในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียสูงไม่พบยีน *amoA* ของ

AOA เลข การเพิ่มขึ้นของจำนวนยีน *amoA* ของ AOB มีผลมาจากความเข้มข้นของแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ ดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อที่ 4.3.1.1

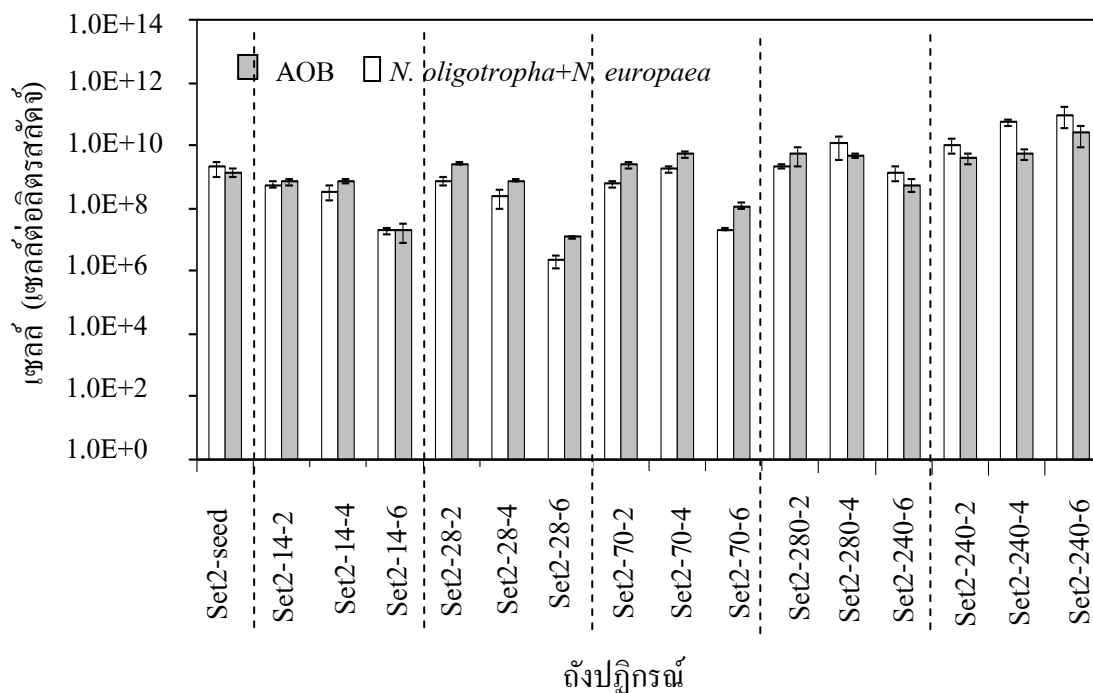
4.3.2.2 จำนวนเซลล์ของ *Nitrosomonas oligotropha* และ *Nitrosomonas europaea*

จากการนับจำนวนยีน *amoA* ของ *N. oligotropha* และยีน 16S rRNA ของ *N. europaea* จาก หัวเชื้อตะกอนจุลินทรีย์เริ่มต้น (Set2-seed) พบเฉพาะ *N. oligotropha* ซึ่งมีจำนวนเซลล์เท่ากับ $1.39 \times 10^9 \pm 0.35 \times 10^9$ เซลล์ต่อลิตรสลัดจ์ และไม่สามารถนับจำนวนเซลล์ของ *N. europaea* ได้เนื่องจากมีจำนวนเซลล์น้อยกว่า 250 เซลล์ต่อมิลลิกรัมต่อลิตรสลัดจ์ และจากผลการนับจำนวนเซลล์จากถังปฏิกรณ์ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ (ถังปฏิกรณ์ Set2-14 และ Set2-28) พบเฉพาะ *N. oligotropha* เนื่องจาก ความเข้มข้นของแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ใกล้เคียงกับระบบบำบัดน้ำเสียดินแดง และในส่วนของถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียสูง (ถังปฏิกรณ์ Set2-70 Set2-280 และ Set2-420) พบทั้ง *N. oligotropha* และ *N. europaea* ซึ่งจากการนับจำนวนเซลล์ของทั้ง 2 สาย ได้แก่ จากถังปฏิกรณ์ Set2-70 พบยีน 16S rRNA ของ *N. europaea* หลังสัปดาห์ที่ 4 และมีจำนวนเซลล์ของ *N. oligotropha* มีจำนวนเท่ากับจำนวนเซลล์ของ *N. europaea* และถังปฏิกรณ์ Set2-280 และ Set2-420 มีจำนวนเซลล์ของ *N. europaea* เพิ่มขึ้นจนมากกว่าจำนวนเซลล์ของ *N. oligotropha* ประมาณ 1,000 เท่า ซึ่งในส่วนของจำนวนเซลล์ *N. europaea* มีจำนวนเซลล์มากขึ้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ กล่าวคือ ถังปฏิกรณ์ Set2-70 Set2-280 และ Set2-420 มีจำนวนเซลล์ของ *N. europaea* เพิ่มขึ้น โดยเรียงตามจำนวนเซลล์น้อยไปมากตามลำดับ และถังปฏิกรณ์ทั้ง 3 ถังมีจำนวนเซลล์ของ *N. oligotropha* ใกล้เคียงกับจำนวนเซลล์เริ่มต้น (Set2-seed) ดังนั้นความเข้มข้นของแอมโมเนียมีผลต่อการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ของ AOB (ดังภาพที่ 4.7)



ภาพที่ 4.7 จำนวนเซลล์ ของ *Nitrosomonas oligotropha* และ *Nitrosomonas europaea* ในถึงปฏิกรณ์ชุดที่ 2 ในแต่ละช่วงเวลา

หลังจากนั้นทำการรวมจำนวนเซลล์ *N. oligotropha* รวมกับ *N. europaea* ซึ่งเป็นสายพันธุ์หลักที่พบในระบบบำบัดน้ำเสีย (Koops และคณะ, 2003) เพื่อเป็นการยืนยันผลการนับจำนวนเซลล์ของ AOB จากตะกอนจุลินทรีย์เริ่มต้น (Set2-seed) และจากถึงปฏิกรณ์ ซึ่งจากผลการนับจำนวนเซลล์ของ AOB เทียบกับจำนวนเซลล์ของ *N. oligotropha* รวมกับ *N. europaea* พบว่าไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้มีความเหมาะสมกับ *N. oligotropha* และ *N. europaea* ซึ่งจำนวนเซลล์ของ *N. oligotropha* รวมกับ *N. europaea* มีค่าใกล้เคียงกับจำนวนเซลล์ของ AOB (ดังภาพที่ 4.8)



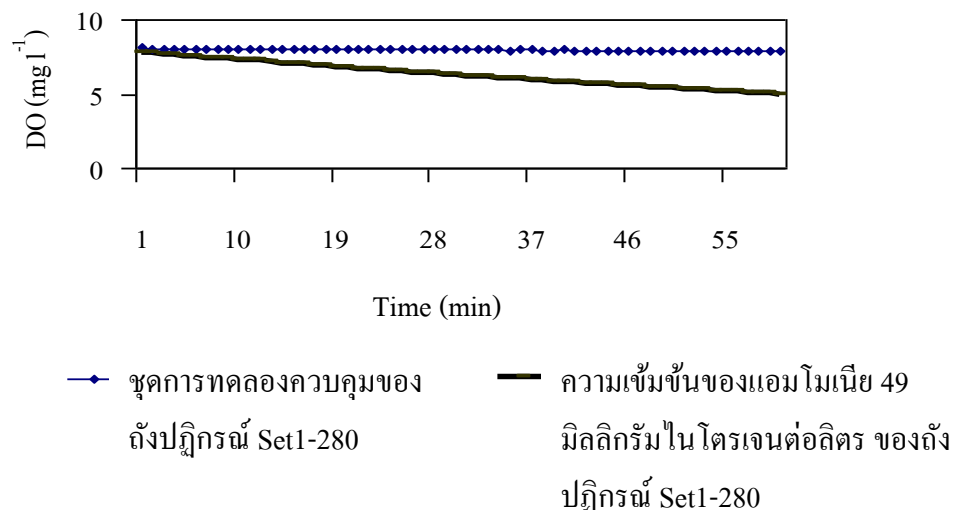
ภาพที่ 4.8 จำนวนเซลล์ของ AOB กับจำนวนเซลล์ *Nitrosomonas oligotropha* รวมกับ *Nitrosomonas europaea* ในถึงปฏิกรณ์ชุดที่ 2 ในแต่ละช่วงเวลา

4.4 ผลการศึกษาค่า K_s ตามสมการ monod ด้วยวิธีเรสไปโรเมตริก

การศึกษาค่า K_s เพื่อศึกษาการกำจัดแอมโมเนียของจุลินทรีย์ที่ออกซิไดซ์แอมโมเนีย ในตะกอนจุลินทรีย์แบบผสมซึ่งมีกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียแตกต่างกัน ใช้วิธีเรสไปโรเมตริก ซึ่งวิธีเรสไปโรเมตริกเป็นวิธีการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของจุลินทรีย์ในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย ณ เวลาต่างๆ กัน โดยการทดลองนี้ใช้ตะกอนจุลินทรีย์จากถึงปฏิกรณ์ที่กล่าวมาแล้วในช่วงต้นที่ผ่านการเดินระบบเป็นระยะเวลาประมาณ 45 วัน มีผลการศึกษา ดังนี้

4.4.1 การยืนยันการหาค่า K_s ในถึงปฏิกรณ์

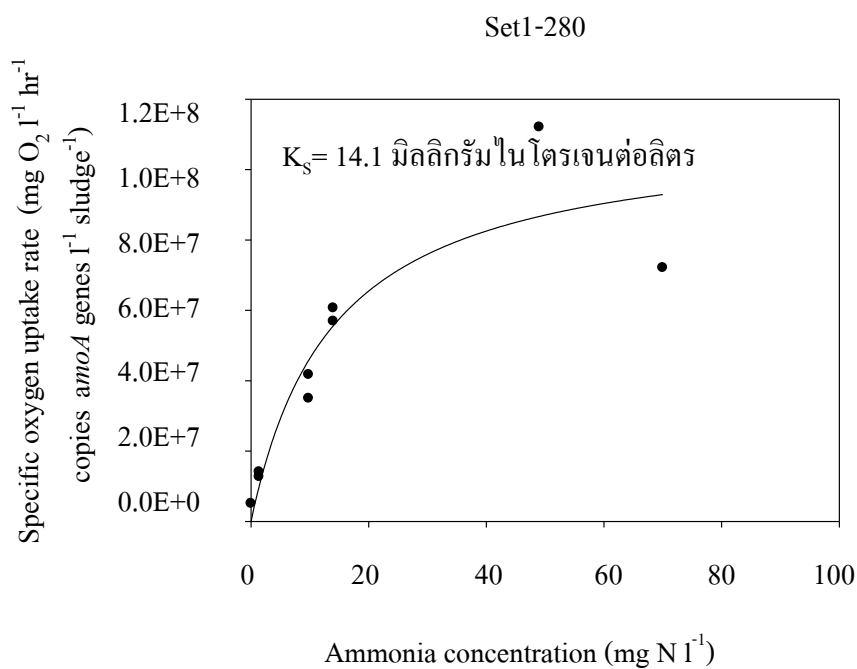
เพื่อเป็นยืนยันว่าการใช้ออกซิเจนของตะกอนจุลินทรีย์มาจากจุลินทรีย์ที่ออกซิไดซ์แอมโมเนีย ไม่ใช่เฮเทอโรโทรป ได้ทำการทดลองกับชุดทดลองควบคุม ซึ่งเติม ATU เพื่อยับยั้งการทำงานของ AOB และไม่เติมแอมโมเนียเทียบกับชุดการทดลองที่เติมแอมโมเนีย ตัวอย่างดังภาพที่ 4.9



ภาพที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างออกซิเจนที่ใช้ ต่อเวลา จากถังปฏิกรณ์ Set1-280 ของชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมแอมโมเนียและชุดการทดลองที่ความเข้มข้นของแอมโมเนีย 49 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

จากภาพที่ 4.9 ได้วัดค่าความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรต ของการทดลองโดยวัดที่ก่อนทดลอง และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ดังนี้ (ขอยกตัวอย่างเฉพาะจุดที่แสดงดังภาพที่ 4.10) ชุดการทดลองควบคุมมีค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียก่อนทดลองและเมื่อสิ้นสุดการทดลองเท่ากับ 0 และ 0 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ค่าความเข้มข้นของไนไตรต์ก่อนทดลองและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง เท่ากับ 0.2 และ 0.2 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และค่าความเข้มข้นของไนเตรตก่อนทดลองและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง เท่ากับ 0.5 และ 0.5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ชุดการทดลองที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียก่อนการทดลอง 49 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร มีค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียเมื่อสิ้นสุดการทดลอง เท่ากับ 48 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ค่าความเข้มข้นของไนไตรต์ก่อนทดลองและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง เท่ากับ 0.4 และ 1.2 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และค่าความเข้มข้นของไนเตรตก่อนทดลองและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง เท่ากับ 2.1 และ 2.1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

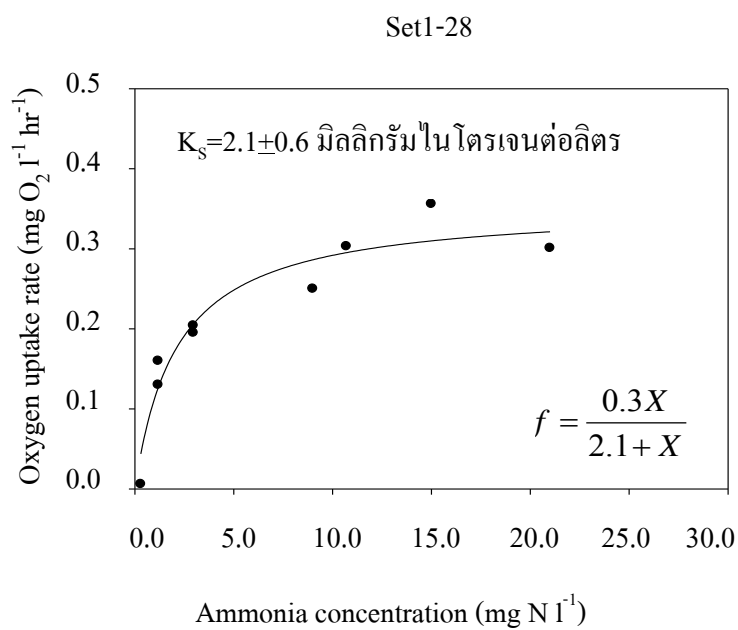
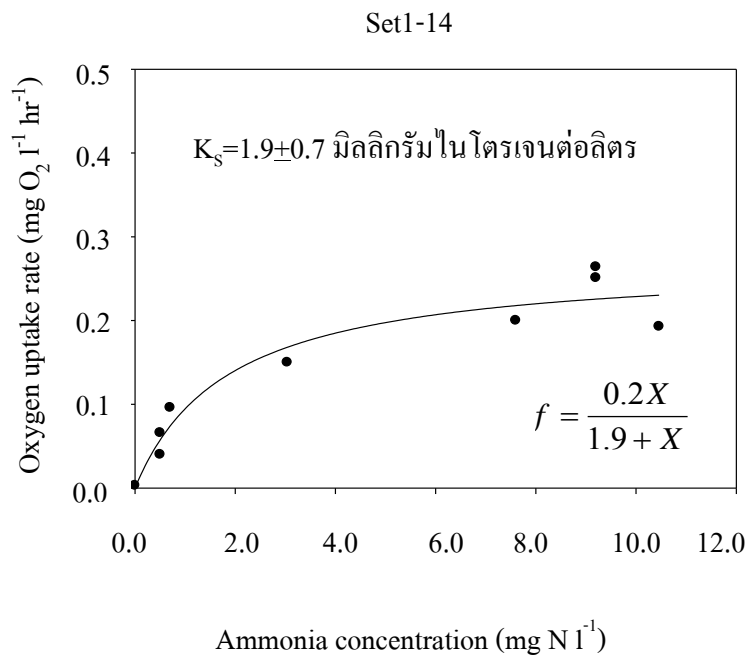
นอกจากนี้ การอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างออกซิเจนจำเพาะที่ใช้ (Specific oxygen uptake rate; SOUR) ต่อความเข้มข้นแอมโมเนีย (แสดงเฉพาะของถังปฏิกรณ์ Set1-280) เป็นการยืนยันการหาค่า K_s โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างออกซิเจนที่ใช้ ต่อความเข้มข้นแอมโมเนียได้ (ดังภาพที่ 4.10)



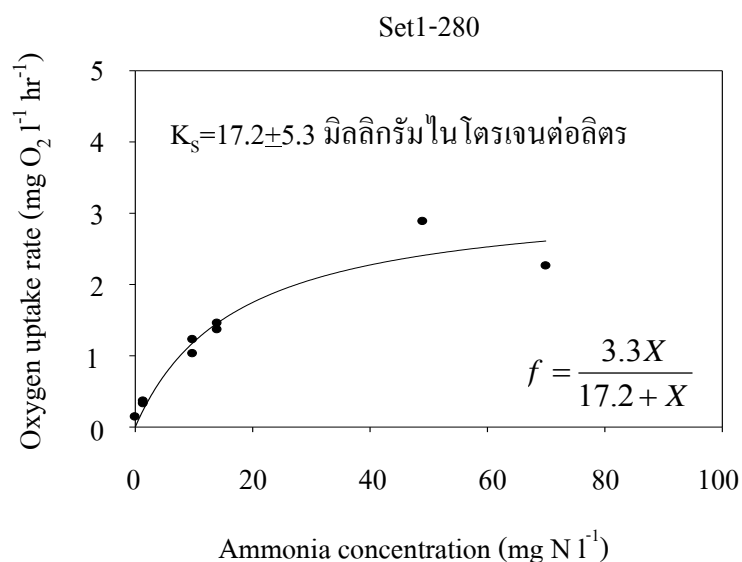
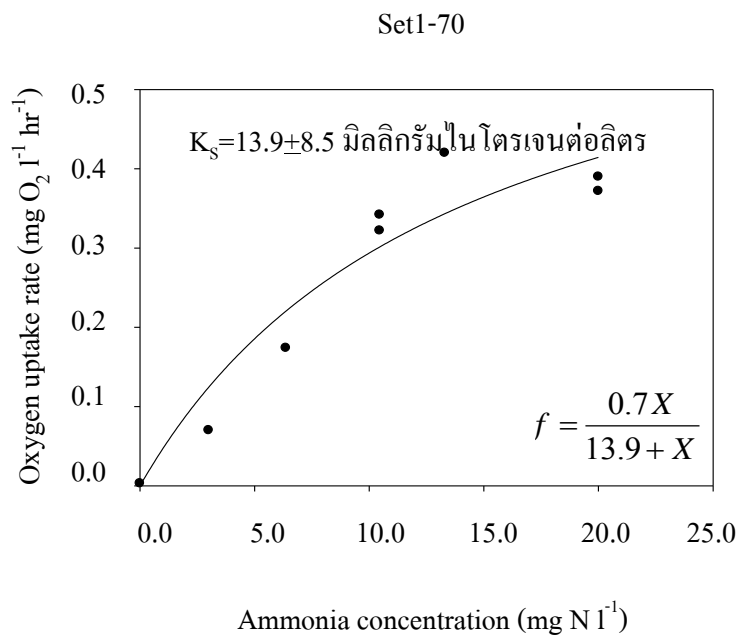
ภาพที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างออกซิเจนจำเพาะที่ใช้ ต่อความเข้มข้นแอมโมเนียของ
ถังปฏิกรณ์ตัวอย่าง

4.4.2 ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1 (AOB)

จากการทดลองหาค่า K_s ของตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1 พบว่า ค่า K_s ของจุลินทรีย์ที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ Set1-14 Set1-28 Set1-70 และ Set1-280 มีค่าแตกต่างกัน คือ 1.9 ± 0.7 2.1 ± 0.6 13.9 ± 8.5 และ 17.2 ± 5.3 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ (ดังภาพที่ 4.11)



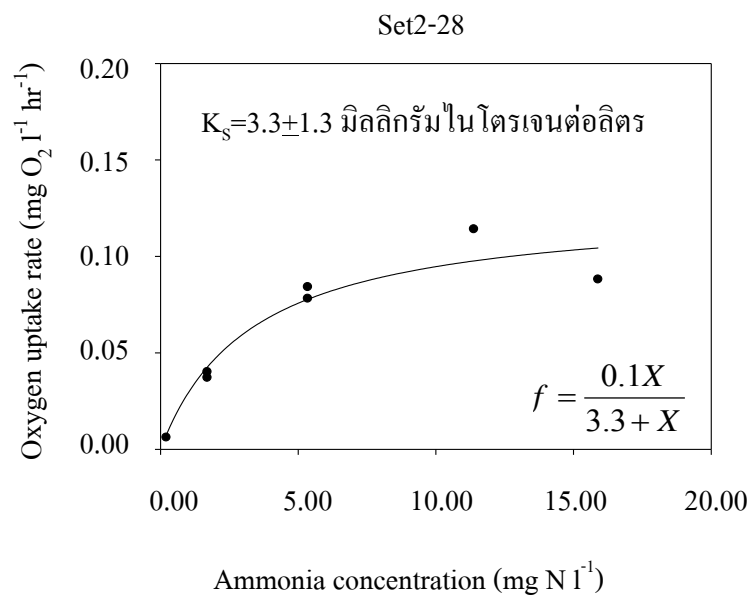
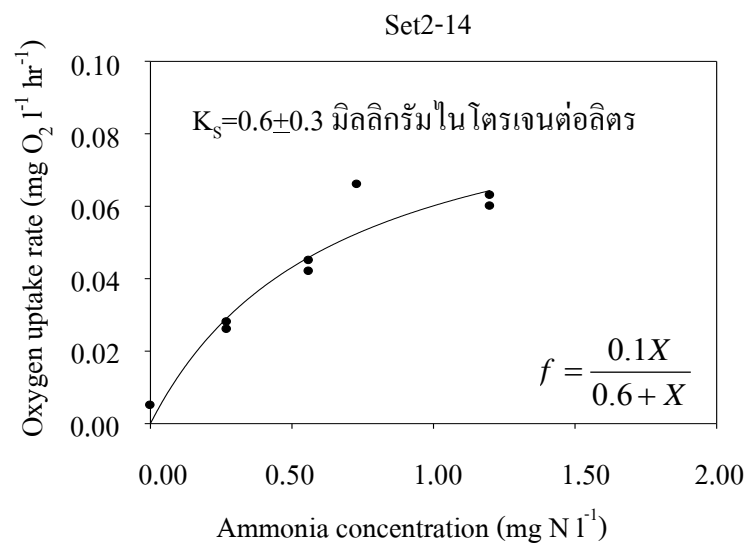
ภาพที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างออกซิเจนที่ใช้ ต่อความเข้มข้นแอมโมเนียของ
ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1



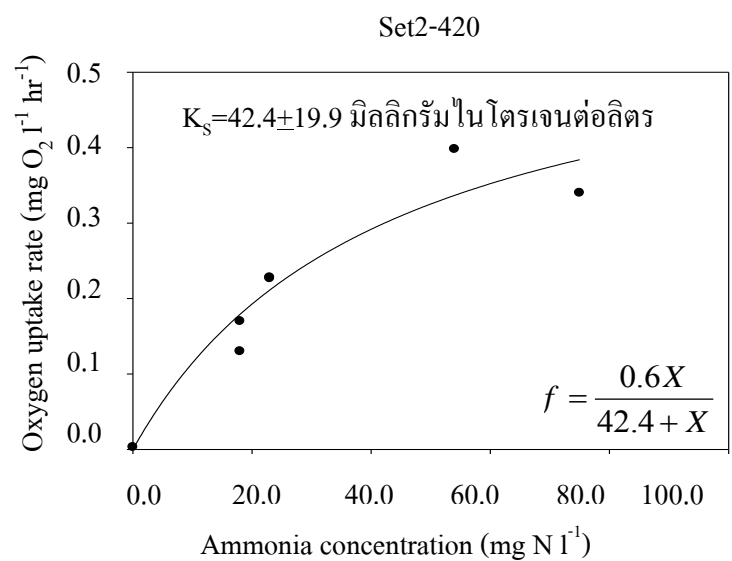
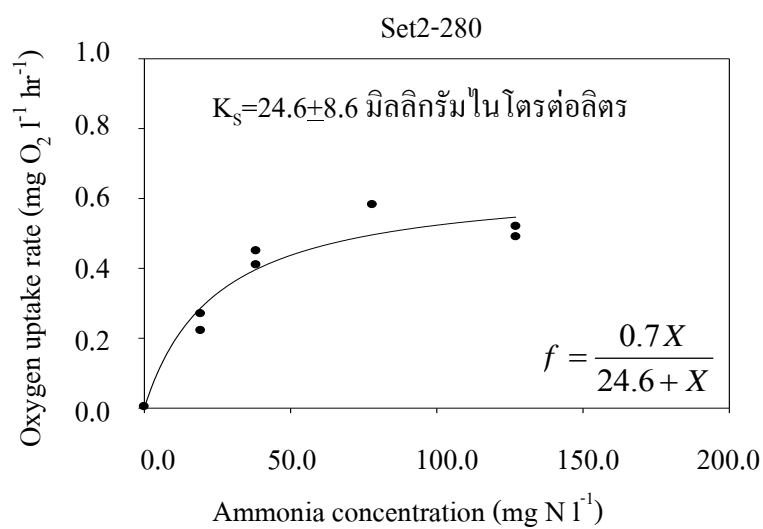
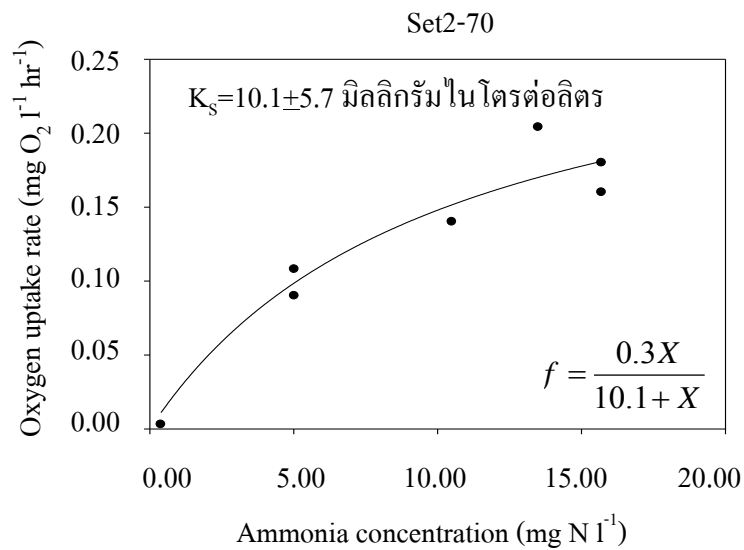
ภาพที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างออกซิเจนที่ใช้ ต่อความเข้มข้นแอมโมเนียของ
ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1 (ต่อ)

4.4.3 ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2 (AOA+AOB)

ค่า K_s ของตะกอนจุลินทรีย์ที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2 อันได้แก่ ถังปฏิกรณ์ Set2-14 Set2-28 Set2-70 Set2-280 และ Set2-420 มีค่าแตกต่างกัน คือ 0.6 ± 0.3 3.3 ± 1.3 10.1 ± 5.7 24.6 ± 8.6 และ 42.4 ± 8.6 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ (ดังภาพที่ 4.12)



ภาพที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างออกซิเจนที่ใช้ ต่อความเข้มข้นแอมโมเนียของ
ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2



ภาพที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างออกซิเจนที่ใช้ ต่อความเข้มข้นแอมโมเนียของ
ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2 (ต่อ)

4.4.4 การเปรียบเทียบค่า K_s ตามสมการ monod ของถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ชุด

จากผลการนับจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB รวมไปถึงจำนวนยีน *amoA* ของ *N. oligotropha* และ *N. europaea* พบว่าลักษณะกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่ออกซิโดซ์แอมโมเนียที่อยู่ในตะกอนจุลินทรีย์ มีผลต่อค่า K_s ของตะกอนจุลินทรีย์ แต่ทั้งนี้หากเปรียบเทียบถังปฏิกรณ์ที่มีค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียเหมือนกันระหว่างชุดที่ 1 และชุดที่ 2 จะพบว่ามีค่า K_s ใกล้เคียงกัน เช่น ค่า K_s ของถังปฏิกรณ์ Set1-14 ซึ่งมีเฉพาะ AOB สายพันธุ์ *N. oligotropha* นั้นมีค่า K_s มากกว่าถังปฏิกรณ์ Set2-14 ที่มี AOA และ AOB สายพันธุ์ *N. oligotropha* อยู่ด้วยกัน โดยมีอัตราส่วน ค่า K_s ระหว่างถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ชุด (ถังปฏิกรณ์ Set1-14:Set2-14) เท่ากับ 2:1 และเมื่อเปรียบเทียบในถังปฏิกรณ์ Set1-28 ซึ่งมีเฉพาะ AOB สายพันธุ์ *N. oligotropha* นั้นมีค่า K_s ใกล้เคียงกับของถังปฏิกรณ์ Set2-28 ที่มีทั้ง AOA และ AOB สายพันธุ์ *N. oligotropha* อยู่ด้วยกัน มีอัตราส่วนของค่า K_s เท่ากับ 1:1 (ถังปฏิกรณ์ Set1-28:Set2-28) และค่า K_s จากถังปฏิกรณ์ Set1-70 และ Set2-70 มีค่าใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับของถังปฏิกรณ์ Set1-280 ที่มีค่า K_s ใกล้เคียงกันกับถังปฏิกรณ์ Set2-280 ซึ่งสามารถคิดเป็นอัตราส่วน ของถังปฏิกรณ์ Set1-70:Set2-70 และ Set1-280:Set2-280 เท่ากับ 1:1 และ 1:1.4 ตามลำดับ (ดังตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 สรุปค่า K_s และการมีอยู่ของ AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ชุด

ถังปฏิกรณ์ ชุดที่ 1	ค่า $K_s \pm$ ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน(มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร)	AOA	AOB	ถังปฏิกรณ์ ชุดที่ 2	ค่า $K_s \pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน มาตรฐาน (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อ ลิตร)	AOA	AOB
Set1-14	1.9±0.7	-	<i>N. oligotropha</i>	Set2-14	0.6±0.3	+	<i>N. oligotropha</i>
Set1-28	2.1±0.6	-	<i>N. oligotropha</i>	Set2-28	3.3±1.3	+	<i>N. oligotropha</i>
Set1-70	13.9±8.5	-	<i>N. oligotropha</i> เท่ากับ <i>N. europaea</i>	Set2-70	10.1±5.7	-	<i>N. oligotropha</i> เท่ากับ <i>N. europaea</i>
Set1-280	17.2±5.3	-	<i>N. oligotropha</i> น้อยกว่า <i>N. europaea</i>	Set1-280	24.6±8.6	-	<i>N. oligotropha</i> เท่ากับ <i>N. europaea</i>
Set1-420	NA	NA	<i>N. oligotropha</i> น้อยกว่า <i>N. europaea</i>	Set2-420	42.4±19.9	-	<i>N. oligotropha</i> น้อยกว่า <i>N. europaea</i>

เครื่องหมาย

NA คือ Not Available

+ คือ พบยีน *amoA* ของ AOA

- คือ ไม่พบยีน *amoA* ของ AOA

ตารางที่ 4.5 ค่า K_s ของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ (pure culture) AOA สายพันธุ์ *N.maritimus* และ AOB สายพันธุ์ *N. europaea* และ *N. oligotropha*

ชนิด	สายพันธุ์	K_s (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	อ้างอิง
AOA	<i>N.maritimus</i>	0.002	Habbena และคณะ, 2009
AOB	<i>N. europaea</i>	12.3-27.4	Laanbroek และคณะ, 1994
		16.1-32.9	Koops และคณะ 2003
		7.7	Habbena และคณะ, 2009
	<i>N. oligotropha</i>	0.4-1.1	Stech และคณะ, 1995
		0.7-1.4	Bollmann และคณะ, 2002
		1.0-2.1	Koops และคณะ 2003

ผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ค่า K_s ของตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ชุด มีค่าใกล้เคียงกันทั้งๆที่ในถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1 (ถังปฏิกรณ์ Set1-14 และ Set1-28) ไม่พบ AOA ขณะที่ถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2 (ถังปฏิกรณ์ Set2-14 และ Set2-28) มี AOA ซึ่งหมายความว่า AOA ไม่ได้มีผลกับ K_s ของตะกอนจุลินทรีย์โดยรวม โดยค่า K_s จะเป็นไปตามกลุ่มประชากร AOB มากกว่า จากผลการศึกษา AOA บริสุทธิ์ พบว่า ค่า K_s ของ *N.maritimus* มีค่าเท่ากับ 0.002 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (ตารางที่ 4.5) ซึ่งน้อยกว่า ค่า K_s ของ AOB มาก (0.4-32.9 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) แสดงให้เห็นว่า การปรากฏของ AOA ไม่ได้ทำให้ ค่า K_s ของตะกอนจุลินทรีย์โดยรวมเปลี่ยนแปลงไป โดย AOA มักพบในสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำมากๆ จากงานวิจัยของ Habbena และคณะ(2009) พบว่า AOA น่าจะเป็นตัวการสำคัญในกระบวนการออกซิไดซ์แอมโมเนียในน้ำทะเล เนื่องจาก ค่า K_s ของ AOA มีค่าใกล้เคียงกับค่า K_s ในกระบวนการไนตริฟิเคชันในน้ำทะเลมากกว่าค่า K_s ของ AOB ในขณะที่ค่า K_s ที่ได้จากการทดลองนี้ (ตารางที่ 4.5) มีค่าใกล้เคียงกับ ค่า K_s ของ AOB บริสุทธิ์ (ตารางที่ 4.5) โดยค่า K_s ถังปฏิกรณ์ Set1-14 Set1-28 Set2-14 และ Set2-28 ซึ่งมีเฉพาะมี AOB สายพันธุ์ *N. oligotropha* มีค่า K_s ในช่วง 0.6-2.1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับค่า K_s ของ *N. oligotropha* ที่บริสุทธิ์ (ในช่วง 0.4-2.1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ทั้งนี้ความเข้มข้นของแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ดังกล่าว ณ วันที่เริ่มต้นแบทช์และวันที่สิ้นสุดแบทช์ มีค่าใกล้เคียงกับค่า K_s ของ *N. oligotropha*

ในส่วนของถังปฏิกรณ์ที่มีเฉพาะกลุ่มประชากร AOB ได้ทดลองหาค่า K_s ของจุลินทรีย์ที่ออกซิไดซ์แอมโมเนีย ได้แก่ ถังปฏิกรณ์ Set1-14 Set1-28 Set1-70 Set1-280 สำหรับถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1 และ Set2-70 Set2-280 และ Set2-420 สำหรับถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2 โดยเมื่อเปรียบเทียบค่า K_s ของถังปฏิกรณ์ดังกล่าวกับค่า K_s จากงานวิจัยที่ศึกษาจุลินทรีย์บริสุทธิ์ (ตารางที่ 4.5) พบว่าถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ (ถังปฏิกรณ์ Set1-14 และ Set1-28) มีค่า K_s ระหว่าง 0.6-3.3 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับค่า K_s ของ *N. oligotropha* ของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ คือ 0.4-2.1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรและสอดคล้องกับกลุ่มประชากร AOB ที่พบ (*N. oligotropha*) และค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียหลังสิ้นสุดแบทช์เฉลี่ย เท่ากับ 0.0-2.1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรในส่วนของ การทดลองหาค่า K_s ของ ถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูง มีค่า K_s ในช่วง 10.1-42.4 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกับค่า K_s ของ *N. europaea* ที่บริสุทธิ์ (ในช่วง 7.7-32.9 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) แต่จุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์นี้พบ *N. oligotropha* อยู่ด้วย จึงเป็นที่น่าสังเกตว่าค่า K_s ของตะกอนจุลินทรีย์ในถังดังกล่าวอยู่ในช่วงของ *N. europaea* ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *N. europaea* อาจเป็นจุลินทรีย์ที่ทำงานจริงในระบบ ทั้งนี้ อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ได้นำตะกอนจุลินทรีย์มาทำการหาค่า K_s ในวันที่ 45 ของการเดินระบบ ซึ่งในความเป็นจริงแล้วกลุ่มประชากรจุลินทรีย์อาจยังไม่ถึงจุดสมดุลที่แท้จริง เนื่องจากการเอาตะกอนจากถังปฏิกรณ์แบบแบทช์ไม่ได้นำตะกอนจุลินทรีย์ที่ไม่ทำงานออกจากระบบได้ดีเท่ากับถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง โดยการศึกษาของ Limpiyakorn และคณะ (2007) ที่ทำการศึกษา พบว่า ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียน้ำเข้า เท่ากับ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และมีความเข้มข้นของแอมโมเนียน้ำออก เท่ากับ 0 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร *N. oligotropha* หายไปหลังวันที่ 25 ของการเดินระบบ และมีการปรากฏของ *N. europaea* ตั้งแต่วันที่ 10 ของการเดินระบบ ซึ่งหมายความว่า *N. oligotropha* อาจมีอยู่ในถังปฏิกรณ์ของการทดลองนี้แต่ไม่ทำงาน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน โดย ส่วนที่ 1 เป็นการศึกษาผลของแอมโมเนียที่มีต่อยีน *amoA* ของ AOA และ AOB และ ต่อกลุ่มประชากร AOB ได้แก่จำนวนยีน *amoA* ของ *N. oligotropha* และ 16S rRNA ของ *N. europaea* และส่วนที่ 2 เป็นการศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ในการกำจัดแอมโมเนียของจุลินทรีย์ที่กำจัดแอมโมเนียในตะกอนจุลินทรีย์แบบผสมที่มีกลุ่มประชากรที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียแตกต่างกัน โดยผลการทดลองที่ได้สามารถตอบวัตถุประสงค์ของงานวิจัย ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

การศึกษาส่วนที่ 1 ความเข้มข้นของแอมโมเนียส่งผลต่อจำนวนยีน *amoA* ของ AOA AOB และ *N. oligotropha* และจำนวนยีน 16S rRNA ของ *N. europaea* คือ ในถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำ (ถังปฏิกรณ์ที่มีการวัด ณ วันที่แบทช์ประมาณ 14 และ 28 มิลลิกรัมในโตรเจนต่อลิตร) พบยีน *amoA* ของ AOA และ AOB (ความเข้มข้นของแอมโมเนียเมื่อสิ้นสุดแบทช์ประมาณ 0.0-2.1 มิลลิกรัมในโตรเจนต่อลิตร) ส่วนถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูง (ถังปฏิกรณ์ที่มีการวัด ณ วันที่แบทช์ประมาณ 70 280 และ 420 มิลลิกรัมในโตรเจนต่อลิตร) พบเฉพาะยีน *amoA* ของ AOB (ความเข้มข้นของแอมโมเนียเมื่อสิ้นสุดแบทช์ประมาณ 10-150 มิลลิกรัมในโตรเจนต่อลิตร) และถึงแม้ว่าระบบจะมี AOB ในทุกๆ ถังปฏิกรณ์ (ทั้งถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1 และ 2) แต่สัดส่วนประชากรของ AOB มีความแตกต่างกันในแต่ละถังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแอมโมเนียในถัง กล่าวคือ ในถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ จะพบเฉพาะ *N. oligotropha* ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียสูง จะพบ *N. europaea* ในปริมาณสูง ทั้งนี้ การปรากฏของกลุ่มจุลินทรีย์แต่ละชนิดในถังปฏิกรณ์จะสัมพันธ์กับค่า K_s ของจุลินทรีย์นั้นๆ และความเข้มข้นของแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ คือ ค่า K_s ของ จุลินทรีย์กลุ่ม *N. oligotropha* มีค่าต่ำ ทำให้พบจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ที่มีค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ ส่วนค่า K_s ของจุลินทรีย์กลุ่ม *N. europaea* มีค่าสูง ทำให้พบในถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูง

การศึกษาส่วนที่ 2 พบว่า ค่า K_s ของตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์แต่ละถังมีค่าแตกต่างกัน โดยค่า K_s ที่พบจะสอดคล้องกับค่า K_s ของ AOB บริสุทธิ์ที่พบในถัง กล่าวคือ ถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ จะพบเฉพาะ *N. oligotropha* ซึ่งมีค่า K_s อยู่ในช่วง 0.6-3.3 มิลลิกรัมในโตรเจนต่อลิตร และค่า K_s ในถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูง จะอยู่ในช่วงเดียวกับ *N. europaea* ซึ่งมีค่า K_s อยู่ในช่วง 10.1-24.6 มิลลิกรัมในโตรเจนต่อลิตร อย่างไรก็ตามเป็นที่

น่าสังเกตว่า ถึงแม้ในถึงปฏิกรณ์ที่ค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำบางถัง จะพบ AOA อยู่ร่วมกับ AOB สายพันธุ์ *N. oligotropha* แต่ค่า K_s ที่ได้อยู่ในช่วงค่า K_s ของ *N. oligotropha* อย่างเดียว ซึ่งแสดงว่า AOA อาจไม่มีผลทำให้ค่า K_s โดยรวมของตะกอนจุลินทรีย์เปลี่ยนไป ทั้งที่ความเป็นจริง AOA จะร่วมกันออกซิไดซ์แอมโมเนียด้วย

จากผลการทดลองทั้งสองส่วนสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของแอมโมเนียมีผลต่อจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB และมีผลต่อสัดส่วนประชากร AOB ได้แก่ *N. oligotropha* และ *N. europaea* คือ ในสถานะที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำจะพบ AOA และกลุ่มประชากร AOB สายพันธุ์ *N. oligotropha* และในสถานะที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงจะไม่พบ AOA และพบกลุ่มประชากร AOB สายพันธุ์ *N. europaea* นอกจากนี้ ความเข้มข้นของแอมโมเนียยังส่งผลต่อลักษณะการดำรงชีวิตของแต่ละจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม โดยจุลินทรีย์ที่พบแต่ละกลุ่มจะมีค่า K_s แตกต่างกัน ตามลักษณะทางกายภาพของจุลินทรีย์กลุ่มนั้นๆ ดังนั้น ผลการทดลองนี้สามารถนำไปใช้ในการพัฒนากระบวนการบำบัดไนโตรเจนในระบบบำบัดน้ำเสียโดยเลือกใช้กลุ่มจุลินทรีย์ที่บำบัดแอมโมเนียให้เหมาะสมกับสภาพของน้ำเสียแต่ละประเภท และนำค่า K_s สำหรับตะกอนจุลินทรีย์แต่ละแบบไปใช้ในการออกแบบระบบบำบัดน้ำเสียให้มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรศึกษาตำแหน่งของ AOA และ AOB ที่อยู่ในตะกอนจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization) ในการระบุตำแหน่งและพฤติกรรมของ AOA และ AOB เช่น สามารถดูการรวมกลุ่ม หรือตำแหน่ง ของ AOA และ AOB ในตะกอนจุลินทรีย์ เป็นต้น เพื่อให้ทราบว่าจุลินทรีย์กลุ่มใดที่กำลังกำจัดแอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสีย

5.2.2 ควรศึกษาปัจจัยอื่นของระบบบำบัดน้ำเสียต่อจำนวนประชากร AOA ในระบบบำบัดน้ำเสีย อาทิเช่น ฆ่าไฟด์ ออกซิเจน ระยะเวลาที่เก็บตะกอนจุลินทรีย์ เป็นต้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จารุณี เรียมพิมพ์. จลนศาสตร์การบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังโดยใช้กระบวนการสัมผัสแอนแอโรบิก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต, วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, 2545.

ชลธิพร สุทธิธรรม. การศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนในกรุงเทพมหานคร และการสร้างแบบจำลองทางคอมพิวเตอร์ของโรงบำบัดน้ำเสียดินแดง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต, สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2549.

พัชนียา ธรรมวงศ์. ข้อมูลเบื้องต้น Real-Time PCR. โรช ไดแอกโนสติกส์, 2551

วิลาสินี ไตรยราช. องค์การพิพิธภัณฑ์วิทยาศาสตร์แห่งชาติ. Eutrophication (ปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสี)[ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.nsm.or.th/nsm2008/modules.php?name=News&file=article &sid=1019> [2553, กุมภาพันธ์ 12]

อโนทัย โภคาธิกรณ์. 2549. Basic Real-time PCR. เอกสารประกอบประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง Introduction to Real time-PCR and its applications. วันที่ 16 - 17 พฤศจิกายน 2549 ณ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ภาษาอังกฤษ

Aakra, Å., Utåker, J. B. and Nes, I. F. RFLP of rRNA genes and sequencing of the 16S-23S rDNA intergenic spacer region of ammonia-oxidizing bacteria: A phylogenetic approach (1999) International Journal of Systematic Bacteriology, 49 (1), pp. 123-130.

APHA, AWWA and WEF. (2005) Standard Methods For the Examination of Water and Waste Water. 21st ed: Washington DC. American Public Health Association.

Beman, J. M. and Francis, C. A. Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified subtropical estuary: Bahia del Tobari, Mexico (2006) Applied and Environmental Microbiology, 72 (12), pp. 7767-7777.

- Bollmann, A., Bär-Gilissen, M.-J. and Laanbroek, H. J. Growth at low ammonium concentrations and starvation response as potential factors involved in niche differentiation among ammonia-oxidizing bacteria (2002) Applied and Environmental Microbiology, 68 (10), 4751–4757.
- Caffrey, J. M., Bano, N., Kalanetra, K. and Hollibaugh, J. T. Ammonia oxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia (2007) ISME Journal, 1 (7), pp. 660-662.
- Carvalho, L., Carrera, J. and Chamy, R. Nitrifying activity monitoring and kinetic parameters determination in a biofilm airlift reactor by respirometry(2002) Biotechnology Letters, 24 (24), pp. 2063-2066.
- Coolen, M. J. L., Abbas, B., Van Bleijswijk, J., Hopmans, E. C., Kuypers, M. M. M., Wakeham, S. G. and Sinninghe Damsté, J. S. Putative ammonia-oxidizing Crenarchaeota in suboxic waters of the Black Sea: A basin-wide ecological study using 16S ribosomal and functional genes and membrane lipids (2007) Environmental Microbiology, 9 (4), pp. 1001-1016.
- De La Torre, J. R., Walker, C. B., Ingalls, A. E., Könneke, M. and Stahl, D. A. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol (2008) Environmental Microbiology, 10 (3), pp. 810-818.
- Erguder, T. H., Boon, N., Wittebolle, L., Marzorati M. and Verstraete, W. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea (2009) FEMS Microbiology Reviews, 33 (5), pp. 855-869.
- Francis, C. A., Roberts, K. J., Beman, J. M., Santoro, A. E. and Oakley, B. B. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean (2005) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102 (41), pp. 14683-14688.
- Francis, C.A., Beman, J.M. and Kuypers, M.M.M. New processes and players in the nitrogen cycle: The microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation (2007) International Society for Microbial Ecology, 1 (1), pp. 19-27.
- Ginestet, P., Audic, J.-M., Urbain, V. and Block, J. C. Estimation of nitrifying bacterial activities by measuring oxygen uptake in the presence of the metabolic inhibitors allylthiourea and azide (1998) Applied and Environmental Microbiology, 64 (6), pp. 2266-2268.

- Goodman, J. M. Michaelis-Menten equation [online]. 2010. Available from: <http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/magnus/michmenten.html> [2010, March 22]
- Grady, L. C. P., Daigger, G.T. and Lim, H. C. (1998) Biological Wastewater Treatment, 1st ed. New York: Marcel Dekker.
- Habbena, M. W., Berube, P. M., Urakawa, H., De La Torre, J. R. and Stahl, D. A. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria (2009) Nature, 461 (7266), pp. 976-979.
- Harms, G., Layton, A. C., Dionisi, H. M., Gregory, I. R., Garrett, V. M., Hawkins, S. A., Robinson, K. G. and Sayler, G. S. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant (2003) Environmental Science and Technology, 37 (2), pp. 343-351.
- Hatzenpichler, R., Lebedeva, E. V., Spieck, E., Stoecker, K., Richter, A., Daims, H. and Wagner, M. A. moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring (2008) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105 (6), pp. 2134-2139.
- He, J.-Z., Shen, J.-P., Zhang, L.-M., Zhu, Y.-G., Zheng, Y.-M., Xu, M.-G. and Di, H. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices (2007) Environmental Microbiology, 9 (9), pp. 2364-2374.
- Herndl, G. J., Reinthaler, T., Teira, E., Van Aken, H., Veth, C., Pernthaler, A. and Pernthaler, J. Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep atlantic ocean (2005) Applied and Environmental Microbiology, 71 (5), pp. 2303-2309.
- Könneke, M., Bernhard, A. E., De La Torre, J. R., Walker, C. B., Waterbury, J. B. and Stahl, D. A. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon (2005) Nature, 437 (7058), pp. 543-546.
- Koops, H. P. and Pommerening-Röser, A. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species (2001) FEMS Microbiology Ecology, 37 (1), pp. 1-9.

- Koops, H. P., Purkhold U., Pommerening-Röser A., Timmermann G. and Wagner M. The Lithoautotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria (2003) The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. 3rd ed: release 3.13. New York. Springer-Verlag.
- Kowalchuck, G. A., Stephen, J. R., De Boer, W., Prosser, J. I., Embley, T. M. and Woldendorp, J.M. (1997) Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. Applied and Environmental Microbiology, 63, pp. 1489–1497.
- Kuypers, M. M. M., Silekers, A. O., Lavik, G., Schmid, M., Jørgensen, B. B., Kuenen, J. G., Sinninghe Damste, J. S., Strous, M. and Jetten, M. S. M. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea (2003) Nature, 422 (6932), pp. 608-611.
- Laanbroek, H. J., Bodelier, P. L. E. and Gerards, S. Oxygen consumption kinetics of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter hamburgensis* grown in mixed continuous cultures at different oxygen concentrations (1994) Archives of Microbiology, 161 (2), pp. 156-162.
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., Prosser, J. I., Schuster, S. C. and Schleper, C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils (2006) Nature, 442 (7104), pp. 806-809.
- Lim, J., Lee, S. and Hwang, S. Use of quantitative real-time PCR to monitor population dynamics of ammonia-oxidizing bacteria in batch process (2008) Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35 (11), pp. 1339-1344.
- Limpiyakorn, T., Kurisu, F., Sakamoto, Y. and Yagi, O. Effects of ammonium and nitrite on communities and populations of ammonia-oxidizing bacteria in laboratory-scale continuous-flow reactors (2007) FEMS Microbiology Ecology, 60 (3), pp. 501-512.
- Limpiyakorn, T., Sonthiphand, P., Rongsayamanont, C. and Polprasert, C. Abundance of *amoA* genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in activated sludge of full-scale wastewater treatment plants (2011) Bioresource Technology, 102 (4), pp. 3694-3701.
- Metcalf and Eddy. Wastewater Engineering Treatment and Reuse. 4th ed: McGraw-Hill, 2003.

- Nicol, G. W., Leininger, S., Schleper, C. and Prosser, J. I. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria (2008) Environmental Microbiology, 10 (11), pp. 2966-2978.
- Nicol, G. W. and Schleper, C. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? (2006) Trends in Microbiology, 14 (5), pp. 207-212.
- Norton, J. M., Alzerreca, J. J., Suwa, Y. and Klotz, M. G. Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria (2002) Archives of Microbiology, 177 (2), pp. 139-149.
- Park, H. D., Wells, G. F., Bae, H., Griddle, C. S. and Francis, C. A. Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors (2006) Applied and Environmental Microbiology, 72 (8), pp. 5643-5647.
- Rongsayamanont, C., Limpiyakorn, T., Law, B. and Khan, E. Relationship between respirometric activity and community of entrapped nitrifying bacteria: Implications for partial nitrification (2010) Enzyme and Microbial Technology, 46 (3-4), pp. 229-236.
- Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P. and Liesack, W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations (1997) Applied and Environmental Microbiology, 63 (12), pp. 4704-4712.
- Stech, G., Bottcher, B., Dittberner, P., Rath, G. and Koops, H. P., The ammonia oxidizing nitrifying population of the River Elbe estuary. (1995) FEMS Microbiology. Ecology, 17, pp.177–186.
- Sonthiphand, P. and Limpiyakorn, T. Change in ammonia-oxidizing microorganisms in enriched nitrifying activated sludge (2010) Applied Microbiology and Biotechnology, pp. 1-11.
- Treusch, A. H., Leininger, S., Kietzin, A., Schuster, S.C., Klenk, H. P. and Schleper, C. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling (2005) Environmental Microbiology, 7 (12), pp. 1985-1995.
- Tyagi S. and Kramer F. R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization (1996) National Biotechnology, 14(3), pp. 303–308.
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., Fouts, D. E., Levy, S., Knap, A. H., Lomas, M.

- W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y. H. and Smith, H. O. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea (2004) Science, 304 (5667), pp. 66-74.
- Wells, G. F., Park, H. D., Yeung, C. H., Eggleston, B., Francis, C. A. and Criddle, C. S. Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor: Betaproteobacterial dynamics and low relative abundance of Crenarchaea (2009) Environmental Microbiology, 11 (9), pp. 2310-2328.
- Widdel, F. and Bak, F. in The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Application 2nd ed (eds Ballows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H.) 3352--3378 (Springer, New York, 1992).
- Woese, C. R., Magrum, L. J. and Fox, G. E. Archaeobacteria (1978) Journal of Molecular Evolution, 11 (3), pp. 245-252.
- Wuchter, C., Abbas, B., Coolen, M. J. L., Herfort, L., Van Bleijswijk, J., Timmers, P., Strous, M., Teira, E., Herndl, G. J., Middelburg, J. J., Schouten, S. and Damsté, J. S. S. Archaeal nitrification in the Ocean (2006) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103 (33), pp. 12317-12322.
- Zhang, T., Jin, T., Yan, Q., Shao, M., Wells, G., Criddle, C. and Fang, H. H. P. Occurrence of ammonia-oxidizing Archaea in activated sludges of a laboratory scale reactor and two wastewater treatment plants (2009) Journal of Applied Microbiology, 107 (3), pp. 970-977.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีสกัดดีเอ็นเอจากตะกอนจุลินทรีย์

วิธีสกัดดีเอ็นเอจากตะกอนจุลินทรีย์ โดยใช้ Fast DNA SPIN Kit for soil

1. ชั่งตะกอนจุลินทรีย์ตัวอย่าง 0.25-0.35 กรัม ลงในหลอด PCR (PCR Tube) เติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเปิดสารละลายผสมออกมา 1 มิลลิลิตรใส่ใน Lysis matrix เติม MT buffer ปริมาตร 122 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายผสมที่เติม MT buffer ใส่ในชุด Fast Prep เป็นระยะเวลา 30 วินาที ด้วยความเร็ว 5.5 แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที
2. เปิดสารละลายผสมที่อยู่ด้านบนที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงตามข้อ 1. ใส่ในหลอด PCR ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เติม PPS agent ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วเขย่า จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที
3. เปิดเฉพาะดีเอ็นเอด้านบนที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงตามข้อ 2. เติม Binding matrix ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 3 นาที เปิดสารละลายที่อยู่ด้านบนที่ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
4. เปิดสารละลายที่เหลืออกมาปริมาตร 600 มิลลิลิตร ใส่ในตัวกรอง (Filter) ที่อยู่ด้านบน catch tube จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่อยู่ด้านบนนอกตัวกรองทิ้ง จากนั้นทำซ้ำอีกครั้ง
5. นำส่วนที่เหลืจากข้อ 3. เข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที เติมสารละลาย SEW-M ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที เทน้ำด้านบนทิ้ง แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบ เป็นเวลา 2 นาที
6. นำสารละลายจากข้อ 5. ใส่ลงใน catch tube ทิ้งไว้ 5 นาที ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลาย DES ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยง (Vortex) ให้สารไหลได้ แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบ เป็นเวลา 2 นาที
7. จากข้อ 4. และ ข้อ 6. นำตัวกรองทิ้ง จะได้ดีเอ็นเอที่สกัดแล้วอยู่ด้านล่างของ catch tube

ภาคผนวก ข

ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแอมโมเนียไนโตรเจน ไนโตรต์ และไนเตรต

ตารางที่ ข.1 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรต ของถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1

น้ำ	วันที่	14 mg N l ⁻¹			28 mg N l ⁻¹			70 mg N l ⁻¹			280 mg N l ⁻¹			420 mg N l ⁻¹		
		[NH ₄ ⁺]	[NO ₂ ⁻]	[NO ₃ ⁻]	[NH ₄ ⁺]	[NO ₂ ⁻]	[NO ₃ ⁻]	[NH ₄ ⁺]	[NO ₂ ⁻]	[NO ₃ ⁻]	[NH ₄ ⁺]	[NO ₂ ⁻]	[NO ₃ ⁻]	[NH ₄ ⁺]	[NO ₂ ⁻]	[NO ₃ ⁻]
→	1	15.0	-	-	20.0	-	-	72.5	-	-	250.0	-	-	480.0	-	-
←	4	0.0	10.5	4.7	7.2	6.8	13.1	55.8	5.7	65.8	120.9	21.5	228.9	150.0	21.5	43.0
→	4	9.0	5.0	2.4	15.0	4.9	6.6	60.0	2.7	28.6	250.0	15.4	140.1	450.0	15.4	35.3
←	7	0.1	10.2	19.2	5.8	13.4	28.4	48.6	19.7	89.4	141.2	44.2	294.2	160.0	44.2	92.9
→	7	15.0	6.8	11.3	25.0	8.4	12.2	90.0	14.9	35.8	290.0	27.6	126.6	400.0	27.6	49.8
←	11	0.1	12.2	27.2	4.9	4.3	29.3	52.9	28.2	118.2	149.0	13.8	303.8	140.0	13.8	33.1
→	11	16.0	7.7	10.5	30.0	2.1	19.4	80.0	14.1	38.2	250.0	6.9	114.4	430.0	6.9	9.0
←	15	0.0	15.5	31.5	0.0	12.3	42.3	19.8	34.6	114.6	101.5	93.3	343.3	145.0	93.3	214.5
→	15	19.2	4.3	12.3	33.9	6.8	22.3	70.5	14.4	45.2	280.0	51.8	123.3	470.0	51.8	124.4
←	19	0.0	10.4	29.6	0.1	19.5	53.4	13.2	37.9	108.4	108.0	15.8	295.8	150.0	15.8	41.2
→	19	11.6	8.5	12.5	27.8	8.5	23.9	82.4	22.3	52.7	238.0	6.9	147.4	420.0	6.9	18.6
←	22	0.0	19.6	31.2	2.0	32.0	59.8	20.3	49.4	131.8	100.0	130.4	368.4	135.0	130.4	169.5

เมื่อ → คือ เริ่มต้นแบทช์

← คือ สิ้นสุดแบทช์

- คือ ไม่ได้ตรวจวัดความเข้มข้น

ตารางที่ ข.1 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรต ของถังปฏิกรณ์ชุดที่ 1 (ต่อ)

น้ำ	วันที่	14 mg N l ⁻¹			28 mg N l ⁻¹			70 mg N l ⁻¹			280 mg N l ⁻¹			420 mg N l ⁻¹		
		[NH ₄ ⁺]	[NO ₂ ⁻]	[NO ₃ ⁻]	[NH ₄ ⁺]	[NO ₂ ⁻]	[NO ₃ ⁻]	[NH ₄ ⁺]	[NO ₂ ⁻]	[NO ₃ ⁻]	[NH ₄ ⁺]	[NO ₂ ⁻]	[NO ₃ ⁻]	[NH ₄ ⁺]	[NO ₂ ⁻]	[NO ₃ ⁻]
→	22	11.8	7.8	10.4	30.6	13.9	19.9	85.7	27.5	43.9	270.0	56.7	122.8	450.0	56.7	79.4
←	25	0.0	19.4	31.2	0.8	29.2	59.8	19.2	46.2	131.8	85.0	98.4	368.4	140.0	98.4	167.3
→	25	18.6	9.0	18.3	32.9	12.7	31.1	68.0	20.1	75.4	269.8	42.8	201.0	400.0	42.8	111.2
←	29	0.1	12.5	31.2	0.0	19.9	52.8	8.4	60.2	128.2	75.0	72.0	341.7	180.0	72.0	158.4
→	29	14.5	2.4	15.5	20.1	10.5	40.3	58.0	37.6	82.2	279.0	37.9	222.4	480.0	37.9	106.1
←	33	0.1	4.1	18.6	0.1	28.3	48.3	11.2	40.7	98.7	100.0	12.3	266.9	145.0	12.3	25.8

เมื่อ → คือ เริ่มต้นแบทช์
 ← คือ สิ้นสุดแบทช์

ตารางที่ ข.2 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนโตรต์ และไนเตรต ของถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2

น้ำ	วันที่	14 mg N l ⁻¹			28 mg N l ⁻¹			70 mg N l ⁻¹			280 mg N l ⁻¹			420 mg N l ⁻¹		
		[NH ₄ ⁺]	[NO ₂ ⁻]	[NO ₃ ⁻]	[NH ₄ ⁺]	[NO ₂ ⁻]	[NO ₃ ⁻]	[NH ₄ ⁺]	[NO ₂ ⁻]	[NO ₃ ⁻]	[NH ₄ ⁺]	[NO ₂ ⁻]	[NO ₃ ⁻]	[NH ₄ ⁺]	[NO ₂ ⁻]	[NO ₃ ⁻]
→	1	15	0.0	0.0	30.2	0.0	0.0	75.6	0.0	0.0	298.0	0.0	0.0	450.0	0.0	0.0
←	5	0.8	11.7	6.2	1.2	18.7	4.7	20.4	7.3	60.9	175.0	23.4	80.9	300.1	30.5	120.3
→	5	16.3	5.6	2.6	32.4	8.9	2.2	80.3	3.5	26.5	286.0	10.2	35.2	500.0	13.3	52.3
←	10	1.2	10.7	4.5	2.3	10.7	6.5	18.1	16.3	70.5	156.5	34.6	119.6	280.3	40.3	193.2
→	10	12.4	4.7	2.1	28.5	4.7	3.4	73.2	7.8	30.7	312.0	15.0	57.0	460.0	17.5	101.7
←	15	1	9.4	3.8	1.5	11.4	10.2	11.7	18.1	68.4	121.3	43.4	137.4	245.3	45.2	235.4
→	15	15.3	5.2	1.7	30.1	6.3	5.3	65.5	7.9	36.0	300.0	22.8	72.3	490.0	23.8	112.1
←	20	0.8	9.3	7.9	2.5	9.3	11.1	7.6	15.9	71.3	100.7	42.1	183.5	189.2	36.5	254.3
→	20	17.8	3.6	3.4	34.6	3.6	4.8	79.5	9.4	29.7	315.0	17.5	73.4	470.0	15.2	106.0
←	25	1.2	7.2	8.6	3.4	7.2	9.4	10.4	20.1	76.5	112.3	49.8	198.2	175.5	46.8	278.1
→	25	15.1	4.2	4.8	26.3	4.2	5.5	76.8	8.7	42.5	275.0	27.7	82.6	435.0	26.0	115.9
←	30	0.9	10.6	12.4	2.3	10.6	12.5	9.8	24.3	69.3	87.3	56.7	220.4	143.2	54.3	290.2

เมื่อ → คือ เริ่มต้นแบทช์
 ← คือ สิ้นสุดแบทช์

ตารางที่ ข.2 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรต ของถังปฏิกรณ์ชุดที่ 2 (ต่อ)

น้ำ	วันที่	14 mg N l ⁻¹			28 mg N l ⁻¹			70 mg N l ⁻¹			280 mg N l ⁻¹			420 mg N l ⁻¹		
		[NH ₄ ⁺]	[NO ₂ ⁻]	[NO ₃ ⁻]	[NH ₄ ⁺]	[NO ₂ ⁻]	[NO ₃ ⁻]	[NH ₄ ⁺]	[NO ₂ ⁻]	[NO ₃ ⁻]	[NH ₄ ⁺]	[NO ₂ ⁻]	[NO ₃ ⁻]	[NH ₄ ⁺]	[NO ₂ ⁻]	[NO ₃ ⁻]
→	30	15.7	5.0	5.2	27.7	5.0	5.2	75.6	14.3	31.5	290.0	25.8	95.8	470.0	24.7	116.1
←	35	1.4	8.7	19.5	1.8	8.7	15.4	8.6	25.4	72.3	107.2	57.8	246.5	121.5	55.4	287.5
→	35	16.5	4.1	9.3	31.3	4.1	6.4	70.8	11.0	34.4	285.0	27.5	107.2	490.0	26.4	159.7
←	40	1.7	6.5	17.3	2.6	6.5	16.3	7.5	22.1	80.6	94.3	53.2	250.3	167.8	53.7	293.2
→	40	19.1	3.4	9.1	34.2	3.4	7.4	72.1	13.0	44.8	290.0	29.6	100.1	445.0	29.8	146.6
←	45	1.1	7.8	15.6	1.7	7.8	19.1	8.9	21.9	78.9	98.1	48.9	256.6	170.9	60.3	301.9

เมื่อ → คือ เริ่มต้นแบทช์
 ← คือ สิ้นสุดแบทช์

ตารางที่ ข.3 ความเข้มข้นแอมโมเนีย ไนไตรต์ ไนเตรต และค่าออกซิเจนละลายต่อชั่วโมง ของการทดลองหาค่ากลนพลศาสตร์

ถึง ปฏิกรณ์	[NH ₄ ⁺] (มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร)		[NO ₂ ⁻] (มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร)		[NO ₃ ⁻] (มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร)		DO (มิลลิกรัม ต่อลิตร)	
	เริ่มต้น	สิ้นสุด	เริ่มต้น	สิ้นสุด	เริ่มต้น	สิ้นสุด	นาที่ ที่ 0	นาที่ ที่ 60
Set1-14	control	-	-	-	-	-	8.31	8.27
MLSS	0.0	-	-	-	-	-	7.76	7.72
150	0.5	-	-	-	-	-	8.27	8.20
มิลลิกรัม	0.7	0.5	0.6	0.9	0.9	0.9	7.84	7.74
ต่อลิตร	3.0	-	-	-	-	-	8.13	7.98
	7.6	-	-	-	-	-	8.05	7.85
	9.2	-	-	-	-	-	7.43	7.17
	10.5	-	-	-	-	-	7.65	7.46
Set1-28	control	-	-	-	-	-	7.30	7.24
MLSS	0.3	-	-	-	-	-	7.80	7.74
150	1.2	-	-	-	-	-	7.60	7.47
มิลลิกรัม	3.0	1.9	0.9	1.7	0.8	0.8	7.90	7.70
ต่อลิตร	9.0	-	-	-	-	-	7.40	7.15
	10.7	-	-	-	-	-	6.90	6.60
	15.0	-	-	-	-	-	7.60	7.24
	21.0	-	-	-	-	-	7.30	7.00
Set1-70	control	-	-	-	-	-	8.10	8.10
MLSS	0.0	-	-	-	-	-	7.80	7.73
150	3.0	1.4	1.2	2.1	0.9	0.9	7.60	7.43
มิลลิกรัม	6.4	-	-	-	-	-	7.70	7.38
ต่อลิตร	10.5	-	-	-	-	-	7.50	7.16
	13.3	-	-	-	-	-	7.60	7.18
	20.0	-	-	-	-	-	7.70	7.33

เมื่อ ความเข้มข้นแอมโมเนีย ไนไตรต์และไนเตรต เป็นค่าที่ได้จากการสุ่มวัดเมื่อเริ่มต้นการทดลอง และสิ้นสุดการทดลอง และค่าออกซิเจนละลาย เป็นค่าที่ได้จากการทดลองที่ 60 นาทีแรก

- คือ ไม่ได้ตรวจวัดความเข้มข้น

ตารางที่ ข.3 ความเข้มข้นแอมโมเนีย ไนโตรต์ ไนเตรต และค่าออกซิเจนละลายต่อชั่วโมง ของการทดลองหาค่าจลนพลศาสตร์ (ต่อ)

ถึง ปฏิกรณ์	[NH ₄ ⁺] (มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร)		[NO ₂] (มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร)		[NO ₃] (มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร)		DO(มิลลิกรัม ต่อลิตร)	
	เริ่มต้น	สิ้นสุด	เริ่มต้น	สิ้นสุด	เริ่มต้น	สิ้นสุด	นาที ที่ 0	นาที ที่ 60
Set1- 280 MLSS 200 มิลลิกรัม ต่อลิตร	control(0.0)	0.0	0.2	0.2	0.5	0.5	7.10	7.10
	0.0	-	-	-	-	-	7.40	7.26
	1.4	-	-	-	-	-	7.60	7.24
	9.8	7.1	1.3	2	1.2	1.2	6.80	5.57
	14.0	-	-	-	-	-	7.30	5.85
	49.0	48.0	1.1	1.9	0.7	0.7	7.20	4.32
	70.0	-	-	-	-	-	7.80	5.54
Set2-14	control	-	-	-	-	-	8.32	8.32
MLSS	0.0	-	-	-	-	-	8.35	8.35
100	0.3	0.2	0.5	0.7	0.5	0.5	7.88	7.85
มิลลิกรัม ต่อลิตร	0.6	-	-	-	-	-	7.54	7.50
	0.7	-	-	-	-	-	6.89	6.82
	1.2	-	-	-	-	-	7.12	7.06
Set2-28	control	-	-	-	-	-	7.89	7.89
MLSS	0.2	-	-	-	-	-	7.81	7.80
100	1.7	1.2	0.9	1.3	0.6	0.6	7.54	7.50
มิลลิกรัม ต่อลิตร	5.4	-	-	-	-	-	7.65	7.57
	11.4	10.8	1.2	1.7	0.8	0.8	7.46	7.35
	15.9	-	-	-	-	-	6.89	6.80

เมื่อ ความเข้มข้นแอมโมเนีย ไนโตรต์และไนเตรต เป็นค่าที่ได้จากการสุ่มวัดเมื่อเริ่มต้นการทดลอง และสิ้นสุดการทดลอง และค่าออกซิเจนละลาย เป็นค่าที่ได้จากการทดลองที่ 60 นาทีแรก

- คือ ไม่ได้ตรวจวัดความเข้มข้น

ตารางที่ ข.3 ความเข้มข้นแอมโมเนีย ไนโตรต์ ไนเตรต และค่าออกซิเจนละลายต่อชั่วโมง ของการทดลองหาค่าจลนพลศาสตร์ (ต่อ)

ถึง ปฏิกรณ์	[NH ₄ ⁺] (มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร)		[NO ₂] (มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร)		[NO ₃] (มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร)		DO(มิลลิกรัม ต่อลิตร)	
	เริ่มต้น	สิ้นสุด	เริ่มต้น	สิ้นสุด	เริ่มต้น	สิ้นสุด	นาที่ ที่ 0	นาที่ ที่ 60
Set2-70 MLSS 100 มิลลิกรัม ต่อลิตร	control	-	-	-	-	-	7.87	7.87
	0.0	-	-	-	-	-	7.87	7.86
	5.0	-	-	-	-	-	7.85	7.76
	10.5	-	-	-	-	-	7.56	7.42
	13.5	-	-	-	-	-	7.89	7.69
	15.7	14.8	1.1	1.6	0.9	0.9	7.13	6.97
Set2- 280 MLSS 100 มิลลิกรัม ต่อลิตร	control(0.1)	0.1	0.4	0.4	1.2	1.2	7.12	7.12
	0.0	-	-	-	-	-	7.81	7.81
	19.3	17.8	0.5	1.7	1.4	1.4	7.45	7.23
	38.3	-	-	-	-	-	7.65	7.20
	78.0	-	-	-	-	-	7.67	7.09
	127.1	-	-	-	-	-	7.89	7.40
Set2- 420 MLSS 100 มิลลิกรัม ต่อลิตร	control	-	-	-	-	-	7.43	7.43
	0.0	-	-	-	-	-	7.34	7.34
	18.4	-	-	-	-	-	7.85	7.72
	23.5	22.9	0.8	1.3	1.1	1.1	7.45	7.22
	54.0	-	-	-	-	-	7.62	7.22
	75.0	-	-	-	-	-	7.89	7.55

เมื่อ ความเข้มข้นแอมโมเนีย ไนโตรต์และไนเตรต เป็นค่าที่ได้จากการสุ่มวัดเมื่อเริ่มต้นการทดลอง และสิ้นสุดการทดลอง และค่าออกซิเจนละลาย เป็นค่าที่ได้จากการทดลองที่ 60 นาทีแรก

- คือ ไม่ได้ตรวจวัดความเข้มข้น

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวภัทรพร คุณาพงษ์กิติ เกิดเมื่อวันที่ 4 มีนาคม พ.ศ. 2529 ที่จังหวัดสมุทรสงคราม สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจาก โรงเรียนศรีรัตนสมุทร เมื่อปี พ.ศ. 2546 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เมื่อปี พ.ศ. 2550 และเข้ารับการศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2551

เผยแพร่งานวิจัย ในการประชุมวิชาการทางวิทยาศาสตร์ วิศวกรรมและการจัดการสิ่งแวดล้อม ครั้งที่ 3 (Conference in Environment Science, Engineering and Management, CESEM) วันที่ 14-15 มีนาคม พ.ศ. 2554 ณ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หัวข้อเรื่อง จลนพลศาสตร์ของตะกอนแร่ที่มีกลุ่มประชากรแอมโมเนียออกไซด์ซึ่งแบคทีเรียแตกต่างกัน