งานหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

การศึกษาแบคทีเรียที่จำเป็นในระบบกรองน้ำแบบชีววิทยา ในสถานเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม

พัฒนา ภูลเปี่ยม
จิตรา ตีระเมธี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3 1 ม.ค. 2548

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2539
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล
พ.ศ. 2542

การศึกษาแบคทีเรียที่จำเป็นในระบบกรองน้ำแบบชีววิทยา ในสถานเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม

โดย

พัฒนา ภูลเปี่ยม*
จิตรา ตีระเมธี*

บทคัดย่อ

การศึกษาตัวอย่างน้ำและดินตะกอนจากระบบกรองน้ำแบบปิดของตู้เลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม ในสถานเลี้ยงสัตว์น้ำเค็มของสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา เป็นระยะเวลา 10 เดือน ตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2541 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2542 พบปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำและดินตะกอนตัวอย่างอยู่ในช่วง 7.2×10^4 ถึง 2.6×10^5 และ 5.7×10^4 ถึง 1.7×10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เป็นแบคทีเรียในสกุล *Micrococcus* , *Achromobacter* , *Pseudomonas* , *Salmonella* , *Aeromonas* และ *Bacillus*

ปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ในน้ำและดินตะกอนตัวอย่างอยู่ในช่วง 1.3×10^2 ถึง 1.7×10^4 และ 1.24×10^4 ถึง 7.6×10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เป็นแบคทีเรียในสกุล *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* และ *Nitrosovibrio* และปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนไนไตรท์ไปเป็นไนเตรทในน้ำและดินตะกอนตัวอย่างอยู่ในช่วง 21 ถึง 2.9×10^3 และ 1.32×10^3 ถึง 1.17×10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เป็นแบคทีเรียในสกุล *Nitrococcus*

* สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน จังหวัดชลบุรี 20131

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

A Study on the Biological Filtration Bacteria in Marine Aquarium

by

Pattana Poonpium*

Jittra Teeramaethee*

Abstract

A study on water and sediment samples in closed recirculating system of the Institute of Marine Science, Burapha University, for a period of 10 months from April, 1998 to January, 1999. It was revealed that the number of total bacterias in water and sediment samples ranges between 7.2×10^4 to 2.3×10^5 and 5.7×10^4 to 1.7×10^6 colony per millilitres, respectively. Genus of bacterias were *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Aeromonas* and *Bacillus*.

It was revealed that the oxidation of ammonia to nitrite bacterias in water and sediment samples ranges between 1.3×10^2 to 1.7×10^4 and 1.24×10^4 to 7.6×10^4 colony per millilitres, respectively. Genus of bacterias were *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* and *Nitrosovibrio*. The oxidation of nitrite to nitrate bacterias in water and sediment samples ranges between 21 to 2.9×10^3 and 1.32×10^3 to 1.17×10^4 colony per millilitres, respectively. Genus of bacteria were *Nitrococcus*.

* Institute of Marine Science, Burapha University, Bangsaen, Chon Buri 20131

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน หมวดเงินอุดหนุน มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ 2539 คณะผู้ทำการวิจัยใคร่ขอขอบคุณเป็นอย่างมากไว้ ณ โอกาสนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลทุกท่านที่มีส่วนช่วยทำให้งานวิจัยเรื่องนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ฆ
สารบัญ	ง
รายการตาราง	ช
รายการรูปประกอบ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
เหตุผล และที่มาของงานวิจัย	1
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎี	
วัฏจักรของไนโตรเจน	3
ผลเสียต่อสภาพสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากน้ำเสียมีสารประกอบไนโตรเจน	5
การบำบัดไนโตรเจนโดยกระบวนการบำบัดทางชีวภาพ	7
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	14
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	15
บทที่ 4 ผลการทดลอง	18
บทที่ 5 สรุปผล และข้อเสนอแนะ	22
บรรณานุกรม	26
ภาคผนวก	29

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	วิธีการกำจัดไนโตรเจนรูปต่าง ๆ	7
2.2	ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนของ nitrifying organisms และอัตราส่วนของ BOD_5 / TKN	11
4.1	การแยก และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อขบวนการย่อยสลายจาก น้ำเลี้ยงและดินตะกอนจากระบบกรองน้ำเค็มของตู้เลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม	19

รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
2.1	การเปลี่ยนรูปของสารประกอบไนโตรเจนโดยกระบวนการบำบัดทางชีวภาพ	9

รูปผนวกที่

1	ผังแบบตู้และระบบกรองน้ำเค็มของตู้เลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม	29
2	การเปลี่ยนสีของตัวบ่งชี้ เมื่อมีการสะสมของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	30

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 1
บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเค็มกันอย่างกว้างขวางทั้งสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น ปลากะพงขาว ปลากะรัง และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น กุ้งกุลาดำ หอยนางรม ฯลฯ เป็นต้น ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเหล่านี้ล้วนแล้วแต่ต้องทำการเลี้ยงในบ่อเพาะเลี้ยงทั้งสิ้น และวิธีการเลี้ยงส่วนใหญ่แล้วจะเป็นการเลี้ยงแบบเปลี่ยนน้ำแล้วทิ้งไปเลย ไม่มีการนำน้ำเค็มที่ใช้แล้วไปบำบัดแล้วนำกลับมาใช้อีก ดังนั้นเกษตรกรจึงต้องเสียค่าใช้จ่ายในการซื้อน้ำเค็มสดมาใช้ซึ่งมีราคาสูงมากทำให้ต้นทุนในการเพาะเลี้ยงแต่ละครั้งสูงมากตามไปด้วย ถ้าหากเกษตรกรสามารถนำน้ำเค็มที่ใช้แล้วเหล่านี้มาทำการบำบัดแล้วนำกลับมาใช้ใหม่ หรือสามารถจะเลี้ยงสัตว์น้ำเค็มได้นานๆ โดยไม่ต้องทำการเปลี่ยนน้ำบ่อยครั้งๆ ละมากๆ ก็จะสามารถประหยัดค่าใช้จ่ายลงไปได้อีกมาก และอาจเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยแก้ปัญหาการปล่อยน้ำเค็มทิ้งในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเค็มในพื้นที่ดินจืด ซึ่งมีปัญหาจากน้ำเค็มที่ปล่อยทิ้งต่อการใช้แหล่งน้ำตามธรรมชาติในการอุปโภค-บริโภค ปัญหาต่อการเลี้ยงสัตว์ชนิดอื่นที่จำเป็นต้องใช้น้ำจืด ปัญหาต่อน้ำและดินที่ใช้ในการเพาะปลูก

เนื่องจากสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลได้เล็งเห็นถึงปัญหาดังกล่าว และสถาบันฯ เองนั้นมีสถานเลี้ยงสัตว์น้ำเค็มทั้งมีกระดูกสันหลัง และไม่มีกระดูกสันหลังโดยระบบปิด คือ ระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำเค็มเป็นเวลานานๆ โดยไม่ต้องเปลี่ยนน้ำบ่อยๆ ทั้งนี้เพราะเป็นระบบที่มีระบบกรองน้ำประสิทธิภาพสูงสามารถทำให้น้ำเค็มที่ใช้เลี้ยงสัตว์มีคุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงอยู่ตลอดเวลา ในระบบกรองน้ำที่มีประสิทธิภาพสูงนั้นจะมีจุลินทรีย์หลายชนิดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปของสารเคมีต่างๆ ที่สะสมอยู่ภายในถังกรอง จึงถือได้ว่ามีความสำคัญต่อระบบกรองอย่างยิ่ง ทั้งนี้เพราะการเลี้ยงสัตว์น้ำเค็มในบ่อเลี้ยงนั้นจะมีสารอินทรีย์และอนินทรีย์เกิดขึ้นและสะสมอยู่ในน้ำเลี้ยงตลอด โดยจุลินทรีย์จะเป็นตัวการในการเปลี่ยนสารอนินทรีย์ที่เป็นโทษต่อสัตว์น้ำให้เป็นสารอินทรีย์ในรูปของเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น และ/หรือ สารอนินทรีย์ที่ไม่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำ โดยขบวนการทางชีวเคมีต่างๆ หลายขบวนการ เช่น Mineralization, Nitrification และ Denitrification ฯลฯ เป็นต้น

ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับระบบกรองน้ำเค็ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญต่อระบบกรองจึงน่าจะมีประโยชน์ต่อการพัฒนาระบบกรองเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเค็มได้เป็นอย่างดี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาชนิดของแบคทีเรียในถังกรองและตู้เลี้ยงที่เป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม

2. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียในถังกรองที่จำเป็นต่อขบวนการชีวเคมีในถังกรอง ได้แก่ Mineralization, Nitrification และ Denitrification ฯลฯ เป็นต้น เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการกำจัดของเสียในถังกรองให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

สถานที่เก็บตัวอย่างและทำการทดสอบ

ตู้เลี้ยงและระบบกรองน้ำของตู้เลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงชนิดของแบคทีเรียที่มีความเกี่ยวข้องกับขบวนการชีวเคมีในถังกรองและตู้เลี้ยงที่เป็นประโยชน์ต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม

2. ทำให้ทราบถึงชนิดของแบคทีเรียที่เหมาะสมจะใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในระบบกรองและตู้เลี้ยงเพื่อความรวดเร็วในการพร้อมทำงานของระบบ

3. ทำให้สามารถใช้แบคทีเรียเติมลงในถังกรองเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกรองให้ดีขึ้นและช่วยแก้ปัญหาในการปรับปรุงคุณภาพน้ำ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 2
ทฤษฎี

ระบบบำบัดทางชีววิทยาจะอาศัยสิ่งมีชีวิตอันได้แก่ พวกจุลินทรีย์ในการกิน ทำลาย ย่อยสลาย ดูดซับ หรือเปลี่ยนรูปของมลสาร ซึ่งอยู่ในรูปของสารอินทรีย์ต่าง ๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำเสียให้มีความสกปรกน้อยลง ด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมี ซึ่งกระบวนการสามารถเขียนได้ดังนี้

มลสารอินทรีย์ + จุลินทรีย์ + ออกซิเจน่ ⟶ จุลินทรีย์เซลล์ใหม่ + คาร์บอนไดออกไซด์ + น้ำ + พลังงาน

มลสาร (Pollutants) ที่อยู่ในน้ำเสียจะถูกจุลินทรีย์ใช้เป็นอาหาร และการเจริญเติบโต พลังงานก็จะถูกจุลินทรีย์ใช้ในการดำรงชีวิต สรุปแล้วมลสารซึ่งส่วนใหญ่ได้แก่สารอินทรีย์ต่าง ๆ ในน้ำเสียจะถูกเปลี่ยนมาเป็นมวลจุลินทรีย์ที่หนักกว่าน้ำ สามารถแยกออกได้ง่ายด้วยการตกตะกอน

ในการใช้สารอาหาร หรือในการย่อยสลาย (Break down) สารอินทรีย์ของจุลินทรีย์อาจจะมีการทำงานร่วมกันหลายชนิดก็ได้ โดยจุลินทรีย์บางชนิดเริ่มทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ซับซ้อน (complex organics) ก่อน จากนั้นจะมีชนิดอื่น ๆ ย่อยสลายส่วนที่เหลือ หรือมิฉะนั้นก็อาจจะเป็นการนำเอาผล หรือของเสียที่เกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ มาทำการย่อยสลายต่อจนเป็นสารที่ไม่สามารถย่อยได้อีกต่อไป (End products)

จุลินทรีย์ต้องนำออกซิเจนมาใช้ย่อยสลายสารอินทรีย์ เพื่อให้ได้พลังงาน ซึ่งพลังงานที่ได้จะนำไปใช้ในการสร้างเซลล์ใหม่ ตามสมการดังนี้

สารอินทรีย์ + ออกซิเจน + จุลินทรีย์ + เอนไซม์ ⟶ คาร์บอนไดออกไซด์ + น้ำ + พลังงาน -----(1)

สารอินทรีย์ + ฟอสฟอรัส + ไนโตรเจน + ออกซิเจน + จุลินทรีย์ + เอนไซม์และพลังงาน

⟶ เซลล์ใหม่ + คาร์บอนไดออกไซด์ + น้ำ -----(2)

โดยพลังงานที่ได้จากสมการที่ 1 จะถูกจุลินทรีย์นำมาใช้ในสมการที่ 2 เพื่อสร้างเซลล์ใหม่ และนอกจากนี้จุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ต้องนำออกซิเจนมาใช้ในการย่อยสลายจุลินทรีย์ที่ตายแล้ว โดยจุลินทรีย์ที่ตายแล้วจะถูกใช้เป็นอาหารของจุลินทรีย์ตัวอื่น ๆ ที่ยังมีชีวิตอยู่ ตามสมการนี้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จุลินทรีย์ที่ตายแล้ว + ออกซิเจน + จุลินทรีย์ + เอนไซม์ ⟶ คาร์บอนไดออกไซด์ + น้ำ + แอมโมเนียหรือไนเตรท + พลังงาน ---(3)

ในช่วงแรกของการบำบัดน้ำเสียแบบกะ (Batch) ค่าความเข้มข้นของสิ่งสกปรกหรือสารอินทรีย์ในน้ำเสียจะมีค่าสูง ส่วนจุลินทรีย์จะมีค่าความเข้มข้นต่ำ และมีอัตราการใช้ออกซิเจนต่ำ ต่อจากนั้นจุลินทรีย์เริ่มทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ เพื่อนำพลังงานไปใช้ในการเจริญเติบโตทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนและเจริญเติบโตสูงขึ้น เป็นผลให้มีจำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ครั้นเมื่ออาหารเริ่มขาดแคลนจนไม่เพียงพอในการดำรงชีพของจุลินทรีย์ ปริมาณจุลินทรีย์และอัตราความต้องการออกซิเจนก็จะลดลงตามลำดับ แต่สำหรับในระบบบำบัดน้ำเสียจริงซึ่งมีน้ำเสียไหลเข้าระบบอย่างต่อเนื่อง จุลินทรีย์ก็จะย่อยสลายสารอินทรีย์ และเพิ่มปริมาณอยู่ตลอดเวลา และอัตราการใช้ออกซิเจนสูงตลอดเวลาเช่นเดียวกัน

วัฏจักรของไนโตรเจน

สารประกอบไนโตรเจนที่เข้ามาเกี่ยวข้องกับน้ำเสียแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

1. สารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่น แอมโมเนีย (NH_3), ไนเตรท (NO_3) และไนไตรท์ (NO_2) สารพวกนี้อาจอยู่ในรูปปุ๋ย เกลือในปัสสาวะ

2. สารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิค สารดังกล่าวนี้เป็นส่วนประกอบของร่างกายพืชและสัตว์ ในอุจจาระ และในปุ๋ยที่ได้จากมูลสัตว์ เป็นต้น

สาเหตุที่สารเหล่านี้เข้ามามีบทบาทในน้ำเสีย ก็เพราะสามารถเปลี่ยนรูปจากสารอินทรีย์ไปเป็นสารอนินทรีย์โดยกระบวนการที่เรียกว่า มินเนอเรไรเซชั่น (Mineralization) ซึ่งมีแบคทีเรียเป็นตัวสำคัญในการเกิดการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้สารอนินทรีย์ในรูปต่าง ๆ ก็อาจเปลี่ยนกลับไปมาได้โดยอาศัยแบคทีเรียเช่นกัน กระบวนการที่เกิดขึ้นเช่น แอมโมนิฟิเคชั่น (Ammonification), ไนตริฟิเคชั่น (Nitrification) และดีไนตริฟิเคชั่น (Denitrification) ความสำคัญของกระบวนการมินเนอเรไรเซชั่น คือ การเปลี่ยนสารอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำให้เป็นรูปที่ละลายน้ำ ซึ่งแบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ กระบวนการดังกล่าวมีความสำคัญเกี่ยวกับวัฏจักรในน้ำเสีย เพราะทำให้มีสารอาหารซึ่งพวกพืชน้ำ และสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ ในน้ำสามารถนำไปใช้ได้

ความสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบไนโตรเจนในรูปต่าง ๆ และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในธรรมชาติแสดงให้เห็นในวัฏจักรของไนโตรเจน (Nitrogen Cycle) กล่าวคือ ในระหว่างที่เกิดฝนฟ้าคะนอง ประจุไฟฟ้าในบรรยากาศจะทำให้ก๊าซไนโตรเจนถูกออกซิไดซ์เกิดเป็นสารประกอบไนเตรทขึ้น เมื่อสารประกอบไนเตรทซึ่งละลายอยู่ในน้ำฝนตกลงสู่พื้นดินก็จะกลายเป็นอาหารของพืชสีเขียวในการสังเคราะห์แสงเพื่อสร้างโปรตีน (Plant Protein) นอกจากนี้มีแบคทีเรียบางชนิดที่อาศัยอยู่ตามรากของพืชที่สามารถจับก๊าซไนโตรเจนในบรรยากาศได้เช่นกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เมื่อคนและสัตว์รับประทานพืชเป็นอาหาร โปรตีนในพืชจะถูกนำไปใช้สร้างโปรตีนในคนและสัตว์ (Animal Protein) และเมื่อสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ขับถ่ายของเสียออกมาเช่น ปัสสาวะ อุจจาระ หรือ ตายไป ของเสียเหล่านี้จะเกิดการเน่าเปื่อย และเปลี่ยนรูปเป็นแอมโมเนียที่เหลือใช้จากพืช หาก สภาวะแวดล้อมมีออกซิเจนมากพอก็จะถูกออกซิไดซ์โดยแบคทีเรีย ประเภทออโตโทรฟิคไนตริ ฟายอิงแบคทีเรีย (Autotrophic Nitrifying Bacteria) เกิดเป็นสารประกอบไนไตรท์และสาร ประกอบไนเตรท ถ้าสภาวะแวดล้อมเกิดสภาพไร้ออกซิเจน สารประกอบไนเตรทก็จะถูกเปลี่ยน กลับเป็นสารประกอบไนไตรท์ และไนโตรเจน

จากวัฏจักรของไนโตรเจนจะเห็นว่าสารประกอบไนโตรเจนมีความสำคัญต่อวงจร ชีวิตของทั้งพืชและสัตว์เป็นอย่างมากทั้งนี้เพราะไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญจากโครง สร้างของเซลล์สิ่งมีชีวิต

ผลเสียต่อสภาพสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากน้ำเสียมีสารประกอบไนโตรเจน

น้ำเสียที่มีสารประกอบไนโตรเจนทั้งอินทรีย์ไนโตรเจนและ/หรืออนินทรีย์ไนโตรเจน ปะปนอยู่ เมื่อปล่อยลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะ จะก่อให้เกิดผลเสียต่อสภาพสิ่งแวดล้อมตาม ธรรมชาติหลายประการ ดังนี้

1. เป็นพิษต่อสัตว์น้ำและปลา สารประกอบไนโตรเจนที่อาจเป็นพิษต่อสัตว์และปลา ได้แก่ แอมโมเนียไนโตรเจน ไนไตรท์ และไนเตรท โดยปกติแอมโมเนียไนโตรเจนจะอยู่ในรูป ของแอมโมเนียอิออน (NH_4^+) เมื่อระดับพีเอชเท่ากับ 7 และจะไม่แสดงความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ ในทางตรงกันข้ามถ้าหากระดับพีเอชเพิ่มมากขึ้นจะมีผลให้แอมโมเนียไนโตรเจนจะเปลี่ยนสภาพ เป็นแอมโมเนียอิสระในปริมาณ 0.01-2 มก./ลิตร หรือมากกว่าจะแสดงความเป็นพิษต่อสัตว์ น้ำ เนื่องจากแอมโมเนียในรูปไม่แตกตัวนั้น จะสามารถแพร่กระจายผ่านผนังเซลล์ได้ดี เนื่องจาก ไม่มีประจุไฟฟ้า และสามารถละลายได้ในไขมัน ซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของผนังเซลล์ได้ ในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ การให้อาหารประเภทที่มีโปรตีนสูงนั้น ของเสียหรือเศษอาหารที่เหลืออยู่ จะ ทำให้ปริมาณของแอมโมเนียในน้ำสูงขึ้น ซึ่งจะเป็นพิษต่อสัตว์น้ำได้ โดยจะมีผลทำให้การเจริญ เติบโตของปลาลดลง เนื่องจากเหงือกถูกทำลาย คือ บริเวณเหงือกจะมีการเพิ่มขอบจำนวนเซลล์ (hyperplasia) เซลล์บางเซลล์จะมีการขยายใหญ่ขึ้น และมีการรวมตัวกัน (hypertrophy) เซลล์ บวมน้ำ (edema) และการเสื่อมสภาพของเซลล์ (cellular degeneration) ทำให้ความสามารถใน การนำออกซิเจนเข้าสู่ร่างกายลดลง โดยฮีโมโกลบินของเลือดจะสูญเสีย ความสามารถในการรวม กับออกซิเจนและมีผลทำให้การกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากร่างกายได้น้อยลง อาจกล่าว ได้ว่าความเป็นพิษที่เกิดจากแอมโมเนียไนโตรเจนมีมากขึ้นตามระดับพีเอชที่สูงขึ้น ในกรณีของ ไนไตรท์ ในสภาวะที่น้ำมี pH ต่ำหรือเป็นกรด จะมีปริมาณไฮโดรเจรอิออน (H^+) สูง ซึ่งไฮโดร เจนอิออนนั้น จะทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ ได้กรดไนตรัส (nitrous acid) ดังสมการ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

$$NO_2^- + H^+ \longrightarrow HNO_2$$

สำหรับกรดไนตรัสนั้น จะมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำสูงกว่าไนไตรท์ ในสภาวะปกติไนไตรท์ในน้ำมักไม่ค่อยทำอันตรายต่อสัตว์น้ำ นอกจากจะเกิดการสะสมจนกระทั่งถึงระดับที่เป็นพิษ ดังนั้นในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจมีการสะสมของไนไตรท์จนถึงระดับที่เป็นพิษได้โดยเฉพาะบ่อที่มีการหมุนเวียนเอาน้ำที่ใช้แล้วกลับมาใช้ใหม่ ส่วนไนเตรททางด้านการประมงไม่ถือว่ามีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำโดยตรง นอกจากจะมีระดับความเข้มข้นสูงมาก แต่จะทำให้เกิดปัญหาทางอ้อมในกรณีที่ไนเตรท มีการเปลี่ยนสภาพมาเป็นไนไตรท์ และแอมโมเนีย สำหรับการบริโภคน้ำที่มีไนเตรทในปริมาณสูง จะก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย โดยจะทำให้เกิดโรคต่อระบบโลหิต (methemoglobinemia)

2. ทำให้ออกซิเจนละลายในน้ำ (Dissolved Oxygen) มีปริมาณลดต่ำลงน้ำเสียที่มีแอมโมเนียไนโตรเจนเมื่อระบายลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะจะทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดต่ำลง มีผลโดยตรงต่อการหายใจของสัตว์น้ำ ทั้งนี้เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่น โดยแอมโมเนียไนโตรเจนจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไนไตรท์ และไนเตรทตามลำดับ ซึ่งในเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่นที่เกิดขึ้นต้องการออกซิเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญดังนี้คือ

$$2NH_4^+ + 3O_2 \longrightarrow 4H^+ + 2H_2O + 2NO_2$$

$$NH_4^+ + 2O_2 \longrightarrow 2H^+ + H_2O + NO_3$$

3. ทำให้เกิดยูโทรฟิเคชั่น (Eutrophication) สารประกอบไนโตรเจนโดยเฉพาะไนเตรท เมื่อถูกระบายลงสู่แหล่งน้ำที่ขังนิ่ง เช่น ทะเลสาบ หนองบึง จะทำให้สาหร่ายในแหล่งน้ำนั้นเติบโตอย่างรวดเร็ว และมากขึ้น จนในที่สุดสาหร่ายเหล่านี้จะตายไป และจะเกิดการทับถมกันบริเวณก้นของทะเลสาบ และหนองบึงนั้นๆ เมื่อปริมาณมากขึ้นจะเกิดปัญหาการเน่าเหม็น (เกิดการย่อยสลายเซลล์ของสาหร่ายที่ตายแล้ว) และแหล่งน้ำเกิดการเน่าเสียมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำต่ำซึ่งจะเป็นปัญหาต่อสภาพแวดล้อม และการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ ซึ่งการที่น้ำขาดหรือมีปริมาณออกซิเจนต่ำนั้นอาจเกิดขึ้นได้ในช่วงที่มีการเจริญอย่างมากของสาหร่าย (Bloom) ซึ่งในเวลากลางคืนเซลล์สาหร่ายจะมีการหายใจมากตามไปด้วย ทำให้แหล่งน้ำนั้นๆ เกิดการขาดออกซิเจนขึ้น อาจทำให้สัตว์น้ำที่อาศัยอยู่เสียชีวิตได้

4. ทำให้สิ้นเปลืองคลอรีนในการฆ่าเชื้อ เนื่องจากคลอรีนจะทำปฏิกิริยาเคมีกับแอมโมเนียไนโตรเจนที่มีอยู่ในน้ำเสีย การฆ่าเชื้อโรคจึงสิ้นเปลืองปริมาณคลอรีนมากขึ้นเพื่อใช้ในการทำลายแอมโมเนียเสียก่อน ผลของปฏิกิริยาได้สารประกอบคลอรามีน (Chloramines) ซึ่งสามารถฆ่าเชื้อได้แต่อำนาจในการฆ่าเชื้อนั้นต่ำกว่าคลอรีนอิสระมาก ดังนั้นการสิ้นเปลืองคลอรีนจึงมากขึ้นเมื่อนำไปใช้กับน้ำที่มีแอมโมเนียไนโตรเจนปะปนอยู่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5. เป็นอันตรายต่อสุขภาพ และอนามัยของเด็กทารก น้ำเสียที่มีปริมาณไนเตรท และไนไตรท์สูงเกินไปอาจทำให้เกิดโรค Methemoglobinemia หรือ Blue Babies กับทารกโดยไนไตรท์ จะทำปฏิกิริยากับฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) ในเลือด เกิด Methemoglobin ซึ่งไม่สามารถรับส่งออกซิเจน ทำให้ทารกมีอาการหายใจไม่ออก และตัวเขียว ตามค่ามาตรฐานปริมาณไนเตรทไม่ควรเกิน 10 มก./ลิตร ของไนโตรเจน (as N)

ทั้งนี้ในกรณีของน้ำเค็มที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม เมื่อปล่อยออกสู่แหล่งน้ำจืดสาธารณะ จะมีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมเพิ่มขึ้นมาอีกปัจจัยหนึ่งด้วย

การบำบัดไนโตรเจนโดยกระบวนการบำบัดทางชีวภาพ

สารประกอบไนโตรเจนในน้ำเสียมีอยู่ 4 ชนิด คือ แอมโมเนียไนโตรเจน (NH_3-N), ไนเตรทไนโตรเจน (NO_3-N), ไนไตรท์ไนโตรเจน (NO_3-N) และอินทรีย์ไนโตรเจน (Organic Nitrogen) ซึ่งรูปแบบของสารประกอบไนโตรเจนจะเป็นตัวกำหนดการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ พบว่าสามารถจำแนกจุดมุ่งหมาย และวิธีการกำจัดไนโตรเจนตามประเภทของสารประกอบไนโตรเจนที่ปะปนอยู่ในน้ำได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 วิธีการกำจัดไนโตรเจนรูปต่าง ๆ

ประเภทของไนโตรเจน	จุดมุ่งหมายและวิธีการกำจัดไนโตรเจน		
	เปลี่ยนรูปแบบของไนโตรเจน	กำจัดไนโตรเจนออกจากน้ำเสีย	สร้างเซลล์
สารอินทรีย์ไนโตรเจน	Ammonification (เปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย)	-	-
แอมโมเนีย	Nitrification (เปลี่ยนเป็นไนเตรท)	-	Assimilation (เปลี่ยนเป็นโปรตีน)
ไนไตรท์	Nitrification (เปลี่ยนเป็นไนเตรท)	Denitrification (เปลี่ยนเป็นก๊าซ N_2)	-
ไนไตรท	-	Denitrification (เปลี่ยนเป็นก๊าซ N_2)	Assimilation (เปลี่ยนเป็นโปรตีน)

ในบรรดาไนโตรเจนในรูปต่าง ๆ มีอินทรีย์ไนโตรเจนที่ถูกรีดิวซ์มากที่สุด อินทรีย์ไนโตรเจนจะถูกย่อยสลายโดยอาศัยปฏิกิริยาแอมโมนิฟิเคชั่น (Ammonification) ให้เปลี่ยนรูปเป็นแอมโมเนียไนโตรเจน และแอมโมเนียไนโตรเจนที่เกิดขึ้นนี้จะถูกกำจัดออกโดยกลไกทาง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ชีววิทยา 2 ทางคือ กลไกแรก แอสสิมิเลชั่น (Assimilation) หมายถึง การที่แบคทีเรียใช้แอมโมเนียไนโตรเจน (NH_3-N) ในการสร้างเซลล์ กลไกที่สอง คือ ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่น (Nitrification) และปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชั่น (Denitrification) ซึ่งการเปลี่ยนรูปของสารประกอบไนโตรเจนโดยอาศัยขบวนการทางชีวภาพแสดงดังรูปที่ 2.1

ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่น

ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่น หมายถึง การเปลี่ยนแอมโมเนีย (NH_3) ไปเป็นไนเตรท (NO_3) โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ซึ่งจะเกิดขึ้นโดยอาศัยแบคทีเรียพวกไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (Nitifying Bacteria) ซึ่งมีอยู่ 2 ตระกูลใหญ่ ๆ คือ ไนโตรโซโมแนส (Nitrosomonas Species) และไนโตรแบคเตอร์ (Nitrobacter Species) แบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้จัดอยู่ในประเภทออโตโทรฟิคแบคทีเรีย (Autotrophic Bacteria) คือแบคทีเรียที่ได้พลังงานในการเจริญเติบโตจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) ของสารอนินทรีย์ไนโตรเจน และใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ในการสร้างเซลล์แบคทีเรีย

ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่นสามารถแบ่งออกได้ 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกนั้นเป็นการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ (NO_2) ไปเป็นไนเตรท (NO_3) โดย *Nitrobacter* ซึ่งจะเห็นว่าในการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่นระบบต้องอยู่ภายใต้สภาวะแอโรบิค (Aerobic Condition) คือ มีการเติมอากาศในระบบ

1. ปริมาณสัมพันธ์ (Stoichiometric) ของปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่น

ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่นสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ขั้นตอน คือ

1.1 การออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์โดยอาศัยแบคทีเรียกลุ่ม *Nitrosomonas* ซึ่งแอมโมเนียในน้ำเสียส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปแอมโมเนียอิออน (NH_4^+) สมการออกซิเดชั่นเป็นดังนี้

$$NH_4^+ + 3/2O_2 \longrightarrow NO_2^- + 2H^+ + H_2O \quad \text{--------} (1)$$

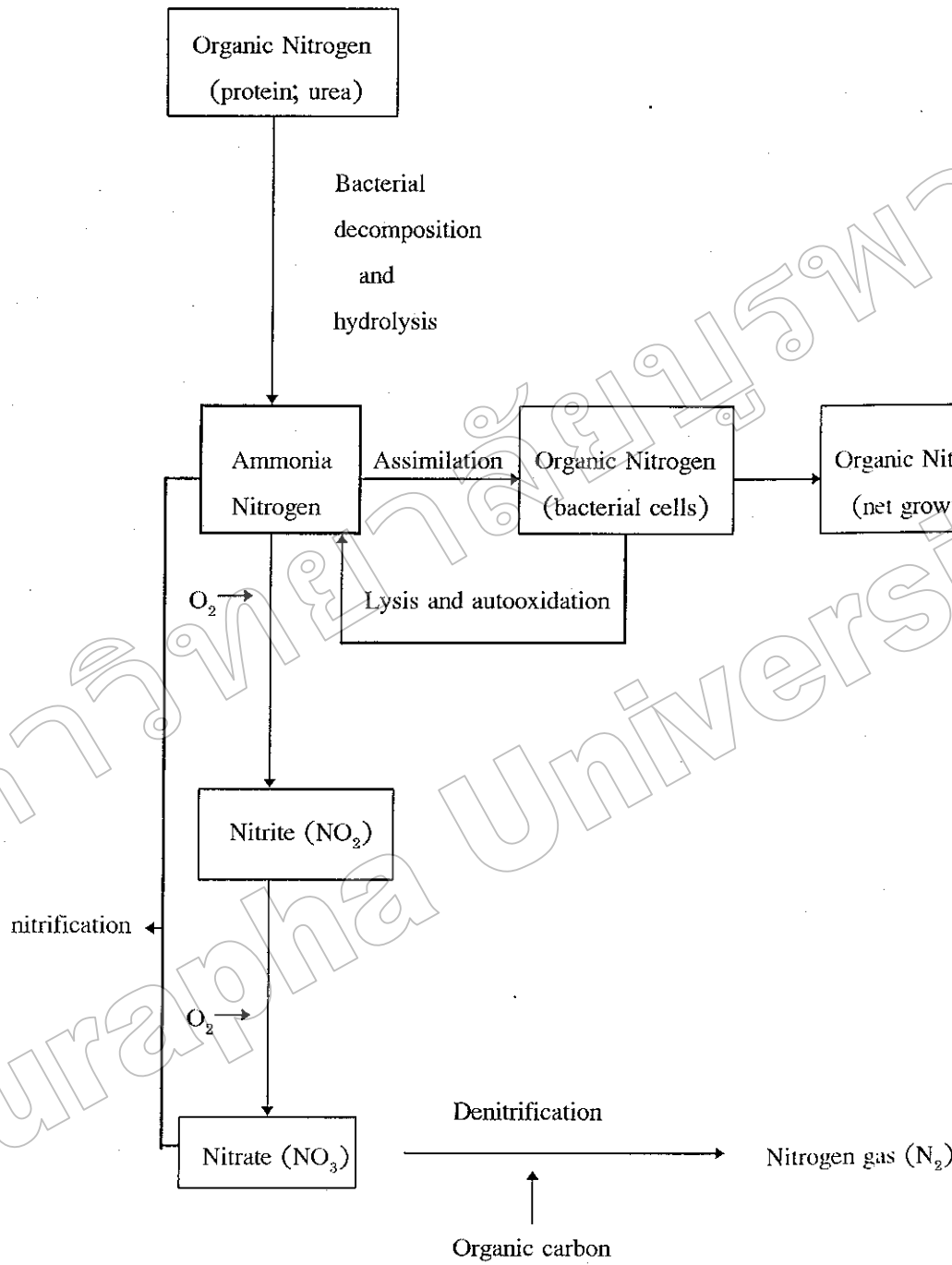
1.2 การออกซิไดซ์ไนไตรท์ไปเป็นไนเตรท โดยอาศัยแบคทีเรียกลุ่ม *Nitrobacter* สมการออกซิเดชั่นเป็นดังนี้

$$NO_2^- + 1/2O_2 \longrightarrow NO_3^- \quad \text{--------} (2)$$

รวมสมการที่ 1 และ 2 เข้าด้วยกันซึ่งจะเป็นสมการออกซิเดชั่นรวมดังนี้

$$NH_4^+ + 2O_2 \longrightarrow NO_2^- + 2H^+ + H_2O \quad \text{--------} (3)$$

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 2.1 การเปลี่ยนรูปของสารประกอบไนโตรเจนโดยกระบวนการบำบัดทางชีวภาพ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากสมการที่ 3 จะได้พลังงานออกมาจำนวนหนึ่งที่เซลล์จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโต และแอมโมเนียอิออน (NH_4^+) บางส่วนจะถูกนำไปใช้ในการสร้างเซลล์ เมื่อเซลล์ของแบคทีเรียมีสูตรเอมพิกัล (emprical) เป็น $C_5H_7O_2N$ สมการการสร้างเซลล์เขียนได้ดังนี้

$$4CO_2 + HCO_3^- + NH_4^+ + H_2O \longrightarrow C_5H_7O_2N + 50_2 \text{ ------ (4)}$$

รวมสมการที่ 3 และที่ 4 ได้เป็นสมการการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่นที่สมบูรณ์ ดังนี้

$$NH_4^+ + 1.830_2 + 1.98HCO_3^- \longrightarrow 0.021C_5H_7O_2N + 0.98NO_3^- + 1.041H_2O + 1.88H_2CO_3 \text{ ---------- (5)}$$

จากสมการที่ 5 จะเห็นว่าในออกซิไดซ์แอมโมเนียอิออน (NH_4^+) ไปเป็นไนเตรท (NO_3^-) จะต้องใช้ออกซิเจน (O_2) ทั้งหมด 4.3 มิลลิกรัมต่อแอมโมเนียอิออน 1 มิลลิกรัม

2. ประเภทของปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่น (Classical of Nitrification)

2.1 ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่นระบบรวม (Combine Carbon Oxidation - Nitrification) ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่นแบบนี้เป็นการรวมขั้นตอนการเกิดคาร์บอนออกซิเดชั่นและไนตริฟิเคชั่นไว้ด้วยกัน ซึ่งถือว่าเป็นแบบขั้นตอนเดียว (Single Stage) และโดยทั่วไปแล้วกระบวนการไนตริฟิเคชั่นแบบนี้จะมีปริมาณไนตริฟายเออร์ (Nitrifier) น้อยเนื่องจากอัตราส่วนของ Biochemical Oxygen Demand (BOD_5)/Total Kjeldahl Nitrogen (TKN) ของน้ำเข้ามีค่าสูง คือ BOD_5/TKN มีค่ามากกว่า 5

2.2 ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่นระบบแยก (Separate stage Nitrification) เป็นระบบที่ขั้นตอนการเกิดคาร์บอนออกซิเดชั่น และไนตริฟิเคชั่นออกจากกัน เป็นระบบที่มีค่า BOD_5/TKN ต่ำคือมีค่า BOD_5/TKN น้อยกว่า 3 ผลก็คือจะมีปริมาณไนตริฟายเออร์ (Nitrifier) ในสัดส่วนที่มากทำให้การเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่นมีอัตราสูง

3. ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่น

3.1 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (Dissloved Oxygen, DO) ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (*Nitrosomonas* และ *Nitrobacter*) ในปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่นปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำที่เหมาะสมอย่างน้อยต้องมีปริมาณเท่ากับ 2 มิลลิกรัม/ลิตร

3.2 อุณหภูมิ (Temperature) อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่น ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 28-36 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.3 อัตราส่วนของ BOD_5/TKN มีผลต่อสัดส่วนของไนตริฟายอิงแบคทีเรีย ซึ่งความสัมพันธ์แสดงดังตารางที่ 2.2

สำหรับระบบไนตริฟิเคชั่นที่รวมขั้นตอนคาร์บอนออกซิเดชั่น และไนตริฟิเคชั่น ค่าอัตราส่วน BOD_5/TKN มากกว่า 5 ทำให้ค่าสัดส่วนของไนตริฟายอิงแบคทีเรียต่ำกว่า 0.054 ส่วนไนตริฟิเคชั่นแบบระบบแยก BOD_5/TKN น้อยกว่า 3 สัดส่วนของไนตริฟายอิงแบคทีเรียจึงมีค่าสูงกว่า 0.083

ตารางที่ 2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนของ nitrifying organisms และอัตราส่วนของ BOD_5 / TKN

BOD_5/TKN	Nitrifier Fraction
0.5	0.35
1	0.21
2	0.12
3	0.083
4	0.064
5	0.054
6	0.043
7	0.037
8	0.033
9	0.029

4. พีเอช ระดับพีเอชที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่นจะอยู่ในสภาวะความเป็นด่างเล็กน้อย พีเอชที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 7.5-8.5 สำหรับการเจริญเติบโตของ *Nitrosomonas* และ *Nitrobacter*

5. ความเข้มข้นของแอมโมเนียและไนไตรท์ ซึ่ง Sharma และ Ahlert ได้รายงานผลการศึกษาของ Painter (1970) ไว้ว่า *Nitrosomonas* และ *Nitrobacter* จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้ถ้าความเข้มข้นของแอมโมเนียและไนไตรท์สูงเกินไป

6. อายุตะกอน (Sludge Age) และภาระการรับสารอินทรีย์ (Organic Lcading) ซึ่ง Prakasam และ Loehr พบว่าการเพิ่มของภาระบรรทุกสารอินทรีย์ จะเป็นผลให้ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่นเกิดเพิ่มขึ้น อีกทั้ง Sharma และ Ahlert ได้รายงานผลการศึกษาของ Poduska (1973) : Poduska และคณะ (1974) ว่าปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่นจะเกิดในอัตราที่สูงเมื่ออายุตะกอนประมาณ 3-4 วัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชั่น

ปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชั่น หมายถึง กระบวนการที่ไนเตรท (NO_3^-) เปลี่ยนไปเป็นก๊าซไนโตรเจน (N_2) ซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรก ไนเตรท เปลี่ยนไปเป็นไนไตรท์ ส่วนขั้นตอนที่สอง ไนไตรท์เปลี่ยนไปเป็นก๊าซไนโตรเจน และในการเปลี่ยนรูปของไนเตรทมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องด้วยกัน 2 ชนิด คือ

1. แอสสิมิลาทอรี (Assimilatory) จะทำการเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นแอมโมเนีย เพื่อใช้ในการสร้างเซลล์ใหม่ของแบคทีเรีย และเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเฉพาะในเวลาที่มีไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวเท่านั้น

2. ดิสสิมิลาทอรี (Dissimilatory) เป็นการเปลี่ยนรูปไนเตรทไปเป็นก๊าซไนโตรเจนซึ่งเอนไซม์นี้รับผิดชอบการเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชั่น

ปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชั่น เกิดเนื่องจากแบคทีเรียประเภทแฟคคัลเททีฟเฮเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย (Facultative heterotrophic bacteria) เช่นพวก *Pseudomonas, Micrococcus, Achromobacter* และ *Bacillus* ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะใช้ออกซิเจนในสารประกอบไนเตรท และไนไตรท์ ในการหายใจภายใต้สภาวะแอนนอกซิค (Anoxic Condition) คือ สภาวะไม่มีออกซิเจน แต่มีไนเตรทอยู่ และจะเห็นว่าในปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชั่น ไนเตรท และไนไตรท์จะเป็นตัวรับออกซิเจน (Electron acceptor) ตัวสุดท้ายแทนออกซิเจน และในปฏิกิริยานี้จะต้องมีแหล่งอินทรีย์คาร์บอน (Organic Carbon Source) พอเพียงเพื่อเป็นแหล่งพลังงานในการเปลี่ยนไนเตรท ไปเป็นก๊าซไนโตรเจน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแหล่งอินทรีย์คาร์บอนจะเป็นตัวให้อิเลคตรอน (Electron donor) ให้แก่ปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชั่น

และแหล่งอินทรีย์คาร์บอนที่ให้อิเลคตรอนแก่ระบบจำแนกได้ดังนี้

- จากแหล่งภายใน (Internal Source) ซึ่งได้แก่ จากน้ำเสียที่เข้าระบบ และจากเซลล์ของแบคทีเรียที่ตาย (ตะกอนแบคทีเรีย) การใช้อินทรีย์คาร์บอนจากแหล่งภายในเป็นตัวให้อิเลคตรอนแก่ระบบ จะเป็นระบบที่รวมขั้นตอนการเกิดคาร์บอนออกซิเดชั่น และไนตริฟิเคชั่นดีไนตริฟิเคชั่น ไว้ด้วยกัน

- จากแหล่งภายนอก (External Source) ซึ่งได้แก่ สารเคมีที่เติมให้กับระบบ เช่น เมธานอล (CH_3OH) จะใช้ในระบบที่แยกขั้นตอนการเกิดคาร์บอนออกซิเดชั่น, ไนตริฟิเคชั่น-ดีไนตริฟิเคชั่น

ตัวอย่างสมการ ปริมาณสัมพันธ์ (Stoichiometric) ในปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชั่น สำหรับระบบที่แยกขั้นตอนการเกิดคาร์บอนออกซิเดชั่น และไนตริฟิเคชั่น-ดีไนตริฟิเคชั่น ที่ใช้เมธานอลเป็นตัวให้อิเลคตรอนแก่ระบบ

ขั้นตอนที่ 1 $6NO_3^- + 2CH_3OH \longrightarrow 6NO_2^- + 2CO_2 + 4H_2O$ -------- (6)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ขั้นตอนที่ 2 $6NO_2^- + 3CH_3OH \longrightarrow 3N_2 + 3CO_2 + 3H_2O + 6OH^-$ --- (7)

รวมสมการที่ 6 และที่ 7 ได้ดังนี้

$$6NO_3^- + 5CH_3OH \longrightarrow 5CO_2 + 3N_2 + 7H_2O + 6OH^- \text{ ----- (8)}$$

ดังที่กล่าวแล้วระบบต้องมีการสร้างเซลล์จึงต้องใช้เมธานอล ประมาณร้อยละ 25-30 ในการสร้างเซลล์ และสมการการสร้างเซลล์เป็นดังนี้

$$3NO_3^- + 14CH_3OH + CO_2 + 3H^+ \longrightarrow 3C_5H_7O_2N + H_2O \text{ ------ (9)}$$

รวมสมการที่ 8 และสมการที่ 9 ได้สมการดีไนตริฟิเคชั่นที่สมบูรณ์ คือ

$$NO_3^- + 1.08CH_3OH + H^+ \longrightarrow 0.65C_5H_7O_2N + 0.47N_2 + 0.76CO_2 + 2.44H_2O \text{ -- (10)}$$

ชนิดของแหล่งคาร์บอน มีความสำคัญต่อระบบดีไนตริฟิเคชั่น โดยที่อัตราเร็วของปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชั่นขึ้นอยู่กับความยากง่ายในการย่อยสลายสารอินทรีย์คาร์บอน แหล่งอินทรีย์คาร์บอนที่ย่อยสลายง่ายจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชั่นเร็วขึ้นด้วย

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (รวมทั้งมีคาร์บอนไม่จำกัด) อัตราเร็วของดีไนตริฟิเคชั่นจะมีค่าคงที่สูงสุด แต่ถ้ามีการจำกัดแหล่งคาร์บอนจากภายนอก หรือน้ำเสียมีคาร์บอนให้ไม่เพียงพอ แบคทีเรียจะใช้คาร์บอนจากตัวเซลล์ของแบคทีเรียเอง (โดยใช้ขบวนการที่เรียกว่า Endogeneous Respiration) เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชั่น อัตราเร็วของดีไนตริฟิเคชั่นจะมีค่าต่ำ

1. ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชั่น

1.1 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (Dissloved Oxygen, DO) ควรมีค่าเท่ากับศูนย์ หรือใกล้เคียงกับศูนย์มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแบคทีเรียในการเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชั่น จะใช้ไนเตรทแทนออกซิเจน

1.2 พีเอช (pH) ระดับพีเอชที่เหมาะสมในปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชั่นจะมีค่าพีเอชที่เป็นกลาง หรืออยู่ในสภาพเป็นด่างเล็กน้อย แต่ชนิดของแบคทีเรียในปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชั่นมีหลายชนิด ดังนั้น ระดับพีเอชจะเกิดในช่วงที่กว้างคือ 49.5

1.3 อุณหภูมิ (Temperature) ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่นจะเกิดได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 0-50 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด คือ 40 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Hunik, J.H. และคณะ (1992) ได้รายงานว่าขบวนการ Nitrification ของแอมโมเนีย ในน้ำทิ้งต่าง ๆ จะมี *Nitrosomonas europaea* เป็นชนิดเด่น และได้ทดลองเลี้ยง *N. europaea* โดยใช้สารอาหารคือ NH_4^+ ผลผลิตที่ได้คือ NO_2^-, K^+, Na^+, SO_4^{2-}, NO_3^-, Cl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จนถึง 500 โมลต่อลูกบาศก์เมตร ค่าพีเอชของน้ำเลี้ยงอยู่ในช่วง 6.5-8.5 พบว่าที่ความเข้มข้นสูง ๆ ของอิออนต่าง ๆ จะยับยั้งการเจริญ โดยมีการยับยั้งการเจริญสูงสุดที่พีเอช 6.5 และการยับยั้งปฏิกิริยาเปลี่ยนรูปของแอมโมเนียโดยผลผลิตของปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับค่าพีเอช

Szweinski, H. และคณะ (1986) ได้รายงานว่าขบวนการ Nitrification เป็นขบวนการการสร้างกรด ตามทฤษฎีการต้านการแพร่กระจายต่อการเคลื่อนที่ (diffusional resistance to the transport) ใน biofilm ของสารอินออกานิคคาร์บอนต่าง ๆ ดังผลที่ได้แสดงโดยผลผลิตที่เป็นกรดของ nitrifying biofilm ได้ทำให้พีเอชด้านในของ biofilm ลดลง ซึ่งได้มีการทดสอบต่อการพัฒนา biofilm ต่าง ๆ บนพื้นผิวต่าง ๆ ของ rotating drum ในห้องทดลองแล้ว ปรากฏการณ์นี้สามารถที่จะเพิ่มผลที่ไม่คาดหวังต่าง ๆ ของ nitrifying biofilm ได้ เมื่อแบคทีเรียส่วนใหญ่ทำงานภายใต้พีเอชต่ำกว่าพีเอชในมวลน้ำ

Suzuki, I. และคณะ (1974) ได้รายงานผลของพีเอชต่อค่า K_m ของแอมโมเนียซึ่งได้ศึกษาการ oxidation โดย *Nitrosomonas* และสารสกัดจากเซลล์ของ *Nitrosomonas* เอง พบว่าค่า K_m ลดลงขณะที่พีเอชเพิ่มขึ้น และพบว่า NH_3 จะไวต่อการ oxidation ได้ดีกว่า NH_4^+

St-Arnaud, S. และคณะ (1991) ได้ทดลองเลี้ยง *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 ที่ปรับสภาพแล้วในของเสียจากหมู พบว่าจำนวนเซลล์ที่ใส่ลงไปในของเสียจากหมูได้ลดลงอย่างรวดเร็วทั้งภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic condition) โดยการ oxidation ของสารอินทรีย์ในของเสีย และภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน (anaerobic condition) ซึ่งพบได้ในแหล่งที่เก็บของเสีย การ oxidation ของแอมโมเนียจะช้าลงเมื่อใส่ *N.europaea* ที่ปรับสภาพแล้วลงไปในของเสียที่ปล่อยทิ้งไว้จนไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (stabilized) บางส่วน เมื่อเทียบกับของเสียที่ปล่อยทิ้งไว้จนไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยสมบูรณ์ biofilm ของ *N.europaea* 107 MPN/cm^2 จะเกิดขึ้นใน 114 วัน หลังการบ่มที่ 29 องศาเซลเซียส บน polyvinyl chloride disc ซึ่งคลุมด้วย geotextile ใน rotating biological contractor โดยใช้ inorganic medium biofilm นี้ได้ถูกพัฒนาให้ใช้กับของเสียจากหมูที่ปล่อยทิ้งไว้จนไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงแล้ว พบว่าการลดลงของแอมโมเนียจะเป็น 270 มิลลิกรัม/ลิตร/วัน

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินงาน

<u>การตรวจหาแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อขบวนการย่อยสลาย</u>

1. เก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจากตู้เลี้ยงสัตว์น้ำเค็มและระบบถังกรองของตู้เลี้ยงด้วยขวดแก้วปากกว้างที่ปราศจากเชื้อ

2. นำมาหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง สูตรที่ 1 (แสดงในภาคผนวก)

3. ตรวจนับปริมาณเชื้อที่เจริญได้บนอาหารแข็ง

4. คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เข็มเขี่ยบนอาหารแข็งชนิดเดิม

5. ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ลงเลี้ยงบนอาหาร Thiosulphate citrate bild salt sucrose (TCBS) agar และ Eosin methylene blue (EMB) agar เพื่อคัดแยกเชื้อสกุล *Vibrio* ที่อาจก่อให้เกิดโรคต่อสัตว์น้ำ และแบคทีเรียในสกุล *Escherichia* โดยเฉพาะ *E. coli* ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของอุจจาระของสัตว์เลือดอุ่นออกไป

6. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เหลือไปศึกษาคุณลักษณะบางประการเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

7. เก็บเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อแบคทีเรียไว้ทำการศึกษาเพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมที่จะใช้ในระบบกรองและตู้เลี้ยงเพื่อความรวดเร็วในการพร้อมทำงานของระบบต่อไป

<u>การตรวจหาและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ได้</u>

1. เก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจากตู้เลี้ยงสัตว์น้ำเค็มและระบบถังกรองของตู้เลี้ยงด้วยขวดแก้วปากกว้างที่ปราศจากเชื้อ

2. นำมาหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง สูตรที่ 2 (แสดงในภาคผนวก)

3. นำเชื้อที่เจริญได้บนอาหารแข็งมาทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เข็มเขี่ยบนอาหารแข็งสูตรเดิม

4. ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกับอาหารแข็ง

5. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถเจริญเติบโตได้ดี สามารถสังเกตเห็นความขุ่นของน้ำเลี้ยงได้ในระยะเวลาที่สั้นที่สุด และมีความสามารถในการเปลี่ยนรูปแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ได้ดีโดยดูจากสีของตัวบ่งชี้ (indicator) ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แดงเป็นสีเหลืองเมื่อมีไนไตรท์สะสมมากขึ้นในน้ำเลี้ยง (ตัวอย่างลักษณะการเปลี่ยนสีของตัวบ่งชี้แสดงในรูปผนวกที่ 2)

6. นำเชื้อที่ได้จากการคัดเลือกไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิม ซ้ำกันหลายรอบเพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีความคงตัวดีที่สุด โดยดูจากระยะเวลาการเจริญและความสามารถในการเปลี่ยนรูปแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์

7. เก็บเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติตามข้อ 5 และ 6 ไว้ทำการศึกษาเพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมที่จะใช้ในระบบกรองและตู้เลี้ยงเพื่อความรวดเร็วในการพร้อมทำงานของระบบต่อไป

<u>การตรวจหาและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนไนไตรท์ไปเป็นไนเตรทได้</u>

1. เก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจากตู้เลี้ยงสัตว์น้ำเค็มและระบบถังกรองของตู้เลี้ยงด้วยขวดแก้วปากกว้างที่ปราศจากเชื้อ

2. นำมาหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนไนไตรท์ไปเป็นไนเตรทได้ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง สูตรที่ 3 (แสดงในภาคผนวก)

3. นำเชื้อที่เจริญได้บนอาหารแข็งมาทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เข็มเขี่ยบนอาหารแข็งสูตรเดิม

4. ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกับอาหารแข็ง

5. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถเจริญเติบโตได้ดี สามารถสังเกตเห็นความขุ่นของน้ำเลี้ยงได้ในระยะเวลาที่สั้นที่สุด และมีความสามารถในการเปลี่ยนรูปไนไตรท์ไปเป็น ไนเตรทได้ดีโดยดูจากสีของตัวบ่งชี้ (indicator) ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อจะยังคงเป็นสีเหลืองเหมือนเดิม และพบการสะสมไนเตรทเพิ่มขึ้นในน้ำเลี้ยง

6. นำเชื้อที่ได้จากการคัดเลือกไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิม ซ้ำกันหลายรอบเพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีความคงตัวดีที่สุด โดยดูจากระยะเวลาการเจริญ

7. เก็บเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติตามข้อ 5 และ 6 ไว้ทำการศึกษาเพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมที่จะใช้ในระบบกรองและตู้เลี้ยงเพื่อความรวดเร็วในการพร้อมทำงานของระบบต่อไป

<u>การตรวจหาและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนไนไตรท์หรือไนเตรทไปเป็นก๊าซไนโตรเจนได้</u>

1. เก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจากตู้เลี้ยงสัตว์น้ำเค็มและระบบถังกรองของตู้เลี้ยงด้วยขวดแก้วปากกว้างที่ปราศจากเชื้อ

2. นำมาหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนไนไตรท์ หรือไนเตรทไปเป็นก๊าซไนโตรเจนได้ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง สูตรที่ 4 (แสดงในภาคผนวก)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. นำเชื้อที่เจริญได้บนอาหารแข็งมาทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เข็มเขี่ยบนอาหารแข็งสูตรเดิม

4. ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกับอาหารแข็ง

5. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถเจริญเติบโตได้ดี สามารถสังเกตเห็นความขุ่นของน้ำเลี้ยงได้ในระยะเวลาที่สั้นที่สุด และมีความสามารถในการเปลี่ยนรูปไนไตรท์หรือไนเตรทไปเป็นแก๊สไนโตรเจนได้ดีโดยดูจากสีของตัวบ่งชี้ (indicator) ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดง และไม่พบการสะสมของแอมโมเนียในน้ำเลี้ยง

6. นำเชื้อที่ได้จากการคัดเลือกไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิม ซ้ำกันหลายรอบเพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีความคงตัวดีที่สุด โดยดูจากระยะเวลาการเจริญ

7. เก็บเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติตามข้อ 5 และ 6 ไว้ทำการศึกษาเพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมที่จะใช้ในระบบกรองและตู้เลี้ยงเพื่อความรวดเร็วในการพร้อมทำงานของระบบต่อไป

<u>หมายเหตุ</u> ในการทดสอบแต่ละขั้นตอนยืนยันผลด้วยการตรวจหาปริมาณไนเตรท, ไนไตรท์ และแอมโมเนีย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 4
ผลการศึกษา

จากการศึกษาตัวอย่างน้ำและดินตะกอนจากระบบกรองน้ำของตู้เลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม เมื่อนำมาตรวจหาปริมาณแบคทีเรียรวมบนอาหารแข็ง สูตรที่ 1 พบว่าน้ำตัวอย่างมีปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ในช่วง 7.2×10^4 ถึง 2.6×10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และดินตะกอนตัวอย่างมีปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ในช่วง 5.7×10^4 ถึง 1.7×10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

เมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อขบวนการย่อยสลายที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันบนอาหารแข็ง สูตรที่ 1 สามารถคัดเลือกได้ทั้งหมด 29 โคโลนี เมื่อถ่ายแบคทีเรียทั้ง 29 โคโลนี ลงบนอาหารแข็งชนิดเดียวกัน เพื่อทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 1 พบว่ามีแบคทีเรียเจริญเพียง 24 โคโลนี และเมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ซ้ำในครั้งที่ 2 บนอาหารแข็งชนิดเดียวกัน มีแบคทีเรียเจริญเพียง 21 โคโลนี และเมื่อถ่ายแบคทีเรียทั้ง 21 โคโลนี ลงเลี้ยงในอาหาร TCBS agar พบว่ามีแบคทีเรียเจริญได้ดีและให้โคโลนีสีเขียวเข้มและสีเหลืองทั้งสิ้น 7 โคโลนี รวมเหลือแบคทีเรียอีก 14 โคโลนีที่ไม่เจริญบนอาหาร TCBS agar ถ่ายแบคทีเรียทั้ง 14 โคโลนี ลงเลี้ยงในอาหาร EMB agar พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 2 โคโลนี มีลักษณะโคโลนีเป็นโลหะมันวาวสีเขียวเข้ม ซึ่งเป็นลักษณะโคโลนีของ *E.coli* เมื่อผ่านขั้นตอนการคัดเลือกข้างต้นแล้วเหลือแบคทีเรียทั้งสิ้น 12 โคโลนีจากแบคทีเรียเริ่มต้น 29 โคโลนี มีลักษณะของโคโลนีแตกต่างกัน ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกไว้ สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยพบว่าจัดอยู่ในสกุลต่างๆ คือ *Micrococcus* (D_2, D_7, D_8), *Achromobacter* (D_{13}), *Pseudomonas* (D_1, D_6, D_{26}), *Salmonella* (D_9), *Aeromonas* (D_4) และ *Bacillus* (D_{15}, D_{20}, D_{21})

จากการศึกษาตัวอย่างน้ำและดินตะกอนจากระบบกรองน้ำของตู้เลี้ยงสัตว์ทะเล เมื่อนำมาตรวจหาปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์บนอาหารแข็ง สูตรที่ 2 พบว่าน้ำตัวอย่างมีปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ในช่วง 1.3×10^2 ถึง 1.7×10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และดินตะกอนตัวอย่างมีปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ในช่วง 1.24×10^4 ถึง 7.6×10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

เมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ได้ที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันบนอาหารแข็ง สูตรที่ 2 พบว่าแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งสูตรที่ 2 มีลักษณะ ขนาดและสีโคโลนีใกล้เคียงกันมากคือโคโลนีกลม ขนาดเล็ก สีขาวขุ่น ทำให้ยากต่อการคัดเลือก ทั้งนี้ได้ทำการซุ่มคัดเลือกแบคทีเรียไว้ทั้งหมด 120 โคโลนี เมื่อถ่ายแบคทีเรียทั้ง 120 โคโลนี ลงบนอาหารแข็งชนิดเดียวกัน เพื่อทำให้บริสุทธิ์ พบการเจริญของแบคทีเรียนับจาก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4.1 การแยก และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อขบวนการย่อยสลายจากน้ำเลี้ยงและดินตะกอนจากระบบกรองน้ำเค็มของตู้เลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม

รหัส	ลักษณะของโคโลนีที่เจริญ
D_1	โคโลนีขุ่น ขอบเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร
D_2	โคโลนีใส ขอบหยัก เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร
D_4	โคโลนีใส ขอบหยัก เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร
D_6	โคโลนีครีมปนเทา ขอบหยัก เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร
D_7	โคโลนีใสออกสีดำจางๆในเนื้อโคโลนี ขอบเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 มิลลิเมตร
D_8	โคโลนีขุ่น ขอบเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร
D_9	โคโลนีขุ่น ขอบเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร
D_{13}	โคโลนีใส ขอบเรียบ โค้งนูน เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร
D_{15}	โคโลนีใส แผ่ออกบนผิววุ้น
D_{20}	โคโลนีครีมปนเทา ขอบเรียบ โค้งนูน เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร
D_{21}	โคโลนีใส ขอบหยัก เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร
D_{25}	โคโลนีทึบออกดำ ขอบเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เริ่มทำการเพาะเลี้ยงภายใน 30 วัน จำนวน 74 โคโลนี เมื่อถ่ายเชื้อทั้ง 74 โคโลนีลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกับอาหารแข็ง เริ่มพบการเจริญของแบคทีเรียในช่วง 17 ถึง 28 วัน และมีการสะสมของไนไตรท์เพิ่มขึ้นในน้ำเลี้ยงที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

เมื่อทำการเลี้ยงซ้ำแบคทีเรียทั้ง 74 โคโลนี ในอาหารเหลวสูตรเดิม จะมีการเจริญของแบคทีเรียใน 2 ลักษณะคือ กลุ่มที่ 1 พบการเจริญและการสะสมไนไตรท์ในน้ำเลี้ยงเร็วขึ้นกว่าเดิม และกลุ่มที่ 2 พบการเจริญและการสะสมไนไตรท์ในน้ำเลี้ยงช้าลง หรือบางตัวอย่างพบการเจริญในน้ำเลี้ยงน้อยมากและไม่พบการสะสมไนไตรท์ (ปริมาณแอมโมเนียเริ่มต้นคงที่) ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่เจริญในน้ำเลี้ยงได้ดี คือ 14 วัน จากเริ่มต้นการเลี้ยง และมีอัตราการเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ได้เร็ว เพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกไว้ สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยพบว่าจัดอยู่ในสกุลต่าง ๆ คือ *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* และ *Nitrosovibrio*

จากการศึกษาตัวอย่างน้ำและดินตะกอนจากระบบกรองน้ำของตู้เลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม เมื่อนำมาตรวจหาปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนไนไตรท์ไปเป็นไนเตรทบนอาหารแข็ง สูตรที่ 3 พบว่าน้ำตัวอย่างมีปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ในช่วง 21 ถึง 2.9×10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และดินตะกอนตัวอย่างมีปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ในช่วง 1.32×10^3 ถึง 1.17×10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

เมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนไนไตรท์ไปเป็นไนเตรทได้ที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันบนอาหารแข็ง สูตรที่ 3 พบว่าแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งสูตรที่ 3 ให้ผลทำนองเดียวกับการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์คือมีลักษณะ ขนาดและสีโคโลนีใกล้เคียงกันมากคือโคโลนีกลม ขนาดเล็ก สีขาวขุ่น ทำให้ยากต่อการคัดเลือก ทั้งนี้ได้ทำการชุ่มคัดเลือกแบคทีเรียไว้ทั้งหมด 120 โคโลนี เมื่อถ่ายแบคทีเรียทั้ง 120 โคโลนี ลงบนอาหารแข็งชนิดเดียวกัน เพื่อทำให้บริสุทธิ์ พบการเจริญของแบคทีเรียนับจากเริ่มทำการเพาะเลี้ยงภายใน 60 วัน จำนวน 8 โคโลนี เมื่อถ่ายเชื้อทั้ง 8 โคโลนีลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกับอาหารแข็ง เริ่มพบการเจริญของแบคทีเรียในช่วง 42 ถึง 63 วัน และมีการสะสมของไนเตรทเพิ่มขึ้นในน้ำเลี้ยงที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

เมื่อทำการเลี้ยงซ้ำแบคทีเรียทั้ง 8 โคโลนี ในอาหารเหลวสูตรเดิม พบการเจริญและการสะสมไนเตรทในน้ำเลี้ยงช้าลงในช่วง 57 ถึง 82 วัน ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่เจริญในน้ำเลี้ยงได้ดี คือ 57 วัน จากเริ่มต้นการเลี้ยง และมีอัตราการเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ได้เร็วที่สุด เพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกไว้ สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยพบว่าจัดอยู่ในสกุลของ *Nitrococcus*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากการศึกษาตัวอย่างน้ำและดินตะกอนจากระบบกรองน้ำของตู้เลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม เมื่อนำมาตรวจหาปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนไนเตรทไปเป็นไนไตรท์และไนโตรเจนบนอาหารแข็ง สูตรที่ 4 พบว่าแม้ทิ้งไว้นานมากจนอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งก็ยังไม่สามารถเห็นการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวได้ ได้ทำการปรับเปลี่ยนวิธีการทดสอบโดยนำตัวอย่างดินและน้ำไปทำการเลี้ยงในอาหารเหลวก่อนเป็นเวลา 60 วัน เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อแล้วจึงนำน้ำเลี้ยงมาเกลี่ยบนอาหารแข็งอีกครั้ง แต่ยังไม่สามารถสังเกตการเจริญของแบคทีเรียได้ ทั้งนี้ในส่วนของอาหารเหลวก็ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียด้วย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษา

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

เมื่อนำตัวอย่างน้ำและดินตะกอนจากระบบกรองน้ำของตู้เลี้ยงสัตว์น้ำเค็มมาตรวจหาปริมาณแบคทีเรียรวมบนอาหารแข็ง สูตรที่ 1 พบว่าน้ำตัวอย่างมีปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ในช่วง 7.2×10^4 ถึง 2.6×10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และดินตะกอนตัวอย่างมีปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ในช่วง 5.7×10^4 ถึง 1.7×10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อขบวนการย่อยสลายที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันบนอาหารแข็ง สูตรที่ 1 สามารถคัดเลือกได้ทั้งหมด 29 โคโลนี เมื่อถ่ายแบคทีเรียทั้ง 29 โคโลนี ลงบนอาหารแข็งชนิดเดียวกัน เพื่อทำให้บริสุทธิ์ มีแบคทีเรียเจริญเพียง 21 โคโลนี มีปริมาณลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ที่เจริญเริ่มแรก อาจเป็นเพราะมีจุลินทรีย์บางชนิดที่ไม่สามารถย่อยสลายสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในรูปของสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กที่เซลล์นำไปใช้ได้จริง แต่มีการสะสมสารอาหารในขณะเจริญอยู่ในน้ำและดินตะกอนก่อนหน้านี้แล้วจึงมีการนำสารอาหารที่สะสมอยู่มาใช้ในขณะทำการเพาะเลี้ยงครั้งแรก และมีการเจริญเป็นโคโลนีให้เห็นบนผิวอาหารแข็ง นอกจากนี้อาจมีสารบางอย่างในน้ำและดินตะกอนที่มีผลช่วยให้จุลินทรีย์เจริญ (growth factor) ซึ่งไม่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดเลือกจึงไม่สามารถเจริญได้ หรืออาจเป็นคุณสมบัติของจุลินทรีย์บางชนิดที่ต้องเจริญร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น เนื่องจากจำเป็นต้องใช้สารบางอย่างที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นสร้างขึ้น แต่เมื่อนำมาแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์ และไม่มีแหล่งของสารที่เคยได้รับจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นทำให้ไม่สามารถเจริญได้ ทั้งนี้อาจเป็นเหตุผลใดเหตุผลหนึ่ง หรือหลายเหตุผลข้างต้นร่วมกัน ทำให้ปริมาณของจุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงบนสารอาหารสูตร 1 ขณะถ่ายแยกให้บริสุทธิ์มีปริมาณลดลง และเมื่อถ่ายแบคทีเรียทั้ง 21 โคโลนี ลงเลี้ยงในอาหาร TCBS agar พบว่ามีแบคทีเรียเจริญได้ดีและให้โคโลนีสีเขียวเข้มและสีเหลืองทั้งสิ้น 7 โคโลนี ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในสกุล *Vibrio* ซึ่งอาจก่อให้เกิดโรคกับสัตว์น้ำที่เลี้ยงอยู่ เมื่ออยู่ในสภาวะที่อ่อนแอหรือมีความเข้มข้นของเชื้อสูง จึงไม่น่าที่จะนำมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป รวมเหลือแบคทีเรียอีก 14 โคโลนีที่ไม่เจริญบนอาหาร TCBS agar และเมื่อถ่ายแบคทีเรียทั้ง 14 โคโลนี ลงเลี้ยงในอาหาร EMB agar พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 2 โคโลนี มีลักษณะโคโลนีเป็นโลหะมันวาวสีเขียวเข้ม ซึ่งเป็นลักษณะโคโลนีของ *E.coli* ซึ่งบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนสิ่งขับถ่ายจากสัตว์เลือดอุ่น ซึ่งในสภาวะปกติไม่น่าจะมีอยู่ในธรรมชาติ หากนำมาใช้ในการบำบัดน้ำโดยการเติมเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวเข้าสู่ระบบอาจคงอยู่เพียงแค่ช่วงหนึ่งเท่านั้น และทำให้ไม่สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของน้ำเลี้ยงจากอุจจาระได้เพราะไม่ทราบได้ว่าเป็นเชื้อจากการปนเปื้อนหรือเชื้อที่เติมเข้าสู่ระบบ เมื่อผ่านขั้นตอนการคัดเลือกข้างต้นแล้วเหลือแบคทีเรียทั้งสิ้น 12 โคโลนีจากแบคทีเรียเริ่มต้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกไว้ สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยพบว่าจัดอยู่ในสกุลต่างๆ คือ *Micrococcus* (D_2, D_7, D_8), *Achromobacter* (D_{13}), *Pseudomonas* (D_1, D_6, D_{26}), *Salmonella* (D_9), *Aeromonas* (D_4) และ *Bacillus* (D_{15}, D_{20}, D_{21}) ซึ่งจากการตรวจเอกสารพบว่าแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* , *Salmonella* และ *Aeromonas* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคกับคนและสัตว์ จึงไม่น่าที่จะนำมาใช้ในการศึกษาต่างๆ กับระบบถังกรอง คงมีแต่แบคทีเรียในสกุล *Micrococcus* , *Achromobacter* , และ *Bacillus* รวมทั้งสิ้นเพียง 7 โคโลนี ที่คัดเลือกจากเชื้อเริ่มต้นเพื่อเก็บไว้ใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

จากการศึกษาตัวอย่างน้ำและดินตะกอนจากระบบกรองน้ำของตู้เลี้ยงสัตว์ทะเล เมื่อนำมาตรวจหาปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์บนอาหารแข็ง สูตรที่ 2 พบว่าน้ำตัวอย่างมีปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ในช่วง 1.3×10^2 ถึง 1.7×10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และดินตะกอนตัวอย่างมีปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ในช่วง 1.24×10^4 ถึง 7.6×10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ทำการสุ่มคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ได้ทั้งหมด 120 โคโลนี เมื่อถ่ายแบคทีเรียทั้ง 120 โคโลนี ลงบนอาหารแข็งชนิดเดียวกัน เพื่อทำให้บริสุทธิ์ พบการเจริญของแบคทีเรียนับจากเริ่มทำการเพาะเลี้ยงภายใน 30 วัน จำนวน 74 โคโลนี เมื่อถ่ายเชื้อทั้ง 74 โคโลนีลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกับอาหารแข็ง เริ่มพบการเจริญของแบคทีเรียในช่วง 17 ถึง 28 วัน และมีการสะสมของไนไตรท์เพิ่มขึ้นในน้ำเลี้ยงที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เมื่อทำการเลี้ยงซ้ำแบคทีเรียทั้ง 74 โคโลนี ในอาหารเหลวสูตรเดิม คัดเลือกแบคทีเรียที่เจริญในน้ำเลี้ยงได้ดี คือ 14 วัน จากเริ่มต้นการเลี้ยง และมีอัตราการเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ได้เร็ว

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกไว้ สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยพบว่าจัดอยู่ในสกุลต่างๆ คือ *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* และ *Nitrosovibrio* เก็บรักษาเชื้อไว้ในอาหารที่มีแอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อทดสอบใช้ในการบำบัดน้ำเลี้ยงสัตว์ในระบบของสถานเลี้ยงสัตว์น้ำเค็มต่อไป

589.3
ว592ก
126561

จากการศึกษาตัวอย่างน้ำและดินตะกอนจากระบบกรองน้ำของตู้เลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม เมื่อนำมาตรวจหาปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนไนไตรท์ไปเป็นไนเตรทบนอาหารแข็ง สูตรที่ 3 พบว่าน้ำตัวอย่างมีปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ในช่วง 21 ถึง 2.9×10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และดินตะกอนตัวอย่างมีปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ในช่วง 1.32×10^3 ถึง 1.17×10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ทำสุ่มคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนไนไตรท์ไปเป็นไนเตรทได้ ทั้งหมด 120 โคโลนี เมื่อถ่ายแบคทีเรียทั้ง 120 โคโลนี ลงบนอาหารแข็งชนิดเดียวกัน เพื่อทำให้บริสุทธิ์ พบการเจริญของแบคทีเรียนับจากเริ่มทำการเพาะเลี้ยงภายใน 60 วัน จำนวน 8 โคโลนี เมื่อถ่าย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เชื้อทั้ง 8 โคโลนีลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกับอาหารแข็ง เริ่มพบการเจริญของแบคทีเรียในช่วง 42 ถึง 63 วัน และมีการสะสมของไนเตรทเพิ่มขึ้นในน้ำเลี้ยงที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เมื่อทำการเลี้ยงซ้ำแบคทีเรียทั้ง 8 โคโลนี ในอาหารเหลวสูตรเดิม พบการเจริญและการสะสมไนเตรทในน้ำเลี้ยงช้าลงในช่วง 57 ถึง 82 วัน ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่เจริญในน้ำเลี้ยงได้ดี คือ 57 วัน จากเริ่มต้นการเลี้ยง และมีอัตราการเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ได้เร็วที่สุด

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกไว้ สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยพบว่าจัดอยู่ในสกุลของ *Nitrococcus* เก็บรักษาเชื้อไว้ในอาหารที่มีไนไตรท์เป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อทดสอบใช้ในการบำบัดน้ำเลี้ยงสัตว์ในระบบของสถานเลี้ยงสัตว์น้ำเค็มต่อไป

จากการศึกษาตัวอย่างน้ำและดินตะกอนจากระบบกรองน้ำของตู้เลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม เมื่อนำมาตรวจหาปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนไนเตรทไปเป็นไนไตรท์และไนโตรเจนบนอาหารแข็ง สูตรที่ 4 ไม่สามารถเห็นการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวได้ อาจเป็นเพราะสารอาหารที่ใช้ยังไม่เหมาะต่อเชื้อที่มีอยู่ในระบบกรองของสถานเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม หรืออาจมีเชื้อกลุ่มนี้ในระบบกรองน้อยมากจนไม่สามารถตรวจพบได้ ทั้งนี้เชื้อแบคทีเรียบางกลุ่มที่เจริญบนอาหารสูตร 1 มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนไนเตรทไปเป็นไนไตรท์และไนโตรเจนได้เช่นกัน แต่ที่เลือกใช้อาหารสูตรที่ 4 ในการคัดเลือกเนื่องจากต้องการคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติในการใช้สารอนินทรีย์ในการเจริญเติบโต (Chemolithotrophic bacteria) เนื่องจากลักษณะการเลี้ยงสัตว์น้ำส่วนใหญ่จะให้อาหารที่เป็นเนื้อเป็นส่วนใหญ่ทำให้มีปริมาณอินทรีย์คาร์บอนในน้ำเลี้ยงมีปริมาณต่ำ ซึ่งไม่เหมาะต่อการทำงานของเชื้อบางกลุ่มที่เจริญบนอาหารสูตร 1 (Heterotrophic bacteria) หากเติมแหล่งของอินทรีย์จากภายนอกเข้าสู่ระบบ อาจทำให้เชื้ออื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนไนเตรทไปเป็นไนโตรเจนเจริญเติบโตมากขึ้นด้วย เป็นการเพิ่มต้นทุนโดยเปล่าประโยชน์ นอกจากนี้อาจทำให้ระบบเสียสมดุลย์เนื่องจากเมื่อมีเชื้อมากขึ้นการใช้ออกซิเจนจะมากตามไปด้วย และหากเชื้อที่เจริญมากขึ้นนั้นเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคกับสัตว์น้ำแล้ว จะเป็นผลเสียต่อสัตว์น้ำที่ทำการเลี้ยงไว้โดยตรง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาของแบคทีเรียในกลุ่มต่าง ๆ ที่ทำการศึกษาใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตที่นานมากไม่เหมาะกับการทำการวิจัยในระยะเวลาอันสั้นซึ่งอาจได้ผลการทดลองที่ไม่ครอบคลุม หรือไม่ได้เชื้อแบคทีเรียที่เป็นตัวแทนของระบบจริง ๆ

2. ในการทำการวิจัยยังขาดตู้บ่มเชื้อในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน (Anaerobic / Environmental Chamber) ที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดอยู่จึงยังไม่สามารถบอกได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในขณะทำการวิจัยเป็นตัวแทนของระบบทั้งหมดได้ ซึ่งอุปกรณ์ดังกล่าวมีราคาสูงทั้งตัวอุปกรณ์เองและความสิ้นเปลืองในการสร้างระบบที่ปราศจากออกซิเจน หากนักวิจัยท่านใดหรือหน่วยงานใดมีความพร้อมในจุดนี้น่าที่จะศึกษาและให้ความสนใจในส่วนนี้ด้วย

3. การวิจัยในขั้นตอนแรกนี้ถึงจะได้ผลเป็นที่พอใจ แต่ยังขาดการนำไปใช้งานจริง ซึ่งต้องทำการทดสอบอีกหลายขั้นตอนก่อนที่จะนำไปใช้งานจริง เพื่อให้แน่ใจว่าไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อระบบ และมีผลกระทบต่อสภาวะแวดล้อมในภายหลังเพื่อการใช้ประโยชน์แบบยั่งยืน ซึ่งผู้วิจัยจะทำการวิจัยต่อไปจนกว่าจะได้ผลเป็นที่น่าพอใจจากการนำไปใช้ประโยชน์จริง ๆ

4. จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อการบำบัดน้ำเสีย ยังมีอีกหลายแหล่งที่น่าทำการศึกษา เช่น ดินตะกอนจากตัวอย่างบริเวณป่าชายเลน ดินเลนจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ตัวอย่างจากแหล่งกำจัดของเสียในระบบอุตสาหกรรมที่มีการสะสมของสารประกอบไนโตรเจนสูง ๆ เป็นต้น ซึ่งจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างดังกล่าวอาจมีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียที่ดี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บรรณานุกรม

บัญญัติ สุขศรีงาม, 2525, จุลชีววิทยาทั่วไป, พิมพ์ครั้งที่ 2, โอเดียนสโตร์, 358 หน้า.

สุรชัย ใหญ่สว่าง, 2530, การกำจัดไนโตรเจนในน้ำเสียด้วยระบบแอกทิเวตเต็ดสลัดจ์และแอเรตเต็ดลากูน, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมสุขาภิบาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, หน้า 2-5.

สุรพล สายพานิช, 2528, รวมบทความทางวิชาการ เล่ม 1, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, หน้า 39-44.

Austin, B, 1988, Marine Microbiology, Cambridge University Press, Cambridge, 222 p.

Balderdton, W.L., and Sieburth, J.M., 1976, Nitrate Removal in Closed-System Aquaclture by Columnar Denitrification, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 32, No. 6, pp. 808-818.

Barnes, D. and Bliss, P.J., 1983, Biological Control of Nitrogen in Wastewater London, University of Cambridge Press, pp. 5-11.

Drtil, M., Nemeth, P., Kucman, K., Bodik, I. and Kasperek, V, 1995, Acidobasic Balances in the Course of Heterotrophic Denitrification, Water Research, Vol. 29, No. 5, pp. 1353-1360.

Her, J. and Huang, J., 1995, Denitrifying Kinetics Involving the Distributed Ratio of Reductases, J. Chem. Tech. Biotechnol., Vol. 62, pp. 261-267.

Hunik, J.H., Meijer, H.J.G. and Tramper, J., 1992, Kinetics of *Nitrosomonas europaea* at Extreme, Substrate, Product and Salt Concentrations, App. Microbiol, Biotechnol., Vol. 37, pp. 802-807.

Johnson, P.W. and Sieburth, J.M., 1976, In Situ Morphology of Nitrifying-Like Bacteria in Aquaculture Systems, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 31, No. 3, pp. 23-432.

Lee, R.W. and Childress, J.J., 1994, Assimilation of Inorganic Nitrogen by Marine Invertebrates and Their Chemoautotrophic and Methanotrophic Symbionts, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 60, No. 8, pp. 1852-1858.

Liu, Y. and Capdeville, B., 1994, Dynamics of Nitrifying Biofilm Growth in Biological in Biological Nitrogen Removal Process, Wat. Sci. Tech., Vol. 29, No. 7, pp. 377-380.

Mahne, I., Princic, A. and Megusar, F., 1996, Nitrification/Denitrification in Nitrogen High-Strength Liquid Wastes, Water Research, Vol. 30, No. 9, pp. 2107-2111.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Metcalf, E., 1991, Wastewater Engineering : Treatment Disposal Reuse, 3rd ed., Singapore, McGraw-Hill, pp. 400-720.

Moat, A.G. and Foster, J.W., 1988, Microbial Physiology. John Wiley & Sons, Inc., New York, 597 p.

Omil, F., Mendez, R. and Lema, J.M., 1995, Anaerobic Treatment of Saline Wastewaters Under High Sulphide and Ammonia Content, Bioresource Technology, Vol. 54, pp. 269-278.

Pakasam, T.B.S. and Loesr, R.C., 1972, Microbial Nitrification and Denitrification in Concentrated Wastes, Water Research, Vol. 6, pp. 859-869.

Raveendran, P., 1989, Study on The Operation Parameters Affecting The Removal of Nitrogen and Phosphorus in Sequencing Batch Reactors, Thesis, Master of Engineering, Environmental Programme, Asian Institute of Technology, p. 7.

Sharma, B. and Ahlert, R.C., 1977, Nitrification and Nitrogen Removal, Water Research, Vol. 11, p. 903, 906

Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. and Holt, J.G., 1989, Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology Vol 3, Williams & Wilkins, London, pp. 1807-1834.

St-Arnaud, S., Bisaillon, J.G. and Beaudet, R., 1991, Microbiological Aspects of Ammonia Oxidation of Swine Waste, Can. J. Microbiol. Vol. 37, pp. 918-923.

Strickland, J.D. and Parsons., T.R., 1972, A Practical Handbook of Seawater Analysis, Fishery Research Board of Canada Bulletin, 167, Ottawa. 284 p.

Spotte, S., 1979, Seawater Aquariums the Captive Environment, John Wiley & Sons, Inc., New York, 413 p.

Spotte, S., 1992, Captive Seawater Fishes Science and Technology, John Wiley & Sons, Inc., New York, 942 p.

Suzuki, I., Dular, U. and Kwok, S.C., 1974, Ammonia or Ammonium Ion as Substrate for Oxidation by *Nitrosomonas europaea* Cells and Extracts, J. of Bacteriol. Vol. 120, pp. 556-558.

Szwerinski, H., Arvin, E. and Harremoes, P., 1986, pH-Decrease in Nitrifying Biofilms. Water Research, Vol. 20, No. 8, pp. 971-976.

Taylor, B., Hoare, D. S. and Hoare, S. L., 1971, *Thiobacillus denitrificans* as an Obligate Chemolithotroph. Isolation and growth studies, Archiv fur Microbiologie, Vol. 78, pp. 193-204.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

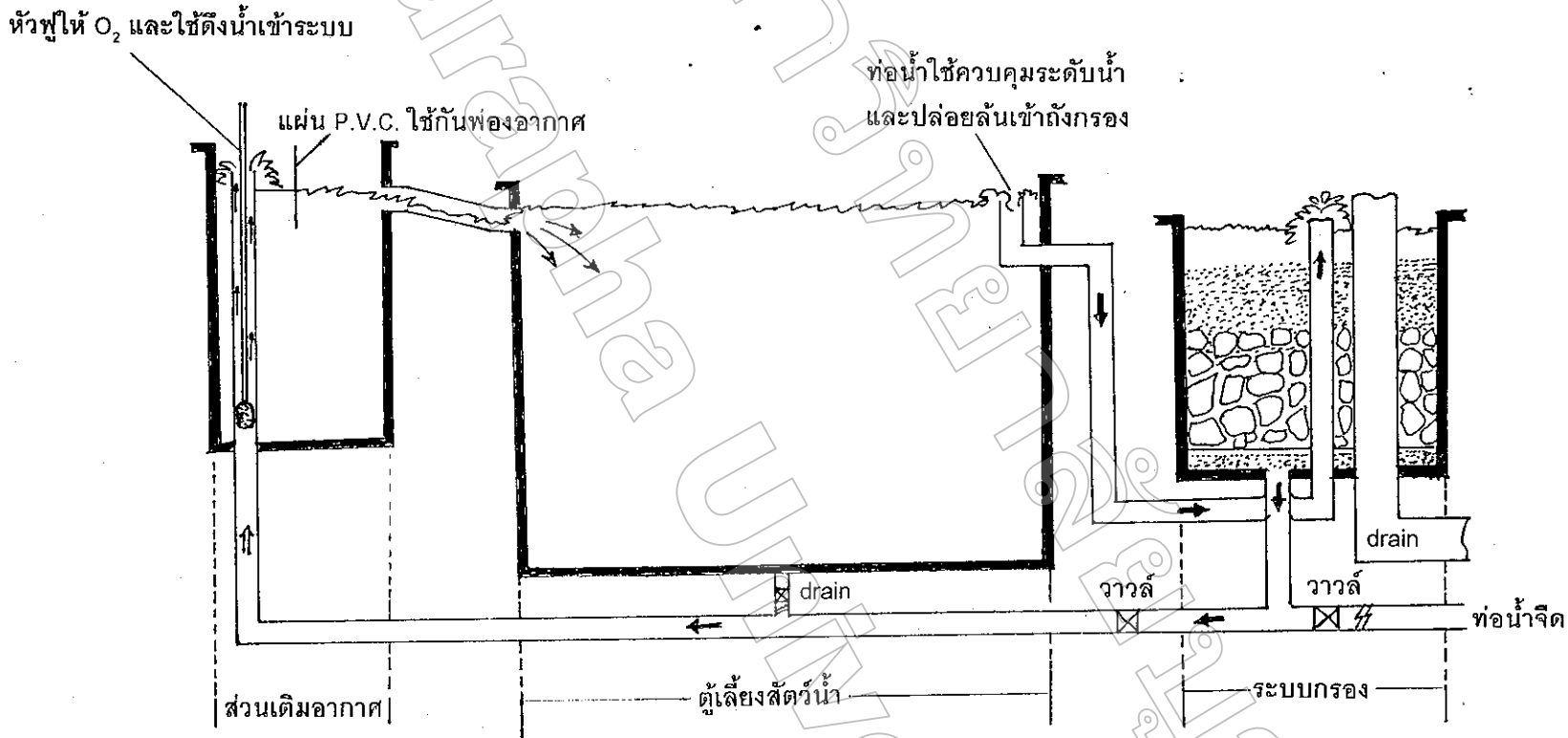
Watson, S. W., Valois, F. W. and Waterbury, J. B., 1981, The family Nitrobacteraceae. In *The Procaryotes*, vol. 1, M. P. Starr *et al.* (Eds), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 380-389.

Woolard, C.R. and Irvine, R.L., 1995, Treatment of Hypersaline Wastewater in the Sequencing Batch Reactor, Water Research, Vol. 29, No. 4, pp. 1159-1168.

Yang, P.Y., Nitisoravut, S. and Wu, J.S., 1995, Nitrate Removal Using A Mixed-culture Entrapped Microbial Cell Immobilization Process Under High Salt Conditions, Water Research, Vol. 29, No. 6, pp. 1525-1532.

Zellnel, G., Feuerhake, E., Jordening, H.J., Macario, A.J.L. and Conway de Macario, E., 1995, Denitrifying and Methanogenic Bacteria in the Biofilm of a Fixed-film Reactor Operated with Methanol/Nitrate Demonstrated by Immunofluorescence and Microscopy, Appl. Microbiol. Biotechnol, Vol. 43, pp. 566-571.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปผนวกที่ 1 ผังแบบตู้และระบบกรองน้ำเค็มของตู้เลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม

Burapha University มหาวิทยาลัยบูรพา

รูปผนวกที่ 2 การเปลี่ยนสีของตัวบ่งชี้ เมื่อมีการสะสมของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรที่ 1

อาหารสำหรับแยกและเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่มีอยู่ในน้ำและดินตะกอนตัวอย่าง (ORI medium : Ocean Research Institute, The University of Tokyo, Japan)

Yeast extract	1	กรัม
Proteose peptone No. 3	1	กรัม
Phytone (BBL)	0.5	กรัม
$Na_2S_2O_3 . 5H_2O$	0.2	กรัม
Na_2SO_3	0.05	กรัม
Fe - citrate	0.04	กรัม

(กรณีอาหารแข็ง เติม agar 15 กรัมต่อลิตร)

น้ำทะเลความเค็ม 35 ส่วนในพันส่วน ต่อน้ำกลั่น เท่ากับ 900 : 100 มิลลิลิตร ค่า pH หลังทำการฆ่าเชื้อเท่ากับ 7.6

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สูตรที่ 2

อาหารสำหรับแยกและเลี้ยงเชื้อ Nitrification ($NH_4^+ \longrightarrow NO_2^-$) : Drews, 1974

$(NH_4)_2SO_4$	1.0	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
NaCl	2.0	กรัม
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.2	กรัม
$FeSO_4 . 7H_2O$	0.05	กรัม
$CaCO_3$	6.0	กรัม
Phenol red	0.01	กรัม

น้ำทะเลความเค็ม 35 เปอร์เซ็นต์ : น้ำกลั่น เท่ากับ 400 : 600 หรือ 600 : 400 มิลลิลิตร (กรณีอาหารแข็ง เติม agar 15 กรัมต่อลิตร)

สูตรที่ 3

อาหารสำหรับแยกและเลี้ยงเชื้อ Nitrification ($NO_2^+ \longrightarrow NO_3^-$) : Watson และคณะ, 1981

$NaNO_2$	2.0	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.05	กรัม
KH_2PO_4	0.15	กรัม
$CaCO_3$	7.0	มิลลิกรัม
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} . 4H_2O$	0.05	มิลลิกรัม
$FeSO_4 . 7H_2O$	0.15	มิลลิกรัม
Phenol red	0.01	กรัม

น้ำทะเลความเค็ม 35 เปอร์เซ็นต์ : น้ำกลั่น เท่ากับ 700 : 300 หรือ 300 : 700 มิลลิลิตร (กรณีอาหารแข็ง เติม agar 15 กรัมต่อลิตร)

สูตรที่ 4

อาหารสำหรับแยกและเลี้ยงเชื้อ Denitrification (Organic compounds - oxidizing bacteria) Taylor และคณะ, 1971

Solution 1 (Trace metals)

Na_2 - EDTA	50.0	กรัม
$ZnSO_4 . H_2O$	2.2	กรัม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

$CaCl_2 . 2H_2O$	7.34	กรัม
$MnCl_2 . 4H_2O$	2.5	กรัม
$CoCl_2 . 6H_2O$	0.5	กรัม
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} . 4H_2O$	0.5	กรัม
$FeSO_4 . 7H_2O$	5.0	กรัม
$CuSO_4 . 5H_2O$	0.2	กรัม
NaOH	11.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

แต่ละตัวละลายแยกกันที่ pH 6.0 เวลาใช้นำมารวมกันครั้งละน้อยๆ ปรับ pH เป็น 4.0 ใช้ไม่หมดเก็บที่ 4.0 ° C

Solution 2

KNO_3	2.0	กรัม
NH_4Cl	1.0	กรัม
KH_2PO_4	2.0	กรัม
$NaHCO_3$	2.0	กรัม
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.8	กรัม
$Na_2S_2O_3 . 5H_2O$	5.0	กรัม
$CaCO_3$	6.0	กรัม
Trace metals	1.0	มิลลิลิตร
Phenol red	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

(กรณีอาหารแข็ง เติม agar 15 กรัมต่อลิตร)

สูตรที่ 5

อาหารสำหรับคัดแยกเชื้อ *Vibrio* spp. (Thiosulphate citrate bild salt sucrose agar : TCBS) เป็นอาหารสำเร็จรูปมีสูตรดังนี้

Sodium Thiosulphate	10.0	กรัม
Sodium Citrate	10.0	กรัม
Oxgall	5.0	กรัม
Sodium chlolate	3.0	กรัม
Sucrose	20.0	กรัม
Polypeptone	10.0	กรัม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Yeast extract	5.0	กรัม
Sodium chloride	10.0	กรัม
Iron citrate	1.0	กรัม
Thymol blue	0.04	กรัม
Bromthymol blue	0.04	กรัม
Agar	14.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

นำอาหารเลี้ยงเชื้อ 89 กรัม ผสมน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อนจนวุ้นละลายไม่ต้องนำไปทำให้ปราศจากเชื้อ

สูตรที่ 6

อาหารสำหรับคัดแยกเชื้อ *Escherichia* spp. (Eosin methylene blue agar : EMB) เป็นอาหารสำเร็จรูปมีสูตรดังนี้

Peptone	10.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Dipotassium hydrogen Phosphate (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
Eosin Y	0.4	กรัม
Methylene blue	0.065	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นจน agar หลอม นำไปทำให้ปราศจากเชื้อ ค่า pH หลังทำการฆ่าเชื้อเท่ากับ 7.1 ± 0.2

ขั้นตอนการทดสอบ และเตรียมสารเคมีที่สำคัญ

1. <u>การย้อมสีแกรม</u>

1.1 <u>สารเคมี</u>

1.1.1 Gram's crystal violet

สารละลาย A

crystal violet	2.0	กรัม
ethyl alcohol (95 %)	20.0	มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารละลาย B

ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

นำสารละลาย A และ B ผสมกัน นำไปกรองเพื่อแยกส่วนที่เป็นตะกอนออกก่อนนำไปใช้

1.1.2 Gram's iodine

iodine	1.0	กรัม
โปตัสเซียมไอโอไดด์	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

(เติมไอโอดีน หลังจากโปตัสเซียมไอโอไดด์ละลายน้ำหมดแล้ว)

1.1.3 Gram's alcohol (ใช้สำหรับล้างสี)

เอธานอล (95 %)	98	มิลลิลิตร
อะซีโตน	2	มิลลิลิตร

1.1.4 Gram's safranin

safranin O	10	มิลลิลิตร
(2.5 % ในเอธานอล (95 %))		
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

1.2 ขั้นตอนการทดสอบ

1.2.1 เกลี่ย (smear) เชื้อที่ต้องการย้อมบางๆ บนสไลด์ที่ล้างสะอาด ทิ้งให้แห้งแล้ว fix โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เซลล์แห้งยึดติดแน่นกับสไลด์

1.2.2 หยดสี Gram's crystal violet บนเชื้อที่เกลี่ย นาน 1-2 นาที แล้วเทสีทิ้ง

1.2.3 หยดสารละลายไอโอดีน (Gram's iodine) บนเชื้อที่เกลี่ย นาน 2 นาที แล้วเททิ้ง เพื่อช่วยให้เซลล์ติดสีย้อมได้ดีขึ้น (mordant)

1.2.4 นำแบคทีเรียมาล้างสี (decolorized) ด้วย Gram's alcohol จนกระทั่งไม่มีสีของ crystal violet ละลายปนออกมาจึงล้างด้วยน้ำ

1.2.5 หยดสี Gram's safranin บนเชื้อที่เกลี่ย นาน 15-30 วินาที ล้างน้ำ ซับให้แห้งแล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การย้อมสีด้วยวิธีนี้ แบคทีเรียแกรมบวกเซลล์ติดสีม่วงของ crystal violet และแบคทีเรียแกรมลบเซลล์ติดสีแดงของ safranin

2. การย้อมสปอร์

2.1 สารเคมี

malachite green	5	กรัม
น้ำกลั่น	95	มิลลิลิตร

2.2 ขั้นตอนการทดสอบ

2.2.1 เกลี่ย (smear) เชื้อที่ต้องการย้อมบางๆ บนสไลด์ที่ล้างสะอาด ทิ้งให้แห้ง แล้ว fix โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เซลล์แห้งยึดติดแน่นกับสไลด์

2.2.2 หยดสี malachite green ให้ท่วมบริเวณที่เกลี่ยเชื้อไว้ นำสไลด์ไปวางบนไอน้ำเดือดนาน 10-15 นาที โดยค่อยๆเติมสีบนสไลด์อย่าให้สีแห้ง ล้างสีด้วยน้ำ แล้วซับให้แห้ง

2.2.3 หยดสี safranin นาน 1 นาที ล้างสี ซับให้แห้ง นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

การย้อมสีด้วยวิธีนี้ ตัวเซลล์ติดสีแดงของ safranin ส่วนสปอร์ติดสีเขียวของ malachite green

3. การตรวจวิเคราะห์แอมโมเนีย

3.1 สารเคมี

3.1.1 สารละลายไฮโปครอไรท์ (hypochlorite stock solution)

โซเดียมไฮโปครอไรท์ (sodium hypochlorite) ที่มีคลอรีนประมาณ 5.5 เปอร์เซ็นต์ เก็บในภาชนะทึบแสง และไม่ควรเก็บไว้นาน

3.1.2 สารละลายอัลคาไลน์ (alkaline stock solution)

โซเดียมซิเตรท	100.0	กรัม
NaOH	5.0	กรัม
น้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน	500.0	มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.1.3 oxidizing reagent

ใช้สารละลายอัลคาไลน์ผสมกับสารละลายไฮโปครอไรท์ เท่ากับ 4 : 1 เก็บในขวดทึบแสงปิดฝา สารละลายนี้เตรียมใช้ใหม่ๆ ทุกครั้ง

3.1.4 สารละลายโซเดียมไนโตรพรัสไซด์ (sodium nitroprusside solution)

$Na_2(NO)Fe(CN)_5.2H_2O$	1.0	กรัม
น้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน	200.0	มิลลิลิตร

3.1.5 phenol reagent

phenol	50.0	กรัม
เอธานอล (95 %)	1000	มิลลิลิตร

3.1.6 สารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย (standard ammonia solution)

NH_4Cl ที่อบแห้งแล้วปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น

	3.818	กรัม
น้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน	1000.0	มิลลิลิตร

3.2 ขั้นตอนการทดสอบ

3.2.1 ดูดตัวอย่างน้ำ 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เพื่อเป็น blank ใส่ในขวดแก้วมีจุกขนาด 100 มิลลิลิตร อย่างละขวดตามลำดับ

3.2.2 เติม phenol reagent 2 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน

3.2.3 เติมสารละลายโซเดียมไนโตรพรัสไซด์ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน

3.2.4 เติม oxidizing reagent 5 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง แต่ไม่ควรเกิน 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่า absorbance ด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร

3.2.5 บันทึกค่า absorbance หลังจากลบค่า absorbance ของ blank ออกแล้ว นำไปหาความเข้มข้น จากกราฟมาตรฐานแอมโมเนีย

กราฟมาตรฐานแอมโมเนียจัดทำโดยดูดสารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย 0.01, 0.02, 0.05, 0.07 และ 0.1 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แต่ละขวดปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้นของแอมโมเนีย 100, 200, 500, 700 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดูดสารละลายมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้น ไปผ่านขั้นตอนวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำ นำค่า absorbance ที่ได้ ไปทำกราฟมาตรฐานของแอมโมเนีย

4. การตรวจวิเคราะห์ไนไตรท์

4.1 สารเคมี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.1.1 สารละลายบัฟเฟอร์ (buffer solution)

NH_4Cl	100.0	กรัม
sodium tetraborate	20.0	กรัม
EDTA	1.0	กรัม
น้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน	500.0	มิลลิลิตร

4.1.2 สารละลายซัลฟานิลามีด (sulfanilamide solution)

กรดไฮโดรคลอริค เข้มข้น	100.0	มิลลิลิตร
ซัลฟานิลามีด	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

ค่อย ๆ รินกรดกรดไฮโดรคลอริค เข้มข้น ลงในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เติมซัลฟานิลามีด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร

4.1.3 สารละลายเอ็นอีดี ไดไฮโดรคลอไรด์ (NED dihydrochloride solution)

เอ็น-1 (เนฟทิล) เอทธีลีนไดอะมีนไดไฮโดรคลอไรด์

0.5 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออนจนได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร จะได้สารละลายใสหรือสีชมพูอ่อน ๆ เก็บสารละลายในขวดสีน้ำตาล ถ้าสารละลายเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลเข้มจะต้องเตรียมใหม่

4.1.4 สารละลายมาตรฐานไนไตรท์ (standard nitrite solution)

$NaNO_2$ ที่อบแห้งแล้วปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น

	0.4928	กรัม
น้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน	1000.0	มิลลิลิตร

(1 มิลลิลิตร ของสารละลาย เท่ากับ 100 ไมโครกรัมของไนไตรท์)

4.2 ขั้นตอนการทดสอบ

4.2.1 กรองตัวอย่างน้ำด้วยกระดาษกรอง

4.2.2 ดูดตัวอย่างน้ำที่กรองแล้ว 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เพื่อเป็น blank ใส่ในขวดแก้วมีจุกขนาด 100 มิลลิลิตร อย่างละขวดตามลำดับ

4.2.3 เติมสารละลายบัฟเฟอร์ ตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน

4.2.4 เติมสารละลายซัลฟานิลามีด 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.2.5 เติมสารละลายเอ็นอีดีไดไฮโดรคลอไรด์ ตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที แต่ไม่ควรเกิน 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่า absorbance ด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร

4.2.6 บันทึกค่า absorbance หลังจากลบค่า absorbance ของ blank ออกแล้ว นำไปหาความเข้มข้น จากกราฟมาตรฐานไนไตรท์

กราฟมาตรฐานไนไตรท์จัดทำโดยดูดสารละลายมาตรฐานไนไตรท์ 0.01, 0.025, 0.1 และ 0.25 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แต่ละขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออนเป็น 100 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้นของไนไตรท์ 10, 25, 50, 100 และ 250 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดูดสารละลายมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้น ไปผ่านขั้นตอนวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำ นำค่า absorbance ที่ได้ ไปทำกราฟมาตรฐานของไนไตรท์

5. การตรวจวิเคราะห์ไนเตรท

5.1 <u>สารเคมี</u>

5.1.1 สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (coppersulphate solution)

$CuSO_4.5H_2O$	20.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออนจนปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร

5.1.2 กรดไฮโดรคลอริค (hydrochloric acid) 2 นอร์มอล

5.1.3 แคดเมียม ฟิลลิ่ง (cadmium filling)

ใช้โลหะแคดเมียม (cd) เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 มิลลิเมตร

5.1.4 สารละลายบัฟเฟอร์ (buffer solution)

NH_4Cl	100.0	กรัม
sodium tetraborate	20.0	กรัม
EDTA	1.0	กรัม
น้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน	500.0	มิลลิลิตร

5.1.5 สารละลายซัลฟานิลามีด (sulfanilamide solution)

กรดไฮโดรคลอริค เข้มข้น	100.0	มิลลิลิตร
ซัลฟานิลามีด	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

ค่อย ๆ รินกรดกรดไฮโดรคลอริค เข้มข้น ลงในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เติมซัลฟานิลามีด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร

5.1.6 สารละลายเอ็นอีดี ไดไฮโดรคลอไรด์ (NED dihydrochloride solution)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เอ็น-1 (เนฟทิล) เอทธีลีนไดอะมีนไดไฮโดรคลอไรด์ 0.5 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออนจนได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร จะได้สารละลายใสหรือสีชมพูอ่อน ๆ เก็บสารละลายในขวดสีน้ำตาล ถ้าสารละลายเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลเข้มจะต้องเตรียมใหม่

5.1.7 สารละลายมาตรฐานไนเตรท (standard nitrate solution)

KNO_3 0.7218 กรัม

(ที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 °C นาน 90 นาที แล้วปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น)

น้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน 1000.0 มิลลิลิตร

(เก็บสารละลายในขวดทึบแสงและที่อุณหภูมิต่ำ สารละลาย 1 มิลลิลิตร ของสารละลาย เท่ากับ 100 ไมโครกรัมของไนเตรท)

5.2 <u>ขั้นตอนการทดสอบ</u>

5.2.1 กรองตัวอย่างน้ำด้วยกระดาษกรอง

5.2.2 ดูดตัวอย่างน้ำที่กรองแล้ว 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน 50 มิลลิลิตร เพื่อเป็น blank ใส่ในขวดแก้วมีจุกขนาด 100 มิลลิลิตร อย่างละขวดตามลำดับ

5.2.3 เติมสารละลายบัฟเฟอร์ ตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน

5.2.4 นำสารละลายทั้งหมดไปผ่าน column จนได้สารละลายที่ผ่าน column 25 มิลลิลิตร ถ่ายลงขวดแก้วมีจุกขนาด 50 มิลลิลิตร

5.2.5 เติมสารละลายซัลฟานิลามีด 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

5.2.6 เติมสารละลายเอ็นอีดีไดไฮโดรคลอไรด์ ตัวอย่างละ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที แต่ไม่ควรเกิน 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่า absorbance ด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร

5.2.7 บันทึกค่า absorbance หลังจากลบค่า absorbance ของ blank ออกแล้ว นำไปหาความเข้มข้น จากกราฟมาตรฐานไนเตรท

ถ้าตัวอย่างน้ำมีไนไตรท์อยู่ด้วย ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 5.2.7 จะเป็นความเข้มข้นรวมของไนไตรท์และไนเตรท ต้องทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของไนไตรท์ แล้วนำมาลบออก จะได้เป็นความเข้มข้นของไนเตรทในตัวอย่างน้ำ

กราฟมาตรฐานไนเตรทจัดทำโดยดูดสารละลายมาตรฐานไนเตรท 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.25 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แต่ละขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออนเป็น 100 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้นของไนไตรท์ 50,

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

100, 200, 300 และ 500 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดูดสารละลายมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้น ไปผ่านขั้นตอนวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำ นำค่า absorbance ที่ได้ ไปทำกราฟมาตรฐานของไนเตรท

การเตรียม cadmium – copper reducing column

1. ชั่งแคดเมียมฟิลลิ่ง 25 กรัม ใส่ในภาชนะความจุ 125 มิลลิลิตร ที่มีกรดไฮโดรคลอริค 2 นอร์มอล อยู่ 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง ใช้แท่งแก้วคนเป็นระยะๆ

2. รินส่วนที่เป็นของเหลวออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออนหลายๆ ครั้ง เพื่อล้างกรดไฮโดรคลอริคออกให้หมด รินน้ำออก

3. เติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 10 มิลลิลิตร เขย่าภาชนะที่บรรจุไปมาจนสีฟ้าของสารละลายหมดไป

4. ใช้คีมคีบใยแก้ว (glass wool) เกลี่ยให้อยู่ส่วนล่างของ column เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออนให้เต็ม column

5. ค่อยๆ ตักแคดเมียมที่เตรียมได้จากขั้นตอนในข้อ 3 ใส่ลงใน column โดยโรยก้อนแคดเมียมให้ลงไปจัดเรียงตัวซ้ำ ป้องกันการอัดตัวแน่นของก้อนแคดเมียม ทำการไขน้ำออกช้าๆ เพื่อไม่ให้น้ำล้น column ระดับน้ำควรเต็ม column อยู่เสมอ เพื่อป้องกันให้ก้อนแคดเมียมสัมผัสกับอากาศน้อยที่สุด

6. ใช้คีมคีบใยแก้วเกลี่ยอย่างเบาๆ ให้ชิดส่วนบนของแคดเมียม ไขน้ำออกให้ระดับน้ำอยู่เหนือใยแก้วเล็กน้อย

7. เติมสารละลายที่ผสมระหว่างน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร กับสารละลายบัฟเฟอร์ 5 มิลลิลิตร

8. ปล่อยสารละลายไหลทิ้งไป โดยให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 25 มิลลิลิตร ต่อ 4 นาที

9. เติมน้ำกลั่นให้เต็ม column ปิดน้ำให้หยุดไหล เก็บ column เพื่อให้ในการวิเคราะห์ไนเตรทต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของ cadmium – copper reducing column

1. ดูดสารละลายมาตรฐานไนเตรท ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออนจนได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน สารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้นของไนเตรท เท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร

2. ดูดสารละลายจากข้อ 1 มา 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วความจุ 80-100 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. นำสารละลายไปผ่าน cadmium - copper reducing column ตามขั้นตอนดังนี้

4.1 ปรับอัตราการไหลผ่านของน้ำกลั่นที่เติมไว้ เท่ากับ 7-10 มิลลิลิตรต่อนาที

4.2 เมื่อระดับน้ำกลั่นอยู่เหนือใยแก้วเล็กน้อย เติมสารละลายจากข้อ 3 ลงไปประมาณ 10 มิลลิลิตร เมื่อระดับของสารละลายอยู่เหนือใยแก้วเล็กน้อยจึงเติมสารละลายลงไปอีกประมาณ 10 มิลลิลิตร

4.3 เมื่อระดับของสารละลายที่เติมครั้งที่ 2 อยู่เหนือใยแก้วเล็กน้อย เติมสารละลายที่เหลืออีก 30 มิลลิลิตรลงไป

4.4 รองสารละลายที่ผ่านออกมา 25 มิลลิลิตร ใส่ขวดแก้วมีจุกความจุ 50 มิลลิลิตร

4.5 ล้าง column ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน 2 ครั้งๆ ละ 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้เต็ม column ปิดจุกไม่ให้น้ำไหลออก เก็บไว้ใช้ในครั้งต่อไป

5. ดูดสารละลายมาตรฐานไนไตรท์ 100 มิลลิลิตรต่อลิตร มา 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออนจนครบ 100 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้มีความเข้มข้นของไนไตรท์ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร

6. ดูดสารละลายจากข้อ 5 มา 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วความจุ 80-100 มิลลิลิตร

7. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน

8. นำสารละลายไปผ่าน cadmium - copper reducing column ตามขั้นตอนทำนองเดียวกับข้อ 4.1-4.5

9. เติมสารละลายซัลฟานิลามีด ลงในสารละลายที่ผ่าน column ทั้งสอง สารละลายละ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

10. เติมสารละลายเอ็นอีดีไดไฮโดรคลอไรด์ ตัวอย่างละ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที แต่ไม่ควรเกิน 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่า absorbance ด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร

11. บันทึกค่า absorbance นำไปหาประสิทธิภาพของ column จากสูตร

$$\text{ประสิทธิภาพของ column (\%)} = \frac{\text{absorbance ของไนเตรท X 100}}{\text{absorbance ของไนไตรท์}}$$

ประสิทธิภาพที่ได้ควรมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ถ้าต่ำกว่านี้ต้องเตรียมใหม่ และต้องทดสอบประสิทธิภาพใหม่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประวัติคุณภาพน้ำทางด้านเคมีขณะทำการเก็บตัวอย่าง

คุณสมบัติ	ความเข้มข้น
Salinity (ppt)	28-34
pH	7.3-8.0
Alkalinity (mg/l)	35-94
PO_4-P (mg/l)	0.07-6.535
NH_3-N (mg/l)	0-0.323
NO_2-N (mg/l)	0.003-0.013
NO_3-N (mg/l)	7.45-30.7

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University