รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแยกและคัดเลือกเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็ม สำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้ง

Screening and Isolation of Salt-tolerant Heterotrophic Nitrifying Bacteria for Shrimp Aquaculture

ดร.ยุทธพงษ์ สังข์น้อย
ผศ.ดร.สมพงศ์ โอทอง

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประจำปีงบประมาณ 2557 รหัสโครงการ NAT570385S

1. **ชื่อชุดโครงการ** -
2. **ชื่อโครงการเดี่ยว**

   การแยกและคัดเลือกเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มสำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้ง

   Screening and isolation of salt-tolerant heterotrophic nitrifying bacteria for shrimp aquaculture
3. **คณะนักวิจัย และหน่วยงานต้นสังกัด**

   3.1 ดร.ยุทธพงษ์ สังข์น้อย

   สังกัด ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

   3.2 ผศ.ดร.สมพงศ์ โอทอง

   สังกัด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

4. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากงบเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2557 ภายใต้รหัสโครงการ NAT570385S คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภัทรวุฒิฟาร์มและบริษัทศรีสุบรรณฟาร์ม จำกัด ที่เอื้อเฟื้อและอนุญาตให้เก็บตัวอย่างมาศึกษา ขอขอบคุณนางสาวสุนิภา จันทร์แก้ว บัณฑิตศึกษาผู้รับทุนเชื่อมโยงในโครงการนี้ และขอขอบคุณภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติที่สนับสนุนอุปกรณ์ เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ และห้องปฏิบัติการสำหรับการศึกษาวิจัยครั้งนี้

5. บทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในระบบการเลี้ยงกุ้ง โดยคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างดินและน้ำที่เก็บจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารสูตรดัดแปลง Pep-Beef-AOB ที่เติมแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และเกลือ เพื่อเพิ่มปริมาณของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรีย ผลการคัดแยกและจัดจำแนกเชื้อพบว่าสามารถแยกเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดแอมโมเนียได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม ได้แก่ *Halomonas* spp., *Psychrobacter* sp., *Alcaligenes* spp., *Bacillus* sp. และ *Oceanobacillus* sp. โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *Alcaligenes* sp. SRNB23 และ SRNB35 ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียได้มากกว่า 90% โดยมีค่าแอมโมเนียเริ่มต้นประมาณ 800 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เมื่อศึกษาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสม พบว่า sodium citrate และ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ SRNB23 และ SRNB35 ตามลำดับ ขณะที่ ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมของเชื้อทั้งสองชนิด และเชื้อ SRNB23 และ SRNB35 มีค่า C/N ratio ที่เหมาะสมเท่ากับ 4 และ 2 ตามลำดับ เมื่อศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนีย พบว่าเชื้อผสม (SRNB23:SRNB35) มีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียได้ดีกว่าเชื้อเดี่ยว และสัดส่วนเชื้อผสม 30:70 เป็นสัดส่วนที่ดีที่สุดในการกำจัดแอมโมเนียทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อและในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งที่ศึกษาในห้องปฏิบัติการ โดยสามารถกำจัดแอมโมเนียได้มากกว่า 60% ทั้งนี้เชื้อทั้งสองสายพันธุ์อาจมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อสำหรับการบำบัดแอมโมเนียในระบบการเลี้ยงกุ้งได้ในอนาคต

Abstract

This study aimed to isolate the halotolerant heterotrophic nitrifying bacteria that capable to eliminate toxic inorganic nitrogen such as ammonia, nitrite and nitrate in shrimp culture system. Heterotrophic nitrifying bacteria were isolated from soil and water collected from shrimp farms. Samples were cultivated and enriched into modified Pep-Beef-AOB medium contained carbon and nitrogen sources as well as salt. The result showed that five groups of heterotrophic nitrifying bacteria with high efficiency of ammonium removal were obtained. That five bacteria were identified as *Halomonas* spp., *Psychrobacter* sp., *Alcaligenes* spp., *Bacillus* sp. and *Oceanobacillus* sp. Noteworthy, *Alcaligenes* sp. strains SRNB23 and SRNB35 showed a very high of ammonium removal more than 90% (initial ammonia concentration about 800 mg-N/ml). The result showed that sodium citrate and sucrose were optimal carbon sources of strains SRNB23 and SRNB35, respectively. While ammonium sulfate was an optimal nitrogen source of both strains. The optimal C/N ratios of strains SRNB23 and SRNB35 were 4 and 2, respectively. Result exhibited that using of mixed culture (SRNB23:SRNB35) had an ammonia removal ability more than using of a single species. Moreover, the optimal ratio of 30:70 (SRNB23:SRNB35) had a highest ammonia removal efficiency (>60%) for treating of culturing medium and shrimp cultured wastewater in laboratory. This might suggests that these two heterotrophic nitrifying bacteria have a potential to develop as bacterial seed for ammonia treating in shrimp culture system further.

6. บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

6.1 บทนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งทะเลของประเทศไทย โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงกุ้งมีการเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เพราะกุ้งเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีราคาสูง และเป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศ สร้างมูลค่าการส่งออกให้กับประเทศไทยปีละนับแสนล้านบาท โดยระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งในปัจจุบันเป็นระบบพัฒนา มีการใส่ปัจจัยการผลิต เช่น จำนวนลูกกุ้ง และอาหาร อย่างเต็มที่ เพื่อให้ได้ผลผลิตกุ้งจำนวนมาก อย่างไรก็ตาม ระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งดังกล่าวมักประสบปัญหาการสะสมของของเสียในปริมาณมากจากการขับถ่ายและเศษอาหารที่กุ้งกินเหลือ โดยเฉพาะสารอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนีย (ammonia: NH_3) ไนไตรท์ (nitrite: NO_2^-) และไนเตรท (nitrate: NO_3^-) ที่เมื่อมีความเข้มข้นสูง ส่งผลให้กุ้งมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ กินอาหารลดลง เครียด อ่อนแอ ภูมิคุ้มกันต่ำ และติดเชื้อโรคได้ง่าย นอกจากนี้ยังส่งผลต่อการลอกคราบ และการใช้ออกซิเจนของกุ้งอีกด้วย จากปัญหาดังกล่าวการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในแหล่งเลี้ยงกุ้งจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง โดยเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Heterotrophic nitrifying bacteria) เป็นกลุ่มแบคทีเรียในแหล่งน้ำที่มีความสามารถในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนด้วยกระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification) โดยการเปลี่ยนแอมโมเนียที่มีความเป็นพิษสูงไปเป็นไนไตรท์ และเปลี่ยนไนไตรท์เป็นไนเตรทซึ่งมีความเป็นพิษต่ำ นอกจากนี้เฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียหลายชนิดยังเจริญเติบโตได้ดี มีความสามารถในการแข่งขันสูง ทนต่อแอมโมเนียความเข้มข้นสูง และทนเค็มได้ดี จึงมีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในระบบการเพาะเลี้ยงกุ้ง

ดังนั้น การแยกและคัดเลือกเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจน จึงเป็นสิ่งที่ท้าทายอย่างยิ่ง ทั้งนี้เพื่อให้ได้มาซึ่งสายพันธุ์กล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่มีความสามารถโดดเด่น ซึ่งอาจเป็นเทคโนโลยี หรือผลิตภัณฑ์หนึ่งที่จะช่วยส่งเสริมอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศไทยให้มีความยั่งยืนได้ในอนาคต

6.2 วัตถุประสงค์

- เพื่อแยกและคัดเลือกเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจน
- เพื่อจัดจำแนกเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มที่คัดแยกได้
- เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจน
- เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตกล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาใช้ในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในระบบการเพาะเลี้ยงกุ้ง

6.3 สรุป

งานวิจัยนี้ได้คัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียสำหรับใช้ในการบำบัดแอมโมเนียในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งต้องเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการทนเค็มได้ด้วย จากการคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างดินและน้ำจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้ง พบว่าสามารถแยกเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มที่มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้สูงทั้งหมดจำนวน 5 กลุ่ม ได้แก่ *Halomonas* spp., *Psychrobacter* sp., *Alcaligenes* spp., *Bacillus* sp. และ *Oceanobacillus* sp. โดยเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 5 กลุ่มที่แยกได้นี้ มีลักษณะเด่น 3 ประการ คือ 1. เป็นเชื้อที่สามารถใช้สารอินทรีย์ได้ ทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดี และมีความสามารถในการแข่งขันสูง 2. มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียในสภาวะที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงได้ดี และ 3. มีความสามารถในการทนเค็ม ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวเป็นคุณสมบัติที่ต้องการสำหรับนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง ดังนั้นเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่คัดแยกได้นี้ อาจมีความเหมาะสมในการพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อสำหรับประยุกต์ใช้ในการบำบัดแอมโมเนียในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียเชื้อผสมสูงกว่าเชื้อเดี่ยว ดังนั้นกล้าเชื้อที่จะพัฒนาขึ้นในอนาคตควรเป็นผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อผสมหรือเชื้อรวม เพื่อประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียที่ดีกว่า อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ยังไม่ได้ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียในบ่อเพาะเลี้ยงจริงขณะทำการเลี้ยงกุ้ง ซึ่งมีปัจจัยที่แตกต่างจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ เช่น การให้อาหาร และการขับถ่ายของกุ้ง เป็นต้น และยังไม่ได้ศึกษารูปแบบที่เหมาะสมของการผลิตผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อ ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจและต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

7. ภาคผนวก

7.1 แนบสำเนาบทความที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว

Chankaew, S., O-Thong, S. and Sangnoi, Y. 2017. Nitrogen removal efficiency of salt-tolerant heterotrophic nitrifying bacteria. Chiang Mai J. Sci. 44 (X): 1-10. (*In press*).

Indexed in ISI

Sangnoi, Y., Chankaew, S. and O-Thong, S. 2017. Indigenous *Halomonas* spp., the potential nitrifying bacteria for saline ammonium waste water treatment. Pak. J. Bio. Sci. 20: 52–58.

Indexed in ISI

7.2 ผลการวิจัยส่วนที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์หรือตีพิมพ์ไม่ได้ แต่อยู่ในวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยประกอบไปด้วย

7.2.1 วิธีการ

1. การแยกและจัดจำแนกเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็ม

คัดแยกเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียชอบเค็มจากตัวอย่างน้ำและดินในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งจากบริษัทศรีสุบรรณฟาร์ม จำกัด จ.สุราษฎร์ธานี โดยนำตัวอย่างดังกล่าวมาแยกเชื้อด้วยอาหารเหลวสูตรดัดแปลง Pep-Beef-AOB (modified Pep-Beef-AOB medium) ซึ่งประกอบด้วย peptone 5 g, beef extract 3 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0 g, K_2HPO_4 0.75 g, NaH_2PO_4 0.25 g, $MgSO_4$ 0.03 g, $MnSO_4$ 0.01 g, sodium citrate 17.8054 g, sea salt 20 g, agar 15 g, H_2O 1000 ml, pH 7.0 (ดัดแปลงจาก Yang *et al*., 2011; Lu *et al*., 2012) ที่อุณหภูมิ 28 ℃ เขย่าที่ 180 rpm และทุกๆ 3 วัน ทำการทดสอบความสามารถในการออกซิไดซ์ไนโตรเจน โดยวิธี Griess-Ilosvay method นำตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบที่เป็นบวก (positive) มาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ด้วยการ spread plate และ streak หลายๆ ครั้งบนอาหาร modified Pep-Beef-AOB medium (Yang *et al*., 2011; Lu *et al*., 2012) จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้มาจัดจำแนกชนิด (species) ด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA โดยใช้ universal primers 2 ชุด ได้แก่ 27F (5′-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3′) และ1492R (5’-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3’)

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกล้าเชื้อ

คัดเลือกเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดแอมโมเนียมาทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่างๆ เพื่อความเป็นไปได้ในการผลิตกล้าเชื้อ ดังนี้

2.1 แหล่งคาร์บอน (Carbon source)

ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมโดยเลี้ยงเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียในอาหารสูตรพื้นฐาน (modified Pep-Beef-AOB medium) แต่ปรับเปลี่ยนแหล่งคาร์บอน (carbon เป็น glucose, sodium acetate, sodium succinate และ sucrose โดยใช้ความเข้มข้นของคาร์บอนแต่ละชนิดเท่ากับ 0.6 M (Liang *et al*., 2011; Yang *et al*., 2011; Lu *et al*., 2012)

2.2 แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source)

ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยเลี้ยงเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียในอาหารสูตรพื้นฐาน (modified Pep-Beef-AOB medium) แต่ปรับเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source) เป็น ammonium chloride และ ammonium sulfate โดยใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนแต่ละชนิดเท่ากับ 0.2M (Liang *et al*., 2011; Yang *et al*., 2011; Lu *et al*., 2012)

2.3 สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสม

ศึกษาสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกล้าเชื้อ โดยเลี้ยงเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียในแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด โดยปรับเปลี่ยนค่าสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 0, 2, 4, 8 และ 16 ตามลำดับ (Hu *et al*., 2009; Yang *et al*., 2011; Lu *et al*., 2012)

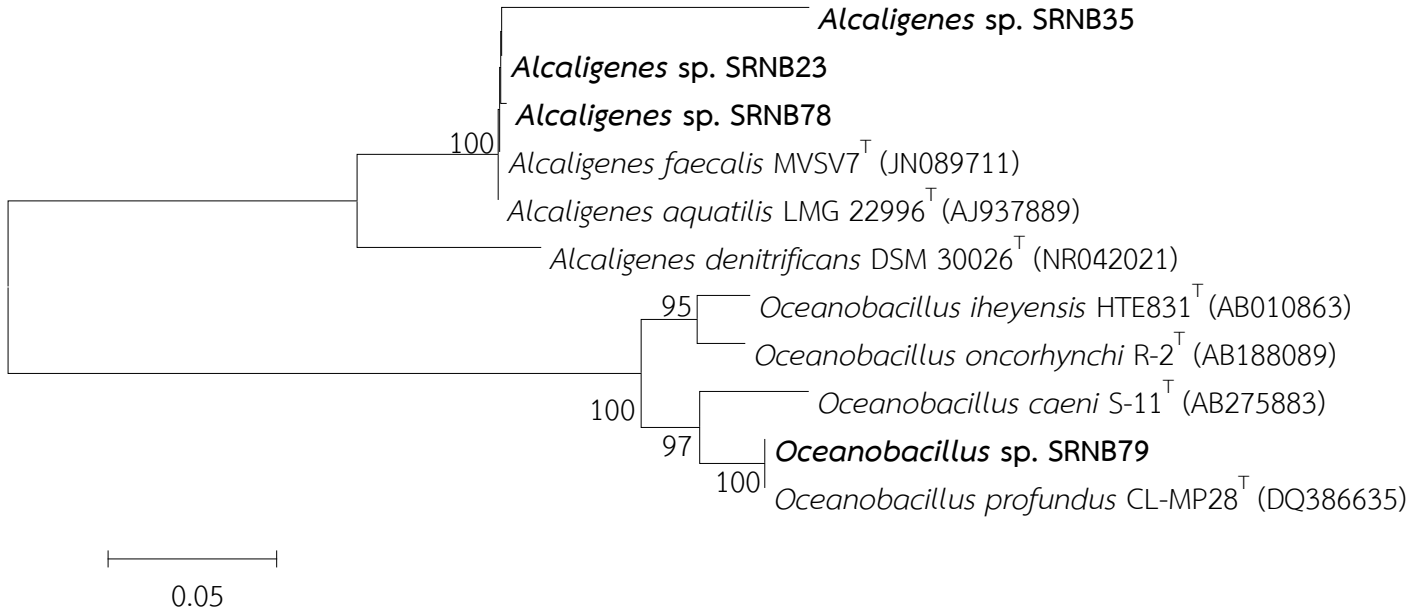
2.4 สัดส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อผสม

ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม จากนั้นนำเชื้อผสมที่มีประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียสูงสุดมาศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อผสม โดยศึกษาที่สัดส่วน 30:70, 40:60, 50:50, 60:40 และ 70:30

7.2.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกและจัดจำแนกเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็ม

จากการคัดแยกเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรีย พบว่ามีเชื้อที่แยกได้จากบริษัทศรีสุบรรณฟาร์ม จำกัด จ.สุราษฎร์ธานี จำนวน 140 ไอโซเลท และพบว่าแบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ SRNB23 SRNB35 SRNB78 และ SRNB79 ที่มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้ในระดับสูง และเมื่อนำเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลทนี้มาจัดจำแนกชนิดด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบในฐานข้อมูลของ GenBank/EMBL/DDBJ พบว่าเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ SRNB78, SRNB23 และ SRNB35 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Alcaligenes* โดยมีค่าความคล้ายคลึง (similarity) กับแบคทีเรีย *A. faecalis* ที่ 99%, 98% และ 91% ตามลำดับ ขณะที่สายพันธุ์ SRNB79 มีค่าความคล้ายคลึงกับ *Oceanobacillus profundus* ที่ 99% และเมื่อวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) พบว่าสอดคล้องกับค่าความคล้ายคลึง โดยที่ SRNB79 มีสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกันมากกับ *O. profundus* ส่วน SRNB78 และ SRNB23 มีสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *A. faecalis* และ *A. aquatilis* ขณะที่ SRNB35 มีสายวิวัฒนาการที่แยกออกจาก *A. faecalis* ค่อนข้างชัดเจน (ภาพที่ 1) ซึ่งมีแนวโน้มว่า SRNB35 อาจจะเป็นแบคทีเรียชนิด (species) หรือ สกุล (genus) ใหม่ เพราะมีค่าความคล้ายคลึงต่ำกว่า 92% (Stackebrandt and Goebel, 1994) อย่างไรก็ตาม การระบุ (propose) ชนิดของแบคทีเรียชนิดหรือสกุลใหม่นั้นจะต้องมีข้อมูลอื่นๆ ประกอบอีก เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ทั้งสาย (full length) การศึกษา DNA-DNA hybridization คุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical tests) ลักษณะของchemotaxonomic characteristics เช่น respiratory quinone, fatty acid profile และ G+C content เป็นต้น ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต



ภาพที่ 1: แผนภูมิวิวัฒนาการของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรีย โดยศึกษาจากยีน 16S rRNA (Bar=0.05)

2. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกล้าเชื้อ

2.1 แหล่งคาร์บอน (Carbon source) และแหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source) ที่เหมาะสม

คัดเลือกเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดแอมโมเนียที่แยกได้จากบริษัทศรีสุบรรณฟาร์ม จำกัด จ.สุราษฎร์ธานี จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ SRNB23 และ SRNB35 และที่แยกได้จากภัทรวุฒิฟาร์ม จ.สงขลา จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ SKNB4 (*Halomonas* sp.) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียสูง มาศึกษาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเชื้อ ผลการศึกษาพบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงสายพันธุ์ SRNB23 คือ sodium citrate ที่สามารถกำจัดแอมโมเนียได้ 82.47% ในขณะที่แหล่งคาร์บอนอื่นให้ผลการกำจัดแอมโมเนียต่ำกว่า 50% โดย sodium succinate ให้ผลในการกำจัดแอมโมเนียน้อยที่สุดเพียง 4.67% เท่านั้น (ตารางที่ 1) แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดของสายพันธุ์ SRNB35 คือ sucrose ที่สามารถกำจัดแอมโมเนียได้เท่ากับ 60.60% ซึ่งแหล่งคาร์บอนอื่นให้ผลการกำจัดแอมโมเนียต่ำกว่า 50% (ตารางที่ 2) ส่วนแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดของ SKNB4 คือ sodium succinate ที่สามารถกำจัดแอมโมเนียได้เท่ากับ 50.90% ขณะที่แหล่งคาร์บอนอื่นให้ผลการกำจัดแอมโมเนียต่ำกว่า 50% (ตารางที่ 3) จากผลการทดลองจะเห็นว่าเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียแต่ละชนิดมีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าสายพันธุ์ SRNB23 กับ SRNB35 แม้จะอยู่ในกลุ่ม *Alcaligenes* เหมือนกัน แต่ชอบแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน จึงอาจเป็นคนละชนิดหรือสกุลกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree ข้างต้น

สำหรับการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์นั้น ได้ศึกษาร่วมกับแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ กล่าวคือ ใช้ sodium citrate, sucrose และ sodium succinate เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อสายพันธุ์ SRNB23, SRNB35 และ SKNB4 ตามลำดับ จากผลการศึกษาพบว่า ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยที่ SRNB23 สามารถลดแอมโมเนียได้ 78.13% (ตารางที่ 4) SRNB35 สามารถลดแอมโมเนียได้ 56.58% (ตารางที่ 5) และ SKNB4 สามารถลดแอมโมเนียได้ 58.22% (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ SRNB23 เมื่อศึกษาเป็นระยะเวลา 5 วัน[1]

Carbon source	Initial Ammonia	Final Ammonia	Ammonia removal		Nitrite	Nitrate
(0.6M)	(mg-N/L)	(mg-N/L)	(mg-N/L)	(percent)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
Glucose	701.87±6.85^{bc}	624.85±20.10^{b}	77.02±12.11^{c}	10.98±2.35^{c}	0.03±0.00^{e}	0.00±0.00^{ns}
Sodium acetate	690.99±12.99^{c}	537.39±15.76^{bc}	153.60±16.81^{c}	22.22±2.25^{c}	0.07±0.00^{b}	0.00±0.00^{ns}
Sodium succinate	801.51±5.71^{a}	764.09±12.03^{a}	37.42±6.95^{c}	4.67±0.90^{c}	0.05±0.00^{c}	0.00±0.00^{ns}
Sucrose	781.06±32.62^{ab}	449.49±12.41^{c}	331.57±26.50^{b}	42.41±1.82^{b}	0.03±0.00^{d}	0.00±0.00^{ns}
Sodium citrate	786.28±11.41^{ab}	137.94±19.29^{d}	648.34±12.88^{a}	82.47±2.14^{a}	0.16±0.00^{a}	0.00±0.00^{ns}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

[ns] คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตารางที่ 2 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ SRNB35 เมื่อศึกษาเป็นระยะเวลา 5 วัน[1]

Carbon source	Initial Ammonia	Final Ammonia	Ammonia removal		Nitrite	Nitrate
(0.6M)	(mg-N/L)	(mg-N/L)	(mg-N/L)	(percent)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
Glucose	701.87±6.85^{bc}	611.80±9.73^{a}	90.07±9.32^{e}	12.83±1.29^{c}	0.04±0.00^{d}	0.00±0.00^{ns}
Sodium Acetate	690.99±12.99^{c}	524.77±13.95^{ab}	166.22±14.46^{d}	24.05±1.89^{bc}	0.20±0.00^{b}	0.00±0.00^{ns}
Sodium succinate	801.51±5.71^{a}	596.57±17.31^{a}	204.95±11.64^{c}	25.58±1.64^{bc}	0.15±0.00^{c}	0.00±0.00^{ns}
Sucrose	781.06±32.62^{ab}	306.77±11.14^{c}	474.29±38.61^{a}	60.60±2.56^{a}	0.07±0.00^{e}	0.00±0.00^{ns}
Sodium citrate	786.28±11.41^{ab}	501.27±42.73^{b}	285.01±48.21^{b}	36.22±5.83^{b}	0.31±0.00^{a}	0.00±0.00^{ns}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

[ns] คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตารางที่ 3 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ SKNB4 เมื่อศึกษาเป็นระยะเวลา 5 วัน[1]

Carbon source	Initial Ammonia	Final Ammonia	Ammonia removal		Nitrite	Nitrate
(0.6M)	(mg-N/L)	(mg-N/L)	(mg-N/L)	(percent)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
Glucose	787.76±28.76^{a}	500.79±8.36^{b}	286.97±21.28^{b}	36.40±1.40^{b}	4.02±0.02^{a}	3.39±0.02^{a}
Sodium Acetate	757.88±18.63^{ab}	639.38±3.12^{a}	118.50±19.32^{d}	15.64±2.15^{c}	0.32±0.00^{d}	0.00±0.00^{b}
Sodium succinate	780.03±20.58^{a}	382.80±2.67^{c}	397.23±21.95^{a}	50.90±1.47^{a}	0.35±0.00^{c}	0.00±0.00^{b}
Sucrose	734.69±0.89^{b}	630.62±5.64^{a}	104.07±4.89^{d}	14.17±0.68^{c}	0.37±0.01^{c}	0.00±0.00^{b}
Sodium citrate	753.09±13.79^{ab}	499.76±4.30^{b}	253.33±17.87^{c}	33.62±1.77^{b}	0.58±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

ตารางที่ 4 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ SRNB23 โดยใช้ sodium citrate เป็นแหล่งคาร์บอน และศึกษาเป็นระยะเวลา 5 วัน[1]

Nitrogen source	Initial Ammonia (mg-N/L)	Final Ammonia (mg-N/L)	Ammonia removal		Nitrite (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)
			(mg-N/L)	(percent)		
Ammonium chloride	803.28±1.81[b]	686.98±7.15[a]	116.29±8.10[b]	14.48±1.00[b]	0.07±0.00[b]	0.00±0.00[ns]
Ammonium sulfate	810.87±16.20[a]	177.54±23.01[b]	633.33±35.15[a]	78.13±2.54[a]	0.08±0.00[a]	0.00±0.00[ns]

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P>0.05$)

[ns] คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตารางที่ 5 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ SRNB35 โดยใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน และศึกษาเป็นระยะเวลา 5 วัน [1]

Nitrogen source	Initial Ammonia	Final Ammonia	Ammonia removal		Nitrite	Nitrate
	(mg-N/L)	(mg-N/L)	(mg-N/L)	(percent)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
Ammonium chloride	846.91±27.97[a]	387.12±40.37[a]	459.76±8.20[b]	54.16±6.14[b]	0.06±0.01[c]	0.00±0.00[ns]
Ammonium sulfate	815.31±23.54[b]	357.80±35.23[b]	463.51±32.62[a]	56.58±4.51[a]	0.10±0.00[a]	0.00±0.00[ns]

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

[ns] คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตารางที่ 6 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ SKNB4 โดยใช้ sodium succinate เป็นแหล่งคาร์บอน และศึกษาเป็นระยะเวลา 5 วัน [1]

Nitrogen source	Initial Ammonia (mg-N/L)	Final Ammonia (mg-N/L)	Ammonia removal		Nitrite (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)
			(mg-N/L)	(percent)		
Ammonium chloride	809.66±4.31[a]	493.6±55.61[a]	316.01±51.31[b]	39.05±6.53[b]	0.26±0.05[b]	0.00±0.00[ns]
Ammonium sulfate	799.66±5.82[a]	334.01±25.10[b]	465.65±30.41[a]	58.22±3.42[a]	0.43±0.02[a]	0.00±0.00[ns]

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P>0.05$)

[ns] คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

2.2 สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสม

ศึกษาสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ โดย SRNB23 ใช้ sodium citrate เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าค่า C/N ratio ที่เหมาะสมที่สุดเท่ากับ 4 ซึ่งสามารถกำจัดแอมโมเนียได้สูงที่สุดเท่ากับ 75.28% รองลงมาคือ C/N ratio เท่ากับ 8 สามารถกำจัดแอมโมเนียได้ 71% ขณะที่ C/N ratio เท่ากับ 0 สามารถกำจัดแอมโมเนียได้น้อยที่สุดที่ 26.06% (ตารางที่ 7) ส่วน SRNB35 ที่ใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าค่า C/N ratio ที่เหมาะสมที่สุดเท่ากับ 2 ซึ่งสามารถกำจัดแอมโมเนียได้สูงที่สุดเท่ากับ 52% ขณะที่ค่า C/N ratio อื่นสามารถกำจัดแอมโมเนียได้น้อยกว่า 50% (ตารางที่ 8) สำหรับ SKNB4 ที่ใช้ sodium succinate เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจน มีค่า C/N ratio ที่เหมาะสมที่สุดเท่ากับ 4 โดยสามารถกำจัดแอมโมเนียได้มากที่สุดเท่ากับ 51.37% ขณะที่ค่า C/N ratio อื่นสามารถกำจัดแอมโมเนียได้น้อยกว่า 50% (ตารางที่ 9)

ทั้งนี้ Kim *et al*. (2005) รายงานค่า C/N ratio ที่เหมาะสมที่สุดของ *Bacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนตริฟิเคชัน โดยใช้ glucose เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจน ว่ามีค่าเท่ากับ 8 ซึ่งเป็นสัดส่วนที่สามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้สูงที่สุด ในขณะที่ Hu *et al*. (2009) รายงานว่าเมื่อใช้ sodium acetate เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรีย *Nitrosomonas europaea* และ *Nitrobacter* sp. พบว่าเมื่อค่า C/N ratio เพิ่มขึ้นจาก 0.5, 1, 2, 4, 8, และ 16 จะสามารถกำจัดปริมาณแอมโมเนียได้มากขึ้นตามลำดับ ในขณะที่ Yang *et al*. (2011) รายงานว่าประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของ *Bacillus subtilis* A1 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่ acetate, glucose, citrate และ succinate และมี ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจน และรายงานว่าค่า C/N ratio ระหว่าง sodium acetate และ ammonium sulfate ที่เหมาะสมที่สุดในการกำจัดแอมโมเนียของ *B. subtilis* A1 คือ 6 และ 12 ซึ่งสามารถกำจัดแอมโมเนียได้ประมาณ 60% ส่วน Lu *et al*. (2012) รายงานว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรีย *Alcaligenes* sp. W1 คือ sodium citrate ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่เฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ SRNB23

(*Alcaligenes* sp. SRNB23) มี sodium citrate เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมด้วยเช่นกัน ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดของ *Alcaligenes* sp. W1 คือ ammonium sulfate ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองครั้งนี้ที่ ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมของทั้ง 3 สายพันธุ์ สำหรับค่า C/N ratio พบว่าที่ค่าเท่ากับ 12 ทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของ *Alcaligenes* sp. W1 ดีที่สุด ขณะที่ค่า C/N ratio เท่ากับ 0.5 มีประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียต่ำที่สุด ทั้งนี้นักวิจัยกล่าวว่าปริมาณคาร์บอนเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการกำจัดแอมโมเนีย เพราะเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียจำเป็นต้องใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต เมื่อมีการเจริญเติบโตดีจะส่งผลให้ความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียดีไปด้วย

ตารางที่ 7 สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสมของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ SRNB23 โดยใช้ sodium citrate เป็นแหล่งคาร์บอน และ ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจน [1]

C/N ratio	Initial Ammonia (mg-N/L)	Final Ammonia (mg-N/L)	Ammonia removal		Nitrite (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)
			(mg-N/L)	(percent)		
0	835.8±11.50[a]	617.98±29.42[a]	217.80±27.94[b]	26.06±3.33[b]	0.16±0.00[a]	0.00±0.00[ns]
2	835.8±11.50[a]	558.82±5.87[a]	276.96±11.40[b]	33.13±1.00[b]	0.15±0.00[a]	0.00±0.00[ns]
4	835.8±11.50[a]	206.42±17.58[b]	629.36±29.06[a]	75.28±2.44[a]	0.03±0.00[b]	0.00±0.00[ns]
8	835.8±11.50[a]	234.60±36.62[b]	601.17±27.08[a]	71.96±4.02[a]	0.03±0.00[b]	0.00±0.00[ns]
16	835.8±11.50[a]	583.12±27.56[a]	252.66±38.57[b]	30.19±4.19[b]	0.05±0.00[b]	0.00±0.00[ns]

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

[ns] คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตารางที่ 8 สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสมของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ SRNB35 โดยใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน และ ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจน [1]

C/N ratio	Initial Ammonia	Final Ammonia	Ammonia removal		Nitrite	Nitrate
	(mg-N/L)	(mg-N/L)	(mg-N/L)	(percent)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
0	842.90±12.71^{a}	559.11±23.58^{a}	283.79±33.08^{b}	33.64±3.54^{b}	0.12±0.00^{a}	0.00±0.00^{ns}
2	842.90±12.71^{a}	399.57±56.40^{b}	443.33±58.74^{a}	52.58±6.80^{a}	0.07±0.03^{b}	0.00±0.00^{ns}
4	842.90±12.71^{a}	581.70±25.69^{a}	261.20±17.45^{b}	31.00±2.33^{b}	0.12±0.00^{a}	0.00±0.00^{ns}
8	842.90±12.71^{a}	607.11±4.85^{a}	235.79±14.48^{b}	27.96±1.55^{b}	0.08±0.00^{ab}	0.00±0.00^{ns}
16	842.90±12.71^{a}	630.80±13.16^{a}	212.10±18.30^{b}	25.15±1.94^{b}	0.07±0.00^{b}	0.00±0.00^{ns}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

[ns] คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

ตารางที่ 9 สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสมของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียสายพันธุ์ SKNB4 โดยใช้ sodium succinate เป็นแหล่งคาร์บอน และ ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจน [1]

C/N ratio	**Initial Ammonia**	**Final Ammonia**	**Ammonia removal**		**Nitrite**	**Nitrate**
	(mg-N/L)	**(mg-N/L)**	**(mg-N/L)**	**(percent)**	**(mg-N/L)**	**(mg-N/L)**
0	836.12±16.64[a]	524.76±25.28[b]	311.36±35.15[a]	37.20±3.73[b]	0.42±0.03[a]	0.00±0.00[ns]
2	836.12±16.64[a]	519.15±49.19[b]	316.97±33.17[a]	37.97±4.69[b]	0.74±0.00[a]	0.00±0.00[ns]
4	836.12±16.64[a]	406.74±19.78[b]	429.38±11.96[a]	51.37±1.71[a]	0.59±0.03[a]	0.00±0.00[ns]
8	836.12±16.64[a]	477.04±44.62[b]	359.09±53.08[a]	42.91±5.79[ab]	0.05±0.04[b]	0.00±0.00[ns]
16	836.12±16.64[a]	744.46±53.88[a]	91.66±44.37[b]	10.95±5.22[c]	0.07±0.02[b]	0.00±0.00[ns]

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

[ns] คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

2.3 สัดส่วนที่เหมาะสมของเชื้อผสมในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจน

คัดเลือกเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดแอมโมเนียจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ SRNB23 SRNB35 SRNB78 และ SRNB79 มาศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม พบว่า เชื้อเดี่ยว SRNB23 และ SRNB35 มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้สูงที่สุด เท่ากับ 91.75% และ 91.21% ตามลำดับ ในขณะที่ผลการศึกษาของเชื้อผสม พบว่า เชื้อผสม SRB23+SRNB35 มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้สูงที่สุด เท่ากับ 66.07% รองลงมาคือ เชื้อผสม SRNB78+SRNB79 ที่สามารถกำจัดแอมโมเนียได้ 60.16% ส่วนการผสมทั้ง 4 เชื้อ (SRB23+SRNB35+ SRNB78+SRNB79) พบว่าให้ผลการกำจัดแอมโมเนียต่ำที่สุด เท่ากับ 35.39% (ตารางที่ 10) ดังนั้นจึงได้เลือกเชื้อผสม SRNB23+SRNB35 มาศึกษาสัดส่วนเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดแอมโมเนียต่อไป โดยศึกษาสัดส่วนเชื้อที่เหมาะสมที่ 30:70, 40:60, 50:50, 60:40 และ 70:30 พบว่า สัดส่วนเชื้อที่เหมาะสมของ SRNB23:SRNB35 ในการกำจัดแอมโมเนีย คือ 30:70 ซึ่งสามารถกำจัดแอมโมเนียได้สูงสุดเท่ากับ 66.77% รองลงมา คือ สัดส่วน 50:50, 40:60, 60:40 และ 70:30 ที่สามารถกำจัดแอมโมเนียได้ 59.03%, 53.72%, 52.21% และ 47.68% ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม [1]

Isolate	Ammonia				Nitrite	Nitrate
	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	Removal (mg-N/L)	Removal (%)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
SRNB23	813.37±7.94^{c}	67.46±4.45^{g}	749.24±12.92^{b}	91.75±0.38^{a}	0.09±0.00^{cd}	0.00±0.00^{c}
SRNB35	871.70±5.24^{b}	76.59±0.17^{g}	795.11±5.41^{a}	91.21±0.07^{a}	0.04±0.00^{dg}	0.00±0.00^{c}
SRNB78	799.56±3.77^{c}	354.94±7.95^{e}	444.62±25.86^{e}	55.57±1.96^{d}	0.13±0.00^{b}	0.03±0.00^{b}
SRNB79	799.56±3.77^{c}	388.87±1.07^{d}	410.69±0.16^{e}	51.37±1.14^{e}	0.04±0.00^{fg}	0.05±0.00^{a}
SRNB23+SRNB35	858.05±0.00^{b}	291.15±1.81^{f}	566.91±1.01^{c}	66.07±2.01^{b}	0.07±0.05^{de}	0.00±0.00^{c}
SRNB23+SRNB78	957.73±6.71^{a}	467.38±0.25^{c}	490.35±6.46^{d}	51.19±0.32^{e}	0.05±0.01^{ef}	0.00±0.00^{c}
SRNB23+SRNB79	957.73±6.71^{a}	402.29±0.10^{d}	555.44±6.81^{c}	57.99±0.30^{cd}	0.20±0.02^{a}	0.00±0.00^{c}
SRNB35+SRNB78	957.73±6.71^{a}	471.11±0.96^{c}	486.62±5.75^{d}	50.81±0.24^{e}	0.03±0.00^{fg}	0.00±0.00^{c}
SRNB35+SRNB79	957.73±6.71^{a}	545.66±2.33^{b}	412.07±9.04^{e}	43.02±0.64^{f}	0.01±0.00^{g}	0.00±0.00^{c}
SRNB78+SRNB79	858.05±0.00^{b}	341.84±2.59^{e}	516.21±20.59^{d}	60.16±2.40^{c}	0.11±0.00^{bc}	0.00±0.00^{c}
SRNB23+SRNB35+ SRNB78+SRNB79	957.73±6.71^{a}	618.78±1.72^{a}	338.95±8.43^{f}	35.39±0.63^{g}	0.04±00^{fg}	0.00±0.00^{c}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

ตารางที่ 11 สัดส่วนที่เหมาะสมของเชื้อผสมสายพันธุ์ SRNB23:SRNB35 ในการกำจัดแอมโมเนีย [1]

Ratio	Ammonia				Nitrite	Nitrate
SRNB23: SRNB35	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	Removal (mg-N/L)	Removal (%)	(mg-N/L)	(mg-N/L)
30 : 70	785.78±11.50^{a}	294.36±33.06^{b}	591.42±31.32^{a}	66.77±3.61^{a}	0.18±0.02^{c}	0.00±0.00^{ns}
40 : 60	785.78±11.50^{a}	409.88±8.51^{a}	475.90±12.31^{b}	53.72±0.99^{ab}	0.25±0.03^{ab}	0.00±0.00^{ns}
50 : 50	785.78±11.50^{a}	362.97±41.36^{ab}	522.81±38.49^{ab}	59.03±4.48^{b}	0.21±0.02^{bc}	0.00±0.00^{ns}
60 : 40	785.78±11.50^{a}	463.81±63.76^{a}	462.82±69.24^{b}	52.21±7.52^{b}	0.27±0.01^{a}	0.00±0.00^{ns}
70 : 30	785.78±11.50^{a}	463.81±93.96^{a}	421.97±88.90^{b}	47.68±10.24^{b}	0.23±0.02^{ab}	0.00±0.00^{ns}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

[ns] คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสดมภ์

จากนั้นเมื่อนำเชื้อเดี่ยวสายพันธุ์ SRNB23, SRNB35 และ SKNB4 และเชื้อผสม SRNB23:SRNB35 ที่สัดส่วนที่เหมาะสม คือ 30:70 มาทดสอบเปรียบเทียบความสามารถในการบำบัดน้ำเสียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงกุ้งในห้องปฏิบัติการเป็นระยะเวลา 14 วัน โดยเติมเชื้อในวันที่ 0 และวันที่ 7 ปรากฏว่า ชุดการทดลองที่เติมเชื้อผสม SRNB23:SRNB35 ที่สัดส่วน 30:70 (Mixed) สามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้ดีที่สุด เท่ากับ 63.07 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เชื้อเดี่ยว SRNB35, SRNB23, SKNB4 และชุดควบคุม (control) ที่ไม่มีการเติมเชื้อ โดยสามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้ในวันที่ 14 เท่ากับ 57.43%, 56.45%, 56.37 % และ 23.42% ตามลำดับ (ตารางที่ 12) และพบว่าทุกชุดการทดลองมีการเพิ่มขึ้นของไนไตรท์ในระหว่างการทดลอง แต่ลดลงในวันที่ 14 ของการทดลอง ยกเว้นชุดการทดลองที่เติมเชื้อผสมระหว่าง SRNB23:SRNB35 ที่สัดส่วน 30:70 (Mixed) ที่พบว่าค่าไนไตรท์ไม่ลดลงระหว่างการทดลอง และมีปริมาณของไนไตรท์เพิ่มสูงขึ้นจากวันเริ่มต้นจนถึงวันที่ 14 ของการทดลองเท่ากับ 0.25±0.02 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร คิดเป็น 171% และพบว่าชุดการทดลองที่เติมเชื้อ SRNB35 ลดปริมาณไนไตรท์ได้ดีที่สุด เท่ากับ 34.89% (ตารางที่ 13) สำหรับปริมาณไนเตรทพบว่าชุดการทดลองที่เติมเชื้อเดี่ยว SRNB23, SRNB35 และชุดควบคุม (Control) มีการลดลงของปริมาณไนเตรท 21.14%, 10.66% และ 7.40% ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมเชื้อเดี่ยว SKNB4 และชุดการทดลองที่เติมเชื้อผสมระหว่าง SRNB23:SRNB35 ที่สัดส่วน 30:70 (Mixed) มีปริมาณไนเตรทเพิ่มขึ้น 11.30% และ 3.14% ในวันที่ 14 ของการทดลอง ตามลำดับ (ตารางที่ 14) ส่วนค่าพีเอช อุณหภูมิ และออกซิเจนละลายน้ำในทุกชุดการทดลอง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.95$) ซึ่งการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้เชื้อผสมมีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียได้ดีที่สุด และสามารถเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์และเปลี่ยนไนไตรท์ไปเป็นไนเตรทได้ตามกระบวนการไนตริฟิเคชัน ซึ่งประสิทธิภาพการใช้เชื้อผสมนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dhanasiri *et al*. (2011) ที่รายงานว่าการใช้เชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียรวม (consortia) ทำให้มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมระดับแอมโมเนียในตู้เพาะเลี้ยงปลาม้าลาย (zebrafish) นอกจากนี้ Suantika *et al*. (2013) ยังได้รายงานถึงการใช้เชื้อเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียผสมระหว่าง *Halomonas aquamarina* และ *Shewanella algae* สำหรับเป็นโปรไบโอติก (probiotic) ในบ่อเพาะฟักลูกกุ้งขาว พบว่าเชื้อผสมนี้มีความสามารถในการเพิ่มอัตราการรอดและน้ำหนักของลูกกุ้ง และยังช่วยต่อต้านแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งได้อีกด้วย

ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมในการลดปริมาณแอมโมเนียในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งระยะเวลา 14 วัน [1]

Treatment	Day	Initial Ammonia (mg-N/L)	Final Ammonia (mg-N/L)	Ammonium removal (mg-N/L)	Ammonium removal (%)
Control	Day 0	461.90±1.49^{b}			
	Day 7		388.94±7.09^{a}	72.96±5.76^{g}	15.80±1.29^{g}
	Day 14		353.73±2.82^{b}	108.17±4.02^{f}	23.42±0.81^{f}
SRNB23	Day 0	467.13±4.19^{ab}			
	Day 7		274.82±12.02^{d}	192.31±10.48^{d}	41.17±2.34^{d}
	Day 14		203.39±4.91^{f}	263.74±8.44^{b}	56.45±1.36^{b}
SRNB35	Day 0	464.82±2.46^{ab}			
	Day 7		299.88±9.58^{c}	164.94±8.27^{e}	35.49±1.86^{e}
	Day 14		197.87±3.26^{f}	266.96±5.69^{b}	57.43±0.92^{b}
SKNB4	Day 0	463.79±4.03^{ab}			
	Day 7		300.47±2.78^{c}	163.32±4.60^{e}	35.21±0.77^{e}
	Day 14		202.38±5.98^{f}	261.40±4.06^{b}	56.37±1.05^{b}
Mixed	Day 0	467.98±0.41^{a}			
	Day 7		246.04±6.79^{e}	221.94±6.58^{c}	47.43±1.43^{c}
	Day 14		172.81±2.90^{g}	295.16±3.29^{a}	63.07±0.65^{a}

หมายเหตุ Mixed = สัดส่วน 30:70 ของเชื้อ SRNB23:SRNB35

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมในการลดปริมาณไนไตรท์ในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งระยะเวลา 14 วัน [1]

Treatment	Day	Initial Nitrite (mg-N/L)	Final Nitrite (mg-N/L)	Nitrite (mg-N/L)	Nitrite (%)
Control	Day 0	0.15±0.01^{a}			
	Day 7		0.18±0.01^{c}	0.04±0.02^{cd}	24.06±12.20^{cd}
	Day 14		0.16±0.01^{cde}	0.01±0.01^{cde}	6.28±7.39^{cd}
SRNB23	Day 0	0.14±0.01^{a}			
	Day 7		0.17±0.01^{cd}	0.02±0.01^{cd}	16.91±5.34^{c}
	Day 14		0.12±0.00^{cde}	-0.02±0.01^{de}	-15.38±6.69^{de}
SRNB35	Day 0	0.14±0.00^{a}			
	Day 7		0.19±0.02^{c}	0.05±0.02^{c}	32.54±12.98^{c}
	Day 14		0.09±0.01^{e}	-0.05±0.01e	-34.89±7.41^{c}
SKNB4	Day 0	0.15±0.01^{a}			
	Day 7		0.18±0.00^{c}	0.04±0.01^{cd}	26.77±7.00^{c}
	Day 14		0.11±0.01^{de}	-0.03±0.01^{e}	-23.42±6.68^{e}
Mixed	Day 0	0.15±0.02^{a}			
	Day 7		0.25±0.11^{b}	0.10±0.10^{b}	68.06±56.77^{b}
	Day 14		0.40±0.03^{a}	0.25±0.02^{a}	171.00±14.68^{a}

หมายเหตุ Mixed = สัดส่วน 30:70 ของเชื้อ SRNB23:SRNB35

\- = การลดลงของปริมาณของไนไตรท์ที่น้อยกว่าวันเริ่มต้น

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมในการลดปริมาณไนเตรทในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งระยะเวลา 14 วัน [1]

Treatment	Day	Initial Nitrate (mg-N/L)	Final Nitrate (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)	Nitrate (%)
Control	Day 0	0.13±0.00^{ab}			
	Day 7		0.11±0.00^{b}	-0.02±0.00^{cde}	-15.86±1.31^{cd}
	Day 14		0.12±0.02^{ab}	-0.01±0.02^{abcd}	-7.40±14.42^{bc}
SRNB23	Day 0	0.13±0.01^{ab}			
	Day 7		0.11±0.01^{ab}	-0.02±0.02^{de}	-17.27±2.88^{cd}
	Day 14		0.10±0.00^{b}	-0.03±0.01^{de}	-21.14±7.63^{cd}
SRNB35	Day 0	0.14±0.01^{a}			
	Day 7		0.10±0.03^{b}	-0.04±0.02^{e}	-27.52±14.72^{d}
	Day 14		0.12±0.03^{ab}	-0.02±0.02^{bcde}	-10.66±13.65^{bcd}
SKNB4	Day 0	0.12±0.01^{ab}			
	Day 7		0.11±0.01^{ab}	-0.01±0.01^{abcd}	-8.69±11.89^{bcd}
	Day 14		0.14±0.01^{a}	0.01±0.01^{a}	11.30±5.27^{a}
Mixed	Day 0	0.12±0.01^{b}			
	Day 7		0.13±0.02^{ab}	0.01±0.2^{ab}	4.93±12.70^{ab}
	Day 14		0.12±0.00^{ab}	0.01±0.02^{abc}	3.14±3.56^{ab}

หมายเหตุ Mixed = สัดส่วน 30:70 ของเชื้อ SRNB23:SRNB35

\- = การลดลงของปริมาณของไนเตรทที่น้อยกว่าวันเริ่มต้น

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

7.2.3 เอกสารอ้างอิง

Dhanasiri, A. K. S., Kiron, V., Fernandes, J. M. O., Bergh, Ø. and Powell, M. D. 2011. Novel application of nitrifying bacterial consortia to ease ammonia toxicity in ornamental fish transport units: trials with zebrafish. J. Appl. Microbiol. 111: 278–292.

Hu, J., Li, D., Liu, Q., Tao, Y., He, X., Wang, X., Li, X. and Gao, P. 2009. Effect of organic carbon on nitrification efficiency and community composition of nitrifying biofilms. J. Environ. Sci. 21: 387–394.

Kim, J. K., Park, K. J., Cho, K. S., Nam, S., Park, T. and Bajpai, R. 2005. Aerobic nitrification-

denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. Bioresour. Technol. 96: 1897–1906.

Liang, S., Zhao, M., Lu, L., Wang, C., Zhao, L. and Liu, W. 2011. Isolation and characteristic of an aerobic denitrifier with high nitrogen removal efficiency. Afr. J. Biotechnol. 10: 10648–10656.

Lu, Y., Wang, X., Liu, B., Liu, Y. and Yang, X. 2012. Isolation and characterization of heterotrophic nitrifying strain W1. Chinese J. Chem. Eng. 20: 995–1002.

Stackebrandt, E. and Goebel, B. M. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 44: 846–849.

Suantika, G., Aditiawati, P., Astuti, D. I. and Khotimah, Z. F. 2013. The use of indigenous probiotic *Halomonas aquamarina* and *Shewanella algae* for white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone) hatchery productivity in zero water discharge system. J. Aquac. Res. Dev. 4: 1–8.

Yang, X. P., Wang, S. M., Zhang, D. W. and Zhou, L. X. 2011. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. Bioresour. Technol. 102: 854–862.

7.3 ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

1. การที่จะสามารถระบุได้ว่าเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่แยกได้นั้นเป็นชนิดหรือสกุลใหม่หรือไม่ ต้องทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ครบทั้งสาย (full length) นอกจากนี้ยังต้องศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical test) และchemotaxonomic characteristics เช่น respiratory quinone, fatty acid profile และ G+C content เป็นต้น เพราะถ้าเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่คัดแยกได้เป็นชนิดหรือสกุลใหม่ จะทำให้งานวิจัยมีความโดดเด่น สามารถตีพิมพ์ในวารสารที่มี impact factor สูง หรืออาจสามารถจดสิทธิบัตรได้ในอนาคต

2. ควรศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำที่บำบัดกับพลวัตประชากรหรือโครงสร้างประชาคมของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียด้วยเทคนิค DGGE เพื่อให้ทราบบทบาทที่แน่ชัดในระยะเวลาต่างๆ ของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียในการบำบัดน้ำ

3. การผลิตกล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่คัดแยกได้และการนำไปใช้จริงในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อสำหรับใช้บำบัดแอมโมเนียในการเพาะเลี้ยงกุ้ง ที่อาจช่วยพัฒนาอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศให้มีความยั่งยืนในอนาคต

7.4 บทความวิจัยที่นำเสนอที่ประชุมวิชาการ

Chankaew, S., O-Thong, S. and Sangnoi, Y. 2016. *Halomonas* sp. SKNB4, a proficient ammonium oxidizing bacterium. Proceedings of the 3rd National Meeting on Biodiversity Management in Thailand, June 15-17, 2016 The Impress Nan Hotel, Nan province, Thailand. 187 – 192.