

จลนพลศาสตร์และกลุ่มประชากรของกลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่ง และไนโตรโทออกซิไดซิ่งในน้ำกร่อย
ที่การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นแอมโมเนียสูงและต่ำ



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Kinetics and communities of ammonia-oxidizing and nitrite-oxidizing microorganisms in brackish water under the change of high and low ammonia concentrations.

Mr. Tarnpetch Charoanwoodtipong



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 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

จลนพลศาสตร์และกลุ่มประชากรของกลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ และไนโตรที่ออกซิไดซ์ในน้ำกร่อยที่การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นแอมโมเนียสูงและต่ำ

โดย

นายธารเพชร เจริญวุฒิมงคล

สาขาวิชา

วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบญจพร สุวรรณศิลป์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร. ตะวัน ลิ้มปิยากร

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ เตชวรสินสกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศรัณย์ เตชะเสน)
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบญจพร สุวรรณศิลป์)
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ตะวัน ลิ้มปิยากร)
..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ขวลิต รัตนธรรมสกุล)
..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชัยพร ภูประเสริฐ)
..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. สรวีศ เผ่าทองสุข)

ธารเพชร เจริญวุฒิพงศ์ : จลนพลศาสตร์และกลุ่มประชากรของกลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่ง และไนโตรที่ออกซิไดซิ่งในน้ำกร่อยที่การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นแอมโมเนียสูงและต่ำ (Kinetics and communities of ammonia-oxidizing and nitrite-oxidizing microorganisms in brackish water under the change of high and low ammonia concentrations.) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. บุญจพร สุวรรณศิลป์, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. ตะวัน ลิ้มปิยกร, 199 หน้า.

งานวิจัยชิ้นนี้มุ่งศึกษาผลของจลนพลศาสตร์และการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรที่เกิดจากการเปลี่ยนความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการกำจัดแอมโมเนีย และไนโตรในระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยงานวิจัยนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ช่วง ในช่วงแรก ได้ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ใน 2 ถึงปฏิกรณ์ขนาด 10 ลิตร แบบที่ละเทที่แอมโมเนียความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยที่ถึงปฏิกรณ์ A เลี้ยงด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 50 mg-N/L ในขณะที่ถึงปฏิกรณ์ B เลี้ยงด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/L โดยทำการเลี้ยงในน้ำเค็มสังเคราะห์ที่มีค่าความเค็มประมาณ 15 ppt ทำการวิเคราะห์ค่าแอมโมเนีย ไนโตรที่และไนเตรท เพื่อดูประสิทธิภาพการบำบัดแอมโมเนีย และไนโตรที่และทำการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ ซึ่งได้แก่ ค่าอัตราการใช้แอมโมเนีย หรือไนโตรที่จำเพาะสูงสุด (q_{max}) และค่า Half saturation constant (K_s) ของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่ง (AOM) และ จุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซิ่ง (NOB) รวมทั้งใช้เทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) เพื่อวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ภายในระบบ โดยที่ถึงปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) กลุ่ม AOM มีค่า q_{max} เท่ากับ 0.128 ± 0.018 mg-N/mgMLVSS.hr และมีค่า K_s เท่ากับ 8.79 ± 3.82 mg-N/L ในขณะที่ถึงปฏิกรณ์ B กลุ่ม AOM มีค่า q_{max} และ K_s เท่ากับ 0.0089 ± 0.0007 mg-N/mgMLVSS.hr และ 1.19 ± 0.47 mg-N/L ในขณะที่ผลการศึกษากลุ่มประชากรด้วยเทคนิค FISH พบว่า ถึงปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) พบกลุ่ม AOM ชนิด *Nitrosomonas europaea* ซึ่งเป็นตัวแทนกลุ่ม Low affinity to ammonia อยู่ร่วมกับชนิด *Nitrosomonas oligotropha* ซึ่งเป็นตัวแทนกลุ่ม High affinity to ammonia ในขณะที่ถึงปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L) พบเฉพาะชนิด *Nitrosomonas oligotropha* เท่านั้น ในส่วนของกลุ่ม NOB ในถึงปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) ค่า q_{max} และค่า K_s มีค่าเท่ากับ 0.045 ± 0.0048 mg-N/mgMLVSS.hr และ 2.57 ± 1.00 mg-N/L ตามลำดับ ในขณะที่ถึงปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L) ค่า q_{max} และค่า K_s มีค่าเท่ากับ 0.0086 ± 0.0009 mg-N/mgMLVSS.hr และ 1.34 ± 0.80 mg-N/L ตามลำดับ โดยที่จุลินทรีย์จากทั้ง 2 ถึงปฏิกรณ์สามารถกำจัดแอมโมเนีย และไนโตรที่ได้เกือบทั้งหมดภายใน 1 วัน สำหรับการทดลองช่วงที่ 2 ได้ทำการสลับความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงในถึงปฏิกรณ์ A จาก 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L และในถึงปฏิกรณ์ B จาก 1 mg-N/L เป็น 50 mg-N/L และทำการทดลองทางจลนพลศาสตร์ในวันที่ 6, 20, 47 และ 95 ภายหลังจากสลับความเข้มข้นและดำเนินการทดลองคล้ายคลึงกับการทดลองช่วงที่ 1 ซึ่งจากค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของกลุ่ม AOM พบว่า ในถึงปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) ค่า q_{max} และค่า K_s ทั้ง 4 ครั้งลดลงอย่างชัดเจน ในขณะที่ถึงปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L) ค่า q_{max} มีค่าเพิ่มขึ้นจากการทดลองที่ 1 ตลอดทั้ง 4 ครั้งในขณะที่ค่า K_s ไม่เปลี่ยนแปลงไปจากการทดลองช่วงที่ 1 มากนัก โดยที่ผลจากเทคนิค FISH พบว่าภายในถึงปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) กลุ่ม AOM ชนิด *Nitrosomonas europaea* ลดลงจากช่วงการทดลองที่ 1 อย่างชัดเจน ในขณะที่ถึงปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L) ยังคงไม่พบ ชนิด *Nitrosomonas europaea* ภายในระบบ โดยที่ทั้ง 2 ถึงปฏิกรณ์ยังคงพบ AOM ชนิด *Nitrosomonas oligotropha* lineage อย่างไรก็ดีอาจมีความเป็นไปได้ว่าจะมีจุลินทรีย์ AOM สกุลอื่นๆ ด้วย แต่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ด้วย probe FISH ในงานวิจัยชิ้นนี้ ส่วนกลุ่ม NOB ในถึงปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) ค่า q_{max} ลดลงจากการทดลองช่วงที่ 1 ในขณะที่ค่า K_s ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน ในขณะที่ถึงปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L) ค่า q_{max} มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่การทดลองที่ 1 ในขณะที่ค่า K_s ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน โดยที่ประสิทธิภาพการบำบัด แอมโมเนียและไนโตรที่ของทั้ง 2 ถึงปฏิกรณ์ยังคงมีประสิทธิภาพไม่ต่างจากการทดลองช่วงที่ 1

ภาควิชา วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

สาขาวิชา วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม

5570232621 : MAJOR ENVIRONMENTAL ENGINEERING

KEYWORDS: AMMONIA-OXIDIZING BACTERIA / AMMONIA-OXIDIZING ARCHAEA / NITRITE-OXIDIZING BACTERIA / FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION / KINETICS / MICROBIAL POPULATION / AMMONIA OXIDATION / NITRITE OXIDATION

TARNPETCH CHAROANWOODTIPONG: Kinetics and communities of ammonia-oxidizing and nitrite-oxidizing microorganisms in brackish water under the change of high and low ammonia concentrations.. ADVISOR: ASST. PROF. BENJAPORN SUWANNASILP, CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. TAWAN LIMPIYAKORN, 199 pp.

This study investigated the changes in kinetics and microbial communities of the microbial enrichments for treating ammonia and nitrite in aquaculture systems caused by the changes of feeding ammonia concentrations. The study was divided into two experiments. For the first experiment, ammonia-oxidizing microorganism (AOM) and nitrite-oxidizing bacteria (NOB) were enriched in two 10-liter batch reactors with different feeding ammonia concentrations, 50 mg-N/l for Reactor A and 1 mg-N/l for Reactor B in which the salinity of both reactors were controlled at approximately 15 ppt. The kinetic characteristics, maximum specific substrate utilization (q_{max}) and half saturation constant for substrate (K_s), of AOM and NOB from both reactors were investigated. Microbial communities in the systems were monitored by Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique. Ammonia and nitrite treatment efficiencies in both reactors were also monitored. In Reactor A (50 mg-N/l), the q_{max} of the AOM was 0.128 ± 0.018 mg-N/mgMLVSS.hr whereas K_s was 8.79 ± 3.82 mg-N/l. For Reactor B (1 mg-N/l), the q_{max} was 0.0089 ± 0.0007 mg-N/mgMLVSS.hr whereas K_s was 1.19 ± 0.47 mg-N/l. The AOM community analysis by FISH technique revealed that in Reactor A (50 mg-N/l), the AOM species, *Nitrosomonas europaea*, which represents the low affinity to ammonia AOM group was found along with the *Nitrosomonas oligotropha* lineage, which represents the high affinity to ammonia AOM group. On the other hand, in Reactor B (1 mg-N/l), only the *Nitrosomonas oligotropha* lineage was observed. For the NOB in Reactor A (50 mg-N/l), the q_{max} and K_s were 0.045 ± 0.0048 mg-N/mgMLVSS.hr and 2.57 ± 1.00 mg-N/l, respectively, whereas in Reactor B (1 mg-N/l), the q_{max} and K_s were 0.0086 ± 0.0009 mg-N/mgMLVSS.hr and 1.34 ± 0.80 mg-N/l, respectively. The microorganisms in both reactors removed ammonia and nitrite in the system effectively within 1 day. For the second experiment, the feeding ammonia concentrations of both reactors were switched. The ammonia concentration fed into Reactor A was changed from 50 mg-N/l to 1 mg-N/l whereas the ammonia concentration fed into Reactor B was changed from 1 mg-N/l to 50 mg-N/l. The kinetic experiments were carried out on the 6th, 20th, 47th and 95th day after the changes of ammonia concentrations. Experimental procedure of the second experiment was identical as in the first experiment. For the kinetics of AOM in Reactor A (1 mg-N/l), the q_{max} and K_s values decreased from the first experiment in all kinetic experiments. For Reactor B (50 mg-N/l), the q_{max} of the AOM increased from the first experiment whereas the K_s did not significantly change from the first experiment. The results of microbial community analysis by FISH revealed that in Reactor A (1 mg-N/l), the AOM species, *Nitrosomonas europaea*, decreased from the first experiment whereas the *Nitrosomonas oligotropha* lineage could still be found in both reactors. Nevertheless, other AOM genera could also be present in these systems but they were not investigated by FISH probes in this study. For the kinetic characteristics of NOB, for Reactor A (1 mg-N/l), the q_{max} decreased from the first experiment while K_s did not significantly change. For Reactor B (50 mg-N/l), the q_{max} increased from the first experiment whereas no significant change in K_s was observed. Ammonia and nitrite were still effectively removed in both reactors similar to before the changes in feeding ammonia concentrations.

Department: Environmental Engineering
Field of Study: Environmental Engineering
Academic Year: 2015

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์จากบุคลากรหลายท่าน ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณบุคคลผู้ให้การอนุเคราะห์สนับสนุนดังต่อไปนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบญจพร สุวรรณศิลป์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. ตะวัน ลิ้มปิยากร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาแนะแนวทางในการดำเนินงานวิจัย และ แก้ไขสิ่งบกพร่องมาตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัย ซึ่งมีส่วนสำคัญมากในการทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรันย์ เตชะเสน ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชัยพร ภูประเสริฐ รองศาสตราจารย์ ดร. ขวลิต รัตนธรรมสกุล และ ดร. สรวิศ เผ่าทองสุข ที่ได้มาเป็นกรรมการ ให้คำปรึกษาชี้แนะ จนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมทั้ง ดร. ภริณดา ทยานุกูล ที่ได้ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับเทคนิค Fluorescence in situ hybridization (FISH) เป็นอย่างดี

คณาจารย์ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนให้ความรู้

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการ ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการใช้วัสดุอุปกรณ์ในการทดลอง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ปฏิบัติการศูนย์เครื่องมือกลางคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (STREC) ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ผล Fluorescence in situ hybridization (FISH)

ขอขอบคุณ นางสาว พิมพ์ศิริ ทิบบแก้ว และ นางสาว ดลหทัย สรวมศิริ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทำงานเก็บข้อมูลงานวิจัยชิ้นนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณโครงการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติประจำปี 2557 สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (WCU-014-PW-57) ที่ได้ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัยงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ และเพื่อนๆ ทุกคนที่ได้ให้กำลังใจ และช่วยเหลือรวมถึงคอยให้คำปรึกษาตลอดช่วงการทำงานวิจัยที่ผ่านมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ฐ
สารบัญตาราง.....	ด
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2	4
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 วัฏจักรไนโตรเจนในธรรมชาติ.....	4
2.2 กระบวนการไนตริฟิเคชัน.....	5
2.2.1. กระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน.....	5
2.2.2 กระบวนการไนโตรทออกซิเดชัน.....	6
2.3 กลุ่มสิ่งมีชีวิตที่เกี่ยวข้องในกระบวนการไนตริฟิเคชัน.....	6
2.3.1 แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Ammonia-Oxidizing Bacteria) (AOB) (Prosser, 2006).....	6
2.3.1.1 ปัจจัยด้านความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ส่งผลต่อการแปรผันกลุ่มประชากร ของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย.....	7

2.3.1.2	ปัจจัยด้านความเค็มที่ส่งผลต่อการผันแปรกลุ่มประชากรของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย	8
2.3.1.3	ปัจจัยด้านความเข้มข้นของแอมโมเนียที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย	9
2.3.1.4	ปัจจัยด้านความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำ (DO) ที่ส่งผลต่ออัตราการใช้ substrate และอัตราการเจริญเติบโตของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย.....	10
2.3.1.5	ปัจจัยของค่าความเค็มที่ส่งผลกระทบต่ออัตราการใช้ substrate ของ Ammonia-oxidizing bacteria.....	11
2.3.1.6	ปัจจัยของ pH ที่ส่งผลกระทบต่ออัตราการใช้ substrate ของ Ammonia-oxidizing bacteria.....	12
2.3.1.7	การวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของกลุ่ม Ammonia-Oxidizing Bacteria.....	12
2.3.2	แอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย (Ammonia-Oxidizing Archea) (Prosser, 2006) ...	14
2.3.3	จุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิง (Nitrite-Oxidizing bacteria) (NOB).....	15
2.4	ผลกระทบของแอมโมเนียและไนไตรท์ต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ	18
2.5	ทฤษฎีทั่วไปของ Monod Equation	19
2.6	Fluorescence in situ hybridization (FISH) (Silverman และ Kool, 2007)	21
2.7	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	24
บทที่ 3	27
การดำเนินการวิจัย	27
3.1	แผนงานวิจัย	27
3.2	การทดลองช่วงที่ 1: การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงและจุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิงที่ความเข้มข้นแอมโมเนียสูง (50 mg-N/L) และความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำ (1 mg-N/L).....	28

3.2.1 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิง และ จุลินทรีย์กลุ่มไนโตรท็อกซิไดซิง	28
3.2.1.1 ลักษณะหัวเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นที่นำมาเพาะเลี้ยง	31
3.2.1.2 ตัวกลาง BCN 012 KLL	31
3.2.1.3 การวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในงานวิจัย	32
3.2.1.4 การวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์	33
3.2.1.5 ขั้นตอนการหา Initial slope และ การสร้างกราฟ Monod	35
3.2.1.6 การหาค่า MLSS ของเชื้อแบคทีเรีย	40
3.3 การทดลองช่วงที่ 2: การเปลี่ยนความเข้มข้นของแอมโมเนียจากความเข้มข้นสูงเป็นความเข้มข้นต่ำ และจากความเข้มข้นต่ำเป็นความเข้มข้นสูง	42
3.4 การศึกษากลุ่มประชากรของแบคทีเรียในระบบ	44
3.4.1 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์จากตัวกลาง	45
3.4.2 ขั้นตอนการ Fixed ตัวอย่างเพื่อเตรียมการนำไปใช้ (Nielsen และคณะ, 2009)	45
3.4.2.1 การเตรียมสารละลายเพื่อ Fixed เซลล์ (4% Paraformaldehyde fixing solution)	45
3.4.2.2 การ Fixation	47
3.4.3 การย้อมสี Probe Fluorescence	49
3.4.3.1 Immobilization	49
3.4.3.2 การเตรียมสารละลาย Probe	49
3.4.3.3 Hybridization และ การล้าง(Washing)	50
3.4.3.4 การส่องกล้อง fluorescence	52
บทที่ 4	53
ผลการดำเนินงานวิจัย	53

4.1 ผลการทดลองช่วงที่ 1 ถึงปฏิกรณ์ A และ B ที่ป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 50 และ 1 mg-N/L.....	53
4.1.1 การดำเนินการถึงปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) และ B (1 mg-N/L)	53
4.1.1.1 การดำเนินการถึงปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L)	53
4.1.1.2 การดำเนินการถึงปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L).....	56
4.1.2. จลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์ในถึงปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) และ ถึงปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L).....	58
4.1.2.1 จลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิง.....	58
4.1.2.2 จลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรทออกซิไดซิง	61
4.1.3 การศึกษากลุ่มประชากรโดยใช้เทคนิค Fluorescence in situ hybridization (FISH)	64
4.1.3.1 การศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในถึงปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) ในช่วงการทดลองที่ 1	64
4.1.3.2 การศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ของถึงปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L).....	71
4.2 การทดลองช่วงที่ 2 ถึงปฏิกรณ์ A และ B ซึ่งป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/L และ 50 mg-N/L.....	78
4.2.1 ผลการดำเนินการถึงปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) และ ถึงปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L).....	78
4.2.1.1 การดำเนินการถึงปฏิกรณ์ A(1 mg-N/L).....	78
4.2.1.2 การดำเนินการถึงปฏิกรณ์ถึงปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L).....	80
4.2.2 จลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์ในถึงปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) และ ถึงปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L).....	83
4.2.2.1 จลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิง.....	84
4.2.2.2 จลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรทออกซิไดซิง	92
4.3 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางจลนพลศาสตร์และกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ภายหลังสลับความเข้มข้นแอมโมเนีย	115

บทที่ 5	123
สรุปผลการทดลอง และ ข้อเสนอแนะ	123
5.1 สรุปผลการทดลอง	123
5.2 ประโยชน์ทางวิศวกรรม.....	129
5.3 ข้อเสนอแนะ	129
รายการอ้างอิง	131
ภาคผนวก.....	140
ภาคผนวก ก.....	141
ภาคผนวก ข.....	145
ภาคผนวก ค.....	154
ภาคผนวก ง.....	160
ภาคผนวก จ.....	169
ภาคผนวก ฉ.....	175
ภาคผนวก ช.....	180
ภาคผนวก ซ.....	190
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	199



สารบัญรูปภาพ

บทที่ 2

รูปที่ 2.1 วัฏจักรไนโตรเจนในธรรมชาติ.....	4
รูปที่ 2.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้ออกซิเจนจำเพาะต่ออัตราการใช้ออกซิเจนจำเพาะสูงสุด (SOUR/SOUR _{MAX}) กับ ค่าแอมโมเนียอิสระ (FA) และ แอมโมเนียทั้งหมด (TAN).....	10
รูปที่ 2.3 เปรียบเทียบอัตราการลดลงของแอมโมเนียเทียบกับเวลา	11
รูปที่ 2.4 Phylogenetic tree ของ β proteobacterial amoA gene	13
รูปที่ 2.5 Phylogenetic tree แบ่งตาม 16S rRNA.....	14
รูปที่ 2.6 ลักษณะของกราฟ Monod ทั่วไป	20
รูปที่ 2.7 หลักการของ FISH อย่างง่าย.....	23

บทที่ 3

รูปที่ 3.1 รายละเอียดแผนงานวิจัย.....	28
รูปที่ 3.2 ลักษณะของถังปฏิกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	29
รูปที่ 3.3 ตัวอย่าง BCN 012 KLL	32
รูปที่ 3.4 ขั้นตอนการทดลองวัดค่าทางจลนพลศาสตร์.....	35
รูปที่ 3.5 กราฟตัวอย่างระหว่างความเข้มข้นของแอมโมเนียและเวลา	36
รูปที่ 3.6: วิธีการลากความชันเพื่อหาความชันเริ่มต้น (Initial slope) ของอัตราการเกิดปฏิกิริยา ...	36
รูปที่ 3.7 ตัวอย่างการหา initial slope ของกราฟที่มี lag time ในช่วงแรก.....	37
รูปที่ 3.8 กราฟระหว่าง specific rate of ammonia oxidation (q)	38
รูปที่ 3.9 สรุปรูปการทดลองช่วงที่ 1.....	41
รูปที่ 3.10 สรุปรูปการทดลองช่วงที่ 2.....	43
รูปที่ 3.11 สรุปรูปการทดลองช่วงที่ 3.....	44
รูปที่ 3.12 การเตรียมสารละลาย 4% Paraformaldehyde.....	46
รูปที่ 3.13 ขั้นตอน Fixation.....	48

บทที่ 4

รูปที่ 4.1 ความเข้มข้นของแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ A ที่ป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย	54
รูปที่ 4.2 ความเข้มข้นของไนโตรทีในถังปฏิกรณ์ A ที่ป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 50 mg-N/L	54
รูปที่ 4.3 ความเข้มข้นของไนเตรทในถังปฏิกรณ์ A ที่เลี้ยงป้อนความเข้มข้นแอมโมเนีย 50 mg-N/L	55
รูปที่ 4.4 ความเข้มข้นของแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ B ที่ป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย	56
รูปที่ 4.5 ความเข้มข้นของไนโตรทีในถังปฏิกรณ์ B ที่ป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/L	57
รูปที่ 4.6 ความเข้มข้นไนเตรทในถังปฏิกรณ์ที่ป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/L	58
รูปที่ 4.7 กราฟ Monod แสดงอัตราการใช้แอมโมเนียจำเพาะ (q) และ ความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น (mg-N/L) ของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L)	60
รูปที่ 4.8 กราฟ Monod แสดงอัตราการใช้แอมโมเนียจำเพาะ (q) และ ความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น (mg-N/L) ของถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L)	61
รูปที่ 4.9 กราฟ Monod แสดงอัตราการใช้นิโตรทีจำเพาะ (q) และ ความเข้มข้นไนโตรทีเริ่มต้น (mg-N/L) ของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L)	63
รูปที่ 4.10 กราฟ Monod แสดงอัตราการใช้นิโตรทีจำเพาะ (q) และ ความเข้มข้นไนโตรทีเริ่มต้น (mg-N/L) ของถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L)	63
รูปที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) ในการทดลองครั้งที่ 1 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe EUB338 (universal bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว)	65
รูปที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) ในการทดลองครั้งที่ 1 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Nse1472 (Nitrosomonas europaea) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว)	66

รูปที่ 4.13 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 1 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Cluster6a192 (*Nitrosomonas oligotropha* lineage) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa- Flour488 (สีเขียว) 67

รูปที่ 4.14 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 1 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Ntspa662 (*Nitrospira*) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว)..... 69

รูปที่ 4.15 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 1 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Nit3 (*Nitrobacter*) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว).... 70

รูปที่ 4.16 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 1 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe EUB338 (universal bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว)..... 72

รูปที่ 4.17 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 1 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Nse1472(*Nitrosomonas europaea*) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว)..... 73

รูปที่ 4.18 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/l) ในช่วงการทดลองที่ 1 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Cluster6a192 (*Nitrosomonas oligotropha* lineage) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว) 74

รูปที่ 4.19 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/l) ในช่วงการทดลองที่ 1 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Ntspa662 (*Nitrospira*) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว).... 76

รูปที่ 4.20 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 1 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Nit3 (*Nitrobacter*) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว).... 77

รูปที่ 4.21 ความเข้มข้นของแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ A เมื่อสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l	78
รูปที่ 4.22 ความเข้มข้นของไนโตรทรีในถังปฏิกรณ์ A เมื่อสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l	79
รูปที่ 4.23 ความเข้มข้นของไนเตรทในถังปฏิกรณ์ A เมื่อสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l	80
รูปที่ 4.24 ความเข้มข้นของแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ B เมื่อสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l	81
รูปที่ 4.25 ความเข้มข้นของไนโตรทรีในถังปฏิกรณ์ B เมื่อสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l	82
รูปที่ 4.26 ความเข้มข้นของไนเตรทในถังปฏิกรณ์ B เมื่อสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l	83
รูปที่ 4.27 กราฟอัตราการใช้แอมโมเนีย จำเพาะ (q) และความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l เป็นเวลา 6 วัน.....	85
รูปที่ 4.28 กราฟอัตราการใช้แอมโมเนียจำเพาะ (q) และความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ B ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l เป็นเวลา 6 วัน	85
รูปที่ 4.29 กราฟอัตราการใช้แอมโมเนียจำเพาะ (q) และความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l เป็นเวลา 20 วัน	87
รูปที่ 4.30 กราฟอัตราการใช้แอมโมเนียจำเพาะ (q) และความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ B ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l เป็นเวลา 20 วัน	87
รูปที่ 4.31 กราฟอัตราการใช้แอมโมเนียจำเพาะ (q) และความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l เป็นเวลา 47 วัน	89

รูปที่ 4.41 กราฟอัตราการใช้นไนโตรเจนจำเพาะ (q) และความเข้มข้นไนโตรเจนเริ่มต้น (mg-N/L) ของถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L เป็นเวลา 95 วัน..... 98

รูปที่ 4.42 กราฟอัตราการใช้นไนโตรเจนจำเพาะ (q) และความเข้มข้นไนโตรเจนเริ่มต้น (mg-N/L) ของถังปฏิกรณ์ B ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/L เป็น 50 mg-N/L เป็นเวลา 95 วัน..... 99

รูปที่ 4.43 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L ในการทดลองช่วงที่ 2 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe EUB338 (Universal bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (Ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว)..... 100

รูปที่ 4.44 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L ในการทดลองช่วงที่ 2 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Nse1472 (Nitrosomonas europaea) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (Ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว)..... 101

รูปที่ 4.45 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L ในการทดลองช่วงที่ 2 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Cluster6a192 (Nitrosomonas oligotropha lineage) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (Ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว)..... 103

รูปที่ 4.46 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L ในการทดลองช่วงที่ 2 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Ntspa662 (Nitrospira) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (Ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว)..... 104

รูปที่ 4.47 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับจากความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L ในการทดลองช่วงที่ 2 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Nit3 (Nitrobacter) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (Ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว)..... 106

รูปที่ 4.48 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ B ภายหลังจากสลับจากความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 เป็น 50 mg-N/L ในการทดลองช่วงที่ 2 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้

probe EUB338 (Universal bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (Ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว)..... 108

รูปที่ 4.49 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ B ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/L เป็น 50 mg-N/L ในการทดลองช่วงที่ 2 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Nse1472 (Nitrosomonas europaea) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (Ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว)..... 109

รูปที่ 4.50 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ B เมื่อสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/L เป็น 50 mg-N/L ในการทดลองช่วงที่ 2 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Cluster6a192 (Nitrosomonas oligotropha lineage) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (Ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว).. 111

รูปที่ 4.51 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ B ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/L เป็น 50 mg-N/L ในการทดลองช่วงที่ 2 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Ntspa662 (Nitrospira) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (Ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว)..... 113

รูปที่ 4.52 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ B เมื่อสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/L เป็น 50 mg-N/L ในการทดลองช่วงที่ 2 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Nit3 (Nitrobacter) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (Ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว) 114

รูปที่ 4.53 ตารางแสดงค่า excitation wavelength และ emission wavelength ของสี florescence ของกล้อง fluorescence confocal รุ่น OLYMPUS-FLUOVIEW-FV10i..... 121

บทที่ 5

รูปที่ 5.1 แผนภูมิแท่งสรุปผลการทดลองค่าอัตราการใช้แอมโมเนียสูงสุด (q_{max}) ของถังปฏิกรณ์ A และ B ในการทดลองช่วงที่ 1 และ ช่วงที่ 2..... 125

รูปที่ 5.2 แผนภูมิแท่งสรุปผลการทดลองค่า Half saturation to ammonia(K_s) ของถังปฏิกรณ์ A และ B ในการทดลองช่วงที่ 1 และ ช่วงที่ 2..... 126

รูปที่ 5.3 แผนภูมิแท่งสรุปผลการทดลองค่าอัตราการใช้ในไตรท์สูงสุด (q_{max}) ของถังปฏิกรณ์ A และ B ในการทดลองช่วงที่ 1 และ ช่วงที่ 2 128

รูปที่ 5.4 แผนภูมิแท่งสรุปผลการทดลองค่า Half saturation to nitrite (K_s) ของถังปฏิกรณ์ A และ B ในการทดลองช่วงที่ 1 และ ช่วงที่ 2 128

รูปที่ 5.5 แผนภูมิแท่งแสดงค่า MLVSS ของถังปฏิกรณ์ A และ B ในการทดลองช่วงที่ 1 และช่วงที่ 2..... 129

ภาคผนวก ก

รูปที่ ก.1 ตัวอย่างกราฟสารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย 142

รูปที่ ก.2 ตัวอย่างกราฟสารละลายมาตรฐานไนไตรท์..... 143

รูปที่ ก.3 ตัวอย่างกราฟสารละลายมาตรฐานไนเตรท 144



สารบัญตาราง

บทที่ 2

ตารางที่ 2.1 ค่าพารามิเตอร์ของแอมโมเนียออกซิไดซิงทั่วไปที่พบตามระบบบำบัดน้ำเสีย.....	7
ตารางที่ 2.2 ค่าพารามิเตอร์เปรียบเทียบทางจุลชีววิทยาของแบคทีเรียในระบบที่มีแบคทีเรียชนิด <i>Nitrosomonas europaea</i> เป็นกลุ่มหลักกับระบบที่มีแบคทีเรียชนิด <i>Nitrosomonas oligotropha</i> เป็นกลุ่มหลัก.....	9
ตารางที่ 2.3 ค่าพารามิเตอร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซิงทั่วไป.....	16
ตารางที่ 2.4 ตารางเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ทางจุลชีววิทยาของ <i>Nitrobacter</i> และ <i>Nitrospira</i>	17
ตารางที่ 2.5 การเลือกใช้ probe FISH ในงานวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย.....	23

บทที่ 3

ตารางที่ 3.1 การเตรียมสารอาหารสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิง.....	30
ตารางที่ 3.2 การเตรียมสารละลาย Non-chelated trace element.....	30
ตารางที่ 3.3 การเตรียมสารละลาย Silinite Tungstate.....	31
ตารางที่ 3.4 คุณสมบัติทางกายภาพของตัวกลางพลาสติก BCN-012 KLL.....	32
ตารางที่ 3.5 การวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ.....	33
ตารางที่ 3.6 ตัวอย่างตารางค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองวัดค่าจุลชีววิทยาของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิง.....	39
ตารางที่ 3.7 ตัวอย่างตารางค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองวัดค่าจุลชีววิทยาของไนโตรที่ออกซิไดซิงแบคทีเรีย.....	40
ตารางที่ 3.8 สารเคมีที่ต้องใช้ในการเตรียม 4% Paraformaldehyde fixing solution (ในกรณีที่ใช้ปริมาตร 10 ml).....	45
ตารางที่ 3.9 รายการ Probe ที่ใช้ทั้งหมดในงานวิจัย.....	50
ตารางที่ 3.10 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอน Hybridization ตามความเข้มข้น Formamide ต่างๆ.....	50

ตารางที่ 3.11 สารเคมีในการเตรียม Washing buffer solution ตามความเข้มข้น formamide ที่ใช้ในขั้นตอน hybridization 51

บทที่ 4

ตารางที่ 4.1 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในถังปฏิกรณ์ A ที่ป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 50 mg-N/L ในการทดลองช่วงที่ 1..... 56

ตารางที่ 4.2 : ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในถังปฏิกรณ์ B ที่ป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/L ในการทดลองช่วงที่ 1..... 58

ตารางที่ 4.3 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องของถังปฏิกรณ์ A ในการทดลองช่วงที่ 2 เมื่อสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L 80

ตารางที่ 4.4 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการทดลองช่วงที่ 2 ของถังปฏิกรณ์ B เมื่อสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/L เป็น 50 mg-N/L 83

ตารางที่ 4.5 สรุปผลพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงตลอดการทดลองของถังปฏิกรณ์ A (การทดลองช่วงที่ 1 ป้อนด้วยแอมโมเนียความเข้มข้น 50 mg-N/L, การทดลองช่วงที่ 2 ป้อนด้วยแอมโมเนียความเข้มข้น 1 mg-N/L)..... 115

ตารางที่ 4.6 สรุปผลพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงตลอดการทดลองของถังปฏิกรณ์ B (การทดลองช่วงที่ 1 ป้อนด้วยแอมโมเนียความเข้มข้น 1 mg-N/L, การทดลองช่วงที่ 2 ป้อนด้วยแอมโมเนียความเข้มข้น 50 mg-N/L) 116

ตารางที่ 4.7 สรุปผลพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซิงตลอดการทดลองของถังปฏิกรณ์ A (การทดลองช่วงที่ 1 ป้อนด้วยแอมโมเนียความเข้มข้น 50 mg-N/L, การทดลองช่วงที่ 2 ป้อนด้วยแอมโมเนียความเข้มข้น 1 mg-N/L) 118

ตารางที่ 4.8 สรุปผลพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซิงตลอดการทดลองของถังปฏิกรณ์ B (การทดลองช่วงที่ 1 ป้อนด้วยแอมโมเนียความเข้มข้น 1 mg-N/L, การทดลองช่วงที่ 2 ป้อนด้วยแอมโมเนียความเข้มข้น 50 mg-N/L) 119

ตารางที่ 5.1 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงในถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) และถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L) ในการทดลองช่วงที่ 2 125

ตารางที่ 5.2 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซิงในถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) และถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L) ในการทดลองช่วงที่ 2 127

ภาคผนวก ข

ตารางที่ ข.1 ผลทางกายภาพของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L)..... 146

ตารางที่ ข.2 ผลทางกายภาพของถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L)..... 150

ภาคผนวก ค

ตารางที่ ค.1 ผลทางกายภาพของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L)..... 155

ตารางที่ ค.2 ผลทางกายภาพของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L)..... 158

ภาคผนวก ง

ตารางที่ ง.1 ผลทางเคมีของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L)..... 161

ตารางที่ ง.2 ผลทางเคมีของถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L)..... 165

ภาคผนวก จ

ตารางที่ จ.1 ผลทางเคมีของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L)..... 170

ตารางที่ จ. 2 ผลทางเคมีของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L)..... 173

ภาคผนวก ฉ

ตารางที่ ฉ.1 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) ในการทดลองช่วงที่ 1. 177

ตารางที่ ฉ.2 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L) ในการทดลองช่วงที่ 1... 177

ตารางที่ ฉ.3 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรท์ของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) ในการทดลองช่วงที่ 1 178

ตารางที่ ฉ.4 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรท์ของถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L) ในการทดลองช่วงที่ 1 179

ภาคผนวก ช

ตารางที่ ช.1 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 1 181

ตารางที่ ช.2 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 2(วันที่ 20 ในการทดลองช่วงที่ 2)..... 183

ตารางที่ ช.3 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 3 (วันที่ 47 ในการทดลองช่วงที่ 2)..... 184

ตารางที่ ช.4 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 4 (วันที่ 95 ในการทดลองช่วงที่ 2)..... 185

ตารางที่ ข.5 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 1 (วันที่ 6 ในการทดลองช่วงที่ 2).....	186
ตารางที่ ข.6 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 2 (วันที่ 20 ในการทดลองช่วงที่ 2).....	187
ตารางที่ ข.7 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 3 (วันที่ 47 ในการทดลองช่วงที่ 2).....	188
ตารางที่ ข.8 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 4 (วันที่ 95 ในการทดลองช่วงที่ 2).....	189

ภาคผนวก ข

ตารางที่ ข.1 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรที่ของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 1.....	191
ตารางที่ ข.2 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรที่ของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 2.....	193
ตารางที่ ข.3 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรที่ของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 3.....	193
ตารางที่ ข.4 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรที่ของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 3.....	194
ตารางที่ ข.5 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรที่ของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 1 (วันที่ 6 ในการทดลองช่วงที่ 2).....	195
ตารางที่ ข.6 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรที่ของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 2 (วันที่ 20 ในการทดลองช่วงที่ 2).....	196
ตารางที่ ข.7 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรที่ของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 3 (วันที่ 47 ในการทดลองช่วงที่ 2).....	197
ตารางที่ ข.8 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรที่ของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 4 (วันที่ 95 ในการทดลองช่วงที่ 2).....	198

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำถือเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญชนิดหนึ่งในประเทศไทย ในปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์สัตว์น้ำต่างๆ เพื่อเป็นสินค้าภายในประเทศ และ สินค้าส่งออก ทั้งอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด และ น้ำเค็ม อาทิ ปลาน้ำจืด ปลาน้ำเค็ม รวมทั้ง อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมที่ทำรายได้หลักให้กับประเทศ (กรมประมง, 2553)

อย่างไรก็ดีในการดำเนินการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น กุ้งต่างๆ อาจมีปัญหาทางสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงดูต่างๆ ที่อาจก่อให้เกิดปัญหาในการควบคุมการเลี้ยงซึ่งเกิดจากตัวสัตว์น้ำเอง อันได้แก่ การสะสมของสารเคมีบางประเภทในระบบ เช่น แอมโมเนีย และ ไนโตรท ในระบบ ซึ่งหากสารเหล่านี้มีปริมาณที่มากเกินไปในระบบจะส่งผลกระทบต่อสัตว์น้ำ ซึ่งอาจส่งผลให้ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพต่ำลงหรืออาจเกิดการสูญเสียสัตว์น้ำเหล่านี้ในระบบ ดังนั้นจึงได้มีความพยายามศึกษาหาแนวทางต่างๆ ในการป้องกันและแก้ไขปัญหาเหล่านี้

แนวทางการแก้ปัญหาหนึ่งที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายคือ การนำหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการบำบัด แอมโมเนีย และ ไนโตรทในระบบ มาเพื่อใช้แก้ปัญหาคาร์บอนไดออกไซด์และ ไนโตรทในระบบ ซึ่งโดยทั่วไปหัวเชื้อที่ถูกนำมาใช้มักเป็นหัวเชื้อที่เลี้ยงภายใต้สภาวะแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียค่อนข้างสูง โดยอาจอยู่ในช่วงระหว่างความเข้มข้นของแอมโมเนียเกิน 20 mg-N/L ขึ้นไป อย่างไรก็ตามหัวเชื้อที่เลี้ยงเพาะสัตว์น้ำส่วนมากมักมีแอมโมเนียปนเปื้อนอยู่ในปริมาณที่ไม่สูงมากนัก ทำให้การนำหัวเชื้อที่ได้จากสภาวะแวดล้อมที่มีแอมโมเนียสูงอาจใช้ไม่ได้ผลมากเท่าที่ควร เนื่องจากปัจจัยทางจลนพลศาสตร์ที่อาจไม่เอื้ออำนวยให้เชื้อเหล่านี้เจริญเติบโตและทำงานได้เต็มประสิทธิภาพ

จากงานวิจัยที่ผ่านมาสามารถสรุปได้ว่าเมื่อนำจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมที่มีสภาวะแบบหนึ่งมาเพาะเลี้ยงในความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ กลุ่มประชากรของจุลินทรีย์จะมีแนวโน้มเปลี่ยนแปลงไปทางกลุ่ม High ammonia affinity และเมื่อถูกเพาะเลี้ยงในระบบที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูง กลุ่มประชากรของจุลินทรีย์ก็จะมีแนวโน้มเปลี่ยนแปลงไปยังกลุ่ม Low ammonia affinity หรืออีกนัยหนึ่ง กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในระบบจะมีแนวโน้มเปลี่ยนแปลงและปรับตัวให้เหมาะสมกับระบบเสมอ เช่นเดียวกับจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรทออกซิไดซิง

อย่างไรก็ตามสืบเนื่องจากประเด็นดังกล่าว ณ ปัจจุบัน ยังไม่มีงานวิจัยที่ยืนยันชัดเจนถึงสมมติฐานข้างต้นเกี่ยวกับการนำหัวเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ที่เลี้ยงด้วยความเข้มข้นแอมโมเนียสูงมาใช้งานที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ หรือในทางกลับกันหากนำเชื้อจากสภาพแวดล้อมความเข้มข้นต่ำมาบำบัดในสภาวะแวดล้อมที่มีความเข้มข้นที่สูง ผลที่ได้จะเป็นเช่นใด และจะมีการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์และจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรโทออกซิไดซ์เป็นอย่างไร ซึ่งประเด็นดังกล่าว จึงเป็นที่มาของงานวิจัยชิ้นนี้

งานวิจัยชิ้นนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลณพลศาสตร์ และกลุ่มประชากรของทั้งกลุ่มจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ และจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรโทออกซิไดซ์เมื่อถูกนำมาเลี้ยงต่างจากสภาพแวดล้อมเดิมที่เชื้อเหล่านั้นเคยอาศัยอยู่ โดยทำการเริ่มเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์และจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรโทออกซิไดซ์จากความเข้มข้นของแอมโมเนีย 1 mg-N/L และ 50 mg-N/L จากนั้นเมื่อระบบคงที่แล้วจึงทำการสลับความเข้มข้นของทั้ง 2 ถึง โดยจะทำการวัดพารามิเตอร์ทางจุลณพลศาสตร์ ได้แก่ อัตราการใช้ Substrate สูงสุด (q_{max}) , และค่า Half saturation constant (K_s) และการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรจะทำได้โดยใช้เทคนิค *fluorescence in situ hybridization*(FISH) เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบ รวมทั้งประสิทธิภาพในการบำบัดแอมโมเนีย และ ไนโตรของทั้ง 2 ถึงปฏิกรณ์

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลณพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์และจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรโทออกซิไดซ์เมื่อความเข้มข้นแอมโมเนียเปลี่ยนแปลงจากความเข้มข้นสูง (50 mg-N/L) ไปความเข้มข้นต่ำ (1 mg-N/L) และจากความเข้มข้นต่ำ (1 mg-N/L) ไปความเข้มข้นสูง (50 mg-N/L)
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์และจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรโทออกซิไดซ์เมื่อความเข้มข้นแอมโมเนียเปลี่ยนแปลงจากความเข้มข้นสูง (50 mg-N/L) ไปความเข้มข้นต่ำ (1 mg-N/L) และจากความเข้มข้นต่ำ (1 mg-N/L) ไปความเข้มข้นสูง (50 mg-N/L)

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. ศึกษาและวิจัยที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ดำเนินการทดลองโดยการนำหัวเชื้อจุลินทรีย์บนตัวกลางพลาสติก (BCN 012-KLL) ที่ผ่านการบ่มโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีความเข้มข้นของ แอมโมเนียแตกต่างกัน (ธนสิทา โชติอนนต์, 2556) มาทำการเพาะเลี้ยงในระบบถังปฏิกรณ์ทั้งหมดแบบแบทช์จำนวน 2 ถังที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 1 mg-N/l และ 50 mg-N/l ตามลำดับโดยที่ปริมาตรแต่ละถังคือ 10 ลิตร โดยใช้ตัวกลางพลาสติก BCN-012 KLL เป็นตัวกลางช่วยยึดเกาะเซลล์แบคทีเรียในระบบ โดยใส่ตัวกลางปริมาตร 5 ลิตรลงในถังปฏิกรณ์แต่ละถัง
3. ทำการสลับความเข้มข้นของถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ถังเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์
4. ใช้น้ำเสียสังเคราะห์เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียและแร่ธาตุที่จำเป็น โดยควบคุมค่าความเค็มที่ 15 part per thousand (ppt)
5. ทำการศึกษาความแตกต่างของจลนพลศาสตร์ของแอมโมเนียออกซิเดชัน และ ไนโตรที่ออกซิเดชัน และทำการวิเคราะห์ค่า Half-saturation constant (K_S), Maximum specific substrate utilization (q_{max}) ของแต่ละถังปฏิกรณ์ และเมื่อทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์สลับค่าความเข้มข้น
6. ศึกษาปริมาณของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิเดชัน และ จุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิเดชัน โดยใช้เทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) เข้าใจจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาทางชีวภาพทั่วไปในระบบที่มีจุลชีพหลายชนิดที่ทำงานคล้ายคลึงกันได้ดีมากซึ่งรวมทั้งเข้าใจการเปลี่ยนแปลงลักษณะกลุ่มประชากรของจุลินทรีย์มากยิ่งขึ้นเมื่อสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงและใช้ข้อมูลเหล่านี้ช่วยในการตัดสินใจคัดเลือกหัวเชื้อมาใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียต่างๆ ได้อย่างเหมาะสม
- 2) เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาทั้งหมดมาทำการปรับปรุงการออกแบบระบบบำบัดน้ำเสียที่เกิดจากของเสียของสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แอมโมเนีย และ ไนโตร

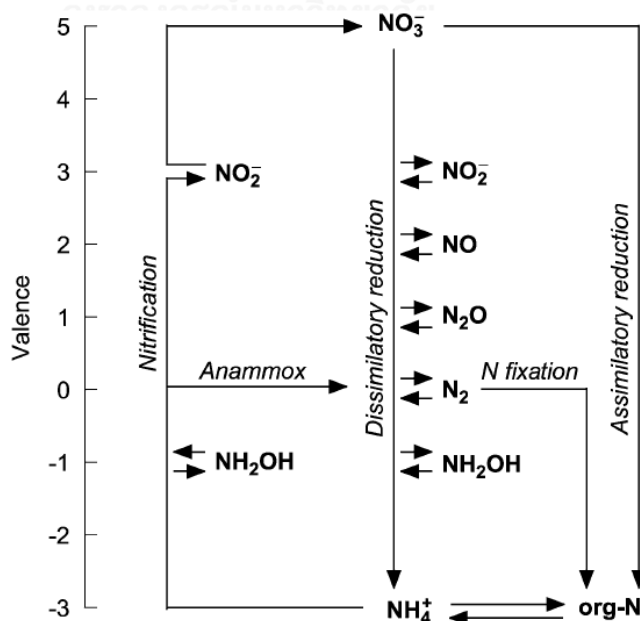
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 วัฏจักรไนโตรเจนในธรรมชาติ (Canfield และคณะ, 2005)

ไนโตรเจนถือเป็นธาตุที่จำเป็นต่อสิ่งมีชีวิตทั่วไปในโลก เนื่องจากไนโตรเจนถือเป็นองค์ประกอบสำคัญ ซึ่งในธรรมชาติไนโตรเจนสามารถอยู่หลายรูปแบบ โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ Inorganic Nitrogen ได้แก่ แอมโมเนีย (NH_4^+), ไนไตรท์ (NO_2^-), ไนเตรท (NO_3^-) ก๊าซไนโตรเจน (N_2) เป็นต้น ในขณะที่สารประกอบไนโตรเจนอีกกลุ่มหนึ่ง คือ Organic Nitrogen เช่น กรดอะมิโน (Amino acid) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของโปรตีนชนิดต่างๆ และเป็นส่วนประกอบสำคัญในร่างกายของสิ่งมีชีวิต, กรดยูริก (Uric acid) และ ยูเรีย (NH_2CONH_2) ซึ่งเป็นของเสียที่เกิดจากกระบวนการเผาผลาญ และขับถ่ายจากร่างกายของสิ่งมีชีวิตต่างๆ

สารประกอบแอมโมเนีย (NH_4^+) สามารถถูกออกซิไดซ์เป็น ไนไตรท์ (NO_2^-) และ ไนเตรท (NO_3^-) โดยกระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification) ในขณะเดียวกันไนเตรทสามารถถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ Organic Nitrogen ด้วยกระบวนการ Assimilatory reduction หรืออาจถูก reduced กลับไปอยู่ในรูปของ ไนโตรเจนที่มีค่าออกซิเดชัน (Oxidation state) ที่ต่ำกว่า เช่น N_2 , NH_2OH , N_2O เป็นต้น วัฏจักรไนโตรเจน และกระบวนการการเปลี่ยนรูปต่างๆ ของไนโตรเจนสามารถสรุปได้ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 วัฏจักรไนโตรเจนในธรรมชาติ (Canfield และคณะ, 2005)

จากวัฏจักรไนโตรเจน ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนีย (NH_4^+) ถือเป็นสารเคมีที่มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำเป็นอย่างมาก เนื่องจากแอมโมเนียมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในแหล่งน้ำ ซึ่งแอมโมเนียเหล่านี้ส่วนมากเกิดขึ้นจากกระบวนการขับถ่ายของสัตว์น้ำ หรืออีกนัยหนึ่งคือไนโตรเจนในรูปของ Organic Nitrogen ถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ แอมโมเนียแล้วถูกขับออกมาดังรูปที่ 2.1 โดยที่ความเป็นพิษของแอมโมเนีย และ รวมถึง Inorganic Nitrogen อื่นๆ เช่น ไนไตรท์ และ ไนเตรท จะถูกกล่าวถึงในหัวข้อถัดไป

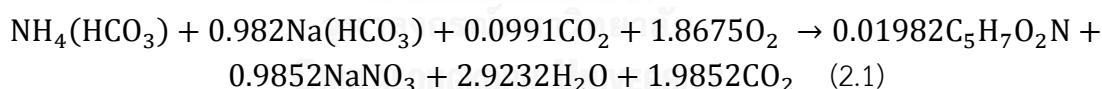
2.2 กระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification)

กระบวนการไนตริฟิเคชัน เป็นกระบวนการกำจัดแอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสียทั่วไป เนื่องจากตัวแอมโมเนียนั้นมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการกำจัดแอมโมเนียก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำ

เนื่องจากแอมโมเนียนั้นมีสถานะออกซิเดชันที่ต่ำ (Oxidation State) จึงใช้วิธีการลดความเป็นพิษของแอมโมเนียด้วยการออกซิไดซ์ ซึ่งการออกซิไดซ์แอมโมเนียนั้นจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนย่อยดังต่อไปนี้

1. กระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน (Ammonia oxidation)
2. กระบวนการไนไตรท์ออกซิเดชัน (Nitrite oxidation)

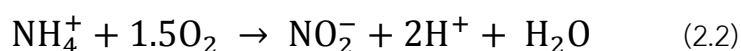
โดยปฏิกิริยาโดยรวมของกระบวนการไนตริฟิเคชันสามารถเขียนออกมาเป็นสมการทางเคมีโดยรวมได้ดังสมการที่ 2.1 (Metcalf and Eddy และคณะ, 2014)



2.2.1. กระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน (Metcalf and Eddy และคณะ, 2014)

กระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชันเป็นกระบวนการเปลี่ยนแอมโมเนีย (NH_4^+) ให้กลายเป็นไนไตรท์ (NO_2^-) โดยมีกลุ่มจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่ง อันได้แก่ แอมโมเนียออกซิไดซ์แบคทีเรีย (Ammonia-oxidizing bacteria) และ แอมโมเนียออกซิไดซ์อาร์เคีย (Ammonia-oxidizing archaea) เป็นตัวที่ทำให้ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้น ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแบคทีเรียกลุ่มคีโมออโต้โทรฟ (Chemoautotroph)

จุลินทรีย์กลุ่มนี้ใช้แอมโมเนียเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) และใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถแสดงเป็นสมการเคมีได้ดังสมการที่ 2.2

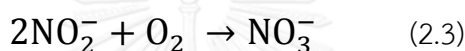


กระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชันสามารถเรียกได้อีกชื่อหนึ่งว่า กระบวนการสร้างไนไตรท์ (Nitritation)

2.2.2 กระบวนการไนไตรท์ออกซิเดชัน (Metcalf and Eddy และคณะ, 2014)

กระบวนการไนไตรท์ออกซิเดชันเป็นกระบวนการต่อเนื่องจากกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชันโดยจะทำการเปลี่ยน ไนไตรท์ (NO_2^-) ให้กลายเป็นไนเตรท (NO_3^-) โดยมีจุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิง (Nitrite-oxidizing microorganisms) เป็นตัวที่ทำให้ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้น ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแบคทีเรียกลุ่มคีโมออโต้โทรฟ (Chemoautotroph) เช่นกัน

แบคทีเรียกลุ่มนี้ใช้ไนไตรท์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) และออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถแสดงเป็นสมการเคมีได้ดังสมการที่ 2.3



กระบวนการไนไตรท์ออกซิเดชันสามารถเรียกได้อีกชื่อหนึ่งว่า กระบวนการสร้างไนเตรท (Nitrataion)

2.3 กลุ่มสิ่งมีชีวิตที่เกี่ยวข้องในกระบวนการไนไตรฟิเคชัน

สิ่งมีชีวิตที่มีความเกี่ยวข้องในกระบวนการไนไตรฟิเคชัน ประกอบไปด้วยกลุ่มสิ่งมีชีวิต 3 ชนิด ได้แก่

1. แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Ammonia-oxidizing bacteria)
2. แอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย (Ammonia-oxidizing archaea)
3. จุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิง (Nitrite-oxidizing bacteria)

2.3.1 แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Ammonia-Oxidizing Bacteria) (AOB) (Prosser, 2006)

แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียชนิด Autotroph ซึ่งใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งมาจากการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้กลายเป็นไนไตรท์ โดยแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียนี้มีมากมายหลายชนิดในธรรมชาติ ซึ่งชนิดที่พบได้ในแหล่งน้ำทั่วไป ได้แก่ *Nitrosomonas oligotropha* , *Nitrosospira* , *Nitrosomonas europaea* และในระบบบำบัดน้ำเสียทั่วไป ได้แก่ *Nitrosomonas europaea* , *Nitrosomonas oligotropha* , *Nitrosomonas eutropha* ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียมีค่าคงที่ต่างๆทางจลนพลศาสตร์เป็นไปดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ค่าพารามิเตอร์ของแอมโมเนียออกซิไดซึ่งทั่วไปที่พบตามระบบบำบัดน้ำเสีย

เอกสารอ้างอิง	μ_{max} (hr ⁻¹)	K_s (mg-N/L)	K_o (mg-O ₂ /L)	Yield	Decay (hr ⁻¹)
Jubany และคณะ (2008)	0.05	-	-	0.18	0.008
Park และ Bae (2009)	0.046	51.3	-	-	-
Munz และคณะ (2011)	0.038	-	-	0.18	0.01
Terada และคณะ (2013)	0.018	3.47	0.10	-	0.01
Ciudad และคณะ (2006)	-	0.3	0.99	-	-
Kaelin และคณะ (2009)	0.033	0.14	0.8	0.18	0.006
Metcalf and Eddy และคณะ (2014)	0.013- 0.042	0.3-0.7	-	-	0.007

2.3.1.1 ปัจจัยด้านความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ส่งผลต่อการแปรผันกลุ่มประชากรของแอมโมเนียออกซิไดซึ่งแบคทีเรีย

ปัจจัยในด้านความเข้มข้นของแอมโมเนียจะส่งผลโดยตรงต่อกลุ่มประชากรภายในระบบ ซึ่งจะส่งผลต่อจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาแอมโมเนียออกซิเดชันอย่างชัดเจน ซึ่งมีงานวิจัยหลายชิ้นได้ทำการตรวจวัดกลุ่มประชากรของแอมโมเนียออกซิไดซึ่งแบคทีเรีย ทั้งจากตัวอย่างน้ำเสียจากระบบบำบัดต่างๆ รวมถึงการนำเชื้อมาเพาะเลี้ยงแล้วนำมาตรวจวัดจำนวนประชากร

จากงานวิจัยของ Jimenez และคณะ (2012) ได้ทำการตรวจวัดกลุ่มประชากร AOB จากระบบบำบัดน้ำเสียซึ่งมีความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ (0-12 mg-N/L) โดยพบกลุ่ม AOB ชนิด *Nitrosomonas oligotropha* อยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Limpiyakorn และคณะ (2011) ที่ได้ทำการตรวจวัดกลุ่มประชากร AOB จากระบบบำบัดน้ำเสียซึ่งมีความเข้มข้นของแอมโมเนียแตกต่างกัน ซึ่งผลที่ได้พบว่ามี *Nitrosomonas oligotropha* เป็นจำนวนมากในระบบที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ (ต่ำกว่า 70 mg-N/L) ในขณะที่ระบบบำบัดแห่งเดียวที่พบว่ามีจำนวนประชากรของ *Nitrosomonas europaea* อยู่เป็นจำนวนมากคือระบบที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูง (422.3 mg-N/L) ในขณะที่ยานวิจัยของ Wang และคณะ (2010) ก็พบ *Nitrosomonas oligotropha* เป็นจำนวนมากเช่นกันในระบบที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำกว่า 70 mgN-NH₄⁺/L และพบ *Nitrosomonas europaea* เป็นส่วนน้อย

ในงานวิจัยของ Whang และคณะ (2009) ได้ทำการตรวจวัดกลุ่มประชากรของแบคทีเรียกลุ่ม AOB จากน้ำเสียของฟาร์มสุกร ซึ่งผลที่ได้พบว่าประชากรส่วนใหญ่เป็นชนิด *Nitrosomonas europaea* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้นเนื่องจากความเข้มข้นของแอมโมเนียในเกณฑ์ที่สูง (215 mg-N/L) แต่ก็ยังพบ *Nitrosomonas oligotropha* อยู่บ้าง

นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Almstrand และคณะ (2011) ซึ่งได้ทำการตรวจวัดกลุ่มประชากร AOB ที่ความเข้มข้นราว 8-9 mg-N/L พบประชากรชนิด *Nitrosomonas oligotropha* มากกว่าร้อยละ 72 จากจำนวนประชากรทั้งหมด อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียเพิ่มสูงขึ้น แนวนิยมของประชากรชนิด *Nitrosomonas europaea* ก็มีแนวโน้มที่จะเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน

จากงานวิจัยดังกล่าวเราจึงพอที่จะสรุปได้ว่า *Nitrosomonas europaea* มักพบในระบบที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูง ในขณะที่ *Nitrosomonas oligotropha* จะพบในระบบที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียค่อนข้างต่ำ

2.3.1.2 ปัจจัยด้านความเค็มที่ส่งผลต่อการผันแปรกลุ่มประชากรของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย

จากงานวิจัยของ Wu และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษากลุ่มประชากรของ Ammonia-oxidizing bacteria และ Ammonia-oxidizing archaea ในโรงงานบำบัดน้ำเสียชุมชนเมื่อมีการแปรผันของค่าความเค็มพบว่า เมื่อค่าความเค็มมีค่าประมาณ 4.83 practical salinity unit (psu) ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างสูง Ammonia-oxidizing bacteria ชนิด *Nitrosomonas marina* และ Ammonia-oxidizing archaea กลุ่ม *Thaumarcheota 1.1a* (marina group) ถูกพบเป็นจำนวนมาก ในขณะที่สูง Ammonia-oxidizing bacteria ชนิด *Nitrosomonas ureae* และ Ammonia-oxidizing archaea กลุ่ม *Thaumarcheota 1.1a* (soil group) จะถูกพบเป็นจำนวนมากเมื่อค่าความเค็มลดต่ำลงเหลือ 1.93 psu

ในขณะที่งานวิจัยของ Sudarno และคณะ (2011) ได้ทำการตรวจสอบกลุ่มประชากร Ammonia-oxidizer ที่มีค่าความเค็มโดยรวมของระบบอยู่ระหว่าง 0.5-9‰ ของเกลือ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ประมาณ 5-90 ppt) พบว่า ประชากรส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม *Nitrosomonas*

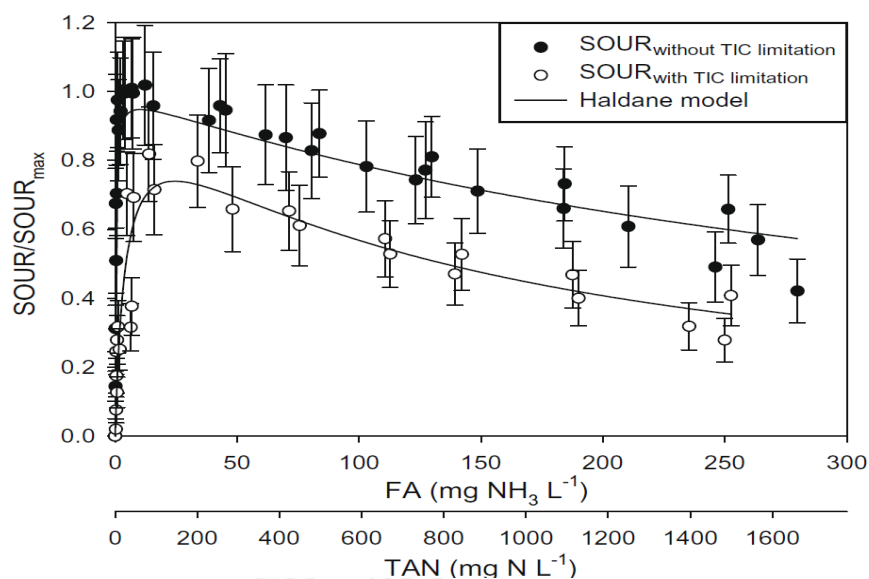
โดยรายละเอียดความแตกต่างทางจุลชีววิทยาของระบบที่มี *Nitrosomonas europaea* อยู่เป็นจำนวนมาก กับ ระบบที่มี *Nitrosomonas oligotropha* อยู่เป็นจำนวนมากสามารถแสดงได้ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ค่าพารามิเตอร์เปรียบเทียบทางจลนพลศาสตร์ของแบคทีเรียในระบบที่มีแบคทีเรียชนิด *Nitrosomonas europaea* เป็นกลุ่มหลักกับระบบที่มีแบคทีเรียชนิด *Nitrosomonas oligotropha* เป็นกลุ่มหลัก

เอกสารอ้างอิง	μ_{\max} (hr ⁻¹) (<i>N.europaea</i>)	μ_{\max} (hr ⁻¹) (<i>N.oligotropha</i>)	K_s (mg/l) (<i>N.europaea</i>)	K_s (mg/l) (<i>N.oligotropha</i>)
Wang และคณะ (2010)	0.088	-	0.42-0.58	0.027-0.059
Limpiyakorn และ คณะ (2011)	0.063-0.138	0.014-0.025	12.3-27.4	0.4-1.1
Wijffels และคณะ (1995)	0.054	-	0.198	-
Taylor และ Bottomley (2006)	-	-	0.2-0.32	0.03-0.07
Rongsayamanont และคณะ (2010)	-	-	0.279-1.06	-
Whang และคณะ (2009)	-	-	37	-
Siripong และ Rittmann (2007)	0.088	-	-	-

2.3.1.3 ปัจจัยด้านความเข้มข้นของแอมโมเนียที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

จากงานวิจัยของ Tora และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นแอมโมเนียที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย AOB ทั้งในสภาวะที่มีการจำกัด Inorganic carbon และไม่จำกัด พบว่าในสภาวะที่ไม่จำกัด Inorganic carbon ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียรวม (Total Ammonium Nitrogen-TAN) ประมาณ 100 mg/l อัตราการใช้ออกซิเจนของแบคทีเรียเริ่มมีค่าลดลงซึ่งจะลดลงไปมากกว่าร้อยละ 20 เมื่อความเข้มข้นของ TAN อยู่ที่ราว 550 mg/l ดังรูปที่ 2.2 โดยการทดลองนี้ได้ทำการทดลองที่ค่า pH เท่ากับ 8.3

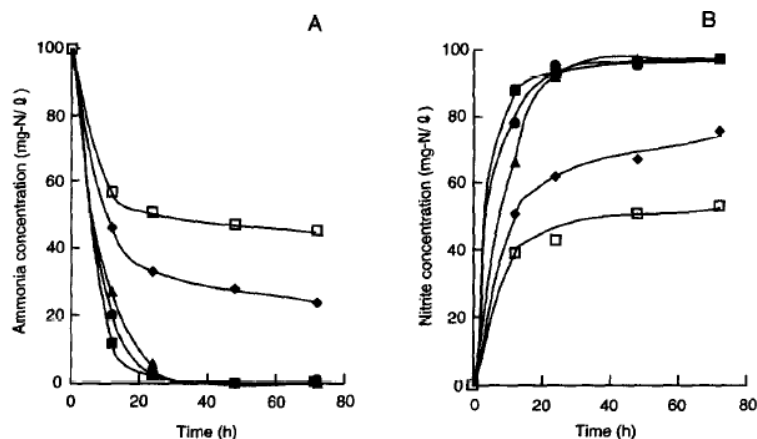


รูปที่ 2. 2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้ออกซิเจนจำเพาะต่ออัตราการใช้ออกซิเจนจำเพาะสูงสุด ($SOUR/SOUR_{MAX}$) กับ ค่าแอมโมเนียอิสระ (FA) และ แอมโมเนียทั้งหมด (TAN) (Tora และคณะ, 2010)

ทางด้านงานวิจัยของ Park และ Bae (2009) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของแอมโมเนียที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ AOB จากสไลด์ 3 ตัวอย่างโดยทำการศึกษาที่ pH เท่ากับ 7 และ 8 พบว่าที่ pH 7 แอมโมเนียแทบจะไม่ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในทุกตัวอย่าง ในขณะที่ pH เท่ากับ 8 จะเริ่มเห็นการยับยั้งที่ความเข้มข้นของแอมโมเนีย ประมาณ 50 mg/l ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tora และคณะ (2010)

2.3.1.4 ปัจจัยด้านความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำ (DO) ที่ส่งผลต่ออัตราการใช้ substrate และอัตราการเจริญเติบโตของแอมโมเนียออกซิไดซ์แบคทีเรีย

จากงานวิจัยของ Uemoto และคณะ (2000) ซึ่งได้ทำการศึกษาปัจจัยในด้านความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำที่มีผลต่ออัตราการใช้ substrate ของแอมโมเนียออกซิไดซ์แบคทีเรียชนิด *N.europaea* ที่ความเข้มข้น 3.84, 7.56, 9.63, 15.54 และ 29.95 mgO₂/l พบว่าที่ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำ 3.84, 7.56, 9.63 mgO₂/l ความเข้มข้นของแอมโมเนียลดลงจาก 100 mg/l เหลือน้อยกว่า 5 mg/l ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ที่ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำ 15.54 และ 29.95 mgO₂/l ความเข้มข้นของแอมโมเนียลดลงอย่างต่อเนื่องใน 12 ชั่วโมงแรกหลังจากนั้นจึงหยุดนิ่ง ซึ่งประสิทธิภาพของการบำบัดแอมโมเนียมีแนวโน้มที่จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำมีค่าสูงขึ้น เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของออกซิเจนสูงขึ้น อัตราการยับยั้งการทำงานของแอมโมเนียออกซิไดซ์แบคทีเรียย่อมมีค่าสูงขึ้น ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 เปรียบเทียบอัตราการลดลงของแอมโมเนียเทียบกับเวลา เมื่อค่าความเข้มข้นการละลายออกซิเจนเปลี่ยนไป (Uemoto และคณะ, 2000)

ทางด้านงานวิจัยของ Park และ Noguera (2004) ได้ทำการวัดอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มที่อาศัยอยู่ในภาวะออกซิเจนต่ำ (Low-DO enrichment) และแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในภาวะออกซิเจนสูง (High-DO enrichment) โดยที่แบคทีเรียกลุ่มแรกจะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดที่ DO ความเข้มข้นประมาณ 2 mg/l และ แบคทีเรียกลุ่มที่สองมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดที่ DO ความเข้มข้นประมาณ 4.5 mg/l อย่างไรก็ตามเมื่ออัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งสองชนิดสูงขึ้นถึงจุดสูงสุด หากค่า DO ยังคงเพิ่มสูงขึ้นอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของทั้งสองชนิดก็มีแนวโน้มที่จะมีค่าลดลง โดยในงานวิจัยนี้พบแบคทีเรียชนิด *N.europaea* เป็นจำนวนมากในแบคทีเรียประเภทที่อาศัยอยู่ในภาวะความเข้มข้นของ DO ต่ำ และพบบ้างในกลุ่มแบคทีเรียที่อยู่ในภาวะความเข้มข้น DO สูง

ในงานวิจัยของ Terada และคณะ (2013) พบว่าอัตราการออกซิไดซ์แอมโมเนียจะเกิดขึ้นสูงสุดที่ความเข้มข้นของ DO 4 mg/l ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Park และ Noguera (2004) อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ไม่ได้ทำการทดลองที่ความเข้มข้นของ DO สูงกว่า 4 mg/l ทำให้ไม่เห็นช่วงที่อัตราการออกซิไดซ์แอมโมเนียลดลงเมื่อความเข้มข้นของ DO สูงขึ้นเหมือนกับงานวิจัยดังกล่าวไว้ข้างต้น

2.3.1.5 ปัจจัยของค่าความเค็มที่ส่งผลกระทบต่ออัตราการใช้ substrate ของ Ammonia-oxidizing bacteria

จากงานวิจัยของ Cortés-Lorenzo และคณะ (2015) ได้ทำการศึกษาผลกระทบต่อค่าความเค็มต่ออัตราการเกิด Nitrification โดยใช้ NaCl ที่ความเข้มข้น 0, 3.7, 24.1 และ 44.1 g/l (ppt) พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่ 24.1 g/l แอมโมเนียที่ออกจากถังปฏิกรณ์มีค่าเพิ่มขึ้นในขณะที่ไนเตรทมีค่าลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัตราการเกิด Nitrification มีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัด

2.3.1.6 ปัจจัยของ pH ที่ส่งผลกระทบต่ออัตราการใช้ substrate ของ Ammonia-oxidizing bacteria

จากงานวิจัยของ Park และ Bae (2009) ยังพบอีกว่า เมื่อทำการทดลองวัดค่าอัตราส่วน activity/maximum activity (q/q_{max}) ที่ pH 7 และ 8 พบว่า ที่ pH เท่ากับ 8 อัตราส่วน q/q_{max} จะเริ่มลดลง ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียราว 50 mg/l และจะลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อแอมโดมเนียเพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ในขณะที่ pH เท่ากับ 7 แทบจะไม่แสดงถึงการลดลงของ q/q_{max} หลังจากที ค่า q/q_{max} ขึ้นสู่จุดสูงสุด เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Jimenez และคณะ (2012) ซึ่งได้ทำการศึกษาทดลองหาค่าอัตราการใช้ออกซิเจนสูงสุด (OUR_{MAX}) ที่ pH แตกต่างกันพบว่าที่ pH 7.53 และ 7.81 ให้ค่า OUR_{MAX} สูงที่สุด

จากงานวิจัยที่ผ่านมาทำให้สรุปได้ว่าที่ pH ประมาณ 7 จะไม่ส่งผลกระทบต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่ม AOB

2.3.1.7 การวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของกลุ่ม Ammonia-Oxidizing Bacteria

การวิเคราะห์โดยใช้แผนภูมิ Phylogenetic (Phylogenetic tree) ช่วยให้ทราบถึงที่มา และบรรพบุรุษของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด รวมถึงวิวัฒนาการของแต่ละชนิดที่แตกแขนงออกมาจากบรรพบุรุษของตัวเอง

โดยทั่วไป Ammonia-Oxidizing Bacteria สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่

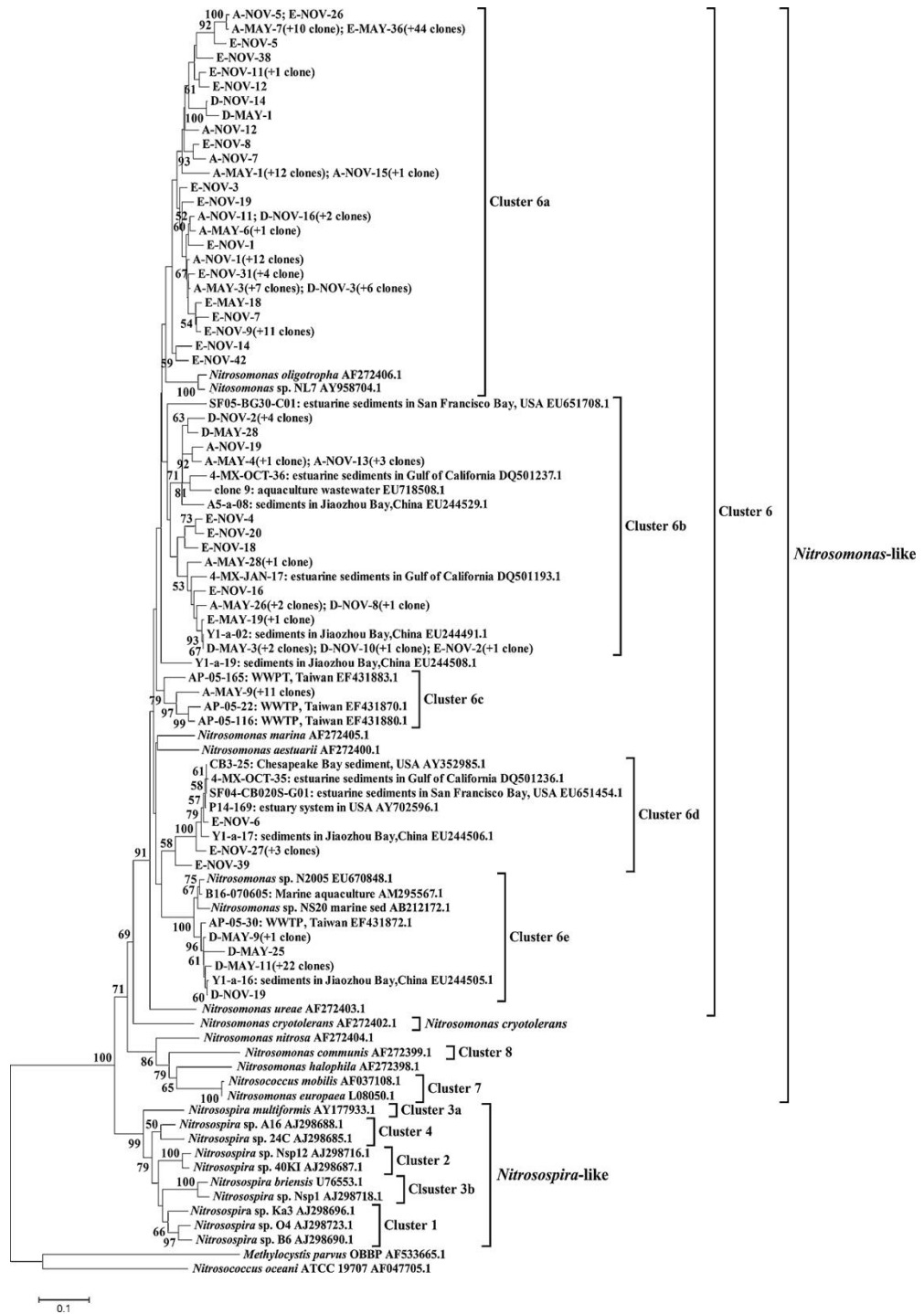
1. Beta-proteobacteria
2. Gamma-proteobacteria

ซึ่งโดยทั่วไป Ammonia-Oxidizing Bacteria มักอยู่ในกลุ่มแรกเป็นหลัก ซึ่งในการวิเคราะห์ Phylogenetic tree สามารถแบ่งการจำแนกได้ออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่

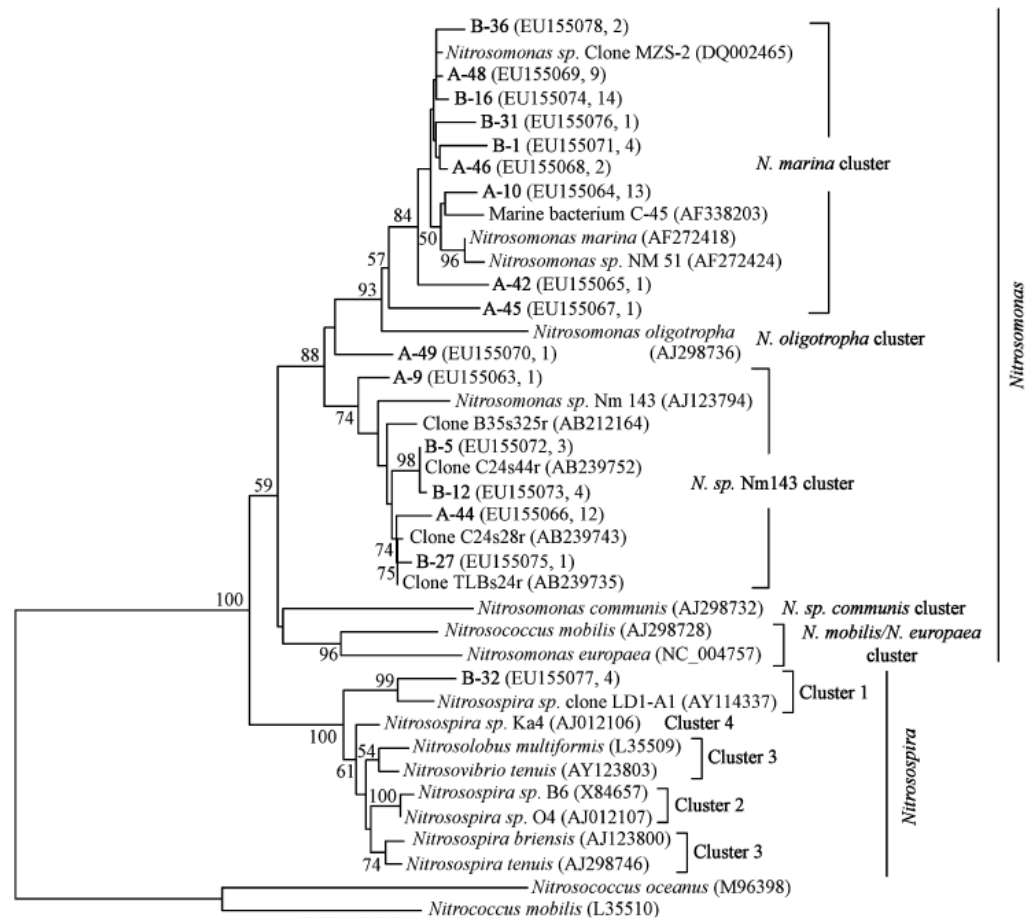
1. การจำแนกตาม amoA gene
2. การจำแนกตาม 16S rRNA gene

สำหรับการจำแนก Ammonia-Oxidizing Bacteria โดยการจำแนกด้วย amoA gene ชนิด *Nitrosomonas europaea* จัดอยู่ใน Cluster 7 ในขณะที่ *Nitrosomonas oligotropha* จัดอยู่ใน Cluster 6a ซึ่งทั้งสองชนิดจัดอยู่ในกลุ่ม *Nitrosomonas* cluster ดังแสดงในรูปที่ 2.4

ในขณะที่การจำแนกด้วย 16S rRNA gene แบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มจัดอยู่ใน cluster “*Nitrosomonas*” ซึ่งในcluster นี้จะถูกแบ่งออกเป็นอีก 6 กลุ่มย่อย ซึ่ง *N.europaea* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับพวก *N.eutropha*, *N.halophila* ส่วน *N.oligotropha* ถูกจำแนกออกเป็นกลุ่มย่อยกลุ่มเดียว ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.4 Phylogenetic tree ของ β proteobacterial *amoA* gene (Cao และคณะ, 2011)



รูปที่ 2.5 Phylogenetic tree แบ่งตาม 16S rRNA (Ma และคณะ, 2008)

2.3.2 แอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย (Ammonia-Oxidizing Archea) (Prosser, 2006)

อาร์เคียจัดเป็นสิ่งมีชีวิตโบราณชนิดหนึ่ง ที่สามารถอาศัยอยู่ในสภาพสิ่งแวดล้อมที่รุนแรงที่แบคทีเรียโดยทั่วไปไม่สามารถอาศัยอยู่ได้ แต่ก็มีบางกลุ่มที่อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมปกติ เช่นกัน ตัวอย่างเช่น Ammonia Oxidizing Archea (AOA)

Ammonia-Oxidizing Archea (AOA) ถูกค้นพบไม่นาน เนื่องจากมีการตรวจพบ ยีนส์ archaea ammonia monooxygenase (amo) ซึ่งบรรจุรหัสพันธุกรรมอยู่บน ammonia monooxygenase (AMO) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการบ่งบอกถึงจุลชีพที่สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียได้

จากงานวิจัยของ Limpiyakorn และคณะ (2011) ได้ทำการตรวจสอบกลุ่มประชากรของ AOA เทียบกับกลุ่มประชากร AOB พบว่า กลุ่มประชากร AOA สามารถพบได้ในน้ำเสียของระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียขาเข้าและขาออกต่ำ (5.6-11.0 mg-N/l และ 0.2-3.0 mg-N/l ตามลำดับ) นอกจากนี้ในงานวิจัยชิ้นนี้ยังได้พบว่ามีกลุ่ม AOA ชนิด *Candidatus-*

Nitrosopumilus martinimus จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นของแอมโมเนีย 28 mg-N/l รวมทั้ง activity ของชนิดนี้ก็ถูกยับยั้งที่ความเข้มข้น 43.1 mg-N/l นอกจากนี้ในงานวิจัยชิ้นนี้ยังได้มีการรายงานค่า K_s ซึ่งมีค่าประมาณ 3.91 μM (0.05 mg-N/l) และมีค่าสัมประสิทธิ์การเจริญเติบโตสูงสุด (μ_{max}) อยู่ในช่วง 0.006-0.138 hr^{-1}

ในงานวิจัยของ Yamada และคณะ (2013) ได้ทำการตรวจสอบกลุ่มประชากรของ AOA เปรียบเทียบกับ AOB ในกองหมักปุ๋ย (Composting pile) ซึ่งมีความเข้มข้นของแอมโมเนียค่อนข้างสูง (>500 mg-N/kg) ซึ่งจากผลงานวิจัยนั้นแทบจะไม่พบกลุ่มสิ่งมีชีวิต AOA อยู่เลย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Limpiyakorn และคณะ (2011)

นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Cao และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษากลุ่มประชากร AOA เปรียบเทียบกับกลุ่มประชากร AOB ในป่าชายเลน (mangrove) ซึ่งมีความเข้มข้นของแอมโมเนียอยู่ในช่วง 55.2 – 344.8 μM (0.78 – 4.8 mg-N/l) พบว่า จำนวนประชากรของ AOA มีปริมาณที่มากกว่า AOB ในทุกที่และทุกช่วงเวลาโดยที่อัตราส่วนระหว่าง AOA/AOB อยู่ระหว่าง 1.8-6.3

จากงานวิจัยข้างต้นที่ได้กล่าวมาทำให้เป็นที่สรุปได้ว่า Ammonia-Oxidizing archaea (AOA) สามารถพบได้เป็นจำนวนมากในสิ่งแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ต่ำมาก ซึ่งจากรายงานดังกล่าวนี้ทำให้เป็นที่เชื่อกันว่า AOA น่าจะเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีบทบาทสำคัญในการกำจัดแอมโมเนียในพื้นที่ที่มีความปนเปื้อนต่ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน ซึ่งมีความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ อย่างไรก็ตาม Ammonia-Oxidizing Archea เป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่เพิ่งมีการค้นพบและยังต้องมีการศึกษาอีกมากเพื่อรวบรวมข้อมูล ทั้งทางด้านจุลชีววิทยาและ การกระจายตัวในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ

2.3.3 จุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิง (Nitrite-Oxidizing bacteria) (NOB)

จุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิงเป็นจุลินทรีย์ชนิด Chemoautotroph ซึ่งใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนหลักเพื่อใช้ในการสร้างเซลล์ ในระบบบำบัดน้ำเสีย แบคทีเรียจำพวกนี้จะใช้ CO_2 ที่ละลายอยู่ในน้ำในรูปของ $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก จุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิงจะเจริญเติบโตได้ดีในช่วง pH ประมาณ 7-10 (Jimenez และคณะ, 2011) และมีค่าพารามิเตอร์โดยทั่วไปทางจุลชีววิทยาดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ค่าพารามิเตอร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซ์ทั่วไป

เอกสารอ้างอิง	K_S (mg-NO ₂ /l)	μ_{max} (hr ⁻¹)	Decay rate constant (hr ⁻¹)	Y_g (gCOD/gVSS)
Ni และคณะ (2008)	-	0.031	0.0083	-
Munz และคณะ (2011)	-	0.058	0.01	0.06
Jubany และคณะ (2005)	12.6	0.019	0.0059	-
Jubany และคณะ (2009)	-	0.043	0.007	-
Kaelin และคณะ (2009)	0.5	0.02-0.04	0.01	0.06
Jime'hez และคณะ (2011)	0.3	-	-	-

จากตารางที่ 2.3 จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีอัตราการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างต่ำ (ค่า K_S , μ_{max} , Yield ต่ำ) เนื่องมาจากการที่ตัวมันเองใช้ CO₂ ที่ละลายในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนหลักซึ่งต้องใช้พลังงานอย่างมากในการเปลี่ยน CO₂ ให้กลับไปอยู่ในรูปของคาร์บอนอินทรีย์จึงเหลือนำมาใช้สร้างเซลล์ได้น้อยนั่นเอง

จุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซ์ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสีย โดยทั่วไป สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดได้แก่

1. *Nitrobacter*
2. *Nitrospira*

จากงานวิจัยของ Huang และคณะ (2010) พบว่าเมื่อสิ่งแวดล้อมมีความเข้มข้นของไนโตรที่สูง *Nitrobacter* จะถูกพบเป็นจำนวนมาก ในขณะที่เดียวกันเมื่อสิ่งแวดล้อมมีความเข้มข้นของไนโตรที่ต่ำ ก็จะมี *Nitrospira* เป็นจำนวนมากแทนซึ่งจากงานวิจัยของ Blackburne และคณะ (2007) ได้ทำการวัดค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด เช่น ค่า K_S ผลที่ออกมาพบว่าค่า K_S ของ *Nitrobacter* มีค่าสูงกว่า *Nitrospira* ซึ่งผลการทดลองนั้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Huang และคณะ รวมทั้งค่าอัตราการใช้ออกซิเจนสูงสุด (OUR_{MAX}) ของ *Nitrobacter* ก็มีค่าสูงกว่า *Nitrospira* อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับผลจากงานวิจัยของ Kim และ Kim (2006) ซึ่งพบว่าอัตราการทำงานของแบคทีเรียกลุ่ม NOB จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อในระบบมี *Nitrobacter* อยู่มาก

อย่างไรก็ดี *Nitrospira* มีแนวโน้มที่จะเจริญเติบโตในสิ่งแวดล้อมที่มีค่าการละลายออกซิเจน (DO) ที่ต่ำกว่า 1 mg/L ได้ดีกว่า *Nitrobacter* รวมทั้งเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า *Nitrobacter* อีกด้วย Huang และคณะ (2010)

นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Alawi และคณะ (2009) ยังได้มีการค้นพบ NOB ชนิดใหม่ที่มีชื่อว่า *Nitrotoga* ซึ่งเป็น NOB ชนิด high affinity to nitrite ซึ่งในงานวิจัยระบุว่าแบคทีเรียชนิด *Nitrotoga* สามารถพบได้ในระบบที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนราว 0.3 M (4.2 mg-N/L) อีกด้วย

ตารางที่ 2.4 ตารางเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของ *Nitrobacter* และ *Nitrospira*

เอกสารอ้างอิง	K_S (<i>Nitrobacter</i>) (mg-NO ₂ /L)	K_S (<i>Nitrospira</i>) (mg-NO ₂ /L)	OUR _{MAX} (<i>Nitrobacter</i>) (mg/g-VSS.h)	OUR _{MAX} (<i>Nitrospira</i>) (mg/g-VSS.h)
Blackburne และคณะ (2007)	1.25	1.00	289	32
Huang และคณะ (2010)	0.39	0.25	-	-

นอกจากนี้จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม NOB มีความอ่อนไหวกับสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก ในงานวิจัยของ Blackburne ยังพบอีกว่า Free Nitrous acid (FNA) ที่มีปริมาณมากพอจะชะลอการทำงานของแบคทีเรียกลุ่ม NOB โดยที่ความเข้มข้นของ FNA มากกว่า 0.4 mg/L จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของ *Nitrobacter* มากกว่าร้อยละ 50 ในขณะที่ *Nitrospira* นั้นจะถูกยับยั้งการทำงานมากกว่าร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น FNA น้อยกว่า 0.2 mg/L หรือหากพูดอีกนัยหนึ่งคือหากความเข้มข้นของไนโตรเจนมีสูงมากกว่า 50 mg/L แบคทีเรียกลุ่ม NOB จะถูกยับยั้งการทำงานมากกว่าร้อยละ 50 อีกทั้งยังมีสารเคมีอิสระอีกมากมายที่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของ NOB ในรายงานของ Blackburne และคณะ (2007) ยังรายงานอีกว่า แอมโมเนียอิสระ (Free Ammonia-FA) สามารถยับยั้งการทำงานของ NOB เช่นกัน โดย *Nitrobacter* จะเริ่มถูกยับยั้งการทำงานที่ความเข้มข้นของ FA เท่ากับ 50 mg/L ในขณะที่งานวิจัยของ Vadivelu และคณะ (2007) รายงานว่าถูกยับยั้งตั้งแต่ 1 mg/L เป็นต้นไป ทางด้านของ *Nitrospira* อยู่ที่ 0.04-0.08 mg/L ตามรายงานของ Blackburne และคณะ (2007) จากผลงานวิจัยข้างต้นทำให้สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียกลุ่ม NOB มีความอ่อนไหวต่อสิ่งแวดล้อมอย่างมาก

2.4 ผลกระทบของแอมโมเนียและไนไตรท์ต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ

ในปัจจุบันมีงานวิจัยต่างๆ จำนวนมากได้ทำการศึกษาและวิจัยถึงผลกระทบของสภาวะแวดล้อมที่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำจากผลกระทบของแอมโมเนีย และ ไนไตรท์

จากงานวิจัยของ Lemarie และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของแอมโมเนียที่อยู่ในรูปไม่แตกตัว (unionized ammonia, NH_3) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของปลาชนิด *Dicentrarchus labrex* ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนีย (NH_4^+) ระหว่าง 6.1-22.3 mg-N/L ซึ่งมีความเข้มข้นของแอมโมเนียอิสระในช่วง 0.24-0.90 mg-N/L ที่ค่า pH ประมาณ 8 พบว่า ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียอิสระ 0.43 mg-N/L มีผลทำให้น้ำหนักตัวของปลาลดลงราวร้อยละ 25 เมื่อเทียบกับปลาที่ถูกเลี้ยงในระบบที่ไม่มีแอมโมเนียอิสระเจือปน นอกจากนี้เมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียอิสระมีค่ามากกว่า 0.88 mg-N/L จะมีผลทำให้อัตราการตายของปลาเพิ่มสูงขึ้นมากถึงร้อยละ 43 และถึงแม้ว่าอัตราการตายจะลดลงเมื่อความเข้มข้นอยู่ที่ 0.90 mg-N/L โดยลดลงเหลือร้อยละ 29 แต่โดยรวมแล้วงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าแอมโมเนียอิสระที่มากเกินไปในระบบจะส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำอย่างเห็นได้ชัด

ในงานวิจัยของ Wuertz และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของไนไตรท์ต่อปลาชนิด *Sander lucioperca* ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.44 – 28 mg-N/L โดยดูผลกระทบในระยะสั้น (acute) และระยะยาว (chronic) ในช่วงเวลา 32 วันพบว่าที่ความเข้มข้น 14 mg-N/L ขึ้นไปปลาทั้งหมดจะตายภายใน 24 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้นไนไตรท์ 7 mg-N/L อัตราการตายจะสูงขึ้นถึงร้อยละ 70 ภายใน 120 ชั่วโมง นอกจากนี้จากผลกระทบระยะยาวยังพบว่ามีอาการสะสมของไนไตรท์ภายในกระแสเลือด และภายในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของปลาอย่างมีนัยยะสำคัญเมื่อความเข้มข้นของไนไตรท์มีค่า 3.5 และ 0.44 mg-N/L ตามลำดับ ซึ่งส่งผลกระทบต่อปริมาณ เซลล์เม็ดเลือดแดง และปริมาณฮีโมโกลบินในร่างกายของปลา

นอกจาก แอมโมเนีย และ ไนไตรท์จะมีผลกระทบต่อสัตว์น้ำโดยตรงแล้ว ความเข้มข้นของเกลือยังส่งผลให้เกิดการสะสมของไนไตรท์ในร่างกายเช่นกัน ซึ่งงานวิจัยของ Wuertz และคณะ (2013) พบว่าผลของปริมาณ Cl^- มีผลช่วยทำให้สัตว์น้ำเหล่านี้มีอัตราการ uptake ไนไตรท์เข้าไปในร่างกายในปริมาณที่สูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นของ Cl^- มากกว่า 240 mg-N/L ส่งผลให้การทำงานของเซลล์เม็ดเลือดแดง และ กล้ามเนื้อถูกยับยั้ง โดยที่ความเข้มข้นของไนไตรท์ในระบบมีค่า 10 mg-N/L เท่านั้น และที่ความเข้มข้นของ Cl^- น้อยกว่า 140 mg/L ยังคงพบการสะสมของไนไตรท์เช่นกัน ถึงแม้ว่าผลของการสะสมไนไตรท์ในร่างกายจะไม่ส่งผลเสียต่อตัวปลาอย่างชัดเจน

โดยสรุปแล้วจากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นพบว่า แอมโมเนียอิสระ (NH_3) ที่เกิดจากการแตกตัวของแอมโมเนีย (NH_4^+) ปริมาณ 0.43 mg-N/L ส่งผลกระทบต่อน้ำหนักของสัตว์น้ำที่ลดลง และเมื่อ

ความเข้มข้นของแอมโมเนียอิสระเพิ่มสูงขึ้นถึง 0.88 mg-N/L อัตราการตายของสัตว์น้ำเพิ่มสูงขึ้นเกือบครึ่งหนึ่งของปริมาณสัตว์น้ำในระบบ อย่างไรก็ตามปริมาณแอมโมเนียอิสระจะสูงขึ้นหรือลดลงขึ้นอยู่กับค่า pH ในระบบซึ่งหาก pH มีค่าสูงขึ้น แอมโมเนียก็มีแนวโน้มที่จะแตกตัวออกเป็นแอมโมเนียอิสระมากขึ้น เช่นกัน

ในขณะเดียวกัน นอกจากแอมโมเนียอิสระจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลเสียต่อสัตว์น้ำในระบบแล้ว ไนโตรที่ซึ่งเกิดจากการออกซิไดซ์ของแอมโมเนียก็ส่งผลเสียเช่นกัน ทั้งผลระยะฉับพลันและระยะยาว โดยในระยะฉับพลันหากความเข้มข้นของไนโตรที่มีค่ามากกว่า 7 mg-N/L จะส่งผลให้อัตราการตายของปลาในระบบสูงขึ้นอย่างมาก และหากไนโตรที่ในระบบมีค่าถึง 14 mg-N/L อาจส่งผลให้สัตว์น้ำตายทั้งระบบได้ นอกจากนี้ความเข้มข้นของไนโตรที่ในระบบเพียง 0.44 mg-N/L ก็สามารถส่งผลกระทบต่อปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์น้ำ ซึ่งส่งผลเสียต่อสุขภาพของปลาในระยะยาวได้เช่นกัน

2.5 ทฤษฎีทั่วไปของ Monod Equation (Metcalf and Eddy และคณะ, 2014)

สมการ Monod นั้นถูกคิดค้นโดย Jaques Monod ในปี 1949 ซึ่งเป็นสมการที่ใช้ในการอธิบายการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ต่างๆ ในระบบ ซึ่งโดยทั่วไปในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่างๆ นั้นสามารถเขียนอธิบายออกมาเป็นสมการทางเคมีได้ดังนี้



ซึ่งจากสมการเราสามารถเขียนสมการทางคณิตศาสตร์เพื่ออธิบายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ออกมาดังสมการ

$$r_g = \mu X \quad (2.5)$$

โดยที่ r_g คือ อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

X คือ ความเข้มข้นของจุลินทรีย์

μ คือ ค่า Specific Growth Rate

โดยที่ค่า Specific Growth Rate นั้นสามารถเขียนอธิบายเป็นสมการได้ดังนี้

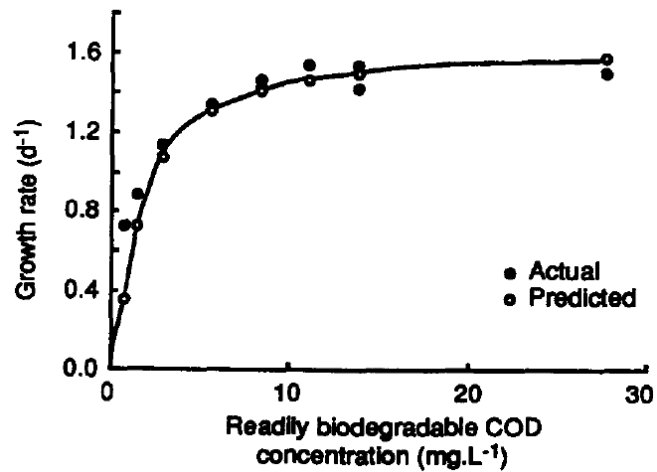
$$\mu = \mu_{max} \frac{C_S}{K_S + C_S} \quad (2.6)$$

โดยที่ค่า μ_{max} คือ ค่า Maximum specific Growth Rate

C_S คือ ค่าความเข้มข้นของ Substrate

K_S คือ ค่าความเข้มข้นของ Substrate ที่ทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้เป็นครึ่งหนึ่งของค่าการเจริญเติบโตสูงสุด

ซึ่งกราฟของสมการจะเป็นไปดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 ลักษณะของกราฟ Monod ทั่วไป (Slade และ Dare, 1993)

หรืออาจเขียนในรูปแบบของอัตราการใช้ Substrate ซึ่งสามารถเขียนได้ดังสมการ

$$r_{su} = qX \quad (2.7)$$

โดยที่ r_{su} คือ อัตราการใช้ Substrate ของจุลชีพ

X คือ ความเข้มข้นของจุลชีพ

q คือ Specific substrate utilization rate

โดยที่ค่า Specific Growth Rate นั้นสามารถเขียนอธิบายเป็นสมการได้ดังนี้

$$q = q_{max} \frac{C_s}{K_s + C_s} \quad (2.8)$$

โดยที่ค่า q_{max} คือ ค่า Maximum specific substrate utilization rate

C_s คือ ค่าความเข้มข้นของ Substrate

K_s คือ ค่าความเข้มข้นของ Substrate ที่ทำให้จุลชีพเจริญเติบโตได้เป็นครึ่งหนึ่งของค่าการเจริญเติบโตสูงสุด

อย่างไรก็ดีในการออกแบบระบบบำบัดน้ำเสียโดยทั่วไปปัจจัยความเข้มข้นอื่นๆ นอกเหนือจาก substrate ถือเป็นสิ่งที่ควรนำมาพิจารณาเช่นกัน เนื่องจากปัจจัยเหล่านี้ส่งผลโดยตรงกับอัตราการเกิดปฏิกิริยาโดยตรงหรือรวมถึงทำให้อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นจากสมการที่ (2.8) จึงได้มีการเติมเทอมของความเข้มข้นอื่นๆ นอกจาก substrate อาทิ ความเข้มข้นของออกซิเจนดังสมการที่ 2.9

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{C_s}{K_s + C_s} \right) \left(\frac{C_{O_2}}{K_{O_2} + C_{O_2}} \right) \quad (2.9)$$

ซึ่งโมเดลสมการดังกล่าวถูกนำมาใช้ในหลายงานวิจัยเช่น งานวิจัยของ Park และ Noguera (2004), งานวิจัยของ Kaelin และคณะ (2009) เป็นต้น

ในงานวิจัยบางชิ้นที่มีการศึกษาลักษณะทางจลนพลศาสตร์ของแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงต่ำ สมการ Monod อาจถูกทำให้อยู่ในรูปแบบ first-order kinetic เช่นในงานวิจัยของ Cheyng และคณะ (2010) ได้การศึกษาลักษณะจลนพลศาสตร์ของการย่อยสลายยาฆ่าแมลงของแบคทีเรียชนิดหนึ่ง ซึ่งหากความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงมีน้อยมากเมื่อเทียบกับค่า Half-saturation constant (K_S) สมการ Monod จะถูกทอนจากสมการที่ (2.9) เหลือเป็นสมการ

$$\mu = \frac{\mu_{max}C_S}{K_S} \quad (2.10)$$

เช่นเดียวกันหากการศึกษาลักษณะจลนพลศาสตร์ของแบคทีเรียอยู่ในช่วงที่ความเข้มข้นสูงมาก สมการ Monod อาจถูกทำให้อยู่ในรูปของ Zero-order kinetic และสามารถเขียนได้ดังสมการ 2.11 (Chou และคณะ, 2008)

$$\mu = \mu_{max} \quad (2.11)$$

สมการ Monod นั้นถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลาย ทั้งในการออกแบบระบบบำบัดน้ำเสียต่างๆ รวมทั้งนำไปเป็นสมการต้นแบบในงานวิจัยต่างๆ เพื่อใช้อธิบายการเจริญเติบโตของจุลชีพต่างๆ ภายในระบบ

2.6 Fluorescence in situ hybridization (FISH) (Silverman และ Kool, 2007)

Fluorescence in situ hybridization (FISH) เป็นเทคนิคที่ใช้ nucleic acid probe ที่ทำให้เรืองแสงด้วย สีย้อม Fluorescence ซึ่งให้เกิดการเรืองแสงขึ้น โดย probe ที่ใช้จะมีลักษณะเฉพาะเพื่อสามารถระบุ rRNA หรือ จุลชีพที่ตรงกับลำดับของ nucleic acid ของ probe ที่เราใช้ทำการตรวจวัดได้

หลักการทั่วไปของเทคนิค FISH คือ เทคนิคนี้จะใช้ Phylogenetic stain ที่ทำให้เกิดการเรืองแสงโดยที่ stain นี้จะมีรหัสของลำดับเบสตรงกับ ยีนส์ หรือ จุลชีพที่เราสนใจ ทั้งนี้ Phylogenetic stain นั้นสามารถทะลุผ่านเซลล์โดยที่ไม่ทำให้เซลล์เกิดความเสียหาย และทำการผสมผสาน (hybridize) กับ ribosomal RNA (rRNA) โดยตรง เนื่องจากตัว ribosome กระจายตัวอยู่ทั่วเซลล์ทำให้ทั่วทั้งเซลล์เกิดการเรืองแสง

ขั้นตอนการดำเนินการเทคนิค FISH

- 1) Fixation and permeabilization of the sample
- 2) Hybridization of fluorescence probe
- 3) Washing away unbound probe
- 4) Detection of labeled cells by microscopy or flow cytometry

ขั้นตอนที่ 1 Fixation and permeabilization of the sample

ในขั้นตอนแรกเซลล์จะถูกตรึงไว้กับ probe โดยสารที่มักจะใช้เป็นตัวยึดนั้น สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ cross-linking reagents อาทิ เช่น aldehydes และอีกชนิด ได้แก่ พวก precipitants ได้แก่ methanol และ ethanol ขณะที่สารที่ทำให้เกิดการซึมผ่านโดยมากมักใช้ ethanol/formalin, ethanol หรือ methanol ความเข้มข้นสูง ซึ่ง formalin มักจะถูกใช้กับ gram-negative bacteria หรือเซลล์มนุษย์

ขั้นตอนที่ 2 Hybridization of fluorescence probe

ขั้นตอนการผสม (Hybridization) และการล้างมักขึ้นอยู่กับ จุดหลอมเหลว (T_M) และการเข้ากันของ probe (Probe affinity) ซึ่งโดยมากขั้นตอนการผสมมักทำที่อุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง

ขั้นตอนที่ 3 Washing away the unbound probe

ขั้นตอนการล้างมักทำในอุณหภูมิเดียวกับขั้นตอนการผสม โดยสารที่ใช้ ได้แก่ SDS, Triton X, Tween หรือ formaldehyde ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่ควบคุมได้ยากแต่สำคัญที่สุด เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่เราต้องทำการลด probe ที่เราไม่ต้องการให้แสดงผลน้อยที่สุด

ขั้นตอนที่ 4 Detection of labeled cells by microscopy or flow cytometry

หลังจากที่ทำการล้าง probe ที่ไม่ต้องการออกแล้ว เซลล์หรือ ตัวอย่างจะถูกวิเคราะห์ด้วย fluorescence microscopy หรือ flow cytometry

เครื่อง fluorescence microscopy นั้นสามารถวิเคราะห์ได้โดยง่ายและรวดเร็วแต่ต้องอาศัยความชำนาญของผู้ใช้ หากผู้ใช้ไม่มีความชำนาญอาจเกิดการผิดพลาดในการตรวจนับข้อมูลเชิงปริมาณได้ ในขณะที่ flow cytometry สามารถให้ข้อมูลเชิงปริมาณได้อย่างแม่นยำแต่ราคาค่อนข้างสูง

รูปที่ 2.7 แสดงหลักการของ FISH อย่างง่าย และตารางที่ 2.5 แสดงการใช้เทคนิค FISH เพื่อตรวจวัดแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียในงานวิจัยที่ผ่านมา



รูปที่ 2.7 หลักการของ FISH อย่างง่าย (Silverman และ Kool, 2007)

ตารางที่ 2.5 การเลือกใช้ probe FISH ในงานวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย

Target organism	Probe	Sequence (5'-3')	เอกสารอ้างอิง
<i>N.europaea</i>	Nse1472	ACCCCAGTCATGACCCCC	Rongsayamanont และคณะ (2010)
แบคทีเรียทั่วไป	EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Rongsayamanont และคณะ (2010)
<i>N.oligotropha</i> lineage	Cluster6a192	CTTTCGATCCCTACTTTCC	Almstrand และคณะ (2011)
<i>N.oligotropha</i> lineage	Noli191	CGATCCCCCACTTTCCCTC	Almstrand และคณะ (2011)
AOB ทั่วไป	Nso1225	CGCCATTGTATTACGTGTGA	Almstrand และคณะ (2011)
<i>Nitrosomonas</i> sp	NEU	CCCCTCTGCTGCACTCTA	Li และคณะ (2013)
<i>Nitrosomonas</i> spp	Nsm 156	TATTAGCACATCTTTCGAT	Dytczak และคณะ (2008)
AOB ทั่วไป	Nso 190	CGATCCCCTGCTTTTGTC	Jubany และคณะ (2008)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยของ Limpiyakorn และคณะ (2007) ได้ทำการทดลองดูการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซิ่ง โดยการนำสลัดจ์ตัวอย่างมาจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง (Activated sludge) ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียประมาณ 15-18 mg-N/L มาเลี้ยงในระบบที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนีย ที่ 28, 70, 140 และ 420 mg-N/L ตามลำดับโดยใช้เทคนิค Real time PCR ในการวิเคราะห์จำนวนประชากรและใช้เทคนิค DGGE ในการวิเคราะห์ชนิดของกลุ่มประชากร โดยเริ่มแรกกลุ่มจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซิ่งหลัก คือ ชนิด *Nitrosomonas oligotropha* เมื่อทำการทดลองเป็นเวลา 15 วันพบว่า ที่ถึงปฏิกรณ์ความเข้มข้น 70 และ 140 mg-N/L ยังคงพบกลุ่มประชากร *Nitrosomonas oligotropha* ในขณะที่ถึง 28 mg-N/L ไม่พบประชากรกลุ่มนี้ เช่นเดียวกับถึง 420 mg-N/L ที่ไม่พบกลุ่มประชากร *Nitrosomonas oligotropha* แต่มีกลุ่มประชากร *Nitrosomonas europaea* มาแทนที่ เมื่อผ่านไป 40 วัน ถึงปฏิกรณ์ความเข้มข้น 70 และ 140 mg-N/L ยังคงพบชนิด *Nitrosomonas oligotropha* เช่นเดียวกับถึงความเข้มข้น 28 mg-N/L ในขณะที่ถึง 420 mg-N/L พบเพียงชนิด *Nitrosomonas europaea* เป็นหลัก นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังได้ทำการทดลองถึงผลของความเข้มข้นของไนโตรที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่ง โดยนำเชื้อที่ผ่านการทดลองในถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนีย 140 mg-N/L จากการทดลองที่แล้วมาทดลองต่อที่ความเข้มข้นของไนโตรที่ 0, 28, 168 และ 308 mg-N/L ผลที่ได้พบว่า ความเข้มข้นของไนโตรที่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรในระบบ

ในงานวิจัยของ Sonthiphand และ Limpiyakorn (2011) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรของจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซิ่งจากสลัดจ์เช่นกัน โดยนำสลัดจ์จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนีย 9.1 mg-N/L มาทำการทดลองในระบบที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนีย 28, 140 และ 420 mg-N/L โดยใช้เทคนิค Real time PCR ในการวิเคราะห์จำนวนประชากรและใช้เทคนิค DGGE ในการวิเคราะห์ชนิดของกลุ่มประชากร เช่นเดียวกับงานของ Limpiyakorn และคณะ (2007) พบว่า ผลการเปรียบเทียบจำนวนระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซิ่ง 2 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียออกซิไดซิ่งแบคทีเรีย (AOB) และ แอมโมเนียออกซิไดซิ่งอาร์เคีย (AOA) พบว่าเมื่อเริ่มต้นกลุ่มประชากร AOA และ AOB มีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อผ่านไป 60 วัน จำนวนของ AOA มีจำนวนน้อยลงอย่างเห็นได้ชัดและแทบจะสูญหายไปจากระบบ ภายในเวลา 360 วันจากทุกๆ ถังปฏิกรณ์ ในขณะที่การตรวจสอบกลุ่มประชากรของ AOA และ AOB พบว่า ในส่วนของ AOB จากสลัดจ์เริ่มต้น พบกลุ่ม AOB ชนิด *Nitrosomonas communis* และ *Nitrosomonas oligotropha* เป็นหลัก เมื่อเดินระบบไปได้ 60 วันถึงปฏิกรณ์กลุ่มจุลินทรีย์ทั้ง 2

ชนิดดังกล่าวกลับไม่ถูกพบในทุกๆ ถังปฏิกรณ์ใดๆ โดยพบชนิด *Nitrosomonas* ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ในถัง 28 และ 140 mg-N/l และพบชนิด *Nitrosomonas europaea* ในถัง 140 mg-N/l ในขณะที่ถัง 420 mg-N/l พบชนิด *Nitrosomonas marina* และเมื่อผ่านไป 360 วันพบว่าในถัง 28 mg-N/l และ 420 mg-N/l ไม่มีการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากร ในขณะที่ถัง 140 mg-N/l ยังคงพบกลุ่ม *Nitrosomonas* ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ ในขณะที่ชนิด *Nitrosomonas europaea* หายไปจากระบบโดยที่มีชนิด *Nitrosomonas communis* มาแทนที่ ซึ่งแตกต่างกับงานวิจัยของ Limpiyakorn และคณะ (2007) ในขณะที่กลุ่มประชากรของ AOA ในระบบพบว่า จากสไลด์จ์เริ่มต้นพบ AOA กลุ่ม Cluster 1.1b-5 และ 1.1b-4 เป็นจำนวนมาก เมื่อผ่านไป 60 วันพบว่าในทุกถัง พบกลุ่ม Cluster 1.1b-5 มากกว่าเดิมในขณะที่ กลุ่ม 1.1b-4 หายไป โดยที่ถัง 28 mg-N/l พบกลุ่ม Cluster 1.1a-2 และ 1.1a-3 เพิ่มขึ้น ในถัง 140 mg-N/l พบกลุ่ม Cluster 1.1a-3 1.1a-4 และ 1.1b-1 ในขณะที่ถัง 420 mg-N/l ไม่พบกลุ่มประชากรชนิดอื่นภายใน 60 วันแรก เมื่อผ่านไป 360 วันยังคงพบกลุ่ม Cluster 1.1b-5 อยู่ประปรายไม่มากเหมือนตอนที่เริ่มระบบ โดยที่ในถัง 420 mg-N/l จุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้หายไปจากระบบในขณะที่กลุ่ม Cluster 1.1b-1 เพิ่มขึ้นอย่างมากหลังจากที่ 60 วันแรกยังพบกลุ่มนี้อยู่เป็นจำนวนน้อย

นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Terada และคณะ (2013) พบว่าเมื่อนำ sludge จากโรงงานบำบัดน้ำชะขยะ (landfill leachate treatment plant) มาทำการทดลองที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนีย 300,600,900 และ 600 ตามลำดับพบว่า กลุ่ม AOB ประเภท Low affinity to ammonia concentration มีแนวโน้มที่จะเพิ่มจำนวนในระบบมากขึ้นสวนทางกับกลุ่มจำพวก High affinity to ammonia concentration อาทิ เช่น *Nitrosomonas oligotropha* หรือ *Nitrosospira spp.*

จากงานของ ธนสิดา โชติอนนต์ (2556) ได้ทำการศึกษากลุ่มประชากรของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งในระบบที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียในระบบแตกต่างกัน โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบใช้ตัวกลางยึดเกาะ โดยเริ่มเลี้ยงเชื้อจากถังปฏิกรณ์ที่มีแอมโมเนียเข้มข้น 1 และ 50 mg-N/l แล้วนำมาเลี้ยงต่อในถัง Chemostat ที่ความเข้มข้น 0.25, 1, 10 และ 25 mg-N/l โดยใช้เทคนิค Real time PCR ในการวิเคราะห์จำนวนประชากรและใช้เทคนิค Clone Library ในการวิเคราะห์ชนิดของกลุ่มประชากร พบว่าในถังที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนีย 0.25 และ 1 mg-N/l จุลินทรีย์ชนิด *Nitrosomonas communis* ซึ่งเป็นกลุ่ม High affinity to ammonia เป็นกลุ่มประชากรหลักในระบบ ในขณะที่ในถังความเข้มข้น 25 mg-N/l พบกลุ่มจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ชนิด *Nitrosomonas europaea* เป็นกลุ่มหลักซึ่งเป็นกลุ่ม Low affinity to ammonia

จากงานของ วิภาชนีย์ ตั้งกิจจาวิสุทธิ (2556) ได้ทำการศึกษากลุ่มประชากรของแบคทีเรียกลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซ์ซึ่งในระบบที่มีความเข้มข้นของไนโตรที่ต่างกัน โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ

จากถึงปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจน 1 และ 50 mg-N/l ซึ่งมีลักษณะการเลี้ยงและการวิเคราะห์กลุ่มประชากรคล้ายคลึงกับงานของ ธนสิดา โชติอนนต์ (2556) เมื่อเพาะเลี้ยงในถังบ่มแล้ว จึงนำมาเลี้ยงต่อในถัง Chemostat ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจน 0.1, 0.5, 3, 20 และ 100 mg-N/l พบว่าในถังบ่ม 1 mg-N/l และ ถึงความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 มีปริมาณประชากรของ *Nitrobacter* และ *Nitrospira* ในจำนวนที่เท่าๆ กัน ในขณะที่ถังบ่ม 50 mg-N/l และถึงความเข้มข้น 3, 20 และ 100 mg-N/l พบชนิด *Nitrobacter* เป็นกลุ่มประชากรส่วนมากของระบบ

อย่างไรก็ดีเนื่องด้วยเทคนิคการวิเคราะห์จำนวนประชากรโดยใช้เทคนิค Real time PCR ดังเช่นงานวิจัยที่ได้กล่าวมาข้างต้น มีข้อเสียในจุดที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ว่าจำนวนที่วัดได้ออกมานั้นเป็นจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่จริงมากเท่าไร ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบจำนวนประชากรที่แน่ชัดในระบบได้ ซึ่งการใช้เทคนิค Fluorescence in situ hybridization (FISH) นั้นจะสามารถตรวจสอบอัตราส่วนของจำนวนเชื้อที่มีชีวิตอยู่ในระบบได้ดีกว่าเทคนิค Real time PCR



บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

3.1 แผนงานวิจัย

ในการวิจัยเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงจลนพลศาสตร์และกลุ่มประชากรของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิง (Ammonia-oxidizing microorganisms) และ จุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิง (Nitrite-oxidizing microorganisms) แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนย่อยดังต่อไปนี้

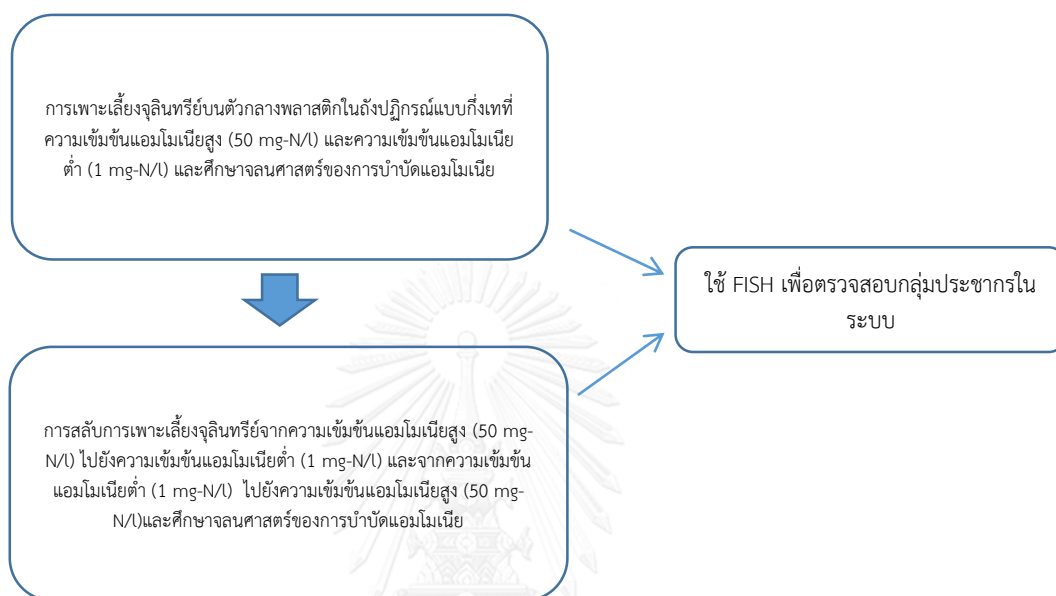
1. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงและจุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิงที่ความเข้มข้นแอมโมเนียสูง (50 mg-N/L) และความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำ (1 mg-N/L)
2. การเปลี่ยนความเข้มข้นของแอมโมเนียจากความเข้มข้นสูงเป็นความเข้มข้นต่ำ และจากความเข้มข้นต่ำเป็นความเข้มข้นสูง
3. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในระบบโดยใช้เทคนิค fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

ในการทดลองช่วงที่ 1 จะทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงและจุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิงที่ค่าความเข้มข้นของแอมโมเนีย 2 ค่า ได้แก่ 1 mg-N/L และ 50 mg-N/L โดยใช้ระบบแบบ “ทีละเท” (Batch) ซึ่งมีขนาดถังละ 10 ลิตร โดยใช้ น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เป็นส่วนประกอบสำคัญ ในช่วงระหว่างการทดลองจะทำการตรวจสอบค่าความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท ในระบบ เมื่อเชื้อจุลินทรีย์ในระบบเจริญเติบโตเป็นจำนวนมากพอจึงทำการวัดค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ต่างๆ ได้แก่ ค่าสัมประสิทธิ์การเจริญเติบโตสูงสุด (Maximum specific growth rate, μ_{max}) ค่า Half-Saturation constant (K_s) ของทั้งจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิง และ จุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิง

ในการทดลองช่วงที่ 2 จะทำการเลี้ยงจุลินทรีย์โดยการสลับความเข้มข้นของแอมโมเนียในทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์จากความเข้มข้นสูง (50 mg-N/L) เป็นความเข้มข้นต่ำ (1 mg-N/L) และจากความเข้มข้นต่ำ (1 mg-N/L) เป็นความเข้มข้นสูง (50 mg-N/L) โดยที่รายละเอียดในการเพาะเลี้ยงจะคล้ายคลึงกับการทดลองในช่วงแรก นอกจากนี้จะมีการตรวจวัดค่าทางจลนพลศาสตร์ต่าง ๆ ที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างต่อเนื่อง

ในการทดลองช่วงที่ 3 จะนำตัวอย่างของจุลินทรีย์ในช่วงการทดลองที่ 1 และ 2 มาทำการศึกษากลุ่มประชากรของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่งและจุลินทรีย์ไนโตรทออกซิไดซิ่งภายในระบบ โดยใช้เทคนิค fluorescence in situ hybridization (FISH)

แผนการทดลองโดยรวมสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 รายละเอียดแผนงานวิจัย

3.2 การทดลองช่วงที่ 1: การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่งและจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรทออกซิไดซิ่งที่ความเข้มข้นแอมโมเนียสูง (50 mg-N/L) และความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำ (1 mg-N/L)

3.2.1 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่ง และ จุลินทรีย์กลุ่มไนโตรทออกซิไดซิ่ง

ในการทดลองช่วงแรกนำหัวเชื้อจุลินทรีย์บนตัวกลางพลาสติก (BCN 012-KLL) ที่ผ่านการบ่มโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียแตกต่างกัน (ชนลิตา โชติอนนต์, 2556) ทำการเพาะเลี้ยงในระบบถังปฏิกรณ์ทั้งหมดแบบที่ละเทจำนวน 2 ถังที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 50 mg-N/L (ถังปฏิกรณ์ A) และ 1 mg-N/L (ถังปฏิกรณ์ B) ตามลำดับ โดยที่ปริมาตรแต่ละถังคือ 10 ลิตร โดยใช้ตัวกลางพลาสติก BCN 012 KLL เป็นตัวกลางช่วยยึดเกาะเซลล์

แบบที่เรียในระบบ ใส่ตัวกลางปริมาตร 5 ลิตรลงไปในถังปฏิกรณ์แต่ละถัง โดยลักษณะถังปฏิกรณ์ เป็นไปดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ลักษณะของถังปฏิกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

สารอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกไซด์ซึ่งแสดงดังตารางที่ 3.1 -3.3 โดยทำการเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นให้สอดคล้องตามค่าที่กำหนดในแต่ละถังปฏิกรณ์ คือ 50 mg-N/l ในถังแอมโมเนียสูง (ถังปฏิกรณ์ A) และ 1 mg-N/l ในถังแอมโมเนียต่ำ (ถังปฏิกรณ์ B) เมื่อแอมโมเนียถูกใช้เกินกว่า 80% (ประมาณ 24 ชม.) ในแต่ละถังปฏิกรณ์จึงทำการเติมแอมโมเนีย ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นตามที่ต้องการอีกครั้ง ดำเนินการทดลองจนกระทั่งจุลินทรีย์เจริญเติบโตมากเพียงพอโดยสังเกตจากอัตราการบำบัดแอมโมเนีย จากนั้นจึงนำไปทดสอบค่าพารามิเตอร์ทาง จลนพลศาสตร์ต่าง ๆ และวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ต่อไป

ถังปฏิกรณ์ที่เพาะเลี้ยงด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/l จะใช้วิธีการปรับค่า pH ด้วยวิธีการเติม NaOH ความเข้มข้น 0.25 นอร์มอล เพื่อควบคุมค่าพีเอช ให้อยู่ในช่วง 7-7.5 ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ความเข้มข้น 50 mg-N/l จะใช้เครื่อง pH controller ในการช่วยเติม NaOH เพื่อควบคุม pH ทั้งสองถังปฏิกรณ์จะมีการเติม NaHCO_3 เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ทั้งสองถังตาม อัตราส่วนปริมาณสารสัมพันธ์ที่เหมาะสมของแต่ละถัง และควบคุมค่าความเค็มของแต่ละถังอยู่ที่ ประมาณ 15 ppt (part per thousand) (ธนสิดา โชติอนนต์, 2556)

ตารางที่ 3.1 การเตรียมสารอาหารสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่ง

สารเคมี	ปริมาณ (g/l)
Potassium Bromide (KBr)	0.1
Marinium reef sea salt	12.6
Potassium di-hydrogen phosphate (KH_2PO_4)	400
Magnesium Sulfate (MgSO_4)	5
*Non-Chelated trace element	1 ml/l
Vitamin รวม	1 ml/l
Vitamin B1	1 ml/l
Vitamin B12	1 ml/l
**Silinite Tungstate	1 ml/l

ตารางที่ 3.2 การเตรียมสารละลาย Non-chelated trace element

สารเคมี	ปริมาณ
Hydrochloric acid (HCl)	12.5 ml/l
Manganese Chloride hexahydrate($\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	5 g/l
Nickle Chloride (NiCl_2)	24 mg/l
Boric Acid (H_3BO_3)	30 mg/l
Ferric Sulfate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.1 g/l
Copper Chloride di hydrate ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	36 mg/l
Zinc Sulfate heptahydrate($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	144 mg/l
Manganese Sulfate (MnSO_4)	40 mg/l
Cobolt Chloride hexahydratte ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	190 mg/l
Sodium Molybdate dihydrate ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	36 mg/l

ตารางที่ 3.3 การเตรียมสารละลาย Silinite Tungstate

สารเคมี	ปริมาณ
Sodium Hydroxide (NaOH)	400 mg
Sodium Tungstate dihydrate ($\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	8 mg
Sodium Silinate pentahydrate ($\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	6 mg
DI Water	1000 ml

3.2.1.1 ลักษณะหัวเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นที่นำมาเพาะเลี้ยง

งานวิจัยชิ้นนี้ได้นำเอาหัวเชื้อเริ่มต้นมาจากการวิจัยของ ธนสิดา โชติอนนท์ (2556) โดยหัวเชื้อที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงได้นำมาจากถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่อง B25 และ A1 ซึ่งจะใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l) และ B (1 mg-N/l) ที่ถูกยึดเกาะอยู่บนตัวกลางพลาสติก BCN-012 KLL โดยหัวเชื้อเริ่มต้นจากการวิจัยดังกล่าวได้นำมาจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งแบบบ่อดินกลางแจ้ง และบ่อเพาะเลี้ยงในโรงเรือนที่มีระบบหมุนเวียน จากนั้นนำหัวเชื้อดังกล่าวมาบ่มในถังปฏิกรณ์แบบกึ่งที่ละเท โดยให้เชื้อจุลินทรีย์ยึดเกาะบนตัวกลาง BKN-012 KLL เมื่อเชื้อเจริญเติบโตมากเพียงพอจึงนำเชื้อที่อยู่บนตัวกลางมาเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่อง โดยถังปฏิกรณ์ B25 ถูกบ่มในถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นแอมโมเนีย 50 mg-N/l และนำไปเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องที่ควบคุมความเข้มข้นที่ 25 mg-N/l โดยมีจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิง ชนิด *Nitrosomonas europaea* เป็นกลุ่มประชากรหลัก ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ A1 ถูกบ่มในถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/l และนำไปเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องที่ควบคุมความเข้มข้นที่ 1 mg-N/l โดยมีจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิง ชนิด *Nitrosomonas communis* เป็นกลุ่มประชากรหลัก

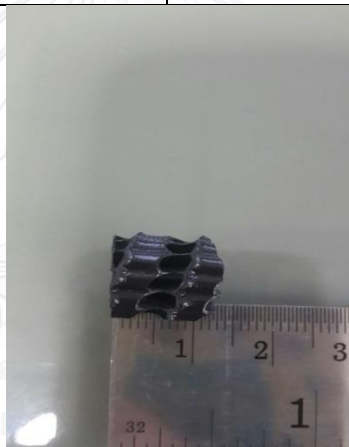
3.2.1.2 ตัวกลาง BCN 012 KLL

ในงานวิจัยนี้ใช้ตัวกลางพลาสติก BCN 012 KLL จากบริษัท Wassercare Thailand, co.ltd เพื่อช่วยในการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียภายในระบบ โดยทั่วไปแล้วตัวกลางพลาสติกนี้ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานทั่วไปในทางวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมมากมาย อาทิ ใช้เป็นตัวกลางยึดเกาะในระบบ

Trickling filter หรือแม่กระทั่งเป็นตัวกลางของ Scrubber ในโรงงานอุตสาหกรรมเคมี คุณสมบัติของตัวกลาง และ รูปภาพประกอบแสดงดังตารางที่ 3.4 และ รูปที่ 3.3

ตารางที่ 3.4 คุณสมบัติทางกายภาพของตัวกลางพลาสติก BCN-012 KLL

ชนิดของพลาสติก	HDPE
คุณสมบัติพิเศษ	ทนทานต่อการเนาเปื่อย รา และ สารเคมีที่ละลายน้ำต่างๆ
ความหนาแน่น	0.95 – 0.98 g/cm ³
พื้นที่ผิว (Surface area)	859 m ² /m ³ media
พื้นที่ผิวสุทธิเมื่อตัวกลางทำงานแบบ moving bed (Protected area)	704 m ² /m ³ media
น้ำหนัก	150 kg/m ³ media



รูปที่ 3.3 ตัวกลาง BCN 012 KLL

3.2.1.3 การวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในงานวิจัย

ทำการวิเคราะห์ค่า ความเข้มข้นของ แอมโมเนีย ไนโตรท์ และ ไนเตรท (ในหน่วย mg-N/l) ค่า pH ค่าการละลายออกซิเจนในน้ำ (Dissolved Oxygen, DO) และค่าความเค็ม (Salinity) รายละเอียดของการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สามารถแสดงได้ดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 การวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ

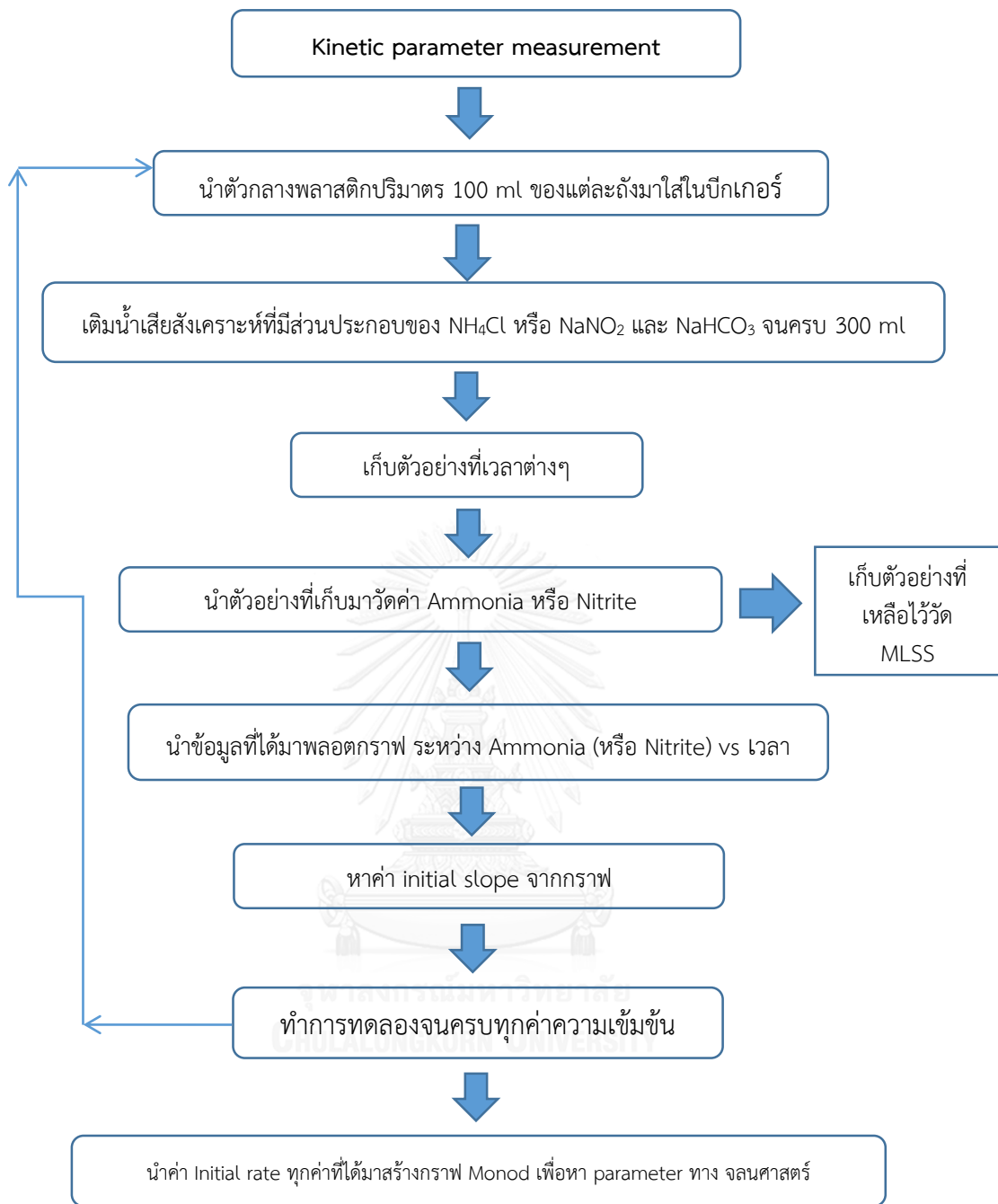
พารามิเตอร์	วิธี/เครื่องมือ	Standard method	ความถี่ในการวัด
แอมโมเนีย	Salicylate method วัดค่า Absorbance ที่ 640 nm	Salicylate-Hypochlorite method (Bower และ Holm-Hansen, 1980)	อย่างน้อย 3 ครั้ง/สัปดาห์
ไนไตรท์	Colorimetric method วัดค่า Absorbance ที่ 543 nm	Colorimetric method (Bratton และ Marshall, 1939)	อย่างน้อย 3 ครั้ง/สัปดาห์
ไนเตรท	วัดค่า Absorbance ที่ 275 และ 220 nm แล้วนำมาหักลบกัน	UV Spectrophotometric Scanning (Armstrong, 1963)	อย่างน้อย 3 ครั้ง/สัปดาห์
pH	pH meter/pH controller	-	อย่างน้อย 4 ครั้ง/สัปดาห์
Salinity	Refractometer	-	อย่างน้อย 3 ครั้ง/สัปดาห์
Dissolved Oxygen	DO meter	-	อย่างน้อย 3 ครั้ง/สัปดาห์

3.2.1.4 การวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์

การวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์จะทำการนำเชื้อที่เลี้ยงภายในระบบ จากทั้ง 2 ถึงปฏิกรณ์มาทำการทดลอง โดยการดึงตัวกลางจากระบบปริมาตร 100 ml ใส่ในบีกเกอร์ ปริมาตร 300 ml ในการวัดค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์จะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนย่อยได้แก่การวัดค่าการลดลงของแอมโมเนีย และค่าการลดลงของไนไตรท์ โดยในส่วนแรกจะทำการเติมน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีส่วนประกอบของ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และ โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) เป็นหลัก ทำการเติมอากาศด้วย air pump diffuser จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างตอนเริ่มต้น และที่เวลาต่างๆ เพื่อนำมาวัดค่าความเข้มข้นของ แอมโมเนีย ไนไตรท์ และ ไนเตรท แล้วนำมาข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของแอมโมเนีย กับ เวลาที่ผ่านไป ในขณะที่ส่วนที่สองรายละเอียดส่วนใหญ่ของการทดลองจะเหมือนขั้นตอนแรกแต่จะทำการเติมน้ำเสียที่มี โซเดียมไนไตรท์ (NaNO_2) แทน

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แล้วนำมาข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของไนโตรเจน กับ เวลาที่ผ่านมา จากนั้นทำการหาค่า initial slope เพื่อนำมาใช้สร้างกราฟ Monod ของแต่ละระบบ ต่อไป ดังแผนผังการทดลองรูปที่ 3.4 โดยในการทดลองทางจุลชีวศาสตร์ครั้งต่อไป ค่าความเข้มข้นของแอมโมเนีย/ไนโตรเจน เริ่มต้น และระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างอาจมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับอัตราการเกิดปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ในแต่ละถังในครั้งล่าสุดที่ได้ทำการทดลอง เพื่อความเหมาะสมและแม่นยำในการเก็บข้อมูลกับการเปลี่ยนกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในระบบ

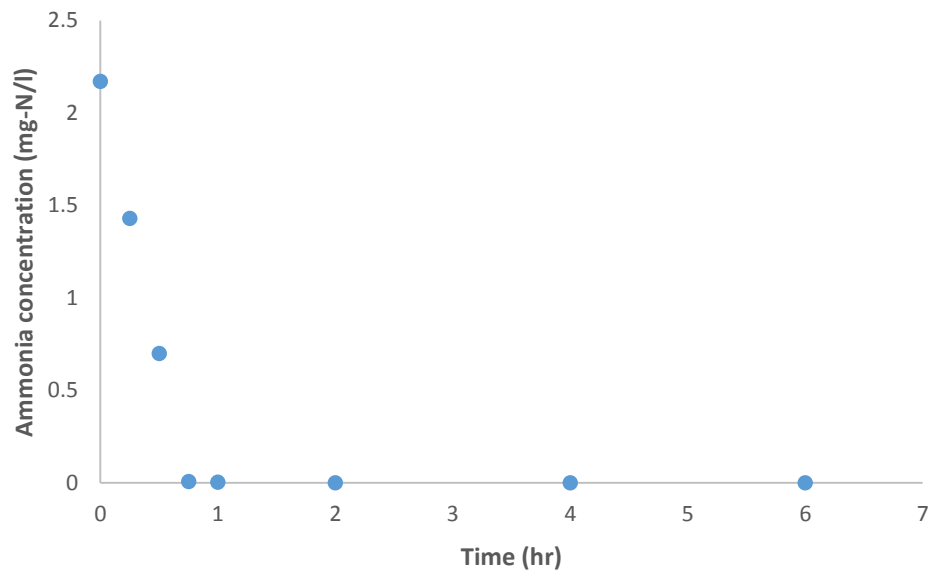




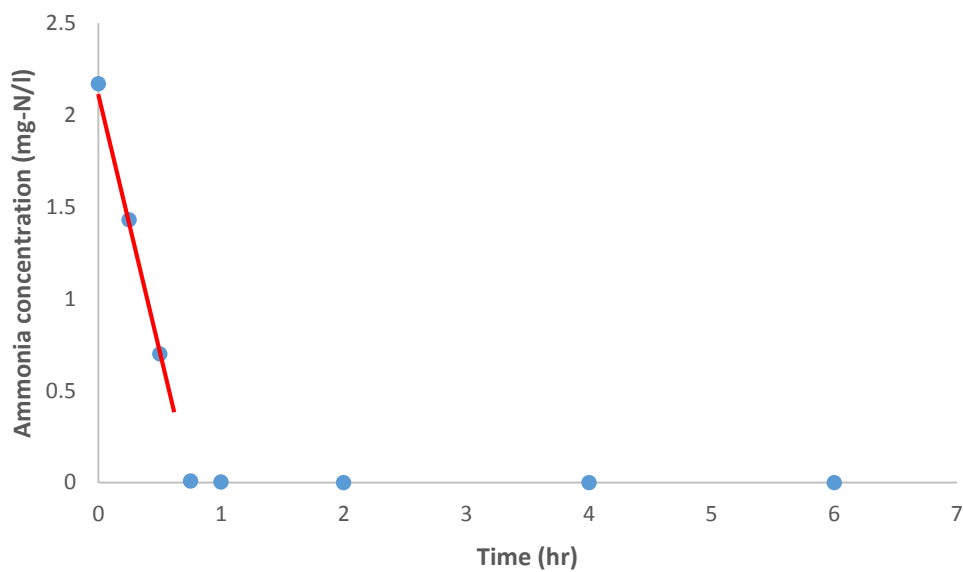
รูปที่ 3.4 ขั้นตอนการทดลองวัดค่าทางจลนพลศาสตร์

3.2.1.5 ขั้นตอนการทำ Initial slope และ การสร้างกราฟ Monod

หลังจากทำการเก็บค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียในแต่ละช่วงเวลาแล้วจึงทำการพล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของแอมโมเนียหรือไนไตรท์ และเวลาดังรูปที่ 3.5 จากนั้นให้ทำการค่าความชันในช่วงเริ่มต้นโดยเลือกใช้จุดที่มีการลดลงของแอมโมเนีย หรือไนไตรท์อย่างชัดเจน 3-5 จุด แรกมาใช้เป็นค่า Initial rate โดยพิจารณาจากกราฟ ดังรูปที่ 3.6

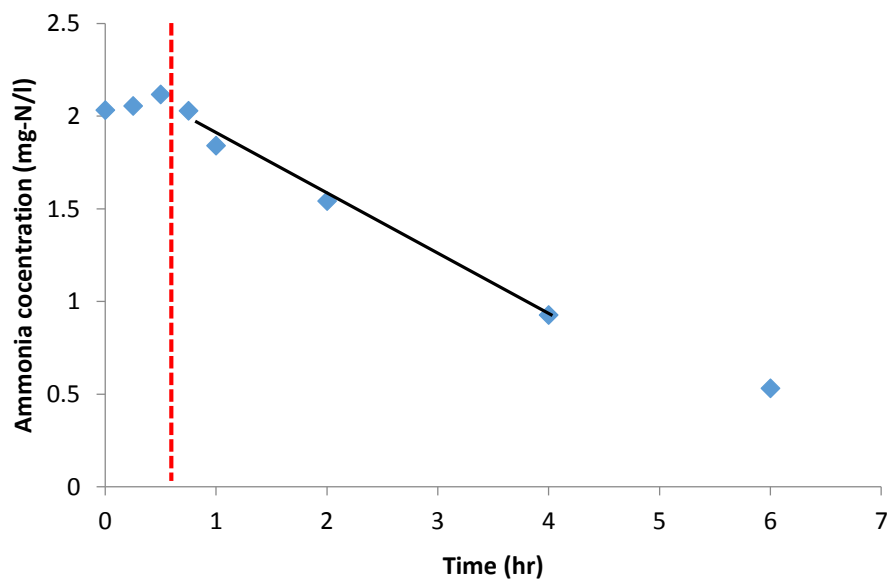


รูปที่ 3.5 กราฟตัวอย่างระหว่างความเข้มข้นของแอมโมเนียและเวลา



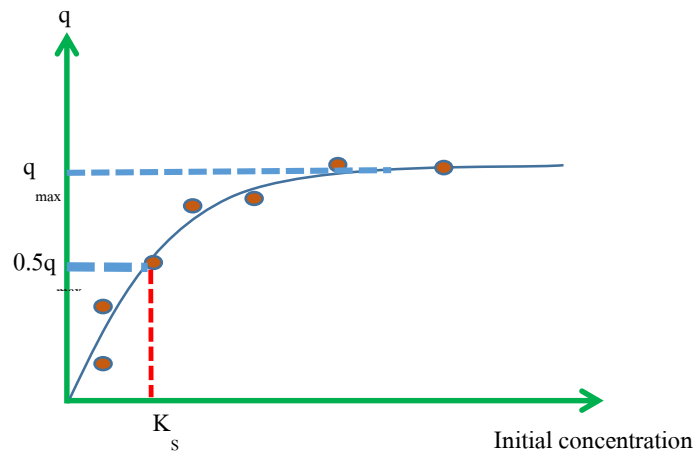
รูปที่ 3.6: วิธีการลากความชันเพื่อหาความชันเริ่มต้น (Initial slope) ของอัตราการเกิดปฏิกิริยา

อย่างไรก็ดีหากกราฟอัตราการใช้แอมโมเนีย หรือ ไนโตรที่ในช่วงแรกไม่ได้แสดงถึงการลดลงที่ชัดเจน เช่น ยังอยู่ในช่วงของ lag time ให้ทำการเลือกช่วงที่เริ่มเห็นการลดลงของแอมโมเนีย หรือ ไนโตรที่ชัดเจนและใช้จุดในช่วงดังกล่าวมาเป็น initial rate ของความเข้มข้นนั้นๆ ดังรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 ตัวอย่างการหา initial slope ของกราฟที่มี lag time ในช่วงแรก

หลังจากได้ค่าอัตราการออกซิไดซ์แอมโมเนีย หรือ ไนไตรท์ครบทุกค่าแล้วจึงนำค่าดังกล่าวมา คำนวณหาค่า specific rate of ammonia oxidation แล้วนำมาหารกับความเข้มข้นของตะกอน จุลินทรีย์ (MLVSS) จากนั้นจึงพล็อตกราฟระหว่าง specific rate of ammonia oxidation และ ความเข้มข้นเริ่มต้น เพื่อคำนวณหาค่า maximum specific rate of ammonia oxidation (q_{max}) และค่า K_s ดังรูปที่ 3.8 โดยใช้โปรแกรม SigmaPlot version 11.0



รูปที่ 3.8 กราฟระหว่าง specific rate of ammonia oxidation (q)
และ ค่าความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น

โดยตัวอย่างการบันทึกค่าความเข้มข้นในการทดลองทางจลนพลศาสตร์ของแอมโมเนียที่จะทำการวัดจะเป็นไปตามตารางที่ 3.6 และค่าความเข้มข้นของไนไตรท์เป็นไปดังตารางที่ 3.7

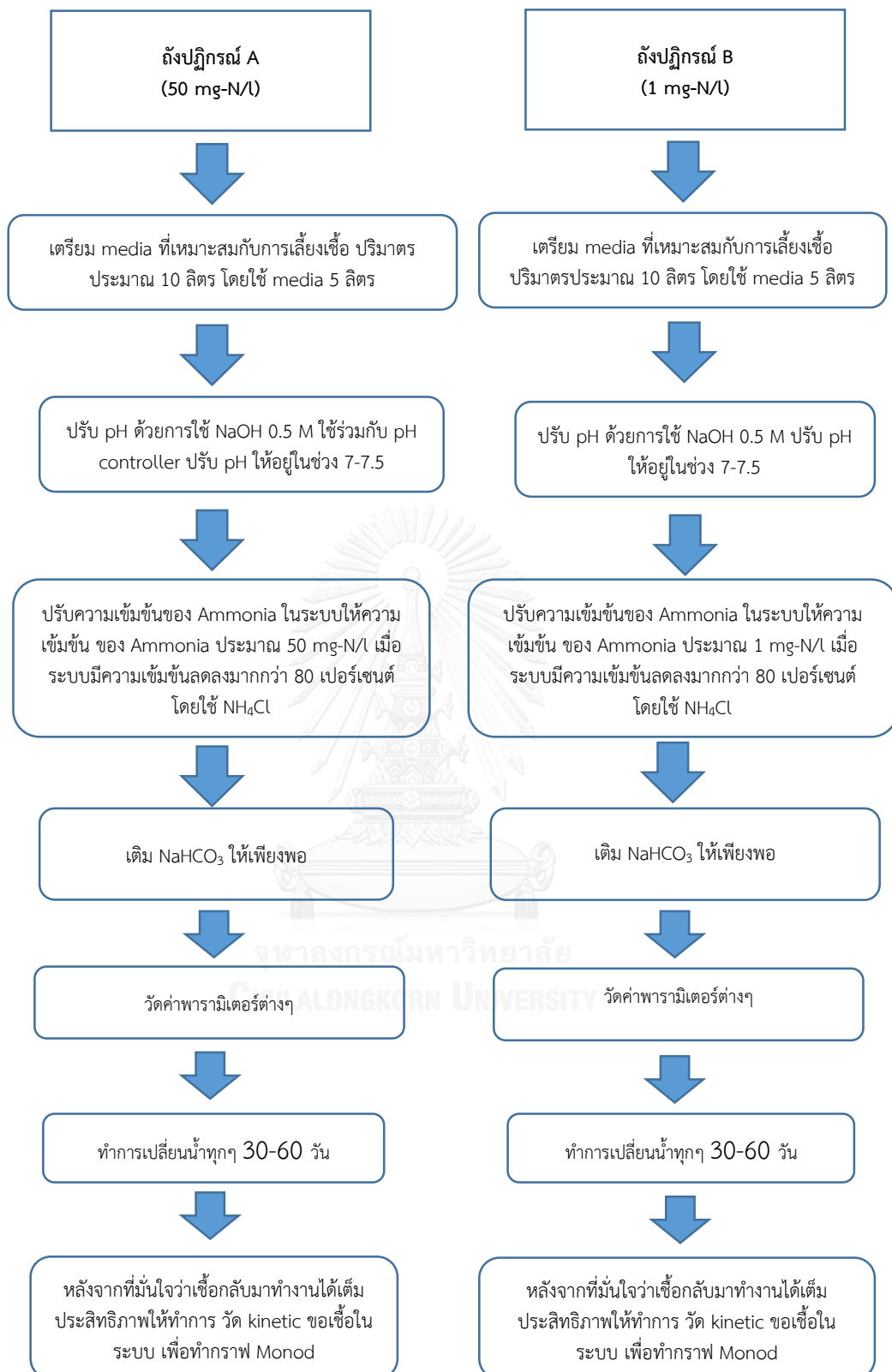
ตารางที่ 3.7 ตัวอย่างตารางค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองวัดค่าจลนพลศาสตร์ของไนโตรเจนออกซิได-ซึ่งแบคทีเรีย

ความเข้มข้นไน- โตรเจนเริ่มต้น (mg-N/l)	Collection time (hr)										
	0	0.25	0.5	0.75	1	1.5	2	3	4	5	6
0.5											
1											
2											
5											
8											
10											
12											
15											
20											
25											
30											
40											
50											
100											

3.2.1.6 การหาค่า MLSS ของเชื้อแบคทีเรีย

นำน้ำตัวอย่างน้ำที่มีตัวกลางพลาสติกจากถังปฏิกรณ์ไปใส่ด้วยน้ำกลั่นในปริมาตรที่เป็นสัดส่วนเดียวกับการทดลองทางจลนพลศาสตร์ (ตัวกลางพลาสติก 100 ml ต่อปริมาตรน้ำ 300 ml) จากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าวไป sonicate เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์หลุดออกจากตัวกลางพลาสติกให้มากที่สุด จากนั้นนำตัวกลางพลาสติกออกแล้วจึงนำน้ำตัวอย่างที่มีตะกอนจุลินทรีย์จากตัวกลางไปวิเคราะห์หาค่า MLSS และ MLVSS ตามวิธีการมาตรฐาน (Woodside และ Kocurek, 1997) จากนั้นคำนวณปริมาณ MLSS และ MLVSS ต่อตัวกลาง ซึ่งจะนำไปใช้คำนวณค่า specific rate of ammonia oxidation ต่อไป

ในการทดลองช่วงที่ 1 สามารถสรุปได้ออกมาเป็นแผนภูมิดังรูปที่ 3.9



รูปที่ 3.9 สรุปการทดลองช่วงที่ 1

3.3 การทดลองช่วงที่ 2: การเปลี่ยนความเข้มข้นของแอมโมเนียจากความเข้มข้นสูงเป็นความเข้มข้นต่ำ และจากความเข้มข้นต่ำเป็นความเข้มข้นสูง

ในการทดลองช่วงที่ 2 จะเป็นการทดลองต่อเนื่องจากการทดลองช่วงแรก หลังจากที่ได้ทำการเลี้ยงเชื้อถังที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูง (50 mg-N/l) และ ถังที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ (1 mg-N/l) ในการทดลองนี้จะทำการสลับความเข้มข้นของแอมโมเนียจากถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ถัง เพื่อทำการดูการเปลี่ยนแปลงของค่าจลนพลศาสตร์ของถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ถังรวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรของจุลินทรีย์ภายในระบบ

รายละเอียดโดยทั่วไปของการทดลองครั้งนี้จะคล้ายคลึงกับการทดลองช่วงที่ 1 ทั้งการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่ง และ จุลินทรีย์กลุ่มไนโตรทอกซิไดซิ่งรวมทั้งการทดลองวิเคราะห์ค่าจลนพลศาสตร์ ขั้นตอนการทดลองช่วงที่ 2 แสดงดังรูปที่ 3.10

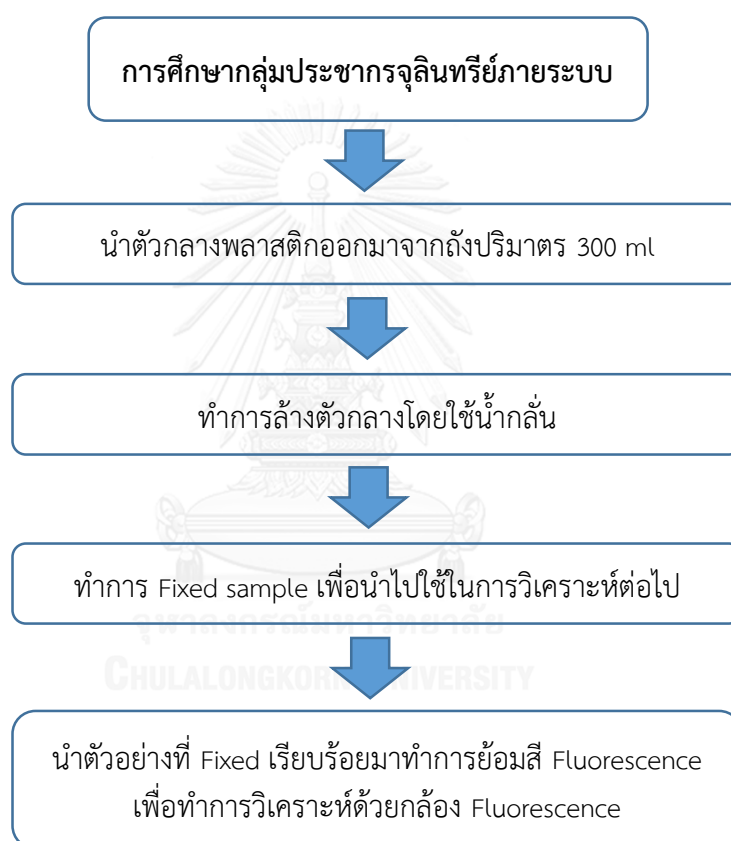




รูปที่ 3.10 สรุปการทดลองครั้งที่ 2

3.4 การศึกษากลุ่มประชากรของแบคทีเรียในระบบ

ในการทดลองช่วงที่ 3 จะเป็นการทดลองเพื่อศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ภายในแต่ละถัง ปฏิกรณ์โดยในงานวิจัยนี้ใช้เทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) ในการศึกษาากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ ซึ่งในการทดลองนี้ทำการทดลองควบคู่ไปกับการทดลองช่วงที่ 1 และ 2 รายละเอียดของการทำการทดลองในช่วงนี้สามารถอธิบายได้ด้วยแผนผัง ดังรูปที่ 3.11



รูปที่ 3.11 สรุปการทดลองช่วงที่ 3

3.4.1 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์จากตัวกลาง

ทำการดึงจุลินทรีย์จากตัวกลางพลาสติกจากถังปฏิกรณ์มาปริมาตร 300 ml จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วนำเชื้อที่ได้จากการล้างตัวกลางมาใช้วิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3.4.2 ขั้นตอนการ Fixed ตัวอย่างเพื่อเตรียมนำไปใช้ (Nielsen และคณะ, 2009)

ขั้นตอนนี้เป็นการเตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วยกล้อง Fluorescence โดยในขั้นตอนนี้จะทำการใช้สารเคมีเพื่อเปิดทำลาย cell membrane ของเซลล์จุลินทรีย์เพื่อให้สารย้อมสี Fluorescence สามารถทะลุเข้าไปในตัวเซลล์แล้วไปจับกับ Ribosomal RNA (rRNA) แล้วสามารถเปล่งแสง Fluorescence ได้

นอกจากนี้ในขั้นตอนนี้ยังสามารถที่จะช่วยให้เราสามารถเก็บตัวอย่างไว้ได้อย่างยาวนานขึ้นอีกด้วย โดยในขั้นตอนนี้จะแบ่งขั้นตอนออกเป็นอีก 2 ขั้นตอนย่อยได้แก่

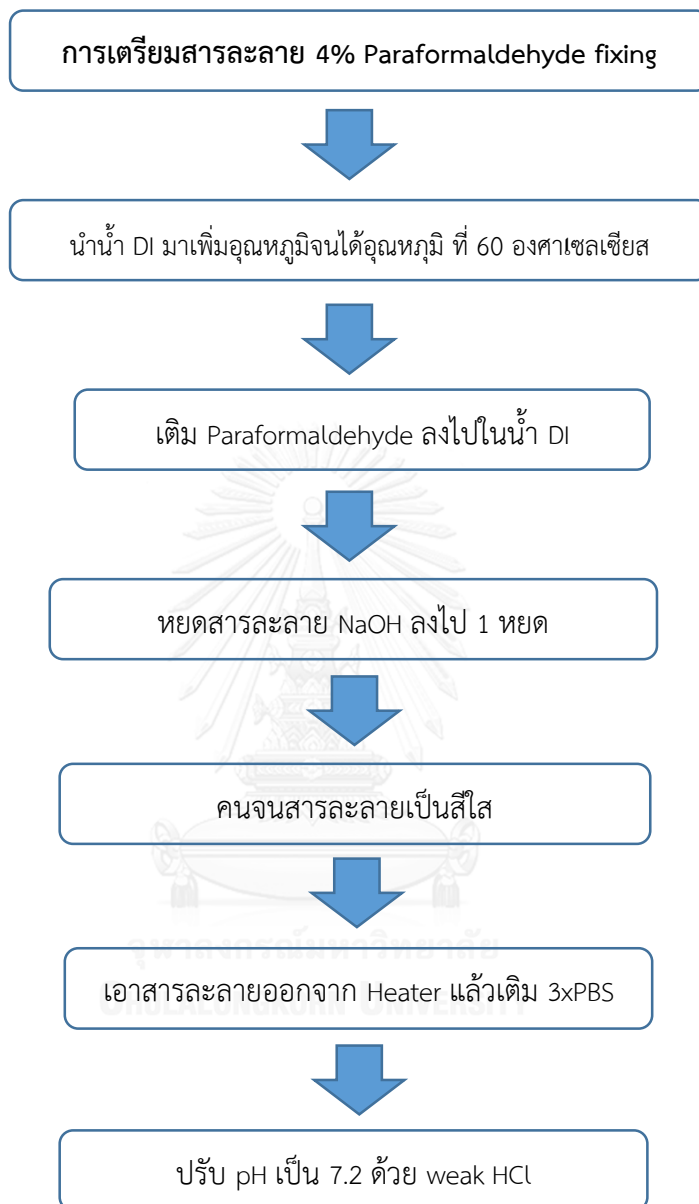
1. การเตรียมสารละลายเพื่อ Fix เซลล์ (4% Paraformaldehyde fixing solution)
2. การ Fixation

3.4.2.1 การเตรียมสารละลายเพื่อ Fixed เซลล์ (4% Paraformaldehyde fixing solution)

การเตรียมสารละลาย 4% Paraformaldehyde fixing solution สารเคมีที่ต้องใช้ในการเตรียม สามารถเตรียมได้ดังตารางที่ 3.8
ตารางที่ 3.8 สารเคมีที่ต้องใช้ในการเตรียม 4% Paraformaldehyde fixing solution (ในกรณีที่ใช้ปริมาตร 10 ml)

สารเคมี	ปริมาณ
3xPhosphate Buffer Saline (3xPBS)	3.5 ml
Paraformaldehyde	0.4 g
DI water	6.5 ml

ขั้นตอนในการทำสามารถสรุปได้เป็นแผนผังดังแสดงในรูปที่ 3.12



รูปที่ 3.12 การเตรียมสารละลาย 4% Paraformaldehyde

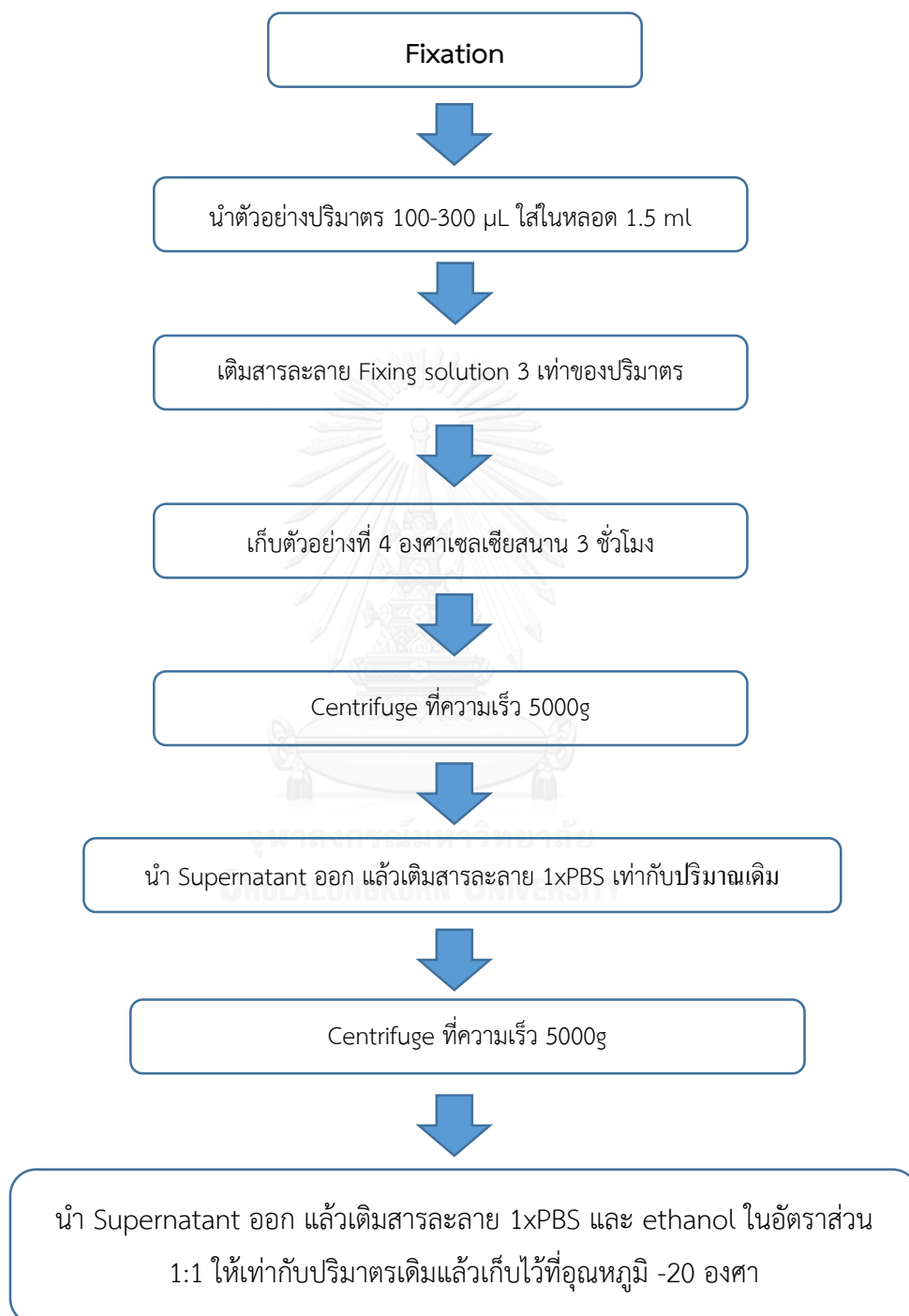
* การเตรียมสารละลาย Fixing solution ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะเริ่มทำการ Fix ตัวอย่าง*

3.4.2.2 การ Fixation

หลังจากที่ได้เตรียมสารละลาย Fixing Solution แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการ Fix ตัวอย่าง ทั้งนี้ต้องมั่นใจว่าตัวอย่างที่นำมา มีความเข้มข้นของเชื้อมากพอที่จะนำมาทำการ Fix โดยหากความเข้มข้นของเชื้อนั้นต่ำเกินไปให้นำตัวอย่างไปทำการ centrifuge ที่ความเร็ว 10,000-15,000g เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ก่อนที่จะดำเนินการในขั้นตอนนี้

ในขั้นตอนนี้เริ่มต้นให้นำตัวอย่างที่เข้มข้นมากพามาใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml โดยใส่ปริมาณตัวอย่าง 100-300 μ L หลังจากนั้นทำการเติมสารละลาย Fixing solution ลงไปในปริมาณ 3 เท่าของปริมาณตัวอย่างที่ใส่ลงไป แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อ fix RNA

หลังจากนั้นนำตัวอย่างมา centrifuge ที่ความเร็ว 5000g เพื่อให้ตกตะกอนจากนั้นทิ้งน้ำส่วนเกิน (supernatant) ออกจากหลอดแล้วเติมสารละลาย 1xPBS ลงไปในปริมาณที่เท่ากับที่เติม Fixing solution เพื่อล้างสารละลาย Fixing solution จากนั้น Centrifuge อีกครั้งแล้วนำ Supernatant ออก โดยในขั้นตอนนี้อาจทำการล้าง 2-3 ครั้งเพื่อให้แน่ใจว่า fixing solution ถูกล้างออกไปจนหมด ในขั้นตอนนี้สุดท้ายให้เติมสารละลาย 1xPBS และสารละลาย ethanol ลงไปในอัตราส่วน 1 : 1 เทียบเท่ากับปริมาตรของสารละลายเดิมแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสโดยสามารถเก็บตัวอย่างได้เป็นเวลาหลายเดือน รายละเอียดโดยรวมของขั้นตอนนี้สามารถสรุปได้เป็นแผนผังดังรูปที่ 3.13



รูปที่ 3.13 ขั้นตอน Fixation

3.4.3 การย้อมสี Probe Fluorescence

ขั้นตอนการย้อมสีสามารถถูกแบ่งได้ออกเป็น 4 ขั้นตอนย่อยได้แก่

1. Immobilization
2. การเตรียมสารละลาย Probe
3. Hybridization และ การล้าง (Washing)
4. การส่องกล้อง fluorescence

3.4.3.1 Immobilization

ในขั้นตอน Immobilization เป็นขั้นตอนในการนำตัวอย่างที่ได้ทำการ Fix แล้วไปหยดลงบนสไลด์กระจก ซึ่งสไลด์ที่จะใช้เป็นแบบ 2 รู โดยขั้นตอนต่างๆ จะเป็นดังต่อไปนี้

ทำการหยดตัวอย่างที่ได้จากการ Fixation ลงบนรูสไลด์กระจกจนเต็มหลุม (ประมาณ 10-15 μL) แล้วกระจายน้ำตัวอย่างให้เต็มช่องว่าง ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นทำการจุ่มสไลด์กระจกลงบน ethanol ที่มีความเข้มข้น 50%, 80% และ 98% ตามลำดับโดยจุ่มลงไปครั้งละ 3 นาทีแล้วจุ่มลงไปอันถัดไปทันที ทำจนครบทั้ง 3 ความเข้มข้นแล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

ในขั้นตอนนี้หากสไลด์กระจกไม่ได้ทำการเคลือบพื้นผิวให้ทำการเคลือบพื้นผิวของสไลด์ก่อนที่จะนำมาทำการทดลอง ไม่เช่นนั้นเซลล์แบคทีเรียจะหลุดออกมาจากสไลด์กระจก

3.4.3.2 การเตรียมสารละลาย Probe

การเตรียมสารละลาย Probe จะถูกเตรียมให้ความเข้มข้นของสารละลาย Probe มีความเข้มข้นอยู่ที่ $100 \text{ pmol}(10^{-12})/\mu\text{L}$ ทำการละลาย Probe เป็น Master solution และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยที่ Probe ทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองนี้มีดังตารางที่ 3.9

ตารางที่ 3.9 รายการ Probe ที่ใช้ทั้งหมดในงานวิจัย

ชื่อ Probe	Sequence (5' – 3')	%Formamide	Labeled	เอกสารอ้างอิง
Universal probe				
EUB 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	15-50	Cy3 (Red)	Rongsayamanont และคณะ (2010)
AOB probe				
Nso 190	CGATCCCCTGCTTTTCTCC	55	Alexa Flour488 (Green)	Rongsayamanont และคณะ (2010)
Cluster 6a 192	CTTTCGATCCCCCTACTTTCC	35	Cy3 (Red)	Almstrand และคณะ (2011)
Nse1472	ACCCAGTCATGACCCCC	50	Cy3 (Red)	Rongsayamanont และคณะ (2010)
NOB probe				
Ntspa 662	GGAATTCGCFCTCCTCT	35	Cy3 (Red)	Dytczak และคณะ (2008)
NIT 3	CCTGTGCTCCATGCTCCG	40	Cy3 (Red)	Dytczak และคณะ (2008)

ในการนำ Probe มาใช้ให้นำ Master solution มา 1-2 μL แล้วทำการเจือจางลง 20 เท่าของความเข้มข้นเดิม ไม่ใช้ Master Solution มาทำการทดลองเด็ดขาด

3.4.3.3 Hybridization และ การล้าง(Washing)

ขั้นตอนการ Hybridization เป็นขั้นตอนการผสม Probe เข้ากับ rRNA ของแบคทีเรีย สารเคมีที่ต้องใช้ เป็นไปตามตารางที่ 3.10

ตารางที่ 3.10 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอน Hybridization ตามความเข้มข้น Formamide ต่างๆ

สารเคมี	ปริมาณสารที่ใช้ในแต่ละความเข้มข้น Formamide				
	15%	35%	40%	50%	55%
Formamide (μl)	300	700	800	1000	1100
5 M NaCl (μl)	360	360	360	360	360
1 M Tris/HCl (μl)	40	40	40	40	40
10.0%SDS (μl)	2	2	2	2	2
DI water (μl)	1400	900	800	600	500
ปริมาตรรวม (μl)	2000	2000	2000	2000	2000

หลังจากเตรียมสารละลายให้น้ำ กระดาษ Chromatography หรือทิชชูมาใส่ในหลอด centrifuge จากนั้นหยดสารละลาย Hybridization ให้เปียกชุ่มจากนั้นนำหลอดดังกล่าวไปใส่ไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 6-10 นาที เพื่อทำให้เกิดสภาวะ vapor-liquid equilibrium ก่อนที่จะทำการ Hybridization

จากนั้นนำหลอด centrifuge ออกมาจากตู้อบแล้วทำการหยดสารละลายลงบน glass slide แต่ละรูตามปริมาณที่เหมาะสม จากนั้นนำใส่หลอด centrifuge ที่ได้ทำการ pre-treatment ไว้แล้วนำไปเข้าเตาอบที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ระหว่างที่เกิดปฏิกิริยา Hybridization ให้ทำการเตรียมสารละลาย Washing buffer solution โดยสามารถเตรียมได้ดังตารางที่ 3.11

ตารางที่ 3.11 สารเคมีในการเตรียม Washing buffer solution ตามความเข้มข้น formamide ที่ใช้ในขั้นตอน hybridization

สารเคมี	ปริมาณสารที่ใช้ในแต่ละความเข้มข้น Formamide				
	15%	35%	40%	50%	55%
0.5 M EDTA (μ l)	0	500	500	500	500
5 M NaCl (μ l)	3180	700	460	180	100
1M Tris/HCl (μ l)	1000	1000	1000	1000	1000
10.0%SDS (μ l)	50	50	50	50	50
DI water (μ l)	47,730	47,500	47,900	48,130	48,350
ปริมาตรรวม (μ l)	50,000	50,000	50,000	50,000	50,000

เมื่อเตรียมเสร็จแล้วให้นำสารละลายใส่หลอด centrifuge 50 ml ไปใส่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส จนกว่าจะถูกนำออกมาใช้

เมื่อขั้นตอน Hybridization เสร็จสิ้นให้นำ glass slide ออกมาแล้วล้างด้วย washing buffer เล็กน้อยแล้วนำ glass slide ดังกล่าวจุ่มลงใน washing buffer แล้วทิ้งไว้ 20 นาทีที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียสใน water bath

หลังจากนั้นนำ glass slide ออกมาล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทำการสับเพื่อเอาน้ำออกจาก glass slide แล้วผึ่งให้แห้งในที่มืด เมื่อแห้งแล้วให้หยดสารละลาย SlowFade-Light ลงไปบน glass slide ในแต่ละรู แล้วนำ glass cover วางทับ ทาขอบ slide ด้วยน้ำยาทาเล็บเพื่อป้องกัน slide cover เลื่อน

3.4.3.4 การส่องกล้อง fluorescence

เมื่อเตรียม glass slide เรียบร้อยแล้วจึงสามารถนำ slide ดังกล่าวไปส่องกับกล้องจุลทรรศน์เพื่อทำการวิเคราะห์ โดยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้เป็นกล้อง fluorescence confocal รุ่น OLYMPUS-FLUOVIEW-FV10i โดยใช้กำลังขยายจากกล้อง 60 เท่า และสามารถปรับซูมภาพจากกำลังขยายกล้องได้มากที่สุด 10 เท่า



บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาจลนพลศาสตร์และกลุ่มประชากรของจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซิ่งและจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรทออกซิไดซิ่งที่เลี้ยงด้วยความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงและต่ำ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ช่วง ได้แก่ การทดลองช่วงที่ 1 เป็นการเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบถังปฏิกรณ์แบบทีละเท (Batch) 2 ถัง โดยใช้แอมโมเนียความเข้มข้น 50 mg-N/l และ 1 mg-N/l จากนั้นทำการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของแต่ละถังปฏิกรณ์ รวมไปถึงทำการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ และทำการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ของทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์ ด้วยเทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) ในขณะที่การทดลองช่วงที่ 2 ได้ทำการสลับความเข้มข้นของแอมโมเนียระหว่างถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ถัง จากสูงไปต่ำ (50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l) และจากต่ำไปสูง (1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l) และทำการวิเคราะห์พารามิเตอร์ เช่นเดียวกับการทดลองช่วงที่ 1 ผลการทดลองที่ได้เป็นไปดังนี้

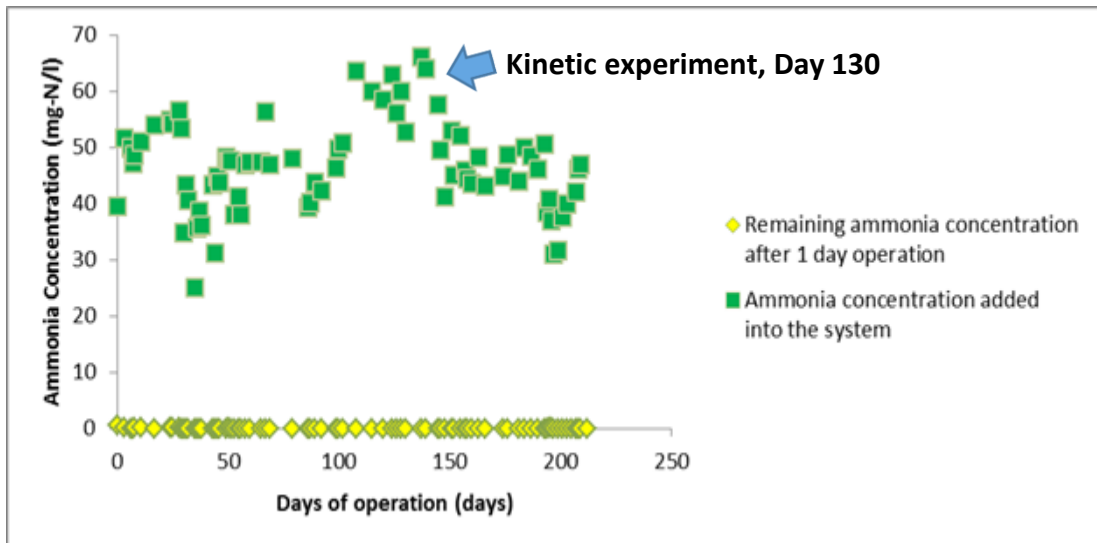
4.1 ผลการทดลองช่วงที่ 1 ถังปฏิกรณ์ A และ B ที่ป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 50 และ 1 mg-N/l

4.1.1 การดำเนินการถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l) และ B (1 mg-N/l)

4.1.1.1 การดำเนินการถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l)

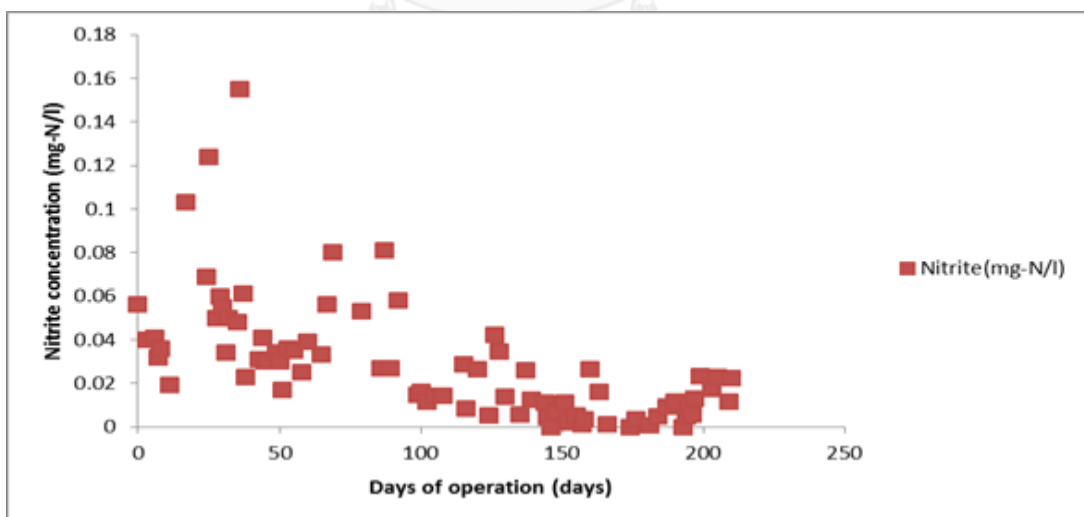
หลังจากทำการดำเนินระบบของถังปฏิกรณ์ A ซึ่งป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 50 mg-N/l เป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 212 วัน ผลการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของ แอมโมเนีย ไนโตรท และ ไนเตรท เป็นไปดังต่อไปนี้

สำหรับค่าความเข้มข้นแอมโมเนียพบว่าแอมโมเนียที่เติมลงไปในระบบมีค่าความเข้มข้นเฉลี่ยอยู่ที่ 46.60 ± 8.09 mg-N/l และค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียหลังจากผ่านการบำบัดไป 1 วันมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.028 ± 0.066 mg-N/l จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า แอมโมเนียถูกบำบัดไปจนเกือบหมดภายในระยะเวลา 1 วัน แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่งสามารถทำงานได้เป็นอย่างดีในระบบตลอดการทดลองช่วงที่ 1 โดยผลของความเข้มข้นแอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l) สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.1



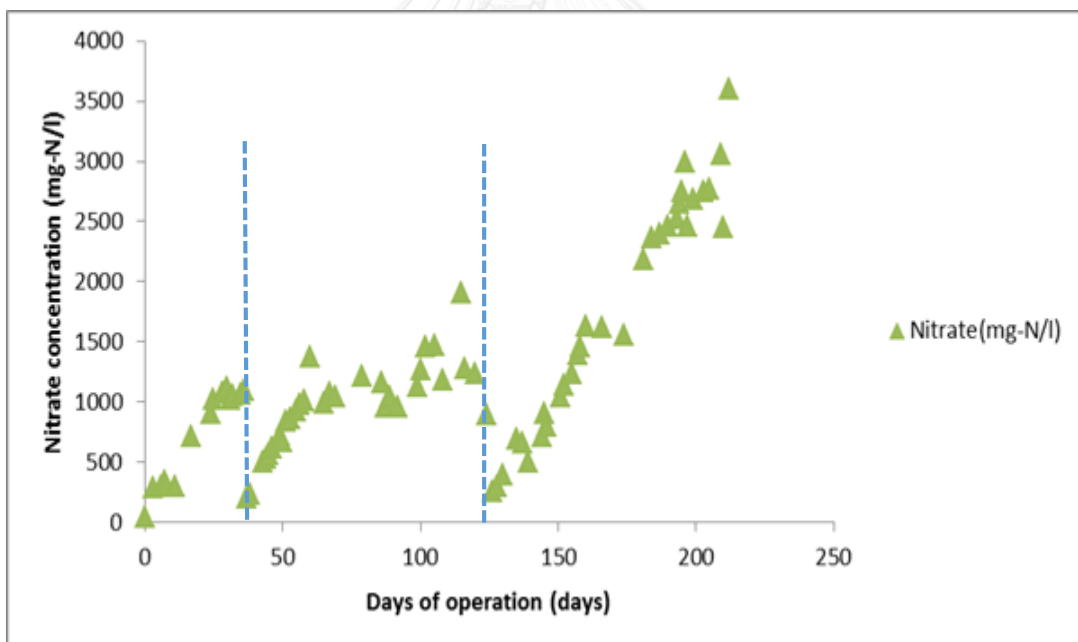
รูปที่ 4.1 ความเข้มข้นของแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ A ที่ป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 50 mg-N/l

ส่วนค่าความเข้มข้นของ ไนไตรท์ในระบบถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยประมาณ 0.029 ± 0.028 mg-N/l แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการบำบัดไนไตรท์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิ่งในระบบที่สามารถทำงานได้เป็นอย่างดี โดยค่าความเข้มข้นของไนไตรท์สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ความเข้มข้นของไนไตรท์ในถังปฏิกรณ์ A ที่ป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 50 mg-N/l

.ในขณะที่การสะสมของไนเตรทในถังปฏิกรณ์ A ในช่วงเริ่มต้นค่าของไนเตรทมีค่าเริ่มต้นอยู่ที่ประมาณ 45 mg-N/l จากนั้นค่าไนเตรทเพิ่มสูงขึ้นจนมีค่าเท่ากับ 1,096 mg-N/l ในวันที่ 36 ภายหลังจากทำการเปลี่ยนน้ำในวันที่ 37 ค่าของไนเตรทลดลงเหลือ 200 mg-N/l และมีค่าเพิ่มขึ้นภายในช่วงวันที่ 37-124 ของการทดลอง เนื่องจากภายในช่วงเวลาดังกล่าวมีการนำเชื้อจุลินทรีย์ภายในระบบมาทำการทดลองทางจลนพลศาสตร์หลายครั้ง ทำให้น้ำบางส่วนถูกนำออกจากระบบ และต้องทำการเติมน้ำเพื่อรักษาปริมาตรภายในระบบ ทำให้ค่าไนเตรทมีค่าค่อนข้างแกว่งไม่เพิ่มขึ้นต่อเนื่องเหมือนในช่วงวันที่ 1-36 จนกระทั่งวันที่ 124 ได้มีการเปลี่ยนน้ำอีกครั้งโดยค่าไนเตรทก่อนเปลี่ยนน้ำมีค่าเท่ากับ 891 mg-N/l และได้ทำการเปลี่ยนน้ำ 2 วันให้หลังและวัดค่าไนเตรทได้ 260 mg-N/l และได้ทำเดินระบบไปจนกระทั่งวันที่ 212 วัดค่าไนเตรทได้ 3,605 mg-N/l โดยความเข้มข้นของไนเตรทในถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l) สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.3 และค่าพารามิเตอร์อื่นๆ ได้แก่ pH อุณหภูมิ ค่าการละลายออกซิเจน และค่าความเค็มในถังปฏิกรณ์ A ในการทดลองช่วงที่ 1 สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.3 ความเข้มข้นของไนเตรทในถังปฏิกรณ์ A ที่เลี้ยงป้อนความเข้มข้นแอมโมเนีย 50 mg-N/l

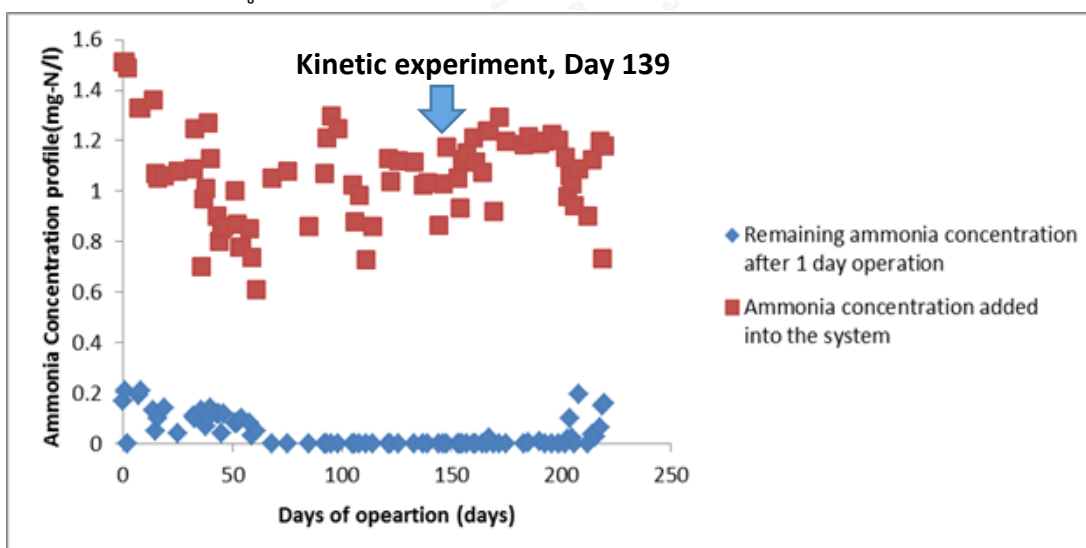
ตารางที่ 4.1 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในถังปฏิกรณ์ A ที่ป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 50 mg-N/l ในการทดลองช่วงที่ 1

พารามิเตอร์	ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
pH	7.88 \pm 0.30
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	29.58 \pm 0.82
ค่าการละลายออกซิเจน (mgO ₂ /l)	7.55 \pm 0.39
ค่าความเค็ม (ppt)	17.59 \pm 2.60

4.1.1.2 การดำเนินการถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/l)

หลังจากทำการดำเนินระบบของถังปฏิกรณ์ B ซึ่งป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/l เป็นเวลาทั้งสิ้น 221 วัน ผลการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของ แอมโมเนีย ไนโตรท์ และไนเตรท เป็นไปดังต่อไปนี้

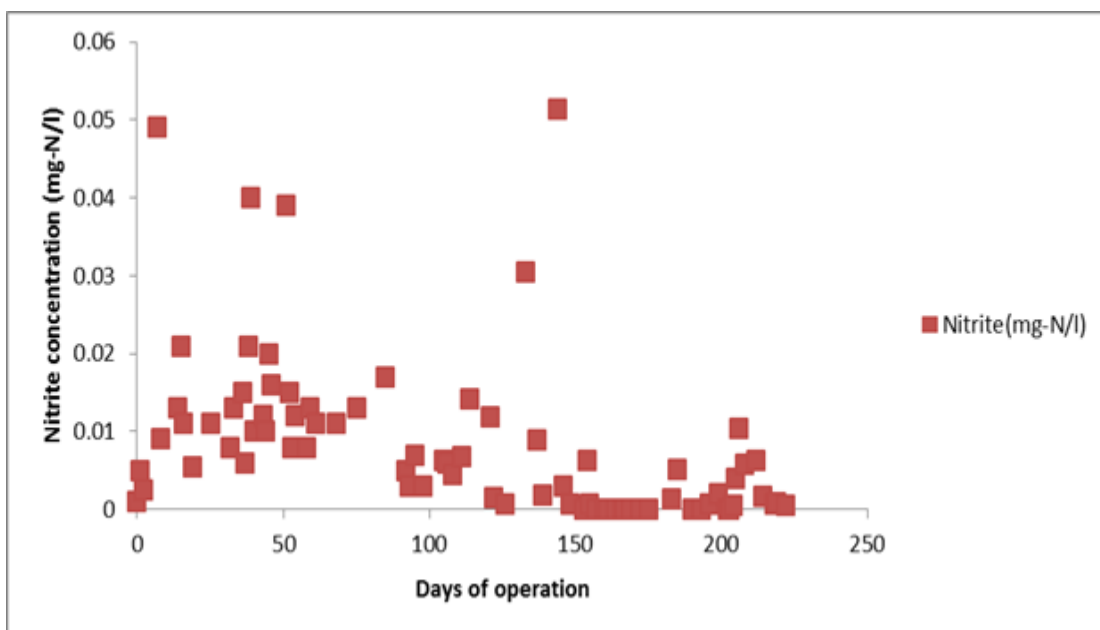
ความเข้มข้นแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ B ที่เติมเข้าสู่ระบบมีค่าเท่ากับ 1.07 \pm 0.19 mg-N/l และมีค่าความเข้มข้นแอมโมเนียหลังจากผ่านการบำบัด 1 วันเฉลี่ยเท่ากับ 0.048 \pm 0.062 mg-N/l จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแอมโมเนียถูกบำบัดจนเกือบหมดในระบบภายใน 1 วัน แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดส์ซึ่งสามารถทำงานได้เป็นอย่างดีในระบบตลอดช่วงการทดลองที่ 1 ซึ่งสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4. 4 ความเข้มข้นของแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ B ที่ป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย

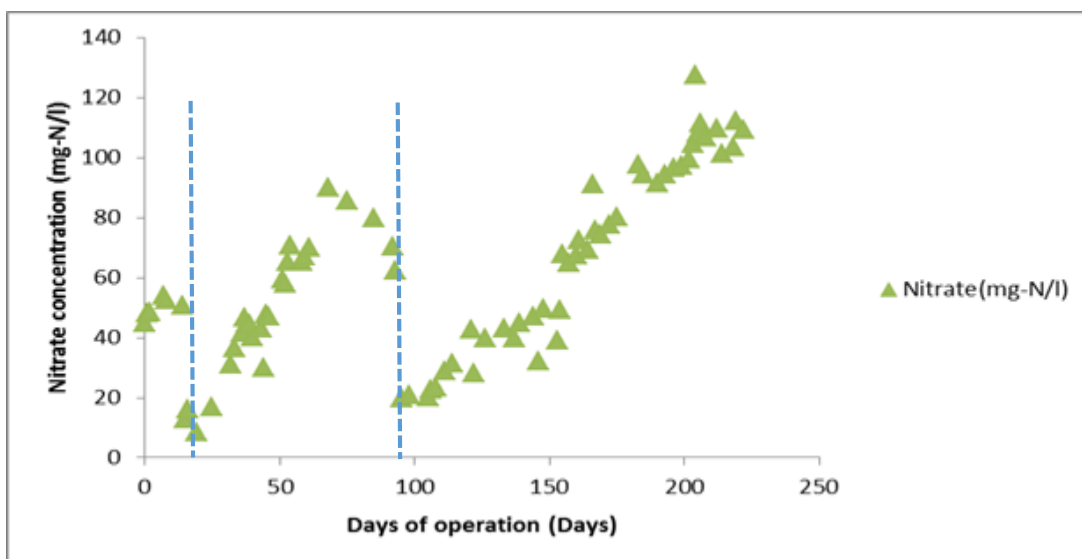
1 mg-N/l

สำหรับค่าความเข้มข้นของไนไตรท์ของถังปฏิกรณ์ B ไนไตรท์เฉลี่ยในระบบมีค่าประมาณ 0.0085 ± 0.01 mg-N/l แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการบำบัดไนไตรท์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิ่งในระบบซึ่งสามารถทำงานได้เป็นอย่างดี โดยค่าความเข้มข้นของไนไตรท์สามารถแสดงดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4. 5 ความเข้มข้นของไนไตรท์ในถังปฏิกรณ์ B ที่ป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/l

ค่าความเข้มข้นไนเตรทในถังปฏิกรณ์ B ในช่วงเริ่มต้นมีค่าประมาณ 45 mg-N/l และมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาผ่านไปจนกระทั่งวันที่ 14 ค่าไนเตรทมีค่าประมาณ 50 mg-N/l ทั้งนี้ในวันที่ 15 ได้มีการเปลี่ยนน้ำใหม่ทำให้ค่าไนเตรทลดลงเหลือ 13 mg-N/l สำหรับในช่วงวันที่ 15-93 เนื่องจากภายในช่วงเวลาดังกล่าวมีการนำเชื้อจุลินทรีย์ภายในระบบมาทำการทดลองทางจุลชีววิทยาหลายครั้ง ทำให้น้ำบางส่วนถูกนำออกจากระบบ และต้องทำการเติมน้ำเพื่อรักษาปริมาตรภายในระบบ ทำให้ค่าไนเตรทมีค่าค่อนข้างแกว่ง ไม่เพิ่มขึ้นต่อเนื่องดังเช่นในช่วงวันที่ 1-14 โดยในวันที่ 93 ค่าไนเตรทมีค่าเท่ากับ 62 mg-N/l และหลังจากเปลี่ยนน้ำในวันที่ 95 ค่าไนเตรทลดลงเหลือ 19.31 mg-N/l และทำการทดลองเดินระบบไปจนกระทั่งจบการทดลองครั้งที่ 1 ค่าไนเตรทมีค่าเท่ากับ 109 mg-N/l โดยค่าความเข้มข้นของไนเตรทในระบบถังปฏิกรณ์ B สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.6 และค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ pH อุณหภูมิ ค่าการละลายออกซิเจน และค่าความเค็มของถังปฏิกรณ์ B ในช่วงการทดลองที่ 1 สามารถแสดงได้ดังตารางที่ 4.2



รูปที่ 4.6 ความเข้มข้นไนเตรทในถังปฏิกรณ์ที่ป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/l

ตารางที่ 4.2 : ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในถังปฏิกรณ์ B ที่ป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/l ในการทดลองช่วงที่ 1

พารามิเตอร์	ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
pH เริ่มต้นเมื่อเติมแอมโมเนีย	7.64 \pm 0.21
pH หลังจากการเติมแอมโมเนีย 1 วัน	6.89 \pm 0.27
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	29.58 \pm 0.82
ค่าการละลายออกซิเจน (mgO ₂ /l)	7.63 \pm 0.40
ค่าความเค็ม (ppt)	15.45 \pm 1.39

4.1.2. จลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l) และ ถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/l)

4.1.2.1 จลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิง

จากการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการใช้แอมโมเนียของตัวกลางซึ่งนำมาจากถังปฏิกรณ์ A และ B สามารถนำมาสร้างกราฟ Monod ผลที่ได้เป็นไปดังนี้

จากการทดลองทางพลจลนพลศาสตร์พบว่าค่าอัตราการใช้แอมโมเนียจำเพาะสูงสุดของถังปฏิกรณ์ A และ B มีค่าเท่ากับ 0.128 \pm 0.018 mg-N/mgMLVSS.hr และ 0.0089 \pm 0.0007 mg-N/mgMLVSS.hr และมีค่า K_s ของถังปฏิกรณ์ A และ B เท่ากับ 8.79 \pm 3.82 mg-N/l และ 1.19 \pm 0.47 mg-N/l ตามลำดับ

จากผลของค่าพารามิเตอร์ของทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์จะเห็นได้ว่าค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ มีความแตกต่างอย่างชัดเจน โดยที่ถังปฏิกรณ์ A มีค่า q_{max} และค่า K_s สูงกว่าถังปฏิกรณ์ B ซึ่งสามารถบ่งบอกถึงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่คาดว่าจะพบในแต่ละระบบที่น่าจะมีความแตกต่างกัน

จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการรายงานค่า K_s ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ เอาไว้เป็นจำนวนมาก อาทิ เช่น จากงานวิจัยของ Jung และคณะ (2011) ได้รายงานค่า K_s ของแบคทีเรียชนิด *Nitrosomonas europaea* เอาไว้ในช่วง 7.72 - 18.2 mg-N/l ในขณะที่งานวิจัยของ Martens-Habbena และคณะ (2009) ได้รายงานค่าของแบคทีเรียชนิด *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosomonas communis*, *Nitrosomonas eutropha* ไว้ในช่วง 0.7 - 14 mg-N/l, 14 - 70 mg-N/l และ 11.2 - 70 mg-N/l ตามลำดับเช่นเดียวกับงานของ ธนสิดา โชติอนนต์ (2556) ได้ทำการศึกษาเลี้ยงแอมโมเนียความเข้มข้นสูง (25 mg-N/l) ในฟิล์มตึงที่มีการไหลอย่างต่อเนื่อง พบว่ากลุ่มประชากรจุลินทรีย์หลักเป็นชนิด *Nitrosomonas europaea* และมีค่า K_s ที่ได้จากการทดลองเท่ากับ 9.23 mg-N/l

จากงานวิจัยข้างต้นดังกล่าว กลุ่มแบคทีเรียที่ได้ทำการกล่าวไว้ในงานวิจัยเหล่านั้นเป็นกลุ่มแบคทีเรียชนิด Low affinity to ammonia และจากผลการทดลองหาค่า K_s ของถังปฏิกรณ์ A ซึ่งมีค่าเท่ากับ 8.79 ± 3.82 mg-N/l นั้นสอดคล้องกับค่า K_s ที่ได้มีการรายงานจากงานวิจัยดังที่ได้กล่าวมา ทำให้สามารถคาดการณ์ได้ว่าในถังปฏิกรณ์ A น่าจะมีกลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ชนิด Low affinity to ammonia อยู่เป็นกลุ่มประชากรหลัก

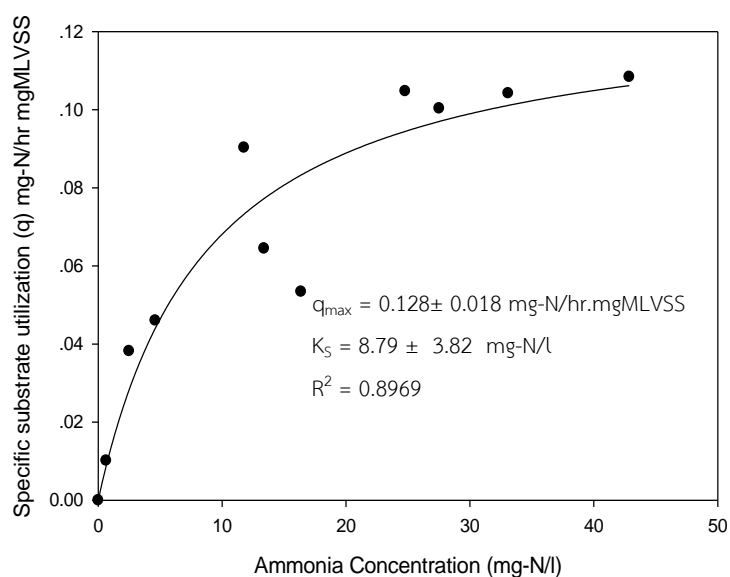
อย่างไรก็ดี มีงานวิจัยบางชิ้นที่ได้ทำการรายงานค่า K_s ของจุลินทรีย์กลุ่ม Low affinity to ammonia ไว้ในช่วงค่าที่แตกต่างจากงานวิจัยข้างต้น โดยงานวิจัยของ Park และ Noguera (2007) ได้ทำการรายงานค่า K_s ของชนิด *Nitrosomonas europaea* อยู่ที่ 2.59 mg-N/l ในขณะที่งานวิจัยของ Keen และ Prosser (1987) รายงานค่า K_s ไว้ที่ 3.65 mg-N/l

นอกจากกลุ่ม Low affinity to ammonia แล้ว ยังมีงานวิจัยอีกหลายชิ้นที่ได้ทำการรายงานค่า K_s ของแบคทีเรียกลุ่ม High affinity to ammonia ซึ่งได้แก่ชนิด *Nitrosomonas oligotropha*, *Nitrosospira* และ *Nitrosomonas marina* ไว้ดังนี้

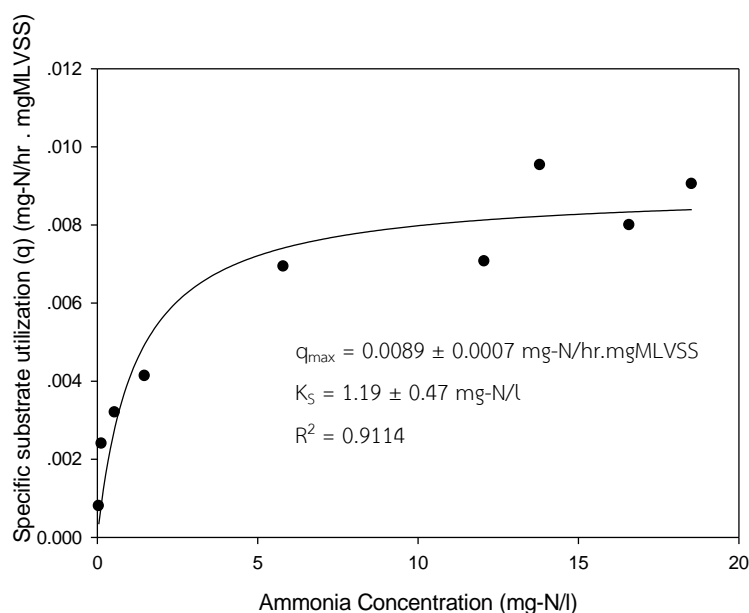
จากงานวิจัยของ Martens-Habbena และคณะ (2009) ได้รายงานค่า K_s ของชนิด *Nitrosomonas oligotropha* และ *Nitrosospira* ไว้ในช่วง 0.28 - 1.4 mg-N/l และ 1.26 - 9.8 mg-N/l ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Park และ Noguera (2007) ในขณะที่งานวิจัยของ Limpiyakorn และคณะ (2007) ได้รายงานค่า K_s ของชนิด *Nitrosospira* ไว้ในช่วง 1 - 7 mg-N/l และงานวิจัยของ Martens-Habbena และคณะ (2009) และงานวิจัยของ Jung และคณะ (2011) ได้ทำการรายงานค่า K_s ของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งอาร์เคียไว้ที่ 0.0014 - 0.0182 mg-N/l

จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาดังกล่าวเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลการทดลองของถังปฏิกรณ์ B ในช่วงการทดลองที่ 1 ซึ่งมีค่า K_s เท่ากับ 1.19 ± 0.47 mg-N/l สามารถคาดการณ์ได้ว่า จุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งในระบบน่าจะเป็นกลุ่ม High affinity to ammonia เป็นหลัก อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์อาร์เคียอาจไม่ถูกพบในระบบ เนื่องจากค่า K_s ของจุลินทรีย์กลุ่มนี้มีค่าต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบผลของค่า q_{max} จากถังปฏิกรณ์ A และ B พบว่าค่า q_{max} ของถังปฏิกรณ์ A มีค่าสูงกว่าถังปฏิกรณ์ B อยู่มากอย่างมีนัยยะสำคัญซึ่งเป็นเครื่องยืนยันว่าทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์น่าจะมีกลุ่มประชากรหลักแตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งโดยทั่วไปกลุ่ม Low affinity to ammonia จะมีค่า q_{max} ที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่ม High affinity to ammonia อย่างไรก็ตามค่าดังกล่าวไม่สามารถนำมาบ่งชี้ชัดกลุ่มชนิดแบคทีเรียได้อย่างชัดเจน โดยกราฟ Monod ของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l) และ B (1 mg-N/l) สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.7 และ 4.8 ตามลำดับ



รูปที่ 4.7 กราฟ Monod แสดงอัตราการใช้แอมโมเนียจำเพาะ (q) และความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l)



รูปที่ 4.8 กราฟ Monod แสดงอัตราการใช้อำมโมเนียจำเพาะ (q) และความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/l)

4.1.2.2 จลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิ่ง

จากการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการใช้ในไตรท์ของตัวกลางจากถังปฏิกรณ์ A และ B ที่ป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 50 และ 1 mg-N/l ตามลำดับ สามารถนำมาสร้างกราฟ Monod ผลที่ได้เป็นไปดังนี้

จากการทดลองพบว่าค่าอัตราการใช้ในไตรท์ จำเพาะสูงสุด ของถังปฏิกรณ์ A และ B มีค่าเท่ากับ 0.048 ± 0.0045 mg-N/mgMLVSS.hr และ 0.0086 ± 0.0009 mg-N/mgMLVSS.hr และมีค่า K_s ของถังปฏิกรณ์ A และ B เท่ากับ 2.57 ± 1.00 mg-N/l และ 1.34 ± 0.80 mg-N/l ตามลำดับ

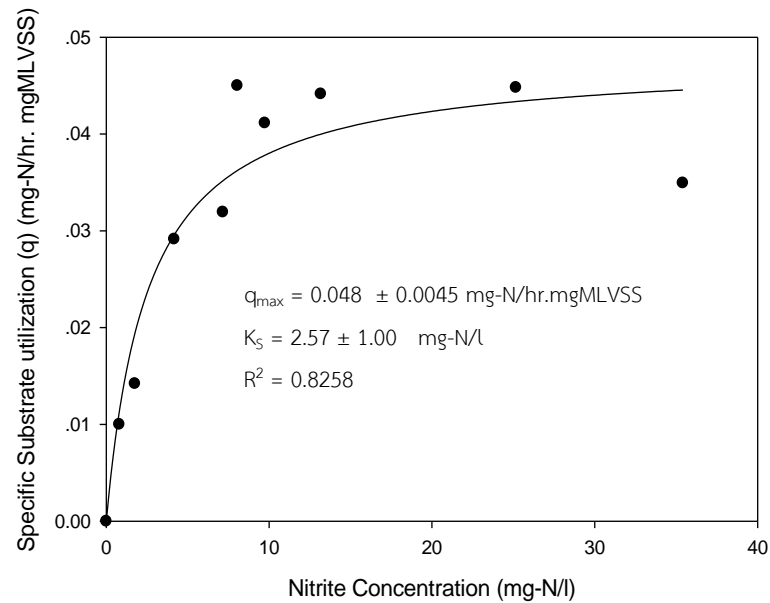
งานวิจัยที่ผ่านมาได้ทำการศึกษาและรายงานค่าทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิ่งชนิด *Nitrobacter* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Low affinity to nitrite และชนิด *Nitrospira* ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่ม High affinity to nitrite เช่น ในงานวิจัยของ Schramm และคณะ (2000) ได้รายงานค่า K_s ของ *Nitrobacter* ไว้ในช่วง 0.84 – 8.4 mg-N/l เช่นเดียวกับงานของ Tangkitjavisut และคณะ (2015) ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิ่งที่มีความเข้มข้นไนไตรท์สูง (3, 20, 100 mg-N/l) ซึ่งมีชนิด *Nitrobacter* เป็นกลุ่มประชากรจุลินทรีย์หลัก และมีค่า K_s อยู่ในช่วง 8.36 - 12.20 mg-N/l

ในขณะที่ *Nitrospira* ได้มีงานวิจัยหลายงานรายงานค่า K_s ไว้เช่นกัน เช่น จากงานวิจัยของ Blackburne และคณะ (2007) ได้รายงานค่า K_s อยู่ที่ 0.9 mg-N/l ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกับงานวิจัยของ

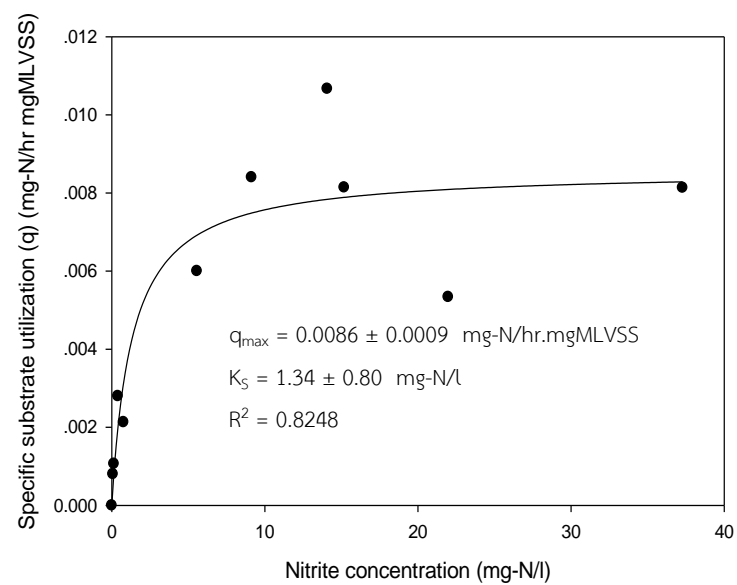
Manser และคณะ (2005) ซึ่งรายงานค่า K_s ในช่วง 0.13 - 1 mg-N/l ในขณะที่งานวิจัยของ Tangkitjawisut และคณะ (2015) ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซึ่งที่ความเข้มข้นไนโตรต่ำ (0.1, 0.5 mg-N/l) ซึ่งมีชนิด *Nitrospira* เป็นกลุ่มประชากรจุลินทรีย์หลัก มีค่า K_s อยู่ในช่วง 0.71 - 0.98 mg-N/l

จากค่า K_s ที่ได้จากทั้ง 2 ถังพบว่า ถังปฏิกรณ์ A และ B ไม่ได้มีค่า K_s แตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ กลุ่มประชากรจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซึ่งน่าจะมีความคล้ายคลึงกันในทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์ อย่างไรก็ตามมีข้อพึงระวังไว้ว่าทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์ไม่ได้มีการเติมไนโตรที่เข้าสู่ระบบโดยตรง แต่ไนโตรที่เกิดขึ้นภายในระบบจะค่อยๆ ถูกปล่อยออกมาจากกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน และแทบจะถูกกำจัดออกไปในทันทีที่เกิดขึ้น ซึ่งจะสังเกตได้ว่าค่าความเข้มข้นไนโตรที่มีค่าต่ำอยู่ตลอดเวลาในการเดินระบบ ทำให้ในความเป็นจริงความเข้มข้นไนโตรที่ในระบบไม่ได้มีค่าที่สูงมากนัก ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซึ่งชนิด *Nitrospira* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม High affinity to nitrite อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าชนิด *Nitrospira* จะมีแนวโน้มเป็นกลุ่มประชากรจุลินทรีย์หลักในระบบ แต่ก็อาจมีจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซึ่งชนิด *Nitrobacter* ซึ่งเป็นกลุ่ม Low affinity to nitrite เจริญเติบโตอยู่ร่วมด้วยได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในถังปฏิกรณ์ A ที่มีการปล่อยไนโตรที่ออกมามากกว่าถังปฏิกรณ์ B เนื่องจากมีการเติมแอมโมเนียที่สูงกว่าถังปฏิกรณ์ B

นอกจากนี้จากค่า q_{max} ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซึ่งของถังปฏิกรณ์ A ยังมีค่าค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับถังปฏิกรณ์ B ซึ่งอาจเป็นการสื่อถึงการมีอยู่ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซึ่งชนิด *Nitrobacter* ในระบบถังปฏิกรณ์ A โดยลักษณะกราฟ Monod ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซึ่งในถังปฏิกรณ์ A และ B สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.9 และ 4.10



รูปที่ 4.9 กราฟ Monod แสดงอัตราการใช้ไนโตรเจนจำเพาะ (q) และความเข้มข้นไนโตรเจนเริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l)



รูปที่ 4.10 กราฟ Monod แสดงอัตราการใช้ไนโตรเจนจำเพาะ (q) และความเข้มข้นไนโตรเจนเริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/l)

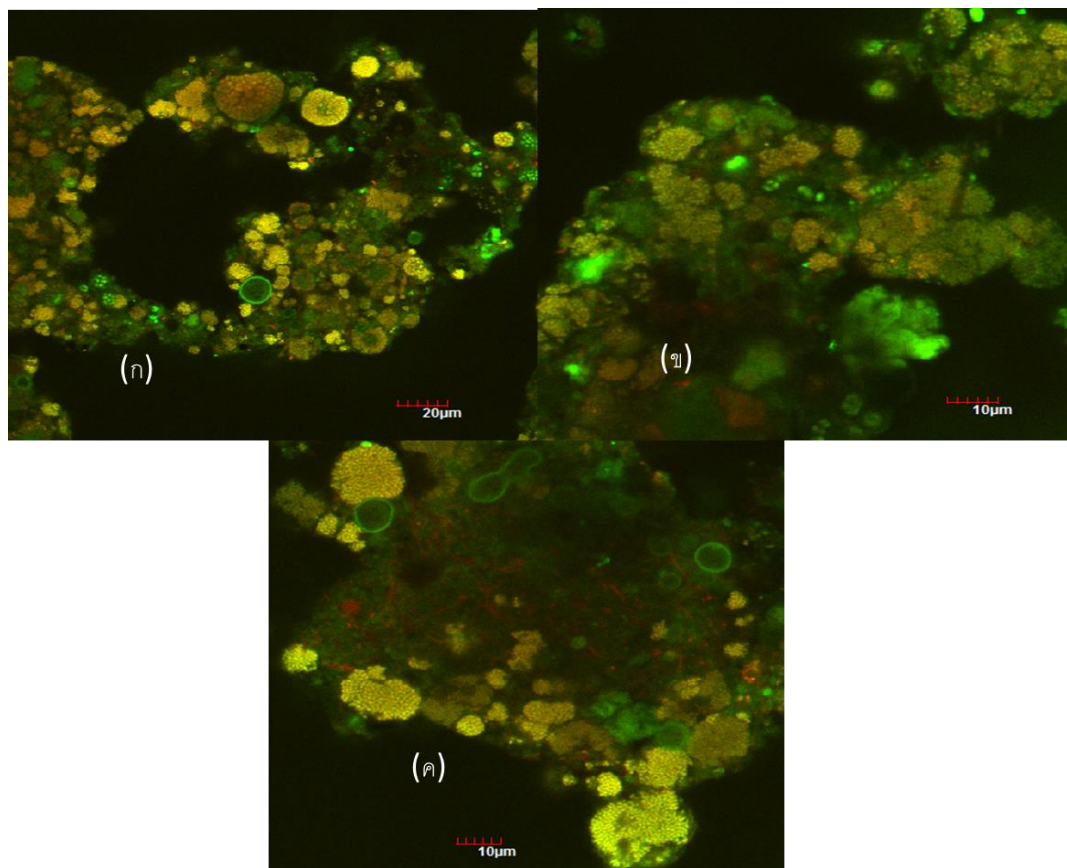
4.1.3 การศึกษาจุลินทรีย์กลุ่มประชากรโดยใช้เทคนิค Fluorescence in situ hybridization (FISH)

4.1.3.1 การศึกษาจุลินทรีย์กลุ่มประชากรในถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l) ในช่วงการทดลองที่ 1

จากการศึกษาจุลินทรีย์กลุ่มประชากรในถังปฏิกรณ์ A ซึ่งป้อนด้วยแอมโมเนียความเข้มข้น 50 mg-N/l โดยใช้เทคนิค FISH ผลที่ได้เป็นดังต่อไปนี้

จากการใช้ probe Nso190 (Labeled Alexa488-Green) ซึ่งเป็น probe ที่ใช้ศึกษาจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งแบคทีเรียใน Betaproteobacteria ซึ่งครอบคลุมแอมโมเนียออกซิไดซ์แบคทีเรียเกือบทั้งหมด และ probe EUB338 (Labeled Cy3-Red) ซึ่งครอบคลุมแบคทีเรียทั้งหมด (universal bacteria)

ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าจากการเดินระบบถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l) จุลินทรีย์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ในระบบเป็นกลุ่มประชากรชนิดแอมโมเนียออกซิไดซ์แบคทีเรีย ซึ่งแสดงจากการที่มีบริเวณที่ probe ทั้ง 2 ชนิดมีการซ้อนทับกันอยู่เป็นจำนวนมาก ทำให้สามารถสรุปได้ว่าถังปฏิกรณ์ A สามารถคัดเลือกกลุ่มประชากรจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ได้สำเร็จเป็นอย่างดี ดังแสดงในรูปที่ 4.11

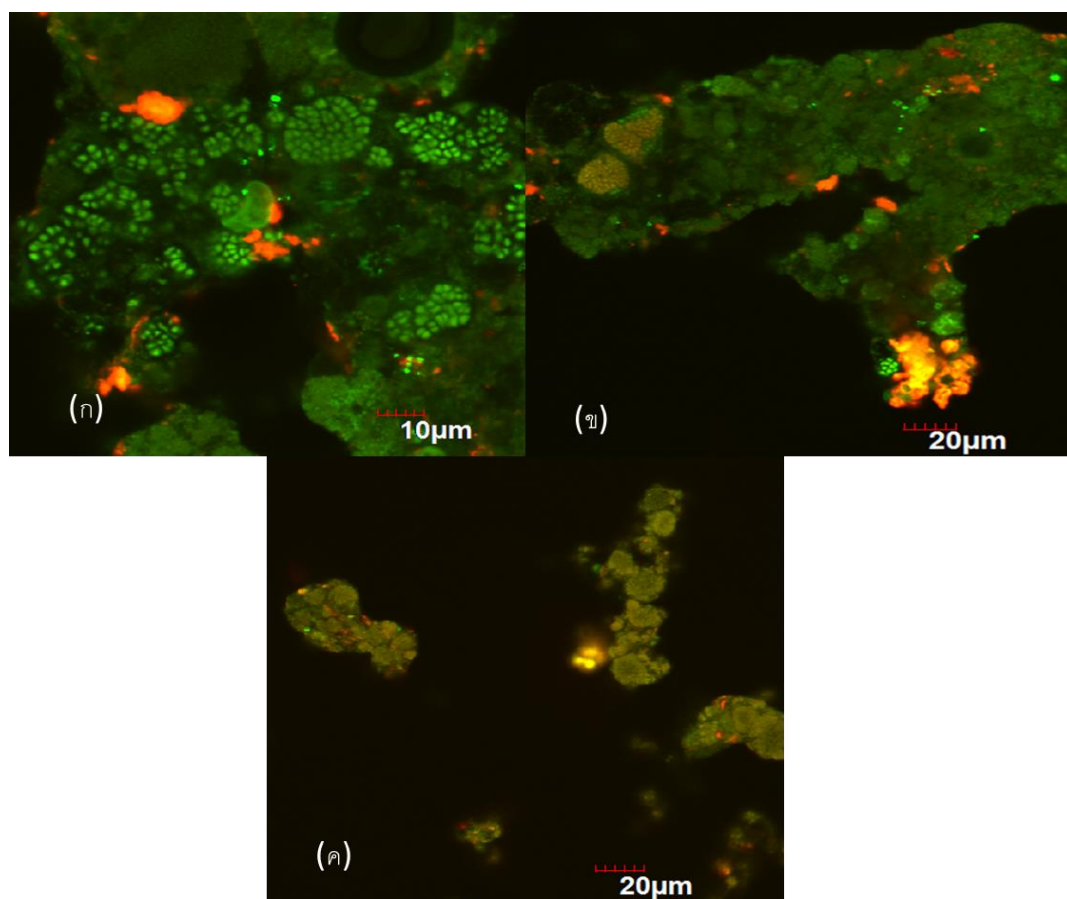


รูปที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 1 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe EUB338 (universal bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว) ส่วนที่เป็นสีเหลือง-ส้มแสดงให้เห็นถึงจุดที่ทั้ง 2 probe ซ้อนทับกัน

เมื่อทราบว่าประชากรส่วนใหญ่ภายในระบบคือ แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียแล้ว ขั้นตอนต่อมา เราจึงใช้ probe Nse1472 (Labeled Cy3-Red) ซึ่งเป็น probe ของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย ชนิด *Nitrosomonas europaea* ซึ่งเป็นตัวแทนที่สำคัญของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียกลุ่ม Low affinity to ammonia ร่วมกับการใช้ probe Nso190 (Labeled Alexa488-Green) ซึ่งเป็น probe แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียใน Betaproteobacteria

ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าในระบบถังปฏิกรณ์ A มีแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย ชนิด *Nitrosomonas europaea* อยู่มากพอสมควร ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ ($K_s = 8.79 \pm 3.82$ mg-N/l) อย่างไรก็ตามก็ยังมีบางจุดพื้นที่ที่ไม่พบกลุ่มประชากรชนิดนี้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ไม่ได้เป็นไปในลักษณะของเนื้อเดียวกัน (homogenous) ทำให้สัดส่วนอัตราการเจริญชนิด *Nitrosomonas europaea* ไม่คงที่ในแต่ละจุด

โดยผลที่ได้สามารถแสดงดังรูปที่ 4.12 โดยที่ในรูป 4.12(ก.) แสดงให้เห็นถึงจุดที่ไม่พบจุลินทรีย์ชนิด *Nitrosomonas europaea*

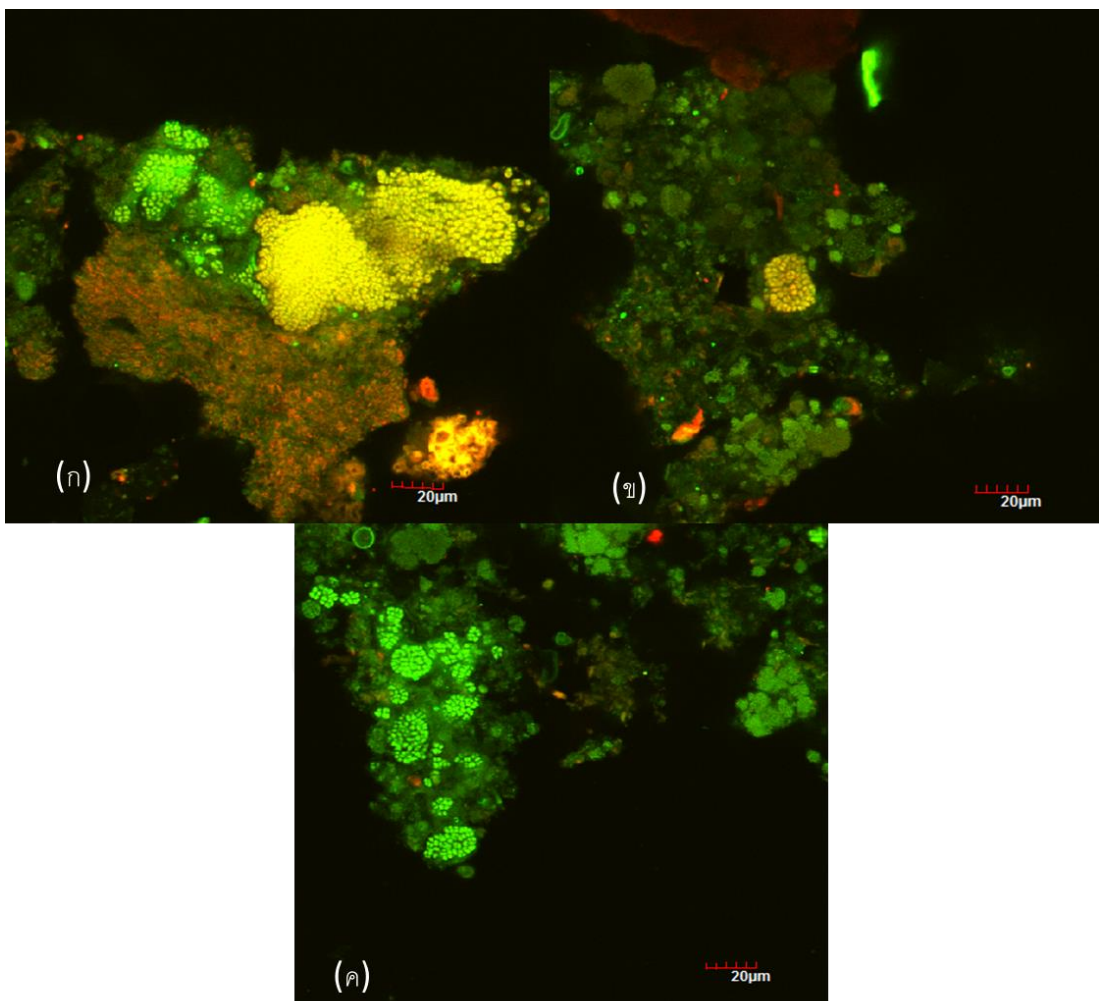


รูปที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 1 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Nse1472 (*Nitrosomonas europaea*) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Fluor 488 (สีเขียว) ส่วนที่เป็นสีเหลือง-ส้มแสดงให้เห็นถึงจุดที่ทั้ง 2 probe ซ้อนทับกัน

หลังจากที่ทำการสำรวจกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ชนิด Low affinity to ammonia แล้ว probe Cluster6a192 (Labeled Cy3-Red) เป็น probe ตัวแทนของกลุ่ม High affinity to ammonia โดย probe นี้เป็น probe ของชนิด *Nitrosomonas oligotropha* lineage โดยใช้ร่วมกับ probe Nso190 ซึ่งเป็น probe แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียใน Betaproteobacteria

โดยผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงการมีอยู่ของจุลินทรีย์ชนิด *Nitrosomonas oligotropha* lineage โดยถึงแม้ว่าในถังปฏิกรณ์ A จะถูกคาดการณ์จากค่า K_s ที่สูง ($K_s = 8.79 \pm 3.82$ mg-N/l) ว่าน่าจะพบกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ประเภท Low affinity to ammonia เป็นจำนวนมากแต่ก็ได้มี

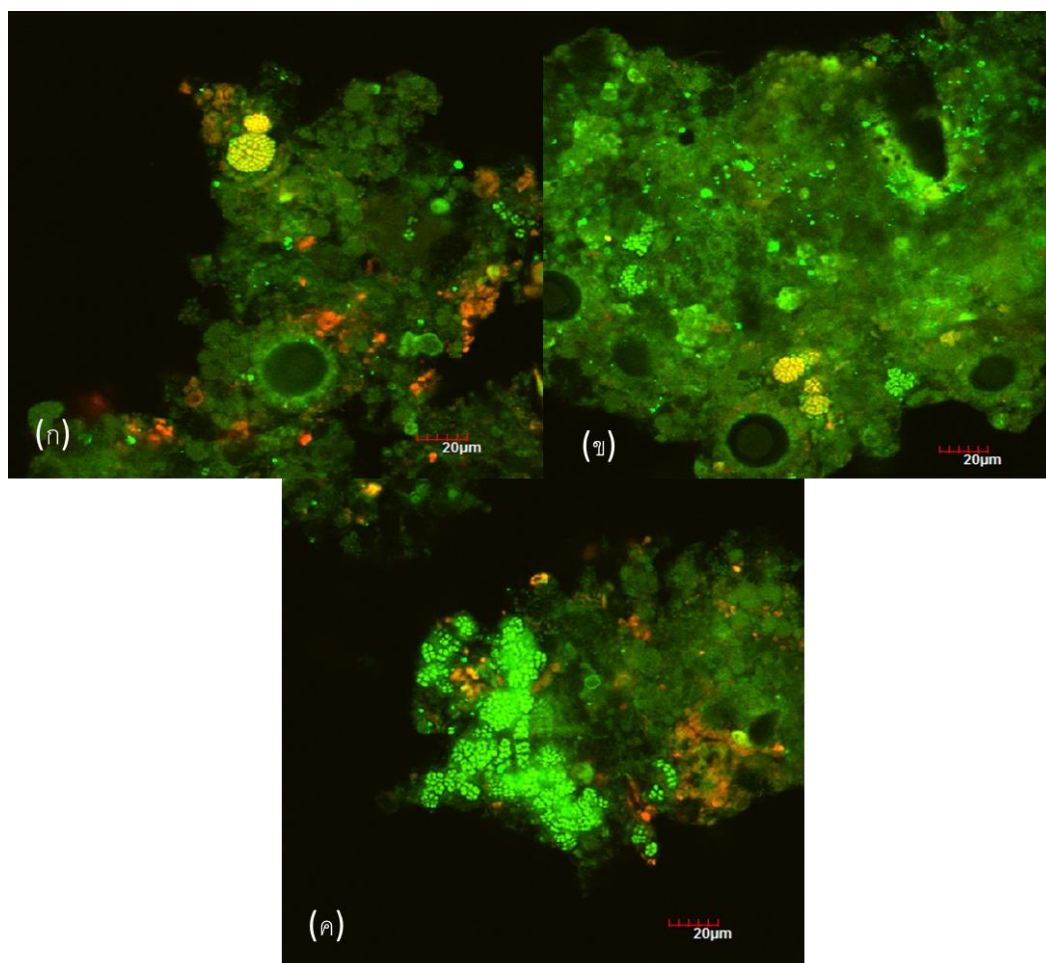
การพบกลุ่มประชากรประเภท High affinity to ammonia อยู่พอสมควรเช่นกัน สาเหตุอาจเนื่องมาจากระบบที่ใช้ในการทดลองเป็นแบบระบบที่ละเท ทำให้ในช่วงแรกเมื่อความเข้มข้นแอมโมเนียยังสูงอยู่กลุ่มจุลินทรีย์ประเภท Low affinity to ammonia เช่น ชนิด *Nitrosomonas europaea* อาจมีบทบาทสำคัญในการกำจัดแอมโมเนีย และเมื่อปริมาณแอมโมเนียลดต่ำลงจุลินทรีย์กลุ่ม High affinity to ammonia ก็อาจทำงานเป็นหลักแทน ซึ่งผลดังกล่าวสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.13 อย่างไรก็ตามการกระจายตัวของแบคทีเรียชนิดนี้ไม่ได้เป็นแบบเนื้อเดียวกัน (homogenous) ทำให้ไม่เจอชนิดนี้ในบางจุดดังเช่นในรูปที่ 4.13 (ค)



รูปที่ 4.13 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 1 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Cluster6a192 (*Nitrosomonas oligotropha* lineage) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa-Flour488 (สีเขียว) ส่วนที่เป็นสีเหลือง-ส้มแสดงให้เห็นถึงจุดที่ทั้ง 2 probe ซ้อนทับกัน

หลังจากที่ทำการวิเคราะห์จุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงแล้ว ขั้นตอนต่อไปเราจึงทำการวิเคราะห์กลุ่มประชากรไนโตรทออกซิไดซิง โดยในขั้นแรกได้ทำการวิเคราะห์ชนิด *Nitrospira* ซึ่งเป็นกลุ่ม High affinity to nitrite โดยใช้ probe Ntspa662 (*Nitrospira*) โดย label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) ร่วมกับกับ probe Nso190 ซึ่งเป็น probe แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียใน Betaproteobacteria

ผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงการมีอยู่ของไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียชนิด *Nitrospira* โดยทั่วไป จุลินทรีย์กลุ่มไนโตรทออกซิไดซิงมักไม่ดำรงอยู่เป็นกลุ่มเดี่ยวๆ โดยมักอยู่บริเวณที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรียกลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงเนื่องจากในบริเวณนี้เป็นจุดที่มักมีการปล่อยไนโตรทออกมาในความเข้มข้นที่มาก (Kindaichi และคณะ, 2006) จากการทำจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงทำการเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนโตรที่ซึ่งสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.14 อย่างไรก็ตามจากรูปที่ 4-14 (ก) และ (ข) นั้นรูปที่แสดงออกมาไม่ได้แสดงถึงจุดสีแดงเดี่ยวๆ ซึ่งเป็นสีที่ได้ทำการย้อมแบคทีเรียชนิด *Nitrospira* แต่เป็นจุดสีเหลืองที่แสดงถึงการซ้อนทับของแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มซึ่งอาจหมายความว่า *Nitrospira* ซึ่งเป็นไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียได้ทำการอยู่ซ้อนทับกับแบคทีเรียแอมโมเนียออกซิไดซิงซึ่งย้อมด้วยสีเขียว ทำให้สัญญาณ fluorescence ไม่สามารถแบ่งแยกแบคทีเรีย 2 กลุ่มนี้ได้อย่างชัดเจนนักจึงเห็นเป็นจุดสีเหลือง อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าการซ้อนทับกันนั้นเกิดขึ้นในทุกตำแหน่งที่พบไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียชนิด *Nitrospira* จึงอาจมีความเป็นไปได้ว่า probe ที่ใช้ในการวิเคราะห์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Nso 190- Labeled Alexa 488-Green) อาจถูกล้างออกไม่หมด ทำให้สัญญาณของ probe Nso 190 บางส่วนติดหลงเหลืออยู่ทำให้เห็นเป็นสีเขียวและแดงซ้อนอยู่ที่จุดเดียวกับที่พบไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียชนิด *Nitrospira* ซึ่งผลการทดลองในที่นี้อาจเป็นสิ่งที่พิสูจน์ได้ยากกว่าเป็นการซ้อนทับกันของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียกับไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียจริงหรือไม่ อย่างไรก็ตามไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียชนิด *Nitrospira* นั้นพบเห็นพอสมควรภายในระบบถังปฏิกรณ์ A อย่างไรก็ตามรูปที่ 4-14 (ค) แสดงถึงตัวอย่างบางส่วนที่ไม่มีการพบแบคทีเรียชนิด *Nitrospira* ในระบบ



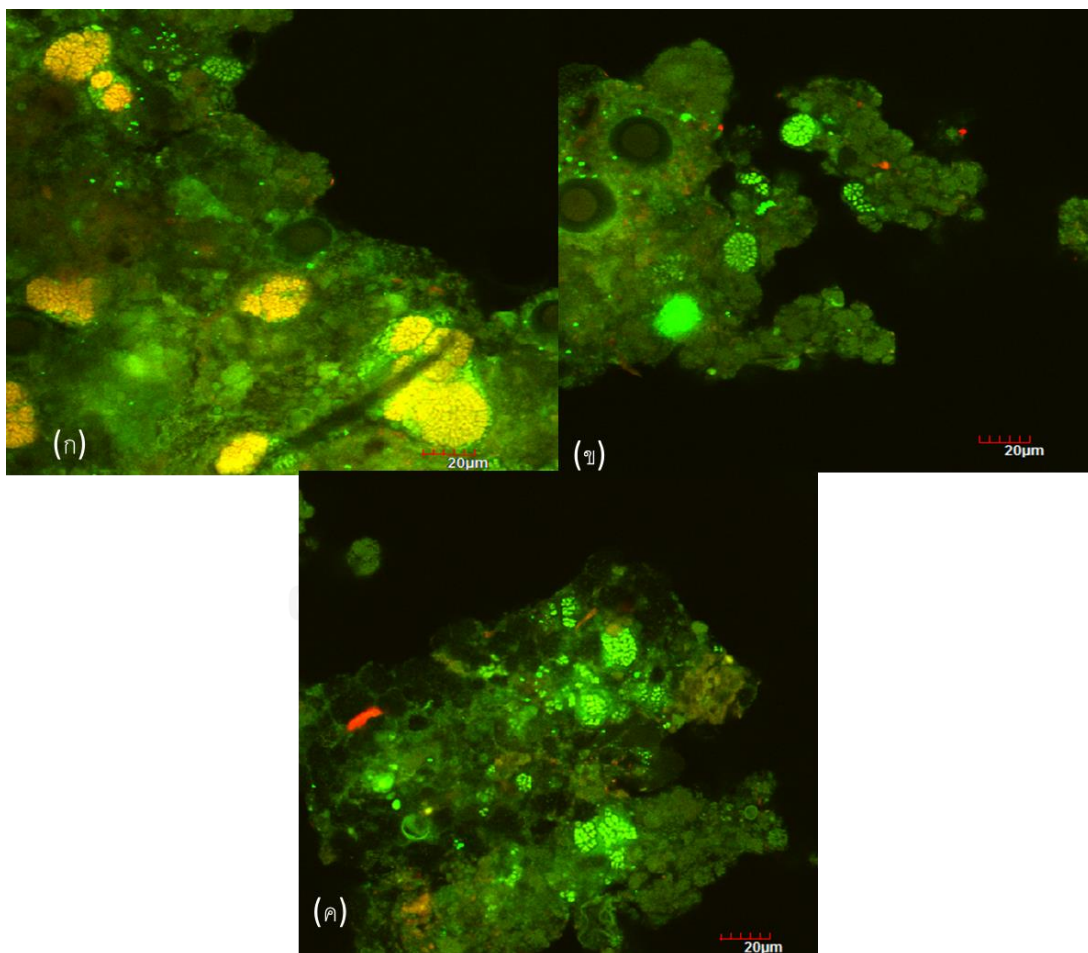
รูปที่ 4.14 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 1 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Ntspa662 (*Nitrospira*) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว) ส่วนที่เป็นสีเหลือง-ส้มแสดงให้เห็นถึงจุดที่ทั้ง 2 probe ซ้อนทับกัน

หลังจากทำการศึกษาแบคทีเรียชนิด *Nitrospira* ซึ่งเป็นไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียกลุ่ม High affinity to nitrite แล้วขั้นต่อไปจึงทำการศึกษากลุ่มไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียกลุ่ม Low affinity to nitrite ซึ่งได้แก่ชนิด *Nitrobacter*

ผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงการดำรงอยู่ของไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียชนิด *Nitrobacter* โดยลักษณะการดำรงอยู่ของจุลินทรีย์กลุ่มนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียอื่น คือ อาศัยอยู่ใกล้ซิดจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงดังแสดงในรูปที่ 4.15 เนื่องจาก *Nitrobacter* เป็นไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียกลุ่ม Low affinity to nitrite จากการที่พบแบคทีเรียกลุ่มนี้อาจเป็นเหตุผลที่ทำให้ค่า K_s และค่า q_{max} ของถังปฏิกรณ์ A ($K_s = 1.34 \pm 0.80$ mg-N/l, $q_{max} = 0.0086 \pm 0.0009$ mg-N/mgMLVSS.hr) มีค่าสูงกว่าถังปฏิกรณ์ B ($K_s = 2.57 \pm 1.00$ mg-N/l,

$q_{\max} = 0.048 \pm 0.0045$ mg-N/mgMLVSS.hr) อย่างไรก็ตามก็ดียังมีบางจุดที่ไม่สามารถพบ *Nitrobacter* ได้ดังรูปที่ 4.15 (ข) และ (ค)

เช่นเดียวกับไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียชนิด *Nitrospira* การที่ probe Nit3 ซึ่งเป็น probe ที่ใช้วิเคราะห์ไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียชนิด *Nitrobacter* ซ้อนทับกับ probe ของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Nso 190) อาจมีความเป็นไปได้ว่า probe Nso190 อาจถูกล้างออกไม่หมดทำให้เห็นสัญญาณของ probe ดังกล่าวบางส่วนติดทับกับ probe Nit3 ซึ่งมีสีแดง ทำให้เห็นเป็นจุดสีเหลือง หรืออาจมีความเป็นไปได้เช่นกันว่ากลุ่มประชากรทั้ง 2 ชนิดอาจอาศัยอยู่ซ้อนกันจนสัญญาณ fluorescence แบ่งแยกได้ไม่ชัดเจน



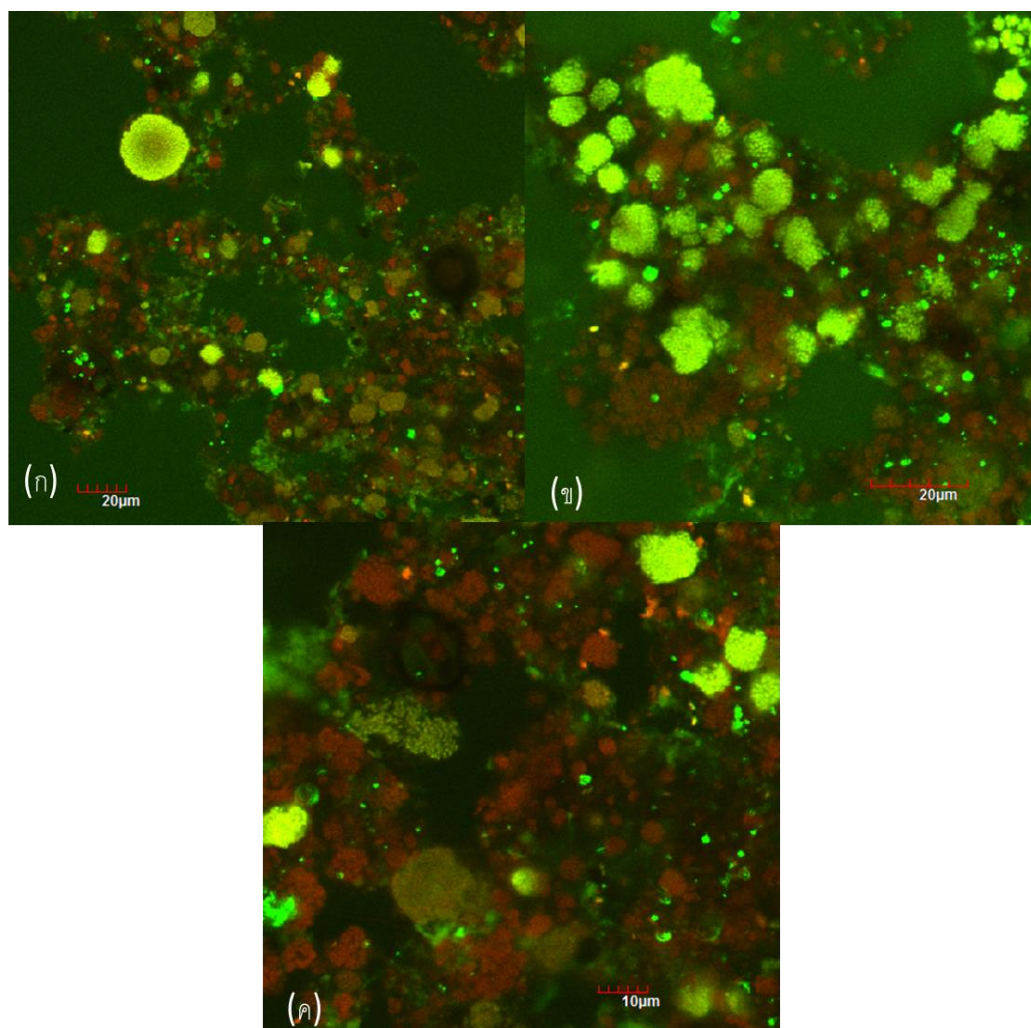
รูปที่ 4.15 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 1 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Nit3 (*Nitrobacter*) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว) ส่วนที่เป็นสีเหลือง-ส้มแสดงให้เห็นถึงจุดที่ทั้ง 2 probe ซ้อนทับกัน

4.1.3.2 การศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ของถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/l)

จากการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ของถังปฏิกรณ์ B โดยใช้เทคนิค FISH ผลที่ได้เป็นดังต่อไปนี้จากการใช้ probe Nso190 (Labeled Alexa488-Green) ซึ่งเป็น probe ที่ใช้ศึกษาแบคทีเรียกลุ่มแอมโมเนียออกไซด์ซึ่งใน Betaproteobacteria ซึ่งครอบคลุมแบคทีเรียกลุ่มแอมโมเนียออกไซด์ซึ่งเกือบทั้งหมด และ probe EUB338 (Labeled Cy3-Red) ซึ่งครอบคลุมแบคทีเรียทั้งหมด (universal bacteria) ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.16

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าจากการเดินระบบถังปฏิกรณ์ B ซึ่งป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/l กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ในระบบเป็นแอมโมเนียออกไซด์ซึ่งแบคทีเรียซึ่งแสดงจากการที่มีบริเวณที่ probe ทั้ง 2 ชนิดมีการซ้อนทับกันอยู่เป็นจำนวนมาก ทำให้สามารถสรุปได้ว่าถังปฏิกรณ์ B สามารถคัดเลือกกลุ่มประชากรแอมโมเนียออกไซด์ซึ่งแบคทีเรียได้สำเร็จ

อย่างไรก็ดีในถังปฏิกรณ์ B มีลักษณะฟล็อกที่เล็กกว่าถังปฏิกรณ์ A รวมทั้งความหนาแน่นของฟล็อกจุลินทรีย์โดยรวมนั้นก็น้อยกว่าถังปฏิกรณ์ A สาเหตุอาจเนื่องมาจากปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ใช้ในระบบมีค่าแตกต่างกันอย่างชัดเจนการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ B จึงน้อยกว่าถังปฏิกรณ์ A โดยผลที่ได้สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.16

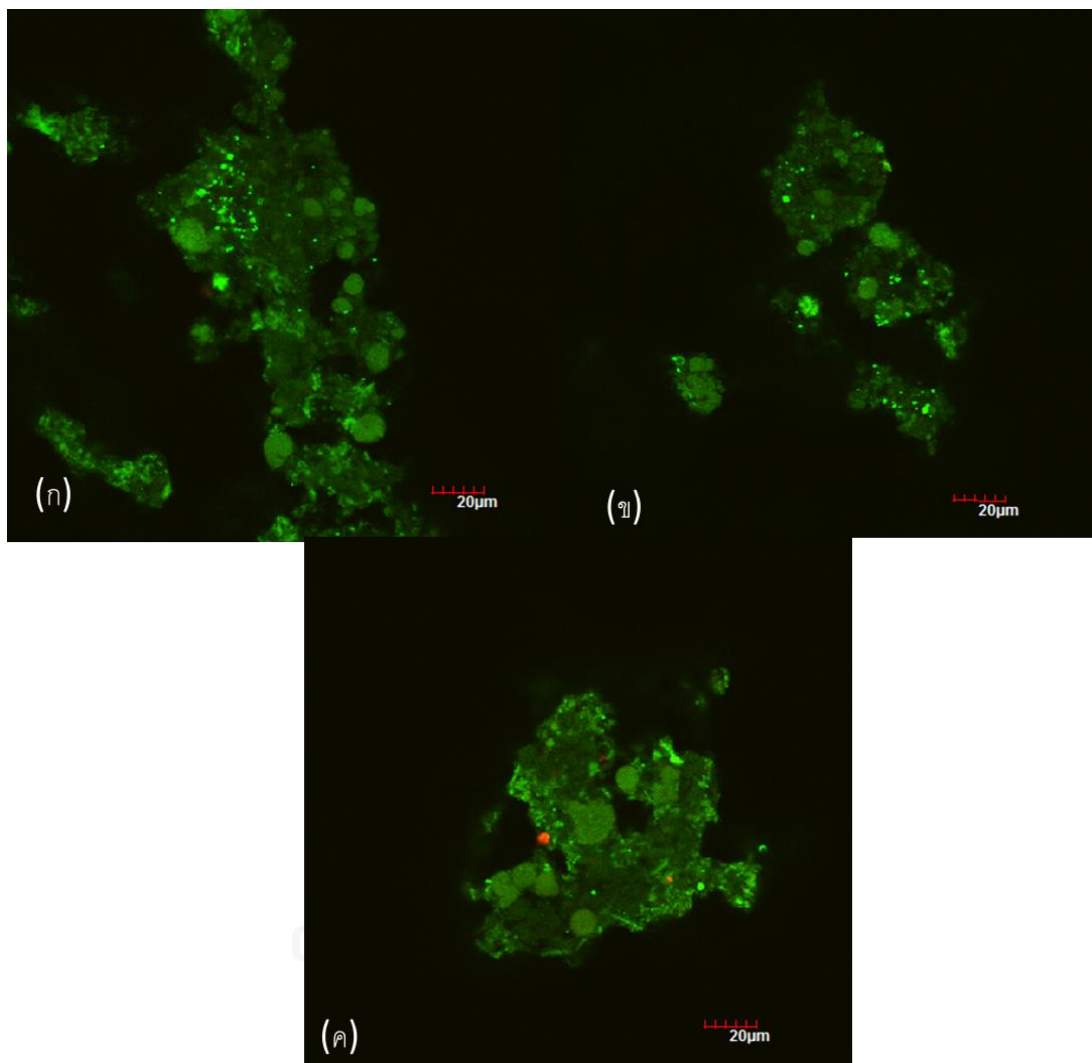


รูปที่ 4.16 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L) ในการทดลองช่วงที่ 1 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe EUB338 (universal bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว) ส่วนที่เป็นสีเหลือง-ส้มแสดงให้เห็นถึงจุดที่ทั้ง 2 probe ซ้อนทับกัน

เมื่อทราบว่าประชากรส่วนใหญ่ภายในระบบคือ แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียแล้ว ขั้นตอนต่อไปจึงใช้ probe Nse1472 (Labeled Cy3-Red) ซึ่งเป็น probe ที่จำเพาะต่อแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย ชนิด *Nitrosomonas europaea* ซึ่งเป็นตัวแทนที่สำคัญของกลุ่ม Low affinity to ammonia ร่วมกับ probe Nso190 (Labeled Alexa488-Green) ซึ่งเป็น probe แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียใน Betaproteobacteria

จากรูปที่ 4.17 แสดงให้เห็นว่าไม่ตรวจพบแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียชนิด *Nitrosomonas europaea* ในระบบถังปฏิกรณ์ B ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทดลองศึกษาพารามิเตอร์ทาง

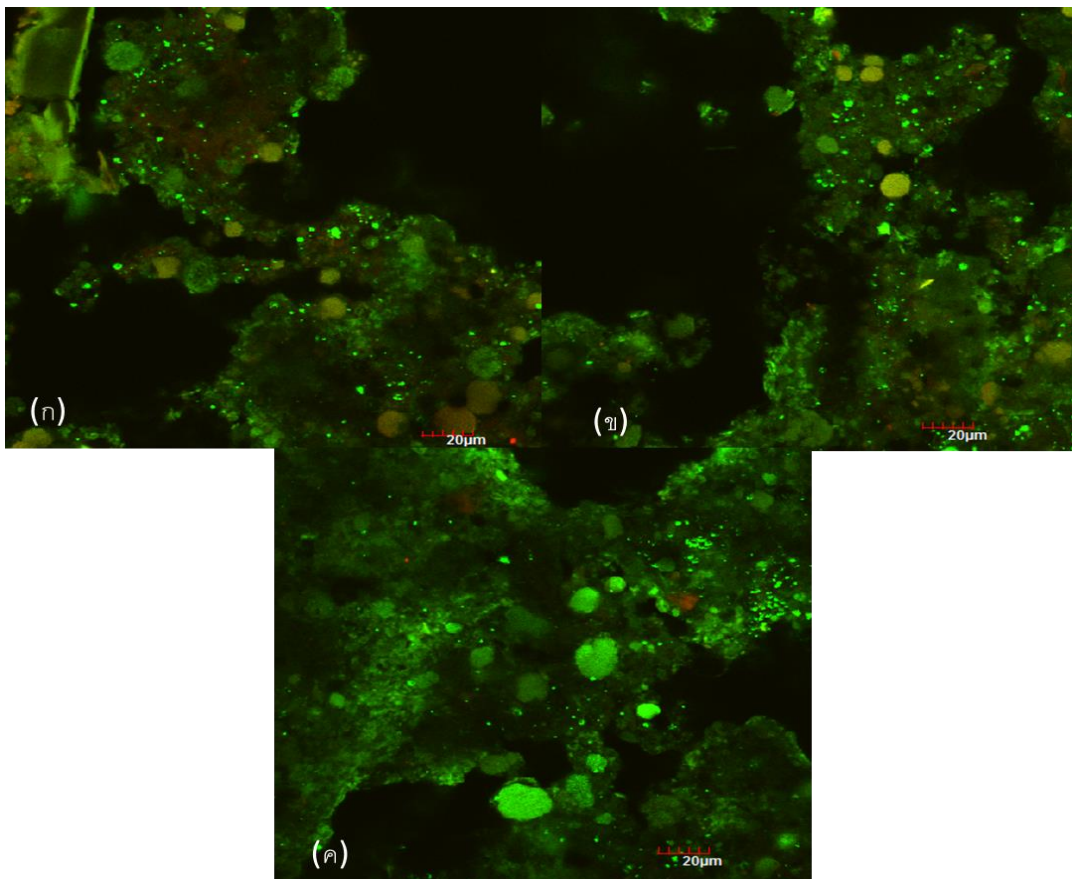
จลนพลศาสตร์ซึ่งพบว่าค่า K_s ของแอมโมเนียมีค่าค่อนข้างต่ำ ($K_s = 1.19 \pm 0.47$ mg-N/L) จึงเป็น
 ดังที่คาดการณ์ไว้ว่าจะไม่มีจุลินทรีย์ประเภท Low affinity to ammonia อยู่ในระบบ



รูปที่ 4.17 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถึงปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L) ในการทดลองช่วงที่ 1
 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Nse1472 (*Nitrosomonas europaea*) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3
 (สีแดง) และ probe Nso190 (Ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Fluor 488
 (สีเขียว) ส่วนที่เป็นสีเหลือง-ส้มแสดงให้เห็นถึงจุดที่ทั้ง 2 probe ซ้อนทับกัน

หลังจากที่ทำการสำรวจจากกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ชนิด Low affinity to ammonia แล้วขั้น
 ต่อมาจึงใช้ probe Cluster6a192 (Labeled Cy3-Red) ซึ่งเป็น probe ตัวแทนของกลุ่ม High
 affinity to ammonia ซึ่งเฉพาะเจาะจงต่อชนิด *Nitrosomonas oligotropha* lineage โดยใช้
 ร่วมกับ probe Nso190 ซึ่งเป็น probe แอมโมเนียออกซิไดส์ซึ่งแบคทีเรียใน Betaproteobacteria

จากรูปที่ 4.18 แสดงให้เห็นถึงการมีอยู่ของแบคทีเรียชนิด *Nitrosomonas oligotropha* lineage ซึ่งมีจำนวนพอสมควรเมื่อพิจารณาจากบริเวณที่มีการซ้อนทับกันของ probe (บริเวณที่มีสีเหลือง - ส้ม) และบริเวณที่มีสีเขียว ซึ่งสอดคล้องกับผลทางจุลชีววิทยาที่ได้ทำการวิเคราะห์ไว้ก่อนหน้านี้ซึ่งค่า K_s มีค่าค่อนข้างต่ำ ($K_s = 1.19 \pm 0.47$ mg-N/l) จึงเป็นที่คาดการณ์ว่าน่าจะพบแบคทีเรียกลุ่ม High affinity to ammonia ในระบบอย่างไรก็ดียังมีบางพื้นที่ที่ไม่พบเจอแบคทีเรียชนิด *Nitrosomonas oligotropha* lineage ดังรูปที่ 4.18 (ค) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่านอกจากชนิดดังกล่าวแล้วอาจมีจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งประเภท High affinity to ammonia กลุ่มอื่นๆ ปะปนอยู่ เช่น ชนิด *Nitrosospira*, *Nitrosomonas marina* และอื่นๆ

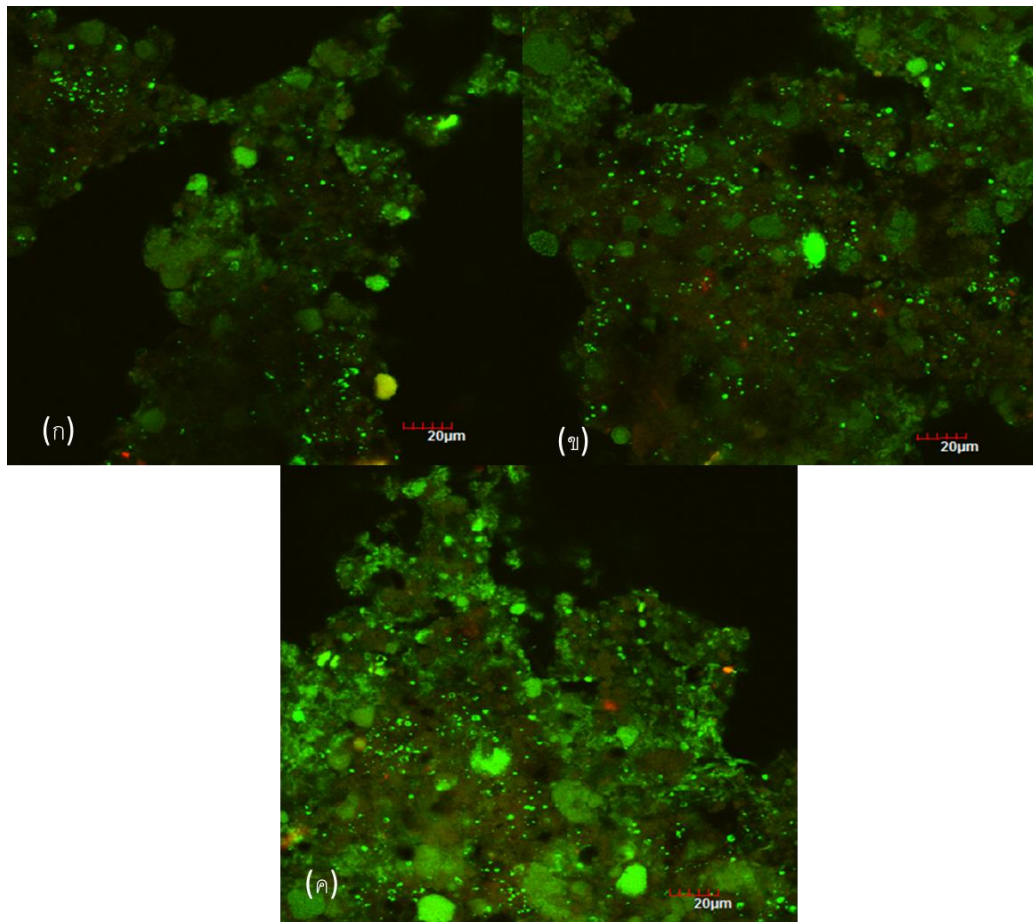


รูปที่ 4.18 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/l) ในช่วงการทดลองที่ 1 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Cluster6a192 (*Nitrosomonas oligotropha* lineage) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว) ส่วนที่เป็นสีเหลือง-ส้มแสดงให้เห็นถึงจุดที่ทั้ง 2 probe ซ้อนทับกัน หลังจากทำการวิเคราะห์แบคทีเรียกลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งแล้ว ขั้นตอนต่อไปเราจึงทำการวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซ์ โดยตอนแรกจะวิเคราะห์ชนิด *Nitrosospira*

ซึ่งเป็นกลุ่ม High affinity to nitrite โดยใช้ probe Ntspa662 (*Nitrospira*) โดย label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) ร่วมกับกับ probe Nso190 ซึ่งเป็น probe แอมโมเนียออกซิไดซึ่งแบคทีเรียใน Betaproteobacteria

จากรูปที่ 4.19 แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซึ่งประเภท High affinity to nitrite สามารถพบเจอได้ยากมากในถังปฏิกรณ์ B สาเหตุอาจเนื่องมาจากการที่ความเข้มข้นของไนโตรที่ในระบบ มีค่าที่ต่ำอยู่ตลอดเวลาทำให้จุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซึ่งมีปริมาณน้อยมาก อย่างไรก็ตามจากผลการดำเนินการถังปฏิกรณ์ B ทำให้เราสามารถยืนยันถึงการมีอยู่ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซึ่งได้อย่างแน่นอนซึ่งสอดคล้องกับผลทางจุลชีววิทยาที่คาดว่าจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซึ่งจะเป็นประเภท High affinity to nitrite เนื่องจากค่า K_s มีค่าค่อนข้างต่ำ ($K_s = 1.34 \pm 0.80$ mg-N/l)

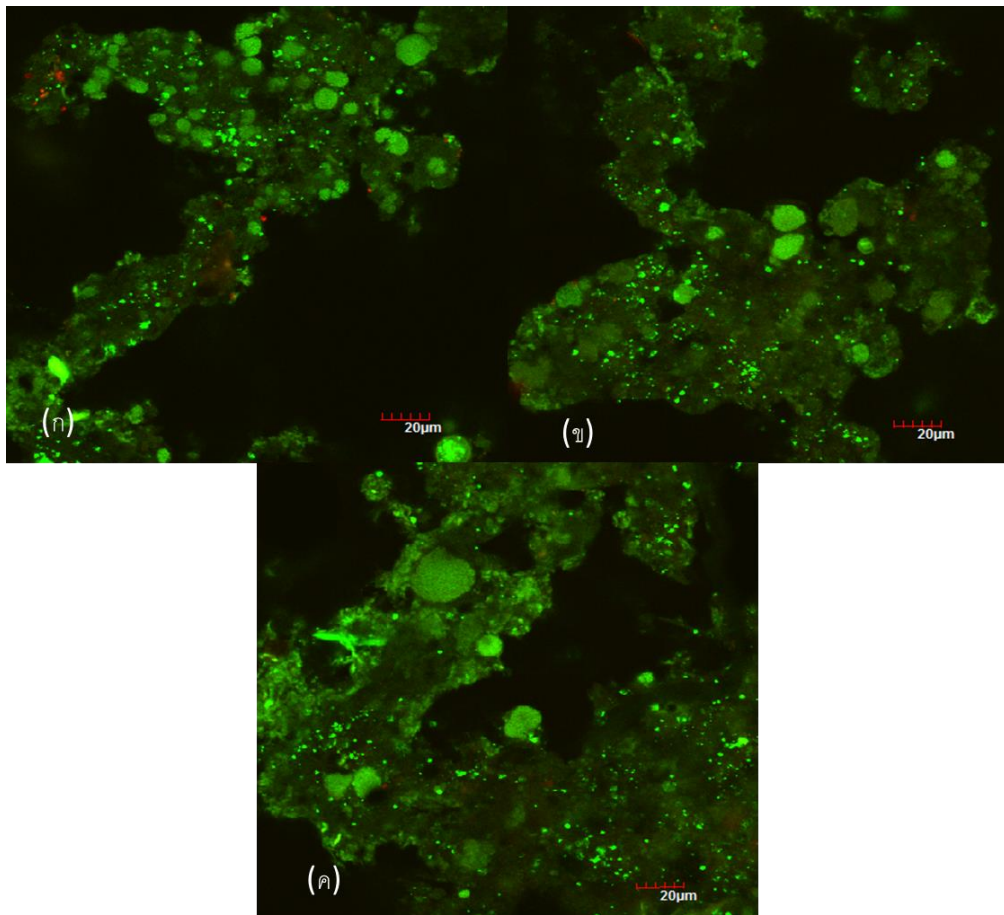




รูปที่ 4.19 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L) ในช่วงการทดลองที่ 1 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Ntspa662 (*Nitrospira*) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว) ส่วนที่เป็นสีเหลือง-ส้มแสดงให้เห็นถึงจุดที่ทั้ง 2 probe ซ้อนทับกัน

หลังจากทำการศึกษาแบคทีเรียชนิด *Nitrospira* ซึ่งเป็นไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียกลุ่ม High affinity to nitrite แล้วขั้นต่อไปจึงทำการศึกษาไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียกลุ่ม Low affinity to nitrite ซึ่งได้แก่ชนิด *Nitrobacter*

จากรูปที่ 4.20 แสดงให้เห็นว่าในระบบถังปฏิกรณ์ B ไม่สามารถตรวจพบเจอไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียชนิด *Nitrobacter* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Low affinity to nitrite ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ ทางจลนพลศาสตร์ที่คาดการณ์ว่าในระบบน่าจะมีแบคทีเรียไนโตรทออกซิไดซิงกลุ่ม High affinity to nitrite เป็นหลักมากกว่ากลุ่ม Low affinity to nitrite เนื่องจากในระบบมีค่า K_s ของไนโตรทก่อนข้างต่ำ ($K_s = 1.34 \pm 0.80$ mg-N/L)



รูปที่ 4.20 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 1 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Nit3 (*Nitrobacter*) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว) ส่วนที่เป็นสีเหลือง-ส้มแสดงให้เห็นถึงจุดที่ทั้ง 2 probe ซ้อนทับกัน

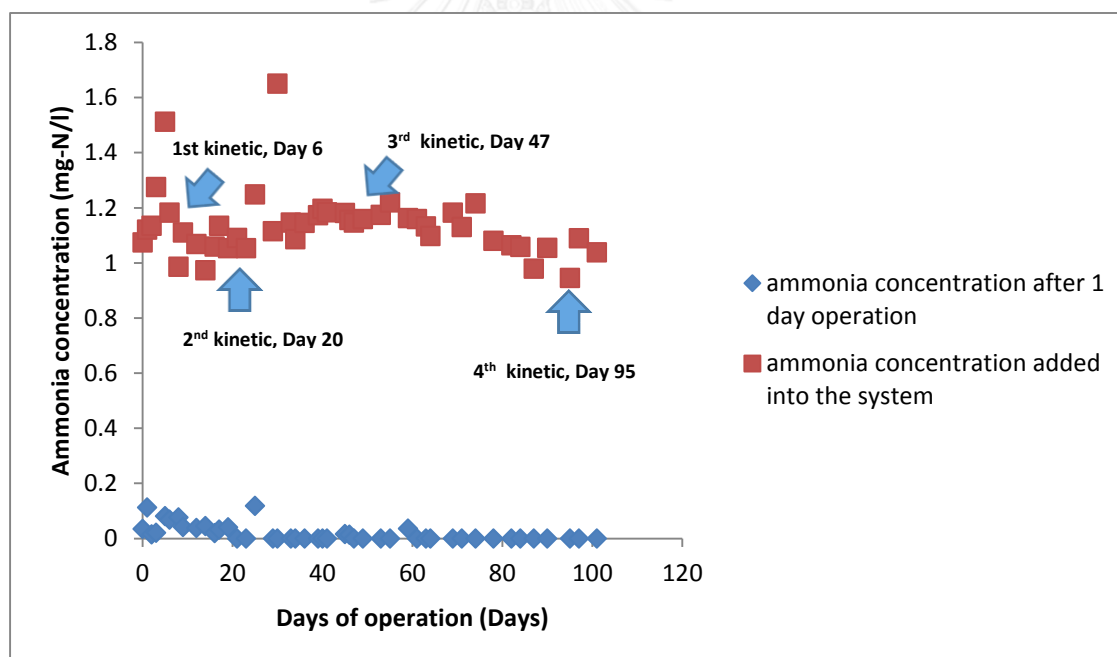
4.2 การทดลองช่วงที่ 2 ถึงปฏิกรณ์ A และ B ซึ่งป้อนด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/L และ 50 mg-N/L

4.2.1 ผลการดำเนินการถึงปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) และ ถึงปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L)

4.2.1.1 การดำเนินการถึงปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L)

ภายหลังจากทำการลดความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ป้อนเข้าสู่ถึงปฏิกรณ์ A จาก 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L และทำการเดินระบบเป็นระยะเวลา 101 วัน ผลการวิเคราะห์ค่า แอมโมเนีย ไนเตรท และไนเตรทของถึงปฏิกรณ์ A ในการทดลองช่วงที่ 2

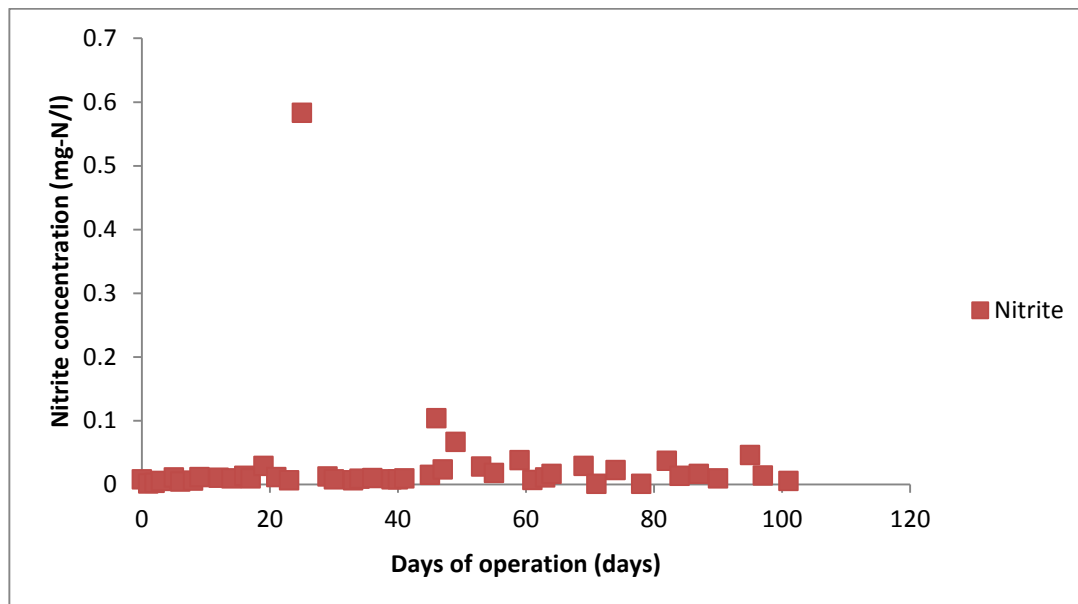
หลังจากทำการทดลองพบว่าค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียที่เติมลงไปในถึงปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) ในช่วงการทดลองที่ 2 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.14 ± 0.12 mg-N/L ในขณะที่ค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียหลังจากผ่านการบำบัดไปแล้ว 1 วันมีค่าเท่ากับ 0.017 ± 0.030 mg-N/L ดังแสดงในรูปที่ 4.21 แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงยังคงทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ แม้ว่าจะทำการสลับความเข้มข้นในการเลี้ยงจาก 50 mg-N/L มาเป็น 1 mg-N/L



รูปที่ 4.21 ความเข้มข้นของแอมโมเนียในถึงปฏิกรณ์ A เมื่อสลับความเข้มข้นแอมโมเนีย จาก 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L

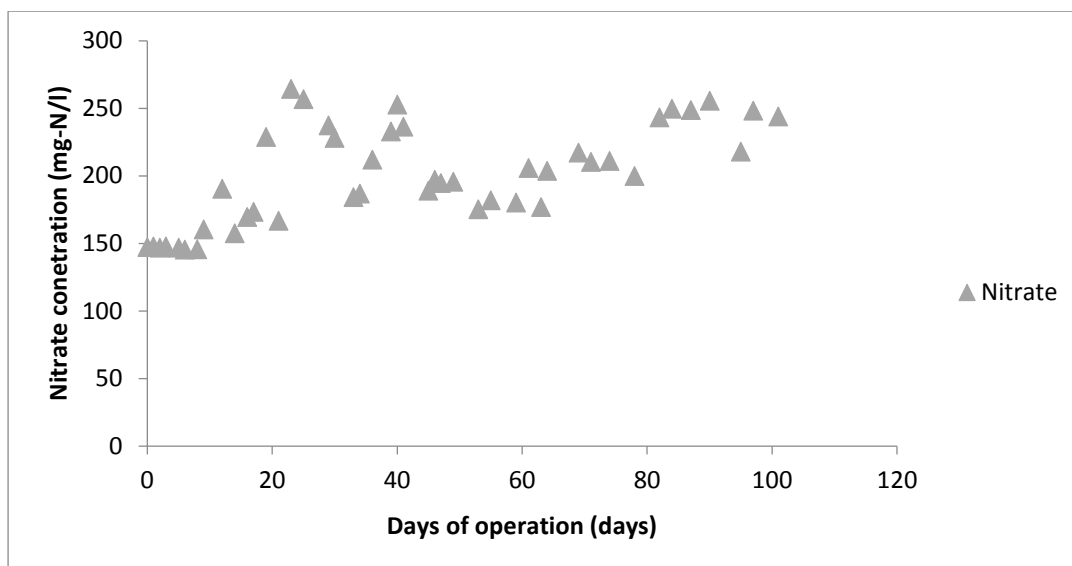
ค่าความเข้มข้นของไนเตรทของถึงปฏิกรณ์ A ในการทดลองช่วงที่ 2 เมื่อสลับความเข้มข้นจาก 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L โดยค่าไนเตรทในระบบมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.029 ± 0.086 mg-N/L ดัง

แสดงในรูปที่ 4.22 แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซึ่งยังคงสามารถทำงานได้อย่างปกติ ยกเว้นวันที่ 25 ที่ไนโตรมีค่าสูงผิดปกติ (0.58 mg-N/l) เพียงวันเดียว



รูปที่ 4.22 ความเข้มข้นของไนโตรที่ในถังปฏิกรณ์ A เมื่อสลับความเข้มข้นแอมโมเนีย จาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l

ค่าความเข้มข้นของไนโตรในระบบถังปฏิกรณ์ A เมื่อสลับความเข้มข้นจาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l ในช่วงการทดลองที่ 2 โดยค่าไนโตรเริ่มต้นในช่วงการทดลองที่ 2 อยู่ที่ 147 mg-N/l จากนั้นไนโตรมีค่าเพิ่มสูงขึ้นจนในวันสุดท้ายของการเดินระบบค่าไนโตรสะสมอยู่ที่ 243 mg-N/l ทั้งนี้อาจมีบางช่วงที่ค่าไนโตรพุ่งสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีการเปลี่ยนหัวกระจายอากาศชนิดใหม่ ซึ่งมีอัตราการปล่อยฟองที่สูงทำให้น้ำในถังมีการระเหยเร็วกว่าปกติ และปริมาณน้ำในระบบลดน้อยลง ส่งผลให้ค่าไนโตรเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในบางช่วงโดยที่ค่าความเข้มข้นไนโตรสามารถแสดงดังรูปที่ 4.23 และค่าพารามิเตอร์ทั้งหมดของถังปฏิกรณ์ A ในช่วงการทดลองที่ 2 สามารถแสดงได้ดังตารางที่ 4.3 โดยได้ทำการนำตัวอย่างมาใช้ในการทดลองจลนพลศาสตร์ในวันที่ 6, 20, 47 และ 95 ของการทดลองช่วงที่ 2



รูปที่ 4.23 ความเข้มข้นของไนเตรทในถังปฏิกรณ์ A เมื่อสลับความเข้มข้นแอมโมเนีย จาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l

ตารางที่ 4.3 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องของถังปฏิกรณ์ A ในการทดลองช่วงที่ 2 เมื่อสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l

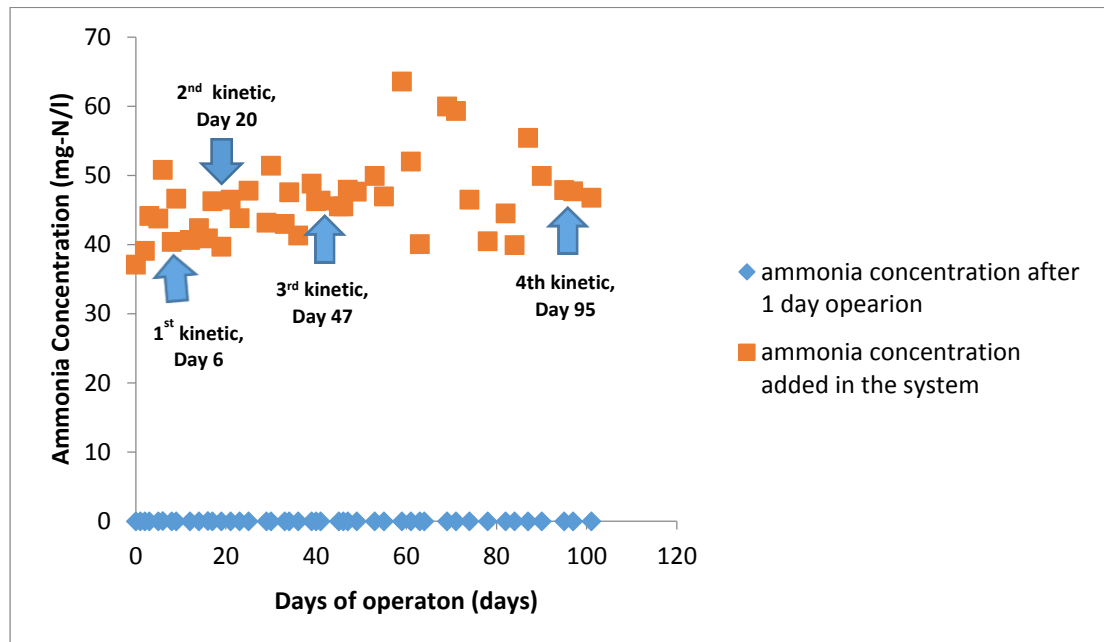
พารามิเตอร์	ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
pH เริ่มต้นเมื่อเติมแอมโมเนีย	7.56 \pm 0.17
pH หลังจากการเติมแอมโมเนีย 1 วัน	7.03 \pm 0.24
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	29.02 \pm 1.41
ค่าการละลายออกซิเจน (mgO ₂ /l)	7.61 \pm 0.36
ค่าความเค็ม (ppt)	13.23 \pm 1.89

4.2.1.2 การดำเนินการถังปฏิกรณ์ถึงปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l)

หลังจากทำการเพิ่มความเข้มข้นแอมโมเนียที่ป้อนเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ B จาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l แล้วทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 101 วัน และทำการวิเคราะห์ค่าแอมโมเนีย ไนโตรทและ ไนเตรทของถังปฏิกรณ์ B เช่นเดียวกับถังปฏิกรณ์ A ผลที่ได้เป็นไปดังนี้

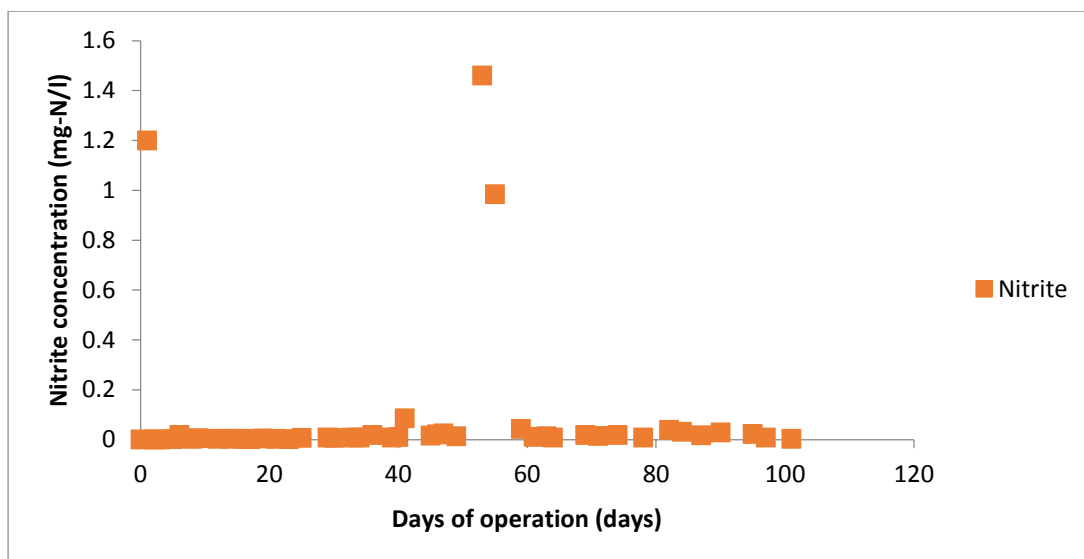
ค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียที่เติมลงไปในถังปฏิกรณ์ B ในการทดลองช่วงที่ 2 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 46.43 \pm 5.64 mg-N/l และค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียหลังจากผ่านการบำบัดไปแล้ว 1 วัน มีค่าเท่ากับ 0.002 \pm 0.005 mg-N/l ดังแสดงในรูปที่ 4.24 แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์กลุ่ม

แอมโมเนียออกไซด์ซึ่งยังคงทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพแม้ว่าจะทำการสลับความเข้มข้นในการเลี้ยง จาก 1 mg-N/l มาเป็น 50 mg-N/l



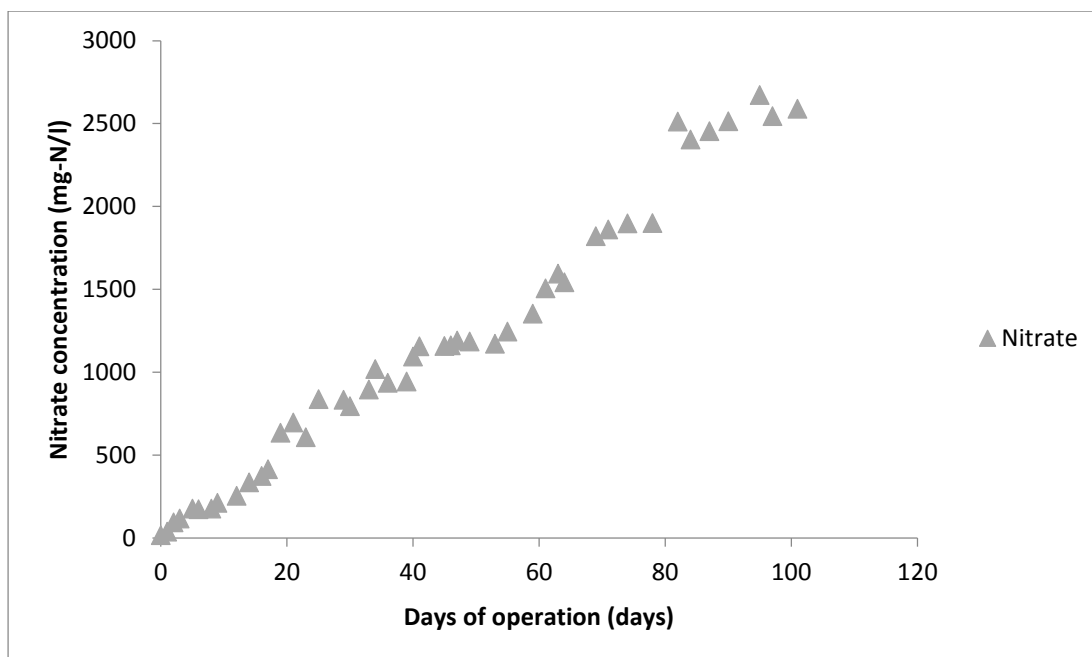
รูปที่ 4.24 ความเข้มข้นของแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ B เมื่อสลับความเข้มข้นแอมโมเนีย จาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l

ค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนในระบบถังปฏิกรณ์ B ในช่วงการทดลองที่ 2 เมื่อสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l โดยค่าไนโตรเจนเฉลี่ยในระบบอยู่ที่ 0.09 ± 0.31 mg-N/l อย่างไรก็ดี ในวันที่ 2 หลังจากการสลับความเข้มข้นของแอมโมเนียในการเลี้ยง ค่าไนโตรเจนภายในระบบอยู่ที่ 1.2 mg-N/l ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความไม่เสถียรของการบำบัดไนโตรเจนในช่วงแรก แต่หลังจากนั้นจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรเจนออกไซด์ซึ่งก็สามารถทำการบำบัดไนโตรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับช่วงการทดลองแรก ถึงแม้ว่าในวันที่ 53 และ 55 ค่าไนโตรเจนจะขึ้นสูงอยู่ที่ 1.46 และ 0.98 mg-N/l ตามลำดับแต่โดยรวมแล้วจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรเจนออกไซด์ซึ่งสามารถทำงานได้อย่างปกติ ดังแสดงในรูปที่ 4.25



รูปที่ 4.25 ความเข้มข้นของไนไตรท์ในถังปฏิกรณ์ B เมื่อสลับความเข้มข้นแอมโมเนีย จาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l

ค่าความเข้มข้นของไนเตรทในระบบถังปฏิกรณ์ B ตลอดการทดลองช่วงที่ 2 เริ่มต้นช่วงการทดลองที่ 2 ไนเตรทในระบบมีค่าประมาณ 16.81 mg-N/l และมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตลอดการเดินระบบและมีค่า 2,590 mg-N/l ในวันสุดท้ายที่ทำการทดลอง แสดงให้เห็นว่ากระบวนการไนตริฟิเคชัน ได้เกิดขึ้นได้ค่อนข้างสมบูรณ์ภายในระบบ โดยที่ผลความเข้มข้นไนเตรทสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.26 และค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ pH อุณหภูมิ ค่าการละลายออกซิเจนและค่าความเค็มของถังปฏิกรณ์ B ในการทดลองช่วงที่ 2 สามารถแสดงได้ดังตารางที่ 4.4 โดยได้ทำการนำตัวอย่างมาใช้ในการทดลองจลนพลศาสตร์ในวันที่ 6, 20, 47 และ 95 ของการทดลองช่วงที่ 2



รูปที่ 4.26 ความเข้มข้นของไนเตรทในถังปฏิกรณ์ B เมื่อสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l

ตารางที่ 4.4 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการทดลองช่วงที่ 2 ของถังปฏิกรณ์ B เมื่อสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l

พารามิเตอร์	ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
pH	7.86 \pm 0.18
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	29.02 \pm 1.41
ค่าการละลายออกซิเจน (mgO ₂ /l)	7.26 \pm 0.48
ค่าความเค็ม (ppt)	17.51 \pm 2.18

4.2.2 จลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l) และ ถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l)

ในระหว่างการทดลองช่วงที่ 2 ภายหลังจากทำการสลับความเข้มข้นของแอมโมเนียทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์ ได้มีการนำจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์มาทำการวิเคราะห์พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์รวมทั้ง 4 ครั้งในช่วงวันที่ 6, 20, 47 และ 95 หลังจากการสลับความเข้มข้น ผลที่ได้เป็นไปดังนี้

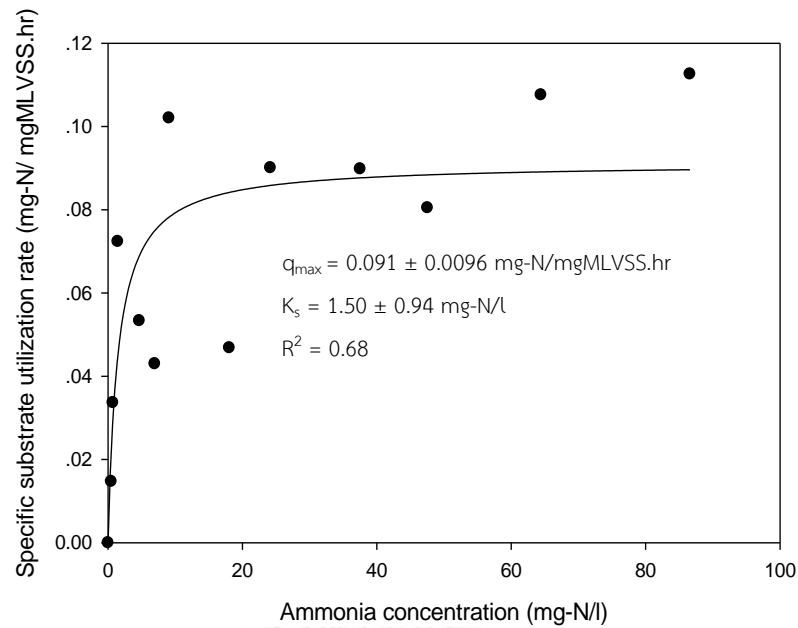
4.2.2.1 จลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่ง

ภายหลังจากการสลับความเข้มข้นแอมโมเนียเป็นเวลา 6 วันผลของพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์เป็นไปดังนี้

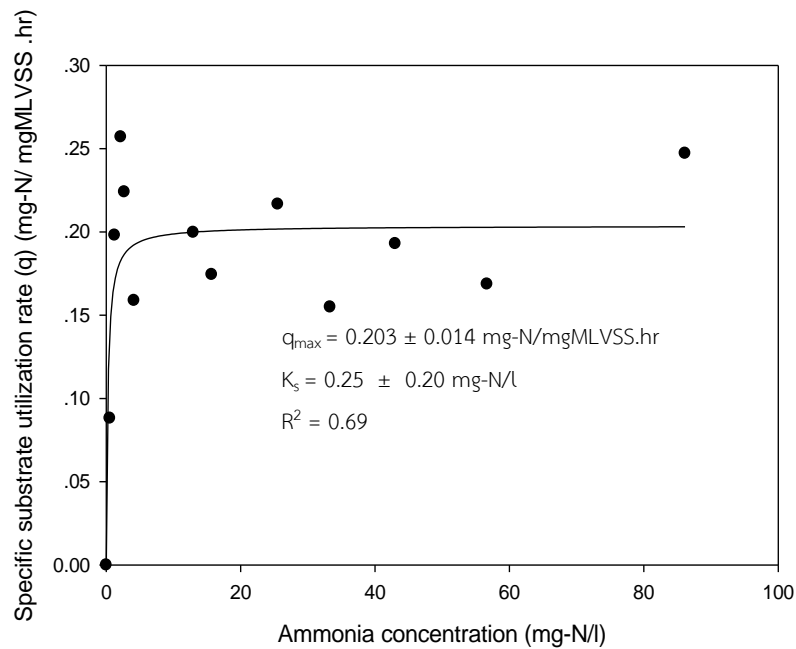
การเปลี่ยนแปลงทางจลนพลศาสตร์ของถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L โดยค่า q_{max} มีค่าเท่ากับ 0.091 ± 0.0096 mg-N/mgMLVSS.hr และค่า K_s มีค่าเท่ากับ 0.203 ± 0.0014 mg-N/L เมื่อเปรียบเทียบกับผลจากการทดลองช่วงที่ 1 ($q_{max} = 0.128 \pm 0.018$ mg-N/mgMLVSS.hr, $K_s = 8.79 \pm 3.82$ mg-N/L) ค่า q_{max} มีค่าไม่แตกต่างจากการทดลองช่วงแรกมากนักในขณะที่ค่า K_s มีค่าลดลงอย่างชัดเจน สาเหตุคาดว่าเนื่องมาจากจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซิ่งกลุ่ม High affinity to ammonia มีแนวโน้มที่จะเพิ่มจำนวนขึ้นเนื่องจากความเข้มข้นของแอมโมเนียในระบบลดลงส่งผลให้ค่า K_s ของระบบลดลง

ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ B ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/L เป็น 50 mg-N/L ค่า q_{max} มีค่าเท่ากับ 0.203 ± 0.014 mg-N/mgMLVSS.hr และมีค่า K_s เท่ากับ 0.25 ± 0.20 mg-N/L เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองช่วงที่ 1 ($q_{max} = 0.0089$ mg-N/mgMLVSS.hr, $K_s = 1.19 \pm 0.47$ mg-N/L) ค่า q_{max} มีค่าสูงขึ้นอย่างชัดเจนอันเนื่องมาจากผลของการสลับความเข้มข้นจากต่ำไปสูง อย่างไรก็ตามจากค่า K_s แสดงให้เห็นว่าอาจยังไม่มี การเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ภายในระบบมากนักเนื่องจากค่า K_s ยังคงอยู่ในช่วงของกลุ่ม High affinity to ammonia ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่าเนื่องจากระบบที่ใช้เป็นระบบแบบที่ละเท ซึ่งมีช่วงระยะเวลาที่ความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำ จึงอาจส่งผลให้จุลินทรีย์กลุ่ม High affinity to ammonia ยังคงสามารถอาศัยอยู่ในระบบได้ อีกทั้งแม้ว่ากลุ่ม Low affinity to ammonia จะมีแนวโน้มที่จะเจริญเติบโตได้ดีในสถานะที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียสูง แต่เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่งโดยทั่วไป เป็นแบคทีเรียชนิด autotroph ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตนั้นค่อนข้างต่ำ ทำให้จุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวอาจไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้มากพอที่จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าจลนพลศาสตร์

โดยกราฟ Monod จุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่งของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) และถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L) ภายหลังจากการสลับความเข้มข้นเป็นเวลา 6 วันสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.27 และ 4.28 ตามลำดับ



รูปที่ 4.27 กราฟอัตราการใช้ออมโมเนียจำเพาะ (q) และความเข้มข้นอมโมเนียเริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับความเข้มข้นอมโมเนียจาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l เป็นเวลา 6 วัน



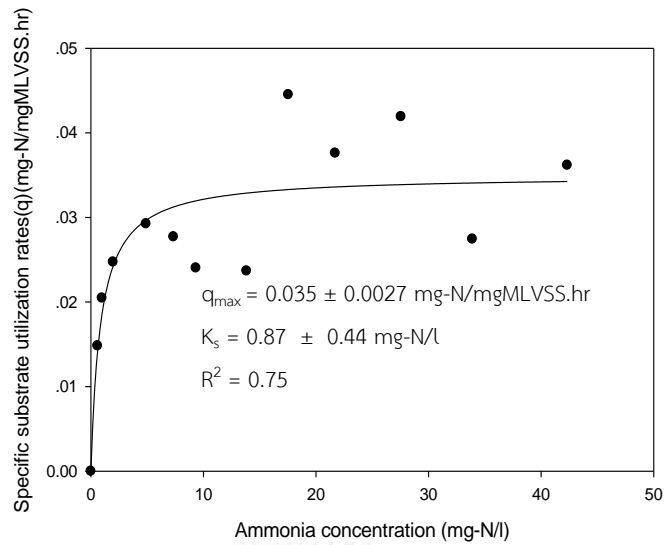
รูปที่ 4.28 กราฟอัตราการใช้ออมโมเนียจำเพาะ (q) และความเข้มข้นอมโมเนียเริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ B ภายหลังจากสลับความเข้มข้นอมโมเนียจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l เป็นเวลา 6 วัน

จากนั้นได้ทำการศึกษาพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ในช่วงที่ 2 ในวันที่ 20 หลังจากการสลับความเข้มข้นของแอมโมเนียในถัง 2 ถึงปฏิกรณ์ผลที่ได้เป็นไปดังนี้

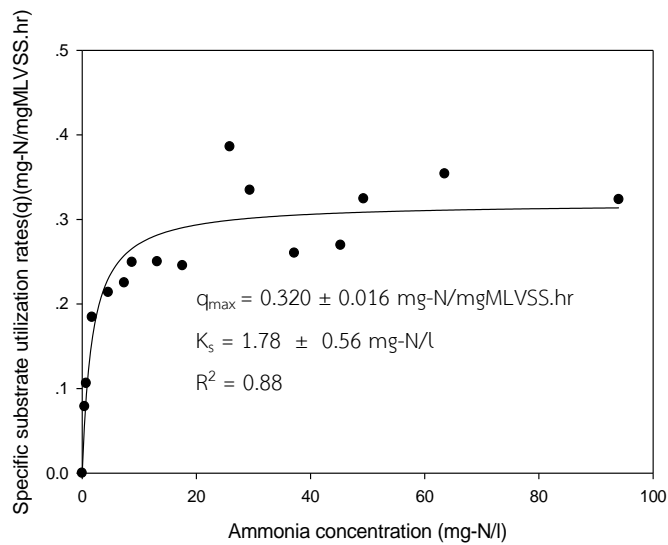
หลังจากทำการสลับความเข้มข้นของแอมโมเนียได้ 20 วันค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของถังปฏิกรณ์ A (สลับจาก 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L) ค่า q_{max} ของถังปฏิกรณ์ A เท่ากับ 0.035 ± 0.0027 mg-N/mgMLVSS.hr ในขณะที่ค่า K_s มีค่าเท่ากับ 0.87 ± 0.44 mg-N/L ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองทางจลนพลศาสตร์ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียเป็นเวลา 6 วัน จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าระบบของถังปฏิกรณ์ A ได้มีการเปลี่ยนกลุ่มประชากรอย่างชัดเจน โดยกลุ่ม Low affinity to ammonia คาดว่าน่าจะมีจำนวนน้อยลงไปในระบบอันเนื่องมาจาก ความเข้มข้นของแอมโมเนียที่จำกัด ในขณะที่กลุ่ม High affinity to ammonia มีแนวโน้มที่จะเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น

ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ B (สลับจาก 1 mg-N/L เป็น 50 mg-N/L) ค่า q_{max} ของถังปฏิกรณ์ B เท่ากับ 0.320 ± 0.016 mg-N/mgMLVSS.hr ในขณะที่ค่า K_s มีค่าเท่ากับ 1.78 ± 0.56 mg-N/L ซึ่งยังคงมีค่าใกล้เคียงกับการทดลองในช่วง 6 วันภายหลังจากการสลับความเข้มข้นแอมโมเนีย แสดงให้เห็นว่าค่า K_s ที่ได้มาเมื่อเทียบกับการทดลองช่วงที่ 1 ก่อนสลับความเข้มข้นแอมโมเนีย ($K_s = 1.19 \pm 0.47$ mg-N/L) แล้วค่า K_s ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน โดยจากผลการทดลองค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ในช่วงนี้อาจสามารถสรุปได้ว่า กลุ่มประชากรจุลินทรีย์เดิมของถังปฏิกรณ์ A ซึ่งเป็นกลุ่ม High affinity to ammonia เริ่มสามารถปรับตัวให้เข้ากับระบบที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นและสามารถย่อยสลายแอมโมเนียได้รวดเร็วขึ้นดังที่สังเกตได้จากค่า q_{max} และยังคงสามารถอาศัยอยู่ในระบบได้ถึงแม้ว่าจะมีการเติมแอมโมเนียในปริมาณที่สูงขึ้นนอกจากนี้จากผลการทดลองทางจลนพลศาสตร์ยังสามารถสื่อให้เห็นว่า กลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งประเภท Low affinity to ammonia นั้นอาจเจริญเติบโตไม่ทันกลุ่ม High affinity to ammonia ทำให้ค่า K_s ยังคงไม่สูงขึ้นไปกว่าเดิม

โดยกราฟ Monod จุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) และถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L) ภายหลังจากการสลับความเข้มข้นเป็นเวลา 20 วันสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.29 และ 4.30 ตามลำดับ



รูปที่ 4.29 กราฟอัตราการใช้ออมโมเนียจำเพาะ (q) และความเข้มข้นอมโมเนียเริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับความเข้มข้นอมโมเนียจาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l เป็นเวลา 20 วัน



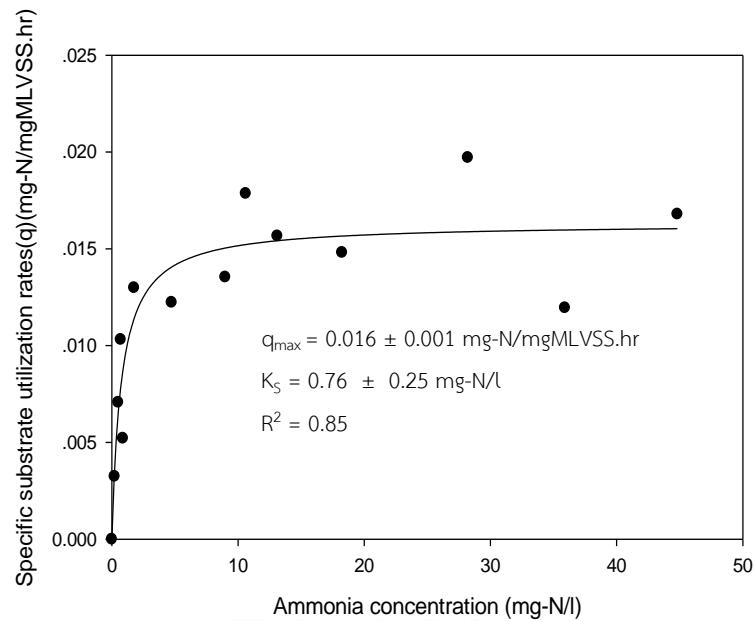
รูปที่ 4.30 กราฟอัตราการใช้ออมโมเนียจำเพาะ (q) และความเข้มข้นอมโมเนียเริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ B ภายหลังจากสลับความเข้มข้นอมโมเนียจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l เป็นเวลา 20 วัน

สำหรับผลการทดลองทางจลนพลศาสตร์ในวันที่ 47 หลังจากการสลับความเข้มข้นอมโมเนีย ผลที่ได้แสดงดังต่อไปนี้

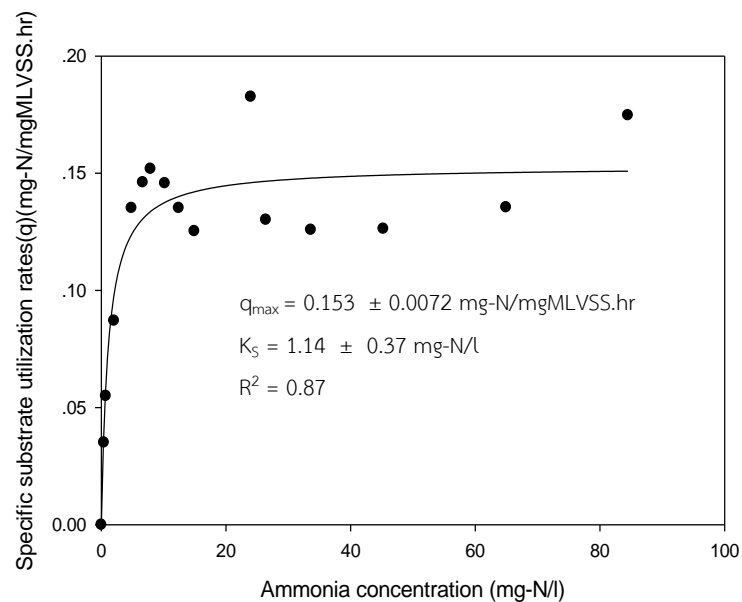
หลังจากที่ได้ทำการวัดพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์หลังจากทำการสลับความเข้มข้นได้ 47 วัน ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของถังปฏิกรณ์ A (สลับจาก 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L) ทั้งค่า q_{max} และค่า K_s เริ่มที่จะคงตัวอยู่ในช่วงค่าที่ต่ำซึ่งแสดงลักษณะของกลุ่ม High affinity to ammonia อย่างชัดเจนมากยิ่งขึ้นโดยค่า q_{max} มีค่าเท่ากับ 0.016 ± 0.001 mg-N/mgMLVSS.hr ในขณะที่ค่า K_s มีค่าเท่ากับ 0.76 ± 0.25 mg-N/L ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนของค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์เมื่อเทียบกับค่าพารามิเตอร์ของถังปฏิกรณ์ A ในช่วงการทดลองที่ 1 ก่อนสลับค่าความเข้มข้นแอมโมเนีย ($q_{max} = 0.128 \pm 0.018$ mg-N/mgMLVSS.hr, $K_s = 8.79 \pm 3.82$ mg-N/L)

ในส่วนของถังปฏิกรณ์ B (สลับจาก 1 mg-N/L เป็น 50 mg-N/L) ค่า q_{max} มีค่าเท่ากับ 0.153 ± 0.0072 mg-N/mgMLVSS.hr ซึ่งลดต่ำลงจากช่วงวันที่ 6 และ 20 ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียซึ่งคือ 0.203 ± 0.014 mg-N/mgMLVSS.hr และ 0.320 ± 0.016 mg-N/mgMLVSS.hr ตามลำดับ อย่างไรก็ตามต้องพึงระลึกไว้ว่าการวิเคราะห์หาค่า q_{max} เทียบกับ MLVSS นั้นรวมทั้งตะกอนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต อีกทั้งยังไม่ได้เจาะจงเฉพาะจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งสำหรับค่า K_s ในการทดลองครั้งที่ 3 ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียได้ 47 วันนั้น มีค่าเท่ากับ 1.14 ± 0.37 mg-N/L ซึ่งยังไม่แตกต่างไปจากครั้งที่ 2 ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนีย 20 วันมากนัก บ่งบอกว่ายังคงเป็นไปได้ว่าอาจยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์แต่อย่างใดแม้ว่าจะผ่านมา 1 เดือนครึ่งแล้วก็ตาม

โดยกราฟ Monod จุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) และถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L) ภายหลังจากการสลับความเข้มข้นเป็นเวลา 47 วันสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.31 และ 4.32 ตามลำดับ



รูปที่ 4.31 กราฟอัตราการใช้ออมโมเนียจำเพาะ (q) และความเข้มข้นอมโมเนียเริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับความเข้มข้นอมโมเนียจาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l เป็นเวลา 47 วัน



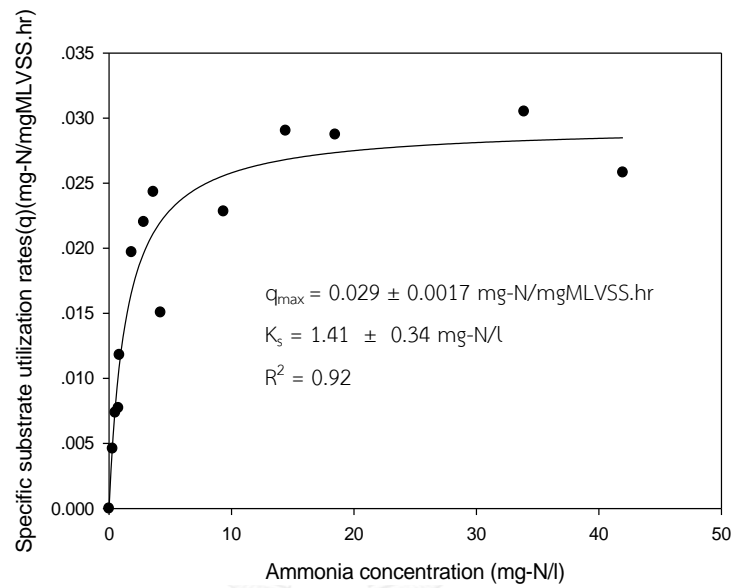
รูปที่ 4.32 กราฟอัตราการใช้ออมโมเนียจำเพาะ (q) และความเข้มข้นอมโมเนียเริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ B ภายหลังจากสลับความเข้มข้นอมโมเนียจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l เป็นเวลา 47 วัน

จากนั้นได้ทำการศึกษาพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ครั้งที่ 4 ต่อในวันที่ 95 ภายหลังจากการสลับความเข้มข้นแอมโมเนียผลที่ได้เป็นไปดังนี้

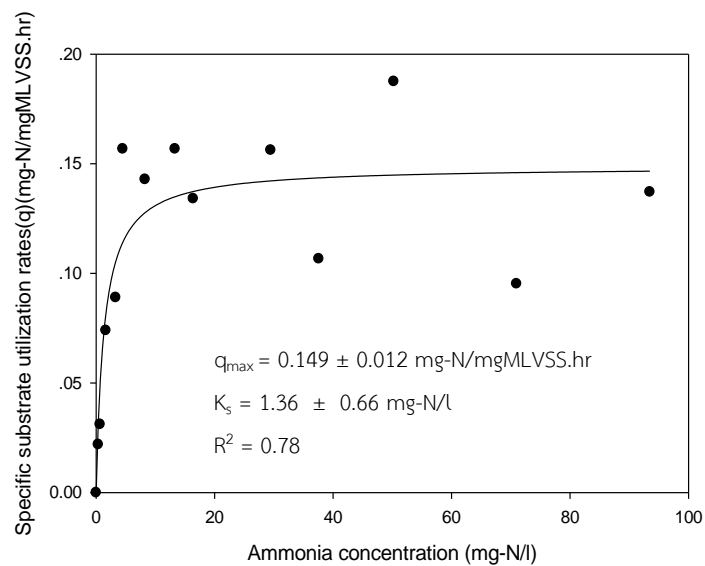
ในการทดลองพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ในครั้งที่ 4 ของการทดลองช่วงที่ 2 ผลของถังปฏิกรณ์ A (สลับจาก 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L) ค่า q_{max} มีค่าเท่ากับ 0.029 ± 0.0017 mg-N/mgMLVSS.hr และค่า K_s มีค่าเท่ากับ 1.41 ± 0.34 mg-N/L โดยรวมแล้วค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ทั้ง 2 ค่าไม่ได้เปลี่ยนแปลงไปมากนักจากการทดลองครั้งที่ 3 ($q_{max} = 0.016 \pm 0.001$ mg-N/mgMLVSS.hr, $K_s = 0.76 \pm 0.25$ mg-N/L) แสดงให้เห็นถึงการที่ระบบเริ่มเข้าสู่สภาวะคงตัว โดยเป็นที่คาดการณ์ว่ากลุ่มจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งกลุ่ม High affinity to ammonia จะเป็นกลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งหลักภายในระบบนี้และคาดว่าภายในระบบถังปฏิกรณ์ A น่าจะมีการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยสมบูรณ์

ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ B (สลับจาก 1 mg-N/L เป็น 50 mg-N/L) ค่า q_{max} มีค่าเท่ากับ 0.149 ± 0.012 mg-N/mgMLVSS.hr ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการทดลองครั้งที่ 3 ($q_{max} = 0.153 \pm 0.0072$ mg-N/mgMLVSS.hr) แสดงให้เห็นว่าอัตราการบำบัดแอมโมเนียเริ่มคงที่และระบบเริ่มมีความเสถียรมากขึ้น ในขณะที่ค่า K_s ของระบบยังคงไม่มีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นโดยมีค่าเท่ากับ 1.36 ± 0.66 mg-N/L ซึ่งค่าดังกล่าวยังคงอยู่ในช่วงของกลุ่มจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ชนิด High affinity to ammonia นั้นอาจหมายความว่าระบบถังปฏิกรณ์ B ยังคงไม่มีการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ในระบบแต่อย่างใด

โดยกราฟ Monod จุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) และถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L) ภายหลังจากการสลับความเข้มข้นเป็นเวลา 95 วันสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.33 และ 4.34 ตามลำดับ



รูปที่ 4.33 กราฟอัตราการใช้อะมโมเนียจำเพาะ (q) และความเข้มข้นอะมโมเนียเริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับความเข้มข้นอะมโมเนียจาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l เป็นเวลา 95 วัน



รูปที่ 4.34 กราฟอัตราการใช้อะมโมเนียจำเพาะ (q) และความเข้มข้นอะมโมเนียเริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ B ภายหลังจากสลับความเข้มข้นอะมโมเนียจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l เป็นเวลา 95 วัน

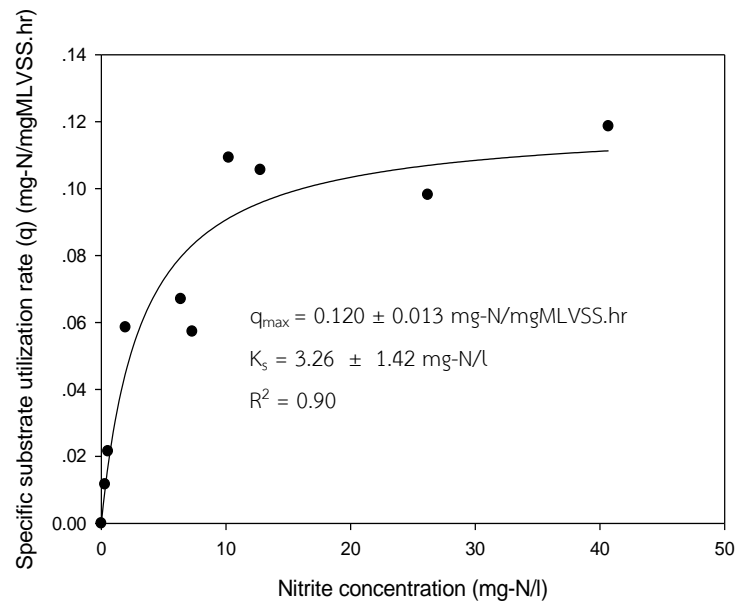
4.2.2.2 จลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซิ่ง

ในการทดลองหาค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซิ่ง ในช่วงวันที่ 6, 20, 47 และ 95 หลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ A และ B โดยผลของพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์ ภายหลังจากการสลับความเข้มข้นได้ 6 วัน สามารถแสดงได้ดังนี้

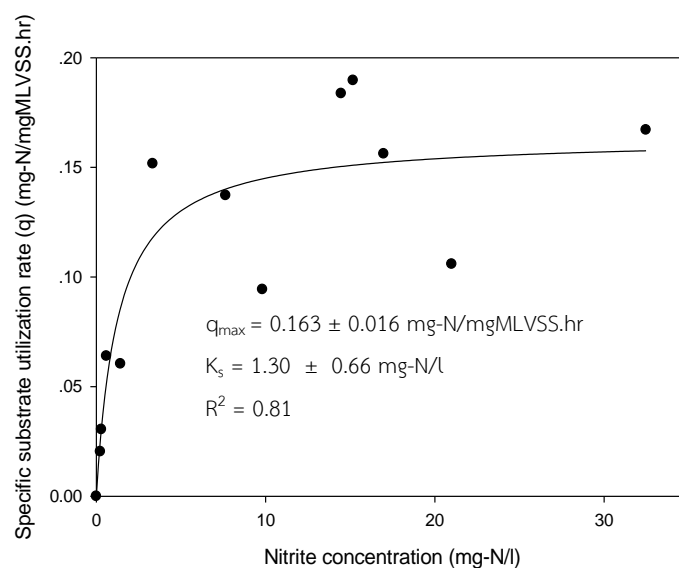
ลักษณะทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซิ่งของถังปฏิกรณ์ A (สลับจากความเข้มข้นแอมโมเนีย 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L) ภายหลังจากการสลับความเข้มข้น 6 วันโดยที่ค่า q_{max} มีค่าเท่ากับ 0.120 ± 0.0013 mg-N/mgMLVSS.hr และค่า K_s มีค่าเท่ากับ 3.26 ± 1.42 mg-N/L ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของถังปฏิกรณ์ A ในการทดลองช่วงที่ 1 มีค่า q_{max} เท่ากับ 0.048 ± 0.0045 mg-N/mgMLVSS.hr และ K_s เท่ากับ 2.57 ± 1.00 mg-N/L ถึงแม้ว่าค่า q_{max} ในช่วงการทดลองที่ 1 และ 2 จะมีค่าแตกต่างกันพอสมควรแต่ K_s ในการทดลองช่วงที่ 1 และการทดลองช่วงที่ 2 ไม่ได้มีความแตกต่างกันมาก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซิ่งไม่ได้เกิดขึ้นอย่างเด่นชัดในช่วง 6 วันแรกหลังจากทำการสลับความเข้มข้นของแอมโมเนีย

ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ B (สลับจากความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/L เป็น 50 mg-N/L) มีค่า q_{max} เท่ากับ 0.163 ± 0.016 mg-N/mgMLVSS.hr และมีค่า K_s เท่ากับ 1.30 ± 0.66 mg-N/L เมื่อเทียบกับการทดลองช่วงที่ 1 ($q_{max} = 0.0086 \pm 0.0009$ mg-N/mgMLVSS.hr, $K_s = 1.34 \pm 0.80$ mg-N/L) ค่า q_{max} มีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ในระบบถังปฏิกรณ์ B สามารถปรับตัวในการบำบัดไนโตรที่มีปริมาณมากขึ้นได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามค่า K_s ของทั้ง 2 ช่วงแทบไม่มีการเปลี่ยนแปลงแสดงให้เห็นว่า ยังคงไม่มีการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซิ่งหลักภายในระบบ เช่นเดียวกับถังปฏิกรณ์ A

โดยกราฟ Monod จุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซิ่งของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) และ ถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L) ภายหลังจากการสลับความเข้มข้นเป็นเวลา 6 วันสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.35 และ 4.36 ตามลำดับ



รูปที่ 4.35 กราฟอัตราการใช้นิโตรที่จำเพาะ (q) และความเข้มข้นไนโตรที่เริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l เป็นเวลา 6 วัน



รูปที่ 4.36 กราฟอัตราการใช้นิโตรที่จำเพาะ (q) และความเข้มข้นไนโตรที่เริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ B ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l เป็นเวลา 6 วัน

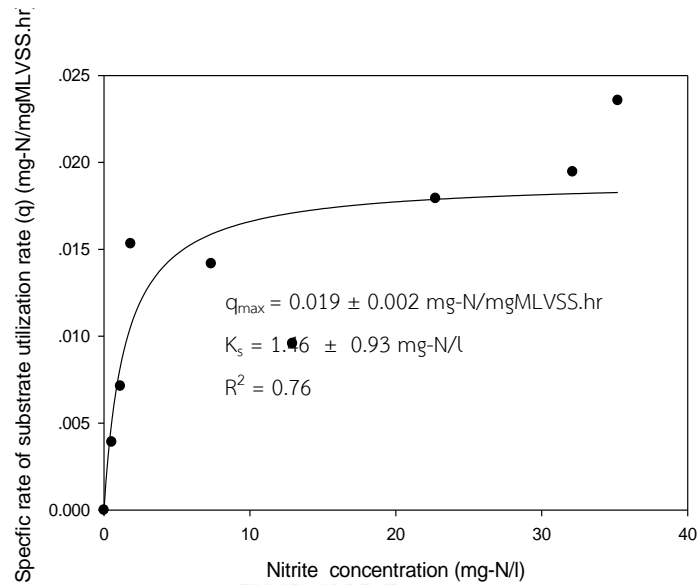
จากนั้นได้ทำการศึกษาพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซ์ต่อในวันที่ 20 หลังจากการสลับความเข้มข้นแอมโมเนียผลที่ได้เป็นไปดังรูปที่ 4.37 และ 4.38

ลักษณะทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซ์ของถังปฏิกรณ์ A (สลับจากความเข้มข้นแอมโมเนีย 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l) โดยที่ค่า q_{max} มีค่าเท่ากับ 0.019 ± 0.002 mg-

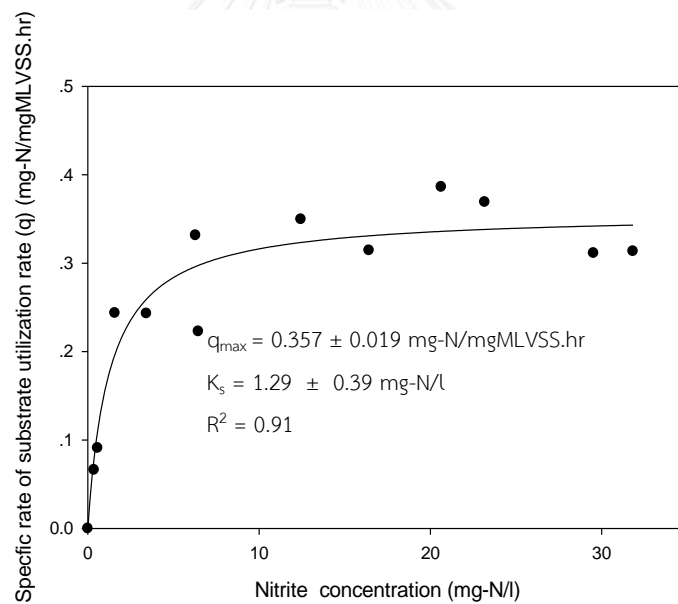
N/mgMLVSS.hr และมีค่า K_s เท่ากับ 1.46 ± 0.93 mg-N/L โดยค่า q_{max} นั้นลดลงจากช่วง 6 วัน หลังจากเริ่มการทดลองช่วงที่ 2 ($q_{max} = 0.120 \pm 0.0013$ mg-N/mgMLVSS.hr) แสดงให้เห็นว่า จุลินทรีย์ในระบบเริ่มปรับตัวให้เข้ากับปริมาณไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้นน้อยลงในระบบ ในขณะที่ค่า K_s มีค่า ลดลงจากเดิมเล็กน้อย ($K_s = 3.26 \pm 1.42$ mg-N/L) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองช่วงที่ 1 แล้ว ($K_s = 2.57 \pm 1.00$ mg-N/L) ก็ไม่ได้มีความแตกต่างกันมากนัก ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลุ่มประชากร จุลินทรีย์กลุ่มไนโตรเจนออกไซด์ซึ่งภายในระบบอาจยังไม่มี การเปลี่ยนแปลงมากนัก อย่างไรก็ตามก็ตี จุลินทรีย์ชนิด *Nitrobacter* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ไนโตรเจนออกไซด์ซึ่ง ประเภท Low affinity to nitrite อาจเริ่มมีจำนวนลดลงจากระบบเนื่องจากค่า q_{max} ที่ลดลง

ในขณะที่ลักษณะทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรเจนออกไซด์ซึ่งของถังปฏิกรณ์ B (สลับจากความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/L เป็น 50 mg-N/L) โดยที่ค่า q_{max} มีค่าเท่ากับ 0.357 ± 0.019 mg-N/mgMLVSS.hr และมีค่า K_s เท่ากับ 1.29 ± 0.39 mg-N/L ซึ่งจากค่า K_s ที่วัดได้นั้น เมื่อ เทียบกับค่า K_s ในช่วงการทดลองที่ 1 ก่อนสลับความเข้มข้นแอมโมเนีย และ ช่วง 6 วันหลังจากสลับ ความเข้มข้นแอมโมเนีย ($K_s = 1.34 \pm 0.80$ mg-N/L และ 1.30 ± 0.66 mg-N/L ตามลำดับ) ยังคง แทบไม่มีการเปลี่ยนแปลง จึงอาจพอที่จะบอกได้ว่าในช่วง 20 วันแรกยังคงไม่เห็นแนวโน้มที่จะเห็น การเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรเจนออกไซด์ซึ่งจากผลของจลนพลศาสตร์

โดยกราฟ Monod จุลินทรีย์กลุ่มไนโตรเจนออกไซด์ซึ่งของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) และ ถัง ปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L) ภายหลังจากการสลับความเข้มข้นเป็นเวลา 20 วันสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.37 และ 4.38 ตามลำดับ



รูปที่ 4.37 กราฟอัตราการใช้นิโตรเจนจำเพาะ (q) และความเข้มข้นไนโตรเจนเริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l เป็นเวลา 20 วัน



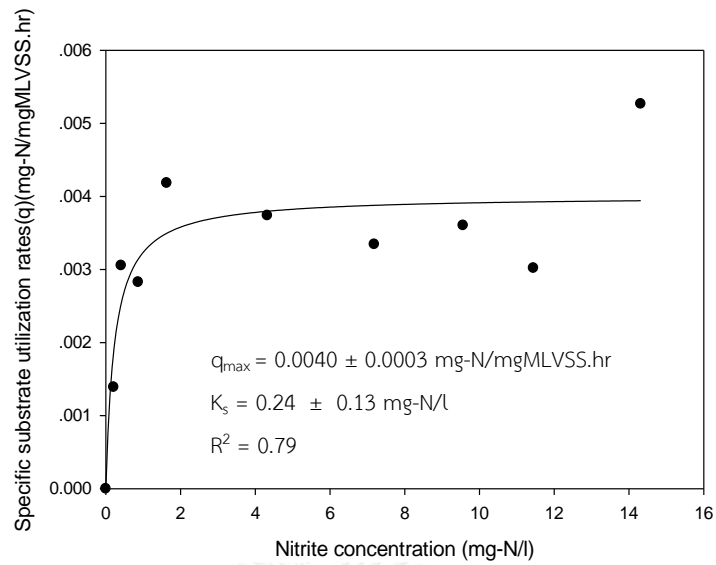
รูปที่ 4.38 กราฟอัตราการใช้นิโตรเจนจำเพาะ (q) และความเข้มข้นไนโตรเจนเริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ B ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l เป็นเวลา 20 วัน

จากนั้นได้ทำการศึกษาพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรเจนออกซิไดซีอีกครั้งในวันที่ 47 หลังจากการสลับความเข้มข้นแอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ ผลที่ได้เป็นไปดังนี้

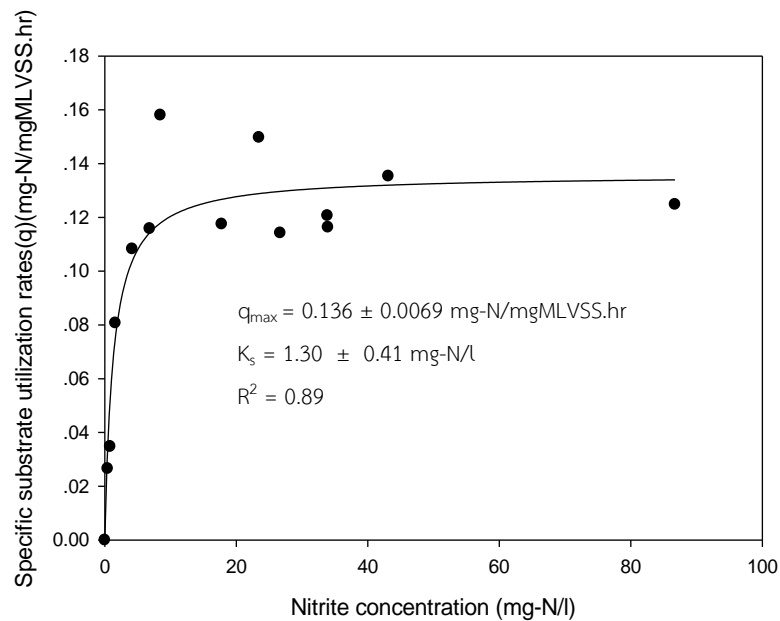
ภายหลังจากการทำการสลับความเข้มข้นแอมโมเนียได้ 47 วัน ลักษณะทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรท็อกซิไดซิ่งในถังปฏิกรณ์ A (สลับจากความเข้มข้นแอมโมเนีย 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L) สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.39 โดยที่ค่า q_{max} มีค่าเท่ากับ 0.0040 ± 0.0003 mg-N/mgMLVSS.hr และมีค่า K_s เท่ากับ 0.24 ± 0.13 mg-N/L ซึ่งหากพิจารณาค่า q_{max} นั้นยังคงลดลงอย่างต่อเนื่องจากวันที่ 20 ภายหลังจากการสลับความเข้มข้นแอมโมเนีย ($q_{max} = 0.019 \pm 0.0002$ mg-N/mgMLVSS.hr) ซึ่งสาเหตุอาจเนื่องมาจากการที่จุลินทรีย์ไนโตรท็อกซิไดซิ่งในระบบอาจเริ่มมีการลดลงเนื่องจากขาดแคลน substrate เนื่องจากไนโตรที่มีจำกัด ในขณะที่เดียวกันค่า K_s ก็เริ่มมีค่าน้อยลงอย่างเห็นได้ชัดจากวันที่ 20 ภายหลังจากการสลับความเข้มข้นแอมโมเนีย ($K_s = 1.46 \pm 0.93$ mg-N/L) ซึ่งอาจแสดงให้เห็นถึงการที่ จุลินทรีย์ชนิด *Nitrobacter* ซึ่งเป็นกลุ่ม Low affinity to nitrite เริ่มมีปริมาณลดลงในระบบ

ในส่วนของถังปฏิกรณ์ B (สลับจากความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/L เป็น 50 mg-N/L) นั้นมีค่า q_{max} เท่ากับ 0.136 ± 0.0069 mg-N/mgMLVSS.hr และมีค่า K_s เท่ากับ 1.30 ± 0.41 mg-N/L ดังแสดงในรูปที่ 4.40 โดยที่หากพิจารณาจากค่า K_s แล้วยังคงแทบไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ จากการทดลองที่ผ่านมาในขณะที่ค่า q_{max} ก็ยังอยู่ในระดับเดียวกับ 2 ครั้งแรกที่ทำทดลองทางจลนพลศาสตร์ในวันที่ 6 และ 20 ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนีย ($K_s = 1.30 \pm 0.66$ mg-N/L และ 1.29 ± 0.39 mg-N/L ตามลำดับ) หรือแม้กระทั่งในการทดลองช่วงที่ 1 ที่ป้อนด้วยแอมโมเนียความเข้มข้น 1 mg-N/L ($K_s = 1.34 \pm 0.80$ mg-N/L)

โดยกราฟ Monod จุลินทรีย์กลุ่มไนโตรท็อกซิไดซิ่งของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) และ ถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L) ภายหลังจากการสลับความเข้มข้นเป็นเวลา 47 วันสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.39 และ 4.40 ตามลำดับ



รูปที่ 4.39 กราฟอัตราการใช้นิไตรท์จำเพาะ (q) และความเข้มข้นไนไตรท์เริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l เป็นเวลา 47 วัน



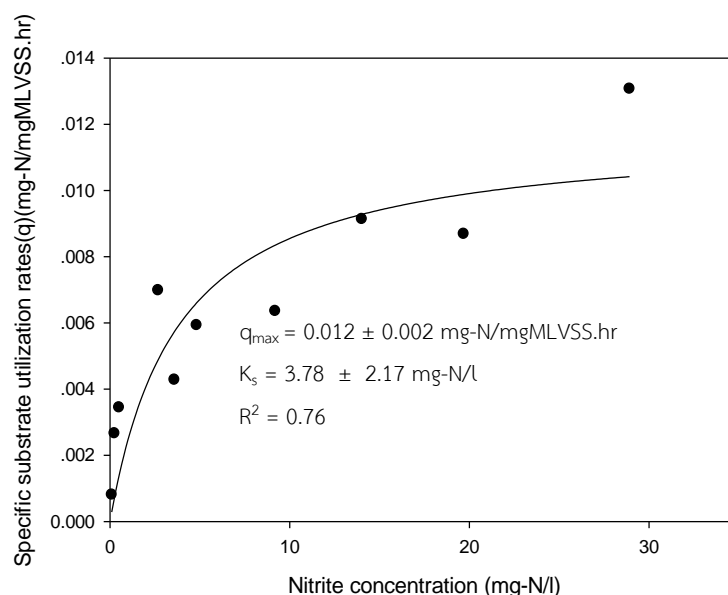
รูปที่ 4.40 กราฟอัตราการใช้นิไตรท์จำเพาะ (q) และความเข้มข้นไนไตรท์เริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ B ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l เป็นเวลา 47 วัน

จากนั้นทำการศึกษาพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิงในครั้งที่ 4 ในวันที่ 95 ภายหลังจากการสลับความเข้มข้นแอมโมเนียผลที่ได้เป็นไปดังนี้

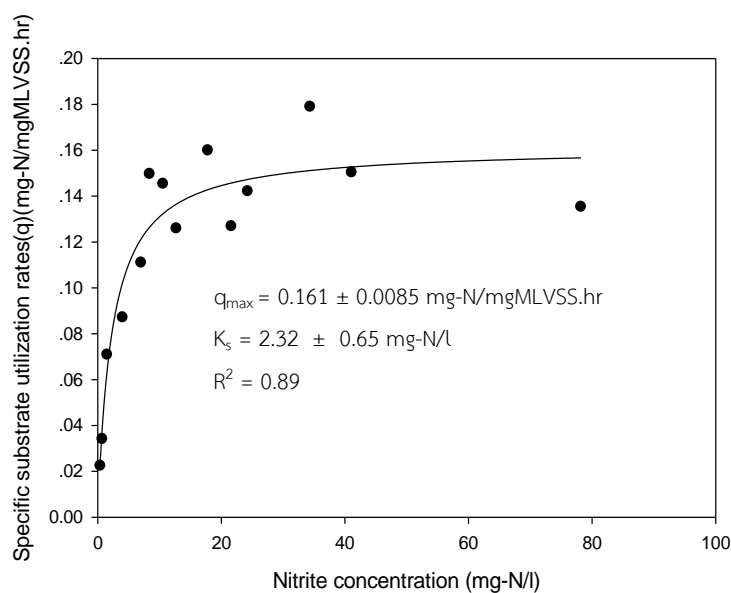
ภายหลังจากทำการสลับความเข้มข้นแอมโมเนียได้ 95 วันลักษณะทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิงของถังปฏิกรณ์ A (สลับจากความเข้มข้นแอมโมเนีย 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l) ค่า q_{max} มีค่าเท่ากับ 0.012 ± 0.002 mg-N/mgMLVSS.hr ในขณะที่ค่า K_s มีค่าเท่ากับ 3.78 ± 2.17 mg-N/l โดยจากการศึกษาพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ในครั้งสุดท้ายค่า q_{max} ยังคงมีค่าที่ค่อนข้างต่ำซึ่งแสดงถึงลักษณะของจุลินทรีย์กลุ่ม High affinity to nitrite ถึงแม้ว่าค่า K_s จะมีค่ากลับมาสูงขึ้นอีกครั้งเมื่อเทียบกับการทดลองครั้งก่อนหน้านี้ แต่ค่า K_s ก็ยังอยู่ในช่วงของกลุ่ม High affinity to nitrite

ในขณะที่ผลทางจลนพลศาสตร์จุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิงของถังปฏิกรณ์ B (สลับจากความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l) ค่า q_{max} มีค่าเท่ากับ 0.161 ± 0.0085 mg-N/mgMLVSS.hr และมีค่า K_s เท่ากับ 2.32 ± 0.65 mg-N/l โดยรวมแล้วก็ยังคงไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิงอย่างชัดเจน

โดยกราฟ Monod จุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิงของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l) และ ถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) ภายหลังจากการสลับความเข้มข้นเป็นเวลา 95 วันสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.41 และ 4.42 ตามลำดับ



รูปที่ 4.41 กราฟอัตราการใช้ไนไตรท์ จำเพาะ (q) และความเข้มข้นไนไตรท์เริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l เป็นเวลา 95 วัน



รูปที่ 4.42 กราฟอัตราการใช้นิโตรเจนจำเพาะ (q) และความเข้มข้นไนโตรเจนเริ่มต้น (mg-N/l) ของถังปฏิกรณ์ B ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l เป็นเวลา 95 วัน

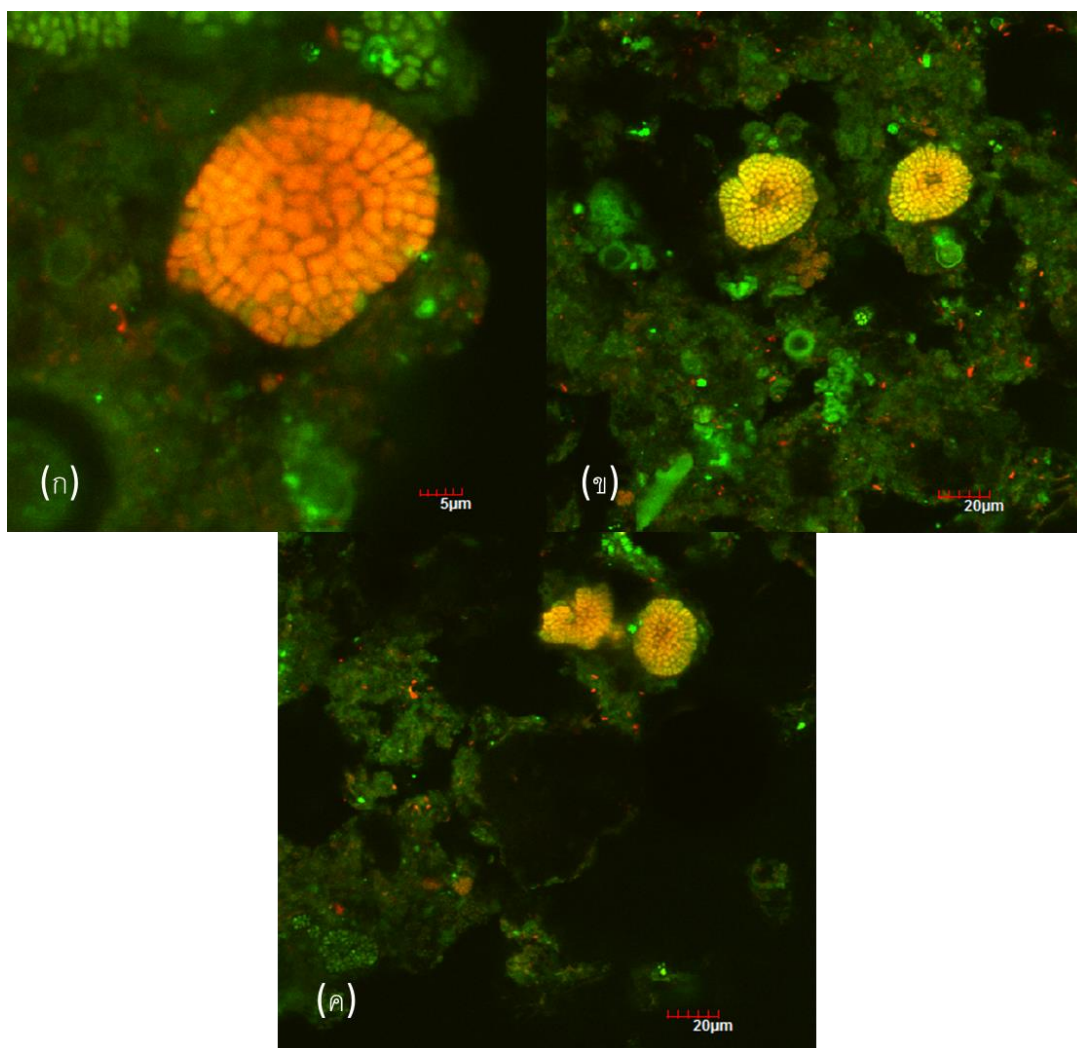
4.2.3 การศึกษาจุลินทรีย์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค Fluorescence in situ hybridization (FISH)

4.2.3.1 การศึกษาจุลินทรีย์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l)

จากการศึกษาจุลินทรีย์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ของถังปฏิกรณ์ A ในช่วงการทดลองที่ 2 โดยใช้เทคนิค FISH และทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 101 หลังจากการสลับความเข้มข้นแอมโมเนีย ผลที่ได้เป็นดังต่อไปนี้

จากการใช้ probe Nso190 (Labeled Alexa488-Green) ซึ่งเป็น probe ที่ใช้ศึกษาแบคทีเรียกลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่ง ใน Betaproteobacteria ซึ่งครอบคลุมแอมโมเนียออกซิไดซิ่งแบคทีเรียเกือบทั้งหมด และ probe EUB338 (Labeled Cy3-Red) ซึ่งครอบคลุมแบคทีเรียทั้งหมด (universal bacteria)

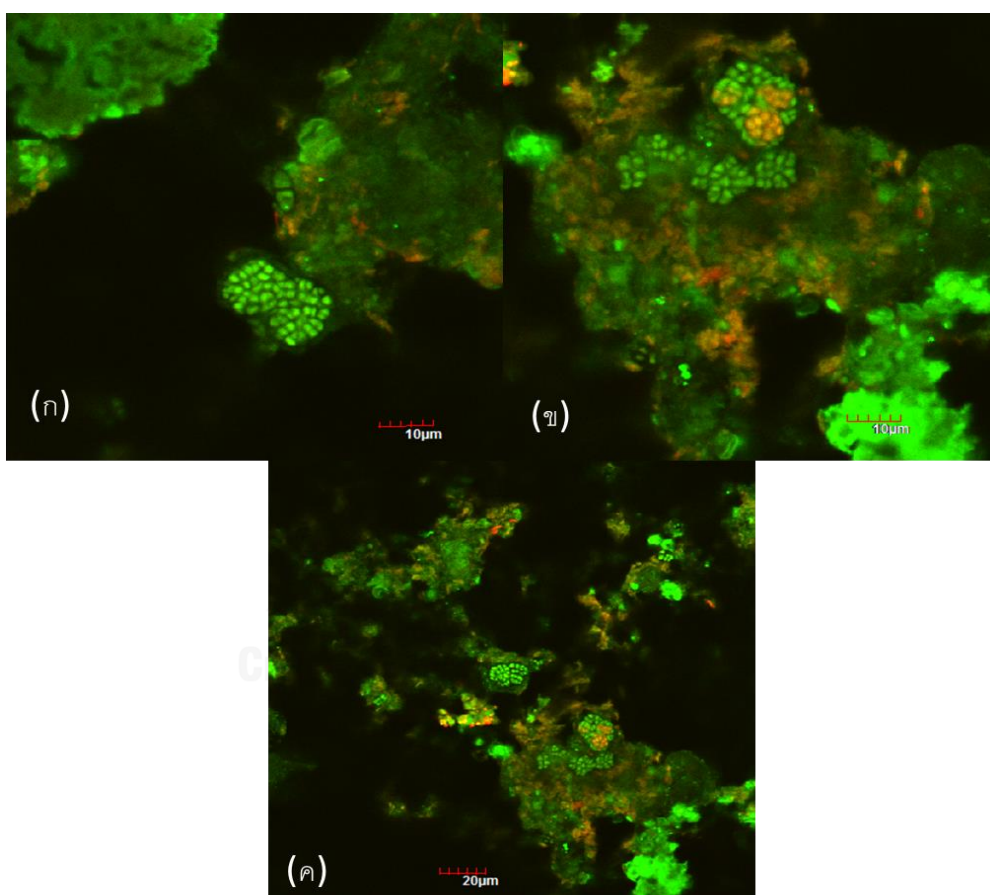
จากการทดลองโดยใช้ probe ทั้งสองมาทำการวิเคราะห์พบว่า ประชากรจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ของระบบถังปฏิกรณ์ A ยังคงเป็นจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่ง ซึ่งสามารถสังเกตได้จากการซ้อนทับกันของทั้ง 2 probe อย่างไรก็ตามลักษณะของฟลูออโรสโคป และความหนาแน่นของฟลูออโรสโคปนั้นน้อยกว่าถังปฏิกรณ์ A ในช่วงการทดลองที่ 1 คาดว่าเนื่องมาจากการลดความเข้มข้นของแอมโมเนียส่งผลให้ปริมาณจุลินทรีย์ในระบบลดลง ดังแสดงในรูปที่ 4.43



รูปที่ 4.43 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l ในการทดลองช่วงที่ 2 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe EUB338 (Universal bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (Ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Fluor 488 (สีเขียว) ส่วนที่เป็นสีเหลือง-ส้มแสดงให้เห็นถึงจุดที่ทั้ง 2 probe ซ้อนทับกัน

เมื่อทราบว่าประชากรจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ภายในระบบคือ แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียแล้ว ขั้นตอนต่อไป เราจึงใช้ probe Nse1472 (Labeled Cy3-Red) ซึ่งเป็น probe ของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย ชนิด *Nitrosomonas europaea* ซึ่งเป็นตัวแทนที่สำคัญของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียกลุ่ม Low affinity to ammonia ร่วมกับการใช้ probe Nso190 (Labeled Alexa488-Green) ซึ่งเป็น probe ที่ครอบคลุมแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียใน Betaproteobacteria

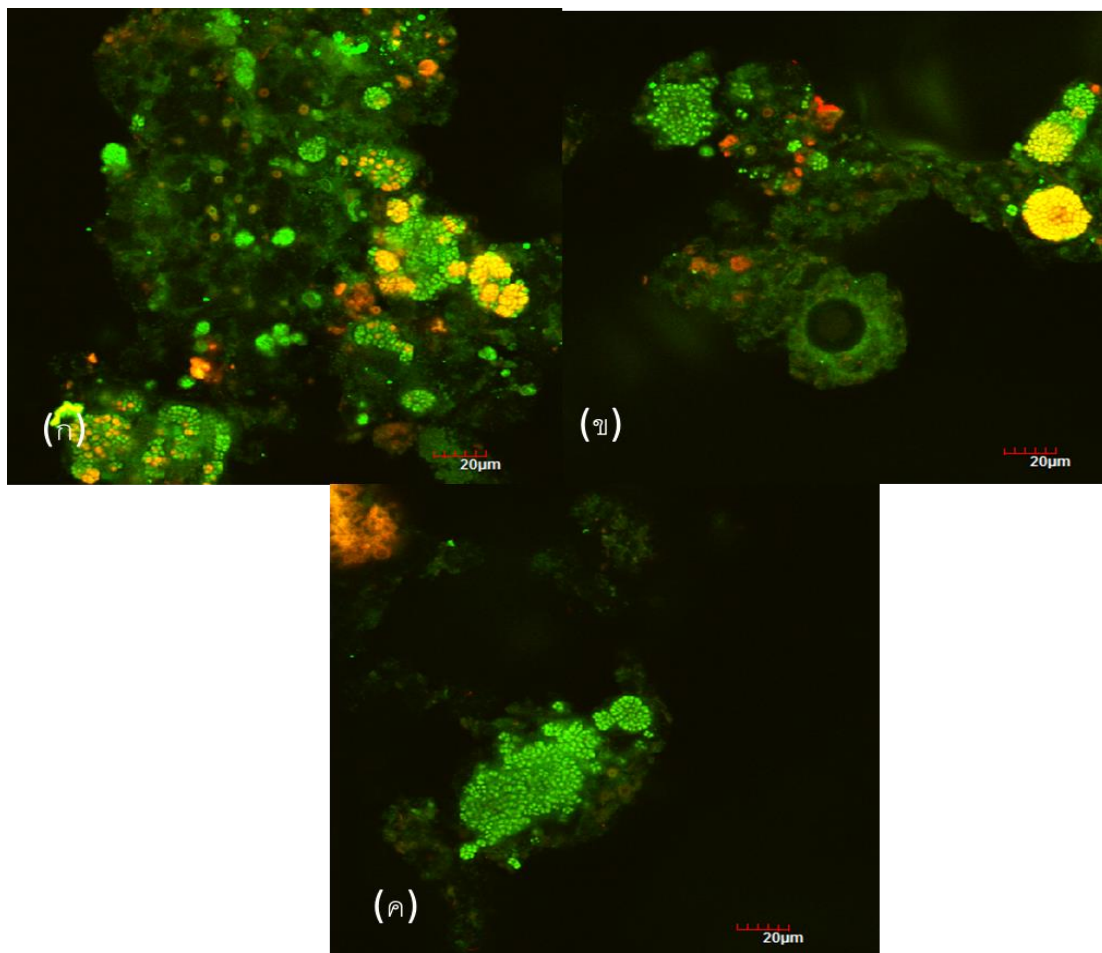
จากรูปที่ 4.44 (ข) และ (ค) พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซิ่งชนิด *Nitrosomonas europaea* ยังคงสามารถพบได้ในถังปฏิกรณ์ A แต่พบในปริมาณและความหนาแน่นที่เบาบาง เนื่องจากจากการที่ระบบถังปฏิกรณ์ A ได้ทำการลดความเข้มข้นของแอมโมเนียจาก 50 เป็น 1 mg-N/L ทำให้ชนิด *Nitrosomonas europaea* ซึ่งเป็นตัวแทนของจุลินทรีย์กลุ่ม Low affinity to ammonia มีจำนวนลดลงในระบบซึ่งสอดคล้องกับผลทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่งในวันที่ 95 หลังจากการสลับความเข้มข้นแอมโมเนีย ($K_s = 1.41 \pm 0.34$ mg-N/L) อย่างไรก็ตามก็ตีพื้นที่ส่วนใหญ่ยังคงไม่พบชนิด *Nitrosomonas europaea* ดังแสดงดังรูป 4.44 (ก)



รูปที่ 4.44 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L ในการทดลองช่วงที่ 2 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Nse1472 (*Nitrosomonas europaea*) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (Ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว) ส่วนที่เป็นสีเหลือง-ส้ม แสดงให้เห็นถึงจุดที่ทั้ง 2 probe ซ้อนทับกัน

หลังจากที่ทำการสำรวจกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ชนิด Low affinity to ammonia แล้วจึงทำการวิเคราะห์โดยใช้ probe Cluster6a192 (Labeled Cy3-Red) เป็น probe ตัวแทนของกลุ่ม High affinity to ammonia โดย probe นี้เป็น probe ของชนิด *Nitrosomonas oligotropha* lineage โดยใช้ร่วมกับ probe Nso190 (Labeled Alexa488- Green) ซึ่งเป็น probe ที่ครอบคลุมแอมโมเนียออกซิไดซ์แบคทีเรียใน Betaproteobacteria

จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ ชนิด *Nitrosomonas oligotropha* lineage ยังคงอาศัยอยู่ได้ภายในระบบภายหลังจากการสลับความเข้มข้นของแอมโมเนียจาก 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L โดยในการทดลองครั้งที่ 2 จุลินทรีย์ตระกูลดังกล่าวซึ่งเป็นจุลินทรีย์ประเภท High affinity to ammonia กลายมาเป็นกลุ่มประชากรหลักอย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 4.45 (ก) และ (ข) ซึ่งแตกต่างกับการทดลองในช่วงแรกที่กลุ่ม High affinity to ammonia และกลุ่ม low affinity to ammonia ดำรงอยู่และทำงานร่วมกันโดยไม่สามารถจำแนกได้อย่างชัดเจนว่ากลุ่มใดเป็นกลุ่มประชากรหลักดังแสดงในรูปที่ 4.12 และ 4.13 อย่างไรก็ตามจากรูปที่ 4.45 (ค) ยังคงแสดงให้เห็นถึงพื้นที่บางจุดที่ไม่พบจุลินทรีย์ชนิด *Nitrosomonas oligotropha* lineage ซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ว่าบริเวณดังกล่าวอาจเป็นจุลินทรีย์ชนิด High affinity to ammonia ชนิดอื่นๆ เช่น ชนิด *Nitrosospira* และ *Nitrosomonas marina* เป็นต้น



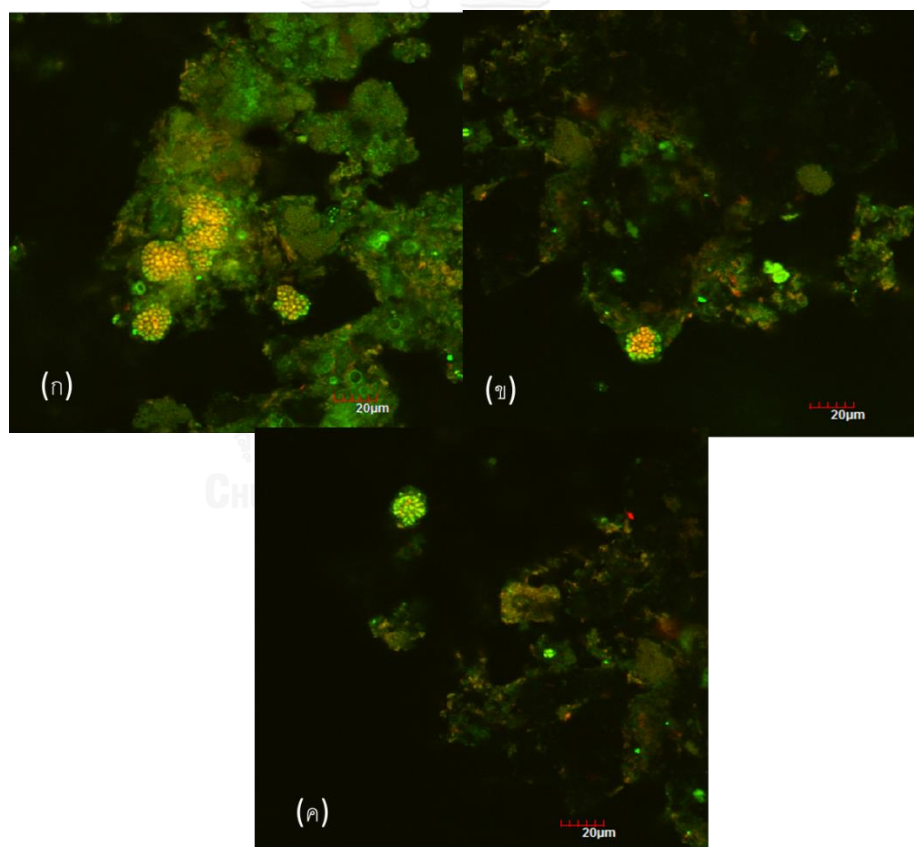
รูปที่ 4.45 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l ในการทดลองช่วงที่ 2 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Cluster6a192 (*Nitrosomonas oligotropha* lineage) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (Ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488(สีเขียว) ส่วนที่เป็นสีเหลือง-ส้มแสดงให้เห็นถึงจุดที่ทั้ง 2 probe ซ้อนทับกัน

หลังจากที่ทำการวิเคราะห์จุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงแล้ว ขั้นตอนต่อไปจึงทำการวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรทออกซิไดซิง โดยเบื้องต้นจะวิเคราะห์ชนิด *Nitrospira* ซึ่งเป็นกลุ่ม High affinity to nitrite โดยใช้ probe Ntspa662 (*Nitrospira*) โดย(Labeled Cy3-Red) ร่วมกับ probe Nso190 (Labeled Alexa488- Green) ซึ่งเป็น probe แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียใน Betaproteobacteria

ผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียชนิด *Nitrospira* ซึ่งเป็นกลุ่ม High affinity to ammonia ยังคงสามารถดำรงอยู่ได้ในระบบถังปฏิกรณ์ A ที่ได้ทำการสลับจากความเข้มข้น 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l ซึ่งลักษณะการดำรงอยู่ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรทออกซิไดซิงมัก

อยู่บริเวณใกล้เคียงหรืออยู่ภายในบริเวณฟลอคของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิง ลักษณะเดียวกับที่พบใน การทดลองช่วงที่ 1 ดังรูปที่ 4.14 ซึ่งอาจส่งผลให้สัญญาณ fluorescence ที่พบมักเห็นเป็นสัญญาณ 2 สีทับกันเป็นจุดสีส้มเหลืองจาก probe ของชนิด *Nitrospira* (Ntspa662-Labeled Cy3-สีแดง) และ probe ของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Nso190 – Labeled Alexa488-สีเขียว) อย่างไรก็ตาม การที่เห็นไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรีย ชนิด *Nitrospira* เป็นจุดสีเหลือง-ส้มแทนที่จะเห็นเป็นจุดสีแดงเดี่ยวๆ นั้นอาจมีความเป็นไปได้เช่นกันว่า probe Nso190 ซึ่งเป็น probe สำหรับแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียอาจถูกล้างออกไม่หมดจนเห็นเป็นจุดเดียวกับไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 4.46 (ก) และ (ข)

นอกเหนือจากจุดที่พบ *Nitrospira* แล้วในรูปที่ 4.46 (ค) แสดงให้เห็นจุดที่ไม่พบจุลินทรีย์ชนิด *Nitrospira* เช่นกันแสดงให้เห็นถึงความไม่เป็นเนื้อเดียวกันของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในแต่ละจุด เช่นเดียวกับตัวอย่างอื่นๆ

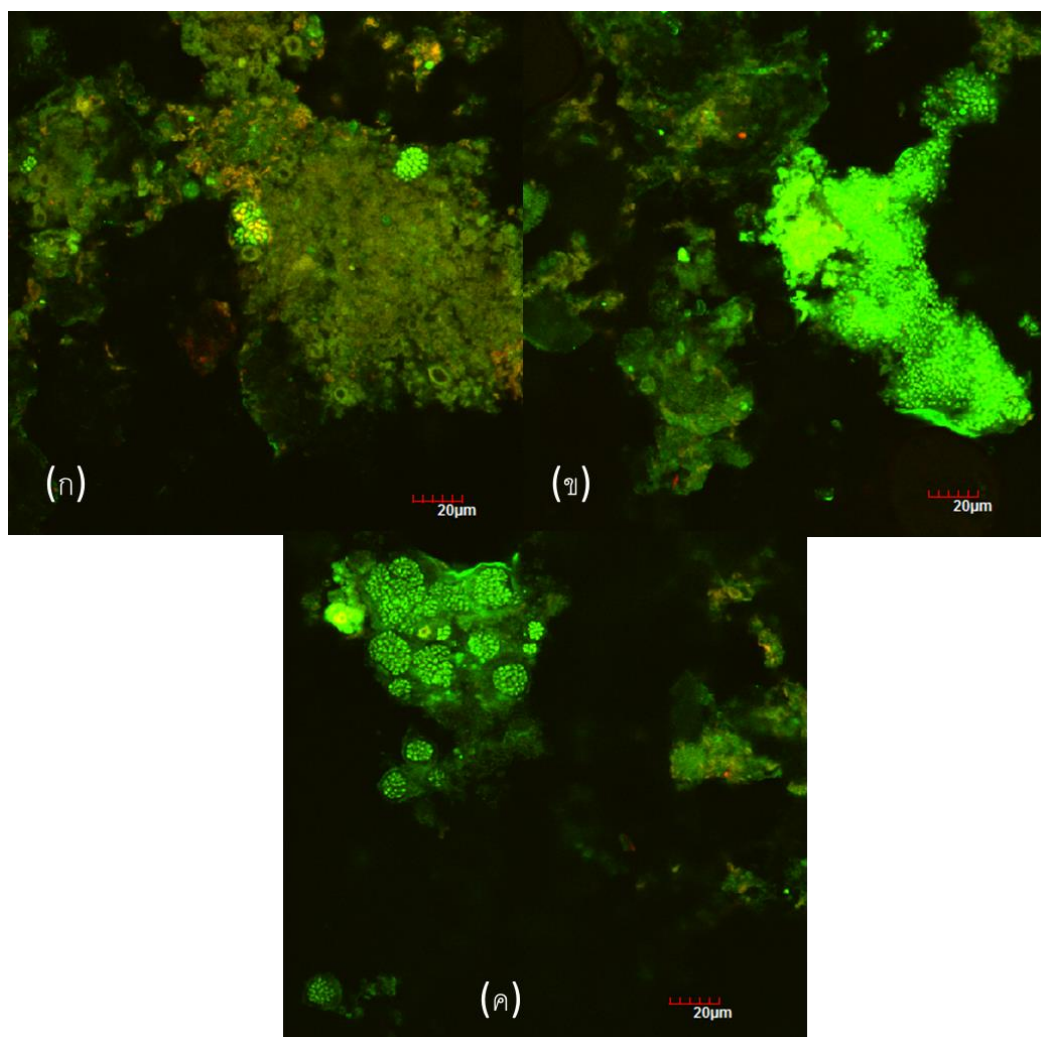


รูปที่ 4.46 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L ในการทดลองช่วงที่ 2 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Ntspa662 (*Nitrospira*) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (Ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว) ส่วนที่เป็นสีเหลือง-ส้มแสดงให้เห็นถึงจุดที่ทั้ง 2 probe ซ้อนทับกัน

หลังจากทำการศึกษาแบคทีเรียชนิด *Nitrospira* ซึ่งเป็นไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียกลุ่ม High affinity to nitrite แล้วขั้นต่อไปจึงทำการศึกษาไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียกลุ่ม Low affinity to nitrite ซึ่งได้แก่ชนิด *Nitrobacter* โดยใช้ probe Nit3 (Labeled Cy3-Red) ร่วมกับกับ probe Nso190 (Labeled Alexa488- Green) ซึ่งเป็น probe แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียใน Betaproteobacteria

ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียชนิด *Nitrobacter* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่ม Low affinity to nitrite ถูกพบในปริมาณที่น้อยมาก ดังรูปที่ 4.47 (ก) โดยสาเหตุอาจเนื่องมาจากการที่ปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ป้อนเข้าระบบลดลงจาก 50 mg-N/L เหลือ 1 mg-N/L ส่งผลให้ปริมาณไนโตรที่เพิ่มขึ้นในระบบลดลงและทำให้จุลินทรีย์ชนิดดังกล่าวค่อยๆ หายออกไปจากระบบดังจะเห็นได้จากรูปที่ 4.47 (ข) และ (ค) ที่ไม่พบจุลินทรีย์ชนิดดังกล่าวอยู่เลยโดยเมื่อเปรียบเทียบกับไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียชนิด *Nitrospira* ซึ่งเป็นกลุ่ม High affinity to nitrite ที่ยังคงดำรงอยู่ได้ในระบบถึงปฏิกรณ์ A ดังรูปที่ 4.46แสดงให้เห็นว่าไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียชนิด *Nitrospira* เป็นกลุ่มประชากรหลักในถังปฏิกรณ์ A อย่างชัดเจนซึ่งสอดคล้องกับผลจลนพลศาสตร์ทั้ง 4 ครั้งในช่วงการทดลองช่วงที่ 2 ของถังปฏิกรณ์ A (K_S ของครั้งที่ 1-4 ของการทดลองช่วงที่ 2 มีค่าเท่ากับ 3.26 ± 1.42 mg-N/L, 1.46 ± 0.93 mg-N/L, 0.24 ± 0.13 mg-N/L, 3.78 ± 2.17 mg-N/L ตามลำดับ) โดยถึงแม้ว่าค่า K_S จะมีการแกว่งไปบ้างแต่โดยรวมแล้วยังถือว่าค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ดังกล่าวสื่อถึงการทำงานในกลุ่ม High affinity to nitrite

อย่างไรก็ดีการพบกลุ่มไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียชนิด *Nitrobacter* ของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) ยังคงมีลักษณะคล้ายคลึงกับการพบไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรีย ชนิด *Nitrospira* ตรงที่เราจะไม่เห็นจุดของไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียเป็นจุดเดี่ยวๆ แต่จะเห็นเป็นสัญญาณซ้อนทับกันเป็น 2 สีระหว่าง probe Nit3 (Labeled Cy3-Red) และ probe Nso190 (Labeled-Alexa488-Green) ซึ่งเป็น probe ของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียอาจเป็นเพราะ จุลินทรีย์กลุ่มไนโตรทออกซิไดซิงมักพบอยู่ในตำแหน่งที่ใกล้กับจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิง ซึ่งการคงอยู่ของแบคทีเรียเหล่านี้อาจมีการซ้อนทับกันจนเห็นเป็นตำแหน่งเดียวกัน หรือมีความเป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากการที่ probe Nso190 ไม่สามารถถูกล้างออกจนหมดทำให้เห็น probe ซ้อนทับกันเป็นสีเหลืองส้ม



รูปที่ 4.47 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ A ภายหลังจากสลับจากความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l ในการทดลองช่วงที่ 2 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Nit3 (*Nitrobacter*) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (Ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว) ส่วนที่เป็นสีเหลือง-ส้มแสดงให้เห็นถึงจุดที่ทั้ง 2 probe ซ้อนทับกัน

4.2.3.2 การศึกษากลุ่มประชากรของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l)

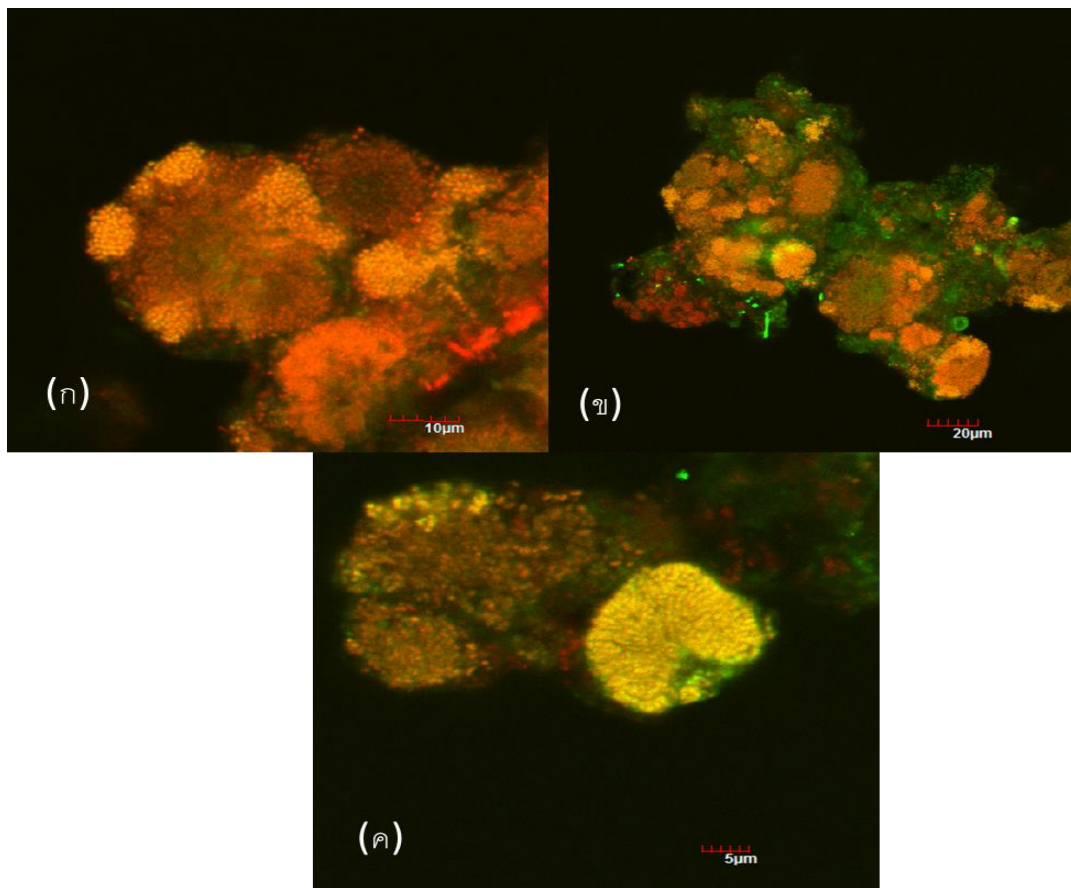
จากการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในการทดลองช่วงที่ 2 ของถังปฏิกรณ์ B ภายหลังจากการสลับความเข้มข้นแอมโมเนีย โดยใช้เทคนิค FISH ผลที่ได้เป็นดังต่อไปนี้

จากการใช้ probe Nso190 (Labeled Alexa488-Green) ซึ่งเป็น probe ที่ใช้ศึกษาแบคทีเรียกลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่ง ใน Betaproteobacteria และ probe EUB338 (Labeled Cy3-Red) ซึ่งครอบคลุมแบคทีเรียทั้งหมด (universal bacteria)

ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่ากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ของระบบถังปฏิกรณ์ B ยังคงเป็นจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่ง ซึ่งสามารถสังเกตได้จากการซ้อนทับกันของทั้ง 2 probe โดยสังเกตได้จากการที่ probe ทั้ง 2 ชนิดมีการซ้อนทับกันเกือบทั้งหมดในทุกพื้นที่

นอกจากนี้จากการที่ปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ถูกป้อนเข้าในระบบเพิ่มขึ้นจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l ทำให้ฟลอคของจุลินทรีย์มีความหนาแน่นขึ้นภายในระบบถังปฏิกรณ์ B ดังแสดงในรูปที่ 4.48



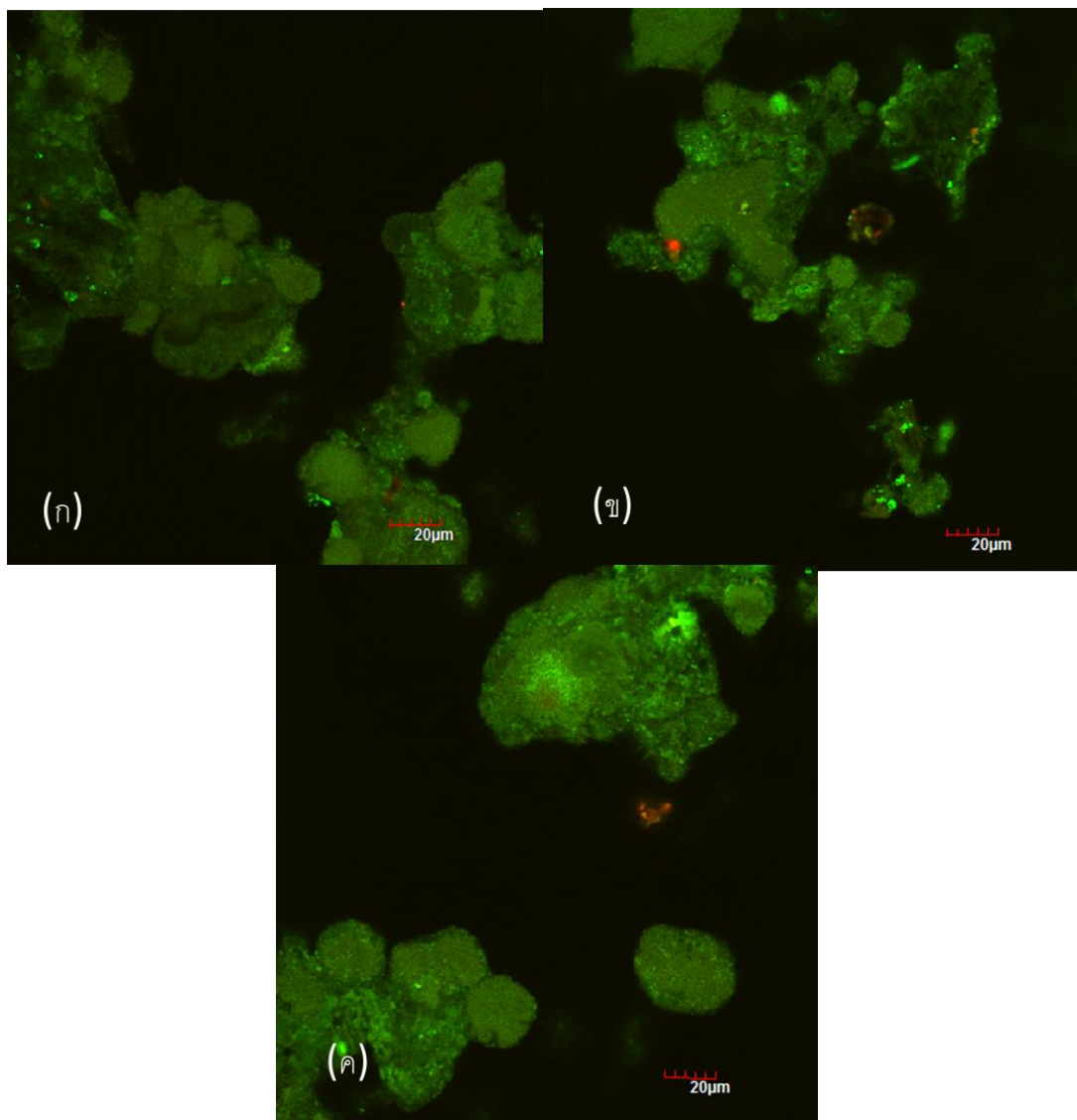


รูปที่ 4.48 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถึงปฏิกรณ์ B ภายหลังจากสลับจากความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 เป็น 50 mg-N/l ในการทดลองช่วงที่ 2 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe EUB338 (Universal bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (Ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว) ส่วนที่เป็นสีเหลือง-ส้มแสดงให้เห็นถึงจุดที่ทั้ง 2 probe ซ้อนทับกัน

เมื่อทราบว่าประชากรจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ภายในระบบคือ แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียแล้ว ขั้นตอนต่อไป จึงใช้ probe Nse1472 (Labeled Cy3-Red) ซึ่งเป็น probe ที่จำเพาะต่อแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย ชนิด *Nitrosomonas europaea* ซึ่งเป็นตัวแทนที่สำคัญของกลุ่ม Low affinity to ammonia ร่วมกับ probe Nso190 (Labeled Alexa488-Green) ซึ่งเป็น probe ที่ครอบคลุมแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียใน Betaproteobacteria

ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ชนิด *Nitrosomonas europaea* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ประเภท Low affinity to ammonia ไม่ถูกพบในถังปฏิกรณ์ B เลยหรืออาจมีอยู่น้อยมากจนสัญญาณ fluorescence มีความเข้มไม่มากเพียงพอที่จะตรวจสอบ ทั้งนี้ได้มีการเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ถูกป้อนเข้าไปในระบบ อย่างไรก็ตามผลดังกล่าวนั้นก็สอดคล้องกับผลของค่าพารามิเตอร์

ทางจุลชีววิทยาตลอดการทดลองช่วงที่ 2 (K_s ของครั้งที่ 1-4 ของการทดลองช่วงที่ 2 มีค่าเท่ากับ 0.25 ± 0.20 mg-N/l, 1.78 ± 0.56 mg-N/l, 1.14 ± 0.37 mg-N/l และ 1.36 ± 0.66 mg-N/l ตามลำดับ) ดังแสดงในรูปที่ 4.49

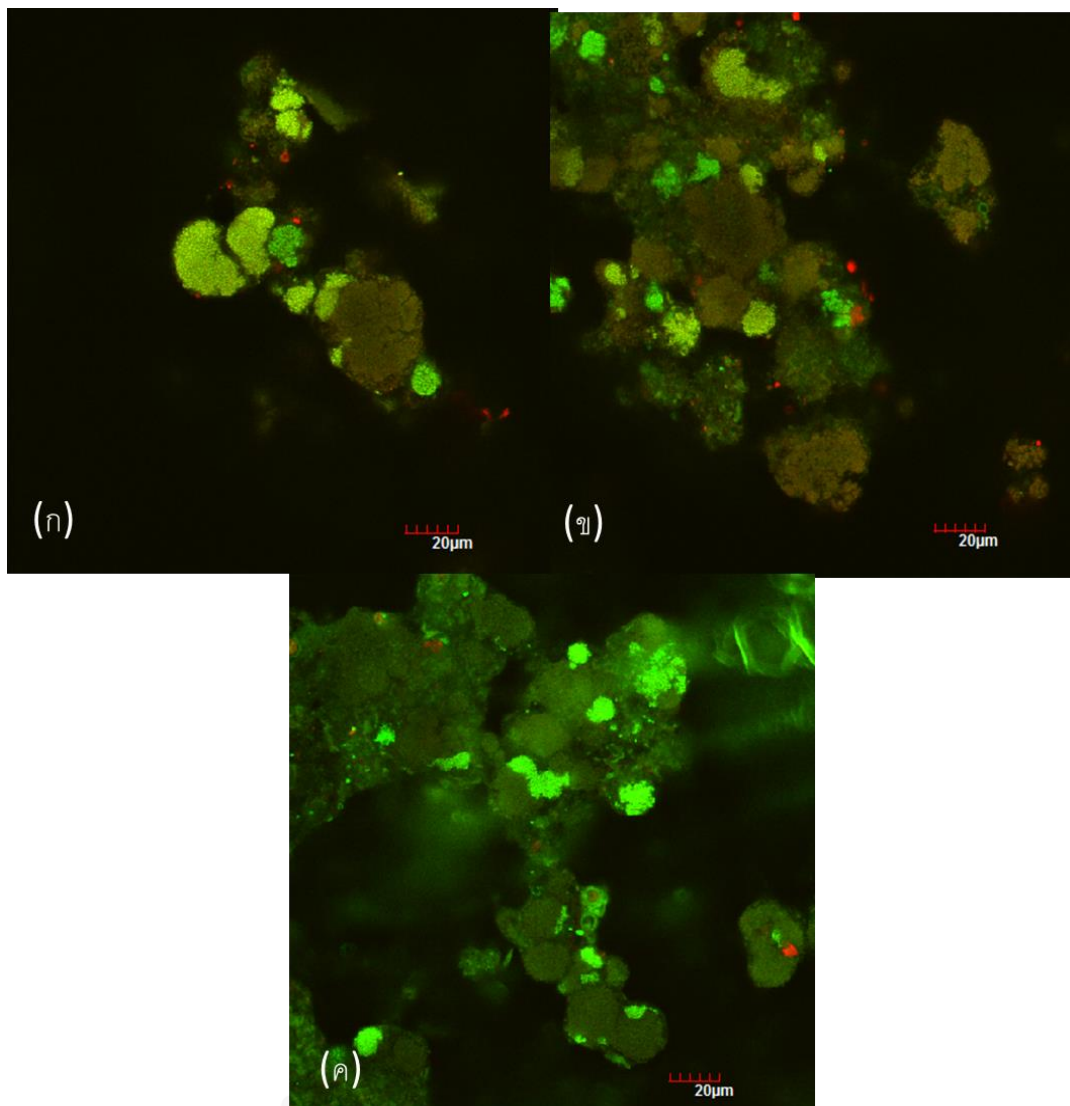


รูปที่ 4.49 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ B ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l ในการทดลองช่วงที่ 2 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Nse1472 (*Nitrosomonas europaea*) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (Ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว) ส่วนที่เป็นสีเหลือง-ส้ม แสดงให้เห็นถึงจุดที่ทั้ง 2 probe ซ้อนทับกัน

หลังจากที่ทำการสำรวจกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ชนิด Low affinity to ammonia แล้วจึงทำการวิเคราะห์โดยใช้ probe Cluster6a192 (Labeled Cy3-Red) ซึ่งเป็น probe ตัวแทนของกลุ่ม High affinity to ammonia โดย probe จำเพาะต่อชนิด *Nitrosomonas oligotropha* lineage โดยใช้ร่วมกับ probe Nso190 ซึ่งเป็น probe ที่ครอบคลุมแอมโมเนียออกไซด์ซึ่งแบคทีเรียใน Betaproteobacteria

ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่ากลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกไซด์ซึ่งชนิด *Nitrosomonas oligotropha* lineage สามารถถูกพบได้ในถังปฏิกรณ์ B นอกจากนี้เมื่อเทียบกับผลของถังปฏิกรณ์ B ในช่วงการทดลองที่ 1 ดังรูปที่ 4.18 จุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวเกาะรวมกันเป็นฟล็อกที่ใหญ่ขึ้นและสามารถสังเกตได้ง่ายขึ้น ซึ่งเกิดจากการที่แอมโมเนียภายในระบบที่ป้อนเข้ามามีค่าเพิ่มขึ้นจาก 1 mg-N/L เป็น 50 mg-N/L อย่างไรก็ตามยังมีจุลินทรีย์แอมโมเนียออกไซด์ซึ่งประเภท High affinity to ammonia นอกเหนือจากชนิด *Nitrosomonas oligotropha* lineage ที่อาจอาศัยอยู่ได้ในถังปฏิกรณ์แต่จากผลการศึกษากลุ่มประชากรนี้ทำให้สามารถยืนยันได้ว่ากลุ่มประชากรหลักในถังปฏิกรณ์ B ยังคงไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะกลุ่มประชากรไปมากนักเมื่อเทียบกับการทดลองช่วงที่ 1 ก่อนเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียจาก 1 mg-N/L เป็น 50 mg-N/L ดังแสดงในรูปที่ 4.50 (ก) และ (ข)

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจุลินทรีย์ตระกูล *Nitrosomonas oligotropha* lineage จะถูกพบอย่างมากแต่ก็ยังมียังมีบางจุดที่ไม่พบจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวดังเช่นรูปที่ 4.50 (ค) ทั้งนี้การพบจุลินทรีย์แอมโมเนียออกไซด์ซึ่งประเภท High affinity to ammonia แต่ไม่พบกลุ่ม Low affinity to ammonia นั้นสอดคล้องกับผลทางจลนพลศาสตร์ที่วิเคราะห์ได้ในการทดลองช่วงที่ 2 (K_S ของครั้งที่ 1-4 ของการทดลองช่วงที่ 2 มีค่าเท่ากับ 0.25 ± 0.20 mg-N/L, 1.78 ± 0.56 mg-N/L, 1.14 ± 0.37 mg-N/L และ 1.36 ± 0.66 mg-N/L ตามลำดับ) ถึงแม้จะมีการเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียที่เดิมเข้าสู่ระบบ แต่มีความเป็นไปได้ว่าในระบบจะมีจุลินทรีย์แอมโมเนียออกไซด์ซึ่งที่มีปริมาณมากซึ่งสามารถลดความเข้มข้นแอมโมเนียอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ภายในระบบยังคงมีความเข้มข้นแอมโมเนียที่ต่ำ ซึ่งส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แอมโมเนียออกไซด์ซึ่งกลุ่ม High affinity to ammonia



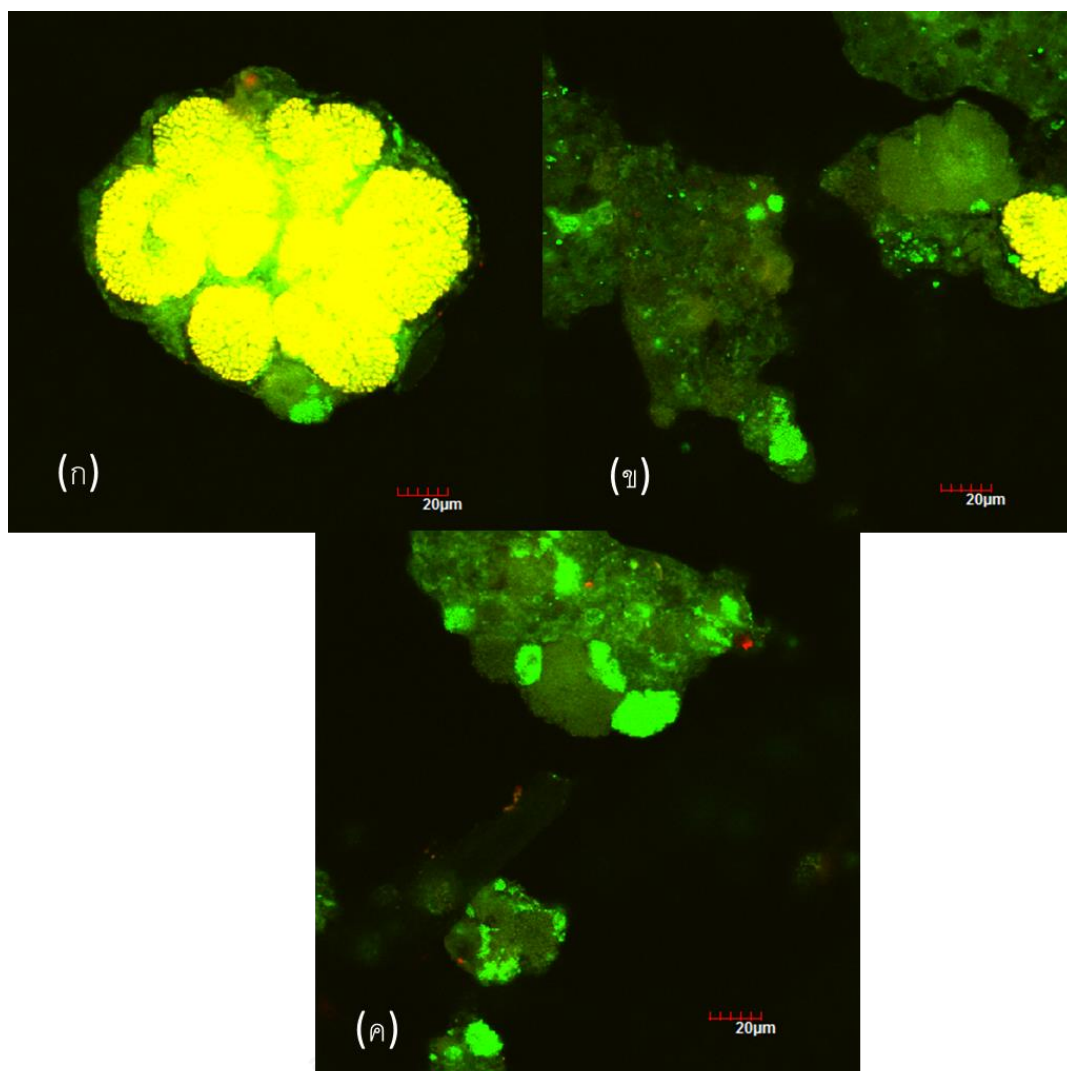
รูปที่ 4.50 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ B เมื่อสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/L เป็น 50 mg-N/L ในการทดลองช่วงที่ 2 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Cluster6a192 (*Nitrosomonas oligotropha* lineage) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (Ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว) ส่วนที่เป็นสีเหลือง-ส้ม แสดงให้เห็นถึงจุดที่ทั้ง 2 probe ซ้อนทับกัน

หลังจากที่ทำการวิเคราะห์จุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงแล้ว ขั้นตอนต่อไปจึงทำการวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรทออกซิไดซิง โดยในขั้นต้นได้ทำการวิเคราะห์ไนโตรทออกซิไดซิงแบบคทีเรียชนิด *Nitrospira* ซึ่งเป็นกลุ่ม High affinity to nitrite โดยใช้ probe Ntspa662

(*Nitrospira*) โดย label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) ร่วมกับกับ probe Nso190 ซึ่งเป็น probe แอมโมเนีย ออกซิไดซ์แบคทีเรียใน Betaproteobacteria

ผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงไนโตรทออกซิไดซ์แบคทีเรียชนิด *Nitrospira* ภายในระบบถังปฏิกรณ์ B ภายหลังจากการสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l โดยในช่วงการทดลองครั้งที่ 2 นี้ไนโตรทออกซิไดซ์แบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงการทดลองครั้งที่ 1 ที่ทำการป้อนด้วยแอมโมเนียความเข้มข้น 1 mg-N/l โดยจากผลการศึกษาพารามิเตอร์ในการทดลองครั้งที่ 2 ค่า K_s ของไนโตรทออกซิไดซ์แบคทีเรียของถังปฏิกรณ์ B มีค่าอยู่ในช่วงกลุ่ม High affinity to nitrite มาโดยตลอด (K_s ของการทดลองครั้งที่ 1-4 มีค่าเท่ากับ 1.30 ± 0.66 mg-N/l, 1.29 ± 0.39 mg-N/l, 1.30 ± 0.41 mg-N/l และ 2.32 ± 0.65 mg-N/l ตามลำดับ) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษากลุ่มประชากรไนโตรทออกซิไดซ์แบคทีเรีย โดยจากผลทั้งจลนพลศาสตร์และกลุ่มประชากรทำให้สามารถสรุปได้ว่า ในการทดลองครั้งที่ 2 ไนโตรทออกซิไดซ์แบคทีเรียกลุ่ม *Nitrospira* เป็นกลุ่มประชากรหลักภายในระบบดังแสดงในรูปที่ 4.51 (ก) และ (ข) อย่างไรก็ตามยังคงมีบางพื้นที่ที่ไม่สามารถค้นพบไนโตรทออกซิไดซ์แบคทีเรียกลุ่ม *Nitrospira* ดังเช่นในรูปที่ 4.51 (ค)

อย่างไรก็ดีการพบกลุ่มไนโตรทออกซิไดซ์แบคทีเรียชนิด *Nitrospira* ของถังปฏิกรณ์ B(50 mg-N/l) ยังคงมีลักษณะคล้ายคลึงกับการพบไนโตรทออกซิไดซ์แบคทีเรียดังที่กล่าวมาก่อนหน้านี้ ตรงที่จะไม่เห็นจุดของไนโตรทออกซิไดซ์แบคทีเรียเป็นจุดเดี่ยวๆ แต่จะเห็นเป็นสัญญาณซ้อนทับกันเป็น 2 สีระหว่าง probe Ntspa662 (Labeled Cy3-Red) และ probe Nso190 (Labeled-Alexa488-Green) ซึ่งเป็น probe ของแอมโมเนียออกซิไดซ์แบคทีเรีย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ ไนโตรทออกซิไดซ์แบคทีเรียมักพบอยู่ในตำแหน่งที่ใกล้กับจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ ซึ่งการคงอยู่ของแบคทีเรียเหล่านี้ อาจมีการซ้อนทับกันจนเห็นเป็นตำแหน่งเดียวกัน หรืออาจเกิดจากการที่ probe Nso190 ไม่สามารถถูกล้างออกจนหมดทำให้เห็นเป็นสีเหลืองส้ม

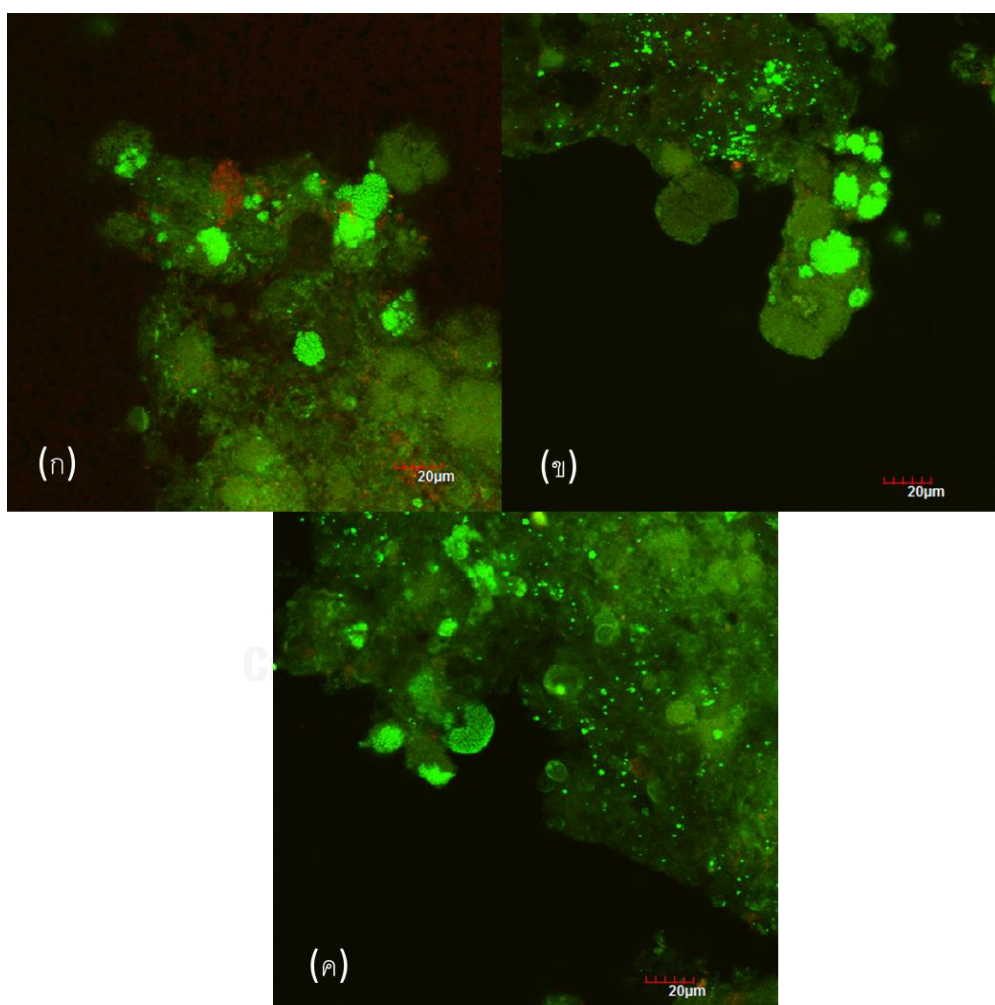


CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 4.51 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ B ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/L เป็น 50 mg-N/L ในการทดลองช่วงที่ 2 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Ntspa662 (*Nitrospira*) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (*Ammonia-oxidizing bacteria*) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว) ส่วนที่เป็นสีเหลือง-ส้มแสดงให้เห็นถึงจุดที่ทั้ง 2 probe ซ้อนทับกัน

หลังจากทำการศึกษาแบคทีเรียชนิด *Nitrospira* ซึ่งเป็นไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียกลุ่ม High affinity to nitrite แล้วขั้นต่อไปจึงทำการศึกษากลุ่มไนโตรทออกซิไดซิงแบคทีเรียกลุ่ม Low affinity to nitrite ซึ่งได้แก่ชนิด *Nitrobacter* โดยใช้ probe Nit3 (Labeled Cy3-Red) ร่วมกับกับ probe Nso190 (Labeled Alexa488- Green) ซึ่งเป็น probe แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียใน Betaproteobacteria

จากผลการทดลองพบว่าภายในถังปฏิกรณ์ B ไม่พบไนโตรทออกซิไดซึ่งแบคทีเรียชนิด *Nitrobacter* ซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่ม Low affinity to nitrite โดยสาเหตุอาจเนื่องมาจากการที่ไนโตรทในระบบนั้นค่อนข้างมีค่าลดต่ำลงตลอดการทดลอง ส่งผลให้ไนโตรทออกซิไดซึ่งแบคทีเรียกลุ่ม Low affinity to nitrite ไม่สามารถอยู่ในระบบได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลทางจลนพลศาสตร์ในการทดลองช่วงที่ 2 ซึ่งค่า K_S ของไนโตรทอยู่ในช่วงต่ำ (K_S ของการทดลองครั้งที่ 1-4 ในการทดลองช่วงที่ 2 มีค่าเท่ากับ 1.30 ± 0.66 mg-N/l, 1.29 ± 0.39 mg-N/l, 1.30 ± 0.41 mg-N/l และ 2.32 ± 0.65 mg-N/l ตามลำดับ) ดังรูปที่ 4.52



รูปที่ 4.52 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบถังปฏิกรณ์ B เมื่อสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l ในการทดลองช่วงที่ 2 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe Nit3 (*Nitrobacter*) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3 (สีแดง) และ probe Nso190 (Ammonia-oxidizing bacteria) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa Flour488 (สีเขียว) ส่วนที่เป็นสีเหลือง-ส้มแสดงให้เห็นถึงจุดที่ทั้ง 2 probe ซ้อนทับกัน

4.3 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางจลนพลศาสตร์และกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ภายหลังสลับความเข้มข้นแอมโมเนีย

จากผลการทดลองพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่งของทั้ง 2 ช่วงการทดลองสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.5 และ 4.6

ตารางที่ 4.5 สรุปผลพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่งตลอดการทดลองของถังปฏิกรณ์ A (การทดลองช่วงที่ 1 ป้อนด้วยแอมโมเนียความเข้มข้น 50 mg-N/L, การทดลองช่วงที่ 2 ป้อนด้วยแอมโมเนียความเข้มข้น 1 mg-N/L)

พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์	การทดลองช่วงที่ 1	การทดลองช่วงที่ 2			
		ครั้งที่ 1 (หลังลดความเข้มข้น 6 วัน)	ครั้งที่ 2 (หลังลดความเข้มข้น 20 วัน)	ครั้งที่ 3 (หลังลดความเข้มข้น 47 วัน)	ครั้งที่ 4 (หลังลดความเข้มข้น 95 วัน)
อัตราการใช้แอมโมเนียจำเพาะสูงสุด (q_{max}) (mg-N/mgMLVSS.hr)	0.128 ± 0.018	0.091 ± 0.0096	0.035 ± 0.0026	0.016 ± 0.001	0.029 ± 0.0017
ค่า Half saturation constant (K_s) (mg-N/L)	8.79 ± 3.82	1.50 ± 0.94	0.87 ± 0.43	0.76 ± 0.25	1.41 ± 0.34
**MLVSS (mgMLVSS/m ²)	314	75	46	129	101
R^2	0.90	0.68	0.75	0.89	0.92

ตารางที่ 4.6 สรุปผลพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซึ่งตลอดการทดลองของถังปฏิกรณ์ B (การทดลองช่วงที่ 1 ป้อนด้วยแอมโมเนียความเข้มข้น 1 mg-N/L, การทดลองช่วงที่ 2 ป้อนด้วยแอมโมเนียความเข้มข้น 50 mg-N/L)

พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์	การทดลองช่วงที่ 1	การทดลองช่วงที่ 2			
		ครั้งที่ 1 (หลังเพิ่มความเข้มข้น 6 วัน)	ครั้งที่ 2 (หลังเพิ่มความเข้มข้น 20 วัน)	ครั้งที่ 3 (หลังเพิ่มความเข้มข้น 47 วัน)	ครั้งที่ 4 (หลังเพิ่มความเข้มข้น 95 วัน)
อัตราการใช้ แอมโมเนียจำเพาะสูงสุด (q_{max}) (mg-N/mgMLVSS.hr)	0.0089 ± 0.0007	0.203 ± 0.014	0.320 ± 0.017	0.153 ± 0.0072	0.149 ± 0.0012
ค่า Half saturation constant (K_s) (mg-N/L)	1.19 ± 0.47	0.25 ± 0.20	1.78 ± 0.56	1.14 ± 0.37	1.36 ± 0.66
**MLVSS (mgMLVSS/m ³)	157	39.5	39.5	86	115
R ²	0.91	0.69	0.88	0.87	0.78

จากผลการทดลองพบว่าลักษณะทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซึ่งในช่วงการทดลองช่วงที่ 1 ของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) และ ถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L) มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนทั้งค่าอัตราการใช้แอมโมเนียจำเพาะสูงสุด (q_{max}) (ถังปฏิกรณ์ A $q_{max} = 0.128 \pm 0.018$ mg-N/mgMLVSS.hr, ถังปฏิกรณ์ B $q_{max} = 0.0089 \pm 0.0007$ mg-N/mgMLVSS.hr) และค่า K_s ของแอมโมเนีย (ถังปฏิกรณ์ A $K_s = 8.79 \pm 3.82$ mg-N/L, ถังปฏิกรณ์ B $K_s = 1.19 \pm 0.47$ mg-N/L) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษากลุ่มประชากรของทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์ (รูปที่ 4.11 ถึง 4.13 และ รูปที่ 4.16 ถึง 4.18) ในถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) พบแอมโมเนียออกซิไดซึ่งแบคทีเรียชนิด *Nitrosomonas europaea* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ประเภท Low affinity to ammonia ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L) ไม่พบจุลินทรีย์ชนิดดังกล่าว ทำให้อาจสามารถสรุปได้ว่า จุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซึ่ง ประเภท Low affinity to ammonia ส่งผลให้ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) มีค่าสูงกว่าถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L) อย่างไรก็ตามในถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) ยังพบว่ามียูลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซึ่ง ชนิด *Nitrosomonas oligotropha* lineage ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ประเภท High affinity to ammonia อยู่ในปริมาณใกล้เคียงกับ ชนิด *Nitrosomonas*

europaea ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่ม High affinity to ammonia คาดว่าสามารถอาศัยร่วมอยู่ได้ในระบบ เนื่องจากในระบบที่ละเท่นั้นย่อมมีช่วงเวลาที่แอมโมเนียถูกใช้ไปจนเหลือความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำมากในระบบ อย่างไรก็ตามผลทางจลนพลศาสตร์ของถังปฏิกรณ์ A ในการทดลองช่วงที่ 1 ($K_s = 8.79 \pm 3.82$ mg-N/l) นั้นสื่อถึงลักษณะทางจลนพลศาสตร์ของกลุ่ม Low affinity to ammonia เป็นหลัก

ในการทดลองช่วงที่ 2 ภายหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/l เป็น 1 mg-N/l ในถังปฏิกรณ์ A และจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l ในถังปฏิกรณ์ B และค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของถังปฏิกรณ์ A ภายหลังลดความเข้มข้นแอมโมเนียเป็น 1 mg-N/l มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ตั้งแต่เวลาผ่านไป 6 วันภายหลังลดความเข้มข้นแอมโมเนีย โดยค่า K_s ของแอมโมเนียลดลงอย่างชัดเจนจากการทดลองช่วงที่ 1 ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ B ซึ่งเพิ่มความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l มีค่าอัตราการใช้แอมโมเนียจำเพาะสูงสุด (q_{max}) สูงขึ้น ตั้งแต่ช่วงเริ่มการทดลอง ในขณะที่ค่า K_s กลับไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนักตลอดการทดลองในช่วงที่ 2 แม้จะผ่านไปนานถึง 95 วันหลังจากสลับความเข้มข้นแอมโมเนีย

สำหรับถังปฏิกรณ์ A ภายหลังลดความเข้มข้นแอมโมเนียเป็น 1 mg-N/l ผลทางจลนพลศาสตร์และผลการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ค่อนข้างมีความสอดคล้องกัน เนื่องจากจุลินทรีย์ชนิด *Nitrosomonas europaea* มีจำนวนลดลงอย่างมากในถังปฏิกรณ์ A ซึ่งมีแนวโน้มที่จะส่งผลต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ทั้งค่า q_{max} และ ค่า K_s อย่างชัดเจน ในส่วนของถังปฏิกรณ์ B ภายหลังเพิ่มความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/l เป็น 50 mg-N/l ผลของค่า K_s ที่ไม่มีการเพิ่มขึ้นสามารถอธิบายได้จากผลการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิง (รูปที่ 4.48 ถึง 4.50) โดยสาเหตุอาจเนื่องมาจากการที่ไม่พบแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียชนิด *Nitrosomonas europaea* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ประเภท Low affinity to ammonia แต่กลับพบเฉพาะแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียกลุ่ม High affinity to ammonia เป็นหลัก ทั้งนี้อาจมีความเป็นไปได้ว่าในระบบนั้นไม่มีแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียกลุ่ม Low affinity to ammonia ตั้งแต่ต้นและแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียกลุ่ม High affinity to ammonia สามารถปรับตัวเข้ากับปริมาณแอมโมเนียที่เติมเข้าสู่ระบบที่เพิ่มสูงขึ้นได้ โดยแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียกลุ่ม High affinity to ammonia อาจมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นและสามารถใช้แอมโมเนียได้อย่างรวดเร็วส่งผลให้แอมโมเนียในระบบยังคงต่ำ ซึ่งเหมาะสมกับแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียกลุ่ม High affinity to ammonia

นอกจากนี้จากการทดลองทั้ง 2 ช่วงยังทำให้ทราบว่า ผลของการเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยความเข้มข้นของแอมโมเนียที่แตกต่างกันส่งผลต่อขนาดของฟลอคจุลินทรีย์อย่างชัดเจนโดยการทดลองช่วงที่ 1 ถังปฏิกรณ์ A ซึ่งเลี้ยงด้วยความเข้มข้นแอมโมเนียสูง (50 mg-N/l) มีขนาดของฟลอคที่ใหญ่กว่าถังปฏิกรณ์ B ซึ่งเลี้ยงด้วยความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำ (1 mg-N/l) อย่างชัดเจน ในขณะที่ในการทดลองช่วงที่ 2 ถังปฏิกรณ์ B ซึ่งเพิ่มความเข้มข้นแอมโมเนียเป็น 50 mg-N/l มีขนาดของฟลอคที่ใหญ่

ขึ้นในขณะที่ถึงปฏิกรณ์ A ซึ่งลดความเข้มข้นแอมโมเนียเป็น 1 mg-N/l มีขนาดที่เล็กลง โดยผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียที่มีต่อฟลอคนี้เข้าไปในลักษณะเดียวกับงานวิจัยของ Munz และคณะ (2012) ที่ทำการวิเคราะห์ลักษณะของฟลอคในถึงปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียต่างกัน

จากผลการทดลองพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซ์ซึ่งในทั้ง 2 ช่วงการทดลองสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.7 และ 4.8

ตารางที่ 4.7 สรุปผลพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซ์ซึ่งตลอดการทดลองของถึงปฏิกรณ์ A (การทดลองช่วงที่ 1 ป้อนด้วยแอมโมเนียความเข้มข้น 50 mg-N/l, การทดลองช่วงที่ 2 ป้อนด้วยแอมโมเนียความเข้มข้น 1 mg-N/l)

พารามิเตอร์ทาง จลนพลศาสตร์	การทดลองช่วงที่ 1	การทดลองช่วงที่ 2			
		ครั้งที่ 1 (หลังลด ความเข้มข้น 6 วัน)	ครั้งที่ 2 (หลังลด ความเข้มข้น 20 วัน)	ครั้งที่ 3 (หลังลด ความเข้มข้น 47 วัน)	ครั้งที่ 4 (หลังลด ความ เข้มข้น 95 วัน)
อัตราการใช้ไนโตรที่ จำเพาะสูงสุด (q_{max}) (mg-N/mgMLVSS.hr)	0.048 ± 0.0045	0.120 ± 0.013	0.019 ± 0.0002	0.0040 ± 0.0003	0.012 ± 0.002
ค่า Half saturation constant(K_s) (mg-N/l)	2.57 ± 1.00	3.26 ± 1.42	1.46 ± 0.93	0.24 ± 0.13	3.78 ± 2.17
**MLVSS (mgMLVSS/m ²)	314	75	46	129	101
R ²	0.83	0.90	0.76	0.79	0.76

ตารางที่ 4.8 สรุปผลพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรโทออกซิไดซิงตลอดการทดลองของถังปฏิกรณ์ B (การทดลองช่วงที่ 1 ป้อนด้วยแอมโมเนียความเข้มข้น 1 mg-N/L, การทดลองช่วงที่ 2 ป้อนด้วยแอมโมเนียความเข้มข้น 50 mg-N/L)

พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์	การทดลองช่วงที่ 1	การทดลองช่วงที่ 2			
		ครั้งที่ 1 (หลังเพิ่มความเข้มข้น 6 วัน)	ครั้งที่ 2 (หลังเพิ่มความเข้มข้น 20 วัน)	ครั้งที่ 3 (หลังเพิ่มความเข้มข้น 47 วัน)	ครั้งที่ 4 (หลังเพิ่มความเข้มข้น 95 วัน)
อัตราการใช้นิโตรเจนจำเพาะสูงสุด (q_{max}) (mg-N/mgMLVSS.hr)	0.0086 ± 0.0009	0.163 ± 0.016	0.357 ± 0.019	0.136 ± 0.0069	0.161 ± 0.0085
ค่า Half saturation constant (K_s) (mg-N/L)	1.34 ± 0.80	1.30 ± 0.66	1.29 ± 0.39	1.30 ± 0.41	2.32 ± 0.65
**MLVSS (mgMLVSS/m ²)	157	39.5	39.5	86	115
R ²	0.82	0.81	0.91	0.89	0.89

จากการทดลองทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรโทออกซิไดซิงในการทดลองช่วงที่ 1 ของถังปฏิกรณ์ A ซึ่งป้อนด้วยแอมโมเนีย 50 mg-N/L และ B ซึ่งป้อนด้วยแอมโมเนีย 1 mg-N/L อัตราการใช้นิโตรเจนจำเพาะสูงสุดมีค่าแตกต่างกันอย่างมาก (q_{max} ถังปฏิกรณ์ A = 0.048 ± 0.045 mg-N/mgMLVSS.hr, q_{max} ถังปฏิกรณ์ B = 0.0086 ± 0.0009 mg-N/mgMLVSS.hr) อย่างไรก็ตามดังที่เคยอธิบายไว้ว่าค่า q_{max} ในที่นี้ไม่สามารถสื่อความหมายได้ชัดเจน เนื่องจากปริมาณ MLVSS ที่วัดนั้นครอบคลุมสารอินทรีย์ทั้งหมดและจุลินทรีย์ทุกกลุ่มในขณะที่จุลินทรีย์กลุ่มไนโตรโทออกซิไดซิงจริงๆ ในระบบมีปริมาณต่ำมาก ในส่วนของค่า K_s นั้นมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก (K_s ของถังปฏิกรณ์ A = 2.57 ± 1.00 , K_s ของถังปฏิกรณ์ B = 1.34 ± 0.80 mg-N/L) และอยู่ในช่วงที่สอดคล้องกับจุลินทรีย์ไนโตรโทออกซิไดซิงกลุ่ม High affinity to nitrite ทั้งนี้ความเข้มข้นของไนโตรเจนในระบบที่มีค่อนข้างต่ำตลอดการทดลองซึ่งส่งเสริมการดำรงอยู่และทำงานของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรโทออกซิไดซิงกลุ่ม High affinity to nitrite อย่างไรก็ตามหากเปรียบเทียบกับผลการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในระบบใน

การทดลองช่วงที่ 1 จะพบว่า ในถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) มีจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซ์อยู่ในปริมาณที่มากกว่าอย่างชัดเจน โดยภายในระบบถังปฏิกรณ์ A พบไนโตรที่ออกซิไดซ์แบคทีเรียชนิด *Nitrobacter* ซึ่งเป็นแบคทีเรียประเภท Low affinity to nitrite นอกจากนี้ยังพบชนิด *Nitrospira* ที่เป็นแบคทีเรียประเภท High affinity to nitrite โดยมีจำนวนไม่แตกต่างกับชนิด *Nitrobacter* มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L) ที่แทบไม่พบสัญญาณ fluorescence ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซ์เลยแม้แต่น้อย ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซ์มีจำนวนน้อยมากทำให้สัญญาณ fluorescence อาจไม่ชัดเจน อย่างไรก็ตามการที่ค่า K_S ของทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์มีค่าไม่แตกต่างกันมากนักจึงอาจสื่อถึงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซ์ที่คล้ายคลึงกันในถังปฏิกรณ์ A และถังปฏิกรณ์ B

ในการทดลองช่วงที่ 2 ภายหลังจากการสลับความเข้มข้นแอมโมเนียค่าอัตราการใช้ในไนโตรที่จำเพาะ (q_{max}) สูงสุดของถังปฏิกรณ์ A ซึ่งปรับลดความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L มีค่าลดลงตามลำดับในขณะที่ค่า K_S มีค่าค่อนข้างกว้าง ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ B ซึ่งเพิ่มความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 1 mg-N/L เป็น 50 mg-N/L ค่า q_{max} มีค่าสูงขึ้นตั้งแต่ช่วงเริ่มการทดลองในขณะที่ค่า K_S แทบไม่มีการเปลี่ยนแปลง โดยเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในการทดลองช่วงที่ 2 แล้ว ในถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) ยังคงตรวจพบไนโตรที่ออกซิไดซ์แบคทีเรียชนิด *Nitrobacter* ซึ่งเป็นกลุ่ม Low affinity to nitrite ถึงแม้จะมีการลดแอมโมเนียที่เติมลงสู่ระบบแล้ว ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L) สามารถตรวจพบไนโตรที่ออกซิไดซ์แบคทีเรียชนิด *Nitrospira* เป็นจำนวนมากและเห็นเป็นกลุ่มฟล็อกที่ชัดเจนยิ่งขึ้นเมื่อเทียบกับการทดลองที่ 1 อย่างไรก็ตามในการทดลองช่วงที่ 2 ยังคงไม่พบไนโตรที่ออกซิไดซ์แบคทีเรียชนิด *Nitrobacter* แม้ความเข้มข้นของแอมโมเนียจะเพิ่มสูงขึ้นซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ว่า ชนิด *Nitrobacter* อาจไม่มีอยู่ในระบบตั้งแต่แรกและค่าไนโตรที่ในระบบมีค่าต่ำอยู่ตลอดการทดลองจึงไม่สามารถแข่งขันสู้กับชนิด *Nitrospira* ซึ่งเป็นกลุ่ม High affinity to nitrite ได้

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาด้วยเทคนิค FISH สัญญาณจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซ์ที่พบนั้นซ้อนทับกับสัญญาณของแอมโมเนียออกซิไดซ์แบคทีเรียจนเห็นเป็นจุดเดียวกันในทุกจุด ซึ่งอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากการที่ probe Nso190 (Labeled-Alexa488-Green) ซึ่งเป็น probe สำหรับวิเคราะห์แอมโมเนียออกซิไดซ์แบคทีเรียอาจถูกล้างออกไม่หมดทำให้มีบางส่วนติดค้างอยู่และเมื่อทำการ hybridize probe ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซ์จึงทำให้เห็นเป็นจุดเดียวกับแอมโมเนียออกซิไดซ์แบคทีเรีย นอกจากนี้การวัดอัตราส่วนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดยังคงทำได้ยากเนื่องจากอัตราส่วนของจุลินทรีย์ไม่คงที่ในแต่ละจุด เช่น บางพื้นที่พบเป็นจำนวนมากในขณะที่บางพื้นที่ไม่พบเลย ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้ยังไม่สามารถวิเคราะห์อัตราส่วนประชากรได้อย่างแม่นยำ

อีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สัญญาณ fluorescence ของ probe แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งแบคทีเรีย (Nso190) ซึ่ง label ด้วยสี Alexa 488(เขียว) และ probe ของไนโตรทออกซิไดซ์ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 สกุล (Nit3 – genus *Nitrobacter*), (Ntspa662 – genus *Nitrospira*) ซึ่ง label ด้วยสี Cy3(แดง) มีค่า Emission wavelength ที่ความยาวคลื่นใกล้เคียงกัน ซึ่งหากเปรียบเทียบระหว่าง แสงสีเขียวและแสงสีแดงแล้ว แสงสีเขียวมีช่วงการปลดปล่อยคลื่นแสง (Emission wavelength) อยู่ในช่วง 490-590 nm และสีแดงอยู่ในช่วง 570-670 nm ซึ่งแสดงให้เห็ดังรูปที่ 4.53

Name	Ex[nm]	Em[nm]
General		
Blue	405	420-520
Blue-Narrow	405	420-460
Green	473	490-590
Green-Narrow	473	490-540
Red	559	570-670
Red-Narrow	559	570-620
FarRed	635	660-760
FarRed-Narrow	635	660-710
A		
Acridine Orange/DNA	502	526
Alexa Fluor 405	401	422
Alexa Fluor 488	499	520
Alexa Fluor 546	557	572
Alexa Fluor 568	577	603
Alexa Fluor 594	590	618
Alexa Fluor 633	631	647
Alexa Fluor 647	653	668
Azami Green	493	505
C		
Calcium Crimson	589	609
Calcium Green-1	506	529
Calcium Green-2	506	529
Calcium Green-5N	506	529
Calcium Orange	549	574
Calcium Orange-5N	549	574
Cy2	490	504
Cy3	547	567
Cy3.5	578	592
Cy5	645	664
Cy5.5	673	693

รูปที่ 4.53 ตารางแสดงค่า excitation wavelength และ emission wavelength ของสี fluorescence ของกล้อง fluorescence confocal รุ่น OLYMPUS-FLUOVIEW-FV10i

ซึ่งจะเห็นได้ว่าสีทั้ง 2 นั้นมีบางช่วงที่ค่าความยาวคลื่นทับกัน ทำให้ในรูปที่ได้จากแต่ละ filter อาจมีพื้นที่บางส่วนที่อาจซ้อนทับกันจนเห็นคล้ายเป็นจุดเดียวกัน เมื่อนำภาพจากทั้ง 2 filter มารวมกันภาพที่เห็นจึงเห็นเป็นสีผสมระหว่าง เขียว และ แดง(เหลือง) ในขณะที่สี Alexa488 มีค่า emission wavelength ที่ 520 nm และสี Cy3 อยู่ในช่วง 567 nm ซึ่งทำให้ทั้ง 2 สีเกิดการ spectral

overlap กันและกันขึ้น โดยการที่ทั้ง 2 สีมี่ค่า wavelength emission ที่ค่าใกล้เคียงกันก็ช่วยสนับสนุนสมมติฐานดังกล่าวมากยิ่งขึ้น

อย่างไรก็ดีเนื่องจากตัวอย่างที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FISH นั้นอาจมีความหนาของ biofilm ที่มากทำให้สัญญาณ fluorescence ของทั้ง แอมโมเนียออกซิไดซ์แบคทีเรีย และ ไนโตรออกซิไดซ์แบคทีเรียในแต่ละชั้นส่งสัญญาณออกมาซ้อนกันอยู่ในภาพเดียวกันจนมองเห็นเป็นสัญญาณ 2 สีผสมกันได้เช่นกัน (Microscopy resource center, 2012)

** วิธีการคำนวณ MLVSS ในหน่วยของ mgMLVSS/m² สามารถคำนวณได้ดังสมการที่ 4.1

$$\frac{mgMLVSS}{m^2} = \frac{mgMLVSS}{1\ l\ water} \times \frac{1\ l\ water}{333\ ml\ media} \times \frac{10^6\ ml\ media}{859\ m^2} \quad (4.1)$$

โดยที่ค่าพื้นที่ผิวของตัวกลางพลาสติก BCN-012 KLL สามารถอ้างอิงได้ดังตารางที่ 3.4 และ ปริมาตรของตัวกลางพลาสติก ต่อปริมาตรของน้ำในการทดลองจลนพลศาสตร์ เป็นอัตราส่วน 1:3 หรือ ตัวกลางพลาสติก 333 ml ต่อ ปริมาตรน้ำ 1 ลิตร และการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของจุลินทรีย์บนตัวกลางพลาสติกตั้งอยู่บนสมมติฐานว่าตัวกลางพลาสติกทุกชิ้นมีความเข้มข้นของจุลินทรีย์เท่ากัน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และ ข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากผลงานวิจัยในการทดลองช่วงที่ 1 ซึ่งเป็นการเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบถังปฏิกรณ์แบบที่ละเท 2 ถัง โดยใช้แอมโมเนียความเข้มข้น 50 mg-N/L (ถังปฏิกรณ์ A) และ 1 mg-N/L (ถังปฏิกรณ์ B) พบว่าถังปฏิกรณ์ A และถังปฏิกรณ์ B สามารถทำการบำบัดแอมโมเนีย และไนไตรท์ ได้เป็นอย่างดี โดยที่ลักษณะทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์มีความแตกต่างกันชัดเจนโดยที่ ถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) มีค่าอัตราการใช้แอมโมเนียจำเพาะ (q_{max}) เท่ากับ 0.128 ± 0.018 mg-N/mgMLVSS.hr และค่า Half saturation constant to ammonia (K_S) เท่ากับ 8.79 ± 3.82 mg-N/L ซึ่งมีค่าสูงกว่าถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L) โดย q_{max} ของถังปฏิกรณ์ B มีค่าเท่ากับ 0.0089 ± 0.0007 mg-N/mgMLVSS.hr และมีค่า K_S เท่ากับ 1.19 ± 0.47 mg-N/L จากผลทางจลนพลศาสตร์ทำให้เป็นที่คาดการณ์ว่าในถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) น่าจะมีจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงชนิด Low affinity to ammonia อยู่เป็นจำนวนมาก ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ B (1mg-N/L) คาดว่าน่าจะมีจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงชนิด High affinity to ammonia อยู่เท่านั้น โดยที่ผลการศึกษาจากกลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค Fluorescence in situ hybridization (FISH) ยืนยันว่าพบจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิง ชนิด *Nitrosomonas europaea* ซึ่งเป็นตัวแทนจุลินทรีย์กลุ่ม Low affinity to ammonia ในถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) อยู่ร่วมกับจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิง ชนิด *Nitrosomonas oligotropha* lineage ซึ่งเป็นตัวแทนจุลินทรีย์กลุ่ม High affinity to ammonia ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L) พบจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิง ชนิด *Nitrosomonas oligotropha* lineage ซึ่งเป็นตัวแทนจุลินทรีย์กลุ่ม High affinity to ammonia เท่านั้น และไม่พบชนิด *Nitrosomonas europaea* ซึ่งเป็นตัวแทนจุลินทรีย์กลุ่ม Low affinity to ammonia แต่อย่างใด

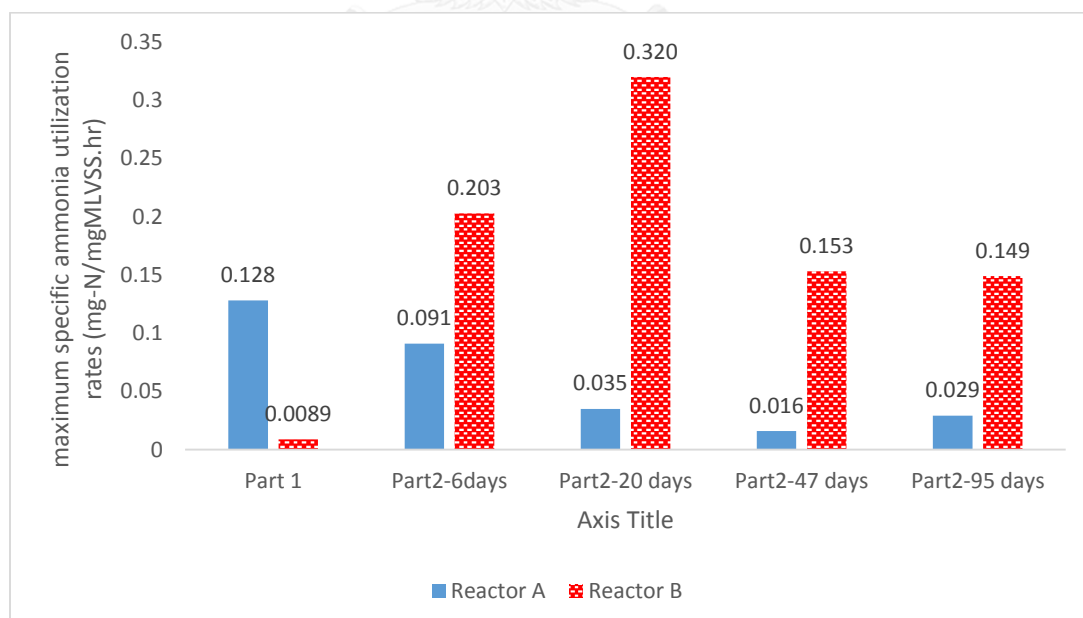
ในขณะที่ลักษณะทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิงของทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์นั้น ค่า Half saturation constant to nitrite (K_S) ของทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์มีค่าใกล้เคียงกัน โดยที่ถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) มีค่า K_S ของไนไตรท์เท่ากับ 2.57 ± 1.00 mg-N/L และถังปฏิกรณ์ B มีค่า K_S ของไนไตรท์เท่ากับ 1.34 ± 0.80 mg-N/L ในขณะที่ค่าอัตราการใช้นิไตรท์จำเพาะของไนไตรท์ (q_{max}) ของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) มีค่าเท่ากับ 0.048 ± 0.0045 mg-N/mgMLVSS.hr ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L) มีค่า q_{max} ของไนไตรท์เท่ากับ 0.0086 ± 0.0009 mg-

N/mgMLSS.hr โดยที่ค่า q_{max} ของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) มีค่ามากกว่าถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L) อย่างมีนัยยะสำคัญ เมื่อใช้เทคนิค FISH ตรวจสอบกลุ่มประชากรจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดส์ซึ่งในระบบแล้วพบว่า ภายในถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) พบไนโตรที่ออกซิไดส์ซึ่งแบคทีเรียชนิด *Nitrobacter* ซึ่งเป็นไนโตรที่ออกซิไดส์ซึ่งแบคทีเรียกลุ่ม Low affinity to nitrite และชนิด *Nitrospira* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดส์ซึ่งกลุ่ม High affinity to nitrite อาศัยอยู่ร่วมกัน ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L) ไม่เจอสัญญาณ fluorescence ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดส์ซึ่งอย่างชัดเจน

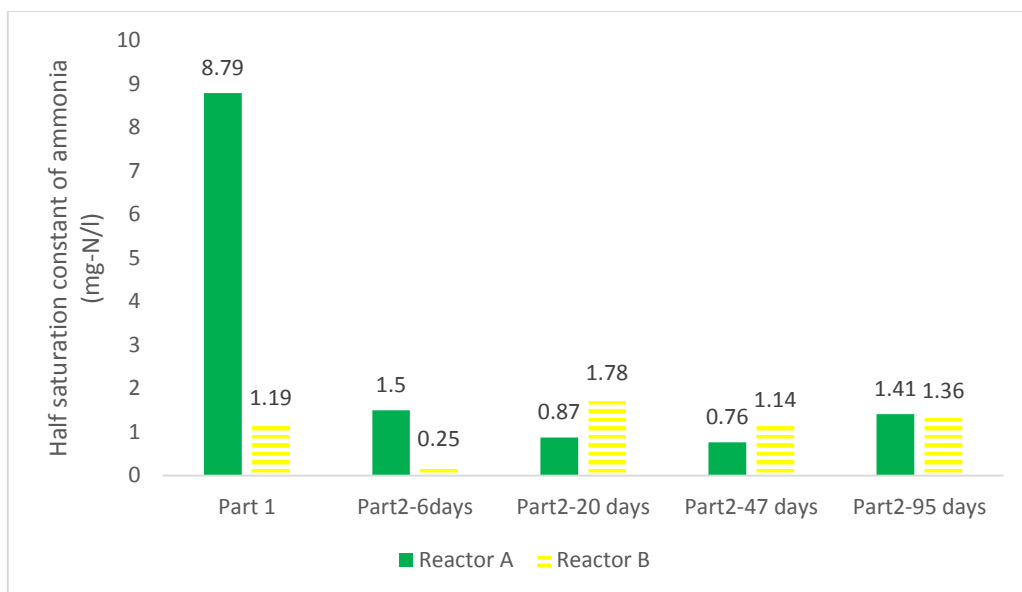
ในการทดลองช่วงที่ 2 หลังจากได้ทำการสลับความเข้มข้นแอมโมเนีย โดยถังปฏิกรณ์ A สลับจากความเข้มข้น 50 mg-N/L เป็น 1 mg-N/L และถังปฏิกรณ์ B สลับจากความเข้มข้น 1 mg-N/L เป็น 50 mg-N/L พบว่าการดำเนินการของถังปฏิกรณ์ยังคงสามารถบำบัดแอมโมเนียและไนโตรที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แสดงให้เห็นว่าการสลับความเข้มข้นแอมโมเนียนั้นไม่มีผลต่อการบำบัดแอมโมเนีย และไนโตรที่ ในขณะที่ลักษณะทางจลนพลศาสตร์ซึ่งได้ทำการทดลองในวันที่ 6, 20, 47 และ 95 ภายหลังจากการสลับความเข้มข้นแอมโมเนีย พบว่าทั้งค่า q_{max} และค่า K_S ของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดส์ซึ่งของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) มีการลดลงอย่างชัดเจนตลอด 4 ครั้งที่ทำกรทดลองทางจลนพลศาสตร์ ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L) q_{max} มีค่าสูงขึ้นทั้ง 4 ครั้งที่ทำกรทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับกรทดลองช่วงที่ 1 ในขณะที่ค่า K_S ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนตลอดกรทดลองทางจลนพลศาสตร์ทั้ง 4 ครั้ง โดยผลการศึกษากลุ่มประชากรด้วยเทคนิค FISH พบว่าภายในถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) จุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดส์ซึ่ง ชนิด *Nitrosomonas europaea* ซึ่งเป็นตัวแทนกลุ่ม Low affinity to ammonia ลดลงจากช่วงกรทดลองที่ 1 อย่างชัดเจน ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L) ยังคงไม่พบจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดส์ซึ่ง ชนิด *Nitrosomonas europaea* ภายในระบบ โดยที่ทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์ยังคงพบจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดส์ซึ่ง ชนิด *Nitrosomonas oligotropha* lineage ซึ่งเป็นตัวแทนจุลินทรีย์กลุ่ม High affinity to ammonia โดยผลการทดลองทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดส์ซึ่งในการทดลองช่วงที่ 2 สามารถแสดงได้ดังตารางที่ 5.1 และผลสรุปของกรทดลองทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดส์ซึ่งทั้ง 2 ช่วงสามารถสรุปได้ดังรูปที่ 5.1 และ 5.2

ตารางที่ 5.1 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ในถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) และถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L) ในการทดลองช่วงที่ 2

ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์	ถังปฏิกรณ์ A(1 mg-N/L)				ถังปฏิกรณ์ B(50 mg-N/L)			
	1 (6 วัน)	2(20 วัน)	3(47 วัน)	4(95 วัน)	1 (6 วัน)	2(20 วัน)	3(47 วัน)	4(95 วัน)
ค่าอัตราการใช้แอมโมเนียจำเพาะสูงสุด (q_{max}) (mg-N/mgMLVSS.hr)	0.091 ± 0.0096	0.035 ± 0.0026	0.016 ± 0.001	0.029 ± 0.0017	0.203 ± 0.014	0.320 ± 0.017	0.153 ± 0.0072	0.149 ± 0.0012
Half saturation to ammonia (K_s) (mg-N/L)	1.50 ± 0.94	0.87 ± 0.43	0.76 ± 0.25	1.41 ± 0.34	0.25 ± 0.20	1.78 ± 0.56	1.14 ± 0.37	1.36 ± 0.66
R^2	0.68	0.75	0.89	0.92	0.69	0.88	0.87	0.78



รูปที่ 5.1 แผนภูมิแท่งสรุปผลการทดลองค่าอัตราการใช้แอมโมเนียสูงสุด (q_{max}) ของถังปฏิกรณ์ A และ B ในการทดลองช่วงที่ 1 และ ช่วงที่ 2

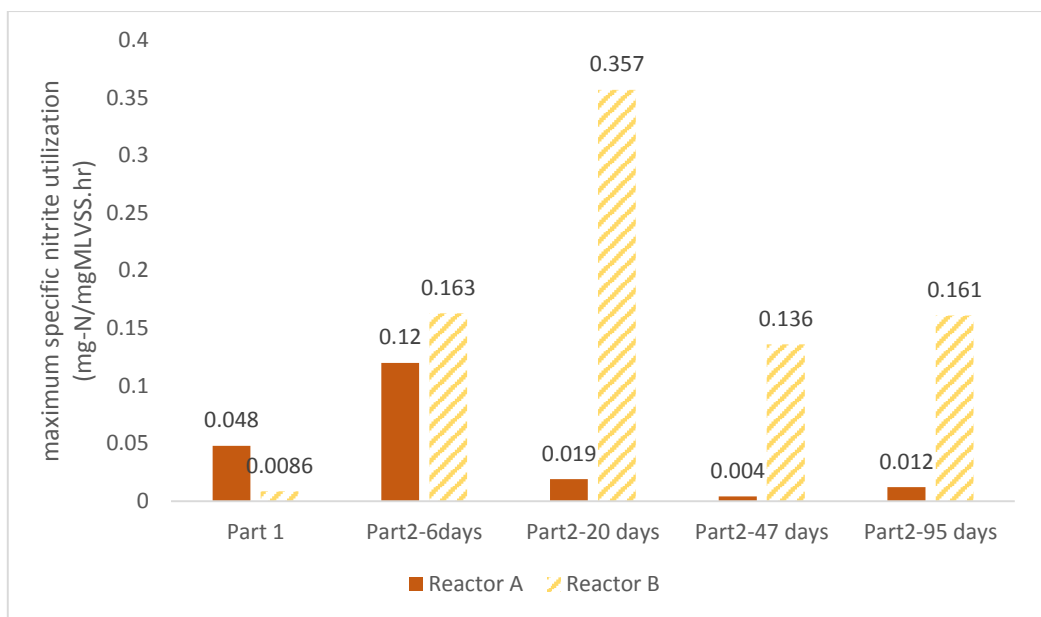


รูปที่ 5.2 แผนภูมิแท่งสรุปผลการทดลองค่า Half saturation to ammonia (K_s) ของถังปฏิกรณ์ A และ B ในการทดลองช่วงที่ 1 และ ช่วงที่ 2

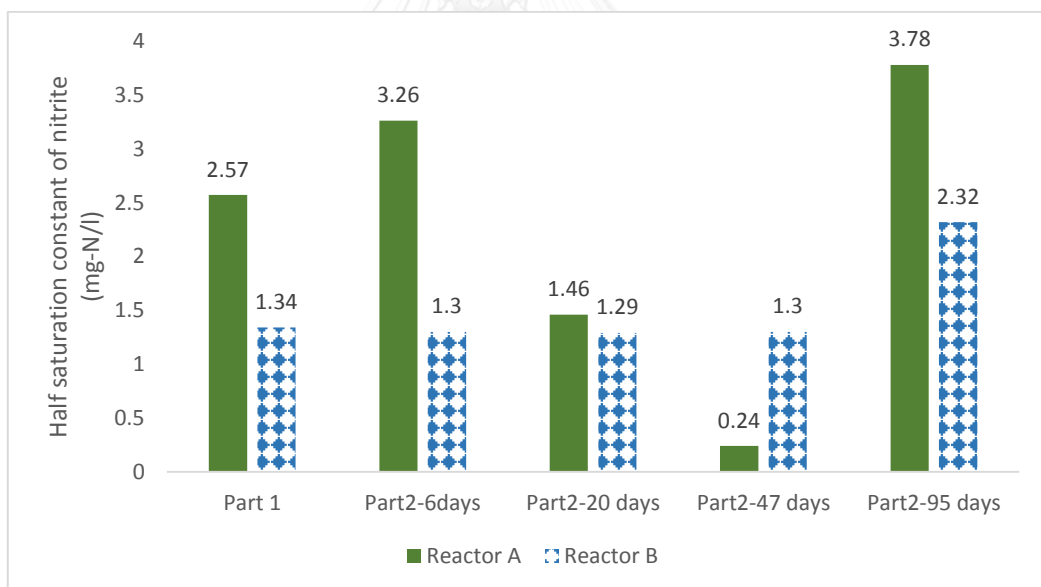
ในขณะที่ลักษณะทางจุลชีววิทยาของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซ์ซึ่งในการทดลองที่ 2 พบว่า ค่า q_{max} ของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l) ลดลงอย่างมีนัยยะสำคัญตลอดช่วงการทดลองทางจุลชีววิทยาทั้ง 4 ครั้งในขณะที่ค่า K_s โดยรวมแล้วไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนมากนักเมื่อเทียบกับการทดลองช่วงที่ 1 ในส่วนของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) พบว่าค่า q_{max} เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญตลอดช่วงการทดลองทางจุลชีววิทยาทั้ง 4 ครั้งในขณะที่ค่า K_s ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองช่วงที่ 1 ผลการทดลองทางจุลชีววิทยาของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซ์ซึ่งในการทดลองช่วงที่ 2 สามารถแสดงได้ดังตารางที่ 5.2 โดยผลการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค FISH พบว่า ในถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l) ไนโตรที่ออกซิไดซ์ซึ่งแบคทีเรียชนิด *Nitrobacter* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซ์ซึ่งกลุ่ม Low affinity to nitrite ลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับการทดลองช่วงที่ 1 และยังคงพบชนิด *Nitrospira* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซ์ซึ่งกลุ่ม High affinity to nitrite ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) พบไนโตรที่ออกซิไดซ์ซึ่งแบคทีเรียชนิด *Nitrospira* แต่ยังคงไม่พบไนโตรที่ออกซิไดซ์ซึ่งแบคทีเรียชนิด *Nitrobacter* โดยที่สัญญาณ fluorescence ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซ์ซึ่งเห็นได้ชัดเจนขึ้นเมื่อเทียบกับการทดลองช่วงที่ 1 โดยผลสรุปของการทดลองทางจุลชีววิทยาของจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ทั้ง 2 ช่วงสามารถสรุปได้ดังรูปที่ 5.3 และ 5.4 และค่า MLVSS ของถังปฏิกรณ์ A และ B ทั้ง 2 ช่วงการทดลองสามารถสรุปได้ดังรูปที่ 5.5

ตารางที่ 5.2 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรที่ออกซิไดซ์ในถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) และถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L) ในการทดลองครั้งที่ 2

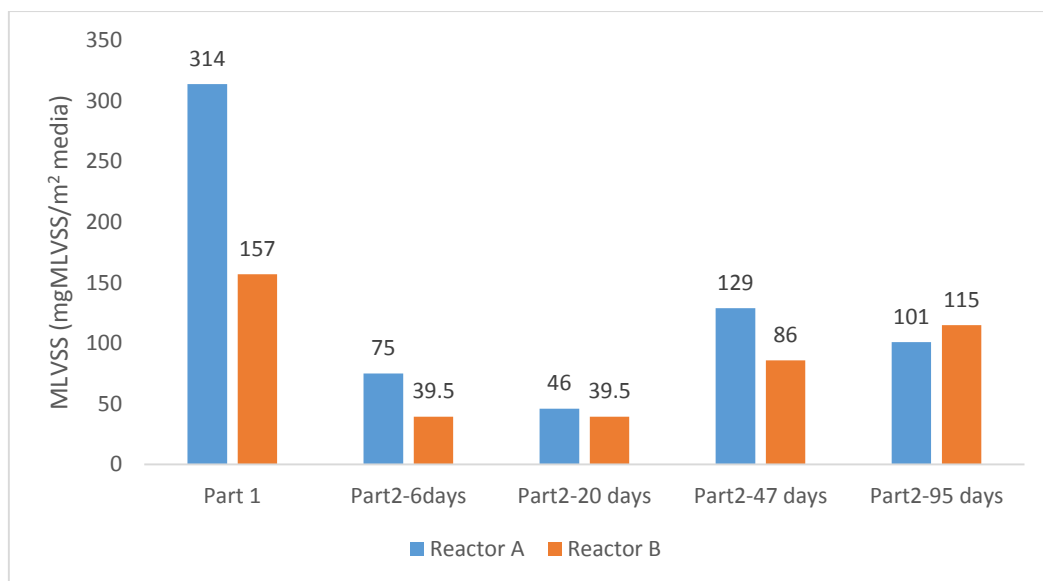
ค่าพารามิเตอร์ ทาง จลนพลศาสตร์	ถังปฏิกรณ์ A(1 mg-N/L)				ถังปฏิกรณ์ B(50 mg-N/L)			
	ครั้งที่ 1 (6 วัน)	2(20 วัน)	3(47 วัน)	4(95 วัน)	1 (6 วัน)	2(20 วัน)	3(47 วัน)	4(95 วัน)
ค่าอัตราการใช้ แอมโมเนีย จำเพาะสูงสุด (q_{max}) (mg- N/mgMLVSS.hr)	0.120 ± 0.013	0.019 ± 0.0002	0.0040 ±0.0003	0.012 ± 0.002	0.163 ± 0.016	0.357 ± 0.019	0.136 ± 0.0069	0.161 ± 0.0085
Half saturation to ammonia (K_s) (mg-N/L)	3.26 ± 1.42	1.46 ± 0.93	0.24 ± 0.13	3.78 ± 2.17	1.30 ± 0.66	1.29 ± 0.39	1.30 ± 0.41	2.32 ± 0.65
R^2	0.90	0.76	0.79	0.76	0.81	0.91	0.89	0.89



รูปที่ 5.3 แผนภูมิแท่งสรุปผลการทดลองค่าอัตราการใช้ไนไตรท์สูงสุด (q_{max}) ของถังปฏิกรณ์ A และ B ในการทดลองช่วงที่ 1 และ ช่วงที่ 2



รูปที่ 5.4 แผนภูมิแท่งสรุปผลการทดลองค่า Half saturation to nitrite (K_s) ของถังปฏิกรณ์ A และ B ในการทดลองช่วงที่ 1 และ ช่วงที่ 2



รูปที่ 5.5 แผนภูมิแท่งแสดงค่า MLVSS ของถังปฏิกรณ์ A และ B ในการทดลองช่วงที่ 1 และช่วงที่ 2

5.2 ประโยชน์ทางวิศวกรรม

ผลที่ได้รับจากงานวิจัยชิ้นนี้สามารถช่วยพัฒนาวิธีการบ่มเพาะเลี้ยงหัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการบำบัดแอมโมเนียและไนโตรที่ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งมักจะมีความเข้มข้นของแอมโมเนียและไนโตรที่ต่ำ โดยจากผลงานวิจัยทำให้ทราบว่าเราสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อในระบบแบบที่ละเทที่ความเข้มข้นแอมโมเนียสูง เพื่อนำไปใช้ในการบำบัดแอมโมเนียและไนโตรที่ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำซึ่งมีความเข้มข้นของแอมโมเนียและไนโตรที่ต่ำได้ ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงหัวเชื้อในระบบแบบที่ละเทด้วยความเข้มข้นแอมโมเนียสูงก่อนนั้นสามารถทำได้โดยง่ายและสามารถช่วยเพิ่มปริมาณหัวเชื้อได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้งานวิจัยชิ้นนี้ยังได้พัฒนาวิธีการบ่มเพาะจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนีย (AOM) และ ไนโตรที่ออกซิไดซิ่ง (NOB) โดยทำการบ่มเพาะที่ความเข้มข้นแอมโมเนียประมาณ 1 mg-N/l เพื่อให้ได้กลุ่มประชากร AOM และ NOB ซึ่งมีค่า K_s ประมาณ 0.76 - 1.50 mg-N/l และ 0.24 - 3.78 mg-N/l ตามลำดับ ทั้งนี้จุลินทรีย์ที่ได้ทำการเลี้ยงสามารถนำไปบำบัดแอมโมเนีย และ ไนโตรที่ในสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียประมาณ 50 mg-N/l ลงไป

5.3 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยชิ้นนี้สามารถชี้ชัดถึงประเด็นในเรื่องของลักษณะการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้ในการบำบัดแอมโมเนีย และไนโตรที่ในระบบเพาะเลี้ยงในสัตว์น้ำ อย่างไรก็ตามก็ยังมีบางประเด็นที่ควรปรับปรุงหรือทำการวิจัยเพิ่มเติม ซึ่งข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคตมีดังนี้

1. ทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ภายในระบบแบบไหลต่อเนื่องแล้วจึงทำการสลับความเข้มข้นเพื่อทดสอบว่าเมื่อทำการทดลองนี้กับระบบที่มีลักษณะใกล้เคียงกับบ่อบำบัดในความเป็นจริงมากขึ้นผลจะเป็นเช่นไร จะแตกต่างจากผลที่ได้จากระบบที่ละเทหรือไม่
2. เพิ่มจำนวน fluorescence probe ที่ใช้ในการทดลองนี้เพื่อที่จะสามารถบ่งบอกกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่มีอยู่ภายในระบบให้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น
3. ศึกษาและทดลองวิธีการ hybridize probe ของจุลินทรีย์กลุ่มไนโตรทีออกซิไดซิ่ง เมื่อใช้ร่วมกับ probe ของ แอมโมเนียออกซิไดซิ่งแบบที่เรีย เพื่อให้สัญญาณ fluorescence ของทั้ง 2 probe สามารถแบ่งแยกกันได้อย่างชัดเจน หรืออาจหา probe ที่เหมาะสมยิ่งขึ้นมาทำการวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค FISH ต่อไป
4. หาวิธีที่สามารถวิเคราะห์อัตราส่วนของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มในระบบ เพื่อให้สามารถระบุชุดถึงข้อมูลเชิงปริมาณได้อย่างชัดเจนมากขึ้น

รายการอ้างอิง

- Alawi, M., Off, S., Kaya, M. and Spieck, E. (2009). Temperature influences the population structure of nitrite-oxidizing bacteria in activated sludge. Environmental microbiology reports **1**(3): 184-190.
- Almstrand, R., Lydmark, P., Sorensson, F. and Hermansson, M. (2011). Nitrification potential and population dynamics of nitrifying bacterial biofilms in response to controlled shifted of ammonium concentrations in wastewater trickling filters. Bioresource Technology **102**: 7685-7691.
- Armstrong, F. (1963). Determination of Nitrate in Water Ultraviolet Spectrophotometry. Analytical Chemistry **35**(9): 1292-1294.
- Blackburne, R., Vadivelu, V., Yuan, Z. and Keller, J. (2007). Kinetic characterization of an enriched *Nitrospira* culture with comparison to *Nitrobacter*. Water Research **41**: 3033-3042.
- Bower, C. E. and Holm-Hansen, T. (1980). A salicylate-hypochlorite method for determining ammonia in seawater. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **37**(5): 794-798.
- Bratton, A. C. and Marshall, E. (1939). A new coupling component for sulfanilamide determination. Journal of Biological Chemistry **128**(2): 537-550.
- Canfield, D. E., Erik, K. and Bo, T. (2005). The Nitrogen cycle. Advances in Marine Biology, Academic Press. **48**: 205-267.

- Cao, H., Li, M., Hong, Y. and Gu, J. D. (2011). Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in polluted mangrove sediment. Systematic and Applied Microbiology **34**: 513-523.
- Cheyns, K., Mertens, J., Diels, J., Smolders, E. and Springael, D. (2010). Monod kinetic rather than a first-order degradation model explains atrazine fate in soil mini-columns : Implications for pesticide fate modelling. Environmental Pollution **158**: 1405-1411.
- Chou, H. H., Huang, J. S., Chen, W. G. and Ohara, R. (2008). Competitive reaction kinetics of sulfate-reducing bacteria and methanogenic bacteria in anaerobic filters. Bioresource Technology **99**: 8061-8067.
- Ciudad, G., Werner, A., Bornhardt, C., Munoz, A. and Antileo, C. (2006). Differential kinetics of ammonia and nitrite-oxidizing bacteria : A simple kinetic study based on oxygen affinity and proton release during nitrification. Process Biochemistry **41**: 1746-1772.
- Cortés-Lorenzo, C., Rodríguez-Díaz, M., Sipkema, D., Juárez-Jiménez, B., Rodelas, B., Smidt, H. and González-López, J. (2015). Effect of salinity on nitrification efficiency and structure of ammonia-oxidizing bacterial communities in a submerged fixed bed bioreactor. Chemical Engineering Journal **266**: 233-240.
- Dytczak, M. A., Londry, K. L. and Oleszkiewicz, J. A. (2008). Activated sludge operational regime has significant impact on the type of nitrifying community and its nitrification rates. Water Research **42**: 2320-2328.
- Huang, Z., Gedalanga, P. B., Asvapathanagul, P. and Olson, B. H. (2010). Influence of physiological and operational parameters on *Nitrobacter* and *Nitrospira* communities in an aerobic activated sludge bioreactor. Water Research **44**: 4351-4358.

- Jime'nez, E., Gime'nez , J. B., Ruano, M. V., Ferrer, J. and Serratta, J. (2011). Effect of pH and nitrite concetnration on nitrite oxidation rate. Bioresource Technology **102**: 8741-8747.
- Jime'nez, E., Gime'nez , J. B., Seco, A., Ferrer, J. and serratta, J. (2012). Effect of pH, substrate and free nitrous acid concentration on ammonium oxidation rate. Bioresource Technology **124**: 478-484.
- Jubany, I., Baeza, J. A., Carrera, J. and Lafuente, J. (2005). Respirometric calibration and validation of a biological nitrite oxidation model including biomass growth and substrate inhibition. Water Research **39**: 4574-4584.
- Jubany, I., Carrera, J., Lafuente, J. and Baeza, J. A. (2008). Start-up of a nitrification system with automatic control to treat highly concentrated ammonium wastewater : Experimental results and modeling. Chemical Engineering Journal **144**: 401-419.
- Jubany, I., Lafuente, J., Baeza, J. A. and Carrera, J. (2009). Total and stable washout of nitrite oxidizing bacteria from a nitrifying continuous activated sludge system using automatic control based on Oxygen Uptake Rate measurements. Water Research **43**: 2761-2772.
- Jung, M.-Y., Park, S.-J., Min, D., Kim, J.-S., Rijpstra, W. I. C., Damsté, J. S. S., Kim, G.-J., Madsen, E. L. and Rhee, S.-K. (2011). Enrichment and characterization of an autotrophic ammonia-oxidizing archaeon of mesophilic crenarchaeal group I. 1a from an agricultural soil. Applied and Environmental Microbiology **77**(24): 8635-8647.
- Kaelin, D., Manser, R., Rieger, L., Eugster, J., Rottermann, K. and Siegrist, H. (2009). Extension of ASM3 for two-step nitrification and denitrification and its

calibration and validation with batch tests and pilot scale data. Water Research **43**: 1680-1692.

Keen, G. and Prosser, J. (1987). Steady state and transient growth of autotrophic nitrifying bacteria. Archives of microbiology **147**(1): 73-79.

Kim, D.-J. and Kim, S.-H. (2006). Effect of nitrite concentration on the distribution and competition of nitrite-oxidizing bacteria in nitrification reactor systems and their kinetic characteristics. Water Research **40**(5): 887-894.

Kindaichi, T., Kawano, Y., Ito, T., Satoh, H. and Okabe, S. (2006). Population dynamics and in situ kinetics of nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by real-time quantitative PCR. Biotechnology and bioengineering **94**(6): 1111-1121.

Lemarie, G., Dosdat, A., Covès, D., Dutto, G., Gasset, E. and Person-Le Ruyet, J. (2004). Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. Aquaculture **229**(1): 479-491.

Li, H., Zhang, Y., Yang, M. and Kamagata, Y. (2013). Effect of hydraulic retention time on nitrification activities and population dynamics of a conventional activated sludge system. Front Environ Sci Eng **7**(1): 43-48.

Limpiyakorn, T., Kurisu, F., Sakamoto, Y. and Yagi, O. (2007). Effects of ammonium and nitrite on communities and populations of ammonia-oxidizing bacteria in laboratory-scale continuous-flow reactors. FEMS microbiology ecology **60**(3): 501-512.

Limpiyakorn, T., Sonthiphand, P., Rongsayamanont, C. and Polprasert, C. (2011). Abundance of *amoA* genes of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge

of full-scale wastewater treatment plants. Bioresource Technology **102**: 3694-3701.

Ma, Y., Wang, L. and Qian, L. (2008). Community structure of β -Proteobacterial ammonia-oxidizing bacteria in prawn farm sediment. Progress in Natural Science **18**: 679-684.

Martens-Habbena, W., Berube, P. M., Urakawa, H., José, R. and Stahl, D. A. (2009). Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. Nature **461**(7266): 976-979.

Metcalf and Eddy, Tchobanoglous, G., Stensel, H. D., Tsuchihashi, R. and Burton, F. (2014). Wastewater engineering : Treatment and resource recovery. Singapore, Mcgraw Hill Education.

Microscopy resource center. Spectral bleed-through artifacts in confocal microscopy. [Online] 2012. Available from: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/bleedthrough.html>. [2016, 30 June]

Munz, G., Lubello, C. and Oleszkiewicz, J. A. (2011). Factors affecting the growth rates of ammonium and nitrite oxidizing bacteria. Chemosphere **83**: 720-725.

Ni, B. J., Fang, F., Xie, W. M. and Yu, H. Q. (2008). Growth, maintenance and product formation of autotrophs in activated sludge : Taking the nitrite-oxidizing bacteria as an example. Water Research **42**: 4261-4270.

Nielsen, P. H., Daims, H. and Lemmer, H. (2009). FISH handbook for biological wastewater treatment. Water Intelligence Online **8**: 9781780401775.

- Park, H. D. and Noguera, D. R. (2004). Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing Bacterial communities in activated sludge. Water Research **38**: 3275-3286.
- Park, H. D. and Noguera, D. (2007). Characterization of two ammonia-oxidizing bacteria isolated from reactors operated with low dissolved oxygen concentrations. Journal of applied microbiology **102**(5): 1401-1417.
- Park, S. and Bae, W. (2009). Modeling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid. Process Biochemistry **44**: 631-640.
- Prosser, J. I. (2006). The ecology of nitrifying bacteria. Biology of the nitrogen cycle: 223.
- Rongsayamanont, C., Limpiyakorn, T., Law, B. and Khan, E. (2010). Relationship between respirometric activity and community of entrapped nitrifying bacteria : Implications for partial nitrification. Enzyme and Microbial Technology **46**: 229-236.
- Schramm, A., De Beer, D., Gieseke, A. and Amann, R. (2000). Microenvironments and distribution of nitrifying bacteria in a membrane-bound biofilm. Environmental Microbiology **2**(6): 680-686.
- Silverman, A. P. and Kool, E. T. (2007). Oligonucleotide probes for RNA-targeted fluorescence *in situ* hybridization. Advances in Clinical Chemistry **43**: 79-115.
- Siripong, S. and Rittmann, B. E. (2007). Diversity study of nitrifying bacteria in full scale wastewater treatment plants. Water Research **41**: 1110-1120.

- Slade, A. H. and Dare, P. H. (1993). Measuring maximum specific growth rate and half saturation coefficient for activated sludge systems using a freeze concentration technique. Water Research **27**: 1793-1795.
- Sonthiphand, P. and Limpiyakorn, T. (2011). Change in ammonia-oxidizing microorganisms in enriched nitrifying activated sludge. Applied microbiology and biotechnology **89**(3): 843-853.
- Sudarno, U., Winter, J. and Gallert, C. (2011). Effect of varying salinity, temperature, ammonia and nitrous acid concentrations on nitrification of saline wastewater in fixed-bed reactors. Bioresource technology **102**(10): 5665-5673.
- Tangkitjawisut, W., Limpiyakorn, T., Powtongsook, S., Pornkulwat, P. and Suwannasilp, B. B. (2015). Differences in nitrite-oxidizing communities and kinetics in a brackish environment after enrichment at low and high nitrite concentrations. Journal of Environmental Sciences.
- Taylor, A. E. and Bottomley, P. J. (2006). Nitrite production by *Nitrosomonas europaea* and *Nitrospira sp.* AV in soils at different solution concentrations of ammonium. Soil Biology & Biochemistry **38**: 828-836.
- Terada, A., Sugawara, S., Yamamoto, T., Zhou, S., Koba, K. and Hosomi, M. (2013). Physiological characteristics of predominant ammonia-oxidizing bacteria enriched from bioreactors with different influent supply regimes. Biochemical engineering journal **79**: 153-161.
- Tora, J. A., Lafuente, J., Baeza, J. A. and Carrera, J. (2010). Combined effect of inorganic carbon limitation and inhibition by free ammonia and free nitrous acid on ammonia oxidizing bacteria Bioresource Technology(101): 6051-6055.

- Uemoto, H., Ando, A. and Saiki, H. (2000). Effect of oxygen concentration on nitrogen removal by *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans* immobilized within tubular polymeric gel. Journal of bioscience and bioengineering **90**: 654-660.
- Vadivelu, V., Keller, J. and Yuan, Z. (2007). Effect of free ammonia respiration and growth processes of an enriched *Nitrobacter* culture. Water Research **41**: 826-834.
- Wang, X., Wen, X., Criddle, C., Wells, G., Zhang, J. and Zhao, Y. (2010). Community analysis of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of eight wastewater treatment systems. Journal of Environmental Sciences **22**(4): 627-634.
- Whang, L. M., Chien, I. C., Yuan, S. I. and Wu, Y. J. (2009). Nitrifying community structures and nitrification performance of full-scale municipal and swine wastewater treatment plants. Chemosphere **75**: 234-242.
- Wijffels, R. H., De Gooijer, C. D., Schepers, A. W., Bouling E.E, Malle'e, L. F. and Tramper, J. (1995). Dynamic modeling of immobilized *Nitrosomonas europaea* : Implementation of diffusion limitation over expanding microcolonies. Enzyme and Microbial Technology **17**: 462-471.
- Woodside, G. and Kocurek, D. (1997). Environmental, Safety, and Health Engineering, Wiley.
- Wu, Y.-J., Whang, L.-M., Fukushima, T. and Chang, S.-H. (2013). Responses of ammonia-oxidizing archaeal and betaproteobacterial populations to wastewater salinity in a full-scale municipal wastewater treatment plant. Journal of bioscience and bioengineering **115**(4): 424-432.

Wuertz, S., Schulze, S., Eberhardt, U., Schulz, C. and Schroeder, J. (2013). Acute and chronic nitrite toxicity in juvenile pike-perch (*Sander lucioperca*) and its compensation by chloride. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **157**(4): 352-360.

Yamada, T., Araki, S., Ikeda-Otsubo, W., Okumura, K. and Endo, G. (2013). Community structure and population dynamics of ammonia oxidizers in composting processes of ammonia-rich livestock waste. Systematic and Applied Microbiology **36**: 359-367.

กรมประมง. แผนแม่บทการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทย(ฉบับร่าง) ปี ๒๕๕๕-๒๕๕๙. [ออนไลน์].2553. แหล่งที่มา: <http://www.fisheries.go.th/sf-lampang/images/downloads/a57.pdf>. [6 ก.ค.2558]

ธนสิดา โชติอนนต์ (2556). ผลของแอมโมเนียต่อการคัดเลือกกลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดเซอร์จากบ่อเลี้ยงกุ้ง. ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ปรินต์นามหาบัณฑิต.

วิภาษณีย์ ตั้งกิจจาวิสุทธิ์ (2556). การพัฒนาหัวเชื้อไนโตรเจนออกซิไดซิงแบคทีเรียเพื่อกำจัดไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงกุ้ง. ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ปรินต์นามหาบัณฑิต.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

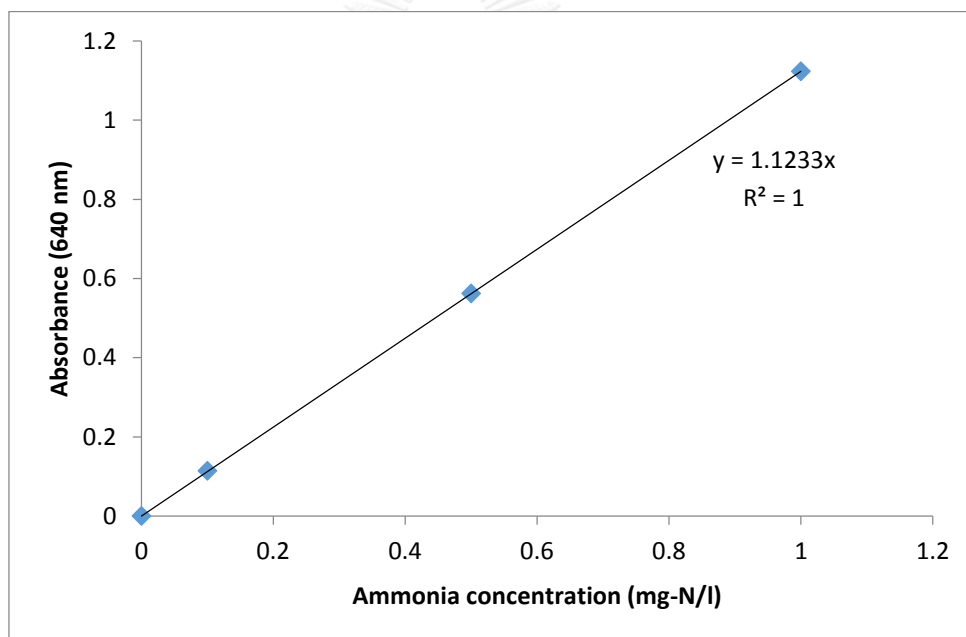


ภาคผนวก ก

การสร้างกราฟมาตรฐาน

ก. การสร้างกราฟสารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย

การเตรียมสารละลายแอมโมเนียมาตรฐานทำโดยการเลือกค่าความเข้มข้นแอมโมเนียมาอย่างน้อย 3 ค่าโดยค่าความเข้มข้นแอมโมเนียดังกล่าวต้องอยู่ในช่วงความเข้มข้นแอมโมเนีย 0.1 – 1 mg-N/l อาทิ เช่น 0.1, 0.5 และ 1 mg-N/l จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานโดยใช้สารละลาย NH_4Cl เข้มข้น (ความเข้มข้น 1000 mg-N/l) แล้วจัดเตรียมสารเคมีที่ใช้วัดต่างๆ ตามวิธีการดังตารางที่ 3.5 จากนั้นให้ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของความเข้มข้นแต่ละค่าแล้วนำมาพลอตกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) และ ความเข้มข้นแอมโมเนียดังรูปที่ ก.1 แล้วจึงนำกราฟดังกล่าวใช้ในการวิเคราะห์หาค่าแอมโมเนียของสารตัวอย่างอื่นๆ ต่อไป

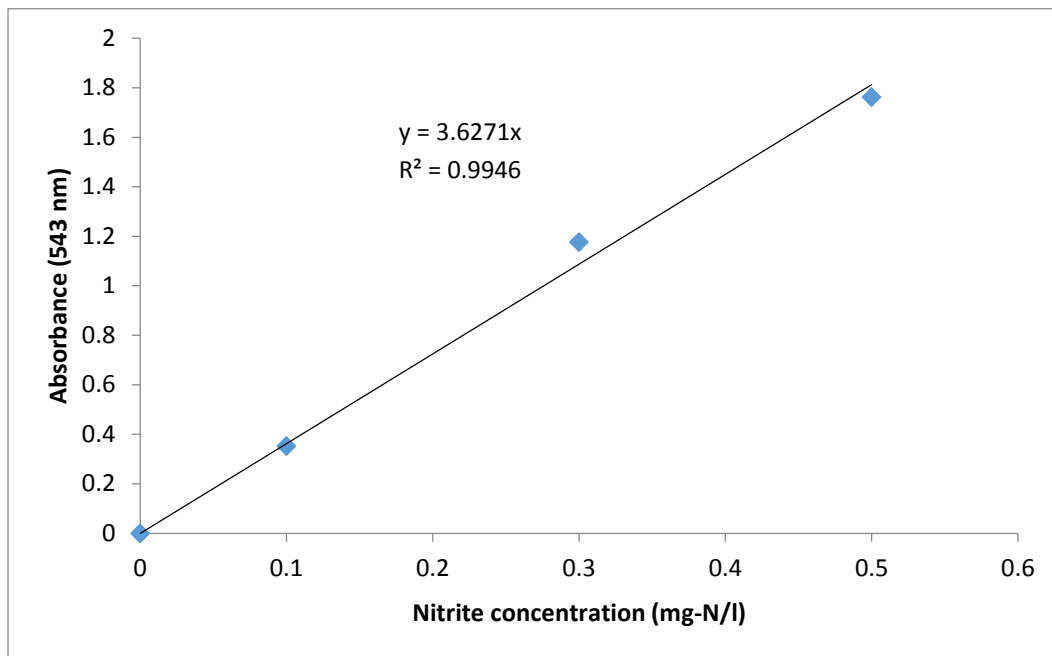


รูปที่ ก.1 ตัวอย่างกราฟสารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย

ข. การสร้างกราฟสารละลายมาตรฐานไนไตรท์

การเตรียมสารละลายไนไตรท์มาตรฐานโดยทำการเลือกค่าความเข้มข้นของไนไตรท์มาอย่างน้อย 3 ค่าโดยค่าความเข้มข้นไนไตรท์ดังกล่าวต้องอยู่ในช่วงความเข้มข้นของไนไตรท์ 0.1 – 0.5 mg-N/l อาทิ เช่น 0.1, 0.3 และ 0.5 mg-N/l จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานโดยใช้สารละลาย NaNO_2 เข้มข้น (ความเข้มข้น 1000 mg-N/l) แล้วจัดเตรียมสารเคมีที่ใช้วัดต่างๆ ตามวิธีการดังตารางที่ 3.5 จากนั้นให้ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของความเข้มข้นแต่ละค่าแล้วนำมาพลอตกราฟระหว่าง ค่าการ

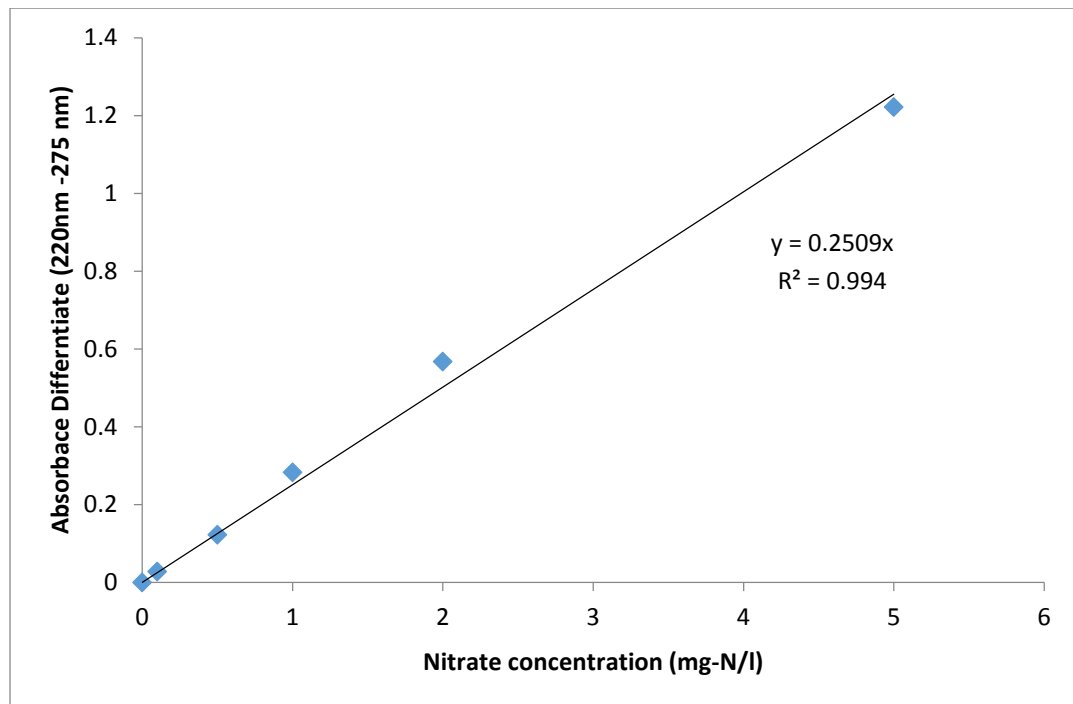
ดูดกลืนแสง (Absorbance) และ ความเข้มข้นแอมโมเนียดังรูปที่ ก.2 แล้วจึงนำกราฟดังกล่าวใช้ในการวิเคราะห์หาค่าไนเตรทของสารตัวอย่างอื่นๆ ต่อไป



รูปที่ ก.2 ตัวอย่างกราฟสารละลายมาตรฐานไนเตรท

ค. การสร้างกราฟมาตรฐานไนเตรท

การเตรียมสารละลายไนเตรทมาตรฐานโดยทำการเลือกค่าความเข้มข้นของไนเตรทมาอย่างน้อย 5 ค่าโดยค่าความเข้มข้นไนเตรทดังกล่าวต้องอยู่ในช่วงความเข้มข้นของไนเตรท 0.1 – 5 mg-N/l อาทิ เช่น 0.1, 0.5, 1, 2 และ 5 mg-N/l จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานโดยใช้สารละลาย NaNO_3 เข้มข้น (ความเข้มข้น 1000 mg-N/l) แล้วจัดเตรียมสารเคมีที่ใช้วัดต่างๆ ตามตารางที่ 3.5 จากนั้นให้ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของความเข้มข้นแต่ละค่าแล้วนำมาพลอตกราฟระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) และ ความเข้มข้นแอมโมเนียดังรูปที่ ก.3 แล้วจึงนำกราฟดังกล่าวใช้ในการวิเคราะห์หาค่าไนเตรทของสารตัวอย่างอื่นๆ ต่อไป



รูปที่ ก.3 ตัวอย่างกราฟสารละลายมาตรฐานไนเตรท



ภาคผนวก ข

ผลทางกายภาพในการทดลองช่วงที่ 1 โดยที่ในถังปฏิกรณ์ A เลี้ยงด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 50 mg-N/l ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ B เลี้ยงด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/l โดยทำการตรวจวัดค่าพารามิเตอร์ ได้แก่ pH, อุณหภูมิ, ค่าการละลายออกซิเจน(DO) และ ค่าความเค็ม ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ ข.1 และ ข.2

ตารางที่ ข.1 ผลทางกายภาพของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l)

วันที่	pH ประจำวัน	อุณหภูมิ (C°)	ค่าการละลาย ออกซิเจน (mg-O ₂ /l)	ค่าความเค็ม (ppt)
24/3/2015	7.82	29.7	7.52	15
25/3/2015	7.84	28.1	7.98	N.A.
27/3/2015	7.62	29.2	7.44	15
30/3/2015	8.01	29.5	7.61	15
31/3/2014	8.00	29.7	N.A.	N.A.
1/4/2015	7.92	29.5	7.49	15
3/4/2015	7.90	29.5	7.89	15
7/4/2015	6.04	30.3	N.A.	N.A.
8/4/2015	7.84	29.9	8.13	N.A.
9/4/2015	7.83	28.9	N.A.	15
16/4/2015	8.12	30.1	6.54	15
17/4/2015	7.99	30.5	7.98	15
21/4/2015	8.02	30.9	7.30	15
22/4/2015	8.13	30.7	N.A.	15
24/4/2015	8.04	29.8	N.A.	15
27/4/2015	7.98	29.5	N.A.	15
28/4/2015	8.03	29.8	7.40	15
29/4/2015	8.02	30.5	7.57	15
30/4/2015	7.98	30.9	N.A.	15

ตารางที่ ข.1 ผลทางกายภาพของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) (ต่อ)

วันที่	pH ประจำวัน	อุณหภูมิ (C°)	ค่าการละลาย ออกซิเจน (mg-O ₂ /l)	ค่าความเค็ม (ppt)
7/5/2015	8.30	31.5	7.31	15
8/5/2015	8.20	31.0	7.31	15
11/5/2015	7.80	31.1	8.10	15
12/5/2015	7.92	30.7	8.35	15
15/5/2015	8.15	29.1	8.18	15
17/5/2015	7.68	30.8	7.65	N.A.
18/5/2015	7.95	29.7	6.87	N.A.
20/5/2015	8.10	30.7	7.80	N.A.
25/5/2015	8.18	30.6	7.67	N.A.
27/5/2015	7.98	29.8	N.A.	N.A.
29/5/2015	8.03	30.1	N.A.	19
5/6/2015	7.85	30.1	N.A.	N.A.
8/6/2015	8.07	29.0	7.92	20
15/6/2015	8.12	29.2	7.73	20
16/6/2015	8.40	29.8	N.A.	20
18/6/2015	8.05	29.0	7.48	20
21/6/2015	8.10	29.4	8.24	20
27/6/2015	7.88	29.4	N.A.	15
29/6/2015	7.65	29.3	N.A.	20
1/7/2015	7.86	31.1	7.58	20
4/7/2015	8.01	30.0	N.A.	20
5/7/2015	8.12	30.5	N.A.	N.A.
7/7/2015	8.19	30.0	7.86	N.A.
14/7/2015	7.98	30.9	N.A.	22
15/7/2015	8.05	29.9	N.A.	22
19/7/2015	8.15	30.1	N.A.	20

ตารางที่ ข.1 ผลทางกายภาพของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) (ต่อ)

วันที่	pH ประจำวัน	อุณหภูมิ (C°)	ค่าการละลาย ออกซิเจน (mg-O ₂ /l)	ค่าความเค็ม (ppt)
24/7/2015	8.04	28.9	N.A.	20
25/7/2015	8.09	28.4	N.A.	N.A.
27/7/2015	7.75	29.6	7.13	15
28/7/2015	7.58	30.4	7.56	15
2/8/2015	7.71	28.6	N.A.	N.A.
3/8/2015	7.73	29.5	7.98	15
4/8/2015	7.72	28.7	7.48	N.A.
5/8/2015	7.72	30.3	N.A.	15
7/8/2015	7.93	28.7	N.A.	N.A.
11/8/2015	7.90	29.6	7.95	N.A.
12/8/2015	7.90	30.3	7.95	N.A.
13/8/2015	7.81	29.5	7.95	N.A.
14/8/2015	7.90	28.8	8.05	17
16/8/2015	7.92	30.8	N.A.	17
20/8/2015	7.91	30.7	7.78	19
23/8/2015	8.05	29.5	7.07	19
25/8/2015	7.82	30.5	7.59	20
26/8/2015	7.80	29.9	N.A.	20
28/8/2015	8.60	29.3	7.17	20
31/8/2015	8.00	30.5	N.A.	20
3/9/2015	7.72	30.0	7.20	20
7/9/2015	7.68	30.8	N.A.	N.A.
11/9/2015	7.96	29.0	N.A.	20
13/9/2015	7.71	30.8	7.08	20
18/9/2015	7.66	29.1	N.A.	20
24/9/2015	7.64	28.9	N.A.	N.A.

ตารางที่ ข.1 ผลทางกายภาพของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) (ต่อ)

วันที่	pH ประจำวัน	อุณหภูมิ (C°)	ค่าการละลาย ออกซิเจน (mg-O ₂ /L)	ค่าความเค็ม (ppt)
27/9/2015	7.76	29.1	7.21	N.A.
1/10/2015	7.73	29.5	7.28	20
2/10/2015	7.54	28.6	N.A.	20
3/10/2015	7.64	28.1	N.A.	20
4/10/2015	7.69	27.3	7.32	21
6/10/2015	7.63	29.3	N.A.	21
10/10/2015	7.63	29.1	6.99	21
12/10/2015	7.81	29.7	7.53	21
16/10/2015	7.67	28.9	7.02	21
17/19/2015	7.25	29.3	7.42	21
19/10/2015	7.97	28.5	7.52	21
ค่าเฉลี่ย	7.88	29.58	7.55	17.63
S.D.	0.30	0.82	0.39	2.60

ตารางที่ ข.2 ผลทางกายภาพของถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L)

วันที่	pH หลังจากการ ดำเนินการ 1 วัน	pH ปรับหลัง การเติม แอมโมเนีย	อุณหภูมิ (C°)	ค่าการละลาย ออกซิเจน (mg-O ₂ /l)	ค่าความ เค็ม (ppt)
16/3/2015	7.50	7.72	28.5	N.A.	20
17/3/2015	7.33	7.69	29.1	6.88	20
18/3/2015	7.19	7.67	29.2	7.24	20
23/3/2015	7.07	7.71	29.9	N.A.	20
24/3/2015	6.95	7.42	29.7	7.12	20
25/3/2015	6.97	7.42	28.1	7.75	N.A.
27/3/2015	6.81	7.63	29.2	7.03	20
30/3/2015	6.72	7.20	29.5	7.25	15
31/3/2014	6.81	7.60	29.7	N.A.	N.A.
1/4/2015	6.85	7.58	29.5	7.43	15
3/4/2015	7.34	7.54	29.5	7.67	15
7/4/2015	7.20	7.61	30.3	N.A.	N.A.
8/4/2015	7.16	7.65	29.9	8.04	N.A.
9/4/2015	6.97	7.50	28.9	N.A.	15
16/4/2015	6.90	7.63	30.1	6.41	15
17/4/2015	7.06	7.75	30.5	7.75	15
21/4/2015	6.88	7.63	30.9	7.16	15
22/4/2015	6.93	7.45	30.7	N.A.	15
24/4/2015	6.86	7.30	29.8	N.A.	15
27/4/2015	6.85	7.40	29.5	N.A.	15
28/4/2015	6.86	7.43	29.8	7.92	15
29/4/2015	6.94	7.40	30.5	7.45	15
30/4/2015	6.88	7.42	30.9	N.A.	15
7/5/2015	7.17	7.45	31.5	7.28	15
8/5/2015	6.97	7.68	31.0	7.47	15
11/5/2015	6.92	7.60	31.1	8.08	15

ตารางที่ ข.2 ผลทางกายภาพของถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/l) (ต่อ)

วันที่	pH หลังจากการ ดำเนินการ 1 วัน	pH ปรับหลัง การเติม แอมโมเนีย	อุณหภูมิ (C°)	ค่าการละลาย ออกซิเจน (mg-O ₂ /l)	ค่าความ เค็ม (ppt)
12/5/2015	6.95	7.93	30.7	8.19	15
15/5/2015	7.11	7.61	29.1	8.38	15
17/5/2015	7.06	7.51	30.8	7.70	N.A.
18/5/2015	6.95	7.37	29.7	7.52	15
20/5/2015	7.03	7.68	30.7	8.06	15
25/5/2015	6.83	7.43	30.6	7.95	N.A.
27/5/2015	6.88	7.53	29.8	N.A.	N.A.
29/5/2015	6.89	7.81	30.1	N.A.	15
5/6/2015	7.18	7.60	30.1	N.A.	N.A.
8/6/2015	7.09	7.42	29.0	8.08	15
15/6/2015	6.67	7.61	29.2	8.02	15
16/6/2015	6.64	7.61	29.8	N.A.	15
18/6/2015	6.84	7.63	29.0	8.03	15
21/6/2015	7.49	7.55	29.4	8.04	15
27/6/2015	6.90	7.87	29.4	N.A.	15
29/6/2015	7.02	7.84	29.3	N.A.	17
1/7/2015	6.56	7.50	31.1	8.14	15
4/7/2015	5.54	7.81	30.0	N.A.	15
5/7/2015	7.10	7.84	30.5	N.A.	N.A.
7/7/2015	6.34	8.14	30.0	7.86	15
14/7/2015	6.86	7.90	30.9	N.A.	15
15/7/2015	7.15	7.93	29.9	N.A.	15
19/7/2015	6.91	7.57	30.1	N.A.	15
24/7/2015	6.95	7.59	28.9	N.A.	15
25/7/2015	7.08	7.80	28.4	N.A.	N.A.
27/7/2015	6.99	7.83	29.6	7.39	15

ตารางที่ ข.2 ผลทางกายภาพของถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/l) (ต่อ)

วันที่	pH หลังจากการดำเนินการ 1 วัน	pH ปรับหลังการเติมแอมโมเนีย	อุณหภูมิ (C°)	ค่าการละลายออกซิเจน (mg-O ₂ /l)	ค่าความเค็ม (ppt)
28/7/2015	6.76	7.53	30.4	8.13	15
2/8/2015	6.41	7.49	28.6	N.A.	15
4/8/2015	6.64	7.96	28.7	7.71	15
5/8/2015	6.80	7.49	30.3	N.A.	15
7/8/2015	6.75	7.86	38.7	N.A.	15
11/8/2015	6.98	7.76	29.6	N.A.	N.A.
12/8/2015	7.07	8.02	30.3	7.78	15
13/8/2015	7.04	7.85	29.5	8.18	15
14/8/2015	7.01	7.88	28.8	8.02	15
16/8/2015	6.82	7.70	30.8	N.A.	15
20/8/2015	6.64	7.47	30.7	7.72	15
23/8/2015	6.67	7.52	29.5	7.62	15
25/8/2015	6.73	7.78	30.5	7.92	15
26/8/2015	6.60	7.80	29.9	N.A.	15
28/8/2015	6.70	7.96	29.3	7.38	15
31/8/2015	6.72	7.70	30.5	N.A.	15
3/9/2015	6.73	7.70	30.0	7.76	15
7/9/2015	6.81	7.82	30.8	N.A.	N.A.
11/9/2015	6.91	8.06	29.0	N.A.	15
13/9/2015	6.72	7.97	30.8	7.56	15
18/9/2015	6.12	8.14	29.1	N.A.	15
24/9/2015	6.76	7.15	28.9	N.A.	N.A.
27/9/2015	6.81	7.45	29.1	7.61	N.A.
1/10/2015	6.93	7.63	29.5	7.15	15
2/10/2015	6.93	7.53	28.6	N.A.	15
3/10/2015	6.84	7.92	28.1	N.A.	15

ตารางที่ ข.2 ผลทางกายภาพของถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L) (ต่อ)

วันที่	pH หลังจากการ ดำเนินการ 1 วัน	pH ปรับหลัง การเติม แอมโมเนีย	อุณหภูมิ (C°)	ค่าการละลาย ออกซิเจน (mg-O ₂ /l)	ค่าความ เค็ม (ppt)
4/10/2015	7.03	7.51	27.3	7.71	15
6/10/2015	6.60	7.40	29.3	N.A.	15
10/10/2015	6.84	7.68	29.1	7.38	15
12/10/2015	7.67	7.83	29.7	7.66	15
16/10/2015	7.03	7.78	28.9	7.23	15
17/19/2015	6.74	7.76	29.3	7.03	15
19/10/2015	6.98	7.55	28.5	7.77	15
ค่าเฉลี่ย	6.89	7.64	29.58	7.63	15.45
S.D.	0.29	0.21	0.82	0.40	1.39



ภาคผนวก ค

ผลทางกายภาพในการทดลองช่วงที่ 2 โดยที่ในถังปฏิกรณ์ A เลี้ยงด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/l ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ B เลี้ยงด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 50 mg-N/l โดยทำการตรวจวัดค่าพารามิเตอร์ ได้แก่ pH, อุณหภูมิ, ค่าการละลายออกซิเจน(DO) และ ค่าความเค็ม ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ ค.1 และ ค.2

ตารางที่ ค.1 ผลทางกายภาพของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l)

วันที่	pH หลังจากดำเนินการ 1 วัน	pH ปรับหลังจากเติมแอมโมเนีย	อุณหภูมิ (C°)	ค่าการละลายออกซิเจน (mg-O ₂ /l)	ค่าความเค็ม (ppt)
19/10/2015	6.98	7.62	28.5	7.52	15
20/10/2015	6.94	7.30	28.5	6.63	15
21/10/2015	7.09	7.19	29.2	7.12	15
22/10/2015	6.93	7.31	27.9	7.65	15
24/10/2015	6.92	7.50	29.8	N.A.	15
27/10/2015	6.93	7.28	29.7	N.A.	15
28/10/2015	6.98	7.20	29.7	6.87	15
31/10/2015	6.80	7.42	28.0	N.A.	15
2/11/2015	6.71	7.43	30.1	N.A.	15
4/11/2015	6.82	7.50	29.7	7.77	15
5/11/2015	7.21	7.57	30.3	7.48	15
7/11/2015	7.24	7.57	29.5	N.A.	14
9/11/2015	7.17	7.48	30.4	N.A.	14
11/11/2015	7.22	7.58	30.1	N.A.	13
13/11/2015	7.2	7.61	29.6	7.52	13
17/11/2015	6.47	7.43	30.1	N.A.	13
18/11/2015	6.62	7.38	30.5	7.67	13
21/11/2015	6.66	7.32	30.8	7.61	14

ตารางที่ ค.1 ผลทางกายภาพของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l) (ต่อ)

วันที่	pH หลังจาก ดำเนินการ 1 วัน	pH ปรับ หลังจากเติม แอมโมเนีย	อุณหภูมิ (C°)	ค่าการ ละลาย ออกซิเจน (mg-O ₂ /l)	ค่าความเค็ม (ppt)
22/11/2015	6.83	7.56	29.8	7.50	14
24/11/2015	6.81	7.49	30.5	7.59	15
27/11/2015	6.79	7.51	30.0	7.45	15
28/11/2015	6.84	7.63	29.7	7.81	15
3/12/2015	6.89	7.63	29.6	N.A.	13
4/12/2015	6.71	7.66	29.0	N.A.	13
5/12/2015	6.73	7.65	28.4	N.A.	13
7/12/2015	6.94	7.63	28.4	7.87	12
11/12/2015	7.00	7.66	28.4	7.66	12
13/12/2015	7.26	7.69	29.6	7.66	12
17/12/2015	7.10	7.69	27.3	8.02	12
19/12/2015	7.03	7.71	27.5	7.91	12
21/12/2015	7.26	7.91	28.2	8.00	12
22/12/2015	7.34	7.72	27.0	8.12	12
27/12/2015	7.04	7.80	30.1	N.A.	12
29/12/2015	7.45	7.80	29.0	N.A.	12
1/1/2016	7.28	7.49	27.8	N.A.	11
5/1/2016	7.02	7.32	28.4	N.A.	12
9/1/2016	7.08	7.69	29.2	7.52	12
11/1/2016	7.18	7.80	29.2	7.58	12
14/1/2016	6.81	7.60	30.4	7.42	12
18/1/2016	7.16	7.81	30.2	7.47	11
21/1/2016	7.20	7.68	29.7	7.33	12
23/1/2016	7.03	7.81	30.2	7.31	12

ตารางที่ ค.1 ผลทางกายภาพของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l) (ต่อ)

วันที่	pH หลังจาก ดำเนินการ 1 วัน	pH ปรับ หลังจากเติม แอมโมเนีย	อุณหภูมิ (C°)	ค่าการ ละลาย ออกซิเจน (mg-O ₂ /l)	ค่าความเค็ม (ppt)
25/1/2016	7.39	7.87	23.4	8.44	12
28/1/2016	7.20	7.60	25.4	8.04	12
29/1/2016	7.38	7.57	27.3	7.82	12
31/1/2016	7.53	7.53	29.2	7.57	12
ค่าเฉลี่ย	7.03	7.56	29.02	7.61	13.23
S.D.	0.24	0.17	1.41	0.36	1.39

ตารางที่ ค.2 ผลทางกายภาพของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L)

วันที่	pH	อุณหภูมิ (C°)	ค่าการละลาย ออกซิเจน (mg-O ₂ /l)	ค่าความเค็ม (ppt)
19/10/2015	7.55	28.5	7.52	15
20/10/2015	7.53	28.5	7.52	15
21/10/2015	7.53	29.2	7.38	15
22/10/2015	7.62	27.9	7.63	15
24/10/2015	7.77	29.8	N.A.	15
27/10/2015	7.73	29.7	N.A.	15
28/10/2015	7.72	29.7	7.21	15
31/10/2015	7.84	28.0	N.A.	15
2/11/2015	7.93	30.1	N.A.	15
4/11/2015	7.98	29.7	7.17	15
5/11/2015	7.98	30.3	6.72	15
7/11/2015	7.58	29.5	N.A.	15
9/11/2015	7.86	30.4	N.A.	15
11/11/2015	7.92	30.1	N.A.	15
13/11/2015	8.00	29.6	7.03	15
17/11/2015	8.05	30.1	N.A.	17
18/11/2015	8.02	30.5	6.92	17
21/11/2015	8.20	30.8	7.50	17
22/11/2015	8.03	29.8	7.76	17
24/11/2015	7.91	30.5	6.48	17
27/11/2015	7.60	30.0	6.41	17
28/11/2015	7.70	29.7	6.52	17
3/12/2015	7.56	29.6	N.A.	18
4/12/2015	7.72	29.0	N.A.	20
5/12/2015	7.67	28.4	7.06	20

ตารางที่ ค.2 ผลทางกายภาพของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) (ต่อ)

วันที่	pH	อุณหภูมิ (C°)	ค่าการละลาย ออกซิเจน (mg-O ₂ /l)	ค่าความเค็ม (ppt)
7/12/2015	7.79	28.4	7.60	20
11/12/2015	7.87	28.4	7.70	19
13/12/2015	7.72	29.6	6.56	19
17/12/2015	7.80	27.3	7.51	19
19/12/2015	7.84	27.5	7.47	20
21/12/2015	7.84	28.2	7.44	19
22/12/2015	7.93	27.0	7.71	20
27/12/2015	8.01	30.1	N.A.	20
29/12/2015	8.03	29.0	N.A.	19
1/1/2016	8.00	27.8	N.A.	20
5/1/2016	8.01	28.4	N.A.	20
9/1/2016	7.89	29.2	7.22	20
11/1/2016	7.87	29.2	7.36	19
14/1/2016	7.87	30.4	6.61	19
18/1/2016	8.26	30.2	6.87	19
21/1/2016	8.02	29.7	7.05	20
23/1/2016	7.90	30.2	6.72	20
25/1/2016	7.84	23.4	8.40	20
28/1/2016	8.07	25.4	8.05	20
29/1/2016	8.05	27.3	7.58	19
31/1/2016	8.10	29.2	7.49	19
ค่าเฉลี่ย	7.86	29.02	7.26	17.51
S.D.	0.18	1.41	0.48	2.18



ภาคผนวก ง

ผลทางเคมีในการทดลองครั้งที่ 1 โดยที่ในถังปฏิกรณ์ A เลี้ยงด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 50 mg-N/l ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ B เลี้ยงด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/l โดยทำการตรวจวัดค่าพารามิเตอร์ แอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ ง.1 และ ง.2

ตารางที่ ง.1 ผลทางเคมีของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l)

วันที่	Ammonia หลังจาก ผ่านการดำเนินการ 1 วัน(mg-N/l)	Ammonia (mg-N/l)	Nitrite (mg-N/l)	Nitrate (mg-N/l)
24/3/2015	0.567	39.56	0.056	45
27/3/2015	0.072	51.53	0.004	291
30/3/2015	0.055	50.03	0.041	297
31/3/2015	0.041	47.07	0.032	341
1/4/2015	0.080	48.73	0.036	298
3/4/2015	0.074	50.94	0.019	304
9/4/2015	0.039	53.98	0.103	720
16/4/2015	0.086	54.88	0.069	904
17/4/2015	0.073	54.23	0.124	1023
20/4/2015	0.058	56.43	0.05	1074
21/4/2015	0.052	53.41	0.06	1077
22/4/2015	0.018	34.79	0.055	1116
23/4/2015	0.028	43.41	0.034	1023
24/4/2015	0.023	40.67	0.05	1054
27/4/2015	0.023	25	0.048	1065
28/4/2015	0.004	35.68	0.155	1096
29/4/2015	0.025	38.72	0.061	200
30/4/2015	0.030	36	0.023	234
5/5/2015	0.038	43.42	0.031	503
6/5/2015	0.027	31.27	0.041	529

ตารางที่ ง.1 ผลทางเคมีของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) (ต่อ)

วันที่	Ammonia หลังจาก ผ่านการดำเนินการ 1 วัน(mg-N/L)	Ammonia (mg-N/L)	Nitrite (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)
7/5/2015	0.055	44.86	0.03	564
8/5/2015	0.046	43.78	0.03	615
11/5/2015	0.048	48.24	0.034	728
12/5/2015	0.903	47.67	0.03	673
13/5/2015	0.051	47.52	0.017	841
15/5/2015	0.003	38	0.036	859
17/5/2015	0.00	41.25	0.035	932
20/5/2015	0.00	38.1	0.029	983
20/5/2015	0.00	46.88	0.025	1010
22/5/2015	0.00	47.28	0.039	1373
25/5/2015	0.00	47.3	0.033	996
27/5/2015	0.00	56.36	0.056	1082
29/5/2015	0.00	46.96	0.08	1047
8/6/2015	0.00	48.04	0.053	1220
15/6/2015	0.00	39.23	0.027	1047
16/6/2015	0.00	40.05	0.081	965
18/6/2015	0.00	43.78	0.027	1047
21/6/2015	0.00	42.32	0.058	965
28/6/2015	0.00	46.31	0.015	1126
29/6/2015	0.00	49.72	0.016	1265
1/7/2015	0.00	50.83	0.011	1461
4/7/2015	0.00	70.55	0.014	1476
7/7/2015	0.00	63.51	0.014	1180
14/7/2015	0.00	59.92	0.029	1912
15/7/2015	0.00	77.92	0.008	1276

ตารางที่ ง.1 ผลทางเคมีของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) (ต่อ)

วันที่	Ammonia หลังจาก ผ่านการดำเนินการ 1 วัน(mg-N/L)	Ammonia (mg-N/L)	Nitrite (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)
19/7/2015	0.00	58.34	0.026	1236
23/7/2015	0.00	62.22	0.005	891
25/7/2015	0.00	56.00	0.042	260
27/7/2015	0.00	58.87	0.035	297
29/7/2015	0.00	52.46	0.014	398
3/8/2015	0.00	72.60	0.006	697
5/8/2015	0.00	64.99	0.026	665
7/8/2015	0.00	63.94	0.013	505
12/8/2015	0.00	71.89	0.011	718
13/8/2015	0.00	57.62	0.004	909
14/8/2015	0.007	49.51	0	801
16/8/2015	0.023	41.25	0.007	-
19/8/2015	0.025	53.00	0.011	1047
20/8/2015	0.018	45.14	0.002	1137
23/8/2015	0.00	52.03	0.005	1235
25/8/2015	0.00	45.79	0.001	1394
26/8/2015	0.00	44.41	0.003	1464
28/8/2015	0.001	43.60	0.027	1633
31/8/2015	0.010	48.22	0.016	-
3/9/2015	0.00	43.11	0.001	1619
11/9/2015	0.00	44.81	0	1561
13/9/2015	0.002	48.62	0.003	
18/9/2015	0.00	43.92	0.0006	2131
21/9/2015	0.00	50	0.005	2341
24/9/2015	0.00	48.46	0.009	2248

ตารางที่ ง.1 ผลทางเคมีของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) (ต่อ)

วันที่	Ammonia หลังจาก ผ่านการดำเนินการ 1 วัน(mg-N/L)	Ammonia (mg-N/L)	Nitrite (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)
27/9/2015	0.001	46.19	0.012	2326
30/9/2015	0.00	50.49	0	2507
1/10/2015	0.013	38.52	0.005	2386
2/10/2015	0.058	40.72	0.009	2445
3/10/2015	0.05	36.96	0.006	3000
4/10/2015	0.031	30.90	0.013	2466
6/10//2015	0.002	31.56	0.023	2682
10/10/2015	0.039	37.63	0.017	2753
12/10/2015	0.017	39.93	0.023	2775
16/10/2015	0.021	42.05	0.011	3055
17/10/2015	0.040	46.07	0.022	2455
19/10/2015	0.035	-	-	3606
ค่าเฉลี่ย		47.88	0.029	-
S.D.		9.80	0.028	-

ตารางที่ ง.2 ผลทางเคมีของถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L)

วันที่	Ammonia หลังจาก ผ่านการดำเนินการ 1 วัน (mg-N/L)	Ammonia (mg-N/L)	Nitrite (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)
16/3/2015	0.17	1.51	0.001	44.98
17/3/2015	0.21	1.51	0.005	48.23
18/3/2015	0.00	1.49	0.003	48.45
23/3/2015	0.19	1.33	0.049	53.89
24/3/2015	0.21	1.33	0.009	52.49
30/3/2015	0.13	1.35	0.013	50.63
31/3/2015	0.05	1.08	0.021	13.03
1/4/2015	0.1	1.05	0.011	16.29
3/4/2015	0.14	1.06	0.006	8.47
9/4/2015	0.04	1.08	0.011	16.94
16/4/2015	0.11	1.09	0.008	31.03
17/4/2015	0.1	1.25	0.013	36.6
20/4/2015	0.13	0.7	0.015	41.58
21/4/2015	0.1	0.97	0.006	46.56
22/4/2015	0.07	1.01	0.021	44.96
23/4/2015	0.1	1.27	0.04	44.54
24/4/2015	0.14	1.13	0.035	40.1
27/4/2015	0.12	0.9	0.012	43.22
28/4/2015	0.12	0.8	0.01	30
29/4/2015	0.04	0.85	0.02	48
30/4/2015	0.12	0.86	0.016	47
5/5/2015	0.08	1.00	0.039	59.52
6/5/2015	0.08	0.87	0.015	58.08
7/5/2015	0.09	0.78	0.008	65.33

ตารางที่ ง.2 ผลทางเคมีของถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L) (ต่อ)

วันที่	Ammonia หลังจาก ผ่านการดำเนินการ 1 วัน (mg-N/L)	Ammonia (mg-N/L)	Nitrite (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)
8/5/2015	0.1	0.78	0.012	70.66
12/5/2015	0.08	0.85	0.008	65.34
13/5/2015	0.03	0.74	0.013	67.27
15/5/2015	0.05	0.61	0.011	70.18
22/5/2015	0.00	1.05	0.011	89.88
29/5/2015	0.00	1.08	0.013	85.8
8/6/2015	0.00	0.86	0.017	79.67
15/6/2015	0.00	1.07	0.005	70.48
16/6/2015	0.00	1.21	0.003	62.31
18/6/2015	0.00	1.3	0.007	19.91
21/6/2015	0.00	1.25	0.003	20.94
28/6/2015	0.00	1.03	0.006	20.01
29/6/2015	0.00	0.88	0.006	22.58
1/7/2015	0.00	0.98	0.004	23.28
4/7/2015	0.00	0.73	0.007	28.83
7/7/2015	0.00	0.86	0.014	31.49
14/7/2015	0.00	1.13	0.012	42.67
15/7/2015	0.00	1.04	0.001	28.05
19/7/2015	0.00	1.12	0.0007	39.9
23/7/2015	0.00	1.11	0.03	43.17
27/7/2015	0.00	1.03	0.009	39.94
29/7/2015	0.00	1.03	0.002	44.74
3/8/2015	0.00	0.87	0.051	47.15
5/8/2015	0.00	1.03	0.003	32.15
7/8/2015	0.00	1.17	0.0007	49.55

ตารางที่ ง.2 ผลทางเคมีของถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/l) (ต่อ)

วันที่	Ammonia หลังจาก ผ่านการดำเนินการ 1 วัน (mg-N/l)	Ammonia (mg-N/l)	Nitrite (mg-N/l)	Nitrate (mg-N/l)
12/8/2015	0.00	1.05	0.00	39.03
13/8/2015	0.00	0.93	0.006	49.18
14/8/2015	0.00	1.13	0.0006	67.96
16/8/2015	0.00	1.15	0.00	64.96
19/8/2015	0.00	1.21	0.00	67.51
20/8/2015	0.00	1.11	0.00	72.43
23/8/2015	0.00	1.07	0.00	69.25
25/8/2015	0.00	1.24	0.00	90.99
26/8/2015	0.021	1.24	0.00	75.83
28/8/2015	0.00	0.92	0.00	74.30
31/8/2015	0.00	1.29	0.00	77.54
3/9/2015	0.00	1.20	0.00	80.23
11/9/2015	0.00	1.18	0.001	97.69
13/9/2015	0.005	1.21	0.005	94.40
18/9/2015	0.010	1.19	0.00	91.49
21/9/2015	0.00	1.20	0.00	94.50
24/9/2015	0.00	1.22	0.0006	96.65
27/9/2015	0.00	1.20	0.002	97.41
30/9/2015	0.002	1.14	0.00	99.40
1/10/2015	0.184	0.98	0.00	104.50
2/10/2015	0.101	1.06	0.0006	127.68
3/10/2015	0.023	1.03	0.004	108.07
4/10/2015	0.001	0.94	0.01	111.36
6/10/2015	0.196	1.09	0.006	106.80
10/10/2015	0.001	0.90	0.006	109.65

ตารางที่ ง.2 ผลทางเคมีของถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L) (ต่อ)

วันที่	Ammonia หลังจาก ผ่านการดำเนินการ 1 วัน (mg-N/L)	Ammonia (mg-N/L)	Nitrite (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)
12/10/2015	0.036	1.13	0.002	101.36
16/10/2015	0.062	1.20	0.0007	103.57
17/10/2015	0.151	0.74	0.0009	112.094
19/10/2015			0.0005	109.42
ค่าเฉลี่ย		1.07	0.009	-
S.D.		0.19	0.011	-



ภาคผนวก จ

ผลทางเคมีในการทดลองช่วงที่ 2 โดยที่ในถังปฏิกรณ์ A เลี้ยงด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/l ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ B เลี้ยงด้วยความเข้มข้นแอมโมเนีย 50 mg-N/l โดยทำการตรวจวัดค่าพารามิเตอร์ แอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ จ.1 และ จ.2

ตารางที่ จ.1 ผลทางเคมีของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l)

วันที่	Ammonia หลังจาก ผ่านการดำเนินการ 1 วัน (mg-N/l)	Ammonia (mg-N/l)	Nitrite (mg-N/l)	Nitrate (mg-N/l)
19/10/2015	0.035	1.07	0.008	147.36
20/10/2015	0.112	1.12	0.002	147.89
21/10/2015	0.015	1.13	0.003	146.83
22/10/2015	0.020	1.28	0.006	147.71
24/10/2015	0.080	1.51	0.011	146.76
25/10/2015	0.068	1.18	0.004	145.54
27/10/2015	0.077	0.99	0.006	145.59
28/10/2015	0.041	1.11	0.012	160.28
31/10/2015	0.038	1.07	0.011	190.36
2/11/2015	0.045	0.97	0.010	157.61
4/11/2015	0.019	1.06	0.014	169.60
5/11/2015	0.032	1.14	0.010	173.32
7/11/2015	0.040	1.05	0.029	228.86
9/11/2015	0.00	1.09	0.012	166.80
11/11/2015	0.00	1.05	0.007	264.42
13/11/2015	0.118	1.25	0.583	256.66
17/11/2015	0.00	1.11	0.013	237.26
18/11/2015	0.00	1.65	0.008	228.21
21/11/2015	0.00	1.15	0.007	184.25
22/11/2015	0.00	1.09	0.009	186.84

ตารางที่ จ.1 ผลทางเคมีของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) (ต่อ)

วันที่	Ammonia หลังจาก ผ่านการดำเนินการ 1 วัน (mg-N/L)	Ammonia (mg-N/L)	Nitrite (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)
24/11/2015	0.00	1.15	0.010	212.05
27/11/2015	0.00	1.17	0.008	232.74
28/11/2015	0.00	1.20	0.008	252.78
29/11/2015	0.00	1.18	0.009	236.35
3/12/2015	0.015	1.18	0.015	189.12
4/12/2015	0.013	1.16	0.104	197.16
5/12/2015	0.00	1.15	0.024	194.70
7/12/2015	0.00	1.16	0.067	195.70
11/12/2015	0.00	1.17	0.028	175.30
13/12/2015	0.00	1.22	0.018	181.95
17/12/2015	0.035	1.16	0.038	180.22
19/12/2015	0.00	1.16	0.007	205.86
21/12/2015	0.00	1.13	0.011	176.96
22/12/2015	0.00	1.10	0.017	203.67
27/12/2015	0.00	1.18	0.029	217.22
29/12/2015	0.00	1.13	0.001	210.31
1/1/2016	0.00	1.22	0.023	210.97
5/1/2016	0.00	1.08	0.001	199.95
9/1/2016	0.00	1.06	0.037	243.30
11/1/2016	0.00	1.06	0.014	249.65
14/1/2016	0.00	0.98	0.017	248.70
18/1/2016	0.00	1.05	0.010	255.62
23/1/2016	0.00	0.94	0.046	218.03
25/1/2016	0.00	1.09	0.014	248.32
29/1/2016	0.00	1.04	0.006	243.94

ตารางที่ จ.1 ผลทางเคมีของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) (ต่อ)

	Ammonia หลังจาก ผ่านการดำเนินการ 1 วัน (mg-N/L)	Ammonia (mg-N/L)	Nitrite (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)
ค่าเฉลี่ย	0.018	1.14	0.029	N.A
S.D.	0.030	0.12	0.086	N.A.



ตารางที่ จ. 2 ผลทางเคมีของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L)

วันที่	Ammonia หลังจากผ่าน การดำเนินการ 1 วัน (mg-N/L)	Ammonia (mg-N/L)	Nitrite (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)
19/10/2015	0.007	37.13	0.001	16.81
20/10/2015	0.013	-	1.2	38.01
21/10/2015	0.001	39.12	0.001	95.37
22/10/2015	0.002	44.17	0.0003	117.83
24/10/2015	0.002	43.78	0.002	177.61
25/10/2015	0.021	50.82	0.018	173.80
27/10/2015	0.001	40.40	0.003	177.61
28/10/2015	0.012	46.66	0.005	212.99
31/10/2015	0.005	40.67	0.004	255.59
2/11/2015	0.008	42.41	0.003	335.46
4/11/2015	0.023	40.91	0.004	375.40
5/11/2015	0.012	46.31	0.002	415.34
7/11/2015	0.00	39.73	0.004	634.86
9/11/2015	0.00	46.55	0.004	697.57
11/11/2015	0.00	43.85	0.002	607.71
13/11/2015	0.00	47.81	0.008	837.86
17/11/2015	0.00	43.21	0.009	833.98
18/11/2015	0.00	51.45	0.008	796.48
21/11/2015	0.00	43.02	0.008	896.04
22/11/2015	0.00	47.60	0.009	1018.88
24/11/2015	0.00	41.32	0.018	936.12
27/11/2015	0.00	48.84	0.008	943.88
28/11/2015	0.00	46.30	0.011	1095.16
29/11/2015	0.00	46.39	0.085	1156.50
3/12/2015	0.00	45.57	0.017	1158.16
4/12/2015	0.00	45.57	0.022	1163.15

ตารางที่ จ.2 ผลทางเคมีของถังปฏิกรณ์ B(50 mg-N/L) (ต่อ)

วันที่	Ammonia หลังจากผ่าน การดำเนินการ 1 วัน (mg-N/L)	Ammonia (mg-N/L)	Nitrite (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)
5/12/2015	0.00	47.96	0.025	1192.04
7/12/2015	0.00	47.70	0.014	1186.40
11/12/2015	0.00	49.94	1.460	1172.45
13/12/2015	0.00	46.99	0.985	1246.18
17/12/2015	0.00	63.63	0.044	1354.79
19/12/2015	0.00	52.04	0.010	1506.91
21/12/2015	0.00	40.09	0.013	1595.92
22/12/2015	0.00	-	0.009	1542.78
27/12/2015	0.00	59.99	0.019	1821.78
29/12/2015	0.00	59.34	0.015	1861.63
1/1/2016	0.00	46.53	0.019	1898.50
5/1/2016	0.00	40.52	0.009	1899.50
9/1/2016	0.00	44.51	0.039	2513.33
11/1/2016	0.00	39.94	0.032	2404.76
14/1/2016	0.00	55.46	0.018	2453.97
18/1/2016	0.00	49.94	0.029	2515.24
23/1/2016	0.00	47.92	0.022	2673.65
25/1/2016	0.00	47.75	0.008	2545.71
29/1/2016	0.00	46.80	0.003	2590.48
ค่าเฉลี่ย	0.002	46.43	0.094	N.A.
S.D.	0.005	5.64	0.307	N.A.



ภาคผนวก ฉ

ผลการศึกษาพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของ จุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่ง และ จุลินทรีย์กลุ่มไนโตรทออกซิไดซิ่ง ในการทดลองช่วงที่ 1 โดยนำตัวกลางพลาสติก 100 ml ที่ผ่านการ บ่มจากถังปฏิกรณ์ A(50 mg-N/l) และ ถังปฏิกรณ์ B(1 mg-N/l) มาใส่ในแก้วพลาสติกแล้วเติมน้ำเสีย สั้เคราะห์ที่มีความเข้มข้น แอมโมเนีย หรือ ไนโตรที่แตกต่างกันจนมีปริมาตร 300 ml ทำการปรับ pH ด้วย NaOH และ NaHCO_3 ทำการทดลองในแต่ละชุด 1 ชั่วโมง แล้วจึงทำการวิเคราะห์ค่า แอมโมเนีย หรือ ไนโตรที่ ตลอดการทดลองดังแสดงในตารางที่ ฉ.1 ถึงตารางที่ ฉ.4



ตารางที่ ฉ.1 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 1

ความเข้มข้นแอมโมเนียในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)										
เวลา (ชม.)	1 ppm	2 ppm	5 ppm	10 ppm	12 ppm	15 ppm	20 ppm	25 ppm	30 ppm	50 ppm
0	0.70	2.90	4.82	9.25	10.13	13.07	24.11	22.76	N.A.	N.A.
0.25	0.35	1.11	3.61	9.51	11.6	15.08	27.52	24.50	32.88	43.43
0.5	0.15	0.60	2.07	8.17	11.2	13.93	28.20	20.10	30.14	39.95
0.75	0.00	0.20	2.17	5.44	8.80	13.10	22.67	19.44	30.22	37.21
1	0.00	0.05	0.70	3.65	7.54	11.35	20.83	13.51	25.04	36.21
2	0.00	0.05	0.11	2.01	3.82	8.05	16.62	12.77	22.55	32.23
4	0.00	0.00	0.00	0.55	1.65	5.40	12.84	12.27	19.90	27.38
6	0.00	0.00	0.11	0.22	1.31	2.95	11.77	N.A.	17.08	22.28

ตารางที่ ฉ.2 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 1

ความเข้มข้นแอมโมเนียในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)										
เวลา (ชม.)	0.2 ppm	0.5 ppm	1 ppm	2 ppm	8 ppm	12 ppm	เวลา (ชม.)	20 ppm	25 ppm	30 ppm
0	0.045	0.135	0.534	1.44	N.A.	N.A.	0	13.56	17.01	18.54
0.25	0.039	0.103	0.485	1.43	5.62	N.A.	0.5	13.56	N.A.	18.26
0.5	0.03	0.072	0.517	1.50	6.20	12.17	1	13.56	15.98	N.A.
0.75	0.019	0.063	0.434	1.46	6.02	12.13	2	12.66	15.77	18.26
1	0.012	0.022	0.380	1.31	5.87	11.75	3	12.52	15.01	17.92
2	N.A.	0.00	0.235	1.22	5.51	11.60	4	12.18	15.36	17.30
4	N.A.	0.00	0.156	1.15	4.80	10.60	6	12.18	14.60	16.67
6	0.00	0.00	0.067	1.15	N.A.	10.52	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

ตารางที่ ๓.3 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรเจนของถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 1

ความเข้มข้นไนโตรเจนในแต่ละระบบความเข้มข้น (mg-N/l)									
เวลา (ชม.)	1 ppm	2 ppm	5 ppm	8 ppm	10 ppm	12 ppm	15 ppm	35 ppm	40 ppm
0	0.82	1.72	4.14	6.90	7.62	9.69	13.13	25.16	N.A.
0.25	0.57	1.50	3.61	6.61	7.41	9.78	12.31	24.79	35.52
0.5	0.32	1.11	2.78	5.95	6.32	8.36	11.12	N.A.	34.21
0.75	0.15	0.81	2.25	5.11	5.01	7.29	10.21	24.22	34.30
1	0.07	0.46	1.55	4.06	3.77	5.89	9.21	N.A.	33.58
2	0.02	0.10	0.42	1.50	0.97	2.07	4.83	22.39	28.80
4	0.01	0.02	0.05	0.20	0.21	0.43	0.70	12.28	24.10
6	0.02	0.01	0.01	0.04	0.06	0.03	0.00	4.07	17.26

ตารางที่ ฉ.4 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรเจนของถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 1

ความเข้มข้นไนโตรเจนในแต่ละระบบความเข้มข้น (mg-N/l)					
เวลา (ชม.)	0.1 ppm	0.2 ppm	0.5 ppm	1 ppm	5 ppm
0	0.078	0.14	0.41	0.770	N.A.
0.25	0.069	0.13	0.39	0.712	5.56
0.5	0.056	0.11	0.33	N.A	5.50
0.75	0.049	0.10	0.29	0.695	5.42
1	0.040	0.09	0.27	0.689	5.34
2	0.018	0.04	0.16	0.585	4.89
4	0.007	0.02	0.05	0.394	4.71
6	0.004	0.01	0.03	0.171	4.23

ตารางที่ ฉ.4 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรเจนของถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 1 (ต่อ)

ความเข้มข้นไนโตรเจนในแต่ละระบบความเข้มข้น (mg-N/l)						
เวลา (ชม.)	12 ppm	18 ppm	45 ppm	เวลา (ชม.)	15 ppm	25 ppm
0	9.13	14.60	37.28	0	15.03	21.97
0.25	8.94	14.21	36.44	0.5	14.84	N.A.
0.5	8.89	13.32	36.91	2	14.55	21.63
0.75	8.76	13.24	36.62	3	14.32	21.41
1	8.92	N.A.	36.38	4	13.89	21.34
2	8.75	14.08	35.95	5	13.00	20.77
4	8.02	N.A.	33.83	6	12.54	20.54
6	7.24	11.14	35.59	7	12.13	20.40



ภาคผนวก ข

ผลการศึกษาพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของ จุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิ่ง ในการทดลองช่วงที่ 2 โดยนำตัวกลางพลาสติก 100 ml ที่ผ่านการบ่มจากถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) และถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L) มาใส่ในแก้วพลาสติกแล้วเติมน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้น แอมโมเนีย หรือ ไนไตรท์ที่แตกต่างกันจนมีปริมาตร 300 ml ทำการปรับ pH ด้วย NaOH และ NaHCO₃ ทำการทดลองในแต่ละชุด 1 ชั่วโมง แล้วจึงทำการวิเคราะห์ค่า แอมโมเนีย โดยทำการทดลอง 4 ครั้ง ในวันที่ 6, 20, 47 และ ของการทดลองช่วงที่ 2 ผลการทดลองของถังปฏิกรณ์ A(1 mg-N/L) แสดงในตารางที่ ข.1 ถึงตารางที่ ข.4 และถังปฏิกรณ์ B(50 mg-N/L) แสดงในตารางที่ ข.5-ข.8

ตารางที่ ข.1 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 1 (วันที่ 6 ในการทดลองช่วงที่ 2)

ความเข้มข้นแอมโมเนียในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/L)							
เวลา (ชม.)	0.5 mg-N/l	1 mg-N/l	2 mg-N/l	เวลา (ชม.)	5 mg-N/l	8 mg-N/l	10 mg-N/l
0	0.33	0.71	1.47	0	4.67	7.03	9.08
0.25	0.17	0.54	1.04	0.5	4.07	6.37	7.98
0.5	0.105	0.35	0.69	1	3.52	6.28	6.88
0.75	0.08	0.18	0.36	1.5	3.22	5.60	5.75
1	0.03	0.08	0.16	2	2.99	5.20	4.83
2	0.00	0.01	0.02	3	2.66	4.73	2.77
4	0.00	0.00	0.07	4	2.40	4.83	0.45
6	0.01	0.00	0.05	6	1.67	4.36	0.03

ตารางที่ ข.1 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l) ในการทดลองครั้งที่ 2 ครั้งที่

1

(วันที่ 6 ในการทดลองครั้งที่ 2) (ต่อ)

ความเข้มข้นแอมโมเนียในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)							
เวลา (ชม.)	15 mg-N/l	20 mg-N/l	25 mg-N/l	40 mg-N/l	50 mg-N/l	70 mg-N/l	100 mg-N/l
0	12.86	18.03	24.11	37.53	47.62	64.44	86.76
0.5	11.46	17.59	N.A.	36.56	46.50	63.23	84.06
1	11.40	N.A.	22.20	36.40	45.89	62.12	82.37
2	11.32	16.53	21.27	N.A.	45.57	60.35	81.57
3	11.06	16.24	20.55	35.76	45.16	58.28	77.63
4	10.66	16.09	20.39	35.63	44.77	56.31	74.85
5	10.10	15.87	19.67	35.36	N.A.	51.18	74.33
6	10.05	14.74	19.02	34.71	44.73	47.14	71.27

ตารางที่ ข.2 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l) ในการทดลองครั้งที่ 2 ครั้งที่ 2 (วันที่ 20 ในการทดลองครั้งที่ 2)

ความเข้มข้นแอมโมเนียในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)							
เวลา (ชม.)	0.5 mg-N/l	1 mg-N/l	2 mg-N/l	5 mg-N/l	เวลา (ชม.)	8 mg-N/l	10 mg-N/l
0	0.58	0.98	2.03	4.84	0	N.A.	N.A.
0.25	0.56	0.98	2.06	4.83	0.5	7.31	9.40
0.5	0.51	0.92	2.11	4.91	1	7.19	9.07
0.75	0.43	0.85	2.03	4.84	1.5	6.97	N.A.
1	0.38	0.78	1.84	4.65	2	6.78	8.88
2	0.17	0.46	1.54	4.34	3	6.41	8.55
4	0.00	0.05	0.92	3.60	4	6.16	8.31
6	0.00	0.00	0.53	3.17	6	5.79	8.21

ตารางที่ ข.2 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l) ในการทดลองครั้งที่ 2 ครั้งที่ 2 (วันที่ 20 ในการทดลองครั้งที่ 2) (ต่อ)

ความเข้มข้นแอมโมเนียในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)							
เวลา (ชม.)	15 mg-N/l	20 mg-N/l	25 mg-N/l	30 mg-N/l	เวลา (ชม.)	40 mg-N/l	50 mg-N/l
0	13.81	17.43	21.49	N.A.	0	33.88	N.A.
0.5	13.68	N.A.	N.A.	27.48	0.5	N.A.	42.31
1	13.55	17.46	21.65	27.30	1	33.66	42.34
1.5	13.34	17.37	21.82	27.18	2	33.36	41.96
2	12.83	17.02	21.29	26.60	3	33.11	41.39
3	12.50	16.35	21.04	26.32	4	32.35	39.96
4	12.35	16.05	20.47	26.20	5	N.A.	N.A.
6	11.79	15.72	19.47	24.95	6	31.73	N.A.

ตารางที่ ข.3 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 3 (วันที่ 47 ในการทดลองช่วงที่ 2)

ความเข้มข้นแอมโมเนียในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)							
เวลา (ชม.)	0.2 mg-N/l	0.5 mg-N/l	0.8 mg-N/l	เวลา (ชม.)	1 mg-N/l	2 mg-N/l	5 mg-N/l
0	0.21	0.48	0.70	0	0.88	1.85	N.A.
0.25	0.19	0.51	0.72	0.5	0.79	1.82	4.73
0.5	0.16	0.43	0.58	1	0.69	1.77	4.50
0.75	0.12	0.34	0.52	1.5	0.57	1.51	4.33
1	0.11	0.32	0.43	2	0.42	1.29	4.04
2	0.02	0.09	0.17	3	0.17	0.91	3.55
4	0.00	0.00	0.00	4	0.00	0.49	3.15
6	0.00	0.00	0.00	6	0.00	0.00	1.85

ตารางที่ ข.3 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 3 (วันที่ 47 ในการทดลองช่วงที่ 2) (ต่อ)

ความเข้มข้นแอมโมเนียในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)								
เวลา (ชม.)	10 mg-N/l	12 mg-N/l	15 mg-N/l	20 mg-N/l	เวลา (ชม.)	30 mg-N/l	40 mg-N/l	50 mg-N/l
0	9.00	11.05	13.50	18.03	0.5	28.20	35.90	43.95
0.5	9.08	10.95	13.40	18.22	1	27.95	35.70	44.80
1	8.70	10.78	13.22	18.04	2	26.93	35.06	44.82
1.5	8.36	10.55	13.15	17.64	3	26.48	34.90	44.34
2.5	8.06	9.98	12.46	17.17	4	25.76	34.08	43.25
3.5	7.83	9.36	11.98	17.22	5	24.47	33.22	43.11
5.5	6.76	7.92	10.80	14.79	6	24.27	32.71	41.97

ตารางที่ ข.4 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 4 (วันที่ 95 ในการทดลองช่วงที่ 2)

ความเข้มข้นแอมโมเนียในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)							
เวลา (ชม.)	0.2 mg-N/l	0.5 mg-N/l	0.8 mg-N/l	1 mg-N/l	2 mg-N/l	3 mg-N/l	4 mg-N/l
0	0.29	0.52	0.78	0.82	1.83	2.73	3.47
0.5	N.A.	0.39	0.64	0.73	1.60	2.61	3.40
1	0.15	0.30	0.56	0.52	1.26	2.28	3.08
1.5	0.09	0.25	0.46	0.32	0.83	N.A.	2.40
2	0.00	0.05	0.16	0.18	0.54	1.50	1.81
3	N.A.	N.A.	N.A.	0.03	0.13	0.78	1.68
4	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0.21	0.92
6	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0.00

ตารางที่ ข.4 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 4 (วันที่ 95 ในการทดลองช่วงที่ 2) (ต่อ)

ความเข้มข้นแอมโมเนียในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)							
เวลา (ชม.)	5 mg-N/l	10 mg-N/l	15 mg-N/l	เวลา (ชม.)	20 mg-N/l	40 mg-N/l	50 mg-N/l
0	4.10	N.A.	14.19	0	N.A.	N.A.	N.A.
0.5	4.20	9.28	14.39	0.5	18.56	33.79	42.33
1	4.01	9.13	14.06	1	18.41	33.54	41.40
1.5	3.77	8.70	13.54	2	17.76	32.64	40.47
2	3.53	8.32	13.13	3	16.74	31.61	N.A.
3	2.95	7.77	12.20	4	15.67	31.18	39.52
4	2.28	6.85	11.60	5	14.67	31.07	39.19
6	0.94	5.41	10.06	6	13.72	30.13	38.25

ตารางที่ ข.5 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 1 (วันที่ 6 ในการทดลองช่วงที่ 2)

ความเข้มข้นแอมโมเนียในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)							
เวลา (ชม.)	1 mg-N/l	2 mg-N/l	3 mg-N/l	4 mg-N/l	เวลา (ชม.)	5 mg-N/l	10 mg-N/l
0	0.55	1.25	2.17	2.74	0	4.17	6.96
0.25	0.25	0.67	1.43	2.07	0.5	3.27	5.40
0.5	0.05	0.13	0.70	1.39	1	2.26	3.85
0.75	0.00	0.005	0.008	0.76	1.5	1.36	2.25
1	0.00	0.002	0.004	0.24	2	0.66	N.A
2	0.00	0.00	0.00	0.003	3	0.00	0.93
4	0.00	0.00	0.00	0.00	4	0.00	N.A.
6	0.00	0.00	0.00	0.00	6	0.00	0.11

ตารางที่ ข.5 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 1 (วันที่ 6 ในการทดลองช่วงที่ 2) (ต่อ)

ความเข้มข้นแอมโมเนียในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)							
เวลา (ชม.)	15 mg-N/l	20 mg-N/l	30 mg-N/l	40 mg-N/l	50 mg-N/l	70 mg-N/l	100 mg-N/l
0	13.51	15.66	26.08	33.27	42.79	57.28	84.80
0.5	12.10	15.13	25.37	32.31	41.72	N.A.	N.A.
1	N.A.	13.92	25.17	32.08	42.79	N.A.	85.95
2	10.04	12.77	20.84	30.37	38.51	53.33	84.00
3	8.41	N.A.	17.82	27.19	34.89	51.45	79.99
4	5.68	9.08	17.59	24.81	32.87	48.55	77.37
5	3.47	7.50	14.61	N.A.	33.03	47.91	75.78
6	0.10	4.46	15.24	22.35	30.77	N.A.	71.93

ตารางที่ ข.6 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 2 (วันที่ 20 ในการทดลองช่วงที่ 2)

ความเข้มข้นแอมโมเนียในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)									
เวลา (ชม.)	0.5	1	2	5	8	เวลา (ชม.)	10	15	20
	mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l		mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l
0	0.45	0.73	1.73	4.57	7.26	0	8.64	12.96	17.44
0.25	0.16	0.40	1.69	4.42	6.23	0.5	7.56	12.14	16.52
0.5	0.005	0.13	0.89	3.80	N.A.	1	5.83	10.14	14.68
0.75	0.00	0.00	0.26	2.77	3.52	1.5	4.65	8.87	13.44
1	0.00	0.00	0.04	1.53	2.32	2	3.12	7.42	11.97
2	0.00	0.00	0.00	0.06	0.63	3	1.11	5.27	9.94
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4	0.08	3.42	7.79
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6	0.00	0.54	4.61

ตารางที่ ข.6 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 2 (วันที่ 20 ในการทดลองช่วงที่ 2) (ต่อ)

ความเข้มข้นแอมโมเนียในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)								
เวลา (ชม.)	25	30	เวลา (ชม.)	40	45	50	70	100
	mg-N/l	mg-N/l		mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l
0	26.07	29.40	0	37.17	44.90	49.03	63.95	94.02
0.5	23.45	29.10	0.5	36.57	45.45	47.90	63.46	93.97
1	21.34	26.40	1	34.91	43.57	45.55	61.58	91.06
1.5	19.54	25.06	1.5	31.02	40.68	41.94	57.50	88.28
2	18.34	23.27	2	29.47	37.74	40.11	56.06	86.43
3	15.78	20.51	3	27.05	35.57	38.21	53.66	84.28
4	13.79	18.66	4	25.50	34.42	36.85	52.58	82.46
6	10.15	14.99	6	23.76	32.38	35.16	50.97	N.A.

ตารางที่ ข.7 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 3 (วันที่ 47 ในการทดลองช่วงที่ 2)

ความเข้มข้นแอมโมเนียในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)									
เวลา (ชม.)	0.5	1	2	5	8	เวลา (ชม.)	10	12	15
	mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l		mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l
0	0.45	0.77	2.19	4.85	6.71	0	7.78	10.10	12.39
0.25	0.13	0.30	1.31	4.00	5.61	0.5	6.25	8.56	10.88
0.5	0.02	0.09	0.91	3.18	4.94	1	4.03	6.50	9.02
0.75	0.00	0.00	0.53	2.10	3.63	1.5	2.70	4.95	7.69
1	0.00	0.00	0.33	1.36	2.68	2	1.19	3.36	6.02
2	0.00	0.00	N.A.	0.45	0.27	3	0.00	1.56	4.08
4	0.00	0.00	N.A.	N.A.	N.A.	4	N.A.	0.04	2.34
6	0.00	0.00	N.A.	N.A.	N.A.	6	N.A.	N.A.	0.00

ตารางที่ ข.7 ผลจลนพลศาสตร์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 3 (วันที่ 47 ในการทดลองช่วงที่ 2) (ต่อ)

ความเข้มข้นแอมโมเนียในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)								
เวลา (ชม.)	20	25	30	เวลา (ชม.)	40	50	70	100
	mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l		mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l
0	14.98	23.95	26.32	0	33.53	45.11	64.71	N.A.
0.5	13.47	22.12	24.96	0.5	32.26	44.51	63.65	85.08
1	11.44	18.76	23.10	1	30.42	41.32	61.48	81.41
1.5	10.49	17.53	21.21	2	27.41	39.25	58.20	78.30
2	9.18	15.49	19.53	3	25.42	37.10	56.18	77.02
3	7.22	13.36	17.56	4	22.83	35.16	53.65	74.57
4	5.06	11.12	15.25	5	21.48	33.61	52.13	74.75
6	2.72	9.47	12.51	6	19.82	31.75	51.28	71.56

ภาคผนวก ซ



ภาพผนวก ซ

ผลการศึกษาดูการเปลี่ยนแปลงของ จุลินทรีย์กลุ่มไนโตรเจนออกไซด์ซึ่ง ในการทดลองช่วงที่ 2 โดยนำตัวกลางพลาสติก 100 ml ที่ผ่านการบ่มจากถังปฏิกรณ์ A (50 mg-N/L) และถังปฏิกรณ์ B (1 mg-N/L) มาใส่ในแก้วพลาสติกแล้วเติมน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้น แอมโมเนีย หรือ ไนโตรที่ที่แตกต่างกันจนมีปริมาตร 300 ml ทำการปรับ pH ด้วย NaOH และ NaHCO₃ ทำการทดลองในแต่ละชุด 1 ซ้ำ แล้วจึงทำการวิเคราะห์ค่า ไนโตรที่ โดยทำการทดลอง 4 ครั้ง ในวันที่ 6, 20, 47 และ ของการทดลองช่วงที่ 2 ผลการทดลองของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) แสดงในตารางที่ ซ.1 ถึงตารางที่ ซ.4 และถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/L) แสดงในตารางที่ ซ.5 ถึงตารางที่ ซ.8

ตารางที่ ซ.1 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรที่ของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/L) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 1 (วันที่ 6 ในการทดลองช่วงที่ 2)

ความเข้มข้นไนโตรที่ในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/L)						
เวลา (ชม.)	0.5 mg-N/l	1 mg-N/l	2 mg-N/l	เวลา (ชม.)	5 mg-N/l	8 mg-N/l
0	0.31	0.65	1.91	0	3.71	6.15
0.25	0.22	0.41	1.68	0.5	3.24	5.51
0.5	0.19	0.30	1.28	1	3.21	N.A.
0.75	0.11	0.22	1.09	1.5	N.A.	4.31
1	0.05	0.07	0.63	2	2.74	3.15
2	0.00	0.00	0.06	3	0.69	1.01
4	0.00	0.00	0.00	4	0.00	0.00
6	0.01	0.00	0.00	6	0.00	0.00

ตารางที่ ซ.1 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรเจนของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l) ในการทดลองครั้งที่ 2 ครั้งที่ 1 (วันที่ 6 ในการทดลองครั้งที่ 2) (ต่อ)

ความเข้มข้นไนโตรเจนในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)						
เวลา (ชม.)	10 mg-N/l	15 mg-N/l	20 mg-N/l	25 mg-N/l	30 mg-N/l	40 mg-N/l
0	6.67	10.23	13.55	N.A.	24.58	42.73
0.5	6.15	9.83	N.A.	18.65	N.A.	38.51
1	5.82	9.51	10.62	18.44	24.03	36.37
1.5	4.73	8.16	N.A.	16.45	24.70	N.A.
2	3.61	7.85	9.01	12.44	22.46	33.84
3	0.54	5.44	8.15	11.72	21.91	31.13
4	0.00	2.25	6.99	10.41	17.78	26.33
6	0.00	0.11	3.52	8.27	13.68	21.82

ตารางที่ ข.2 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรเจนของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 2 (วันที่ 20 ในการทดลองช่วงที่ 2)

ความเข้มข้นไนโตรเจนในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)										
เวลา (ชม.)	0.5	1	2	เวลา (ชม.)	8	เวลา (ชม.)	15	25	35	40
	mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l		mg-N/l		mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l
0	0.53	1.12	1.83	0	7.35	0	12.93	22.71	32.09	35.36
0.25	0.52	1.11	1.83	0.5	7.27	0.5	12.84	22.63	32.03	34.92
0.5	0.51	N.A.	1.81	1	7.16	1	12.80	22.50	31.83	34.82
0.75	0.49	1.08	1.79	1.5	7.10	2	12.76	22.25	31.74	34.67
1	0.48	1.02	1.79	2	6.96	3	12.72	21.96	31.59	34.43
2	0.42	0.81	1.70	3	6.82	4	N.A.	N.A.	31.36	34.24
4	0.21	0.46	1.27	4	6.64	5	12.69	21.74	31.09	N.A.
6	0.20	0.13	0.81	6	6.38	6	N.A.	N.A.	N.A.	33.14.

ตารางที่ ข.3 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรเจนของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 3 (วันที่ 47 ในการทดลองช่วงที่ 2)

ความเข้มข้นไนโตรเจนในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)											
เวลา (ชม.)	0.2	0.5	1	เวลา (ชม.)	2	5	8	10	12	15	25
	mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l		mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l	mg-N/l
0	N.A.	0.39	0.78	0	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
0.25	0.19	0.38	0.84	0.5	1.71	4.30	N.A.	N.A.	11.43	14.36	22.22
0.5	0.20	0.42	0.84	1	1.63	4.31	N.A.	N.A.	11.39	14.17	22.51
0.75	0.20	0.40	N.A.	1.5	1.62	4.32	N.A.	9.46	11.33	N.A.	N.A.
1	0.20	0.41	0.82	2	1.55	4.26	7.16	9.52	11.27	14.00	22.30
2	0.17	0.31	0.76	3	1.43	4.11	7.08	9.46	11.19	13.85	22.38
4	0.05	0.07	0.48	4	1.23	4.00	6.96	9.36	11.11	N.A.	22.25
6	0.00	0.01	0.21	6	0.86	3.66	6.67	8.99	10.56	13.53	21.97

ตารางที่ ข.4 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรเจนของถังปฏิกรณ์ A (1 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 3 (วันที่ 47 ในการทดลองช่วงที่ 2)

ความเข้มข้นไนโตรเจนในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)											
เวลา (ชม.)	0.1	0.2	0.5	3	4	5	เวลา (ชม.)	10	15	20	30
	mg- N/l	mg- N/l	mg- N/l	mg- N/l	mg- N/l	mg- N/l		mg- N/l	mg- N/l	mg- N/l	mg- N/l
0	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
0.5	N.A.	0.27	0.50	2.89	3.59	4.73	0.5	9.25	14.08	19.51	28.90
1	0.09	0.26	0.49	2.86	3.56	4.74	1	9.03	14.10	19.44	29.01
2	0.08	0.24	0.41	2.76	3.57	4.63	2	8.92	14.18	19.41	28.28
3	0.04	0.18	0.29	2.64	3.46	4.56	4	8.56	14.12	19.04	27.97
4	0.03	0.09	0.15	2.53	3.33	4.36	6	8.21	13.28	18.59	N.A.
6	0.04	0.00	0.00	2.05	2.95	3.88	8	7.75	13.06	17.46	26.21
8	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	10	7.43	N.A.	N.A.	N.A.

ตารางที่ ซ.5 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรเจนของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 1 (วันที่ 6 ในการทดลองช่วงที่ 2)

ความเข้มข้นไนโตรเจนในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)						
เวลา (ชม.)	0.2 mg-N/l	0.5 mg-N/l	1 mg-N/l	2 mg-N/l	5 mg-N/l	8 mg-N/l
0	0.24	0.30	0.60	1.43	3.34	5.71
0.25	0.20	0.29	0.57	1.40	3.39	5.02
0.5	0.12	0.18	0.39	1.20	3.33	4.36
0.75	0.05	0.08	0.21	0.95	3.01	3.78
1	0.02	0.03	N.A.	0.11	1.55	2.64
2	0.00	0.00	0.01	0.19	0.75	1.03
4	0.00	0.00	0.00	0.01	0.05	0.18
6	0.00	0.01	0.00	0.00	0.03	0.02

ตารางที่ ซ.5 : ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรเจนของถังปฏิกรณ์ B(50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 1 (วันที่ 6 ในการทดลองช่วงที่ 2) (ต่อ)

ความเข้มข้นไนโตรเจนในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)									
เวลา (ชม.)	10 mg-N/l	12 mg-N/l	15 mg-N/l	17 mg-N/l	20 mg-N/l	เวลา (ชม.)	25 mg-N/l	30 mg-N/l	40 mg-N/l
0	7.70	9.79	14.09	15.10	16.87	0	21.00	23.60	31.99
0.5	6.98	9.34	13.21	14.24	15.61	0.5	21.07	23.15	32.91
1	5.94	8.72	12.24	12.97	14.90	1	20.97	23.22	31.43
1.5	5.28	8.12	11.56	12.80	14.20	1.5	N.A.	22.36	27.07
2	4.72	7.89	10.91	12.13	N.A.	2	18.57	19.44	N.A.
3	2.71	6.15	8.68	9.56	10.89	3	17.87	16.13	26.29
4	1.67	4.33	6.16	5.97	7.89	4	16.02	14.69	24.88
6	0.43	1.26	1.70	1.74	2.71	6	15.07	11.23	23.67

ตารางที่ ซ.6 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรเจนของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 2 (วันที่ 20 ในการทดลองช่วงที่ 2)

ความเข้มข้นไนโตรเจนในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)							
เวลา (ชม.)	0.5 mg-N/l	1 mg-N/l	2 mg-N/l	5 mg-N/l	เวลา (ชม.)	8 mg-N/l	10 mg-N/l
0	0.39	0.57	1.55	3.12	0	6.19	6.08
0.25	0.12	0.32	1.03	3.03	0.5	4.64	5.56
0.5	0.02	0.06	0.31	2.34	1	2.45	4.32
0.75	0.01	0.01	0.03	1.06	1.5	0.58	2.31
1	0.00	0.00	0.00	0.26	2	0.03	0.34
2	0.00	0.00	0.00	0.00	3	0.00	0.05
4	0.00	0.00	0.00	0.00	4	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00	6	0.00	0.00

ตารางที่ ซ.6 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรเจนของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 2 (วันที่ 20 ในการทดลองช่วงที่ 2)

ความเข้มข้นไนโตรเจนในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)							
เวลา (ชม.)	15 mg-N/l	20 mg-N/l	25 mg-N/l	30 mg-N/l	เวลา (ชม.)	35 mg-N/l	40 mg-N/l
0	12.32	16.29	20.66	23.05	0	29.44	31.55
0.5	10.72	14.91	18.41	21.35	0.5	27.95	29.88
1	8.38	12.75	16.31	18.89	1	25.93	29.12
1.5	5.35	10.47	14.14	16.38	2	22.06	24.40
2	3.07	7.12	11.07	12.94	3	17.90	19.71
3	0.08	3.00	5.82	7.34	4	12.68	14.58
4	0.00	0.13	1.14	1.79	5	8.23	10.45
6	0.00	0.00	0.00	0.06	6	2.95	5.04

ตารางที่ ซ.7 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรเจนของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 3 (วันที่ 47 ในการทดลองช่วงที่ 2)

ความเข้มข้นไนโตรเจนในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)								
เวลา (ชม.)	0.5 mg-N/l	1 mg-N/l	2 mg-N/l	5 mg-N/l	เวลา (ชม.)	8 mg-N/l	10 mg-N/l	15 mg-N/l
0	0.46	0.83	1.63	4.18	0	6.77	8.38	17.82
0.25	0.26	0.60	1.07	3.50	0.5	5.55	6.65	16.24
0.5	0.13	0.40	0.63	2.84	1	3.91	4.47	14.92
0.75	0.05	0.20	0.28	2.12	1.5	2.72	2.81	13.38
1	0.02	0.08	0.09	1.44	2	1.40	1.08	11.60
2	0.00	0.01	0.00	0.11	3	0.14	0.02	8.33
4	0.00	0.00	0.00	0.00	4	0.00	0.00	4.82
6	0.00	0.00	0.00	0.00	6	0.00	0.00	0.40

ตารางที่ ซ.7 ผลจลนพลศาสตร์ไนโตรเจนของถังปฏิกรณ์ B (50 mg-N/l) ในการทดลองช่วงที่ 2 ครั้งที่ 3 (วันที่ 47 ในการทดลองช่วงที่ 2) (ต่อ)

ความเข้มข้นไนโตรเจนในแต่ละระบบของความเข้มข้น (mg-N/l)							
เวลา (ชม.)	20 mg-N/l	25 mg-N/l	เวลา (ชม.)	30 mg-N/l	40 mg-N/l	50 mg-N/l	100 mg-N/l
0	23.25	26.61	0	33.90	33.85	43.15	86.36
0.5	22.03	25.41	0.5	32.31	32.72	41.41	85.56
1	19.55	23.78	1	30.92	30.97	39.81	83.70
1.5	N.A.	20.77	2	26.77	26.89	N.A.	N.A.
2	16.25	18.32	3	25.01	24.51	31.75	77.37
3	12.38	17.25	4	20.28	19.23	28.54	74.92
4	8.30	12.50	5	17.10	16.40	22.60	71.99
6	1.60	5.20	6	12.00	11.40	20.41	69.61

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย ธารเพชร เจริญวุฒิจพงศ์ เกิดเมื่อวันที่ 25 ธันวาคม 2531 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร จบการศึกษาระดับมัธยมปลายจาก โรงเรียนอัสสัมชัญในปีการศึกษา 2549 ได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาตรี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาควิชาวิศวกรรมนาโน (หลักสูตรนานาชาติ) ในปีการศึกษา 2550 และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา พ.ศ. 2553 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทคณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ในปีการศึกษา พ.ศ. 2555

ในระหว่างการศึกษาระดับปริญญาโท ได้เป็นนักเรียนแลกเปลี่ยนของมหาวิทยาลัยโตเกียว (University of Tokyo) ตั้งแต่เดือน เมษายน 2557 ถึง กรกฎาคม 2557 รวมทั้งได้มีการนำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการ 3rd International Conference on Biological, Chemical and Environmental Sciences (BCES-2015) ระหว่างวันที่ 21-22 กันยายน 2558 ณ กรุง กัวลาลัมเปอร์ ประเทศมาเลเซีย ในหัวข้อ “Kinetics of Ammonia-Oxidizing microorganisms and Nitrite-oxidizing bacteria enriched at high and low ammonia concentrations.”