

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ระบบบำบัดน้ำเสียในการเลี้ยงกุ้งแบบสองขั้นตอนด้วยผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อแบคทีเรียและ
ก๊าซโอโซน

Two-Stage System for Shrimp Farm Effluent Treatment Using Bacterial
Seedling Product and Ozonation

ผศ.ดร.ยุทธพงษ์ ลั้งษ์น้อย

ผศ.ดร.สมพงศ์ โอทอง

ดร.ธีญาภรณ์ แก้วทวี

อานนท์ อูปบัลลังก์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก เงินงบประมาณแผ่นดิน (สะสม)

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2560 รหัสโครงการ NAT601988S

ชื่อโครงการ

ระบบบำบัดน้ำเสียในการเลี้ยงกุ้งแบบสองขั้นตอนด้วยผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อแบคทีเรียและก๊าซ
โอโซน

Two-Stage System for Shrimp Farm Effluent Treatment Using Bacterial
Seedling Product and Ozonation

คณะนักวิจัย และหน่วยงานต้นสังกัด

- | | | |
|-------------------------------|--------------------|-------------------------------------|
| 1) ผศ.ดร. ยุทธพงษ์ สังข์น้อย | ภาควิชาวาริชศาสตร์ | คณะทรัพยากรธรรมชาติ |
| 2) ดร. ธิญาภรณ์ แก้วทวี | ภาควิชาวาริชศาสตร์ | คณะทรัพยากรธรรมชาติ |
| 3) อาจารย์อานนท์ อุปลัลลิ่งก์ | ภาควิชาวาริชศาสตร์ | คณะทรัพยากรธรรมชาติ |
| 4) ผศ.ดร. สมพงษ์ โอทอง | ภาควิชาชีววิทยา | คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยทักษิณ |

สารบัญ

ชื่อโครงการ	1
คณะนักวิจัย และหน่วยงานต้นสังกัด	1
สารบัญ	2
รายการตาราง	3
รายการตาราง (ต่อ)	4
รายการภาพประกอบ	5
รายการภาพประกอบ (ต่อ)	6
กิตติกรรมประกาศ	7
บทคัดย่อ	8
Abstract	9
บทนำ	10
วัตถุประสงค์	11
การตรวจเอกสาร	12
วิธีการทดลอง	24
ผลการทดลองและวิจารณ์	30
สรุปผลการทดลอง	57
เอกสารอ้างอิง	58
ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป	63

รายการตาราง

ตารางที่ 1	คุณภาพน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	13
ตารางที่ 2	วิธีการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจน	24
ตารางที่ 3	ประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง	25
ตารางที่ 4	การศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียโดยใช้ชุดระบบบำบัดน้ำเสียในการเลี้ยงกุ้งแบบสองขั้นตอน	25
ตารางที่ 5	การศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งโดยใช้ชุดระบบบำบัดน้ำเสียในการเลี้ยงกุ้งแบบสองขั้นตอน	26
ตารางที่ 6	การศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งโดยใช้ชุดอุปกรณ์ต้นแบบระบบบำบัดน้ำเสียในการเลี้ยงกุ้งแบบสองขั้นตอน	29
ตารางที่ 7	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. แต่ละสายพันธุ์	31
ตารางที่ 8	การทดสอบความสามารถในการบำบัดแอมโมเนียเบื้องต้นของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. 4 ไอโซเลท เป็นระยะเวลา 14 วัน	33
ตารางที่ 9	การทดสอบความสามารถในการบำบัดไนโตรเจนเบื้องต้นของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. 4 ไอโซเลท เป็นระยะเวลา 14 วัน	35
ตารางที่ 10	ความสามารถในการบำบัดไนเตรทเบื้องต้นของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. 4 ไอโซเลท เป็นระยะเวลา 14 วัน	36
ตารางที่ 11	ประสิทธิภาพของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมในการลดแอมโมเนียในน้ำเสียเป็นระยะเวลา 5 วัน	37
ตารางที่ 12	ประสิทธิภาพของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมในการบำบัดไนโตรเจนในน้ำเสียเป็นระยะเวลา 5 วัน	38
ตารางที่ 13	ประสิทธิภาพของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมในการบำบัดไนเตรทในน้ำเสียระยะเวลา 5 วัน	39
ตารางที่ 14	ประสิทธิภาพของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมในการบำบัดออร์โธฟอสเฟตในน้ำเสียกุ้ง เป็นระยะเวลา 5 วัน	40
ตารางที่ 15	ประสิทธิภาพของคอลัมน์เซรามิกที่ผ่านการตรึงแบคทีเรียระยะเวลา 24 ชั่วโมง	45

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่ 16	ประสิทธิภาพของคอลัมน์สารกรองเรซินที่ผ่านการตรึงแบคทีเรียระยะเวลา 24 ชั่วโมง	48
ตารางที่ 17	ประสิทธิภาพการบำบัดคุณภาพน้ำของชุดจำลองระบบบำบัดน้ำเสียแบบ 2 ชั้นตอน	50
ตารางที่ 18	ปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียในน้ำเลี้ยงกึ่งหลังจากบำบัดทั้งสองชั้นตอน	54
ตารางที่ 19	ปริมาณความเข้มข้นของไนโตรเจนในน้ำเลี้ยงกึ่งหลังจากบำบัดทั้งสองชั้นตอน	54
ตารางที่ 20	ปริมาณความเข้มข้นของไนเตรทในน้ำเลี้ยงกึ่งหลังจากบำบัดทั้งสองชั้นตอน	54
ตารางที่ 21	ปริมาณความเข้มข้นของออร์โธฟอสเฟตในน้ำเลี้ยงกึ่งหลังจากบำบัดทั้งสองชั้นตอน	55
ตารางที่ 22	ปริมาณสารแขวนลอยรวมในน้ำเลี้ยงกึ่งหลังจากบำบัดทั้งสองชั้นตอน	56
ตารางที่ 23	ประสิทธิภาพการกำจัดปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ของชุดอุปกรณ์ต้นแบบระบบบำบัดน้ำแบบ 2 ชั้นตอน	56

รายการภาพประกอบ

ภาพที่ 1 การเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน	15
ภาพที่ 2 ลักษณะเซลล์ของ <i>Halomonas</i> sp. SKNB4 (Bar = 2 μ m)	17
ภาพที่ 3 Phylogenetic tree ของ <i>Halomonas</i> spp. จำนวน 5 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ (สายพันธุ์ SKNB2, SKNB4, SKNB17, SKNB20 และ SKNB22)	18
ภาพที่ 4 ลักษณะเซลล์ของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรีย	19
ภาพที่ 5 Phylogenetic tree ของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่แยกได้จาก ฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้ง	19
ภาพที่ 6 การประยุกต์ใช้อุปกรณ์บำบัดน้ำเสียแบบ 2 ขั้นตอนในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล	27
ภาพที่ 7 ชุดอุปกรณ์ต้นแบบระบบบำบัดน้ำในการเลี้ยงกุ้งแบบสองขั้นตอน	28
ภาพที่ 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>Bacillus</i> spp.; a) <i>Bacillus</i> sp. Ba9, b) <i>Bacillus</i> sp. Ba11, c) <i>Bacillus</i> sp. SF-1 และ d) <i>Bacillus</i> sp. SF-5.	31
ภาพที่ 9 แผนภูมิวิวัฒนาการของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. ที่คัดแยกได้ โดยศึกษาจากยีน 16S rRNA (Bar=0.02).	32
ภาพที่ 10 ความสามารถในการบำบัดแอมโมเนียเบื้องต้นของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. 4 ไอโซเลท 34	
ภาพที่ 11 การตรึงกล้าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>Bacillus</i> spp. แบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมกับ สารกรองเรซินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	41
ภาพที่ 12 การตรึงกล้าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>Bacillus</i> spp. แบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมกับแท่ง เซรามิคเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	41
ภาพที่ 13 การศึกษาความสามารถในการกำจัดสารอนินทรีย์ของชุดอุปกรณ์บำบัดทางชีวภาพที่ผ่าน การตรึงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (อัตราการไหล 8 – 10 ml/min)	42
ภาพที่ 14 การศึกษาความสามารถในการกำจัดสารอนินทรีย์ของชุดอุปกรณ์บำบัดทางชีวภาพ (อุปกรณ์ขั้นตอนที่ 1)	42
ภาพที่ 15 การลดปริมาณแอมโมเนียของคอลัมน์เซรามิคที่ผ่านการตรึงแบคทีเรียระยะเวลา 24 ชั่วโมง	43

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่ 16 การลดปริมาณไนไตรท์ของคอลัมน์เซรามิกที่ผ่านการตรึงแบคทีเรียระยะเวลา 24 ชั่วโมง	44
ภาพที่ 17 การลดปริมาณไนเตรทของคอลัมน์เซรามิกที่ผ่านการตรึงแบคทีเรียระยะเวลา 24 ชั่วโมง	44
ภาพที่ 18 การลดปริมาณออร์โธฟอสเฟตของคอลัมน์เซรามิกที่ผ่านการตรึงแบคทีเรียระยะเวลา 24 ชั่วโมง	45
ภาพที่ 19 การลดปริมาณแอมโมเนียของคอลัมน์สารกรองเรซินที่ผ่านการตรึงแบคทีเรียระยะเวลา 24 ชั่วโมง	46
ภาพที่ 20 การลดปริมาณไนไตรท์ของคอลัมน์เรซินที่ผ่านการตรึงแบคทีเรียระยะเวลา 24 ชั่วโมง	47
ภาพที่ 21 การลดปริมาณไนเตรทของคอลัมน์เรซินที่ผ่านการตรึงแบคทีเรียระยะเวลา 24 ชั่วโมง	47
ภาพที่ 22 การลดปริมาณออร์โธฟอสเฟตของคอลัมน์สารกรองเรซินที่ผ่านการตรึงแบคทีเรีย ระยะเวลา 24 ชั่วโมง	48
ภาพที่ 23 จำลองระบบบำบัดน้ำเสียแบบ 2 ขั้นตอน โดยอุปกรณ์ระบบบำบัดน้ำขั้นตอนที่ 1 (ตรึง แบคทีเรียบนวัสดุสารกรองเรซิน) และชุดอุปกรณ์บำบัดน้ำขั้นตอนที่ 2 (ก๊าซโอโซน)	49
ภาพที่ 24 ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นก่อนเข้าสู่ชุดจำลองระบบบำบัดน้ำเสียแบบ 2 ขั้นตอน	50
ภาพที่ 25 ปริมาณแบคทีเรียเมื่อผ่านชุดจำลองระบบบำบัดน้ำเสียขั้นตอนที่ 1	51
ภาพที่ 26 ปริมาณแบคทีเรียเมื่อผ่านชุดจำลองระบบบำบัดน้ำเสียขั้นตอนที่ 2	51

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่สนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัย และขอขอบคุณ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์ต่าง ๆ สำหรับการวิจัยนี้

คณะนักวิจัย

30 กันยายน 2562

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประดิษฐ์ชุดอุปกรณ์ระบบบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยง กุ้งแบบสองขั้นตอน ซึ่งประกอบด้วย ขั้นตอนที่หนึ่ง คือ ชุดอุปกรณ์ระบบบำบัดทางชีวภาพด้วย แบคทีเรีย และต่อด้วยขั้นตอนที่สอง คือ ชุดอุปกรณ์ระบบบำบัดด้วยก๊าซโอโซน โดยในชุดอุปกรณ์ บำบัดขั้นตอนที่หนึ่ง ได้ใช้ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus oceanisediminis* สายพันธุ์ Ba9 ที่ คัดแยกได้ ตรงกับสารกรองเรซินเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้ง เมื่อระบบบำบัดน้ำแบบสอง ขั้นตอนเริ่มทำงาน พบว่าระบบมีประสิทธิภาพในการกำจัดปริมาณแอมโมเนียได้ดี เท่ากับ 70.32 ± 3.72 เปอร์เซ็นต์ และพบปริมาณไนโตรเจนลดลง เท่ากับ 33.23 ± 4.66 mg-N/L ส่วนปริมาณไนเตรท และออร์โธฟอสเฟตเพิ่มขึ้นเป็น 10.03 ± 1.45 mg-N/L และ 2.25 ± 1.30 mg-P/L ตามลำดับ และสามารถลดปริมาณสารแขวนลอยได้มากถึง 42.62 ± 5.12 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่าสามารถลด ปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมทั้งหมดได้จาก 3.30×10^7 CFU/ml เหลือเพียง 9.23×10^3 CFU/ml

Abstract

This research study was aimed to invent the two-stage system for shrimp farm effluent treatment. The first stage was biological treatment using isolated salt-tolerant *Bacillus oceanisediminis* strain Ba9, which has immobilized on resin as substrate, to increase wastewater treatment efficiency. The second stage was continuously treated by using ozonation. When the system started, best ammonium removal efficiency was presented at $70.32 \pm 3.72\%$. Nitrite concentration was decreased about 33.23 ± 4.66 mg-N/L, nitrate and orthophosphate concentration were increased about 10.03 ± 1.45 mg-N/L and 2.25 ± 1.30 mg-P/L, respectively. Total suspended solid can decline up to $42.62 \pm 5.12\%$. Moreover, this treatment system could reduce the amounts of total bacteria from 3.30×10^7 CFU/ml to 9.23×10^3 CFU/ml.

บทนำ

กุ้งทะเลเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เป็นที่นิยมบริโภคทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ มีผลทำให้ความต้องการกุ้งทะเลเพิ่มขึ้นทุก ๆ ปี โดยในปี 2557 ประเทศไทยสามารถผลิตกุ้งได้ประมาณ 316,683 ตัน เป็นกุ้งจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล 279,907 ตัน เป็นกุ้งจากธรรมชาติ 36,776 ตัน คิดเป็นร้อยละ 88.39 และ 11.61 ของปริมาณกุ้งทะเลทั้งหมดที่ผลิตได้ตามลำดับ และในปี 2558 สามารถผลิตกุ้งได้ประมาณ 328,071 ตัน เป็นกุ้งทะเลจากฟาร์มเลี้ยง 294,740 ตัน เป็นกุ้งทะเลจากธรรมชาติ 33,331 ตัน คิดเป็นร้อยละ 89.84 และ 11.16 ของปริมาณกุ้งทะเลทั้งหมดที่ผลิตได้ตามลำดับ เนื่องจากอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งได้สร้างมูลค่าการส่งออกให้กับประเทศไทยสูงเป็นอันดับต้นๆ ทำให้เป็นที่ดึงดูดใจเกษตรกรให้หันมาเพาะเลี้ยงกุ้ง จากสถานการณ์โรค EMS (Early Mortality Syndrome) ที่เกิดปัญหาในช่วงปลายปี 2555 ส่งผลให้มีการเลี้ยงลดลง ซึ่งในปี 2558 มีฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาจำนวน 17,484 ฟาร์ม และแบบกึ่งพัฒนา 3,598 ฟาร์ม (กรมประมง, 2560)

การมุ่งหวังผลผลิตสูงสุดการการเลี้ยงกุ้ง ทำให้มีการเพิ่มปัจจัยการผลิตต่างๆ ให้กับการเพาะเลี้ยง ไม่ว่าจะเป็นการเพิ่มความหนาแน่นในการเพาะเลี้ยง และการเพิ่มปริมาณอาหาร เป็นต้น ในการเพิ่มปัจจัยการผลิตโดยเฉพาะการเพิ่มปริมาณอาหาร ทำให้เกิดของเสียจำพวกสารประกอบไนโตรเจนในบ่อมากขึ้น ซึ่งกุ้งสามารถเก็บไนโตรเจนไว้ในตัวได้เพียง 21.8% เท่านั้น ส่วนที่เหลือนั้นจะตกค้างอยู่ในบ่อทั้งในรูปของของเสียจากการขับถ่ายของกุ้งและรูปของเศษอาหาร ส่งผลให้คุณภาพน้ำในบ่อไม่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยง ทำให้เกิดของเสียที่อยู่ในรูปสารประกอบไนโตรเจน คือ แอมโมเนีย (ammonia) ไนไตรท์ (nitrite) และไนเตรท (nitrate) ซึ่งเป็นพิษต่อกุ้งสะสมอยู่ในน้ำและตะกอนดินในบ่อมาก และหากมีการสะสมของสารประกอบไนโตรเจนในน้ำเป็นจำนวนมาก อาจส่งผลทำให้กุ้งตายและทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจแก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยง (นิคม และคณะ, 2547) หรือแม้แต่การที่มีแอมโมเนียและไนไตรท์ความเข้มข้นต่ำ ๆ ก็อาจจะทำให้กุ้งอ่อนแอและตายได้ สำหรับไนเตรทที่เกิดขึ้นจะมีความเป็นพิษกับกุ้งน้อยมากเมื่อเทียบกับแอมโมเนียและไนไตรท์ แต่หากมีปริมาณของไนเตรทสะสมอยู่มากก็อาจส่งผลเสียต่อกุ้งได้ (กัญญาณัฐ และคณะ, 2552) อย่างไรก็ตาม สารประกอบไนโตรเจนในแหล่งน้ำสามารถถูกกำจัดได้ด้วยจุลินทรีย์ โดยเฉพาะกลุ่มที่มีบทบาทสำคัญในวัฏจักรไนโตรเจน (Nitrogen cycle) ได้แก่ เฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Heterotrophic nitrifying bacteria) ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดสารประกอบไนโตรเจน กล่าวคือ มีความสามารถในการเปลี่ยนรูปสารประกอบไนโตรเจน เรียกกระบวนการนี้ว่า กระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification) ที่ต้องอาศัยไนตริไฟอิงแบคทีเรีย 2 กลุ่ม กลุ่มแรก ได้แก่ Ammonium oxidizing bacteria (AOB) ซึ่งมีความสามารถในการออกซิไดซ์

แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ ตัวอย่างกลุ่มแบคทีเรีย AOB เช่น *Nitrosomonas* และ *Nitrosococcus* กลุ่มที่สอง ได้แก่ Nitrite oxidizing bacteria (NOB) ซึ่งมีความสามารถในการออกซิไดซ์ไนไตรท์ไปเป็นไนเตรท ตัวอย่างกลุ่มแบคทีเรีย NOB เช่น *Nitrosobacter*, *Nitrobacter* และ *Nitrococcus* (Francis *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2009)

นอกจากนี้การสะสมของของเสียยังทำให้เกิดปัญหาโรคระบาดตามมา ทำให้เกษตรกรที่ทำการเพาะเลี้ยงกุ้งในระบบปิด ซึ่งเป็นระบบที่ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ หรือมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำในปริมาณที่น้อยมาก ประสบกับปัญหาโรคกุ้ง ซึ่งเชื้อก่อโรคที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. เช่น โรคเรืองแสง โรคตับอักเสบและโรคกุ้งซีขาว ส่วนเชื้อไวรัส ทำให้เกิดโรคหัวเหลือง โรคทอราซินโดรมและโรคตัวแดงดวงขาว ซึ่งมีวิธีในการรักษาหรือกำจัดโดยใช้ยาการรักษาและยาต้านโรคกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ เอนโรฟล็อกซาซิน (Enrofloxacin) เป็นต้น หรือน้ำยาฆ่าเชื้อ เช่น ฟอ์มาลิน และ ไอโอดีนฟอ์ ล้างไข่กุ้งก่อนนำไปเพาะเลี้ยง (มลฤดี และศรีภาพรรณ, 2558) นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีการประยุกต์ใช้ก๊าซโอโซนในการบำบัดน้ำเสีย ซึ่งโอโซนจะเข้าไปออกซิไดซ์สารพิษทำให้โครงสร้างทางเคมีของสารเหล่านั้นเปลี่ยนไป โดยโอโซนยังสามารถออกซิไดซ์สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ พร้อมทั้งช่วยลดค่า COD และ BOD ได้ ในส่วนของการฆ่าเชื้อโรคโดยใช้โอโซนนั้น โอโซนจะแตกตัวให้อนุมูลอิสระ ซึ่งอนุมูลอิสระนี้จะส่งผลต่อความสามารถในการเลือกผ่านกิจกรรมของเอนไซม์และ DNA ของผนังเซลล์แบคทีเรีย ส่วนไวรัสก็จะถูกทำลายแกนของกรดนิวคลีอิก ทำให้น้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งปลอดจากไวรัสและแบคทีเรียที่ทำให้กุ้งเป็นโรคได้ (อุไรวรรณ, 2546)

โครงการวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อประดิษฐ์ชุดอุปกรณ์ระบบบำบัดน้ำเสียแบบสองขั้นตอนสำหรับใช้บำบัดน้ำเสียในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง โดยขั้นตอนที่หนึ่ง เป็นระบบบำบัดทางชีวภาพ ที่อาศัยการทำงานของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อเห็ดออโรโทรฟิคไนโตรไฟอิงแบคทีเรียที่ทนเค็ม ที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเลี้ยงกุ้ง และขั้นตอนที่สอง เป็นระบบบำบัดทางกายภาพ ที่อาศัยการทำงานของก๊าซโอโซน เพื่อทำลายเชื้อแบคทีเรีย โปรโตซัว และไวรัสก่อโรคในกุ้งที่หลงเหลืออยู่ ทำให้น้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการบำบัดด้วยชุดอุปกรณ์ระบบบำบัดสองขั้นตอนนี้ มีความสะอาด ปราศจากเชื้อ ไม่มีสารตกค้าง และมีคุณภาพตามเกณฑ์มาตรฐานน้ำสำหรับการเลี้ยงกุ้ง ซึ่งเหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งระบบน้ำหมุนเวียน อีกทั้งเหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งทั้งแบบระบบปิดและระบบเปิด

วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อผลิตกล้าเชื้อทนเค็มสำหรับบำบัดน้ำ
- 2) เพื่อผลิตชุดอุปกรณ์ต้นแบบระบบบำบัดน้ำในการเลี้ยงกุ้งแบบสองขั้นตอน

การตรวจเอกสาร

1. การเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ถือว่ามีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย เช่น การเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งสามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศได้ปีละกว่าหมื่นล้านบาท รวมไปถึงยังสามารถเป็นสินค้าแปรรูปส่งออกต่างประเทศในรูปของกุ้งสดแช่เย็น แช่แข็ง กุ้งแปรรูป เป็นต้น ปัจจุบันเกษตรกรได้เพาะเลี้ยงกุ้งต่อพื้นที่อย่างหนาแน่น (super-intensive) เพื่อให้ได้ปริมาณผลผลิตสูงสุดโดยการเพิ่มปัจจัยการผลิต ไม่ว่าจะเป็นการเพิ่มความหนาแน่น และการให้อาหารในปริมาณมาก โดยอาหารกุ้งเป็นแหล่งไนโตรเจนหลักที่เข้าสู่บ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง (ประมาณ 97 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งกุ้งสามารถเก็บไนโตรเจนไว้ในเนื้อกุ้งได้เพียงประมาณ 21.8 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น อีกประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ จะตกค้างในบ่อ (พุทธ และคณะ, 2546) ส่งผลทำให้ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งมีสารอินทรีย์จากการขับถ่ายของกุ้งและจากเศษอาหารตกค้างอยู่ในบ่อเพาะเลี้ยง ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเกษตรกรบางรายได้ทำการจับสัตว์น้ำและมีการปล่อยน้ำจากการเพาะเลี้ยงออกสู่ธรรมชาติ ซึ่งน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงได้ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ส่งผลทำให้คุณภาพน้ำและดินในบริเวณนั้นเกิดความเสื่อมโทรม รวมถึงทำให้แหล่งน้ำจืดและแหล่งน้ำผิวดินในบริเวณใกล้เคียงไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้ (กษิตศ, 2551 และ Nimrat *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอีกหลายประการดังต่อไปนี้

ปัญหาเรื่องภาวะมลพิษในบ่อเพาะเลี้ยง เนื่องจากปัจจุบันการเพาะเลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่เป็นแบบหนาแน่น มีการให้อาหารในปริมาณมาก ทำให้มีสารอินทรีย์จากเศษอาหารและสิ่งขับถ่ายของกุ้งอยู่ในมวลน้ำของการเพาะเลี้ยง และบริเวณกันบ่ออยู่มาก ส่งผลให้คุณสมบัติของคุณภาพน้ำเปลี่ยนแปลง และมีความไม่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยง เกิดเป็นน้ำเสีย ทำให้กุ้งในบ่อเพาะเลี้ยงเกิดความเครียด ไม่กินอาหาร อ่อนแอ เสี่ยงต่อการเป็นโรคและตายในที่สุด อันนำมาซึ่งความเสียหายต่อระบบการเพาะเลี้ยงภายในบ่อและต่อตัวเกษตรกรที่สูญเสียรายได้ อีกทั้งปัญหาเรื่องโรคระบาดเป็นปัญหาใหญ่ที่ส่งผลต่อการตายของกุ้ง เนื่องมาจากการที่คุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสม เกิดมลภาวะทำให้กุ้งเครียด ไม่กินอาหาร อ่อนแอ และขาดความต้านทานโรค นอกจากนี้การเปลี่ยนถ่ายน้ำยังส่งผลต่อการปนเปื้อนของเชื้อโรคจากแหล่งที่เลี้ยงไปสู่ธรรมชาติ หรือจากธรรมชาติมาสู่แหล่งเลี้ยง ซึ่งเป็นการเพิ่มความเสี่ยงให้กุ้งตายมากขึ้น

ปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมภายนอกบ่อเพาะเลี้ยง เมื่อคุณสมบัติของน้ำภายในบ่อเพาะเลี้ยงเสื่อมโทรมหรือช่วงเก็บเกี่ยวผลผลิตจากการเพาะเลี้ยง เกษตรกรบางรายเลือกที่จะปล่อยน้ำเสียออกสู่ภายนอก ซึ่งเป็นน้ำที่มีองค์ประกอบของเสียพวกสารอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่น แอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท รวมไปถึงสารประกอบฟอสฟอรัสอยู่ในปริมาณมากและเกินมาตรฐานน้ำทิ้ง (ตารางที่ 1) ซึ่งสารอนินทรีย์ไนโตรเจนเป็นสารอาหารที่สิ่งมีชีวิตจำพวกแพลงก์ตอนพืชและสาหร่ายสามารถดูดซึม

ไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้ แต่ถ้ามีสารอาหารมากเกินไปจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ยูโทรฟิเคชัน (Eutrophication) ซึ่งมีปริมาณของเซลล์แพลงก์ตอนพืชชนิดใดชนิดหนึ่งมากเกินไป ส่งผลให้ปริมาณของออกซิเจนละลายน้ำลดต่ำลงจนกลายเป็นแหล่งน้ำเน่าเสีย ทั้งนี้ของเสียที่พบบ่อยและเป็นสารที่มีพิษมากที่สุดต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำ คือ แอมโมเนีย ซึ่งถือเป็นอุปสรรคต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอย่างยิ่ง

ตารางที่ 1 คุณภาพน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

ดัชนีคุณภาพน้ำ	มาตรฐานน้ำทิ้ง	น้ำทิ้งจากการ	น้ำทิ้งจากการ	น้ำทิ้งจากการ
	ของกรมควบคุมมลพิษ ¹	เพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ²	เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ³	เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ⁴
1.ความเป็นกรดและด่าง (pH)	6.5-9.0	7.4-8.2	7.8-8.5	NA
2.บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand, BOD) (mg/L)	< 20	6.3-19.0	3.7-19.9	12.2 – 40.2
3.สารแขวนลอย (Suspended Solids, SS)	< 70	35.0-437.0	55.0-345.0	87.0 – 480.0
4.แอมโมเนีย (NH ₃ -N) (mg-N/L)	< 1.1	0.8-4.6	0.1-5.5	0.4 – 37.2
5.ฟอสฟอรัสรวม (Total Phosphorus) (mg-P/L)	< 0.4	0.4-0.8	0.3-0.6	0.14 – 1.03
6.ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H ₂ S) (mg/L)	<0.01	0.0-0.8	0.1-2.2	NA
7.ไนโตรเจนรวม (Total Nitrogen) (mg-N/L)	< 4.0	3.7-12.0	3.5-14.8	7.8-61.0

NA หมายถึง ไม่มีการบันทึกข้อมูล

ที่มา: ดัดแปลงจาก กรมควบคุมมลพิษ (2555)¹, สิริ และชนินทร์ (2541)², สิริ และคณะ (2548)³ และ พุทธ และคณะ (2546)⁴

2. สารอนินทรีย์ไนโตรเจนและความเป็นพิษของสารอนินทรีย์ไนโตรเจน

1) แอมโมเนีย (Ammonia)

แอมโมเนียที่พบในแหล่งน้ำมี 2 รูปแบบ คือ แอมโมเนีย (NH_3) และแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) ซึ่งทั้ง 2 รูปแบบสามารถเปลี่ยนกลับไปมาได้ โดยขึ้นอยู่กับค่า pH เมื่อค่า pH เพิ่มขึ้นปริมาณของแอมโมเนียจะเพิ่มขึ้น และเมื่อค่า pH ลดลงปริมาณของแอมโมเนียมไอออนจะเพิ่มขึ้น ซึ่งแอมโมเนียมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำมากกว่าแอมโมเนียมไอออน (ภาพที่ 1) (Spotte, 1979) โดยที่ปริมาณแอมโมเนียที่ปลอดภัยต่อการเลี้ยงกุ้งจะต้องมีปริมาณที่น้อยกว่า 0.1 mg-N/L หากมีปริมาณที่อยู่ในช่วง 0.1–0.4 mg-N/L จะทำให้กุ้งโตช้า แต่หากว่ามีปริมาณที่สูงกว่า 0.4 mg-N/L จะส่งผลทำให้กุ้งเกิดความเครียด โตช้า และตายในที่สุด หากในแหล่งน้ำมีปริมาณของแอมโมเนียเพิ่มขึ้นจะทำให้กุ้งมีความต้องการออกซิเจนที่สูงขึ้น ซึ่งจะทำให้กุ้งสามารถขับแอมโมเนียออกที่เหงือก แต่หากมีออกซิเจนละลายน้ำต่ำจะทำให้กุ้งลดการหายใจเพื่อไม่ให้แอมโมเนียจากในน้ำเข้าสู่ร่างกาย นอกจากนี้เมื่อน้ำมีค่า pH สูงขึ้นจะส่งผลให้ความเป็นพิษของแอมโมเนียสูงขึ้นทั้งที่ปริมาณของแอมโมเนียเท่าเดิม (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

2) ไนไตรท์ (Nitrite)

ไนไตรท์เกิดจากกระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification) โดยที่แอมโมเนียถูกแบคทีเรียในกลุ่ม Ammonium oxidizing bacteria (AOB) เปลี่ยนเป็นไนไตรท์ในสภาวะที่มีอากาศ คุณสมบัติของไนไตรท์จะให้ความเป็นพิษเช่นเดียวกับแอมโมเนีย ส่งผลต่อเลือดของกุ้งทำให้ระดับโปรตีนและค่า pH ของเลือดกุ้งลดลง การทำงานของระบบเผาผลาญอาหารมีประสิทธิภาพลดลง ส่งผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโต นอกจากนี้ไนไตรท์ยังสามารถที่จะเกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ในการเปลี่ยนไนเตรทให้กลับมาเป็นไนไตรท์โดยแบคทีเรียที่มีอยู่ในน้ำและดินของบ่อกุ้ง และเกิดขึ้นในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน นอกจากนี้ความเป็นพิษของไนไตรท์ถูกยับยั้งได้ด้วยคลอไรด์ในน้ำ โดยในน้ำทะเลที่มีคลอไรด์สูง จะมีความเป็นพิษของไนไตรท์ต่อสัตว์น้ำค่อนข้างต่ำ ระดับความเป็นพิษของไนไตรท์จะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved oxygen; DO) และค่า pH ของน้ำลดลง (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

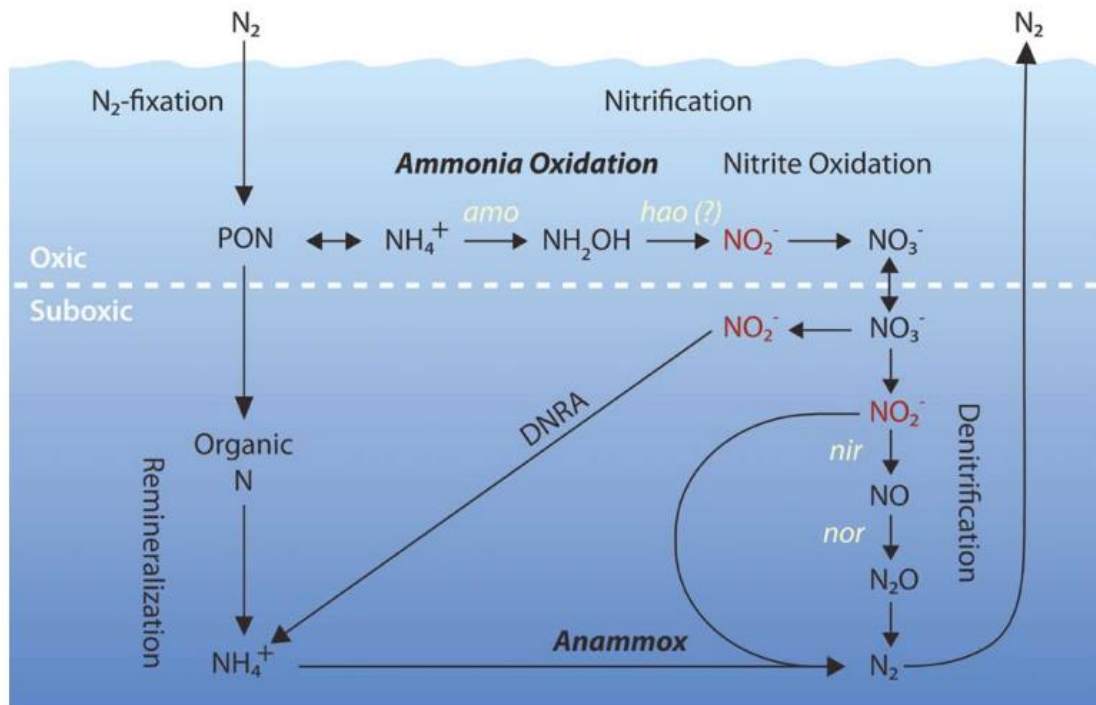
3) ไนเตรท (Nitrate)

ไนเตรทเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) จากไนไตรท์เป็นไนเตรท ซึ่งเกิดในกระบวนการไนตริฟิเคชัน ไนเตรทเป็นสารที่มีความเป็นพิษน้อย เนื่องจากไม่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลัน ไนเตรทส่งผลต่อสุขภาพของสัตว์น้ำ โดยทำให้เกิดความอ่อนแอ กินอาหารน้อยลงและมีโอกาสติดเชื้อได้ง่าย ไนเตรทมีความเป็นพิษมากขึ้นถ้าสัตว์น้ำต้องอาศัยอยู่ในน้ำที่มีระดับของไนเตรทสูงเป็น

เวลานาน ซึ่งผลการเป็นพิษของไนเตรทให้ผลเช่นเดียวกันกับพิษของไนไตรท์ ถ้าในน้ำการเพาะเลี้ยง กุ้งมีปริมาณของไนเตรทเข้มข้น 15.4 mg-N/L จะส่งผลให้กุ้งประมาณ 50 % ตายภายใน 90 ชั่วโมง และไม่ควรมีความเข้มข้นของไนเตรทสูงกว่า 100 mg-N/L เพราะจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของ สัตว์น้ำ นอกจากนี้ไนเตรทยังสามารถเปลี่ยนเป็นก๊าซไนโตรเจน (N_2) กลับสู่ชั้นบรรยากาศด้วย กระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification) ด้วยแบคทีเรียในกลุ่มดีไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Denitrifying bacteria) ซึ่งจะเกิดในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Hart and O'Sullivan, 1993)

3. การบำบัดไนโตรเจนทางชีวภาพ

การบำบัดไนโตรเจนในน้ำซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี ทั้งทางกายภาพ เช่น การใส่สารเคมี และการเปลี่ยนถ่ายน้ำ และทางชีวภาพด้วยกระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification) คือ กระบวนการ ออกซิไดซ์สารอนินทรีย์ไนโตรเจนซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ กระบวนการไนตริฟิเคชันแบ่ง ออกเป็น 2 ขั้นตอนย่อย และมีกลุ่มแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง 2 กลุ่ม เรียกว่า ไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Nitrifying bacteria) (ภาพที่ 1) ซึ่งสามารถแบ่งได้ ดังนี้ (ธงชัย, 2544; Yanagita, 1990; Bitton, 1994; Francis *et al.*, 2007)



ภาพที่ 1 การเกิดปฏิกิริยานิตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน

ที่มา : Francis *et al.*, 2007

แอมโมเนียถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ โดยอาศัยการทำงานของไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (nitrifying bacteria) กลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ (Ammonium Oxidizing Bacteria: AOB) เช่น *Nitrosomonas* และ *Nitrosococcus* และไนไตรท์ถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นไนเตรท โดยอาศัยการทำงานของไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (nitrifying bacteria) กลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการออกซิไดซ์ไนไตรท์ไปเป็นไนเตรท (Nitrite Oxidizing Bacteria: NOB) เช่น *Nitrobacter* และ *Nitrococcus* ซึ่งทำให้ความเป็นพิษของแอมโมเนียลดลงไปมากเมื่อกลายเป็นไนเตรท และไนเตรทยังสามารถถูกนำไปใช้โดยแพลงก์ตอนพืชในแหล่งน้ำ หรืออาจถูกเปลี่ยนไปเป็นไนโตรเจนอิสระ (N_2) ได้ด้วยกระบวนการดีไนตริฟิเคชันโดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic microorganisms) นอกจากนี้ยังมีกลุ่มแบคทีเรียอื่น ๆ เช่น *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Halomonas* และ *Alcaligenes* ที่สามารถบำบัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนได้ (Matsuzaka *et al.*, 2003; Wen and Wei, 2011; Yang *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2012; Suantika *et al.*, 2013; Chankaew *et al.*, 2018; Sangnoi *et al.*, 2017)

อย่างไรก็ตาม ไนตริไฟอิงแบคทีเรียซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มออโตโทรฟ (autotroph) มักมีข้อจำกัดในเรื่องของการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างช้า ใช้ระยะเวลานาน มีความสามารถในการแข่งขันต่ำ และไม่ทนต่อสภาวะที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูง ดังนั้นนักวิจัยจึงหันมาสนใจเชื้อกลุ่มเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้เช่นกัน และยังสามารถใช้สารอินทรีย์ จึงทำให้มีการเจริญเติบโตที่ดี ใช้ระยะเวลาน้อย และมีความสามารถในการแข่งขันสูง และยังพบว่าสามารถทนต่อสภาวะที่แอมโมเนียสูงได้ดีกว่าเชื้อกลุ่มออโตโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรีย

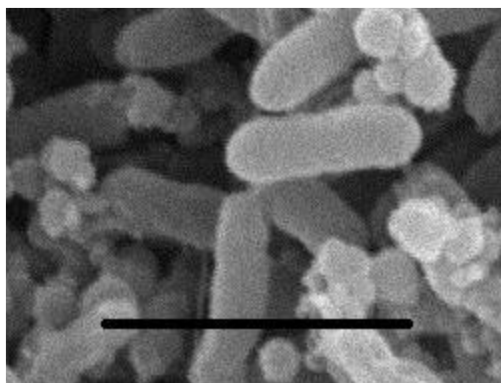
โดย Yang *et al.* (2011) ได้แยกเชื้อ aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacteria จาก activated sludge ในบ่อบำบัดน้ำเสียของเทศบาล ซึ่งเริ่มจากการเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารเหลวสูตร basal inorganic medium และบ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที (rpm) และทดสอบปริมาณไนไตรท์และไนเตรทที่เกิดขึ้น ทุก ๆ 7 วัน ด้วยวิธี Griess-Ilosvay method จากนั้นนำตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวก ไปทำบริสุทธิ์เชื้อด้วยการ streak plate หลาย ๆ ครั้ง ในอาหารสูตร fresh washed-agar จากผลการคัดแยกเชื้อดังกล่าว พบว่าสามารถแยกเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียได้จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis* strain A1

ต่อมาในปี 2012 มีรายงานการคัดแยกเชื้อ heterotrophic nitrifying bacteria W1 ใน activated sludge ที่มาจากการประกอบอาหาร โดยนำ activated sludge มาเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารเหลวสูตร beef extract-peptone medium ก่อนในเบื้องต้น โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm และทดสอบปริมาณไนไตรท์ที่เกิดขึ้นทุก ๆ 3 วัน ด้วย Nessler's reagent จากนั้นแยกเชื้อในตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวก โดยนำเชื้อกลับไปเลี้ยงในอาหารสูตร basic medium และทำบริสุทธิ์เชื้อด้วยการ spread plate และ streak plate หลาย ๆ ครั้ง ในอาหาร

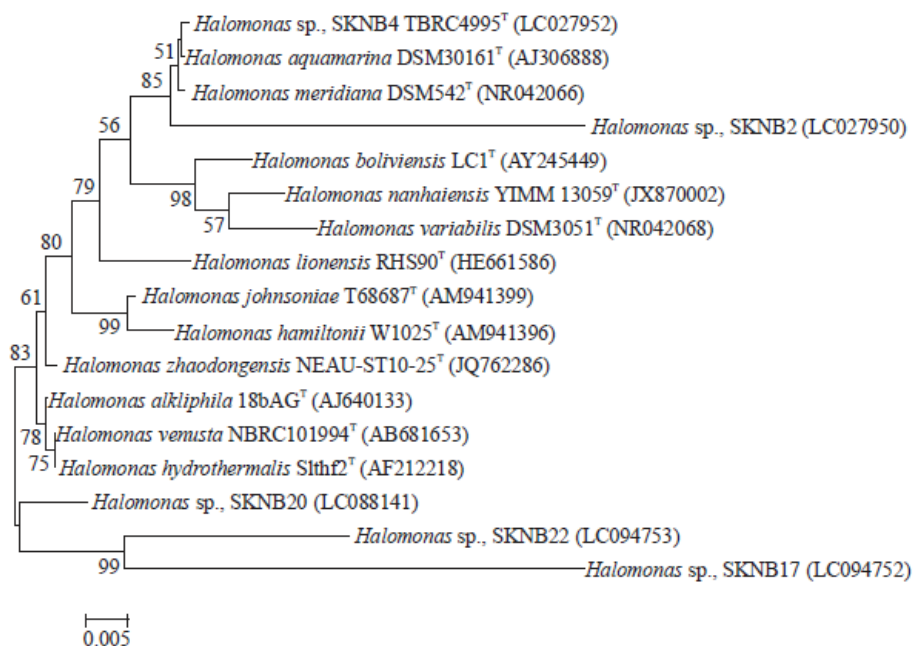
สูตร fresh washed-agar ซึ่งได้รับเชื้อ heterotrophic nitrifying bacteria จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ *Alcaligenes* sp. W1 (Lu *et al.*, 2012)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยจำนวนหนึ่ง ที่ได้ศึกษาและพัฒนาเกี่ยวกับสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไนตริไฟอิงแบคทีเรีย เช่น Sliemers *et al.* (2004) รายงานว่า urea เป็นแหล่งที่ให้พลังงานกับ ammonia oxidizing bacteria (AOB) ได้ดีกว่า ammonia

ขณะที่คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาวิจัยและคัดแยกจนได้เฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนีย โดย Sangnoi *et al.* (2017) รายงานการคัดแยกเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โคโลนีสีขาวครีม รูปร่างแท่งสั้น (ภาพที่ 2) และเมื่อทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และวิเคราะห์ Phylogenetic tree ปรากฏว่าแบคทีเรียที่แยกได้เป็นแบคทีเรียในสกุล *Halomonas* (ภาพที่ 3) และมีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 800-900 mg-N/L ซึ่งนับว่าเป็นความเข้มข้นที่สูงมากได้ประมาณ 23-71% โดยทั่วไปแล้วความเข้มข้นของแอมโมเนียระดับนี้จะเป็นพิษต่อทั้งสัตว์น้ำและเซลล์ของไนตริไฟอิงแบคทีเรียเอง ผู้วิจัยระบุว่าเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียกลุ่ม *Halomonas* spp. เป็นกลุ่มเชื้อที่มีศักยภาพในการนำมาใช้บำบัดน้ำเสียที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงและมีความเค็ม เช่น การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม เป็นต้น

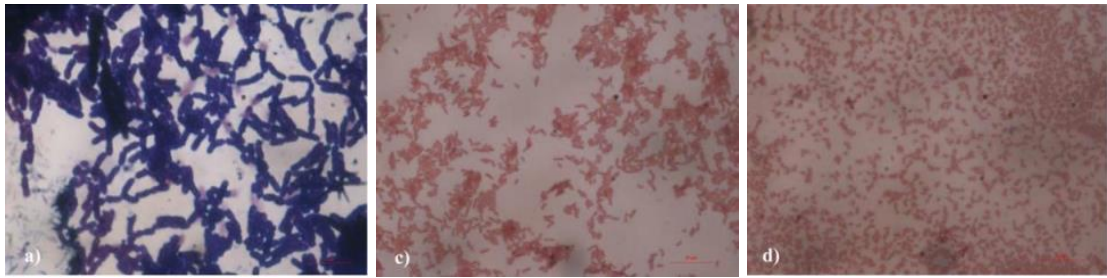


ภาพที่ 2 ลักษณะเซลล์ของ *Halomonas* sp. SKNB4 (Bar = 2 μ m)
ที่มา: Sangnoi *et al.* (2017)



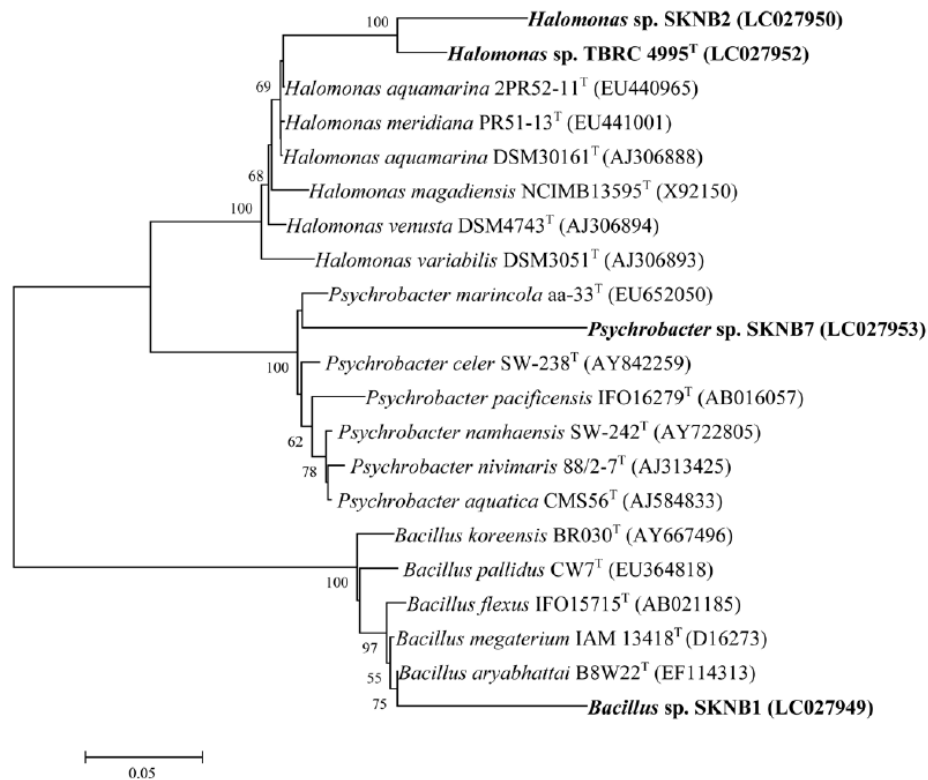
ภาพที่ 3 Phylogenetic tree ของ *Halomonas* spp. จำนวน 5 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ (สายพันธุ์ SKNB2, SKNB4, SKNB17, SKNB20 และ SKNB22) ที่มา: Sangnoi *et al.* (2017)

ต่อมาคณะผู้วิจัยยังได้รายงานเพิ่มเติมเกี่ยวกับประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียทนเค็มที่คัดแยกจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งขาว โดยรายงานว่เฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่คัดแยกได้นั้นมีหลายชนิด ได้แก่ *Bacillus* sp., *Halomonas* sp. และ *Psychrobacter* sp. (ภาพที่ 4 และ 5) ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มที่คัดแยกได้นี้มีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียที่มีความเข้มข้นสูง (815.86 mg-N/L) ได้ตั้งแต่ 23-56 เปอร์เซ็นต์ (Chankaew *et al.* 2018) โดยปกติแล้วความเข้มข้นของแอมโมเนียในปริมาณสูงมักทำลายเซลล์ของไนตริไฟอิงแบคทีเรียเอง ส่งผลให้ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันเกิดขึ้นได้น้อย ประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียจึงด้อยลงไปด้วย ดังนั้นเฮเทอโรโทรฟิคไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่สามารถทำงานได้ดีภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงและมีความเค็ม จึงเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่น่าสนใจในการนำมาใช้ประโยชน์ด้านการปรับปรุงคุณภาพน้ำในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกร่อย



ภาพที่ 4 ลักษณะเซลล์ของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรีย

ที่มา: Chankaew *et al.* (2018)



ภาพที่ 5 Phylogenetic tree ของเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่แยกได้จากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้ง

ที่มา: Chankaew *et al.* (2018)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษากการใช้เชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียผสมในการบำบัดน้ำเสียและการเพิ่มผลผลิตของกุ้งขาว โดย Kumar *et al.* (2009) ได้ทดลองผลิตกล้าเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียผสม เพื่อใช้ในระบบบำบัดน้ำหมุนเวียนจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล โดยกล้าเชื้อที่ผลิตขึ้นนั้นประกอบไป

ด้วยไนตริไฟอิงแบคทีเรียชนิด *Nitrosomonas* จำนวน 2 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล คือ สายพันธุ์ AMONPCU-1 และ AMOPCU-1 ซึ่งเชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้ถูกเลี้ยงในอาหารที่เตรียมจากน้ำทะเล (15 หรือ 30 ส่วนในพันส่วน) และมืองค์ประกอบอื่น เช่น $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 10 mg/l และ $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ 2 mg/l โดยเลี้ยงในอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 28 °C และค่า pH 8.5 การผลิตกล้าเชื้อทำได้โดยการปั่นเหวี่ยงเชื้อที่ 6000 g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างตะกอนเชื้อด้วยน้ำทะเล และตรึง (fix) เชื้อเอาไว้นาน 2.5 เปอร์เซ็นต์ glutaraldehyde ซึ่งเตรียมในน้ำทะเลที่ 4 °C จากนั้นตรึงอีกครั้งใน 2 เปอร์เซ็นต์ osmium tetroxide ที่ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำทะเล จากนั้นกำจัดน้ำออกโดยการล้างด้วย acetone ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 70–100 เปอร์เซ็นต์ แล้วใส่ resin ลงไปเพื่อให้เชื้อเกาะอยู่ที่ resin และเมื่อทดลองนำกล้าเชื้อดังกล่าวไปใช้ในถังหมักขนาด 200 ลิตร ที่จำลองระบบการหมุนเวียนน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง พบว่าปริมาณแอมโมเนียถูกกำจัดไป 1.948 และ 1.242 g/l ในวันที่ 160 และ 270 ตามลำดับ ส่วน Dhanasiri *et al.* (2011) ได้ศึกษาการใช้กลุ่มเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (nitrifying bacterial consortia) ในการกำจัดแอมโมเนียในตู้ขนส่งปลาม้าลาย (zebrafish) โดยได้เปรียบเทียบกลุ่มเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียทั้งกลุ่ม AOB และ NOB จำนวนสองชุด ชุดแรก คือ Nbc 1 ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อเหลวที่ประกอบด้วย *Nitrosomonas marina* เป็นเชื้อ AOB และ *Nitrobacter winogradskyi* กับ *Nitrobacter alcalicus* เป็นเชื้อ NOB ส่วนชุดที่สอง คือ Nbc 2 ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อผงที่ประกอบด้วย *Nitrosomonas eutropha* เป็นเชื้อ AOB และ *Nitrobacter winogradskyi* เป็นเชื้อ NOB จากการทดลองพบว่า การใช้กลุ่มเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียโดยเฉพาะกลุ่มเชื้อชุด Nbc 1 มีประสิทธิภาพในการลดแอมโมเนียในตู้ขนส่งปลาม้าลายได้ดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมกลุ่มเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรีย เพราะว่าการเติมกลุ่มเชื้อดังกล่าวมีองค์ประกอบทั้งเชื้อ AOB และ NOB ซึ่งทำให้กระบวนการไนตริฟิเคชันเกิดได้อย่างสมบูรณ์ และสอดคล้องกับการศึกษา DGGE profile ของกลุ่มเชื้อดังกล่าวที่พบว่ามีแถบ DNA ของเชื้อกลุ่มไนตริไฟอิงแบคทีเรียปรากฏอยู่ในชุดการทดลองที่เติมกลุ่มเชื้อทั้ง 2 ชุด (Nbc 1 และ Nbc 2) ขณะที่ไม่พบแถบ DNA ของเชื้อกลุ่มไนตริไฟอิงแบคทีเรียของชุดควบคุม (Cont) ที่ไม่มีการเติมกลุ่มเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรีย เช่นเดียวกับ Kumar *et al.* (2013) ที่ได้พัฒนากล้าเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียทางการค้าขึ้น เรียกว่า nitrifying bacterial consortia (NBC) ที่แยกจากน้ำเค็มและน้ำกร่อย สำหรับใช้ในถังหมักชีวภาพชนิด Packed Bed Bioreactor (PBBR) และ Stringed Bed Suspended Bioreactor (SBSBR) และได้รายงานว่ากล้าเชื้อ NBC ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพดีในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) นอกจากนี้ Suantika *et al.* (2013) ได้รายงานการทดลองการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Halomonas aquamarina* และ *Shewanella algae* เป็นโปรไบโอติกในการอนุบาลลูกกุ้งขาว ว่า

เชื้อทั้งสองชนิดนี้ทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม มีความสามารถในการเพิ่มอัตราการรอดของลูกกุ้งขาว ระยะเวลาโพสต์ลาร์วา (post larva) ได้มากถึง 90 เปอร์เซ็นต์

จากการทบทวนวรรณกรรมข้างต้นทำให้เห็นว่า เชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียมี ประสิทธิภาพ และศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการบำบัดน้ำ และยังมีประเด็นที่ น่าสนใจเกี่ยวกับการใช้กล้าเชื้อผสมในการบำบัดน้ำเสีย โดยรายงานวิจัยส่วนใหญ่ระบุว่า การใช้กล้า เชื้อผสมมีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียได้ดีกว่ากล้าเชื้อเดี่ยว ดังนั้นจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่งใน การศึกษาการสร้างผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อผสมเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรีย สำหรับใช้ในการบำบัด น้ำเสียในระบบการเลี้ยงกุ้ง

4. การใช้แบคทีเรียไนตริไฟอิงตรึงกับวัสดุตัวกลางสำหรับการบำบัดน้ำ

มีการศึกษาการใช้กระบวนการไนตริฟิเคชันในการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจน (แอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท) หลากหลายรูปแบบ เช่น การใช้เซลล์แบบแขวนลอย และแบบตรึงเซลล์ ซึ่ง ส่วนใหญ่การศึกษากระบวนการไนตริฟิเคชันจะศึกษาโดยใช้รูปแบบการตรึงเซลล์ เนื่องจากไนตริไฟอิง แบคทีเรียต้องใช้ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งการตรึงเซลล์จะไม่ทำให้แบคทีเรียสูญเสีย ออกไปจากระบบ วัสดุที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์ไนตริไฟอิงแบคทีเรียคือ เม็ดพลาสติกพอลิโพรไพลีน (polypropylene), แผ่นพอลิเอทิลีน (Polyethylene; PE), พีวีซี (Polyvinyl chloride, PVC), คาร์ ราจีแนน (Carrageenan), พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl alcohol, PVA), โพลีอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide, PAM), โพลียูรีเทน (Polyurethane) และเอทิลีนไกลคอล (ethylene glycol) (Krüner and Rosenthal, 1983; Trampler and Grootjen, 1986; Ichimura *et al.*, 1987; Sumino *et al.*, 1987 Sumino *et al.*, 1992a; Sumino *et al.*, 1992b; Dong *et al.*, 2010; Lertsutthiwong *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2017)

อรุณวรรณและคณะ (2548) ศึกษาปริมาณแผ่นโพลีเอสเตอร์ที่เหมาะสม (0-5% ของ ปริมาตรเปียก) ที่มีไนตริไฟอิงแบคทีเรียตรึงอยู่ เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีความเข้มข้นของ แอมโมเนียอยู่ในช่วง 1-10 mg-N/L จากการศึกษาพบว่าจะต้องใช้แผ่นตรึงเซลล์อย่างน้อย 3 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ระดับแอมโมเนียเริ่มต้นไม่เกิน 3 mg-N/L จึงจะสามารถกำจัดแอมโมเนียได้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่หากต้องการลดปริมาณของไนโตรเจนที่เหลือ 0.02 mg-N/L แล้ว จะต้องใช้แผ่น ตรึง 5 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นอยู่ที่ 3 mg-N/L เช่นเดียวกัน

ชุมพลและคณะ (2557) ได้ทำใช้ไนตริไฟอิงแบคทีเรีน้ำเค็มตรึงบนเม็ดโพลีเอสเตอร์เพื่อใช้ ในการกำจัดแอมโมเนียและไนโตรเจนในบ่ออนุบาลลูกกุ้งที่มีความหนาแน่น 150 ตัว/L ร่วมกับระบบน้ำ หมุนเวียน โดยทำการทดลอง 3 ชุดการทดลอง คือ ชุดควบคุมที่ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ ชุดควบคุมที่มี การเปลี่ยนถ่ายน้ำ และชุดการทดลองที่มีการติดตั้งระบบบำบัดน้ำไนตริไฟอิงแบคทีเรีย พบว่าในชุด

การทดลองที่มีการติดตั้งระบบบำบัดน้ำไนตริไฟอิงแบบที่เรียและชุดควบคุมที่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ ปริมาณของแอมโมเนียไม่มีความแตกต่างกัน แต่ชุดการทดลองที่มีการติดตั้งระบบบำบัดน้ำไนตริไฟอิง แบบที่เรียสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ เช่น ค่าน้ำเค็ม ค่าแรงงาน ค่าสารเคมีสำหรับเตรียมน้ำ รวมถึง ค่าพลังงานที่ใช้ในการเปลี่ยนถ่ายน้ำ อีกทั้งการระบายน้ำที่ออกจากบ่ออนุบาลลูกกุ้งยังไม่ส่งผลกระทบต่อชุดควบคุมที่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ

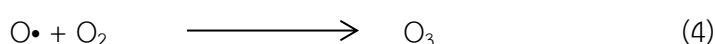
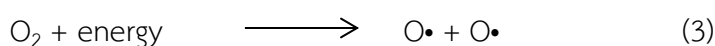
Gross *et al.* (2003) ได้ทำการตรึงและเพิ่มปริมาณเชื้อไนตริไฟอิงแบบที่เรียบนเม็ดพลาสติก (macaroni beads) เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำภายในบ่อเลี้ยงปลา และเปรียบเทียบกับบ่อที่ไม่ใส่เชื้อ พบว่าบ่อที่ใส่เชื้อมีค่าแอมโมเนียเฉลี่ยน้อยกว่า 2 mg/L ในขณะที่บ่อที่ไม่ใส่เชื้อมีแอมโมเนียสูงสุด 18 mg/L เช่นเดียวกับ Dong *et al.* (2010) ได้ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของเชื้อไนตริไฟอิงแบบที่เรียที่ตรึงบนโพลียูรีเทน (polyurethane) เปรียบเทียบกับการใช้เชื้อแขวนลอย พบว่าการใช้เชื้อที่ตรึงบนโพลียูรีเทนมีประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียดีกว่าการใช้เชื้อแขวนลอย นอกจากนี้ยังมีวัสดุทางชีวภาพที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ หิน ทราวย และเปลือกหอย ซึ่งจะมีราคาถูก แต่มีปัญหาเรื่องการอุดตันของตัวกรองและน้ำหนักรวมที่มีมากและมีความคงทนของวัสดุต่ำ

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าขั้นตอนการบำบัดน้ำทั้งจากการเลี้ยงกุ้งโดยกระบวนการทางชีวภาพ จะสามารถกำจัดสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ในแหล่งน้ำได้ แต่ก็ไม่สามารถกำจัดเชื้อก่อโรคในแหล่งน้ำทั้งแบคทีเรียและไวรัสได้ ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้โอโซนมาใช้ในการบำบัดน้ำ เพื่อใช้ในการบำบัดคุณภาพน้ำและทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้

5. โอโซน

โอโซนมีการนำมาใช้ในการกำจัดเชื้อโรคในน้ำดื่มและน้ำเสีย โดยที่โอโซนเป็นสารฆ่าเชื้อโรค (Disinfectant) ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับคลอรีนและสามารถบำบัดคุณภาพน้ำ เช่น ลดปริมาณของแข็งแขวนลอยในน้ำ (TSS) ลดค่าความต้องการออกซิเจนทางเคมี (COD) และลดค่าออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (BOD) รวมถึงไม่สร้างสารประกอบที่เป็นพิษให้แก่ น้ำที่บำบัด ไม่เกิดปัญหาเกี่ยวกับการขนถ่ายสารเคมี แต่มีข้อเสียคือ ต้นทุนอุปกรณ์ราคาสูง ต้องติดตั้งอยู่กับที่ ความสามารถในการละลายต่ำที่อุณหภูมิสูง บำรุงรักษายาก นอกจากความสามารถในการบำบัดคุณภาพน้ำแล้ว ยังช่วยให้สีน้ำและกลิ่นของน้ำดีขึ้นอีกด้วย (Evan, 1972; Lin and Yeh, 1993; Sallanko and Okkonen, 2009) อีกทั้งโอโซนยังไม่สร้างสารประกอบที่เป็นพิษแก่ น้ำ และยังสามารถสลายตัวเร็ว ซึ่งการสลายตัวของโอโซนขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ pH ปริมาณสารอินทรีย์และอนินทรีย์ที่ละลายอยู่ในน้ำ โอโซนมีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์อย่างรุนแรง สามารถเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วและมีอายุสั้น มีพิษน้อย การผลิตโอโซนมี 2 วิธี คือ โอโซนที่เกิดจากการถ่ายประจุไฟฟ้าแบบ High voltage corona ที่มีความต่างศักย์สูง 5,000 – 10,000 (Corona type)

(Roustan, 1997) และโอโซนที่ผลิตจากหลอดอัลตราไวโอเล็ต มีความยาวคลื่น 170-250 nm รังสีอัลตราไวโอเล็ตจะกระตุ้นให้เกิดการเหนี่ยวนำก๊าซออกซิเจนให้แตกตัวออกเป็น 2 อะตอมที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (อนันต์, 2542) โอโซนที่เกิดขึ้นเมื่อรวมตัวกับออกซิเจนดังสมการที่ (3) และ (4) ตามลำดับ การเกิดโอโซนนี้เป็นสภาวะสมดุลของการเกิดปฏิกิริยา (Equilibrium reaction) ดังนั้นจะเกิดปฏิกิริยาผันกลับของโอโซนที่อุณหภูมิของการเกิดปฏิกิริยาสูงกว่า 32 องศาเซลเซียส (อนันต์, 2542)



ปัจจุบันได้มีการนำโอโซนมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในแง่ของการฆ่าเชื้อโรคและปรับปรุงคุณภาพน้ำอย่างกว้างขวาง โดยที่มีการรายงานว่าโอโซนมีความสามารถในการควบคุมโปรโตซัวได้ดี และมีความสามารถในการฆ่าเชื้อ และปรับปรุงคุณภาพน้ำโดยการออกซิไดซ์สารอินทรีย์จำพวกสารประกอบไนโตรเจน (ชัชวาล และคณะ, 2544; Liltved *et al.*, 1995) จากการศึกษาของ Owsley (1991) รายงานว่าการใช้โอโซนที่ความเข้มข้น 0.2 mg/L เป็นเวลา 10 นาที มาใช้ในการบำบัดน้ำที่ผ่านการเพาะเลี้ยง สามารถฆ่า infectious hematopointic necrosis virus (IHNV) เมื่อน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วทำการผ่าน pack column ซึ่งจะสามารถลดระดับโอโซนลงจนไม่มีพิษต่อปลาที่เลี้ยง หากใช้โอโซนที่ความเข้มข้น 0.15 – 0.20 mg/L เป็นเวลา 180 วินาที สามารถฆ่าแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida* และ *Yersinia ruckeri* และสามารถกำจัดไวรัสได้ถึง 99.99% และการใช้โอโซนที่ความเข้มข้น 0.1 µg/L เป็นเวลา 2.5 นาที สามารถฆ่าเชื้อ striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) ได้ (Liltved *et al.*, 1995; Arimoto *et al.*, 1996) และยังพบว่าการใช้โอโซนในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำส่วนใหญ่มักจะใช้ในโรงเพาะฟัก การเลี้ยงในระบบรีไซเคิล และการเลี้ยงกุ้งทะเล

แต่โอโซนเองก็มีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ โดยพบว่ากุ้งกุลาดำระยะ P 15 สามารถทนต่อโอโซนที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 0.34–0.50 mgO₃/L ROC (ROC = Residual Ozone Concentration) มากกว่า 8 ชั่วโมง โดยไม่มีการตายของลูกกุ้ง แต่ขาเดินและขาว่ายน้ำของลูกกุ้งจะอ่อนแอลงและเกิดการกระตุก เมื่อตรวจสอบเนื้อเยื่อภายหลัง 8 ชั่วโมง พบการบวมน้ำในเหงือกและมีเลือดซังภายในนิวเคลียส แต่ชั่วโมงที่ 10 จะเกิดการตายของลูกกุ้งโดยคิดเป็น 23 เปอร์เซ็นต์ และจะเพิ่มเป็น 34 เปอร์เซ็นต์ และเนื้อเยื่อเหงือกจะมีการขยายใหญ่ขึ้น (Meunpol *et al.*, 2003)

ดังนั้นการสร้างชุดอุปกรณ์บำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งแบบสองชั้นตอนนอกจากจะสามารถกำจัดสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ได้แล้ว ยังสามารถกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรคในกุ้งได้อีกด้วย

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียและศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสารประกอบไนโตรเจน

นำกล้าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28°C เขย่าที่ 170 rpm จากนั้นทำการศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบไนโตรเจนหัวเชื้อเดี่ยวและหัวเชื้อผสมโดยใช้น้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ที่อัตราส่วน 1% (v/v) ที่อุณหภูมิ 28°C เขย่า 170 rpm เป็นเวลา 5 วัน และทำการทดสอบคุณภาพน้ำ ดังตารางที่ 2 (Chankaew *et al.*, 2018; Sangnoi *et al.*, 2017)

ตารางที่ 2 วิธีการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสารอินทรีย์ไนโตรเจน

Parameter	Method	Reference
Ammonia (mg/L)	Phenol – hypochlorite method	Strickland and Parson (1972)
Nitrite (mg/L)	Colorimetric method	Strickland and Parson (1972)
Nitrate (mg/L)	Cadmium Reduction Column	Strickland and Parson (1972)

2. ชุดอุปกรณ์จำลองระบบบำบัดน้ำแบบสองขั้นตอน

2.1 อุปกรณ์จำลองระบบบำบัดน้ำขั้นตอนที่ 1 (แบคทีเรีย)

1) การตรึงกล้าเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุยึดเกาะ

ทำการฆ่าเชื้ออาหารเหลวที่มีวัสดุสำหรับตรึงของแบคทีเรีย (สารกรองเรซินหรือเซรามิก) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงเปิดกล้าเชื้อแบคทีเรีย 1% (v/v) ที่มีปริมาณเชื้อ 10^9 CFU/ml เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสารกรองเรซินที่เตรียมไว้และเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 170 rpm ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 3 วัน

2) การทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำของวัสดุ

ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งโดยใช้ 5% และ 10% (w/v) ของวัสดุยึดเกาะที่ผ่านการตรึงเซลล์แล้วใส่ในฟลาสก์ที่มีน้ำเสีย 100 ml ทำการเขย่าที่ 170 rpm ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบตามกำหนดทำการทดสอบคุณภาพน้ำดังตารางที่ 2

3) สร้างชุดอุปกรณ์ (คอลัมน์) ระบบบำบัดน้ำทางชีวภาพ

ทำการสร้างฝาและปิดท่ออะคริลิกทรงกระบอก เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 cm หนา 0.3 cm ความยาว 17 cm พร้อมทั้งเจาะรูที่ฝาและก้นท่ออะคริลิกโดยให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 cm สำหรับให้สายซิลิโคนผ่านได้ ใช้กล่องพลาสติกขนาดความจุ 3 ลิตร สำหรับใส่น้ำเสีย พร้อมทั้งติดตั้งปั้มน้ำ และเจาะรูที่ฝากล่องสำหรับให้สายซิลิโคนผ่าน

ผลตกกล้าเชื้อเฮเทอโรโทรฟิกไนตริไฟอิงแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นเชื้อ 10^9 CFU/ml จากนั้นทำการตรึงแบคทีเรียบนวัสดุยึดเกาะ (สารกรองเรซินหรือแท่งเซรามิก) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยป้อนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรีย (cell suspension) จากด้านล่างของคอลัมน์อะคริลิก (up flow immobilization) แล้วจึงทำการศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยปรับให้มีอัตราการไหลผ่านของน้ำเสีย 10–15 ml/min และทำการทดสอบคุณภาพน้ำดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง

Parameter	Method	Reference
Ammonia (mg/L)	Phenol – hypochlorite method	Strickland and Parson (1972)
Nitrite (mg/L)	Colorimetric method	Strickland and Parson (1972)
Nitrate (mg/L)	Cadmium Reduction Column	Strickland and Parson (1972)
Orthophosphate (mg/L)	Ascorbic acid method	Strickland and Parson (1972)

4) จำลองระบบบำบัดน้ำเสียแบบ 2 ขั้นตอน

ทำการประกอบชุดอุปกรณ์บำบัดน้ำขั้นตอนที่ 1 และขั้นตอนที่ 2 เข้าด้วยกัน โดยชุดอุปกรณ์บำบัดน้ำขั้นตอนที่ 1 จะใช้วัสดุที่มีการตรึงของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบไนโตรเจนสูง ร่วมกับชุดอุปกรณ์บำบัดน้ำขั้นตอนที่ 2 ที่ใช้ปริมาณโอโซนอิมพอสเป็นระยะเวลา 10 นาที โดยทำการทดสอบกับน้ำเสียสังเคราะห์หรือน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง และทำการทดสอบคุณภาพน้ำดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียโดยใช้ชุดระบบบำบัดน้ำเสียในการเลี้ยงกุ้งแบบสองขั้นตอน

Parameter	Method/Equipment	Reference
Ammonia (mg-N/L)	Phenol – hypochlorite method	Strickland and Parson (1972)
Nitrite (mg-N/L)	Colorimetric method	Strickland and Parson (1972)
Nitrate (mg-N/L)	Cadmium reduction method	Strickland and Parson (1972)
Orthophosphate (mg/L)	Ascorbic acid method	Strickland and Parson (1972)
Total bacteria count	Standard plate count	FAO (1992)

5) ทดสอบใช้ชุดอุปกรณ์บำบัดน้ำเสียแบบ 2 ขั้นตอนในโรงเพาะฟักกุ้งทะเล

ศึกษาการประยุกต์ใช้ชุดอุปกรณ์ระบบบำบัดน้ำเสียในการเลี้ยงกุ้งแบบสองขั้นตอนด้วยผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อแบคทีเรียและก๊าซโอโซนในโรงเพาะฟักกุ้ง โดยใช้ปัจจัยที่ดีที่สุดในการทดลอง เพื่อนำมาใช้ในโรงเพาะฟักและฟาร์มอนุบาลลูกกุ้ง โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำมาวิเคราะห์คุณภาพน้ำจำนวน 3 จุด ดังนี้ (ภาพที่ 6)

จุดที่ 1 เก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อเพาะเลี้ยงก่อนที่จะเข้าสู่อุปกรณ์ชุดที่ 1

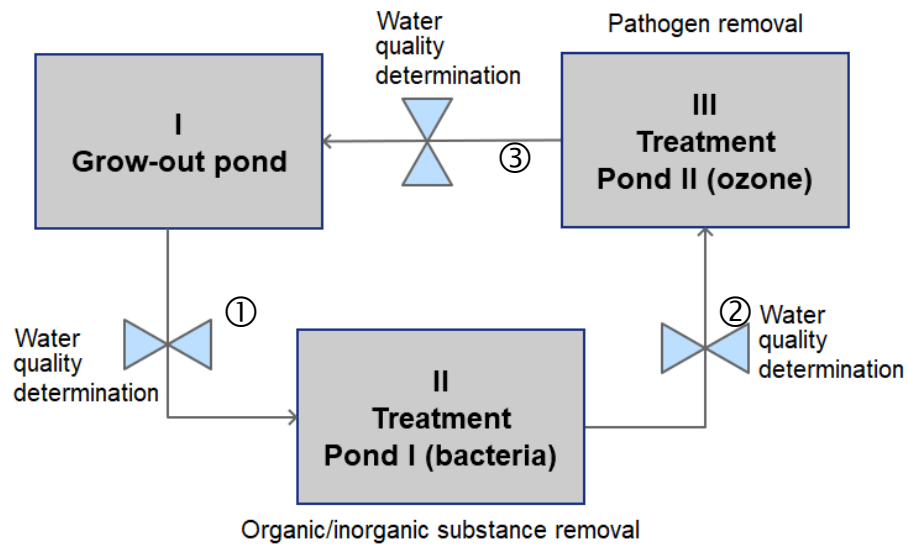
จุดที่ 2 เก็บตัวอย่างน้ำที่ออกจากอุปกรณ์ชุดที่ 1 และก่อนเข้าสู่อุปกรณ์ชุดที่ 2

จุดที่ 3 เก็บตัวอย่างน้ำที่ออกจากอุปกรณ์ชุดที่ 2

ทั้ง 3 จุดการเก็บตัวอย่างจะทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางกายภาพ และเคมี รวมถึงการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งโดยใช้ชุดระบบบำบัดน้ำเสียในการเลี้ยงกุ้งแบบสองขั้นตอน

Parameter	Method/Equipment	Reference
pH	pH meter	-
Dissolved oxygen (mg/L)	DO meter	-
Temperature (°C)	Thermometer	-
Total suspended solids (TSS)	-	Strickland and Parson (1972)
Ammonia (mg-N/L)	Phenol – hypochlorite method	Strickland and Parson (1972)
Nitrite (mg-N/L)	Colorimetric method	Strickland and Parson (1972)
Nitrate (mg-N/L)	Cadmium reduction method	Strickland and Parson (1972)
Orthophosphate (mg/L)	Ascorbic acid method	Strickland and Parson (1972)
COD	Closed reflux method	APHA <i>et al.</i> (2012)
BOD ₅	5 Days Incubation	APHA <i>et al.</i> (2012)
Target bacterial count (<i>Vibrio</i> spp.)	Standard plate count	FAO (1992)
Total Bacteria Count	Standard plate count	FAO (1992)



ภาพที่ 6 การประยุกต์ใช้อุปกรณ์บำบัดน้ำเสียแบบ 2 ขั้นตอนในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

3. ชุดอุปกรณ์ต้นแบบระบบบำบัดน้ำแบบสองขั้นตอน

ทำการประกอบชุดอุปกรณ์ต้นแบบระบบบำบัดน้ำทางชีวภาพ ด้วยกระบอกกรองน้ำสำเร็จรูป ขนาด 1 ลิตร จำนวน 3 กระบอก สำหรับบรรจุกระบอกสารกรองเรซินที่ผ่านการตรึงเซลล์แบคทีเรียแล้ว ประกอบกับปั้มน้ำขนาดเล็ก สำหรับดูดน้ำเสียเข้าสู่ชุดอุปกรณ์ต้นแบบ จากนั้นส่งตรงไปยังกระบอกกักเก็บน้ำ ขนาดประมาณ 5 ลิตร ที่ทำการต่อสายโอโซนเข้ามา เพื่อทำการฆ่าเชื้อโรคและจุลินทรีย์ต่าง ๆ ก่อนนำน้ำกลับไปหมุนเวียนในระบบอีกครั้ง ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ชุดอุปกรณ์ต้นแบบระบบบำบัดน้ำในการเลี้ยงกุ้งแบบสองขั้นตอน

3.1 ชุดอุปกรณ์ต้นแบบระบบบำบัดน้ำขั้นตอนที่ 1 (แบคทีเรีย)

1) การตรึงกล้าเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุยึดเกาะ

ทำการฆ่าเชื้ออาหารเหลว วัสดุสำหรับตรึงของแบคทีเรีย (สารกรองเรซิน) และน้ำเกลือที่ความเค็ม 2 เปอร์เซ็นต์ NaCl สำหรับขยายเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงเปิดกล้าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus oceanosediminis* Ba9 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ที่มีปริมาณเชื้อ 10^9 CFU/ml เลี้ยงในอาหารเหลวที่เตรียมไว้และเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 170 rpm ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการขยายเชื้อแบคทีเรียในน้ำเกลือที่ความเค็ม 2% NaCl โดยให้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการตรึงเชื้อแบคทีเรียบนสารกรองเรซินด้วยท่อปิดพีวีซี เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 นิ้ว หนา 0.3 cm ความยาว 32 cm พร้อมทั้งเจาะรูที่ฝาและก้นท่อพีวีซี โดยให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 cm สำหรับให้สายซิลิโคนผ่านได้ ใช้กล่องพลาสติกขนาดความจุ 3 ลิตร สำหรับใส่น้ำเกลือ 2 เปอร์เซ็นต์ NaCl ที่ทำการขยายเชื้อแล้ว พร้อมทั้งติดตั้งปั้มน้ำและเจาะรูที่ฝากล่องสำหรับให้สายซิลิโคนผ่าน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยปั้มน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรีย (cell suspension) จากด้านล่างของท่อปิดพีวีซี (upflow immobilization) โดยปรับให้มีอัตราการไหลผ่านของน้ำเสีย 10–15 ml/min เมื่อทำการตรึงของแบคทีเรียบนสารกรองเรซินเรียบร้อยแล้ว นำกระบอกที่บรรจุสารกรองเรซินใส่ลงในกระบอกกรองน้ำสำเร็จรูป ขนาด 1 ลิตร ทั้ง 3 กระบอก

2) การทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำของวัสดุยัดเกาะ

ทำการศึกษาดูประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยใช้น้ำตัวอย่าง 100 ml จากน้ำเสียในบ่อเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการบำบัดในกระบอกที่บรรจุสารกรองเรซินที่ผ่านการตรึงเซลล์แล้ว ทำการทดสอบคุณภาพน้ำดังตารางที่ 6

3.2 ชุดอุปกรณ์ต้นแบบระบบบำบัดน้ำขั้นตอนที่ 2 (โอโซน)

ชุดอุปกรณ์บำบัดน้ำขั้นตอนที่ 1 และขั้นตอนที่ 2 ประกอบเข้าด้วยกัน โดยชุดอุปกรณ์บำบัดน้ำขั้นตอนที่ 1 จะใช้วัสดุที่มีการตรึงของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบไนโตรเจนสูง จะส่งน้ำเสียต่อรวมกับชุดอุปกรณ์บำบัดน้ำขั้นตอนที่ 2 ที่ใช้ปริมาณโอโซนอิ่มพอเป็นระยะเวลา 30 นาที โดยทำการทดสอบกับน้ำเสียสังเคราะห์หรือน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง และทำการทดสอบคุณภาพน้ำ ดังตารางที่ 6

3.3 ทดสอบใช้ชุดอุปกรณ์บำบัดน้ำเสียแบบ 2 ขั้นตอนในโรงเพาะฟักกุ้งทะเล

ศึกษาการประยุกต์ใช้ชุดอุปกรณ์ระบบบำบัดน้ำเสียในการเลี้ยงกุ้งแบบสองขั้นตอนด้วยผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อแบคทีเรียและก๊าซโอโซนในโรงเพาะฟักกุ้ง โดยใช้ปัจจัยที่ดีที่สุดในการทดลอง เพื่อนำมาใช้ในโรงเพาะฟักและฟาร์มอนุบาลลูกกุ้ง โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำมาวิเคราะห์คุณภาพน้ำจำนวน 3 จุด เช่นเดียวกับชุดจำลองอุปกรณ์บำบัดน้ำเสีย (ภาพที่ 6) ทั้ง 3 จุดการเก็บตัวอย่างจะทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางกายภาพ และเคมี รวมถึงการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 การศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งโดยใช้ชุดอุปกรณ์ต้นแบบระบบบำบัดน้ำเสียในการเลี้ยงกุ้งแบบสองขั้นตอน

Parameter	Method/Equipment	Reference
Total suspended solids (TSS)	-	Strickland and Parson (1972)
Ammonia (mg-N/L)	Phenol – hypochlorite method	Strickland and Parson (1972)
Nitrite (mg-N/L)	Colorimetric method	Strickland and Parson (1972)
Nitrate (mg-N/L)	Cadmium reduction method	Strickland and Parson (1972)
Orthophosphate (mg/L)	Ascorbic acid method	Strickland and Parson (1972)
COD	Closed reflux method	APHA <i>et al.</i> (2012)
BOD ₅	5 Days Incubation	APHA <i>et al.</i> (2012)
Total Bacteria Count	Standard plate count	FAO (1992)

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

เมื่อได้ผลการวิเคราะห์น้ำในพารามิเตอร์ต่างๆแล้ว นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ความแตกต่างของระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลอง โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test และ T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม R

ผลการทดลองและวิจารณ์

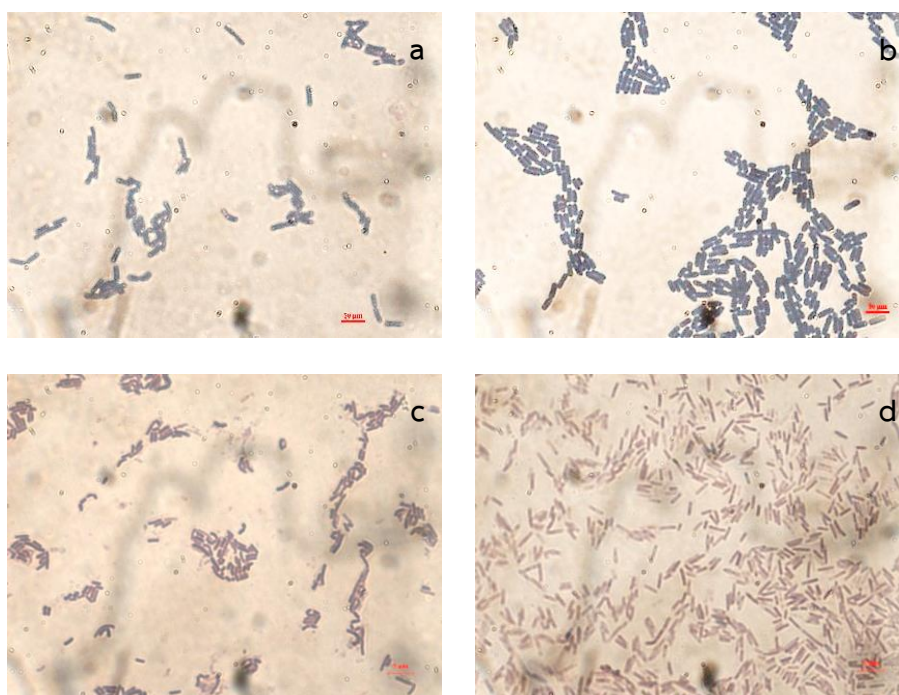
1. ผลการแยกเชื้อและคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรีย

จากการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีความสามารถในการทนเค็ม สำหรับนำมาใช้ในการบำบัดน้ำ พบว่ามีแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินในแหล่งน้ำเค็ม จำนวน 4 ไอโซเลทที่ย้อมติดสีแกรมบวกและมีรูปร่างแบบแท่ง (ภาพที่ 8) และเมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท (Ba9, Ba11, SF-1 และ SF-5) มาทดสอบแคตตาเลส และศึกษาการสร้างสปอร์ภายในเซลล์พบว่า แบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลทมีการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ (ตารางที่ 7) ซึ่งเป็นคุณลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรีย *Bacillus* และเมื่อศึกษาชนิดของแบคทีเรียด้วยดีเอ็นเอ (DNA) โดยใช้ยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลทเป็นแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ Ba9 มีความคล้ายคลึงกับ *B. oceanisediminis* 99 เปอร์เซ็นต์, Ba11 มีความคล้ายคลึงกับ *B. thuringiensis* 98 เปอร์เซ็นต์, SF-1 มีความคล้ายคลึงกับ *B. vietnamensis* 92 เปอร์เซ็นต์ และ SF-5 คล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *B. firmus* 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ที่วิเคราะห์ได้ (ภาพที่ 9)

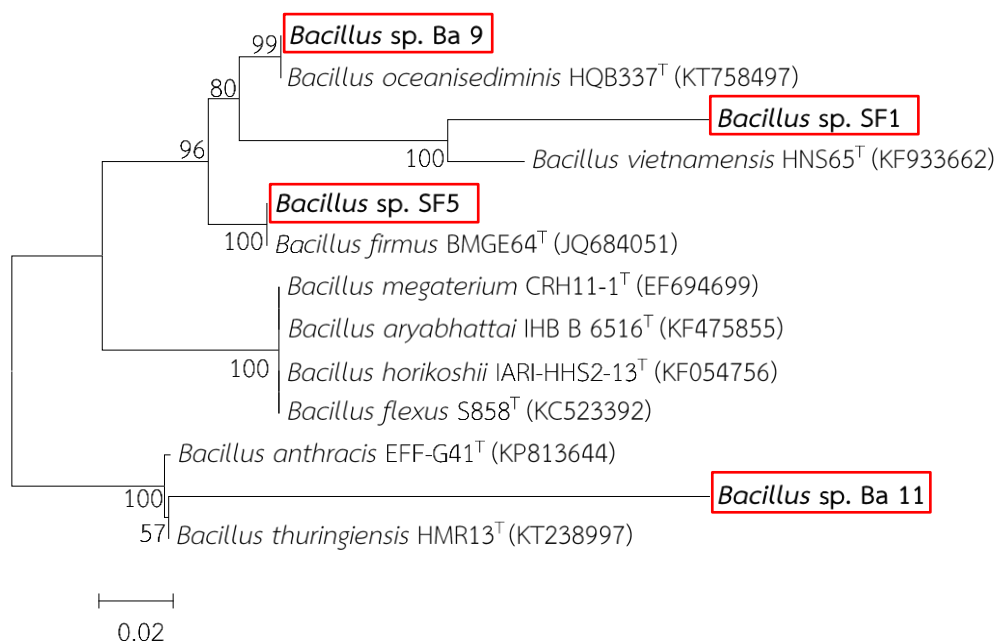
นอกจากนี้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลทมีความสามารถในการกำจัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนีย (ammonia) ไนไตรท์ (nitrite) และไนเตรท (nitrate) และสามารถลดออร์โธฟอสเฟต (orthophosphate) ค่าบีโอดี (Biological Oxygen Demand: BOD) และค่าซีโอดี (Chemical Oxygen Demand: COD) ในน้ำเสียได้เช่นเดียวกับการศึกษาของ Chankaew *et al.* (2018) และ Sangnoi *et al.* (2017)

ตารางที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. แต่ละสายพันธุ์

Characteristic	Ba9	Ba11	SF1	SF5
Isolation source	Sediment	Sediment	Sediment	Sediment
Shape	Rod	Rod	Rod	Rod
Gram's stain	+	+	+	+
Endospore forming	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+
Optimal salinity (%NaCl w/v)	1.5-4	1.5	2-4	2-3



ภาพที่ 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Bacillus* spp.; a) *Bacillus* sp. Ba9, b) *Bacillus* sp. Ba11, c) *Bacillus* sp. SF-1 และ d) *Bacillus* sp. SF-5.



ภาพที่ 9 แผนภูมิวิวัฒนาการของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ตัดแยกได้ โดยศึกษาจากยีน 16S rRNA (Bar=0.02).

1.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียเป็นระยะเวลา 14 วัน

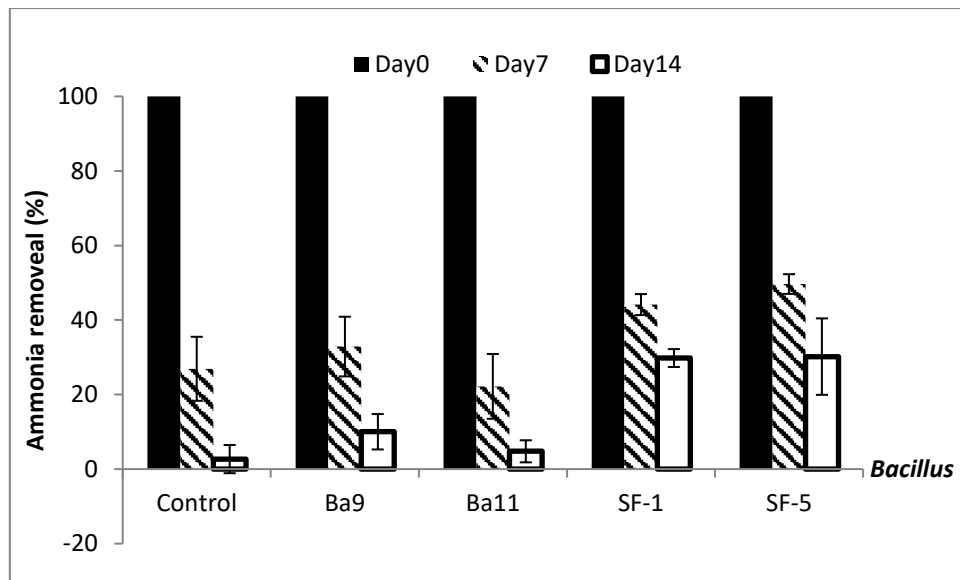
● แอมโมเนีย

จากการวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียในน้ำเสียสังเคราะห์ของแต่ละชุดการทดลอง พบว่า ปริมาณแอมโมเนียมีแนวโน้มลดลงในทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 8) โดยเมื่อผ่านการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า ทุกชุดการทดลองมีการลดลงของแอมโมเนีย โดยพบว่า *Bacillus* sp. Ba11 มีความสามารถในการลดปริมาณแอมโมเนียได้ 77.81 ± 8.69 เปอร์เซ็นต์ และลดลง 95.23 ± 2.96 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 14 (ภาพที่ 10)

ตารางที่ 8 ความสามารถในการบำบัดแอมโมเนียเบื้องต้นของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. 4 ไอโซเลท เป็นระยะเวลา 14 วัน

Experiment	Day	Initial Ammonia (mg-N/L)	Final Ammonia (mg-N/L)	Ammonium removal (mg-N/L)	Ammonium removal (%)
Control	Day 0				
	Day 7	155.59±0.00 ^a	41.46±19.59 ^{ab}	114.19±18.38 ^{bc}	73.09 ± 58.59 ^b
	Day 14		4.167±5.88 ^e	151.42±5.42 ^a	97.32 ± 3.78 ^a
<i>Bacillus</i> sp. Ba9	Day 0	155.59±0.00 ^a			
	Day 7		51.17±12.44 ^a	104.42±12.14 ^c	67.12 ± 8.00 ^b
	Day 14		15.60±7.39 ^{de}	139.99±7.35 ^a	89.98 ± 4.75 ^a
<i>Bacillus</i> sp. Ba11	Day 0	155.59±0.00 ^a			
	Day 7		34.52±13.52 ^{bc}	121.07±11.88 ^b	77.81 ± 8.69 ^b
	Day 14		7.43±4.61 ^e	148.16±4.36 ^a	95.23 ± 2.96 ^a
<i>Bacillus</i> sp. SF-1	Day 0	65.08±0.00 ^b			
	Day 7		28.72±2.22 ^{bcd}	36.36±1.84 ^d	55.86±2.82 ^c
	Day 14		19.40±1.31 ^{cde}	45.68±1.33 ^d	70.20±2.04 ^b
<i>Bacillus</i> sp. SF-5	Day 0	65.08±0.00 ^b			
	Day 7		32.32±1.89 ^{bc}	32.76±1.72 ^d	50.34±2.64 ^c
	Day 14		19.64±6.80 ^{cde}	45.76±1.72 ^d	69.82±10.26 ^b

หมายเหตุ : ตัวเลขที่นำเสนอนี้เป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มี ความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)



ภาพที่ 10 ความสามารถในการบำบัดแอมโมเนียเบื้องต้นของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. 4 ไอโซเลท

- ไนไตรท์

การวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์ในแต่ละชุดการทดลอง พบว่าในวันที่ 7 ของการทดลอง ทุกชุดการทดลองมีการลดลงของปริมาณไนไตรท์ และเพิ่มขึ้นในวันที่ 14 ของการทดลอง ซึ่งชุดการทดลอง Ba11 และชุด Ba9 มีปริมาณไนไตรท์เท่ากับ 0.09 ± 0.03 mg-N/L และ 0.16 ± 0.07 mg-N/L ตามลำดับและ *Bacillus* sp. SF-1 มีค่าเท่ากับ 0.93 ± 0.41 mg-N/L *Bacillus* sp. SF-5 มีค่าเท่ากับ 0.93 ± 0.76 mg-N/L (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ความสามารถในการบำบัดไนไตรท์เบื้องต้นของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 4 ไอโซเลท เป็นระยะเวลา 14 วัน

Experiment	Day	Initial Nitrite (mg-N/L)	Final Nitrite (mg-N/L)	Nitrite production (mg-N/L)
Control	Day 0	0.02± 0.00 ^a		
	Day 7		0.01±0.00 ^b	-0.01±0.00 ^b
	Day 14		0.08±0.06 ^a	0.06±0.06 ^b
<i>Bacillus</i> sp. Ba9	Day 0	0.02± 0.00 ^a		
	Day 7		0.01±0.01 ^b	-0.01±0.01 ^b
	Day 14		0.16±0.07	0.14±0.06 ^b
<i>Bacillus</i> sp. Ba11	Day 0	0.02± 0.00 ^a		
	Day 7		0.01±0.01 ^b	-0.01±0.01 ^b
	Day 14		0.09±0.03 ^b	0.07±0.03 ^b
<i>Bacillus</i> sp. SF-1	Day 0	0.05±0.00 ^b		
	Day 7		0.00±0.00 ^b	-0.05±0.00 ^b
	Day 14		0.93±0.41 ^a	0.88±0.41 ^a
<i>Bacillus</i> sp. SF-5	Day 0	0.05±0.00 ^b		
	Day 7		0.00±0.00 ^b	-0.05±0.00 ^b
	Day 14		0.93±0.76 ^a	0.88±0.71 ^a

หมายเหตุ : - = การลดลงของปริมาณไนเตรทที่น้อยกว่าวันเริ่มต้น

ตัวเลขที่นำเสนอมือเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ
ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P>0.05$)

- ไนเตรท

จากการวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทในแต่ละชุดการทดลอง พบว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรีย *Bacillus* spp. Ba9 และ Ba11 พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของปริมาณไนเตรทอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาทดลอง 14 วัน โดยในวันที่ 14 ชุดการทดลอง Ba9 มีปริมาณไนเตรท เท่ากับ 0.24 ± 0.01 mg-N/L ส่วนชุดการทดลอง Ba11 และชุดควบคุมมีปริมาณไนเตรท เท่ากับ 0.271 ± 0.05 mg-N/L ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SF-1 และ SF-5 มีปริมาณไนเตรทลดลงในวันที่ 7 ของการทดลองและเพิ่มขึ้นในวันที่ 14 ซึ่งมีปริมาณไนไตรท์ 0.21 ± 0.06 และ 0.20 ± 0.11 mg-N/L ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ความสามารถในการบำบัดไนเตรทเบื้องต้นของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. 4 ไอโซเลท เป็นระยะเวลา 14 วัน

Experiment	Day	Initial Nitrate (mg-N/L)	Final Nitrate (mg-N/L)	Nitrate production (mg-N/L)
Control	Day 0	0.01± 0.00 ^b		
	Day 7		0.07±0.06 ^c	0.06±0.06 ^{cd}
	Day 14		0.30±0.07 ^a	0.29±0.07 ^a
<i>Bacillus</i> sp. Ba9	Day 0	0.01± 0.00 ^b		
	Day 7		0.03±0.04 ^c	0.02±0.04 ^{def}
	Day 14		0.24±0.01 ^{ab}	0.23±0.01 ^{ab}
<i>Bacillus</i> sp. Ba11	Day 0	0.01± 0.00 ^b		
	Day 7		0.05±0.04 ^c	0.04±0.04 ^{cde}
	Day 14		0.27±0.05 ^{ab}	0.26±0.05 ^a
<i>Bacillus</i> sp. SF-1	Day 0	0.08±0.00 ^a		
	Day 7		0.03±0.03 ^c	-0.05±0.03 ^{ef}
	Day 14		0.21±0.06 ^{ab}	0.13±0.06 ^{bc}
<i>Bacillus</i> sp. SF-5	Day 0	0.08±0.00 ^a		
	Day 7		0.01±0.02 ^c	-0.07±0.02 ^f
	Day 14		0.20±0.11 ^b	0.12±0.11 ^{cd}

หมายเหตุ : - = การลดลงของปริมาณไนเตรทที่น้อยกว่าวันเริ่มต้น

ตัวเลขที่นำเสนอมือเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ
ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P>0.05$)

1.2 ความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดสารอนินทรีย์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* spp. แบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม

- การเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียในระหว่างการทดลอง

จากการทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดแอมโมเนียของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* spp. แบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม พบว่าเชื้อผสม SF-1 + SF-5 สามารถลดแอมโมเนียได้สูงสุดเท่ากับ 17.41 ± 2.62 mg-N/L คิดเป็น 57.82 ± 8.72 เปอร์เซนต์ ในขณะที่เชื้อเดี่ยว Ba9, SF-1 และ เชื้อผสม Ba11+SF-1 สามารถลดแอมโมเนียได้มากกว่า 50 เปอร์เซนต์ โดยสามารถที่จะลดแอมโมเนียได้

เท่ากับ 15.58 ± 2.04 , 15.34 ± 2.90 และ 15.09 ± 1.48 mg-N/L คิดเป็น 51.77 ± 6.77 , 50.96 ± 9.63 และ 50.15 ± 4.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมในการลดแอมโมเนียในน้ำเสียเป็นระยะเวลา 5 วัน

Experiment	Initial Ammonia (mg-N/L)	Final Ammonia (mg-N/L)	Removal Ammonia (mg-N/L)	Ammonia Removal (%)
Ba9	30.10 ± 1.74^a	14.52 ± 1.43^{de}	15.58 ± 2.04^{ab}	51.77 ± 6.77^{ab}
Ba11	30.10 ± 1.74^a	16.54 ± 0.42^{bcd}	13.56 ± 1.83^{abc}	45.05 ± 6.09^{abc}
SF-1	30.10 ± 1.74^a	14.76 ± 2.07^{cde}	15.34 ± 2.90^{ab}	50.96 ± 9.63^{ab}
SF-5	30.10 ± 1.74^a	17.29 ± 0.15^{bcd}	12.80 ± 1.80^{bcde}	42.54 ± 5.97^{bcde}
Ba9+Ba11	30.10 ± 1.74^a	16.25 ± 0.63^{bcd}	13.85 ± 1.77^{abc}	46.01 ± 5.87^{abc}
Ba9+SF-1	30.10 ± 1.74^a	18.43 ± 0.14^{ab}	11.67 ± 1.63^{bcde}	38.77 ± 5.41^{bcde}
Ba9+SF-5	30.10 ± 1.74^a	16.94 ± 3.11^{bcd}	13.16 ± 3.44^{abcd}	43.72 ± 11.44^{abcd}
Ba11+SF-1	30.10 ± 1.74^a	15.01 ± 0.77^{cde}	15.09 ± 1.48^{abc}	50.15 ± 4.90^{abc}
Ba11+SF-5	30.10 ± 1.74^a	17.45 ± 1.59^{bc}	12.65 ± 2.37^{bcde}	42.01 ± 7.88^{bcde}
SF-1+SF-5	30.10 ± 1.74^a	12.69 ± 2.37^e	17.41 ± 2.62^a	57.82 ± 8.72^a
Ba9+Ba11+SF-1	30.10 ± 1.74^a	21.01 ± 0.44^a	9.09 ± 1.66^{de}	30.21 ± 5.52^{de}
Ba9+SF-1+SF-5	30.10 ± 1.74^a	18.76 ± 3.18^{ab}	11.34 ± 2.03^{bcde}	37.66 ± 6.76^{bcde}
Ba9+SF-1+SF-5	30.10 ± 1.74^a	17.03 ± 2.44^{bcd}	13.07 ± 2.61^{bcd}	43.43 ± 8.67^{bcd}
Ba11+SF-1+SF-5	30.10 ± 1.74^a	21.32 ± 1.84^a	8.78 ± 2.80^e	29.17 ± 9.30^e
4 strains	30.10 ± 1.74^a	19.10 ± 0.64^{ab}	11.00 ± 1.65^{cde}	36.56 ± 5.49^{cde}

หมายเหตุ : 4 strains = การผสม Ba9, Ba11, SF-1 และ SF-5 ในอัตราส่วน 1:1:1:1

ตัวเลขที่นำเสนอมือเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในส้อมที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P > 0.05$)

- การเปลี่ยนแปลงไนโตรเจนในระหว่างการทดลอง

จากการทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดไนโตรเจนของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* spp. แบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม พบว่าการใช้เชื้อผสมในการ Ba9+SF-1+SF-5 มีปริมาณของไนโตรเจนสูงสุด คือ 0.02 ± 0.00 mg-N/L คิดเป็น 3.89 ± 0.77 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อเดี่ยว SF-1 และ SF-5 มีปริมาณของไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 0.02 ± 0.00 และ 0.02 ± 0.00 mg-N/L โดยคิดเป็น 3.89 ± 0.50 และ

3.89±0.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเชื้อผสม Ba9+SF-1 มีปริมาณของไนโตรที่ต่ำที่สุดคือ 0.00±0.01 mg-N/L โดยคิดเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมในการบำบัดไนโตรที่ในน้ำเสียเป็นระยะเวลา 5 วัน

Experiment	Initial Nitrite (mg-N/L)	Final Nitrite (mg-N/L)	Nitrite production (mg-N/L)	Nitrite residue (%)
Ba9	0.43±0.00 ^a	0.44±0.01 ^{ab}	0.01±0.01 ^{abcdef}	2.11±1.24 ^{abcdef}
Ba11	0.43±0.00 ^a	0.44±0.01 ^{ab}	0.01±0.01 ^{abcde}	2.79±1.56 ^{abcde}
SF-1	0.43±0.00 ^a	0.45±0.00 ^a	0.02±0.00 ^{ab}	3.89±0.50 ^{ab}
SF-5	0.43±0.00 ^a	0.45±0.00 ^a	0.02±0.00 ^{ab}	3.89±0.60 ^{ab}
Ba9+Ba11	0.43±0.00 ^a	0.44±0.00 ^{ab}	0.02±0.00 ^{abcde}	2.37±0.43 ^{abcde}
Ba9+SF-1	0.43±0.00 ^a	0.43±0.01 ^b	0.00±0.01 ^f	0.00±0.00 ^f
Ba9+SF-5	0.43±0.00 ^a	0.44±0.00 ^{ab}	0.01±0.00 ^{abcd}	3.26±1.02 ^{abcd}
Ba11+SF-1	0.44±0.00 ^a	0.44±0.01 ^{ab}	0.01±0.00 ^{ef}	1.27±0.21 ^{ef}
Ba11+SF-5	0.44±0.00 ^a	0.44±0.01 ^{ab}	0.01±0.01 ^{abcde}	2.44±1.49 ^{abcde}
SF-1+SF-5	0.44±0.00 ^a	0.45±0.00 ^{ab}	0.01±0.00 ^{abc}	3.35±1.04 ^{abc}
Ba9+Ba11+SF-1	0.43±0.00 ^a	0.44±0.01 ^{ab}	0.01±0.01 ^{def}	1.57±1.32 ^{def}
Ba9+SF-1+SF-5	0.43±0.00 ^a	0.45±0.00 ^a	0.02±0.00 ^a	3.89±0.77 ^a
Ba9+SF-1+SF-5	0.43±0.00 ^a	0.44±0.00 ^{ab}	0.01±0.00 ^{bcdef}	2.09±0.31 ^{bcdef}
Ba11+SF-1+SF-5	0.43±0.00 ^a	0.44±0.00 ^{ab}	0.01±0.00 ^{abcde}	2.46±0.25 ^{abcde}
4 strains	0.43±0.00 ^a	0.44±0.00 ^{ab}	0.01±0.00 ^{cdef}	1.59±0.92 ^{cdef}

หมายเหตุ : 4 strains = การผสม Ba9, Ba11, SF-1 และ SF-5 ในอัตราส่วน 1:1:1:1

ตัวเลขที่นำเสนอมือเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในส้อมที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

- การเปลี่ยนแปลงไนเตรทในระหว่างการทดลอง

จากการทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดไนเตรทของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* spp. แบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม พบว่าปริมาณไนเตรทโดยการใช้เชื้อผสม Ba11+SF-1+SF-5 และ Ba9+SF-11+SF-5 มีปริมาณของไนเตรทเพิ่มสูงสุด คือ 0.15±0.00 และ 0.12±0.00 mg-N/L (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมในการบำบัดไนเตรทในน้ำเสียระยะเวลา 5 วัน

Experiment	Initial Nitrate (mg-N/L)	Final Nitrate (mg-N/L)	Nitrate production (mg-N/L)	Nitrate residue (%)
Ba9	0.05±0.00 ^a	0.05±0.01 ⁱ	0.00±0.01 ⁱ	2.60±13.11 ⁱ
Ba11	0.05±0.00 ^a	0.06±0.00 ^{gh}	0.01±0.00 ^{gh}	21.49±2.82 ^{gh}
SF-1	0.05±0.00 ^a	0.06±0.00 ^{ghi}	0.01±0.00 ^{ghi}	19.02±3.55 ^{ghi}
SF-5	0.05±0.00 ^a	0.07±0.00 ^g	0.01±0.00 ^g	28.13±4.88 ^g
Ba9+Ba11	0.05±0.00 ^a	0.06±0.00 ^{hi}	0.00±0.00 ^{hi}	7.16±3.63 ^{hi}
Ba9+SF-1	0.05±0.00 ^a	0.06±0.00 ^{hi}	0.00±0.00 ^{hi}	5.08±3.85 ^{gi}
Ba9+SF-5	0.05±0.00 ^a	0.10±0.02 ^e	0.04±0.02 ^e	90.39±35.52 ^e
Ba11+SF-1	0.05±0.00 ^a	0.09±0.00 ^e	0.04±0.00 ^e	74.37±3.40 ^e
Ba11+SF-5	0.05±0.00 ^a	0.08±0.00 ^f	0.02±0.00 ^f	51.19±4.74 ^f
SF-1+SF-5	0.05±0.00 ^a	0.08±0.00 ^f	0.03±0.00 ^f	50.80±4.08 ^f
Ba9+Ba11+SF-1	0.05±0.00 ^a	0.12±0.00 ^d	0.07±0.00 ^d	124.65±5.47 ^d
Ba9+SF-11+SF-5	0.05±0.00 ^a	0.17±0.00 ^a	0.12±0.00 ^b	228.85±4.95 ^b
Ba9+SF-1+SF-5	0.05±0.00 ^a	0.14±0.00 ^b	0.08±0.00 ^c	157.21±3.71 ^c
Ba11+SF-1+SF-5	0.05±0.00 ^a	0.20±0.00 ^c	0.15±0.00 ^a	281.47±4.82 ^a
4 strains	0.05±0.00 ^a	0.05±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^{hi}	8.21±5.12 ^{hi}

หมายเหตุ : 4 strains = การผสม Ba9, Ba11, SF-1 และ SF-5 ในอัตราส่วน 1:1:1:1

ตัวเลขที่นำเสนอมือเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสัปดาห์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

- การเปลี่ยนแปลงของออร์โธฟอสเฟตในระหว่างการทดลอง

จากการทดสอบปริมาณของออร์โธฟอสเฟตในน้ำเสียโดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* spp. แบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม พบว่า เชื้อเดี่ยว Ba11 มีปริมาณของออร์โธฟอสเฟตสูงที่สุด โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้น 0.20±0.00 mg-P/L คิดเป็น 704.44±9.12 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือเชื้อผสม Ba9+SF-11+SF-5 และ Ba9+Ba11 มีปริมาณของออร์โธฟอสเฟตเพิ่มขึ้น 0.19±0.00 และ 0.19±0.00 mg-P/L โดยคิดเป็น 682.54±7.69 และ 670.13±2.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 14) ซึ่งค่าออร์โธฟอสเฟตที่สูงบ่งบอกว่ามีกิจกรรมการย่อยสลายสารอินทรีย์วัตถุสูง

ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพของของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมในการบำบัดออร์โธฟอสเฟตในน้ำเสียกุ้งเป็นระยะเวลา 5 วัน

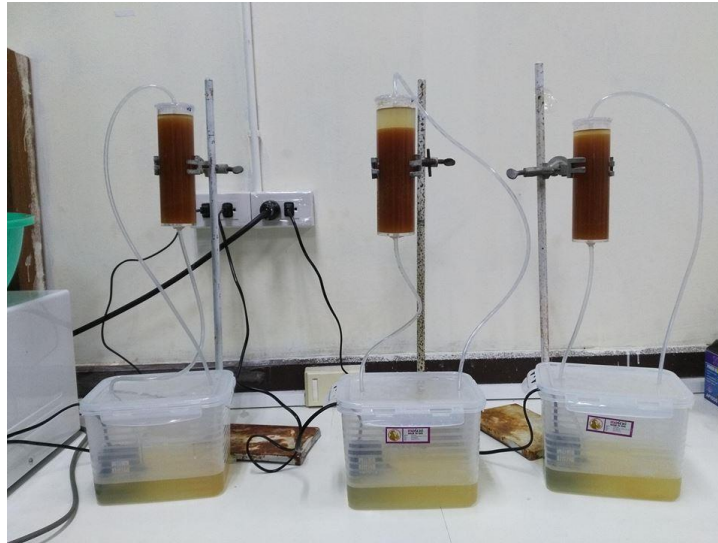
Experiment	Initial Orthophosphate (mg-P/L)	Final Orthophosphate (mg-P/L)	Orthophosphate (mg-P/L)	Orthophosphate residue (%)
Ba9	0.03±0.00 ^a	0.21±0.00 ^{bc}	0.18±0.00 ^c	629.98±19.35 ^c
Ba11	0.03±0.00 ^a	0.23±0.00 ^a	0.20±0.00 ^a	704.44±9.12 ^a
SF-1	0.03±0.00 ^a	0.10±0.00 ⁱ	0.07±0.00 ⁱ	262.07±0.07 ⁱ
SF-5	0.03±0.00 ^a	0.19±0.00 ^{ef}	0.16±0.00 ^e	580.34±15.33 ^e
Ba9+Ba11	0.03±0.00 ^a	0.22±0.00 ^{ab}	0.19±0.00 ^b	670.13±2.19 ^b
Ba9+SF-1	0.03±0.00 ^a	0.19±0.00 ^{def}	0.17±0.00 ^e	583.99±6.69 ^e
Ba9+SF-5	0.03±0.00 ^a	0.22±0.00 ^a	0.19±0.00 ^b	675.24±11.24 ^b
Ba11+SF-1	0.03±0.00 ^a	0.19±0.00 ^{def}	0.17±0.00 ^e	586.18±6.69 ^e
Ba11+SF-5	0.03±0.00 ^a	0.20±0.01 ^{cd}	0.18±0.00 ^{cd}	623.41±21.27 ^{cd}
SF-1+SF-5	0.03±0.00 ^a	0.03±0.00 ^j	0.00±0.00 ^j	-4.38±3.78 ^j
Ba9+Ba11+SF-1	0.03±0.00 ^a	0.20±0.00 ^{cde}	0.17±0.00 ^{de}	598.59±16.44 ^{de}
Ba9+SF-11+SF-5	0.03±0.00 ^a	0.22±0.00 ^a	0.19±0.00 ^{ab}	682.54±7.69 ^{ab}
Ba9+SF-1+SF-5	0.03±0.00 ^a	0.19±0.00 ^{fg}	0.17±0.00 ^f	554.79±16.14 ^f
Ba11+SF-1+SF-5	0.03±0.00 ^a	0.18±0.00 ^g	0.15±0.00 ^g	525.59±15.79 ^g
4 strains	0.03±0.00 ^a	0.14±0.00 ^h	0.12±0.00 ^h	411.71±7.59 ^h

หมายเหตุ : 4 strains = การผสม Ba9, Ba11, SF-1 และ SF-5 ในอัตราส่วน 1:1:1:1

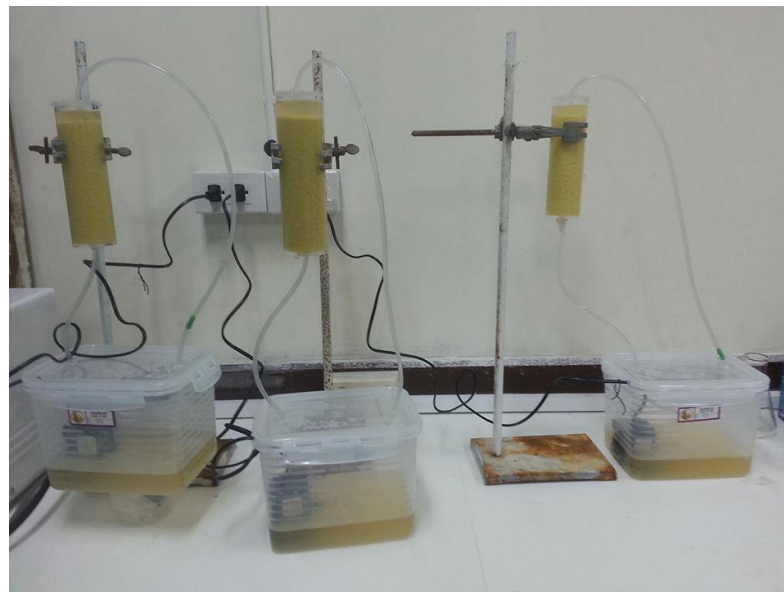
ตัวเลขที่นำเสนอมือเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในส้อมที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P>0.05$)

2. ประสิทธิภาพการกำจัดสารอินทรีย์ของชุดอุปกรณ์จำลองระบบบำบัดแบบสองขั้นตอน

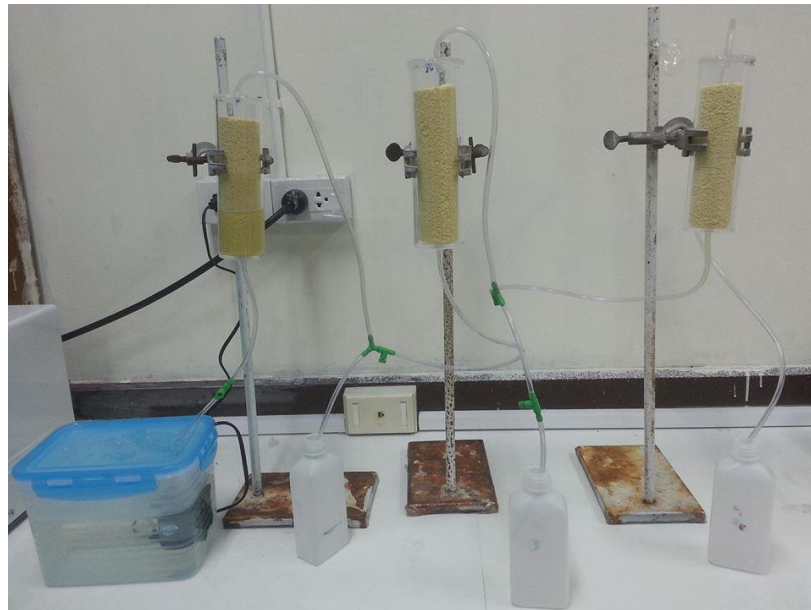
จากการศึกษาความสามารถเบื้องต้นในการกำจัดสารอินทรีย์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* spp. แบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม ได้ดำเนินการคัดเลือกเชื้อผสม SF-1 + SF-5 และ Ba11+SF-1 และเชื้อเดี่ยว Ba9 และ SF-1 มาสร้างชุดอุปกรณ์บำบัดทางชีวภาพ (ชุดอุปกรณ์บำบัดน้ำขั้นตอนที่ 1) โดยให้เซลล์ตรึงบนวัสดุ ได้แก่ สารกรองเรซิน (ภาพที่ 11) และเศษเซรามิก (ภาพที่ 12) โดยทำการตรึงเซลล์แบคทีเรียกับวัสดุด้วยการปั่นเซลล์ของแบคทีเรีย (cell suspension) ที่เลี้ยงในอาหาร NB ทางด้านใต้ของคอลัมน์ (up flow immobilization) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปศึกษาความสามารถในการกำจัดสารอินทรีย์ในน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยมีอัตราการไหล 8 – 10 ml/min (ภาพที่ 13)



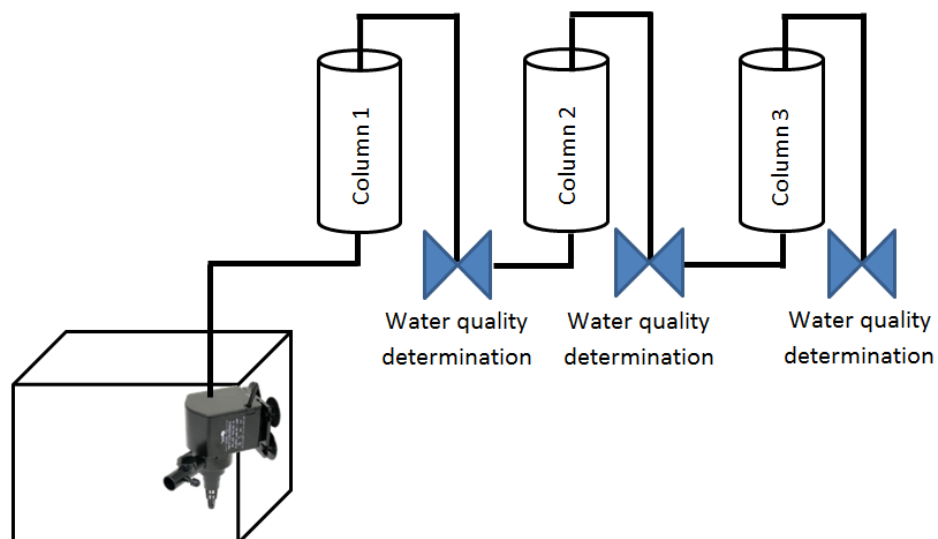
ภาพที่ 11 การตรึงกล้ำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* spp. แบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมกับสารกรองเรซินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 12 การตรึงกล้ำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* spp. แบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมกับแท่งเซรามิกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 13 การศึกษาความสามารถในการกำจัดสารอินทรีย์ของชุดอุปกรณ์บำบัดทางชีวภาพที่ผ่านการตรึงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (อัตราการไหล 8 – 10 ml/min)



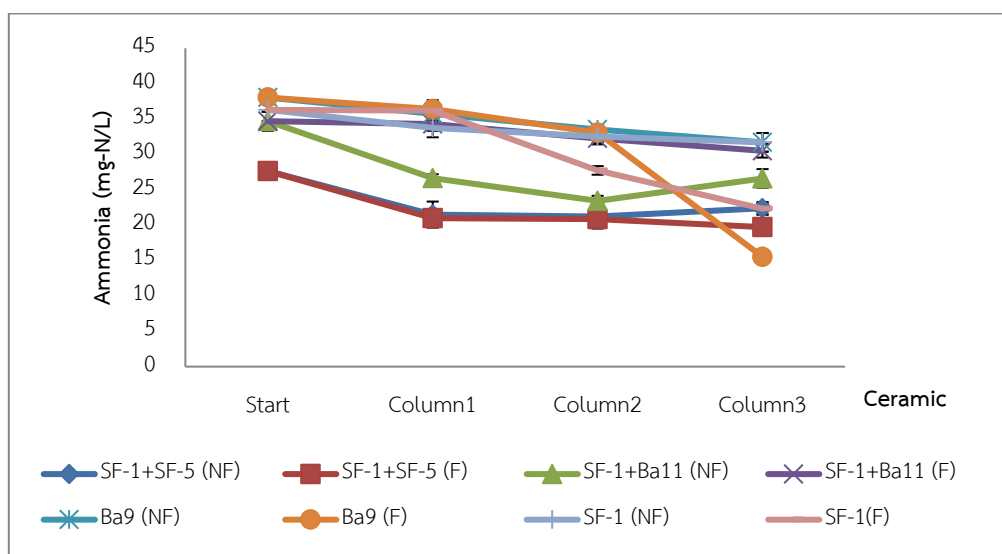
ภาพที่ 14 การศึกษาความสามารถในการกำจัดสารอินทรีย์ของชุดอุปกรณ์บำบัดทางชีวภาพ (อุปกรณ์ขั้นตอนที่ 1)

จากการศึกษาประสิทธิภาพของชุดอุปกรณ์บำบัดน้ำทางชีวภาพของหัวเชื้อเดี่ยวและหัวเชื้อผสมที่ตรึงกับแท่งเซรามิค (Ceramic) ในการบำบัดน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่ามีการลดลงของ

แอมโมเนียทั้ง 3 คอลัมน์ (ภาพที่ 14) อย่างต่อเนื่อง ซึ่งการใช้หัวเชื้อเดี่ยว *Bacillus* sp. Ba9 สามารถลดแอมโมเนียได้สูงที่สุด เท่ากับ 57.09 ± 1.49 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15) และหัวเชื้อเดี่ยว *Bacillus* sp. SF1 สามารถลดปริมาณของแอมโมเนียได้ เท่ากับ 38.48 ± 2.19 เปอร์เซ็นต์ (แอมโมเนียเริ่มต้นอยู่ในช่วง 25.00 – 40.00 mg-N/L) (ภาพที่ 15)

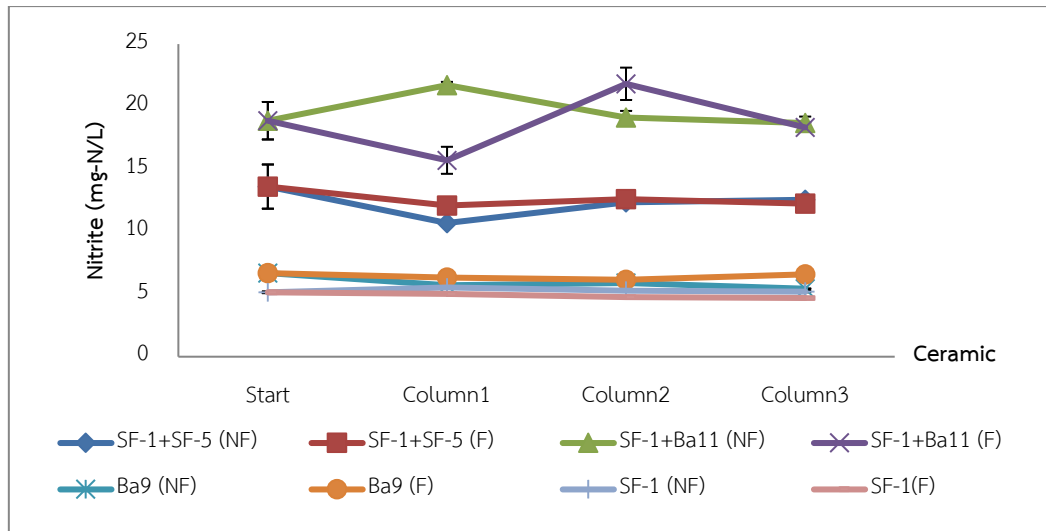
ในการบำบัดไนโตรเจนและไนเตรทในน้ำเสียที่ทำการทดลอง พบว่า มีการเพิ่มขึ้น และลดลงของปริมาณไนโตรเจน และไนเตรทระหว่างการทดลอง ซึ่งการตรึงหัวเชื้อ *Bacillus* sp. SF-1 มีความสามารถในการลดปริมาณของไนโตรเจนได้ 8.88 ± 1.35 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 16) และ *Bacillus* sp. Ba9 สามารถลดปริมาณของไนเตรทได้ 0.57 ± 0.07 mg-N/L (ลดจาก 2.02 ± 0.07 เหลือเพียง 1.46 ± 0.00 mg-N/L) (ภาพที่ 17)

การลดปริมาณของออร์โทฟอสเฟตในน้ำเสียพบว่าการทุกชุดการทดลองมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณออร์โทฟอสเฟตและจากนั้นจะลดลง แต่ในชุดการทดลองตรึงหัวเชื้อ *Bacillus* sp. SF-1 มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณออร์โทฟอสเฟตสูงที่สุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ โดยเพิ่มปริมาณจาก 1.60 ± 0.24 เป็น 18.88 ± 1.72 mg-P/N (ภาพที่ 18)



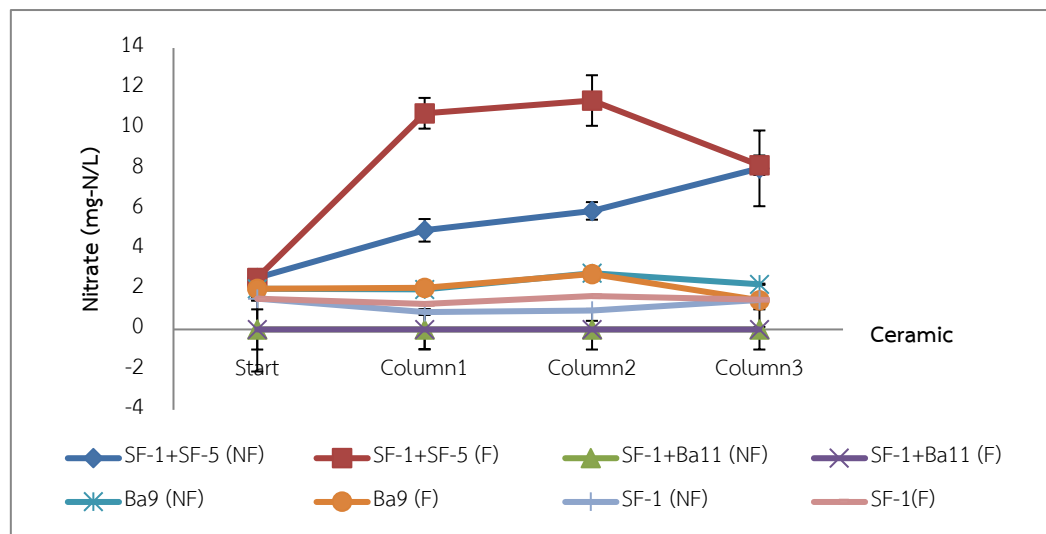
ภาพที่ 15 การลดปริมาณแอมโมเนียของคอลัมน์เซรามิกที่ผ่านการตรึงแบคทีเรียระยะเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ : NF = ไม่มีการตรึงของแบคทีเรีย
F = มีการตรึงของแบคทีเรีย



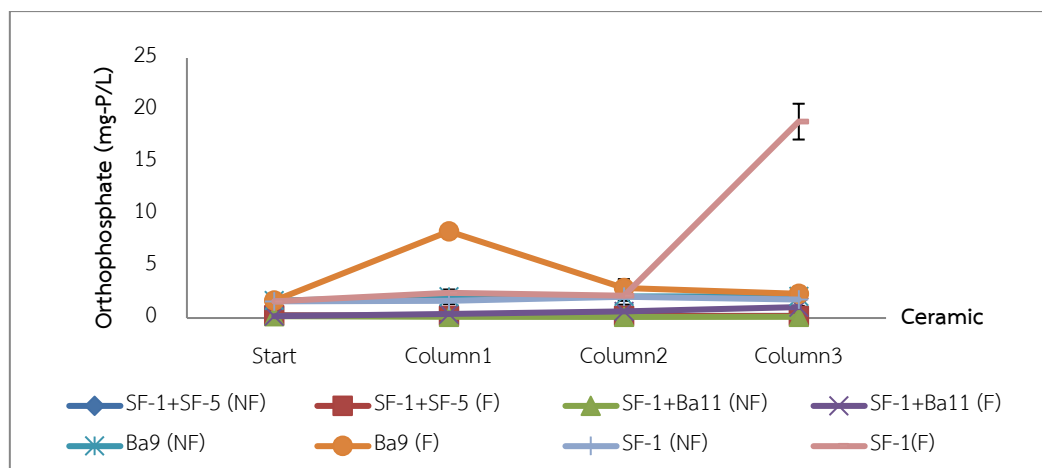
ภาพที่ 16 การลดปริมาณไนไตรท์ของคอลัมน์เซรามิกที่ผ่านการตรึงแบคทีเรียระยะเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ : NF = ไม่มีการตรึงของแบคทีเรีย
F = มีการตรึงของแบคทีเรีย



ภาพที่ 17 การลดปริมาณไนเตรทของคอลัมน์เซรามิกที่ผ่านการตรึงแบคทีเรียระยะเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ : NF = ไม่มีการตรึงของแบคทีเรีย
F = มีการตรึงของแบคทีเรีย



ภาพที่ 18 การลดปริมาณออร์โธฟอสเฟตของคอลัมน์เซรามิกที่ผ่านการตรึงแบคทีเรียระยะเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ : NF = ไม่มีการตรึงของแบคทีเรีย
F = มีการตรึงของแบคทีเรีย

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพของคอลัมน์เซรามิกที่ผ่านการตรึงแบคทีเรียระยะเวลา 24 ชั่วโมง

Experiment	Ammonia removal (%)	Nitrite (%)	Nitrate (mg-N/L)	Orthophosphate (mg-P/L)
SF1+SF5 (NF)	22.37±3.26	1.04±0.10	12.51±1.88	0.20±0.02
SF1+SF5 (F)	28.69±0.92	1.36±0.39	2.58±0.49	0.20±0.02
SF1+Ba11 (NF)	37.76±3.81	0.18±0.52	0.00±1.87	0.11±0.00
SF1+Ba11 (F)	26.70±2.76	0.53±0.35	0.00±1.52	1.05±0.01
Ba9 (NF)	16.65±3.47	18.58±0.35	0.00±0.03	2.07±0.00
Ba9 (F)	57.09±1.49	1.33±0.35	0.00±0.00	2.33±0.61
SF1 (NF)	12.65±3.64	0.00±1.18	0.50±0.04	1.77±0.60
SF1 (F)	38.48±2.19	8.88±1.35	0.50±0.02	18.88±1.72

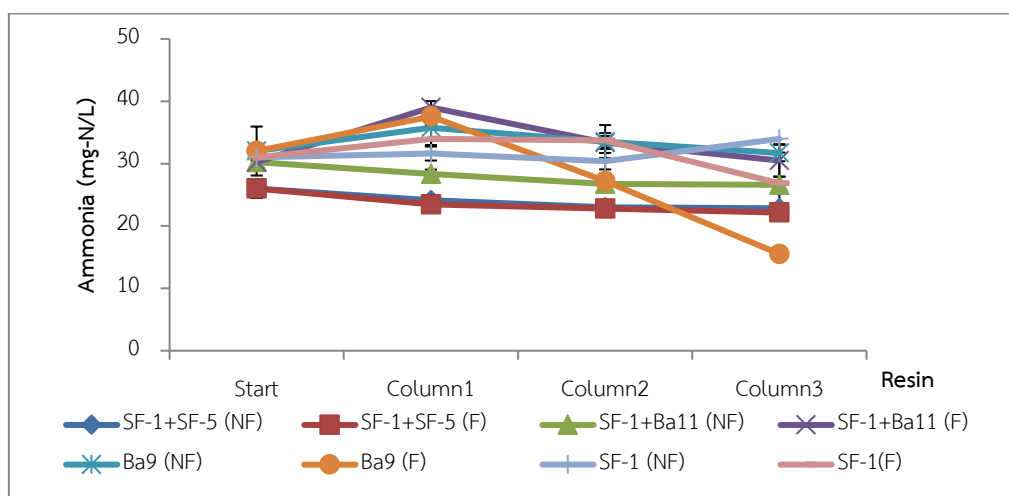
หมายเหตุ : NF = ไม่มีการตรึงของแบคทีเรีย
F = มีการตรึงของแบคทีเรีย

จากการศึกษาการตรึงเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมที่ตรึงกับสารกรองเรซิน (Resin) ในการบำบัดน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่ามีการลดลงของแอมโมเนียทั้ง 3 คอลัมน์ อย่างต่อเนื่อง ซึ่งการใช้หัวเชื้อเดี่ยว *Bacillus* sp. Ba9 สามารถลดแอมโมเนียได้สูงที่สุด เท่ากับ 70.32 ± 3.72 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่

16) และ *Bacillus* sp. SF-1 สามารถลดปริมาณของแอมโมเนียได้ 27.21 ± 2.44 เปอร์เซ็นต์ (แอมโมเนียเริ่มต้นอยู่ในช่วง 26.00 – 30.00 mg-N/L) (ภาพที่ 19)

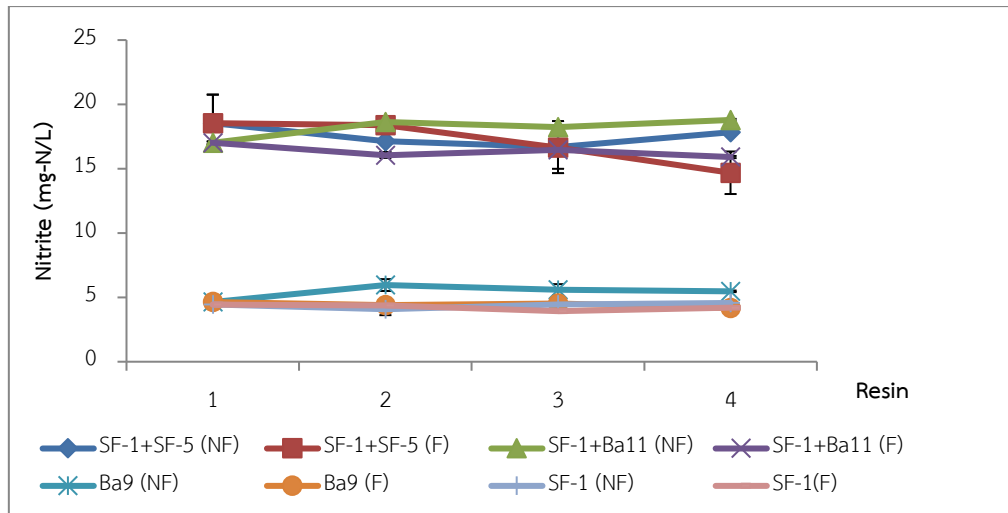
ในการบำบัดไนโตรเจนและไนเตรทในน้ำเสีย พบว่ามีทั้งการเพิ่มขึ้น และลดลงของปริมาณไนโตรเจน และไนเตรทระหว่างการทดลอง ซึ่งหัวเชื้อ *Bacillus* spp. SF-1+SF-5 ที่ถูกตรึงมีความสามารถในการลดปริมาณของไนโตรเจน 20.78 ± 8.92 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 20) และ *Bacillus* sp. Ba9 สามารถเพิ่มปริมาณของไนเตรทได้เป็น 0.14 ± 0.12 mg-N/L และ *Bacillus* sp. SF-1 สามารถลดปริมาณของไนเตรทได้ 0.21 ± 0.14 mg-N/L ในขณะที่เชื้อผสม SF-1+SF-5 และ SF-1+Ba11 ไม่มีการเพิ่มและลดของปริมาณไนเตรท (ภาพที่ 21)

การลดปริมาณของออร์โธฟอสเฟตในน้ำเสีย พบว่าทุกชุดการทดลองที่มีการตรึงแบคทีเรียมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณออร์โธฟอสเฟตและจากนั้นลดลง ในขณะที่ชุดที่ไม่มีการตรึงแบคทีเรียไม่มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณออร์โธฟอสเฟต ในชุดการทดลองตรึงหัวเชื้อ *Bacillus* sp. SF-1 มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณออร์โธฟอสเฟตสูงที่สุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ โดยเพิ่มปริมาณจาก 2.28 ± 0.17 เป็น 32.24 ± 0.78 mg-P/L (ภาพที่ 22)



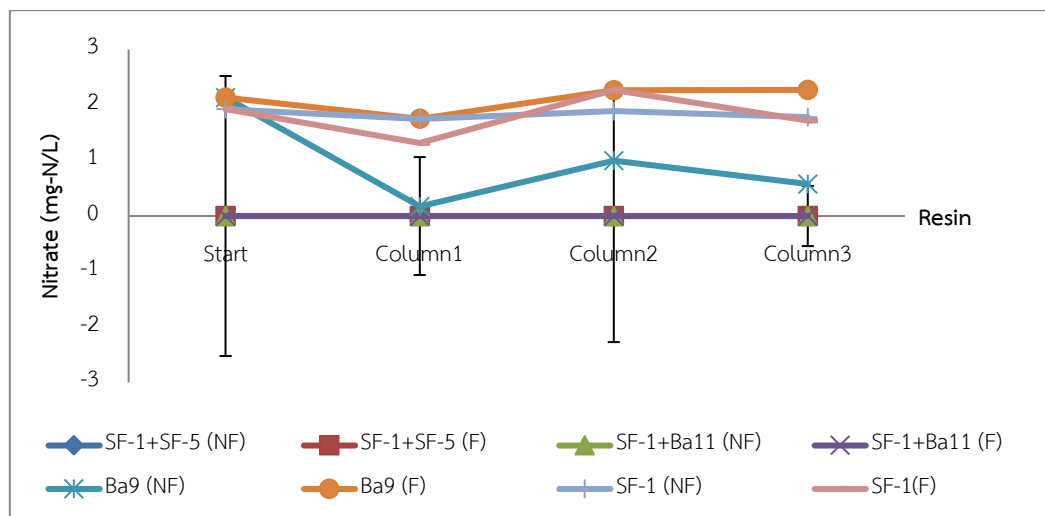
ภาพที่ 19 การลดปริมาณแอมโมเนียของคอลัมน์สารกรองเรซินที่ผ่านการตรึงแบคทีเรียระยะเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ : NF = ไม่มีการตรึงของแบคทีเรีย
F = มีการตรึงของแบคทีเรีย



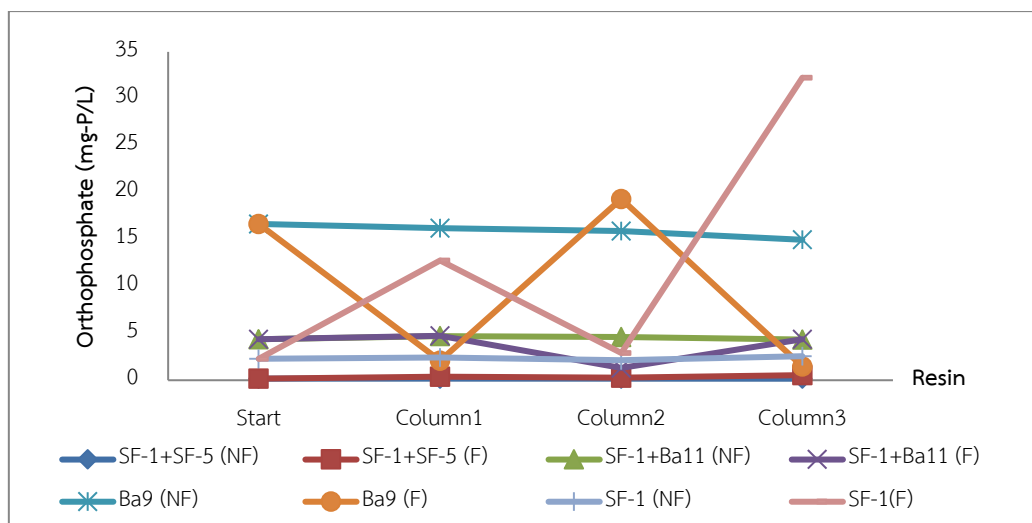
ภาพที่ 20 การลดปริมาณไนไตรท์ของคอลัมน์สารกรองเรซินที่ผ่านการตรึงแบคทีเรียระยะเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ : NF = ไม่มีการตรึงของแบคทีเรีย
F = มีการตรึงของแบคทีเรีย



ภาพที่ 21 การลดปริมาณไนเตรทของคอลัมน์สารกรองเรซินที่ผ่านการตรึงแบคทีเรียระยะเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ : NF = ไม่มีการตรึงของแบคทีเรีย
F = มีการตรึงของแบคทีเรีย



ภาพที่ 22 การลดปริมาณออร์โธฟอสเฟตของคอลัมน์สารกรองเรซินที่ผ่านการตรึงแบคทีเรีย
ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ : NF = ไม่มีการตรึงของแบคทีเรีย
F = มีการตรึงของแบคทีเรีย

ตารางที่ 16 ประสิทธิภาพของคอลัมน์สารกรองเรซินที่ผ่านการตรึงแบคทีเรียระยะเวลา 24 ชั่วโมง

Experiment	Ammonia removal (%)	Nitrite (%)	Nitrate (mg-N/L)	Orthophosphate (mg-P/L)
SF1+SF5 (NF)	12.15±0.81	-3.77±1.14	0.00±0.54	0.16±0.22
SF1+SF5 (F)	14.81±3.82	-20.78±8.92	5.11±0.39	0.54±0.01
SF1+NB11 (NF)	26.79±4.27	+10.40±0.50	0.00±1.43	4.34±0.06
SF1+NB11 (F)	13.87±8.62	-6.52±0.49	1.52±0.07	4.37±0.06
NB9 (NF)	19.78±4.13	+17.96±1.32	0.00±0.66	14.97±0.21
NB9 (F)	70.32±3.72	-10.10±0.86	0.13±0.13	1.48±0.24
SF1 (NF)	19.41±3.81	+2.83±1.38	1.78±0.07	2.56±0.40
SF1 (F)	27.21±2.44	-5.15±1.81	1.72±0.06	32.24±0.78

หมายเหตุ : NF = ไม่มีการตรึงของแบคทีเรีย
F = มีการตรึงของแบคทีเรีย
- = การลดลงของปริมาณของไนโตรเจนที่น้อยกว่าวันเริ่มต้น
+ = การเพิ่มขึ้นของปริมาณของไนโตรเจนที่มากกว่าวันเริ่มต้น

3. จำลองระบบบำบัดน้ำเสียแบบ 2 ขั้นตอน

จากการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสารอินทรีย์ของชุดอุปกรณ์ระบบบำบัดทางชีวภาพพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. Ba9 มีความสามารถในการลดปริมาณแอมโมเนียได้สูงทั้งในวัสดุเซรามิกและสารกรองเรซิน แต่จะสามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้สูงสุดเมื่อทำการตรึงกับสารกรองเรซิน โดยความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้ที่ 70.32 ± 3.72 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เมื่อทำการยึดบนเซรามิกจะมีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียได้ที่ 57.09 ± 1.49 เปอร์เซ็นต์ จึงจำลองระบบบำบัดน้ำเสียแบบ 2 ขั้นตอน (ภาพที่ 23) และได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. Ba9 โดยทำการตรึงบนสารกรองเรซินเป็นชุดอุปกรณ์บำบัดทางชีวภาพ (ชุดอุปกรณ์บำบัดน้ำขั้นตอนที่ 1) และทำการเชื่อมต่อกับชุดโอโซน โดยทำการให้โอโซนเป็นเวลา 10 นาที (ชุดอุปกรณ์บำบัดน้ำขั้นตอนที่ 2)



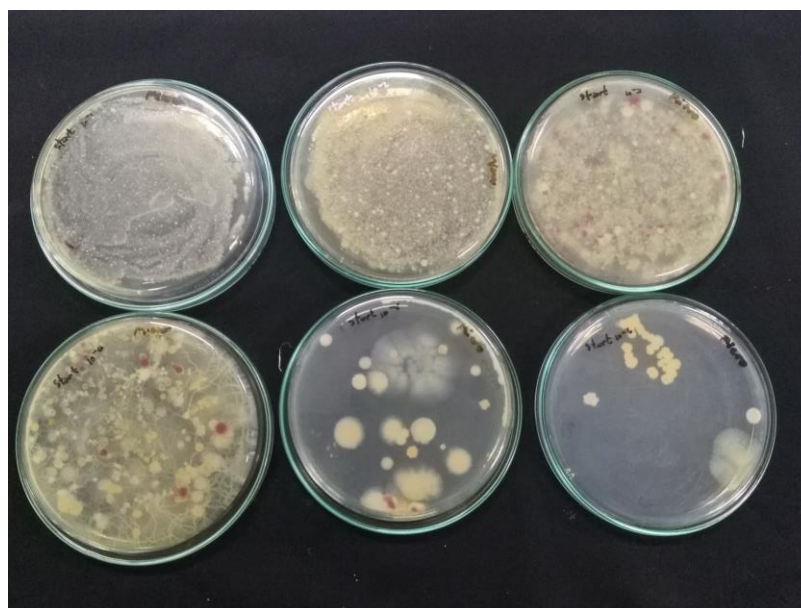
ภาพที่ 23 จำลองระบบบำบัดน้ำเสียแบบ 2 ขั้นตอน โดยอุปกรณ์ระบบบำบัดน้ำขั้นตอนที่ 1 (ตรึงแบคทีเรียบนวัสดุสารกรองเรซิน) และชุดอุปกรณ์บำบัดน้ำขั้นตอนที่ 2 (ก๊าซโอโซน)

จากการจำลองระบบบำบัดน้ำเสียแบบ 2 ขั้นตอน โดยทำการตรึงเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus* sp. Ba9 ซึ่งเป็นอุปกรณ์ขั้นตอนที่ 1 เชื่อมต่อกับชุดโอโซนซึ่งเป็นอุปกรณ์ชุดที่ 2 เป็นเวลา 10 นาที พบว่า สามารถลดแอมโมเนียได้ 60.39 ± 6.73 และ 52.19 ± 7.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (โดยมีแอมโมเนียเริ่มต้น 54.87 ± 4.19 mg-N/L) มีปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 0.04 ± 0.00 และ 0.02 ± 0.01 mg-N/L ตามลำดับ มีปริมาณไนเตรทเพิ่มขึ้น 0.05 ± 0.01 และ 0.29 ± 0.01 mg-N/L และมีปริมาณ

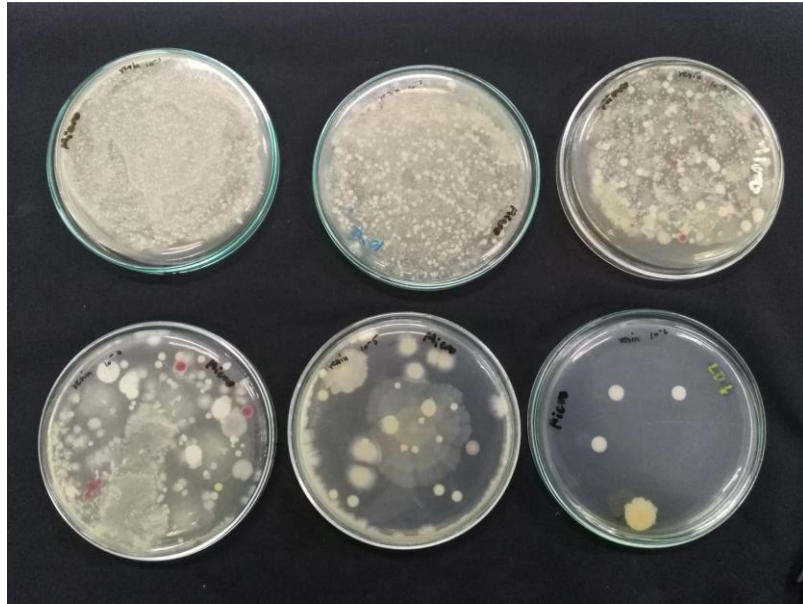
ออร์โธฟอสเฟตเพิ่มขึ้น 0.03 ± 0.01 mg-P/L และ 0.27 ± 0.00 mg-P/L (ตารางที่ 17) นอกจากนี้ ปริมาณของแบคทีเรียที่ผ่านบำบัดด้วยโอโซน (ชุดอุปกรณ์ชุดที่ 2) มีการลดลงของแบคทีเรีย ซึ่ง เริ่มต้นมีปริมาณแบคทีเรีย 6.13×10^7 CFU/ml (ภาพที่ 24) ผ่านการบำบัดด้วยชุดอุปกรณ์ที่ 1 พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียรวม 3.30×10^7 CFU/ml (ภาพที่ 25) เมื่อผ่านการบำบัดด้วยโอโซนเป็นเวลา 10 นาที พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียรวมลดลงเหลือ 9.23×10^3 CFU/ml (ภาพที่ 26)

ตารางที่ 17 ประสิทธิภาพการบำบัดคุณภาพน้ำของชุดจำลองระบบบำบัดน้ำเสียแบบ 2 ขั้นตอน

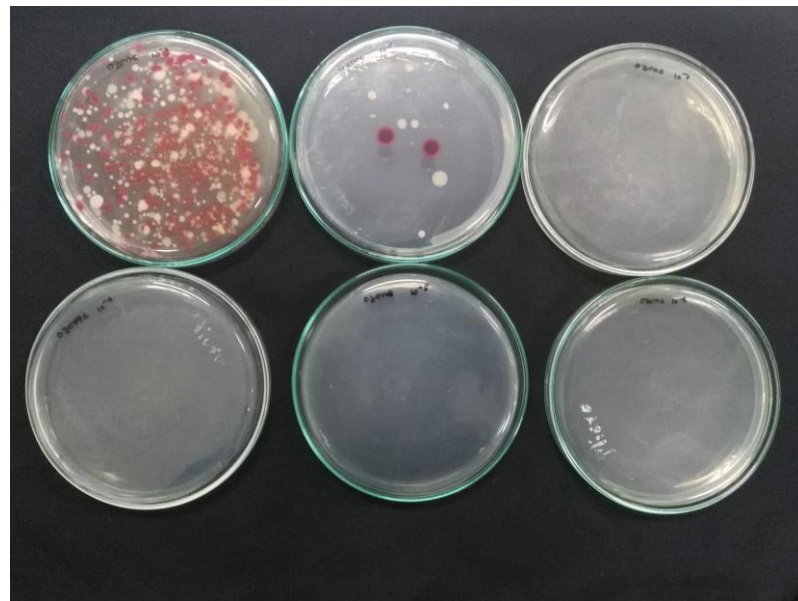
	Ammonia removal (%)	Nitrite (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)	Orthophosphate (mg-P/L)	Total bacteria (CFU/ml)
NB9+resin (NF)	18.54 ± 2.41^b	0.01 ± 0.00^b	0.00 ± 0.02^c	0.01 ± 0.00^d	2.56×10^7
NB9+resin(F)	60.39 ± 6.73^a	0.04 ± 0.00^a	0.05 ± 0.01^b	0.03 ± 0.01^c	3.30×10^7
Ozone (NF)	12.97 ± 2.44^b	0.01 ± 0.00^b	0.03 ± 0.03^b	0.23 ± 0.00^b	7.21×10^4
Ozone (F)	52.19 ± 7.53^a	0.02 ± 0.01^b	0.29 ± 0.01^a	0.27 ± 0.00^a	9.23×10^3
หมายเหตุ :	NF =	ไม่มีการตรึงของแบคทีเรีย			
	F =	มีการตรึงของแบคทีเรีย			



ภาพที่ 24 ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นก่อนเข้าสู่ชุดจำลองระบบบำบัดน้ำเสียแบบ 2 ขั้นตอน



ภาพที่ 25 ปริมาณแบคทีเรียเมื่อผ่านชุดจำลองระบบบำบัดน้ำเสียขั้นตอนที่ 1



ภาพที่ 26 ปริมาณแบคทีเรียเมื่อผ่านชุดจำลองระบบบำบัดน้ำเสียขั้นตอนที่ 2

4. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการใช้กล้าเชื้อ *Bacillus oceanisediminis* Ba9 ร่วมกับชุดอุปกรณ์ต้นแบบระบบบำบัดน้ำในการเลี้ยงกุ้งแบบสองขั้นตอน

4.1 ผลการกำจัดสารอินทรีย์หลังจากผ่านการบำบัดทางชีวภาพขั้นตอนที่ 1

จากการศึกษาประสิทธิภาพของชุดอุปกรณ์ต้นแบบขั้นตอนที่ 1 โดยใช้แบคทีเรีย *Bacillus oceanisediminis* Ba9 กล้าเชื้อเดี่ยวตรึงบนสารกรองเรซินในการบำบัดน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อเปรียบเทียบกับเทียบกับชุด control ที่ไม่มีการตรึงเชื้อบนสารกรองเรซิน ทั้ง 3 กระบอก พบว่า น้ำที่ผ่านการบำบัดในชุด *Bacillus oceanisediminis* Ba9 และชุด control มีปริมาณแอมโมเนียในน้ำเลี้ยงกุ้งเพิ่มขึ้น กล่าวคือ มีค่าเท่ากับ 51.64 ± 0.57 เปอร์เซ็นต์ (ค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 0.37 ± 0.01 mg-N/L) และ 82.86 ± 0.70 เปอร์เซ็นต์ (เริ่มต้น 0.20 ± 0.00 mg-N/L) ตามลำดับ (ตารางที่ 18) จะเห็นได้ชัดเจนว่าชุด *Bacillus oceanisediminis* Ba9 มีความเข้มข้นของแอมโมเนียน้อยกว่า เนื่องจากสารกรองเรซินได้ทำการตรึงด้วยแบคทีเรียในอาหารเหลว (Nutrient Broth, NB) ที่มีความเค็ม 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นสถานะที่เอื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เมื่อนำมาผ่านระบบบำบัดน้ำเลี้ยงกุ้งที่มีปริมาณแอมโมเนียสะสมอยู่ ทำให้แบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียด้วยเช่นกัน สอดคล้องกับ Sangnoi *et al.* (2017) และ Chankaew *et al.* (2018) ที่ยืนยันว่า ศักยภาพของเฮเทอโรโทรฟิกไนโตรไฟอิงแบคทีเรียจะมีเพิ่มขึ้นเมื่อนำมาใช้บำบัดน้ำเสียที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงและมีความเค็ม และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Gross *et al.* (2003) ที่ทำการตรึงเชื้อแบคทีเรียน้ำเค็มบนวัสดุยึดเกาะเม็ดโพลีเอสเตอร์ในการบำบัดน้ำภายในบ่อเลี้ยงปลา พบว่า มีปริมาณแอมโมเนียน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

สำหรับปริมาณไนโตรเจนลดลง 64.00 ± 2.44 เปอร์เซ็นต์ (เริ่มต้น 0.16 ± 0.01 mg-N/L) ในชุด *Bacillus oceanisediminis* Ba9 และเพิ่มขึ้น 21.76 ± 0.90 เปอร์เซ็นต์ (เริ่มต้น 0.39 ± 0.00 mg-N/L) ในชุด control (ตารางที่ 19) ปริมาณไนเตรทเพิ่มขึ้น 15.72 ± 0.45 เปอร์เซ็นต์ (เริ่มต้น 0.72 ± 0.12 mg-N/L) ในชุด *Bacillus oceanisediminis* Ba9 และลดลง 18.00 ± 3.92 เปอร์เซ็นต์ (เริ่มต้น 0.48 ± 0.01 mg-N/L) ในชุด control (ตารางที่ 20) จะเห็นได้ว่าในชุด *Bacillus oceanisediminis* Ba9 มีการลดลงของปริมาณไนโตรเจนมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณไนเตรทเพิ่มขึ้น เนื่องจากเชื้อ *Bacillus oceanisediminis* Ba9 มีความสามารถในการเปลี่ยนไนโตรเจนให้กลายเป็นไนเตรท

ส่วนปริมาณออร์โทฟอสเฟตเพิ่มขึ้นเท่ากับ 0.26 ± 0.00 mg-P/L ในชุด *Bacillus oceanisediminis* Ba9 และลดลงเท่ากับ 0.23 ± 0.00 mg-P/L ในชุด control (ตารางที่ 21) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ทั้งสองชุดการทดลองนี้มีปริมาณออร์โทฟอสเฟตอยู่ในช่วงที่ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ และไม่เกินมาตรฐานน้ำทิ้งของกรมควบคุมมลพิษ (2555)

4.2 ผลการกำจัดสารอินทรีย์หลังจากผ่านการบำบัดทางชีวภาพขั้นตอนที่ 2

จากการศึกษาประสิทธิภาพของชุดอุปกรณ์ต้นแบบขั้นตอนที่ 2 โดยใช้โอโซนในการบำบัดน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 30 นาที พบว่า ชุด *Bacillus oceanisediminis* Ba9 มีปริมาณแอมโมเนียในน้ำเลี้ยงกุ้งเพิ่มขึ้น เท่ากับ 52.77 ± 5.19 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไนโตรเจนลดลง เท่ากับ 33.23 ± 86.50 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณไนเตรทเพิ่มขึ้น เท่ากับ 7.47 ± 17.61 เปอร์เซ็นต์ สำหรับในชุด control มีปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นถึง 73.32 ± 22.87 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไนโตรเจนลดลง เท่ากับ 7.36 ± 16.09 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณไนเตรทลดลง เท่ากับ 5.78 ± 12.95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปริมาณแอมโมเนีย ไนโตรเจน และไนเตรทในชุด *Bacillus oceanisediminis* Ba9 น้อยกว่าในชุด control อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และสอดคล้องกับการศึกษาของ Chankaew *et al.* (2018) ที่รายงานว่า แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* มีความสามารถในการบำบัดสารอินทรีย์ไนโตรเจนให้มีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำน้อยลงได้ สำหรับปริมาณออร์โทฟอสเฟตเพิ่มขึ้น เท่ากับ 0.26 ± 0.01 mg-P/L ในชุด *Bacillus oceanisediminis* Ba9 และมีปริมาณออร์โทฟอสเฟตลดลง เท่ากับ 0.23 ± 0.00 mg-P/L ในชุด control ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลอง แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ระหว่างชุดอุปกรณ์ต้นแบบขั้นตอนที่ 1 และ 2 นอกจากนี้ทั้งสองชุดการทดลองมีปริมาณออร์โทฟอสเฟตอยู่ในช่วงที่ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ และไม่เกินมาตรฐานน้ำทิ้งของกรมควบคุมมลพิษ (2555)

ตารางที่ 18 ปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียในน้ำเลี้ยงกุ้งหลังจากบำบัดทั้งสองขั้นตอน

Ammonia concentration	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	Changes (mg-N/L)	% Ammonia
Control	0.20±0.00 ^b	0.36±0.00 ^c	0.17±0.00 ^b	82.86±0.70 ^a
Ba9	0.37±0.01 ^a	0.56±0.00 ^a	0.19±0.00 ^a	51.64±0.57 ^c
Control + ozone	0.20±0.00 ^b	0.35±0.00 ^b	0.15±0.00 ^c	73.32±1.54 ^b
Ba9 + ozone	0.37±0.01 ^a	0.56±0.00 ^a	0.19±0.00 ^a	52.77±1.10 ^c

หมายเหตุ : ตัวเลขที่นำเสนอมือเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มี ความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

ตารางที่ 19 ปริมาณความเข้มข้นของไนไตรท์ในน้ำเลี้ยงกุ้งหลังจากบำบัดทั้งสองขั้นตอน

Nitrite concentration	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	Changes (mg-N/L)	% Nitrite
Control	0.39±0.00 ^a	0.47±0.00 ^a	+0.08±0.00 ^a	+21.76±0.90 ^a
Ba9	0.16±0.01 ^b	0.07±0.00 ^c	-0.10±0.00 ^c	-64.00±2.44 ^c
Control + ozone	0.39±0.00 ^a	0.42±0.00 ^b	+0.03±0.01 ^b	+7.36±2.62 ^b
Ba9 + ozone	0.16±0.01 ^b	0.10±0.01 ^d	-0.05±0.01 ^d	-33.23±4.66 ^d

¹ ตัวเลขที่นำเสนอมือเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มี ความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

หมายเหตุ : - = การลดลงของปริมาณของไนไตรท์ที่น้อยกว่าวันเริ่มต้น
+ = การเพิ่มขึ้นของปริมาณของไนไตรท์ที่มากกว่าวันเริ่มต้น

ตารางที่ 20 ปริมาณความเข้มข้นของไนเตรทในน้ำเลี้ยงกุ้งหลังจากบำบัดทั้งสองขั้นตอน

Nitrate concentration	Initial (mg-N/L)	Final (mg-N/L)	Changes (mg-N/L)	% Nitrate
Control	0.48±0.01 ^b	0.39±0.02 ^b	-0.09±0.02 ^b	-18.00±3.92 ^b
Ba9	0.72±0.12 ^a	0.81±0.00 ^a	+0.11±0.00 ^a	+15.72±0.45 ^a
Control + ozone	0.48±0.01 ^b	0.45±0.03 ^b	-0.03±0.03 ^b	-5.78±5.56 ^b
Ba9 + ozone	0.72±0.12 ^a	0.77±0.01 ^a	+0.07±0.01 ^a	+10.03±1.45 ^a

หมายเหตุ : ตัวเลขที่นำเสนอมือเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มี ความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

- = การลดลงของปริมาณของออร์โธฟอสเฟตที่น้อยกว่าวันเริ่มต้น
+ = การเพิ่มขึ้นของปริมาณของออร์โธฟอสเฟตที่มากกว่าวันเริ่มต้น

ตารางที่ 21 ปริมาณความเข้มข้นของออร์โธฟอสเฟตในน้ำเลี้ยงกุ้งหลังจากบำบัดทั้งสองขั้นตอน

Orthophosphate concentration	Initial (mg-P/L)	Final (mg-P/L)	Changes (mg-P/L)	% Orthophosphate
Control	0.23±0.00 ^b	0.23±0.00 ^b	-0.01±0.00 ^{ab}	-2.95±1.11 ^{ab}
Ba9	0.26±0.01 ^a	0.26±0.00 ^a	0.00±0.00 ^{ab}	+1.79±1.40 ^{ab}
Control + ozone	0.23±0.00 ^b	0.23±0.00 ^b	-0.01±0.00 ^b	-3.29±1.13 ^b
Ba9 + ozone	0.26±0.01 ^a	0.26±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a	+2.25±1.30 ^a

หมายเหตุ : ตัวเลขที่นำเสนอนี้เป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

- = การลดลงของปริมาณของออร์โธฟอสเฟตที่น้อยกว่าวันเริ่มต้น

+ = การเพิ่มขึ้นของปริมาณของออร์โธฟอสเฟตที่มากกว่าวันเริ่มต้น

นอกจากนี้เมื่อผ่านชุดอุปกรณ์ต้นแบบระบบบำบัดน้ำในการเลี้ยงกุ้งสองขั้นตอน พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณแบคทีเรียมากกว่าค่าเริ่มต้นทั้งในชุด control และชุด *Bacillus oceanisediminis* Ba9 โดยในชุด control เริ่มต้นมีปริมาณแบคทีเรีย 2.67×10^7 CFU/ml ผ่านการบำบัดด้วยชุดอุปกรณ์ที่ 1 พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียรวม 3.58×10^7 CFU/ml เมื่อผ่านการบำบัดด้วยโอโซนเป็นเวลา 30 นาที พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียรวมเพิ่มขึ้น 3.79×10^7 CFU/ml สำหรับชุด *Bacillus oceanisediminis* Ba9 เริ่มต้นมีปริมาณแบคทีเรีย 0.055×10^7 CFU/ml ผ่านการบำบัดด้วยชุดอุปกรณ์ที่ 1 พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียรวมมากกว่า $>10^7$ CFU/ml เนื่องจากมีการตรึงเชื้อแบคทีเรียเพิ่มเข้ามาเพื่อช่วยในการกำจัดปริมาณสารอินทรีย์ไนโตรเจน เมื่อผ่านการบำบัดด้วยโอโซนเป็นเวลา 30 นาที พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียรวมลดลงเหลือ 2.94×10^7 CFU/ml (ตารางที่ 22) ทั้งนี้ปริมาณแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นมากกว่าค่าเริ่มต้น อาจเนื่องจากอัตราเร็วของน้ำทิ้งที่ผ่านระบบบำบัดขั้นตอนที่ 1 ที่ทำให้เชื้อหลุดออกมาจากการตรึงบนเรซินได้

อย่างไรก็ตาม รายงานวิจัยอื่น ๆ รายงานว่าการใช้โอโซนในการบำบัดน้ำเป็นเวลา 30 นาทีสามารถฆ่าเชื้อไวรัสและแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งได้ (Owsley, 1991; Liltved *et al.*, 1995; Arimoto *et al.*, 1996) ในขณะที่ปริมาณสารแขวนลอย (TSS) ลดลงจากค่าเริ่มต้นมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ทั้งในชุด control และชุด *Bacillus oceanisediminis* Ba9 (ตารางที่ 22) ซึ่งเกินมาตรฐานน้ำทิ้งของกรมควบคุมมลพิษ (2555) แต่ปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (BOD) ในวันที่ 5 หลังจากผ่านการบำบัดด้วยโอโซน (ชุดอุปกรณ์ต้นแบบขั้นที่ 2) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทั้งในชุด *Bacillus oceanisediminis* Ba9 และชุด control เท่ากับ 62.53 ± 31.77 และ 67.16 ± 10.59 mg/L

ตามลำดับ (ตารางที่ 23) แสดงให้เห็นว่ามีปริมาณจุลินทรีย์หลงเหลืออยู่ ทำให้ยังมีการย่อยสลายสารอินทรีย์ ส่งผลให้ค่า BOD เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 22 ปริมาณสารแขวนลอยรวมในน้ำเลี้ยงกุ้งหลังจากบำบัดทั้งสองขั้นตอน

TSS concentration	Initial	Final	Change	%
Control	213.33±25.17 ^b	160.00±10.00 ^c	-53.33±10.00 ^b	-25.00±1.69 ^{bc}
Ba9	406.67±15.17 ^a	316.67±15.28 ^a	-90.00±15.28 ^b	-22.13±3.76 ^c
Control + ozone	213.33±25.17 ^b	103.33±11.55 ^c	-110.00±11.55 ^b	-51.56±5.41 ^a
Ba9 + ozone	406.67±15.17 ^a	233.33±20.82 ^b	-173.34±20.82 ^a	-42.62±5.12 ^{ab}

หมายเหตุ : ตัวเลขที่นำเสนอมือเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

- = การลดลงของปริมาณของออร์โธฟอสเฟตที่น้อยกว่าวันเริ่มต้น

+ = การเพิ่มขึ้นของปริมาณของออร์โธฟอสเฟตที่มากกว่าวันเริ่มต้น

ตารางที่ 23 ประสิทธิภาพการกำจัดปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ของชุดอุปกรณ์ต้นแบบระบบบำบัดน้ำแบบ 2 ขั้นตอน

BOD	Initial	Final	Change
Control	11.69±31.26 ^{ns}	46.36±32.77 ^{ns}	34.67±32.77 ^{ns}
Control + ozone	11.69±31.26 ^{ns}	67.16±10.59 ^{ns}	55.47±10.59 ^{ns}
Ba9	41.73±36.69 ^{ns}	62.53±45.46 ^{ns}	20.80±45.46 ^{ns}
Ba9 + ozone	41.73±36.69 ^{ns}	62.53±31.77 ^{ns}	20.80±31.77 ^{ns}

หมายเหตุ : ตัวเลขที่นำเสนอมือเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียทนเค็มที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ *Bacillus oceanisediminis* Ba9 และนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในชุดอุปกรณ์ระบบบำบัดน้ำในการเลี้ยงกุ้งแบบสองขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกเป็นการบำบัดทางชีวภาพ ด้วยการตรึงกล้าเชื้อบนวัสดุสารกรองเรซิน และขั้นตอนที่ 2 เป็นการบำบัดด้วยการให้ก๊าซโอโซนเป็นเวลา 30 นาที พบว่าระบบบำบัดแบบสองขั้นตอนนี้ สามารถลดความเข้มข้นของแอมโมเนียในน้ำเสียได้ดี และสามารถเปลี่ยนไนไตรท์เป็นไนเตรทได้ดีตามกระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification) มีปริมาณออร์โธฟอสเฟตเพิ่มขึ้น ปริมาณสารแขวนลอยลดลง และปริมาณของแบคทีเรียรวมลดลงหลังจากน้ำเสียผ่านชุดระบบบำบัดนี้

เอกสารอ้างอิง

- กรมประมง. 2560. หนังสือสถิติหน่วยธุรกิจการประมง พ.ศ. 2558. กองนโยบายและยุทธศาสตร์
พัฒนาการประมง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. เอกสารฉบับที่ 5/2560.
- กษิติศ หนูทอง. 2551. การบำบัดไนโตรเจนในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบปิด. ว.พระจอมเกล้า
ลาดกระบัง. 16: 11-22.
- กัญญาณัฐ ขุนดี, ชลอ ลี้มสุวรรณ และพรเลิศ จันทร์รัชชกุล. 2552. ประสิทธิภาพของไนตริไฟอิง
แบคทีเรียในการควบคุมปริมาณแอมโมเนียและไนโตรท์. การประชุมทางวิชาการของ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 17-20 มี.ค. 2552. 188-196.
- ชลอ ลี้มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกุล. 2547. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย.
บริษัท เมจิคพับบลิเคชันจำกัด, กรุงเทพฯ.
- ชุมพล ศรีทอง, อัมพิกา แจ้งไพโร และอรุณวรรณ หวังกอบเกียรติ. 2557. การใช้ไนตริไฟอิง
แบคทีเรียน้ำเค็มที่ตรึงบนเม็ดโพลีเอสเตอร์เพื่อเร่งการกำจัดแอมโมเนียและไนโตรท์ในบ่อ
อนุบาลลูกกุ้ง. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 52 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ณ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน. 4-7 กุมภาพันธ์ 2557 กรุงเทพฯ
- ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2544. การกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทางชีวภาพ. สมาคมวิศวกรรม
สิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 703 หน้า.
- นิคม ละอองศิริวงศ์, ภาสกร ฅมพลกรัง, ลักษณ์ ละอองศิริวงศ์ และทองเพชร สันบุคา. 2547. ยูโทร
ฟิเคชัน : ผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการประมงในทะเลสาบสงขลา. กลุ่ม
งานวิจัยระบบและการจัดการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
ชายฝั่ง สำนักงานวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง. 40 หน้า.
- พุทธ ส่องแสงจินดา, ลักษณ์ ละอองศิริวงศ์ และชัชวาล อินทรมนตรี. 2546. พลั๊กซ์ของสารอนินทรีย์
ไนโตรเจนที่ผิวสัมผัสของน้ำ-ตะกอนดินในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการ
เพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย. 13 หน้า.
- มลฤดี สอนิ และศรีภาพรรณ ธาระนารถ. 2558. การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้ง
ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัสภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆ.
คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา 9-22.
- อนันต์ ต้นสุตะพานิช. 2542. แนวทางการฟื้นฟูการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (การเลี้ยงแบบรีไซเคิลในมิติที่
ประหยัดลดมลพิษและใช้ทรัพยากรอย่างยั่งยืน). ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง
ฉะเชิงเทรา กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง. 34 หน้า.

- อรุณวรรณ หวังกอบเกียรติ, ศิริวัฒน์ คูเจริญไพบูลย์ และกรรณิกา ศรีปัญญา. 2548. การกำจัดแอมโมเนียด้วยกระบวนการไนตริฟิเคชัน ในน้ำจืดและน้ำเค็ม โดยใช้แบคทีเรียไนตริไฟอิงที่ตรึงกับแผ่นโพลีเอสเตอร์. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 7: 100-114.
- อุไรวรรณ พงศ์พานิชย์เจริญ. 2546. การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบการเลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำโดยใช้โอโซนและคลอรีนในการฆ่าเชื้อโรค. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
- APHA AWWA WPCF (American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation). 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater, 22nd Edition. American Public Health Association, Washington, D. C.
- Arimoto, M., Sato. J., Maruyama. K., Mimura, G. and Furusawa, I. 1996. Effect of chemical and physical treatment on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture* 143: 15-22.
- Bitton, G. 1994. Wastewater Microbiology. Wiley-Liss, Inc. USA. 765 pp.
- Chankaew, S., O-Thong, S. and Sangnoi, Y. 2018. Nitrogen removal efficiency of salt-tolerant heterotrophic nitrifying bacteria. *Chiang Mai J. Sci.* 45:11-20.
- Dong, Y., Zhang, Y. and Tu, B. 2017. Immobilization of ammonia-oxidizing bacteria by polyvinyl alcohol and sodium alginate. *Braz. J. Microbiol.* 48: 515-521.
- Dong, Y., Zhang, Z., Jin, Y., Li, Z. and Lu, J. 2010. Nitrification performance of nitrifying bacteria immobilized in waterborne polyurethane at low ammonia nitrogen concentrations. *J. Environ. Sci.* 23: 366-371.
- Evan, F. L. 1972. Ozone in water and wastewater treatment. Environmental Protection Agency, Ann Arbor Sci. Publ., Michigan. 164 pp.
- FAO. 2016. "Indian white prawn-*Penaeus indicus*." Aquaculture Feed and Fertilizer Resources Information System.
- Francis, C. A., Beman, J. M. and Kuypers, M. M. M. 2007. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *The ISME Journal.* 1: 19-27.
- Gross, A., Nemirovskya, A., Zilbergb, D., Khaimova, A., Brennerc, A., Snird, E., Ronena, Z. and Nejidata., A. 2003. Soil nitrifying enrichments as biofilter starters in intensive recirculating saline water aquaculture. *Aquaculture.* 223: 51-62.

- Hart, P. and O'Sullivan, D. B. 1993. Recirculation systems: design, construction and management; Turtle Press: Tasmania, Australia. 127 pp.
- Ichimura, K., Mishima, K. and Watanabe, A. 1987. Immobilization of nitrifier by entrapped method using photocrosslinkable resin prepolymer. *J. Wat. Waste.* 29: 742-749.
- Krüner, G and Rosenthal, H. 1983. Efficiency of nitrification in trickling filters using different substrates. *Aquac. Eng.* 2: 49-67.
- Kumar, V. J. R., Achuthan, C., Manju, N. J., Philip, R. and Singh, I. S. B. 2009. Mass production of nitrifying bacterial consortia for the rapid establishment of nitrification in saline recirculating aquaculture systems. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 407-414.
- Lertsutthiwong, P., Boonpuak, D., Pungrasmi, W. and Powtongsook, S. 2013. Immobilization of nitrite oxidizing bacteria using biopolymeric chitosan media. *J Environ Sci.* 25: 262-267.
- Liltved, H., Heektoen, H. and Efraimsem, H. 1995. Inactivation of bacteria and viral fish pathogens by ozonation or uv irradiation in water of different salinity. *Aquac. Eng.* 14: 107-122.
- Lin, S. H. and Yeh, K. L. 1993. Looking to treat wastewater try ozone. *Chem. Eng.* 6: 112-116.
- 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.
- Matsuzaka, E., Nomura, N., Nakajima-Kambe, T., Okada, N. and Nakahara, T. 2003. A simple screening procedure for heterotrophic nitrifying bacteria with oxygen-tolerant denitrification activity. *J. Biosci. Bioeng.* 95: 409-411.
- Meunpol, O., Lopinyosiri, K. and Menasveta, P. 2003. The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture.* 220: 437-448.
- Nimrat, S., Sakanuchaichan, K., Chuersuwan, N. and Vuthiphandchai, V. 2005. Prevalence of *Vibrio* spp. in aquatic organism collection from natural environments and aquaculture systems. *Burapha Science Journal.* 10: 83-91.

- Owsley, D.E. 1991. Ozone for disinfecting hatchery rearing water. In J. Colt and R. J. White, editors. Fisheries Bioengineering Symposium. American Fisheries Society, Symposium 10, Bethesda, Maryland. 417–420 pp.
- Roustan, M. 1997. Ozone use in a drinking water treatment plant. Franco – Thai symposium new advances in water and wastewater treatment, 28–41 pp.
- Sallanko, J. and Okkonen, J. 2009. Effect of ozonation on treated municipal wastewater. *J. Environ. Sci. Health. A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 44: 57–61.
- 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.
- Spotte, S. 1979. Seawater Aquariums: The Captive Environment. New York : John Wiley and Sons. 413 pp.
- Strickland, J. D. H. and Parson, T. R. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Canada: Fishery Research Board. 310 pp.
- 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.
- Sumino, T., Nakamura, H., Mori, N. and Kawaguchi, Y. 1992a. Immobilization of nitrifying bacteria by polyethylene glycol prepolymer. *J. Ferment. Bioeng.* 73: 37–42.
- Sumino, T., Nakamura, H., Mori, N., Kawaguchi, Y. and Tada, M. 1992b. Immobilization of nitrifying bacteria in porous pellets of urethane gel for removal of ammonium nitrogen from waste-water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 556–560.
- Wen, Y. and Wei, C. H. 2011. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacterium isolated from anaerobic/ anoxic/ oxic treatment system. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 6985–6990.
- Yanagita, T. 1990. Nature Microbiology Communities: Ecological and Physiological Features. Tokyo Japan Scientific Societies Press, Japan. 485 pp.

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.

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

- 1) การศึกษาอัตราการไหลและระยะเวลาการไหลที่เหมาะสมของน้ำเสียที่ผ่านระบบบำบัด
- 2) การศึกษาวิธีการตรึงเชื้อบนวัสดุยึดเกาะที่เหมาะสม
- 3) ระยะเวลาการบำบัดที่เหมาะสมด้วยก๊าซไอโซน
- 4) การจัดเรียงระบบบำบัดที่เหมาะสม