

การคัดเลือกตัวกลางที่เหมาะสมต่อการยึดเกาะของเมือกชีวภาพเพื่อบำบัดไนเตรท จากน้ำทิ้งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง

Selection of Suitable Media for Biofilm Attachment to Treat Nitrate From Coastal Aquaculture Wastewater.

อาภาวรรณ พ่อคำ^{1,5} สมพงษ์ โอทอง² สุภฎา คีรีรัตนิกม^{3,5} และนุกูล อินทรสังข์^{4,5,*}

Arpawon Phoakha^{1,5}, Sompong O-Thong², Suphada Kiriratnikom^{3,5} and Nugul Intrasangha^{4,5,*}

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของตัวกลางที่เหมาะสมต่อการเกิดเมือกชีวภาพในการบำบัดไนเตรทในน้ำเสียสังเคราะห์จากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งที่ระดับความเค็ม 15 พีพีทีด้วยระบบการทดลองแบบกะ โดยใช้ตัวกลาง 4 ชนิดคือ โปไอบอล หินภูเขาไฟ เปลือกหอยนางรม และแผ่นอวนในลอนชนิดทอไม่มีปม เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ติดตามประสิทธิภาพการบำบัดน้ำทางเคมี ร่วมกับการตรวจสอบลักษณะของเมือกชีวภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฉากสว่างและแบบส่องกราด และตรวจสอบชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องด้วยเทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) และการนับปริมาณแบคทีเรียดีในτριโฟอิงด้วยเทคนิค MPN แบบไมโครเทคนิค ผลการศึกษาพบว่าแผ่นอวนในลอนที่ตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1×1 นิ้ว มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการบำบัดไนเตรท เนื่องจากมีลักษณะโครงสร้างของตัวกลางเหมาะสมต่อการยึดเกาะของจุลินทรีย์ ระบบสามารถเข้าสู่สภาวะคงที่ได้เร็วที่สุด สอดคล้องกับการผลการนับปริมาณแบคทีเรียดีในτριโฟอิง พบว่าในช่วงแรกของการทดลองพบการเกิดเมือกชีวภาพบางๆ แต่เมื่อระบบดำเนินไปอย่างต่อเนื่องพบว่าเมือกชีวภาพเริ่มหนาและจับเกาะตัวกันเป็นกลุ่ม ตรวจพบปริมาณแบคทีเรียในไฟลัม Proteobacteria คลาส Gammaproteobacteria เป็นกลุ่มเด่น

คำสำคัญ: ตัวกลาง เมือกชีวภาพ ไนเตรท น้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ฟลูออเรสเซนส์ อิน ซิงไฮบริไดเซชัน (FISH)

¹ นิสิตปริญญาโท สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง 93110

² อ.ดร. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง 93110

³ อ.ดร. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง 93110

⁴ ผศ.ดร. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง 93110

⁵ หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง 93110

* Corresponding author: E-mail: nugul @ tsu..ac.th, Tel : 0865981816

Abstracts

This study was to compare 4 types of media suitable for biofilm formation prior to be used in semi-batch system for nitrate removal from synthetic coastal aquaculture wastewater at 15 ppt salinity. They were bioball, pumice, oyster shell and a square cut woven nylon net (1×1 inch) and suspended system as a control experiment. The selection criteria were to monitor each reactor's performance of nitrate removal using chemical analysis and the observation of biofilm characteristics using microscope both light and scanning electron microscopes.. In addition, the bacterial communities involving to nitrate removal were investigated using Fluorescence In Situ Hybridisation (FISH) technique and MPN with microtechnique analyses. It was found that the nylon net showed the best nitrate removal performance. This may mainly due to the proper structure and physical characteristic of nylon net for bacterial adhesion. It was confirmed with the presence of denitrifying bacteria when using MPN with microtechnique analysis and the dominant of bacteria belong to Gammaproteobacteria group when using FISH technique.

Keywords : Media, Biofilm, Nitrate, Coastal Aquaculture Wastewater, Fluorescence In Situ Hybridisation (FISH)

บทนำ

ประเทศไทยมีการขยายตัวของอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะตามแนวชายฝั่งทะเล ส่งผลให้เกิดปัญหาภาวะมลพิษจากน้ำทิ้งที่มีการปนเปื้อนของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ โดยเฉพาะสารประกอบไนโตรเจนทั้งแอมโมเนีย ไนไตรท์และไนเตรท ซึ่งมีสาเหตุมาจากเศษอาหารและสิ่งขับถ่ายของสัตว์น้ำ โดยของเสียจะสะสมอยู่บริเวณพื้นบ่อส่งผลให้เกิดน้ำเน่าเสีย อาจส่งผลให้เกิดพิษเฉียบพลันต่อสัตว์น้ำ เพื่อป้องกันปัญหาที่เกิดขึ้น นักวิชาการได้พัฒนารูปแบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำด้วยระบบน้ำหมุนเวียน (Recirculating aquaculture systems; RAS) ซึ่งเป็นระบบที่จะนำน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วกลับมาใช้เลี้ยงสัตว์น้ำอีกครั้ง และเป็นระบบที่สามารถควบคุมคุณภาพของน้ำได้อย่างสม่ำเสมอ ทำให้สัตว์น้ำมีอัตราการรอดตายสูง [1] โดยน้ำเสียจะผ่านการบำบัดด้วยกระบวนการทางกายภาพและชีวภาพ อาศัยการทำงานของแบคทีเรีย 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียไนโตรไฟอิง และแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิงผ่านกระบวนการไนตริฟิเคชันและกระบวนการดีไนตริฟิเคชันตามลำดับ [2] แต่ระบบดังกล่าวเมื่อใช้ไปนานๆพบว่าระบบไม่สามารถบำบัดไนเตรทได้อย่างสมบูรณ์จากผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่าระบบ RAS สามารถควบคุมการบำบัดแอมโมเนียได้ดีไม่ทำให้เป็นพิษต่อสัตว์น้ำ แต่กลับมีการสะสมไนเตรทในปริมาณสูง (อาจพบสูงถึง 300 มิลลิกรัมต่อลิตร) เนื่องจากเกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันไม่สามารถทำงานได้ จากปัญหาดังกล่าวทำให้มีการศึกษาเพื่อแก้ปัญหาไนเตรทสะสมในปริมาณที่สูงโดยอาศัยเมือกชีวภาพ (biofilm) ซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ที่แบคทีเรียผลิตออกมาเพื่อป้องกันตัวเองและใช้ยึดเกาะกับพื้นผิวของตัวกลาง โดยบริเวณเมือกด้านในส่วนใหญ่จะพบแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนส่วนชั้นด้านนอกของเมือกชีวภาพส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ชอบออกซิเจน ซึ่งเมือกชีวภาพจะทำหน้าที่บำบัดสารประกอบไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท ทำให้น้ำเสียที่ไหลผ่านชั้นเมือกชีวภาพจะผ่านการบำบัดให้มีคุณภาพดีกว่าระบบการบำบัดแบบจุลินทรีย์ที่แขวนลอย เนื่องจากจุลินทรีย์อาจหลุดไปพร้อมน้ำที่ไหลออกหรือถูกโปรโตซัว

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 22 ปี 2555

จับกินได้ [2] งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการบำบัดในเตรทสะสม โดยเปรียบเทียบตัวกลางที่เหมาะสมให้จุลินทรีย์ยึดเกาะจากตัวกลางที่มีการใช้ทั่วไปในการบำบัดน้ำเสีย จำนวน 4 ชนิด คือ 1) ไบโอบอล 2) หินภูเขาไฟ 3) เปลือกหอยนางรม และ 4) แผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1×1 นิ้ว เปรียบเทียบกับระบบที่ไม่มีตัวกลางเป็นชุดควบคุมทำการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ โดยศึกษาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงต่อประสิทธิภาพการบำบัดในเตรทในระยะเวลาการบำบัดที่แตกต่างกัน โดยใช้เทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) และการนับปริมาณแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงด้วยเทคนิค MPN แบบไมโครเทคนิค ร่วมกับการตรวจสอบลักษณะพื้นผิวของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะบนผิวตัวกลางด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฉากสว่างและแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) โดยทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมีเพื่อศึกษาบทบาทและหน้าที่ของกลุ่มจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง ผลการศึกษาที่ได้จะนำไปประยุกต์ใช้ในการทดลองขั้นนำร่องของ RAS ที่มีการเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจริงเพื่อทำการแก้ปัญหาปริมาณในเตรทสะสมในระบบต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ช่วงการทดลอง คือ ช่วงแรกเป็นการเพาะขยายกล้าเชื้อแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ (Semi-batch culture) และช่วงที่ 2 เป็นการเปรียบเทียบชนิดของตัวกลางที่เหมาะสมต่อการบำบัดในเตรท จากตัวกลางทั้ง 4 ชนิดกับชุดควบคุม ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้การเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง

นำกล้าเชื้อแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงเริ่มต้นจากงานที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ได้แก่ งานวิจัยของสุกฤดีศิริฐนิคม สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง (NICA) สถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำสงขลา และจากงานวิจัยของนุกุล อินทรสังขา และคณะ [2] โดยนำมาเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ (Semi-batch culture) ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่เรียกว่า “Artificial saline wastewater (ASW)” มีความเข้มข้นของไนเตรท-ไนโตรเจน ($\text{NO}_3^- - \text{N}$) 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระดับความเค็ม 15 พีพีที โดยมีการเติมเมทานอลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง ตามวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของคอร์กัก ชัยสาร และคณะ [3] เปรียบเทียบชนิดของตัวกลางที่เหมาะสมต่อการบำบัดในเตรทโดยเมือกชีวภาพ

ทำการจำลองสถานการณ์เพื่อศึกษาและแก้ปัญหาของไนเตรทสะสม โดยการเปรียบเทียบตัวกลางที่ให้เมือกชีวภาพมายึดเกาะเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดในเตรทจากเมือกชีวภาพ ประกอบด้วยชุดการทดลองที่เติมตัวกลาง 4 ชนิด คือ ไบโอบอล หินภูเขาไฟ เปลือกหอยนางรม และแผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1×1 นิ้ว จำนวน 4 ถึงปฏิกิริยา (ภาพที่ 1) กับชุดควบคุม เป็นการทดลองที่ไม่มีการเติมอากาศเพื่อให้เกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน โดยอาศัยการทำงานของแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบเซมิแบตช์ และเติมน้ำเสียสังเคราะห์ ASW ที่มีความเข้มข้นของไนเตรท-ไนโตรเจน ($\text{NO}_3^- - \text{N}$) 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระดับความเค็ม 15 พีพีที โดยเติมเมทานอลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง



ภาพที่ 1 ชนิดของตัวกลางที่ใช้ในการทดลอง: a: ใบบอล; b: เปลือกหอยนางรม; c: แผ่นวุ้นในลอนชนิดทอไม่มีปม และ d: หินภูเขาไฟ

การศึกษาประสิทธิภาพของการบำบัดในเตรทด้วยการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

วิเคราะห์ปริมาณในเตรทด้วยวิธีการของนิแอ และคณะ [4] และวิเคราะห์ปริมาณของแข็งแขวนลอยระเหยง่าย (Volatile Suspended Solids, VSS) ตามวิธีมาตรฐาน [5]

การศึกษาทางด้านจุลชีววิทยา

ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงด้วยเทคนิค MPN แบบไมโครเทคนิค โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Soto *et al.* [6] และศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องด้วยเทคนิค FISH ตามวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Amann *et al.* [7] โดยใช้ดีเอ็นเอโพรบ คือ ALB1 ซึ่งเป็นตัวแทนแบคทีเรียในกลุ่มย่อย Alphaproteobacteria, BET42a ซึ่งเป็นตัวแทนแบคทีเรียในกลุ่มย่อย Betaproteobacteria และ GAM42a ซึ่งเป็นตัวแทนแบคทีเรียในกลุ่มย่อย Gammaproteobacteria ควบคู่กับตรวจสอบลักษณะเมือกชีวภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฉากสว่างด้วยการย้อมสี Gram's stain จากทั้ง 5 ถึงปฏิกิริยา และกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) โดยเลือกจากถึงปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพการบำบัดในเตรทดีที่สุด โดยส่งตัวอย่างไปตรวจสอบที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเมือกชีวภาพโดยใช้การย้อมแบบเปียกด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฉากสว่าง Olympus BX51 (Japan)

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

ศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดในเตรทจากแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง

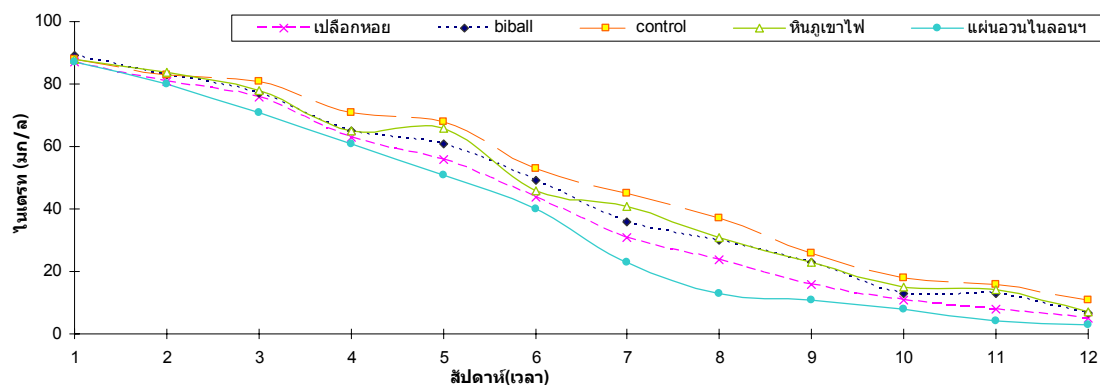
ติดตามการเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพการบำบัดในเตรทจากแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ช่วงการทดลองคือ ช่วงแรกเป็นการเพาะขยายกล้าเชื้อแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะและช่วงที่ 2 เป็นการเปรียบเทียบชนิดของตัวกลางที่เหมาะสมต่อการบำบัดในเตรทจากตัวกลางทั้ง 4 ชนิดกับชุดควบคุม ด้วยการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมี ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 22 ปี 2555

ในช่วงแรก พบว่าเมื่อระบบการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงเข้าสู่สภาวะคงที่แล้วแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงสามารถบำบัดไนเตรทได้เกือบสมบูรณ์ ภายในระยะเวลา 7 วัน และพบว่าระบบมีระยะเวลากักน้ำ (HRT) เท่ากับ 8.7 วัน ส่วนในช่วงที่ 2 เป็นการเปรียบเทียบชนิดของตัวกลางที่เหมาะสมต่อการบำบัดไนเตรท จากตัวกลางทั้ง 4 ชนิด คือ ไบโอบอล หินภูเขาไฟ เปลือกหอยนางรม และแผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1×1 นิ้ว เทียบกับชุดควบคุม พบว่าประสิทธิภาพการบำบัดไนเตรทโดยเฉลี่ยแล้ว ผลปรากฏว่าตัวกลางที่เหมาะสมต่อการบำบัดไนเตรทได้ดีที่สุด คือ แผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1×1 นิ้ว เป็นตัวกลางที่มีประสิทธิภาพการบำบัดไนเตรทได้ดีที่สุด คิดเป็นร้อยละ 85 รองลงมาคือ เปลือกหอยนางรม คิดเป็นร้อยละ 79 ไบโอบอล คิดเป็นร้อยละ 75 และหินภูเขาไฟ คิดเป็นร้อยละ 73 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีประสิทธิภาพการบำบัดไนเตรทเพียงร้อยละ 68 นอกจากนี้ยังพบว่า ถึงปฏิกิริยาดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนเตรทภายในถังปฏิกิริยาที่บรรจุตัวกลางแต่ละชนิด เทียบกับชุดควบคุม พบว่าในช่วงแรกของระบบแต่ละถังปฏิกิริยามีปริมาณไนเตรทเริ่มต้นใกล้เคียงกัน แต่เมื่อระบบดำเนินไปอย่างต่อเนื่องพบว่าในสัปดาห์ที่ 7 ของการทดลองระบบภายในถังปฏิกิริยาดังกล่าวมีปริมาณไนเตรทลดลงได้เร็วกว่าถังปฏิกิริยาที่บรรจุตัวกลางชนิดอื่น เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่ตัวกลาง นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองภายในถังปฏิกิริยาดังกล่าวเหลือปริมาณไนเตรทน้อยกว่าถังปฏิกิริยาที่บรรจุตัวกลางชนิดอื่น เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 1 และภาพที่ 2) เนื่องจากแผ่นอวนไนลอนมีลักษณะโครงสร้างทางกายภาพเป็นเส้น แล้วนำมาทอเป็นเส้นสายแบบตาข่าย และลักษณะพื้นผิวของแต่ละเส้นนั้นมีลักษณะผิวหยาบและไม่ลื่น จึงมีพื้นที่ที่เหมาะสมต่อการเข้าไปยึดเกาะของกล้าเชื้อจุลินทรีย์ แล้วพัฒนากลายเป็นเมือกชีวภาพได้ดีที่สุดและมีพื้นที่ผิวจำเพาะสูงที่สุดจากจากตัวกลางทั้ง 4 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงด้วยเทคนิค MPN แบบไมโครเทคนิคการวิเคราะห์หาค่าของแข็งแขวนลอย และน้ำหนักแห้งมวลชีวภาพที่ผลิตได้ต่อซับเตรทที่ใช้ไป (yield)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบคุณลักษณะทั่วไปและความสามารถของตัวกลางต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษารังนี้เกี่ยวกับชุดควบคุม

ประเด็น	ชนิดตัวกลาง				
	ชุดควบคุม	ไบโอบอล	เปลือกหอยนางรม	แผ่นอวนไนลอน	หินภูเขาไฟ
ขนาด (กxย)	-	-	3×2 ตร.นิ้ว	1×1 ตร.นิ้ว	1×0.7 ตร.นิ้ว
พื้นที่ผิวจำเพาะ(m ² /L.)	-	0.006	0.0014	0.5	-
ประเภทของวัสดุ	-	พลาสติก	ธรรมชาติ	เส้นใยสังเคราะห์	ธรรมชาติ
ประสิทธิภาพการบำบัดไนเตรท (%)	68	75	79	85	73
ความสามารถในการยึดเกาะของเมือกชีวภาพ	-	ยึดเกาะได้เล็กน้อย	ยึดเกาะได้ปานกลาง	ยึดเกาะได้มากที่สุด	ยึดเกาะได้ปานกลาง
ปริมาณตัวกลาง (ชิ้น/ถัง)	-	10 ชิ้น	10 ชิ้น	10 ชิ้น	10 ชิ้น



ภาพที่ 2 ติดตามการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตรทจากถังปฏิบัติการที่บรรจุตัวกลาง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีตัวกลาง ที่มีความเข้มข้นของ $\text{NO}_3^- \text{--N}$ 100 มก/ล. ที่ระดับความเค็ม 15 พีพีที

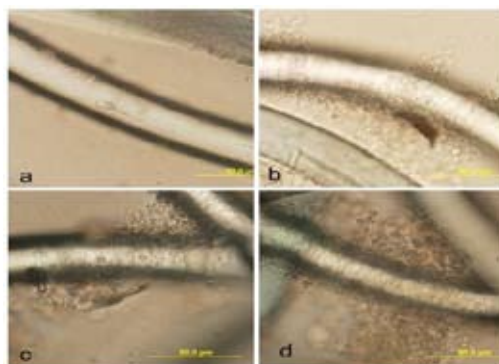
การหาปริมาณแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงในระบบการทดลองแบบกะ

การนับจำนวนแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง ซึ่งประกอบไปด้วยแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงกลุ่ม Denitrifying bacteria (DB) และกลุ่ม Nitrate reducing bacteria (NRB) ด้วยเทคนิค MPN แบบไมโครเทคนิค โดยทำการคัดเลือกตัวกลางแต่ละชุดการทดลองจำนวน 4 ชิ้นต่อชุดการทดลอง จาก 4 ถังปฏิบัติการที่บรรจุตัวกลาง โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าถังปฏิบัติการที่บรรจุแผ่นวุ้นในลอนชนิดทอไม่มีปมขนาด 1x1 นิ้ว พบแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงทั้ง 2 กลุ่มมากที่สุด คือ 4.09×10^5 เอ็มพีเอ็น/ตร.ม. และ 3.01×10^5 เอ็มพีเอ็น/ตร.ม. ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพการบำบัดไนเตรทเมื่อทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีนอกจากนั้นได้มีการวิเคราะห์ค่าที่ใช้แทนปริมาณของจุลินทรีย์ในระบบทั้งหมด ด้วยการวิเคราะห์ค่าของแข็งแขวนลอยระเหย (Volatile Suspended Solids, VSS) และวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งมวลชีวภาพที่ผลิตได้ต่อซับเตรทที่ใช้ไป (yield) จากถังปฏิบัติการที่บรรจุตัวกลาง โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าถังปฏิบัติการที่บรรจุแผ่นวุ้นในลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1x1 นิ้ว มีปริมาณจุลินทรีย์ในระบบมากที่สุด คือ ค่า VSS เท่ากับ 8.82×10^8 มก./ตร.ม. และค่า Yield 1.30×10^3 กรัมเซลล์/กรัมซับเตรท/ตร.ม.

ศึกษาลักษณะทางกายภาพของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะของตัวกลาง

ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเมือกชีวภาพ จากถังปฏิบัติการที่เกิดประสิทธิภาพการบำบัดไนเตรทได้ดีที่สุดมาทำการย้อมแบบเปียกเพื่อดูลักษณะภายนอกของเมือกชีวภาพ พบว่าลักษณะภายนอกของเมือกชีวภาพมีลักษณะเป็นแผ่นบางๆ สีน้ำตาล นอกจากนั้นได้ทำการคัดเลือกตัวกลางจากถังปฏิบัติการที่มีการบำบัดไนเตรทได้ดีที่สุด เพื่อดูลักษณะการยึดเกาะของเมือกชีวภาพบนตัวกลางที่ก้างขยา 100 เท่า ได้ทำการศึกษาในวันที่ 0, 30, 60 และ 120 ตามลำดับ (ภาพที่ 3) โดยมีการวัดขนาดความหนาของเมือกชีวภาพด้วยการใช้ไมโครมิเตอร์ (micrometer) (ตารางที่ 2)

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 22 ปี 2555



ภาพที่ 3 การศึกษาลักษณะทั่วไปของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะตัวกลาง ด้วยเทคนิคการย้อมแบบเปียกที่กำลังขยาย 100 เท่า จากถึงปฏิบัติการที่การบำบัดในเตรทได้ดีที่สุด วันที่ 0 (a) วันที่ 30 (b) วันที่ 60 (c) และวันที่ 120 (d)

ตารางที่ 2 ความหนาของเมือกชีวภาพจากพื้นผิวตัวกลางของแผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปม ขนาด 1x1 นิ้ว โดยทำการย้อมแบบเปียกเพื่อดูลักษณะของการเกาะของเมือกชีวภาพบนตัวกลาง

วันที่	ความหนาของเมือกชีวภาพ(ไมโครเมตร)
0	0
30	12.85 ±3.8
60	14.72 ±3.04
120	18.57 ±3.00

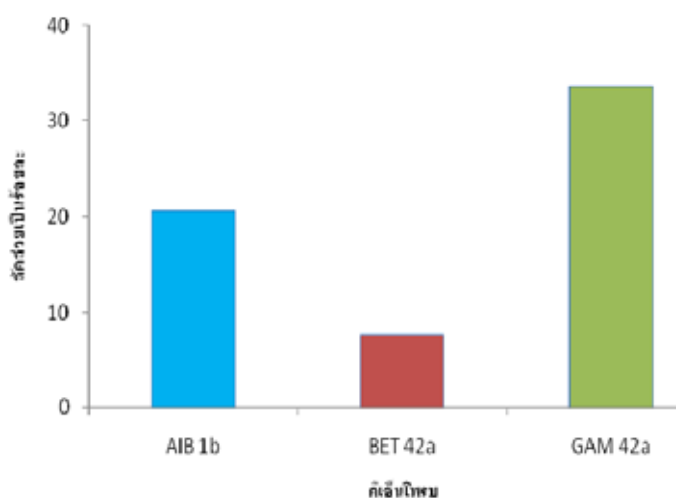
การศึกษาลักษณะทางชีวภาพจากเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะบนพื้นผิวตัวกลาง

จากการศึกษาลักษณะทางชีวภาพจากเมือกชีวภาพ โดยการนำเอาเมือกชีวภาพแต่ละถึงปฏิบัติการมาตรวจดูลักษณะของแบคทีเรียภายในเมือกชีวภาพด้วยการย้อมสี Gram's stain ผลปรากฏว่าพบแบคทีเรียรูปร่างท่อนยาวติดสีแกรมลบ และแบคทีเรียรูปร่างท่อนสั้นติดสีแกรมลบ และยังพบแบคทีเรียเส้นใย (Filamentous bacteria) จำนวนมากติดสีแกรมลบ

ศึกษาโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH

การตรวจสอบโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องด้วยเทคนิค FISH จากถึงปฏิบัติการที่มีการบำบัดในเตรทได้ดีที่สุด ผลปรากฏว่า พบแบคทีเรียในไฟลัม Proteobacteria โดยเฉพาะกลุ่มย่อย Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria และ Gammaproteobacteria ร้อยละ 20.6, 7.7 และ 33.6 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของเกยูร คำคง [8] ได้ตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียชนิดรีโอฟิงที่ใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบ

แบคทีเรียจีโนส *Methalophaga* ที่ติดดีเอ็นเอโพรบ MPH 730 และแบคทีเรีย *M. marina* ที่ติดดีเอ็นเอโพรบ MPHm 994 ซึ่งทั้งหมดเป็นกลุ่มย่อยในคลาส Gammaproteobacteria และสอดคล้องกับงานวิจัยของคอร์กัก ชัยสารและคณะ (2550) ได้ตรวจสอบแบคทีเรียด้วยเทคนิค Clone library จากตะกอนจุลินทรีย์ในกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน พบแบคทีเรียในจีโนส *Methylophaga* ซึ่งเป็นสมาชิกในคลาส Gammaproteobacteria เป็นกลุ่มเด่น และน่าจะมีส่วนสำคัญในกระบวนการดีไนตริฟิเคชันในน้ำที่มีความเค็มที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาพที่ 4)

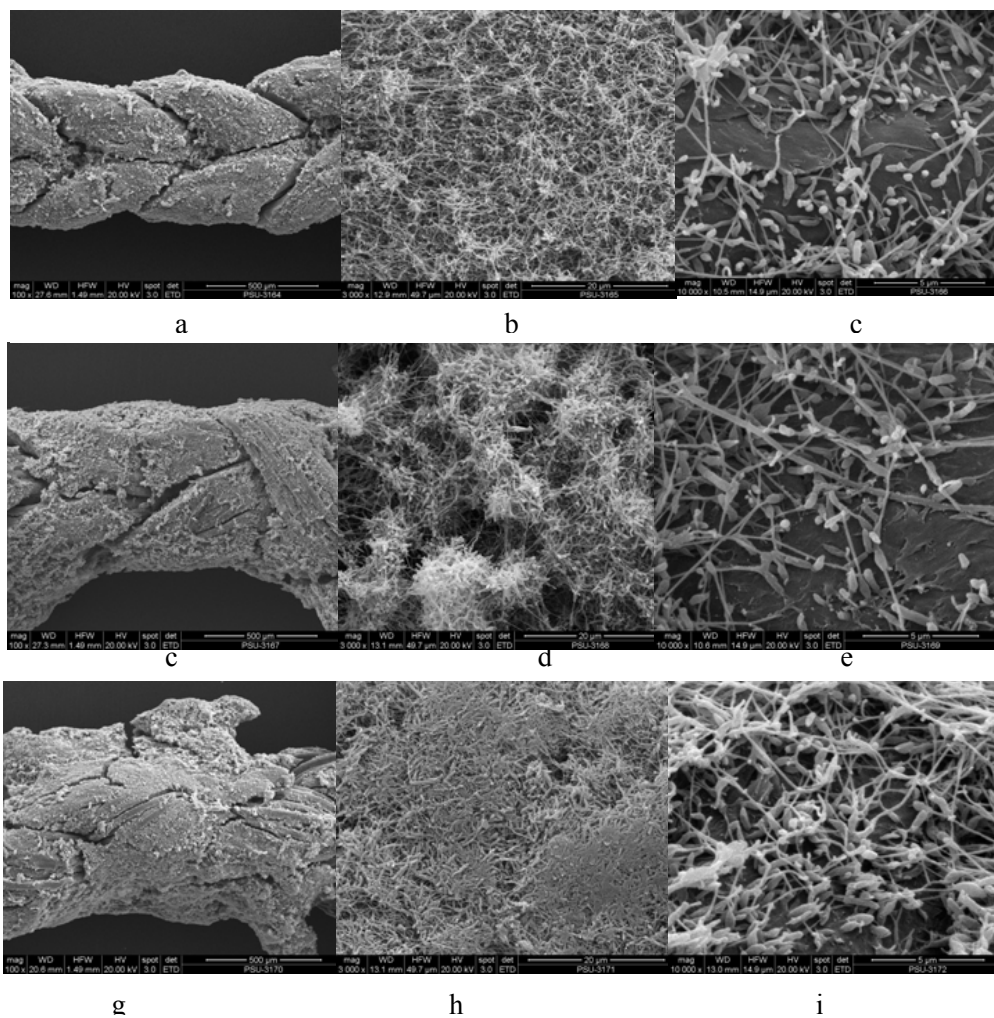


ภาพที่ 4 โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียจากถังปฏิกรณ์ที่มีการบำบัดในเตรทได้ดีที่สุดมาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH โดยมีสัดส่วนเป็นร้อยละของแบคทีเรียระดับไฟลัมไปจนถึงระดับสปีชีส์เมื่อเทียบกับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด โดยใช้ดีเอ็นเอโพรบ คือ ALB1 ซึ่งเป็นตัวแทนแบคทีเรียในกลุ่มย่อย *Alphaproteobacteria*, BET42a ซึ่งเป็นตัวแทนแบคทีเรียในกลุ่มย่อย *Betaproteobacteria* และ GAM42a ซึ่งเป็นตัวแทนแบคทีเรียในกลุ่มย่อย *Gammaproteobacteria*

ศึกษาลักษณะพื้นผิวของเมือกชีวภาพจากแบคทีเรียที่ยึดเกาะบนของตัวกลาง

ผลการตรวจสอบลักษณะพื้นผิวของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะบนผิวตัวกลางภายในถังปฏิกรณ์ที่มีประสิทธิภาพการบำบัดในเตรทดีที่สุด คือ แผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปม ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 100 เท่า 3,000 เท่า และ 10,000 เท่า จากเมือกชีวภาพที่มีอายุ 30, 60 และ 120 วัน ตามลำดับ (ภาพที่ 5) ผลปรากฏว่าในช่วง 30 วันแรกของการดำเนินระบบบนผิวตัวกลางเริ่มมีเมือกชีวภาพบางๆ เกิดขึ้น และเมื่อดำเนินระบบผ่านไป 60 วัน พบว่าบนผิวของตัวกลางนั้นเมือกชีวภาพเริ่มก่อตัวหนาขึ้นเมื่อเทียบกับช่วงแรกของการดำเนินระบบ เมื่อดำเนินระบบไปอย่างต่อเนื่องถึงวันที่ 120 พบว่าบนผิวของตัวกลางนั้นเกิดเมือกชีวภาพหนามาก อยู่กันหนาแน่นรวมตัวกันเป็นกระจุกและมีการกระจายตัวค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับช่วงแรกของการดำเนินระบบ เนื่องจากแผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมมีลักษณะโครงสร้างทางกายภาพและพื้นที่ผิวที่เหมาะสมต่อการเข้าไปยึดเกาะของจุลินทรีย์ แล้วพัฒนากลายเป็นเมือกชีวภาพได้ดีที่สุดจากตัวกลางทั้ง 4 ชนิด ซึ่งผลสอดคล้องกับการการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีที่พบว่าระบบเมื่อดำเนินไปอย่างต่อเนื่องระบบเริ่มมีการบำบัดในเตรทได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 22 ปี 2555



ภาพที่ 5 ลักษณะการยึดเกาะของแบคทีเรียบนตัวกลางชนิดแผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีขนาด 1×1 นิ้ว โดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 100 เท่า 3,000 เท่า และ 10,000 เท่า ตามลำดับ :a - c เมือกชีวภาพที่อายุ 30 วัน ; d - f เมือกชีวภาพที่อายุ 60 วัน และ g - i เมือกชีวภาพที่อายุ 120 วัน

สรุปผลการทดลอง

จากการเปรียบเทียบชนิดตัวกลางที่เหมาะสมต่อการบำบัดในเตรทจากเมือกชีวภาพ โดยใช้ตัวกลาง 4 ชนิด คือ ใบบอล หินภูเขาไฟ เปลือกหอยนางรม และแผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1×1 นิ้ว เปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าแผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 1×1 นิ้ว เป็นตัวกลางที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดในเตรทได้ดีที่สุด เนื่องจากโครงสร้างทางกายภาพของตัวกลางดังกล่าว เหมาะสมแก่การยิดเกาะของแบคทีเรีย สอดคล้องกับผลการนับจำนวนแบคทีเรียในตรีฟอิงด้วยเทคนิค MPN แบบไมโครเทคนิค และ การวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งมวลชีวภาพที่ผลิตได้ต่อซับเตรทที่ใช้ไป (yield) พบว่าถึงปฏิกิริยาดังกล่าวมีปริมาณแบคทีเรียในตรีฟอิงมากที่สุด และการตรวจสอบโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียภายในเมือกชีวภาพด้วยเทคนิค FISH ร่วมกับการตรวจลักษณะของเมือกชีวภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฉากสว่างและแบบส่องกราด พบว่าในช่วงแรกของการทดลองพบการเกิดเมือกชีวภาพบางๆ แต่เมื่อระบบดำเนินไปอย่างต่อเนื่อง พบว่าเมือกชีวภาพเริ่มหนาและจับเกาะตัวกันเป็นกลุ่ม มีการตรวจพบปริมาณแบคทีเรียในไฟลัม Proteobacteria คลาส Gammaproteobacteria เป็นกลุ่มเด่น

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) โครงการทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2554 ด้านการบริหารจัดการทรัพยากรน้ำ ผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่สนับสนุนสถานที่และอุปกรณ์ในการดำเนินการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- [1] ยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตร. (2553). “การเลี้ยงปลากระพงขาวในระบบน้ำหมุนเวียนและความเป็นไปได้ในการพัฒนาเชิง,” ใน เอกสารประกอบสัมมนาเรื่องการพัฒนาการเลี้ยงปลากระพงขาวในน้ำจืดด้วยระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียนและบ่อดิน, (หน้า 1-11). พัทลุง: มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- [2] นุฏ อินทระสังขา. (2553). “ปัญหาและแนวทางการควบคุมระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียน,” ใน เอกสารประกอบสัมมนาเรื่องการพัฒนาการเลี้ยงปลากระพงขาวในน้ำจืดด้วยระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียนและบ่อดิน, (หน้า 12-14). พัทลุง: มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- [3] ดอกกรัก ชัยสาร จรรย์รัตน์ พ่วงฟู และนุฏอินทระสังขา . (2550). “การศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่บำบัดสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในน้ำทิ้งที่มีความเค็มด้วยระบบเอสบีอาร์แบบสองขั้นตอนโดยใช้เทคนิคด้าน 16S rRNA,” วารสารวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมไทย. 21(3), 83-94.
- [4] นิแอ นิยะ พีระศักดิ์ ศิริวัฒน์ สมพงษ์ โอทอง นพดล สุกระกาญจน์ และ นุฏ อินทระสังขา. (2548). “การประยุกต์การวิเคราะห์ไนเตรทในน้ำเสียที่มีความเค็มโดยวิธี Copper-Cadmium Reduction Column และการใช้ชุดวิเคราะห์ไนเตรทสำเร็จรูปของ Merck Ltd,” วารสารวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมไทย. 19(1), 113-121.
- [5] APHA. (1992). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Washington, DC: American Public Health Association.

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 22 ปี 2555

- [6] Soto, O., S'anchezo, Asp'e, E. and Roeckel, M. (2002). "Denitrification kinetics of simulated fish processing wastewater at different ratios of nitrate to biomass," **Biotechnology Letters**. 24(3), 1173-1176.
- [7] Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K-L. (1995). "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cell without cultivation," **Applied and Environmental Microbiology**. 59, 143-169.
- [8] เกยูร คำคง. (2550). ตรวจสอบและติดตามแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงและไนตริไฟอิง ในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียนด้วยเทคนิค **Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สงขลา : มหาวิทยาลัยทักษิณ.