

การย่อยสลายฮอร์โมน 17 แอลฟา-เมทิลเทสโทสเตอโรน และ 17 แอลฟา-เอทินิลเอสตราไดออล โดย
ตะกอนจุลินทรีย์ที่มีจลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียแตกต่างกัน



นายรัตนรัตน์ แจ่มใจ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

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

Degradation of hormone 17 alpha-methyltestosterone and 17 alpha-ethinylestradiol by sludge with different kinetics of ammonia oxidation

Mr. Rattanarat Jangjai



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	การย่อยสลายฮอร์โมน 17 แอลฟา-เมทิลเทสโทสเตอโรน และ 17 แอลฟา-เอทินิลเอสตระไดออล โดยตะกอนจุลินทรีย์ที่มีจุลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียแตกต่างกัน
โดย	นายรัตนรัตน์ แจ่มใจ
สาขาวิชา	วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ตะวัน ลิ้มปิยากร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. ไชยวัฒน์ รงค์สยามานนท์

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชัยพร ภู่งามเสริฐ)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.ตะวัน ลิ้มปิยากร)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. ไชยวัฒน์ รงค์สยามานนท์)
.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เบญจพร สุวรรณศิลป์)
.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิบูลย์ลักษณ์ ฟุ้งรัมย์)
.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.สรวิศ เผ่าทองสุข)

รัตนรัตน์ แจ่มใจ : การย่อยสลายฮอร์โมน 17 แอลฟา-เมทิลเทสโทสเตอโรน และ 17 แอลฟา-เอthinylestradiol โดยตะกอนจุลินทรีย์ที่มีจุลณพลศาสตร์การออกซิโดซ์แอมโมเนียแตกต่างกัน (Degradation of hormone 17 alpha-methyltestosterone and 17 alpha-ethinylestradiol by sludge with different kinetics of ammonia oxidation) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.ตะวัน ลิ้มปิยากร, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร. ไชยวัฒน์ รงค์สยามานนท์, 169 หน้า.

17 α -เอthinylestradiol (EE2) เป็นส่วนประกอบหลักในยาเม็ดคุมกำเนิดที่ใช้ป้องกันการตั้งครรภ์แบบชั่วคราว เมื่อรับประทานแล้วจะถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมผ่านทางปัสสาวะและป็นอนในน้ำเสีย โดยจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียทั่วไปไม่สามารถย่อยสลายได้ ทำให้ตกค้างในน้ำทิ้ง 17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน (MT) เป็นฮอร์โมนเพศชายสังเคราะห์ ใช้ในการแปลงเพศลูกปลานิล โดย MT จะถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมผ่านการปล่อยน้ำทิ้งจากฟาร์มเพาะเลี้ยงที่ไม่ได้รับการบำบัดอย่างถูกวิธี มีงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า EE2 สามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยแอมโมเนียออกซิโดซ์ซิงแบคทีเรีย (AOB) ผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมได้ เนื่องจากฮอร์โมน MT มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ EE2 จึงมีความเป็นไปได้ว่า MT จะสามารถย่อยสลายได้โดย AOB ผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมได้เช่นเดียวกัน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์คือ 1.เพื่อสร้างตะกอนที่มีจุลณพลศาสตร์ในการออกซิโดซ์แอมโมเนียที่แตกต่างกัน 2.เพื่อศึกษาการย่อยสลาย EE2 และ MT ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมโดย AOB 3.เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียที่แตกต่างกันต่อการสลาย EE2 และผลของความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ EE2 ต่อการออกซิโดซ์แอมโมเนีย การทดลองเริ่มจากการเตรียมตะกอนจุลินทรีย์ ในถังปฏิกรณ์ที่มีค่าแอมโมเนียเข้าเท่ากับ 28, 70, 140 และ 420 มก.ไนโตรเจน/ล. ทำให้มีค่าแอมโมเนียที่ออกแตกต่างกันคือ 0.09 \pm 0.05, 0.25 \pm 0.12, 2.3 \pm 0.85 และ 15.27 \pm 9.03 มก.ไนโตรเจน/ล. หลังจากนั้นเลือกถังปฏิกรณ์ 2 ถัง คือถัง 70 และ 420 มก.ไนโตรเจน/ล. มาศึกษาจุลณพลศาสตร์การออกซิโดซ์แอมโมเนียและกลุ่มประชากร AOB ผลการทดลองพบว่าค่า Ks ของถัง 70 มก.ไนโตรเจน/ล. เท่ากับ 5.50 \pm 2.61 มก.ไนโตรเจน/ล. และค่า V_{max} เท่ากับ 1.12 \pm 0.10 มก.ไนโตรเจน/ล./ชม. ส่วนค่า Ks ของตะกอนจากถัง 420 มก.ไนโตรเจน/ล. เท่ากับ 15.22 \pm 6.91 มก.ไนโตรเจน/ล. และค่า V_{max} เท่ากับ 1.48 \pm 0.15 มก.ไนโตรเจน/ล./ชม. เมื่อเปรียบเทียบกับค่า Ks ของ AOB สายพันธุ์บริสุทธิ์พบว่าถึง 70 มก.ไนโตรเจน/ล. มีแนวโน้มที่จะพบ AOB ในกลุ่มที่มี Substrate affinity สูง ส่วนถัง 420 มก.ไนโตรเจน/ล. มีแนวโน้มที่จะพบจุลินทรีย์กลุ่มที่มี Substrate affinity ต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษากลุ่มประชากร AOB ที่ศึกษาด้วยวิธี PCR-sequencing โดยกลุ่มประชากรจุลินทรีย์กลุ่มหลักในถังปฏิกรณ์ 70 มก.ไนโตรเจน/ล. อยู่ในชนิด *N. oligotropha* cluster และกลุ่มประชากรจุลินทรีย์กลุ่มหลักในถังปฏิกรณ์ 420 มก.ไนโตรเจน/ล. อยู่ในชนิด *N. europaea* cluster จากนั้นทำการศึกษาการย่อยสลาย MT และ EE2 ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วม โดยตะกอนจุลินทรีย์จากทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์ พบว่า AOB ในทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์ไม่ใช่จุลินทรีย์กลุ่มหลักในการย่อยสลาย MT โดยจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่มีส่วนในการย่อยสลาย MT น่าจะเป็นจุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรป ในส่วนการย่อยสลาย EE2 พบว่า AOB สามารถย่อยสลาย EE2 ผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมได้และจุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรปไม่มีส่วนในการย่อยสลายเหมือนในกรณีของ MT จากนั้นได้ทำการยืนยันผลการย่อยสลาย EE2 โดยการเติมแอมโมเนียเพิ่มหลังจากมีการใช้แอมโมเนียหมด เพื่อยืนยันความสำคัญของแอมโมเนียต่อการย่อยสลาย EE2 ผลการทดลองพบว่าแอมโมเนียมีผลต่อการย่อยสลาย EE2 แต่อัตราการย่อยสลาย EE2 ในการเติมแอมโมเนียในครั้งที่ 2 และ 3 จะน้อยกว่าอัตราการย่อยสลายในครั้งแรกเสมอ อีกทั้งยังพบว่าการเติมแอมโมเนียแบบต่อเนื่องหลังจากแอมโมเนียครั้งก่อนหมดลงทันทีให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายได้ดีกว่าการทิ้งระยะเวลาไว้ช่วงหนึ่งก่อนเติมแอมโมเนียครั้งถัดไป จากนั้นศึกษาผลของความเข้มข้นแอมโมเนียต่อการย่อยสลาย EE2 และผลของความเข้มข้น EE2 ต่อการออกซิโดซ์แอมโมเนีย โดยกำหนดค่าความเข้มข้นของแอมโมเนีย 2 ค่าคือ 5 และ 100 มก.ไนโตรเจน/ล. และกำหนดค่า EE2 2 ค่าคือ 2 และ 5 มก./ล. ผลการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียสูงกว่าให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดีกว่าชุดการทดลองที่มีค่าความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำ ในส่วนของผลของความเข้มข้น EE2 ต่อการออกซิโดซ์แอมโมเนียพบว่าผลของความเข้มข้น EE2 ที่ศึกษาไม่ได้มีอิทธิพลต่อการออกซิโดซ์แอมโมเนีย

ภาควิชา วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม

5570348821 : MAJOR ENVIRONMENTAL ENGINEERING

KEYWORDS: AMMONIA OXIDIZING BACTERIA / CO-METABOLISM / 17 α – METHYLTESTOSTERONE / 17 α -ETHINYLESTRADIOL

RATTANARAT JANGJAI: Degradation of hormone 17 alpha-methyltestosterone and 17 alpha-ethinylestradiol by sludge with different kinetics of ammonia oxidation. ADVISOR: ASSOC. PROF. TAWAN LIMPIYAKORN, Ph.D., CO-ADVISOR: CHAIWAT RONGSAYAMANONT, Ph.D., 169 pp.

17 α -ethinylestradiol (EE2) is the main component in the contraceptive pill used to prevent pregnancy temporarily. EE2 can be released to the environment through urination. EE2 is a recalcitrant compound therefore, it cannot be removed by common microorganisms in wastewater treatment systems. 17 α -methyltestosterone (MT) is a synthetic testosterone used in transgender of Tilapia. MT can be released to the environment via discharge of effluent from aquaculture farms that is not handle properly. Previous research found that EE2 can be biodegradable by ammonia oxidizing bacteria (AOB) via co-metabolism. Because MT has a similar structure to EE2, it is possible that MT can be also biodegraded by AOB via co-metabolism. The objectives of this research are 1. to create sludge with different kinetics of ammonia oxidation. 2. to study the degradation of EE2 and MT via co-metabolism by AOB. 3. To study the effect of different ammonia concentrations on EE2 degradation and the effect of different EE2 concentrations on ammonia oxidation. Four reactors were set to receive influent with different ammonia concentrations of 28, 70, 140 and 420 mgN/L resulting in the effluent ammonia concentrations of 0.09±0.05, 0.25±0.12, 2.3±0.85 and 15.27±9.03 mgN/L, respectively. Then, two reactors, which were reactors 70 and 420 mgN/L were selected, for study of ammonia oxidation kinetics and AOB communities. The K_s value for reactor 70 mgN/L was 5.50±2.61 mgN/L and the V_{max} value was 1.12±0.10 mgN/L/hr. The K_s value for reactor 420 mgN/L was 15.22±6.91 mgN/L with the V_{max} value of 1.48±0.15 mgN/L/hr. Compared to the K_s values of AOB pure cultures, the results suggested that the K_s value of reactor 70 mgN/L was in a range of AOB with high substrate affinity and the K_s value for reactor 420 mgN/L was in a range of AOB with low substrate affinity. This is consistent with the results of the AOB community analysis using PCR-sequencing technique. AOB in reactor 70 mgN/L was mainly in *N. oligotropha* cluster and AOB in reactor 420 mgN/L was mainly in *N. europaea* cluster. Degradation study with the two selected sludge suggested that MT was mainly degraded by other microorganisms probably heterotrophic bacteria in the sludge rather than AOB. For EE2, AOB played the main role in EE2 degradation by the sludge. Then, confirmation of EE2 degradation under the presence of ammonia was performed with the replenishment of ammonia after ammonia depleted. The result confirmed the importance of ammonia on EE2 degradation but the rate of EE2 degradation decreased for the second and third replenishment as compared to the first time. Effect of ammonia concentration on EE2 degradation and effect of EE2 degradation on ammonia oxidation were studied with sludge from reactor 420 mgN/L with ammonia concentrations of 5 and 100 mgN/L and EE2 concentrations of 2 and 5 mg/L. The result showed that the higher ammonia concentration provided the better EE2 degradation rate than at the lower ammonia concentration. In addition, the range of EE2 concentration in this study was found not to affect the ammonia oxidation.

Department: Environmental Engineering

Field of Study: Environmental Engineering

Academic Year: 2015

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ตะวัน ลิ้มปิยากร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ อาจารย์ ดร.ไชยวัฒน์ รงค์สยามานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้ความรู้ คำปรึกษา และความช่วยเหลือตลอดทุกๆขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัย และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์อย่างสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชัยพร ภูประเสริฐ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.วิบูลย์ลักษณะ พิ้งรัมย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เบญจพร สุวรรณศิลป์ และ ดร.สรวิศ เผ่าทองสุข กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความกรุณาตรวจทานวิทยานิพนธ์และให้คำแนะนำเพื่อให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์ รวมไปถึงคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้และความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการศึกษาภาควิชาสิ่งแวดล้อม

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนอุดหนุนของภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านการจัดการสารและของเสียอันตรายที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่สำหรับการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับมิตรภาพและกำลังใจ ตลอดจนความช่วยเหลือทั้งทางการเรียนและการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ นายประสิทธิ์ แจ่มใจ คุณแม่ นางสุภัทราแจ่มใจ และน้องชาย นายปกรณ์กฤษณ์ แจ่มใจ ที่มอบความรัก กำลังใจ และการสนับสนุนข้าพเจ้าในทุกๆด้าน ตลอดจนครอบครัวแจ่มใจ และครอบครัวประภาสวัต ที่คอยสนับสนุนทุนทรัพย์เพื่อการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ.....	ถ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	3
1.2.1 เพื่อสร้างตะกอนจุลินทรีย์ที่มีจุลนพลศาสตร์ของการออกซิไดซ์แอมโมเนียที่แตกต่างกัน.....	3
1.2.2 เพื่อศึกษาการย่อยสลาย 17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน (MT) และ 17 α -เอthinylเอสโตรได ออล (EE2) ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมของตะกอนจุลินทรีย์	3
1.2.3 เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นที่แตกต่างกันของแอมโมเนียต่อการย่อยสลาย EE2 และ ผลของความเข้มข้น EE2 ต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนีย.....	3
1.3 สมมติฐานการทดลอง.....	3
1.4 ขอบเขตงานวิจัย.....	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2	5
ทบทวนเอกสาร	5
2.1. ฮอโรโมน 17 α -เอthinylเอสโตรไดออล (17 α -ethinylestradiol) หรือ EE2	5
2.1.1 แหล่งกำเนิด.....	7
2.1.2. ผลกระทบของ EE2 ในสิ่งแวดล้อม	8

2.1.3. EE2 ในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนและแหล่งน้ำธรรมชาติ	8
2.1.4. การสลายตัวของ EE2 ในระบบบำบัดน้ำเสีย	10
2.1.5. การสลายตัวทางชีวภาพของ EE2 โดย AOB ในระบบบำบัดน้ำเสีย.....	11
2.2. ฮอโมน 17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน (17 α -methyltestosterone) หรือ MT	13
2.1.1. แหล่งกำเนิดของ MT	15
2.1.2. ผลกระทบของ MT ในสิ่งแวดล้อม	15
2.1.3. การย่อยสลาย MT ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ	16
2.3. แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย (Ammonia oxidizing bacteria).....	17
2.3.1. แอมโมเนียออกซิเดชัน (Ammonia oxididation).....	17
2.3.2. ชนิดของแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย (AOB)	18
2.3.3. ลักษณะสมบัติของ AOB	21
2.3.4. เมทาบอลิซึมของและเมทาบอลิซึมร่วมของ AOB.....	22
บทที่ 3	26
วิธีการทดลอง	26
3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย	27
การทดลองที่ 1 การสร้างตะกอนจุลินทรีย์ที่มีจุลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียที่ แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์ 4 ถัง.....	27
การทดลองที่ 2 จุลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียของตะกอนจุลินทรีย์	29
การทดลองที่ 3 การย่อยสลาย 17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน (MT) และ 17 α -เอทินิลเอสต ระไดออล (EE2) ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมโดยกลุ่มประชากรแอมโมเนีย ออกซิไดซ์ซิงในตะกอนจุลินทรีย์	30
การทดลองที่ 4 การศึกษาผลของความเข้มข้นแอมโมเนียต่อการสลาย 17 α -เอทินิลเอสต ระไดออล และผลของความเข้มข้นของ 17 α -เอทินิลเอสตระไดออล (EE2) ต่อ การออกซิไดซ์แอมโมเนีย	32

3.2. ขั้นตอนการเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์.....	33
3.2.1. การเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์.....	33
3.2.2. การเตรียม 17 α -เอthinylเอสโตรไดออล (17 α -ethinylestradiol) หรือ EE2.....	35
3.2.3. การเตรียม 17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน (17 α -methyltestosterone) หรือ MT....	35
3.2. วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง.....	36
3.3.1. วิธีวัดแอมโมเนีย.....	36
3.3.2. วิธีวัดไนโตรเจน.....	37
3.3.3. วิธีการวัดหาไนเตรต.....	38
3.3.4. วิธีการวัดออกซิเจนละลาย.....	38
3.3.5. วิธีการวัดพีเอช.....	38
3.3.6. การวัดความเข้มข้นของของแข็ง.....	38
3.3.7. วิธีการวัด EE2.....	39
3.3.8. วิธีการวัด MT.....	39
3.3.9 การวิเคราะห์หากกลุ่มประชากรของแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย.....	41
บทที่ 4.....	42
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	42
4.1. การทดลองที่ 1: สร้างตะกอนจุลินทรีย์ที่มีจุลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียที่ แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์.....	42
4.2 การทดลองที่ 2: จุลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียของตะกอนจุลินทรีย์.....	46
4.3 การทดลองที่ 3: การย่อยสลายของ 17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน (MT) และ 17 α -เอthinyl เอสโตรไดออล (EE2) ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมโดยกลุ่มประชากรแอมโมเนีย ออกซิไดซ์ซิงในตะกอนจุลินทรีย์.....	52
4.3.1. การย่อยสลายสาร MT ด้วยกลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงใน ตะกอนจุลินทรีย์.....	53

4.3.2 การย่อยสลายสาร EE2 ด้วยกลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งในตะกอน จุลินทรีย์	62
4.3.3.การยืนยันการย่อยสลายสาร EE2 ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมโดย กลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งในตะกอนจุลินทรีย์	67
4.3.3.1.การยืนยันการย่อยสลายสาร EE2 โดยการใส่แอมโมเนียต่อเนื่อง ทันทีหลังจากแอมโมเนียหมด	67
4.3.3.2.การยืนยันการย่อยสลายสาร EE2 โดยการใส่แอมโมเนียไม่ ต่อเนื่องโดยทิ้งช่วงเวลา 4-5 วันหลังจากแอมโมเนียครั้งแรก หมด	71
4.4 การทดลองที่ 4: ศึกษาผลของความเข้มข้นแอมโมเนียต่อการสลาย 17 α -เอทีนิลเอสตร ไดออล (EE2) และผลของความเข้มข้นของ 17 α -เอทีนิลเอสตรไดออล (EE2) ต่อการ ออกซิไดซ์แอมโมเนีย	79
บทที่ 5	87
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	87
5.1 สรุปผลการทดลอง	87
5.2 ข้อเสนอแนะ	89
รายการอ้างอิง	90
ภาคผนวก ก วิธีการทำ PCR-sequencing.....	98
ภาคผนวก ข การสร้างกราฟมาตรฐาน	104
ภาคผนวก ค การศึกษาจลนพลศาสตร์	110
ภาคผนวก ง การศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ AOB	113
ภาคผนวก จ การย่อยสลาย MT.....	117
ภาคผนวก ฉ การย่อยสลาย EE2.....	131
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	169

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ EE2 ก่อนเข้าโรงบำบัดในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอน เร่งของ 6 โรงบำบัดน้ำเสียในอิตาลีและเทศบาลอังกฤษ	9
ตารางที่ 2.2 ความเข้มข้นของ EE2 ในน้ำผิวดิน	9
ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติทางสรีรวิทยาของ AOB.....	21
ตารางที่ 2.4 ค่า Ks จากจุลินทรีย์กลุ่ม <i>Nitrosomonas</i> สายพันธุ์บริสุทธิ์.....	22
ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างของสารตั้งต้นที่สามารถเมทาบอลิซึมร่วมได้โดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม AMO.....	24
ตารางที่ 3.1 ความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้นในชุดการทดลองการศึกษาจลนพลศาสตร์การ ออกซิไดซ์แอมโมเนียในแต่ละถังปฏิกรณ์.....	29
ตารางที่ 3.2 กำหนดค่าความเข้มข้นแอมโมเนียและฮอโรโมนเริ่มต้นในแต่ละชุดการทดลอง	30
ตารางที่ 3.3 สรุปชุดการทดลองและชุดควบคุมการทดลองของการย่อยสลายฮอโรโมน MT และ EE2.....	31
ตารางที่ 3.4 กำหนดค่าแอมโมเนียและฮอโรโมนในชุดการทดลอง	32
ตารางที่ 3.5 การวัดพารามิเตอร์ต่างๆ.....	36
ตารางที่ 3.6 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวัด EE2 ด้วยเครื่อง HPLC	39
ตารางที่ 3.7 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวัด MT ด้วยเครื่อง HPLC	40
ตารางที่ 4.1 สรุประดับไนโตรเจนในน้ำเข้าและน้ำออกของถังปฏิกรณ์	45
ตารางที่ 4.2 ค่า Ks ของจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งสายพันธุ์บริสุทธิ์.....	48
ตารางที่ 4.3 กลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งจากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร	51
ตารางที่ 4.4 กลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งจากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร	51
ตารางที่ 4.5 อัตราการย่อยสลายสาร MT โดยตะกอนจุลินทรีย์ในแต่ละถังปฏิกรณ์	59

ตารางที่ 4.6 ผลการย่อยสลาย EE2 ระหว่างวันเริ่มต้นและวันสิ้นสุดของทุกชุดการทดลองโดย ตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร	64
ตารางที่ 4.7 ผลการย่อยสลาย EE2 ระหว่างวันเริ่มต้นและวันสิ้นสุดของทุกชุดการทดลองโดย ตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร	65
ตารางที่ 4.8 อัตราการย่อยสลายสาร EE2 โดยตะกอนจุลินทรีย์ในแต่ละถังปฏิกรณ์.....	66
ตารางที่ 4.9 ผลการยับยั้งย่อยสลาย EE2 ระหว่างวันเริ่มต้นและวันสิ้นสุดของทุกชุดการทดลอง โดยตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร	70
ตารางที่ 4.10 ผลยืนยันความสำคัญของแอมโมเนียต่อการย่อยสลาย EE2 ระหว่างวันเริ่มต้นและ วันสิ้นสุดของทุกชุดการทดลองโดยตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร	73
ตารางที่ 4.11 อัตราการย่อยสลาย EE2 จากการใส่แอมโมเนียในแต่ละครั้งในชุด (Degradation test) จากถังปฏิกรณ์รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจน ต่อลิตร	74
ตารางที่ 4.12 ผลยืนยันความสำคัญของแอมโมเนียต่อการย่อยสลาย EE2 ระหว่างวันเริ่มต้นและ วันสิ้นสุดของทุกชุดการทดลองโดยตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร	78
ตารางที่ 4.13 ชุดควบคุมการทดลองผลการย่อยสลาย EE2 ที่มีค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 5 มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร และ EE2 2 มิลลิกรัมต่อลิตร	85
ตารางที่ 4.14 ชุดควบคุมการทดลองผลการย่อยสลาย EE2 ที่มีค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และ EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	85
ตารางที่ 4.15 เปรียบเทียบอัตราการย่อยสลาย EE2 จากการใส่แอมโมเนียและ EE2 ในแต่ละการ ทดลอง.....	86
ตารางที่ ค.1 ผลการทดลองจลนพลศาสตร์จากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร	111
ตารางที่ ค.2 ผลการทดลองจลนพลศาสตร์จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร.....	112

ตารางที่ ฉ.2 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง AOB inhibition test การย่อยสลาย EE2 จาก ถึงปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	133
ตารางที่ ฉ.3 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Abiotic test การย่อยสลาย EE2 จากถึงปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	133
ตารางที่ ฉ.4 ผลการย่อยสลาย EE2 แต่ละชุดการทดลองจากถึงปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อ ลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	134
ตารางที่ ฉ.5 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Degradation test ของการย่อยสลาย EE2 จาก ถึงปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	135
ตารางที่ ฉ.6 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง AOB inhibition test ของการย่อยสลาย EE2 จากถึงปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	136
ตารางที่ ฉ.7 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Abiotic test ของการย่อยสลาย EE2 จากถึง ปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	136
ตารางที่ ฉ.8 ผลการย่อยสลาย EE2 แต่ละชุดการทดลองจากถึงปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อ ลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	137
ตารางที่ ฉ.9 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Degradation test การย่อยสลาย EE2 โดยเติม แอมโมเนีย 3 ครั้งแบบต่อเนื่องจากถึงปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อโดยมี ความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	138

ตารางที่ ฉ.17 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Degradation test ของการย่อยสลาย EE2 โดยเติมแอมโมเนีย 3 ครั้งแบบไม่ต่อเนื่องจากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	149
ตารางที่ ฉ.18 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง AOB inhibition test ของการย่อยสลาย EE2 โดยเติมแอมโมเนีย 3 ครั้งแบบไม่ต่อเนื่องจากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	151
ตารางที่ ฉ.19 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Abiotic test ของการย่อยสลาย EE2 โดยเติมแอมโมเนีย 3 ครั้งแบบไม่ต่อเนื่องจากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	152
ตารางที่ ฉ.20 ผลการย่อยสลาย EE2 แต่ละชุดการทดลองโดยเติมแอมโมเนีย 3 ครั้งแบบไม่ต่อเนื่องจากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	153
ตารางที่ ฉ.21 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Degradation test การย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 2 มิลลิกรัมต่อลิตร	154
ตารางที่ ฉ.22 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง AOB inhibition test การย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 2 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	155
ตารางที่ ฉ.23 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Abiotic test การย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 2 มิลลิกรัมต่อลิตร	156

ตารางที่ ฉ.33 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Degradation test การย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	166
ตารางที่ ฉ.34 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง AOB inhibition test การย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	167
ตารางที่ ฉ.35 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Abiotic test การย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	167
ตารางที่ ฉ.36 ผลการย่อยสลาย EE2 แต่ละชุดการทดลองจากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	168

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.1 ยาเม็ดคุมกำเนิด	5
รูปที่ 2.2 โครงสร้าง 17 α -เอthinilเอสตราไดออล (EE2)	6
รูปที่ 2.3 แหล่งกำเนิด EE2 ที่สามารถปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม	7
รูปที่ 2.4 ฮอร์โมน17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน	13
รูปที่ 2.5 โครงสร้าง 17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน.....	14
รูปที่ 2.6 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในกระชัง.....	15
รูปที่ 2.7 ไนตริฟิเคชัน (Nitrification)	17
รูปที่ 2.8 ลำดับสายวิวัฒนาการของ Betaproteobacterial AOB โดยใช้วิธี 16S rRNA	19
รูปที่ 2.9 ลำดับสายวิวัฒนาการของ betaproteobacterial AOB โดยใช้วิธี <i>amoA</i>	20
รูปที่ 2.10 แสดงวิถีแอมโมเนียออกซิเดชันของAOB	23
รูปที่ 2.11 แสดงกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมของเอทีลินโดย AOB.....	24
รูปที่ 3.1 ถังปฏิกรณ์ต่อเนื่องแบบไม่เวียนตะกอนทั้ง 4 ถัง.....	28
รูปที่ 4.1 ความเข้มข้นไนโตรเจนในน้ำเข้าและน้ำออกของถังปฏิกรณ์.....	43
รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการออกซิไดซ์แอมโมเนียและความเข้มข้นของแอมโมเนียของตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร	47
รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการออกซิไดซ์แอมโมเนียต่อความเข้มข้นของแอมโมเนียของตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร	47
รูปที่ 4.4 การย่อยสลายสาร MT ด้วยตะกอนจากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร.....	55

รูปที่ 4.5 การย่อยสลายสาร MT ด้วยตะกอนจากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร	57
รูปที่ 4.6 โครมาโตรแกรมของการวิเคราะห์สาร MT จากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรในวันแรกของการทดลอง.....	61
รูปที่ 4.7 โครมาโตรแกรมของการวิเคราะห์สาร MT จากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรในวันที่ 16 ของการทดลอง.....	61
รูปที่ 4.8 ผลการย่อยสลาย EE2 ในชุดการทดลองการย่อยสลายทั่วไป (Degradation test) โดยตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร	64
รูปที่ 4.9 ผลการย่อยสลาย EE2 ในชุดการทดลองการย่อยสลายทั่วไป (Degradation test) โดยตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร.....	65
รูปที่ 4.10 ผลการการยับยั้งย่อยสลาย EE2 ในชุดการทดลองการย่อยสลายทั่วไป (Degradation test) โดยตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร	69
รูปที่ 4.11 ผลการยับยั้งความสำคัญของแอมโมเนียต่อการย่อยสลาย EE2 ในชุดการทดลองการย่อยสลายทั่วไป (Degradation test) โดยจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร	72
รูปที่ 4.12 ผลการยับยั้งความสำคัญของแอมโมเนียต่อการย่อยสลาย EE2 ในชุดการทดลองการย่อยสลายทั่วไป (Degradation test) โดยจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร	77
รูปที่ 4.13 ผลการย่อยสลาย EE2 ที่มีค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และ EE2 2 มิลลิกรัมต่อลิตร	81
รูปที่ 4.14 ผลการย่อยสลาย EE2 ที่มีค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และ EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	82
รูปที่ 4.15 ผลการย่อยสลาย EE2 ที่มีค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และ EE2 2 มิลลิกรัมต่อลิตร	83
รูปที่ 4.16 ผลการย่อยสลาย EE2 ที่มีค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และ EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	84

หน้า

รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานสำหรับแอมโมเนีย	105
รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานสำหรับไนไตรท์	106
รูปที่ ข.3 กราฟมาตรฐานสำหรับไนเตรต	107
รูปที่ ข.4 กราฟมาตรฐานสำหรับ MT	108
รูปที่ ข.5 กราฟมาตรฐานสำหรับ EE2	109



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ยาเม็ดคุมกำเนิดเป็นยาที่ใช้ป้องกันการตั้งครรภ์แบบชั่วคราว ประกอบไปด้วย 17 α -เอthinyl เอสโตรเจนไดออล (17 α -ethinylestradiol) หรือ EE2 เป็นส่วนประกอบหลัก เมื่อรับประทานแล้วจะถูกปล่อยออกสู่สภาพแวดล้อมผ่านทางปัสสาวะและป็นเปื้อนในระบบบำบัดน้ำเสีย EE2 มีโครงสร้างทางเคมีที่สลายยาก ไม่สามารถบำบัดได้หมดผ่านระบบบำบัดน้ำเสียทั่วไปจึงเหลือตกค้างและถูกปล่อยออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ มีงานวิจัยพบ EE2 ความเข้มข้น 2.3-8 นาโนกรัมต่อลิตรในน้ำเสียขาเข้าของระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนในประเทศอังกฤษและอิตาลี (Johnson และ Williams, 2004) นอกจากนี้ยังพบว่า EE2 ที่ระดับความเข้มข้น 1-10 นาโนกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดการตอบสนองต่อเอสโตรเจนของปลาในตู้ปลาได้ (Purdom และคณะ, 1994) จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า แอมโมเนียออกไซด์ซีซิงแบคทีเรีย (AOB) สามารถย่อยสลาย EE2 ได้ผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมจากการออกไซด์ซีซิงแอมโมเนีย (Shi และคณะ, 2004) และเนื่องจาก AOB เป็นจุลินทรีย์ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนอยู่แล้วจึงน่าจะสามารถใช้ประโยชน์ดังกล่าวในการกำจัด EE2 ออกจากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนได้

17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน (17 α -methyltestosterone) หรือ MT เป็นฮอร์โมนเพศชายสังเคราะห์ ใช้มากจากการแปลงเพศลูกปลานิลโดย MT จะถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมผ่านการปล่อยน้ำทิ้งจากฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิลที่ไม่ได้รับการบำบัดอย่างถูกวิธีและส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม มีงานวิจัยพบว่า MT ความเข้มข้น 46 นาโนกรัมต่อลิตรทำให้ความสมบูรณ์เพศของปลา medaka เพศผู้ผิดปกติหลังจากสัมผัส MT เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (Kang และคณะ, 2008) และพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Rhodococcus sp.* และ *Nocardioides sp.* ที่แยกได้จากตะกอนดินบ่อเพาะเลี้ยงลูกปลานิลสามารถย่อยสลาย MT ได้ (Homklin และคณะ, 2012) แต่ยังไม่พบการศึกษาการย่อยสลาย MT ในระบบบำบัดน้ำเสียฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิล และจากระบบการเพาะเลี้ยงลูกปลานิลพบว่าในระบบการเพาะเลี้ยงมีแอมโมเนียและสารอินทรีย์ที่เกิดจากเศษอาหารปลาและการขับถ่ายของลูกปลา

อีกทั้งโครงสร้างทางเคมีของ MT มีลักษณะคล้ายกับ EE2 จึงมีความเป็นไปได้ว่า MT สามารถย่อยสลายได้โดย AOB ผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมได้เช่นเดียวกับ EE2 และมีความเป็นไปได้ที่ MT จะถูกย่อยสลายด้วย AOB ในถังบำบัดไนตริฟิเคชันในระบบหมุนเวียนน้ำของบ่อแปลงเพศลูกปลานิลได้

ระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนและระบบหมุนเวียนน้ำของบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นระบบที่ประกอบไปด้วยการกำจัดสารอินทรีย์คาร์บอนและไนโตรเจน การกำจัดสารอินทรีย์คาร์บอนจะใช้ระบบเติมอากาศในการบำบัดโดยจุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรป ส่วนการกำจัดไนโตรเจนจะใช้ 2 กระบวนการคือกระบวนการไนตริฟิเคชันเป็นการเปลี่ยนแอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์และไนไตรท์ถูกเปลี่ยนไปเป็นไนเตรตภายใต้สภาวะใช้อากาศ (Aerobic) และกระบวนการดีไนตริฟิเคชันเป็นการเปลี่ยนจากไนเตรตให้เป็นก๊าซไนโตรเจนภายใต้สภาวะไร้อากาศ (Anaerobic) โดยกระบวนการไนตริฟิเคชันเป็นกระบวนการที่มีสองขั้นตอนหลัก คือแอมโมเนียออกซิเดชันเป็นการเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนไตรท์และไนไตรท์ออกซิเดชันเป็นการเปลี่ยนไนไตรท์ไปเป็นไนเตรต ซึ่งในกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชันนี้เป็นการออกซิไดซ์แอมโมเนียโดยแบคทีเรียประเภทแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย (AOB) เช่น *Nitrosomonas sp* ที่สามารถใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงานและใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งจะได้พลังงานและเกิดการสร้างเซลล์ตามลำดับ (Kowalchuk และ Stephen, 2001; Koops และคณะ, 2003) โดยการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOB เกิดจากเอนไซม์แอมโมเนียโมนอกซิจีเนส (Ammonia monooxygenase) หรือ AMO ซึ่งนอกจากสามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียได้แล้วยังสามารถสลายสารอินทรีย์บางชนิดในระบบบำบัดน้ำเสียที่จุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรปไม่สามารถกำจัดได้ผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วม ซึ่งเป็นกระบวนการที่ไม่ก่อให้เกิดการสร้างเซลล์และพลังงาน (Arp และ Keener, 1993) โดยเฉพาะสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างที่สลายยากและเป็นอันตราย เช่น 17 α -เอทินิลเอสตราไดออล (EE2) Trimethoprim และ nitrapyrin (2-chloro-6-trichloromethyl-pyridine) เป็นต้น

มีงานวิจัยศึกษาการย่อยสลาย EE2 ด้วยจุลินทรีย์ AOM โดย vader และคณะ (2000) ได้ทำการทดลองการย่อยสลาย EE2 ด้วย Nitrifying activated sludge (NAS) ซึ่งพบว่า NAS สามารถย่อยสลายของ EE2 ได้ผ่านการออกซิไดซ์แอมโมเนีย โดยภายหลังได้มีการค้นพบว่าจุลินทรีย์ใน NAS ที่สามารถย่อยสลาย EE2 ได้อาจจะเป็นแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรียหรือ AOB ซึ่งต่อมา shi

และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาการย่อยสลาย EE2 โดยจุลินทรีย์ *Nitrosomonas europaea* (NCIMB 11850) ซึ่งเป็น AOB สายพันธุ์บริสุทธิ์ พบว่าสามารถย่อยสลาย EE2 ผ่านการออกซิไดซ์แอมโมเนียด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมได้ แต่งานผลวิจัยดังกล่าวอยู่ในสภาวะที่ค่อนข้างจำกัด ทำให้ไม่สามารถนำจุลินทรีย์กลุ่มนี้มาประยุกต์ใช้ได้ เช่นเดียวกับกับงานวิจัยของ Gaulke และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาการย่อยสลาย EE2 ด้วยจุลินทรีย์ *N. europaea* สายพันธุ์บริสุทธิ์โดยควบคุม pH แตกต่างกัน พบว่าชุดการทดลองที่มีค่า pH ต่ำ (น้อยกว่า 7) การย่อยสลาย EE2 จะสูงกว่า แต่การย่อยสลายนี้อาจไม่ได้เกิดจากกระบวนการทางชีวภาพโดย AOB เพียงอย่างเดียว แต่เกิดจากกระบวนการ EE2 Nitration ที่เกิดจากไนโตรโทออกซิไดซ์ EE2 ให้กลายเป็นไนโตร-EE2 ในช่วง pH ต่ำรวมอยู่ด้วย นอกจากนี้ผลการทดลองของ Angkana (2013) ได้ทำการศึกษาผลของกลุ่มประชากร AOB ต่อการอัตราการย่อยสลาย EE2 และศึกษาการย่อยสลาย EE2 ด้วย AOB แต่การทดลองดังกล่าวไม่ได้แสดงรายละเอียดชัดเจนมากนัก ในขณะที่การศึกษการย่อยสลาย MT ยังไม่มีผลการทดลองการย่อยสลายโดยกลุ่มประชากร AOB จากเหตุผลดังกล่าวจึงเป็นเหตุให้งานวิจัยนี้ศึกษาวิถีของกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมในการย่อยสลาย EE2 และ MT โดยตะกอนจุลินทรีย์ที่มีจุลณพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียที่แตกต่างกันและศึกษาผลของจุลณพลศาสตร์ของกลุ่มประชากร แอมโมเนีย และความเข้มข้นของ MT และ EE2 มีผลต่อการย่อยสลาย

1.2.วัตถุประสงค์

- 1.2.1. เพื่อสร้างตะกอนจุลินทรีย์ที่มีจุลณพลศาสตร์ของการออกซิไดซ์แอมโมเนียที่แตกต่างกัน
- 1.2.2. เพื่อศึกษาการย่อยสลาย 17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน (MT) และ 17 α -เอthinilเอสโตรไดออล (EE2) ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมของตะกอนจุลินทรีย์
- 1.2.3. เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นที่แตกต่างกันของแอมโมเนียต่อการย่อยสลาย EE2 และผลของความเข้มข้น EE2 ต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนีย

1.3.สมมติฐานการทดลอง

17 α - เมทิลเทสโทสเตอโรน (MT) และ 17 α -เอthinilเอสโตรไดออล (EE2) สามารถถูกย่อยสลายได้โดยแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย (AOB) ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมโดยจุลณพลศาสตร์ของกลุ่มประชากร แอมโมเนีย และความเข้มข้นของ MT และ EE2 มีผลต่อการย่อยสลาย

1.4. ขอบเขตงานวิจัย

1.4.1. งานวิจัยนี้ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และห้องปฏิบัติการ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านการจัดการสารและของเสียอันตราย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4.2. นำตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียสร้างกลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซ์เชิงแบคทีเรีย (AOB) ที่แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์ 4 ถังที่เดินระบบแบบต่อเนื่องและไม่เวียนตะกอนขนาด 6 ลิตร

1.4.3. เลือกตัวอย่าง 2 ถังศึกษาจลนพลศาสตร์ของ AOB ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียที่ความเข้มข้นต่างกันประมาณ 8 ค่าในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตรและทำการทดลองแบบแบทช์สร้างกราฟอัตราการออกซิไดซ์กับความเข้มข้นของแอมโมเนีย

1.4.4. หาชนิดกลุ่มประชากรด้วยเทคนิค PCR-sequencing

1.4.5. ศึกษาการสลาย EE2 และ MT ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมของ AOB ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตรและทำการทดลองแบบแบทช์

1.5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1. พัฒนาความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ AOB ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนและฟาร์มเพาะเลี้ยงลูกปลานิลในการกำจัดสารอินทรีย์ที่เป็นอันตราย เช่น EE2 หรือ MT

1.5.2. นำจลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียของตะกอนจุลินทรีย์ที่มีกลุ่มประชากร AOB ที่แตกต่างกันไปใช้ในการออกแบบระบบ และหาสภาวะที่เหมาะสมในการบำบัดได้จากการศึกษาผลของความเข้มข้นแอมโมเนียต่อการย่อยสลาย EE2 และ MT รวมไปถึงผลของความเข้มข้นของ EE2 และ MT ต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนียของตะกอนจุลินทรีย์แต่ละแบบ

บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

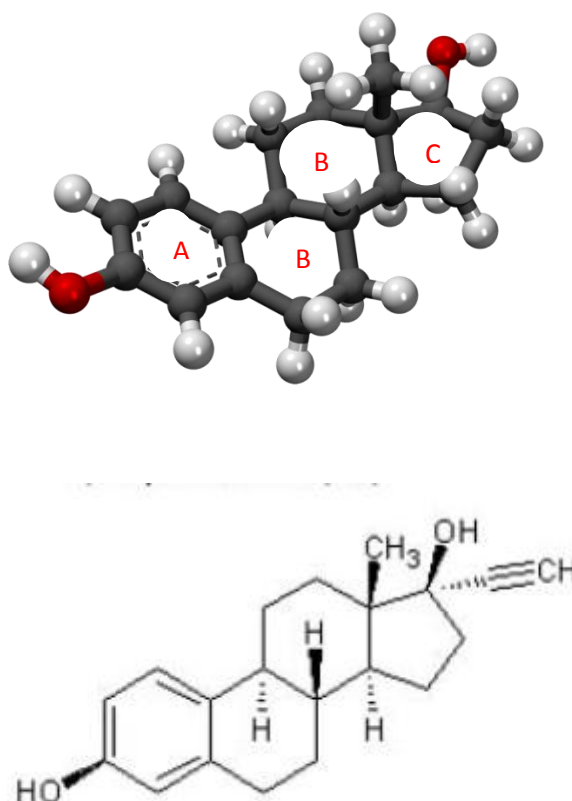
2.1. ฮอร์โมน 17 α -เอthinylเอสตระไดออล (17 α -ethinylestradiol) หรือ EE2

17 α -เอthinylเอสตระไดออลเป็นฮอร์โมนเพศหญิงสังเคราะห์ที่พบในส่วนผสมของยาเม็ดคุมกำเนิดหรือยาที่ใช้ในการรักษาผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนที่มีอาการขาดฮอร์โมนโดยมีชื่อสากลในระบบ IUPAC คือ 17 α -ethnyl-1,3,5[10]-oestratriene-3,17 β -diol



รูปที่ 2.1 ยาเม็ดคุมกำเนิด

ที่มา : สหวิชาการตอทคอม, 2559



รูปที่ 2.2 โครงสร้าง 17 α -เอทินิลเอสโตรอะไดออล (EE2) (Hanselman และ Wilkie, 2003)

ที่มา : wikipedia, 2559

โครงสร้างของ EE2 ประกอบด้วย หนึ่งวงแหวนอะโรมาติกที่ตำแหน่ง A สองวงแหวน hexacyclic ที่ตำแหน่ง B และ C และหนึ่งวงแหวนเพนทาไซคลิก ที่ตำแหน่ง D โดยคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 จะมีหมู่ไฮดรอกซี (OH) และคาร์บอนตำแหน่งที่ 17 จะมีพันธะสาม (Hanselman, Graetz และ Wilkie, 2003)

EE2 มีสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{24}O_2$ มีค่าการละลายน้ำเท่ากับ 3.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์ความไม่ชอบน้ำหรือ $\text{Log } K_{ow}$ เท่ากับ 3.67 ซึ่งให้เห็นว่า EE2 เมื่อถูกปล่อยออกสิ่งแวดล้อมแล้วมีแนวโน้มที่จะดูดติดกับดินหรือตะกอนมากกว่าละลายไปกับน้ำ ในส่วนของค่าความดันไอมีค่าเท่ากับ 2.67×10^{-9} มิลลิเมตรปรอทซึ่งอยู่ในระดับต่ำอย่างมีนัยสำคัญแสดงให้เห็นถึงการมีแนวโน้มที่จะกลายอยู่ในรูปแบบของเหลวมากกว่าที่จะกลายเป็นไอ (Lai และคณะ, 2000)

2.1.1. แหล่งกำเนิด

EE2 สามารถปล่อยสู่สภาพแวดล้อมได้หลายวิธี เช่น จากมนุษย์ สัตว์ อุตสาหกรรมยา การเกษตรกรรม การปศุสัตว์ และหลุมฝังกลบ (Wise และคณะ, 2011) ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แหล่งกำเนิด EE2 ที่สามารถปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม
ที่มา : MGR online, livestockandenvironment และ board.postjung, 2559

2.1.2. ผลกระทบของ EE2 ในสิ่งแวดล้อม

ผลกระทบในมนุษย์พบว่าการบริโภค EE2 ผ่านทางอาหารหรือน้ำดื่มจะทำให้เกิดการลดลงของจำนวนอสุจิและเป็นสาเหตุให้เกิดโรคมะเร็งอัณฑะ รวมไปถึงความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์เพศชาย (Sharp และ Skakkeback, 1993) ทางด้านสิ่งแวดล้อมพบว่าเมื่อ EE2 ปนเปื้อนออกสู่สิ่งแวดล้อมจะทำให้สิ่งมีชีวิตที่สัมผัสเกิดความผิดปกติได้เช่นกัน จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า EE2 ที่ระดับความเข้มข้น 1-10 นาโนกรัมต่อลิตรทำให้เกิดการตอบสนองต่อเอสโตรเจนของปลาที่เลี้ยงในตู้ (Purdom และคณะ, 1994) ซึ่งอาจมีผลต่อวงจรชีวิตในอนาคต และจากการทำนายความเข้มข้นต่ำสุดที่จะทำให้ไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (predicted no effect concentrations หรือ PNECs) จัดทำโดยหน่วยงานด้านสิ่งแวดล้อมของสหราชอาณาจักร (Environmental Agency of the United Kingdom, 2002) (Young, 2002) พบว่า EE2 ความเข้มข้น 0.1 นาโนกรัมต่อลิตรเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะไม่ทำให้เกิดผลกระทบ แต่เนื่องจาก estrogens ในระบบบำบัดน้ำเสียเป็นแบบผสมไม่สามารถแยกได้และมีแนวโน้มทำให้เกิดความเป็นพิษที่รุนแรงกว่าแบบชนิดเดียว (Thorpe และคณะ, 2006) ดังนั้นหน่วยงานด้านสิ่งแวดล้อมของสหราชอาณาจักรจึงกำหนดให้ 1 นาโนกรัมต่อลิตรของ 17 เบต้า-เอสโตรเจนไดออกซีควิเวเลนต์ (E2-equivalent) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดสำหรับพยากรณ์ความเข้มข้นของเอสโตรเจนทั้งหมด

2.1.3. EE2 ในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนและแหล่งน้ำธรรมชาติ

EE2 สามารถปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมได้หลายทางหนึ่งในนั้นคือการขับถ่ายของมนุษย์ ซึ่งจะถูกนำไปกำจัดผ่านระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน ความเข้มข้นของ EE2 ในโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน 6 แห่งในอิตาลีและอังกฤษ พบว่าความเข้มข้นของ EE2 ก่อนเข้าโรงบำบัดอยู่ในช่วง 2.3-8 นาโนกรัมต่อลิตร และเมื่อผ่านการบำบัดน้ำเสียแล้วพบว่าความเข้มข้นของ EE2 ในน้ำทิ้งของโรงบำบัดน้ำเสียอยู่ในช่วง 0.35-0.70 นาโนกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ EE2 ก่อนเข้าโรงบำบัดในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งของ 6 โรงบำบัดน้ำเสียในอิตาลีและเทศบาลอังกฤษ (Johnson และ Williams, 2004)

โรงบำบัดน้ำเสีย	ความเข้มข้นของ EE2 ก่อน เข้าโรงบำบัด (นก./ล.)	ความเข้มข้นของ EE2 หลัง เข้าโรงบำบัด (นก./ล.)
Cobis	4	0.39
Fregene	3.4	0.55
Ostia	2.5	0.47
Roma Sud	2.9	0.53
Roma Est	2.3	0.35
Roma Nord	2.9	0.38
Wiesbaden	8	0.70

สำหรับในแหล่งน้ำธรรมชาติ พบว่า EE2 สามารถปนเปื้อนเข้าสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้ผ่านทางโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน โดยพบความเข้มข้นของ EE2 น้อยกว่า 0.1-5.1 นาโนกรัมต่อลิตรในแหล่งน้ำธรรมชาติ แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการสลาย EE2 ในระบบบำบัดน้ำเสียน้อยมากซึ่งหากปนเปื้อนออกสู่สิ่งแวดล้อมอาจทำให้เกิดผลเสียได้ (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 ความเข้มข้นของ EE2 ในน้ำผิวดิน (Wise O'Brien และคณะ, 2011)

ประเทศ	รายละเอียดการศึกษา	ตรวจพบ	เอกสารอ้างอิง
เนเธอร์แลนด์	เก็บ 11 ตัวอย่างจากชายฝั่งน้ำเค็ม และน้ำจืด LOD ตั้งแต่ 0.2-0.6 ng/L	พบ EE2 3 ตัวอย่าง (ค่าเฉลี่ย < LOD)	Belfroid และคณะ, 1999
สหราชอาณาจักร	เก็บ 28 ตัวอย่างจากแม่น้ำ 2 สาย LOD ตั้งแต่ 0.1-0.5 ng/L	พบ EE2 9 ตัวอย่าง (ค่าเฉลี่ย = 0.7 ng/L)	Williams และคณะ, 2003
เยอรมัน	เก็บ 31 ตัวอย่างจากปลายน้ำของ ระบบบำบัดน้ำเสีย LOD 200 pg/L	พบ EE2 15 ตัวอย่าง (พิสัย < 0.1-5.1)	Kuch และ Ballschmitter, 2001
สหรัฐอเมริกา	เก็บ 19 ตัวอย่างน้ำผิวดินสำหรับ ทำน้ำดื่ม LOD 0.5 ng/L	พบ EE2 1 ตัวอย่าง (ค่าเฉลี่ย = 1.4ng/L)	Benotti และคณะ, 2009

2.1.4. การสลายตัวของ EE2 ในระบบบำบัดน้ำเสีย

EE2 ไม่สามารถย่อยสลายให้หมดไปได้จากระบบตะกอนเร่งทั่วไป (Ternes และคณะ, 1999 และ Weber และคณะ, 2005) แต่มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถย่อยสลาย EE2 ได้ เช่น เชื้อรา *Fusarium proliferatum* strain HNS-1 ซึ่งสามารถแยกได้จากตัวอย่างตะกอนดินและตัวอย่างปุ๋ย (Shi และคณะ, 2002) อีกทั้งยังพบแบคทีเรียย่อยสลาย EE2 ได้คือ *Sphingobacterium* sp. JCR5 ที่สามารถแยกได้จากระบบตะกอนเร่งของโรงงานผลิตยาคุมกำเนิด (Haiyan และคณะ, 2007) โดยจะสลาย EE2 ไปเป็นเอสตระไดออล (E1) แล้วจึงเปลี่ยนเป็น 2-hydroxy-2,4-dienevaleric acid และ 2-hydroxy-2,4-diene-1,6-dioic acid ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่มีมวลโมเลกุลต่ำกว่าก่อนที่จะถูกจุลินทรีย์ชนิดอื่นในระบบบำบัดย่อยสลายต่อไป นอกจากนี้ยังพบจุลินทรีย์แอมโมเนียออกไซด์ไซซิงแบคทีเรีย *Nitrosomonas europaea* และ *Nitrosomonas oligotropha* ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมและโรงบำบัดน้ำเสียชุมชนสามารถย่อยสลาย EE2 ได้เช่นเดียวกัน



2.1.5. การสลายตัวทางชีวภาพของ EE2 โดย AOB ในระบบบำบัดน้ำเสีย

จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า EE2 จะไม่สลายได้ในระบบตะกอนเร่งทั่วไป vader และคณะ (2000) ได้ทดลองโดยตั้งข้อสังเกตว่า Nitrifying activated sludge (NAS) เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย EE2 ระหว่างกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน แต่ในความเป็นจริง จุลินทรีย์ที่ย่อยสลาย EE2 น่าจะเป็นแอมโมเนียออกซิโดซิงแบคทีเรียหรือ AOB ต่อมา Shi และคณะ (2004) ได้แสดงให้เห็นว่าเฮเทอโรทรอเฟอราสามารถสลายตัวโดยแบคทีเรีย heterotroph ใน NAS ส่วน EE2 ซึ่งเป็นเฮเทอโรทรอเฟอราสามารถถูกย่อยสลายโดย AOB ผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วม หลังจากนั้นมีการศึกษาที่สนับสนุนสมมติฐานที่เกี่ยวข้องของ AOB และการกำจัด EE2 โดย Yi และคณะ (2006) ได้ศึกษาเอนไซม์ AMO ที่ผลิตได้จาก AOB มีความสามารถที่จะกำจัด EE2 ได้นอกจากนี้ยังพบว่าเข้มข้นของแอมโมเนียมีผลทำให้อัตราการสลายของ EE2 สูงขึ้น (Ren และคณะ, 2007 ; Yi และ Harper, 2007 ; De Gusseme และคณะ, 2009) เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Panida (2006) ได้ศึกษาการย่อยสลาย EE2 ด้วยจุลินทรีย์ NAS ในระบบบำบัดน้ำเสีย พบว่าจุลินทรีย์ AOB ใน NAS สามารถย่อยสลาย EE2 ผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังศึกษาผลของความเข้มข้นแอมโมเนียต่อการย่อยสลาย EE2 และผลของความเข้มข้น EE2 ต่อการย่อยสลาย EE2 พบว่าค่าความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้นสูงจะทำให้การย่อยสลายดีกว่าค่าความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำและค่าความเข้มข้น EE2 สูงสามารถย่อยสลายได้มากกว่าค่าความเข้มข้น EE2 ต่ำ แต่งานวิจัยดังกล่าวไม่ได้ควบคุม pH ทำให้มีความเป็นไปได้ว่า EE2 ที่ถูกย่อยสลายอาจเกิดจากกระบวนการ Abiotic Nitration ในช่วง pH ต่ำโดยไม่ได้เกิดจากการย่อยสลายด้วยกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งงานวิจัยของ Gaulke และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษการย่อยสลาย EE2 ด้วยจุลินทรีย์ *N. europaea* สายพันธุ์บริสุทธิ์โดยควบคุม pH แตกต่างกัน พบว่าชุดการทดลองที่มีค่า pH ต่ำ (น้อยกว่า 7) การย่อยสลาย EE2 จะสูงกว่า แต่การย่อยสลายนดังกล่าวไม่ได้เกิดจากกระบวนการทางชีวภาพโดย AOB เพียงอย่างเดียว แต่เกิดจากกระบวนการทางกายภาพและเคมีที่มีชื่อว่า EE2 Nitration ที่เกิดจากไนโตรทอกซิเคต EE2 ให้กลายเป็นไนโตร-EE2 ในช่วง pH ต่ำนั่นเอง นอกจากนี้จากงานวิจัยของ Khunjar, W. O และคณะ (2011) ได้ศึกษาการย่อยสลาย EE2 โดย AOB ได้กล่าวว่า AOB สามารถย่อยสลาย EE2 ได้โดยเปลี่ยนรูป EE2 ให้เป็นเมตาบอไลต์ในรูปแบบอื่น

แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งแบคทีเรีย (AOB) สามารถย่อยสลาย EE2 ได้ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมระหว่างการออกซิไดซ์แอมโมเนียด้วยเอนไซม์แอมโมเนียโมโนออกซิจีเนส (AMO) แต่อย่างไรก็ดี การศึกษาอิทธิพลของโครงสร้างกลุ่มประชากร AOB ต่อการย่อยสลาย EE2 นั้นไม่มีการศึกษาใดที่สามารถให้ข้อสรุปได้อย่างชัดเจน Angkana (2013) ได้ศึกษาผลของกลุ่มประชากร AOB และผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียต่อกระบวนการการเมทาบอลิซึมร่วมด้วยเอนไซม์ AMO ในการย่อยสลาย EE2 พบว่าจำนวนประชากร AOB รวมในถังปฏิกรณ์จะแปรผันตามความเข้มข้นแอมโมเนียที่เข้าสู่ระบบ โดยจากผล qPCR พบกลุ่มประชากร AOB ในถังปฏิกรณ์ที่เพาะเลี้ยงด้วยน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้นต่ำคือชนิด *Nitrosomonas oligotropha* เป็นกลุ่มประชากรเด่น ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยแอมโมเนียความเข้มข้นสูงจะพบ AOB ชนิด *Nitrosomonas europaea* เป็นกลุ่มประชากรเด่น โดยพบว่าปริมาณการย่อยสลายของ EE2 ของทั้งสองกลุ่มจะสอดคล้องกับปริมาณแอมโมเนียที่ถูกออกซิไดซ์ แต่การทดลองดังกล่าวยังให้ผลการทดลองไม่ละเอียดมากพอจึงจำเป็นต้องศึกษาต่อไป



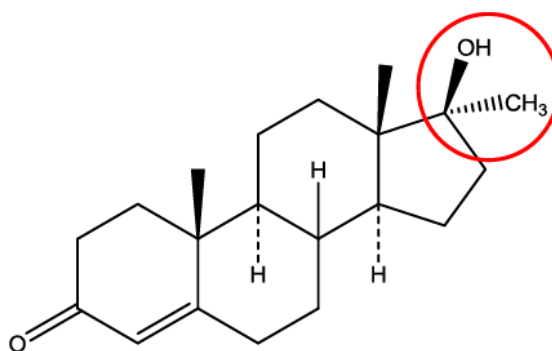
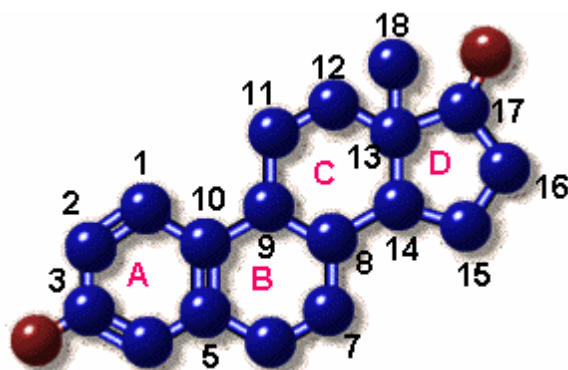
2.2.ฮอร์โมน 17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน (17 α -methyltestosterone) หรือ MT

17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน เป็นฮอร์โมนเพศชายสังเคราะห์ (Androgenic Hormone) ที่ควบคุมการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์และรักษาลักษณะทางเพศ (Secondary Sex Character) โดยปกติแล้วฮอร์โมนชนิดนี้จะกระตุ้นการสร้างสเปิร์ม แต่ถ้าพบมากเกินไปจะไปยับยั้งการสร้างสเปิร์ม โดย MT เป็นฮอร์โมนที่ถูกใช้ในผู้ที่ต้องการบำบัดในสภาวะการขาดฮอร์โมนเพศชายรวมไปถึงการเกษตรกรรม เช่น การแปลงเพศลูกปลานิล โดยมีชื่อทางสามัญคือ 17-Hydroxy-17-methelandro-4-en-3-one มีลักษณะเป็นผงผลึกสีขาวหรือครีม



รูปที่ 2.4 ฮอร์โมน17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน

ที่มา : thaipbd.com, 2559



รูปที่ 2.5 โครงสร้าง 17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน (Regal และคณะ, 2010)

ที่มา : wikipedia, 2559

โครงสร้างของ MT ประกอบด้วยหนึ่งวงแหวนอะโรมาติกที่ตำแหน่ง A สองวงแหวน hexacyclic ที่ตำแหน่ง B และ C และหนึ่งวงแหวนเพนทาไซคลิก ที่ตำแหน่ง D โดยคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 จะมีหมู่เอสเทอร์ (C=) และคาร์บอนตำแหน่งที่ 17 หมู่แอลกอฮอล์และแอลคิลเลชัน

MT เป็นสเตอรอยด์ฮอร์โมนมีสูตรโมเลกุลคือ $C_{20}H_{30}O_2$ น้ำหนักโมเลกุลคือ 302.45 ปกติไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์และอะซิโตนมีค่าสัมประสิทธิ์ความไม่ชอบน้ำหรือ $\log K_{ow}$ เท่ากับ 3.36 ซึ่งให้เห็นว่า MT เมื่อถูกปล่อยออกสิ่งแวดล้อมแล้วมีแนวโน้มที่จะถูกดูดติดกับดินหรือตะกอนมากกว่าที่จะละลายในน้ำ ในส่วนของค่าความดันไอมีค่าเท่ากับ 4.7×10^{-9} มิลลิเมตรปรอท ซึ่งอยู่ในระดับต่ำแสดงให้เห็นถึงการมีแนวโน้มที่จะละลายอยู่ในรูปแบบของเหลวมากกว่าที่จะกลายเป็นไอ และคงตัวในอากาศมีจุดหลอมเหลว 162-168 องศาเซลเซียส (กัตตินาฎ, 2555)

2.1.1. แหล่งกำเนิดของ MT

ฮอร์โมน MT สามารถถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมได้ผ่านการผสมฮอร์โมนลงในยาหรืออาหาร เช่น การแปลงเพศลูกปลานิลจากเพศเมียเป็นเพศผู้ โดยหลังการแปลงเพศลูกปลาแล้วมักมีฮอร์โมนตกค้างอยู่ในบ่อเพาะเลี้ยงและมีความเป็นไปได้ว่าจะถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมโดยไม่มีการบำบัดหรือได้รับการบำบัดอย่างไม่ถูกวิธีซึ่งอาจจะส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมได้ จากงานวิจัยของ Fitzpatrick และคณะ (1999) รายงานว่าพบ MT ในน้ำที่อนุบาลลูกปลานิลความเข้มข้น 1 - 2 ไมโครกรัมต่อลิตร และพบ MT ในดินเลนที่เพาะเลี้ยงความเข้มข้น 1.4 - 1.7 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม



รูปที่ 2.6 การเพาะเลี้ยงลูกปลานิลในกระชัง
ที่มา : ภูมิไทยฟาร์ม, 2559

2.1.2. ผลกระทบของ MT ในสิ่งแวดล้อม

ฮอร์โมน MT มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นสารก่อมะเร็งเนื่องจากไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของฮอร์โมนเพศบนเนื้อเยื่อ ที่อยู่ในต่อมลูกหมากทำให้เกิดเป็นมะเร็งต่อมลูกหมากหลังจากได้รับ MT เป็นระยะเวลานาน (Roberts และ Essenhig, 1986) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยเกี่ยวกับมะเร็งตับ

หลังจากได้รับ MT เป็นเวลานาน (Overly และคณะ, 1984) สำหรับผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมพบว่า MT ความเข้มข้น 46 นาโนกรัมต่อลิตรทำให้เกิดลดลงของการตกไข่และภาวะเจริญพันธุ์ในปลาชิวข้าวสารญี่ปุ่น (*Oryzias latipes*) หลังจากได้รับ MT เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (Kang และคณะ, 2008) Schulte-Oehlmann และคณะ (2004) ศึกษาลักษณะของเพศที่เปลี่ยนไปในหอย ramshorn (*Marisa cornuarietis*) พบอวัยวะเพศชายและหลอดอสุจิในหอยเพศเมียหลังจากได้รับ MT ความเข้มข้น 100-1000 นาโนกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 6 เดือน

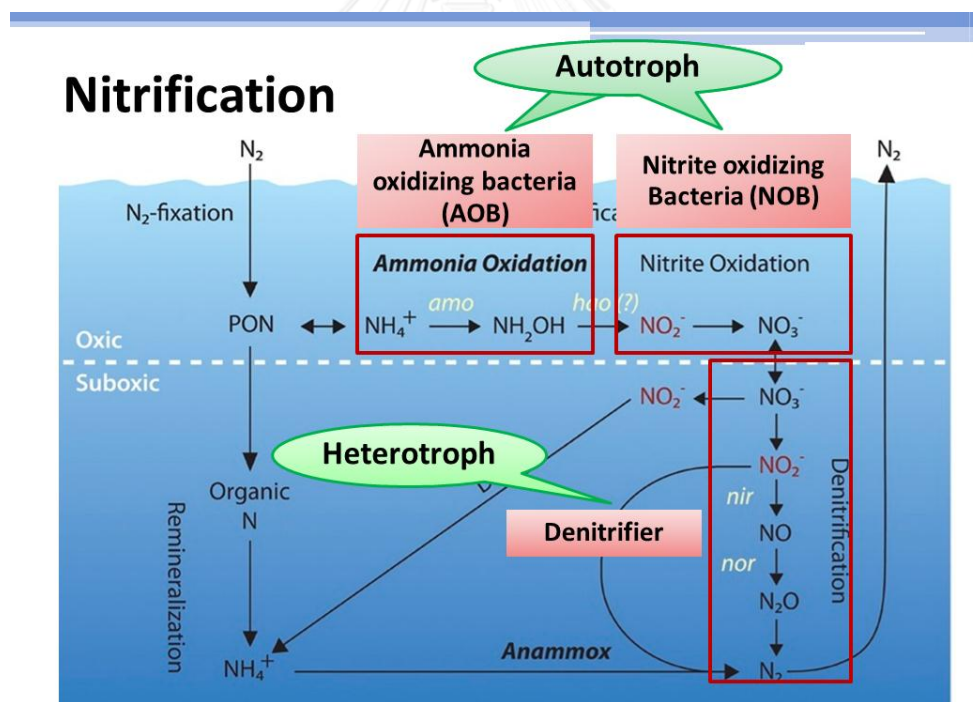
2.1.3. การย่อยสลาย MT ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

Homklin และคณะ (2011) ได้ทำการทดลองการศึกษาการเปลี่ยนรูปร่างทางชีวภาพของ MT ในตะกอนดินจากการเพาะเลี้ยงลูกปลานิลภายใต้สภาวะตัวรับอิเล็กทรอนิกส์ที่แตกต่างกัน 5 สภาวะ คือ สภาวะมีอากาศ สภาวะที่ไม่มีอากาศ สภาวะที่มีไนเตรต สภาวะที่มีเหล็ก และสภาวะที่มีซัลเฟต โดยทำการศึกษาในหลอดทดลองและทำการทดลองแบบแบทช์โดยใช้ความเข้มข้นของ MT เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสภาวะที่มีอากาศมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพมากที่สุด รองลงมาคือซัลเฟต ถัดมาคือแบบไม่มีอากาศ ส่วนเหล็กมีการเปลี่ยนรูปร่างน้อยมากแบบช้าๆ และไนเตรตแทบไม่มีการเปลี่ยนรูปร่างเลย โดยจากการทดลองดังกล่าวทำให้รู้ว่าการจะสลาย MT ทางชีวภาพควรทำให้สภาวะที่มีอากาศจะดีที่สุด นอกจากนี้ยังทำการทดลองคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย MT ได้จากตะกอนดินของบ่อแปลงเพศลูกปลานิล โดยพบว่ามีจุลินทรีย์ 30 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลาย MT ได้ และสามารถคัดแยกได้ 3 สายพันธุ์ คือ *Pimelobacter*, *Rhodococcus* และ *Nocardioidea* แต่ยังไม่พบการศึกษาการบำบัด MT ในระบบบำบัดน้ำเสียฟาร์มเพาะเลี้ยงลูกปลานิล

2.3. แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย (Ammonia oxidizing bacteria)

2.3.1. แอมโมเนียออกซิเดชัน (Ammonia oxidation)

แอมโมเนียออกซิเดชัน (Ammonia oxidation) เป็นกระบวนการหนึ่งที่สำคัญในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน โดยกระบวนการนี้เป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification) ที่มีสองขั้นตอนหลัก คือ แอมโมเนียออกซิเดชัน เป็นการเปลี่ยนแอมโมเนีย (NH_3) เป็นไนไตรท์ (NO_2^-) และไนไตรท์ออกซิเดชัน (Nitrite oxidation) เป็นการเปลี่ยนไนไตรท์ไปเป็นไนเตรต (NO_3^-) ซึ่งกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชันมีจุลินทรีย์ที่สำคัญคือ แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย (Ammonia oxidizing bacteria) หรือ AOB ที่ใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงาน และใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน (Kowalchuk และ Stephen, 2001; Koops และคณะ, 2003)

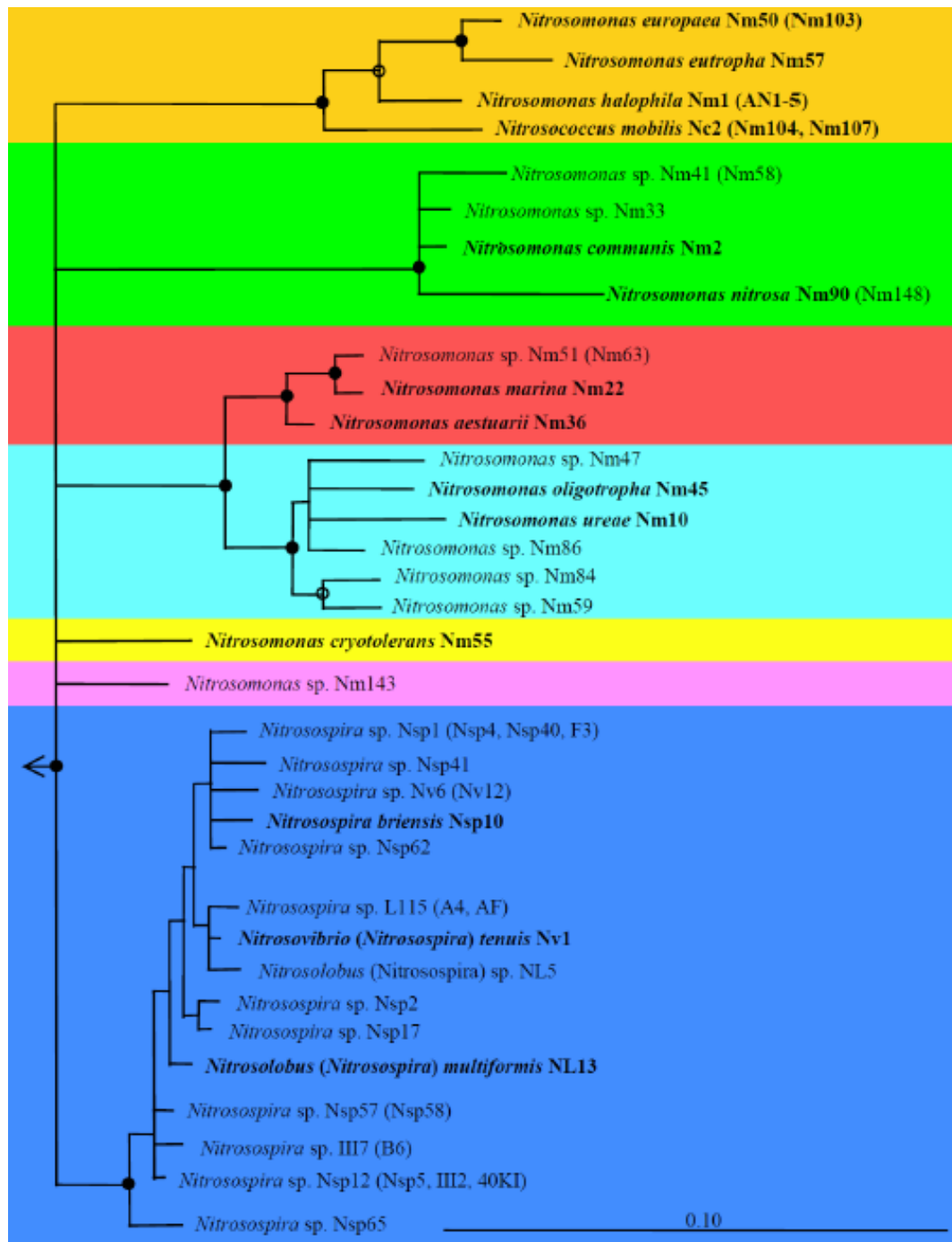


รูปที่ 2.7 ไนตริฟิเคชัน (Nitrification) (Francis และคณะ, 2005)

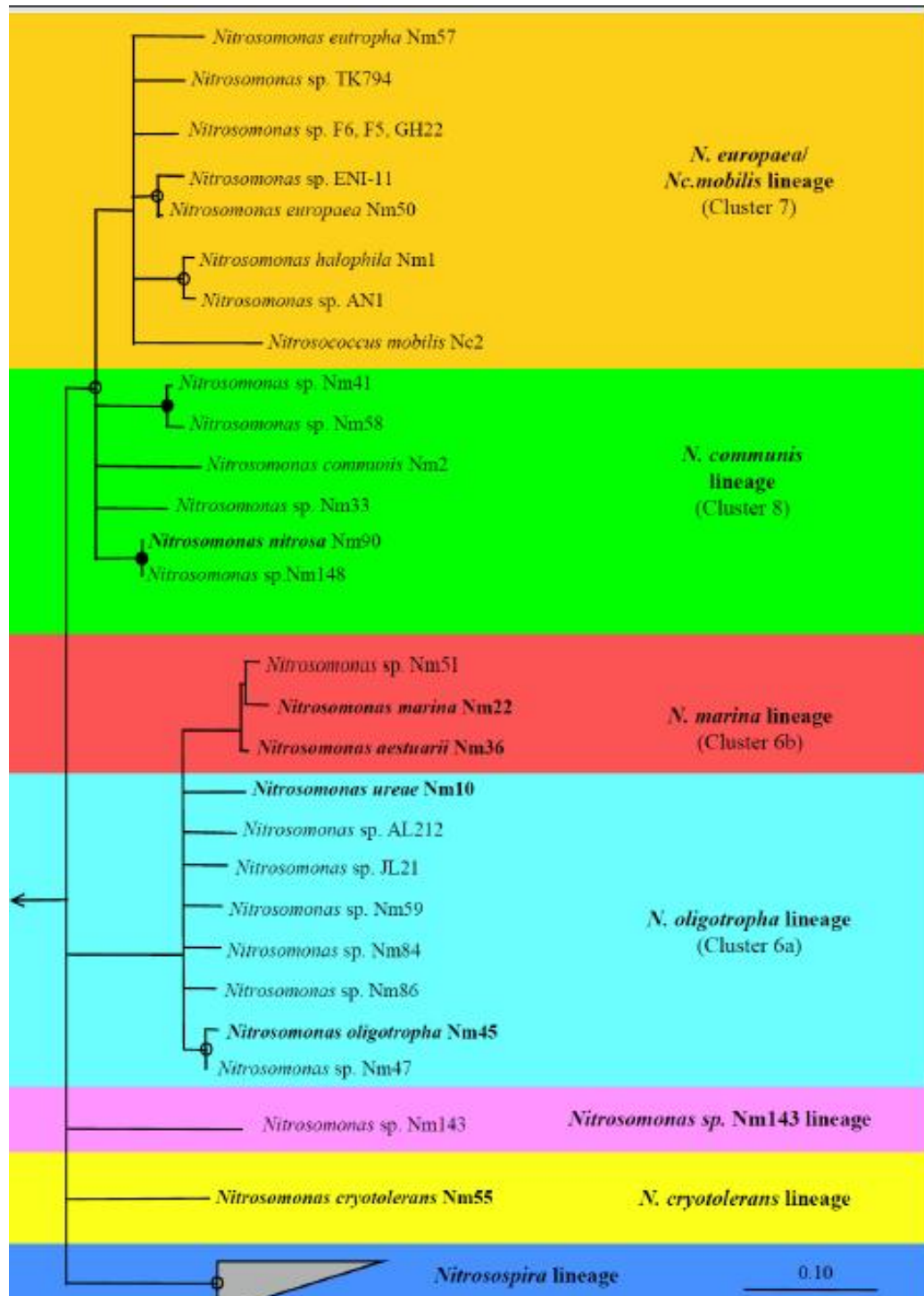
2.3.2. ชนิดของแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย (AOB)

AOB ถูกแบ่งออกเป็นสองคลาส 2 คลาสคือ Gammaproteobacterial AOB และ Betaproteobacterial AOB โดย Gammaproteobacterial AOB ประกอบด้วย 2 ชนิดคือ *Nitrosococcus Oceani* และ *Nitrosococcus halophilus* ซึ่งพบได้ในแหล่งน้ำเค็ม เช่น น้ำทะเล และน้ำกร่อย ส่วน Betaproteobacterial AOB ประกอบด้วย 7 ชนิดคือ *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosomonas communis*, *Nitrosomonas oligotropha*, *Nitrosomonas marina*, *Nitrosomonas cryotolerans*, *Nitrosomonas sp* สายพันธุ์ Nm143 และ *Nitrospira sp.* (Koops และคณะ, 2003)

ในตอนแรก AOB ถูกจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของเซลล์และการจัดเรียงของออร์แกเนลล์ intracytoplasmic หลังจากนั้นเมื่อมีเครื่องมือการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุล โดยศึกษาสายลำดับวิวัฒนาการของ AOB ซึ่งทำการศึกษายีน 16S rRNA วิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับวิวัฒนาการพบว่าสามารถแบ่ง AOB ได้เป็นสองคลาส คือ Gammaproteobacterial AOB และ Betaproteobacterial AOB แต่ถึงกระนั้นการแบ่งโดย 16S rRNA ไม่สามารถแบ่งสายพันธุ์ของ AOB ได้บางสายพันธุ์ จึงมีการศึกษาจากยีน *amoA* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์แอมโมเนียโมนอกซิจีเนส (Ammonia monooxygenase) ในการวิเคราะห์หาชนิดของ AOB ดังรูปที่ 2.8 และ 2.9 โดยความแตกต่างระหว่างการวิเคราะห์ด้วยวิธี 16S rRNA และ วิธี *amoA* gene พบว่าผลการวิเคราะห์ *amoA* gene ให้ความละเอียดมากกว่าแสดงให้เห็นถึงความชัดเจนของตำแหน่งกรดอะมิโนที่เหมือนกัน (Koops และคณะ, 2003)



รูปที่ 2.8 ลำดับสายวิวัฒนาการของ Betaproteobacterial AOB โดยใช้วิธี 16S rRNA (Koops และคณะ, 2003)



รูปที่ 2.9 ลำดับสายวิวัฒนาการของ betaproteobacterial AOB โดยใช้วิธี *amoA* (Koops และคณะ, 2003).

2.3.3. ลักษณะสมบัติของ AOB

ลักษณะสมบัติทางสรีรวิทยาของ AOB ขึ้นอยู่กับชนิดและรูปแบบของสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน ตามลักษณะที่อยู่อาศัยดังแสดงในตารางที่ 2.3 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติทางสรีรวิทยาของ AOB (Koops และคณะ, 2003)

AOB ใช้แหล่งพลังงานจากแอมโมเนียในการสร้างเซลล์และ AOB แต่ละกลุ่มมีความต้องการแอมโมเนียแตกต่างกัน ในการทดลองโดยใช้ตะกอนจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์ (pure culture) พบว่า AOB ชนิด *N. europaea* เจริญได้ดีในสภาวะที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียสูงที่พบได้ตามแหล่งน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งจะมีค่าความเข้มข้นแอมโมเนียครึ่งหนึ่งที่ใช้ในการสร้างเซลล์ (K_s) อยู่ในช่วง 7.7-32.9 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในขณะที่ AOB ชนิด *N. oligotropha* ที่เจริญได้ดีในสภาวะความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำที่พบได้ตามโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน แหล่งน้ำจืด และตะกอนดินธรรมชาติจะมีค่า K_s อยู่ในช่วง 0.4-2.1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เช่นเดียวกับงานวิจัยของภัทรพร (2553) ที่เพาะเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์ผสมจากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนที่มีกลุ่มประชากร AOB ซึ่งกล่าวถึงถึงปฏิกรณณ์ที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำจะพบ *N. oligotropha* เป็นกลุ่มประชากรเด่นซึ่งมีค่า K_s อยู่ในช่วง 0.6-3.3 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ส่วนถึงปฏิกรณณ์ที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียสูงจะพบ *N. europaea* เป็นกลุ่มประชากรเด่นและมีค่า K_s อยู่ในช่วง 10.1-24.6 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยค่า K_s ของ AOB แต่ละสายพันธุ์แสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติทางสรีรวิทยาของ AOB (Koops และคณะ, 2003)

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

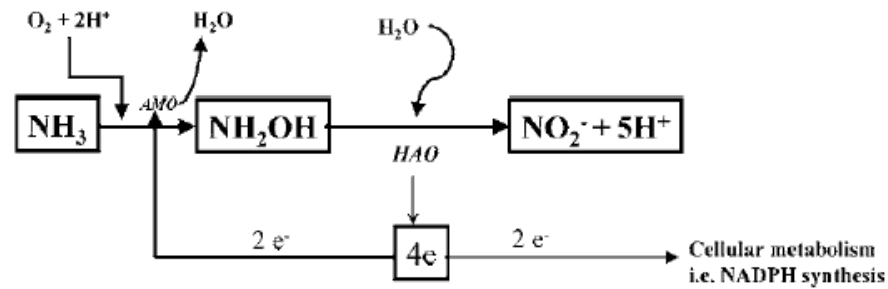
Symbols and Abbreviations: +, present; –, not present; +/-, present in some strains; and ND, no data.

ตารางที่ 2.4 ค่า Ks จากจุลินทรีย์กลุ่ม *Nitrosomonas* สายพันธุ์บริสุทธิ์

กลุ่ม	สายพันธุ์	Ks (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	อ้างอิง
Substrate (NH ₃) affinity ต่ำ	<i>N. europaea</i>	12.3-27.4	Laanbroek และคณะ, 1994
		16.1-32.9	Koops และคณะ, 2003
		7.7	Habbena และคณะ, 2009
Substrate (NH ₃) affinity กลาง	<i>N. communis</i>	2.7-8.4	Koops และคณะ, 2003
Substrate (NH ₃) affinity สูง	<i>N. oligotropha</i>	0.4-1.1	Stehr และคณะ, 1995
		0.7-1.4	Bollmann และคณะ, 2002
		1.0-2.1	Koops และคณะ, 2003
	<i>N. marina</i>	0.7-0.72	Koops และคณะ, 2003

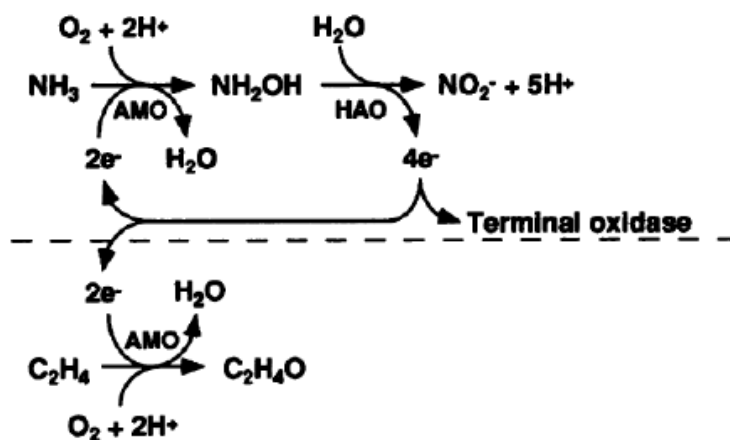
2.3.4. เมทาบอลิซึมของและเมทาบอลิซึมร่วมของ AOB

เมทาบอลิซึมของ AOB มีสองขั้นตอนในปฏิกิริยาแอมโมเนียออกซิเดชัน คือ ขั้นแรกเอนไซม์ Ammonia monooxygenase (AMO) จะออกซิไดซ์แอมโมเนียกลายเป็น Hydroxylamine (NH₂OH) โดยใช้หนึ่งอะตอมของออกซิเจนจากก๊าซออกซิเจน (O₂) เพื่อรีดิวซ์อิเล็กตรอนสองอิเล็กตรอนจากแอมโมเนียให้กลายเป็น NH₂OH และใช้สองอิเล็กตรอนเพื่อรีดิวซ์อะตอมของ O จาก O₂ ให้กลายเป็นน้ำ (H₂O) ขั้นที่สองเอนไซม์ Hydroxylamine oxidoreductase (HAO) จะออกซิไดซ์ Hydroxylamine ให้กลายเป็นไนไตรท์ (NO₂⁻) และปล่อยสี่อิเล็กตรอนออกมา โดยสองอิเล็กตรอนแรกกลับไปเอนไซม์ AMO เพื่อใช้ออกซิไดซ์ O₂ ตัวอื่นในการออกซิไดซ์แอมโมเนียและอีกสองอิเล็กตรอนจะใช้เพื่อการสร้างเซลล์รวมถึงการดูดซึมของสารอาหาร (รูปที่ 2.10) (Arp และ Stein, 2003)



รูปที่ 2.10 แสดงวิถีแอมโมเนียออกซิเดชันของAOB (Subbarao และคณะ, 2006)

โดยปกติแล้วอิเล็กตรอนที่ถูกปล่อยออกมาในระหว่างการเกิดแอมโมเนียออกซิเดชันให้กลายเป็นไนไตรท์โดยเอนไซม์ HAO สองอิเล็กตรอนแรกจะใช้เพื่อการสร้างเซลล์รวมถึงการดูดซึมของสารอาหารอินทรีย์ ส่วนสองอิเล็กตรอนหลังจะกลับไปเอนไซม์ AMO เพื่อใช้รีดิวซ์ O_2 ตัวอื่นในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย แต่ในบางกรณีอิเล็กตรอนที่ควรจะไปเอนไซม์ AMO อาจถูกนำไปใช้ในปฏิกิริยาออกซิเดชันอื่นๆ ก่อนที่จะกลับมาเอนไซม์ AMO อีกครั้งเรียกว่า เมทาบอลิซึมร่วม (co-metabolism) (รูปที่ 2.11) (Arp และ Keener, 1993) อย่างไรก็ตามแอมโมเนียยังคงเป็นสารตั้งต้นหลักสำหรับการใช้เอนไซม์ AMO เพื่อการเจริญเติบโตโดยกระบวนการเมทาบอลิซึมของ AOB ซึ่งหากไม่มีแอมโมเนียเป็นสารตั้งต้นแล้วกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมของสารอื่นจะไม่อาจเกิดขึ้นได้ ทั้งนี้มีสารหลายชนิดที่สามารถถูกเปลี่ยนโดยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมของ AOB ได้เช่นกันดังแสดงในตารางที่ 2.5



รูปที่ 2.11 แสดงกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมของเอทิลีนโดย AOB (Keener และ Arp, 1993)

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างของสารตั้งต้นที่สามารถเมทาบอลิซึมร่วมได้โดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม AMO (Arp และ Stein, 2003)

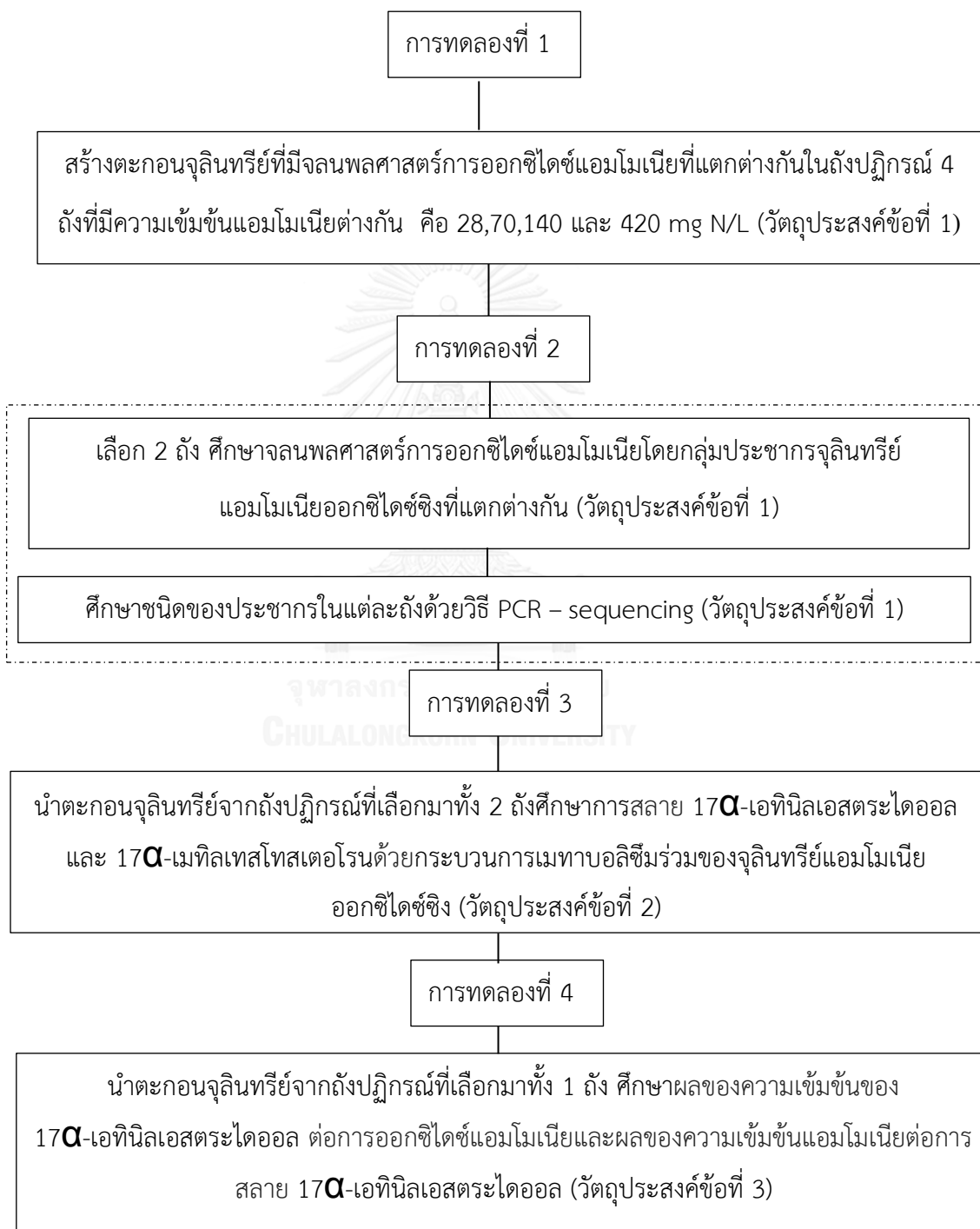
สารตั้งต้น	ผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
O-Insertion Reactions		
Ammonia	Hydroxylamine	Hofman และ Lees, 1953
Alkanes	Alcohols	Hyman และ Wood,
Methane	Methanol	Hyman และคณะ, 1988
Butane	1-, 2-butanol	
Alkenes	Epoxides	Hyman และ Wood, 1984;
Ethene	Ethylene oxide	Hyman และคณะ, 1988
Propene	Propylene oxide	
Aromatic hydrocarbons	Alcohols	Hyman และคณะ, 1985;
Benzene	Benzyl alcohol	Vannelli และ Hooper, 1995;
Naphthalene	Naphthol	Chang และคณะ, 2002
Thioethers	Sulfoxides	Hyman และคณะ, 1985;
Dimethylsulfide	Dimethylsulfoxide	Juliette และคณะ, 1993a Vannelli และ Hooper, 1995; Chang และคณะ, 2002

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างของสารตั้งต้นที่สามารถเมทาบอลิซึมร่วมได้โดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม AMO
(Arp และ Stein, 2003) (ต่อ)

สารตั้งต้น	ผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
O-Ethers Dimethyl ether	Hydrolysis products Methanol and formaldehyde	Hyman และคณะ, 1994
Halogenated Compounds	Various compounds	Hyman และ Wood, 1984a;
Bromoethane	Acetaldehyde and Br	Rasche และคณะ., 1990;
Chlorobenzene Trichloroethylene	4-chlorophenol TCE-epoxide	Vannelli และคณะ, 1990; Keener และ Arp, 1994
Dehydrogenation Reaction Ethylbenzene Reductive	Styrene	Keener และ Arp, 1994
Reductive Dehalogenation 2-chloro-6-trichloromethyl- pyridine (nitrapyrin)	2-chloro-6- dichloromethyl- pyridine	Vannelli และ Hooper, 1993

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

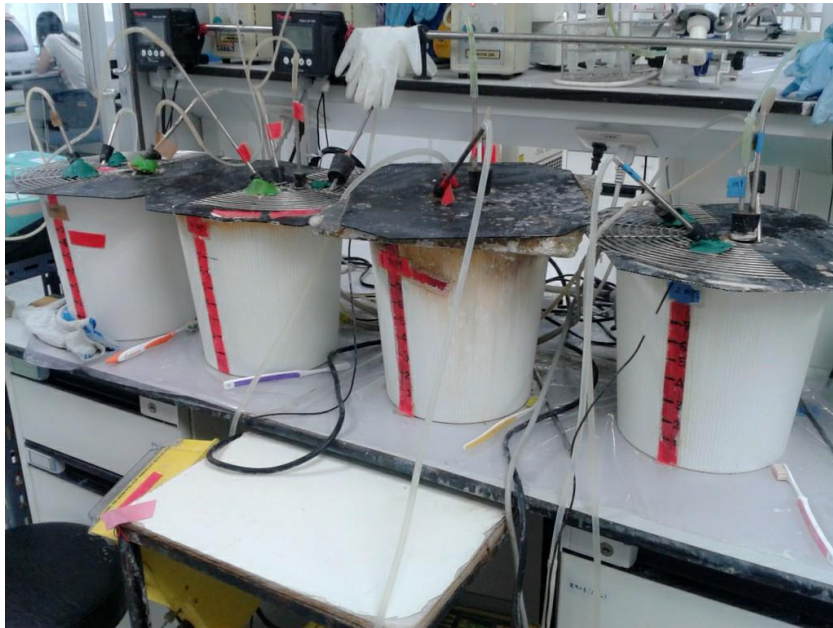


3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย

การทดลองที่ 1 การสร้างตะกอนจุลินทรีย์ที่มีจุลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียที่แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์ 4 ถัง

เพื่อสร้างตะกอนจุลินทรีย์ที่มีจุลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียแตกต่างกัน จึงทำการเลี้ยงตะกอนในถังปฏิกรณ์ 4 ถังโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเข้าต่างกัน คือ 28, 70, 140 และ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยเริ่มจากเก็บตัวอย่างตะกอนจากโรงบำบัดเสียน้ำชุมชนในเขตกรุงเทพมหานครซึ่งมีความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำและโรงบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเลซึ่งมีความเข้มข้นแอมโมเนียสูง นำตัวอย่างแต่ละแหล่งมาเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ 4 ถัง โดยจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Koops และคณะ (2003) พบว่าที่ความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำจะพบจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งมี Substrate affinity สูง เช่น *Nitrosomonas marina* , *Nitrosomonas oligotropha* ส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงจะพบจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งในกลุ่มที่มี Substrate affinity ต่ำเช่น *Nitrosomonas europaea*

ถังปฏิกรณ์ทั้ง 4 ถังเป็นระบบต่อเนื่องไม่มีการเวียนตะกอน ถังปฏิกรณ์แต่ละถังมีปริมาตร 6 ลิตร ใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียต่างกันคือ 28, 70, 140 และ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร กำหนดให้ SRT และ HRT ในแต่ละถัง 5, 4, 3 และ 4 วันตามลำดับ ปรับพีเอชด้วยเครื่องควบคุมพีเอชอัตโนมัติให้พีเอชอยู่ในช่วง 7.5 ± 0.2 โดยในถังปฏิกรณ์ที่ 1 และ 2 ปรับพีเอชโดยใช้ NaOH ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล ในถังปฏิกรณ์ที่ 3 และ 4 ปรับพีเอชโดยใช้ NaOH ความเข้มข้น 1 นอร์มอล (Liquitron DP 5000, LMI Milton Roy, USA) โดยเติม NaHCO_3 เพื่อให้เกิดไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) 0.068 กรัมต่อแอมโมเนียม (NH_4^+) 1 กรัมเป็นบัฟเฟอร์ สำหรับค่าออกซิเจนละลายน้ำใช้เครื่องปั๊มอากาศขนาดเล็กโดยใช้หัวกระจายอากาศแบบหิน และกำหนดให้ค่าออกซิเจนละลายน้ำไม่ต่ำกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตรผ่านหัวปั๊มที่มีวาล์วปรับค่าได้ เก็บถังปฏิกรณ์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าของแข็งแขวนลอยในระบบจนได้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตรและวัดค่าความเข้มข้นขาออกของแอมโมเนียในระบบคงที่จึงสามารถทำการทดลองขั้นต่อไปได้



รูปที่ 3.1 ถังปฏิกรณ์ต่อเนื่องแบบไม่เวียนตะกอนทั้ง 4 ถัง

การทดลองที่ 2 จลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียของตะกอนจุลินทรีย์

เลือกถังปฏิกรณ์ 2 ถังจากการทดลองที่ 1 โดยจะเลือกถังที่มีค่าแอมโมเนียน้ำเข้าความเข้มข้นเท่ากับ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรซึ่งมีแนวโน้มที่จะพบจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งมี Substrate affinity สูง เช่น *Nitrosomonas marina*, *Nitrosomonas oligotropha* เป็นจุลินทรีย์กลุ่มเด่น และถังที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียน้ำเข้าเท่ากับ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรซึ่งมีแนวโน้มที่จะพบจุลินทรีย์ที่มี Substrate affinity ต่ำ เช่น *Nitrosomonas europaea* เป็นจุลินทรีย์กลุ่มเด่น ศึกษาจลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียของตะกอนจุลินทรีย์ โดยนำตัวอย่างแต่ละกลุ่มการทดสอบใส่ในพลาสติกขนาด 600 มิลลิลิตร ออกแบบระบบเป็นแบบแบดท์ที่เติมอากาศ ใส่ตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมแอมโมเนียตามความเข้มข้นเริ่มต้นที่แตกต่างกันตามตารางที่ 3.1 กำหนดปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อสุทธิ 250 มิลลิลิตร ใช้กระดาษฟลอยด์หุ้มฝาเพื่อป้องกันการระเหยของตัวอย่าง ควบคุม pH ด้วย HEPES buffer (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร โดยกำหนด pH ห้ามต่ำกว่า 7.5 เก็บตัวอย่างตามช่วงเวลาที่กำหนดเพื่อหาค่าแอมโมเนีย ไนโตรท์ และไนเตรต สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการออกซิไดซ์แอมโมเนียกับเวลาเพื่อหาอัตราการออกซิไดซ์แอมโมเนียในแต่ละชุดการทดลอง และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการออกซิไดซ์แอมโมเนียกับความเข้มข้นของแอมโมเนียเพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนีย หลังจากนั้นหากกลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ในแต่ละถังปฏิกรณ์ด้วยวิธี PCR-sequencing เพื่อยืนยันผลของความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มประชากรและจลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียที่ได้โดยเลือกสุ่มตัวอย่าง 4-5 โคลน

ตารางที่ 3.1 ความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้นในชุดการทดลองการศึกษาจลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียในแต่ละถังปฏิกรณ์

ถังปฏิกรณ์ความเข้มข้นแอมโมเนีย 70 mg N/L	ถังปฏิกรณ์ความเข้มข้นแอมโมเนีย 420 mg N/L
ความเข้มข้นตะกอนจุลินทรีย์ MLSS 50 mg/L	ความเข้มข้นตะกอนจุลินทรีย์ MLSS 50 mg/L
ความเข้มข้นแอมโมเนีย	ความเข้มข้นแอมโมเนีย
1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 mg N/L	5, 10, 30, 60, 90, 110, 140 และ 100 mg N/L

การทดลองที่ 3 การย่อยสลาย 17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน (MT) และ 17 α -เอทินิลเอสตราไดออล (EE2) ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมโดยกลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงในตะกอนจุลินทรีย์

นำตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่เลือกมาทั้ง 2 ถังศึกษาการย่อยสลาย 17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน และ 17 α -เอทินิลเอสตราไดออล ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมของจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิง โดยแบ่งการทดลองนี้ออกเป็น 2 ขั้นตอนย่อยคือ

3.1. ศึกษาการสลายของ MT และ EE2 ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมโดยตะกอนจุลินทรีย์ โดยนำตัวอย่างแต่ละกลุ่มทดสอบใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ใส่ตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ แอมโมเนีย และ MT หรือ EE2 ความเข้มข้นตามที่กำหนด ให้อากาศโดยการเขย่า 200 รอบต่อนาที ควบคุม pH ด้วย HEPES buffer ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร โดยกำหนด pH ห้ามต่ำกว่า 7.5 แล้วจึงศึกษาการสลายตัวของฮอร์โมนทั้ง 2 วัดค่าแอมโมเนีย ไนโตรท์ ไนเตรต และ MT หรือ EE2 สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการสลายตัวของ MT หรือ EE2 กับเวลา และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอมโมเนีย ไนโตรท์ ไนเตรต ที่ลดลงกับเวลา เปรียบเทียบผลระหว่างกราฟทั้ง 2 โดยกำหนดค่าแอมโมเนียและฮอร์โมนเริ่มต้นดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 กำหนดค่าความเข้มข้นแอมโมเนียและฮอร์โมนเริ่มต้นในแต่ละชุดการทดลอง

ถังปฏิกรณ์ความเข้มข้นแอมโมเนีย 70 mg N/L	ถังปฏิกรณ์ความเข้มข้นแอมโมเนีย 420 mg N/L
ชุดการทดลอง MT	ชุดการทดลอง MT
ความเข้มข้นตะกอนจุลินทรีย์ MLSS 50 mg/L	ความเข้มข้นตะกอนจุลินทรีย์ MLSS 100 mg/L
ความเข้มข้นแอมโมเนีย 28 mg N/L	ความเข้มข้นแอมโมเนีย 100 mg N/L
ความเข้มข้น MT 10 mg/L	ความเข้มข้น MT 10 mg/L
ชุดการทดลอง EE2	ชุดการทดลอง EE2
ความเข้มข้นตะกอนจุลินทรีย์ MLSS 100 mg/L	ความเข้มข้นตะกอนจุลินทรีย์ MLSS 100 mg/L
ความเข้มข้นแอมโมเนีย 70 mg N/L	ความเข้มข้นแอมโมเนีย 100 mg N/L
ความเข้มข้น EE2 5 mg/L	ความเข้มข้น EE2 5 mg/L

ชุดการทดลองทำตามตารางที่ 3.3 ประกอบด้วยชุดทดสอบการสลายทั่วไป (Degradation test) เพื่อศึกษาการสลาย MT และ EE2 โดยกลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงที่แตกต่างกัน ควบคุมการทดลองด้วยชุดควบคุม 3 ชุด คือชุดควบคุมการทดลอง AOB inhibition test โดยเติม Allylthiourea (ATU) ความเข้มข้น 86 หรือ 500 ไมโครโมลาร์ เพื่อยืนยันว่าหากจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงถูกยับยั้งการทำงานฮอร์โมน MT หรือ EE2 จะถูกย่อยสลายได้หรือไม่ เนื่องจาก ATU มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ammonia monooxygenase (AMO) ซึ่ง

เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่ง ชุดควบคุมการทดลองที่สองคือ Abiotic degradation test โดยไม่ใส่ตะกอนจุลินทรีย์ลงในชุดการทดลองเพื่อยืนยันว่าฮอร์โมน MT หรือ EE2 ไม่สลายตัวเองด้วยกระบวนการทางกายภาพและเคมี และชุดควบคุมการทดลองสุดท้ายคือ Degradation by heterotroph ซึ่งเป็นชุดการทดลองที่ไม่เติมแอมโมเนียเพื่อทดสอบว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นในระบบนอกจากจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งสามารถย่อยสลาย MT หรือ EE2 ได้หรือไม่

ตารางที่ 3.3 สรุปชุดการทดลองและชุดควบคุมการทดลองของการย่อยสลายฮอร์โมน MT และ EE2

ชุดการทดลอง	NH ₃	EE2 หรือ MT	ATU	ตะกอนจุลินทรีย์	ตะกอนจุลินทรีย์ฆ่าเชื้อ
Degradation test	✓	✓	✗	✓	✗
AOB inhibition test	✓	✓	✓	✓	✗
Abiotic degradation test	✓	✓	✗	✗	✓
Degradation by heterotroph	✗	✓	✗	✓	✗

3.2. ยืนยันผลของกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมจากการทดลองที่ 3.1 โดยอ้างอิงผลจากการทดลองที่ 3.1 คือเมื่อการทดลองที่ 3.1 สิ้นสุดแล้วพบว่าปริมาณแอมโมเนียหมดก่อนปริมาณของ EE2 ให้เติมแอมโมเนียความเข้มข้นเดียวกับตอนแรกลงในระบบแล้วดูการสลายตัวของ EE2 อีกครั้ง * โดยใช้ชุดควบคุมเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1

ในการทดลองนี้มีวิธีทำ 2 แบบคือแบบใส่แอมโมเนียต่อเนื่องทันทีโดยใส่แอมโมเนียความเข้มข้นเดียวกับตอนแรกลงในระบบแล้วดูการสลายตัวของ EE2 เพื่อศึกษาว่าแอมโมเนียมีผลต่อการย่อยสลาย EE2 หรือไม่ และแบบใส่แอมโมเนียไม่ต่อเนื่องโดยทิ้งช่วงเวลาประมาณ 4-5 วันหลังจากแอมโมเนียครั้งลงแล้วจึงเติมแอมโมเนียความเข้มข้นเดียวกับตอนแรกแล้วดูการสลายตัวของ EE2 เพื่อศึกษาว่าหากไม่มีแอมโมเนียในระบบแล้วจะมีผลต่อการย่อยสลาย EE2 หรือไม่

หมายเหตุ * จากผลการทดลองที่ 3.1 พบว่ามีเฉพาะฮอร์โมน EE2 เท่านั้นที่ถูกย่อยสลายได้ด้วยแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งแบคทีเรีย ส่วนฮอร์โมน MT พบว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มเฮเทอโรโทรฟน่าจะเป็นจุลินทรีย์กลุ่มเด่นในการย่อยสลาย ดังนั้น การทดลองที่ 3.2 จึงทำเฉพาะฮอร์โมน EE2 เท่านั้น

การทดลองที่ 4 การศึกษาผลของความเข้มข้นแอมโมเนียต่อการสลาย 17 α -เอthinilเอสตราไดออล และผลของความเข้มข้นของ 17 α -เอthinilเอสตราไดออล (EE2) ต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนีย

การศึกษาค้นคว้าผลของความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ EE2 ต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนียและผลของแอมโมเนียต่อการสลาย EE2 โดยใช้ตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่เลือกมาทั้ง 1 ถึงคือตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรและทำเฉพาะฮอร์โมน EE2 ทำการทดลองในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ใส่ตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์แอมโมเนีย และ EE2 ตามความเข้มข้นตามที่กำหนดดังตารางที่ 3.4 ให้อากาศโดยการเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ควบคุม pH ด้วย HEPES buffer ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร โดยกำหนด pH ห้ามต่ำกว่า 7.5 แล้วจึงวัดค่าแอมโมเนีย ไนโตรท์ ไนเตรต และ EE2 สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการสลายตัวของ EE2 และ MT กับเวลา และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอมโมเนีย ไนโตรท์ ไนเตรต ที่ลดลงกับเวลา เปรียบเทียบผลระหว่างกราฟทั้ง 2 * **

ตารางที่ 3.4 กำหนดค่าแอมโมเนียและฮอร์โมนในชุดการทดลอง

<p>ถังปฏิกรณ์ความเข้มข้นแอมโมเนีย 420 mg N/L</p> <p>ความเข้มข้นตะกอนจุลินทรีย์ MLSS 100 mg/L</p> <p>ความเข้มข้นแอมโมเนีย เท่ากับ 5 และ 100 mg N/L</p> <p>ความเข้มข้น EE2 เท่ากับ 2 และ 5 mg/L</p>

หมายเหตุ* จากผลการทดลองที่ 3.1 พบว่ามีเฉพาะฮอร์โมน EE2 เท่านั้นที่ถูกย่อยสลายได้ด้วยแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งแบคทีเรีย ส่วนฮอร์โมน MT พบว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มเฮเทอโรโทรปน่าจะ เป็นจุลินทรีย์กลุ่มเด่นในการย่อยสลาย ดังนั้นการทดลองที่ 4 จึงทำเฉพาะฮอร์โมน EE2 เท่านั้น

หมายเหตุ ** จากผลการทดลองการทดลองที่ 3.1 และ 3.2 พบว่าตะกอนจุลินทรีย์จากทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์มีประสิทธิภาพในการบำบัด EE2 ใกล้เคียงกัน การทดลองที่ 4 จึงเลือกตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรเพียงแค่อันเดียวเพื่อทำการทดลองอื่นๆต่อไป

3.2. ขั้นตอนการเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์

3.2.1. การเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์

3.2.1.1. การเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์ความเข้มข้นแอมโมเนีย 28 และ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (Widdel และ Bak, 1992)

เตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ในถังขนาด 1 ลิตรใส่สารเคมีปริมาณตามที่กำหนดละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปรับปริมาตรแล้วจึงใส่ในถังปฏิกรณ์และเติมแอมโมเนียน้ำเข้าตามความเข้มข้นที่กำหนด

สารละลาย Non-chelated trace element	1	มิลลิลิตร
สารละลายซีลีไนท์ทั้งสแตน	1	มิลลิลิตร
สารละลายวิตามินรวม	1	มิลลิลิตร
สารละลายวิตามินบี1	1	มิลลิลิตร
สารละลาย วิตามินบี 12	1	มิลลิลิตร

1. สารละลาย Non-chelated trace element เตรียมจากน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl)25%	12.5	มิลลิลิตร
เฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2100	มิลลิกรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	30	มิลลิกรัม
สารละลายแมงกานีสคลอไรด์ ($\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	100	มิลลิกรัม
โคบอลต์คลอไรด์ ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	190	มิลลิกรัม
นิเกิลคลอไรด์ ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	24	มิลลิกรัม
คอปเปอร์คลอไรด์ ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	144	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	36	มิลลิกรัม

2. สารละลายซีลีไนท์ทั้งสเดน (Selenite-tungstate) เตรียมจากน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 1 ลิตรประกอบด้วย

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

3. สารละลายวิตามินรวม (Vitamin mixture) เตรียมจาก โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร พีเอช 7.1-7.4

อะมิโนเบนโซอิกแอซิด (4-aminobenzoic acid)	4	มิลลิกรัม
ดี-ไบโอติน (D-biotin)	1	มิลลิลิตร
นิโคตินิกแอซิด (Nicotinic acid)	10	มิลลิกรัม
แคลเซียมดี-เพนโทธีเนต (Calcium D-pantothenate)	5	มิลลิกรัม
พริดอกไซด์ ไดไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxine dihydrochloride)	15	มิลลิกรัม

4. สารละลายวิตามินบี1 (Thiaminesolution) ประกอบด้วย

ไทอะมีนคลอไรด์ ไดไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine chloride dihydrochloride) 10 มิลลิกรัม
ละลายใน โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร พีเอช 3.4

5. สารละลาย วิตามินบี 12 (Vitamin B12) มหาวิทยาลัย

ไซยาโนโคบาลามิน (Cyanocobalamine Cyanocobalamine) 5 มิลลิกรัม
ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร

6. สารละลายน้ำเสียสังเคราะห์พื้นฐานเตรียมจากน้ำกลั่นปราศจากไอออน 1 ลิตร

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1000	มิลลิกรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	400	มิลลิกรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	100	มิลลิกรัม
โพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4)	200	มิลลิกรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	500	มิลลิกรัม

3.2.1.2. การเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์ความเข้มข้นแอมโมเนีย 140 และ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (Rongsayamanont และคณะ, 2010)

เตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ในถังขนาด 1 ลิตรใส่สารเคมีปริมาณตามที่กำหนดละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปรับปริมาตรแล้วจึงใส่ในถังปฏิกรณ์และเติมแอมโมเนียน้ำเข้าตามความเข้มข้นที่กำหนด

โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(Na_2HPO_4)	4.05	กรัม
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(K_2HPO_4)	2.10	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.01	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.09	กรัม

3.2.2. การเตรียม 17 α -เอthinylเอสโตรไดออล (17 α -ethinylestradiol) หรือ EE2

EE2 นำเข้าจากบริษัทซิกม่า (เซนต์หลุยส์, สหรัฐอเมริกา) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรละลายในเมทานอล

3.2.3. การเตรียม 17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน (17 α -methyltestosterone) หรือ MT

MT นำเข้าจากบริษัทซิกม่า (เซนต์หลุยส์, สหรัฐอเมริกา) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรละลายในเมทานอล

3.2. วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ตารางที่ 3. 5 การวัดพารามิเตอร์ต่างๆ

พารามิเตอร์	วิธีการตรวจวัด
แอมโมเนีย	Colorimetric method
ไนโตรเจน	Colorimetric method
ไนเตรต	UV screening method
ค่าออกซิเจนละลาย	เครื่องวัดออกซิเจนละลาย (Hanna instrument, Thailand)
พีเอช	เครื่องวัดพีเอช (Eetech pH Testr 30, Singapore)
ของแข็งและของแข็งระเหยได้	Gravimetric method
17 α -เอทินิลเอสตราไดออล	High Performance Liquid Chromatography (HPLC; Agilent Series 1100)
17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน	High Performance Liquid Chromatography (HPLC; Agilent Series 1100)

3.3.1. วิธีวัดแอมโมเนีย

นำตัวอย่างที่ผ่านการกรองผ่านตัวกรอง PTFE เมมเบรนฟิลเตอร์ 0.45 ไมโครเมตรเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย Salicylated-catalyst solution 0.6 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมสารละลายอัลคาไลน์-ไฮโปคลอไรต์ 1 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 1-3 ชั่วโมงเพื่อทำให้เกิดสี วัดการดูดกลืนแสงที่ 640 นาโนเมตรด้วย UV visible spectrophotometers รุ่น Thermo Electron Corporation, Hexious α , Cambridge, UK (Bower และ Holm-Hansen, 1980) เปรียบเทียบค่าของแอมโมเนียจากสารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย

3.3.1.1. สารละลาย Salicylated-catalyst เตรียมจาก

โซเดียมซาลิไซเลต	440	กรัม
โซเดียมไนโตรป	0.28	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน	1000	มิลลิลิตร

3.3.1.2. สารละลายอัลคาไลน์-ไฮโปคลอไรต์

ใช้อัตราส่วนโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 1 ส่วน ต่อ ปริมาณสารละลายอัลคาไลน์ -ซีเตรต 9 ส่วน

3.3.1.3. สารละลายอัลคาไลน์ -ซีเตรต เตรียมจาก

โซเดียมไฮดรอกไซด์	18.5	กรัม
โซเดียมซีเตรต	100	กรัม
ปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร		

3.3.2. วิธีวัดไนโตรท์

นำตัวอย่างที่ผ่านการกรองผ่านตัวกรอง PTFE เมมเบรนฟิลเตอร์ 0.45 ไมโครเมตรเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร เติม color reagent 400 ไมโครลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาทีถึง 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนสี วัดการดูดกลืนแสงที่ 543 นาโนเมตรด้วย UV visible spectrophotometers รุ่น Thermo Electron Corporation, Hexious α , Cambridge, UK (Strickland และคณะ, 1972) เปรียบเทียบค่าของไนโตรท์จากสารละลายมาตรฐานไนโตรท์

3.3.2.1. สารละลาย color reagent เตรียมจาก

ซัลฟานิลาไมด์(Sulphanilamide)	10	กรัม
-------------------------------	----	------

ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม

กรดฟอสโฟนิก (phosphonic acid) 85%	100	มิลลิลิตร.
N-(1-naphthyl) ethylenediamine DIHYDROCHLORIDE	1	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็น 1000 มิลลิลิตร

3.3.3. วิธีการวัดหาไนเตรต

นำตัวอย่างที่ผ่านการกรองผ่านตัวกรอง PTFE เมมเบรนฟิลเตอร์ 0.45 ไมโครเมตรเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร นำตัวอย่างวัดการดูดกลืนแสงที่ 220 นาโนเมตรเพื่อที่จะหาค่า NO_3^- และการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตรเพื่อหาค่าสารอินทรีย์ละลายน้ำป้องกันการรบกวนด้วย UV visible spectrophotometers รุ่น Thermo Electron Corporation, Hexious α , Cambridge, UK (Federation และ Association, 2005) เปรียบเทียบค่าของไนเตรตจากสารละลายมาตรฐานไนเตรต

3.3.4. วิธีการวัดออกซิเจนละลาย

ใช้เครื่องวัดออกซิเจนละลาย (Hanna instrument, Thailand) ในการวัด โดยนำโพรบจุ่มตัวอย่างแล้วอ่านค่าที่ได้

3.3.5. วิธีการวัดพีเอช

ใช้เครื่องวัดพีเอช (Eutech ph tester 30, Singapore) ในการวัด โดยนำโพรบจุ่มตัวอย่างแล้วอ่านค่าที่ได้

3.3.6. การวัดความเข้มข้นของของแข็ง

ความเข้มข้นของ mixed liquor suspended solids (MLSS) วัดโดยวิธี gravimetric ตามวิธีมาตรฐาน (Federation และ Association, 2005) โดยใช้ตัวอย่างจากถังปฏิกรณ์ 50 มิลลิลิตร กรองใส่กระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตรแล้วจึงอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส

3.3.7. วิธีการวัด EE2

นำตัวอย่างจากหลอดทดลองเติมด้วยเมทานอลปริมาตรเท่ากับปริมาตรตัวอย่างเพื่อสกัด EE2 ออกจากตะกอนจุลินทรีย์แล้วจึงปั่นด้วยเครื่อง vortex เพื่อให้ EE2 ออกมาจากตะกอนจุลินทรีย์ทั้งหมดแล้วจึงนำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร กรองผ่านตัวกรอง PTFE เมมเบรนฟิลเตอร์ 0.45 ไมโครเมตร วิเคราะห์หาค่า EE2 ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC; Agilent Series 1100) โดยใช้สภาวะต่างๆตามตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวัด EE2 ด้วยเครื่อง HPLC

พารามิเตอร์	สภาวะ
ชนิดคอลัมน์	C18 (Agilent 250x4.6mm,5um)
Mobile Phase	60% acetonitrile 40% water
Flow Rate (มิลลิลิตร/นาท)	0.8
UV Detector Wavelength	210 นาโนเมตร
Retention time (นาท)	ประมาณ 5.3
Run Time (นาท)	10
Injection Volume (µL)	50
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	30

3.3.8. วิธีการวัด MT

นำตัวอย่างจากหลอดทดลองเติมด้วยเมทานอลปริมาตรเท่ากับปริมาตรตัวอย่างเพื่อสกัด MT ออกจากตะกอนจุลินทรีย์ แล้วจึงปั่นด้วยเครื่อง vortex เพื่อให้ MT ออกมาจากตะกอนจุลินทรีย์ทั้งหมดแล้วจึงนำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร กรองผ่านตัวกรอง PTFE เมมเบรนฟิลเตอร์ 0.45 ไมโครเมตร วิเคราะห์หาค่า MT ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC; Agilent Series 1100) โดยใช้สภาวะต่างๆตามตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวัด MT ด้วยเครื่อง HPLC

พารามิเตอร์	สภาวะ
ชนิดคอลัมน์	C18 (Apollo 250x4.6mm,5um)
Mobile Phase	Gradient solution 60% acetonitrile นาที 0 95% acetonitrile นาที 6 60% acetonitrile นาที 6.1 60% acetonitrile นาที 9
Flow Rate (มิลลิลิตร/นาที)	1
Diode array detector	245 นาโนเมตร
Retention time (นาที)	ประมาณ 6.3
Run Time (นาที)	9
Injection Volume (μL)	50
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	40

3.3.9 การวิเคราะห์หากกลุ่มประชากรของแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งแบคทีเรีย

3.3.9.1. การเตรียมตัวอย่าง

นำตะกอนตัวอย่างจากถังปฏิกรณ์ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที โดยเก็บตัวอย่างตะกอนจากการปั่นเหวี่ยง 2 มิลลิกรัมต่อลิตรในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.9.2. การสกัดดีเอ็นเอ

ใช้วิธี Fast-DNA SPIN kits for soil (QBiogenes, USA) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต ตรวจสอบตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis บน 1.5% agarose gel (ภาคผนวก ก)

3.3.9.3. การทำ Polymerase Chain Reaction

ใช้ฟอร์เวิร์ดไพเมอร์ (*amoA* 1F 5-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3 ; Rotthauwe และคณะ, 1997) ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ รีเวิร์ดไพเมอร์ (*amoA* 2R 5-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3 ; Rotthauwe และคณะ, 1997) ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ใช้ Taq DNA polymerase (Takara Bio Inc., Japan) PCR conditions คือ initial denaturation นาน 10 นาที ที่ 95 องศาเซลเซียส DNA denaturation 60 วินาที ที่ 95 องศาเซลเซียส primer annealing 60 วินาที ที่ 56 องศาเซลเซียส DNA extension 30 วินาที ที่ 72 องศาเซลเซียสและ final extension 15 วินาที ที่ 78 องศาเซลเซียส โดยใช้จำนวนรอบ 35 รอบ (Sonthiphand และ Limpiyakorn, 2011) (ภาคผนวก ก)

4.3.9.4 การทำ PCR-Cloning และ PCR-sequencing

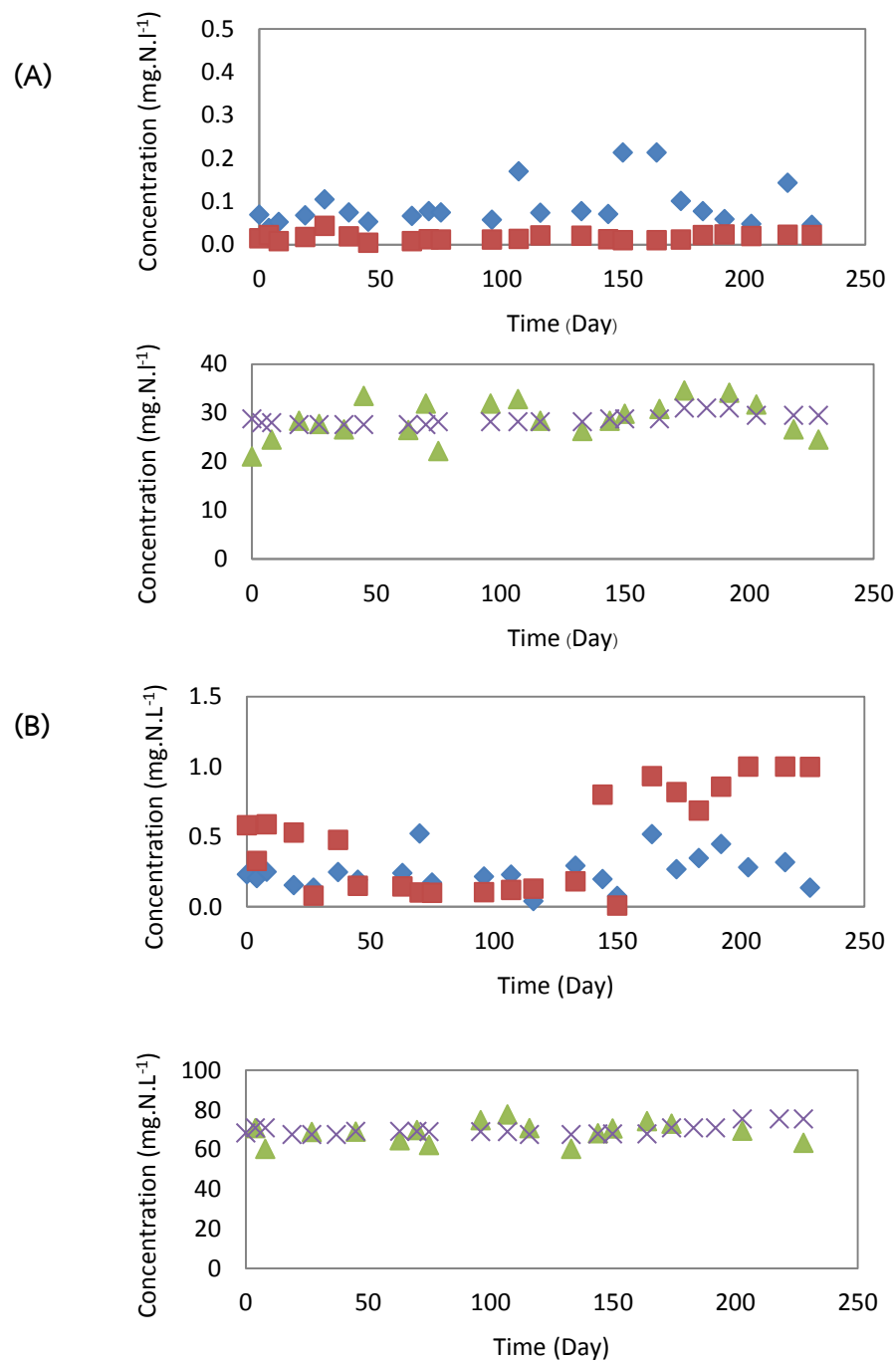
นำตัวอย่าง PCR product โคลนนิ่งด้วยใช้ชุด PCR Cloning Kit โดยใช้ NucleoSpin Extract II Kit (ClontechLaboratories Inc., USA). เพื่อทำให้ DNA บริสุทธิ์จากนั้นโคลนนิ่งโดยใช้ pGEM-T Easy vector system (Promega, USA) สุ่มเลือก 4-5 โคลนเพื่อส่งตัวอย่างหาการจัดลำดับ PCR-sequencing บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้วิธีทำอยู่ใน (ภาคผนวก ก)

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1. การทดลองที่ 1: สร้างตะกอนจุลินทรีย์ที่มีจลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียที่แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์

การทดลองนี้เป็นการสร้างตะกอนจุลินทรีย์ผสมที่มีจลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียที่แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์ 4 ถัง กำหนดระบบของถังปฏิกรณ์ทั้ง 4 ถังเป็นแบบต่อเนื่องไม่เวียนตะกอน ใส่น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแอมโมเนียความเข้มข้นน้ำเข้าคือ 28, 70, 140 และ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เพื่อให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียขาออกแตกต่างกันซึ่งจะมีผลทำให้จลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียและกลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งในแต่ละถังปฏิกรณ์แตกต่างกัน รูปที่ 4.1 แสดงความเข้มข้นไนโตรเจนในน้ำเข้าและน้ำออกของแต่ละถังปฏิกรณ์ โดยแสดงผลในช่วง 250 วันสุดท้ายที่นำมาใช้ในการศึกษาจลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียโดยกลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งรวมไปถึงการย่อยสลาย MT และ EE2 ซึ่งในช่วงการทดลองนี้แต่ละถังจะมี MLSS ความเข้มข้นประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ในช่วงเวลาดังกล่าวได้เดินระบบถังปฏิกรณ์ 140 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรเพียง 80 วันแล้วหยุดการเดินระบบเนื่องจากการข้อขัดข้องของอุปกรณ์เดินระบบ โดยตารางที่ 4.1 แสดงสรุปผลการเดินระบบถังปฏิกรณ์ทั้ง 4 ถังในช่วงเวลาดังกล่าวซึ่งพบว่าแอมโมเนียขาออกในถังที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียน้ำเข้า 28 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรเท่ากับ 0.09 ± 0.05 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ถังปฏิกรณ์ความเข้มข้นแอมโมเนียน้ำเข้า 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรเท่ากับ 0.25 ± 0.12 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ถังปฏิกรณ์ความเข้มข้นแอมโมเนียน้ำเข้า 140 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรเท่ากับ 2.3 ± 0.85 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรและถังปฏิกรณ์ความเข้มข้นแอมโมเนียน้ำเข้า 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรเท่ากับ 15.27 ± 9.03 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร นอกจากนี้ทั้ง 4 ถังไม่มีการสะสมไนโตรเจนมากนักเนื่องจากมีจุลินทรีย์ Nitrite-oxidizing bacteria (NOB) เปลี่ยนไนไตรท์ให้เป็นไนเตรต นอกจากนี้ยังพบปริมาณไนโตรเจนเล็กน้อยที่หายไปจากถังปฏิกรณ์ทั้ง 4 ถังนี้อาจเป็นเพราะเกิดการดูดซึมไนโตรเจนจากตะกอนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หรืออาจเกิดจากกระบวนการ Denitrification

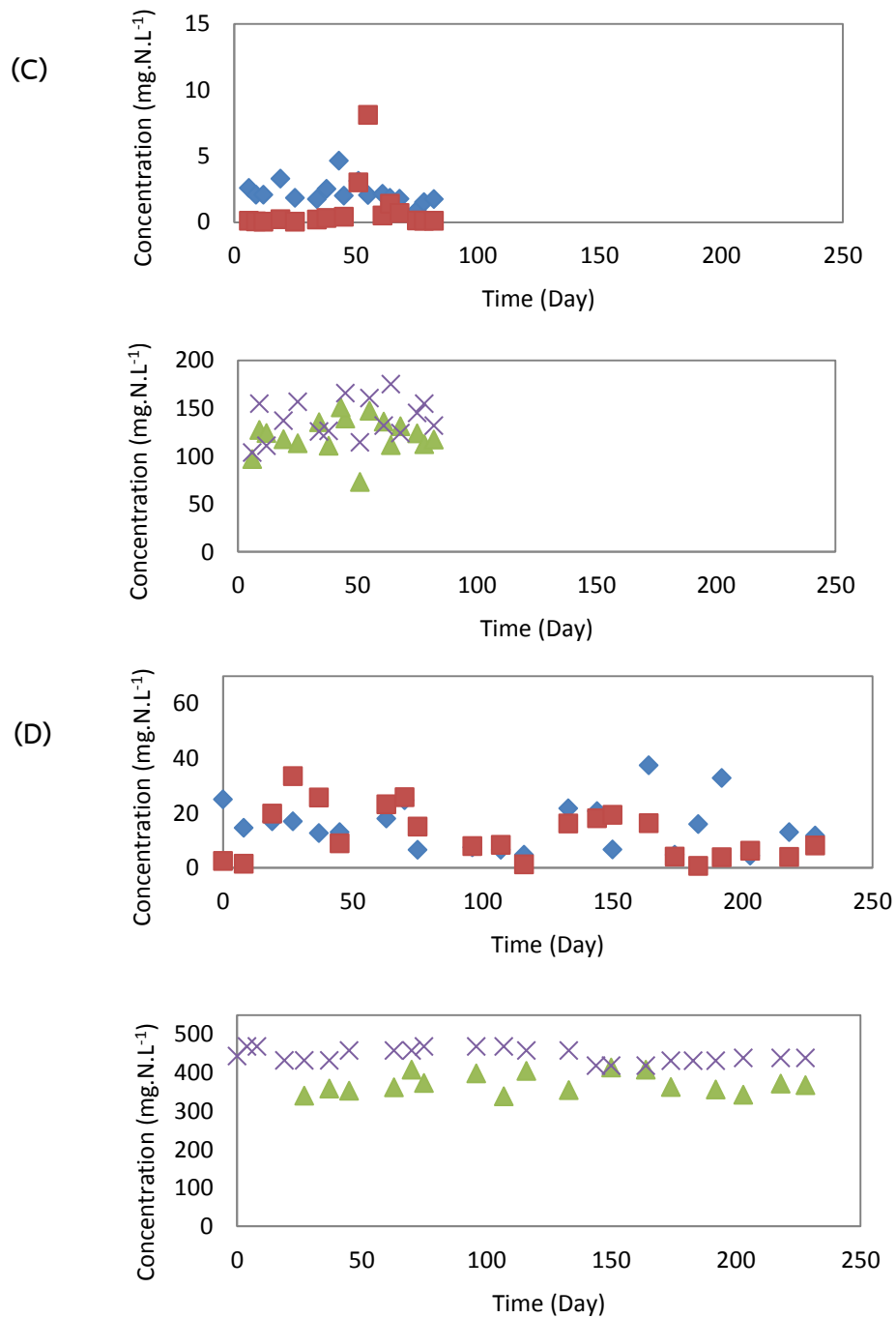


(A) ถึงปฏิบัติการความเข้มข้นแอมโมเนียน้ำเข้า 28 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

(B) ถึงปฏิบัติการความเข้มข้นแอมโมเนียน้ำเข้า 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

× NH_3 น้ำเข้า (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ◆ NH_3 น้ำออก (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)
 ■ NO_2^- น้ำออก (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ▲ NO_3^- น้ำออก (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)

รูปที่ 4.1 ความเข้มข้นไนโตรเจนในน้ำเข้าและน้ำออกของถังปฏิบัติการ



(C) ถังปฏิกรณ์ความเข้มข้นแอมโมเนียน้ำเข้า 140 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

(D) ถังปฏิกรณ์ความเข้มข้นแอมโมเนียน้ำเข้า 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

× NH₃ น้ำเข้า (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ◆ NH₃ น้ำออก (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)
 ■ NO₂⁻ น้ำออก (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ▲ NO₃⁻ น้ำออก (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)

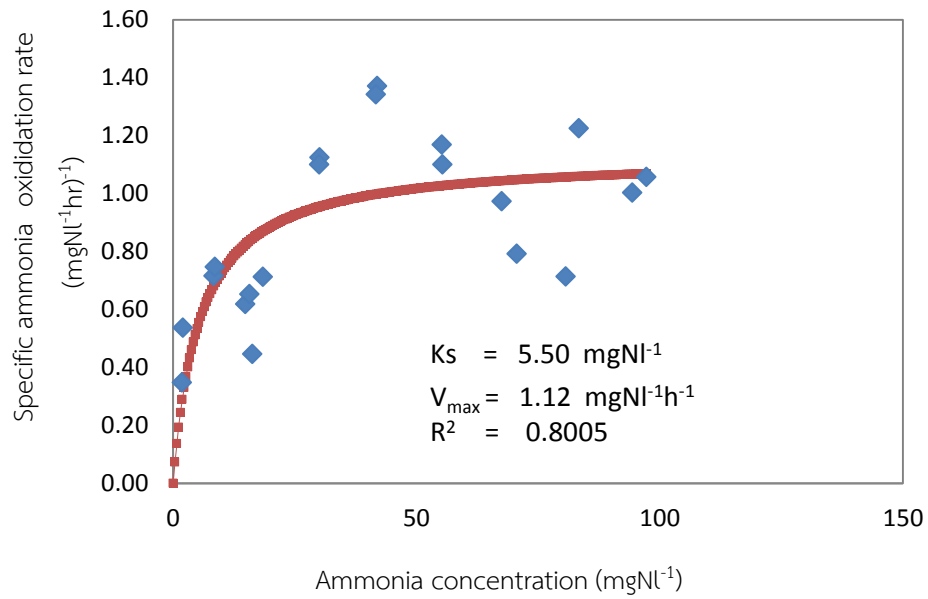
รูปที่ 4.1 ความเข้มข้นไนโตรเจนในน้ำเข้าและน้ำออกของถังปฏิกรณ์(ต่อ)

ตารางที่ 4.1 สรุประดับไนโตรเจนในน้ำเข้าและน้ำออกของถังปฏิกรณ์

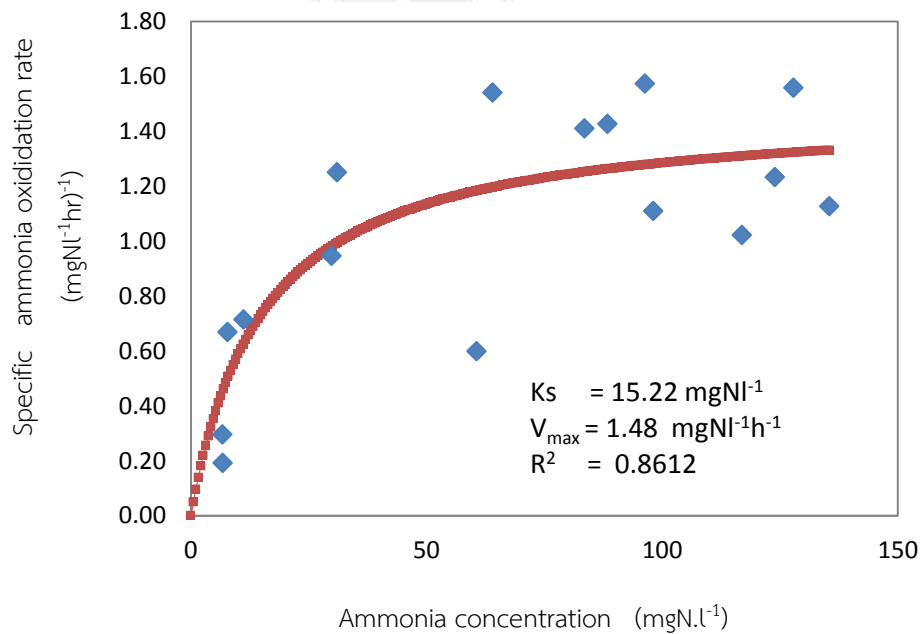
พารามิเตอร์	ถังปฏิกรณ์ที่มี แอมโมเนีย น้ำเข้า 28 มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร	ถังปฏิกรณ์ที่มี แอมโมเนีย น้ำเข้า 70 มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร	ถังปฏิกรณ์ที่มี แอมโมเนีย น้ำเข้า 140 มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร	ถังปฏิกรณ์ที่มี แอมโมเนีย น้ำเข้า 420 มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร
NH_3 น้ำเข้า (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	29.16±1.39	69.82±2.55	142.73±15.02	439.11±16.11
NH_3 น้ำออก (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	0.09±0.05	0.25±0.12	2.3 ± 0.85	15.27±9.03
NO_2^- น้ำออก (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	0.02±0.01	0.46±0.36	2.05±0.96	12.26±9.03
NO_3^- น้ำออก (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)	28.18± 4.39	67.61±5.08	121.26±18.94	370.98±25.35
ผลรวมไนโตรเจน	28.77±3.85	68.30±5.10	131.90± 24.19	398.63±30.96
ประสิทธิภาพการ บำบัดแอมโมเนีย (%)	99.69	99.64	98.83	96.52

4.2 การทดลองที่ 2: จลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียของตะกอนจุลินทรีย์

การทดลองนี้ทำโดยนำตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่เลือกมาทั้ง 2 ถังจากการทดลองที่ 1 ที่มีค่าแอมโมเนียเข้าความเข้มข้นเท่ากับ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรและ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียและมีค่าความเข้มข้นแอมโมเนียขาออกแตกต่างกันอย่างชัดเจนมาศึกษาจลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนีย จากผลการศึกษาจลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียโดยจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งในตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่เลือกมาทั้ง 2 ถัง (รูปที่ 4.2) พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์โมโนด (K_s) ของตะกอนจากถังที่รับน้ำเสียที่มีความเข้มข้นแอมโมเนีย 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เท่ากับ 5.50 ± 2.61 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรและค่า V_{max} เท่ากับ 1.12 ± 0.10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนค่า K_s ของตะกอนจากถังที่รับน้ำเสียที่มีความเข้มข้นแอมโมเนีย 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรเท่ากับ 15.22 ± 6.91 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรและค่า V_{max} เท่ากับ 1.48 ± 0.15 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับค่า K_s ของ จุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งสายพันธุ์บริสุทธิ์ (ตารางที่ 4.2) แสดงให้เห็นว่าตะกอนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์รับน้ำเสียที่มีความเข้มข้นแอมโมเนีย 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรมีแนวโน้มใกล้เคียงกับจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งในกลุ่มที่มี Substrate affinity สูงและกลาง เช่น ชนิด *Nitrosomonas marina* cluster , ชนิด *Nitrosomonas oligotropha* cluster และ ชนิด *Nitrosomonas communis* cluster ตามลำดับ ในขณะที่ตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียที่มีความเข้มข้นแอมโมเนีย 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร จะมีแนวโน้มที่พบจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งในกลุ่มที่มี Substrate affinity ต่ำ เช่น ชนิด *Nitrosomonas europaea* cluster



รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการออกซิไดซ์แอมโมเนียและความเข้มข้นของแอมโมเนียของตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร



รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการออกซิไดซ์แอมโมเนียต่อความเข้มข้นของแอมโมเนียของตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

ตารางที่ 4.2 ค่า Ks ของจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งสายพันธุ์บริสุทธิ์

กลุ่ม	สายพันธุ์	Ks	อ้างอิง
Substrate (NH ₃) affinity ต่ำ	<i>Nitrosomonas europaea</i>	12.3-27.4 mgN/L	Laanbroek และคณะ, 1994
		16.1-32.9 mgN/L	Koops และคณะ, 2003
		7.7 mgN/L	Habbena และคณะ, 2009
Substrate (NH ₃) affinity กลาง	<i>Nitrosomonas communis</i>	2.7-8.4 mgN/L	Koops และคณะ, 2003
Substrate (NH ₃) affinity สูง	<i>Nitrosomonas oligotropha</i>	0.4-1.1 mgN/L	Stehr และคณะ, 1995
		0.7-1.4 mgN/L	Bollmann และคณะ, 2002
		1.0-2.1 mgN/L	Koops และคณะ, 2003
	<i>Nitrosomonas marina</i>	0.7-0.72 mgN/L	Koops และคณะ, 2003
Substrate (NH ₃) affinity สูงมาก	<i>Nitrosopumilus maritimus</i>	1.86 µgN/L	Könneke และคณะ, 2005 Martens-Habbena และคณะ, 2009
	<i>Candidatus Nitrosoarchaeum koreensis</i>	9.66 µgN/L	Jung และคณะ, 2011

เพื่อยืนยันผลจลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียโดยตะกอนจุลินทรีย์ในแต่ละถัง ปฏิกรณ์จึงหากลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งในแต่ละถัง โดยใช้ตะกอนแต่ละถัง 2 มิลลิกรัมต่อลิตรสกัด DNA โดยชุด Fast-DNA SPIN kits for soil (QBiogenes, USA) ทำให้ DNA บริสุทธิ์โดยวิธี PCR จากนั้นนำตัวอย่าง PCR ที่บริสุทธิ์แล้วโคลนนิ่งด้วยชุด PCR cloning Kit โดยใช้แบบ PGEM-T easy vector system (Promega, USA) แล้วจึงสุ่มเลือกตัวอย่างแต่ละถัง ปฏิกรณ์ 4-5 โคลนเพื่อส่งตัวอย่างหาการจัดลำดับ PCR-sequencing จากนั้นจึงนำลำดับรหัส พันธุกรรมของยีน *amoA* ที่ได้เปรียบเทียบกับเอกลักษณ์และความคล้ายคลึงจากฐานข้อมูลผ่านทางเว็บไซต์ NCBI BLAST โดยเลือกแบบ type culture ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.3 และ 4.4

จากผลการเพาะเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งในถังปฏิกรณ์ที่มีค่าแอมโมเนีย น้ำเข้า 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยสุ่มเลือกตัวอย่าง 5 โคลน พบว่าลำดับ Sequencing ของ 4 โคลนมีความคล้ายคลึงกับ *Nitrosomonas ureae* strain Nm10 ซึ่งอยู่ในชนิด *N. oligotropha* cluster ที่มี Substrate affinity สูงโดยทั้ง 4 โคลนแสดงเอกลักษณ์ ความคล้ายคลึงอยู่ในช่วง 93-96 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอีก 1 โคลนพบว่ามี ความคล้ายคลึงกับ *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 ซึ่งอยู่ในชนิด *N. europaea* cluster โดยมีเอกลักษณ์ ความคล้ายคลึงเท่ากับ 94 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ากลุ่มประชากร จุลินทรีย์กลุ่มหลักในถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรคือ AOB ที่อยู่ในชนิด *N. oligotropha* cluster ซึ่งมี Substrate affinity สูง

จากผลการเพาะเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งในถังปฏิกรณ์ที่มีค่าแอมโมเนีย น้ำเข้า 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยสุ่มเลือกตัวอย่าง 4 โคลน พบว่าลำดับ sequencing ของทั้ง 4 โคลนมีความคล้ายคลึงกับ *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 ซึ่งอยู่ในชนิด *N. europaea* cluster ที่มี Substrate affinity ต่ำ โดยแสดงเอกลักษณ์ความ คล้ายคลึงอยู่ในช่วง 97 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ กลุ่มหลักในถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรคือ AOB ที่อยู่ในชนิด *N. europaea* cluster

ทั้งนี้การศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งนั้นได้ทำการถอดรหัส พันธุกรรมแต่ละตัวอย่างเพียง 4-5 โคลน เพื่อใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์ของกลุ่มประชากรและ จลนพลศาสตร์เท่านั้น ในความเป็นจริงการศึกษากลุ่มประชากรควรใช้จำนวนโคลนมากกว่านี้แต่ เนื่องจากตะกอนมีปริมาณที่จำกัดจึงใช้จำนวนโคลนเพียง 4-5 โคลนเพื่อเป็นการประเมินเบื้องต้น เท่านั้น

จากผลการทดลองการเพาะเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์ การศึกษาจุลณพศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียและการหากลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่ง พบว่าผลการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกัน โดยถึงปฏิกรณ์รับน้ำเสียที่มีความเข้มข้นแอมโมเนีย 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรพบค่าแอมโมเนียน้ำออกต่ำคือ 0.25 ± 0.12 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งมีผลทำให้ค่าจุลณพศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียเท่ากับ 5.50 ± 2.61 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยผลจุลณพศาสตร์ดังกล่าวเกิดจากในถังปฏิกรณ์มีกลุ่มประชากร AOB ชนิด *N. oligotropha* cluster เป็นกลุ่มประชากรเด่น ในขณะที่ถังปฏิกรณ์รับน้ำเสียที่มีความเข้มข้นแอมโมเนีย 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรพบค่าแอมโมเนียน้ำออกสูงคือ 15.27 ± 9.03 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งมีผลทำให้ค่าจุลณพศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียเท่ากับ 15.22 ± 6.91 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยผลจุลณพศาสตร์ดังกล่าวเกิดจากในถังปฏิกรณ์มีกลุ่มประชากร AOB ชนิด *N. europaea* cluster เป็นกลุ่มประชากรเด่น ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งหมดดังกล่าวจึงสรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ที่มีค่าความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้นที่แตกต่างกันทำให้เกิดจุลณพศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียแตกต่างกัน โดยผลจุลณพศาสตร์ที่แตกต่างกันนี้เกิดจากการมีกลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งกลุ่มเด่นแตกต่างกันนั่นเอง นอกจากนี้ผลการทดลองยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ ภัทรพร (2553) ที่เพาะเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์ผสมจากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนที่มีกลุ่มประชากร AOB ซึ่งกล่าวว่าถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำจะพบ *N. oligotropha* เป็นกลุ่มประชากรเด่นโดยมีค่า K_s อยู่ในช่วง 0.6-3.3 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ส่วนถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียสูงจะพบ *N. europaea* เป็นกลุ่มประชากรเด่นและมีค่า K_s อยู่ในช่วง 10.1-24.6 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

ตารางที่ 4.3 กลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งจากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจน
ต่อลิตร

ชื่อตัวอย่าง	Accession No	Closet type culture	คะแนน	ความเหมือน	ช่องว่าง	AOB Cluster
70-1	CP013341	<i>Nitrosomonas ureae</i> strain Nm10	586	371/398(93%)	0/398(0%)	<i>N. oligotropha</i>
70-2	CP013341	<i>Nitrosomonas ureae</i> strain Nm10	595	380/409(93%)	0/409(0%)	<i>N. oligotropha</i>
70-3	CP013341	<i>Nitrosomonas ureae</i> strain Nm10	588	376/405(93%)	0/405(0%)	<i>N. oligotropha</i>
70-4	CP013341	<i>Nitrosomonas ureae</i> strain Nm10	675	395/410(96%)	0/410(0%)	<i>N. oligotropha</i>
70-5	AB070981	<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19178	619	382/406(94%)	0/406(0%)	<i>N. europaea</i>

ตารางที่ 4.4 กลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งจากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจน
ต่อลิตร

ชื่อตัวอย่าง	Accession No	Closet type culture	คะแนน	ความเหมือน	ช่องว่าง	AOB Cluster
420-1	AB070981	<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19178	689	398/411(97%)	0/411(0%)	<i>N. europaea</i>
420-2	AB070981	<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19178	695	401/414(97%)	0/414(0%)	<i>N. europaea</i>
420-3	AB070981	<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19178	675	392/406(97%)	0/406(0%)	<i>N. europaea</i>
420-4	AB070981	<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19178	688	399/413(97%)	0/413(0%)	<i>N. europaea</i>

4.3 การทดลองที่ 3: การย่อยสลายของ 17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน (MT) และ 17 α -เอทินิลเอสตราไดออล (EE2) ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมโดยกลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงในตะกอนจุลินทรีย์

การทดลองนี้ทำโดยนำตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่เลือกมาทั้ง 2 ถังจากการทดลองที่ 2 ศึกษาการย่อยสลาย 17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน (MT) และ 17 α -เอทินิลเอสตราไดออล (EE2) ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมของจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิง โดยแบ่งการทดลองนี้ออกเป็น 2 ขั้นตอนคือ

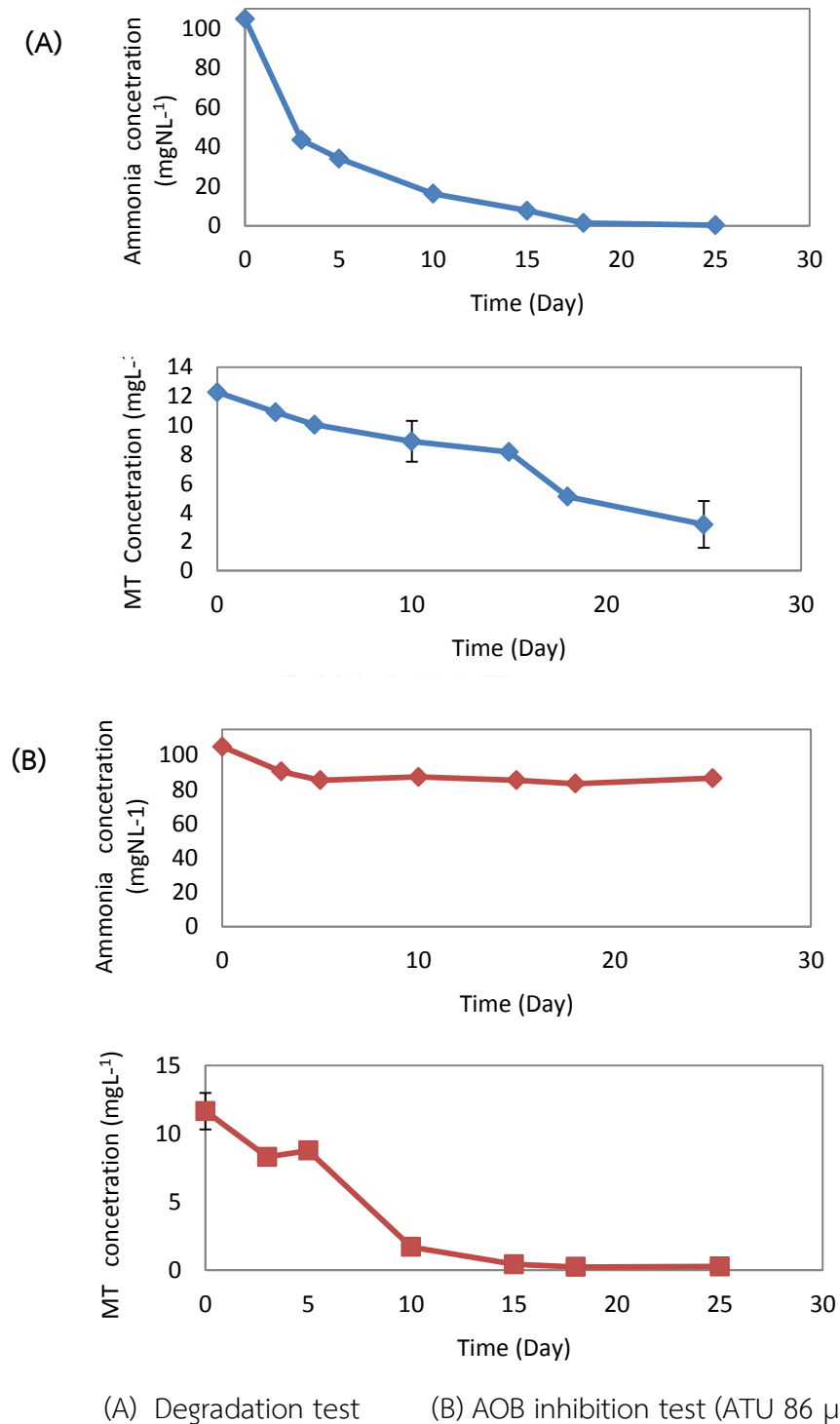
1. การศึกษาการย่อยสลายของ MT และ EE2 ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมโดยตะกอนจุลินทรีย์ที่มีกลุ่มประชากรจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิง

2. การยืนยันผลของกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมจากการทดลองที่ 1 โดยการเติมแอมโมเนียลงในระบบอีกครั้ง ซึ่งในการทดลองนี้มีวิธีการเติมแอมโมเนีย 2 แบบคือ แบบใส่แอมโมเนียต่อเนื่องทันทีหลังจากแอมโมเนียหมด โดยใส่แอมโมเนียความเข้มข้นเดียวกับตอนแรกลงในระบบแล้วดูการสลายตัวของ EE2 เพื่อศึกษาว่าแอมโมเนียมีผลต่อการย่อยสลาย EE2 หรือไม่ และแบบใส่แอมโมเนียไม่ต่อเนื่อง โดยทิ้งช่วงเวลาประมาณ 4-5 วันหลังจากแอมโมเนียหมดลง แล้วจึงเติมแอมโมเนียความเข้มข้นเดียวกับตอนแรกแล้วดูการสลายตัวของ EE2 เพื่อศึกษาว่าหากไม่มีแอมโมเนียในระบบแล้วจะมีผลต่อการย่อยสลาย EE2 หรือไม่

4.3.1. การย่อยสลายสาร MT ด้วยกลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งในตะกอนจุลินทรีย์

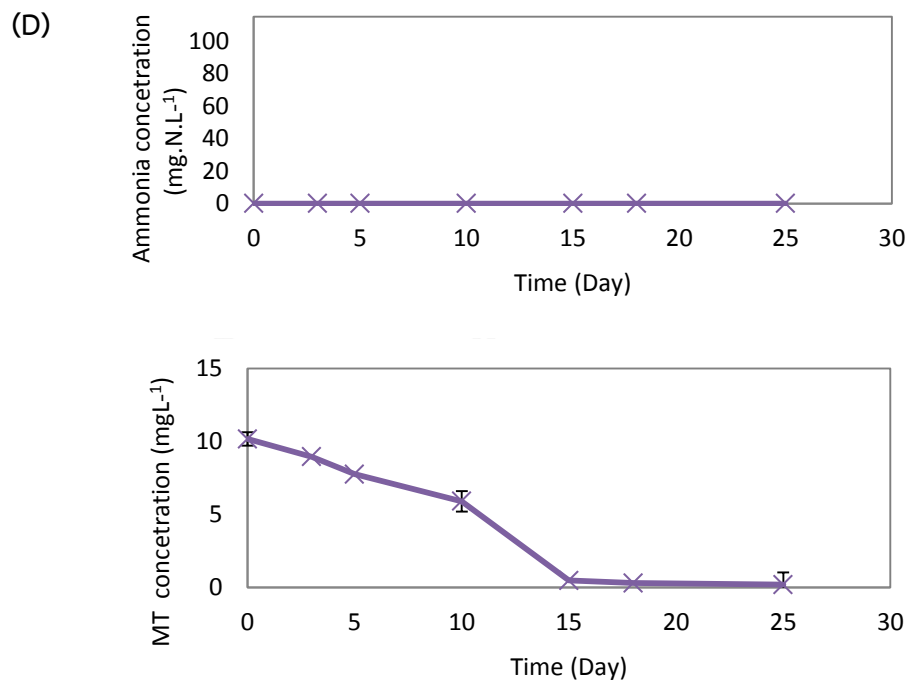
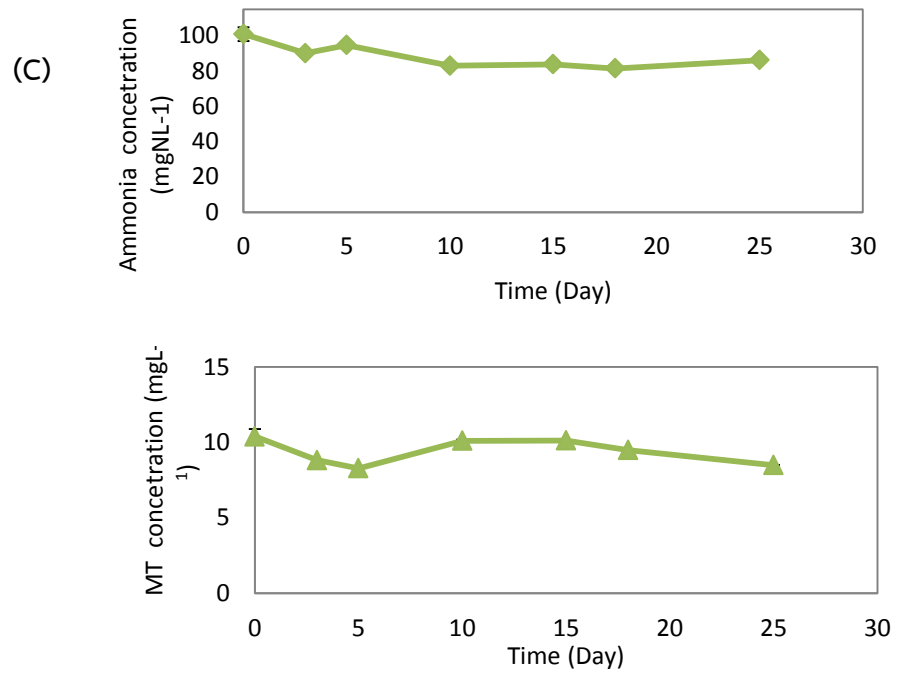
การทดลองนี้เป็นการศึกษาการสลายของฮอโรโมน MT ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมกัน โดยกลุ่มประชากร AOB ในตะกอนจุลินทรีย์ทั้ง 2 ถึงปฏิกรณ์ จากผลการย่อยสลายสาร MT ด้วยตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (รูปที่ 4.4) พบว่าผลการทดลองชุด Degradation test (รูปชุด A) ซึ่งเป็นชุดการย่อยสลายทั่วไปมีการออกซิไดซ์แอมโมเนียลดลงอย่างต่อเนื่องและหมดลงภายในเวลา 10 วันและพบการย่อยสลาย MT เมื่อเวลาผ่านไป สำหรับชุด AOB inhibition test (รูปชุด B) ซึ่งเป็นชุดการทดลองที่ใส่สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AMO โดยใส่สาร ATU ความเข้มข้น 86 ไมโครโมลาร์มีอัตราการออกซิไดซ์แอมโมเนียน้อยมากและพบการย่อยสลาย MT เมื่อเวลาผ่านไป สำหรับชุด Abiotic test (รูปชุด C) ซึ่งเป็นชุดการทดลองที่ใส่ตะกอนจุลินทรีย์ฆ่าเชื้อมีอัตราการออกซิไดซ์แอมโมนี้น้อยมากและไม่พบการย่อยสลาย MT สำหรับชุด Heterotroph test (รูปชุด D) ซึ่งไม่มีการใส่แอมโมเนีย พบว่ามีการย่อยสลาย MT และเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองชุด Degradation test และชุดการทดลอง AOB inhibition test แสดงให้เห็นว่า AOB ไม่ได้มีส่วนในการย่อยสลาย MT ผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมกันอย่างชัดเจน เนื่องจากผลการทดลองชุด AOB inhibition test พบฮอโรโมน MT ถูกย่อยสลายแม้ว่าจะไม่เกิดการออกซิไดซ์แอมโมเนียก็ตาม และเมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างชุด Degradation test และชุด Abiotic test จะพบว่าฮอโรโมน MT ในระบบไม่ได้ย่อยสลายเองด้วยกระบวนการทางกายภาพและเคมีเนื่องจากผลการทดลองชุด Abiotic test ไม่พบการย่อยสลายฮอโรโมน MT เนื่องจากใส่ตะกอนจุลินทรีย์ที่ฆ่าเชื้อ และเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างชุด Degradation test และชุด Heterotroph test ซึ่งไม่ใส่แอมโมเนียลงในระบบ แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์กลุ่มเด่นในตะกอนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย MT ได้น่าจะเป็นกลุ่มเฮเทอโรโทรฟ ขณะที่ผลการทดลองไม่สามารถพิสูจน์ได้อย่างแน่ชัดว่า MT สามารถถูกย่อยสลายโดย AOB ผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมกันได้หรือไม่

สำหรับผลการย่อยสลายสาร MT ด้วยตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (รูปที่ 4.5) พบผลการทดลองสอดคล้องกับผลการย่อยสลายด้วยตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียแอมโมเนียความเข้มข้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร แต่จะต่างเพียงเล็กน้อยในชุดการทดลอง AOB inhibition test ซึ่งใส่สาร ATU ความเข้มข้น 86 ไมโครโมลาร์ พบว่ามีอัตราการออกซิไดซ์แอมโมเนีย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ ATU ความเข้มข้น 86 ไมโครโมลาร์ที่ใช้ อาจไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ AOM ทุกสายพันธุ์ได้ ดังเช่นงานวิจัยของ Martens-Habbena และคณะ (2015) ซึ่งพบว่าต้องใช้ ATU ความเข้มข้นแตกต่างกันในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AMO ของจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์แอมโมเนียแต่ละสายพันธุ์ ทั้งนี้สำหรับการทดลองต่อไปได้เพิ่มระดับความเข้มข้น ATU เป็น 500 ไมโครโมลาร์ (Shen และคณะ, 2013) อย่างไรก็ตามเนื่องจากผลการทดลองแสดงชัดเจนว่าจุลินทรีย์เฮเทอโรโทรฟน่าจะเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่ย่อยสลายฮอโมน MT ในตะกอนจุลินทรีย์ จึงไม่มีความจำเป็นต้องทำการทดลองส่วนนี้ซ้ำอีกด้วยความเข้มข้น ATU 500 ไมโครโมลาร์



Y error bar คำนวณจากค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวัด 3 ซ้ำ pH = 7.5-8 DO = 2.1-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

รูปที่ 4.4 การย่อยสลายสาร MT ด้วยตะกอนจากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

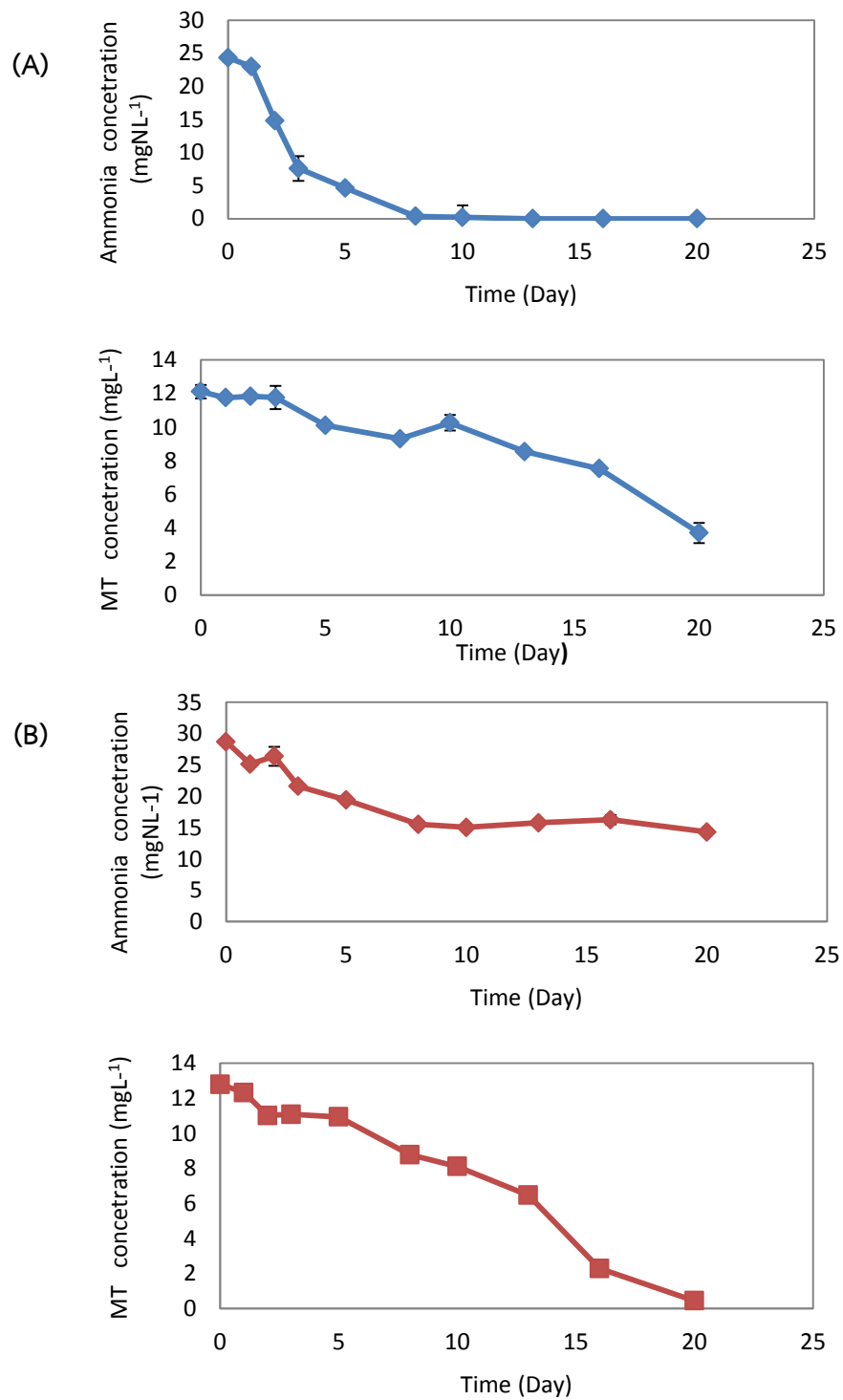


(C) Abiotic test

(D) Heterotroph test

Y error bar คำนวณจากค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวัด 3 ซ้ำ pH = 7.5-8 DO = 2.1-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

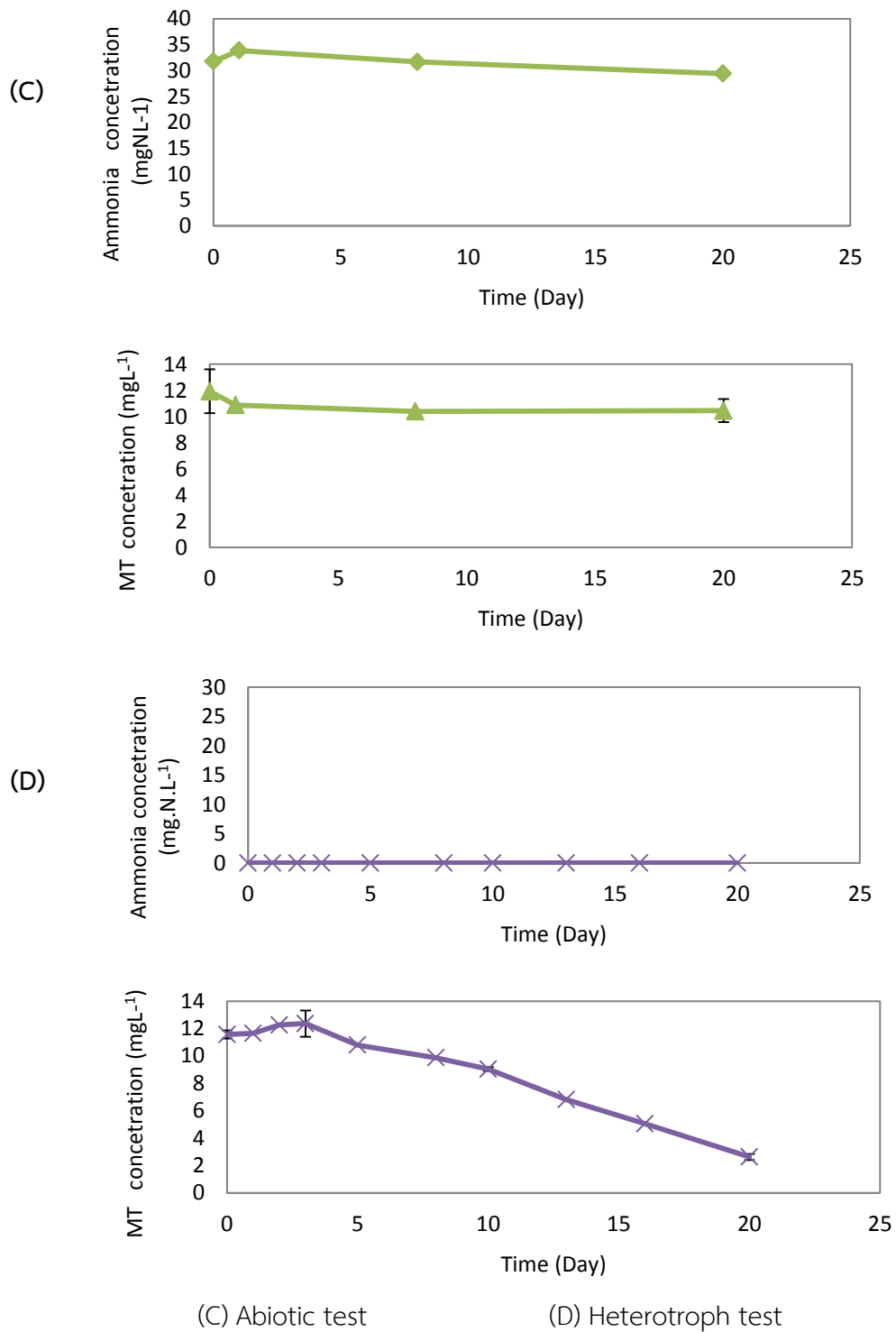
รูปที่ 4.4 การย่อยสลายสาร MT ด้วยตะกอนจากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร(ต่อ)



(A) Degradation test (B) AOB inhibition test (ATU 86 μM)

Y error bar คำนวณจากค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวัด 3 ซ้ำ pH = 7.5-8 DO = 2.1-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

รูปที่ 4.5 การย่อยสลายสาร MT ด้วยตะกอนจากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร



Y error bar คำนวณจากค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวัด 3 ซ้ำ pH = 7.5-8 DO = 2.1-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

รูปที่ 4.5 การย่อยสลายสาร MT ด้วยตะกอนจากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น

70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (ต่อ)

ตารางที่ 4.5 อัตราการย่อยสลายสาร MT โดยตะกอนจุลินทรีย์ในแต่ละถังปฏิกรณ์

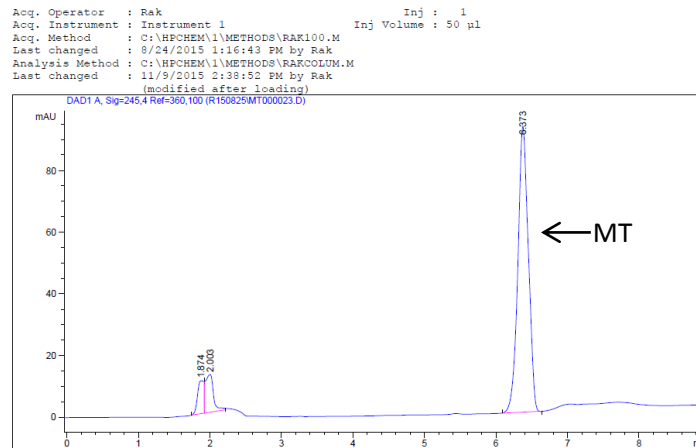
ชุดการทดลอง	Degradation test (มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อ ลิตรต่อวัน)	AOB inhibition test (มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อ ลิตรต่อวัน)	Heterotroph test (มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อ ลิตรต่อวัน)
ถังปฏิกรณ์รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร	0.3524	0.7888	0.6208
ถังปฏิกรณ์รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร	0.3625	0.6050	0.4752

คำนวณอัตราการย่อยสลายจาก initial rate (zero order reaction)

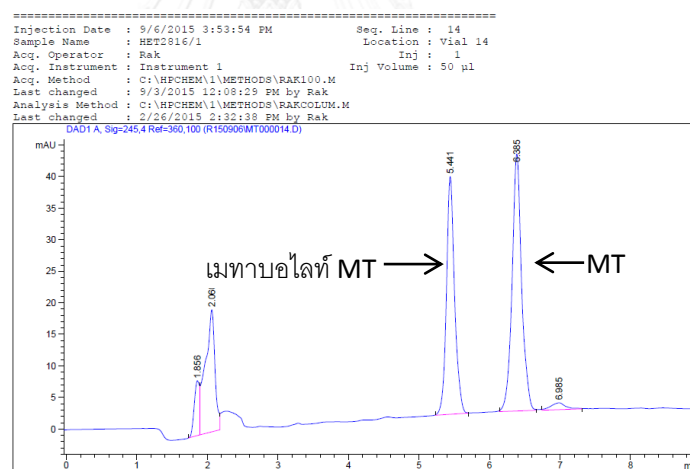
ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบอัตราการย่อยสลาย MT โดยตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ถังพบว่าตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่มีค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรมีอัตราการย่อยสลายสาร MT ในชุดการทดลอง AOB inhibition test มากที่สุด รองลงมาคือในชุดการทดลอง Heterotroph test และชุด Degradation test ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับตะกอนจากถังปฏิกรณ์ที่มีค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน โดยสาเหตุที่อัตราการย่อยสลาย MT ในชุด Degradation test ต่ำกว่าชุดการทดลองอีก 2 ชุดอาจเป็นเพราะปัจจัยภายนอก เช่น การแข่งขันเพื่อแย่งออกซิเจนและสารอาหารระหว่างจุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรปและแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งในระหว่างการย่อยสลาย MT และการออกซิไดซ์แอมโมเนียตามลำดับ

รูปที่ 4.7 และ 4.8 แสดงภาพตัวอย่างโครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ฮอร์โมน MT พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปชุดการทดลองในแต่ละชุดจะพบพีคที่เกิดขึ้นใหม่ โดยจะเป็นพีคที่เกิดก่อนสาร MT เดิม ทั้งนี้ได้เลือกกราฟในชุดการทดลอง Heterotroph test จากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียที่แอมโมเนีย ความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรมาแสดง เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองในวันที่ 1 และ วันที่ 16 พบว่าในวันที่ 16 พีคสาร MT (นาที่ที่ 6.3) มีค่าความสูงและพื้นที่ใต้กราฟลดลงเมื่อเทียบกับ วันแรก อีกทั้งยังปรากฏพีคใหม่ขึ้นในนาที่ที่ 5.3 เป็นไปได้ว่าพีคดังกล่าวคือเมตาบอไลต์ของฮอร์โมน MT ที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่าหรือมีขั้วมากกว่า โดยพีคดังกล่าวนี้จะเกิดและขยายใหญ่ขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้น จากงานวิจัยก่อนหน้านี้มีเป็นไปได้ว่าเมตาบอไลต์ดังกล่าวคือสาร 17α -methyl- 5α -androstane- 3α - 17β -diol และ 17α -methyl- 5α -androstane- 3α - 17β - diol (Homklin และคณะ, 2012) แต่ทั้งนี้ยังไม่อาจสรุปได้แน่ชัดจึงจำเป็นต้องระบุเมตาบอไลต์ด้วย เทคนิคอื่นต่อไป





รูปที่ 4.6 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์สาร MT จากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรในวันแรกของการทดลอง



รูปที่ 4.7 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์สาร MT จากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรในวันที่ 16 ของการทดลอง

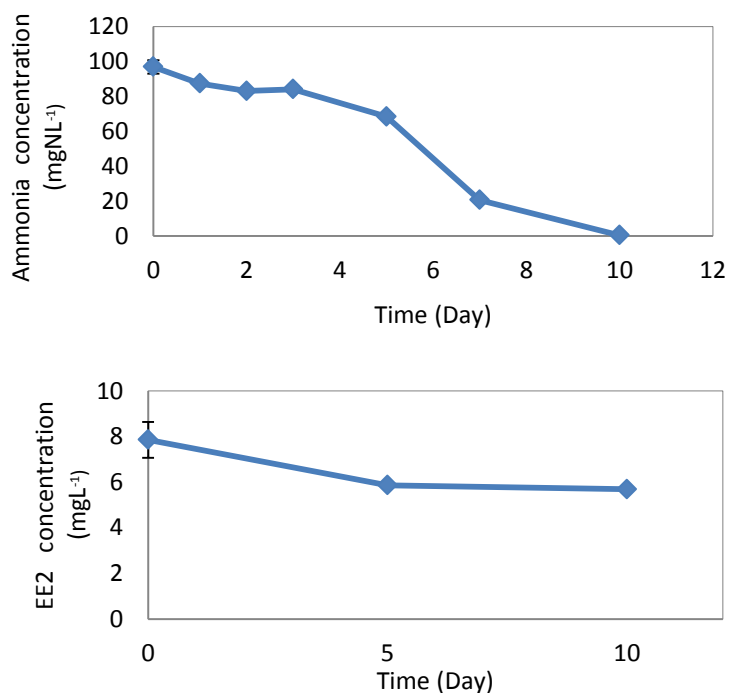
4.3.2 การย่อยสลายสาร EE2 ด้วยกลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งในตะกอนจุลินทรีย์

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการสลายของ EE2 ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมโดยตะกอนจุลินทรีย์เช่นเดียวกับการย่อยสลาย MT เพื่อยืนยันอีกครั้งว่าฮอร์โมน EE2 สามารถถูกย่อยสลายด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมโดยกลุ่มประชากร AOB ได้ดังงานวิจัยก่อนหน้านี้ โดยจากผลการย่อยสลายสาร EE2 ด้วยตะกอนจุลินทรีย์ จากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (รูปที่ 4.8) ที่มีกลุ่มประชากร AOB กลุ่ม ammonia substrate affinity ต่ำเป็นกลุ่มประชากรเด่น พบว่าชุด Degradation test ซึ่งเป็นชุดการย่อยสลายทั่วไปมีการออกซิไดซ์แอมโมเนียลดลงอย่างต่อเนื่องและหมดลงภายในเวลา 10 วันและพบการย่อยสลาย EE2 เช่นเดียวกันเมื่อเวลาผ่านไป ชุด AOB inhibition test ซึ่งเป็นชุดการทดลองที่ใส่สาร ATU ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ AMO ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ พบว่าไม่เกิดการออกซิไดซ์แอมโมเนียและการย่อยสลาย EE2 สำหรับชุด Abiotic test ซึ่งเป็นชุดการทดลองที่ใส่ตะกอนจุลินทรีย์ฆ่าเชื้อ มีความเข้มข้นแอมโมเนียคงที่ และพบว่าฮอร์โมน EE2 ไม่ถูกย่อยสลาย ขณะที่ชุด Heterotroph test ซึ่งไม่ได้ใส่แอมโมเนียลงในระบบพบว่าไม่มีการย่อยสลาย EE2 เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองในแต่ละชุดพบว่า ผลการทดลองชุด Degradation test และชุดการทดลอง AOB inhibition test แสดงให้เห็นว่า EE2 ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้ถ้าเอนไซม์ AMO ถูกยับยั้ง เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองชุด Degradation test และชุดการทดลอง Abiotic test แสดงให้เห็นว่าฮอร์โมน EE2 ในระบบไม่ได้ย่อยสลายเองด้วยกระบวนการทางกายภาพและเคมี และเมื่อเปรียบเทียบชุดการทดลอง Degradation test และชุดการทดลอง Heterotroph test แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มเฮเทอโรโทรฟในตะกอนจุลินทรีย์ไม่สามารถย่อยสลายฮอร์โมน EE2 ได้เช่นเดียวกัน จากผลการทดลองทั้งหมดดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าฮอร์โมน EE2 ถูกย่อยสลายได้โดย AOB ผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วม โดยการทดลองดังกล่าวทำการควบคุม pH ให้อยู่ในช่วง 7.5-8 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ไม่เกิด EE2 nitration ที่เกิดจากไนโตรทออกซิไดซ์ EE2 ให้อยู่ในรูป ไนโตร-EE2 ที่ pH อยู่ในช่วงต่ำกว่า 7 (Gaulke และคณะ, 2008)

สำหรับผลการย่อยสลายสาร EE2 ด้วยตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ที่มีกลุ่มประชากร AOB กลุ่ม ammonia substrate affinity สูง (รูปที่ 4.9) พบว่าแนวโน้มในลักษณะเดียวกันกับผลการย่อยสลายด้วยตะกอน

จากถังที่รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยครั้งนี้ใส่ ATU ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AMO ได้ค่อนข้างสมบูรณ์ โดยทำให้เกิดการออกซิไดซ์แอมโมเนียเพียงเล็กน้อยเท่านั้นซึ่งแตกต่างจากการย่อยสลาย MT จากผลการทดลองดังกล่าว จึงเป็นการยืนยันว่าการย่อยสลายสารฮอร์โมน EE2 สามารถถูกย่อยสลายได้โดย AOB ผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมได้

ผลการทดลองการย่อยสลาย EE2 โดยถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ถึงสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Shi และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาการย่อยสลาย EE2 โดยจุลินทรีย์ *Nitrosomonas europaea* (NCIMB 11850) ซึ่งเป็น AOB สายพันธุ์บริสุทธิ์ พบว่าสามารถย่อยสลาย EE2 ผ่านการออกซิไดซ์แอมโมเนียด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมได้ ขณะที่งานวิจัยของ Gaulke และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาการย่อยสลาย EE2 ด้วยจุลินทรีย์ AOB *N. europaea* สายพันธุ์บริสุทธิ์โดยควบคุม pH แตกต่างกัน พบว่าชุดการทดลองที่มีค่า pH ต่ำ (น้อยกว่า 7) การย่อยสลาย EE2 จะสูงกว่า แต่การย่อยสลายนี้อาจไม่ได้เกิดจากกระบวนการทางชีวภาพโดย AOB แต่เกิดจากกระบวนการทางกายภาพและเคมีซึ่งเรียกว่า EE2 Nitration ที่เกิดจากไนโตรตออกซิไดซ์ EE2 ให้กลายเป็นไนโตร-EE2 ในช่วง pH ต่ำนั่นเอง นอกจากนี้จากงานวิจัยของ Khunjar, W. O และคณะ (2011) ได้ศึกษาการย่อยสลาย EE2 โดย AOB โดยกล่าวว่า AOB สามารถย่อยสลาย EE2 ได้โดยเปลี่ยนรูป EE2 ให้เป็นเมตาบอลิไทน์ในรูปแบบอื่น นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Panida (2006) ได้ศึกษาการย่อยสลาย EE2 ด้วยจุลินทรีย์ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสีย พบว่าสามารถย่อยสลาย EE2 ได้เช่นเดียวกัน แต่งานวิจัยดังกล่าวไม่ได้ควบคุม pH ทำให้มีความเป็นไปได้ว่า EE2 ที่ถูกย่อยสลายอาจเกิดจากกระบวนการ Abiotic Nitration ไม่ได้เกิดจากการการย่อยสลายด้วยกระบวนการทางชีวภาพ



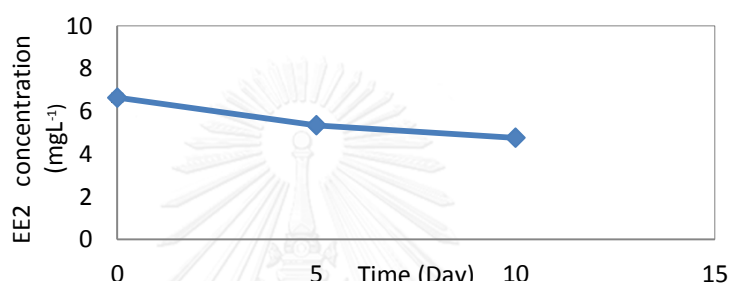
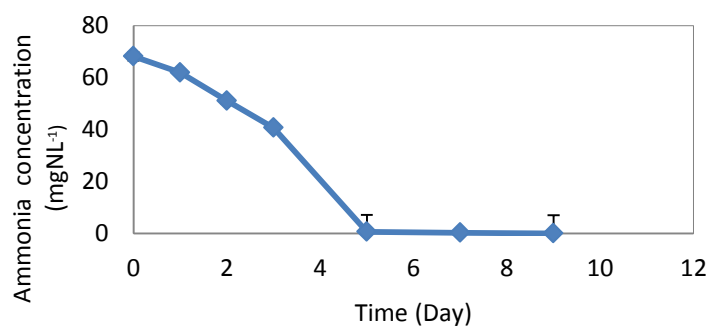
Y error bar คำนวณจากค่ามากที่สุดและน้อยสุดลบด้วยค่าเฉลี่ยจากการวัด 2 ซ้ำ

รูปที่ 4.8 ผลการย่อยสลาย EE2 ในชุดการทดลองการย่อยสลายทั่วไป (Degradation test) โดยตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

ตารางที่ 4.6 ผลการย่อยสลาย EE2 ระหว่างวันเริ่มต้นและวันสิ้นสุดของทุกชุดการทดลองโดยตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

การทดลอง	pH	ความเข้มข้นแอมโมเนีย (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)		ความเข้มข้น EE2 (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
		วันที่ 0 (วันเริ่มต้น)	วันที่ 10 (วันสิ้นสุด)	วันที่ 0 (วันเริ่มต้น)	วันที่ 10 (วันสิ้นสุด)
Degradation test	7.90 ±0.01	96.83±3.84	0.51±0.35	7.86±0.79	5.69±0.10
AOB inhibition test	8.08 ±0.05	82.68±0.05	62.30±0.73*	5.51	4.83*
Abiotic test	8.08 ±0.03	69.17±2.66	63.63±0.41*	6.25	5.84**
Heterotroph test	8.20 ±0.06	-	-	4.83	4.70**

DO = 2.1-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร *NH₃ และ EE2 เก็บตัวอย่างวันที่ 13 **EE2 เก็บตัวอย่างวันที่ 30



Y error bar คำนวณจากค่ามากที่สุดและน้อยสุดลบด้วยค่าเฉลี่ยจากการวัด 2 ซ้ำ

รูปที่ 4.9 ผลการย่อยสลาย EE2 ในชุดการทดลองการย่อยสลายทั่วไป (Degradation test) โดยตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

ตารางที่ 4.7 ผลการย่อยสลาย EE2 ระหว่างวันเริ่มต้นและวันสิ้นสุดของทุกชุดการทดลองโดยตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

ผลการทดลอง	pH	ความเข้มข้น แอมโมเนีย (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)		ความเข้มข้น EE2 (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
		วันที่ 0 (วันเริ่มต้น)	วันที่ 9 (วันสิ้นสุด)	วันที่ 0 (วันเริ่มต้น)	วันที่ 9 * (วันสิ้นสุด)
Degradation test	7.97±0.14	68.11±1.60	<LOD	6.64±0.18	4.76±0.08
AOB inhibition test	8.10±0.09	70.04±0.32	58.90±3.66*	4.94	5.26*
Abiotic test	8.19±0.03	65.00±0.32	63.71±0.32*	4.78	4.96**
Heterotroph test	8.15±0.06	-	-	5.17	5.28**

DO = 2.1-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร *NH₃ และ EE2 เก็บตัวอย่างวันที่ 10 **EE2 เก็บตัวอย่างวันที่ 25

ตารางที่ 4.8 อัตราการย่อยสลายสาร EE2 โดยตะกอนจุลินทรีย์ในแต่ละถังปฏิกรณ์

ชุดการทดลอง	Degradation test (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรต่อวัน)
ถังปฏิกรณ์รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร	0.2172
ถังปฏิกรณ์รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร	0.1881

คำนวณอัตราการย่อยสลายจาก initial rate (zero order reaction)

ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบอัตราการย่อยสลาย EE2 ในชุด Degradation test ระหว่างถังปฏิกรณ์ 2 ถังชี้ให้เห็นว่าอัตราการย่อยสลายฮอร์โมน EE2 โดยตะกอนจากถังปฏิกรณ์ที่มีค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรที่มีกลุ่มประชากร AOB กลุ่ม ammonia substrate affinity ต่ำ มีค่ามากกว่าตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่มีค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรที่มีกลุ่มประชากร AOB กลุ่ม ammonia substrate affinity สูงเล็กน้อย ทั้งนี้ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Angkana (2013) ที่พบว่าอัตราการย่อยสลายฮอร์โมน EE2 ในตะกอนจุลินทรีย์ที่มี *Nitrosomonas europaea* cluster เป็นกลุ่มประชากรเด่นจะสูงกว่าตะกอนจุลินทรีย์ที่มี *Nitrosomonas oligotropha* cluster เป็นกลุ่มประชากรเด่น แต่ทั้งนี้งานวิจัยดังกล่าวไม่ได้ทำการศึกษาจลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนีย

4.3.3.การยืนยันการย่อยสลายสาร EE2 ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมโดยกลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงในตะกอนจุลินทรีย์

การทดลองนี้เป็นการยืนยันผลของกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วม เพื่อยืนยันว่าแอมโมเนียเป็นปัจจัยสำคัญของกระบวนการดังกล่าวหรือไม่ โดยเติมแอมโมเนียความเข้มข้นเดียวกับตอนแรกลงในระบบหลังจากแอมโมเนียถูกใช้หมดแล้วดูการสลายตัวของ EE2 อีกครั้ง สำหรับการเติมแอมโมเนียในการทดลองนี้มีวิธีการ 2 แบบคือ

1) แบบใส่แอมโมเนียต่อเนื่องทันทีหลังจากแอมโมเนียครั้งแรกหมด โดยใส่แอมโมเนียความเข้มข้นเดียวกับตอนแรกลงในระบบแล้วดูการสลายตัวของ EE2 เพื่อศึกษาว่าแอมโมเนียมีผลต่อการย่อยสลาย EE2 หรือไม่

2) แบบใส่แอมโมเนียไม่ต่อเนื่องโดยทิ้งช่วงเวลาประมาณ 4-5 วันหลังจากแอมโมเนียครั้งแรกหมดลง แล้วจึงเติมแอมโมเนียความเข้มข้นเดียวกับตอนแรกแล้วดูการสลายตัวของ EE2 เพื่อศึกษาว่าหากไม่มีแอมโมเนียในระบบแล้วจะมีผลต่อการย่อยสลาย EE2 หรือไม่

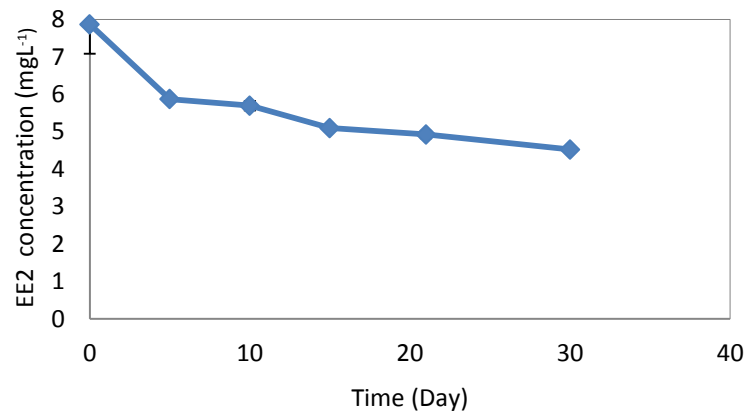
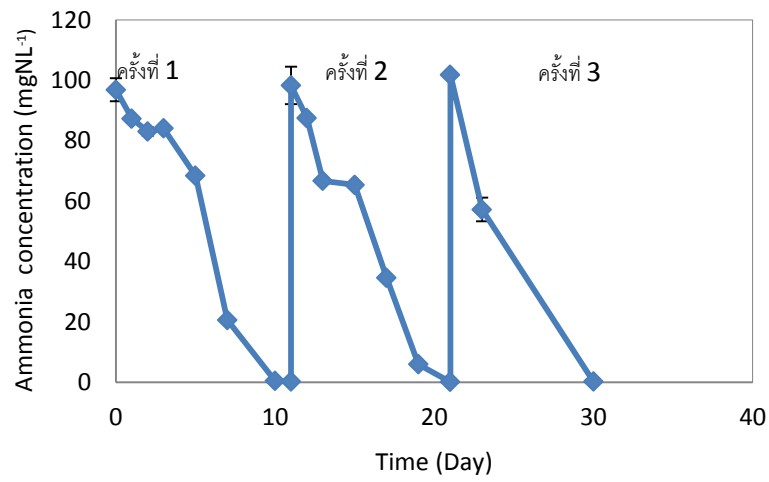
4.3.3.1.การยืนยันการย่อยสลายสาร EE2 โดยการใส่แอมโมเนียต่อเนื่องทันทีหลังจากแอมโมเนียหมด

จากผลการย่อยสลายสาร EE2 ด้วย AOB ในตะกอนจากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (รูปที่ 4.10) พบว่าผลการทดลองชุด Degradation test ซึ่งเป็นชุดการย่อยสลายทั่วไปมีการออกซิไดซ์แอมโมเนียลดลงอย่างต่อเนื่องและหมดลงภายในเวลา 11 วัน (วันที่ 1-11) และพบการย่อยสลาย EE2 เช่นเดียวกันโดยฮอริโมน EE2 ลดลงจากความเข้มข้นเริ่มต้น 7.86 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 5.69 มิลลิกรัมต่อลิตรในช่วง 11 วันดังกล่าว หลังจากนั้นจึงเติมแอมโมเนียลงในระบบให้เท่ากับความเข้มข้นเริ่มต้นตอนแรกอีกครั้งในวันเดียวกัน พบว่าการเติมแอมโมเนียครั้งที่ 2 นี้ทำให้แอมโมเนียหมดลงภายในเวลา 10 วัน (วันที่ 11-21) อีกทั้งความเข้มข้นฮอริโมน EE2 ก็ลดลงเช่นเดียวกันโดยลดลงจากความเข้มข้น 5.69 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 4.92 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นจึงเติมแอมโมเนียเพื่อให้ความเข้มข้นกลับมาเท่ากับความเข้มข้นเริ่มต้นอีกครั้งเป็นครั้งที่ 3 พบว่าแอมโมเนียหมดลงภายในเวลา 10 วัน (วันที่ 21-30) เช่นเดียวกันแต่ความเข้มข้นฮอริโมน EE2 ลดลงเพียงเล็กน้อยจาก 4.95 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็น 4.52

มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการทดลองดังกล่าวทำการควบคุม pH ให้อยู่ในช่วง 7.5-8 ซึ่งเป็นช่วงที่ไม่ทำให้เกิด EE2 Nitration (Gaulke และคณะ, 2008)

สำหรับผลของชุดควบคุมทั้ง 3 ชุด ได้แก่ ชุด Abiotic test ชุด AOB inhibition test และชุดการทดลอง Heterotroph test ทั้ง 3 ชุดการทดลองไม่เกิดการย่อยสลายฮอร์โมน EE2 โดยผลการทดลองชุด Abiotic test และ AOB inhibition test มีแอมโมเนียลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับผลการทดลองชุด Degradation test ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแอมโมเนียในระบบสามารถระเหยได้ ซึ่งเป็นผลจากปัจจัยสนับสนุนต่างๆ เช่น อุณหภูมิ และระยะเวลาในการทดลองที่นานถึง 30 วัน

จากผลการทดลองทั้งหมดที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าแอมโมเนียมีผลต่อการย่อยสลายฮอร์โมน EE2 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yi และคณะ (2006) ที่ได้ศึกษาเอนไซม์ AMO ที่ผลิตได้จาก AOB โดยพบว่าเข้มข้นของแอมโมเนียมีผลทำให้อัตราการสลายของ EE2 สูงขึ้น เช่นเดียวกับกับงานวิจัยของ Angkana (2013) ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นแอมโมเนียต่ออัตราการย่อยสลาย EE2 พบว่าแอมโมเนียมีผลต่อการย่อยสลาย EE2 เช่นเดียวกัน



Y error bar คำนวณจากค่ามากที่สุดและน้อยสุดลบด้วยค่าเฉลี่ยจากการวัด 2 ซ้ำ

รูปที่ 4.10 ผลการการย่นย่นย่อยสลาย EE2 ในชุดการทดลองการย่อยสลายทั่วไป (Degradation test) โดย ตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

ตารางที่ 4.9 ผลการยืนยันย่อยสลาย EE2 ระหว่างวันเริ่มต้นและวันสิ้นสุดของทุกชุดการทดลองโดยตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

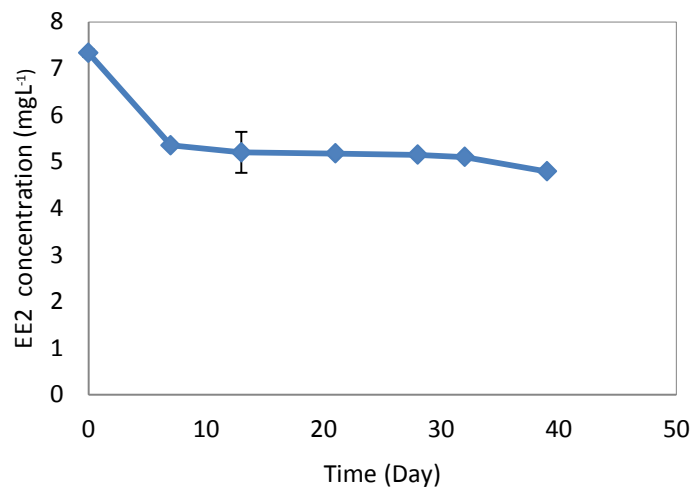
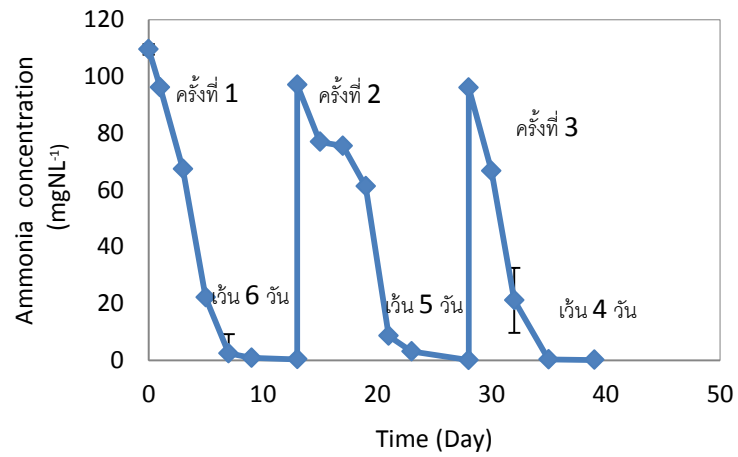
ผลการทดลอง	pH	ความเข้มข้นแอมโมเนีย (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)					ความเข้มข้น EE2 (มิลลิกรัมต่อลิตร)				
		วันที่ 0 (วันเริ่มต้น)	วันที่ 11	วันที่ 21	วันที่ 30 (วันสิ้นสุด)	วันที่ 0 (วันเริ่มต้น)	วันที่ 11 *	วันที่ 21	วันที่ 30 (วันสิ้นสุด)		
Degradation test	7.74±0.21	96.84±3.84	98.26±3.89	101.79±11.08	0.22±0.02	7.86±0.79	5.69±0.13	4.90±0.03	4.52±0.04		
AOB inhibition test	8.08±0.08	82.68±0.05	62.29±0.73	65.32±0.27	40.31±0.00	5.51	4.83	-	5.25		
Abiotic test	8.08±0.03	69.17±2.66	63.62±0.41	50.61±0.78	31.01±0.78	6.25	-	-	5.84		
Heterotroph test	8.08±0.03	-	-	-	-	4.83	-	-	4.70		

DO = 2.1-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร *EE2 วัดวันที่ 10

4.3.3.2.การยืนยันการย่อยสลายสาร EE2 โดยการใส่แอมโมเนียไม่ต่อเนื่องโดยทิ้งช่วงเวลา 4-5 วันหลังจากแอมโมเนียครั้งแรกหมด

จากผลการทดลองการยืนยันการย่อยสลายสาร EE2 โดยตะกอนจากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (รูปที่ 4.11) พบว่าผลการทดลองชุด Degradation test ซึ่งเป็นชุดการย่อยสลายทั่วไปมีการออกซีไดซ์แอมโมเนียลดลงอย่างต่อเนื่องและหมดลงภายในเวลา 7 วัน (วันที่ 1-7) และพบการย่อยสลาย EE2 เช่นเดียวกัน โดยฮอโรโมน EE2 ลดลงจากความเข้มข้นเริ่มต้น 7.33 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 5.35 มิลลิกรัมต่อลิตรในช่วง 7 วันดังกล่าว หลังจากแอมโมเนียหมดลงแล้วได้ทิ้งระยะเวลา 6 วันจน (วันที่ 7-13) ซึ่งพบการย่อยสลาย EE2 เพียงเล็กน้อยจาก 5.35 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 5.20 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นจึงเติมแอมโมเนียลงในระบบให้ความเข้มข้นเท่ากับ ความเข้มข้นเริ่มต้นซึ่งพบว่าการเติมแอมโมเนียครั้งที่ 2 นี้ทำให้แอมโมเนียหมดภายในเวลา 10 วัน (วันที่ 13-23) แต่ความเข้มข้นฮอโรโมน EE2 ลดลงเพียงเล็กน้อยโดยลดลงจากความเข้มข้น 5.20 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 5.18 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากแอมโมเนียหมดลงแล้วได้ทิ้งระยะเวลา 5 วัน (วันที่ 23-28) พบการย่อยสลาย EE2 เพียงเล็กน้อยจาก 5.18 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 5.15 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นจึงเติมแอมโมเนียลงในระบบให้ความเข้มข้นเท่ากับ ความเข้มข้นเริ่มต้นเป็นครั้งที่ 3 พบว่าแอมโมเนียหมดลงภายในเวลา 7 วัน (วันที่ 28-35) ขณะที่ความเข้มข้นฮอโรโมน EE2 ลดลงเพียงเล็กน้อยจาก 5.15 มิลลิกรัมต่อลิตรจนเหลือความเข้มข้น 5.10 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากแอมโมเนียหมดลงแล้วได้ทิ้งระยะเวลา 4 วัน (วันที่ 35-39) พบการย่อยสลาย EE2 เพียงเล็กน้อยจาก 5.10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 4.94 มิลลิกรัมต่อลิตร

สำหรับผลชุดควบคุมการทดลองในการทดลองนี้จะมีชุดควบคุมการทดลองแค่ชุดเดียวคือชุดการทดลอง AOB inhibition test ซึ่งไม่เกิดการย่อยสลายฮอโรโมน EE2 โดยมีแอมโมเนียลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับผลการทดลองชุด Degradation test ทั้งนี้เนื่องจากผลการทดลองที่ 4.3.2 พบว่าชุด Heterotroph test และ Abiotic test ให้ผลที่มีแนวโน้มเดียวกันกับชุด AOB inhibition test จึงไม่มีความจำเป็นต้องทำการทดลองอีก



Y error bar คำนวณจากค่ามากที่สุดและน้อยสุดลบด้วยค่าเฉลี่ยจากการวัด 2 ซ้ำ

รูปที่ 4.11 ผลการยืนยันความสำคัญของแอมโมเนียต่อการย่อยสลาย EE2 ในชุดการทดลองการย่อยสลายทั่วไป (Degradation test) โดยจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

ตารางที่ 4.10 ผลยืนยันความสำคัญของแอมโมเนียต่อการย่อยสลาย EE2 ระหว่างวันเริ่มต้นและวันสิ้นสุดของทุกชุดการทดลองโดยตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

ผลการทดลอง	pH	ความเข้มข้นแอมโมเนีย (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)				ความเข้มข้น EE2 (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
		วันที่ 0 (วันเริ่มต้น)	วันที่ 13	วันที่ 28	วันที่ 39 (วันสิ้นสุด)	วันที่ 0 (วันเริ่มต้น)	วันที่ 13	วันที่ 28	วันที่ 39 (วันสิ้นสุด)
Degradation test	7.80±0.12	109.62±1.86	97.11±0.18	96.10±0.57	0.08±0.07	7.33±0.12	5.20±0.06	5.15±0.32	4.94±0.00
AOB inhibition test	8.06±0.15	118.23±3.55	117.70±0.89	96.75±0.89*	72.96±0.00	4.80	6.20	-	5.07

DO = 2.1-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร *เก็บตัวอย่างวันที่ 30

ตารางที่ 4.11 อัตราการย่อยสลาย EE2 จากการใส่แอมโมเนียในแต่ละครั้งในชุด (Degradation test) จากถังปฏิกรณ์รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

ชุดการทดลอง	ครั้งที่ 1 (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรต่อวัน)	ครั้งที่ 2 (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรต่อวัน)	ครั้งที่ 3 (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรต่อวัน)
ใส่แอมโมเนียแบบต่อเนื่อง	0.2172	0.0686	0.0387
ใส่แอมโมเนียแบบไม่ต่อเนื่อง	0.1974	0.0034	0.0042

คำนวณอัตราการย่อยสลายจาก initial rate (zero order reaction)

จากตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบอัตราการย่อยสลาย EE2 แบบใส่แอมโมเนียต่อเนื่องและแบบใส่ไม่ต่อเนื่อง พบอัตราการย่อยสลายแบบใส่แอมโมเนียต่อเนื่องในช่วงการใส่แอมโมเนียครั้งแรกเท่ากับ 0.2172 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และเมื่อเติมแอมโมเนียครั้งที่ 2 มีอัตราการย่อยสลายลดลงเหลือเพียง 0.0686 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และลดลงอีกในช่วงการเติมแอมโมเนียครั้งที่ 3 เหลือเพียง 0.0387 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเติมแอมโมเนียครั้งที่ 2 และ 3 มีอัตราการย่อยสลาย EE2 น้อยกว่าการเติมแอมโมเนียครั้งแรก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการเติมแอมโมเนียในครั้งต่อไปใส่เฉพาะแอมโมเนียเพียงอย่างเดียวแต่ไม่ได้ใส่ธาตุอาหารอื่นๆที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตลงไปด้วย จึงมีความเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์ในระบบอาจจะต้องปรับตัวเนื่องจากขาดธาตุอาหารดังกล่าวบางชนิด อีกประการหนึ่งความเข้มข้นของ EE2 ก็มีผลต่อการย่อยสลายตัว EE2 เอง ดังเช่นผลการทดลองที่จะกล่าวในการทดลองที่ 4

ส่วนอัตราการย่อยสลาย EE2 แบบใส่แอมโมเนียไม่ต่อเนื่อง ให้ผลการทดลองในลักษณะเดียวกันคือจะมีอัตราการย่อยสลายสูงสุดในช่วงการใส่แอมโมเนียครั้งแรกโดยมีอัตราการย่อยสลาย 0.1974 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน แต่เมื่อเติมแอมโมเนียครั้งที่ 2 และ 3 มีอัตราการย่อยสลายลดลงเหลือเพียง 0.0034 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และ 0.0042 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวันตามลำดับซึ่งน้อยกว่าการใส่แอมโมเนียแบบต่อเนื่องมาก จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการใส่แอมโมเนียต่อเนื่องหลังจากแอมโมเนียครั้งแรกหมดลงทันทีให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลาย EE2 มากกว่าการใส่แอมโมเนียแบบไม่ต่อเนื่อง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการเว้นช่วงเวลาที่นานเกินไปเป็นผลทำให้จุลินทรีย์ในระบบบางส่วนได้รับความเสียหายจากการขาดสารอาหาร และเมื่อใส่แอมโมเนียใหม่ลงมาอีกครั้งทำให้ต้องใช้เวลาช่วงหนึ่งในการฟื้นตัว อีกประการหนึ่งอาจเกิดจากปริมาณเอนไซม์ AMO ที่ผลิตขึ้นในช่วงเวลาดังกล่าว โดยการเติมแอมโมเนียแบบต่อเนื่องมีความเป็นไปได้ว่ามีการใช้เอนไซม์ทั้งเก่าและใหม่ที่ผลิตขึ้นจากการเติมแอมโมเนียครั้งแรกและต่อไป ทำให้อัตราการย่อยสลาย EE2 สูงกว่าแบบการเติมแอมโมเนียไม่ต่อเนื่อง ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าในช่วงที่เว้นระยะเวลาก่อนการเติมแอมโมเนียครั้งต่อไปเอนไซม์ AMO ที่เคยมีอยู่ก่อนหน้านี้ได้สลายตัวไปจนหมด ซึ่งการเติมแอมโมเนียครั้งต่อไปจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งต้องสร้างเอนไซม์ขึ้นมาใหม่จึงทำให้อัตราการย่อยสลาย EE2 ในการเติมแอมโมเนียแบบไม่ต่อเนื่องต่ำกว่า แต่ทั้งนี้การอภิปรายเป็นเพียงการคาดการณ์จำเป็นต้องศึกษาในรายละเอียดต่อไป

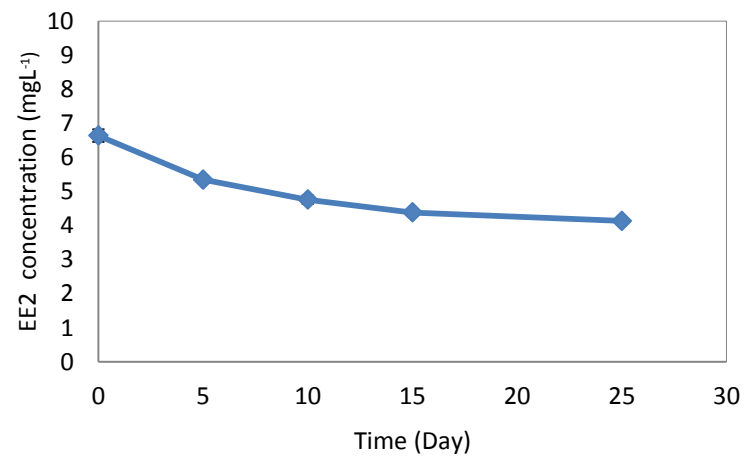
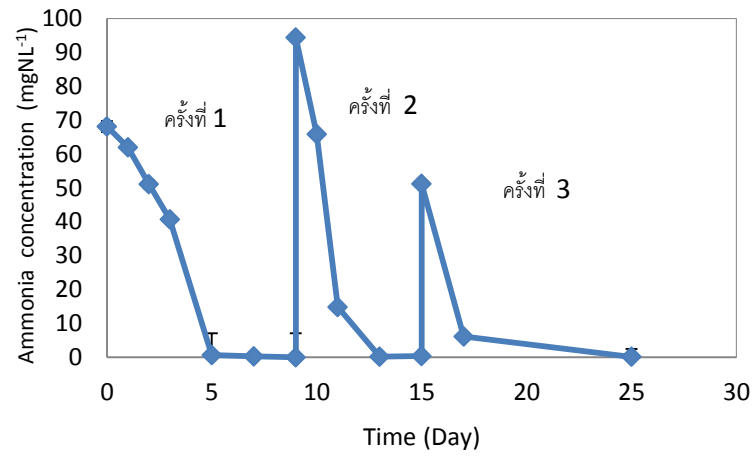
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับการยืนยันการย่อยสลายสาร EE2 โดยตะกอนจากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยการเติมแอมโมเนียแบบไม่ต่อเนื่อง (รูปที่ 4.12) พบว่าผลการทดลองชุด Degradation test ซึ่งเป็นชุดการย่อยสลายทั่วไปมีการออกซิไดซ์แอมโมเนียหมดลงภายในเวลา 5 วัน (วันที่ 1-5) และพบการย่อยสลาย EE2 เช่นเดียวกันโดยฮอริโมน EE2 ลดลงจากความเข้มข้นเริ่มต้น 6.64 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือเพียง 4.76 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากแอมโมเนียหมดลงแล้วได้ทิ้งระยะเวลา 4 วันจน (วันที่ 5-9) จากนั้นจึงเติมแอมโมเนียลงในระบบให้เท่ากับความเข้มข้นเริ่มต้นซึ่งพบว่าการเติมแอมโมเนียครั้งที่ 2 นี้ทำให้แอมโมเนียลดลงและหมดภายในเวลา 4 วัน (วันที่ 9-13) และพบความเข้มข้นฮอริโมน EE2 ลดลงเล็กน้อยจากความเข้มข้น 4.76 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือเพียง 4.38 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากแอมโมเนียหมดลงแล้วได้ทิ้งระยะเวลา 2 วันจน (วันที่ 13-15) จากนั้นจึงเติมแอมโมเนียลงในระบบให้เท่ากับความเข้มข้นเริ่มต้นอีกครั้งเป็นครั้งที่ 3 พบว่าแอมโมเนียหมดลง

ภายในเวลา 10 วัน (วันที่ 15–25) และความเข้มข้นฮอร์โมน EE2 ก็ลดลงจาก 4.38 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็น 4.13 มิลลิกรัมต่อลิตร

สำหรับผลการทดลองชุดควบคุมการทดลองทั้ง 3 ชุด ได้แก่ ชุด Abiotic test ชุดการทดลอง AOB inhibition test และชุดการทดลอง Heterotroph test ทั้ง 3 ชุดการทดลองไม่เกิดการย่อยสลายฮอร์โมน EE2 โดย ผลการทดลองชุด Abiotic test และ AOB inhibition test มีแอมโมเนียลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับผลการทดลองชุด Degradation test ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแอมโมเนียในระบบสามารถระเหยได้ซึ่งเป็นผลจากการสนับสนุนของปัจจัยภายนอกเช่น อุณหภูมิ และระยะเวลาในการทดลองที่นานถึง 25 วัน

จากผลการทดลองดังกล่าวทั้ง 2 ถึงปฏิกรณ์แสดงให้เห็นว่าแอมโมเนียมีผลต่อการย่อยสลายฮอร์โมน EE2 ในกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมของ AOB เห็นได้จากเมื่อเติมแอมโมเนียลงในระบบในครั้งที่ 2 และ 3 พบว่าเกิดอัตราการย่อยสลาย EE2 เช่นเดียวกัน แต่อัตราการย่อยสลายของการเติมแอมโมเนียในครั้งที่ 2 และ 3 จะน้อยกว่าอัตราการย่อยสลายในครั้งแรก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแอมโมเนียไม่ใช่ปัจจัยเดียวต่อการเจริญเติบโตของตะกอนจุลินทรีย์ในระบบ แต่มีสารประกอบบางชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตต่อ AOB ในตะกอนเช่นเดียวกัน อีกประการหนึ่ง อาจจะเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ AMO และผลของความเข้มข้น EE2 ต่อการย่อยสลายตัวมันเองดังจะกล่าวต่อไปในการทดลองที่ 4



CHULALONGKORN UNIVERSITY

Y error bar คำนวณจากค่ามากที่สุดและน้อยสุดลบด้วยค่าเฉลี่ยจากการวัด 2 ซ้ำ

รูปที่ 4.12 ผลการยืนยันความสำคัญของแอมโมเนียต่อการย่อยสลาย EE2 ในชุดการทดลองการย่อยสลายทั่วไป (Degradation test) โดยจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่รับน้ำเสียที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

ตารางที่ 4.12 ผลยืนยันความสำคัญของแอมโมเนียต่อการย่อยสลาย EE2 ระหว่างวันเริ่มต้นและวันสิ้นสุดของทุกชุดการทดลองโดยตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

ผลการทดลอง	pH	ความเข้มข้นแอมโมเนีย (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)				ความเข้มข้น EE2 (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
		วันที่ 0 (วันเริ่มต้น)	วันที่ 9	วันที่ 15	วันที่ 25 (วันสิ้นสุด)	วันที่ 0 (วันเริ่มต้น)	วันที่ 9*	วันที่ 15	วันที่ 25 (วันสิ้นสุด)
Degradation test	7.88±0.19	68.12±1.60	94.32±2.34	51.13±1.01	0.14±0.05	4.76±0.08	4.38±0.05	4.13±0.29	
AOB inhibition test	8.15±0.19	70.04±0.32	58.90±3.66*	52.90±1.14	50.71±0.50	5.26	-	5.54	
Abiotic test	8.16±0.04	65.00±0.32	63.72±0.32*	62.43±0.32	61.15±0.32	-	-	4.96	
Heterotroph test	8.19±0.04	-	-	-	-	-	-	5.28	

DO = 2.1-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

*NH₃ และ EE2 วัดวันที่ 10

4.4 การทดลองที่ 4: ศึกษาผลของความเข้มข้นแอมโมเนียต่อการสลาย 17 α -เอทินิลเอสตราไดออล (EE2) และผลของความเข้มข้นของ 17 α -เอทินิลเอสตราไดออล (EE2) ต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนีย

การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของความเข้มข้นแอมโมเนียต่อการย่อยสลายฮอร์โมน EE2 และผลของความเข้มข้นของฮอร์โมน EE2 ต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนีย โดยจากผลการทดลองที่ 4.3.1 พบว่าการย่อยสลายฮอร์โมน MT เกิดจากการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรปเป็นหลัก ส่วนจุลินทรีย์กลุ่ม AOB ไม่ได้มีบทบาทหรืออาจจะมีบทบาทน้อยมากต่อการย่อยสลายฮอร์โมน MT จึงไม่มีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาจากการทดลองนี้ต่อไป การทดลองนี้ใช้ตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่เลือกมาทั้ง 1 ถึงคือตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เนื่องจากผลการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรมีประสิทธิภาพการบำบัด EE2 ดีกว่าตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรเล็กน้อย เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของฮอร์โมน EE2 ต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนียและผลของความเข้มข้นแอมโมเนียต่อการย่อยสลายฮอร์โมน EE2 ได้กำหนดค่าความเข้มข้นของแอมโมเนีย 2 ค่าคือ 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรและ 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และกำหนดค่าฮอร์โมน EE2 2 ค่า คือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

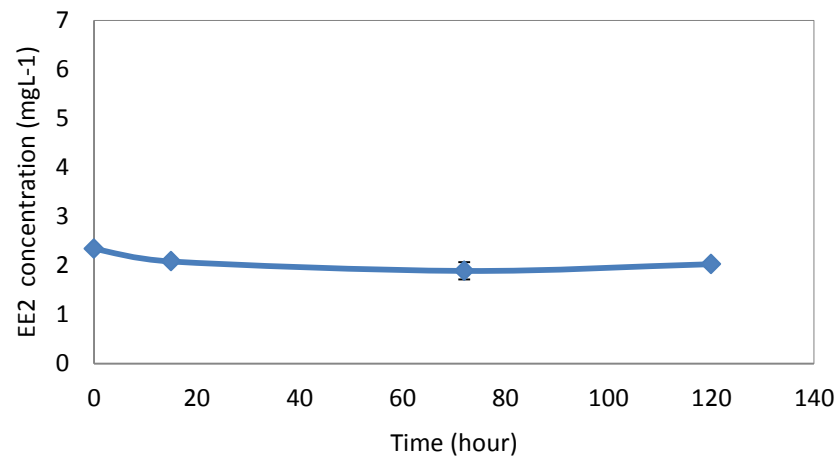
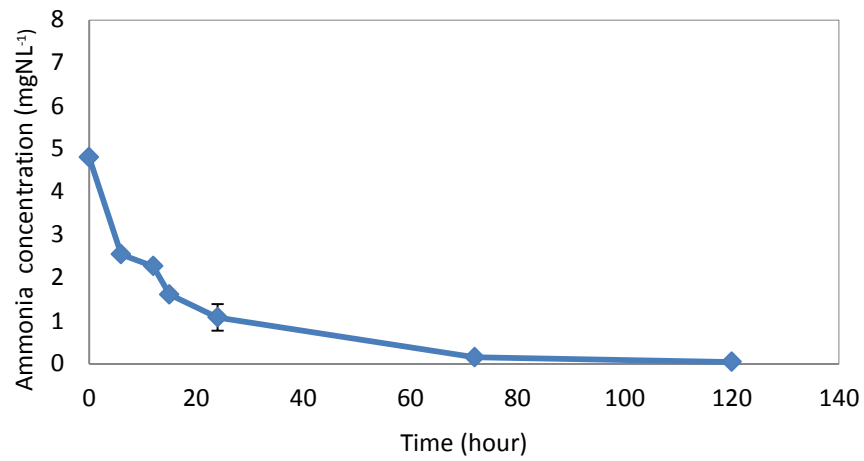
จากผลการทดลองพบว่าชุดที่มีความเข้มข้นแอมโมเนีย 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรและความเข้มข้น EE2 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.13) สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียหมดลงในเวลา 120 ชั่วโมง แต่ EE2 ลดลงจาก 2.34 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็น 2.03 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งถือว่าน้อยมากสำหรับชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นแอมโมเนีย 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรและความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.14) สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียหมดลงในเวลา 120 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน แต่สามารถย่อยสลาย EE2 ลดลงได้มากกว่า (ลดลงจาก 6.56 มิลลิกรัมต่อลิตรเหลือ 5.22 มิลลิกรัมต่อลิตร)

ส่วนชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นแอมโมเนีย 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรและความเข้มข้น EE2 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.15) ตะกอนจุลินทรีย์สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียหมดลงในเวลา 10 วัน และสามารถย่อยสลาย EE2 ลดลงจาก 2.40 มิลลิกรัมต่อลิตรจนถึง 1.87 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่านั้น ส่วนชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นแอมโมเนีย 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรและความ

เข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.16) ตะกอนจุลินทรีย์สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียหมดลงใน 10 วัน เช่นเดียวกัน แต่สามารถย่อยสลาย EE2 ลดลงได้มากกว่า (ลดลงจาก 7.33 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 5.20 มิลลิกรัมต่อลิตร)

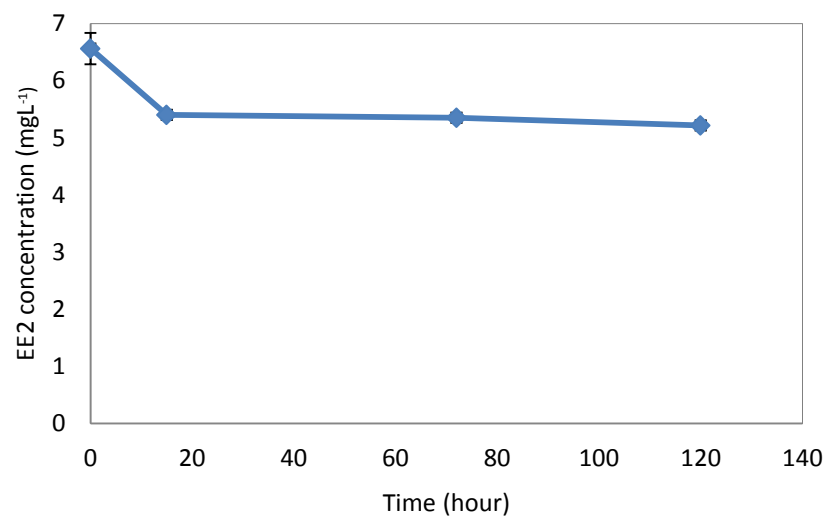
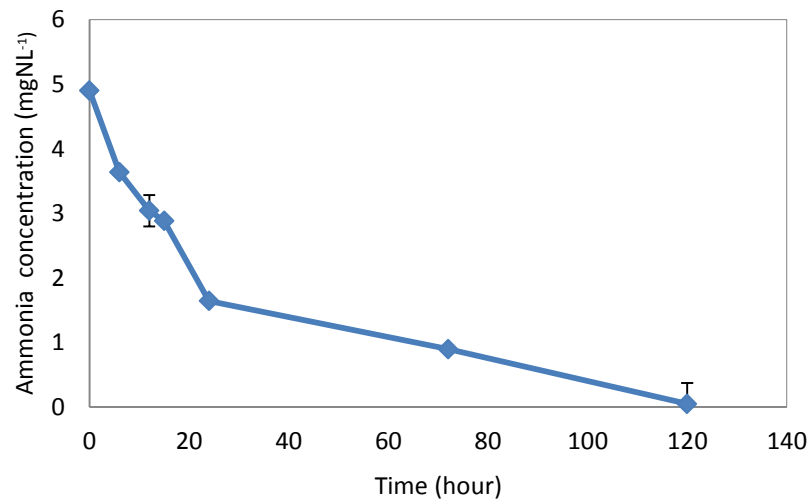
สำหรับการทดลองนี้จะมีชุดควบคุมการทดลองแค่ชุดเพียง 2 ชุดคือชุดที่มีความเข้มข้นแอมโมเนีย 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรและ EE2 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.13) และชุดที่มีความเข้มข้นแอมโมเนีย 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรและ EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.14) โดยจะทำเฉพาะชุดการทดลอง AOB inhibition test มีแนวโน้มเช่นเดียวกันกับชุด AOB inhibition test คือไม่เกิดการออกซิไดซ์แอมโมเนียและการย่อยสลาย EE2 จึงไม่มีความจำเป็นต้องทำการทดลองต่อไป





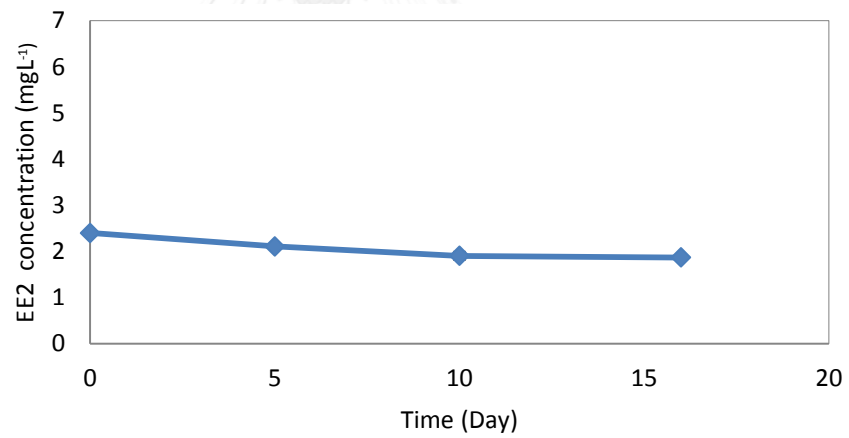
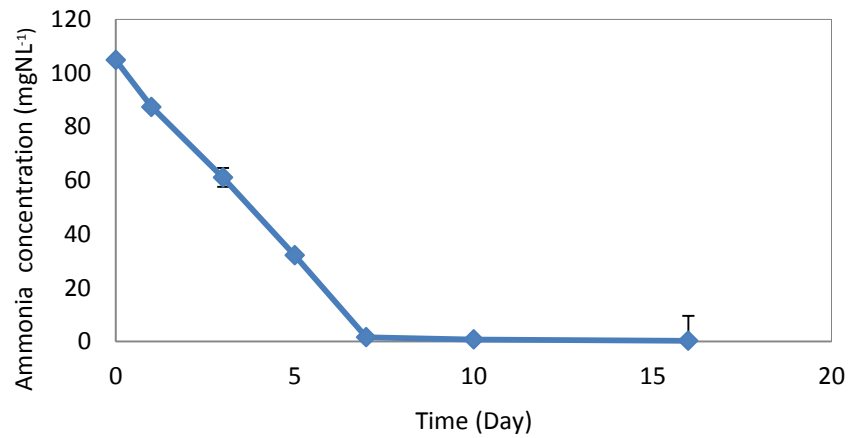
Y error bar คำนวณจากค่ามากที่สุดและน้อยสุดลบด้วยค่าเฉลี่ยจากการวัด 2 ซ้ำ DO = 2.1-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร pH = 8.08 ± 0.12

รูปที่ 4.13 ผลการย่อยสลาย EE2 ที่มีค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และ EE2 2 มิลลิกรัมต่อลิตร



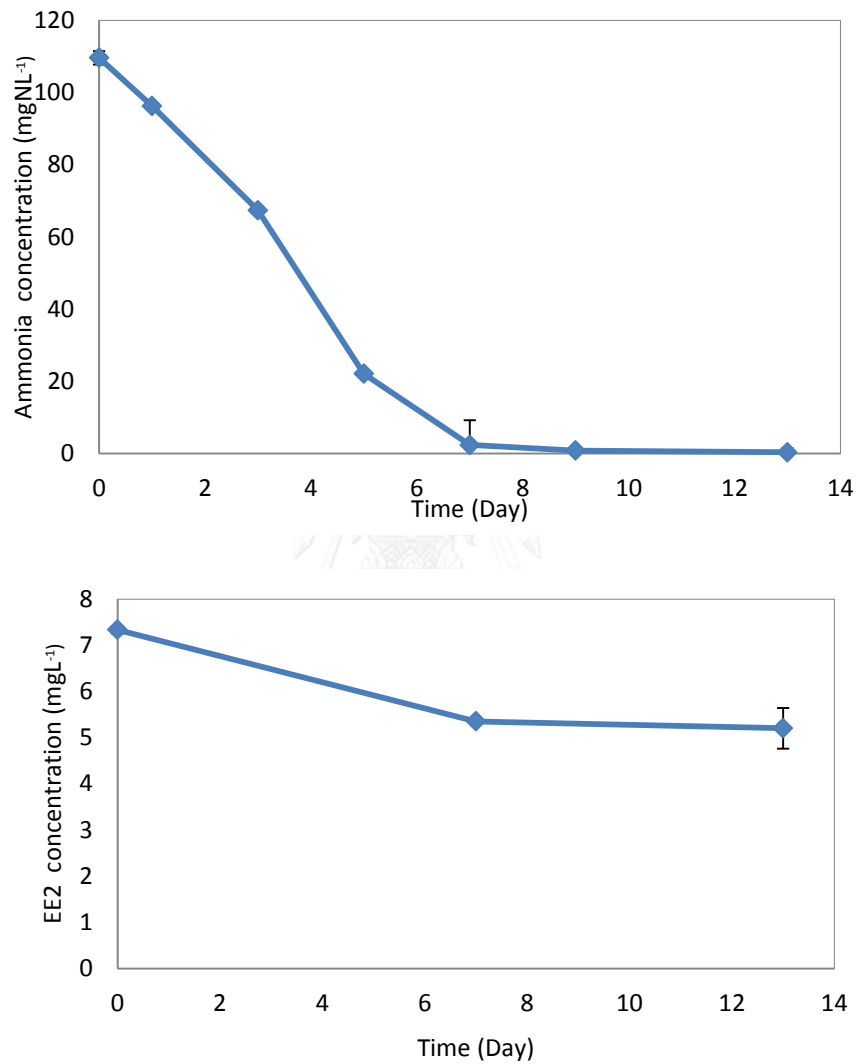
Y error bar คำนวณจากค่ามากที่สุดและน้อยสุดลบด้วยค่าเฉลี่ยจากการวัด 2 ซ้ำ DO = 2.1-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร pH = 8.07 ± 0.11

รูปที่ 4.14 ผลการย่อยสลาย EE2 ที่มีค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และ EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร



Y error bar คำนวณจากค่ามากที่สุดและน้อยสุดลบด้วยค่าเฉลี่ยจากการวัด 2 ซ้ำ DO = 2.1-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร pH = 7.90± 0.07

รูปที่ 4.15 ผลการย่อยสลาย EE2 ที่มีค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และ EE2 2 มิลลิกรัมต่อลิตร



Y error bar คำนวณจากค่ามากที่สุดและน้อยสุดลบด้วยค่าเฉลี่ยจากการวัด 2 ซ้ำ DO = 2.1-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร pH = 8.01± 0.05

รูปที่ 4.16 ผลการย่อยสลาย EE2 ที่มีค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และ EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.13 ชุดควบคุมการทดลองผลการย่อยสลาย EE2 ที่มีค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และ EE2 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชุดควบคุม	ความเข้มข้นแอมโมเนีย (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)				ความเข้มข้น EE2 (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
	ชั่วโมง 0 (เริ่มต้น)	ชั่วโมง 9	ชั่วโมง 15	ชั่วโมง 120 (สิ้นสุด)	ชั่วโมง 0 (เริ่มต้น)	ชั่วโมง 9	ชั่วโมง 15	ชั่วโมง 120 (สิ้นสุด)
AOB inhibition test	5.18±0.02	4.84±0.05	5.46±0.00	4.64±0.16	2.36	2.07	-	2.09

DO = 2.1-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร pH = 8.09± 0.10

ตารางที่ 4.14 ชุดควบคุมการทดลองผลการย่อยสลาย EE2 ที่มีค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และ EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชุดควบคุม	ความเข้มข้นแอมโมเนีย (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)		ความเข้มข้น EE2 (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	วันที่ 0 (เริ่มต้น)	วันที่ 13 (สิ้นสุด)	วันที่ 0 (เริ่มต้น)	วันที่ 13 (สิ้นสุด)
AOB inhibition test	118.23±3.55	82.90±4.08	4.80	6.20

DO = 2.1-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร pH = 8.16± 0.15

ตารางที่ 4.15 เปรียบเทียบอัตราการย่อยสลาย EE2 จากการใส่แอมโมเนียและ EE2 ในแต่ละการทดลอง

ชุดการทดลอง	NH ₃ 5 มก.ไนโตรเจน/ล. EE2 2 มก./ล.	NH ₃ 5 มก.ไนโตรเจน/ล. EE2 5 มก./ล.	NH ₃ 100 มก.ไนโตรเจน/ล. EE2 2 มก./ล.	NH ₃ 100 มก.ไนโตรเจน/ล. EE2 5 มก./ล.
ผลการออกซิไดซ์แอมโมเนีย (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรต่อวัน)	3.45	3.21	14.52	16.06
ผลการย่อยสลาย EE2 (มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน)	0.0264	0.0312	0.0333	0.1674

คำนวณอัตราการย่อยสลายจาก initial rate (zero order reaction)

ตารางที่ 4.10 เปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายในแต่ละชุดการทดลอง พบว่าผลของความเข้มข้นแอมโมเนียน่าจะมีผลทำให้อัตราการย่อยสลาย EE2 สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้น EE2 เดียวกัน กล่าวคือชุดที่มีค่าแอมโมเนียสูง (ความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) มีอัตราการย่อยสลาย EE2 มากกว่าชุดที่มีค่าแอมโมเนียต่ำ (แอมโมเนียเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ดังนั้นหากน้ำเสียปนเปื้อนแอมโมเนียสูงจะทำให้การเมทาบอลิซึมร่วมของ EE2 สูงขึ้นตามไปด้วย สำหรับผลของความเข้มข้น EE2 ต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนีย พบว่าความเข้มข้น EE2 ไม่มีผลต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนียที่ความเข้มข้นแอมโมเนียเดียวกัน กล่าวคือชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มข้น EE2 2 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ใช้ความเข้มข้นแอมโมเนียเดียวกันมีอัตราการออกซิไดซ์แอมโมเนียที่ไม่ต่างกัน อีกประการหนึ่งคือความเข้มข้นของ EE2 ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการย่อยสลาย EE2 เช่นเดียวกัน กล่าวคือชุดการทดลองที่มีความเข้มข้น EE2 สูง (5 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีอัตราการย่อยสลายมากกว่าชุดการทดลองที่มีค่า EE2 ต่ำ (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) จากผลการทดลองดังกล่าวจึงสรุปว่าระดับความเข้มข้นแอมโมเนียมีผลต่อการย่อยสลาย EE2 ขณะที่ความเข้มข้น EE2 ไม่มีผลต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนีย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

สมมติฐานของงานวิจัยนี้คือ 17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน (MT) และ 17 α -เอทินิลเอสตราไดออล (EE2) สามารถถูกย่อยสลายได้โดยแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย (AOB) ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมโดยจุลินทรีย์ของกล่มประชากร แอมโมเนีย และความเข้มข้นของ MT และ EE2 มีผลต่อการย่อยสลาย

จากการเตรียมตะกอนจุลินทรีย์พบว่าค่าจลนพลศาสตร์การออกซิไดซ์แอมโมเนียและกลุ่มประชากรแตกต่างกัน โดยถึงปฏิกรณ์ที่มีค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรมีค่าจลนพลศาสตร์สอดคล้องกับจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงที่มี ammonia substrate affinity สูง และผลจากการทำ PCR-sequencing พบจุลินทรีย์ชนิด *N. oligotropha* cluster ในขณะที่ถึงปฏิกรณ์ที่มีค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรมีค่าจลนพลศาสตร์สอดคล้องกับจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงที่มี ammonia substrate affinity ต่ำ และผลจากการทำ PCR-sequencing พบจุลินทรีย์ชนิด *N. europaea* cluster

การทดลองการศึกษาการย่อยสลายฮอร์โมน 17 α -เมทิลเทสโทสเตอโรน (MT) โดยตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ถัง พบว่ากลุ่มประชากร AOB ทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์ไม่ใช่จุลินทรีย์กลุ่มหลักในการย่อยสลาย MT ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วม โดยจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่มีส่วนในการย่อยสลายคือจุลินทรีย์ในกลุ่มเฮทเทอโรโทรปซึ่งไม่สอดคล้องกับสมมติฐานการทดลองก่อนหน้านี้ ที่กล่าวถึงโครงสร้างของฮอร์โมน MT และ EE2 คล้ายคลึงกันจึงมีความเป็นไปได้ที่จะถูกย่อยสลายโดยแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรียผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมได้เช่นเดียวกันกับ EE2 สำหรับการย่อยสลายฮอร์โมน EE2 ด้วยตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ถัง พบว่าจุลินทรีย์ AOB สามารถย่อยสลาย EE2 ผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมได้และจุลินทรีย์กลุ่มเฮทเทอโรโทรปในตะกอนจุลินทรีย์ไม่ได้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย จึงสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ทั้งนี้ ตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรที่มี

Substrate affinity ต่ำมีประสิทธิภาพย่อยสลาย EE2 ได้ดีกว่าตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรที่มี Substrate affinity สูงเล็กน้อย

การยืนยันการย่อยสลาย EE2 ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วม โดยทำการทดลอง เช่นเดียวกับการศึกษาการย่อยสลายแบบปกติแต่จะเพิ่มการใส่แอมโมเนียอีก 2 ครั้งหลังจากมีการใช้แอมโมเนียจนหมดเพื่อศึกษาว่าแอมโมเนียเป็นปัจจัยสำคัญในการย่อยสลาย EE2 หรือไม่ พบว่าแอมโมเนียมีผลต่อการย่อยสลาย EE2 ในกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมโดยเห็นได้จากเมื่อเติมแอมโมเนียลงในระบบในครั้งที่ 2 และ 3 พบว่ามีการย่อยสลาย EE2 แต่อัตราการย่อยสลายของการเติมแอมโมเนียในครั้งที่ 2 และ 3 จะน้อยกว่าการย่อยสลายในครั้งแรกเสมอ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแอมโมเนียอาจไม่ใช่ปัจจัยเดียวต่อการเจริญเติบโตของตะกอนจุลินทรีย์ในระบบ แต่อาจมีสารประกอบบางชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตต่อ AOB ในตะกอน อีกทั้งยังพบว่าการเติมแอมโมเนียต่อเนื่องหลังจากแอมโมเนียหมดลงทันทีให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายได้ดีกว่าการทิ้งระยะเวลาช่วงหนึ่งหลังจากแอมโมเนียหมดลง

การทดลองการศึกษาผลความเข้มข้นของแอมโมเนียต่อการย่อยสลาย EE2 และผลความเข้มข้น EE2 ต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนีย โดยนำตะกอนจากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรศึกษา ซึ่งกำหนดค่าความเข้มข้นของแอมโมเนีย 2 ค่าคือ 5 และ 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และกำหนดค่าฮอริโมน EE2 2 ค่า คือ 2 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชุดที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียสูงมีแนวโน้มอัตราการย่อยสลาย EE2 มากกว่าชุดที่มีค่าแอมโมเนียต่ำ ในส่วนของผลความเข้มข้น EE2 ต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนียพบว่าความเข้มข้น EE2 ไม่ได้มีอิทธิพลต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนีย แต่ความเข้มข้นของ EE2 ก็มีผลต่อการย่อยสลายตัวมันเองเช่นเดียวกัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1. จากผลการทดลองการย่อยสลาย MT โดยตะกอนจุลินทรีย์ในการทดลองได้ข้อสรุปคือ จุลินทรีย์ในกลุ่มเฮเทอโรโทรปน่าจะเป็นจุลินทรีย์กลุ่มเด่นในการย่อยสลาย MT แต่ไม่ได้ยืนยันว่า จุลินทรีย์ในกลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งมีส่วนร่วมหรือไม่ จึงควรทำการทดลองโดยใช้จุลินทรีย์ในกลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งสายพันธุ์บริสุทธิ์เพื่อยืนยันอีกครั้ง และเนื่องจากฮอโรโมน MT น่าจะสามารถถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรป จึงไม่มีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนา AOB ในการย่อยสลายฮอโรโมน MT

5.2.2. เนื่องจากฮอโรโมน EE2 ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ทั่วไปในระบบบำบัดน้ำเสียแต่ EE2 สามารถถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ AOB ผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึมร่วมจึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาจุลินทรีย์กลุ่มนี้โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการบำบัดสูงสุด

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

การปศุสัตว์. สืบค้นจากปศุสัตว์. [ออนไลน์]. 2559. แหล่งที่มา : <http://www.livestockandenvironment.info/tag/%E0%B8%AA%E0%B8%B4%E0%B8%99%E0%B8%84%E0%B9%89%E0%B8%B2%E0%B8%9B%E0%B8%A8%E0%B8%B8%E0%B8%AA%E0%B8%B1%E0%B8%95%E0%B8%A7%E0%B9%8C>. [4 มิถุนายน 2557]

กัตตินานู สกกุลสวัสดิพันธ์. การย่อยสลาย แอลฟา - เมิลเทสโทสเตอโรนด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2555

ภัทรพร คุณาพงษ์กิติ. จลนพลศาสตร์และผลของแอมโมเนียต่อจำนวนยีน *amoA* ของแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงอาร์เคียและแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2553

ภาคภูมิ. จำหน่าย ฮอร์โมนปลาหมัน แปลงเพศปลานิล [ออนไลน์]. 2559. แหล่งที่มา : <http://www.thaipbd.com/board/read.php?5,207> [9 มิถุนายน 2553]

เพชรพรรณ สมศรี, สหวิชาการดอทคอม. ยาเม็ดคุมกำเนิด. [ออนไลน์]. 2559. แหล่งที่มา: <http://www.sahavicha.com/?name=knowledge&file=readknowledge&id=2915> [20 กรกฎาคม พ.ศ.2553]

เมนเจอร์ ออนไลน์. อย.เตือนปรึกษาแพทย์ก่อนใช้ยาคุมฯ ชี้เสี่ยงล้มเลือดอุดตัน. [ออนไลน์]. 2559. แหล่งที่มา : <http://www.manager.co.th/QOL/ViewNews.aspx?NewsID=956000017586> [11 กุมภาพันธ์ 2556]

ภาษาอังกฤษ

Arp, D. J. and L. Y. Stein (2003). "Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria." Crit Rev Biochem Mol Biol 38(6): 471-495.

Angkana Jantanprasartporn. 17 α -ethinylestradiol degradation by different population of ammonia-oxidizing microorganisms. Degree of Master of Science

Program in Environmental Management (Interdisciplinary Program) Graduate School Chulalongkorn University. 2013

Belfroid, A., A. Van der Horst, A. Vethaak, A. Schäfer, G. Rijs, J. Wegener, and W. Cofino (1999). "Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands." Science of the Total Environment 225(1): 101-108.

Benotti, M. J. and B. J. Brownawell (2009). "Microbial degradation of pharmaceuticals in estuarine and coastal seawater." Environ Pollut 157(3): 994-1002.

Bollmann, A., M.-J. Bär-Gilissen, and H. J. Laanbroek (2002). "Growth at low ammonium concentrations and starvation response as potential factors involved in niche differentiation among ammonia-oxidizing bacteria." Appl Environ Microbiol 68(10): 4751-4757.

Bower, C. E. and T. Holm-Hansen (1980). "A salicylate-hypochlorite method for determining ammonia in seawater." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 37(5): 794-798.

De Gusseme, B., B. Pycke, T. Hennebel, A. Marcoen, S. E. Vlaeminck, H. Noppe, N. Boon, and W. Verstraete (2009). "Biological removal of 17 α -ethinylestradiol by a nitrifier enrichment culture in a membrane bioreactor." Water Res 43(9): 2493-2503.

Federation, W. E. and A. P. H. Association (2005). "Standard methods for the examination of water and wastewater." American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA.

Fitzpatrick, M., W. Contreras-Sánchez, R. Milston, R. Hornick, G. Feist, C. Schreck, K. McElwee, D. Burke, M. Niles, and H. Egn (1999). "Detection of MT in aquarium water after treatment with MT food." Sixteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon: 81-84.

Francis, C. A., K. J. Roberts, J. M. Beman, A. E. Santoro, and B. B. Oakley (2005). "Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and

- sediments of the ocean." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(41): 14683-14688.
- Gaulke, L. S., S. E. Strand, T. F. Kalthorn, and H. D. Stensel (2008). "17 α -ethinylestradiol Transformation via Abiotic Nitration in the Presence of Ammonia Oxidizing Bacteria." Environmental Science & Technology 42(20): 7622-7627.
- Haiyan, R., J. Shulan, N. ud din Ahmad, W. Dao, and C. Chengwu (2007). "Degradation characteristics and metabolic pathway of 17 α -ethinylestradiol by *Sphingobacterium* sp. JCR5." Chemosphere 66(2): 340-346.
- Hanselman, T. A., D. A. Graetz, and A. C. Wilkie (2003). "Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: a review." Environmental Science & Technology 37(24): 5471-5478.
- Homklin, S., S. K. Ong, and T. Limpiyakorn (2011). "Biotransformation of 17 α -methyltestosterone in sediment under different electron acceptor conditions." Chemosphere 82(10): 1401-1407.
- Homklin, S., S. K. Ong, and T. Limpiyakorn (2012). "Degradation of 17 α -methyltestosterone by *Rhodococcus* sp. and *Nocardioides* sp. isolated from a masculinizing pond of Nile tilapia fry." J Hazard Mater 221: 35-44.
- Johnson, A. C. and R. J. Williams (2004). "A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethinylestradiol at sewage treatment works." Environ Sci Technol 38(13): 3649-3658.
- Jung, M.-Y., S.-J. Park, D. Min, J.-S. Kim, W. I. C. Rijpstra, J. S. S. Damsté, G.-J. Kim, E. L. Madsen, and S.-K. Rhee (2011). "Enrichment and characterization of an autotrophic ammonia-oxidizing archaeon of mesophilic crenarchaeal group I. 1a from an agricultural soil." Appl Environ Microbiol 77(24): 8635-8647.
- Kang, I. J., H. Yokota, Y. Oshima, Y. Tsuruda, Y. Shimasaki, and T. Honjo (2008). "The effects of methyltestosterone on the sexual development and reproduction of adult medaka (*Oryzias latipes*)." Aquat Toxicol 87(1): 37-46.

- Kayee, P., P. Sonthiphand, C. Rongsayamanont, and T. Limpiyakorn (2011). "Archaeal amoA genes outnumber bacterial amoA genes in municipal wastewater treatment plants in Bangkok." Microb Ecol 62(4): 776-788.
- Keener, W. K. and D. J. Arp (1993). "Kinetic studies of ammonia monooxygenase inhibition in *Nitrosomonas europaea* by hydrocarbons and halogenated hydrocarbons in an optimized whole-cell assay." Appl Environ Microbiol 59(8): 2501-2510.
- Khunjar, W. O. and N. G. Love (2011). "Sorption of carbamazepine, 17 α -ethinylestradiol, iopromide and trimethoprim to biomass involves interactions with exocellular polymeric substances." Chemosphere 82(6): 917-922.
- Könneke, M., A. E. Bernhard, R. José, C. B. Walker, J. B. Waterbury, and D. A. Stahl (2005). "Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon." Nature 437(7058): 543-546.
- Koops, H. P., Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Timmermann, G. and Wagner, M. (2003). *The Lithoautotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria. The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community* M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt. New York, Springer-Verlag.
- Kowalchuk, G. A. and J. R. Stephen (2001). "Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology." Annual Reviews in Microbiology 55(1): 485-529.
- Kuch, H. M. and K. Ballschmiter (2001). "Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range." Environmental Science & Technology 35(15): 3201-3206.
- Laanbroek, H. J., P. L. Bodelier, and S. Gerards (1994). "Oxygen consumption kinetics of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter hamburgensis* grown in mixed continuous cultures at different oxygen concentrations." Archives of microbiology 161(2): 156-162.

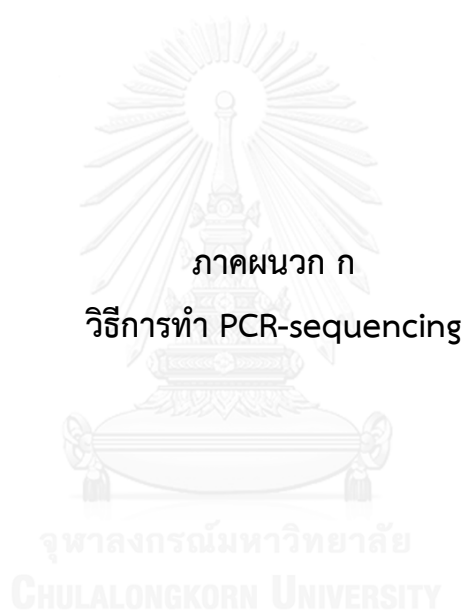
- Lai, K., K. Johnson, M. Scrimshaw, and J. Lester (2000). "Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems." Environmental Science & Technology 34(18): 3890-3894.
- Limpiyakorn, T., S. Homklin, and S. K. Ong (2011). "Fate of estrogens and estrogenic potentials in sewerage systems." Critical Reviews in Environmental Science and Technology 41(13): 1231-1270.
- Martens-Habbena, W., P. M. Berube, H. Urakawa, R. José, and D. A. Stahl (2009). "Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria." Nature 461(7266): 976-979.
- Martens-Habbena, W., W. Qin, R. E. Horak, H. Urakawa, A. J. Schauer, J. W. Moffett, E. V. Armbrust, A. E. Ingalls, A. H. Devol, and D. A. Stahl (2015). "The production of nitric oxide by marine ammonia-oxidizing archaea and inhibition of archaeal ammonia oxidation by a nitric oxide scavenger." Environ Microbiol 17(7): 2261-2274.
- Panida Sermwaraphan. DEGRADATION OF 17 α -ETHYNYLESTRADIOL (EE2) BY NITRIFYING ACTIVATED SLUDGE CONTAINING DIFFERENT AMMONIA-OXIDIZING BACTERIAL COMMUNITIES Degree of Master of Science Program in Environmental Management (Interdisciplinary Program) Graduate School Chulalongkorn University. 2013
- Purdom, C., P. Hardiman, V. Bye, N. Eno, C. Tyler, and J. Sumpter (1994). "Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works." Chemistry and Ecology 8(4): 275-285.
- Regal, P., C. Nebot, B. Vázquez, A. Cepeda, and C. Fente (2010). "Determination of the hormonal growth promoter 17 α -methyltestosterone in food-producing animals: Bovine hair analysis by HPLC-MS/MS." Meat science 84(1): 196-201.
- Ren, Y.-X., K. Nakano, M. Nomura, N. Chiba, and O. Nishimura (2007). "Effects of bacterial activity on estrogen removal in nitrifying activated sludge." Water Res 41(14): 3089-3096.
- Roberts, J. and D. Essenhig (1986). "Adenocarcinoma of prostate in 40-year-old body-builder." The Lancet 328(8509): 742.

- Rongsayamanont, C., T. Limpiyakorn, B. Law, and E. Khan (2010). "Relationship between respirometric activity and community of entrapped nitrifying bacteria: implications for partial nitrification." Enzyme and Microbial Technology 46(3): 229-236.
- Rotthauwe, J.-H., K.-P. Witzel, and W. Liesack (1997). "The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations." Appl Environ Microbiol 63(12): 4704-4712.
- Schulte-Oehlmann, U., M. Oetken, J. Bachmann, and J. Oehlmann (2004). Effects of ethinylestradiol and methyltestosterone in prosobranch snails. Pharmaceuticals in the Environment, Springer: 233-247.
- Sharpe, R. M. and N. E. Skakkebaek (1993). "Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?" The Lancet 341(8857): 1392-1396.
- Shen, T., M. Stieglmeier, J. Dai, T. Urich, and C. Schleper (2013). "Responses of the terrestrial ammonia-oxidizing archaeon *Ca. Nitrososphaera viennensis* and the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosospira multiformis* to nitrification inhibitors." FEMS Microbiol Lett 344(2): 121-129.
- Shi, J., S. Fujisawa, S. Nakai, and M. Hosomi (2004). "Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*." Water Res 38(9): 2322-2329.
- Shi, J., Y. Suzuki, B.-D. Lee, S. Nakai, and M. Hosomi (2002). "Isolation and characterization of the ethinylestradiol-biodegrading microorganism *Fusarium proliferatum* strain HNS-1." Water Science and Technology 45(12): 175-179.
- Sonthiphand, P. and T. Limpiyakorn (2011). "Change in ammonia-oxidizing microorganisms in enriched nitrifying activated sludge." Appl Microbiol Biotechnol 89(3): 843-853.
- Stehr, G., B. Böttcher, P. Dittberner, G. Rath, and H.-P. Koops (1995). "The ammonia-oxidizing nitrifying population of the River Elbe estuary." FEMS Microbiol Ecol 17(3): 177-186.
- Strickland, J. D. and T. R. Parsons (1972). "A practical handbook of seawater analysis."

- Subbarao, G., O. Ito, K. Sahrawat, W. Berry, K. Nakahara, T. Ishikawa, T. Watanabe, K. Suenaga, M. Rondon, and I. M. Rao (2006). "Scope and strategies for regulation of nitrification in agricultural systems—challenges and opportunities." Critical Reviews in Plant Sciences 25(4): 303-335.
- Ternes, T. A., M. Stumpf, J. Mueller, K. Haberer, R.-D. Wilken, and M. Servos (1999). "Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants—I. Investigations in Germany, Canada and Brazil." Science of the Total Environment 225(1): 81-90.
- Thorpe, K. L., M. Gross-Sorokin, I. Johnson, G. Brighty, and C. R. Tyler (2006). "An assessment of the model of concentration addition for predicting the estrogenic activity of chemical mixtures in wastewater treatment works effluents." Environ Health Perspect 114 Suppl 1: 90-97.
- Vader, J., C. Van Ginkel, F. Sperling, J. De Jong, W. De Boer, J. De Graaf, M. Van Der Most, and P. Stokman (2000). "Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge." Chemosphere 41(8): 1239-1243.
- Weber, S., P. Leuschner, P. Kämpfer, W. Dott, and J. Hollender (2005). "Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture." Appl Microbiol Biotechnol 67(1): 106-112.
- Widdel, F. and F. Bak (1992). Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. The prokaryotes, Springer: 3352-3378.
- Williams, R. J., A. C. Johnson, J. J. Smith, and R. Kanda (2003). "Steroid estrogens profiles along river stretches arising from sewage treatment works discharges." Environmental Science & Technology 37(9): 1744-1750.
- Wikipedia. [Online]. Ethinyl estradiol 2016. Available from : https://en.wikipedia.org/wiki/Ethinyl_estradiol [2016,june 13]
- Wikipedia. [Online]. Methyltestosterone 2016. Available from : <https://en.wikipedia.org/wiki/Methyltestosterone> [2016,june 13]
- Wise, A., K. O'Brien, and T. Woodruff (2011). "Are oral contraceptives a significant contributor to the estrogenicity of drinking water?" Environ Sci Technol 45(1): 51-60.

- Yi, T., W. F. Harper Jr, R. D. Holbrook ,and N. G. Love (2006). "Role of Particle Size and Ammonium Oxidation in Removal of 17 α -Ethinyl Estradiol in Bioreactors." Journal of Environmental Engineering 132(11): 1527-1529.
- Young, W. (2002). Proposed Predicted–No–Effect Concentrations (PNECs) for Natural and Synthetic Steroid Estrogens in Surface Waters. UK Environment Agency. อ้างอิงใน, R&D Technical Report P2-T04/1.





1. การสกัด DNA โดยใช้ชุด Fast Spin Kit for soil

- 1.ปั่นเหวี่ยงตะกอนจุลินทรีย์เพื่อเก็บ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร
- 2.เติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 978 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเปิดสารละลายผสมลงในหลอด Lysis matrix แล้วจึงเติม MT buffer ปริมาตร 122 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง Fast Prep ความเร็ว 5.5 เวลา 30 วินาที แล้วจึงไปปั่นเหวี่ยงที่ 14000 รอบต่อนาทีนาน 1 นาที
- 3.เปิดเฉพาะส่วนน้ำใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย PBS agent 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการพลิกหลอดขึ้นลง 10 ครั้ง จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 14000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที
- 4.เปิดเฉพาะส่วนใส 1 มิลลิลิตรใส่หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม Bing Matrix Suspension 1 มิลลิลิตร ผสมโดยการพลิกหลอดขึ้นลงนาน 2 นาทีแล้วตั้งทิ้งไว้ 3 นาที
5. ถ่ายส่วนใสทิ้ง 500 ไมโครลิตรแล้วจึงเขย่าให้ตะกอนฟุ้งอีกครั้ง หลังจากนั้นถ่ายใส่หลอด catch tube ที่มีตัวกรองโดยใส่ทีละ 500 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 14000 รอบต่อนาทีนาน 1 นาที ทั้งส่วนใสที่อยู่ในหลอดที่มีตัวกรองออก จากนั้นจึงเติมสารละลายผสมที่เหลือใส่ในหลอด catch tube ที่มีตัวกรองอีกครั้งโดยทำจนกว่าสารละลายผสมจะหมด
- 6.นำหลอด catch tube ที่มีตัวกรองปั่นเหวี่ยงที่ 14000 รอบต่อนาทีนาน 2 นาทีเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีส่วนของเหลวในหลอดเสร็จแล้วถ่ายเฉพาะส่วนตัวกรองที่มีตะกอนลงใน catch tube อีกอันหนึ่งตั้งทิ้งไว้เวลานาน 5 นาที
- 7.เติมสารละลาย DES ปริมาตร 50 ไมโครลิตรโดยใส่ลงตรงๆบนตะกอนบนตัวกรอง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 14000 รอบต่อนาทีนาน 2 นาที แล้วจึงทิ้งส่วนตะกอนบนตัวกรองซึ่งจะได้ DNA ที่สกัดแล้วอยู่บน catch tube เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อทำการทดลองขั้นต่อไป

2. การทำ Polymerase Chain Reaction

นำตัวอย่าง Template DNA	1	ไมโครลิตร
น้ำที่ปราศจาก DNA	14.25	ไมโครลิตร
10X buffer	2.5	ไมโครลิตร
ฟอร์เวิร์ดไพเมอร์ ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ (5-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3 ; Rotthauwe และคณะ, 1997)	2.5	ไมโครลิตร
รีเวิร์ดไพเมอร์ ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ (2R 5-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3 ' ; Rotthauwe และคณะ, 1997)	2.5	ไมโครลิตร
ใช้ Taq DNA polymerase (Takara Bio Inc, Japan)	0.25	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	25	ไมโครลิตร

PCR conditions คือ initial denaturation 10 นาที 95 องศาเซลเซียส โดยใช้ DNA denaturation 60 วินาที ที่ 95 องศาเซลเซียส primer annealing 60 วินาที ที่ 56 องศาเซลเซียส DNA extension 30 วินาที ที่ 72 องศาเซลเซียส และ final extension 15 วินาที ที่ 78 องศาเซลเซียส จำนวน 35 รอบ

3. การทำ Cloning โดยชุด PCR Cloning Kit แบบ pGEM-T Easy vector system (Promega, USA)

3.1 Ligation

ใส่ 2x Rapid Ligation buffer 5 ไมโครลิตรลงในหลอด PCR ตามด้วย PGEM-T Easy Vector 1 ไมโครลิตร หลังจากนั้นจึงเติม purify DNA จาก PCR product 3 ไมโครลิตร และ T4 DNA Ligase 1 ไมโครลิตร ตามลำดับซึ่งจะได้ปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมงแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 16 ชั่วโมง

3.2 Transformation

3.2.1 แช่หลอดทดลองขนาด 2 มิลลิตรบนน้ำแข็ง พร้อมหลอด competent cell ทิ้งไว้ ประมาณ 5 นาที

3.2.2 ใส่ competent cell ลงในหลอดที่เตรียมไว้ 50 ไมโครลิตร ตามด้วย β -mercaptoethanol 0.85 ไมโครลิตรโดยแช่ในน้ำแข็งนาน 10 นาทีและเขย่าทุก 2 นาที

3.2.3 เติมตัวอย่างจากการ Ligation ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร แล้วแช่บนน้ำแข็ง 30 นาที

3.2.4 Heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสไม่เกิน 60 วินาที จากนั้นบ่มบนน้ำแข็ง 2 นาที

3.2.5 เติม SOC medium ที่ให้ความร้อนแล้วอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสปริมาตร 450 ไมโครลิตร

3.2.6 นำไปเขย่าที่ 250 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยจะ ได้ที่ transform แล้วปริมาตร 600 ไมโครลิตร

3.2.7 ดูดตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร spread plate บน LB-ampicillin agar โดยทำ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 16 ชั่วโมง

3.2.8 ตัวอย่างที่เหลือนำไป centrifuge ที่ 5000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงดูน้ำ ใส่ทิ้งประมาณ 200 ไมโครลิตร และเติม SOC medium ที่ให้ความร้อนแล้วอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

3.2.9 ดูดตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร spread plate บน LB-ampicillin agar โดยทำ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 16 ชั่วโมง

3.3 Pick up Colony

3.3.1 ตรวจสอบ plate ที่มีโคโลนีสีฟ้าและสีขาวโดยมีอัตราส่วน ฟ้า : ขาว เท่ากับ 40 : 60 เลือก plate ที่ดีที่สุด

3.3.2 Pick up colony สีขาวลงบน plate LB-ampicillin agar ที่ติดหมายเลขไว้โดยใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อเชื้อโคโลนีที่ต้องการลงบน plate ที่ติดหมายเลขแล้วจึงใช้ไม้จิ้มฟันอันเดิมแต่ละลงในหลอด PCR ที่เติมน้ำกลั่นปราศจาก DNA ปริมาตร 20-40 ไมโครลิตรพร้อมติดหมายเลขเดียวกัน

3.3.3 นำ plate โคโลนีเดิมพันด้วยพาราฟิล์มแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วน plate ที่ pick up และติดหมายเลขนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 16 ชั่วโมงแล้วจึงพันด้วยพาราฟิล์มแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกัน

3.3.4 หลอด PCR ที่ผ่านการ pick up แล้วจะได้ template DNA ให้นำไปเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ template DNA โดยใช้จำนวนรอบต่ำที่สุดเพื่อจะได้ไม่ amplify DNA ชนิดอื่น (ประมาณ 15-20 รอบ) จากนั้นเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสส่ง sequence ต่อไป

การเตรียมสารเคมีสำหรับการทำ Cloning

SOB medium

Tryptone	20	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม

ปรับปริมาตรโดยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อโดย autoclave 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ก่อนใช้เติมสารละลาย $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 2 มิลลิลิตร และสารละลาย $MgSO_4$ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 10 มิลลิลิตร

สารละลาย $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1 โมลาร์

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	10.15	กรัม
----------------------	-------	------

ปรับปริมาตรโดยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

สารละลาย $MgSO_4$ ความเข้มข้น 1 โมลาร์

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	12.3	กรัม
----------------------	------	------

ปรับปริมาตรโดยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

สารละลายกลูโคส 2 โมลาร์

กลูโคส $C_6H_{12}O_6$	3.6	กรัม
ปรับปริมาตรโดยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร		

SOC medium

SOB medium	99	ส่วน
สารละลายกลูโคส 2 โมลาร์	1	ส่วน
แบ่งใส่หลอดขนาด 2 มิลลิลิตรหลอดละ 1 มิลลิลิตรและควรเตรียมก่อนใช้ทันที		

สารละลาย IPIG 1 โมลาร์

IPIG	1.2	กรัม
ปรับปริมาตรโดยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรเก็บไว้ภาชนะป้องกันแสง		

สารละลาย X-Gal 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)	100	มิลลิกรัม
เติม N,N'-dimethylformamide ให้เป็น 2 มิลลิลิตรเก็บไว้ภาชนะป้องกันแสง		

สารละลาย ampicillin

Ampicillin	10	มิลลิกรัม
ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร(เก็บได้ไม่เกิน 1 เดือนหลังเตรียม)		

LB ampicillin agar plates

LB	5	กรัม
Agar	5	กรัม

ปรับปริมาตรโดยน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตรและฆ่าเชื้อโดย autoclave 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีทิ้งไว้จนอุ่นแล้วจึงเติม

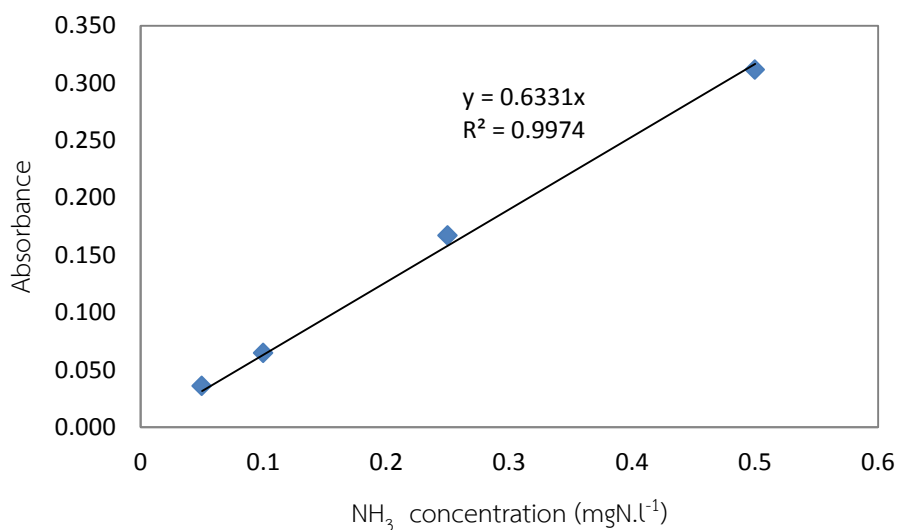
สารละลาย IPIG 1 โมลาร์	150	ไมโครลิตร
สารละลาย X-Gal 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	480	ไมโครลิตร
สารละลาย ampicillin	300	ไมโครลิตร

เขย่าเบาๆให้เข้ากันแล้วจึงเทลง plate ปราศจาเชื้อที่เตรียมไว้ โดยประมาณ 10 plate ต่อสารละลาย 250 มิลลิลิตร



1. การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับแอมโมเนีย

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1 , 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร หลังจากนั้นใส่สารเคมีเช่นเดียวกับตัวอย่างเขย่าให้เข้ากันแล้วจึงเก็บไว้ในที่มืดนาน 3 ชั่วโมง จากนั้นจึงวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ 640 นาโนเมตรด้วย UV visible spectrophotometers (Bower และ Holm-Hansen, 1980) สร้างกราฟมาตรฐานดังรูป

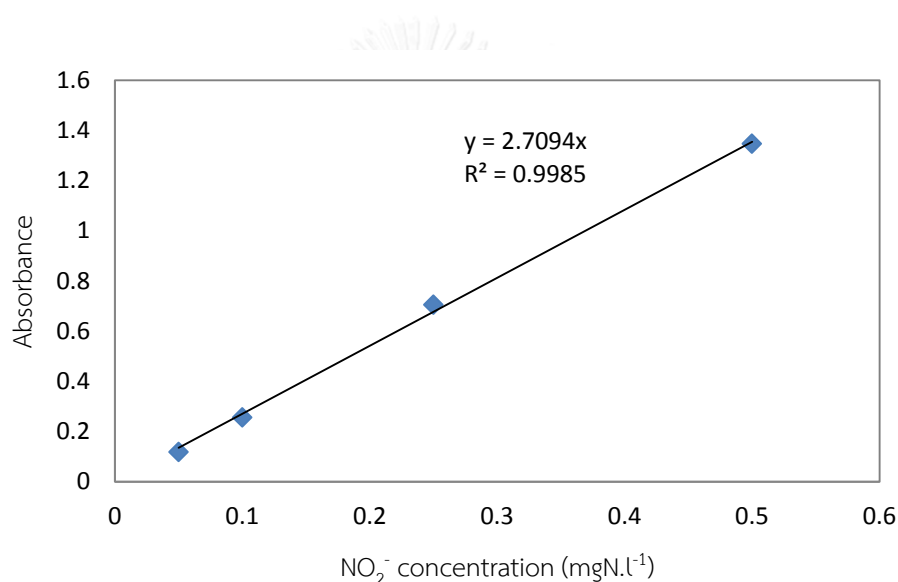


CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานสำหรับแอมโมเนีย

2. การสร้างการพมาตรฐานสำหรับไนไตรท์

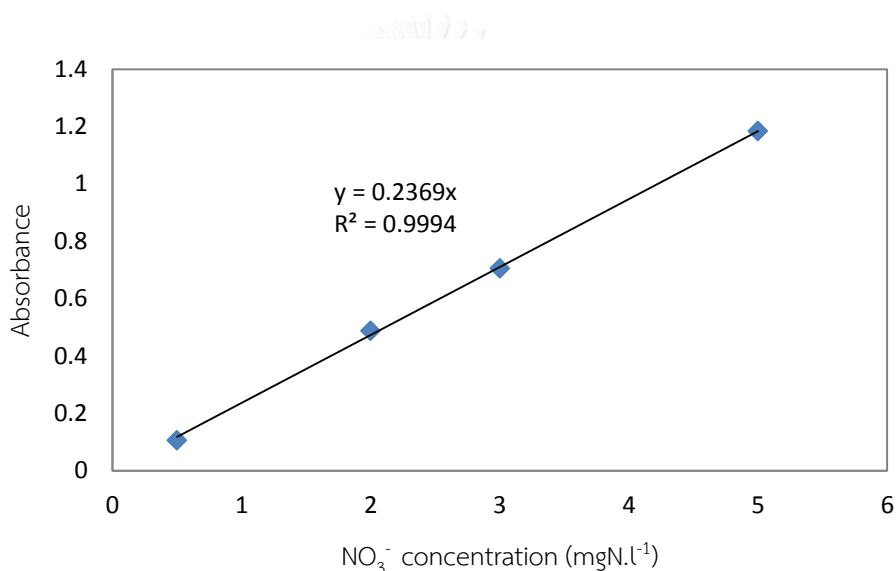
เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1 , 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร หลังจากนั้นใส่สารเคมีเช่นเดียวกับตัวอย่างเขย่าให้เข้ากัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ถึง 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนสีวัดการดูดกลืนแสงที่ 543 นาโนเมตรด้วย UV visible spectrophotometers รุ่น Thermo Electron Corporation, Hexious **α**, Cambridge, UK (Strickland และคณะ, 1972) เปรียบเทียบหาค่าของไนไตรท์จากสารละลายมาตรฐานไนไตรท์ ดังรูป



รูปที่ ข.2 กราพมาตรฐานสำหรับไนไตรท์

3. การสร้างการพมาตรฐานสำหรับไนเตรต

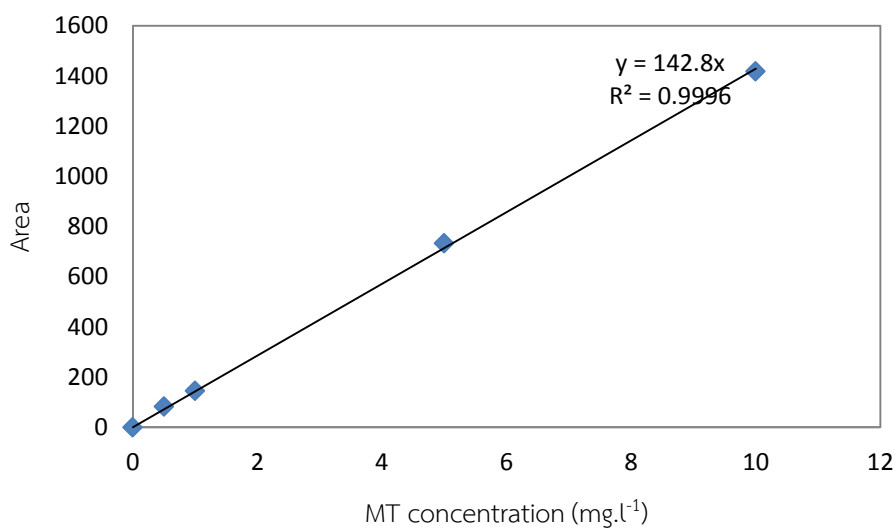
เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.5, 2 , 3 และ 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร หลังจากนำตัวอย่างวัดการดูดกลืนแสงที่ 220 นาโนเมตรเพื่อที่จะหาค่า NO₃ และการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตรเพื่อหาค่าสารอินทรีย์ละลายน้ำป้องกันการรบกวนได้ด้วย UV visible spectrophotometers รุ่น เทอร์โมอิคอร์ปอเรชั่น α Hexious, เคมบริดจ์ สหราชอาณาจักร (Federation และ Association, 2005) เปรียบเทียบหาค่าของไนเตรตจากสารละลายมาตรฐานไนเตรต ดังรูป



รูปที่ ข.3 กราพมาตรฐานสำหรับไนเตรต

4. กราฟมาตรฐานความเข้มข้น MT

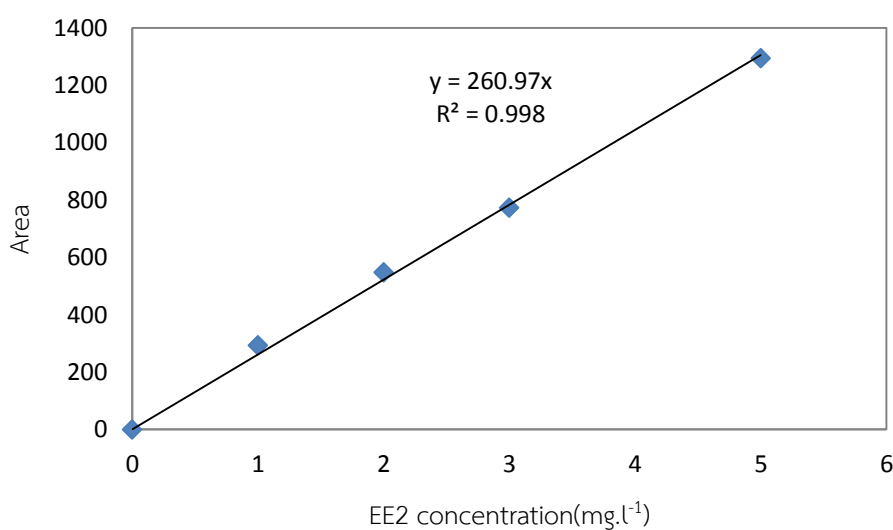
เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร วิเคราะห์หา
ค่า MT ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC; Agilent Series 1100)
โดยใช้สภาวะเช่นเดียวกับตัวอย่างและคอลัมน์ C18 (Apollo 250x4.6mm,5um)



รูปที่ ข.4 กราฟมาตรฐานสำหรับ MT

5. กราฟมาตรฐานความเข้มข้น EE2

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร วิเคราะห์หาค่า EE2 ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC; Agilent Series 1100) โดยใช้สภาวะเช่นเดียวกับตัวอย่างและคอลัมน์ C18 (Agilent 250x4.6mm,5um)



รูปที่ ข.5 กราฟมาตรฐานสำหรับ EE2



ตารางที่ ค.1 ผลการทดลองจลนพลศาสตร์จากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

ความเข้มข้นแอมโมเนียที่เตรียม	ความเข้มข้นแอมโมเนียที่วัดได้	ความชัน	R ²
1	2.03	0.5365	0.9389
	1.80	0.3473	0.9408
5	8.29	0.7159	0.8844
	8.610	0.7459	0.8639
10	14.85	0.6181	0.8296
	15.72	0.6527	0.8506
15	16.29	0.4465	0.9643
	18.44	0.7117	0.9913
20	30.09	1.1237	0.9837
	30.01	1.1001	0.9670
30	41.94	1.3700	0.9198
	41.70	1.3413	0.8887
40	55.20	1.1681	0.9562
	55.36	1.1002	0.9546
50	67.52	0.9731	0.9828
	70.62	0.7917	0.9343
60	80.71	0.7134	0.9630
	83.40	1.2244	0.9004
70	94.38	1.0028	0.9469
	97.30	1.0571	0.9513

หมายเหตุ ชุดการทดลองที่ 1 (บน)

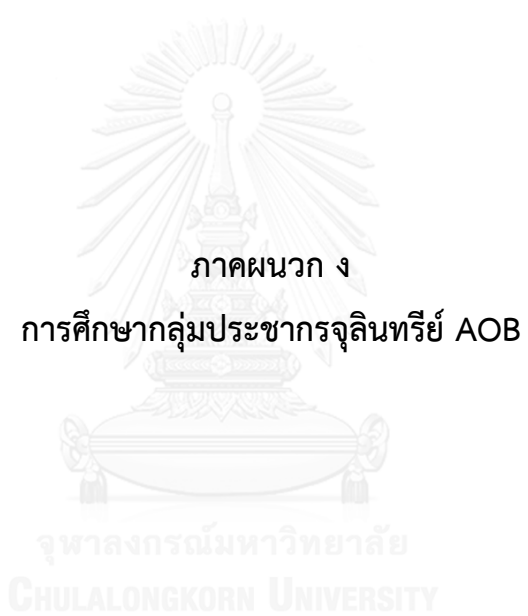
ชุดการทดลองที่ 2 (ล่าง)

ตารางที่ ค.2 ผลการทดลองจลนพลศาสตร์จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

ความเข้มข้นแอมโมเนียที่เตรียม	ความเข้มข้นแอมโมเนียที่วัดได้	ความชัน	R ²
5	6.79	0.1912	0.9567
	6.68	0.2952	0.9404
10	11.19	0.7138	0.9898
	7.76	0.6689	0.9550
30	31.03	1.2503	0.9245
	29.86	0.9468	0.9956
60	64.05	1.5416	0.9793
	60.60	0.5983	0.9990
90	83.54	1.4106	0.9205
	88.42	1.4263	0.9949
110	96.36	1.5732	0.9908
	98.11	1.1091	0.9774
14	123.96	1.2329	0.9327
	116.97	1.0226	0.9571
170	135.47	1.1266	0.9590
	127.90	1.5586	0.8300

หมายเหตุ ชุดการทดลองที่ 1 (บน)

ชุดการทดลองที่ 2 (ล่าง)



ตัวอย่างจากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิลิตรไนโตรเจนต่อลิตร

70-1

TGCGTTGATGCTGGACACAATTATGTTATTGACGGGTAAGTGGCTGATAACCGCACTGTTAGGTGGT
 GGATTCTGGGGATTATTTTTCTATCCAGGCAACTGGCCTATTTTTGGTCCAACCCACTTGCCTCTGGTT
 GTAGAAGGCGTGTTGCTGTCAGTAGCTGACTACACAGGTTTCTTGTATGTGCGTACAGGTACACCGG
 AATATGTTTCGCCTGATTGAGCAAGGATCGCTGCGTACTTTTTGGTGGCCACACCACGGTGATTGCCGC
 GTTCTTCTCAGCTTTTGTATCGATGTTGATGTTCTGTGTATGGTGGTACTTTGGCAAATACTGTAC
 CGCTTTCTTCTATGTTAAAGGAGAAAGAGGACGTATATCGATGAAGAATGACGTAACGGCATT

70-2

TGGTGC GTT GATGCTGGATACGATTTTATTATTGACGGGTAAGTGGTGGTAACCGCACTGTTAGGT
 GGTGGATTCTGGGGTTTATTTTTCTATCCGGGCAACTGGCCTATTTTTGGTCCCACCCACTTACCGCTG
 GTTGTAGAAGGCGTATTGCTGTCAGTAGCTGACTACACAGGTTTCTGTATGTACGTACAGGTACAC
 CGGAATATGTTTCGCCTGATTGAGCAAGGATCGCTGCGTACTTTTGGTGGTCACACCACGGTATTGCT
 GCGTTTTTCTCAGCCTTTGTATCAATGCTGATGTTCTGCGTATGGTGGTACTTTGGCAAATACTGT
 ACTGCTTTCTACTATGTTAAAGGAGAAAGAGGACGTATATCGATGAAGAATGACGTAACGGCATTG
 GTG

70-3

TGGTGC GTT GATGCTGGACACAATTATGTTATTGACGGGTAAGTGGCTGATAACCGCACTGTTAGGT
 GGTGGATTCTGGGGATTATTTTTCTATCCAGGCAACTGGCCTATTTTTGGTCCAACCCACTTGCCTCTG
 GTTGTAGAAGGCGTGTTGCTGTCAGTAGCTGACTACACAGGTTTCTTGTATGTGCGTACAGGTACAC
 CGGAATATGTTTCGCCTGATTGAGCAAGGATCGCTGCGTACTTTTGGTGGCCACACCACGGTGATTGC
 CGGTTCTTCTCAGCTTTTGTATCGATGTTGATGTTCTGTGTATGGTGGTACTTTGGCAAATACTGT
 TACCGCTTTCTTCTATGTTAAAGGAGAAAGAGGACGTATATCGATGAAGAATGACGTAACGGCATT
 GGT

70-4

TGGTGCGTTGATGCTGGACACAATTATGTTATTGACGGGTAACCTGGCTGATAACCGCACTGTTAGGT
GGTGGATTCTGGGGATTATTTTTCTATCCAGGCAACTGGCCTATTTTTGGTCCAACCCACTTGCCTCTG
GTTGTAGAAGGCGTGTTGCTGTCAGTAGCTGACTACACAGGTTTCTTGTATGTGCGTACAGGTACAC
CGGAATATGTTGCGCTGATTGAGCAAGGATCGCTGCGTACTTTTGGTGGCCACACCACGGTGATTGC
CGCGTTCTTCTCAGCTTTTGTATCGATGTTGATGTTCTGTGTATGGTGGTACTTTGGCAAACATACTG
TACCGCTTTCTTCTATGTTAAAGGAGAAAGAGGACGTATATCGATGAAGAATGACGTAACGGCATT

70-5

TGCGCTGATGCTGGACTTCACGCTGTATCTGACACGTAACCTGGCTGGTGACAGCTCTGGTTGGGGGC
GGATTCTTTGGTCTGCTGTTCTACCCGGGTAACCTGGCCGATCTTTGGTCCAACGCATCTGCCAATCGT
TGTAGAAGGAACACTGCTGTGATGGCTGACTACATGGGCCATATGTATGTTTCGTACGGGTACACCT
GAGTATGTTTCGTCATATTGAGCAAGGTTCACTGCGGACCTTTGGTGGACATACCACAGTTATTGCAG
CGTTCTTCTCTGCATTCGATCAATGTTGATGTTACGGTATGGTGGTATCTTGAAAGGTTTACTGTA
CAGCCTTTTCTACGTTAAAGGTAAGAGGTCGTATCGTACATCGCAATGATGTTACCGCATTCCGGT



ตัวอย่างจากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิลิตรไนโตรเจนต่อลิตร

420-1

GCTGATGCTGGACTTCACGCTGTATCTGACACGCAACTGGCTGGTGACAGCTCTGGTTGGAGGCGG
 ATTCTTCGGTCTGCTGTTCTATCCGGGTAAGTGGCCGATCTTTGGTCCAACGCATCTGCCAATCGTTGT
 AGAAGGAACACTGTTGTCGATGGCTGACTACATGGGCCATATGTATGTTTCGTACAGGTACACCCGAG
 TATGTTTCGTACATATTGAGCAAGGTTCACTGCGTACCTTTGGTGGTCATACCACAGTTATTGCAGCATT
 CTTCTCTGCGTTCGTATCAATGTTGATGTTACCGTATGGTGGTATCTTGAAAAAGTTTACTGTACAG
 CCTTTTTCTACGTTAAAGGTAAGAGAGGTCGTATCGTACATCGCAATGATGTTACCGCATTTCGGTGAA
 GAAGG

420-2

TGCGCTGATGCTGGACTTCACGCTGTATCTGACACGCAACTGGCTGGTGACAGCTCTGGTTGGAGGC
 GGATTCTTCGGTCTGCTGTTCTATCCGGGTAAGTGGCCGATCTTTGGTCCAACGCATCTGCCAATCGT
 TGTAAGGAACACTGTTGTCGATGGCTGACTACATGGGCCATATGTATGTTTCGTACAGGTACACCC
 GAGTATGTTTCGTACATATTGAGCAAGGTTCACTGCGTACCTTTGGTGGTCATACCACAGTTATTGCAGC
 ATTCTTCTCTGCGTTCGTATCAATGTTGATGTTACCGTATGGTGGTATCTTGAAAAAGTTTACTGTAC
 AGCCTTTTTCTACGTTAAAGGTAAGAGAGGTCGTATCGTACATCGCAATGATGTTACCGCATTTCGGTG
 AAGAAGG

420-3

TGCGCTGATGCTGGACTTCACGCTGTATCTGACACGCAACTGGCTGGTGACAGCTCTGGTTGGAGGC
 GGATTCTTCGGTCTGCTGTTCTATCCGGGTAAGTGGCCGATCTTTGGTCCAACGCATCTGCCAATCGT
 TGTAAGGAACACTGTTGTCGATGGCTGACTACATGGGCCATATGTATGTTTCGTACAGGTACACCC
 GAGTACGTTTCGTACATATTGAGCAAGGTTCACTGCGTACCTTTGGTGGTCATACCACAGTTATTGCAGC
 ATTCTTCTCTGCGTTCGTATCAATGTTGATGTTACCGTATGGTGGTATCTTGAAAAAGTTTACTGTAC
 AGCCTTTTTCTACGTTAAAGGTAAGAGAGGTCGTATCGTACATCGCAATGATGTTACCGCATTTCGGT

420-4

CGCTGATGCTGGACTTCACGCTGTATCTGACACGCAACTGGCTGGTGACAGCTCTGGTTGGAGGCGG
 ATTCTTCGGTCTGCTGTTCTATCCGGGTAAGTGGCCGATCTTTGGTCCAACGCATCTGCCAATCGTTG
 TAGAAGGAACACTGTTGTCGATGGCTGACTACATGGGCCATATGTATGTTTCGTACAGGTACACCCGA
 GTATGTTTCGTACATATTGAGCAAGGTTCACTGCGTACCTTTGGTGGTCATACCACAGTTATTGCAGCAT
 TCTTCTCTGCGTTCGTATCAATGTTGATGTTACCGTATGGTGGTATCTTGAAAAAGTTTACTGTACAG
 CCTTTTTCTACGTTAAAGGTAAGAGAGGTCGTATCGTACATCGCAATGATGTTACCGCATTTCGGTGAA
 GAAGGC



ตารางที่ จ.1 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Degradation test ของการย่อยสลาย MT จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรมีความเข้มข้นแอมโมเนีย 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น MT 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Degradation test												ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนโตรที่			ไนเตรต						
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	SD	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	SD	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	SD	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	SD	
0	104.84	104.84	0.00	<LOD	<LOD	0.00	<LOD	<LOD	0.00	<LOD	<LOD	0.00	104.84
				<LOD			<LOD			<LOD			
				<LOD			<LOD			<LOD			
3	42.46	43.45	1.65	14.97	17.12	3.87	19.11	22.28	4.91	25.46	15.79	82.85	
	45.35			21.59									
	42.54			14.81									
5	36.28	34.04	1.94	19.78	21.81	2.79	33.75	32.64	2.23	31.52	35.98	88.49	
	32.92			25.00									
	32.92			20.65									
10	14.78	16.32	2.60	4.02	4.02	0.00	48.11	48.11	2.21	48.11	44.28	68.44	
	14.86												
	19.32												

ตารางที่ จ.1 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Degradation test ของการย่อยสลาย MT จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น MT 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ต่อ)

วันที่	Degradation test												ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนโตรที่			ไนเตรต						
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	SD	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	SD	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	SD	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	SD	
15	7.72	7.72	0.00	<LOD	<LOD	0.00	70.43	75.86	6.26	81.28			
				<LOD			81.28						
				<LOD			70.43						
18	1.49	1.49	0.00	<LOD	<LOD	0.00	81.28	81.28	2.03	81.28			
				<LOD			81.28						
				<LOD			84.79						
25	0.32	0.32	0.00	<LOD	<LOD	0.00	82.56	82.56	0.00	82.56			
				<LOD									
				<LOD									

ตารางที่ จ.3 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Abiotic test ของการย่อยสลาย MT จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น MT 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Abiotic test												ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนโตรเจน			ไนเตรต			ไนเตรต			
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	
0	97.02	100.93	3.91	<LOD	<LOD	0.00	<LOD	<LOD	0.00	<LOD	<LOD	0.00	100.93
	104.84			<LOD									
3	89.99	89.99	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	1.34	1.44	0.10	91.43
										1.53			
5	94.68	94.68	0.00	0.14	0.14	0.00	0.14	0.14	0.00	2.46	2.46	0.00	97.27
10	82.95	82.95	0.00	0.12	0.07	0.05	0.07	0.07	0.05	1.85	2.01	0.16	85.03
				0.03						2.17			
15	83.73	83.73	0.00	<LOD	<LOD	0.00	<LOD	<LOD	0.00	2.84	2.84	0.00	86.57
				<LOD									
18	81.39	81.39	0.00	<LOD	<LOD	0.00	<LOD	<LOD	0.00	2.81	2.81	0.00	84.19
				<LOD									
25	86.08	86.08	0.00	<LOD	<LOD	0.00	<LOD	<LOD	0.00	2.81	2.81	0.00	88.88
				<LOD									

ตารางที่ จ.5 ผลรวมไม่ตรงกันชุดการทดลอง Degradation test ของการย่อยสลาย MT จากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไม่ตรงกันต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 28 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น MT 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Degradation test												ผลรวมไม่ตรงกัน
	แอมโมเนีย			ไนโตรที่			ไนเตรต			ไนโตรเจน			
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	SD	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	
0	24.76	24.33	0.53	1.94	1.87	0.07	0.06	0.38	0.32	26.58			
	23.74			1.80			0.70						
	24.47												
1	23.74	22.97	1.87	5.41	5.41	0.00	5.16	4.84	0.32	33.22			
	20.83						4.53						
	24.33												
2	15.29	14.81	1.80	1.58	1.61	0.03	15.69	16.01	0.32	32.43			
	16.31			1.64			16.33						
	12.82												
3	8.14	7.60	0.47	0.56	0.56	0.00	26.85	27.01	0.16	35.18			
	7.28						27.17						
	7.39												
5	4.18	4.64	0.40	0.28	0.37	0.09	26.85	27.01	0.16	32.03			
	4.81			0.46			27.17						
	4.94												
8	0.35	0.37	0.03	0.28	0.34	0.06	26.54	28.77	2.23	29.48			
	0.35			0.40			31.00						
	0.41												

ตารางที่ จ.5 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Degradation test ของการย่อยสลาย MT จากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 28 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น MT 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ต่อ)

วันที่	Degradation test												ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนเตรท			ไนเตรต			ไนเตรต			
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	SD	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	
10	0.20	0.21	0.22	<LOD	<LOD	0.00	23.03	22.55	0.48				
	0.44			<LOD			22.07						
	<LOD												
13	<LOD	<LOD	0.00	<LOD	<LOD	0.00	22.07	22.23	0.16				
	<LOD			<LOD			22.39						
	<LOD												
16	<LOD	<LOD	0.00	<LOD	<LOD	0.00	24.62	24.62	0.00				
	<LOD			<LOD									
	<LOD												
20	<LOD	<LOD	0.00	<LOD	<LOD	0.00	26.22	25.42	0.80				
	<LOD			<LOD			24.62						
	<LOD												

ตารางที่ จ.6 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง AOB inhibition test ของการย่อยสลาย MT จากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 28 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น MT 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	AOB inhibition test												ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย				ไนเตรท์				ไนเตรต				
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	
0	28.40	28.70	0.29	<LOD	<LOD	0.00	0.83	0.83	0.00				29.53
	28.99			<LOD									
1	26.66	25.13	1.53	<LOD	<LOD	0.00	4.02	4.02	0.00				29.15
	23.60			<LOD									
2	25.93	26.37	0.44	<LOD	<LOD	0.00	3.06	3.06	0.00				29.43
	26.80			<LOD									
3	21.59	21.59	0.00	<LOD	<LOD	0.00	5.62	5.62	0.00				27.20
				<LOD									
5	20.13	19.40	0.73	<LOD	<LOD	0.00	5.62	5.62	0.00				25.02
	18.67			<LOD									
8	15.73	15.51	0.22	<LOD	<LOD	0.00	10.08	10.08	0.00				25.59
	15.29			<LOD									

ตารางที่ ๖.6 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง AOB inhibition test ของการย่อยสลาย MT จากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 28 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น MT 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ต่อ)

วันที่	AOB inhibition test										ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนไตรท์			ไนเตรต			Y error bar	
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		
10	14.30	15.03	0.73	<LOD	<LOD	0.00	7.53	9.12	1.59	24.16	
	15.76			<LOD			10.72				
13	15.70	15.76	0.00	<LOD	<LOD	0.00	12.00	11.36	0.64	27.12	
				<LOD			10.72				
16	15.79	16.26	0.50	<LOD	<LOD	0.00	13.91	12.47	1.44	28.73	
	16.75			<LOD			11.04				
20	14.30	14.30	0.00	<LOD	<LOD	0.00	14.55	14.55	0.00	28.85	
				<LOD							

ตารางที่ จ.7 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Abiotic test ของการย่อยสลาย MT จากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น MT 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Abiotic test											
	แอมโมเนีย			ไนโตรที่			ไนเตรต			ผลรวมไนโตรเจน		
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar
0	31.75	31.75	0.00	<LOD	<LOD	0	0.81	0.81	0.00			32.57
1	33.86	33.86	0.00	<LOD	<LOD	0	3.37	3.37	0.00			37.23
8	31.67	31.67	0.00	<LOD	<LOD	0	5.28	5.28	0.00			36.96
20	29.40	29.40	0.00	<LOD	<LOD	0	5.27	5.28	0.00			34.69

ตารางที่ ๑.8 ผลการย่อยสลาย MT แต่ละชุดการทดลองจากถึงปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 28 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น MT 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Degradation test			Heterotroph test			AOB inhibition test		
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	SD	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	SD	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar
0	12.49	12.11	0.39	11.74	11.57	0.30	12.90	12.80	0.10
	11.71			11.22			12.69		
	12.14			11.74					
1	12.21	11.75	0.70	11.09	11.64	0.96	11.99	12.32	0.33
	12.10			11.09			12.65		
	10.95			12.75					
2	12.33	11.84	0.47	12.42	12.25	0.15	10.72	11.01	0.29
	11.78			12.17			11.30		
	11.40			12.17					
3	11.11	11.76	0.60	12.13	12.36	0.22	11.29	11.09	0.20
	12.29			12.56			10.89		
	11.88			12.40					
5	10.06	10.10	0.40	11.07	10.80	0.72	11.33	10.94	0.39
	10.52			11.33			10.55		
	9.72			9.98					
8	9.18	9.30	0.10	10.07	9.87	0.46	8.72	8.79	0.06
	9.36			10.18			8.85		
	9.36			9.35					

ตารางที่ จ.8 ผลการย่อยสลาย MT แต่ละชุดการทดลองจากถึงปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 28 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น MT 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ต่อ)

วันที่	Degradation test			Heterotroph test			AOB inhibition test		
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	SD	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	SD	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar
10	9.66	10.26	0.64	9.35	9.04	0.29	8.17	8.11	0.06
	10.20			8.98			8.05		
	10.94			8.78					
13	7.25	8.54	1.19	6.46	6.81	0.60	7.77	6.46	1.30
	8.76			7.50			5.16		
	9.59			6.47					
16	7.54	7.53	0.01	5.40	5.05	0.44	2.28	2.28	0.00
	7.52			5.19					
				4.55					
20	3.70	3.70	0.00	2.63	2.62	0.01	0.46	0.44	0.02
				2.62			0.42		
				2.61					

ตารางที่ จ.8 ผลการย่อยสลาย MT แต่ละชุดการทดลองจากถึงปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 28 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น MT 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ต่อ)

วันที่	Abiotic test		
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar
0	10.26	11.94	1.67
	13.61		
1	11.76	10.88	0.88
	10.00		
8	10.78	10.39	0.38
	10.01		
20	11.28	10.45	0.82
	9.63		



ตารางที่ จ.1 ผลรวมไม่แปรเจนชุดการทดลอง Degradation test การย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไม่แปรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไม่แปรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Degradation test												ผลรวมไม่แปรเจน
	แอมโมเนีย				ไม่ไตรท์				ไนเตรต				
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		
0	92.99	96.84	3.84		0.27	0.27	0.00		3.51	1.76	1.75		98.87
	100.69								0.00				
1	85.85	87.31	1.46		1.24	1.19	0.05		4.47	4.79	0.32		93.29
	88.78				1.14				5.11				
2	83.19	83.01	0.18		5.52	4.38	1.14		4.79	4.95	0.16		92.34
	82.82				3.25				5.11				
3	83.92	84.06	0.13		8.19	8.61	0.42		7.02	7.02	0.00		99.69
	84.20				9.03								
5	62.12	68.35	6.22		21.29	20.72	0.57		22.33	22.33	0.00		111.40
	74.58				20.15								
7	21.68	20.64	1.03		19.65	21.12	1.47		67.63	62.05	5.58		103.80
	19.60				22.59				56.46				
10	0.87	0.51	0.35		<LOD	<LOD	0.00		92.51	85.81	6.70		86.33
	0.16				<LOD				79.11				

(ตารางนี้เป็นส่วนหนึ่งของตารางที่ จ 19)

ตารางที่ ๑.2 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง AOB inhibition test การย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิบัติการ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	AOB inhibition test										ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนโตรเจน			ไนเตรต			Y error bar	
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		
0	82.64	82.68	0.05	<LOD	<LOD	0.00	0.12	5.87	8.12	88.56	
	82.73			<LOD			11.61				
13	63.03	62.30	0.73	<LOD	<LOD	0.00	25.64	38.08	17.59	100.39	
	61.57			<LOD			50.52				

(ตารางนี้เป็นส่วนหนึ่งของตารางที่ ๑.10)

ตารางที่ ๑.3 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Abiotic test การย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิบัติการ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Abiotic test										ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนโตรเจน			ไนเตรต			Y error bar	
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		
0	71.83	69.17	2.66	<LOD	<LOD	0.00	0.03	1.15	1.58	70.33	
	66.51			<LOD			2.27				
13	63.22	63.63	0.41	<LOD	<LOD	0.00	31.93	30.81	1.58	94.45	
	64.04			<LOD			29.70				

(ตารางนี้เป็นส่วนหนึ่งของตารางที่ ๑.11)

ตารางที่ ๑.๔ ผลการย่อยสลาย EE2 แต่ละชุดการทดลองจากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิลิตรในไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนีย เริ่มต้น 100 มิลลิลิตรในไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิลิตรต่อลิตร

วันที่	Degradation test		Heterotroph test ความเข้มข้น	AOB inhibition test ความเข้มข้น	Abiotic test ความเข้มข้น
	ค่าเฉลี่ย	Y error bar			
0	7.08	0.79	4.83	5.51	6.25
	8.65				
5	5.74	0.13	-	-	-
	5.99				
10	5.79	0.10	-	4.83	-
	5.59				
30	4.49	0.04	4.70		5.84
	4.56				

(ตารางนี้เป็นส่วนหนึ่งของตารางที่ ๑12)

ตารางที่ ๑.5 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Degradation test ของการย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมี ความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Degradation test												ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย				ไนโตรท์				ไนเตรต				
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		
0	69.72	68.12	1.60		<LOD	<LOD	0.00		0.67	0.35	0.32		68.47
	66.51			<LOD					0.03				
1	63.12	61.93	1.19		2.01	2.26	0.25		19.17	10.72	8.45		74.91
	60.74			2.51					2.26				
2	57.54	51.08	6.46		14.74	13.24	1.50		10.88	13.43	2.55		77.74
	44.62			11.73					15.98				
3	47.73	40.68	7.05		11.27	17.45	6.18		37.99	23.16	14.83		81.28
	33.62			23.63					8.32				
5	0.67	0.67	0.00		41.10	41.10	0.00		30.65	23.95	6.70		65.72
									17.26				
7	0.28	0.28	0.00		11.33	16.59	5.26		24.91	41.82	16.91		58.69
					21.86				58.72				
9	<LOD	<LOD	0.00		0.78	0.69	0.08		58.72	58.72	0.00		59.41
	<LOD			0.61									

ตารางที่ ๑.6 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง AOB inhibition test ของการย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	AOB inhibition test										ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนไตรท์			ไนเตรต			Y error bar	
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		
0	70.36	70.04	0.32	<LOD	<LOD	0.00	0.09	0.41	0.31		70.458
	69.72			<LOD			0.73				
10	62.57	58.91	3.66	<LOD	<LOD	0.00	7.75	5.83	1.91		64.749
	55.25			<LOD			3.92				

(ตารางนี้เป็นส่วนหนึ่งของตารางที่ ๑.18)

ตารางที่ ๑.๗ ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง AOBIC test ของการย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Abiotic test										ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนไตรท์			ไนเตรต			Y error bar	
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		
0	65.32	65.00	0.32	<LOD	<LOD	0.00	9.09	5.10	3.99		70.11
	64.68			<LOD			1.12				
10	64.04	63.72	0.32	<LOD	<LOD	0.00	16.43	13.08	3.35		76.80
	63.40			<LOD			9.73				

(ตารางนี้เป็นส่วนหนึ่งของตารางที่ ๑.19)

ตารางที่ ๘.8 ผลการย่อยสลาย EE2 แต่ละชุดการทดลองจากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิลิตรไบโอทรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิลิตร
ไบโอทรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิลิตรต่อลิตร

วันที่	Degradation test		AOB inhibition test	Heterotroph test	Abiotic test
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย			
0	6.82	6.64	0.18	5.17	4.78
	6.46				
10	4.84	4.76	0.08	-	-
	4.67		5.26		
25	4.42	4.13	0.29	5.28	5.28
	3.84				

(ตารางนี้เป็นส่วนหนึ่งของตารางที่ ๘.20)

ตารางที่ ๑.๑ ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Degradation test การย่อยสลาย EE2 โดยเติมแอมโมเนีย 3 ครั้งแบบต่อเนื่องจากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Degradation test										ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนโตรที่			ไนเตรต				
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	Y error bar	
0	92.99 100.69	96.84	3.84	0.27	0.27	0.00	3.51 0.00	1.76	1.75	1.75	98.87
1	85.85 88.78	87.31	1.46	1.24 1.14	1.19	0.05	4.47 5.11	4.79	0.32	0.32	93.29
2	83.19 82.82	83.01	0.18	5.52 3.25	4.38	1.14	4.79 5.11	4.95	0.16	0.16	92.34
3	83.92 84.20	84.06	0.13	8.19 9.03	8.61	0.42	7.02	7.02	0.00	0.00	99.69
5	62.12 74.58	68.35	6.22	21.29 20.15	20.72	0.57	22.33	22.33	0.00	0.00	111.40
7	21.68 19.60	20.64	1.03	19.65 22.59	21.12	1.47	67.63 56.46	62.05	5.58	5.58	103.80
10	0.87 0.16	0.51	0.35	<LOD <LOD	<LOD	0.00	92.51 79.11	85.81	6.70	6.70	86.33
11	0.22	0.22	0.00	<LOD <LOD	<LOD	0.00	79.11 86.45	82.78	3.67	3.67	83.01
11	94.37 102.15	98.26	3.89	<LOD <LOD	<LOD	0.00	107.82 65.08	86.45	21.37	21.37	184.71

ตารางที่ ๑.๑ ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Degradation test การย่อยสลาย EE2 โดยเติมแอมโมเนีย 3 ครั้งแบบต่อเนื่องจากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อไอโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ต่อ)

วันที่	Degradation test												ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย				ไนโตรที่				ไนเตรต				
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	
12	87.86	87.49	0.36	0.54	0.59	0.05	87.09	102.72	15.63	118.35		190.80	
	87.13			0.64									
13	67.43	66.70	0.73	0.61	0.59	0.02	96.34	97.13	0.80	97.93		164.42	
	65.96			0.57									
15	68.53	65.37	3.10	0.54	0.67	0.13	102.08	119.14	17.07	136.21		185.19	
	62.21			0.81									
17	44.34	34.54	9.80	3.88	2.33	1.55	178.31	155.67	22.65	133.02		192.53	
	24.74			0.78									
19	8.74	5.95	2.78	0.54	0.34	0.20	170.66	174.17	3.51	177.68		180.46	
	3.16			0.14									
21	0.19	0.15	0.04	0.04	0.09	0.05	160.13	168.90	8.77	177.68		169.14	
	0.10			0.14									
21	90.70	101.79	11.08	0.01	0.01	0.00	164.60	166.99	2.39	169.38		268.78	
	112.87												
23	61.93	57.21	4.71	1.58	1.58	0.00	225.20	225.20	0.00			284.00	
	52.50												
30	0.24	0.22	0.02	<LOD	<LOD	0.00	252.32	243.55	8.77	234.77		243.77	
	0.19			<LOD	<LOD								

ตารางที่ ๑.10 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง AOB inhibition test การย่อยสลาย EE2 โดยเติมแอมโมเนีย 3 ครั้งแบบต่อเนื่องจากถึงปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	AOB inhibition test												ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนโตรที่			ไนเตรต			ไนเตรต			
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	
0	82.64	82.68	0.05	<LOD	<LOD	0.00	0.12	5.87	8.12				88.56
	82.73			<LOD			11.61						
13	63.03	62.30	0.73	<LOD	<LOD	0.00	25.64	38.08	17.59				100.39
	61.57			<LOD			50.52						
21	65.05	65.32	0.27	<LOD	<LOD	0.00	28.51	28.51	0.00				93.84
	65.60			<LOD									
30	40.31	40.31	0.00	<LOD	<LOD	0.00	40.00	45.10	7.22				85.42
				<LOD			50.20						

ตารางที่ จ.11 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Abiotic test การย่อยสลาย EE2 โดยเติมแอมโมเนีย 3 ครั้งแบบต่อเนื่องจากถึงปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Abiotic test												
	แอมโมเนีย				ไนเตรท์				ไนเตรต				ผลรวมไนโตรเจน
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	
0	71.83	69.17	2.66	<LOD	<LOD	0.00	0.03	1.15	1.58				70.33
	66.51			<LOD			2.27						
13	63.22	63.63	0.41	<LOD	<LOD	0.00	31.93	30.81	1.58				94.45
	64.04			<LOD			29.70						
21	49.84	50.62	0.78	<LOD	<LOD	0.00	19.49	19.33	0.23				69.96
	51.40			<LOD			19.17						
30	30.23	31.01	0.78	<LOD	<LOD	0.00	30.66	29.22	2.03				60.24
	31.79			<LOD			27.78						

ตารางที่ จ.12 ผลการย่อยสลาย EE2 แต่ละชุดการทดลองโดยเติมแอมโมเนีย 3 ครั้งแบบต่อเนื่องจากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อ
โดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Degradation test		Heterotroph test ความเข้มข้น	AOB inhibition test ความเข้มข้น	Abiotic test ความเข้มข้น
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย Y error bar			
0	7.08	7.86	4.83	5.51	6.25
	8.65				
5	5.74	5.87	-	-	-
	5.99				
10	5.79	5.69	-	4.83	-
	5.59				
15	5.11	5.09	-	-	-
	5.07				
21	4.95	4.92	-	-	-
	4.89				
30	4.49	4.52	4.70	5.25	5.84
	4.56				

ตารางที่ จ.13 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Degradation test การย่อยสลาย EE2 โดยเติมแอมโมเนีย 3 ครั้งแบบไม่ต่อเนื่องจากถึงปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Degradation test												ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย				ไนโตรท์				ไนเตรต				
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		
0	107.76	109.62	1.86		0.73	1.14	0.42		4.51	4.67	0.16		115.44
	111.49			1.56				4.83					
1	96.22	96.22	0.00		3.22	3.32	0.10		13.13	11.53	1.59		111.07
				3.43				9.94					
3	60.54	67.37	6.83		28.57	32.57	4.00		29.71	29.07	0.64		129.01
	74.21			36.57				28.44					
5	23.26	22.10	1.15		43.11	43.11	0.00		68.31	69.43	1.12		134.64
	20.95							70.54					
7	2.41	2.41	0.00		63.37	63.37	0.00		68.95	68.63	0.32		134.41
								68.31					
9	0.83	0.83	0.00		37.40	37.40	0.00		71.82	75.96	4.15		114.20
								80.11					
13	0.41	0.34	0.07		0.10	0.31	0.42		74.05	75.01	0.96		75.66
	0.27			0.73				75.96					
13	97.28	97.11	0.18		<LOD	<LOD	0.00		78.84	76.28	2.55		173.18
	96.93			<LOD				73.73					

ตารางที่ จ.13 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Degradation การย่อยสลาย EE2 โดยเติมแอมโมเนีย 3 ครั้งแบบไม่ต่อเนื่องจากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ต่อ)

วันที่	Degradation test												ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนโตรที่			ไนเตรต						
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	
15	65.51	76.96	11.45	10.39	10.28	0.10	87.13	87.13	0.00				174.37
	88.41			10.18									
17	75.45	75.54	0.09	11.43	10.49	0.93	89.36	91.44	2.07				177.46
	75.63			9.56			93.51						
19	63.91	61.25	2.66	11.43	11.69	0.26	119.35	119.35	0.00				192.28
	58.58			11.95									
21	8.56	8.56	0.00	2.08	2.08	0.00	153.16	153.00	0.16				163.63
							152.84						
23	3.20	3.11	0.09	1.56	1.56	0.00	160.18	158.58	1.59				163.25
	3.02						156.99						
28	<LOD	<LOD	0.00	0.14	0.12	0.02	158.58	156.19	2.39				156.32
	<LOD			0.11			153.80						
28	95.52	96.09	0.57	0.17	0.19	0.02	163.05	162.25	0.80				258.53
	96.66			0.21			161.45						
30	64.88	66.73	1.84	0.47	0.52	0.05	199.41	196.86	2.55				264.11
	68.57			0.57			194.31						

ตารางที่ จ.13 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Degradation การย่อยสลาย EE2 โดยเติมแอมโมเนีย 3 ครั้งแบบไม่ต่อเนื่องจากถึงปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ต่อ)

วันที่	Degradation test												ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนโตรที่			ไนเตรต			ไนเตรต			
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	
32	23.14	21.15	1.99	<LOD	<LOD	0.00	191.75	188.41	3.35				
	19.17			<LOD			185.06						
35	0.28	0.25	0.03	<LOD	<LOD	0.00	221.10	223.81	2.71				
	0.22			<LOD			226.52						
39	0.01	0.08	0.07	<LOD	<LOD	0.00	227.80	227.80	0.00				
	0.15			<LOD									

ตารางที่ จ.14 ผลรวมโน้ตโรเจนชุดการทดลอง AOB inhibition test การย่อยสลาย EE2 โดยเติมแอมโมเนีย 3 ครั้งแบบไม่ต่อเนื่องจากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมโน้ตโรเจนต่อโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมโน้ตโรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	AOB inhibition test										ผลรวมโน้ตโรเจน
	แอมโมเนีย			โน้ตโรท			โน้ตโรต			ผลรวมโน้ตโรเจน	
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		
0	121.78	118.23	3.55	<LOD	<LOD	0.00	0.48	0.33	0.16	118.61	
	114.68			<LOD			0.17				
13	118.59	117.70	0.89	<LOD	<LOD	0.00	6.86	6.72	0.14	124.45	
	116.81			<LOD			6.58				
30	97.64	96.75	0.89	<LOD	<LOD	0.00	3.04	2.99	0.05	100.19	
	95.86			<LOD			2.94				
39	72.96	72.96	0.00	<LOD	<LOD	0.00	6.58	6.90	0.32	80.31	
				<LOD			7.22				

ตารางที่ จ.15 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Abiotic test การย่อยสลาย EE2 โดยเติมแอมโมเนีย 3 ครั้งแบบไม่ต่อเนื่องจากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Abiotic test										ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนไตรท์			ไนเตรต			ผลรวมไนโตรเจน	
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		
0	109.36 101.19	105.27	4.08	0.06	0.06	0.00	0.01 6.39	3.20	3.19	108.53	
13	94.09 79.89	86.99	7.10	<LOD <LOD	<LOD	0.00	1.22 4.41	2.82	1.59	89.84	
30	86.99 78.82	82.90	4.08	<LOD <LOD	<LOD	0.00	4.09 5.18	4.63	0.54	87.58	
39	74.03 93.56	83.79	9.76	<LOD <LOD	<LOD	0.00	5.02 4.79	4.91	0.11	88.74	

ตารางที่ ฉ.16 การย่อยสลาย EE2 โดยเติมแอมโมเนีย 3 ครั้งแบบไม่ต่อเนื่องจากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนีย เริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Degradation test		Y error bar	AOB inhibition test
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย		
0	7.42	7.33	0.08	4.85
	7.25			
7	4.91	5.35	0.44	-
	5.79			
13	5.24	5.20	0.04	6.20
	5.16			
21	5.18	5.18	0.00	-
	5.18			
28	4.92	5.15	0.23	-
	5.38			
32	5.33	5.10	0.23	-
	4.87			
39	4.94	4.94	0.00	5.07

ตารางที่ ๑.17 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Degradation test ของการย่อยสลาย EE2 โดยเติมแอมโมเนีย 3 ครั้งแบบไม่ต่อเนื่องจากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Degradation test												ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนโตรที่			ไนเตรต			ไนเตรต			
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	
0	69.72	68.12	1.60	<LOD	<LOD	0.00	0.67	0.35	0.32				68.47
	66.51			<LOD			0.03						
1	63.12	61.93	1.19	2.01	2.26	0.25	19.17	10.72	8.45				74.91
	60.74			2.51			2.26						
2	57.54	51.08	6.46	14.74	13.24	1.50	10.88	13.43	2.55				77.74
	44.62			11.73			15.98						
3	47.73	40.68	7.05	11.27	17.45	6.18	37.99	23.16	14.83				81.28
	33.62			23.63			8.32						
5	0.67	0.67	0.00	41.10	41.10	0.00	30.65	23.95	6.70				65.72
							17.26						
7	0.28	0.28	0.00	11.33	16.59	5.26	24.91	41.82	16.91				58.69
				21.86			58.72						
9	<LOD	<LOD	0.00	0.78	0.69	0.08	58.72	58.72	0.00				59.41
	<LOD			0.61									

ตารางที่ จ.17 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Degradation test ของการย่อยสลาย EE2 โดยเติมแอมโมเนีย 3 ครั้งแบบไม่ต่อเนื่องจากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีค่าความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ต่อ)

วันที่	Degradation test												ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย				ไนโตรเจน				ไนเตรต				
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	
9	91.98	94.32	2.34	0.61	0.31	0.30	51.70	56.49	4.78	151.12			
	96.66			0.01			61.27						
10	64.77	65.83	1.05	14.51	14.54	0.03	59.04	54.89	4.15	135.26			
	66.88			14.57			50.75						
11	14.75	14.80	0.05	46.74	50.44	3.69	134.00	120.92	13.08	186.16			
	14.84			54.13			107.85						
13	0.19	0.19	0.00	6.76	3.71	3.04	134.00	128.42	5.58	132.32			
				0.67			122.84						
15	0.41	0.36	0.05	0.34	0.34	0.00	127.62	125.23	2.39	125.93			
	0.31						122.84						
15	50.11	51.12	1.01	0.57	0.57	0.00	128.90	141.18	12.28	192.88			
	52.13						153.46						
17	7.79	6.14	1.65	8.69	11.88	3.19	183.76	175.47	8.29	193.49			
	4.49			15.07			167.18						
25	0.09	0.14	0.05	0.31	0.31	0.00	173.24	171.80	1.44	172.25			
	0.18						170.37						

ตารางที่ ๑.18 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง AOB inhibition test ของการย่อยสลาย EE2 โดยเติมแอมโมเนีย 3 ครั้งแบบไม่ต่อเนื่องจากถังปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	AOB inhibition test										ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนโตรเจน			ไนเตรต			ผลรวมไนโตรเจน	
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		
0	70.36	70.04	0.32	<LOD	<LOD	0.00	0.09	0.41	0.32	70.458	
	69.72			<LOD			0.73				
10	62.57	58.91	3.66	<LOD	<LOD	0.00	7.75	5.83	1.91	64.749	
	55.25			<LOD			3.92				
15	54.05	52.91	1.15	<LOD	<LOD	0.00	9.02	9.34	0.32	62.257	
	51.76			<LOD			9.66				
25	51.21	50.71	0.50	<LOD	<LOD	0.00	10.30	5.51	4.78	56.230	
	50.21			<LOD			0.73				

ตารางที่ จ.19 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Abiotic test ของการย่อยสลาย EE2 โดยเติมแอมโมเนีย 3 ครั้งแบบไม่ต่อเนื่องจากถึงปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Abiotic test												ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย				ไนเตรท				ไนเตรต				
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	
0	65.32	65.00	0.32	<LOD	<LOD	0.00	9.09	5.10	3.99	70.11			
	64.68			<LOD			1.12						
10	64.04	63.72	0.32	<LOD	<LOD	0.00	16.43	13.08	3.35	76.80			
	63.40			<LOD			9.73						
15	62.76	62.44	0.32	<LOD	<LOD	0.00	5.58	7.66	2.07	70.10			
	62.12			<LOD			9.73						
25	61.48	61.15	0.32	<LOD	<LOD	0.00	0.56	5.15	4.58	66.31			
	60.83			<LOD			9.73						

ตารางที่ จ.20 ผลการย่อยสลาย EE2 แต่ละชุดการทดลองโดยเติมแอมโมเนีย 3 ครั้งแบบต่อเนื่องจากถึงปฏิกรณ์ 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Degradation test		AOB inhibition test control	Heterotroph test	Abiotic test
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย Y error bar			
0	6.82	0.18	4.94	5.17	4.78
	6.46				
5	5.22	0.12	-	-	-
	5.47				
10	4.84	0.08	5.26	-	-
	4.67				
15	4.34	0.05	-	-	-
	4.43				
25	4.42	0.29	5.54	5.28	5.28
	3.84				

ตารางที่ จ.21 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Degradation test การย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา(ชั่วโมง)	Degradation test												ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย				ไนโตรที่				ไนเตรต				
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	
0	4.85	4.80	0.05	0.05	0.03	0.02	0.99	0.86	0.13	5.70			
	4.75		0.01				0.73						
6	2.57	2.55	0.02	0.67	0.66	0.00	0.82	0.64	0.18	3.85			
	2.52						0.47						
12	1.97	2.27	0.31	0.78	0.89	0.11	6.66	5.06	1.59	8.22			
	2.58			1.00			3.47						
15	1.60	1.61	0.01	0.24	0.24	0.01	6.85	6.42	0.43	8.27			
	1.63			0.23			5.99						
24	1.08	1.08	0.00	<LOD	<LOD	0.00	6.69	6.69	0.00	7.77			
	1.09			<LOD									
72	0.20	0.15	0.05	<LOD	<LOD	0.00	3.85	5.62	1.77	5.78			
	0.10			<LOD			7.39						
120	0.05	0.05	0.00	<LOD	<LOD	0.00	6.30	6.75	0.45	6.80			
				<LOD			7.20						

ตารางที่ ๑.22 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง AOB inhibition test การย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา(ชั่วโมง)	AOB inhibition test										ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย		ไนไตรท์				ไนเตรต				
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		
0	5.20	5.18	0.02	<LOD	<LOD	0.00	1.24	1.08	0.16	6.27	
	5.17			<LOD			0.92				
9	4.79	4.84	0.05	<LOD	<LOD	0.00	1.50	2.45	0.96	7.30	
	4.90			<LOD			3.41				
15	5.46	5.46	0.00	<LOD	<LOD	0.00	1.85	1.70	0.14	7.17	
				<LOD			1.56				
120	4.80	4.64	0.16	<LOD	<LOD	0.00	2.39	2.23	0.16	6.88	
	4.49			<LOD			2.07				

ตารางที่ ๑.23 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Abiotic test การย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา(ชั่วโมง)	Abiotic test												ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย				ไนไตรท์				ไนเตรต				
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	
0	5.17	5.08	0.09	<LOD	<LOD	0.00	0.99	0.99	0.00	0.99	0.00	6.07	
	4.98			<LOD									
9	5.17	5.19	0.02	<LOD	<LOD	0.00	1.15	1.31	0.16	1.31	0.16	6.50	
	5.21			<LOD			1.47						
15	4.80	4.80	0.00	<LOD	<LOD	0.00	1.28	1.37	0.10	1.37	0.10	6.17	
				<LOD			1.47						
120	4.67	4.73	0.06	<LOD	<LOD	0.00	2.20	2.20	0.00	2.20	0.00	6.94	
	4.80			<LOD									

ตารางที่ จ.24 ผลการย่อยสลาย EE2 แต่ละชุดการทดลองจากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร มีความเข้มข้นแอมโมเนีย 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา(ชั่วโมง)	Degradation test			AOB inhibition test
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	
0	2.38	2.34	0.04	2.36
	2.31			
15	1.91	2.09	0.18	2.07
	2.26			
72	2.00	1.89	0.10	-
	1.79			
120	2.26	2.03	0.23	2.09
	1.80			

ตารางที่ จ.25 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Degradation test การย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา(ชั่วโมง)	Degradation test												ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย				ไนเตรท์				ไนเตรต				
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		
0	4.89	4.90	0.01		<LOD	<LOD	0.00		0.24	0.61	0.37		5.55
	4.91			<LOD				0.98					
6	3.39	3.64	0.24		0.29	0.26	0.03		0.57	0.73	0.16		4.63
	3.88			0.23				0.89					
12	3.06	3.04	0.02		0.90	0.74	0.15		1.75	2.71	0.96		6.49
	3.02			0.59				3.67					
15	3.21	2.88	0.32		0.24	0.24	0.01		1.75	2.71	0.96		5.83
	2.56			0.23				3.67					
24	1.64	1.64	0.00		<LOD	<LOD	0.00		6.22	6.22	0.00		7.86
				<LOD									
72	0.80	0.90	0.10		<LOD	<LOD	0.00		6.73	6.25	0.48		7.15
	0.99			<LOD				5.77					
120	0.05	0.05	0.00		<LOD	<LOD	0.00		5.93	5.93	0.00		5.98
				<LOD									

ตารางที่ ๑.26 ผลรวมโน้ตเรจเนชันการทดลอง AOB inhibition test การย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมโน้ตเรจเนชันต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมโน้ตเรจเนชันต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา(ชั่วโมง)	AOB inhibition test												ผลรวมโน้ตเรจเนชัน
	แอมโมเนีย				โน้ตเรจ				โน้ตเรต				
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		
0	5.23	5.22	0.01		<LOD	<LOD	0.00		2.08	1.11	0.97		
	5.21			<LOD				0.13					
9	6.10	5.70	0.40		<LOD	<LOD	0.00		1.60	1.26	0.33		
	5.30			<LOD				0.93					
15	5.15	5.41	0.26		<LOD	<LOD	0.00		0.74	0.66	0.08		
	5.67			<LOD				0.58					
120	5.17	5.13	0.04		<LOD	<LOD	0.00		1.28	1.28	0.00		
	5.09			<LOD									

ตารางที่ จ. 27 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Abiotic test การย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา(ชั่วโมง)	Abiotic test										ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนไตรท์			ไนเตรต			ผลรวมไนโตรเจน	
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		
0	5.45	5.36	0.09	<LOD	<LOD	0.00	0.09	0.09	0.00	5.45	
	5.27			<LOD			0.09				
9	5.49	5.49	0.00	<LOD	<LOD	0.00	1.27	0.92	0.35	6.41	
				<LOD			0.57				
15	5.11	5.30	0.19	<LOD	<LOD	0.00	0.38	0.47	0.10	5.78	
	5.49			<LOD			0.57				
120	4.94	4.86	0.07	<LOD	<LOD	0.00	1.30	1.36	0.06	6.23	
	4.79			<LOD			1.43				

ตารางที่ ๑.28 ผลการย่อยสลาย EE2 แต่ละชุดการทดลองจากถึงปฏิกรณ์ 420 มิลลิลิตรไม่ไตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 5 มิลลิลิตรไม่ไตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิลิตรต่อลิตร

เวลา(ชั่วโมง)	Degradation test		
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar
0	6.83	6.56	0.27
	6.28		
15	5.43	5.40	0.03
	5.37		
72	5.38	5.35	0.03
	5.32		
120	4.84	5.22	0.38
	5.59		

ตารางที่ จ.29 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Degradation test การย่อยสลาย EE2 จากถึงปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Degradation test												ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนโตรเจน			ไนเตรต			ไนเตรต			
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	
0	105.27	104.83	0.44	<LOD	<LOD	0.00	8.87	4.40	4.47	109.23			
	104.38			<LOD			-0.06						
1	83.79	87.34	3.55	13.19	13.14	0.05	9.51	7.75	1.75	108.24			
	90.89			13.09			6.00						
3	61.42	61.07	0.36	27.43	30.23	2.80	34.70	33.43	1.28	124.73			
	60.71			33.04			32.15						
5	22.72	32.04	9.32	27.01	26.59	0.42	74.26	79.04	4.78	137.68			
	41.36			26.18			83.83						
7	1.03	1.52	0.49	27.01	27.01	0.00	75.53	75.53	0.00	104.06			
	2.01												
10	0.67	0.67	0.00	<LOD	<LOD	0.00	82.55	78.88	3.67	79.56			
				<LOD			75.22						
16	0.37	0.20	0.17	<LOD	<LOD	0.00	79.04	79.04	0.00	79.25			
	0.04			<LOD									

ตารางที่ ๓.30 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง AOB inhibition test การย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	AOB inhibition test										ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนเตรท			ไนเตรต			Y error bar	
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		
0	92.67	92.49	0.18	0.05	0.05	0.00	1.74	1.77	0.03	94.31	
	92.31						1.80				
5	93.73	93.91	0.18	0.03	0.03	0.00	0.01	0.48	0.46	94.42	
	94.09						0.94				
10	84.68	84.06	0.62	0.11	0.11	0.00	1.96	2.26	0.30	86.43	
	83.44						2.57				
16	88.76	89.47	0.71	0.07	0.07	0.00	3.75	3.75	0.00	93.29	
	90.18										

ตารางที่ ๑.31 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Abiotic test การย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Abiotic test										ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนโตรท์			ไนเตรต			ผลรวมไนโตรเจน	
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		
0	93.56	92.93	0.62	0.06	0.068	0.00	0.75	0.96	0.21	93.96	
	92.31						1.17				
5	85.21	85.03	0.18	0.04	0.04	0.00	1.01	0.61	0.40	85.69	
	84.86						0.21				
10	66.39	66.04	0.36	0.11	0.11	0.00	4.23	4.23	0.00	70.38	
	65.68										
16	71.01	70.83	0.18	0.05	0.05	0.00	5.19	4.53	0.65	75.42	
	70.66						3.88				

ตารางที่ จ. 32 ผลการย่อยสลาย EE2 แต่ละชุดการทดลองจากถึงปฏิกรณ์ 420 มิลลิลิตรในไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิลิตรในไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 2 มิลลิลิตรต่อลิตร

วันที่	Degradation test		
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar
0	2.42	2.40	0.02
	2.37		
5	2.19	2.11	0.09
	2.02		
10	1.92	1.90	0.02
	1.88		
16	1.88	1.87	0.01
	1.85		

ตารางที่ ๓.33 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Degradation test การย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Degradation test												ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนโตรที่			ไนเตรต						
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	
0	107.76	109.62	1.86	0.73	1.14	0.42	4.51	4.67	0.16	4.83			115.44
	111.49			1.56									
1	96.22	96.22	0.00	3.22	3.32	0.10	13.13	11.53	1.59	9.94			111.07
				3.43									
3	60.54	67.37	6.83	28.57	32.57	4.00	29.71	29.07	0.64	28.44			129.01
	74.21			36.57									
5	23.26	22.10	1.15	43.11	43.11	0.00	68.31	69.43	1.12	70.54			134.64
	20.95												
7	2.41	2.41	0.00	63.37	63.37	0.00	68.95	68.63	0.32	68.31			134.41
9	0.83	0.83	0.00	37.40	37.40	0.00	71.82	75.96	4.15	80.11			114.20
13	0.41	0.34	0.07	0.10	0.31	0.42	74.05	75.01	0.96	75.96			75.66
	0.27			0.73									

(ตารางนี้เป็นส่วนหนึ่งของตารางที่ ๓.5)

ตารางที่ ๓.34 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง AOB inhibition test การย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	AOB inhibition test										ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนโตรที่			ไนเตรต			Y error bar	
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		
0	121.78	118.23	3.55	0.05	0.05	0.00	0.48	0.33	0.16	118.61	
	114.68						0.17				
13	118.59	117.70	0.89	0.03	0.03	0.00	6.86	6.72	0.14	124.45	
	116.81						6.58				

(ตารางนี้เป็นส่วนหนึ่งของตารางที่ ๓.๖)

ตารางที่ ๓.35 ผลรวมไนโตรเจนชุดการทดลอง Abiotic test การย่อยสลาย EE2 จากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Abiotic test										ผลรวมไนโตรเจน
	แอมโมเนีย			ไนโตรที่			ไนเตรต			Y error bar	
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	Y error bar		
0	109.36	105.27	4.08	0.06	0.06	0.00	0.01	3.20	3.19	108.53	
	101.19			0.06			6.39				
13	94.09	86.99	7.10	0.04	0.04	0.00	1.22	2.82	1.59	89.84	
	79.89			0.04			4.41				

(ตารางนี้เป็นส่วนหนึ่งของตารางที่ ๓.7)

ตารางที่ ๓.36 ผลการย่อยสลาย EE2 แต่ละชุดการทดลองจากถังปฏิกรณ์ 420 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรโดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้น EE2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	Degradation test		AOB inhibition test
	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย Y error bar	
0	7.42	7.33	0.08
	7.25		
7	4.91	5.35	0.44
	5.79		
13	5.24	5.20	0.04
	5.16		

(ตารางนี้เป็นส่วนหนึ่งของตารางที่ ๓.8)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายรัตนรัตน์ แจ่มใจ เกิดเมื่อวันที่ 27 ธันวาคม พ.ศ.2529 ที่จังหวัดนครสวรรค์ สำเร็จ การศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจาก โรงเรียนตาคลีประชาสรรค์ เมื่อปี พ.ศ.2547 สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อ ปี พ.ศ.2551 และเข้ารับการศึกษาระดับปริญญาโทวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ.2555

การเผยแพร่วิทยานิพนธ์

การจัดประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 38 (The National Graduate Research Conference) วันที่ 19-20 กุมภาพันธ์ 2559 ณ อาคารเอกาทศรถ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย หัวข้อเรื่อง การย่อยสลาย 17 α -เมทิลเทส โทสเตอโรนด้วยตะกอนที่มีประชากรของจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิง