กลุ่มประชากรและปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง

นางสาวปพิชญา ศรีเทพ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMMUNITIES AND EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON COMMUNITIES OF NITRITE-OXIDIZING BACTERIA IN SHRIMP PONDS

Miss Papitchaya Srithep

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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	กลุ่มประชากรและปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง
โดย	นางสาวปพิชญา ศรีเทพ
สาขาวิชา	วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ดร. ตะวัน ลิมปิยากร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. สรวิศ เผ่าทองศุข

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชวลิต รัตนธรรมสกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ดร. ตะวัน ลิมปิยากร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร. สรวิศ เผ่าทองศุข)

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

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.สมเกียรติ เตชกาญจนารักษ์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปพิชญา ศรีเทพ : กลุ่มประชากรและปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง (Communities and effect of environmental factors on communities of nitrite-oxidizing bacteria in shrimp ponds) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ดร. ตะวัน ลิมปิยากร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ดร. สรวิศ เผ่าทองศุข, 154 หน้า.

ปัญหาที่พบในระบบเพาะเลี้ยงกุ้ง คือการควบคุมปริมาณไนโตรเจนโดยปกติแล้วระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งจะมีปัญหาในการควบคุมและการกำจัดไนโตรเจนแตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพของระบบแบบนั้นๆการย่อยสลายทางชีวภาพจะเป็นกลไกหลักในการควบคุมปริมาณไนโตรเจนในระบบเพาะเลี้ยง ซึ่งในกระบวนการนี้มีแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่มีการเจริญเติบโตช้าและมีความอ่อนไหวต่อสภาวะแวดล้อม จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นทำให้เกิดงานวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นการศึกษากลุ่มประชากร NOB จากระบบเพาะเลี้ยงแบบต่างๆ ได้แก่ ระบบเพาะเลี้ยงกุ้งกลางแจ้ง ระบบบำบัดน้ำหมุนเวียนของบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง และระบบบำบัดน้ำในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ ซึ่งแต่ละบ่อมีความหนาแน่นกุ้งและความเค็มแตกต่างกัน ด้วยเทคนิค Specific-PCR-cloning-sequencing ซึ่งในการทดลองนี้ได้รวบรวมไพร์เมอร์จากหลายงานวิจัยแล้วมาทำการทดสอบด้วย ARB program package เพื่อให้ได้ไพร์เมอร์ที่ครอบคลุมกลุ่มประชากร NOB มากที่สุด จากการทดลองส่วนนี้พบกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* ในทุกระบบการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้เนื่องจากในทุกระบบเพาะเลี้ยงกุ้งมีปริมาณไนตรต์ในช่วง 0.02 – 0.17 มคก.ไนโตรเจน/ล. ซึ่งแบคทีเรียสกุลดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงปริมาณไนไตรต์ต่ำ (4.9 มล.ไนโตรเจน/ล.) เนื่องจากมี ลักษณะสมบัติแบบ K-strategists และมีการกระจายตัวใน 2 Sublineage คือ SublineageII (*Nitrospira moscoviensis* lineage) และ SublineageIV (*Nitrospira marina* lineage) และไม่พบกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrobacter* ในทุกระบบการเพาะเลี้ยง เนื่องจากแบคทีเรียสกุลนี้มีลักษณะสมบัติแบบ R-strategists คือเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจนและความเข้มข้นไนไตรต์สูง ดังนั้นหากต้องการประยุกต์ใช้ NOB เพื่อใช้บำบัดน้ำเสียจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้ง ควรพัฒนา NOB สกุล *Nitrospira marina* เนื่องจากเป็น NOB สกุลดังกล่าวพบในทุกระบบการเพาะเลี้ยง ไม่ว่าจะเป็นระบบบ่อดินกลางแจ้งหรือระบบบ่อบ่อในโรงเรือน ทั้งในบ่อที่มีความเค็มสูงและบ่อที่มีความเค็มต่ำ โดยครอบคลุมถึงบ่อที่มีความหนาแน่นกุ้งสูงและบ่อที่มีความหนาแน่นกุ้งต่ำ ส่วนที่ 2 ศึกษาผลกระทบของประเภทของสารประกอบไนโตรเจนต่ออัตราการกำจัดไนไตรต์พบว่าสารประกอบไนโตรเจนประเภทต่างๆที่ใช้เป็นสารเริ่มต้นในการบ่ม ได้แก่ สารประกอบแอมโมเนีย ไนไตรต์ และแอมโมเนียและไนไตรต์ หลังจากนั้นนำตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนข้างต้นมาทำการทดลองการกำจัดไนไตรต์ปริมาณ 10 มล.กไนโตรเจน/ล. พบว่าประเภทของสารประกอบไนโตรเจนที่ใช้เป็นสารเริ่มต้นในการบ่มไม่มีผลต่ออัตราการกำจัดไนไตรต์ หลังจากนั้นศึกษากลุ่มประชากร NOB บนตัวกรองที่ผ่านการบ่มและชุดการทดลองการกำจัดไนไตรต์โดยใช้ตัวกรองที่ผ่านการบ่ม พบว่าประเภทของสารประกอบไนโตรเจนไม่มีผลต่อกลุ่มประชากร NOB คือมีการพบกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* กลุ่มSublineageII (*Nitrospira moscoviensis* lineage) และ SublineageIV (*Nitrospira marina* lineage) เช่นเดียวกับในระบบเพาะเลี้ยงกุ้ง และไม่พบกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrobacter* ในทุกชุดตัวกรอง ดังนั้นถ้าต้องการเลี้ยงกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* เพื่อใช้ในการกำจัดไนไตรต์ในระบบเพาะเลี้ยงกุ้ง ใช้สารประกอบไนโตรเจนประเภทใดก็ได้เป็นสารตั้งต้นในการบ่ม แต่ให้มีปริมาณสารตั้งต้นมีปริมาณ เพื่อให้ได้แบคทีเรียกลุ่ม *Nitrospira marina* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปและเป็นสกุลเด่นที่พบในระบบเพาะเลี้ยงทุกแบบ

ภาควิชา.....วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม.....ลายมือชื่อนิสิต.....ปพิชญา ศรีเทพ.....

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

ปีการศึกษา.....2553.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5070580521: MAJOR ENVIRONMENTAL ENGINEERING

KEYWORDS : SHRIMP POND / NITRIFICATION / NITRITE OXIDIZING BACTERIA/ NITROBACTER/NITROSPIRA

PAPITCHAYA SRITHEP : COMMUNITIES AND EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON COMMUNITIES OF NITRITE-OXIDIZING BACTERIA IN SHRIMP PONDS. THESIS ADVISOR : TAWAN LIMPIYAKORN, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : SORAWIT POWTONGSOOK, Ph.D., 154 pp.

The major concern for culturing shrimp is the controlling of quality of water in the pond and effluent. In general, this can be achieved by biological nitrogen removal via nitrification and denitrification processes. Among these sequential processes, nitrite oxidation by NOB is believed to be the rate-limiting step due to their slow growth rate and more sensitivity to several environmental factors such as salinity and pH than AOB. This study contains 2 parts, first, an investigation of future NOB community in shrimp culture pond in Thailand in order to develop the high strength marine NOB and the other part, study of effects from each type of nitrogen compounds on biofilters' nitrite removal rate. In the first part, analyze NOB communities, sediment/water/biofilm were taken to the type of shrimp ponds including outdoor-earthen pond, outdoor-lining pond, indoor pond with water recirculation system and water recirculation system of marine aquarium. The communities of NOB are analyzed by using specific Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification, cloning, and sequencing. In this study, primers were selected specifically by ARB program package in order to obtain primers that covered the largest NOB. In this part of the experiment, *Nitrospira* was found in every culture system. This was due to the fact that every shrimp culture system had nitrite concentration in a range of 0.02-0.17 mg-N/l. The bacteria in this genus could grow in a low range of nitrite (4.9 mg-N/l) because of their K-strategists characteristics and 2 sublineages distribution, which were SublineageII *(Nitrospira moscoviensis* lineage) and SublineageIV (*Nitrospira marina* lineage). Furthermore, *Nitrobacter* was not found in any culture system, because these bacteria had R-strategists characteristics, which means that they could grow well under aerobic and high nitrite condition. It can be seen that if NOB were to be used for treating wastewater from shrimp culture system, then *Nitrospira marina* should be further developed. Since the said NOB were detected in every culture system, including outdoor earthen pond and indoor culture system, both high and low salinity ponds as well as high and low density shrimp systems.The second part was a study of effects from each type of nitrogen compounds on biofilters' nitrite removal rate. These biofilters had passed through immobilization process from indoor shrimp culture system. From studying NOB population on biofilters, it was found that type of nitrogen compounds had no effect on nitrite removal rate at nitrite concentration of 10 mg-N/l. Or in other word, in regardless of the type of nitrogen compounds presented, nitrite removal rates were similar and had minor effects on the change of NOB between biofilters that were immobilized under different nitrogen compound conditions (ammonia, nitrite, and ammonia+nitrite) and biofilters that passed through nitrite removal rate measurement by using immobilized filters. Most of the experiment sets had NOB with 2 sublineages distribution, including SublineageII *(Nitrospira moscoviensis* lineage) and SublineageIV (*Nitrospira marina* lineage).

From both part of experiment, it can be seen that if NOB were to be used for treating wastewater from shrimp culture system, then *Nitrospira marina* should be further developed. Since the said NOB were detected in every culture system, including outdoor earthen pond and indoor culture system, both high and low salinity ponds as well as high and low density shrimp systems. In addition, any nitrogen compounds could be used for seed culture development, however, the nitrogen concentration must be low in order to obtain the same kind of bacteria found in shrimp culture system.

Department:.....Environmental Engineering.....Student's Signature..ปภิชญา ศรีเทพ.....

Field of Study:.....Environmental Engineering.....Advisor's Signature.....

Academic Year:.....2010.....Co-Advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ดร.ตะวัน ลิมปิยากร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.สรวิศ เผ่าทองสุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือตลอดทุกขั้นตอนในการทำวิจัยและตรวจทานแก้วิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ชวลิต รัตนธรรมสกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรัณย์ เตชะเสน และ ดร.สมเกียรติ เตชกาญจนารักษ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจทานวิทยานิพนธ์และคำแนะนำทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้กรุณามอบความรู้อันเป็นประโยชน์ คำแนะนำ และความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาในการศึกษา ณ ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยหลักจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและทุนอุดหนุนของภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตรายที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่สำหรับการทำวิจัย

ขอขอบคุณศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ และสารเคมีในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ภาควิชาวิศวกรรมศาสตร์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับมิตรภาพ กำลังใจ ตลอดจนความช่วยเหลือทั้งในด้านการเรียนและการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่มอบความรัก กำลังใจ และสนับสนุนข้าพเจ้าในทุกๆด้าน ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญภาพ..... ฒ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... 3

1.3 ขอบเขตของวิจัย..... 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 5

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม..... 6

2.1 วัฏจักรไนโตรเจน..... 6

2.1.1. กระบวนแอมโมนิฟิเคชัน (Amonification)..... 7

2.1.2. กระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification)..... 7

2.1.3. กระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification)..... 7

2.1.4 ปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอมโมเนียในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Anaerobic ammonium oxidation)..... 8

2.2 กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิงไดซิงแบคทีเรีย 8

2.2.1 ข้อมูลทั่วไป..... 8

2.2.2 ประเภทของไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย..... 8

2.2.2.1 แบ่งตามลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology)..... 8

2.2.2.2 แบ่งตามลักษณะวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (phylogeny)..... 9

2.2.3 แหล่งที่พบกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย..... 18

2.2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย..... 19

2.2.4.1 ความเป็นกรด-ด่าง..... 19

หน้า

2.2.4.2 อุณหภูมิ……..…….. 19
2.2.4.3 ไนไตรต์…… 19
2.2.4.4 ความเค็ม…….. 19
2.2.5 วิธีการจำแนกไนไตรต์ออกซิงไดซิงแบคทีเรีย……..……. 25
2.2.5.1 เทคนิค PCR-Cloning……...…… 25
2.2.5.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสแบบเวลาจริง
(Real-Time Polymerase Chain Reaction; Real-Time PCR)…… 27
2.3 การเลี้ยงกุ้ง…… 31
2.3.1 การเลี้ยงกุ้ง……..... 31
2.3.1.1 ประเภทของการเลี้ยงกุ้ง…….... 31
2.3.1.2 คุณภาพน้ำที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้ง……..……. 34
2.3.1.3 ตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้ง…….…….. 38
2.3.2 สารประกอบไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงกุ้ง……... 39
2.3.2.1 การสะสมไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงกุ้ง…… 39
2.3.2.2 การเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงกุ้ง..... 39
2.3.2.3 ผลกระทบของไนโตรเจนต่อสิ่งแวดล้อม…… 41
2.4 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง…… 42

บทที่ 3 แผนการทดลองและการดำเนินการวิจัย…… 45
3.1 การดำเนินการวิจัย…… 45
3.2 วิธีการวิเคราะห์……. 52
3.2.1ปัจจัยสิ่งแวดล้อม..... 52
3.2.1.1 การเตรียมตัวอย่างก่อนการวัด……..…. 52
3.2.1.2 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแอมโมเนีย..... 53
3.2.1.3 วิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนไตรต์……..……. 53
3.2.1.4 วิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนเตรต……. 53
3.2.1.5 วิธีการวัดความเค็ม……... 53
3.2.16 วิธีการวัดปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ …….. 53
3.2.1.7 วิธีค่าความเป็นกรดด่าง (ในน้ำ)……..…. 53

หน้า

3.2.1.8 วิธีการวัดอุณหภูมิ…… 54
3.2.1.9 วิธีการวัดความเป็นด่าง (ในน้ำ)..... 54
3.2.1.10 วิธีการวัดประสิทธิภาพในการออกซิเดชันรีดักชัน (วัดทั้งในดินและในน้ำ)..... 54
3.2.2 การศึกษาจำนวนและกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งและบนตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการบ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนต่างชนิดและหลังจากผ่านการบำบัดไนไตรต์……... 55
3.2.2.1 การเตรียมตัวอย่าง..... 56
3.2.2.2 การศึกษากลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย…..…… 56
3.2.2.3 การศึกษาจำนวนประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย…..…. 57

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลทดลอง……..…….. 59
4.1 การทดลองส่วนที่1 กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งและศึกษาผลกระทบของปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย..... 59
4.1.1 ลักษณะของบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง…… 59
4.1.1.1 ระบบบ่อดินกลางแจ้ง ……..... 59
4.2.1.2 ระบบบ่อไร้ดินกลางแจ้ง.....……. 59
4.2.1.3 ระบบบ่อในโรงเรือน……. 59
4.2.1.4 ระบบบำบัดคุณภาพน้ำในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ..... 59
4.1.2 การเลือกไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย……. 63
4.1.2.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงและครอบคลุมของไพรเมอร์ต่อกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย สกุล *Nitrobacter*……. 64
4.1.2.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงและครอบคลุมของไพรเมอร์ต่อกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย สกุล *Nitrospira*…… 66
4.1.3 กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่พบในระบบเพาะเลี้ยงกุ้ง…… 69

หน้า

4.1.4 ปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่พบในระบบเพาะเลี้ยงกุ้ง…… 77
4.1.4.1 ความหนาแน่นกุ้งต่อกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย…… 77
4.1.4.2 ผลของความเค็มต่อกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย…… 79
4.1.5 จำนวนประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้ง 81
4.2 การทดลองส่วนที่ 2 การศึกษาผลกระทบของประเภทของสารประกอบไนโตรเจนต่ออัตราการบำบัดไนไตรต์และศึกษากลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการตรึงแล้วหลังจากผ่านการบำบัดไนไตรต์ …… 85
4.2.1 การบ่มตัวกรองด้วยสารประกอบไนโตรเจนที่ต่างกัน…….. 86
4.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพหัวเชื้อไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่ตรึงอยู่บนตัวกรองชีวภาพในการบำบัดไนไตรต์..... 90
4.2.3 กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนที่ต่างกันและตัวกรองที่ผ่านการวัดอัตราการกำจัดไนไตรต์…… 93
4.2.4 จำนวนประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนที่ต่างกันและตัวกรองที่ผ่านการวัดอัตราการกำจัดไนไตรต์..... 102

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ……..... 109
5.1 การศึกษากลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งและศึกษาผลกระทบของปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย…...……. 109
5.2 การศึกษาผลกระทบของประเภทของสารประกอบไนโตรเจนต่ออัตราการบำบัดไนไตรต์และศึกษากลุ่มประชากรและจำนวนไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการตรึงแล้วหลังจากผ่านการบำบัดไนไตรต์..... 110
5.3 ข้อเสนอแนะ……..…….. 111

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

รายการอ้างอิง..... 111

ภาคผนวก..... 119
ภาคผนวก ก..... 120
ภาคผนวก ข..... 122
ภาคผนวก ค..... 133
ภาคผนวก ง..... 136
ภาคผนวก จ..... 143
ภาคผนวก ฉ..... 146
ภาคผนวก ช..... 150
ภาคผนวก ซ..... 152

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 156

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ลักษณะทั่วไปของไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียทั้ง 4 สกุล……..…….. 9
ตารางที่ 2.2 กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียแต่ละสกุลที่พบในระบบ
สิ่งแวดล้อม……..... 21
ตารางที่ 2.3 สรุปลักษณะทางกายภาพ สภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของกลุ่ม
ประชากรNOB สกุล *Nitrobacter* *Nitrospina* และ *Nitroccocus*…….... 22
ตารางที่ 2.4 สรุปลักษณะทางกายภาพ สภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของกลุ่ม
ประชากรNOB สกุล *Nitrospira*…… 24
ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์กลุ่มประชากรNOB…… 27
ตารางที่ 2.6 ผลกระทบของพีเอชต่อกุ้งกุลาดำ..... 35
ตารางที่ 2.7 ผลกระทบของปริมาณออกซิเจนต่อกุ้งกุลาดำ…… 36
ตารางที่ 2.8 ปริมาณแอมโมเนียอิสระและผลกระทบต่อกุ้งทะเล……..…… 37
ตารางที่ 2.9 สรุปคุณภาพน้ำที่เหมาะกับการเลี้ยงกุ้ง……..… 38
ตารางที่ 2.10 ตารางสรุปผลกระทบของตะกอนต่อสุขภาพกุ้ง..... 39
ตารางที่ 3.1 สรุปวิธีวิเคราะห์ปัจจัยสิ่งแวดล้อม…… 54
ตารางที่ 3.2 ไพร์เมอร์และโปรแกรมสังเคราะห์ดีเอ็นเอ……..…… 58
ตารางที่ 4.1 รายละเอียดของแต่ละตัวอย่างระบบการเพาะเลี้ยงกุ้ง……...…… 61
ตารางที่ 4.2 รายละเอียดปัจจัยสิ่งแวดล้อมของแต่ละตัวอย่างในแต่ละระบบเพาะเลี้ยงกุ้ง…..... 62
ตารางที่ 4.3 ตัวอย่างไพรเมอร์ ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิง
แบคทีเรีย (16S rDNA)…….. 64
ตารางที่ 4.4 ความจำเพาะเจาะจงและการครอบคลุมของไพร์เมอร์ แต่ละชุดไพร์เมอร์ต่อกลุ่ม
ประชากรNOB สกุล *Nitrobacter*…….. 65
ตารางที่ 4.5 ความจำเพาะเจาะจงและการครอบคลุมของไพร์เมอร์ แต่ละชุดต่อ กลุ่ม
ประชากร NOB สกุล *Nitrospira*……... 67
ตารางที่ 4.6 ความเหมือนของ รหัสพันธุกรรมของตัวอย่างจากแต่ละรบบเพาะเลี้ยงกุ้งและ
ฐานข้อมูล…… 70
ตารางที่ 4.7 สรุปการกระจายตัวของกลุ่ม NOB ในแต่ละตัวอย่างระบบเพาะเลี้ยง..... 77

หน้า

ตารางที่ 4.8 สรุปกลุ่มประชากร NOB และปัจจัยสิ่งแวดล้อมของแต่ละตัวอย่างจากแต่ละระบบเพาะเลี้ยง..... 80
ตารางที่ 4.9 จำนวน NOB จากตัวแทนจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งแต่ละระบบ..... 82
ตารางที่ 4.10 จำนวน *Nitrospira* จากตัวอย่างตะกอนจากสถานที่ต่างๆ โดยวิธี real time PCR..... 83
ตารางที่ 4.11 ปัจจัยสิ่งแวดล้อมในชุดการทดลองบ่มตัวกรองด้วยสารประกอบไนโตรเจนที่ต่างกัน..... 89
ตารางที่ 4.12 ปัจจัยสิ่งแวดล้อมในชุดการทดลองบำบัดไนไตรต์ด้วยตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนต่างชนิดกัน..... 93
ตารางที่ 4.13 ความเหมือนของรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างตัวกรองและฐานข้อมูล..... 95
ตารางที่ 4.14 สรุปการกระจายตัวของกลุ่มประชากร NOB ในแต่ละตัวอย่างจากตัวกรองแต่ละชุดการทดลอง..... 100
ตารางที่ 4.15 จำนวน NOB จากตัวกรองจากทั้ง 2 ชุดการทดลอง..... 103
ตารางที่ 4.16 จำนวน *Nitrospira* จากตัวอย่างตะกอนจากสถานที่ต่างๆ โดยวิธี realtime PCR..... 106
ตารางที่ 4.17 อัตราเฉพาะการออกซิไดซ์ไนไตรต์ต่อเซลล์ บนแผ่นฟิล์มชีวภาพบนตัวกรองต่างชนิด..... 107
ตารางที่ ช.1 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนในชุดการทดลองที่ 1 เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ความเข้มข้น 1 มก.ไนโตรเจน/ล. 149
ตารางที่ ช.2 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนในชุดการทดลองที่ 2 เติมโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้น 1 มก.ไนโตรเจน/ล. 150
ตารางที่ ช.3 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนในชุดการทดลองที่ 3 เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนไตรต์ความเข้มข้นอย่างละ 1 มก.ไนโตรเจน/ล. 150
ตารางที่ ซ.1 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนในชุดการทดลองที่ 1 ชุดการทดลองการกำจัดไนไตรต์โดยใช้ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์(NH_4Cl) ความเข้มข้น 1 มก.ไนโตรเจน/ล..... 152

ตารางที่ ซ.3 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนในชุดการทดลองที่ 3 ชุดการทดลองการกำจัดไนไตรต์โดยใช้ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้นอย่างละ 1 มก. ไนโตรเจน/ล..... หน้า 153

ตารางที่ ซ .4 การเปลี่ยนแปลงของปัจจัยสิ่งแวดล้อมจากชุดการทดลองการกำจัดไนไตรต์โดยใช้ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนต่างชนิดกัน..... 154

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 วัฏจักรไนโตรเจน..... 6
รูปที่ 2.2 ซับดิวิชันในกลุ่มของโพรเทอริโอแบคทีเรีย…….. 10
รูปที่ 2.3 แบคทีเรียในซับดิวิชันแอลฟา……..…….. 10
รูปที่ 2.4 การจัดลำดับความคล้ายของแบคทีเรียสกุล *Nitrobacter* 30 สายพันธุ์..... 13
รูปที่ 2.5 แบคทีเรียในซับดิวิชันแกมมา..... 14
รูปที่ 2.6 การจัดลำดับความคล้ายของแบคทีเรียสกุล*Nitrospira*……..…… 17
รูปที่ 2.7 การวัดปริมาณ fluorescence จาก DNA มาตรฐาน ใน real-time PCR และกราฟเส้นตรงที่ได้ ซึ่งแสดงจำนวนรอบและความเข้มข้นของ DNA มาตรฐาน ณ ตำแหน่งนั้นๆ ใน exponential phase ของปฏิกิริยา..... 29
รูปที่ 2.8 การวัด fluorescence จาก PCR product เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเรื่อยๆ ในกรอบบน และเมื่อเปลี่ยน scale ให้เป็น dF/dt จะได้กราฟดังรูปในกรอบล่าง ซึ่งแสดงอุณหภูมิที่เป็น melting temperature ของ PCR product แต่ละตัว โดยเทียบกับขนาดเมื่อ run gel electrophoresis ตามที่ลูกศรชี้……..……. 30
รูปที่ 3.1 แผนผังงานวิจัย…….. 46
รูปที่ 3.2 การทดลองส่วนที่ 1 …….. 48
รูปที่ 3.3 การทดลองส่วนที่ 2…….. 50
รูปที่ 3.4 ขั้นตอนการศึกษากลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย……... 55
รูปที่ 4.1 Phylogenetic tree ของ 16s ของ *Nitrospira* จากการคำนวณโดยวิธี Neighbor joining (Distance matrix)…….…… 76
รูปที่ 4.2 การตรึงแบคทีเรียจากระบบบ่อเลี้ยงกุ้งในโรงเรือนบนตัวกรองชีวภาพ..... 85
รูปที่ 4.3 การบำบัดสารประกอบไนโตรเจนต่างชนิดด้วยตัวกรองที่ผ่านการตรึง..... 86
รูปที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนจากชุดการทดลองที่ 1 (แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ความเข้มข้น 1 มก.ไนโตรเจน/ล.)..... 87
รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน จากชุดการทดลองที่ 2 (โซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้น 1 มก.ไนโตรเจน/ล.)…… 87
รูปที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน จากชุดการทดลองที่ 3 (แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้นอย่างละ 1 มก.ไนโตรเจน/ล.)……... 87

หน้า

รูปที่ 4.7 อัตราการลดลงของไนไตรต์ จากชุดการทดลองที่ 1 (แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ความเข้มข้น 1 มก.ไนโตรเจน/ล.)..... 91
รูปที่ 4.8 อัตราการลดลงของ ไนไตรต์ จากชุดการทดลองที่ 2 (โซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้น 1 มก.ไนโตรเจน/ล.)…….…… 91
รูปที่ 4.9 อัตราการลดลงของไนไตรต์ ชุดการทดลองที่ 3 (แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้นอย่างละ 1 มก.ไนโตรเจน/ ล.)…….…….. 91
รูปที่ 4.10 Phylogenetic tree ของ 16s ของ *Nitrospira* จากการคำนวณโดยวิธี Neighbor joining (Distance matrix)..... 99
รูปที่ 4.11 จำนวน *Nitrospira* บนตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนที่ต่างกัน และตัวกรองที่ผ่านการวัดอัตราการกำจัดไนไตรต์……..…… 104
รูปที่ ก.1 ใช้ไพร์เมอร์ P338f + NIT3 เพื่อศึกษากลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrobacter* ความยาวประมาณ 600 bp..... 120
รูปที่ ก.2 ใช้ไพร์เมอร์ P338f + Ntspa0685r เพื่อศึกษากลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* ความยาวประมาณ 320 bp……... 120
รูปที่ ค.1 Phylogenetic tree ของ 16s ของ *Nitrospira* จากการคำนวณโดยวิธี Neighbor joining……..…… 133
รูปที่ ค.2 Phylogenetic tree ของ 16s ของ *Nitrospira* จากการคำนวณโดยวิธี Maximum Likehood……..…… 134
รูปที่ จ.1 Phylogenetic tree ของ 16s ของ *Nitrospira* จากการคำนวณโดยวิธี Neighbor joining…….. 142
รูปที่ จ.2 Phylogenetic tree ของ 16s ของ *Nitrospira* จากการคำนวณโดยวิธี Maximum Likehood……...…….. 143
รูปที่ ฉ.1 กราฟมาตรฐานสำหรับแอมโมเนีย…… 146
รูปที่ ฉ.2 กราฟมาตรฐานสำหรับไนไตรต์…… 147
รูปที่ ฉ.3 กราฟมาตรฐานสำหรับไนเตรต……. 147

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมา

ระบบเพาะเลี้ยงกุ้งแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ ได้แก่ ระบบบ่อดินกลางแจ้ง ระบบบ่อไร้ดินกลางแจ้ง เช่นบ่อซีเมนต์หรือบ่อที่ปูพลาสติกที่ตั้งอยู่กลางแจ้ง และระบบบ่อในโรงเรือนที่มีลักษณะเป็นบ่อหรือถังไม่มีดินแต่มีหลังคาปกคลุมและมีระบบหมุนเวียนน้ำเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ ในอดีตการเลี้ยงกุ้งจะเป็นระบบบ่อดินกลางแจ้งเท่านั้นแต่เนื่องจากระบบบ่อแบบนี้ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็นปัญหาน้ำเสียที่ปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติหรือ การรั่วซึมจากบ่อลงสู่พื้นดิน ปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อโรคที่ไม่พึงประสงค์จากดิน จึงมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งในระบบบ่อไร้ดินกลางแจ้งและบ่อในโรงเรือนที่มีการหมุนเวียนน้ำกลับมาใช้ใหม่ ทั้งนี้การเลือกระบบบ่อ เพาะเลี้ยง จะขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และข้อจำกัดของผู้เลี้ยง แต่ปัญหาที่พบ ในระบบการเลี้ยงทั้ง 3 แบบคือการควบคุมปริมาณไนโตรเจนที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงกุ้งในระบบ โดยทั่วไปการย่อยสลายทางชีวภาพจะเป็นกลไกหลักในการควบคุมปริมาณไนโตรเจนในระบบเพาะเลี้ยง ซึ่งกระบวนการไนตริฟิเคชันจะเกิดขึ้นภายในสภาวะที่ใช้ออกซิเจน โดย แบคทีเรียกลุ่ม แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Ammonia-oxidizing bacteria) จะออกซิไดซ์ แอมโมเนีย เป็นไนไตรต์ และแบคทีเรียกลุ่มไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Nitrite-oxidizing bacteria) จะออกซิไดซ์ไนไตรต์เป็นไนเตรต ต่อจากนั้นจะเกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification) รีดิวซ์ไนเตรตเป็นก๊าซไนโตรเจนในสภาวะไร้อากาศ ก๊าซไนโตรเจนที่ถูกเปลี่ยนนี้จะปล่อยสู่บรรยากาศต่อไป โดยปกติแล้วระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งแต่ละระบบจะมีปัญหาในการควบคุมและกำจัดไนโตรเจนแตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพของระบบนั้นๆ ในระบบดินกลางแจ้ง กระบวนการกำจัดไนโตรเจน ส่วนใหญ่ จะเกิดขึ้นทั้งในตะกอนดินก้นบ่อ ซึ่งหากควบคุมลักษณะทางกายภาพของบ่อให้เอื้อต่อระบบนิเวศของกลุ่มแบคทีเรียที่กำจัดไนโตรเจนแล้ว กระบวนการกำจัดไนโตรเจนจะเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ อย่างไรความรู้ในส่วนนี้ยังไม่ได้รับการพัฒนาเท่าที่ควร ทำให้ยังพบปัญหาในการควบคุมและการกำจัดไนโตรเจนในระบบบ่อดินกลางแจ้งอยู่เสมอ ในกรณีของบ่อไร้ดินกลางแจ้งจะเกิดปัญหาที่ต่างออกไปจากระบบบ่อดินกลางแจ้ง คือการกำจัดไนโตรเจนในระบบบ่อไร้ดินกลางแจ้งจะเกิดเฉพาะในน้ำ เนื่องจากระบบนิเวศตะกอนดินก้นบ่อซึ่งเป็นแหล่งของแบคทีเรียกลุ่มที่กำจัดไนโตรเจนจ ะถูกตัดออกไป ปัญหาที่พบมากในระบบนี้คือการสะสม

ของไนไตรต์ ซึ่งเกิดจากกระบวนการไนตริฟิเคชันไม่สมบูรณ์ ทำให้การเพาะเลี้ยงกุ้งระบบนี้ยังคงเป็นปัญหาอยู่ ส่วนระบบบ่อในโรงเรือนก็จะมีปัญหาที่แตกต่างกันออกไป ระบบแบบนี้จำเป็นต้องมีระบบบำบัดคุณภาพน้ำติดตั้งอยู่ด้วย เนื่องจากกระบวนการกำจัดไนโตรเจนเกิดขึ้นได้ภายในบ่อเลี้ยง เนื่องจากทั้งระบบนิเวศในน้ำและตะกอนดินก้นบ่อถูกตัดออกไป โดยการกำจัดไนโตรเจนของระบบเพาะเลี้ยงแบบโรงเรือนจะต้องใช้ตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการตรึงด้วยไนตริฟายอิงแบคทีเรีย ซึ่งแม้ว่าการแก้ปัญหาการควบคุมไนโตรเจนในระบบทั้ง 3 ระบบจะแตกต่างออกไป ขึ้นกับลักษณะทางกายภาพของระบบนั้นๆ หากแต่ในระบบบ่อทุกแบบ กระบวนการไนตริฟิเคชันจะเป็นขั้นตอนที่มีผลการจำกัดอัตรา (Rate limiting step) เนื่องจากแบคทีเรียในกระบวนการนี้เป็นแบคทีเรียเฉพาะกลุ่มที่มีอัตราการเจริญเติบโตช้ามาก และมีความอ่อนไหวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมสูง ซึ่งมีความแตกต่างกันโดยชิ้นเชิง เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียดีไนตริฟิเคชันที่เกิดจากการทำงานกันของแบคทีเรียหลายกลุ่ม ดังนั้นหัวใจของการควบคุมไนโตรเจนในระบบบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทั้ง 3 แบบคือแบคทีเรียกลุ่มไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (Nitrifying bacteria) แต่เนื่องจากกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความอ่อนไหวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมจริงสูงกว่ากลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ และอุณหภูมิ

ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคนิคระดับโมเลกุล (Molecular technique) ในการวิเคราะห์กลุ่มประชากร (Community) ของแบคทีเรียในระบบสิ่งแวดล้อม ข้อดีของเทคนิคนี้คือสามารถศึกษาแบคทีเรียในระบบสิ่งแวดล้อมได้โดยตรงโดยไม่จำเป็นต้องเพาะเชื้อ (Culture-dependent technique) ซึ่งโดยมากแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจะไม่ใช่แบคทีเรียที่มีอยู่จริงในระบบสิ่งแวดล้อมนั้นๆ เนื่องจากเป็นไปได้ยากที่จะจำลองสภาวะระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการให้เหมือนกับสภาวะที่เกิดขึ้นจริงในระบบสิ่งแวดล้อมนั้นๆได้ทุกประการ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยสำคัญชิ้นใดทำการวิเคราะห์แบคทีเรียกลุ่มไนไตรต์ออกซิงแบคทีเรีย ในระบบสิ่งแวดล้อมในประเทศไทย ไม่ว่าจะเป็นระบบดิน ระบบน้ำจืด ระบบน้ำเค็ม หรือระบบบำบัดคุณภาพน้ำด้วยเทคนิคอย่างจริงจัง

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นจึงทำให้เกิดงานวิจัยนี้ โดย (1) ศึกษากลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียและผลกระทบของปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อกลุ่มประชากรกลุ่มดังกล่าวในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งแบบต่างๆในประเทศไทย (2) ศึกษาผล กระทบของประเภทของสารประกอบไนโตรเจน ต่ออัตราการกำจัดไนไตรต์และ จำนวนกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการตรึงจากระบบบ่อเลี้ยงกุ้งในโรงเรือน

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษากลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย ในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งกลางแจ้ง ระบบบำบัดน้ำหมุนเวียนของบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง และระบบบำบัดน้ำในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ และผลกระทบของปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อกลุ่มประชากรกลุ่มไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย ในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งแบบดังกล่าว

1.2.2 เพื่อศึกษาผลกระทบของประเภทของสารประกอบไนโตรเจน ต่ออัตราการกำจัดไนไตรต์บนตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการตรึงจากระบบบ่อเลี้ยงกุ้งในโรงเรือน และศึกษากลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรองดังกล่าว

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 เป็นการศึกษาประชากรกลุ่มไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียใน ระบบบ่อเพาะ เลี้ยงกุ้งและศึกษาผลกระทบของปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อกลุ่มประชากรกลุ่มดังกล่าว งานวิจัยส่วนนี้จะทำการทดลองในห้องปฏิบัติการศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย การทดลองส่วนที่ 2 เป็นการศึกษาผลกระทบของประเภทของสารประกอบไนโตรเจนต่ออัตราการ กำจัดไนไตรต์และ กลุ่มประชากรและจำนวนประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการตรึงแล้ว ก่อนและหลังการกำจัดไนไตรต์ โดยตรึงตัวกรองจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งในโรงเรือน งานวิจัยส่วนนี้จะทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยมีการกำหนดขอบเขตของงานวิจัยแบ่งงานวิจัยออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

1.3.1 <u>การทดลองในงานวิจัยส่วนที่ 1</u>: การศึกษาประชากรกลุ่มไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งและศึกษาผลกระทบของปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อกลุ่มประชากรกลุ่มดังกล่าว และสุ่มตัวอย่างจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งแต่ละระบบเพื่อศึกษาจำนวนกลุ่มประชากรไนไตร์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย

ตัวอย่างจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้ง ครอบคลุมทั้งระบบบ่อดินกลางแจ้ง ระบบบ่อไร้ดินกลางแจ้ง ระบบบ่อในโรงเรือนที่มีการหมุนเวียนน้ำกลับมาใช้ใหม่ รวมถึงตัวอย่างจากระบบบำบัดคุณภาพน้ำในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ โดยแต่ละระบบการมีค่าความเค็ม และความหนาแน่นของกุ้งแตกต่างกัน โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น

1.3.1.1 ระบบบ่อดินกลางแจ้ง จำนวน 7 บ่อ สามารถแบ่งระบบบ่อดินกลางแจ้งออกเป็น

- ระบบบ่อความเค็มสูงความหนาแน่นกุ้งสูง คือบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งซึ่งมีความเค็ม 15-30 พีพีทีและมีความหนาแน่นกุ้งมากกว่า 50 ตัวต่อตารางเมตร จำนวน 2 บ่อ
- ระบบบ่อความเค็มสูงความหนาแน่นกุ้งต่ำ คือบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งซึ่งมีความเค็ม 15-30 พีพีทีและมีความหนาแน่นกุ้งน้อยกว่า 50 ตัวต่อตารางเมตร จำนวน 3 บ่อ
- ระบบบ่อความเค็มต่ำความหนาแน่นกุ้งต่ำ คือบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งซึ่งมีความเค็ม 4-10 พีพีทีและมีความหนาแน่นกุ้งน้อยกว่า 50 ตัวต่อตารางเมตร จำนวน 2 บ่อ

1.3.1.2 ระบบบ่อไร้ดินกลางแจ้ง จำนวน 1 บ่อ

1.3.1.3 ระบบบ่อในโรงเรือน จำนวน 1 บ่อ

1.3.1.4 ระบบบำบัดคุณภาพน้ำในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ จำนวน 1 บ่อ

1.3.2 <u>การทดลองในงานวิจัยส่วนที่ 2</u>: การศึกษาผลกระทบของประเภทของสารประกอบไนโตรเจนต่ออัตราการ กำจัดไนไตรต์และ กลุ่มประชากรและจำนวน ประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการตรึง ก่อนและ หลังการ กำจัดไนไตรต์ โดยตรึงตัวกรองจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้ง ในโรงเรือน การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ส่วนย่อย คือการทดลองย่อยส่วนที่ 1 ตรึงตัวกรองชีวภาพจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งในโรงเรือน การทดลองย่อยส่วนที่ 2 นำตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการตรึงมาทำการบ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนที่ต่างชนิดกัน โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง คือชุดการทดลองที่ 1 เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ปริมาณ 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ชุดการทดลองที่ 2 เติมโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ปริมาณ 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อ

ลิตร และชุดการทดลองที่ 3 เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ปริมาณ อย่างละ 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร การทดลองย่อยส่วนที่ 3 ทดสอบการกำจัดไนไตรต์ปริมาณ 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยใช้ตัวกรองที่ผ่านการบ่มจากการทดลองย่อยส่วนที่ 2 ซึ่งตลอดการทดลองทั้ง ส่วนที่ 2 และส่วนที่ 3 ทำการควบคุมค่าอัลคาลินิตีให้อยู่ในช่วง 100-120 มิลลิกรัมแคลเซียมคาร์บอเนตต่อลิตร ตลอดระยะเวลาการทดลองและน้ำทะเลที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคซึ่งมีค่าความเค็มเท่ากับ 30 พีพีที ต่อจากนั้นศึกษากลุ่มประชากรและจำนวนประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรองที่ผ่านการตรึงก่อนและหลังการกำจัดไนไตรต์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เป็นการเพิ่มองค์ความรู้เกี่ยวกับแบคทีเรียกลุ่มไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย ที่พบในทุก ระบบเพาะเลี้ยงกุ้งเพื่อ นำไปสู่การ เลือกแบคทีเรียกลุ่มไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุด และพัฒนาเพื่อใช้กำจัดไนไตรต์ในระบบเพาะเลี้ยงเพื่อการค้า

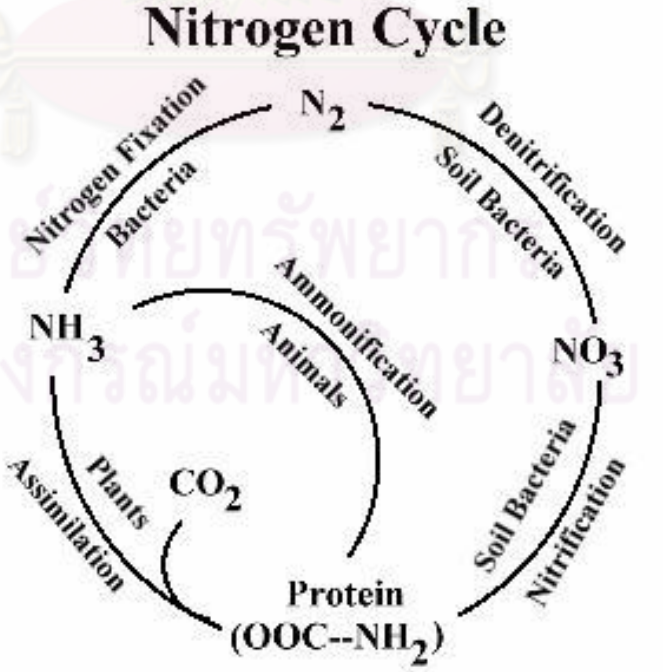
1.4.2 เป็นการเพิ่มองค์ความรู้เกี่ยวกับ ประเภทของสารประกอบไนโตรเจน ต่ออัตราการกำจัดไนไตรต์บนตัวกรองชีวภาพ และการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียเพื่อนำไปสู่การเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

2.1 วัฏจักรไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นแก๊สที่พบมากที่สุดในบรรยากาศของโลกประมาณ 78% แต่สิ่งมีชีวิตชั้นสูงไม่สามารถนำแก๊สไนโตรเจนนี้มาใช้ประโยชน์ ดังนั้นแก๊สไนโตรเจนจะเข้าสู่วัฏจักรไนโตรเจนเพื่อเปลี่ยนแก๊สไนโตรเจนในบรรยากาศเป็นสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน เรียกขบวนการนี้ว่า ขบวนการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation) ต่อจากนั้นสารประกอบอินทรีย์จะเข้าสู่กระบวนการ Mineralization หรือ Ammonification ซึ่งจะเปลี่ยนสารอินทรีย์ไนโตรเจนเป็นแอมโมเนีย โดยแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรฟ เรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ ว่า Ammonifer bacteria เช่น *Arthrobacter* และ*Bacillus* เป็นต้น สิ่งมีชีวิตจะเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนเตรต เรียกกระบวนการนี้ว่าไนตริฟิเคชัน (Nitrification) โดยไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (Nitrifying Bacteria) หลังจากนั้นไนเตรตจะเข้าสู่กระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification) เพื่อเปลี่ยนไนเตร ตให้เป็นก๊าซไนโตรเจน นอกจากนี้ยังมีปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอมโมเนียในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Anaerobic ammonium oxidation) เพื่อเปลี่ยนแอมโมเนียและไนไตรตให้เป็นก๊าซไนโตรเจน โดยแบคทีเรียชนิด *Brocadia anammoxidans* (ดังแสดงในรูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 วัฏจักรไนโตรเจน (Hartzog, 2009)

2.1.1. กระบวนแอมโมนิฟิเคชัน (Amonification)

กระบวนแอมโมนิฟิเคชัน เป็นกระบวนการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน เป็นสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนซึ่งเป็นสารประกอบที่สิ่งมีชีวิตสามารถใช้ประโยชน์ได้ เช่นการย่อยสลายโปรตีนเป็นกรดอะมิโน โดยมีแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรฟทำหน้าที่ย่อยสลาย แบคทีเรียประเภทนี้เรียกว่า Ammonifer bacteria เช่น *Arthrobacter* และ*Bacillus* เป็นต้น กระบวนการนี้เกิดได้ทั้งสภาวะมีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน

2.1.2. กระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification)

กระบวนการไนตริฟิเคชัน เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียเป็นไนเตรต ซึ่งเป็นสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนที่สิ่งมีชีวิตสามารถนำไปใช้ได้ดีขึ้น กระบวนการ ไนตริฟิเคชันเกิดขึ้นในสภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งกระบวนการไนตริฟิเคชันประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่

กระบวนการเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรต์ (ดังสมการที่ 1) โดยแบคทีเรียกลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิง (Ammonia Oxidizing Bacteria; AOB) เช่น *Nitrosomonas, Nitrosospira*

$$55NH_4^+ + 76O_2 + 5CO_2 \longrightarrow C_5H_7O_2N + 54NO_2^- + 52H_2O + 109H^+ \quad (1)$$

กระบวนการเปลี่ยนไนไตรต์เป็นไนเตรต (ดังสมการที่ 2) โดยแบคทีเรียกลุ่มไนไตรต์ออกซิไดซิง (Nitrite Oxidizing Bacteria; NOB) เช่น *Nitrobacter, Nitrospira*

$$400NO_2^- + 2H_2O + NH_4^+ + 5CO_2 + 195O_2 \longrightarrow C_5H_7O_2N + 400\,NO_3^- + H^+ \quad (2)$$

2.1.3. กระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification)

กระบวนการดีไนตริฟิเคชันจะเกิดขึ้นในสภาวะที่แหล่งน้ำขาดออกซิเจน โดยมีแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรฟบางชนิดไปรีดิวซ์ออกซิเจนจากไนเตรตในแหล่งน้ำให้เป็นไนไตรต์ และถูกรีดิวซ์ต่อไปเป็นก๊าซไนโตรเจน (ดังสมการที่3) แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Pseudomonas, Achomobacter*

$$CH_2O + 0.0232NO_3^- + 0.142NH_4^+ + 0.142HSO_3^- \longrightarrow 0.142C_5H_7O_2N + 0.432CO_2 + 0.116N_2 + 0.9746H_2O \quad (3)$$

2.1.4 ปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอมโมเนียในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Anaerobic ammonium oxidation)

กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน โดยกลุ่มเฮเทอโรโทรฟบางชนิดจะเปลี่ยนแอมโมเนียและไนไตรตให้เป็นก๊าซไนโตรเจน (ดังสมการที่ 4) แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Brocadia anammoxidans*

$$1NH_4^+ + 1.32NO_2^- + 0.066HCO_3^- + 0.13\,H^+ \longrightarrow 1.02N_2 + 0.26NO_3^- + 0.066CH_2O_{0.5}N_{0.15} + 2.03H_2O \quad (4)$$

2.2 กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิงไดซิงแบคทีเรีย (Nitrite Oxidizing Bacteria)

2.2.1 ข้อมูลทั่วไป

ไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Nitrite Oxidizing Bacteria) จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มคีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (Chemoautotrophic Nitrifying Bacteria) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์ไนไตรต์ให้เป็นไนเตรตในกระบวนการไนตริฟิเคชัน ขั้นที่ 2 (ดังสมการที่ 2) โดยใช้ออกซิเจนในการหายใจ และใช้คาร์บอนไดออกไซด์หรือไบคาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอน เจริญเติบโตช้า เจริญที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส และจะหยุดการเจริญเติบโตเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 42 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด -ด่างที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตคือ 7.5-8.0

2.2.2 ประเภทของไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย

2.2.2.1 แบ่งตามลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ออกเป็น 4 สกุล

– สกุล *Nitrobacter* เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น ขนาด 0.5 ถึง 0.9×1.0 ถึง 2.0 ไมโครเมตร มีการยืดขยายในด้านใดด้านหนึ่งของไซโตเมมเบรน เพื่อที่จะแบ่งออกเป็นสองเซลล์ การขยายพันธุ์ใช้วิธีการแตกหน่อ (budding) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียสกุลนี้ (ดังแสดงในตารางที่ 2.1)

– สกุล *Nitrococcus* เซลล์มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ไมโครเมตร หรือมากกว่า เคลื่อนที่ได้ มีไซโตโครมในเซลล์มาก จึงเห็นเป็นสีของอาหารเหลวที่มีเซลล์ไม่ใช่เกิดจากเม็ดสี ต้องการออกซิเจน เติบโตได้ในน้ำเค็ม 70-100 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น อาจพบเป็นเซลล์อิสระในอาหารเหลวหรืออยู่เป็นกลุ่มเล็กๆตั้งแต่ 100 เซลล์ขึ้นไป มีส่วนประกอบของ G+C 61.2 โมลเปอร์เซ็นต์ มี

เพียงกลุ่มเดียวคือ *Nitrococcus mobilis* (ปิติภรณ์ บัวเจริญ, 2540 อ้างถึงใน Bockและคณะ, 1983) (ดังแสดงในตารางที่ 2.1)

– สกุล *Nitrospina* เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งยาวตรง ขนาด 0.3 ถึง 0.5×1.7 ถึง 6.6 มค.ม. ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถแยกศึกษาแบคทีเรียสกุลนี้ ได้จากน้ำเค็ม มีส่วนประกอบของ G+C 57.7 โมลเปอร์เซ็นต์ มีเพียงชนิดเดียวคือ *Nitrospina gracilis* (ปิติภรณ์ บัวเจริญ, 2540 อ้างถึงใน Bockและคณะ, 1983) (ดังแสดงในตารางที่ 2.1)

– สกุล *Nitrospira* เซลล์มีลักษณะเป็นแท่งโค้ง หรือม้วนเป็นเกลียว 1-12 รอบ ขนาด 0.2 ถึง 0.4×0.9 ถึง 2.2 ไมโครเมตร ไม่มีเยื่อหุ้มไซโตพลาสมิค สามารถแยกศึกษาแบคทีเรียสกุลนี้ ได้จากน้ำเค็ม และน้ำจืด มีส่วนประกอบของ G+C 50.0 ถึง 50.5 โมลเปอร์เซ็นต์ ในสกุลนี้มีแบคทีเรีย สามสกุลได้แก่ *Nitrospira moscoviensis* *Nitrospira marina* และ *Nitrospira defluvii* (ปิติภรณ์ บัวเจริญ, 2540 อ้างถึงใน Bockและคณะ, 1983) (ดังแสดงในตารางที่ 2.1)

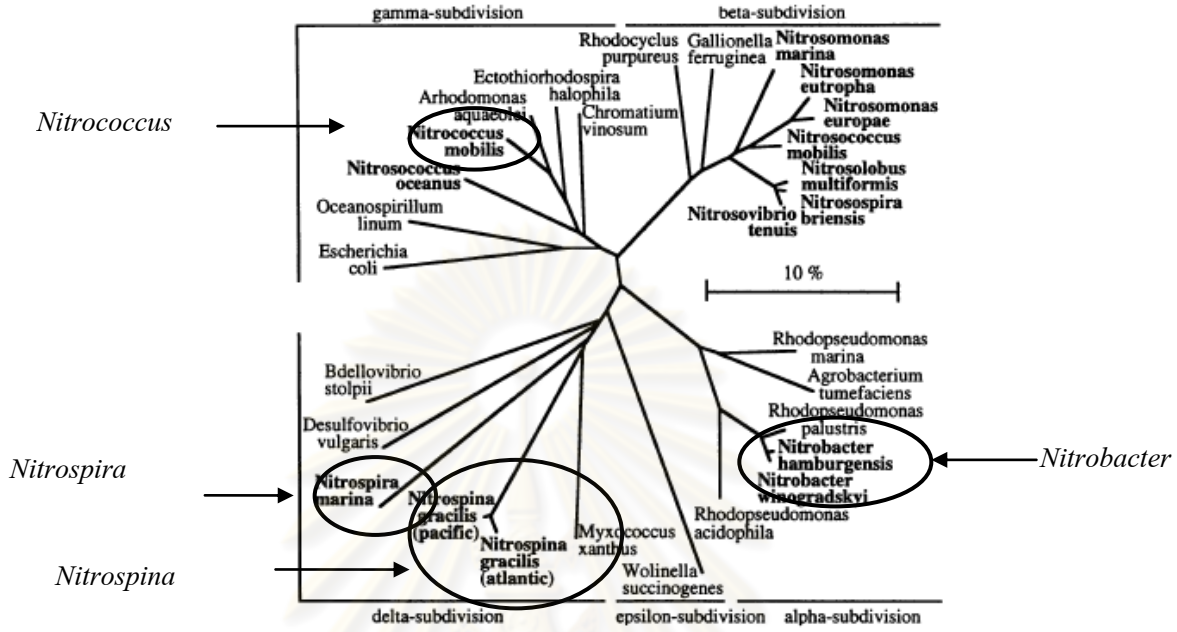
ตารางที่ 2.1 ลักษณะทั่วไปของไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียทั้ง 4 สกุล

ลักษณะ	***Nitrobacter***	***Nitrococcus***	***Nitrospina***	***Nitrospira***
รูปร่างของเซลล์	รูปร่างแท่งสั้น	รูปร่างกลม	รูปร่างเป็นแท่งยาวตรง	รูปร่างโค้งหรือม้วนเป็นเกลียว
ขนาด (ไมโครเมตร)	0.5 - 0.9×1.0 - 2.0	1.5-1.8	0.3 - 0.5×1.7 - 6.6	0.2- 0.4×0.9 - 2.2
การเคลื่อนที่	เคลื่อนที่ได้	เคลื่อนที่ได้	เคลื่อนที่ไม่ได้	เคลื่อนที่ไม่ได้
การสืบพันธุ์	แตกหน่อหรือแบ่งเซลล์	แบ่งเซลล์	แบ่งเซลล์	แบ่งเซลล์

ที่มา Spieck และ Bock, 2006

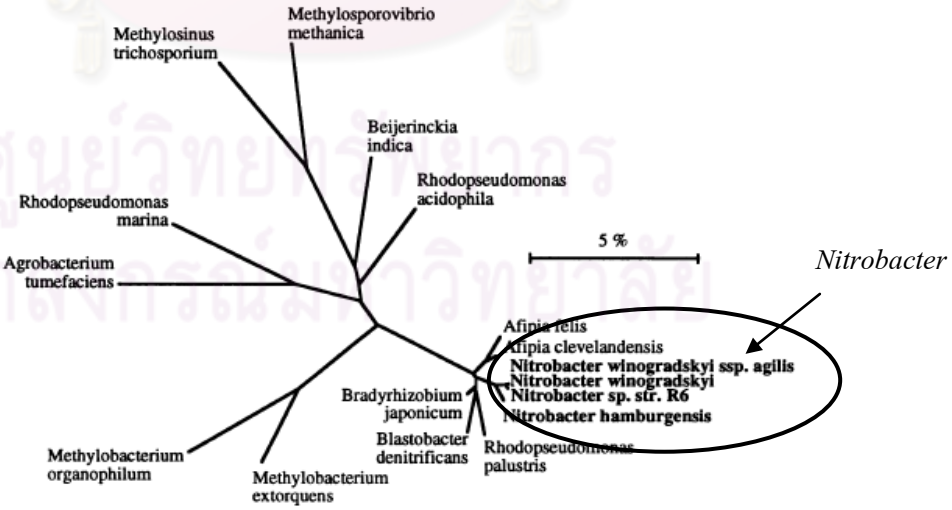
2.2.2.2 แบ่งตามลักษณะวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (phylogeny)

กลุ่มประชากร ไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียจัดอยู่ในกลุ่มของโพรเทอริโอแบคทีเรีย (Proteobacteria) แบคทีเรียกลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 3 ซับดิวิชัน และ 1 ไฟลัม ได้แก่ (ดังแสดงในรูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 ซับดิวิชันในกลุ่มของโพรเทอริโอแบคทีเรีย (Teske และคณะ, 1994)

– <u>*ซับดิวิชันแอลฟา*</u> (Subdivision Alpha) แบคทีเรียที่พบในซับดิวิชันนี้ได้แก่ *Rhodopseudomonas palustris, Bradyrhizobium japonicum, Blastobacter denitrifican, Afipia felis* และ *Afipia clevelและensis* (ดังแสดงในรูป 2.3)



รูปที่ 2.3 แบคทีเรียในซับดิวิชันแอลฟา (Teske และคณะ, 1994)

กลุ่มประชากร ไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่อยู่ในซับดิวิชันนี้ได้แก่ แบคทีเรียสกุล *Nitrobacter* ใช้พลังงานจากการออกซิไดซ์ไนไตรต์เป็นไนเตรตเพื่อเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน ถ้าไม่มี แหล่งคาร์บอน ไนไตรต์แบคทีเรียกลุ่มนี้จะใช้พลังงานจากไพรูเวท (pyruvate) ฟอร์เมท (format) และอะซิติก (Acetic) ตามลำดับ ค่าความเป็นกรด -ด่างที่เหมาะแก่การเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 7.5-8.0 อุณหภูมิที่แบคทีเรียกลุ่มนี้จะเจริญเติบโตได้อยู่ระหว่าง 5-37 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 28-30 องศาเซลเซียส (Spieck และ Bock, 2006)

Navarro และคณะ (1992) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ *Nitrobacter* พบว่า *Nitrobacter* มี 39 สายพันธุ์และความสัมพันธ์ระหว่าง *Nitrobacter* แต่ละสายพันธุ์มีความใกล้เคียงกัน โดย *Nitrobacter hamburgensis* X14 และ *Nitrobacter winogradskyi* ATCC1413 มีความแตกต่างกันมากที่สุดประมาณ 7.5-7.7 % สายพันธุ์ที่มีความใกล้คียงกันมากที่สุดได้แก่ *Nitrobacter winogradskyi* ATCC1413และ *Nitrobacter spp*. Strain R-6 มีความแตกต่างประมาณ 3-4% Vanparys และคณะ (2006) จัดกลุ่มแบคทีเรียสกุล *Nitrobacter* 30 สายพันธุ์ โดยใช้หลักเกณฑ์ความคล้ายกันของการจัดลำดับเบสของ16S rRNA แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ (แสดงในรูปที่ 2.4)

<u>กลุ่มที่ 1</u> กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีการจัดเรียงลำดับเบสใน 16S rRNA คล้ายกัน 100% แบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ *Nitrobacter winogradskyi* (Vanparys และคณะ, 2006) ลักษณะเป็นแท่งสั้น หรือลักษณะเป็นลูกแพร์ ขนาด 0.6-0.8×1.0-2.0 ไมโครเมตร สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลัม (flagellum) สามารถเจริญเติบโตในสภาวะไร้อากาศ โดยใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเลคตรอน ค่าความเป็นกรด -ด่างที่แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญเติบโตได้อยู่ในช่วง 7.5-8.0 อุณหภูมิที่เหมาะในการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส แหล่งที่พบทั้งในดิน น้ำจืด มหาสมุทร การฝังกลบขยะและการทำปุ๋ย (Spieck และ Bock, 2006)

<u>กลุ่มที่ 2</u> กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีการจัดเรียงลำดับเบสใน 16S rRNA คล้ายกัน 99.9-100% แบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ *Nitrobacter winogradskyi* (Vanparys และคณะ,2007)

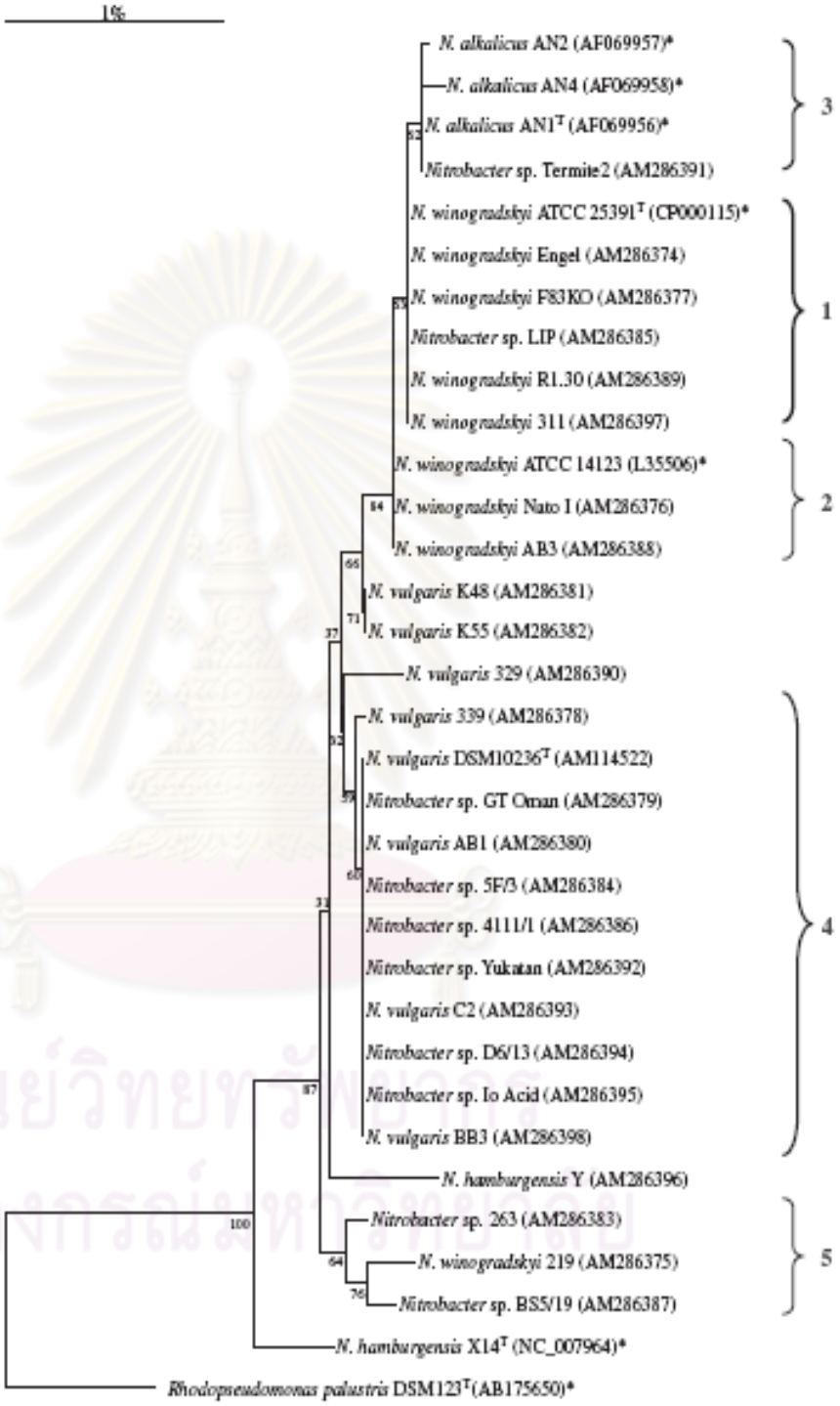
<u>กลุ่มที่ 3</u> กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีการจัดเรียงลำดับเบสใน 16S rRNA คล้ายกัน 99.9% แบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ *Nitrobacter alkalicus* (Vanparys และคณะ, 2007) ลักษณะเซลล์เป็นรูปแพร์ ขนาด 0.6-0.9 × 1.2-1.8 ไมโครเมตร สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ ความเป็นกรด-ด่างที่แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญเติบโตได้อยู่ในช่วง 6.5-10.2 และค่าที่เหมาะสมสำหรับการ

เจริญเติบโตคือ 9.5 อุณหภูมิที่เหมาะในการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 25-28 องศาเซลเซียส แหล่งที่พบพบในดินที่มีสภาพเป็นด่าง เช่นดินจากทะเลสาบ (Sorokin, 1998)

<u>กลุ่มที่ 4</u> กลุ่มที่มีการจัดเรียงลำดับเบสใน 16S rRNA มีความคล้ายกัน 99.4-99.6 % แบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ *Nitrobacter vulgenis* (Vanparys และคณะ, 2007) แหล่งที่พบพบในดิน น้ำใต้ดิน น้ำกร่อยและกองปลวก (Spieck และ Bock, 2006)

<u>กลุ่มที่ 5</u> กลุ่มที่มีการจัดเรียงลำดับเบสใน 16S rRNA มีความคล้ายกัน 99.5-99.7% แบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ *Nitrobacter winogradskyi* และ *Nitrobacter hamburgensis* มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในกลุ่มนี้ 98.8% (Vanparys และคณะ, 2007) แหล่งที่พบแบคทีเรีย *Nitrobacter hamburgensis* พบในดินในเมืองฮัมบูร์ก ประเทศเยอรมณี (Spieck และ Bock, 2006)

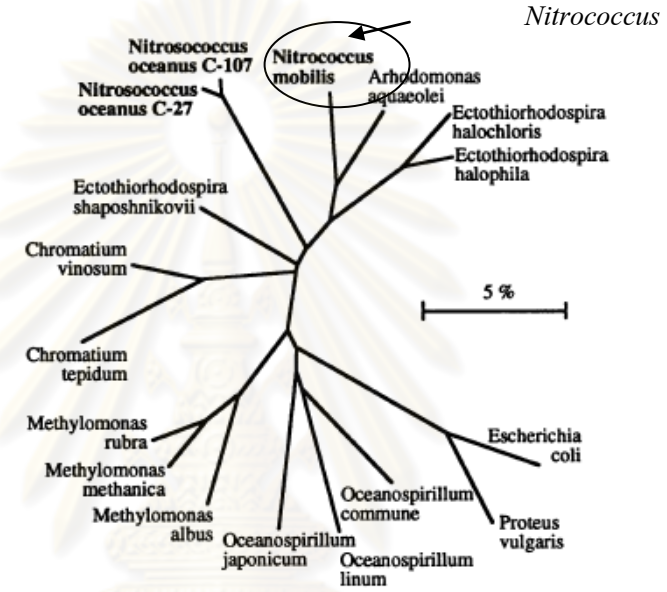
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.4 การจัดลำดับความคล้ายของกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrobacter* 30 สายพันธุ์ (Vanparys และคณะ, 2007)

– *ซับดิวิชันแกมมา* (Gamma Subdivision)

แบคทีเรียที่พบในซับดิวิชันนี้ได้แก่ *Nitrosococcus, Ectothiorhodospira, Arhodomonas aquaeolei* แบคทีเรียในซับดิวิชันแกมมามีบรรพบุรุษมาเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (Teske และคณะ, 1994) (ดังแสดงในรูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 แบคทีเรียในซับดิวิชันแกมมา (Teske และคณะ, 1994)

กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่อยู่ในซับดิวิชันนี้ได้แก่ กลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrococcus* (Teske และคณะ, 1994) เซลล์มีลักษณะเป็นแกรมลบ ขนาด 1.5 ไมโครเมตร สืบพันธุ์โดยการแบ่งเซลล์ อุณหภูมิที่เหมาะกับการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 7.5-8 (Watson และ Waterbury, 1971)

กลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrococcus* แบ่งได้ 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Nitrococcus mobilis* เซลล์มีลักษณะเป็นทรงกลมมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5-1.8 ไมโครเมตร สืบพันธุ์โดยการแบ่งตัว สามารถเคลื่อนที่ได้เนื่องจากมีแฟกเจลลา อยู่ในสภาพมีอากาศใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอน เจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมิ 14-40 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 7.5-8.0 และความเค็มอยู่ระหว่าง 70-100% เช่นเดียวกับแบคทีเรียกลุ่มอื่นในซับดิวิชันแกมมา ได้แก่ *Ectothiorhodospira, Arhodomonas aquaeolei* ซึ่งจะเจริญเติบโตในสภาพที่มีความเค็ม (Teske และคณะ, 1994) แต่จะไม่เจริญในน้ำจืด ถึงแม้ว่าจะมีการเติมเกลือ (NaCl) ลงไปก็ตาม (Watson และ Waterbury, 1971)

– *ซับดิวิชันเดลตา* (Subdivision Delta)

กลุ่มประชากร ไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่อยู่ในซับดิวิชันนี้ได้แก่ แบคทีเรียสกุล *Nitrospina* เซลล์มีลักษณะตรง ยาว ขนาด 0.3-0.4× 2.7-6.5 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.35-1.45 ไมโครเมตร เจริญเติบโตในน้ำที่มีอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด -ด่างประมาณ 7.5-8.0 และความเค็ม 70-100% แต่จะไม่เจริญในน้ำจืด ถึงแม้ว่าจะมีการเติมเกลือ (NaCl) ลงไปก็ตาม (Watson และ Waterbury, 1971)

แบคทีเรียสกุล *Nitrospina* แบ่งได้ 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Nitrospina gracilis* ไม่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่ำกว่า 14 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส เจริญเติบโตได้ดีในไพรูเวทที่มีความเข้มข้นต่ำ แหล่งที่พบมหาสมุทรก่อนถึงปากแม่น้ำอะเมซอน 200 ไมล์ (Spieck และ Bock, 2006)

– *ไฟลัมไนโตรสไปรา* (Phylum *Nitrospira*)

ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในไฟลัมไนโตรสไปรา แบ่งความสัมพันธ์ได้ 3 กลุ่ม (Ehrich และคณะ, 1995) โดยให้ความสำคัญกับกลุ่มที่ 1 เนื่องจากกลุ่มที่นี้มีกลุ่มประชากรไน ไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสกุล *Nitrospira* แบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มนี้แก่ *Nitrospira moscoviensis Nitrospira marina* และ*Nitrospira defluvii* ในกลุ่มที่ 2 และ3 เป็นแบคทีเรียสกุลอื่นที่ไม่ใช่ กลุ่มประชากร ไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย เช่น *L.ferroxidans T.yellowstonii* และ *M.bavaricum* นอกจากการแบ่งความสัมพันธ์เป็น 3 กลุ่มใหญ่แล้ว การแบ่งความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในไฟลัมไนโตรสไปรา ยังแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มย่อย (ดังแสดงในรูป 2.6) โดยในแต่ละกลุ่มย่อยมีความคล้ายในการเรียงลำดับเบสอย่างน้อย 94.9 % (Daims และคณะ, 2001)

<u>กลุ่มย่อยที่ 1</u> (Sublineage 1) หรือ *Nitrospira deflivii* sublineage (Satoh และคณะ, 2006) แบคทีเรียที่พบในกลุ่มย่อยนี้ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ พบถังบำบัดไนโตรเจน ขนาดทดลองทำการทดลองแบบทีละและแบบไหลต่อเนื่อง นอกจากนี้ยังพบในระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมแบบตะกอนเร่ง (Daims และคณะ, 2001)

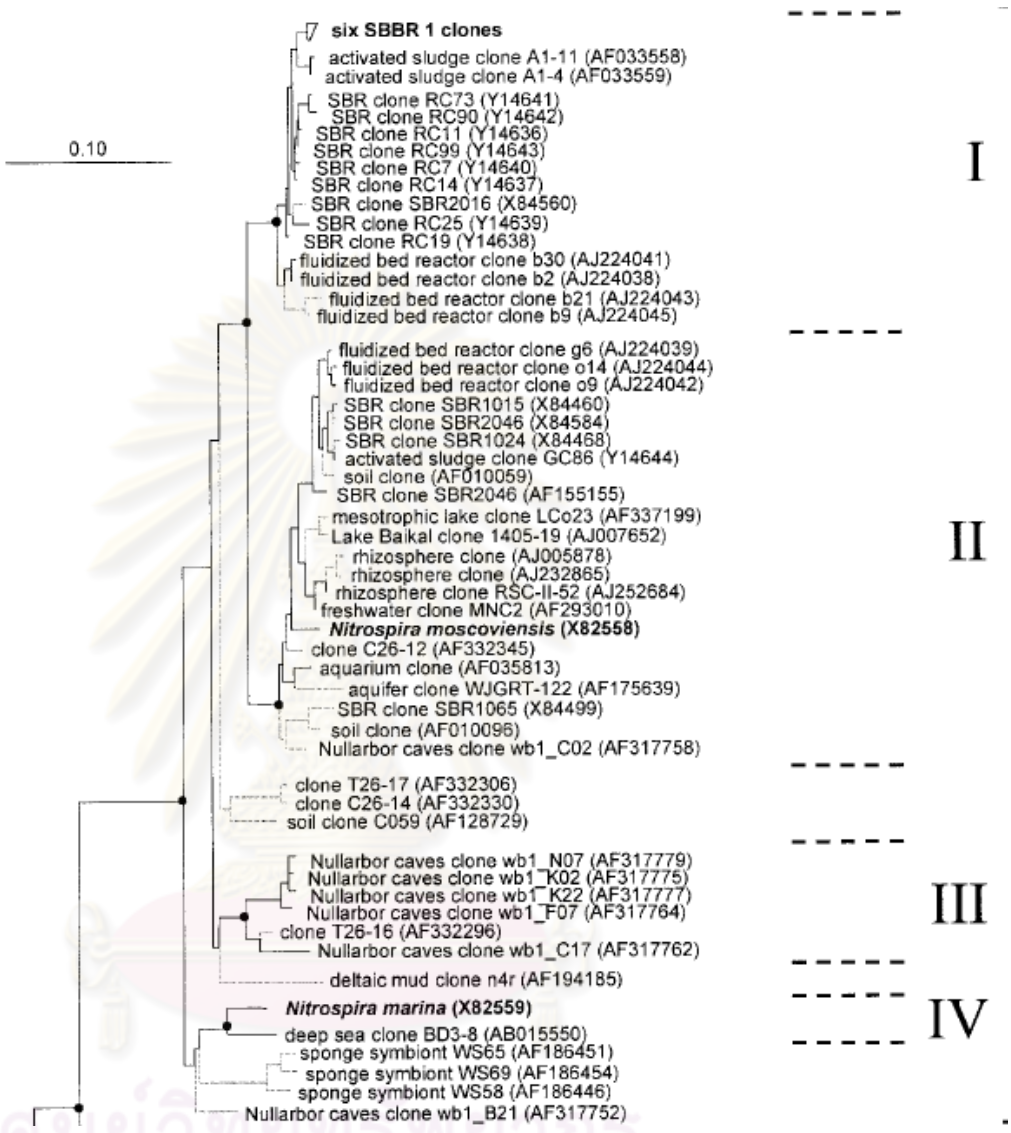
<u>กลุ่มย่อยที่ 2</u> (Sublineage 2) หรือ *Nitrospira moscoviensis* Sublineage (Satoh และคณะ, 2006) แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถทำการเพาะเลี้ยงเชื้อได้ ลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้คือเซลล์เป็นแกรมลบ เคลื่อนที่ไม่ได้ ขนาด0.9-2.2×0.2-0.4 ไมโครเมตร สืบพันธุ์แบบแตกหน่อ เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด -ด่างประมาณ 7.6-8.0 ใช้ไนไตร ต์เป็นเหล่ง

พลังงานและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณไนไตร ต์ที่เหมาะแก่การเจริญเติบโตคือ 0.35มิลลิโมล พบแบคทีเรียสกุลดังกล่าวได้จากระบบสิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้แก่ การเพาะเลี้ยงน้ำจืด ดิน และทะเลสาบ (Ehrich และคณะ, 1995) นอกจากนี้ยังพบบนแผ่นฟิล์มชีวภาพในระบบเพาะเลี้ยงน้ำเค็มที่มีความเค็ม 20 พีพีที (Foesel และคณะ, 2007)

กลุ่มย่อยที่ 3 แบคทีเรียที่มีการเรียงลำดับในกลุ่มย่อยนี้ เป็นแบคทีเรียสกุลอื่น ไม่ใช่กลุ่ม *Nitrospira* พบในน้ำจากถ้ำนูลาบอร์ ประเทศออสเตรเลีย (Holmes และคณะ, 2001)

กลุ่มย่อยที่ 4 (Sublineage 4) หรือ *Nitrospira marina* sublineage (Satoh และคณะ, 2006) แบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มนี้คือ *Nitrospira marina* รูปร่างเซลล์คล้ายลูกน้ำ เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส และ ค่าความเป็นกรด -ด่างประมาณ 7.6-8.0 พบแบคทีเรียสายพันธุ์นี้บริเวณที่มีน้ำเค็ม (Daims และคณะ, 2001) จัดแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่เติบโตได้ในสภาวะที่มีความเค็ม (Halophillic) (Watson และคณะ, 1971; Koops และคณะ, 2001; Egli, 2003 และ Whang และคณะ, 2009)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.6 การจัดลำดับความคล้ายของแบคทีเรียสกุล*Nitrospira (*(Daims และคณะ, 2001)

นอกจากนี้แล้วยังมีการพบกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงกลุ่มใหม่ คือ *Candidatus Nitrospira bockiana* ซึ่งยังไม่มีการจัดเข้ากลุ่ม (Sublineage) อุณหภูมิที่เหมาะกับการเจริญเติบโตประมาณ 44-46 องศาเซลเซียส และสามารทนปริมาณไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ประมาณ 480 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (Lebedeva และคณะ, 2008)

Hovanec และคณะ (1992) ทำการทดลองเพื่อยืนยันสมมุติฐานว่า *Nitrospira* เป็นแบคทีเรียที่พบมากในการเพาะเลี้ยงน้ำจืด ผลการทดลองพบว่ามี กลุ่มประชากร ไนไตรต์ออกซิไดซิง

แบคทีเรียสกุล *Nitrospira* จำนวนมาก ทั้ง *Nitrospira moscoviensis* และ *Nitrospira marina* แต่ไม่พบแบคทีเรียสกุล *Nitrobacter* ซึ่งในอดีตเคยเชื่อกันว่าแบคทีเรียสกุล *Nitrobacter* เป็นแบคทีเรียสกุลเด่นที่พบในแหล่งเพาะเลี้ยงน้ำจืด

Cebron และ Garnier (2005) ทำการศึกษา *Nitrobacter* และ *Nitrospira* ในแม่น้ำ Seine ประเทศฝรั่งเศส ซึ่งตลอดระยะทางของแม่น้ำ มีโรงบำบัดน้ำเสีย จากการศึกษาพบว่ามีไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียทั้งสองชนิดตลอดแม่น้ำต่างกัน คือ ในช่วงต้นของแม่น้ำพบ *Nitrobacter* มากกว่า *Nitrospira* แต่ในช่วงที่ผ่านโรงบำบัดน้ำเสียพบ *Nitrospira* มากกว่า *Nitrobacter* และบริเวณใกล้ปากแม่น้ำ(บริเวณที่มีความเค็มเพิ่มขึ้น)จะพบ *Nitrobacter*เพียงชนิดเดียว เนื่องจาก *Nitrobacter* มีลักษณะสมบัติแบบ R-strategists คือจะเจริญเติบโตได้ในที่ที่มีปริมาณไนไตรต์และออกซิเจน สูง และ *Nitrospira* มีลักษณะสมบัติแบบ K-strategists คือจะเจริญเติบโตได้ในที่ที่มีปริมาณไนไตรต์และออกซิเจนต่ำ

นอกจากจะพบในน้ำจืดแล้ว ยังพบได้ในระบบบำบัดน้ำจากการเพาะเลี้ยงปลาทองแบบเวียนกลับน้ำโดยใช้ตัวกรองชีวภาพ บริเวณชั้นนอกของชั้นกรอง (Itoi และคณะ, 2007)

2.2.3 แหล่งที่พบกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย

กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียจะพบในสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจนได้เป็นโคโลนีเดียวพบว่า *Nitrobacter winogradskyi, Nitrobacter hamburgensis*, *Nitrobacter vulgeni* และ *Nitrospira moscoviensis* เป็นไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่ไม่ทนต่อความเค็ม แหล่งพบแบคทีเรียทั้งสามสกุลนี้ได้แก่ ดิน นอกจากนี้ยังพบไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียทั้งสี่สกุลนี้ในแหล่งที่ต่างกันคือ *Nitrobacter winogradskyi* พบในน้ำจืด น้ำเสีย แผ่นฟิล์มชีวภาพในระบบบำบัดน้ำเสีย มหาสมุทร ดิน หิน หลุมฝังกลบขยะและกองปุ๋ยหมัก *Nitrobacter hamburgensis* พบในดิน *Nitrobacter vulgeni* พบในน้ำจืด น้ำเสีย ดิน หิน และกองปลวก *Nitrospira moscoviensis* พบในดิน ทะเลสาบ มหาสมุทร ระบบเพาะเลี้ยงน้ำจืด นอกจากนี้ยังพบในแผ่นฟิล์มชีวภาพในระบบเพาะเลี้ยงน้ำเค็ม ความเค็ม 20 พีพีที จัดกลุ่มแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวเป็นพวกทนความเค็ม (Halotolerance) *Nitrobacter alkalicus* เป็นไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่ทนต่อความเป็นด่าง ดังนั้นจึงพบไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสกุลนี้ในน้ำและดินที่เป็นด่าง *Nitrococcus mobilis*, *Nitrospina gracilis* และ *Nitrospira marina* เป็นไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่ สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีความเค็ม (Halophillic) ดังนั้นจึงพบไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสามสกุลนี้ในน้ำในมหาสมุทร

นอกจากนี้ยังพบ *Nitrospina gracilis* และ *Nitrospira marina* ในน้ำเค็ม รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2.2

2.2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย

2.2.4.1 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียแต่ละสกุลสามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เป็นกลางถึงเบสอ่อนคือ 7.5-8.0 ยกเว้น *Nitrobacter alkalicus* เท่านั้นที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่างสูงประมาณ 10 (ดังแสดงในตารางที่ 2.3)

2.2.4.2 อุณหภูมิ

กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียแต่ละสกุลสามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงระหว่าง 25-40 องศาเซลเซียส ยกเว้น*Nitrococcus mobilis* และ *Nitrospina gracilis* สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำสุดประมาณ 14 องศาเซลเซียส (ดังแสดงในตารางที่ 2.3)

2.2.4.3 ไนไตรต์

กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียแต่ละสกุลสามารถเจริญเติบโตในสิ่งแวดล้อมหรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณไนไตรต์ที่ต่างกัน โดย *Nitrobacter* จะเจริญในที่ที่มีปริมาณไนไตรต์สูง ทนได้ถึง 14 มิลลิโมลาร์ หรือประมาณ 2 กรัมโซเดียมไนไตรต์ /ลิตร (Cebron และ Garnier, 2005) เช่น *Nitrobacter alkalicus* สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีปริมาณไนไตรต์น้อยกว่า 10มิลลิโมลาร์ *Nitrobacter hamburgensis* สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีปริมาณไนไตรต์สูง ประมาณ 5 มิลลิโมลาร์ *Nitrobacter vulgaris* สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีปริมาณไนไตรต์น้อยกว่า 5 มิลลิโมลาร์ (ดังแสดงในตารางที่ 2.3) แต่*Nitrospira* จะเจริญในที่ที่มีปริมาณไนไตรต์ต่ำๆ Km ประมาณ 0.01 มิลลิโมลาร์ (ประมาณ 0.14 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร) (Cebron และ Garnier, 2005) *Nitrospira moscoviensis* สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีปริมาณไนไตรท์ 0.35 มิลลิโมลาร์ และจะถูกยับยั้งถ้ามีไนไตรต์มากกว่า 15 มิลลิโมลาร์ *Nitrospira marina* จะถูกยับยั้งถ้ามีปริมาณไนไตรต์มากกว่า 7 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร *Nitrospira bockiana Candidatus* จะถูกยับยั้งถ้ามีปริมาณไนไตรต์มากกว่า 26-30 มิลลิโมลาร์ (Lebedeva และคณะ, 2008) และ *Cadidatus Nitrospira defluvii* จะถูกยับยั้งถ้ามีปริมาณไนไตรต์มากกว่า 20-25 มิลลิโมลาร์ (ดังแสดงในตารางที่ 2.3 และตารางที่ 2.4)

2.2.4.4 ความเค็ม

กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียแต่สกุลสามารถเจริญเติบโตในสิ่งแวดล้อมหรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเค็มแตกต่างกัน บางสกุลพบในน้ำเค็มเท่านั้น เช่น *Nitrococcus mobilis และ Nitrospira marina* ซึ่งเป็นกลุ่มที่เจริญเติบโตในสิ่งแวดล้อมที่มีความเค็ม (halophillic) และ *Nitrospira moscoviensis* เป็นกลุ่มที่ทนต่อความเค็ม (halotolerance) (Watson และคณะ, 1971; Koops และคณะ, 2001; Egli, 2003 และWhang และคณะ, 2009) บางสกุลพบได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม เช่น *Nitrospira mosccoviensis* ซึ่งจัดแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่ทนต่อความเค็ม (Halotoleramce)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียแต่ละสกุลที่พบในระบบสิ่งแวดล้อม

ระบบสิ่งแวดล้อม	ระบบสิ่งแวดล้อม	*Nitrobacter*				*Nitrococcus*	*Nitrospina*	*Nitrospira*	
		N. winogradskyi	*N. alkalicus*	*N. hamburgensis*	*N. vulgeni*	*N. mobilis*	*N. gracilis*	*N. marina*	*N. moscoviensis*
น้ำจืด	น้ำจืด	+[4]			+[4]				+[1][2]
น้ำเสีย	น้ำเสีย	+[4]			+[4]				
	แผ่นฟิล์มชีวภาพ	+[5]							
น้ำเค็ม	น้ำเค็ม							+[4]	+[6]
	มหาสมุทร/ทะเลสาบ	+[4]				+[4]	+[4]	+[4]	+[1]
น้ำที่เป็นด่าง	น้ำที่เป็นด่าง		+[3]						
ดิน	ดิน	+[4]		+[4]	+[4]				+[1]
หิน	ดินที่เป็นด่าง		+[4]						
	หิน	+[4]			+[4]				
กองขยะ	หลุมฝังกลบขยะ	+[4]							
	กองปุ๋ยหมัก	+[4]							
อื่นๆ	จอมปลวก				+[4]				

+ พบแบคทีเรียสกุลนั้นในที่สภาพนั้นๆ

ที่มา [1] Ehrich et al., 1995

[2] Hovanec et al., 1998

[3] Sorokin et al., 1998

[4] Spieck and Bock, 2006

[5] Montras et al., 2008

[6] Foesel et al., 2007

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 สรุปลักษณะทางกายภาพ สภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของกลุ่มประชากรNOB สกุล *Nitrobacter* *Nitrospina* และ *Nitroccocus*

	Nitrobacter				***Nitrococcus***	***Nitrospina***
	N.winogradskyi	***N. alkalicus***	***N.hamburgensis***	***N. vulgeni***	***N.mobilis***	***N.gracilis***
ลักษณะวิวัฒนาการ	ซับดิวิชันแอลฟา				ซับดิวิชันแกมมา	ซับดิวิชัยเดลต้า
รูปร่างเซลล์	แท่งสั้น	แท่งสั้น	แท่งสั้น	แท่งสั้น	กลม	แท่งยาวตรง
ขนาด (ไมโครเมตร)	0.6-0.8×1.0-2.0	0.6-0.9×1.2-1.8	-	-	1.5-1.8	0.3-0.40×2.7-6.5
การเคลื่อนที่	เคลื่อนที่ได้	เคลื่อนที่ได้	เคลื่อนที่ได้	เคลื่อนที่ได้	เคลื่อนที่ได้	เคลื่อนที่ไม่ได้
การสืบพันธุ์	แตกหน่อหรือแบ่งเซลล์	แตกหน่อหรือแบ่งเซลล์	แตกหน่อหรือแบ่งเซลล์	แตกหน่อหรือแบ่งเซลล์	แบ่งเซลล์	แบ่งเซลล์
ความเป็นกรด-ด่าง	7.5-8.0	6.5-10.2	7.5-8.0	7.5-8.0	7.5-8.0	7.5-8.0
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	28-30	25-28	28-30	28-30	14-40	14-40

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 สรุปลักษณะทางกายภาพ สภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของกลุ่มNOB สกุล *Nitrobacter* *Nitrospina* และ *Nitroccocus*

	Nitrobacter				***Nitrococcus***	***Nitrospina***
	N.winogradskyi	***N. alkalicus***	***N.hamburgensis***	***N. vulgeni***	***N.mobilis***	***N.gracilis***
	K-strategists					
ปริมาณไนไตรต์ (มิลลิโมลาร์)	<5	<10	5	<5	-	-
ความเค็ม					70-100% *	
ตัวรับอิเลคตรอน	สามารถเติบโตได้ในสภาวะไร้ออกซิเจนโดยใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเลคตรอน					

* ไม่เจริญเติบโตในน้ำที่มีการผสม NaCl เข้าลงไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.4 สรุปลักษณะทางกายภาพ สภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของกลุ่มประชากรNOB สกุล *Nitrospira*

	***Nitrospira* ***			
	Nitrospira bockiana Candidatus	***Candidatus Nitrospira defluvii***	***N. moscoviensis***	***N.marina***
ลักษณะวิวัฒนาการ	ไฟลัมไนโรสไปรา			
รูปร่างเซลล์	เกลียว	ท่อนหรือม้วนเป็นเกลียว	โค้งหรือม้วนเป็นเกลียว	โค้งหรือม้วนเป็นเกลียว
ขนาด (ไมโครเมตร)	0.3-0.6 × 1.0-2.5		0.9-2.20×0.2-0.4	-
การเคลื่อนที่			เคลื่อนที่ไม่ได้	เคลื่อนที่ไม่ได้
การสืบพันธุ์			แบ่งเซลล์	แบ่งเซลล์
ความเป็นกรด-ด่าง			7.6-8.0	7.6-8.0
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	44-46	28-32	25-39	20-30
กลุ่มย่อยในphylogenetic tree	กลุ่มย่อยใหม่	กลุ่มย่อยที่ 1	กลุ่มย่อยที่ 2	กลุ่มย่อยที่ 4
ความเค็มในอาหารเลี้ยงเชื้อ	อาหารไม่มีความเค็ม	อาหารไม่มีความเค็ม	อาหารไม่มีความเค็ม	อาหารมีความเค็ม
ปริมาณไนไตรต์สูงสุดที่ทนได้ (มิลลิโมลาร์)	26-30	20-25	15	6

* Lebedeva และคณะ, 2008

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.5 วิธีการจำแนกไนไตรต์ออกซิงไดซิงแบคทีเรีย

ในอดีตการจำแนกชนิดของแบคทีเรียนิยมใช้วิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจนได้โคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์แล้ว และวิเคราะห์ชนิดของเซลล์เดี่ยว โดยการส่องตรวจรูปร่างลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียหรือใช้วิธีการทดสอบทางชีวเคมี แต่วิธีนี้จะไม่ สามารถจำแนกแบคทีเรียที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ เนื่องจากในการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะใส่สารอาหารที่แบคทีเรียต้องการมากจนเกินพอและมีการปรับสภาวะ เพื่อให้แบคทีเรียเจริญเติบได้ แต่สภาพสิ่งแวดล้อมจริง สารอาหารที่แบคทีเรียต้องการอาจมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตและสภาวะไม่เหมาะสม ทำให้ไม่สามารถคัดแยกแบคทีเรียเหล่านี้จากสิ่งแวดล้อม

ในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคทางโมเลกุลทำให้สามารถจำแนกชนิดแบคทีเรียได้ถึงระดับยีน (gene) โดยใช้การศึกษาความแตกต่างของลำดับเบสใน RNA หรือ DNA และจัดแบ่งความหลากหลายของประชากรสิ่งมีชีวิตออกมาเป็นกลุ่มตามลักษณะความแตกต่าง ซึ่งวิธีนี้สามารถใช้เปรียบเทียบองค์ประกอบของแบคทีเรียและสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรีย วิธีการจำแนกแบคทีเรียที่ใช้กันในปัจจุบันได้แก่เทคนิคเทคนิค PCR-Cloning-Sequencing, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Fluorescence in situ hybridization (FISH) และReal time PCR ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ เทคนิค PCR-Cloningและ Real time PCR ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

2.2.5.1 เทคนิค PCR-Cloning

ขั้นตอนทั่วไปของการจำแนกแบคทีเรีย โดยวิธี PCR-Cloning ประกอบด้วย

- <u>การสกัดกรดนิวคลีอิค (DNA หรือ RNA)</u>

วิธีการทำลายเซลล์หรือเยื้อหุ้มนิวเคลียสให้แตก โดยใช้วิธีการทางกายภาพ เคมี หรือใช้อุณหภูมิ วิธีที่เป็นที่นิยมในการทำลายเซลล์คือวิธีการการทำลายทางกายภาพ

- <u>ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส</u> (Polymerase chain reaction : PCR หรือ conventional PCR)

เป็นกระบวนการสังเคราะห์ชิ้นส่วน DNA ในขั้นตอนนี้มี DNAสังเคราะห์ขนาดสั้นประมาณ 15-25 เบส ที่เรียกว่า ไพรเมอร์ (Primer) เพื่อเข้ามาจับบริเวณที่มีลำดับเบส ไพรเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอนนี้จะเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ 16S rRNA gene และยีนที่มีความจำเพาะเจาะจงกับหน้าที่ในแต่ละประเภทของแบคทีเรีย (functional gene) ในการศึกษากลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสามารถศึกษาได้ทั้ง 16S rRNA gene และยีนที่มีความจำเพาะเจาะจงกับหน้าที่ เช่น nxrX และ nxrB ที่สร้างเอนไซม์ Nitrite oxidoreductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายไนไตรต์ ในปัจจุบัน

การศึกษายีนที่มีความจำเพาะเจาะจงกับหน้าที่ของประชากรของกลุ่มไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย ยังไม่สามารถทำได้ครอบคลุมกลุ่มประชากรของแบคทีเรียกลุ่มไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียทุกกลุ่ม โดยจะศึกษาได้เฉพาะกลุ่มประชากรของแบคทีเรียกลุ่มไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย สกุล *Nitrobacter* เท่านั้น (Vanparys และคณะ, 2006) ดังนั้นการศึกษาประชากรของกลุ่มไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียในงานวิจัยนี้เลือกศึกษา 16S rRNA (รายละเอียดไพเมอร์แสดงในตารางที่ 2.5) ซึ่งวิธีการทำ PCR ประกอบไปด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

- การแยกสาย DNA เกลียวคู่ออกจากกัน (Denaturation) ลักษณะ DNA แม่แบบ ในช่วงเริ่มต้น มี ลักษณะเป็นเกลียวคู่ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึงประมาณ 94 องศาเซลเซียส จะทำให้พันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสของ DNA ถูกทำลาย ทำให้เส้น DNA แยกออกจากกัน

- การจับของไพร์เมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing) เมื่อแยกสาย DNA ออกจากกันแล้ว จะลดอุณหภูมิลงเหลือ 40-62 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพร์เมอร์เข้ามาจับบริเวณที่มีลำดับเบสคู่เหมาะสมกัน

- การสังเคราะห์ DNA สายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (Extension) ในขั้นตอนนี้จะเป็นการสร้างสาย DNA ต่อจากไพร์เมอร์ โดยอุณหภูมิที่ใช้จะพอเหมาะกับ การทำงานของ Taq DNA polymeras ซึ่งโดยปกติจะใช้อุณหภูมิประมาณ 68-72 องศาเซลเซียส

– <u>วิเคราะห์ยีนจากPCR โดยใช้เทคนิค clone library</u>

เทคนิคโคลนนิ่งเป็นวิธีการแยก DNA และเป็นวิธีการเพิ่ม DNA เนื่องจากวิธีนี้ไม่สามารถแยก DNA ออกจากกันได้เหมือนกับวิธี DGGE ดังนั้นต้องมีการถ่าย DNA ไปยังสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวก่อนการแยก โดย DNA ที่ผ่านการทำ PCR ใส่ลงในพลาสมิด แล้วถ่ายเทพลาสมิดลงในสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว (เลือกใช้ *Escherichia coli (E.coli)*) หลังจากนั้นจะทำการสุ่มโคโลนีเพื่อไปทำการอ่านลำดับรหัสพันธุกรรมต่อไป

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์กลุ่มประชากรNOB

อ้างอิง	สกุล	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5’-3’)
Cebron และ Garnier (2005)	*Nitrobacter*	FGPS 872	CTAAAACTCAAAGGAATTGA
		FGPS 1269’	TTTTTTGAGATTTGCTAG
Montras และคณะ (2007)		Nwi 70F	GGCGTAGCAATACGTCAG
		Nwi 165R	ATCCGGTATTAGCCCAAG
Jie และ Daping (2008)		P338f	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
		NIT3	CCTGTGCTCCATGCTCCG
Cebron และ Garnier (2005)	*Nitrospira*	NSR 1113F	CCTGCTTTCAGTTGCTACCG
		NSR 1264R	GTTTGCAGCGCTTTGTACCG
Nakamura และคณะ (2006)		NTSPAf	CGCAACCCCTGCTTTCAGT
		NTSPAr	CGTTATCCTGGGCAGTCCTT
Itoi และคณะ (2007)			AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
			TCTACGCATTTCACCGCTAC
Liu และคณะ (2008)		P338f	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
		Ntspa0685r	CGGGAATTCCGCGCTC

2.2.5.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสแบบเวลาจริง (Real-Time Polymerase Chain Reaction; Real-Time PCR)

ปฏิกิริยา Real – Time PCR ใช้หลักการพื้นฐานเดียวกับปฏิกิริยา PCR ในเรื่องการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมหรือยีนของสิ่งมีชีวิต และมีข้อแตกต่างกันระหว่างปฏิกิริยาทั้งสอง คือ ปฏิกิริยา Real –Time PCR ผลที่ได้ออกมาจะเป็นไปในเชิงปริมาณ เพราะสามารถนับจำนวนสารพันธุกรรมหรือยีนของสิ่งมีชีวิตได้ แต่ผลของปฏิกิริยา PCR จะเป็นไปในเชิงคุณภาพเพราะไม่สามารถนับได้และต้องนำตัวอย่างที่ผ่านการทำปฏิกริยาแล้วไปทำต่อด้วยวิธีการโคลนนิง (Clone library) หรือวิธีการ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)) ต่อไปเพื่อให้ทราบสายพันธุ์หรือกลุ่มสิ่งมีชีวิต ข้อดีของเทคนิค Real-Time PCR คือมีความรวดเร็ว น่าเชื่อถือ เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอต่ำ เช่น ตัวอย่างตะกอนดิน (Nakamura และคณะ, 2006)

– วิธีการติดตามการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ

- สีเรืองแสง (Fluorescent dyes)

สีเรืองแสงสามารถซึมไปใน DNA สายคู่ได้ในขั้นตอนการทำให้สาย DNA เข้าคู่กับไพร์เมอร์โดยใช้ความร้อน (Annealing) และสามารถตรวจจับสีเรืองแสงได้ที่ขั้นตอนการเพิ่มจำนวน DNA กล่าวคือ ในระหว่างขั้นตอนการทำ DNA คลายเกลียว DNAทั้งหมดจะกลายเป็น DNA สายเดี่ยว ที่สถานะนั้นสารเรืองแสงจะอยู่อย่างอิสระในสารละลายต่อ ในระหว่างขั้นตอนการทำให้ DNA เข้าคู่กับไพร์เมอร์โดยใช้ความร้อน ไพร์เมอร์จะเข้าคู่กับลำดับเบสเป้าหมายกลายเป็น DNA สายคู่ทำให้สารเรืองแสงสามารถซึมเข้าไปได้ และเมื่อสิ้นสุดขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ สีเรืองแสงซึมเข้าสู่ดีเอ็นเอสายคู่มากพอและ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลตจากเครื่อง Real-Time ก็สามารถตรวจนับจำนวนสิ่งมีชีวิตนั้นๆได้ แต่ถ้าเพิ่มไพร์เมอร์มากเกินไปจะเกิดการจับคู่กันเองระหว่างไพร์เมอร์ หรือที่เรียกว่า primer dimer สีเรืองแสงก็จะซึมเข้าสู่ DNA สายคู่นั้นๆได้เช่นเดียวกันทำให้ค่าที่ได้ผิดพลาด

- การใช้โพรบ (Probe)

ฉลากเรืองแสงที่ติดมากับโพรบสามารถเข้าไปเกาะติดกับไพร์เมอร์ในขั้นตอนการทำให้สาย DNA เข้าคู่กับไพร์เมอร์ กล่าวคือ โพรบประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ตัวรายงานสัญญาณ (Reporter) และตัวเปล่งแสง (Quencher) เมื่อโพรบที่ติดฉลากเรืองแสงไว้จะเข้าไปเกาะติดกับไพร์เมอร์ในขั้นตอนการทำให้DNA คู่กับไพร์เมอร์โดยใช้ความร้อน ตัวเปล่งแสงและตัวรายงานสัญญาณจะทำงานเนื่องจากไพร์เมอร์และลำดับเบสคู่ยังเข้าคู่กัน และตัวรายงานสัญญาณส่งสัญญาณแสงไปยังตัวรับสัญญาณในเครื่อง Real-Time PCR ดังนั้นการใช้โพรบจะไม่สามารถอ่านสัญญาณของ DNA คู่ที่เกิดจากการจับคู่กันเองของไพร์เมอร์ หรือ DNA แม่แบบได้

การเลือกใช้โพรบที่ติดฉลากสารเรืองแสงที่เกิดขึ้นผ่านปฏิกิริยาการถ่ายเทพลังงานสารเรืองแสง (Fluorescent Resonance Energy; FRET) ขึ้นอยู่กับลักษณะและวัตถุประสงค์การศึกษาโดยที่ไพร์เมอร์ที่เลือกใช้ไม่ไปเพิ่มจำนวน DNA ของชนิดพันธุ์อื่นหรือไม่ไปเข้าคู่กับกรดนิวคลีอิค

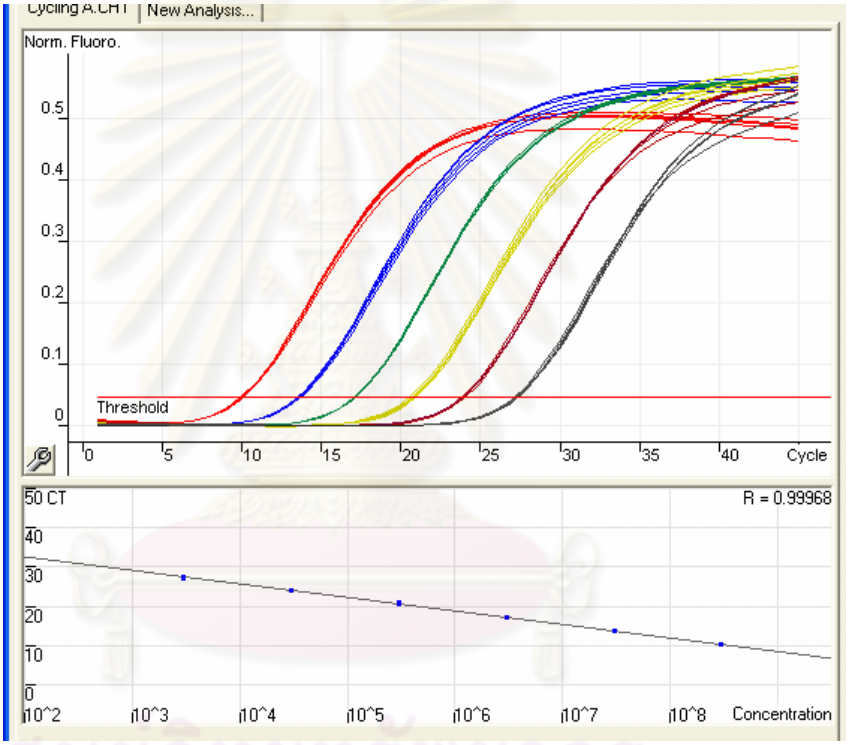
– หลักการเทคนิค Real time PCR

แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะคือ

- การใช้งานในเชิงวิเคราะห์ปริมาณ (Quantification analysis)

การใช้งานในเชิงวิเคราะห์ปริมาณ (Quantification analysis) เป็นพื้นฐานการวัดปริมาณสีเรืองแสงจาก ตัวเปล่งแสง (fluorophore) ในปฏิกิริยาในเชิงปริมาณ ซึ่งสามารถมองเห็นการ

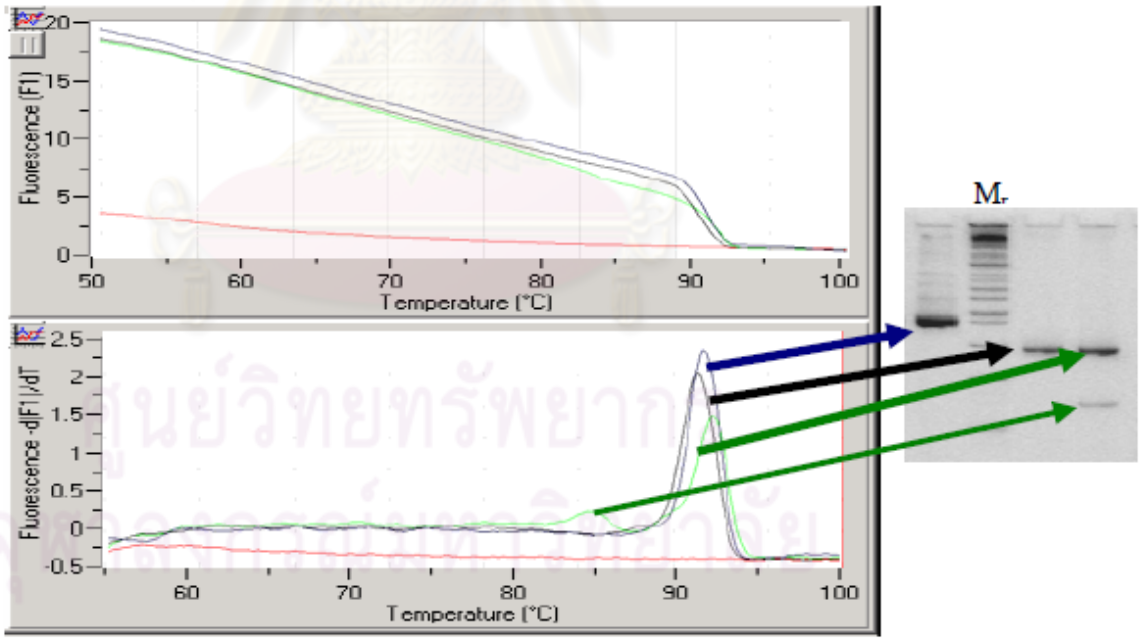
เพิ่มของผลิตภัณฑ์ได้ ในระหว่างที่มีการเพิ่มปริมาณ DNAในทุกๆรอบ จอประมวลผลจะแสดงออกมาในรูปแบบกราฟเส้นรูปตัวเอส (S shape) ซึ่งเป็นกราฟระหว่างสีเรืองแสงกับจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยจำนวนเส้นกราฟขึ้นอยู่กับจำนวนตัวอย่างที่ตรวจวัดด้วยเครื่อง Real-Time PCR ในแต่ละครั้ง และในแต่การตรวจวัดเชิงปริมาณสัมพันธ์ที่สามารถทำได้โดยการนำDNA มาตรฐานของยีนที่สนใจและยีนอ้างอิงที่ทราบความเข้มข้นแล้วมาทำการเพิ่มปริมาณ ปริมาณข้อมูลที่ได้จากดีเอ็นเอมาตรฐานจะถูกนำไปสร้าง กราฟมาตรฐาน (Sและard Curve) เพื่อใช้คำนวณหาปริมาณสารตั้งต้นของDNAเป้าหมายและDNAอ้างอิง ดังแสดงในรูป (พัชนียา ธรรมวงศ์, 2551)



รูปที่ 2.7 การวัดปริมาณ fluorescence จาก DNA มาตรฐาน ใน real-time PCR และกราฟเส้นตรงที่ได้ ซึ่งแสดงจำนวนรอบและความเข้มข้นของ DNA มาตรฐาน ณ ตำแหน่งนั้นๆ ใน exponential phase ของปฏิกิริยา

- การวิเคราะห์ Melting curve analysis

การวิเคราะห์ melting curve เป็นการวิเคราะห์เพื่อยืนยันว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการจริงหรือไม่ การวิเคราะห์ทำ melting curve ใช้กับการติดตามจำนวน DNA โดยใช้สารเรืองแสงเท่านั้น และหลังจากการวิเคราะห์ melting curve แล้วจะไม่มีการทำเจลโดยใช้ไฟฟ้า ซึ่งหลักการวิเคราะห์ melting curve คือปฏิกิริยาลูกโซ่ในเครื่อง Real-time PCR จบลง โปรแกรมจะประมวลผลนับจำนวน DNA โดยตัวรับสัญญาณแสงจะนับจำนวน DNA โดยตัวรับสัญญาณแสงจะนับจากแสงที่สารเรืองแสงเปล่งออกมาจาก DNAสายคู่ ต่อจากนั้นจะเริ่มการวิเคราะห์ melting curve ทันที โดยการเพิ่มอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนDNAสายคู่เป้าหมาย ที่มีคู่เบสของนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ เนื่องจากดีเอ็นเอสายคู่ที่เกิดจากการจับคู่กันเองของไพร์เมอร์หรือDNAแม่แบบจะแยกตัวออกจากกันซึ่งDNAแต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิเฉพาะตัวในการแยกตัวออกจากกัน ที่จุดนี้อุณหภูมิขึ้นอยู่กับความยาวและปริมาณ G และ C ที่มีในDNAแต่ละชนิด ดังนั้นจึงสามารถแยก DNAเป้าหมายออกจากผลิตภัณฑ์ DNA ปนเปื้อนได้ โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ประมวลผลแล้วทำกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสารเรืองแสงที่เปลี่ยนแปลงไปต่ออุณหภูมิ (dF/dT) กับอุณหภูมิ (T) จะได้ค่าสูงสุดที่อุณหภูมิต่ำ



รูปที่ 2.8 การวัด fluorescence จาก PCR product เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเรื่อยๆ ในกรอบบนและเมื่อเปลี่ยน scale ให้เป็น dF/dt จะได้กราฟดังรูปในกรอบล่าง ซึ่งแสดงอุณหภูมิที่เป็น melting temperature ของ PCR product แต่ละตัว โดยเทียบกับขนาดเมื่อ run gel electrophoresis ตามที่ลูกศรชี้

2.3 การเลี้ยงกุ้ง

2.3.1 การเลี้ยงกุ้ง

2.3.1.1 ประเภทของการเลี้ยงกุ้ง

การแบ่งประเภทการเลี้ยงกุ้ง มีหลักเกณฑ์ในการแบ่งได้หลายประเภท เช่นการแบ่งตามลักษณะบ่อ แบ่งตามระดับความเค็ม และแบ่งตามลักษณะการเลี้ยง ได้ดังนี้

– ประเภทของการเลี้ยงกุ้งแบ่งตามลักษณะบ่อ

ระบบเปิด (Open systems)

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในอดีตจะเป็นแบบระบบเปิดคือ จะมีการนำน้ำทะเลมาใช้เพาะเลี้ยงสัตว์โดยตรงหรืออาจจะผ่านระบบการกรองอย่างง่าย หลังจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสิ้นสุดลง น้ำในบ่อจะถูกสูบออกปล่อยสู่ธรรมชาติหรือสูบพักเก็บไว้ในบ่อพักน้ำต่อไป ระบบนี้ไม่มีการนำน้ำนั้นกลับมาใช้ใหม่ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงสัตว์ด้วยระบบนี้ต้องมีแหล่งน้ำที่มีคุณภาพเหมาะสมตลอดเวลา หากบางช่วงเวลาคุณภาพในแหล่งน้ำนั้นไม่เหมาะสมก็ไม่สามารถนำน้ำจากแหล่งนั้นมาใช้ประโยชน์ได้ วิธีการแก้ปัญหาดังกล่าวคือการเพาะเลี้ยงด้วยระบบนี้ต้องเลือกพื้นที่ให้อยู่ใกล้กับบริเวณแหล่งน้ำที่มีความเหมาะสมกับการเลี้ยง แต่เนื่องจากน้ำที่ผ่านจากระบบไม่มีการบำบัดอาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพสิ่งแวดล้อม

ระบบกึ่งเปิด (Semi-Open systems)

ระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนี้เป็นการลดปริมาณการเปลี่ยนถ่ายน้ำหรือมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำบางช่วง ซึ่งทำให้สามารถควบคุมอาหารที่ใช้เลี้ยงและความสามารถในการเปิดปิดระบบเมื่อคุณภาพน้ำทะเลภายนอกเหมาะสมและไม่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง ระบบนี้ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าระบบการเพาะเลี้ยงแบบเปิด เนื่องจากมีการปล่อยน้ำทิ้งที่ผ่านการเพาะเลี้ยงแล้วน้อยกว่าระบบการเพาะเลี้ยงแบบเปิด

ระบบปิด (Closed or recirculating systems)

ระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจะมีการปรับสภาพน้ำที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเพื่อให้มีคุณภาพที่ดีขึ้นสามารถนำน้ำมาหมุนเวียนใช้ในระบบได้อีก ซึ่งระบบในการบำบัดน้ำประกอบด้วยส่วนต่างๆได้แก่ ขั้นแรกจะใช้การกรองผ่านชั้นทรายใช้ผ้ากรอง หรือใช้วัสดุกรองชนิดต่างๆที่ใช้ในระบบอุตสาหกรรม ซึ่งเป็นการบำบัดทางกายภาพ หลังจากนั้นน้ำที่ผ่านการใช้แล้วจะถูกบำบัดโดยกระบวนการทางชีวภาพ คือกระบวนการไนตริฟิเคชันซึ่งใช้แบคทีเรียช่วยในการเปลี่ยนแปลงของเสียแอมโมเนียและไนไตรต์ให้เป็นไนเตร ตซึ่งมีความเป็นพิษน้อยกว่า หลังจากบำบัดทางชีวภาพ

แล้วจะทำการฆ่าเชื้อโรคคือการใช้ รังสีอัลตราไวโอเลตและการใช้โอโซน ก่อนที่จะนำน้ำนั้นมาหมุนเวียนในระบบการเพาะเลี้ยงอีก

– ประเภทของการเลี้ยงกุ้งแบ่งตามระดับความเค็ม (ธวัชชัย สันติกุล, 2549)

<u>การเลี้ยงกุ้งระดับความเค็มต่ำ</u>

การเลี้ยงกุ้งระดับความเค็มต่ำมีความเค็มอยู่ในช่วง 3-4 พีพีที โดยมักจะใช้น้ำจืดจากแม่น้ำลำคลองเติมลงในน้ำเค็ม

ข้อดีของการเลี้ยงกุ้งระบบนี้คือควบคุมคุณภาพน้ำทำได้ง่ายกว่า ทำให้กุ้งมีความเครียดน้อยกว่า กุ้งจึงไม่ป่วย และการเลี้ยงกุ้งระดับความเค็มต่ำจะไม่พบแพลงตอนพิษในกลุ่มขี้ปลาวาฬ (ไดโนแฟลกเจลเลต) แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสง (วิบริโอ) ไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งโดยปกติกลุ่มสิ่งมีชีวิตเหล่านี้จะพบในการเพาะเลี้ยงกุ้งที่ความเค็มสูง

การเลี้ยงกุ้งระดับความเค็มต่ำยังพบปัญหาอื่นๆอีก เช่น อัลคาลินิตีมีค่าต่ำหรือสูงเกินไปทำให้การควบคุมค่าดังกล่าวเป็นไปได้ยาก ในช่วงท้ายการเลี้ยงที่ความเค็มเหลือน้อยกุ้งในบ่อจะโตช้าทำให้ขนาดของกุ้งในระบบนี้เล็กกว่าระบบน้ำเค็ม

<u>การเลี้ยงกุ้งระดับความเค็มปกติ</u>

การเลี้ยงกุ้งระดับความเค็ม ปกติมีความเค็มอยู่ในช่วง 10-25 พีพีที ในฟาร์มที่มีการเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่นมากกว่า 120,000ตัว/ไร่ มีอัตราการอยู่รอดประมาณ 80%

<u>การเลี้ยงกุ้งระดับความเค็มสูง</u>

การเลี้ยงกุ้งระดับความเค็ม สูงมีความเค็มอยู่ในช่วง 25-30 พีพีที การเลี้ยงระดับความเค็มสูงไม่เป็นที่นิยมเลี้ยงนัก เนื่องจากกุ้งที่เลี้ยงในระบบจะเกิดโรค ทำให้ผู้เลี้ยงนิยมเลี้ยงกุ้งในระบบดับความเค็มต่ำมากกว่า

– ประเภทของการเลี้ยงกุ้งแบ่งตามลักษณะการเลี้ยง

<u>การเลี้ยงแบบธรรมชาติ</u> (Extensive System)

การเลี้ยงกุ้งแบบธรรมชาติหรือแบบดั้งเดิม เป็นลักษณะพื้นฐานของการเริ่มต้นการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย การเลี้ยงกุ้งในลักษณะนี้ต้องใช้พื้นที่มากประมาณ 50-120ไร่ ส่วนใหญ่จะดัดแปลงจากนาข้าวชายฝั่งทะเลหรือดัดแปลงจากนาเกลือหรือจากการหักร้างถางป่าชายเลน มีการขุดร่องน้ำโดยรอบนากุ้ง โดยขุดดินจากร่องยกขึ้นเป็นคันนาล้อมรอบพื้นที่เพื่อกักเก็บน้ำ

(ชูศักดิ์ แสงธรรม, 2541) ใช้เวลาการเลี้ยงกุ้งนานประมาณ 1-2 เดือน (ประพันธ์ ธารบุปผา, 2530) ให้ผลผลิตต่อไร่ประมาณ 40-70 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี (ชูศักดิ์ แสงธรรม, 2541)

การเลี้ยงกุ้งแบบธรรมชาตินี้จะให้ผลดีในช่วงการเลี้ยงในระยะแรกเท่านั้น เพราะการเลี้ยงกุ้งแบบนี้อาศัยเชื้อลูกกุ้งจากแหล่งน้ำธรรมชาติซึ่งจะมีลูกกุ้งชุกชุมในช่วงแรกๆเท่านั้น กระทั่งการเลี้ยงกุ้งครั้งต่อมาเชื้อลูกกุ้งจากทะเลลดน้อยลงผลผลิตกุ้งจึงลดลงต่ำลงไปด้วย แต่ก็เป็นวิธีการเลี้ยงกุ้งที่ลงทุนต่ำ กุ้งที่ได้เกือบทั้งหมดเป็นกุ้งแชบ๊วย (ชูศักดิ์ แสงธรรม, 2541)

<u>การเลี้ยงกุ้งแบบกึ่งพัฒนา</u> (Semi-intensive system)

การเลี้ยงกุ้งแบบนี้เรียกว่าการเลี้ยงกุ้งแบบปล่อยเสริม (Additional System) (ประพันธ์ ธารบุปผา, 2530) ใช้การดัดแปลงพื้นที่นากุ้งบางส่วนเป็นบ่ออนุบาลกุ้งเพื่อรองรับลูกกุ้งจากโรงเพาะฟัก มีการให้อาหารเสริมและกำจัดศัตรูของลูกกุ้ง เมื่อลูกกุ้งที่อนุบาลโตและแข็งแรงเพียงจึงเปิดประตูปล่อยลูกกุ้งออกไปเลี้ยงรวมกันกับกุ้งที่เลี้ยงแบบธรรมชาติซึ่งอยู่ในนากุ้งแบบเก่าต่อไป (ชูศักดิ์ แสงธรรม, 2541)

การเลี้ยงกุ้งแบบนี้ ใช้เวลาการเลี้ยงนาน 3-4 เดือน ให้ผลผลิตต่อไร่ประมาณ 80-100 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี ลูกกุ้งที่ปล่อยเสริมทั้งหมดมักเป็นกุ้งกุลาดำ (ประพันธ์ ธารบุปผา, 2530)

<u>การเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่น (Intensive System)</u>

การเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่น หรือการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนา หรือการเลี้ยงกุ้งให้ผลผลิตสูง นับเป็นการเลี้ยงที่ทันสมัย ต้องใช้ความรู้ตามหลักวิชาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำตลอดจนการบริหารการจัดการด้านต่างๆ มาประยุกต์ใช้ในการดำเนินงาน ได้แก่ การเพาะขยายพันธุ์กุ้ง การเตรียมบ่อ การให้อาหาร การใส่ปุ๋ย การอนุบาลกุ้ง การควบคุมระดับน้ำ และกิจกรรมอื่นๆที่จะปฏิบัติค่อนข้างซับซ้อน ต้องอาศัยความรู้และความชำนาญเป็นอย่างมาก ส่วนใหญ่จะทำการเพาะเลี้ยงกุ้งในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งดำเนินโดยเกษตรกรรายใหญ่ เพราะต้องลงทุนสูง รวมทั้งต้องใช้เวลาในการอนุบาลและการเลี้ยงมากขึ้น คือใช้เวลาในการเลี้ยงประมาณ 4-5 เดือน แต่จะให้ผลผลิตต่อไร่สูงและให้ผลตอบแทนคุ้มค่าแก่การลงทุน (ประพันธ์ ธารบุปผา, 2530) การเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่น แบ่งออกเป็น (Funge-Smith และ Briggs, 1998)

- การเลี้ยงกุ้งความหนาแน่นต่ำ คือมีปริมาณกุ้งน้อยกว่า 50 ตัวต่อตารางเมตร
- การเลี้ยงกุ้งความหนาแน่นสูง คือมีปริมาณกุ้งมากกว่า 50 ตัวต่อตารางเมตร

2.3.1.2 คุณภาพน้ำที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้ง

คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อชีวิตและความเป็นอยู่ของกุ้งที่เลี้ยง คุณภาพน้ำที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงกุ้ง (อุตสาหกรรมกุ้งไทย, 2551) ได้แก่

— *อุณหภูมิ*

กุ้งแต่ละชนิดต้องการอุณหภูมิสำหรับการเจริญเติบโตไม่เหมือนกัน โดยทั่วไปแล้วกุ้งจะเจริญเติบโตเร็วถ้าอุณหภูมิสูง แต่ถ้าอุณหภูมิเกินไปกุ้งจะตาย อุณหภูมิของน้ำในนากุ้งของไทยเฉลี่ยประมาณ 22-29 องศาเซลเซียส

— *ความเค็ม*

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่มีความสามารถทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของความเค็มในช่วงกว้าง คือระหว่าง 2-70 พีพีที แต่ความเค็มที่เหมาะสมและการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดคืออยู่ระหว่าง 15-20 พีพีที ในปัจจุบันพบว่าการเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยนิยมเลี้ยงในบ่อกุ้งที่มีความเค็มต่ำ คือ 3-10 พีพีที เนื่องจากโอกาสที่จะเกิดโรคกุ้งมีน้อยกว่าการเลี้ยงกุ้งที่มีความเค็มสูง

— *ค่าความเป็นกรด-ด่าง*

ค่าความเป็นกรด -ด่าง ของน้ำมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของกุ้งกุลาดำมาก เนื่องจากพีเอชมีผลต่อคุณสมบัติของน้ำตัวอื่นๆอีกเช่นมีผลต่อความเป็นพิษของแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไฮโดรเจนซัลไฟด์ เป็นต้น ค่าความเป็นกรด -ด่าง ของน้ำที่เหมาะสมแก่การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ควรอยู่ระหว่าง 7.5-8.5 ดังแสดงในตารางที่ 2.6

ค่าความเป็นกรด -ด่างของน้ำจะต่ำสุดในตอนเช้ามืดเนื่องจากมีการย่อยสลายของเสียโดยแบคทีเรียและการหายใจของกุ้งและแพลงก์ตอนรวมทั้งสิ่งมีชีวิตอื่นๆในบ่อ ค่าความเป็นกรด-ด่างจะค่อยๆเพิ่มขึ้นจนทีค่าสูงสุดในตอนบ่ายเนื่องจากมีการสังเคราะห์แสงของแพลงค์ตอนพืช ความแตกต่างของ ค่าความเป็นกรด -ด่าง ในรอบวันไม่ควรมากกว่า 0.5 หากมีเปลี่ยนแปลง ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในรอบวันมากเกินไปจะทำให้กุ้งเครียดมีผลต่อการเจริญเติบโต

การเปลี่ยนแปลงของ ค่าความเป็นกรด -ด่าง ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำขึ้นอยู่ปัจจัยหลายอย่างเช่น คุณสมบัติของดิน ค่าอัลคาไลน์นิตี้ การผลิตและการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำส่วนใหญ่ขึ้นกับปริมาณแพลงก์ตอนพืช

ตารางที่ 2.6 ผลกระทบของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อกุ้งกุลาดำ

ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
น้อยกว่า 4	เป็นกรดกุ้งจะตาย
ระหว่าง 4-6	การเจริญเติบโตช้า
ระหว่าง 6-9	การเจริญเติบโตดีที่สุด
ระหว่าง 9-11	การเจริญเติบโตช้า
มากกว่า 11	เป็นด่างกุ้งจะตาย

ที่มา อุตสาหกรรมกุ้งไทย, 2551

– *ออกซิเจนที่ละลายน้ำ*

ปริมาณของออกซิเจนในน้ำมีความสำคัญต่อชีวิตและความเป็นอยู่ของกุ้ง กุ้งจะไม่กินอาหารถ้าน้ำในบ่อมีออกซิเจนน้อยกว่า 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ออกซิเจนในบ่อจะมีมากน้อยแค่ไหนขึ้นอยู่กับความเค็มและอุณหภูมิด้วย คือถ้าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำจะลดลงถ้าน้ำในบ่อมีความเค็มและมีอุณหภูมิสูงขึ้น

ตามปกติกุ้งขนาดเล็กต้องการออกซิเจนสูงกว่ากุ้งขนาดใหญ่ กุ้งขนาด 0.1-0.5 กรัม จะใช้ออกซิเจนประมาณชั่วโมงละ 1-2 มิลลิลิตร ส่วนกุ้งขนาด 10-20 กรัม จะใช้ออกซิเจนประมาณชั่วโมงละ 0.3 มิลลิลิตร กุ้งจะใช้ออกซิเจนสูงกว่าปกติในระยะลอกคราบ

ปัญหาการขาดออกซิเจนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจะพบในบ่อเลี้ยงกุ้งที่ปล่อยกุ้งไปในปริมาณมากหรือกุ้งที่มีอันตรารอดสูงมากแต่มีเครื่องให้อากาศไม่เพียงพอ โดยเฉพาะในช่วงเดือนสุดท้ายของการเลี้ยง ในบ่อที่มีกุ้งหนาแน่นเมื่อมีการให้อาหารในปริมาณที่มากในแต่ละวัน อาหารที่เหลือและของเสียที่กุ้งขับออกมามากนั้นจะมีการดึงออกซิเจนไปใช้ในการย่อยสลายเศษอาหารและของเสีย รวมทั้งการหายใจของแพลงตอนที่มีหนาแน่นและการหายใจของกุ้งที่มีขนาดใหญ่ขึ้นในบ่อจะมีผลให้ออกซิเจนน้อยลง ผลกระทบของปริมาณออกซิเจนต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ แสดงในตารางที่2.7

ตารางที่ 2.7 ผลกระทบของปริมาณออกซิเจนต่อกุ้งกุลาดำ

ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ผลกระทบ
มากกว่า 4	กุ้งเจริญเติบโตดี สารอินทรีย์สลายตัวได้เร็ว
ระหว่าง 3-4	กุ้งเจริญเติบโตช้าลง การสะสมของสารอินทรีย์เพิ่มขึ้น
น้อยกว่า 3	กินอาหารน้อยลง การเจริญเติบโตช้า โอกาสป่วยเพิ่มขึ้น
น้อยกว่า 2	กุ้งจะลอย กุ้งตัวที่อ่อนแอจะลอกคราบแล้วตาย
น้อยกว่า 1	กุ้งจะตาย

ที่มา อุตสาหกรรมกุ้งไทย, 2551

— *ค่าอัลคาไลน์ในน้ำหรืออัลคาไลนิตี (Alkalinity)*

ค่าอัลคาไลน์ในน้ำเป็นปัจจัยอย่างหนึ่งที่มีความสำคัญต่อคุณภาพน้ำสำหรับการเลี้ยงกุ้ง โดยมีความสัมพันธ์อย่างมากกับค่าพีเอชซึ่งค่าอัลคาไลน์จะเป็นตัวรักษาระดับพีเอชน้ำในบ่อให้คงที่หรือมีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดและช่วยรักษาสีน้ำ

ค่าอัลคาไลน์ในน้ำที่เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำคือ 100-120 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำที่มีค่าอัลคาไลน์ต่ำ ส่วนมากจะพบในบริเวณที่ดินเป็นกรดจัด ส่งผลให้ลูกกุ้งระยะที่เพิ่งปล่อยลงในบ่อ จะลอกคราบไม่ออกในลักษณะคราบติดหัวและตายทำให้มีอัตราการรอดต่ำ แก้ไขโดยการใช้วัสดุปูนในกลุ่มคาร์บอเนต บางพื้นที่ที่มีค่าอัลคาไลน์ในน้ำสูงมากกว่า 180,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดจากดินบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้งมีสภาพเป็นด่างมากหรือมีน้ำจืดไหลผ่านแหล่งที่มีหินปูน แก้ไขโดยการใช้โซเดียมไบคาร์บอเนตหรือโซเดียมคาร์บอเนตแล้วแต่ระดับพีเอชของน้ำ (ชะลอ ลิ้มสุวรรณ, 2543)

ในพื้นที่เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำเค็มต่ำหลายแห่งพบว่าถ้าค่าอัลคาไลน์สูงมาก และพีเอชของน้ำในตอนเช้าเกิน 8.3 และตอนบ่ายจะสูงมากขึ้นอีก กุ้งจะไม่ลอกคราบ กุ้งจะเป็นตะกรันตามเปลือกและเจริญเติบโตช้ามา แต่ถ้าพีเอชของน้ำตอนเช้าไม่เกิน 8.0 กุ้งสามารถเจริญเติบโตได้ต่ำกว่าปกติเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

— *แอมโมเนีย*

แอมโมเนียในบ่อเลี้ยงกุ้งนั้นมีอยู่ทั้งในรูปของแอมโมเนีย (NH_3) และในรูปของแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) โดยปรกติแล้วแอมโมเนียไอออนนั้นไม่เป็นพิษ เพราะไม่สามารถจะ

ซึมผ่านผนังเซลล์ได้ แอมโมเนียในน้ำจะมีมากน้อยแค่ไหนขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและพีเอช ถ้าพีเอชของน้ำสูงขึ้น แอมโมเนียจะมีปริมาณมาก

แอมโมเนียที่ขับออกมาจากกุ้งจะมีปริมาณมากน้อยแค่ไหนขึ้นอยู่กับขนาดของกุ้ง กุ้งขนาดเล็กจะขับแอมโมเนียออกมาในปริมาณที่สูงกว่ากุ้งขนาดใหญ่ เช่น กุ้งที่มีขนาดต่ำกว่า 5 กรัมลงมาจะขับแอมโมเนียออกมาประมาณวันละ 1 มิลลิกรัม แต่ถ้ากุ้งมีขนาดใหญ่กว่า 10-20 กรัม จะขับแอมโมเนียออกประมาณวันละ 0.5 มิลลิกรัม ปริมาณของแอมโมเนียในบ่อกุ้งไม่ควรสูงกว่า 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าในน้ำหนึ่งลิตรมีแอมโมเนีย 0.45 มิลลิกรัม อัตรากรเจริญเติบโตของกุ้งจะลดลงประมาณร้อยละ 50 (ดังแสดงในตารางที่ 2.8)

ตารางที่2.8 ปริมาณแอมโมเนียอิสระและผลกระทบต่อกุ้งทะเล

ปริมาณแอมโมเนียอิสระ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	**ผลกระทบต่อกุ้งทะเล**
น้อยกว่า 0.1	ปลอดภัยต่อการเลี้ยง
ระหว่าง 0.1-0.4	กุ้งโตช้า
มากกว่า 0.4	กุ้งโตช้า กินอาหารน้อยลง เครียดหรือตาย

ที่มา: อุตสาหกรรมกุ้งไทย, 2551

– *ไนไตรต์*

ไนไตรต์เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่มีความเป็นพิษต่อกุ้งน้อยกว่าแอมโมเนีย ความเป็น พิษของไนไตรต์ขึ้นกับระดับของความเค็ม ในน้ำจืดไนไตรต์จะมีระดับความเป็นพิษสูงกว่าในน้ำ เค็ม ระดับของไนไตรต์ที่ปลอดภัยต่อกุ้งที่ทดลองในห้องปฏิบัติการอยู่ที่ระดับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับที่สูงมากและไม่ค่อยพบในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล

ความเป็นพิษของไนไตรต์ต่อสัตว์น้ำเกิดจากการที่ไนไตรต์ไปออกซิไดซ์เหล็ก ซึ่งเป็นองค์ประกอบของฮีโมโกลบิน ทำให้ไม่สามารถขนถ่ายออกซิเจนได้ ทำให้เกิดการตายเนื่องจากการขาดออกซิเจน ในสัตว์ประเภทพวกกุ้งและปูมีเลือดสีน้ำเงินมีฮีโมไซยานิน ไนไตรต์จะเข้าจับกับเม็ดเลือดได้น้อยกว่า ไนไตรต์จึงมีความเป็นพิษต่อกุ้งน้อยลง ระดับความเป็นพิษของไนไตรต์จะเพิ่มขึ้นเมื่อค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ และค่าพีเอชน้ำลดลง นอกจากนี้ความเป็นพิษของไนไตรต์จะถูกยับยั้งโดยคลอไรด์ในน้ำ ดังนั้นในน้ำทะเลซึ่งมีคลอไรด์สูงความเป็นพิษของไนไตรต์ต่อสัตว์น้ำจึงค่อนข้างต่ำ เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งที่ใช้น้ำทะเลโดยตรงนั้นปัญหาของความเป็นพิษของไนไตรต์ต่อกุ้งจะน้อย แต่สำหรับเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำความเค็มต่ำซึ่งมีปริมาณของคลอไรด์ในน้ำน้อย

ปัญหาความเป็นพิษของไนไตรต์ในบ่อกุ้งจึงเกิดได้ง่ายกว่า การเติมเกลือลงในน้ำที่มีความเค็มต่ำจึงมีความจำเป็นอย่างมากหากพบว่าค่าไนไตรต์ในบ่อสูง

– *ไฮโดรเจนซัลไฟด์*

ก๊าซนี้เป็นพิษต่อกุ้ง และมักเกิดตามพื้นนาหรือในบ่อหลังจากที่เก็บกักน้ำไว้นานๆ กุ้งจะตายทันทีถ้าน้ำนั้นมีไฮโดรเจนซัลไฟด์ประมาณ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่2.9 สรุปคุณภาพน้ำที่เหมาะกับการเลี้ยงกุ้ง

พารามิเตอร์	**ค่าที่เหมาะกับการเลี้ยงกุ้ง**
อุณหภูมิ	22-29 องศาเซลเซียส
ความเค็ม	15,000-20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร
พีเอช	7.5-8.5
ออกซิเจนที่ละลายน้ำ	มากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร
อัลคาไลนิตี	100-120 มิลลิกรัมต่อลิตร
แอมโมเนีย	น้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
ไฮโดรเจนซัลไฟด์	น้อยกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.3.1.3 ตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้ง (พุทธ และคณะ, 2544)

ตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้ง หมายถึง สารที่เจือปนอยู่ในน้ำ อาจมีทั้งชนิดที่ละลายน้ำได้และไม่ละลายน้ำ ตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งประกอบด้วยดิน ซากแพลงตอนพืช ซากแพลงตอนสัตว์ เศษอาหารกุ้ง แอมโมเนีย ไนไตรต์และไนเตรต ตะกอนเหล่านี้เกิดจากอาหารกุ้งที่ผู้เลี้ยงให้กิน ในแต่ละวันจะเหลือตกค้างและสะสมในบ่อเลี้ยงกุ้งและการกัดเซาะของคันดิน

– ประเภทของตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้ง

ตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งประกอบโดยตะกอนชนิดที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ ตะกอนที่ละลายน้ำ เช่น ตะกอนเกลือ (NaCl) แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ตะกอนที่ละลายน้ำได้แก่ดิน ซากแพลงตอนพืช ซากแพลงตอนสัตว์ เศษอาหารกุ้ง

– ผลกระทบของตะกอนต่อสุขภาพกุ้ง

บ่อกุ้งที่มีตะกอนมากจนเกินไป จะส่งผลเสียต่อสุขภาพกุ้งทำให้กุ้งไม่เจริญเติบโต และอาจตายในที่สุด ผลของตะกอนจะส่งผลต่อกุ้งในด้านต่างๆ พอสรุปได้ดังตารางที่2.10

ตารางที่ 2.10 ตารางสรุปผลกระทบของตะกอนต่อสุขภาพกุ้ง

อวัยวะ	ผลกระทบ
เหงือกกุ้ง	ตะกอนเข้าเหงือกมากจะทำให้เกิดอาการระคายเคือง เหงือกอักเสบ
เหงือก	กุ้งแลกเปลี่ยนแก๊สออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ได้น้อยลง ส่งผลให้กุ้งโตช้า
กระบวนการเมตาบอลิซึม	น้อย การสันดาปพลังงานทำได้ไม่ดีส่งผลให้กุ้งได้รับสารอาหารไม่เพียงพอทำให้กุ้งไม่โต เปลือกนิ่ม ตัวหลวมในที่สุด
การแลกเปลี่ยนอิออนต่างๆ ระหว่างเหงือกกุ้งกับสิ่งแวดล้อม	เหงือกกุ้งมีตะกอนมากเหงือกจะไม่สามารถนำแร่ธาตุไปใช้ได้ ทำกุ้งมีการเจริญเติบโตช้า แคระ เปลือกบางนิ่ม

2.3.2 สารประกอบไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงกุ้ง

2.3.2.1 การสะสมไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงกุ้ง

ไนโตรเจนเกือบทั้งหมด 97% ที่เข้าสู่บ่อเลี้ยงกุ้ง มาจากอาหารที่ให้กุ้งกิน โดยกุ้งสามารถสะสมไนโตรเจนไว้ในเนื้อกุ้งได้ ประมาณ 21.8% ไนโตรเจนอีกประมาณ เกือบ 80% นั้นจะตกค้างอยู่ในบ่อในรูปของเศษอาหารและขี้กุ้งที่บริเวณก้นบ่อประมาณ 70% และในรูปของสิ่งขับถ่ายที่ละลายน้ำได้ เช่น อินทรีย์ไนโตรเจน แอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรตประมาณ 9% ภายในเวลา 3-4 วัน ไนโตรเจนที่สะสมอยู่ในบ่อมีการเปลี่ยนแปลงจากรูปที่สามารถเป็นอาหารของแบคทีเรียและสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก (อินทรีย์ไนโตรเจน) ให้อยู่ในรูปของสารประกอบที่เป็นพิษกับกุ้ง (แอมโมเนีย และไนไตรต์) หมุนเวียนไปมาในระบบนิเวศของบ่อเลี้ยงกุ้ง บางส่วนจะถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซไนโตรเจนและจะออกจากบ่อเลี้ยงกุ้งไป (พุทธ ส่องแสงจินดา, 2551)

2.3.2.2 การเกิดปฏิกริยาของสารประกอบไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงกุ้ง

– กระบวนการแอมโมนิฟิเคชันในบ่อเลี้ยงกุ้ง

เมื่อให้อาหารกุ้งในบ่อเลี้ยงกุ้งและน้ำในบ่อมีออกซิเจนละลายน้ำอย่างพอเพียง (มากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร) กุ้งจะสามารถสร้างพลังงานเพื่อการดำรงชีวิตโดยการเผาผลาญโปรตีนทำให้เกิดแอมโมเนีย ซึ่งกุ้งจะขับออกมานอกร่างกาย แบคทีเรียทั้งที่อยู่ในน้ำและในตะกอนดินในบ่อเลี้ยงกุ้งก็จะใช้สารอินทรีย์ในเศษอาหารกุ้ง ขี้กุ้งและซากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เพื่อดำรงชีวิตและปล่อยแอมโมเนียออกมาในน้ำ ส่งผลให้คุณภาพน้ำเปลี่ยนแปลงไป คือ สารอินทรีย์ในน้ำจะลดลง น้ำจะมีคาร์บอนไดออกไซด์มากขึ้นทำให้ พีเอชต่ำลง ในขณะที่ออกซิเจนในน้ำจะถูกแบคทีเรียและกุ้งใช้ทำให้ออกซิเจนที่เหลืออยู่ไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง และมีสิ่งขับถ่ายในรูปของแอมโมเนียมากขึ้น ซึ่งแอมโมเนียจะเป็นพิษกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ยกเว้นแพลงตอนพืชและแบคทีเรียที่ใช้แอมโมเนียเป็นอาหาร (พุทธ ส่องแสงจินดา, 2551)

– กระบวน*ไนตริฟิเคชันในบ่อเลี้ยงกุ้ง*

แอมโมเนียที่มาจากกระบวนการแอมโมนิฟิเคชันและแอมโมเนียที่เกิดจากการขับถ่ายและในกรณีของบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งประเภทบ่อดินจะมีแอมโมเนียที่ปล่อยออกมาจากตะกอนดินพื้นบ่อแล้วรวมอยู่ด้วย (มะลิวัลย์ คุตะโคและคณะ, 2550)

แอมโมเนียเหล่านี้จะเป็นจะถูกใช้โดยแบคทีเรียในกลุ่มไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Nitrifying Bacteria) เช่นไนโตรโซโมแนส (*Nitrosomonas spp.*) และไนโตรแบคเตอร์ (*Nitrobactor spp.)* โดยใช้แอมโมเนียเป็นอาหารและเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนไตรต์และไนเตรต ซึ่งกระบวนการนี้เรียกว่าไนตริฟิเคชัน (Nitrification) แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะไม่สามารถใช้แอมโมเนียเป็นอาหารได้เพียงอย่างเดียวในการเจริญเติบโตแบคทีเรียจำเป็นต้องมีแหล่งของคาร์บอน ส่วนใหญ่เป็นไบคาร์บอเนต ซึ่งเกษตรกรใส่ลงไปในบ่อเลี้ยงกุ้งในรูปของปูนคาร์บอเนตหรือปูนโดโลไมท์ และแบคทีเรียในกลุ่มนี้จำเป็นต้องดำรงชีวิตในสภาพของน้ำที่มีออกซิเจน เพื่อใช้ออกซิเจนในการเผาพลาญอาหารสร้างพลังงาน การขาดออกซิเจนหรือมีออกซิเจนไม่พอก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้แอมโมเนีย เปลี่ยนไปเป็นไนไตรต์ และไนเตรตไม่สมบูรณ์ความสัมพันธ์ของไนโตรเจนกับออกซิเจนและไบคาร์บอเนตในปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน (พุทธ ส่องแสงจินดา, 2551)

ผลจากการเกิดปฏิกริยาไนตริฟิเคชันในบ่อเลี้ยงกุ้งจะทำให้ปริมาณแอมโมเนียลดลง มีการใช้ออกซิเจนมากขึ้น น้ำจะมีออกซิเจนน้อยลง และเนื่องจากมีการดูดเอาไบคาร์บอเนตไปใช้และปล่อยคาร์บอนไดออกไซค์ ออกมาจะทำให้น้ำมีพีเอชที่ต่ำลง ในกรณีที่มีออกซิเจนหรือปริมาณแบคทีเรียไม่เพียงพอ จะทำให้การเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียไปเป็นไนเตร ต เกิดขึ้นอย่างไม่

สมบูรณ์ ในสภาพเช่นนี้ อาจจะทำให้เกิดการสะสมของไนไตรต์ในน้ำซึ่งเป็นพิษกับกุ้งได้ (พุทธ ส่องแสงจินดา, 2551)

– กระบวนการดีไนตริฟิเคชันในบ่อกุ้ง

ไนเตร ตที่เกิดจากการกระบวนการไนตริฟิเคชันจะตกลงไปสะสมปริมาณก้นบ่อ ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ได้รับอากาศทำให้ส่วนดังกล่าวกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน โดยแบคทีเรียประเภทดีไนตริไฟอิง (Denitrifying Bacteria) ผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการนี้ คือ ก๊าซไนโตรเจน ปล่อยออกมาจากดิน ซึ่งสามารถเห็นได้จากการที่มีฟองก๊าซลอยขึ้นมาในบ่อที่มีสารอินทรีย์เน่าเสียที่พื้นก้นบ่อเป็นปริมาณมาก ซึ่งแสดงถึงโอกาสที่พื้นก้นบ่อจะขาดออกซิเจนจนเป็นอันตรายต่อกุ้งได้ (พุทธ ส่องแสงจินดา, 2551)

2.3.2.3 ผลกระทบของไนโตรเจนต่อสิ่งแวดล้อม

<u>ผลกระทบของไนโตรเจนในสภาพน้ำ</u>

– ก่อให้เกิดกระบวนการยูโทรฟิเคชัน (Eutrophication) ซึ่งสารประกอบไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต แต่ในสภาวะแวดล้อมที่มีสารประกอบไนโตรเจนมากเกินจะก่อให้เกิดปรากฏการณ์การเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสิ่งมีชีวิตในน้ำและบางครั้งก่อให้เกิดผลกระทบต่อสภาวะแวดล้อม เช่น การเกิดปรากฏการณ์ Red Tide (การบลูมของแพลงตอนพืช) ซึ่งบางครั้งพบการเกิดสารพิษเพิ่มขึ้นจากการเกิดแพลงค์ตอนบลูม หรือการเจริญเติบโตของพืชน้ำไปรบกวนสภาพแวดล้อม

– ปริมาณออกซิเจนในแหล่งน้ำลดลง การเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียไปเป็นไนไตรต์และไนเตรตในแหล่งน้ำจำเป็นต้องใช้ออกซิเจนเพื่อให้เกิดปฏิกริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ดังนั้นแหล่งน้ำที่มีสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนหรือแอมโมเนียมาก เมื่อปล่อยน้ำเหล่านี้ลงสู่แหล่งน้ำแม่น้ำ ลำคลอง จะทำให้เกิดปัญหาหารลดลงของออกซิเจนละลายน้ำในแหล่งน้ำนั้น นอกจากนี้แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนตริฟิเคชัน ซึ่งจำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิตก็จะมีผลต่อการลดลงของออกซิเจนในน้ำ ทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ

– ความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ ทั้งไนไตรทและแอมโมเนีย เป็นสารพิษที่มีผลกระทบต่อการดำเนินชีวิตของสิ่งมีชีวิตในน้ำ เช่นแพลงตอน กุ้ง ปลา ซึ่งค่ามาตรฐานที่ยอมรับให้มีไนไตรตและแอมโมเนียในน้ำไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตรและ0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลกระทบของไนโตรเจนในสภาพพื้นดิน

– แอมโมเนียมีผลต่อกระบวนการเกิดดินกรด มีการประมาณแอมโมเนียร้อยละ 75 จะกลับคืนสู่ดิน ซึ่งเกิดจากกระบวนการไนตริฟิเคชันและการจับกลุ่มของซัลเฟอร์ในดินซึ่งเป็นสารประกอบ Ammonium sulphide นี้จะจับกันแน่นและละลายน้ำง่าย ทำให้โอกาสที่กรดจากซัลเฟอร์ละลายออกมาได้สูงทำให้ดินมีสภาวะเป็นกรดเกิดขึ้น

– ในทางการเกษตร การเติมปุ๋ยพวกแอมโมเนียหรือไนเตรทที่เกินขนาด พบว่ามีการแย่งและยับยั้งการดูดซึมของธาตุอาหารอื่นของพืช เช่น ธาตุอาหารกลุ่มโปแทสเซียม แมกนีเซียม และโครเมียม ทำให้พืชมีโอกาสขาดธาตุอาหารเหล่านี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สิริ ทุกข์วินาศ และ ชนินทร์ แสงรุ่งเรือง (2541) ศึกษาการบำบัดและปรับปรุงคุณภาพน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาระบบปิดด้วยตัวกรองชีวภาพโดยใช้แบคทีเรียระบบเติมอากาศและไม่เติมอากาศ ผลการทดลองพบว่าสามารถลดสารอินทรีย์ในรูปของแอมโมเนียและค่าบีโอดีลดลงให้อยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำได้ภายในระยะเวลา 7 ชั่วโมง โดยมีค่าบีโอดี ปริมาณไนโตรเจนรวม คลอโรฟิลล์เอ ตะกอน และปริมาณแบคทีเรียรวมลดลง 24.8-84.8% ซึ่งระบบย่อยสลายโดยใช้ออกซิเจนสามารถดำเนินได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สุธาสินี อ่วมจันทร์ (2546) ศึกษาองค์ประกอบชนิดของแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันและถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน (NR และ DNR) สำหรับใช้ในระบบเพาะเลี้ยงในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งดำเนินการทดลองด้วยถังปฏิกรณ์สองถังที่เหมือนกัน โดยจัดให้ถัง NR มีการพ่นอากาศอยู่ตลอดเวลาเพื่อให้เหมาะสมกับการเกิดปฏิกริยาไนตริฟิเคชัน ส่วนถัง DNR ควบคุมให้ภายในถังมีสภาวะไร้อากาศซึ่งจะเหมาะสมกับการเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียกลุ่มเด่นที่พบในทั้ง 2 ถังได้แก่ *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*(CFB) group bacterium กลุ่มเด่นที่พบในถังปฏิกรณ์ไนตริฟิเคชันได้แก่ *Alpha-proteobacterium*, CFB group bacterium และ *Methylobacterium sp.* ส่วนแบคทีเรียชนิดเด่นในถังปฏิกรณ์ดีไนตริฟิเคชัน ได้แก่ *Bacteroidetes bacterium(CFB) group bacterium, Pseudomonas sp.* หรือ *Uncultured Colwellia sp*. และ *Desulfobullbus sp.*

ปริยา นุพาสันต์ (2548) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสังคมแบคทีเรียและคุณลักษณะดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้ง โดยมีการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของดินตะกอน การศึกษาสังคมแบคทีเรียโดยวิธีเลี้ยงเชื้อและ 16S rDNA PCR-DGGE และจำแนกชนิดของแบคทีเรียของแบคทีเรียโดยเปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นส่วน 16S rDNA กับฐานข้อมูล พบว่าในระหว่างการเลี้ยงกุ้งจะพบสารอินทรีย์ในตะกอนดิน อย่างชัดเจน ในขณะที่ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นลงตลอดเวลา พบว่าปริมาณของแอมโมเนียและไนไตรท์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงกุ้ง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับจำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น ผลการติดตามการเปลี่ยนแปลงของประชากรแบคทีเรียในตะกอนดินพบว่าเมื่อศึกษาโดยการนับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าแบคทีเรียมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยง ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาด้วย DGGEและจากการโคลน 16S rDNA ของกลุ่มแบคทีเรียที่พบเด่นชัดบนเจลพบว่าเป็นกลุ่ม Psudomonas, Serradia, Vibrio นอกจากนี้ยังพบ

แบคทีเรียที่พบเป็นชนิดเด่นจากการศึกษาด้วยเทคนิค DGGE เป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้

มะลิวัลย์ คุตะโค และคณะ (2550) ศึกษาประสิทธิภาพของตัวกรองชีวภาพไนตริฟิเคชันในการบำบัดแอมโมเนียในถังเลี้ยงกุ้งระบบไร้ดินกลางแจ้ง โดยการทดลองแรกเป็นเป็นการศึกษาผลของตัวกรองชีวภาพต่อการบำบัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยมีการเตรียมตัวกรอง (ไบโอโพลิมา)มาปรับสภาพโดยการนำไปแช่ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อาหารกุ้งลงไปเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่ามีการสะสมแอมโมเนียและไนไตรต์ในชุดถังควบคุมที่ไม่มีตัวกรอง ในขณะที่ถังชุดที่มีตัวกรองสามารถบำบัดแอมโมเนียและไนไตรต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพทั้งในสภาพมืดและสว่าง การทดลองที่ 2 ทำเช่นเดียวกับแบบแรกแต่ให้อาหารกุ้งทุกสามวันเพื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนเข้าสู่ระบบ พบว่าตัวกรองชีวภาพไนตริฟิเคชันสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันที่ไม่สมบูรณ์ได้ โดยเฉพาะในชุดทดลองกลางแจ้งที่มีการพรางแสง และผลการทดลองยังแสดงให้เห็นบทบาทร่วมกันของแพลงตอนพืชและตัวกรองชีวภาพ ไนตริฟิเคชันที่เปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นมวลชีวภาพและไปเป็นไนเตร ต การทดลองส่วนสุดท้ายเป็นการประเมินบทบาทของตัวกรองชีวภาพในถังเลี้ยงกุ้งกุลาดำกลางแจ้ง เปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลองที่มีตัวกรองชีวภาพ ผลการศึกษาพบว่ามีการสะสมแอมโมเนียและไนไตรต์ในถังชุดควบคุม นอกจากนี้ยังพบการบลูมของแพลงตอนพืชในถังชุดควบคุมซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่ลดปริมาณแอมโมเนียในน้ำ ในขณะที่ตัวกรองชีวภาพในถังชุดทดลองสามารถเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนเตรทได้อย่างรวดเร็วโดยกระบวนการไนตริฟิเคชัน ดังนั้นการบำบัดแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจึงเกิดจากกระบวนการไนตริฟิเคชันเป็นหลักและเกิดจากการบำบัดโดยแพลงค์ตอนพืชเพียงเล็กน้อย ส่งผลให้ถังชุดทดลองดีกว่าถังชุดควบคุม ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการใช้ตัวกรองชีวภาพไนตริฟิเคชันเพื่อการบำบัดแอมโมเนียในบ่อไร้ดินกลางแจ้งเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Itoi และคณะ (2007) ศึกษาการกระจายของกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิงไดซิงแบคทีเรียบนวัสดุกรองในบ่อเลี้ยงปลาทอง *Carassius auratus* ซึ่งมีการหมุนเวียนน้ำ พบว่าความหนาแน่นของแบคทีเรียที่เกาะด้านนอกวัสดุกรองมีค่ามากกว่าด้านในวัสดุตัวกรอง เมื่อทำการศึกษาโดยใช้เทคนิคในระดับโมเลกุลเพื่อศึกษาประเภทของแบคทีเรีย โดยเก็บตัวอย่างจากด้านนอกของวัสดุตัวกรองในวันที่ 8, 15, 22และ64 พบแบคทีเรียกลุ่ม Acidibacteria, Actinobacteria, Bacilli, Bacteroidetes, Flavobacteria, Nitrospira กลุ่มของแบคทีเรียที่พบจากการเก็บตัวอย่างจากด้านใน

ของวัสดุตัวกรองเป็นแบคทีเรียเช่นเดียวกับกลุ่มแบคทีเรียที่เก็บตัวอย่างจากด้านใน ยกเว้น *Nitrospira* ที่พบเฉพาะด้านนอกของวัสดุตัวกรอง

Jie และDaping (2008) ศึกษาการกำจัดไนไตรต์และสังคมของไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียเมื่อได้รับสารอินทรีย์ โดยใช้โซเดียมอะซิเตทเป็นตัวแทนของสารอินทรีย์ มีปริมาณเริ่มต้นคือ 0.5, 1, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผลการศึกษาพบว่าปริมาณโซเดียมอะซิเตทต่ำจะทำให้อัตราการกำจัดไนตรต์สูงที่สุด การเปลี่ยนแปลงของสังคมแบคทีเรียพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงจากไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียเป็ยแบคทีเรียกลุ่มดีไนตริไฟอิงแบคทีเรีย โดยเฉพาะ *Pseudomonas stutze*

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
แผนการทดลองและการดำเนินการวิจัย

3.1 การดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนที่ 1 เป็นการศึกษากลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย (NOB)ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งและศึกษาผลกระทบของปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย (NOB) ระบบบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งที่ทำการศึกษาแบ่งออกเป็น 4 ระบบ ได้แก่ระบบบ่อดินกลางแจ้ง ระบบบ่อไร้ดินกลางแจ้ง ระบบบ่อในโรงเรือน และระบบบำบัดคุณภาพน้ำในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ โดยแต่ละระบบการเพาะเลี้ยงมีค่าความเค็มและความหนาแน่นของกุ้งแตกต่างกัน การทดลองในส่วนที่ 2 เป็นการศึกษาผลกระทบของประเภทของสารประกอบไนโตรเจนต่ออัตราการ กำจัดไนไตรต์และ กลุ่มประชากรและจำนวนประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการตรึง ก่อนและหลัง การกำจัดไนไตรต์ โดยตรึงตัวกรองจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งในโรงเรือน (รายละเอียดของงานวิจัยแสดงในรูปที่ 3.1)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.1 แผนผังงานวิจัย

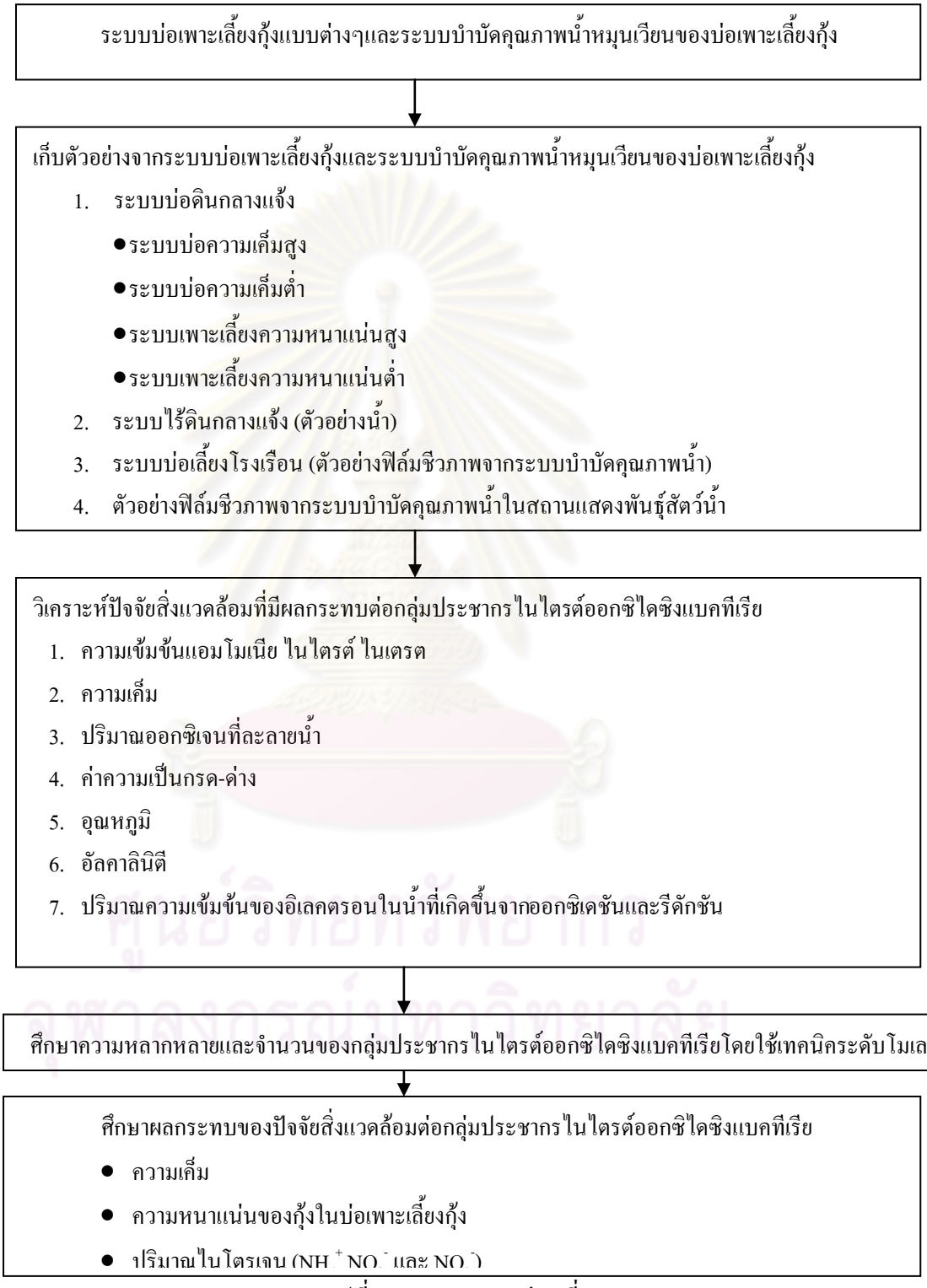
<u>การทดลองส่วนที่ 1</u> เป็นการศึกษากลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียจากระบบบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งที่มีค่าความเค็มและความหนาแน่นของกุ้งแตกต่างกัน และ ศึกษาปัจจัยแวดล้อมที่ผลต่อ กลุ่มประชากร ประชากรดังกล่าว โดยเก็บตัวอย่างจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งที่มีระบบการเลี้ยงต่างกัน 3 ระบบและระบบบำบัดคุณภาพน้ำ 1 ระบบ ได้แก่ ระบบบ่อดินกลางแจ้ง ระบบบ่อไร้ดินกลางแจ้ง ระบบบ่อโรงเรือนและระบบบำบัดคุณภาพน้ำในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ ซึ่งแต่ละระบบเพาะเลี้ยงกุ้งมีความหนาแน่นของกุ้งและความเค็มของน้ำในระบบต่างกัน

ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่ผลต่อกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่ทำการวิเคราะห์ ได้แก่ ความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนไตรต์ ไนเตรต ความเค็ม ออกซิเจนละลายน้ำ ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ อัลคาลินิตี และปริมาณความเข้มข้นของอิเลคตรอนในน้ำที่เกิดขึ้นจากออกซิเดชันและรีดักชัน (รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงในหัวข้อที่ 3.2.1)

การศึกษากลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียทำโดยใช้เทคนิคระดับโมเลกุล (PCR- Cloning-Sequencing) ในงานวิจัยนี้จะมีการเลือกไพร์เมอร์โดยใช้โปรแกรม ARB program package เพื่อให้ครอบคลุมกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย (รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์และรายละเอียดไพร์เมอร์ที่ทำการเลือกแล้ว แสดงในหัวข้อ 3.2.2)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

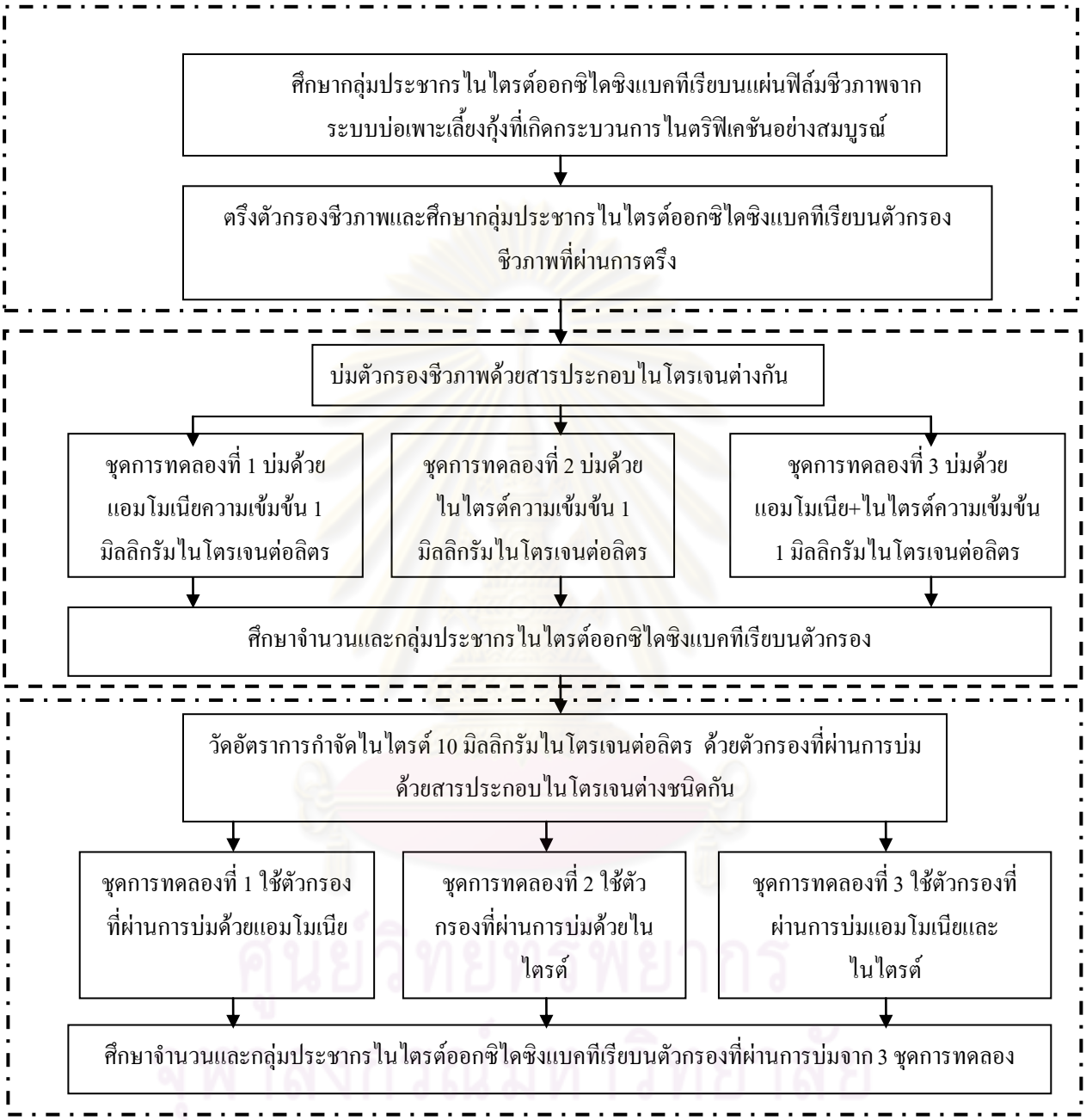
แผนผังการทดลองส่วนที่ 1



รูปที่ 3.2 การทดลองส่วนที่ 1

<u>การทดลองส่วนที่2</u> การทดลองในส่วนที่ 2 เป็นการศึกษาผลกระทบของประเภทของสารประกอบไนโตรเจนต่ออัตราการ กำจัดไนไตรต์และศึกษา กลุ่มประชากรและจำนวน ประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการตรึงแล้วหลังจากผ่านการ กำจัดไนไตรต์ โดยตรึงตัวกรองจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งที่มี กระบวนไนตริฟิเคชันสมบูรณ์ ในระดับห้องปฏิบัติการ การทดลองส่วนนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย ได้แก่การทดลองย่อยที่ 1 เป็นการตรึงตัวกรองชีวภาพและศึกษากลุ่มประชากรและจำนวนประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งที่มีกระบวนไนตริฟิเคชันสมบูรณ์ ในระดับห้องปฏิบัติการ การทดลองย่อยที่ 2 เป็นการศึกษาผลกระทบของประเภทของ สารประกอบไนโตรเจนต่ออัตราการ กำจัดไนไตรต์และศึกษากลุ่มประชากร และจำนวนประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการตรึงแล้วหลังจากผ่านการกำจัดไนไตรต์ (รายละเอียดดังแสดงในรูปที่ 3.3)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.3 การทดลองส่วนที่ 2

การทดลองย่อย ส่วนที่ 1 ศึกษากลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรองที่ผ่านการตรึงแล้ว โดยเลือกหัวเชื้อจากระบบบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งในโรงเรือน

การเตรียมตัวกรองชีวภาพ

1. ทำการตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นบนตัวกลาง โดย แช่ตัวกลางพลาสติกรุ่น BCN - 009 ที่ระดับความลึกประมาณ 10 เซนติเมตร จากผิวน้ำเป็นเวลา 2 เดือน จากระบบบ่อเลี้ยงกุ้งในโรงเรือนของศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นตัวแทนของหัวเชื้อจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งในโรงเรือน ที่มีการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชัน (มนวิกานต์ ขจรบุญ, 2552) จำนวน 1000 ชิ้น

2. ศึกษากลุ่มประชากรและจำนวนไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการตรึงแล้ว โดยการสุ่มตัวกรอง ทดสอบโดยวิธี PCR-Cloning-Sequencing (รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงในหัวข้อที่ 3.2.2)

การทดลองย่อยส่วนที่ 2 การศึกษาผลกระทบของประเภทของสารประกอบไนโตรเจนต่ออัตราการ กำจัดไนไตรต์และศึกษา จำนวนและ กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการตรึงบ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนต่างชนิดและ หลังจากผ่านการ กำจัดไนไตรต์ แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ช่วง

ช่วงที่ 1 การบ่มตัวกรองด้วยสารประกอบไนโตรเจนที่ต่างกัน

นำตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการตรึงมาบ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนที่ต่างกัน โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ชุดการทดลองที่ 2 เติมโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และชุดการทดลองที่ 3 เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในถังปฏิกรณ์ที่บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 30 พีพีที ควบคุมออกซิเจนในแต่ละถัง ให้มากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และควบคุมค่าอัลคาไลนิตีให้มีค่าระหว่าง 100-120 มิลลิกรัมแคลเซียมคาร์บอเนตต่อลิตร ซึ่งแต่ละถังปฏิกรณ์บรรจุตัวกรองที่ผ่านการตรึงแล้วถังละ 300 ชิ้น ทำการทดลองจนกระทั่งปริมาณไนไตรต์ในแต่ละชุดการทดลองลดลงเหลือต่ำกว่า 0.1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร หลังจากนั้นสุ่มนำตัวกรองมาจากแต่ละชุด

การทดลองเพื่อศึกษาจำนวนและกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการตรึงบ่มแล้ว ทดสอบโดยวิธี PCR-Cloning-Sequencing และ real-time PCR ตามลำดับ

<u>ช่วงที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพหัวเชื้อไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่ตรึงอยู่บนตัวกรองชีวภาพในการกำจัดไนไตรต์</u>

นำตัวกรองที่ผ่านการบ่มจากทั้ง 3 ชุดการทดลอง (จากการทดลองย่อยส่วนที่ 2 ช่วงที่ 1) มาทดสอบการกำจัดไนไตรต์ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 ใช้ตัวกรองจากชุดการทดลองที่ 1 (ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์) ชุดการทดลองที่ 2 ใช้ตัวกรองจากชุดการทดลองที่ 2 (ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยโซเดียมไนไตรต์) และชุดการทดลองที่ 3 ใช้ตัวกรองจากชุดการทดลองที่ 3 (ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์และโซเดียมไนไตรต์) โดยให้ความเข้มข้นไนไตรต์เริ่มต้นที่ 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในถังปฏิกรณ์ที่บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 30 พีพีที ควบคุมออกซิเจนในแต่ละถัง ให้ได้ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และความควบคุมค่าอัลคาไลนิตีให้มีค่าระหว่าง 100-120 120 มิลลิกรัมแคลเซียมคาร์บอเนตต่อลิตร ซึ่งแต่ละถังปฏิกรณ์บรรจุตัวกรองที่ผ่านการบ่มแล้วถังละ 300 ชิ้น ทดลองจนกระทั่งปริมาณไนไตรต์ในแต่ละชุดการทดลองลดลงเหลือต่ำ 0.1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร หลังจากนั้นสุ่มนำตัวกรองมาจากแต่ละชุดการทดลองเพื่อศึกษาจำนวนและกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการตรึงบ่มแล้ว ทดสอบโดยวิธี PCR-Cloning-Sequencing และ real-time PCR ตามลำดับ

3.2 วิธีการวิเคราะห์

3.2.1 ปัจจัยสิ่งแวดล้อม

3.2.1.1 การเตรียมตัวอย่างก่อนการวัด

การเตรียมตัวอย่างตัวอย่างดินและน้ำสำหรับการวัดความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนไตรต์ ไนเตรต ทำโดยการตัวอย่างดินไปสกัดด้วยโพแทสคลอไรด์ (KCl) ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า (shaker) นาน 30 นาที กรองน้ำสกัดด้วยกระดาษกรอง GF/C ขนาด 25 มิลลิเมตร เก็บน้ำไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป การเตรียมตัวอย่างน้ำกรองตัวอย่างน้ำด้วยกระดาษ GF/C ขนาด 25 มมเก็บน้ำไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นต่อไป ดังแสดงในตารางสรุปตารางที่ 3.1

3.2.1.2 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแอมโมเนีย

ใช้ตัวอย่างที่ผ่านการสกัด (จากข้อ 3.2.1.1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล 40 ไมโครลิตร ตามด้วย Sodium nitroprussude 40 ไมโครลิตร และสาร Oxidizing reagent 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ ทำการหมุนเหวี่ยงเพื่อให้สารผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 60 นาที แล้วนำมาวัดด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร (Strickland และ คณะ, 1972)

3.2.1.3 วิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนไตรต์

ใช้ตัวอย่างที่ผ่านการสกัด (จากข้อ 3.2.1.1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย sulfanilamide 20 ไมโครลิตร ตามด้วยสารละลาย NNED 20 ไมโครเมตร ทำการหมุนเหวี่ยงให้สารผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสีนาน 30 นาที แล้วนำมาวัดด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร (Strickland และ คณะ, 1972)

3.2.1.4 วิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนเตรต

นำตัวอย่างที่ผ่านการสกัด (จากข้อ 3.2.1.1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายไฮโดรคลอลิค 1 นอร์มัล เพื่อกำจัดสารรบกวนพวกไฮดรอกไซด์ หรือเติมคาร์บอเนตที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 1000 มิลลิกรัมต่อลิตรแคลเซียมคาร์บอเนตต่อลิตร วัดด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร และ 275 นาโนเมตร

3.2.1.5 วิธีการวัดความเค็ม

ใช้ hand refractometer salinity tester (The RHS series) โดยทำการวัดตามคู่มือ

3.2.16 วิธีการวัดปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ

ใช้เครื่อง DO meter (Hanna instrument, Thailand) ในการวัดโดยนำ probe จุ่มในน้ำแล้วค่าออกมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.1.7 วิธีค่าความเป็นกรดด่าง (ในน้ำ)

ใช้เครื่องpH meter (Eutech pHTestr30, Singapore) ในการวัดโดยวัดในน้ำโดยนำ probe ไปจุ่มแล้วอ่านค่าออกมา

3.2.1.8 วิธีการวัดอุณหภูมิ

วัดโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์วัดอุณหภูมิ โดยการจุ่มลงในน้ำแล้ววัด

3.2.1.9 วิธีการวัดความเป็นด่าง (ในน้ำ)

ใช้ชุดทดสอบวัดค่าความเป็นด่างทั้งหมดสำหรับน้ำทะเลและน้ำจืด (AQUA-VBC, Thailและ) โดยทำการวัดตามคู่มือชุดทดสอบ

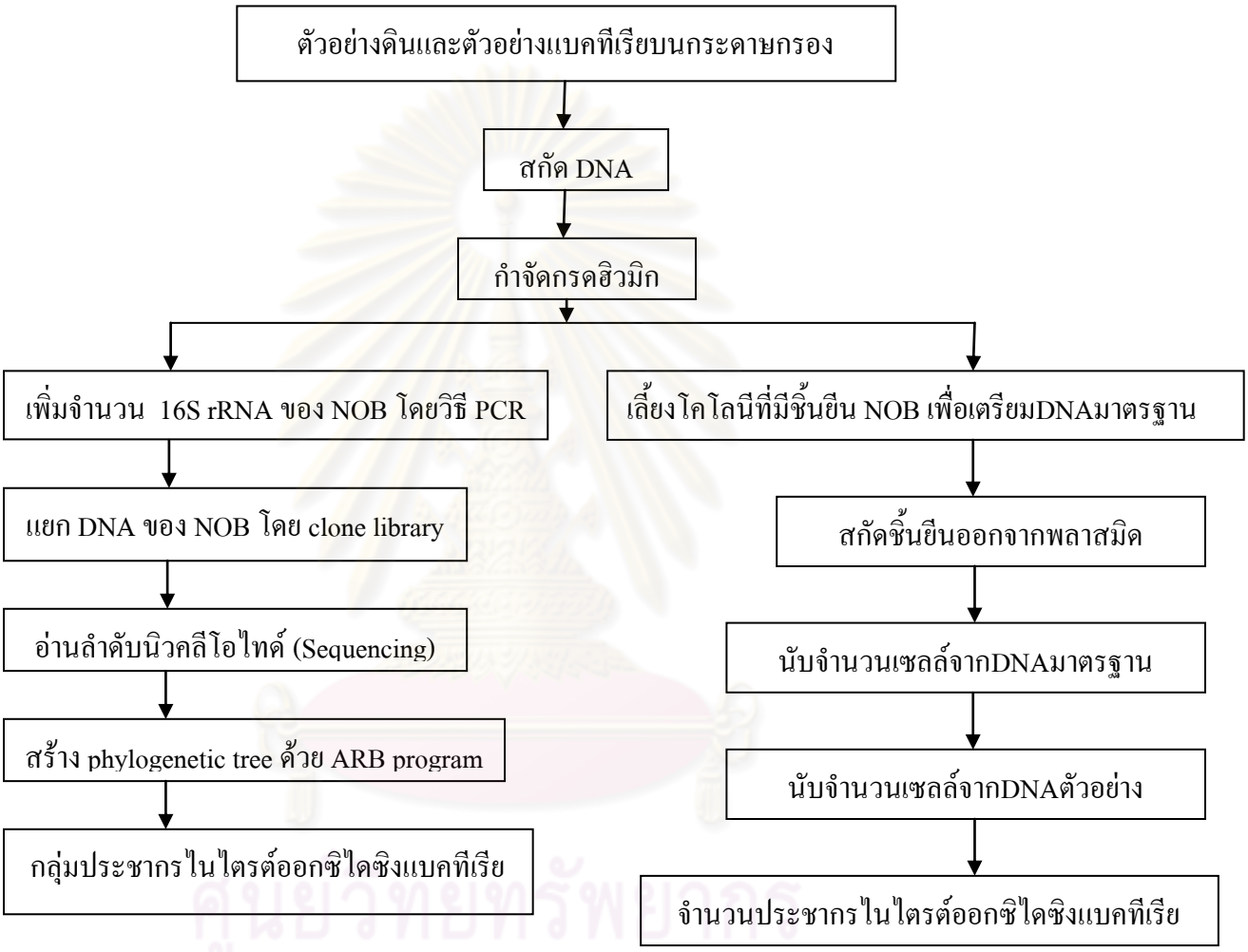
3.2.1.10 วิธีการวัดประสิทธิภาพในการออกซิเดชันรีดักชัน (วัดทั้งในดินและในน้ำ)

ใช้เครื่อง Oxidation-Reduction Potential meter (Hanna instrument, Thailและ) การวัดในน้ำทำโดยนำ probe จุ่มน้ำแล้วอ่านค่า การวัดในดินทำโดยนำ probe ปักลงดินแล้วอ่านค่า

ตารางที่ 3.1 สรุปวิธีวิเคราะห์ปัจจัยสิ่งแวดล้อม

ปัจจัยสิ่งแวดล้อม	วิธีการวิเคราะห์
ความเข้มข้นของแอมโมเนีย	Phenol method
ความเข้มข้นของไนไตรต์	Colorimetric method
ความเข้มข้นของไนเตรต	UV screening method
ความเค็ม	ใช้เครื่อง hและ refractometer salinity tester
ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ	ใช้เครื่อง DO meter (Hanna instrument, Thailและ)
ค่าความเป็นกรดด่าง	ใช้เครื่อง pH meter (Eutech pHTestr30, Singapore)
อุณหภูมิ	ใช้เทอร์โมมิเตอร์
ความเป็นด่าง	ชุดทดสอบวัดค่าความเป็นด่างทั้งหมดสำหรับน้ำทะเลและน้ำจืด (AQUA-VBC, Thailและ)
การวัดประสิทธิภาพในการออกซิเดชันรีดักชัน	เครื่อง Oxidation-Reduction Potential meter (Hanna instrument, Thailและ)

3.2.2 การศึกษา จำนวนและ กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย จากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งและ บนตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการ บ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนต่างชนิดและ หลังจากผ่านการบำบัดไนไตรต์ (ดังแสดงในรูปที่ 3.4) มีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้



รูปที่ 3.4 ขั้นตอนการศึกษากลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

<u>การเตรียมตัวอย่างดิน</u> ได้แก่ ตัวอย่างจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งระบบบ่อดินกลางแจ้ง ชั่งดิน 0.35 กรัม สกัดโดยใช้ Fast DNA SPIN Kit for Soil (QGiogene, Ohio, USA) ต่อจากนั้นนำ DNA ที่สกัดได้มากำจัดกรดฮิวมิกด้วย G-50 Mini Column (Geneaid, Taipei, Taiwan) แต่ละตัวอย่างทำการสกัด 2 ครั้งแล้วนำมาผสมรวมกันเพื่อลดความผิดพลาดจากการสกัด

<u>การเตรียมตัวอย่างน้ำและตัวอย่างจากตัวกรองชีวภาพ</u> ได้แก่

- ตัวอย่างน้ำจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งระบบไร้ดินกลางแจ้ง ระบบบ่อในโรงเรือน และระบบบำบัดคุณภาพน้ำในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ

กรองตัวอย่างน้ำด้วยกระดาษกรอง ขนาด 0.22 ไมครอน โดยใช้ปริมาณน้ำตัวอย่าง 250 มิลลิลิตรต่อกระดาษกรอง 1 แผ่น หลังจากนั้นนำกระดาษกรองไปสกัด DNA โดยใช้ Fast DNA SPIN Kit for Soil (QGiogene, Ohio, USA)

- ตัวกรองในระบบบ่อในโรงเรือน และ ตัวกรอง ชีวภาพ ที่ผ่านการตรึง บ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนต่างชนิดและหลังจากผ่านการบำบัดไนไตรต์

เขย่าตัวกรอง โดยใช้ความถี่สูง (sonicate) จากแต่ละตัวอย่าง ตัวอย่างจากตัวกรองในระบบโรงเรือน ใช้ตัวกรอง (เปลือกหอยนางรม) จำนวน 5 เปลือก และจากชุดการทดลอง ใช้ตัวกรองการทดลองละ 300 ตัวกรองในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร กรองตัวอย่างน้ำด้วยกระดาษกรอง ขนาด 45 ไมครอน โดยใช้ปริมาณน้ำน้ำตัวอย่าง 250 มิลลิลิตรต่อกระดาษกรอง 1 แผ่น หลังจากนั้นนำกระดาษกรองไปสกัด DNA โดยใช้ Fast DNA SPIN Kit for Soil (QGiogene, Ohio, USA)

3.2.2.2 การศึกษากลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย

การศึกษา ประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย ในตัวอย่างดิน ตัวอย่างน้ำและตัวอย่างตัวกรอง โดยเลือกใช้ไพร์เมอร์และโปรแกรมสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังแสดงในตารางที่ 3.1 โดยแต่ละ reaction มีปริมาตรทั้งหมด 12.5 ไมโครลิตร ประกอบด้วย H_2O 7.125 ไมโครลิตร 10X buffer 1.25 ไมโครลิตร ฟอร์เวิร์ด ไพร์เมอร์ (Forward primer) ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร รีเวิร์ดไพร์เมอร์ (Reverse primer) ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร

Taq DNA polymerase 0.125 ไมโครลิตร(Takara Bio Inc, Japan) และ DNA template 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ เพื่อเตรียมสำหรับการโคลนนิ่ง ด้วยชุด NucleoSpin® Extract II (MACHEREY-NAGEL, Düren , Germany) เพื่อกำจัด DNA fragment และ primer dimer ออก หลังจากนั้นทำการโคลนนิ่ง โดยเลือกใช้ pGEM-T Easy Vector System I kit (Promega, USA) และ XL1-Blue competent cells (Stratagene, USA) โดยสุ่ม 10 โคโลนี /1 ตัวอย่าง เพื่อทำการอ่านรหัสพันธุกรรม ซึ่งการอ่านรหัสพันธุกรรมจะส่งที่บริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลี ต่อจากนั้นจะนำรหัสพันธุกรรมที่อ่านได้มาสร้าง phylogenectic tree ด้วยโปรแกรม ARB

3.2.2.3 การศึกษาจำนวนประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย

การศึกษาจำนวนประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย เลือกศึกษายีน 16 rRNA และใช้วิธีการติดตามจำนวนแบคทีเรียโดยใช้สีเรืองแสงและเลือกใช้ไพร์เมอร์เช่นเดียวกับการศึกษาประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียและโปรแกรมสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (ดังแสดงในตารางที่ 3.2) ซึ่งในแต่ละ reaction มีปริมาตรทั้งหมด 12.5 ไมโครลิตร ประกอบด้วย H_2O 4.75 ไมโครลิตร realtime PCR master mix (Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix, Stratagene, USA) ปริมาตร 6.25 ไมโครลิตร ฟอร์เวิร์ด ไพร์เมอร์ (Forward primer) ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร รีเวิร์ดไพร์เมอร์ (Reverse primer) ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และDNA template 0.5 ไมโครลิตร

การสร้าง DNA มาตรฐานเพื่อศึกษา จำนวน *Nitrospira* โดยเลือกโคโลนีที่ได้จากการโคลนนิ่งตัวอย่างดินจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้ง (OEPHSLD-3) ซึ่งผ่านการทดสอบว่าเป็นโคโลนีที่มียีน 16s rRNA ของแบคทีเรียกลุ่ม *Nitrospira* เพื่อใช้ DNA มาตรฐาน จะใช้ T-vector (Promega, USA) และใช้ชุดสกัด พลาสมิคด้วยชุดสกัดพลาสมิค NucleoSpin® Plasmid (MACHEREY-NAGEL, Düren , Germany) เพื่อสร้าง DNA มาตรฐานในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 10^2-10^8จำนวนเซลล์ต่อลิตร โดยคำนวณ 1 copies16S DNA เท่ากับ 1 เซลล์ของประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Nakamura และคณะ, 2006)

ตารางที่ 3.2 ไพร์เมอร์และโปรแกรมสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย	**ชื่อไพร์เมอร์**	**การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์**	**ตำแหน่ง 16SrRNA บน *E.coli***	**โปรแกรมสังเคราะห์ดีเอ็นเอ**	**อ้างอิง**
Nitrobacter	P338f	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	1035-1048	initial denaturation 5 นาที 95^{O}C DNA denaturation 1.5 นาที 95^{O}C primer annealing 0.5 นาที 65^{O}C DNA extension 1 นาที 72^{O}C } 30 รอบ final extension 6 นาที 72^{O}C	Jie และ Daping (2008)
	NIT3	CCTGTGCTCCATGCTCCG			
Nitrospira	P338f	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	666-682	initial denaturation 5 นาที 95^{O}C DNA denaturation 1.5 นาที 95^{O}C primer annealing 0.5 นาที 65^{O}C DNA extension 1 นาที 72^{O}C } 30 รอบ final extension 6 นาที 72^{O}C	Liu และ คณะ (2008)
	Ntspa0685r	CGGGAATTCCGCGCTC			

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 <u>การทดลองส่วนที่ 1</u> กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งและศึกษาผลกระทบของปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย

4.1.1 ลักษณะของบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง

ทำการศึกษาระบบเพาะเลี้ยงกุ้งครอบคลุมทั้งระบบบ่อดินกลางแจ้ง ระบบบ่อไร้ดินกลางแจ้ง ระบบบ่อในโรงเรือนที่มีการหมุนเวียนน้ำกลับมาใช้ใหม่ รวมถึงตัวอย่างจากระบบบำบัดคุณภาพน้ำในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ โดยแต่ละระบบการเพาะเลี้ยงมีค่าความเค็ม และความหนาแน่นของกุ้งแตกต่างกัน โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 4 ประเภทตามลักษณะระบบการเพาะเลี้ยง ได้แก่

4.1.1.1 ระบบบ่อดินกลางแจ้ง (OEP) จำนวน 7 บ่อ สามารถแบ่งระบบบ่อดินกลางแจ้งออกเป็น

- ระบบบ่อความเค็มสูงความหนาแน่นกุ้งสูง (HSHD) คือบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งซึ่งมีความเค็ม 25-30 พีพีทีและมีความหนาแน่นกุ้งมากกว่า 50 ตัวต่อตารางเมตร จำนวน 2 บ่อ ได้แก่ OEPHSHD-1 และ OEPHSHD-2
- ระบบบ่อความเค็มสูงความหนาแน่นกุ้งต่ำ (HSLD) คือบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งซึ่งมีความเค็ม 25-30 พีพีทีและมีความหนาแน่นกุ้งน้อยกว่า 50 ตัวต่อตารางเมตร จำนวน 3 บ่อ ได้แก่ OEPHSLD-1 OEPHSLD-2 และ OEPHSLD-3
- ระบบบ่อความเค็มต่ำความหนาแน่นกุ้งต่ำ (LSLD) คือบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งซึ่งมีความเค็ม 4-10 พีพีทีและมีความหนาแน่นกุ้งน้อยกว่า 50 ตัวต่อตารางเมตร จำนวน 2 บ่อ ได้แก่ OEPLSLD-1 และ OEPLSLD-2

4.2.1.2 ระบบบ่อไร้ดินกลางแจ้ง (OLP) จำนวน 1 บ่อ ได้แก่ OLPLSLD-1

4.2.1.3 ระบบบ่อในโรงเรือน (IWR) จำนวน 1 บ่อ ได้แก่ IWRHSHD-1

4.2.1.4 ระบบบำบัดคุณภาพน้ำในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ (AWR) จำนวน 1 บ่อ ได้แก่ AWRHSLD-1

งานวิจัยนี้ทำการเก็บตัวอย่างจากหลายสถานที่ เพื่อให้ครอบคลุมทุกระบบการเพาะเลี้ยง รายละเอียดสถานที่เก็บตัวอย่างในแต่ละระบบเพาะเลี้ยงกุ้งแสดงในตารางที่ 4.1 โดยแต่ละระบบบ่อเพาะเลี้ยงเลือกเก็บตัวอย่างต่างกัน เช่นระบบบ่อดินกลางแจ้ง เลือกเก็บตะกอนดิน เพราะตะกอนดินเป็นแหล่งใหญ่ในการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันเนื่องจากในตะกอนดินเป็นแหล่งรวบรวมกลุ่มประชากรไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Nakamura และคณะ, 2006 และ Satoh และคณะ, 2006) ระบบบ่อไร้ดินกลางแจ้ง เลือกเก็บตัวอย่างน้ำเนื่องจากระบบนี้มีการรองก้นบ่อด้วยพลาสติก ระบบบ่อในโรงเรือน เลือกเก็บตัวอย่างแผ่นฟิล์มชีวภาพบนตัวกรอง เนื่องจากระบบดังกล่าวใช้ตัวกรองชีวภาพในการควบคุมไนโตรเจน และระบบบัดคุณภาพน้ำในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ เลือกเก็บตะกอนดินทราย ในระบบบำบัดคุณภาพน้ำ ทั้งนี้แต่ละระบบเพาะเลี้ยงมีสายพันธุ์กุ้งที่เลือกเลี้ยงต่างกัน คือในระบบเพาะเลี้ยงแบบระบบบ่อดินกลางแจ้งเลือกเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus Vannamei*) และในระบบบ่อไร้ดินกลางแจ้ง และระบบบ่อในโรงเรือนที่มีการหมุนเวียนน้ำกลับมาใช้ใหม่คือ กุ้งกุลาดำ (*Penaeus Monodon)* รายละเอียดปัจจัยสิ่งแวดล้อมแสดงในตารางที่ 4.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 รายละเอียดของแต่ละตัวอย่างระบบการเพาะเลี้ยงกุ้ง

ระบบการเพาะเลี้ยงกุ้ง			สถานที่เก็บตัวอย่าง	ความเค็ม (พีพีที)	ความหนาแน่น (ตัวต่อตารางเมตร)
ระบบบ่อดินกลางแจ้ง (OEP)	ระบบบ่อความเค็มสูง ความหนาแน่นกุ้งสูง (HSHD)	OEPHSHD-1 J3	จันทร์สวัสดิ์ฟาร์ม จ.จันทบุรี	16	62.5
		OEPHSHD-2 J2	ลุงโสนฟาร์ม จ.จันทบุรี	15	188
	ระบบบ่อความเค็มสูง ความหนาแน่นกุ้งต่ำ (HSLD)	OEPHSLD-1 BS1	บรรจงฟาร์ม บ่อเลี้ยง จ.ฉะเชิงเทรา	27	40
		OEPLSLD-3 BS2	บรรจงฟาร์ม บ่อบำบัด จ.ฉะเชิงเทรา	26	1
		OEPHSLD-3 B7	บางขุนเทียนฟาร์ม บ่อคุณต๋อง จ.กรุงเทพ	18	11
	ระบบบ่อความเค็มต่ำ ความหนาแน่นกุ้งต่ำ (LSLD)	OEPLSLD-1 B6	บางขุนเทียนฟาร์ม บ่อคุณปรีชา จ.กรุงเทพฯ	1	10
		OEPLSLD-2 J4	กำนันฟาร์ม จ.จันทบุรี	6	44
ระบบบ่อไร้ดินกลางแจ้ง (OLP)	ระบบบ่อความเค็มสูง ความหนาแน่นกุ้งต่ำ (LSLD)	OLPLSLD-1 MB	บ่อกุ้งดำ ม.บูรพา จ.จันทบุรี	11	1
ระบบบำบัดคุณภาพน้ำของระบบบ่อในโรงเรือน (IWR)	ระบบบ่อความเค็มสูง ความหนาแน่นกุ้งสูง(HSHD)	IWRHSHD-1 CU	ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์	35	350
ระบบบำบัดคุณภาพน้ำของระบบบ่อในโรงเรือน (AWR)	ระบบบ่อความเค็มสูง ความหนาแน่นกุ้งต่ำ (HSLD)	AWRHSLD-1 BW	สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล ม.บูรพา จ.ชลบุรี	43	0*

* ไม่มีกุ้งแต่มีสัตว์น้ำชนิดอื่น

ตารางที่ 4.2 รายละเอียดปัจจัยสิ่งแวดล้อมของแต่ละตัวอย่างในแต่ละระบบเพาะเลี้ยงกุ้ง

ระบบบ่อ	ความหนาแน่นกุ้ง (ตัว/ตรม.)	ความเค็ม (พีพีที)	แอมโมเนียในดิน (ไมโครกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	ไนไตร์ตในดิน (ไมโครกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	ไนเตรตในดิน (ไมโครกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	แอมโมเนียในน้ำ (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	ไนไตร์ตในน้ำ (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	ไนเตรตในน้ำ (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)
OEPHSHD-1	62.5	16	4 ± 0.32	0.15 ± 0. 26	6.56 ± 0.12	1.14 ± 0.45	1.96 ±0.34	4.23 ± 0.84
OEPHSHD-2	188	15	3.3 ± 0.24	0.06 ± 0.14	5.53 ± 0.45	0.96 ± 0.35	0.2± 0.02	2.23 ± 0.54
OEPHSLD-2	1	26	0.3 ± 0.13	0.02 ± 0.23	8.11 ± 1.00	0.22 ± 0.14	0.04 ±0.01	4.81 ± 1.57
OEPHSLD-3	22	18	9.35 ± 0.55	0.22 ± 0.13	10.2 ± 1.45	0.03 ± 0.01	0.01±0.001	1.66 ± 0.05
OEPLSLD-1	1	6	6.1 ± 0.4	0.02 ± 0.01	68.4 ± 1.57	0.12 ± 0.04	0.006 ± 0.05	1.03 ± 0.04
OEPLSLD-2	44	6	3.6 ± 0.12	0.17 ± 0.03	4.72 ± 1.76	0.46 ± 0.027	0.21±0.03	1.38 ± 0.23
OLPLSLD-1	1	11	ND	ND	ND	0.8 ± 0.35	0.05±0.49	0.46 ± 0.12
IWRHSHD-1	350	35	ND	ND	ND	0.075 ±0.02	0.07 ± 0.04	1.80 ± 0.54
AWRHSLD-1	0	43	ND	ND	ND	1.28 ± 0.39	0.07 ± 0.04	0.75 ± 0.01

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.2 การเลือกไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย

การศึกษากลุ่มประชากร NOB ในตัวอย่างจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งใช้วิธี PCR-Cloning-Sequecing แต่เนื่องจากการศึกษากลุ่มประชากร NOB สามารถศึกษาได้ทั้งยีน 16S rRNA และ functional gene เช่น nxrX และ nxrB ที่สร้างเอนไซม์ Nitrite oxidoreductase (เอนไซม์ที่ใช้ออกซิไดซ์ไนไตรต์) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการศึกษา functional gene ของNOB ยังไม่สามารถทำได้ครอบคลุม กลุ่มประชากร ดังกล่าวได้ทุกกลุ่ม โดยจะศึกษาเฉพาะ กลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrobacter* เท่านั้น ดังนั้นการศึกษากลุ่มประชากร NOB ในงานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษา ยีน 16S rRNA

ในการศึกษากลุ่มประชากร NOB ด้วยยีน 16s RNA ต้องเลือกใช้ไพรเมอร์หลายชุดเนื่องจากกลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวกระจายอยู่ในหลายซับดิวิชัน ได้แก่ *Nitrobacte*r อยู่ในซับดิวิชันแอลฟา *Nitrococcus* อยู่ในซับดิวิชันแกมมา *Nitrospina* อยู่ในซับดิวิชันเดลตา และ *Nitrospira* อยู่ในไฟลัม Nitrospira สำหรับวิจัยนี้จะเลือกศึกษา *Nitrobacte*r และ *Nitrospira* ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสำคัญในระบบสิ่งแวดล้อม โดยจะไม่ศึกษา *Nitrococcus* และ *Nitrospina* เนื่องจากไม่พบแบคทีเรียสองสกุลนี้ในสิ่งแวดล้อม (Haseborg และคณะ, 2010) รายละเอียดไพรเมอร์ซึ่งทำการรวบรวมมาจากหลายงานวิจัยเพื่อทำการคัดเลือกให้ไพร์เมอร์มีความครอบคลุมและจำเพาะเจาะจงสำหรับกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงมากที่สุด (ดังแสดงตารางที่ 4.3)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่4.3 ตัวอย่างไพรเมอร์ ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย (16S rDNA)

อ้างอิง	สกุล	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')
Cebron และ Garnier (2005)	*Nitrobacter*	FGPS 872	CTAAAACTCAAAGGAATTGA
		FGPS 1269'	TTTTTTGAGATTTGCTAG
Montras และคณะ (2007)		Nwi 70F	GGCGTAGCAATACGTCAG
		Nwi 165R	ATCCGGTATTAGCCCAAG
Jie และ Daping (2008)		P338f	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
		NIT3	CCTGTGCTCCATGCTCCG
Cebron และ Garnier (2005)	*Nitrospira*	NSR 1113F	CCTGCTTTCAGTTGCTACCG
		NSR 1264R	GTTTGCAGCGCTTTGTACCG
Nakamura และคณะ (2006)		NTSPAf	CGCAACCCCTGCTTTCAGT
		NTSPAr	CGTTATCCTGGGCAGTCCTT
Itoi และคณะ (2007)			AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
			TCTACGCATTTCACCGCTAC
Liu และคณะ (2008)		P338f	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
		Ntspa0685r	CGGGAATTCCGCGCTC

4.1.2.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงและครอบคลุมของไพรเมอร์ต่อกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย สกุล *Nitrobacter*

จากการนำไพรเมอร์ แต่ละตัวในตารางที่ 4.3 มาทดสอบกับโปรแกรม ARB program package (Daims และคณะ, 2001) โดยใช้ฟังก์ชัน probe match ARB เพื่อทดสอบความจำเพาะเจาะจงและครอบคลุมต่อสมาชิกกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrobacter* (24 ตัวใน SSU rRNA database ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่มีการเพิ่มกลุ่มประชากร *Nitrobacter* ที่เพิ่งถูกค้นพบแล้ว) (รายละเอียดแสดงในตารางที่ 4.4) พบว่าไพรเมอร์ทั้งสามมีความจำเพาะเจาะจง เรียงจากมากไปน้อยได้ดังนี้

ตารางที่ 4.4 ความจำเพาะเจาะจงและการครอบคลุมของไพร์เมอร์ แต่ละชุดไพร์เมอร์ต่อกลุ่มประชากรNOB สกุล *Nitrobacter*

อ้างอิง	ไพรเมอร์	0 mismatch[1]		1 mismatch [2]		2 mismatch [3]	
		***Nitrobacter*[4] (24)**	**Non *Nitrobacter*[5]**	***Nitrobacter*[4] (24)**	**Non *Nitrobacter*[5]**	***Nitrobacter*[4] (24)**	**Non *Nitrobacter*[5]**
Cebron และ Garnier (2005)	FGPS 872*	24	30321	0	0	0	0
	FGPS 1269	24	202	0	0	0	0
Montras และคณะ (2007)	Nwi 70F	28	283	18	1611	0	0
	Nwi 165R	14	194	0	0	0	0
Jie และ Daping (2008)	P338f *	24	37755	0	0	0	0
	NIT3	21	3	21	141	21	143

(1) ไม่มีการจับคู่นิวคลีโอไทด์ผิดตำแหน่ง

(2) มีการจับคู่นิวคลีโอไทด์ผิด 1 ตำแหน่ง

(3) มีการจับคู่นิวคลีโอไทด์ผิด 2 ตำแหน่ง

(4) จำนวนชนิดของNOB สกุล *Nitrobacter* ที่ไพรเมอร์ นี้ครอบคลุม

(5) จำนวนชนิดของแบคทีเรียสกุลอื่นที่ไพรเมอร์นี้ครอบคลุม

* universal primer

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ไพรเมอร์ชุด P338f + NIT3 ครอบคลุม *Nitrobacter* ทั้งหมด 21 ตัว จากความสามารถของไพรเมอร์ ชุดนี้ที่สามารถวิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมด 24 ตัว โดยครอบคลุมแบคทีเรียตัวอื่น 3 ตัว
- ไพรเมอร์ชุด Nwi 70F+ Nwi 165R ครอบคลุม*Nitrobacter* ทั้งหมด 14 ตัว จากความสามารถของ ไพรเมอร์ชุดนี้ที่สามารถวิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมด 208 ตัว โดยครอบคลุมแบคทีเรียตัวอื่น 194 ตัว
- ไพรเมอร์ ชุด FGPS 872+ FGPS 1269' ครอบคลุม*Nitrobacter* ทั้งหมด คือ 24 ตัว จากความสามารถของ primer ชุดนี้ที่สามารถวิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมด 226 ตัว โดยครอบคลุมแบคทีเรียตัวอื่น 202 ตัว

ดังนั้นในงานวิจัยนี้เลือกใช้ไพรเมอร์ ชุด P338f + NIT3 เพื่อศึกษาความหลากหลายของกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrobacter*

4.1.2.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงและครอบคลุมของไพรเมอร์ต่อกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira*

กลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* ในSSU rRNA databaseสามารถแบ่งได้ 7 กลุ่ม ได้แก่

- กลุ่มที่ 1 *Nitrospira moscoviensis* (30)
- กลุ่มที่ 2 *Nitrospira sp.* (16)
- กลุ่มที่ 3 uncultured (2)
- กลุ่มที่ 4 uncuture bacterium (EB) bacteria environment sample (1)
- กลุ่มที่ 5 uncultured (5)
- กลุ่มที่ 6 *Nitrospira marina* (2)
- กลุ่มที่ 7 unculture Nitrospira (EB) Bacteria Nitrospirae (6)

จากการนำไพรเมอร์แต่ละตัวในตารางที่ 4.3 มาทดสอบกับโปรแกรม ARB program package (Daims และคณะ, 2001) โดยใช้ฟังก์ชัน probe match ARB เพื่อทดสอบความจำเพาะเจาะจงและครอบคลุมของไพรเมอร์ต่อสมาชิกกลุ่มประชากร NOB ในสกุล *Nitrospira* (62 ตัวในSSU rRNA database) (รายละเอียดแสดงในตารางที่ 4.5) พบว่าไพรเมอร์แต่ละตัวมีความจำเพาะและครอบคลุมแตกต่างกัน เรียงจากมากไปน้อยได้ดังนี้

ตารางที่ 4.5 ความจำเพาะเจาะจงและการครอบคลุมของไพร์เมอร์ แต่ละชุดต่อ กลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira*

อ้างอิง	ไพร์เมอร์	0 mismatch								1 mismatch							
		กลุ่ม 1 (30)	กลุ่ม 2 (16)	กลุ่ม 3 (2)	กลุ่ม 4 (1)	กลุ่ม 5 (5)	กลุ่ม 6 (2)	กลุ่ม 7 (6)	Non *Nitrospira*	กลุ่ม 1 (30)	กลุ่ม 2 (16)	กลุ่ม 3 (2)	กลุ่ม 4 (1)	กลุ่ม 5 (5)	กลุ่ม 6 (2)	กลุ่ม 7 (6)	Non *Nitrospira*
Cebron และ Garnier (2005)	NSR 1113F	0	16	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	4
	NSR 1264R	7	11	0	0	0	0	0	24	0	11	2	0	0	0	0	101
Nakamura และคณะ (2006)	NTSPAf	0	16	0	0	0	0	0	2	0	16	0	0	4	0	0	77
	NTSPAr	-	13	2	1	-	2	-	1	-	16	2	1	5	2	5	7
Liu et al (2008)	P338f*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ntspa0685r	29	16	2	1	2	0	5	0	-	-	-	-	-	-	-	-

* universal primer

-ไม่มีการทดสอบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ไพรเมอร์ชุด P338f + Ntspa0685r ในกรณีที่ไม่มีการจับคู่นิวคลีโอไทด์ผิดตำแหน่งไพรเมอร์ชุดครอบคลุม *Nitrospira* ทั้งหมด 55 ตัว จากความสามารถของไพรเมอร์ชุดนี้ที่สามารถวิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมด 55 ตัว และไพรเมอร์ชุดนี้ครอบคลุม *Nitrospira* 6 กลุ่มจากกลุ่ม *Nitrospira* ทั้งหมด7กลุ่ม กรณีที่มีการจับคู่ นิวคลีโอไทด์ผิด 1 ตำแหน่งไม่มีการทดสอบ
- ไพรเมอร์ชุด NTSPAf+ NTSPAr ในกรณีที่ไม่มีการจับคู่นิวคลีโอไทด์ผิดตำแหน่งไพรเมอร์ชุดนี้ครอบคลุม *Nitrospira* ทั้งหมด 16 ตัว จากความสามารถของ ไพรเมอร์ชุดนี้ที่สามารถวิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมด 18 ตัว โดยครอบคลุมแบคทีเรียตัวอื่น 2 ตัว และไพรเมอร์ชุดนี้ครอบคลุม *Nitrospira* 1 กลุ่มจากกลุ่ม *Nitrospira* ทั้งหมด 7 กลุ่ม ในกรณีที่มีการจับคู่นิวคลีโอไทด์ผิด 1 ตำแหน่ง ไพรเมอร์ชุดนี้จะครอบคลุม *Nitrospira* ทั้งหมด 20 ตัว จากความสามารถของ ไพรเมอร์ชุดนี้ที่สามารถวิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมด 97 ตัว โดยครอบคลุมแบคทีเรียตัวอื่น 77 ตัว และไพรเมอร์ชุดนี้ครอบคลุม *Nitrospira* 2 กลุ่มจากกลุ่ม *Nitrospira* ทั้งหมด 7 กลุ่ม
- ไพรเมอร์ ชุด NSR 1113F+ NSR 1264R ในกรณีที่ไม่มีการจับคู่นิวคลีโอไทด์ผิดตำแหน่ง ไพรเมอร์ชุดนี้ครอบคลุม *Nitrospira* ทั้งหมด 11 ตัว จากความสามารถของไพรเมอร์ชุดนี้ที่สามารถวิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมด 42 ตัว โดยครอบคลุมแบคทีเรียตัวอื่น 31 ตัว และไพรเมอร์ชุดนี้ครอบคลุม *Nitrospira* 1 กลุ่มจากกลุ่ม *Nitrospira* ทั้งหมด 7 กลุ่ม ในกรณีที่มีการจับคู่นิวคลีโอไทด์ผิด 1 ตำแหน่ง ไพรเมอร์ชุดนี้จะครอบคลุม *Nitrospira* ทั้งหมด 11 ตัว จากความสามารถของ ไพรเมอร์ชุดนี้ที่สามารถวิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมด 114 ตัว โดยครอบคลุมแบคทีเรียตัวอื่น 103 ตัว และไพรเมอร์ชุดนี้ครอบคลุม *Nitrospira* 1 กลุ่มจากกลุ่ม *Nitrospira* ทั้งหมด 7 กลุ่ม

ดังนั้นในงานวิจัยนี้เลือกใช้ ไพรเมอร์ชุด P338f + Ntspa0685r เพื่อศึกษาความหลากหลายของกลุ่มประชากรNOB สกุล *Nitrospira* เพื่อให้ครอบคลุม *Nitrospira* มากที่สุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.3 กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่พบในระบบเพาะเลี้ยงกุ้ง

การศึกษากลุ่มประชากร NOB ในตัวอย่างจากระบบบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งใช้วิธี PCR amplification-cloning แล้วทำการสุ่มตัวอย่างละ 10 โคโลนีต่อตัวอย่าง เพื่อทำการอ่านรหัสพันธุกรรม ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ไพร์เมอร์ P338f และ Ntspa0685r เพื่อศึกษา กลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* จากระบบบ่อเพาะเลี้ยงทั้งหมด 10 บ่อ พบกลุ่มประชากรกลุ่มดังกล่าว ทั้งสิ้น 10 บ่อ ยกเว้น OEPHSLD-1 แต่เมื่อเปลี่ยนไพรเมอร์เป็น P338f และ NIT3 เพื่อศึกษากลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียกลุ่ม *Nitrobacter* พบว่าไม่พบ แบคทีเรีย กลุ่มดังกล่าว ในทุกระบบเพาะเลี้ยงกุ้ง

เมื่อนำรหัสพันธุกรรมที่ได้จากการ จากการถอดรหัสพันธุกรรม ด้วยไพรเมอร์ P338f และ Ntspa0685r (รายละเอียดของรหัสพันธุกรรมที่ได้จากการถอดรหัส แสดงในภาคผนวก ข) มาทำการวิเคราะห์ Homology Search ด้วยโปรแกรม Blast ดังแสดงในตารางที่ 4.6 ผลจากการทำ Homology Search พบว่ารหัสพันธุกรรมที่ได้มีความใกล้เคียงกับรหัสพันธุกรรมของ กลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* ในระบบฐานข้อมูล ซึ่งแสดงว่าไพรเมอร์นี้มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว โดยมีความใกล้เคียงกับ กลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* ในฐานข้อมูลในช่วง 88-100% และผลที่จากการทำ Homology Search พบว่า จากตัวอย่างจากระบบบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทั้งหมด 10 บ่อ พบ *Nitrospira* ในระบบบ่อดินกลางแจ้งทั้งสิ้น 7 บ่อ ระบบบ่อไร้ดินกลางแจ้ง ระบบบำบัดคุณภาพน้ำของระบบบ่อในโรงเรือน และระบบบำบัด คุณภาพน้ำในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำอย่างละ 1 บ่อ ได้แก่ OEPHSHD-1 OEPHSHD-2 OEPHSLD-2 OEPHSLD-3 OEPLSLD-1 OEPLSLD-2 OLPHSLD-1 IWRHSHD-1 และ AWRHSLD-1 ตามลำดับ แต่ไม่พบในตัวอย่าง OEPHSLD-1 ซึ่งแบคทีเรีย ที่พบในตัวอย่างนี้เป็น แบคทีเรียกลุ่ม *Thermaerobacter sp.* ทั้งนี้เนื่องจากว่าไพร์เมอร์ Ntspa0685r สามารถ amplified แบคทีเรียกลุ่ม *Thermaerobacter sp.*บางตัวได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่4.6 ความเหมือนของรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างจากแต่ละรบบเพาะเลี้ยงกุ้งและฐานข้อมูล

ตัวอย่าง	หมายเลขโคลน	คะแนน	ความเหมือน	ช่องว่าง	รหัสประจำตัว Accession Number	สิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียง	แหล่งที่มา
OEPHSHD-1	3	569	326/335 (97%)	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp.
	4	569	326/335 (97%)	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp.
	6	549	322/335 (96%)	0/335 (0%)	AF155152	Nitrospira cf. moscoviensis SBR1015	Nitrospira cf. moscoviensis SBR1015
	9	564	325/335 (97%),	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp.
	10	505	292/301 (97%)	1/301 (0%)	EF434854	Uncultured Nitrospira sp. clone As-05-21	uncultured Nitrospira sp.
	13	564	326/336 (97%)	1/336 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp.
	14	564	325/335 (97%)	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp.
	15	564	325/335 (97%)	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp.
	16	569	326/335 (97%)	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp.
	19	564	325/335 (97%)	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp.
OEPHSHD-2	1	436	259/270 (95%)	2/270 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp.
	2	440	246/251 (98%)	0/251 (0%)	EF434854	Uncultured Nitrospira sp. clone As-05-21	uncultured Nitrospira sp.
	4	418	243/251 (96%	2/251 (0%)	EF434854	Uncultured Nitrospira sp. clone As-05-21	uncultured Nitrospira sp.
	5	424	244/251 (97%	1/251 (0%)	EF434854	Uncultured Nitrospira sp. clone As-05-21	uncultured Nitrospira sp.
	8	435	259/269 (96%	3/269 (1%)	EF434854	Uncultured Nitrospira sp. clone As-05-21	uncultured Nitrospira sp.
	11	567	325/335 (97%),	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp
	12	553	323/335 (96%)	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp
	15	558	324/335 (96%)	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp
	16	558	324/335 (96%)	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp
	17	558	324/335 (96%)	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp

ตารางที่4.6 ความเหมือนของรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างจากแต่ละระบบเพาะเลี้ยงกุ้งและฐานข้อมูล

ตัวอย่าง	หมายเลขโคลน	คะแนน	ความเหมือน	ช่องว่าง	รหัสประจำตัว Accession Number	สิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียง	แหล่งที่มา
OEPHSLD-1	1	226	171/194 (88%)	8/146 (5%)	FJ469368	Biocorrosive Thermophilic Microbial Communities	Alaskan North Slope Oil Facilities
	3	176	97/98 (98%)	12/239 (5%)	GQ918817	Uncultured soil bacterium clone 19_45KH11	Environmental sample
	4		213/239 (89%)	10/277 (3%)	AB444428	Thermaerobacter sp. SS	activated sludge
	6	294	241/277 (87%)	8/262 (3%)	FJ469368	Uncultured bacterium clone CO1SHNF644	Alaskan North Slope Oil Facilities
	8	274	228/262 (87%),	8/262 (3%)	FJ469368	Uncultured bacterium clone CO1SHNF644	Alaskan North Slope Oil Facilities
	14	387	307/352 (87%)	16/352 (4%)	AB444428	Thermaerobacter composti gene for	activated sludge

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่4.6 ความเหมือนของรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างจากแต่ละรบบเพาะเลี้ยงกุ้งและฐานข้อมูล

ตัวอย่าง	หมายเลขโคลน	คะแนน	ความเหมือน	ช่องว่าง	รหัสประจำตัว Accession Number	สิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียง	แหล่งที่มา
OEPHSLD-3	1	608	333/335 (99%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae
	6	525	314/329 (95%)	0/329 (0%)	CP001644	Ralstonia pickettii 12D	Ralstonia pickettii 12D
	8	606	332/334 (99%)	0/334 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae
	9	597	331/335 (98%),	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae
	10	608	333/335 (99%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae
	15	608	333/335 (99%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae
	16	608	333/335 (99%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae
	28	597	331/335 (98%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae
OEPLSLD-1	2	603	332/335 (99%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae
	3	606	332/334 (99%)	0/334 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae
	4	601	332/335 (99%)	1/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae
	5	601	331/334 (99%)	0/334 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae
	6	603	332/335 (99%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae
	7	608	333/335 (99%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae
	8	523	319/336 (94%)	3/336 (0%)	AY711583	Uncultured Nitrospira sp. clone SIMO-2217	uncultured Nitrospira sp.
	9	514	318/337 (94%)	4/337 (1%)	AY711583	Uncultured Nitrospira sp. clone SIMO-2217	uncultured Nitrospira sp.
	10	603	332/335 (99%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae
	11	608	333/335 (99%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่4.6 ความเหมือนของรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างจากแต่ละระบบเพาะเลี้ยงกุ้งและฐานข้อมูล

ตัวอย่าง	หมายเลขโคลน	คะแนน	ความเหมือน	ช่องว่าง	รหัสประจำตัว Accession Number	สิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียง	แหล่งที่มา
OEPLSLD-2	8	412	231/235 (98%)	0/235 (0%)	FJ460059	Actinobacterium MS-F-1 16S	actinobacterium MS-F-1
	10	603	332/335 (99%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	12	603	332/335 (99%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	13	603	332/335 (99%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	14	603	333/335 (99%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	15	603	333/335 (99%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	18	597	331/335 (98%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	19	608	331/335 (98%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	20	597	331/335 (98%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	23	246	133/133 (100%)	0/133 (0%)	FM214692	Photobacterium damselae sub sp.	uncultured bacterium
OLPLSLD-1	MB_3	531	319/335 (95%)	0/335 (0%)	EU315579	Uncultured Nitrospirae bacterium clone HCM3MC80_4G_FF	uncultured Nitrospirae bacterium
	MB_5	558	325/336 (96%)	2/336 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	MB_6	536	321/336 (95%)	2/336 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	MB_7	564	325/335 (97%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	MB_8	564	325/335 (97%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	MB_11	547	323/336 (96%)	2/336 (0%)	AY711583	Uncultured Nitrospira sp. clone SIMO-2217	uncultured Nitrospira sp.
	MB_15	523	309/316 (97%)	2/316 (0%)	EU315579	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 925-C8	uncultured Nitrospirae bacterium

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่4.6 ความเหมือนของรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างจากแต่ละรบบเพาะเลี้ยงกุ้งและฐานข้อมูล

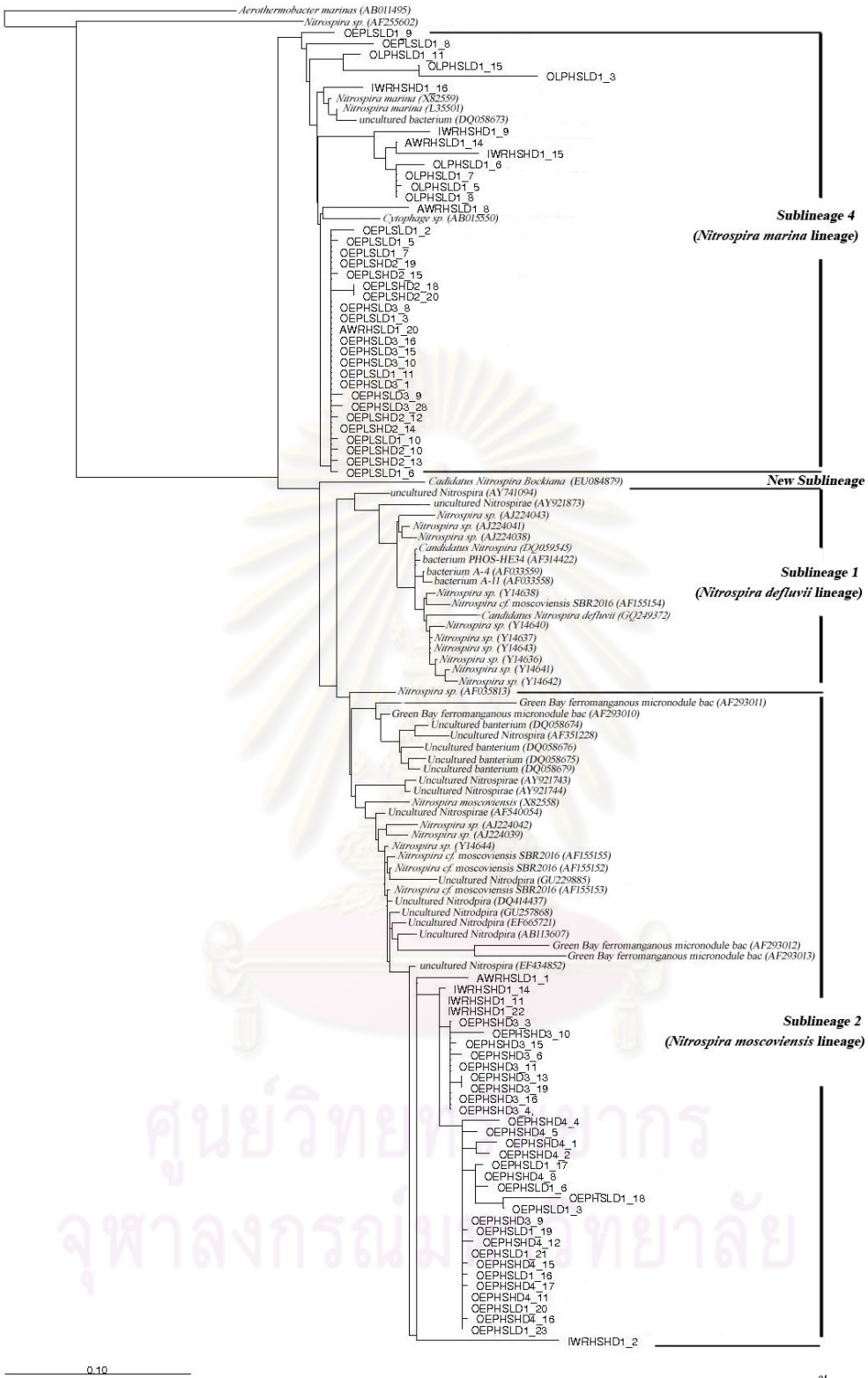
ตัวอย่าง	หมายเลขโคลน	คะแนน	ความเหมือน	ช่องว่าง	รหัสประจำตัว Accession Number	สิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียง	แหล่งที่มา
IWRHSHD1	2	361	201/204 (98%)	0/204 (0%)	EF434854	Uncultured Nitrospira sp. clone As-05-21	uncultured Nitrospira sp.
	3	499	277/281 (98%)	1/281 (0%)	AM295545	Uncultured bacterium partial	uncultured bacterium
	6	501	279/283 (98%)	0/283 (0%)	X82559	N.marina 16S rRNA gene	Nitrospira marina Nb-295
	7	453	257/263 (97%)	0/263 (0%)	FM175752	Uncultured Acidimicrobiales bacterium partial	uncultured Acidimicrobiales bacterium
	15	431	272/291 (93%)	2/291 (0%)	AY795679	Uncultured Nitrospira sp. clone Aster_22_29.07	uncultured Nitrospira sp.
	9	542	321/335 (95%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	11	575	327/335 (97%)	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp.
	14	569	326/335 (97%)	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp.
AWRHSLD-1	1	436	249/255 (97%)	1/255 (0%)	EF434854	Uncultured Nitrospira sp. clone As-05-21	uncultured Nitrospira sp.
	8	510	280/282 (99%	0/282(0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	9	104	65/69 (94%	1/69 (1%)	FJ938620	Uncultured bacterium clone PC-C19	uncultured bacterium
	4	248	134/134 (100%)	0/134 (0%)	AJ749800	Photobacterium damselae sub sp.	Solea senegalensis
	5	248	134/134 (100%)	0/134 (0%)	AJ749800	Photobacterium damselae sub sp.	Solea senegalensis
	14	564	325/335 (97%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospira sp. clone Aster_22_29.07	uncultured Nitrospirae bacterium

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลังจากนั้นนำรหัสพันธุกรรมที่ได้พร้อมกับรหัสพันธุกรรมของ *Nitrospira* ที่เคยพบในอดีตมาสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธีการคำนวณ สองแบบ (Distance metrix และ Maximum Parsimony) เพื่อเปรียบเทียบกัน พบว่าการจัดกลุ่ม *Nitrospira* จาก Phylogenetic tree ที่ได้จากวิธีการคำนวณทั้งสองแบบ ให้ผลการจัดกลุ่มเหมือนกัน (ดังแสดงในภาคผนวก ค) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ารหัสพันธุกรรมที่ทำการวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือ และไม่ว่าจะใช้วิธีการคำนวณแบบใดก็ให้ผลเหมือนกัน จากรูปที่ 3.1 แสดง Phylogenetic tree ของ 16s ของ *Nitrospira* จากการคำนวณโดยวิธี Neighbor joining (Distance matrix) พบว่ารหัสพันธุกรรมที่ผ่านการอ่านรหัสพันธุกรรมจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งแบบระบบบ่อดินกลางแจ้งและระบบบ่อไร้ดินกลางแจ้ง มีการกระจายตัวอยู่ใน 2 Sublineage ที่ความเหมือนของรหัสพันธุกรรม 90% ตามการศึกษาของ Daim และคณะ (2001) คือ กลุ่ม SublineageII (*Nitrospira moscoviensis* lineage) และ SublineageIV (*Nitrospira marina* lineage)

นอกจากนี้รหัสพันธุกรรมทุกรหัสส่วนใหญ่ที่มาจากตัวอย่างเดียวกัน (สถานที่เก็บเดียวกัน) จะอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เช่น ในระบบบ่อดินกลางแจ้งแบบ OEPHSHD-1 OEPHSHD-2 และ OEPHSLD-1 รหัสพันธุกรรมจากทุกโคโลนีจากทั้ง 3 ตัวอย่าง จะกระจายอยู่ในกลุ่ม SublineageII (*Nitrospira moscoviensis* lineage) และในระบบบ่อดินกลางแจ้งแบบ OEPHSLD-3 OEPLSLD-2 OEPLSLD-1 และ OLPLSLD-1 ลำดับนิวคลิโอไทด์ จากทุกโคโลนีจากทั้ง 4 ตัวอย่าง จะกระจายอยู่ในกลุ่ม SublineageIV (*Nitrospira marina* lineage) ยกเว้น ตัวอย่างจากระบบบำบัดคุณภาพน้ำของระบบบ่อในโรงเรือน (IWRHSHD-1) และระบบคุณภาพน้ำในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ (AWRHSHD-1) มีการกระจายตัวของกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* ร่วมกันใน 2 กลุ่ม Sublineage คือ กลุ่ม SublineageIV (*Nitrospira marina* lineage) และ กลุ่ม SublineageII (*Nitrospira moscoviensis* lineage) โดยมีจำนวนโคโลนีในแต่ละกลุ่ม Sublineage ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 phylogenectic tree สร้างโดยเพิ่ม sequence ของตัวอย่างจากระบบบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทั้งหมด โดยใช้วิธี parsimony method ลงใน phylogenetic ที่สร้างมาจาก sequence ของ *Nitrospira* ทั้งหมด (ที่มีความยาวมากกว่า 1000 bp) โดยใช้วิธี neighbor joining (distance matrix)

ตารางที่ 4.7 สรุปการกระจายตัวของกลุ่ม NOB ในแต่ละตัวอย่างระบบเพาะเลี้ยง

ตัวอย่าง	*Nitrobacter*	*Nitrospira*			
		SublineageI (*Nitrospira defluvi* lineage)	**SublineageII (*Nitrospira moscoviensis* lineage)**	**Sublineage IV (*Nitrospira marina* lineage)**	***Candidatus Nitrospira Bockiana***
OEPHSHD-1	-	-	√√√√√√√√√	-	-
OEPHSHD-2	-	-	√√√√√√√√√	-	-
OEPHSLD-2	-	-	-	√√√√√√	-
OEPHSLD-3	-	-	-	√√√√√√√√	-
OEPLSLD-1	-	-	-	√√√√√√√	-
OEPLSLD-2	-	-	√√√√√√√√√	-	-
OLPLSLD-1	-	-	-	√√√√√√	-
IWRHSHD-1	-	-	√√√	√	-
AWRHSHD-1	-	-	√	√√√	-

√ จำนวนโคโลนีของแต่ละตัวอย่างที่พบในแต่ละSublineage

- ไม่พบแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว

4.1.4 ปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่พบในระบบเพาะเลี้ยงกุ้ง

4.1.4.1 ความหนาแน่นกุ้งต่อกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย

การสะสมของปริมาณไนไตรต์ในระบบบ่อดินกลางแจ้งในมีค่าอยู่ในช่วง 0.02 – 0.17 โครกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับงานของ Funge-Smith (1998) ทำการศึกษาปริมาณไนไตรต์ที่สะสมในตะกอนดินและตะกอนดินบนแผ่นพลาสติกพบว่าปริมาณไนไตรต์จากทั้งสองส่วนมีค่า 0.51 และ 1.08 มคก.ไนโตรเจน/ล. ตามลำดับ ปริมาณไนไตรต์ในการทดลองนี้มีค่าน้อยกว่างานวิจัยของ Funge-Smith มาก เนื่องจากว่าปริมาณไนไตรต์จากงานวิจัยของ Funge-Smith (1998) เป็นปริมาณไนไตรต์มากสุดที่ระบบบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งจะมี ซึ่งค่านี้เป็นค่าที่ได้จากการคำนวณจากปริมาณอาหารที่ให้ในระบบเพาะเลี้ยงกุ้ง และไม่คำนึงถึงการย่อยสลายทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์

จากตารางที่ 4.8 พบว่าปริมาณไนไตรต์จากตัวอย่างตะกอนดินจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งกลางแจ้งมีค่าอยู่ในช่วง 0.02 – 0.17 ไมโครกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกันมาก และปริมาณไนไตรต์จากตัวอย่างน้ำจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งแบบไร้ดินกลางแจ้ง ระบบเพาะเลี้ยงในโรงเรือนและระบบบำบัดคุณภาพน้ำในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ มีค่าอยู่ในช่วง 0.05-0.07 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งจากค่าปริมาณไนไตรต์ที่พบจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งทุกแบบนั้นจะเห็นว่ามีปริมาณน้อย ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าในทุกระบบบ่อการเพาะเลี้ยงกุ้งมีการเกิดกระบวนไนตริฟิเคชันเกิดขึ้นในบ่อได้อย่างดี และปริมาณไนไตรต์ไม่มีความสัมพันธ์กับความหนาแน่นกุ้งในแต่ละระบบการเพาะเลี้ยง เนื่องจากปริมาณไนไตรต์ที่เกิดขึ้นนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณอาหารที่เหลือในบ่อและการออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรต์ของAOB

ปริมาณไนไตรต์ที่พบในแต่ละระบบเพาะเลี้ยงมีความสอดคล้องกับกลุ่มประชากร คือ พบ NOB สกุล *Nitrospira* ในระบบเพาะเลี้ยงทุกระบบ เนื่องจากโดยปกติ กลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* เป็นสกุลที่ชอบอาศัยในสิ่งแวดล้อมที่มีปริมาณไนไตรต์ต่ำๆ (Cebron และ Garnier, 2005) เช่น พบ NOB สกุล *Nitrospira* เพียงสกุลเดียวในน้ำทิ้งจากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนที่มีกระบวนกำจัดไนโตรเจนอย่างสมบูรณ์ ซึ่งมีปริมาณไนไตรต์ในน้ำทิ้งประมาณ 0.01 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ทั้งนี้ เนื่องจากแบคทีเรียสกุลดังกล่าวมีลักษณะสมบัติแบบ K-strategists คือจะเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน และความเข้มข้นไนไตรต์ต่ำ (Kim และ Kim, 2006) และมีค่า K_s (substrate half-saturation constants) ต่ำกว่ากลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrobacter* คือมีค่าอยู่ระหว่าง 0.14 - 0.15 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (Schramm และคณะ, 1999 และ Manser และคณะ, 2005) Ehrich และคณะ (1995) พบว่าปริมาณไนไตรต์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มประชากร NOB กลุ่ม *Nitrospira moscoviensis* มีค่าประมาณ 4.9 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร Bartosch และคณะ (1999) นำ *Nitrospira* จากตะกอนในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งมาเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณไนไตรต์ 41 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร แต่ไม่สำเร็จ เนื่องจาก แบคทีเรียสกุลดังกล่าวนี้จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตถ้ามีปริมาณไนไตรต์ 7 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

ในขณะที่งานวิจัยนี้ไม่พบกลุ่มประชากร NOB สกุล*Nirobacter* เนื่องจากแบคทีเรียสกุลดังกล่าวชอบอาศัยในสิ่งแวดล้อมที่มีปริมาณไนไตรต์สูง (Cebron และ Garnier, 2005) แบคทีเรียสกุลดังกล่าวมีลักษณะสมบัติเป็นแบบ R-strategists คือเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจนและความเข้มข้นไนไตรต์สูง (Kim et al, 2006) และมีค่า Ks สูงกว่ากลุ่มประชากร NOB สกุล *Nirospira* คือมีค่าประมาณ 0.3 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (Beccari และคณะ, 1979 และ Alleman และคณะ, 1984) ส่งผลให้แบคทีเรียสกุลดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตในสภาวะการทดลองซึ่งมีความเข้มข้นไนไตรต์ได้สูงกว่า 202.89 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (Bock และ Koops,

1992) แต่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ที่มีความเข้มข้นไนไตรต์ 405.79 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (Bartosh และคณะ, 2002)

4.1.4.2 ผลของความเค็มต่อกลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย

ในระบบเพาะเลี้ยงเพาะกุ้งที่มีความเค็มสูง ในงานวิจัยนี้ คือระบบเพาะเลี้ยงกุ้งที่มีความเค็มอยู่ในช่วง 15 - 43 พีพีที (จากตารางที่ 4.8) ได้แก่ ตัวอย่างที่มาจากระบบ OEPHSHD-1 OEPHSHD-2 OEPHSLD-2 OEPHSLD-3 IWRHSHD-1 และ AWRHSHD-1 พบกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* กระจายใน 2 Sublineage ได้แก่ SublineageII *(Nitrospira moscoviensis* lineage) และ SublineageIV (*Nitrospira marina* lineage) โดยส่วนใหญ่แล้วจำนวนโคโลนีทั้งหมดในตัวอย่างเดียวกันจะกระจายอยู่ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งอย่างชัดเจน (จากตารางที่ 4.8) ยกเว้นตัวอย่างจากระบบบำบัดคุณภาพน้ำของระบบบ่อในโรงเรือน (IWRHSHD-1) และระบบคุณภาพน้ำในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ (AWRHSHD-1) ที่มีการกระจายอยู่ทั้งสองกลุ่ม

ส่วนในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งความเค็มต่ำ คือระบบเพาะเลี้ยงกุ้งที่มีความเค็มอยู่ในช่วง 7 -15 พีพีที (จากตารางที่ 4.8) ได้แก่ ตัวอย่างจากระบบ OEPLSLD-1 OEPLSLD-2 และ OLPLSLD-1 พบกลุ่มประชากรกระจายใน 2 Sublineage เช่นกัน แต่จำนวนโคโลนีทั้งหมดในตัวอย่างเดียวกันจะกระจายอยู่ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งอย่างชัดเจน (ดังแสดงในตารางที่4.8)

โดยปกติแล้ว SublineageII *(Nitrospira moscoviensis* lineage) เป็นกลุ่มที่แบคทีเรียที่ทนต่อความเค็ม (halotolerance) (Ehrich และคณะ, 1995 และ Egli, 2003) แต่ในงานวิจัยส่วนใหญ่กลับพบ แบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวในสภาพแวดล้อมที่ไม่มีความเค็ม เช่น จากถังปฏิกรณ์ชีวภาพ การเพาะเลี้ยงน้ำจืด ดิน ทะเลสาบน้ำจืด (Ehrich และคณะ, 1995; Sugita และคณะ, 2004; Martiny ey al., 2005 และ Itoi และคณะ, 2007) นอกจากนี้แล้วสามารถเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีความเค็ม (Lebedeva และคณะ, 2008) แต่ Foesel et al (2007) พบ *Nitrospira* สกุลนี้ในระบบแผ่นฟิล์มชีวภาพในระบบเพาะเลี้ยงน้ำเค็มที่ความเค็ม 20 พีพีที ในขณะที่กลุ่มแบคทีเรียที่อยู่ SublineageIV (*Nitrospira marina* lineage) เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีความเค็ม (Halophillic) (Watson และคณะ, 1971, Koops และคณะ, 2001, Egli, 2003 และ Whang และคณะ, 2009) สามารถพบในสิ่งแวดล้อมและในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเค็มตั้งแต่ 4 - 40 พีพีที (Koops และ Roser, 2001; Cebron และ Granier, 2005; Foesel และคณะ, 2007; Sudarno และคณะ, 2010) ซึ่งความเค็มจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งที่ทำการศึกษามีค่าความเค็มอยู่ในช่วง 1- 43 พีพีที ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา (ดังแสดงในตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 สรุปกลุ่มประชากร NOB และปัจจัยสิ่งแวดล้อมของแต่ละตัวอย่างจากแต่ละระบบเพาะเลี้ยง

ระบบบ่อ	สกุล *Nitrobacter*	สกุล *Nitrospira*				ความหนาแน่นกุ้ง (ตัว/ตรม.)	ความเค็ม (พีพีที)	แอมโมเนียในดิน (ไมโครกรัมไนโตรเจนต่อกรัมดิน)	ไนไตร์ตในดิน (ไมโครกรัมไนโตรเจนต่อกรัมดิน)	ไนเตรตในดิน (ไมโครกรัมไนโตรเจนต่อกรัมดิน)	แอมโมเนียในน้ำ (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	ไนไตร์ตในน้ำ (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	ไนเตรตในน้ำ (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)
		SublineageI (*Nitrospira defluvi* lineage)	SublineageII (*Nitrospira moscoviensis* lineage)	Sublineage IV (*Nitrospira marina* lineage)	*Candidatus Nitrospira Bockiana*								
OEPHSHD-1	-	-	-	√√√√√√√√	-	62.5	16	4 ± 0.32	0.15 ± 0.26	6.56 ± 0.12	1.14 ± 0.45	1.96 ±0.34	4.23 ± 0.84
OEPHSHD-2	-	-	-	√√√√√√√√	-	188	15	3.3 ± 0.24	0.06 ± 0.14	5.53 ± 0.45	0.96 ± 0.35	0.2± 0.02	2.23 ± 0.54
OEPHSLD-2	-	-	√√√√√√√	-	-	1	26	0.3 ± 0.13	0.02 ± 0.23	8.11 ± 1.00	0.22 ± 0.14	0.04 ±0.01	4.81 ± 1.57
OEPHSLD-3	-	-	√√√√√√√√	-	-	22	18	9.35 ± 0.55	0.22 ± 0.13	10.2 ± 1.45	0.03 ± 0.01	0.01±0.001	1.66 ± 0.05
OEPLSLD-1	-	-	√√√√√√√√	-	-	1	6	6.1 ± 0.4	0.02 ± 0.01	68.4 ± 1.57	0.12 ± 0.04	0.006 ± 0.05	1.03 ± 0.04
OEPLSLD-2	-	-	-	√√√√√√√√	-	44	6	3.6 ± 0.12	0.17 ± 0.03	4.72 ± 1.76	0.46 ± 0.027	0.21±0.03	1.38 ± 0.23
OLPLSLD-1	-	-	√√√√√√√	-	-	1	11	ND	ND	ND	0.8 ± 0.35	0.05±0.49	0.46 ± 0.12
IWRHSHD-1	-	-	√	√√√	-	350	35	ND	ND	ND	0.075 ±0.02	0.07 ± 0.04	1.80 ± 0.54
AWRHSLD-1	-	-	√√√	√	-	0	43	ND	ND	ND	1.28 ± 0.39	0.07 ± 0.04	0.75 ± 0.01

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.5 จำนวนประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้ง

การศึกษาจำนวนกลุ่มประชากร NOB จากระบบเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยใช้วิธี realtime PCR ร่วมกับสี SYBR Green ซึ่งในการศึกษาส่วนนี้ใช้ไพร์เมอร์ชุดเดียวกับการศึกษากลุ่ม NOB คือใช้ไพร์เมอร์ P338f + NIT3 เพื่อศึกษาจำนวนกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrobacter* และใช้ไพร์เมอร์ P338f + Ntspa0685r สำหรับการศึกษาจำนวนกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* (ดังแสดงในหัวข้อ) ในการทดลองส่วนนี้ ทำการเลือกตัวแทนจากระบบบ่อดินกลางแจ้ง ระบบบ่อไร้ดินกลางแจ้งกลางแจ้ง ระบบบ่อในโรงเรือนที่มีการหมุนเวียนน้ำกลับมาใช้ใหม่ โดยเลือกตัวแทนมาระบบละ 1 ตัวอย่าง คือ OEPLSLD-1 OLPLSLD-1 IWRHSHD-1 และ AWRHSLD-1 ตามลำดับ

จากการทดลองส่วนนี้พบว่าไม่สามารถหาจำนวนกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrobacter* ได้ เนื่องจากมีจำนวนน้อยกว่า detection limit (10^{2} -10^{6} จำนวนเซลล์ต่อลิตร) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษากลุ่มประชากร *Nitrobacter* (ดังแสดงในหัวข้อที่ 4.1.3) เมื่อเปลี่ยนเป็นไพร์เมอร์ P338f + Ntspa0685r เพื่อศึกษากลุ่มประชากร *Nitrospira* พบว่าแต่ละระบบการเพาะเลี้ยงให้ปริมาณแบคทีเรียต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.9 จำนวน NOB จากตัวแทนจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งแต่ละระบบ

ระบบการเพาะเลี้ยง	ตัวอย่าง	จำนวน *Nitrobacter*		จำนวน *Nitrospira*	
		จำนวนยีนต่อหนึ่งหน่วยตัวอย่าง	จำนวนเซลล์ต่อหนึ่งตัวอย่าง [(1)]	จำนวนยีนต่อหนึ่งหน่วยตัวอย่าง	จำนวนเซลล์ต่อหนึ่งตัวอย่าง [(1)]
ระบบบ่อดินกลางแจ้ง	OEPLSLD-1	<LOD	<LOD	$(4.09 \pm 1.83) \times 10^{7}$ [(2)]	$4.09 \pm 1.83 \times 10^{7}$ [(2)]
ระบบบ่อไร้ดินกลางแจ้ง	OLPLSLD-1	<LOD	<LOD	$(4.42 \pm 1.66) \times 10^{7}$ [(3)]	$4.42 \pm 1.66 \times 10^{7}$ [(3)]
ระบบบ่อในโรงเรือน	IWRHSHD-1	<LOD	<LOD	$(1.39 \pm 0.19) \times 10^{12}$ [(4)]	$1.39 \pm 0.19 \times 10^{12}$ [(4)]
ระบบบำบัดคุณภาพน้ำในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ	AWRHSLD-1	<LOD	<LOD	$(1.06 \pm 0.70) \times 10^{9}$ [(2)]	$1.06 \pm 0.70 \times 10^{9}$ [(2)]

[(1)] ปริมาณ 1 copies 16S DNA = 1 cell ของ Nitrite Oxidizing bacteria (Nakamura และคณะ, 2006)

[(2)] หน่วย จำนวนเซลล์ต่อกรัมดิน/ตัวอย่าง

[(3)] หน่วย จำนวนเซลล์ต่อลิตร

[(4)] หน่วย จำนวนเซลล์ต่อมก.MLSS

ในปัจจุบันการศึกษาจำนวนกลุ่มประชากร NOB ในระบบสิ่งแวดล้อมด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล ยังไม่เป็นที่แพร่หลายมาก ซึ่งงานวิจัยที่มีอยู่เป็นการศึกษาตะกอนดินจากแม่น้ำซึ่งตั้งอยู่ใกล้บริเวณโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน ได้แก่ Cebron และ Garnier (2005) ศึกษาตะกอนดินริมแม่น้ำ Seine ประเทศฝรั่งเศส โดยวิธี cPCR และ Nakamura และคณะ (2006) ศึกษากลุ่มประชากร *Nitrospira* จากตะกอนดินริมแม่น้ำ Niida ประเทศญี่ปุ่นโดยใช้วิธี real time PCR ซึ่งทั้งสองงานวิจัยนี้ไม่ใช้ไพร์เมอร์เดียวกับการทดลองนี้

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนประชากร NOB สกุล *Nitrospira* จากตัวอย่างระบบบ่อเลี้ยงกุ้งกลางแจ้ง (OEPLSLD-1) และตัวอย่างตะกอนจากระบบบำบัดคุณภาพน้ำในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ (AWRHSLD-1) กับตัวอย่างดินในระบบสิ่งแวดล้อม คือตัวอย่างตะกอนดินริมแม่น้ำ Niida ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งมี จำนวน *Nitrospira* ในช่วง 2.7 - 9.6 × 10^7 จำนวนต่อกรัมดิน (Nakamura และคณะ, 2006) พบว่าจำนวน *Nitrospira* จาก OEPLSLD-1 มีค่าใกล้เคียงกับตะกอนในแม่น้ำ และตัวอย่าง AWRHSLD-1 มีจำนวน *Nitrospira* มากกว่าในตะกอนดิน

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบจำนวนประชากร NOB สกุล *Nitrospira* ในระบบบ่อในโรงเรือน (IWRHSHD-1) และกับจำนวนประชากร NOB สกุล *Nitrospira* ในตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงพยาบาล ตะกอนน้ำเสียชุมชน และโรงงานผลิตกระดาษ (ดังแสดงในตารางที่ 4.10) พบว่าจำนวน *Nitrospira* จากระบบบ่อในโรงเรือน มีจำนวนมากกว่าตะกอนในระบบบำบัดน้ำเสียจากสถานที่ดังกล่าว

ตารางที่ 4.10 จำนวน *Nitrospira* จากตัวอย่างตะกอนจากสถานที่ต่างๆ โดยวิธี real time PCR

ตัวอย่าง	**วิธีการติดตามการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ (DNA)**	**ประเภทไพร์เมอร์**	**จำนวน *Nitrospira* (จำนวนเซลล์ต่อมก. MLSS)**	**อ้างอิง**
ตะกอนจากโรงพยาบาล	SYBR Green I Dye	NSR113F +NSR1264R	(4.7±2.3) × 10^5	Geeta และคณะ, 2007
ตะกอนชุมชน	SYBR Green I Dye	NSR113F +NSR1264R	(1.8±0.8) × 10^7	
ตะกอนจากโรงงานผลิตกระดาษ	SYBR Green I Dye	NSR113F +NSR1264R	(1.1±0.4) × 10^7	

การใช้จุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำเสียจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจุลินทรีย์ที่เกษตรนิยมใช้อยู่ในรูปของน้ำสกัดชีวภาพ (EM) ส่วนประกอบหลักของน้ำหมักชีวภาพคือกลุ่มจุลินทรีย์หลายกลุ่มทำงานร่วมกัน หนึ่งในนั้น คือ แบคทีเรียกลุ่ม *Nitrobacter* (เกรียงศักดิ์ พูลสุข, 2546) แต่เนื่องจากที่ได้กล่าวได้ข้างต้นว่าปริมาณไนไตรต์ในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่มีค่าไม่สูงมากนัก และกลุ่มประชากร NOB ที่พบโดยส่วนใหญ่คือ กลุ่มประชากร NOB

สกุล *Nitrospira* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ชอบอาศัยในสิ่งแวดล้อมที่มีปริมาณไนไตรต์ต่ำๆ ดังนั้นการใช้น้ำหมักชีวภาพเพื่อบำบัดน้ำเสีย จึงไม่เป็นที่สมควร เนื่องจากกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrobacter* ไม่สามารถอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีปริมาณไนไตรต์ต่ำๆได้ ดังนั้นถ้าหากจะใช้น้ำหมักชีวภาพให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นควรมีพัฒนากลุ่ม *Nitrospira* แทนกลุ่ม *Nitrobacter*

การทดลองในช่วงที่ 1 เป็นศึกษากลุ่มประชากร NOB ในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งในระบบบ่อดินกลางแจ้ง ระบบบ่อไร้ดิน ระบบบ่อในโรงเรือน และระบบบำบัดคุณภาพน้ำในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ ครอบคลุมระบบระบบบ่อความเค็มสูง ระบบบ่อความเค็มต่ำ ระบบบ่อความหนาแน่นกุ้งสูงและระบบบ่อความหนาแน่นกุ้งต่ำ โดยใช้เทคนิค Specific-PCR-Cloning จากผลการทดลองพบว่าไม่มีการกระจายตัวของ NOB สกุล *Nitrobacter* แต่มีการกระจายตัวของกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* ได้แก่กลุ่ม *Nitrospira* SublineageIV (*Nitrospira marina* lineage) ในระบบบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทุกระบบ หลังจากนั้นทำการเลือกตัวแทนจากแต่ละระบบเพาะเลี้ยงรวม 4 ตัวอย่าง เพื่อทำการศึกษาประชากร NOB โดยใช้เทคนิค Real- time PCR ร่วมกับสี SYBR Green โดยใช้ไพร์เมอร์ชุดเดียวกับการศึกษากลุ่มประชากร NOB พบว่าไม่สามารถหาจำนวนกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrobacter* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษากลุ่มประชากร NOB ในขณะที่จำนวนกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* จากระบบเพาะเลี้ยงแบบบ่อดินกลางแจ้งและระบบบำบัดคุณภาพน้ำในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำมีค่าใกล้เคียงกับตะกอนดินในธรรมชาติ และจำนวน *Nitrospira* จากระบบบ่อในโรงเรือนมีจำนวนใกล้เคียงกับตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงพยาบาล โรงบำบัดน้ำเสียชุมชน และโรงงานผลิตกระดาษ และผลการทดลองส่วนนี้เป็นการยืนยันว่า ในทุกระบบการเพาะเลี้ยง กลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* เป็นกลุ่มประชากรเด่น ดังนั้นหากต้องการพัฒนาหัวเชื้อ NOB เพื่อใช้ในการบำบัดไนไตรต์ในระบบบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง ที่มีปริมาณไนไตรต์ต่ำ ควรพัฒนากลุ่ม NOB สกุล คือกลุ่ม *Nitrospira* SublineageIV (*Nitrospira marina* lineage)

4.2 <u>การทดลองส่วนที่ 2</u> การศึกษาผลกระทบของประเภทของสารประกอบไนโตรเจนต่ออัตราการกำจัดไนไตรต์และศึกษากลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการตรึงแล้วหลังจากผ่านการกำจัดไนไตรต์

<u>การทดลองย่อยส่วนที่ 1</u> ตรึงแบคทีเรียจากระบบบ่อเลี้ยงกุ้งในโรงเรือนบนตัวกรองชีวภาพโดยเลือกหัวเชื้อจากระบบที่มีการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันอย่างสมบูรณ์

เมื่อนำตัวกรองชีวภาพพลาสติกสำหรับใช้เป็นตัวยึดเกาะของแบคทีเรียที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปแช่ในระบบบ่อเลี้ยงกุ้งในโรงเรือนของศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (IWRHSHD-1) ซึ่งเป็นตัวแทนของหัวเชื้อจากระบบเพาะเลี้ยงกุ้งในโรงเรือนที่มีการเกิดกระบวนไนตริฟิเคชันอย่างสมบูรณ์ มนวิกานต์ ขจรบุญ, 2552 รายงาน การทดสอบประสิทธิภาพหัวเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่ตรึงอยู่บนตัวกรองชีวภาพจากระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเค็มแบบต่างๆในการบำบัด โดยแช่ตัวกรองในระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำบนผิวน้ำ ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 1.5 เดือน พบว่าตัวกรองที่ตรึงหัวเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียจาก ระบบบ่อเลี้ยงในโรงเรือน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีผลทำให้เกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันอย่างสมบูรณ์ เนื่องจากมีความเข้มข้นของไนเตรตเพิ่มขึ้นและไม่พบการสะสมของไนไตรต์ ดังนั้นในการตรึงตัวกรองในครั้งนี้จึงเลือกตรึงเชื้อจากระบบบ่อเลี้ยงกุ้งในโรงเรือน โดยแช่ตัวกรองดังกล่าวบนผิวหน้าน้ำ (ดังแสดงในรูปที่ 4.2) ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่าตัวกรองจะมีชั้นฟิล์มที่บางจนแทบจะมองไม่เห็น เคลือบอยู่บนผิวของวัสดุตัวกรอง หลังจากนั้นทำการศึกษากลุ่มประชากรและจำนวนไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรอง

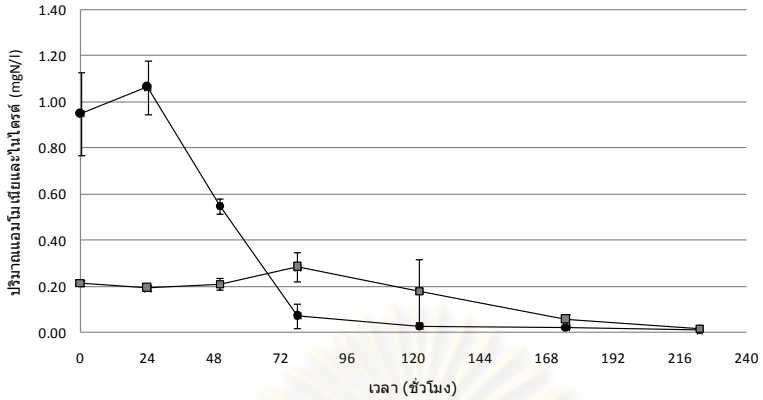
รูปที่ 4.2 การตรึงแบคทีเรียจากระบบบ่อเลี้ยงกุ้งในโรงเรือนบนตัวกรองชีวภาพ

<u>การทดลองย่อยส่วนที่ 2</u> การศึกษาผลกระทบของประเภทของสารประกอบไนโตรเจนต่ออัตราการกำจัดไนไตรต์

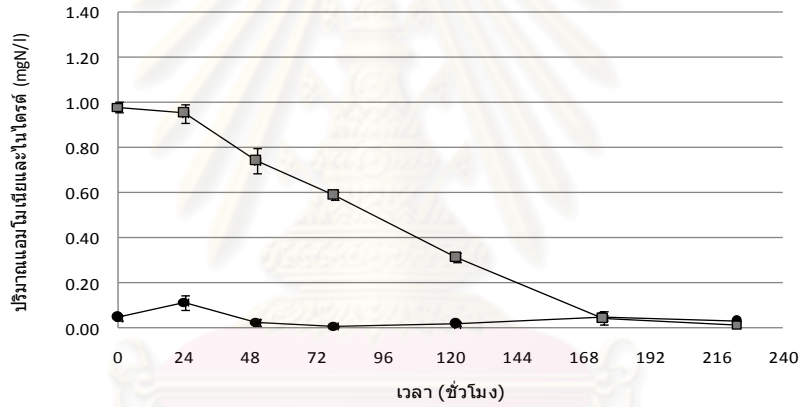
4.2.1 การบ่มตัวกรองด้วยสารประกอบไนโตรเจนด้วยที่ต่างกัน

เมื่อนำตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการตรึงมาทำการบ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนที่ต่างกัน โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองที่ 1 เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ชุดการทดลองที่ 2 เติมโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และชุดการทดลองที่ 3 เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรในถังปฏิกรณ์ที่บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 30 พีพีที ควบคุมออกซิเจนในแต่ละถัง ให้มากกว่า 4 มก./ล. และควบคุมค่าอัลคาไลนิตีให้มีค่าระหว่าง 100-120 มิลลิกรัมแคลเซียมคาร์บอเนตต่อลิตร ซึ่งแต่ละถังปฏิกรณ์บรรจุตัวกรองที่ผ่านการตรึงแล้วถังละ 300 ชิ้น (ดังแสดงในรูปที่ 4.3) ทำการทดลองจนกระทั่งปริมาณไนไตรต์ในแต่ละชุดการทดลองลดลงเหลือต่ำกว่า 0.1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

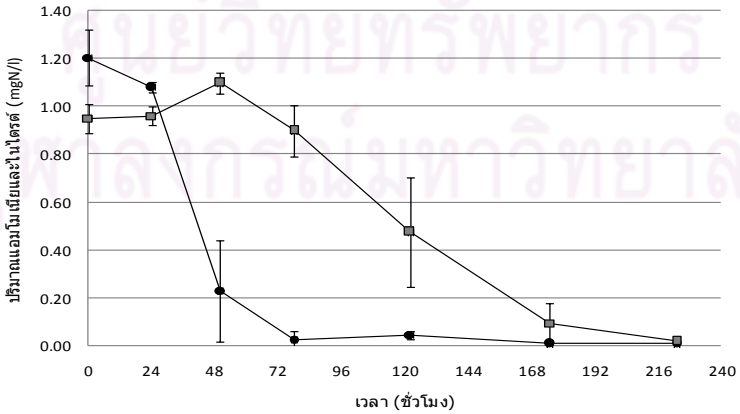
รูปที่ 4.3 การบำบัดสารประกอบไนโตรเจนต่างชนิดด้วยตัวกรองที่ผ่านการตรึง



รูปที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนจากชุดการทดลองที่ 1 (แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)



รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนจากชุดการทดลองที่ 2 (โซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)



รูปที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนจากชุดการทดลองที่ 3 (แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)

จากการศึกษาพบว่าตัวกรองจากทั้งสามชุดการทดลองสามารถลดความเข้มข้นของไนไตรต์ได้เหลือน้อยกว่า 0.05 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ภายในเวลา 216 ชั่วโมง โดยในชุดการทดลองที่ 1 (ชุดการทดลองที่มีการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ความเข้มข้นของแอมโมเนียในช่วง 24 ชั่วโมงแรกมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 0.9 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เป็น 1.0 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร หลังจากนั้นช่วง 24-72 ชั่วโมง ความเข้มข้นของแอมโมเนียลดลงอย่างรวดเร็วจาก 1.0 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ลดลงเหลือ 0.07 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นไนไตรต์ค่อยๆเพิ่มขึ้นจาก 0.21 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เป็น 0.28 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ภายในเวลา 72 ชั่วโมง และค่อยๆลดลงจนเหลือ 0.05 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ภายในเวลา 96 ชั่วโมง (ดังแสดงในรูป 4.4) ซึ่งคิดอัตราการกำจัดไนไตรต์ของชุดการทดลองนี้ได้ เท่ากับ 2.39×10^{-3} มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร / ชม. ชุดการทดลองที่ 2 (ชุดการทดลองที่มีการเติมโซเดียมไนไตรต์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ความเข้มข้นของแอมโมเนียมีค่าต่ำกว่า 0.1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตลอดการทดลอง ในขณะที่ความเข้มข้นของไนไตรต์ มีค่าลดลงตั้งแต่ 0.98 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรถึง 0.04 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ภายในเวลา 168 ชั่วโมง (ดังแสดงในรูป 4.5) ซึ่งคิดอัตราการกำจัดไนไตรต์ของชุดการทดลองนี้ได้ เท่ากับ 6.32×10^{-3} มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร / ชม. ชุดการทดลองที่ 3 (ชุดการทดลองที่มีการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์และโซเดียมไนไตรต์ ความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ความเข้มข้นของแอมโมเนียในช่วง 48 ชั่วโมงแรก ลดลงอย่างรวดเร็วจาก 1.2 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เหลือ 0.23 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และค่อยๆลดลงจนเหลือความเข้มข้นแอมโมเนียประมาณ 0.02 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ภายในเวลา 24 ชั่วโมงถัดไป ในขณะที่ความเข้มข้นไนไตรต์ จะค่อยๆเพิ่มขึ้นจาก 0.95 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เป็น 1.1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ภายในเวลา 48 ชั่วโมง และจะลดลงจน 0.09 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ภายในเวลา 168 ชั่วโมง (ดังแสดงในรูป 4.6) ซึ่งคิดอัตราการกำจัดไนไตรต์ของชุดการทดลองนี้ได้ เท่ากับ 8.36×10^{-3} มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร/ ชม.

ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำใน แต่ละชุดการทดลอง แสดงในตารางที่ 4.11 พบว่าพารามิเตอร์จากทุกแหล่งมีค่าอยู่ในระดับที่เหมาะสมกับการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชัน โดยค่าออกซิเจนละลายน้ำในถังปฏิกรณ์มีค่าอยู่ในช่วง 4.58-5.37 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเหมาะสมต่อการอาศัยและเติบโตของไนตริไฟอิงแบคทีเรีย สอดคล้องกับรายงานของ Hart และ O'sullivan (1993) ที่กล่าวว่าไนตริไฟอิงแบคทีเรียจะไม่สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียได้ที่ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำน้อยกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อตัวกรองไนตริฟิเคชันจะอยู่ในช่วง 6-9 แต่ค่าต่ำสุดที่มีผลทำให้ *Nitrosomonas spp.* และ *Nitrobacter spp.* ทำงานได้ดีมีค่า

ระหว่าง 6.5-7.0 (Lawson, 1995) โดยจากการทดลองนี้น้ำจากถังปฏิกรณ์ต่างๆมีความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในช่วง 6.74 -7.52 ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการทำงานของทั้ง AOB และ NOB นอกจากนี้ Timmons และ Losordo (1994) รายงานไว้ว่าตัวกรองไนตริฟิเคชันสามารถทำงานได้ในช่วงความเค็มที่กว้างตั้งแต่น้ำจืดจนถึงน้ำเค็มโดยมีค่าความเค็มเท่ากับ 40 พีพีที จากการทดลองนี้น้ำในถังปฏิกรณ์มีค่าความเค็มอยู่ในช่วง 31-34 พีพีที จึงไม่เป็นปัญหาต่อการทำงานของตัวกรองชีวภาพ และสำหรับอุณหภูมิของน้ำซึ่งในการทดลองนี้มีค่าอยู่ในช่วง 26.90-28.25 องศาเซลเซียส เป็นช่วงค่าอุณหภูมิที่อัตราการบำบัดแอมโมเนียสามารถเกิดขึ้นได้ โดย Hagopian และ Riley (1998) รายงานไว้ว่าอัตราการบำบัดแอมโมเนียจะมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับอุณหภูมิในช่วง 7-35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่มีความเหมาะสมที่สุดต่อไนตริไฟอิงแบคทีเรียคือ 25 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.11 ปัจจัยสิ่งแวดล้อมในชุดการทดลองบ่มตัวกรองด้วยสารประกอบไนโตรเจนที่ต่างกัน

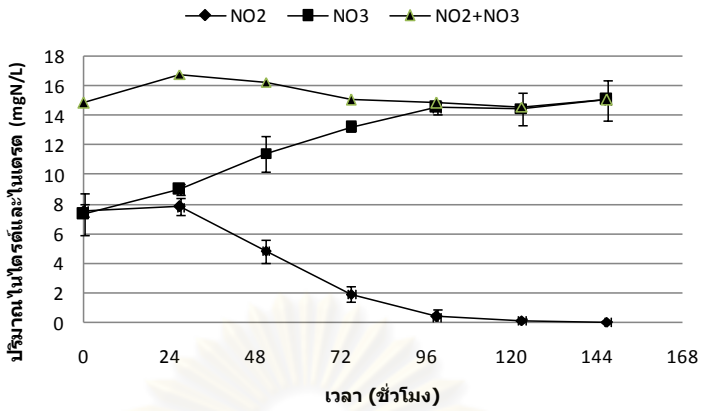
พารามิเตอร์ของน้ำ	**ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ค่าต่ำสุด – ค่าสูงสุด)**		
	ชุดการทดลองที่ 1	**ชุดการทดลองที่ 2**	**ชุดการทดลองที่ 3**
ออกซิเจนละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	5.15±0.43 (4.67-5.9)	5.0±0.24 (4.60-5.30)	5.04±0.25 (4.6-5.3)
ความเป็นกรด-ด่าง	7.27±0.18 (7.02-7.56)	7.40±0.19 (7.02-7.76)	7.29±0.284 (6.78-7.76)
ความเค็ม (พีพีที)	29.83±0.58 (29.00-31.00)	29.92±0.67 (29.00-31.00)	30±0.74 (29.00-31.00)
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	25.12±1.03 (23.2-27.2)	24.95±1.08 (23.2-27.2)	25.22±0.81 (24.2-26.6)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

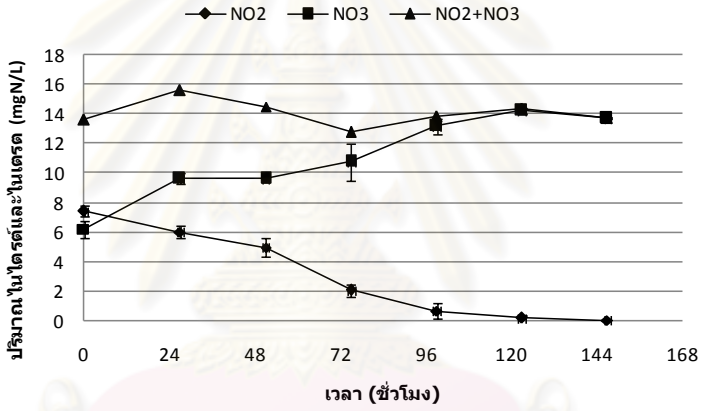
4.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพหัวเชื้อไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่ตรึงอยู่บนตัวกรองชีวภาพในการกำจัดไนไตรต์ 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

นำตัวกรองที่ผ่านการบ่มจากสารประกอบไนโตรเจน จากทั้ง 3 ชุดการทดลอง (จากหัวข้อ 4.2.1) มาทดสอบการกำจัดไนไตรต์ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 ใช้ตัวกรองจากชุดการทดลองที่ 1 (ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยบำบัดแอมโมเนียมคลอไรด์ 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ชุดการทดลองที่ 2 ใช้ตัวกรองจากชุดการทดลองที่ 2 (ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยโซเดียมไนไตรต์ 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) และชุดการทดลองที่ 3 ใช้ตัวกรองจากชุดการทดลองที่ 3 (ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์และโซเดียมไนไตรต์ อย่างละ 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) โดยให้ความเข้มข้นไนไตรต์เริ่มต้นที่ 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในถังปฏิกรณ์ที่บรรจุ น้ำทะเลความเค็ม 30 พีพีที ควบคุมออกซิเจนในแต่ละถัง ให้ได้ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และความควบคุมค่าอัลคาไลนิตี 100-120 มิลลิกรัมแคลเซียมคาร์บอเนตต่อลิตร ซึ่งแต่ละถังปฏิกรณ์บรรจุตัวกรองที่ผ่านการบ่มแล้วถังละ 300 ชิ้น ทดลองจนกระทั่งปริมาณไนไตรต์ในแต่ละชุดการทดลองลดลงเหลือต่ำ 0.1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (ดังแสดงในรูปที่ 4.7-4.9)

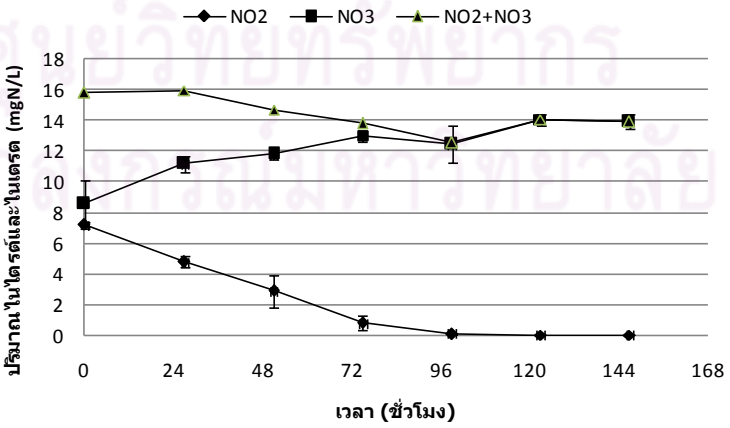
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.7 อัตราการลดลงของ ไนไตรต์ของตัวกรองจากชุดการบ่มที่ 1 (แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)



รูปที่ 4.8 อัตราการลดลงของ ไนไตรต์ของตัวกรอง จากชุดการบ่มที่ 2 (โซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)



รูปที่ 4.9 อัตราการลดลงของไนไตรต์ ของตัวกรอง จากชุดการบ่มที่ 3 (แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)

จากการทดสอบประสิทธิภาพหัวเชื้อไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่ตรึงอยู่บนตัวกรองชีวภาพจากชุดการทดลองต่างๆในการ กำจัดไนไตรต์ 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยการเปรียบเทียบความสามารถในการออกซิไดซ์ไนไตรต์เป็นไนเตรตของกลุ่มประชากร NOB ผลการทดลองพบว่าอัตราการกำจัดไนไตรต์ของตัวกรองทั้งสามชุดการทดลอง เกิดขึ้นอย่างชัดเจน มีผลทำให้ความเข้มข้นของ ไนไตรต์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด จนเหลือความเข้มข้นไนไตรต์ประมาณ 0.06 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นของไนเตรตก่อนทำการทดลองและเสร็จสิ้นการทดลองมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงมากนักในทุกชุดการทดลอง

อัตราการกำจัดไนไตรต์ของแต่ละชุดการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน คือ อัตราการกำจัดไนไตรต์ในชุดการทดลองที่ 1 และชุดการทดลองที่ 3 มีค่าเท่ากันคือ 0.092 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ต่อชั่วโมง และอัตราการกำจัดไนไตรต์ในชุดการทดลองที่ 2 มีค่าเท่ากับ 0.096 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อคิดอัตราการกำจัดไนไตรต์ต่อพื้นที่ตัวกรอง (การทดลองนี้ใช้ตัวกรองชนิด BCN 009 จำนวน 300 ตัวกรอง ซึ่งมีพื้นที่ผิว 0.97×10^{-3} ตารางเมตรต่อหนึ่งตัวกรอง) ได้ค่าดังนี้คือ อัตราการบำบัดไนไตรต์ในชุดการทดลองที่ 1 และชุดการทดลองที่ 3 มีค่าเท่ากับ 7.595 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรต่อวันต่อตารางเมตร ($mgN/L/d/m^2$) และชุดการทดลองที่ 3 มีอัตราการกำจัดไนไตรต์เท่ากับ 7.975 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรต่อวันต่อตารางเมตร ($mgN/L/d/m^2$)

ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำในถังปฏิกรณ์ที่ทำการตรวจวัดอัตราการบำบัด ไนไตรต์ของตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการตรึงหัวเชื้อจาก 3 ชุดการทดลอง แสดงในตารางที่ 4.12 พบว่าพารามิเตอร์จากทุกแหล่งมีค่าอยู่ในระดับที่เหมาะสมกับการเกิดกระบวนการ บำบัดไนไตรต์ โดยค่าออกซิเจนละลายน้ำในถังปฏิกรณ์มีค่าอยู่ในช่วง 4.6-5.9 mg/L ซึ่งเหมาะสมต่อการอาศัยและเติบโตของกลุ่มประชากร NOB สอดคล้องกับรายงานของ Hart และ O'sullivan (1993) ที่กล่าวว่าไนตริไฟอิงแบคทีเรียจะไม่สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียได้ที่ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำน้อยกว่า 2 มก./ล. ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อตัวกรอง ที่มีกลุ่มประชากร NOB จะอยู่ในช่วง 7 - 8 โดยจากการทดลองนี้น้ำจากถังปฏิกรณ์ต่างๆมีความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 7.00 – 7.62 ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการทำงานของ NOB นอกจากนี้ Timmons และ Losordo (1994) รายงานไว้ว่าตัวกรองไนตริฟิเคชันสามารถทำงานได้ในช่วงความเค็มที่กว้างตั้งแต่น้ำจืดจนถึงน้ำเค็มโดยมีค่าความเค็มเท่ากับ 40 พีพีที จากการทดลองนี้น้ำในถังปฏิกรณ์มีค่าความเค็มอยู่ในช่วง 29 – 31 พีพีที จึงไม่เป็น

ปัญหาต่อการทำงานของตัวกรองชีวภาพ และสำหรับอุณหภูมิของน้ำซึ่งในการทดลองนี้มีค่าอยู่ในช่วง 23.2 – 27.2 องศาเซลเซียส เป็นช่วงค่าอุณหภูมิที่อัตราการบำบัดไนไตรต์สามารถเกิดขึ้นได้

ตารางที่ 4.12 ปัจจัยสิ่งแวดล้อมในชุดการทดลองบำบัดไนไตรต์ด้วยตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนต่างชนิดกัน

พารามิเตอร์ของน้ำ	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ค่าต่ำสุด – ค่าสูงสุด)		
	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 3
ออกซิเจนละลายน้ำ (มก./ล.)	5.4 ± 0.237 (5.1 - 5.9)	5.15 ± 0.43 (4.60 - 5.80)	5.20 ± 0.16 (5.0 - 5.6)
ความเป็นกรด-ด่าง	7.27 ± 0.18 (7.02 - 7.56)	7.40 ± 0.20 (7.02 - 7.76)	7.31 ± 0.23 (7.0 - 7.76)
ความเค็ม (พีพีที)	29.83±0.58 (29.00-31.00)	29.92±0.67 (29.00-31.00)	30±0.74 (29.00-31.00)
อุณหภูมิ (˚ซ)	25.13 ± 1.03 (23.2 - 27.2)	25.1 ± 0.93 (24.2 - 27.2)	25.20 ± 0.78 (24.2 - 26.6)

การทดลองย่อยส่วนที่ 3 กลุ่มประชากรและจำนวนไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย บนตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนที่ต่างกันและตัวกรองที่ผ่านการวัดอัตราการกำจัดไนไตรต์

4.2.3 กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนที่ต่างกันและตัวกรองที่ผ่านการวัดอัตราการบำบัดไนไตรต์

การศึกษากลุ่มประชากร NOB บนตัวกรอง ที่ผ่านการตรึงหลังการบ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนที่ต่างกัน ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 บ่มตัวกรองด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (ใช้อักษรย่อเป็น A) ชุดการทดลองที่ 2 บ่มตัวกรองด้วยโซเดียมไนไตรต์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (ใช้อักษรย่อเป็น N) และชุดการทดลองที่ 3 บ่มตัวกรองด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์และโซเดียมไนไตรต์ความเข้มข้นสารละ 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (ใช้อักษรย่อเป็น A+N) และศึกษากลุ่มประชากร NOB บนตัวกรองที่ผ่านการวัดอัตราการกำจัดไนไตรต์ 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 ใช้ตัวกรองที่บ่มจากชุดการทดลองที่ 1 (ใช้อักษรย่อเป็น Test_A) ชุดการทดลองที่ 2 ใช้ตัวกรองที่บ่มจากชุดการทดลองที่ 2 (ใช้อักษรย่อเป็น Test_N) และชุดการทดลองที่ 3 ใช้ตัวกรองที่บ่มจากชุดการ

ทดลองที่ 3 (ใช้อักษรย่อเป็น Test_A+N) รวมชุดการทดลองทั้งสิ้นทั้ง 6 ชุดการทดลองโดยจะทำการศึกษากลุ่มประชากร NOB โดยใช้วิธี Specific PCR amplification-cloning แล้วทำการสุ่มตัวอย่างละ 8 โคโลนีต่อชุดการทดลอง เพื่อทำการอ่านรหัสพันธุกรรม ผลการทดลองพบว่าจากชุดการทดลองทั้งหมด 6 ชุดการทดลอง พบกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* เมื่อใช้ชุดไพรเมอร์ P338f และ Ntspa0685r ในทุกชุดการทดลอง แต่เมื่อเปลี่ยนชุดไพรเมอร์เป็น P338f และ NIT3 เพื่อศึกษากลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrobacter* พบว่าไม่พบ แบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว ในทุกชุดการทดลอง

เมื่อนำรหัสพันธุกรรมที่ได้จากการ จากการถอดรหัสพันธุกรรม ด้วยไพรเมอร์ P338f และ Ntspa0685r มาทำการวิเคราะห์ Homology Search ด้วยโปรแกรม Blast (ดังแสดงในตารางที่ 4.13) ผลจากการทำ Homology Search พบว่ารหัสพันธุกรรมที่ได้มีความใกล้เคียงกับรหัสพันธุกรรมของกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitropira* ในระบบฐานข้อมูล ซึ่งแสดงว่าไพรเมอร์นี้มีความเฉพาะเจาะจงกับ แบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว โดยมีความใกล้เคียงกับ กลุ่มประชากร NOB ในฐานข้อมูลในช่วง 94-99%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.13 ความเหมือนของรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างตัวกรองและฐานข้อมูล

ตัวอย่าง	หมายเลขโคลน	คะแนน	ความเหมือน	ช่องว่าง	รหัสประจำตัว Accession Number	สิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียง	แหล่งที่มา
ชุดการทดลองที่ 1 เติม NH_4Cl ความเข้มข้น 1 mgN/L	A_3	520	EU315579	2/316 (0%)	EU315579	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 925-C8	uncultured Nitrospirae bacterium
	A_8	538	EU315579	2/316 (0%)	EU315579	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 925-C8	uncultured Nitrospirae bacterium
	A_14	527	EU315579	2/316 (0%)	EU315579	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 925-C8	uncultured Nitrospirae bacterium
	A_20	521	EU315579	2/316 (0%)	EU315579	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 925-C8	uncultured Nitrospirae bacterium
	A_21	-					
	A_22	575	EF665721	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp.
	A_23	532	EU315579	2/316 (0%)	EU315579	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 925-C8	uncultured Nitrospirae bacterium
ชุดการทดลองที่ 2 เติม $NaNO_2$ ความเข้มข้น 1 mgN/L	N1_1	575	327/335 (97%)	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp.
	N1_2	555	311/316 (98%)	2/316 (0%)	EU315579	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 925-C8	uncultured Nitrospirae bacterium
	N1_3	575	327/335 (97%)	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp.
	N1_7	569	326/335 (97%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	N1_8	532	307/316 (97%)	2/316 (0%)	EU315579	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 925-C8	uncultured Nitrospirae bacterium
	N1_14	569	326/335 (97%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	N1_17	544	309/316 (97%)	2/316 (0%)	EU315579	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 925-C8	uncultured Nitrospirae bacterium
ชุดการทดลองที่ 3 เติม NH_4Cl และ $NaNO_2$ ความเข้มข้น 1 mgN/L	A+N1_1	569	326/335 (97%)	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp.
	A+N1_3	564	325/335 (97%)	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp.
	A+N1_4	508	317/337 (94%)	4/337 (1%)	EF018873	Uncultured Nitrospiraceae bacterium clone Amb_16S_1357	uncultured Nitrospiraceae bacterium
	A+N1_6	536	307/316 (97%)	2/316 (0%)	EU315579	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 925-C8	uncultured Nitrospirae bacterium
	A+N1_7	527	317/336 (94%)	2/336 (0%)	EU315579	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 925-C8	uncultured Nitrospirae bacterium
	A+N1_20	584	330/337 (97%)	0/337 (0%)	AB113596	Uncultured Nitrospira sp.clone: HAuD-MB7	uncultured Nitrospira sp.Bacteria;

ตารางที่ 4.13 ความเหมือนของรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างตัวกรองและฐานข้อมูล

ตัวอย่าง	หมายเลขโคลน	คะแนน	ความเหมือน	ช่องว่าง	รหัสประจำตัว Accession Number	สิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียง	แหล่งที่มา
ชุดการทดลองที่ 1 วัดการกำจัดไนไตรต์โดยใช้ตัวกรองจากการบ่มด้วย NH_4Cl	Test_A_4		326/335 (97%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	Test_A_5		326/335 (97%),	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	Test_A_6	-					
	Test_A_7	569	326/335 (97%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	Test_A_8	529	305/314 (97%)	2/314 (0%)	EU315579	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 925-C8	uncultured Nitrospirae bacterium
	Test_A_17	544	309/316 (97%)	2/316 (0%)	EU315579	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 925-C8	uncultured Nitrospirae bacterium
	Test_A_18	569	326/335 (97%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	Test_A_20	575	327/335 (97%)	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp.
	Test_A_21	569	326/335 (97%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
ชุดการทดลองที่ 2 วัดการกำจัดไนไตรต์โดยใช้ตัวกรองจากการบ่มด้วย $NaNO_2$	Test_N_3	584	330/337 (97%)	0/337 (0%)	AB113596	Uncultured Nitrospira sp. clone: HAuD-MB7	uncultured Nitrospira sp.
	Test_N_4	544	309/316 (97%)	2/316 (0%)	EU315579	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 925-C8	uncultured Nitrospirae bacterium
	Test_N_6	575	327/335 (97%)	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp.
	Test_N_8	-	213/214 (99%)	0/214 (0%)	EU558528	Arabidopsis lyrata clone CACTA2	
	Test_N_9	575	327/335 (97%)	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp.
	Test_N_11	507	304/319 (95%)	0/319 (0%)	GU230449	Uncultured actinobacterium clone ARTE12_222	
	Test_N_12	547	322/335 (96%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	Test_N_13	758	423/429 (98%)	2/429 (0%)	EU558522	Arabidopsis lyrata clone Gypsy21.	
	Test_N_19	558	324/335 (96%)	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospira sp.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

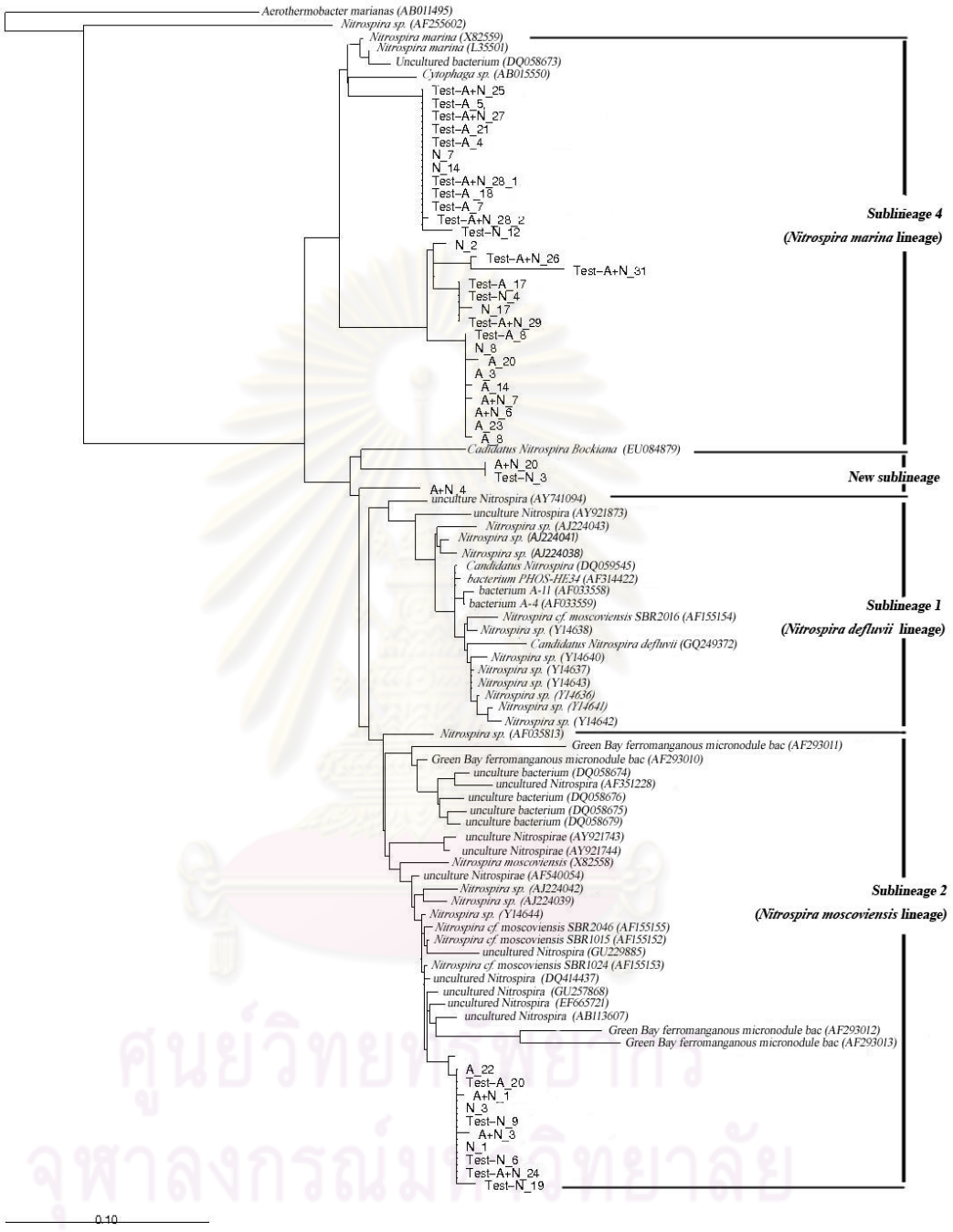
ตารางที่ 4.13 ความเหมือนของรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างตัวกรองและฐานข้อมูล

ตัวอย่าง	หมายเลขโคลน	คะแนน	ความเหมือน	ช่องว่าง	รหัสประจำตัว Accession Number	สิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียง	แหล่งที่มา
ชุดการทดลองที่ 3 วัดการกำจัดไนไตรต์โดยใช้ตัวกรองจากการบ่มด้วย NH_4Cl และ $NaNO_2$	AMNT10_24	575	327/335 (97%)	0/335 (0%)	EF665721	Uncultured Nitrospira sp. clone GASP-MB3S3_A07	uncultured Nitrospirae bacterium
	AMNT10_25	569	326/335 (97%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	AMNT10_26	547	323/336 (96%)	3/336 (0%)	EU374031	Uncultured Nitrospirae bacterium clone HCM3MC90_10E_FF_RP3	uncultured Nitrospirae bacterium
	AMNT10_27	564	326/336 (97%)	1/336 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	AMNT10_28_1	569	326/335 (97%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	AMNT10_28_2	564	325/335 (97%)	0/335 (0%)	FJ024315	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 31	uncultured Nitrospirae bacterium
	AMNT10_29	544	309/316 (97%)	2/316 (0%)	EU315579	Uncultured Nitrospirae bacterium clone 925-C8	uncultured Nitrospirae bacterium
	AMNT10_31	462	307/333 (92%)	11/333 (3%)	EU374031	Uncultured Nitrospirae bacterium clone HCM3MC90_10E_FF_RP3.	uncultured Nitrospirae bacterium

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลังจากนั้นนำรหัสพันธุกรรมที่ได้พร้อมกับรหัสพันธุกรรมของ *Nitrospira* ที่เคยพบในอดีตมาสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธีการคำนวณ สองแบบ (Distance metrix และ Maximum Parsimony) เพื่อเปรียบเทียบกัน พบว่าการจัดกลุ่ม *Nitrospira* จาก Phylogenetic tree ที่ได้จากวิธีการคำนวณทั้งสองแบบ ให้ผลการจัดกลุ่มเหมือนกัน (ดังแสดงในภาคผนวก ข) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ารหัสพันธุกรรมที่ทำการวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือ และไม่ว่าจะใช้วิธีการคำนวณแบบใดก็ให้ผลเหมือนกัน จากรูปที่ 4.10 แสดง Phylogenetic tree ของ 16s ของ *Nitrospira* จากการคำนวณโดยวิธี Neighbor joining (Distance matrix) พบว่าลำดับนิวคลิโอไทด์ที่ผ่านการอ่านรหัสพันธุกรรมจากตัวกรองจากทั้ง 6 ชุดการทดลอง มีการกระจายตัวอยู่ใน 2 Sublineage ที่ความเหมือนของรหัสพันธุกรรม 90% ตามการศึกษาของ Daim และคณะ (2001) คือ กลุ่ม SublineageII (*Nitrospira moscoviensis* lineage) และ SublineageIV (*Nitrospira marina* lineage) นอกจากนี้ยังมีกลุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์จากบางตัวอย่างกระจายอยู่ในกลุ่มใหม่ คือกลุ่มของ *Cadidatus Nitrospira Bockiana* ซึ่งเป็นกุล่มที่ยังไม่ได้มีการจัดลำดับไว้ใน phylogenetic tree (Lebedeva และคณะ, 2008)

นอกจากนี้รหัสพันธุกรรมที่ได้จากตัวอย่างตัวกรอง พบว่ามีการกระจายตัวแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกคือ ตัวอย่างที่มีการกระจายตัวของประชากร NOB ในกลุ่ม SublineageII (*Nitrospira moscoviensis* lineage) และ SublineageIV (*Nitrospira marina* lineage) ได้แก่ ชุดการทดลอง A ชุดการทดลอง N ชุดการบำบัด Test_A และชุดการบำบัด Test_A+N กลุ่มสองคือ ตัวอย่างที่มีการกระจายตัวของประชากร NOB ในกลุ่ม SublineageII (*Nitrospira moscoviensis* lineage) SublineageIV (*Nitrospira marina* lineage) และกลุ่มที่มี *Cadidatus Nitrospira Bockiana* ได้แก่ ชุดการทดลอง A+N และชุดการบำบัด Test_N โดยจำนวนโคโลนีจากตัวกรองแต่ละชุดการทดลองให้ผลเหมือนกันคือ จำนวนโคโลนีจากกลุ่ม SublineageIV (*Nitrospira marina* lineage) มีจำนวนมากกว่า SublineageII (*Nitrospira moscoviensis* lineage) และกลุ่มที่มี *Cadidatus Nitrospira Bockiana* ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.14



รูปที่ 4.10 phylogenectic tree สร้างโดยเพิ่ม sequence ของตัวอย่างจากชุดการทดลองการบ่มตัวกรองด้วยสารประกอบไนโตรเจนต่างชนิดกันและชุดการทดลองการกำจัดไนไตรต์ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยใช้วิธี parsimony method ลงใน phylogenetic ที่สร้างมาจาก sequence ของ *Nitrospira* ทั้งหมด (ที่มีความยาวมากกว่า 1000 bp) โดยใช้วิธี neighbor joining (distance matrix)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.14 สรุปการกระจายตัวของกลุ่มประชากร NOB ในแต่ละตัวอย่างจากตัวกรองแต่ละชุดการทดลอง

ชุดการทดลอง	ตัวอย่าง	*Nitrobacter*	*Nitrospira*			
			***Sublineage 1 Nitrospira deflivii* lineage**	***Sublineage 2 Nitrospira moscoviensis* lineage**	***Sublineage 4 Nitrospira marina* lineage**	***Cadidatus Nitrospira Bockiana***
แผ่นฟิล์มชีวภาพจากระบบบ่อโรงเรือน	IWRHSHD-1	-	-	√√√	√	-
ชุดการทดลองตัวกรองที่ผ่านการวัดอัตราการบำบัดสารประกอบไนโตรเจน	A	-	-	√	√√√√√	-
	N	-	-	√√	√√√√√	
	A+N	-	-	√√	√√	√
ชุดการทดลองตัวกรองที่ผ่านการวัดอัตราการบำบัดไนไตรต์	Test_A	-	-	√	√√√√√√√	
	Test_N	-	-	√√√	√√	√
	Test_A+N	-	-	√	√√√√√√√	-

√ จำนวนโคลนของแต่ละตัวอย่างที่พบในแต่ละSublineage

- ไม่พบแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว

จากตารางที่ 4.13 พบว่ามีตัวอย่างจากแต่ละชุดการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากร NOB น้อยมาก คือ กลุ่มประชากร NOB จากแผ่นฟิล์มชีวภาพ (IWRHSHD-1) ซึ่งเป็นหัวเชื้อสำหรับการตรึงไนตริฟายอิงแบคทีเรียและตัวกรองจากทั้งสองชุดการทดลอง มีการกระจายของกลุ่มประชากร NOB ออกเป็น 2 กลุ่มคือ *Nitrospira marina* และ *Nitrospira moscoviensis* แต่ยังมีบางชุดการทดลองที่มีการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากร NOB ได้แก่ ชุดการทดลองใช้บ่มตัวกรองด้วยสารประกอบแอมโมเนียและไนไตรต์ (A+N) มีการกระจายตัวในกลุ่ม 2 กลุ่มคือ *Nitrospira marina* และ *Nitrospira moscoviensis* หลังจากนั้นนำตัวกรองนี้ไปบำบัดไนไตรต์ พบว่ามีการกระจายตัวเพิ่มมาเป็น 3 กลุ่ม คือ *Nitrospira marina* *Nitrospira moscoviensis* และกลุ่มที่มีแบคทีเรียกลุ่ม *Cadidatus Nitrospira Bockiana* ซึ่งในทางตรงกันข้ามกับชุดการทดลองที่บ่มตัวกรองด้วยสารประกอบแอมโมเนียและไนไตรต์ คือกลุ่มประชากร NOB บนตัวกรองที่ผ่านการบ่มมีการกระจายใน 3 กลุ่มคือ *Nitrospira marina* และ *Nitrospira moscoviensis* และกลุ่มที่มีแบคทีเรียกลุ่ม *Cadidatus Nitrospira Bockiana* หลังจากนั้นนำตัวกรองนี้ไปบำบัดไนไตรต์ พบว่ามีการกระจายตัวลดลงเหลือ 2 กลุ่ม คือ *Nitrospira marina* และ*Nitrospira moscoviensis*

จากผลการทดลอง (ดังแสดงในรูปที่ 4.10 และตารางที่ 4.13) ไม่พบ NOB กลุ่ม *Nitrobacter* แต่จะพบกลุ่ม *Nitrospia* ซึ่ง สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาในอดีตซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นไนไตรต์เป็นปัจจัยหลักที่บ่งชี้ว่าในระบบสิ่งแวดล้อมจะพบ *Nitrobacter* หรือ *Nitrospira* (Both และคณะ, 1992; Bartosch และคณะ, 1999; Bartosch และคณะ, 2000; Wagner และ Loy, 2002; Gieseke และคณะ, 2003; Kim และ Kim, 2006) โดย *Nitrospira* เป็นกลุ่มแบคทีเรียพบในสิ่งแวดล้อมที่มีความเข้มข้นไนไตรต์ต่ำ (Cebron และ Garnier, 2005) เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวมีลักษณะสมบัติแบบ K-strategists คือจะเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจนและความเข้มข้นไนไตรต์ต่ำ (Kim และคณะ, 2006) Schramm และคณะ (1999) และ Maixner และคณะ (2006) ได้คำนวณค่า K_m ของ *Nitrospira marina* ประมาณ 0.14 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร Ehrich et al (1995) ทำการศึกษาถึงความเข้มข้นของไนไตรต์ที่เหมาะกับการเจริญเติบโตของ *Nitrospira moscoviensis* พบว่ามีค่าประมาณ 4.9 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร Bartosch และคณะ (1999) ได้นำ *Nitrospira* จากตะกอนในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งมาเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของไนไตรต์ 41 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร แต่ไม่สำเร็จ เนื่องจาก *Nitrospira* จะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นไนไตรต์ 7 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (Bock และ Koops, 1992) ในขณะที่การทดลองนี้ไม่พบกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrobacter* เนื่องจากแบคทีเรียสกุลดังกล่าวเจริญเติบโตในสิ่งแวดล้อมที่มีปริมาณไนไตรต์สูง มีลักษณะสมบัติเป็นแบบ R-strategists คือเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจนและความเข้มข้นไนไตรต์สูง (Kim และ Kim, 2006) ส่งผลให้แบคทีเรียสกุลดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตในสภาวะการทดลองซึ่งมีปริมาณไนไตรต์ได้ตั้งแต่ 200 – 1000 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (Bock และ Koops, 1992; Kim และ Kim, 2006) และสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ที่มีปริมาณไนไตรต์ 2000 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (Bartosh และคณะ, 2002)

ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคนิคระดับโมเลกุลในการวิเคราะห์กลุ่มประชากร NOB ซึ่งมีหลายงานวิจัยที่นำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้เช่น ใช้เทคนิค PCR-Cloning ศึกษากลุ่มประชากรแบคทีเรียบนแผ่นฟิล์มชีวภาพ ในระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Sugita และคณะ, 2004 และ Itoi และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้เทคนิค FISH เพื่อศึกษากลุ่มประชากรแบคทีเรียบนแผ่นฟิล์มชีวภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม (Foesel และคณะ, 2007) เช่นเดียวกับงานวิจัยนี้คือศึกษากลุ่มประชากร NOB บนแผ่นชีวภาพบนตัวกรองในระบบบำบัดที่มีความเค็ม ผลการทดลองเป็นดังนี้ คือ ในการทดลองบ่มตัวกรองด้วยสารประกอบไนโตรเจนที่ต่างกัน (A1, N1 และ A+N1) และชุดการทดลองตัวกรองที่ผ่านการวัดอัตราการบำบัดไนไตรต์ (Test_A, Test_Nและ Test A+N)

(ดังแสดงในตารางที่) พบ NOB กลุ่ม *Nitrospira marina* lineage เป็นส่วนใหญ่ เนื่องจาก NOB กลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่พบในสิ่งแวดล้อมที่มีความเค็มตั้งแต่ 4-30 พีพีที (Koops และ Roser, 2001; Cebron และ Granier, 2005; Foesel และคณะ, 2007; Sudarno และคณะ, 2010) นอกจากนี้ยังเป็นกลุ่ม *Nitrospira moscoviensis* lineage Nitrospira กลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่ส่วนใหญ่พบในสภาพแวดล้อมที่ไม่มีความเค็ม เช่น จากถังปฏิกรณ์ชีวภาพ การเพาะเลี้ยงน้ำจืด ดิน ทะเลสาบ (Ehrich และคณะ, 1995; Sugita และคณะ, 2004; Martiny ey al., 2005 และ Itoi และคณะ, 2007) แต่ Foesel และคณะ, 2007 พบ NOB กลุ่มนี้ในระบบแผ่นฟิล์มชีวภาพในระบบเพาะเลี้ยงน้ำเค็ม ความเค็ม 20 พีพีที ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองส่วนนี้ คือในการทดลอง

นอกจากนี้ยังพบกลุ่ม *Cadidatus Nitrospira Bockiana* ในตัวอย่างจากชุดทดลองบ่มตัวกรองด้วยสารประกอบไนโตรเจนที่ต่างกัน (A และ N) และชุดการทดลองตัวกรองที่ผ่านการวัดอัตราการบำบัดไนไตรต์ (Test_A และ Test_N) ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียนี้เป็นกลุ่มที่เพิ่งพบใหม่ ยังไม่มีการจัดกลุ่ม โดยพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง เช่น น้ำร้อนใต้ผิวดิน น้ำร้อนใต้ทะเลลึก และสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียนี้ได้ในอุณหภูมิประมาณ 42-46^{O}C (Lebedeva และคณะ, 2008)

4.2.4 จำนวนประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนที่ต่างกันและตัวกรองที่ผ่านการวัดอัตราการกำจัดไนไตรต์

การศึกษาจำนวน NOB บนตัวกรองจากทั้ง 2 ชุดการทดลอง โดยใช้วิธี realtime PCR ร่วมกับสี SYBR Green ซึ่งในการศึกษาส่วนนี้ใช้ไพร์เมอร์ชุดเดียวกับการศึกษากลุ่มประชากร NOB คือใช้ไพร์เมอร์ P338f + NIT3 เพื่อศึกษากลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrobacter* และใช้ไพร์เมอร์ P338f + Ntspa0685r สำหรับกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* (ดังแสดงในหัวข้อ 4.1.5) พบว่า ไม่สามารถหาจำนวนกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrobacter* ได้ เนื่องจากมีจำนวนน้อยกว่า detection limit (10^{2}-10^{7} จำนวนต่อลิตร) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษากลุ่มประชากร *Nitrobacter* จากทั้ง 2 ชุดการทดลอง (ในการทดลองย่อยส่วนที่ 3) เมื่อเปลี่ยนเป็นไพร์เมอร์ P338f + Ntspa0685r เพื่อศึกษากลุ่มประชากร *Nitrospira* พบว่าแต่ละชุดการทดลองให้ปริมาณแบคทีเรียต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.15 และรูปที่ 4.11

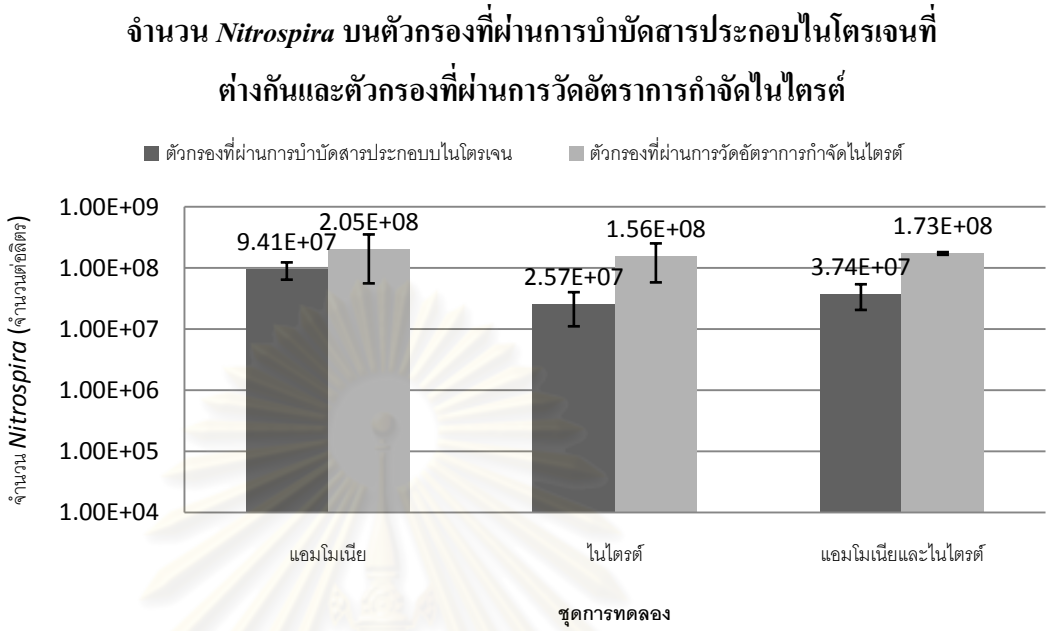
ตารางที่ 4.15 จำนวน NOB จากตัวกรองจากทั้ง 2 ชุดการทดลอง

ชุดการทดลอง	**ตัวอย่าง**	**จำนวน *Nitrobacter* (จำนวนต่อลิตร)**	**จำนวน *Nitrospira* (จำนวนยีนต่อลิตร)**	**จำนวน *Nitrospira* (จำนวนต่อลิตร)***
แผ่นฟิล์มชีวภาพจากระบบบ่อภโรงเรือน	IWRHSHD-1	<LOD	$(1.39 \pm 0.19) \times 10^{12}$ **	$1.39 \pm 0.19 \times 10^{12}$
ตัวกรองที่ผ่านการบ่ม	A	<LOD	$(9.41 \pm 2.96) \times 10^{7}$	$9.41 \pm 2.96 \times 10^{7}$
	N	<LOD	$(2.57 \pm 1.46) \times 10^{7}$	$2.57 \pm 1.46 \times 10^{7}$
	A+N	<LOD	$(3.74 \pm 1.68) \times 10^{7}$	$3.74 \pm 1.68 \times 10^{7}$
ตัวกรองที่ผ่านการวัดอัตราการกำจัดไนไตรต์	Test_A	<LOD	$(2.05 \pm 1.49) \times 10^{8}$	$2.05 \pm 1.49 \times 10^{8}$
	Test_N	<LOD	$(1.56 \pm 0.98) \times 10^{8}$	$1.56 \pm 0.98 \times 10^{8}$
	Test_A+N	<LOD	$(3.33 \pm 0.08) \times 10^{8}$	$3.33 \pm 0.08 \times 10^{8}$

* ปริมาณ 1 copies 16S DNA = 1 cell ของ Nitrite Oxidizing bacteria (Nakamura และคณะ, 2006)

** หน่วย จำนวนเซลล์ต่อมก.MLSS

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.11 จำนวน *Nitrospira* บนตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนที่ต่างกันและตัวกรองที่ผ่านการวัดอัตราการกำจัดไนไตรต์

จากตารางที่ 4.15 และรูปที่ 4.11 แสดงให้เห็นว่าจำนวน *Nitrospira* บนตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนที่ต่างกัน มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก คือ ในชุดการทดลองที่ใช้ตัวกรองบำบัดสารประกอบแอมโมเนีย (A) มีค่ามากที่สุด คือ 9.41×10^7 จำนวนเซลล์ต่อลิตร รองลงมาได้แก่ชุดการที่ใช้ตัวกรองบำบัดสารประกอบแอมโมเนียและไนไตรต์ (A+N) มีจำนวน *Nitrospira* เท่ากับ 3.74×10^7 จำนวนเซลล์ต่อลิตร และชุดการทดลองที่ใช้ตัวกรองบำบัดสารประกอบไนไตรต์ (N) มีจำนวน *Nitrospira* เท่ากับ 2.57×10^7 จำนวนเซลล์ต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบจำนวน *Nitrospira* และอัตราการกำจัดไนไตรต์ระหว่างการบำบัดสารประกอบไนโตรเจน (ในหัวข้อที่ 4.2.1) พบว่าจำนวน *Nitrospira* และ อัตราการกำบำบัดไนไตรต์ไม่สัมพันธ์กัน คือ แนวโน้มของอัตราการกำจัดไนไตรต์ระหว่างการบ่มของชุดการทดลอง ที่ใช้บ่มตัวกรองด้วยสารประกอบไนโตรเจนที่ต่างกัน เป็นดังนี้ คืออัตราการกำจัดไนไตรต์ของตัวกรองที่บ่มด้วยสารประกอบแอมโมเนียและไนไตรต์ (A+N) มีค่ามากว่าชุดการทดลองที่ใช้ตัวกรอง ที่บ่มด้วยไนไตรต์และแอมโมเนียตามลำดับ

ในชุดการทดลองที่ใช้ตัวกรองซึ่งผ่านการบ่มสารประกอบไนโตรเจนต่างกันและวัดอัตราการบำบัดไนไตรต์ พบว่าจำนวน *Nitrospira* บนตัวกรองที่ผ่านการบำบัดไนไตรต์ (Test_A, Test_N และ Test_A+N) มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก และมีแนวโน้มเป็นไปในแนวทางเดียวกับตัวกรองที่ผ่านการบำบัดสารประกอบไนโตรเจนต่างชนิดกัน (A, N และ A+N) คือ ชุดการทดลองที่ใช้ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยสารประกอบแอมโมเนียเพื่อวัดอัตราการบำบัดไนตรต์ (Test_A) มีค่ามากที่สุด คือ 2.05×10^8 จำนวนเซลล์ต่อลิตร รองลงมาได้แก่ชุดการทดลองที่ใช้ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยสารประกอบแอมโมเนียและไนไตรต์เพื่อวัดอัตราการบำบัดไนตรต์ (Test_A+N) มีจำนวน *Nitrospira* เท่ากับ 1.73×10^8 จำนวนเซลล์ต่อลิตร และชุดการทดลองที่ใช้ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยสารประกอบไนไตรต์เพื่อวัดอัตราการบำบัดไนตรต์ (Test_N) มีจำนวน *Nitrospira* เท่ากับ 1.56×10^8 จำนวนเซลล์ต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบจำนวน *Nitrospira* และอัตราการกำจัดไนไตรต์ 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (ในหัวข้อที่ 4.2.2) พบว่าจำนวน *Nitrospira* และอัตราการบำบัดไนไตรต์ คืออัตราการบำบัดไนไตรต์เมื่อใช้ตัวกรองที่ผ่านการบำบัดสารประกอบไนไตรต์เพื่อวัดอัตราการบำบัดไนตรต์ (Test_N) มีค่ามากว่าชุดการทดลองที่ใช้ตัวกรองที่ผ่านการบำบัดสารประกอบแอมโมเนียและไนไตรต์เพื่อวัดอัตราการบำบัดไนตรต์ (Test_A+N) และชุดการทดลองที่ใช้ตัวกรองที่ผ่านการบำบัดสารประกอบแอมโมเนียเพื่อวัดอัตราการบำบัดไนตรต์ (Test_A) ตามลำดับ

ในปัจจุบันการศึกษาจำนวน *Nitrospira* ในระบบน้ำเค็มด้วยวิธี realtime PCR ยังไม่ค่อยเป็นที่แพร่หลาย โดยงานวิจัยที่มีส่วนใหญ่นั้นเป็นการศึกษาในตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียเท่านั้น และยังไม่มีงานวิจัยใดที่ศึกษาด้วยไพร์เมอร์ P338f และ Ntspa0685r รายละเอียดการศึกษาแสดงในตารางที่ 4.15

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.16 จำนวน *Nitrospira* จากตัวอย่างตะกอนจากสถานที่ต่างๆ โดยวิธี realtime PCR

ตัวอย่าง	วิธีการติดตามการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ (DNA)	ประเภทไพร์เมอร์	จำนวน *Nitrospira*	อ้างอิง
ตะกอนจากโรงพยาบาล	SYBR Green I Dye	NSR113F +NSR1264R	$(4.7\pm2.3) \times 10^{5}$ (1)	Geeta และคณะ, 2007
ตะกอนชุมชน	SYBR Green I Dye	NSR113F +NSR1264R	$(1.8\pm0.8) \times 10^{7}$ (1)	
ตะกอนจากโรงงานผลิตกระดาษ	SYBR Green I Dye	NSR113F +NSR1264R	$(1.1\pm0.4) \times 10^{7}$ (1)	
ตะกอนจาก aerobic granular sludge reactor	SYBR Green I Dye	NSR113F +NSR1264R	6.7×10^{11} ถึง 1.2×10^{12} (2)	Feng และคณะ, 2007
ตะกอนจากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน	Taqman probe	NSR113F +NSR1264R +NSR1143Taq	$1.9\pm1.6 \times 10^{10}$ (3)	Harms และคณะ, 2003

(1) หน่วย cell/ml mixed liquid

(2) หน่วย จำนวนเซลล์ต่อลิตร

(3) หน่วย cell/gMLVSS

เมื่อเปรียบเทียบจำนวน *Nitrospira* บนตัวกรอง ที่ผ่านการวัดอัตราการ บำบัดไนไตรต์ (ดังแสดงในตารางที่ 4.14) กับการศึกษาในตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงพยาบาล โรงบำบัดน้ำเสียชุมชน และโรงงานผลิตกระดาษ (ดังแสดงในตารางที่ 4.15) ซึ่งใช้สี SYBR Green I Dye เช่นเดียวกับการทดลองนี้ พบว่าจำนวน *Nitrospira* บนตัวกรองทั้งสามชุดตัวกรองที่ผ่านการวัดอัตราการบำบัดไนไตรตมีจำนวนน้อยกว่าตะกอนในระบบบำบัดน้ำเสียจากสถานที่ดังกล่าว

นอกจากนี้เปรียบเทียบค่าอัตราเฉพาะการออกซิไดซ์ไนไตรต์ต่อเซลล์ (Specific nitrite oxidation rate per cell) ของแต่ละชุดการทดลองการบำบัดไนไตรต์ (Test_A, Test_N และ Test A+N) กับค่าอัตราเฉพาะการออกซิไดซ์ไนไตรต์ต่อเซลล์จากแผ่นฟิล์มชีวภาพ (Schram และคณะ, 1999) ดังแสดงในตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.17 อัตราเฉพาะการออกซิไดซ์ไนไตรต์ต่อเซลล์บนแผ่นฟิล์มชีวภาพบนตัวกรองต่างชนิด

ชุดการทดลอง	**อัตราการกำจัดไนไตรต์ (mgN/Lh)**	**จำนวน *Nitrospira* ในแต่ละชุดการทดลอง (cell/L)**	**อัตราเฉพาะการออกซิไดซ์ไนไตรต์ต่อเซลล์ โมล/เซลล์/ชม.**	**อ้างอิง**
Test_A	0.092	2.05×10^{8}	4.47×10^{-13}	งานวิจัยนี้
Test_N	0.096	1.56×10^{8}	6.17×10^{-13}	
Test_A+N	0.092	1.73×10^{8}	2.77×10^{-13}	
แผ่นฟิล์มชีวภาพ	NA*	NA*	0.02×10^{-15}	Schram และคณะ, 1999

* NA ไม่มีการทดลอง

จากตารางที่ 4.16 พบว่าอัตราเฉพาะการออกซิไดซ์ไนไตรต์ต่อเซลล์ จากทั้งสามชุดการทดลองมีค่าแตกต่างกัน คือ ชุดการทดลองบำบัดไนไตรต์โดยใช้ตัวกรองที่บ่มด้วยสารประกอบไนไตรต์ (Test_N) มีอัตราเฉพาะการออกซิไดซ์ไนไตรต์ต่อเซลล์มากที่สุด คือ 6.17×10^{-13} โมล/เซลล์/ชม. รองลงไปคือชุดการทดลองบำบัดไนไตรต์โดยใช้ตัวกรองที่บ่มด้วยสารประกอบแอมโมเนียและชุดการทดลองบำบัดไนไตรต์โดยใช้ตัวกรองที่ผ่านการบำบัดสารประกอบแอมโมเนียและตัวกรองที่ผ่านการบำบัดไนไตรต์ มีค่าเท่ากับ 4.47×10^{-13} โมล/เซลล์/ชม.และ 2.77×10^{-13} โมล/เซลล์/ชม.ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบอัตราเฉพาะการออกซิไดซ์ไนไตรต์ต่อเซลล์จากทั้งสามชุดการทดลองและบนแผ่นฟิล์มชีวภาพ พบว่าอัตราเฉพาะการออกซิไดซ์ไนไตรต์ต่อเซลล์จากทั้งสามชุดการทดลองมีค่ามากกว่าแผ่นฟิล์มชีวภาพ ประมาณ 1000 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากว่า การหาจำนวน *Nitrospira* บนแผ่นฟิล์มชีวภาพ ใช้เทคนิค FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) เพื่อหาจำนวนนั้นมีข้อจำกัดของเทคนิคนี้คือเป็นเทคนิคที่ให้จำนวนโดยการประมาณ เนื่องจากการหาจำนวนจากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อม คือ ให้สัญญาน้อย และพื้นหลังให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์มาก ทำให้อ่านค่าได้ผิดพลาด อีกทั้งถ้าตัวอย่างเป็นฟิล์มชีวภาพและ

ตัวอย่างที่เป็นก้อน จะมีความหนาแน่นทำให้มองเห็นภาพและนับจำนวนเซลล์ได้ยาก (Schramm, 2003 และ Nakamura et., 2006)

การทดลองช่วงที่ 2 เป็นการศึกษาผลกระทบของประเภทของสารประกอบไนโตรเจนต่ออัตราการกำจัดไนไตรต์พบว่าสารประกอบไนโตรเจนประเภทต่างๆที่ใช้เป็นสารเริ่มต้นในการบ่ม ได้แก่ สารประกอบแอมโมเนีย (A) ไนไตรต์ (N) และแอมโมเนียและไนไตรต์ (A+N) ไม่มีผลต่ออัตราการกำจัดไนไตรต์เมื่อใช้ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนประเภทต่างกัน (Test_A Test_N และ Test_A+N) หลังจากนั้นทำการศึกษากลุ่มประชากร NOB บนแผ่นฟิล์มชีวภาพในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งแบบโรงเรือนซึ่งเป็นสถานที่ที่ใช้ตรึงไนตริฟายอิงแบคทีเรีย และบนตัวกรองที่ผ่านการบ่มและตัวกรองที่ผ่านการกำจัดไนไตรต์ พบว่าตัวอย่างที่มีการกระจายตัวของประชากร NOB ใน 2กลุ่มคือ SublineageII (*Nitrospira moscoviensis* lineage) และ SublineageIV (*Nitrospira marina* lineage) ได้แก่ แผ่นฟิล์มชีวภาพในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งแบบโรงเรือน (IWRHSHD-1) ชุดการทดลอง A ชุดการทดลอง N ชุดการบำบัด Test_A และชุดการบำบัด Test_A+N ตัวอย่างที่มีการกระจายตัวของประชากร NOB ใน 3 กลุ่มคือ SublineageII (*Nitrospira moscoviensis* lineage) SublineageIV (*Nitrospira marina* lineage) และกลุ่มที่มี *Cadidatus Nitrospira Bockiana* ได้แก่ ชุดการทดลอง A+N และชุดการบำบัด Test_N และศึกษาจำนวนกลุ่มประชากร *Nitrospira* พบว่ามีชุดการทดลองที่ใช้ตัวกรองซึ่งผ่านการกำจัดไนไตรต์มีจำนวน*Nitrospira* ใกล้เคียงกับในตัวอย่างตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย โรงพยาบาล โรงบำบัดน้ำเสียชุมชน และโรงงานผลิตกระดาษ ดังนั้นถ้าต้องการเลี้ยงกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* เพื่อใช้ในการกำจัดไนไตรต์ในระบบเพาะเลี้ยงกุ้ง ใช้สารประกอบไนโตรเจนประเภทใดก็ได้เป็นสารตั้งต้นในการบ่ม แต่ให้มีปริมาณสารตั้งต้นมีปริมาณน้อย เพื่อให้ได้แบคทีเรียกลุ่ม *Nitrospira marina* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปและเป็นสกุลเด่นที่พบในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งทุกแบบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 การศึกษา กลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งและศึกษาผลกระทบของปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย

การทดลองในช่วงที่ 1 เป็นศึกษากลุ่มประชากร NOB ในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งในระบบบ่อดินกลางแจ้ง ระบบบ่อไร้ดิน ระบบบ่อในโรงเรือน และระบบบำบัดคุณภาพน้ำในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ ครอบคลุมระบบระบบบ่อความเค็มสูง ระบบบ่อความเค็มต่ำ ระบบบ่อความหนาแน่นกุ้งสูงและระบบบ่อความหนาแน่นกุ้งต่ำ โดยใช้เทคนิค Specific-PCR-Cloning และ Sequencing ซึ่งในการทดลองนี้มีได้ทำการรวบรวมไพร์เมอร์จากหลายงานวิจัย นำมาทดสอบด้วย ARB program package เพื่อให้ได้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงและมีความครอบคลุมกับกลุ่มประชากร NOB มากสุด เลือกใช้ไพร์เมอร์ชุด P338f และNIT3 เพื่อศึกษากลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrobacter* และเลือกใช้ไพร์เมอร์ชุด P338f และ Ntspa0685r เพื่อศึกษากลุ่มประชากร NOB สกุล *NItrospira* จากผลการทดลองพบว่าไม่มีการกระจายตัวของ NOB สกุล *Nitrobacter* แต่มีการกระจายตัวของกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* ได้แก่กลุ่ม *Nitrospira* SublineageIV (*Nitrospira marina* lineage) ในระบบบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทุกระบบ หลังจากนั้นทำการเลือกตัวแทนจากแต่ละระบบเพาะเลี้ยงรวม 4 ตัวอย่าง เพื่อทำการศึกษาประชากร NOB โดยใช้เทคนิค Real-time PCR ร่วมกับสี SYBR Green โดยใช้ไพร์เมอร์ชุดเดียวกับการศึกษากลุ่มประชากร NOB พบว่าไม่สามารถหาจำนวนกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrobacter* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษากลุ่มประชากร NOB ในขณะที่จำนวนกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* จากระบบเพาะเลี้ยงแบบบ่อดินกลางแจ้งและระบบบำบัดคุณภาพน้ำในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำมีค่าใกล้เคียงกับตะกอนดินในธรรมชาติ และจำนวน *Nitrospira* จากระบบบ่อในโรงเรือนมีจำนวนใกล้เคียงกับตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงพยาบาล โรงบำบัดน้ำเสียชุมชน และโรงงานผลิตกระดาษ และผลการทดลองส่วนนี้เป็นการยืนยันว่า ในทุกระบบการเพาะเลี้ยง กลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* เป็นกลุ่มประชากรเด่น ดังนั้นหากต้องการพัฒนาหัวเชื้อ NOB เพื่อใช้ในการบำบัดไนไตรต์ในระบบบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง ที่มีปริมาณไนไตรต์ต่ำ ควรพัฒนากลุ่ม NOB สกุล คือกลุ่ม *Nitrospira* SublineageIV (*Nitrospira marina* lineage)

5.2 การศึกษาผลกระทบของประเภทของสารประกอบไนโตรเจนต่ออัตราการบำบัดไนไตรต์และศึกษากลุ่มประชากรและจำนวนไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนตัวกรองชีวภาพที่ผ่านการตรึงแล้วหลังจากผ่านการบำบัดไนไตรต์

การทดลองช่วงที่ 2 เป็นการศึกษาผลกระทบของประเภทของสารประกอบไนโตรเจนต่ออัตราการกำจัดไนไตรต์พบว่าสารประกอบไนโตรเจนประเภทต่างๆที่ใช้เป็นสารเริ่มต้นในการบ่ม ได้แก่ สารประกอบแอมโมเนีย (ชุดการทดลอง A) ไนไตรต์ (ชุดการทดลอง N) และแอมโมเนียและไนไตรต์ (ชุดการทดลอง A+N) หลังจากนั้นนำตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนข้างต้นมาทำการทดลองการกำจัดไนไตรต์ปริมาณ 10 มล.กไนโตรเจน/ล. พบว่าประเภทของสารประกอบไนโตรเจนที่ใช้เป็นสารเริ่มต้นในการบ่มไม่มีผลต่ออัตราการกำจัดไนไตรต์ ซึ่งแต่ละตัวกรองให้อัตราการกำจัดไนไตรต์ไม่แตกต่างกัน คือ ชุดการทดลองการกำจัดไนไตรต์โดยใช้ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยแอมโมเนีย (Test_A) และชุดการทดลองการกำจัดไนไตรต์โดยใช้ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยแอมโมเนียและไนไตรต์ (Test_A+N) มีค่าเท่ากับ 7.595 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรต่อวันต่อตารางเมตร และชุดการทดลองการกำจัดไนไตรต์โดยใช้ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยไนไตรต์ (Test_ N) มีอัตราการกำจัดไนไตรต์สูงสุดคือ 7.975 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรต่อวันต่อตารางเมตร

หลังจากนั้นทำการศึกษากลุ่มประชากร NOB บนแผ่นฟิล์มชีวภาพในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งแบบโรงเรือนซึ่งเป็นสถานที่ที่ใช้ตรึงไนตริฟายอิงแบคทีเรีย และบนตัวกรองที่ผ่านการบ่มและตัวกรองที่ผ่านการกำจัดไนไตรต์ พบว่าตัวอย่างที่มีการกระจายตัวของประชากร NOB สกุล *Nitrospira* ใน 2 กลุ่มคือ SublineageII (*Nitrospira moscoviensis* lineage) และ SublineageIV (*Nitrospira marina* lineage) ได้แก่ แผ่นฟิล์มชีวภาพในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งแบบโรงเรือน (IWRHSHD-1) ชุดการทดลอง A ชุดการทดลอง N ชุดการบำบัด Test_A และชุดการบำบัด Test_A+N ตัวอย่างที่มีการกระจายตัวของประชากร NOB ใน 3 กลุ่มคือ SublineageII (*Nitrospira moscoviensis* lineage) SublineageIV (*Nitrospira marina* lineage) และกลุ่มที่มี *Cadidatus Nitrospira Bockiana* ได้แก่ ชุดการทดลอง A+N และชุดการบำบัด Test_N ทั้งนี้ไม่พบกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrobacter* ในทุกชุดการทดลอง และศึกษาจำนวนกลุ่มประชากร *Nitrospira* พบว่ามีชุดการทดลองที่ใช้ตัวกรองซึ่งผ่านการกำจัดไนไตรต์มีจำนวน *Nitrospira* ใกล้เคียงกับในตัวอย่างตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย โรงพยาบาล โรงบำบัดน้ำเสียชุมชน และโรงงานผลิตกระดาษ และไม่สามารถหาจำนวนกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrobacter* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษากลุ่มประชากร NOB ดังนั้นถ้าต้องการเลี้ยงกลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* เพื่อใช้

ในการกำจัดไนไตรต์ในระบบเพาะเลี้ยงกุ้ง ใช้สารประกอบไนโตรเจนประเภทใดก็ได้เป็นสารตั้งต้นในการบ่ม แต่ให้มีปริมาณสารตั้งต้นมีปริมาณน้อย เพื่อให้ได้แบคทีเรียกลุ่ม *Nitrospira marina* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปและเป็นสกุลเด่นที่พบในระบบเพาะเลี้ยงทุกแบบ

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ควรศึกษาอัตราการกำจัดไนไตรต์ของกลุ่มประชากร NOB สกุล Nitrospira แต่ละSublineage

5.3.2 ควรศึกษาระยะเวลาที่เชื้อซึ่งผ่านการบ่มจะอยู่ได้ในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งจริง

5.3.3 ควรศึกษาวิธีการรักษาสภาพเชื้อที่ผ่านการบ่มให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรองกาญจน์ จันต๊ะ. Brocadia anammoxidans[ออนไลน์].2552. แหล่งที่มา: http://www.technoinhome.com/vspcite/front/board/show.php?page_id=1&tbl=tblwb03&gid=22&page_size=10&stext=&id=790&PHPSESSID=7f83492ef24e66a4013dbec389d2b13e. [11 กุมภาพันธ์ 2552]

เกรียงศักดิ์ พูลสุข. จุลินทรีย์กับการเพาะเลี้ยงกุ้ง[ออนไลน์].2548. แหล่งที่มา: http://www.nicaonline.com/articles2/site/view_article.asp?idarticle=131. [20 สิงหาคม 2553]

ชะลอ ลิ้มสุวรรณ. กุ้งไทย 2000. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: เจริญรัฐการพิมพ์, 2543.

ชูศักดิ์ แสงธรรม. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. พิมพ์ครั้งที่ 3. นนทบุรี: สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม, 2541.

ธวัชชัย สันติกุล. ความเค็มกับการเลี้ยงกุ้ง. วารสารเทคโนโลยีชาวบ้าน 18(2549): 100-101.

ประพันธ์ ธารบุปผา. การเลี้ยงกุ้งทะเลแบบพัฒนา. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: รุ่งเรืองสาส์นการพิมพ์, 2530.

ปริยา นุพาสันต์. การเปลี่ยนแปลงสังคมแบคทีเรียและคุณลักษณะดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2548.

ปิติภรณ์ บัวเจริญ. การขจัดแอมโมเนียในน้ำทะเลโดยไนตริฟายอิงแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2540.

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

พุทธ ส่องแสงจินดา. การจัดการสารประกอบไนโตรเจนในฟาร์มเลี้ยงกุ้งระบบปิด[ออนไลน์]. 2551. แหล่งที่มา: http://www.allvetgroup.com/KungThai/con_detail.php [3 ตุลาคม 2551]

มะลิวัลย์ คุตะโค, บุปผา ศรีสัมฤทธิ์, สรวิศ เผ่าทองศุข และเปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต. การใช้ตัวกรองชีวภาพไนตริฟิเคชันในการบำบัดไนโตรเจนในถังเลี้ยงสัตว์น้ำกลางแจ้ง. วารสารวิจัยสภาวะแวดล้อม. 29(2550): 23-45.

มนวิกานต์ ขจรบุญ. การคัดเลือกหัวเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียเพื่อการประยุกต์ใช้กับตัวกรองชีวภาพสำหรับระบบน้ำหมุนเวียนของบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งระบบปิด. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552.

สิริ ทุกข์วินาศ และชนินทร์ แสงรุ่งเรือง. การศึกษาวิจัยบำบัดน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาด้วยระบบตัวกรองชีวภาพ. วารสารการประมง 51(2541): 535-540.

สุธาสินี อ่วมจันทร์. การเปลี่ยนแปลงของกลุ่มแบคทีเรียในตัวกรองชีวภาพแบบไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันสำหรับการเพาะเลี้ยงทางน้ำ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2546.

อุตสาหกรรมกุ้งไทย. การจัดการคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ[ระบบออนไลน์]. 2551. แหล่งที่มา: http://www.thailและshrimp.com/agriculture_tiger7.html [3 ตุลาคม 2551]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Bartosch S., Wolgast I., Spieck E., and Bock E. Identification of Nitrite-Oxidizing Bacteria with Monoclonal Antibodies Recognizing the Nitrite.Oxidoreductase**.** Applied and Environmental Microbiology 65(1999): 4126-4133.

Bartosch S., Wolgast I., Spieck E., and Bock E. Immunological detection of nitrospira-like bacteria in various soils. Microbial Ecology 43(2002): 26-33.

Both G.J., Gerards S. and Laambroek H.J. The occurrence of chemolithoautotrophic nitrifiers in watersatured greasslและ soils. Microbial Ecology 23(1992): 15-26.

Cebron A. and Garnier J. Nitrobacter and Nitrospira genera as representatives of nitrite-oxidizing bacteria: Detection, quantification and growth along the lower Seine River(France). Water research 39(2005): 4979-4992.

Daims H., Nielsen L.J., Nielsen H.P., Schleifer H.K. and Wagner M. In Situ Characterization of Nitrospira-Like Nitrite-oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants. Applied and Environment Microbiology 67(2001): 5273-5284.

Egli Rüdiger Konrad. On the use of anammox in treating ammonium-rich wastewater. Degree of Doctor of Natural Sciences. Dipl. Mikrobiol. Universität Zürich, 2003.

Ehrich S., Behrens E., Lebedeva W. and Bock E. A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium. *Nitrospira moscoviensis sp*. nov. and its phylogentic relationship. Archives of Microbiology 164(1995): 16-23.

Feng W., Si-qing X., Yi L., Xue-song C. and Jun Z. Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers in start-up aerobic granular sludge reactor. Journal of Environmental Science 19(2007): 996-1002.

Funge-Smith J. S. and Briggs P.R M. Nutrient budgets in intensive shrimp pond: implications for sustainability. Aquacuture 164(1998): 117-133.

Foesel U. B., Gieseke A., Schwermer C., Stief P., Koch L., Cytryn E., Torre de La J., Rijn van F., Minz D., Drake L. H. และ Schramm A. Nitrosomonas Nm143-like ammonia oxidizers and Nitrospira marina-like nitrite oxidizers dominate the nitrifier community in a marine aquaculture biofilm. . FEMS Microbiology Ecology 63(2008): 192-204.

Geets J., Cooman de M., Wittebolle L., Heylen K., Vanparys B., Vos de P., Verstraete W. and Boon N. Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. Environmental Biotechnology 75(2007): 211-221.

Gieseke A., Bjerrum L., Wagner M. and Amann R. Structure and activity of multiple nitrifying bacterial populations co-existing in a biofilm. Environmental Microbiology 5(2003): 355-369.

Harms G., Layton C.A., Dionisi M.H., Gregory R.I., Garrett M.V., Hawkins A.S., Robinson G.K. and Sayler G. Real-time PCR qualification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. Environmental Science Technology 37(2003): 343-351.

Haseborg T. E., Zamora M. T., Frohlich J. and Frimmel H. F. Nitrifying microoranism in fixed-bed biofilm reactors fed with different nitrite and ammonia concentrations. Bioresource Technology 101(2010): 1701-1706.

Holmes A.J., Tujula A.N., Holley M., Contos A., James M.J., Rogers P. and Gillings R.M. Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia. Environmental Microbiology 64(2001): 258-264.

Hovanec A.T., Taylor T.L., Blakis A. and Delong F.E. Comparative Analysis of Nitrifying Bacteria Associated with Freshwater and Marine Aquaria. Applied and Environment Microbiology 64(1998): 258-264.

Itoi S., Ebihara N., Washio S. and Sugita H. Nitrite-oxidizing bacteria, Nitrospira, distribution in the outer layer of the biofilm from filter materials of a recirculating water system for the goldfish Carassius auratus. Aquaculture 264(2007): 267-308.

Jie H. and Daping Li. Nitrite Removal Performance and Community Structure of Nitrite-Oxidizing and Heterotrophic Bacteria Suffered with Organic Matter. Current Microbiology 57(2008): 287-293.

Kim J.D. and Kim H. S. Effect of nitrite concentration on the distribution and competition of nitrite-oxidizing bacteria in nitratation reactor systems และ their kinetic characteristics. Water Research 40(2006): 887-894.

Koops P. H. and Roser P. A., Distribution and ecolosiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. FEMS Microbiology Ecology 37(2001): 1-9

Lebedeva V. E., Alawi M., Maixner F., Jozsa G. P. and Daims H. Physiological and phylogenetic characterization of a novel lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium, 'Candidatus Nitrospira bockiana'. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58(2008): 242-250.

Liu S., Yang F., Gong Z. and Su Z. Assessment of the positive effect of salinity on the nitrogen removal performance and microbial composition during the start-up of CANON process. Environmental Biotechnology 80(2008): 339-348.

Manser R. Muche K., Gujer W. and Siegrist H. A rapid method to quantify nitrifiers in activated sludge. Water Research 39(2005): 1585-1593.

Martiny C. A., Albrechtsen J. H., Arvin E. and Molin S. Identification of bacteria in biofilm and bulk water samples from a nonchlrinated model drinking water distribution system: Detection of a large Nitrite-Oxidizing Population associated with Nitroapira spp. Applied and Environment Microbiology 71(2005): 8611-8617.

Maixner F., Noguera D.R. Anneser B., Stoecker K., Wegl G., Wagner M. and Daims H. Nitrite concentration influences the population structure of Nitrospira-like bacteria. Environment Microbiology 8(2006): 1487-1495.

Montras A., Pycke B., Boon N., Godia F., Mergeay M., Hendrickx L. และ Perez J. Distribution of Nitrosomonas europaea and Nitrobacter winogradskyi in an autotrophic nitrifying biofilm reactor as depicted by molecular analyses และ mathematical modeling. Water research 42(2008): 1700-1714.

Nakamura Y.,Satoh H., Kindaichi T. and Okabe S. Community Structure, Abundance,และ in Situ Activity of NitrifyingBacteria in River Sediments as Determined by the Combined Use of Molecular Techniques and Microelectrodes. Environmental Science Technology 40(2006): 1532-1539.

Nakatsu H. C. Soil Microbial Community Analysis Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Soil Science Society of America 71(2007): 562-571.

Navarro E., Simonet, Normand P. and Bardin R. Characterization of natural populations of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. Archives of Microbiology 157(1992): 107-115.

Satoh H., Nakamura Y. and Okabe S. Influences of Infaunal Burrows on the Community Structure and Activity of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Intertidal Sediments. Applied and Environment Microbiology 73(2006): 1341-1348.

Schramm A., Beer D.K., Wagner M. และ Amann R. Identification and Activities In Situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as Dominant Populations in a Nitrifying Fluidized Bed Reactor. Applied and Environment Microbiology 64(1998): 3480–3485

Sorokin Y.D., Muyzer G. Brinkhoff T., Kuenen G.J. and Jetten M.S.Mike. Isolation และ characterization of a novel facultatively alkaliphilic Nitrobacter species, N.alkalicus sp. nov. Archives of Microbiology 170(1998): 345-352.

Strickl and J. D. H., Parsons T. R. 1972. A practical hและbook of seawater analysis.

Spieck E. และ Bock E. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. Second Edition. United States: Springer US, 2006.

Sudarno U., Bathe S., Winter J. and Gallert C. Nitrification in fixed-bed reactors treating saline wastewater. Environmental Biotechnology 85(2010): 2017-2030.

Sugita H., Nakamura H. and Shimada T. Microbial communities associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of freshwater fish. Aquaculture 243(2005): 403-409.

Teske A., Regan M.J., Toze S., Rittmann E.B. and Stahl A.D. Evolutionary Relationship among Ammonia- and Nitrite-Oxidizing Bacteria. Journal of Bacteriology 176(1994): 6623-6630.

Vanparys B., Spieck E., Heylen K., Wittebolle L., Geets J., Boon N. และ V.D.Paul. The phylogeny of the *Nitrobacter* based on com[arative rep-PCR, 16S rRNA and nitrite oxidoreductase gene sequence analysis. Systematic and applied microbiology 30(2007): 297-308.

Wang M. L., Chien C. I., Yuan L. S. and Wu J. Y. Nitrifying community structures and nitrification performance of full-scale municipal and swine wastewater treatment plants. Chemosphere 75(2009): 234-242.

Watson W. S. and Waterbury. Characteristics of two Marine Nitrite Oxidizing Bacteria, Nitrospina gracilis nov. gen. nov. sp. and Nitrococcus mobilis nov. gen. nov. sp. Archives of Microbiology 77(1971): 203-230.

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

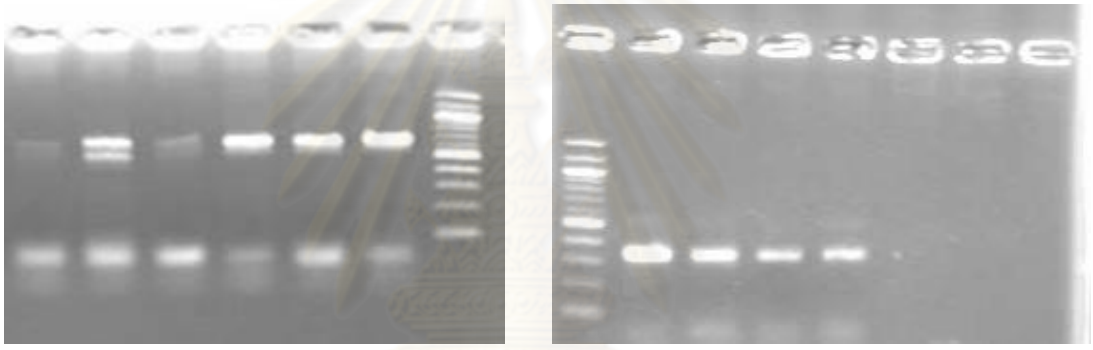
ภาคผนวก ก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การทดสอบความสามารถของไพร์เมอร์ในการใช้งานจริง

จากการทดสอบความครอบคลุมและจำเพาะเจาะจงของไพร์เมอร์เพื่อศึกษากลุ่มประชากรไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย (NOB) สกุล *Nitrobacter* และ *Nitrospira* (ดังแสดงในหัวข้อที่ 4.1.2) พบว่า ไพร์เมอร์ P338f + NIT3 ครอบคลุมและจำเพาะเจาะจงต่อ NOB สกุล *Nitrobacter* และ P33f + Ntspa0685r ครอบคลุมและจำเพาะเจาะจงต่อ NOB สกุล *Nitrospira* หลังจากนั้นนำไพร์เมอร์ทั้งสองชุดนี้มาทำการศึกษากับตัวอย่างจากระบบบำบัดน้ำเสีย เพื่อศึกษาว่าไพร์เมอร์ทั้งสองสามารถamplifyกลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวได้จริง (ดังแสดงในรูปที่ ก-1 และ ก-2)



ก-1 ก-2

รูปที่ ก การทำเจลโดยใช้ไฟฟ้าหลังจากการทำ PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ผ่านการทดสอบความครอบคลุมและความจำเพาะเจาะจง

ก-1 ใช้ไพร์เมอร์ P338f + NIT3 เพื่อศึกษากลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrobacter* ความยาวประมาณ 600 bp

ก-2 ใช้ไพร์เมอร์ P338f + Ntspa0685r เพื่อศึกษากลุ่มประชากร NOB สกุล *Nitrospira* ความยาวประมาณ 320 bp

จากรูปที่ ก-1 และ ก-2 พบว่าไพร์เมอร์ P338f + NIT3 และ P338f + Ntspa0685r สามารถ amplify NOB สกุล *Nitrobacter* และ *Nitrospira* ในตัวอย่างจากระบบบำบัดน้ำเสียได้จริง และมีความยาวเบสจากตัวอย่างที่ผ่านการทำ amplify เท่ากับความยาวเบสของแต่ละไพร์เมอร์ที่สามารถ amplify ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไพร์เมอร์ทั้งสองไพร์เมอร์ดังกล่าวสามารถใช้งานได้จริง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

>AWRHSLD1_1
CGCCGCGTGGGGGGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAACCCCTTTCGGCTTGGAAGATGGGGCGGGTAAC
GCTCGGACGGTACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTG
CAAGCGTTGTTCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCT
CGGGCCTAACCCGGAAAGTGCGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGG
>AWRHSLD1_8
GCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGAAGGTTCTCGGATTGTAAACCCCTTTTGTGAGGAAAGAGAAAGTG
GTAACCACTTAGACGGTACCTCAAGAAAAAGCCACGGCTAACTTCGTGTCAGCAGCCGCGGTAATACG
AGGTGGCGAGCGTTGTTCGGATTTACTGGGCGTAAAGAGCACGTAGGCGGTTGGGTAAGCCTCTTGGG
AAGCTCCCGGCTTAACCGGGAAAGGTCGAGGGGAACTACTCAGCTAGAGGACGGGAGAGGAGCGCGGA
TTCCCGTACCTCTAGCTGAGTAGTTCCCCTCGACCTTTCCGGTTAAGCCGGGAGC
>AWRHSLD1_9
CCGTCTAAGTGGTTACCCACTTTCTCTTTTTTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAGAACCTTTTCCCC
>AWRHSLD1_4
TAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGC
TAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG
>AWRHSLD1_5
TAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCA
TAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG
>AWRHSLD1_14
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGTTGAGTAGTTCCCCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
GAGATTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAGGC
AGTTACCTGCCTTATCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>AWRHSLD1_20
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
AAGCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAGT
GGTTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>AWRHSLD1_43
CAGTACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCAACGCCG
CGTGCGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTCAGTGGGGACGAACCAAGACGGTACCCACAGA
AGAAGCCCCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGATTTAT
TGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTCGATAAGTCGGGTGTGAAACCTCCAGGCTCAACCTGGAGACGC
CACCCGATACTGTCGTGACTAGAGTCCAGTAGGGGAGCGCGGAATTCC
>IWRHSHD1_2
TGGGGCGGGTAACCGCTCGGACGGTACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCC
CTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAACCCGGAAAGTGCGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGA
GGG
>IWRHSHD1_3
CAGCGACGCCGCGTGGGGGATGAAGGTTTTCGGATTGTAAACCCCTTTTGCGAGGAAGATAAGGTAGGT
AACTGCCTAGACGGTACCTCAAGAAAAAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAG
GTGGCGAGCGTTGTTCGGATTTACTGGGCGTAAAGAGCACGTAGGCGGTTGGGTAAGCCTCCTGGGAAA
TCTCTCGGCTTAACCGGGAAAGTTCGGGGGGAACTACTCAGCTAGAGGGCGGGAGAGGAGCGCGGAATT
CCCGAATTAAGCCGAGAGATTTCCCAGGAGGCTTACCC
>IWRHSHD1_6
CGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGAAGGTTTTCGGATTGTAAACCCCTTTCATGAAGAAAGATAAAGTG
GGTAACCACTTAGACGGTACCTCAAGAAGAAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
AAGGTGGCGAGCGTTGTTCGGATTTACTGGGCGTAAAGAGCACGTAGGCGGTTGGGAAAGCCTTTTGGG
AAATCTCCCGGCTTAACCGGGAAAGGTCGAGAGGAACTACTCAGCTAGAGGACGGGAGAGGAGCGCGGA
ATTCCCGAACCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACTTTCCGGTTAAGCCGGGAGATTTCCAAAAGGCTT
TCCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCG
>IWRHSHD1_7
GCAACGCCGCGTGGGGGATGAAGGCTCTCGGGTTGTAAACCCCTTTCAGCAAGGACGAATTTTGACGGT
ACCTGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAGGGGGCAAGCGTTGTC

CGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTGAGTAAGTCGGATGTTAAATCCCCAGGCTCAACC
TGGGACACCACCCGATACTGCTCTGGCTAGAGTCCGGTAGGGGAGCGCGGAATTCCCGA
>IWRHSHD1_15
GGCGAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGAGATGAAGGTTTTCGGATTGTAAACCCCTTTTGGAGGA
AAGATAAGGCAGGTAACTGCCTAAACGGTACCTCAAGAAAAAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACAAAGGTGGCGAGCGTTGGTCGGATTTACTGGGCGTATAGAGCACGTAGGGGGTTGGATA
AGCCTCTTGGGAAATCTCCCGGCTTAACCGGGAAAGGTCGAGGGGAACTACTCAACTAGAGGGGGGGAG
AAGAGCGCGGTATTCCCGTACCTCTAGTTGAGTAGTTCCCCTCACCTTTCCGGTTAAGCCGG
>IWRHSHD1_9
TCGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGCTGAGTAGTTCCCCCCGAACTTTCCCGGTTAAGCCG
AGAGATTTCCCAGGAGGCTCACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTC
GCCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAGG
CAGTTACCTACCTTATCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCG
TCGCTGCGTCAGGCTTTCACCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>IWRHSHD1_11
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCATCCTCTAGCTAAGCAGTCCCCCCCGCACTTTCCGGGTTAGGCCCG
GAGATTTCACGAAGGGCTTACCTAACCGCCTACGCTCCCTGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTGCTTCTGCAGGTACCGTCCGAGC
GGTTACCCGCCCCATCTTCCCTGCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAGACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>IWRHSHD1_14
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCATCCTCTAGCTAAGCAGTCCCCCCCGCACTTTCCGGGTTAGGCCCG
GAGATTTCAAGAAGGGCTTACCTAACCGCCTACGCTCCCTGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTGCTTCTGCAGGTACCGTCCGAGC
GGTTACCCGCCCCATCTTCCCTGCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAGACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>IWRHSHD1_16
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGAAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTG
GGGGATGAAGGTTTTCGGATTGTAAACCCCTTTCATGAGGAAAGATAAAGTGGGTAACCACTTAGACGG
TACCTCAAGAAGAAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAAAGGTGGCAAGCGTTGT
TCGGATTTACTGGGCGTAAAAAACACGTAAACAGTTGGGAAAGCCTTTTGGGAAATCTCCCGGCTTAAC
CGGGAAAGGTCGAGAGGAACTACTCAGCTAGAGGACGGGAGAGGAGCGCGGAATTCCCG
>IWRHSHD1_22
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCATCCTCTAGCTAAGCAGTCCCCCCCGCACTTTCCGGGTTAGGCCCG
GAGATTTCACGAAGGGCTTACCTAACCGCCTACGCTCCCTGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTGCTTCTGCAGGTACCGTCCGAGC
GGTTACCCGCCCCATCTTCCCTGCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAGACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPLSHD1_1
AGCGAGCAATCGTTCGGACGGTACCTCCAGAATTAGCCACGGCCAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTCGGATTCACTGGGCGTACAGGGTGTGTAGGCGGTTTGGTAAGCCTTC
TGTTAAAGCTTCGGGCCCAACCCGGAAAGCGCAGAGGGTACTGCCAGGCTAGAGGGTGGGAGAGGAGCG
G
>OEPLSHD1_9
AAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTGTTGCCGGGAAGAATGGGCAGGTTTGACGCCTGCCGTGACGGTAC
CGGCGGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCG
GAGTTATTGGTCGTTAAGGGCGCGTAGGCGGCCTGGTAAGTCTGAGGTGAAACGCCGCACCTCAACTGC
GGACTGGCCTTGGAAACTGCTTGGCTTGAGGTGATCAGAGGAGCGCGGAATTCCCGACT
>OEPLSHD1_15
AGCGACGCCGCGTGGCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTCAGTTTGGACGAAATTGACGG
TACCTGCAGAAGAAGGCCCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGCCAAGCGTTGT
CCGGATTCATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTCGGTAAGTGAGGTGTGAAATCTCCACGCTCAAC
GTGGAGGGGCCACCTCATACTGCCGTGACTTGAGTCTGGTAGGGGAGCG
> OEPHSLD1_3
GGGGGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAACCCCTTTCGGCAGGGAAGATGGGGCGGGCAACCGCTCGGACG
GTACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGCGTTG
TTCGGATTTACTGGGCGTACTGGGAGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAA
CCCGGAAAGTGCGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGGGT

> OEPHSLD1_6
TGGGCGAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAACCCCTTTCGGCAG
GGAAGATGGGGCGGGCAACCGCTCGGACGGTACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTCGGATTTACTGGGCGTACTGGGAGCGTAGGCGGTTAGG
TAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAACCCGGAAAGTGCGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGG
AGAGGAGCGGG
> OEPHSLD1_11
GCGGGAAGAAAATGACGGTACCTGCAGAAGAAGGTGCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTGACAC
GTAGGCACCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTCAGTAAGTCGGGTGT
GAAAACTCTGGGCTCAACCCAGAGACGCCACCCGATACTGCTGTGACTTGAGTACGGTAGGGGAGCG
> OEPHSLD1_17
CCCCTTTCGGCAGGGAAGATGGGGCGGGCAACCGCTCGGACGGTACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAAC
TTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTCGGATTTACTGGGCGTACTGGGAGC
GTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAACCCGGAAAGCGCGGGGGGGACTGCTTA
GCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGG
>OEPHSLD1_18
CCCCTTTCGGCAGGGAAGATGGGGCGGGCAACCGCTCGGACGGTACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAAC
TTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGCGTTGCTCGGATTTACTGGGCGTACTGGGAGC
GTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAACCCAGAAAGTGCGGGGGGGACTGCTTA
GCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGGGG
>OEPHSLD1_16
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCATCCTCTAGCTAAGCAGTCCCTCCCGCACTTTCCGGGTTAGGCCCG
GAGATTTCACGAAGGGCTTACCTAACCGCCTACGCTCCCAGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTGCTTCTGCAGGTACCGTCCGAGC
GGTTGCCCGCCCCATCTTCCCTGCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAGACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPHSLD1_19
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTG
GGGGATGAAGGTCTTCGGACTGTAAACCCCTTTCGGCAGGGAAGATGGGGCGGGCAACCGCTCGGACGG
TACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGCGTTGT
TCGGATTTACTGGGCGTACTGGGAGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAAC
CCGGAAAGTGCGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAATTCCCG
>OEPHSLD1_20
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTG
GGGGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAACCCCTTTCGGCAGGGAAGATGGGGCGGGCAACCGCTCGGACGG
TACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGCGTTGT
TCGGATTTACTGGGCGTACTGGGAGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAAC
CCGGAAAGTGCGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAATTCCCG
>OEPHSLD1_21
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCATCCTCTAGCTAAGCAGTCCCCCCCGCACTTTCCGGGTTAGGCCCG
GAGATTTCACGAAGGGCTTACCTAACCGCCTACGCTCCCAGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTGCTTCTGCAGGTACCGTCCGAGC
GGTTGCCCGCCCCATCTTCCCTGCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAGACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPHSLD1_23
TCGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCATCCTCTAGCTAAGCAGTCCCCCCCGCACTTTCCGGGTTAGGCCC
GGAGATTTCACGAAGGGCTTACCTAACCGCCTACGCTCCCAGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTT
GCCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTGCTTCTGCAGGTACCGTCCGAG
CGGTTGCCCGCCCCATCTTCCCTGCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAGACCTTCATCCCCCACGCGGCG
TCGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPHSHD1_1
CCCTGTCACCAGGGACGAAGACCGGGGTAGTCAAATAGGCTCCCGGGGTGACGGTACCTGGAGAGGAAG
CCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGC
GTAAAGGGCGCGCAGGCGGCCTGTTAAGTCTGGTGTGAAAGGCCCCGGCTCAACCGG
>OEPHSHD1_3
ATTGTTGACCCCTTTCTGCACGGAAGATGGGGGGGAGCCGATCGGACGGAGGGCCGAAAGCACCGGAGA
GGAATTCCTGGCTGCCTACGCGGTGTACCAACGGGGGCCGTAGGGGGCCATTGTTGGCCGGAATTACTG
GGCGTAAAGGGCGCGCAGGCCCTCTGTTTAATCTGGTGTGAAAGGCCCGGCTCAACCGGGGAGGTGCAC

TGGAAACTGGGAGGCTAGGAGGGGGAGAGGAGCGCGGAATTCCCGAATACGTAGGGTGCTAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTAAAGGGTGCGCAGGCGGTCTTGCAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGGGCTTAACC
TGGGA
>OEPHSHD1_4
CCCTGTCGCCAGGGACGAAGACCGGGGAGTCGAATAGGCTCCCGGGGTGACGGTACCTGGAGAGGAAGC
CCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCG
TAAAGGGCGCGCAGGCGGCCTGTTAAGTCTGGTGTGAAAGGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGTGCACTGG
AAACTGGCAGGCTTGAGGGCAGGAGAGGAGCGGG
>OEPHSHD1_6
GGGTGATGAAGGTCTATGGATCGTAAAGCCCTGTCACCAGGGACGAAGACCGGGGAGTCGAATAGGCTC
CCGGGGTGACGGTACCTGGAGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAGGG
GGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGCAGGCGGCCTGTTAAGTCTGGTGTGAAAGG
CCCCGGCTCAACCGGGGAGGTGCACTGGAAACTGGCAGGCTTGAGGGCAGGAGAGGAGCGGGAATTCCC
A
>OEPHSHD1_8
GGGTGATGAAGGTCTATGGATCGTAAAGCCCTGTCACCAGGGACGAAGACCGGGGAGTCAAATAGGCTC
CGGGGTGACGGTACCTGGAGAGGAGGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAGGGG
GCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGCAGGCGGCCTGTTAAGTCTGGTGTGAAAGGC
CCCGGCTCAACCGGGGAGGTGCACTGGAAACTGGCAGGCTTGAGGGCAGGAGAGGAGGGGCCAATTCCG
GA
>OEPHSHD1_14
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCTGCCCTCAAGCCTGCCAGTTTCCAGTGCACCTCCCCGGTTGAGCCGG
GGCCTTTCACACCAGACTTAACAGGCCGCCTGCGCGCCCTTTACGCCCAGTAATTCCGGACAACGCTCG
CCCCCTACGTGTTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGGGCTTCCTCTCCAGGTACCGTCACCCC
GGGAGCCTATTTGACTCCCCGGTCTTCGTCCCTGGTGACAGGGCTTTACGATCCATAGACCTTCATCAC
CCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGCAAAATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAG
T
>OEPHSHD1_15
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCTGCCCTCAAGCCTGCCAGTTTCCAGTGCACCTCCCCGGTTGAGCCGG
GGCCTTTCACACCAGACTTAACAGGCCGCCTGCGCGCCCTTTACGCCCAGTAATTCCGGACAACGCTCG
CCCCCTACGTGTTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGGGCTTCCTCTCCAGGTACCGTCACCCC
GGGAGCCTATTCGACTCCCCGGTCTTCGTCCCTGGTGACAGGGCTTTACGATCCATAGACCTTCATCAC
CCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGCAAAATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAG
T
>OEPHSHD1_17
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTGCACAATGGGCGCAGGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTG
GGTGATGAAGGTCTATGGATCGTAAAGCCCTGTCACCAGGGACGAAGACCGGGGAGTCGAATAGGCTCC
CGGGGTGACGGTACCTGGAGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAGGGG
GCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGCAGGCGGCCTGTTAAGTCTGGTGTGAAAGGC
CCCGGCTCAACCGGGGAGGTGCACTGGAAACTGGCAGGCTTGAGGGCAGGAGAGGAGCGCGGAATTCCC
G
>OEPHSHD1_18
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCTGCCCTCAAGCCTGCCAGTTTCCAGTGCACCTCCCCGGTTGAGCCGG
GGCCTTTCACACCAGACTTAACAGGCCGCCTGCGCGCCCTTTACGCCCAGTAATTCCGGACAACGCTCG
CCCCCTACGTGTTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGGGCTTCCTCTCCAGGTACCGTCACCCC
GGGAGCCTATTCGACTCCCCGGTCTTCGTCCCTGGTGACAGGGCTTTACGATCCATAGACCTTCATCAC
CCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGCAAAATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAG
T
>OEPHSHD1_19
CGGGAATTCCGCGCTCCCCTCCGAATCTCAAGACTAATGGTTTCGGGCGCACTTCCCGGGTTGAGCCCA
GGGCTTTCACACCCGACTACTTAGTCCGCCTACACGCCCTTTACGCCCAGTAATTCCGAACAACGCTTG
CACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCCTTTGGAGATACCGTCAAACT
GGTAGGGTATTGATCTACCAGGGTTTCGTCTCTCTCGACAGAGCTTTACGACCCGAAGGCCTTCGTCGC
TCACGCGGCATTGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAG
T
>OEPHSHD4_1
TGGGGGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAACCCCTTTCGGCAGGGAAGATGGGGCGGGCAACCGCTCGGAC
GGTACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGCGTT

GTTCGGATTTACTGGGCGTACTGGGAGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTA
ACCCGGAAAGTGCGGGGGGGGACTGCTAAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGGGAAATTCCCGATTA
>OEPHSHD4_2
TGGGGGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAACCCCTTTCGGCAGGGAAGATGGGGCGGGCAACCGCTCGGAC
GGTACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGCGTT
GTTCGGATTTACTGGGCGTACTGGGAGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTA
ACCCGGAAAGTGCGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGGGCAAATTCCCGA
>OEPHSHD4_4
TGGGGGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAACCCCTTTCGGCAGGGAAGATGGGCGGGCAACCGCTCGGACG
GTACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAGGGTGGCAAGCGTTG
TTCGGATCACTGGGCGTACTGGGAGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAAC
CCGGAAAGTGCGGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGGG
>OEPHSHD4_5
GGGGGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAACCCCTTTCGGCAGGGAAGAGGGGGCGGGCAACCGCTCGGACG
GTACCTAGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGCGTT
GTTCGGATTTACTGGGCGTACTGGGAGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTA
ACCCGGAAAGTGCGGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGG
>OEPHSHD4_8
GGGGGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAACCCCTTTCGGCAGGGAAGATGGGGCGGGCAACCGCTCGGACG
GTACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGCGTTG
TTCGGATTTACTGGGCGTACTGGGAGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAA
CCCGGAAAGTGCGGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGGGTAAATTCCCGA
>OEPHSHD4_11
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTG
GGGGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAACCCCTTTCGGCAGGGAAGATGGGGCGGGCAACCGCTCGGACGG
TACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGCGTTGT
TCGGATTTACTGGGCGTACTGGGAGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAAC
CCGGAAAGTGCGGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAATTCCCGAA
>OEPHSHD4_12
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTG
GGGGATGAAGGTCTTCGTATTGTAAACCCCTTTCGGCAGGGAAGATGGGGCGGGCAACCGCTCGAACGG
TACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGCGTTGT
TCGGATTTACTGGGCGTACTGGGAGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAAC
CCGGAAAGTGCGGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAATTCCCG
>OEPHSHD4_15
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCATCCTCTAGCTAAGCAGTCCCCCCCGCACTTTCCGGGTTAGGCCCG
GAGATTTCACGAAGGGCTTACCTAACCGCCTACGCTCCCAGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTGCTTCTGCAGGTACCGTCCGAGC
GGTTGCCCGCCCCATCTTCCCTGCCGAAAGAGGTTTACAATCCGAAGACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPHSHD4_16
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCATCCTCTAGCTAAGCAGTCCCCCCCGCACTTTCCGGGTTAGGCCCG
GAGATTTCACGAAGGGCTTACCTAACCGCCTACGCTCCCAGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTGCTTCTGCAGGTACCGTCCGAGC
GGTTGCCCGCCCCATCTTCCCTGCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAGACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGTGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPHSHD4_17
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCACGTG
GGGGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAACCCCTTTCGGCAGGGAAGATGGGGCGGGCAACCGCTCGGACGG
TACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGCGTTGT
TCGGATTTACTGGGCGTACTGGGAGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAAC
CCGGAAAGTGCGGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAATTCCCG
>OEPHSLD3_1
TCGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCG
GAAGCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTC
GCCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAG
TGGTTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCG
TCGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT

>OEPHSLD3_6
AGGCAGCAGATCGCCGGTCGACAACCCGCGTTCAGCCAACGTGCTCGATATTGCGCACCGAATTGCCCA
TTTGCACCAGATATGTCGTCATCATGCGGTCCATTACGTCGACATGCTGGGCAAACCAGGCCGGCAACT
CCGCCACGAGCCTGCGGCCGAGGTCCACGTCGCCGGCGGCGGCGCGCTTGCGCACTTCGCGGCACAGCG
CCAGCACGTTGTCGTGCTCGCCGCGATGGCAGTGGCGCGGGGGAAAGTCCGCCGCGTCCATCCATCCGT
TCTCTTCAGCGAAGTGGTGCTCGGTGTGGTCGATGAAGGCGTCGAGCGCGGAA
>OEPHSLD3_8
GGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGGA
AGCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCGC
CACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAGTG
GTTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGTC
GCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPHSLD3_9
GCGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTGGTTCCTCTCGACCTCTCCCGGTTAAGCCG
GAAGCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTC
GCCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAG
TGGTTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCG
TCGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPHSLD3_10
TCGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCG
GAAGCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTC
GCCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAG
TGGTTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCG
TCGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPHSLD3_15
TCGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCG
GAAGCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTC
GCCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAG
TGGTTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCG
TCGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPHSLD3_16
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
AAGCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAGT
GGTTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPHSLD3_28
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCTGTTAAGCCGG
AAGCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACACTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAGT
GGTTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPHSHD3_3
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTG
GGGAATGAAGGTCTTCGGATTGTAAACCCCTTTCGGCAGGGAAGATGGGGCGGGTAACCGCTCGGACGG
TACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGCGTTGT
TCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAAC
CCGGAAAGTGCGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAATTCCCG
>OEPHSHD3_4
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCATCCTCTAGCTAAGCAGTCCCCCCCGCACTTTCCGGGTTAGGCCCG
GAGATTTCACGAAGGGCTTACCTAACCGCCTACGCTCCCTGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTGCTTCTGCAGGTACCGTCCGAGC
GGTTACCCGCCCCATCTTCCCTGCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAGACCTTCATTCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPHSHD3_6
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTG
GGGAATGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCCCCTTTCGGCAGGGAAGATGGGGCGGGTAACCGCTCGGACGG

TACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGCGTTGT
TCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAAC
CCGGAAAGTGCGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAATTCCCG
>OEPHSHD3_9
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTG
GGGGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAACCCCTTTCGGCAGGGAAGATGGGGCGGGCAACCGCTCGGACGG
TACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGCGTTGT
TCGGATTTACTGGGCGTACTGGGAGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAAC
CCGGAAAGTGCGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAATTCCCG
>OEPHSHD3_10
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCATCCTCTAGCTAAGCAGTCCCCCCCGCACTTTCCGGGTTAGGCCCG
GAGATTTCACGAAGGGCTTACCTAACCGCCTACGCTCCCTGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTGCTTCTGCAGGTACCGTCCGAGC
GGTTACCCGCCCCATCTTTCCTGCCGTAAGGGGTTTACAATCCGAAGACCTTCATTCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCCATTGCGCCATAATCCTTACTGGCTGCCCTCCCGTAGAAGT
>OEPHSHD3_11
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCATCCTCTAGCTAAGCAGTCCCCCCCCGCACTTTCCGGGTTAGGCCC
GGAGATTTCACGAAGGGCTTACCTAACCGCCTACGCTCCCTGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTT
GCCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTGCTTCTGCAGGTACCGTCCGAG
CGGTTACCCGCCCCATCTTCCCTGCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAGACCTTCATTCCCCACGCGGCG
TCGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPHSHD3_13
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCATCCTCTAGCTAAGCAGTCCCCCCCGCACTTTCCGGGTTAGGCCCG
GAGATTTCACGAAGGGCTTACCTAACCGCCTACGCTCCCTGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTGCTCCTGCAGGTACCGTCCGAGC
GGTTACCCGCCCCATCTTCCCTGCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAGACCTTCATTCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPHSHD3_15
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCATCCTCTAGCTAAGCAGTCCCCCCCGCACTTTCCGGGTTAGGCCCG
GAGATTTCACGAAGGGCTTACCTAACCGCCTACGCTCCCTGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTACTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTGCTTCTGCAGGTACCGTCCGAGC
GGTTACCCGCCCCATCTTCCCTGCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAGACCTTCATTCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPHSHD3_16
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTG
GGGAATGAAGGTCTTCGGATTGTAAACCCCTTTCGGCAGGGAAGATGGGGCGGGTAACCGCTCGGACGG
TACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGCGTTGT
TCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAAC
CCGGAAAGTGCGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAATTCCCG
>OEPHSHD3_19
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCATCCTCTAGCTAAGCAGTCCCCCCCGCACTTTCCGGGTTAGGCCCG
GAGATTTCACGAAGGGCTTACCTAACCGCCTACGCTCCCTGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTGCTCCTGCAGGTACCGTCCGAGC
GGTTACCCGCCCCATCTTCCCTGCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAGACCTTCATTCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPLSHD2_8
CTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGGACAACGCTTGGTGCCTACGTGTCACC
GCGGCTGCTGGCACGTAGTTGGCCGCACCTTCTTCTGCAGGTACCGTCATTTTCTTCCCTGCTGAAAGC
GGTTTACAACCCTAGGGCCTTCTTCCCGCACGCGGCGTTGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGCAAT
ATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPLSHD2_10
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
AAGCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAGT
GGTTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTGCAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPLSHD2_12

TCGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCG
GAAGCTTACCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTC
GCCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAG
TGGTTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCG
TCGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTAAT
>OEPLSHD2_13
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
AAGCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCTCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAGT
GGTTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPLSHD2_14
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
AAGCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAGT
GGTTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPLSHD2_15
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
AAGCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTCTCTTGAGGTACCGTCTAAGT
GGTTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAG
>OEPLSHD2_18
GGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGGGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGGA
AGCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCGC
CACCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAGTG
GTTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGTC
GCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTAATCACTAGTG
AATTCGCGGCCGCCTGCAG
>OEPLSHD2_19
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGG
GGGATGAAGGTTTTCGGATTGTAAACCCCTTTTGTGAGGAAAGAGAAAGTGGGTAACCACTTAGACGGT
ACCTCAAGAAAAAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCGAGCGTTGTT
CGGATTTACTGGGCGTAAAGAGCACGTAGGCGGTTGGGTAAGCCTCTTGGGAAAGCTTCCGGCTTAACC
GGGAAAGGTCGAGAGGAACTACTCAGCTAGAGGACGGGAGAGGAGCGCGGAATTCCCG
>OEPLSHD2_20
GGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGGGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGGA
AGCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCGC
CACCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAGTG
GTTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGTC
GCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPLSHD2_23
AATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCAT
AGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCT
>OEPLSLD1_2
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
AAGCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCCGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAGT
GGTTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTAATCACTAGTG
AATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTT
>OEPLSLD1_3
GGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGGA
AGCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCGC
CACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAGTG
GTTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGTC
GCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT

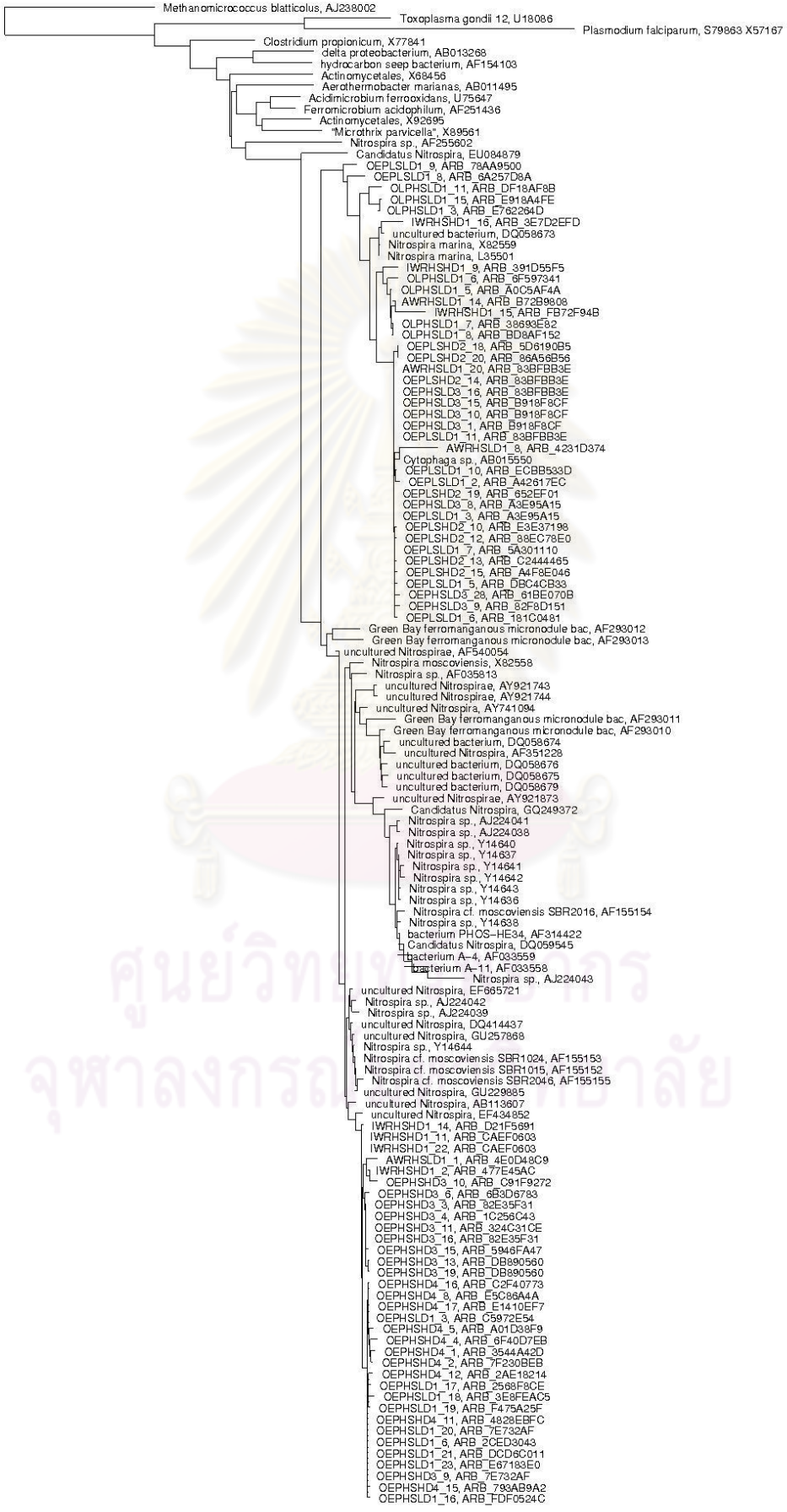
>OEPLSLD1_4
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
AAGCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTTTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAGTG
GTTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGTC
GCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGA
>OEPLSLD1_5
GGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGGAA
GCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCGCC
ACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAGTGG
TTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCTCCACGCGGCGTCG
CTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTA
>OEPLSLD1_6
GGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTCAAGCCGGAA
GCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCGCC
ACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAGTGG
TTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGTCG
CTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAG
>OEPLSLD1_7
GGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGGA
AGCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCGC
CACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAGTG
GTTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGTC
GCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAG
>OEPLSLD1_8
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
AAGCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTGCTTCTTGAGGTACCGTCCAAAC
GGTTGCCCGCTTTCTCTTCCCTGCCGAAAGGGTTTACAATCCGAAGACCTTCATCCCCCACGCGGCGTC
GCTGCGTCAGGCTGTCGCCCATTGCGCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPLSLD1_9
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
AAGTTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTGCTTCTGCAGGTACCGTCCGAGC
GGTTACCCGCCCCATCTTCCCTGCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAGACCGTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPLSLD1_10
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
AAGCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAGT
GGTTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACACGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OEPLSLD1_11
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCTGAGTAGTTCCTCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
AAGCTTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAAGT
GGTTACCCACTTTCTCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OLPHSLD1_3
CCCGCCCTCTAGCTAGGCAGTTACCCTCGACCATTCCCGGTTAAGCCGGGAGATTTCACAAGAGGCTTA
CCTAACCGCCTACGCGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCGCCACCTTCGTATTACCGCGG
CTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTCTTCTGGAGGTACCGTCCAGGCGGTAACCCGCCTTCTCTTTC
CTCCTGAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGTCGCTGCGTCAGGCTTTCGCC
CATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAG
>OLPHSLD1_5
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGCTGAGTAGTTCCCCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
GAGATTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG

CCGCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAGGC
AGTTACCTGCCTCATCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OLPHSLD1_6
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGCTAGGCAGTTACCCTCGACCATTCCCGGTTAAGCCGG
GAGATTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCGCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAGGC
AGTTACCTGCCTTATCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAG
>OLPHSLD1_7
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGCTGAGTAGTTCCCCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
GAGATTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCGCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAGGC
AGTTACCTGCCTTATCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAG
>OLPHSLD1_8
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGCTGAGTAGTTCCCCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
GAGATTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCGCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAGGC
AGTTACCTGCCTTATCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OLPHSLD1_11
TCGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGCTGAGTAGTTCCCCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCG
GGAGATTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTC
GCCGCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTCTTCTGGAGGTACCGTCCAGG
CGGTAACCCGCCTTCTCTTTCCTCCTGAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCG
TCGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>OLPHSLD1_15
TACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGT
GGGGGATGAAGGTTTTCGGATTGTAAACCCCTTTCAGGAGGAAAGAGAAGGCGGGTTACCGCCTGGACG
GTACCTCCAGAAGAAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCGAGCGTTG
TTCGGATTTACTGGGCGTAAAGAGCGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCTCTTGTGAAATCTCCCGGCTTAA
CCGGGAATGGTCGAGGGTAACTGCCTAGCTAGAGGGCGGG

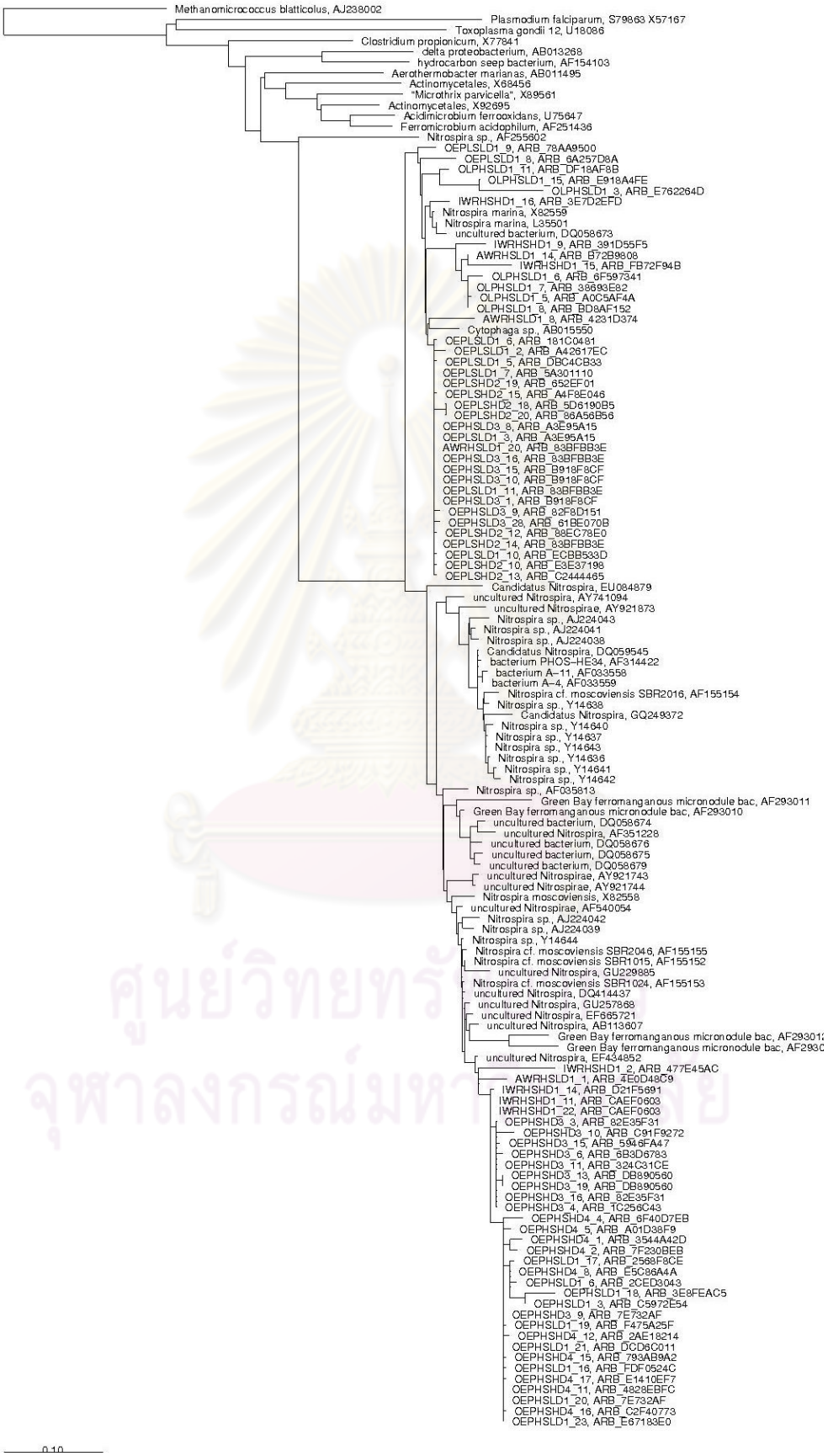
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ค.1 Phylogenetic tree ของ 16s ของ Nitrospira จากการคำนวณโดยวิธี Neighbor joining



รูปที่ ค.2 Phylogenetic tree ของ 16s ของ Nitrospira จากการคำนวณโดยวิธี Maximum Likehood

ภาคผนวก ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

>AM1_3
CCCGCCCTCTAGCTAAGTAGTTCCCCTCGACCATTCCCGGTTAAGCCGGGAGCTTTCACAAGAGGCTTA
CCTAACCGCCTACGCGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCGCCACCTTCGTATTACCGCGG
CTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTCTTCTGGAGGTACCGTCCGGGCGGTTACCCGCTTTTTCTTCC
CTCCTGAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGTCGCTGCGTCAGGCTTTCGCC
CATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>AM1_8
TACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGT
GGGGGATGAAGGTTTTCGGATTGTAAACCCCTTTCAGGAGGGAAGAAAAAGCGGGTAACCGCCCGGACG
GTACCTCCAGAAGAAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCGAGCGTTG
TTCGGATTTACTGGGCGTAAAGAGCGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCTCTTGTGAAAGCTCCCGGCTTAA
CCGGGAATGGTCGAGGGGAACTACTTAGCTAGAGGGCGGG
>AM1_14
CCCGCCCTCTAGCTAAGTAGTTACCCTCGACCATTCCCGGTTAAGCCGGGAGCTTTCACAAGAGGCTTA
CCTAACCGCCTACGCGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCGCCACCTTCGTATTACCGCGG
CTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTCTTCTGGAGGTACCGTCCGGGCGGTTACCCGCTTTTTCTTCC
CTCCTGAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGTCGCTGCGTCAGGCTTTCGCC
CATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>AM1_20
CCCGCCCTCTAGCTAAGTAGTTCCCCTCGACCATTCCCGGTTAAGCCGGGAGCTTTCACAAGAGGCTTA
CCTAACCGCCTACGCGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCGCCGCCTTCGTATTACCGCGG
CTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTCTTCTGGAGGTACCATCCGGGCGGTTACCCGCTTTTTCTTCC
CTCCTGAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGTCGCTGCGTCAGGCTTTCGCC
CATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>AM1_21
NNAANNNNTATNNGGCGATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCG
ATTACTCCTACGGGAGGCAGCAGCCTGCGGGACACAGCAGCGGTTCTGCGTCTGAGCAGCGAAGCAGGC
AGCAGCGCGCTTGACCCCGCAACGCTGATTTCTGCGGTCAGGCGGAACACCCGGCGCCTGTCCACCCAG
GAGGCAACTCAGGTTGTCATGGCAGCGCATGCGCTGACCGCTCCTGGCGCGGTGCCAAGCCTGCGTGTG
GATGGCGCCATGGCCAGCGGACCTGTTGTCAAACGGCTGAGCGATCAGGGCGCCGATATGTCGATCATT
GAAAATGTCAGCCAGACGCCGATGGATGTCACCATGACCGCCTATGGTGTTCCTGAAGTGCCTGCTGCC
TCCCGTAGGAGTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACG
CGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTG
TTTCCTGA
>AM1_22
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTG
GGGGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAACCCCTTTCGGCAGGGAAGATGGGGCGGGTAACCGCTCGGACGG
TACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGCGTTGT
TCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAAC
CCGGAAAGTGCGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAATTC
>AM1_23
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTG
GGGGATGAAGGTTTTCGGATTGTAAACCCCTTTCAGGAGGGAAGAAAAAGCGGGTAACCGCCCGGACGG
TACCTCCAGAAGAAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCGAGCGTTGT
TCGGATTTACTGGGCGTAAAGAGCGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCTCTTGTGAAAGCTCCCGGCTTAAC
CGGGAATGGTCGAGGGGAACTACTTAGCTAGAGGGCGGG
>NT1_1
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTG
GGGGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAACCCCTTTCGGCAGGGAAGATGGGGCGGGTAACCGCTCGGACGG
TACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGCGTTGT
TCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAAC
CCGGAAAGTGCGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAATTCCCG
>NT1_2
CCCGCCCTCTAGCTAGGTAGTTCCCCTCGACCATTCCCGGTTAAGCCGGGAGCTTTCACAAGAGGCTTA
CCTAACCGCCTACGCGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCGCCACCTTCGTATTACCGCGG
CTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTCTTCTGGAGGTACCGTCTAGGCGGTAACCCGCCTTCTCTTTC
CTCCTGAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGTCGCTGCGTCAGGCTTTCGCC
CATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT

>NT1_3
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTG
GGGGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAACCCCTTTCGGCAGGGAAGATGGGGCGGGTAACCGCTCGGACGG
TACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGCGTTGT
TCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAAC
CCGGAAAGTGCGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAATTCCCG
>NT1_7
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGCTGAGTAGTTCCCCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
GAGATTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAGGC
AGTTACCTGCCTTATCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>NT1_8
CCCGCCCTCTAGCTAAGTAGTTCCCCTCGACCATTCCCGGTTAAGCCGGGAGCTTTCACAAGAGGCTTA
CCTAACCGCCTACGCGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCGCCACCTTCGTATTACCGCGG
CTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTCTTCTGGAGGTACCGTCCGGGCGGTTACCCGCTTTTTCTTCC
CTCCTGAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGTCGCTGCGTCAGGCTTTCGCC
CATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>NT1_14
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGCTGAGTAGTTCCCCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
GAGATTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAGGC
AGTTACCTGCCTTATCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>NT1_17
TACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGT
GGGGGATGAAGGTTTTCGGATTGTAAACCCCTTTCAGGAGGAAAGATAAGGCGGGTTACCGCCCGGACG
GTACCTCCAGAAGAAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCGAGCGTTG
TTCGGATTTACTGGGCGTAAAGAGCGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCTCTTGTGAAATCTCCCGGCTTAA
CCGGGAATGGTCGAGGGTAACTGCCTAGCTAGAGGGCGGG
>AMNT1_1
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCATCCTCTAGCTAAGCAGTCCCCCCCGCACTTTCCGGGTTAGGCCCG
GAGATTTCACGAAGGGCTTACCTAACCGCCTACGCTCCCTGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTGCTTCTGCAGGTACCGTCCGAGC
GGTTACCCGCCCCATCTTCCCTGCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAGACCGTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>AMNT1_2
GNNNNNNNNTATAGGGCGATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTC
GATTACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCAACGCCG
CGTGGGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCCCTTTCAGCAGGGACGAAAATGACGGTACCTGCAGAA
GAAGGTCCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGCCAAGCGTTGTCCGGATTTATT
GGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTCAGTAAGTCGGCCGTGAAATTCCAGGGCTCAACCCTGGAACGCC
GGCCGATACTGCTGTGGCTAGAGTTCGGTAGAGGAGCGCGGAATTCCCGAATCACTAGTGAATTCGCGG
CCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTG
TCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGTTTGTTTCCTGATCTCGTTTTCGGGGAAACAGGGT
TCGAGTGTATACGACCATTAAGGGAGAATGGGCCACGTCGTAGCTTCCGGGTGCCGG
>AMNT1_3
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCATCCTCTAGCTAAGCAGTCCCCCCCGCACTTTCCGGGTTAGGCCCG
GAGATTTCACGAAGGGCTTACCTAACCGCCTACGCTCCCTGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTGCTTCTGCAGGTACCGTCCGAGC
GGTTACCCGCCCCATCTTCCCTGCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>AMNT1_4
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCCCGGCAGTCCCCTCTGACCTTTCTGGGTTGAGCCCA
GAGATTTCCCAGAGGGCTTACCGAACCGCCTACACACCCTGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTCTTCTGGAGGTACCGTCCGGGC
GGTTACCCGCTTTTTCTTCCCTCCTGAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT

>AMNT1_6
CCCGCCCTCTAGCTAAGTAGTTCCCCTCGACCATTCCCGGTTAAGCCGGGAGCTTTCACAAGAGGCTTA
CCTAACCGCCTACGCGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCGCCACCTTCGTATTACCGCGG
CTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTCTTCTGGAGGTACCGTCCGGGCGGTTACCCGCTTTTTCTTCC
CTCCTGAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGTCGCTGCGTCAGGCTTTCGCC
CATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>AMNT1_7
CCCGCCCTCTAGCTAAGTAGTTCCCCTCGACCATTCCCGGTTAAGCCGGGAGCTTTCACAAGAGGCTTA
CCTAACCGCCTACGCGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCGCCACCTTCGTATTACCGCGG
CTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTCTTCTGGAGGTACCGTCCGGGCGGTTACCCGCTTTTTCTTCC
CTCCTGAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGTGTCGCTGCGTCAGGCTTTCGCC
CATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>AMNT1_17
NNNNTNNTCTATNGGGCGATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTC
GATTACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCACGCCG
CGTGAGTGATGAAGGCCCTCGGGTCGTAAAGCTCTGTCGGGAGGGACGAAGTACTGACGGTACCTCGCA
AGAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTGCTCGGAATCA
CTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTTTATCAGGTCGGGTGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGAACT
GCATTCGAAACCGGTAGACTTGAGTACGGGAGAGGAGCGCGGAATTCCCGAATCACTAGTGAATTCGCG
GCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGT
GTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTTGTTTCCTGANCCANATTGGGGGCGGAATAAA
AATTCCACACAACATACGATTCGGAAGCATAAAAGTGTAAACCCTGTGGGGGCCTAAN
>AMNT1_20
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCCCGGCAGTCCCCTCTGACCTTTCTGGGTTGAGCCCA
GAGATTTCCCAGAGGGCTTACCGAACCGCCTACACACCCTGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTGGCCGTGGCTGCTTCTGGTGGTACCGTCCGTTC
ACGTTGTCGTGAACCATCTTTCCACCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAGACCTTCATCCCCCACGCGGC
GTCGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>AM10_4
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGCTGAGTAGTTCCCCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
GAGATTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAGGC
AGTTACCTGCCTTATCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>AM10_5
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGCTGAGTAGTTCCCCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
GAGATTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAGGC
AGTTACCTGCCTTATCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>AM10_6
NNNNAACNNNNATAGGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAA
TTCGATTCGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGCTAGGCAGTTACCCTCGACCATTCCCGGTT
AAGCCGGGAGATTTCACAAGAGGCTTACCTAACCGCCTACGCGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACA
ACGCTCGCCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTCTTCTGGAGGTACCG
TCCAGGCGGTAACCCGCCTTCTCTTTCCTCCTGAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCAC
GCGGCGTCGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTAAT
CACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGC
TTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATACTGGTTTCCTGAGTGAAAT
TGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAA
TGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGC
CAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCCGCTTC
CTCGCTCACTGACTCGCTGCCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAGGCGGT
AATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGAAAGATCATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAGGCCA
GGAACCGTAAATACGCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTCCTG
>AM10_7
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGCTGAGTAGTTCCCCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
GAGATTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG

CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAGGC
AGTTACCTGCCTTATCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>AM10_8
CCCGCCCTCTAGCTAAGTAGTTCCCCTCGACCATTCCCGGTTAAGCCGGGAGCTTTCACAAGAGGCTTA
CCTAACCGCCTACGCGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCGCCACCTTCGTATTACCGCGG
CTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTCTTCTGGAGGTACCGTCCGGGCGGTTACCCGCTTTTTCTTCC
CTCCTGAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGTCGCTGCGTCAGGCTTTCGCC
CATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGA
>AM10_17
CCCGCCCTCTAGCTAGGCAGTTACCCTCGACCATTCCCGGTTAAGCCGGGAGATTTCACAAGAGGCTTA
CCTAACCGCCTACGCGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCGCCACCTTCGTATTACCGCGG
CTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTCTTCTGGAGGTACCGTCCAGGCGGTAACCCGCCTTCTCTTTC
CTCCTGAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGTCGCTGCGTCAGGCTTTCGCC
CATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>AM10_18
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGCTGAGTAGTTCCCCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
GAGATTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAGGC
AGTTACCTGCCTTATCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>AM10_20
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCATCCTCTAGCTAAGCAGTCCCCCCCGCACTTTCCGGGTTAGGCCCG
GAGATTTCACGAAGGGCTTACCTAACCGCCTACGCTCCCTGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTGCTTCTGCAGGTACCGTCCGAGC
GGTTACCCGCCCCATCTTCCCTGCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAGACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAG
>AM10_21
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGCTGAGTAGTTCCCCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
GAGATTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAGGC
AGTTACCTGCCTTATCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>NT10_3
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGTCCTCTAGCCCGGCAGTCCCCTCTGACCTTTCTGGGTTGAGCCCA
GAGATTTCCCAGAGGGCTTACCGAACCGCCTACACACCCTGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTGGCCGTGGCTGCTTCTGGTGGTACCGTCCGTTC
ACGTTGTCGTGAACCATCTTTCCACCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAGACCTTCATCCCCCACGCGGC
GTCGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>NT10_4
CCCGCCCTCTAGCTAGGCAGTTACCCTCGACCATTCCCGGTTAAGCCGGGAGATTTCACAAGAGGCTTA
CCTAACCGCCTACGCGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCGCCACCTTCGTATTACCGCGG
CTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTCTTCTGGAGGTACCGTCCAGGCGGTAACCCGCCTTCTCTTTC
CTCCTGAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGTCGCTGCGTCAGGCTTTCGCC
CATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>NT10_6
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTG
GGGGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAACCCCTTTCGGCAGGGAAGATGGGGCGGGTAACCGCTCGGACGG
TACCTGCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGCGTTGT
TCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCGTAGGCGGTTAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAAC
CCGGAAAGTGCGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAATTCCCG
>NT10_8
NTTNANCCNATTGNGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATT
CGATTACTCCTACGGGAGGCAGCAGATGGCAACACCTTCCCCTGACAGCGTTTCAGGGGACCCAACTTG
TGCTGTGCTGTTTACCGACCTTTACTGAAAACGATGCCTGGTTGCTAGAACCACAGGTCAACCGGTTTC
AGAAAGGAGGGATCGTGCTCGCGGTCCTAGTCCCGGACAACGCCTTTCTTGGGAATTCCTGGGGTCGCC
CTCCTCAGGACTTTGGTCTTCCGTTTTTGACTGATCACCTCAATCGTTTGGGCCGTACCCTGCAACTCT

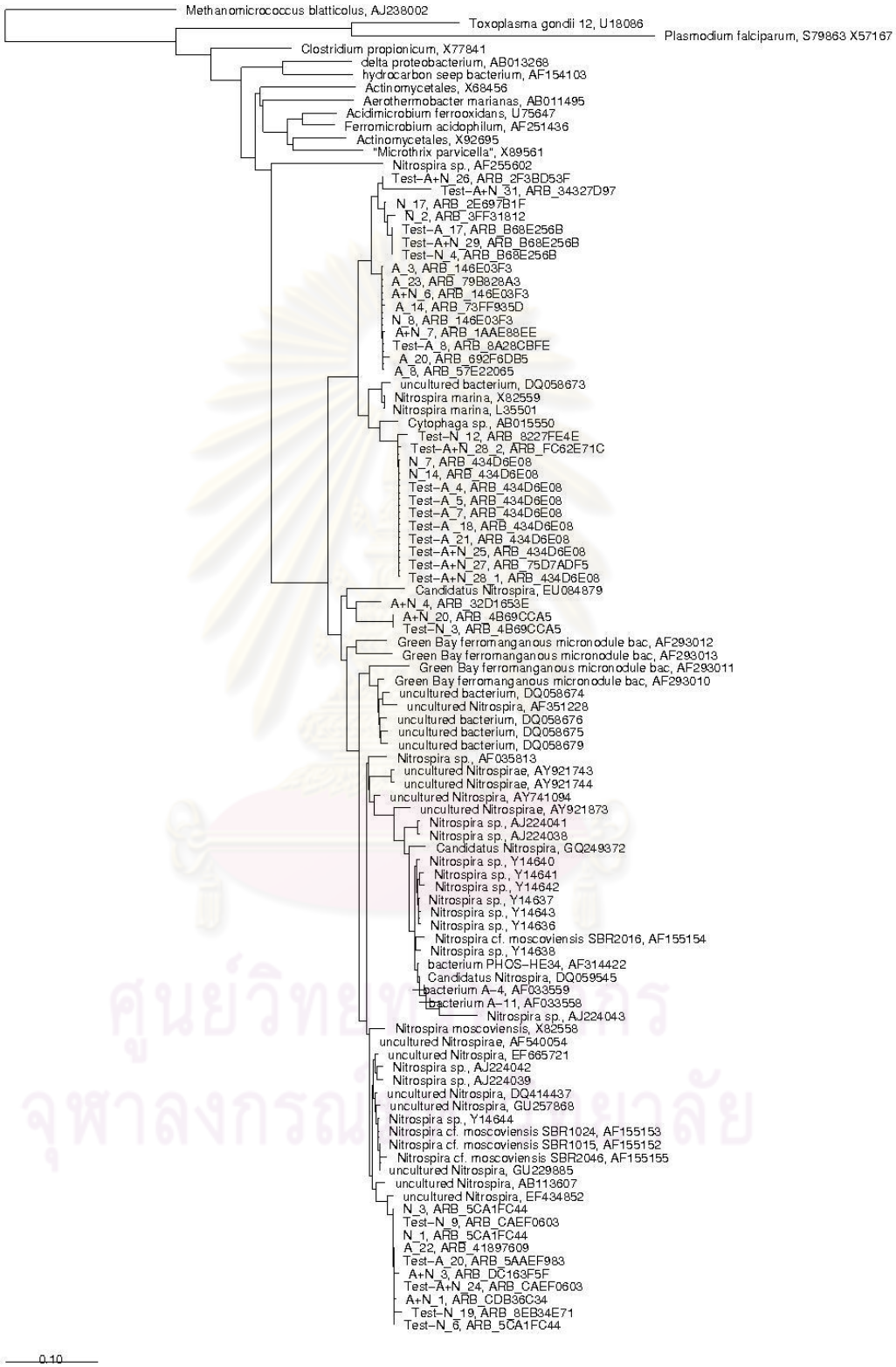
CAGCCTCCTTACCGCCCCATCGATGCGAAACATTATTTTTTGACCATCGCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
AATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCAT
AGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGAGTGA
AATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGGTGC
CTAATGA
>NT10_9
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCATCCTCTAGCTAAGCAGTCCCCCCCGCACTTTCCGGGTTAGGCCCG
GAGATTTCACGAAGGGCTTACCTAACCGCCTACGCTCCCTGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTGCTTCTGCAGGTACCGTCCGAGC
GGTTACCCGCCCCATCTTCCCTGCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAGACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>NT10_11
NNNTAAATNNNATANGGCGATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATT
CGATTACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCCATGCC
GCGTGAGGGAAGACGGCCCTAGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAAATGACGGTACCTGCAGA
AGAAGCCCCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAT
TGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTAGTAAGTCGGATGTGAAAACTCAGGGCTCAACCCGGAGACGC
CATCCGATACTGCTATGACTAGAGTCCGGTAGAGGAGCGCGGAATTCCCGAATCACTAGTGAATTCGCG
GCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGT
GTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATACTTGTTTCCTGATGACATTGTTATCGGGCTCAAAA
TTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCA
CATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCTAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCATCT
>NT10_12
CGGGTATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGTTGAGTAGTTCCCCTCGACCTTTCCCGGTCAAGCCGG
GAGATTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAGGC
AGTTACCTGCCTTATCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>NT10_13
NNNNNNCNNCNNNTNNGGNGATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAAT
TCGATTCGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGCTAGGCAGTTACCCTCGACCATTCCCGGTTA
AGCCGGGAGATTTCACAAGAGGCTTACCTAACCGCCTACGCGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAA
CGCTCGCCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTCTTCTGGAGGTACCGT
CCAGGCGGTAACCCGCCTTCTCTTTCCTCCTGAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACG
CGGCGTCGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTAATC
ACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCT
TGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGAGTGAAATT
GTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAAT
GAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCC
AGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCC
TCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAACGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGTAA
CACGGTTATCTATAGAATCA
>NT10_19
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCATCCTCTAGCTAAGCAGTCCCCCCCGCACTTTCCGGGTTAGGCCCG
GAGATTTCACGAAGGGCTTACCTAACCGCCTACGCTCCCTGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAGGTTAGCCGTGGCTGCTTCTGCAGGTACCGTCCGAGC
GGTTACCCGCCCCATCTTCCCTGCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAGACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATAGTCCTTACTGCGGCCTCCCGTAGGAGT
>AMNT10_24
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCATCCTCTAGCTAAGCAGTCCCCCCCGCACTTTCCGGGTTAGGCCCG
GAGATTTCACGAAGGGCTTACCTAACCGCCTACGCTCCCTGTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTTG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTGCTTCTGCAGGTACCGTCCGAGC
GGTTACCCGCCCCATCTTCCCTGCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAGACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>AMNT10_25
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGCTGAGTAGTTCCCCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
GAGATTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAGGC

AGTTACCTGCCTTATCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>AMNT10_26
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGCTAGGTAGTTCCCCTCGACCATTCCCGGTTAAGCCGG
GAGATTTCACAAAAGGCTTACCTAACCGCCTACGCGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTCTTCTGGAGGTACCGTCCAGGT
GGTAACCCACCTTATCTTTCCTCCTGAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>AMNT10_27
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGCTGAGTAGTTCCCCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
GAGATTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAGGC
AGTTACCTGCCTTATCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTATGGAGT
>AMNT10_28_1
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGCTGAGTAGTTCCCCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
GAGATTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAGGC
AGTTACCTGCCTTATCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>AMNT10_28_2
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGCTGAGTAGTTCCCCTCGACCTTTCCCGGTTAAGCCGG
GAGATTTCCCAAGAGGCTTACCCAACCGCCTACGTGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTTGAGGTACCGTCTAGGC
AGTTACTTGCCTTATCTTTCCTCACAAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>AMNT10_29
CCCGCCCTCTAGCTAGGCAGTTACCCTCGACCATTCCCGGTTAAGCCGGGAGATTTCACAAGAGGCTTA
CCTAACCGCCTACGCGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCGCCACCTTCGTATTACCGCGG
CTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTCTTCTGGAGGTACCGTCCAGGCGGTAACCCGCCTTCTCTTTC
CTCCTGAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGTCGCTGCGTCAGGCTTTCGCC
CATTGCGCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
>AMNT10_31
CGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCGCCCTCTAGCTAGGTAGTTCCCCTCGACCATTCCCGGTTAAGCCGG
GAGATTTCCCAAAAGGCTTACCTAACCGCCTACGCGCTCTTTACGCCCAGTAAATCCGAACAACGCTCG
CCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGTGGCTTTTTCTGGAGGTACCGTCCAGGT
GGTAACCTGCCTTATCTTTCCTCCTGAAAGGGGTTTACAATCCGAAAACCTTCATCCCCCACGCGGCGT
CGCTGCGTCACGCGCTTGCCCATTGCGCACAATTTCTCATGGTGGCCCCCCG

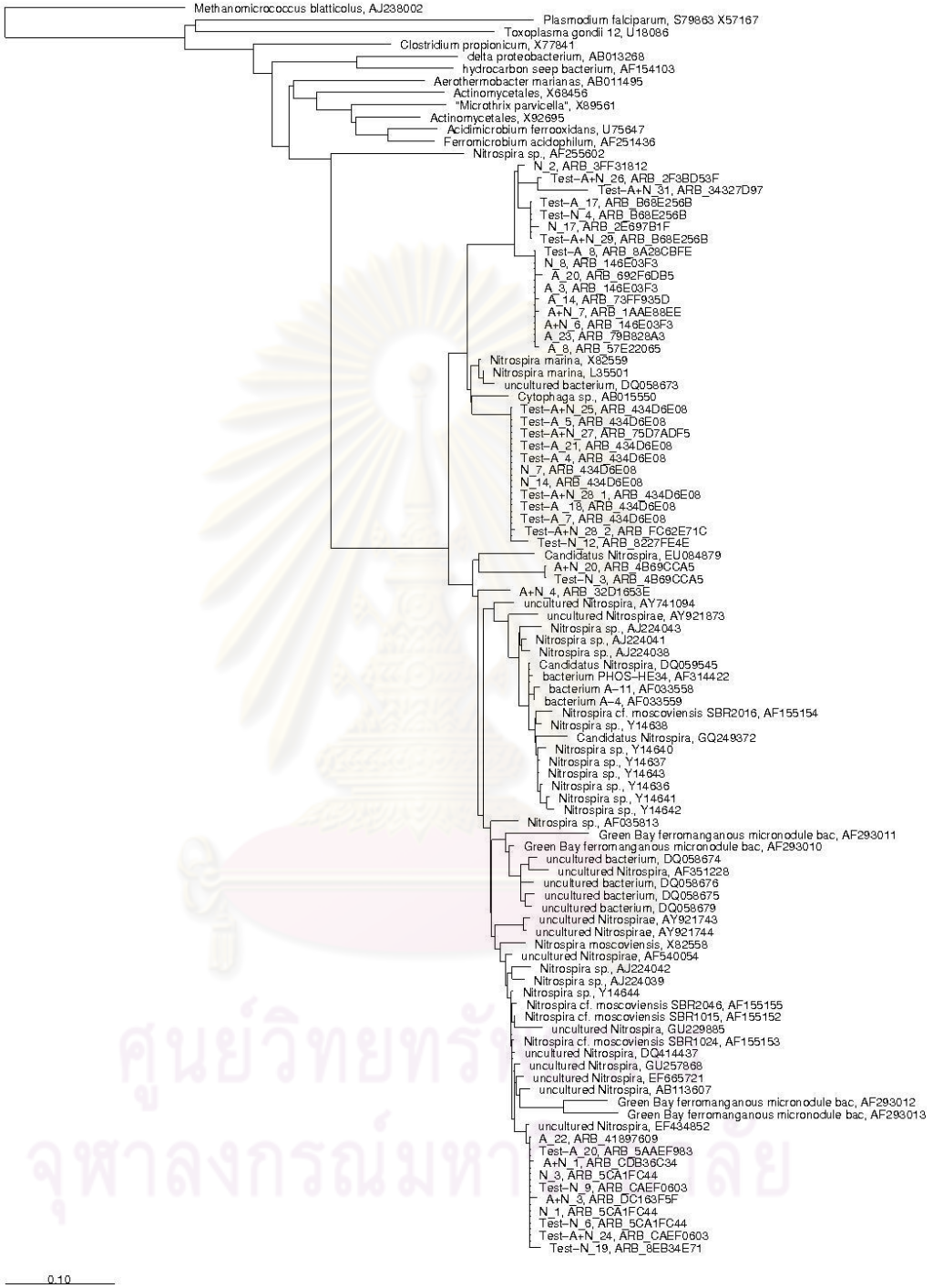
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ จ.1 Phylogenetic tree ของ 16s ของ *Nitrospira* จากการคำนวณโดยวิธี Neighbor joining



รูปที่ จ.2 Phylogenetic tree ของ 16s ของ *Nitrospira* จากการคำนวณโดยวิธี Maximum Likehood

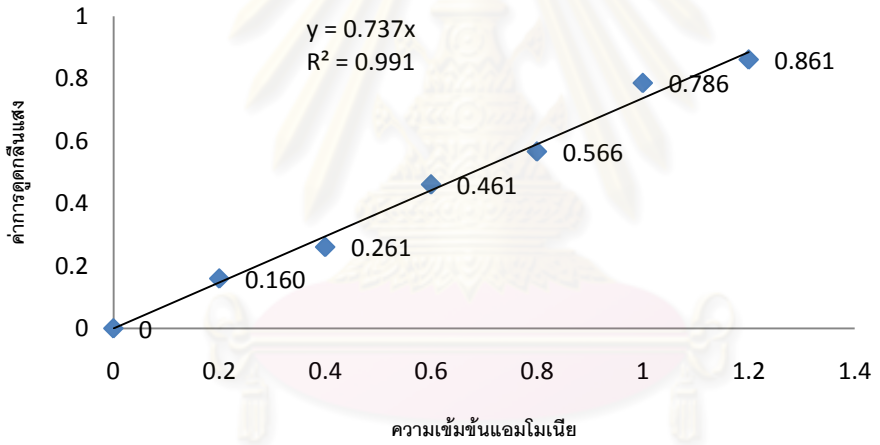
ภาคผนวก ฉ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ
การสร้างกราฟมาตรฐาน

ฉ.1 การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับแอมโมเนีย

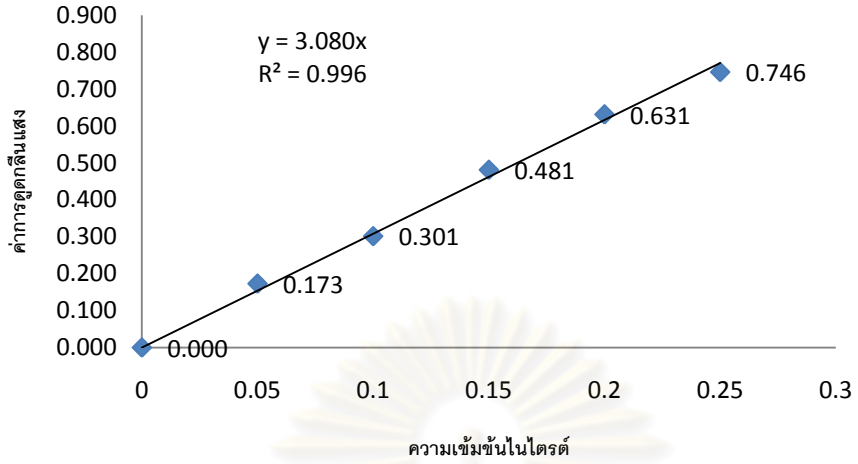
การเตรียมสารละลายแอมโมเนียมาตรฐานเตรียมที่ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0และ1.2 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรตามลำดับ จากสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียเข้มข้น (ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) หลังจากนั้นใส่สารเคมีเช่นเดียวกับการศึกษาตัวอย่าง ทำการหมุนเหวี่ยงเพื่อให้สารผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 60 นาที แล้วนำมาวัดด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร (Strickland และ และคณะ, 1972) (ดังแสดงในหัวข้อที่ 3.2.1.2) กราฟมาตรฐานสำหรับแอมโมเนีย แสดงในรูปที่ ฉ.1



รูปที่ ฉ.1 กราฟมาตรฐานสำหรับแอมโมเนีย

ฉ.2 การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับไนไตรต์

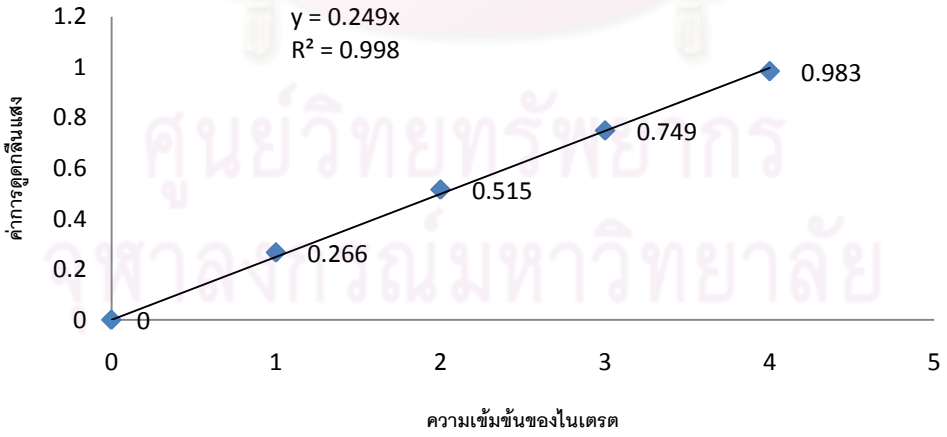
การเตรียมสารละลาย ไนไตรต์มาตรฐานเตรียมที่ความเข้มข้น 0.05 0.10 0.15 0.20 0.25 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรตามลำดับ จากสารละลายมาตรฐาน ไนไตรต์เข้มข้น (ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) หลังจากนั้นใส่สารเคมีเช่นเดียวกับการศึกษาตัวอย่าง (Strickland และคณะ, 1972) (ดังแสดงในหัวข้อที่ 3.2.1.2) ทำการหมุนเหวี่ยงให้สารผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสี นาน 30 นาที แล้วนำมาวัดด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตรกราฟมาตรฐานสำหรับไนไตรต์ แสดงในรูปที่ ฉ.2



รูปที่ ฉ.2 กราฟมาตรฐานสำหรับไนไตรต์

ฉ.3 การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับไนเตรต

การเตรียมสารละลาย ไนไตรต์มาตรฐานเตรียมที่ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรตามลำดับ จากสารละลายมาตรฐาน ไนเตรตเข้มข้น (ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) หลังจากนั้นวัดด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร และ 275 นาโนเมตร กราฟมาตรฐานสำหรับไนเตรต แสดงในรูปที่ ฉ.3



รูปที่ ฉ.3 กราฟมาตรฐานสำหรับไนเตรต

ภาคผนวก ช

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ช

ในการทดลองที่ 4.2.1 การบ่มตัวกรองด้วยสารประกอบไนโตรเจนด้วยที่ต่างกัน โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (ใช้ตัวย่อว่า A) ชุดการทดลองที่ 2 เติมโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (ใช้ตัวย่อว่า N) และชุดการทดลองที่ 3 เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (ใช้ตัวย่อว่า A+N) ทำการวัดปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรต์ ไนเตรต ดังแสดงในตารางที่ ช.1 ช.2 และช.3

ตารางที่ ช.1 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนในชุดการทดลองที่ 1 เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

วันที่ทำการทดลอง	ชั่วโมงการทดลอง	แอมโมเนีย (มก./ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ไนไตรต์ (มก./ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ไนเตรต (มก./ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
3/10/2552	00	0.95	0.18	0.21	0.01	2.22	0.50
4/10/2552	24	1.06	0.12	0.19	0.01	12.30	1.33
6/10/2552	50	0.55	0.03	0.21	0.03	12.21	1.13
8/10/2552	78	0.07	0.05	0.28	0.06	11.93	1.06
10/10/2552	122	0.03	0.01	0.18	0.14	11.72	1.27
12/10/2552	175	0.02	0.01	0.05	0.02	11.52	1.57
14/10/2552	223	0.01	0.01	0.02	0.01	11.26	0.92

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ช.2 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนในชุดการทดลองที่ 2 เติมโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

วันที่ทำการทดลอง	ชั่วโมงการทดลอง	แอมโมเนีย (มก ไนโตรเจน./ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ไนไตรต์ (มก. ไนโตรเจน/ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ไนเตรต (มก. ไนโตรเจน/ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
3/10/2552	00	0.05	0.01	0.98	0.02	3.85	0.03
4/10/2552	24	0.12	0.03	0.96	0.04	18.79	2.53
6/10/2552	50	0.03	0.02	0.74	0.06	17.70	1.61
8/10/2552	78	0.01	0.00	0.59	0.02	17.60	0.98
10/10/2552	122	0.02	0.01	0.31	0.02	16.78	1.76
12/10/2552	175	0.05	0.03	0.04	0.01	16.17	0.70
14/10/2552	223	0.03	0.01	0.02	0.01	16.95	1.11

ตารางที่ ช.3 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนในชุดการทดลองที่ 3 เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนไตรต์ความเข้มข้นอย่างละ 1 มก. ไนโตรเจน/ล.

วันที่ทำการทดลอง	ชั่วโมงการทดลอง	แอมโมเนีย (มก. ไนโตรเจน/ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ไนไตรต์ (มก. ไนโตรเจน/ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ไนเตรต (มก. ไนโตรเจน/ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
3/10/2552	00	0.05	0.01	0.98	0.02	3.85	0.03
4/10/2552	24	0.12	0.03	0.96	0.04	18.79	2.53
6/10/2552	50	0.03	0.02	0.74	0.06	17.70	1.61
8/10/2552	78	0.01	0.00	0.59	0.02	17.60	0.98
10/10/2552	122	0.02	0.01	0.31	0.02	16.78	1.76
12/10/2552	175	0.05	0.03	0.04	0.01	16.17	0.70
14/10/2552	223	0.03	0.01	0.02	0.01	16.95	1.11

ภาคผนวก ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ซ

ในการทดลองที่ 4.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพหัวเชื้อไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่ตรึงอยู่บนตัวกรองชีวภาพในการ กำจัดไนไตรต์ 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร นำตัวกรองที่ผ่านการบ่มจากสารประกอบไนโตรเจน จากทั้ง 3 ชุดการทดลอง มาทดสอบ การกำจัดไนไตรต์ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 ใช้ตัวกรองจากชุดการทดลองที่ 1 (ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยบำบัดแอมโมเนียมคลอไรด์ 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) (ใช้ตัวย่อเป็น Test_A) ชุดการทดลองที่ 2 ใช้ตัวกรองจากชุดการทดลองที่ 2 (ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยโซเดียมไนไตรต์ 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) (ใช้ตัวย่อเป็น Test_N) และชุดการทดลองที่ 3 ใช้ตัวกรองจากชุดการทดลองที่ 3 (ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์และโซเดียมไนไตรต์ อย่างละ 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)(ใช้ตัวย่อเป็น Test_A+N) ทำวัดการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจน ได้แก่ ไนไตรต์และไนเตรต ดังแสดงในตารางที่ ซ .1 ซ.2 และซ.3 และปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ ซ.4

ตารางที่ ซ.1 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนในชุดการทดลองที่ 1 ชุดการทดลองการกำจัดไนไตรต์โดยใช้ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

วันที่ทำการทดลอง	ชั่วโมงการทดลอง	ไนไตรต์ (มก. ไนโตรเจน/ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ไนเตรต (มก. ไนโตรเจน/ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
18/11/2552	0	7.5779	0.3977	14.9029	1.3842
19/11/2552	27	5.8244	0.5799	16.8295	0.3858
20/11/2552	51	4.8484	0.8017	16.3141	1.2188
21/11/2552	75	1.8949	0.5483	15.0710	0.2232
22/11/2552	99	0.8363	0.5588	14.9867	0.4358
23/11/2552	123	0.1088	0.1554	14.6229	1.1339
24/11/2552	147	0.0052	0.0020	15.1488	1.3701

ตารางที่ ซ.2 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนในชุดการทดลองที่ 2 ชุดกา ร ทดลองการกำจัดไนไตรต์โดยใช้ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

วันที่ทำการทดลอง	ชั่วโมงการทดลอง	ไนไตรต์ (มก. ไนโตรเจน/ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ไนเตรต (มก. ไนโตรเจน/ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
18/11/2552	0	7.4383	0.3808	13.6436	0.5963
19/11/2552	27	5.9883	0.4364	15.6128	0.3717
20/11/2552	51	4.9300	0.6410	14.5256	0.2422
21/11/2552	75	2.0260	0.4058	12.7728	1.2981
22/11/2552	99	0.6369	0.5005	13.8066	0.5041
23/11/2552	123	0.1382	0.2051	14.3567	0.1903
24/11/2552	147	0.0169	0.0183	13.7428	0.0880

ตารางที่ ซ.3 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนในชุดการทดลองที่ 3 ชุดการทดลองการกำจัดไนไตรต์โดยใช้ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

วันที่ทำการทดลอง	ชั่วโมงการทดลอง	ไนไตรต์ (มก. ไนโตรเจน/ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ไนเตรต (มก. ไนโตรเจน/ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
18/11/2552	0	7.2008	0.2198	23.1658	1.4927
19/11/2552	27	4.8391	0.3318	15.9882	0.5174
20/11/2552	51	2.9122	1.0492	14.7345	0.3562
21/11/2552	75	0.8392	0.5052	13.8376	0.3803
22/11/2552	99	0.0820	0.0752	12.5377	1.2156
23/11/2552	123	0.0044	0.0056	14.0949	0.3688
24/11/2552	147	0.0063	0.0019	13.9683	0.4987

ตารางที่ ซ.4 การเปลี่ยนแปลงของปัจจัยสิ่งแวดล้อมจากชุดการทดลองการกำจัดไนไตรต์โดยใช้ตัวกรองที่ผ่านการบ่มด้วยสารประกอบไนโตรเจนต่างชนิดกัน

ชั่วโมงการทดลอง	**Test_A**		**Test_N**		**Test_A+N**	
ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	5.40	0.23	5.15	0.43	5.20	0.16
ความเป็นกรด-ด่าง	7.26	0.18	7.38	0.20	7.31	0.23
ค่าความเค็ม (พีพีที)	29.83	0.58	29.92	0.67	30	0.74
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	25.12	1.02	25.1	0.92	25.2	0.78

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปพิชญา ศรีเทพ เกิดวันที่ 22 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2528 ที่อำเภอ เมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2549 และเข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550

ผลงานทางวิชาการ

นำเสนองานวิทยานิพนธ์ในการประชุมทางวิชาการ ระดับชาติ เรื่องกลุ่มประชากรไนตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งแบบบ่อดินกลางแจ้ง ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ วิศวกรรมศาสตร์และการจัดการสิ่งแวดล้อม ครั้งที่ 2 ณ อาคารสถาบัน 2 ชั้น 2 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย จัดขึ้นระหว่างวันที่ 18 มีนาคม 2553

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย