



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การตรึงไนตริไฟอิงแบคทีเรียบนวัสดุชีวภาพไคโตซาน
เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง

โดย

ปราณี เลิศสุทธีวงศ์
สรวิศ เผ่าทองสุข
วิบูลย์ลักษณะณ์ พึ่งรัศมี

กรกฎาคม 2556

กิตติกรรมประกาศ

จากการที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้อนุมัติให้ทุนวิจัยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปี พ.ศ. 2554 เพื่อศึกษาวิจัยเรื่อง “การตรึงไนตริไฟอิงแบคทีเรียบนวัสดุชีวภาพไคโตซานเพื่อใช้ในการบำบัดน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง” คณะผู้วิจัยขอขอบคุณในการสนับสนุนเงินทุนวิจัยครั้งนี้ ซึ่งทำให้งานวิจัยสำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศูนย์วัสดุชีวภาพไคติน-ไคโตซาน สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ และศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือสำหรับทำวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความร่วมมือและความสะดวกตลอดการวิจัย

สุดท้ายนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะกรรมการพิจารณาทุน คณะกรรมการติดตาม และประเมินผลงานวิจัยที่ให้ข้อเสนอแนะต่างๆ ที่ทำให้งานวิจัยนี้มีคุณค่ามากยิ่งขึ้น

คณะผู้วิจัย

จพ
เลขหมู่ ลว 15
เลขทะเบียน 016743
วัน, เดือน, ปี 21 ก.ค. 58

ชื่อโครงการวิจัย การตรึงไนโตรเจนในไตรฟองแบคทีเรียบนวัสดุชีวภาพโคโคซานเพื่อใช้ในการบำบัดน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง

ชื่อผู้วิจัย อาจารย์ ดร. ปราณี เลิศสุทธิวงค์
 ดร. สรวิต เผ่าทองสุข
 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิบูลย์ลักษณ์ ฟังรัมย์

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ พฤษภาคม 2555

บทคัดย่อ

งานวิจัยในปีที่ 1 นี้เป็นการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงเชื้อไนโตรเจนออกซิไดซิงแบคทีเรียบนวัสดุชีวภาพโคโคซาน ซึ่งปัจจัยที่ทำการศึกษา ได้แก่ ระยะเวลาในการตรึงเชื้อไนโตรเจนออกซิไดซิงแบคทีเรีย ค่าความเป็นกรด-ด่างหรือพีเอชที่ใช้ในการปรับประจุบนพื้นผิวของโคโคซาน และขนาดของโคโคซาน จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการตรึงเชื่อนานขึ้น (สูงสุด 24 ชั่วโมง) ส่งผลให้ปริมาณเชื้อที่ตรึงบนวัสดุโคโคซานซึ่งตรวจวัดจากอัตราการบำบัดไนโตรเจนมีมากขึ้นตามไปด้วย และเมื่อปรับประจุบนพื้นผิวของโคโคซานให้มีประจุบวกในสภาวะกรดอ่อน (พีเอช 5.5-6.5) ทำให้สามารถจับกับเชื้อได้ดีขึ้น ส่งผลให้อัตราการบำบัดไนโตรเจนสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ปรับประจุบนพื้นผิวโคโคซานหรือชุดที่ปรับพีเอชเท่ากับ 7.5 นอกจากนี้ขนาดของโคโคซานยังมีผลต่อการตรึงเชื้อไนโตรเจนออกซิไดซิงแบคทีเรียเช่นกัน โดยพบว่าโคโคซานที่มีขนาดเล็กจะมีพื้นที่ผิวมากส่งผลให้มีพื้นที่ในการเกาะติดของเชื้อมากขึ้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ระยะเวลาในการตรึงเชื้อ การปรับประจุบนพื้นผิว และขนาดของโคโคซานมีผลต่อการตรึงเชื้อไนโตรเจนออกซิไดซิงแบคทีเรีย โดยสภาวะที่เหมาะสมในการตรึง คือ โคโคซานควรมีขนาดประมาณ 1-5 มม. และทำการปรับประจุบนพื้นผิวโคโคซานด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอช 6.5 และระยะเวลาในการตรึงเชื้อ เท่ากับ 24 ชั่วโมง

Project Title **Immobilization of nitrifying bacteria on chitosan biomaterial for water treatment
in shrimp pond**

Name of the Investigators **Dr. Pranee Lertsutthiwong**
Dr. Sorawit Powtongsook
Assistant Professor Dr. Wiboonluk Pungrasmi

Year **May 2012**

Abstract

The first year research has been focused on parameter affecting the immobilization of nitrite oxidizing bacteria (NOB) on chitosan biomaterial i.e. immobilization time, surface charge modification by pH pretreatment and particle size of chitosan. The results demonstrated that the amount of NOB immobilized on chitosan, as indicated by nitrite removal rate, increased with the incubation time (up to 24 h). In slightly acidic treatment (pH 5.5-6.5), positive charges dominated on the surface of chitosan particles enhanced NOB attachment on chitosan surface. As a result, nitrite removal rate was therefore enhanced when compared with control and pH 7.5. In addition, size of chitosan particles also affected the immobilization of NOB. Smaller particle size of chitosan provided larger surface area for NOB attachment hence higher nitrite removal was found. In conclusion, immobilization time, pH pretreatment and size of chitosan affects the immobilization of NOB on chitosan and the optimal condition for NOB immobilization was 1-5 mm chitosan particles with pH 6.5 pre-treatment and incubating for the duration of 24 hours.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อ	iii
สารบัญ	v
รายการตารางประกอบ	vii
รายการภาพประกอบ	viii
1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ (2 ปี)	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2 การสำรวจแนวคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง	4
2.2 การบำบัดน้ำในโตรเจนทางชีวภาพ	6
2.2.1 กระบวนการแอมโมเนียเฟิเคชัน	6
2.2.2 กระบวนการไนตริฟิเคชัน	7
2.2.3 กระบวนการดีไนตริฟิเคชัน	8
2.3 การควบคุมคุณภาพน้ำโดยใช้ตัวกรองชีวภาพ	9
2.4 สารประกอบในโตรเจน	10
2.4.1 แอมโมเนีย	10
2.4.2 ไนไตรต์	10
2.4.3 ไนเตรต	11
2.5 ไคโตซาน	11
2.5.1 ลักษณะทั่วไปของไคตินและไคโตซาน	11
2.5.2 สมบัติของไคตินและไคโตซาน	12
2.5.2.1 การละลาย	12
2.5.2.2 ความหนืด	12
2.5.2.3 สมบัติพอลิอิเล็กโทรไลต์	13

2.5.2.4	น้ำหนักโมเลกุล	13
2.5.2.5	ระดับการกำจัดหมู่อะซิetyl	13
2.5.3	การใช้ประโยชน์จากโคโคซาน	14
2.6	การสำรวจแนวคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15
2.6.1	ปัจจัยของโคโคซานต่อการตรึงเชื้อ	15
2.6.2	การใช้โคโคซานในการบำบัดคุณภาพน้ำ	15
3	วิธีการวิจัย	18
3.1	จัดหาวัตถุดิบและวิเคราะห์สมบัติ	18
3.2	ศึกษาปัจจัยและสภาวะที่มีผลต่อการตรึงเชื้อในไทรศออกซิโคซิง แบคทีเรียบนโคโคซาน	28
3.2.1	การเตรียมสภาพของตัวกรองชีวภาพไนตริไฟเคชัน	18
3.2.2	ระยะเวลาในการตรึงเชื้อ	21
3.2.3	ผลของการปรับพื้นผิวของโคโคซาน	22
3.2.4	ขนาดอนุภาคของโคโคซาน	22
3.2.5	การตรวจสอบประสิทธิภาพในการบำบัดไนโตรเจน	22
3.2.6	การวิเคราะห์ทางสถิติ	22
4	ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	23
4.1	ปัจจัยและสภาวะที่มีผลต่อการตรึงเชื้อในไทรศออกซิโคซิง แบคทีเรียบนโคโคซาน	23
4.1.1	ระยะเวลาในการตรึงเชื้อ	25
4.1.2	ผลของการปรับพื้นผิวของโคโคซาน	29
4.1.3	ขนาดอนุภาคของโคโคซาน	31
5	ข้อสรุป	33
	ส่วนอ้างอิง	34
	ภาคผนวก	39
	ภาคผนวก ก: สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองและวิธีวิเคราะห์ โคโคซาน	40
	ภาคผนวก ข: วิธีวิเคราะห์คุณภาพน้ำ	44
	ภาคผนวก ค: ผลลัพธ์ที่ได้จากงานวิจัย	50

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
2.1	ปริมาณการส่งออกกุ้งแช่เย็นแช่แข็งของไทยในช่วงปี พ.ศ. 2546-2550	4
3.1	ตัวอย่างโคโคซานทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัย	18
4.1	สมบัติของโคโคซานที่ใช้ในการศึกษา	23

รายการภาพประกอบ

ภาพที่	หน้า
2.1 ปริมาณ ไนโตรเจนที่เติมเข้าไปและสะสมอยู่ในส่วนต่างๆ ของบ่อเลี้ยงกุ้งระบบปิด	5
2.2 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส ไลคติน และโคโคซาน	11
3.1 วัสดุพลาสติกโพลีเอทิลีน รุ่น BCN-009	19
3.2 ชุดปฏิกรณ์ที่ใช้ในการคัดเลือกไนตริฟายอิงแบคทีเรียกลุ่ม NOB บนตัวกลางพลาสติก	20
3.3 การติดตั้งอุปกรณ์สำหรับการตรวจวัดอัตราการบำบัดไนโตรเจนของตัวกลางพลาสติกที่ผ่านการตรึงเชื้อและคัดเลือกให้เหลือเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม NOB	21
4.1 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย ไนโตรเจน และไนเตรต ของตัวกรองชีวภาพไนตริฟิเคชันในถังคัดเลือกเชื้อ NOB	24
4.2 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย ไนโตรเจน และไนเตรต ระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของตัวกรองชีวภาพไนตริฟิเคชันที่ทำการคัดเลือกให้เหลือแต่เชื้อ NOB	25
4.3 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจนด้วยโคโคซานที่ผ่านการตรึงเชื้อไนโตรเจนออกซิไดซิงแบคทีเรียที่เป็นเวลา 3 6 12 24 และ 72 ชม. เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่ตรึงเชื้อ)	26
4.4 อัตราการบำบัดไนโตรเจนของโคโคซานที่ผ่านการตรึงเชื้อไนโตรเจนออกซิไดซิงแบคทีเรียเป็นเวลา 3 6 12 24 และ 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่ตรึงเชื้อ)	26
4.5 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงพื้นผิวของโคโคซานที่ไม่ผ่านการตรึงเชื้อ (ชุดควบคุม) และโคโคซานที่ผ่านการตรึงเชื้อไนโตรเจนออกซิไดซิงแบคทีเรียเป็นเวลา 3 และ 24 ชม. (กำลังขยาย 5,000 เท่า)	28
4.6 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจนด้วยโคโคซานที่ทำการปรับพื้นผิวด้วยบัพเฟอร์ที่พีเอช 5.5 6.5 และ 7.5 หลังนำไปตรึงเชื้อไนโตรเจนออกซิไดซิงแบคทีเรียที่เป็นเวลา 24 ชม. เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (แช่น้ำกลั่น)	30

- 4.7 อัตราการบำบัดไนโตรเจนของโคโคซานที่ทำการปรับพื้นผิวด้วยบัพเฟอร์ที่พีเอช 5.5 6.5 และ 7.5 หลังนำไปตรึงเชื้อไนโตรด็อกซีโคซิงแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชม. เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (แช่น้ำกลั่น). 30
- 4.8 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรด็อกซีโคโคซาน 3 ขนาด ภายหลังจากนำไปตรึงเชื้อไนโตรด็อกซีโคซิงแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชม. 32
- 4.9 อัตราการบำบัดไนโตรเจนของโคโคซาน 3 ขนาด ภายหลังจากนำไปตรึงเชื้อไนโตรด็อกซีโคซิงแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชม 32

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะกุ้งมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก โดยในแต่ละปีสามารถนำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นมูลค่าหลายหมื่นล้านบาท และยังเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมยุทธศาสตร์ของประเทศที่ถือว่ามีความศักยภาพในการส่งออก โดยผลผลิตกุ้งประมาณร้อยละ 87 ของทั้งหมดถูกส่งออกไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศในรูปของกุ้งสดแช่เย็นแช่แข็ง กุ้งแปรรูป และกุ้งกระป๋อง และเพื่อให้ประเทศของเราสามารถรักษาตำแหน่งหนึ่งในผู้นำการส่งออกกุ้ง ประเทศไทยจึงต้องมียุทธศาสตร์การค้าระหว่างประเทศที่ดีควบคู่กับการรักษาคุณภาพกุ้งให้เป็นที่ต้องการของตลาดโลก ซึ่งปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อสุขภาพและผลผลิตกุ้ง คือ การควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งนั่นเอง

การเลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่จะใช้ระบบบ่อดินกลางแจ้งซึ่งมีปัญหาสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมไม่ว่าจะเป็นปัญหาสภาพดิน การปนเปื้อนของเชื้อโรคที่ไม่พึงประสงค์จากดิน และการรั่วซึมของน้ำในบ่อ ในปัจจุบันจึงมีการปรับปรุงระบบการเลี้ยงกุ้งไปสู่ระบบบ่อไร้อินกลางแจ้ง โดยจะเป็นบ่อที่ปูพื้นด้วยผ้าใบทั้งหมดทำให้ไม่มีตะกอนดินที่ก้นบ่อจึงสามารถลดปัญหาดังกล่าวลงได้ อย่างไรก็ตามระบบบ่อไร้อินกลางแจ้งมักประสบปัญหาการสะสมของสารประกอบอนินทรีย์ในโตรเจน โดยเฉพาะไนไตรต์อยู่เสมอ สืบเนื่องมาจากระบบนิเวศภายในบ่อไม่เอื้ออำนวยต่อกลุ่มจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดปฏิกริยาไนตริฟิเคชันได้อย่างสมบูรณ์ โดยบางครั้งพบความเข้มข้นของไนไตรต์สูงกว่า 10 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับที่อันตราย อาจทำให้กุ้งที่เลี้ยงบางส่วนตายเนื่องจากพิษของไนไตรต์ และบางส่วนเกิดความเครียด อ่อนแอและตายจากการเกิดโรค ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องหาแนวทางเพื่อกำจัดสารประกอบอนินทรีย์ในโตรเจนออกจากระบบ โดยการประยุกต์ใช้ระบบตัวกรองชีวภาพไนตริฟิเคชันเข้ากับระบบบ่อไร้อิน ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่เหมาะสม การบำบัดผ่านกระบวนการไนตริฟิเคชันในลักษณะนี้จะเกิดขึ้นที่บริเวณพื้นผิวของตัวกรองด้วยกลไกทางชีวภาพของแบคทีเรียกลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Ammonia-oxidizing Bacteria; AOB) จะออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรต์ และไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Nitrite-oxidizing Bacteria; NOB) จะออกซิไดซ์ไนไตรต์ไปเป็นไนเตรต ตามลำดับ เนื่องจากแบคทีเรียในกระบวนการนี้มีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้ามากและมีความอ่อนไหวต่อสิ่งแวดล้อมสูง ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ให้มีปริมาณมากและคงอยู่ในระบบด้วยการตรึงบนวัสดุตัวกลาง จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยในการบำบัดคุณภาพน้ำได้ อย่างไรก็ตามวัสดุส่วนใหญ่ที่ใช้ในการตรึงเชื้อมัก

ทำจากพลาสติกหรือใยสังเคราะห์ที่มีขนาดใหญ่ ย่อยสลายได้ยากในธรรมชาติและมีราคาสูง จึงต้องมีการจัดการพื้นที่บำบัดแยกออกจากบ่อเลี้ยงกุ้งทำให้ต้องสูญเสียพลังงานในการขับเคลื่อนมวลน้ำออกมาผ่านระบบบำบัด และสิ้นเปลืองเงินลงทุนจากค่าวัสดุตัวกลางเหล่านั้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการนำวัสดุชีวภาพที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมาใช้ในการตรึงเชื้อ โดยเชื้อที่ตรึงบนวัสดุดังกล่าวสามารถนำมาใช้ได้โดยตรงในบ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งจะเป็นการลดต้นทุนในการสร้างระบบบำบัดแยกออกจากบ่อเลี้ยงกุ้งดังที่ใช้ในปัจจุบัน

จากสมบัติที่โดดเด่นของไคโตซาน ได้แก่ สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม มีความเป็นประจุบวกในสภาวะกรดอ่อน และสามารถสร้างพันธะกับประจุลบที่อยู่บนผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ ทำให้มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นตัวกลางชีวภาพเพื่อตรึงเชื้อแบคทีเรียสำหรับการบำบัดคุณภาพน้ำในระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ โดยงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนากระบวนการตรึงเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียกลุ่มไนโทรค็อกซิโคคิงแบคทีเรียบนไคโตซานเพื่อประยุกต์ใช้งานในระบบบำบัดคุณภาพน้ำสำหรับบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยทำการทดลองภายใต้สภาวะจำลองของบ่อเลี้ยงกุ้งที่ดำเนินการเหมือนจริง ด้วยระบบการเลี้ยงแบบบ่อไร้นกกลางแจ้งเพื่อเป็นต้นแบบของการศึกษา โดยมุ่งเน้นประโยชน์การนำไปสู่การใช้งานได้จริง ไม่ซับซ้อน และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ (2 ปี)

- 1.2.1 เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียบนวัสดุชีวภาพไคโตซาน (ปีที่ 1)
- 1.2.2 เพื่อพัฒนาหัวเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียบนตัวกลางชีวภาพพร้อมใช้งานและทำการทดสอบภายใต้สภาวะเหมือนการใช้งานจริงของระบบบำบัดคุณภาพน้ำสำหรับบ่อเลี้ยงกุ้ง (ปีที่ 2)
- 1.2.3 ศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุไคโตซาน (ปีที่ 2)

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการวิจัยในระดับทดลอง ดำเนินการ ณ อุณหภูมิห้อง ที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ และห้องปฏิบัติการศูนย์วัสดุชีวภาพไคติน-ไคโตซาน สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีการกำหนดขอบเขตของงานวิจัยดังนี้

- 1.3.1 หัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลองเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากระบบหมุนเวียนน้ำแบบเปิดสำหรับใช้เลี้ยงกุ้งแบบความหนาแน่นสูง ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 1.3.2 ตัวกรองที่ใช้ในการทดลองเป็นตัวกลางพลาสติกโพลีเอธิลีนชนิดช่วยกระจายการไหลของน้ำให้ทั่วทั้งพื้นผิว (Random Flow Plastic Media) รุ่น BCN-009 (2H, Germany)
- 1.3.3 น้ำทะเลที่ใช้ในการทดลองมีค่าความเค็มเท่ากับ 30 พีพีที

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ได้เทคโนโลยีในการตรึงไนโตรเจนออกซิโดซิงแบคทีเรียบนตัวกลางแขวนลอยที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติสำหรับใช้ควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ (ปีที่ 1)
- 1.4.2 เป็นต้นแบบผลิตภัณฑ์ตัวกลางชีวภาพที่ตรึงไนโตรเจนออกซิโดซิงแบคทีเรียพร้อมใช้งาน สามารถใช้งานได้จริง ไม่ซับซ้อน และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เพื่อเป็นทางเลือกในการบำบัดคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ (ปีที่ 2)

บทที่ 2

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากสถานการณ์การส่งออกกุ้งแช่เย็นแช่แข็งของไทยในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา พบว่า มีปริมาณการส่งออกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยในปี พ.ศ. 2550 มีปริมาณการส่งออกกุ้งแช่เย็นแช่แข็งเท่ากับ 196,997 ตัน ซึ่งมากกว่าในปี พ.ศ. 2546 ถึงร้อยละ 65 ดังแสดงในตารางที่ 2.1 โดยตลาดส่งออกที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่ ประเทศสหรัฐอเมริกาและญี่ปุ่น (กรมศุลกากร, 2551)

ตารางที่ 2.1 ปริมาณการส่งออกกุ้งแช่เย็นแช่แข็งของไทยในช่วงปี พ.ศ. 2546-2550

ปี พ.ศ.	ปริมาณ (ตัน)
2546	118,921
2547	135,952
2548	157,985
2549	178,246
2550	196,997

จากตารางที่ 2.1 แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของประเทศไทยในการผลิตกุ้งเพื่อการส่งออกที่มีคุณภาพและเป็นที่ยอมรับของตลาดโลกซึ่งปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อคุณภาพกุ้งก็คือการควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง

2.1 คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง

ไนโตรเจนเกือบทั้งหมดที่เข้าสู่บ่อเลี้ยงกุ้งระบบปิดมาจากอาหารที่ให้กุ้งกิน (พุทธ ส่องแสงจินดา, 2549) ซึ่งกุ้งสามารถเก็บไนโตรเจนไว้ในเนื้อกุ้งได้ประมาณร้อยละ 21.8 ส่วนที่เหลือประมาณร้อยละ 80 จะตกค้างอยู่ในบ่อในรูปของเศษอาหารและสิ่งขับถ่ายของกุ้งที่บริเวณก้นบ่อ โดยไนโตรเจนที่สะสมอยู่ในบ่อจะเปลี่ยนแปลงจากรูปสารอินทรีย์ไนโตรเจนซึ่งเป็นอาหารของแบคทีเรียและสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กไปอยู่ในรูปแอมโมเนียและไนไตรต์ที่เป็นพิษต่อกุ้ง โดยสารประกอบไนโตรเจนรูปต่างๆ จะเกิดการหมุนเวียนไปในระบบนิเวศน์ของบ่อเลี้ยงกุ้งซึ่งบางส่วนจะถูกเปลี่ยนเป็นแก๊สไนโตรเจน ดังแสดงในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 ปริมาณ ไนโตรเจนที่เติมเข้าไปและสะสมอยู่ในส่วนต่างๆ ของบ่อเลี้ยงกุ้งระบบปิด (พุทธ ส่องแสงจินดา, 2549)

เป็นที่ทราบกันดีว่าบ่อไร้ดินกลางแจ้งเป็นบ่อที่ได้รับความนิยมสำหรับการเลี้ยงกุ้งแบบความหนาแน่นสูง ซึ่งลักษณะของบ่อเป็นบ่อซีเมนต์หรือบ่อดินที่มีการปูพื้นด้วยผ้าพลาสติก ระบบนี้จะไม่มียตะกอนดินก้นบ่อซึ่งจะพบปัญหาการสะสมของไนไตรต์เกิดขึ้นในระหว่างการเลี้ยงกุ้งเนื่องจากเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันที่ไม่สมบูรณ์ภายในบ่อ (มะลิวัลย์ คุตะ โค และคณะ, 2550) แต่การได้รับแสงตามธรรมชาติจะทำให้เกิดแพลงก์ตอนพืชซึ่งสามารถช่วยควบคุมคุณภาพน้ำภายในบ่อได้ โดยแพลงก์ตอนพืชจะใช้สารอินทรีย์ไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตทั้งในรูปแบบของแอมโมเนียและไนเตรต แต่เมื่อแพลงก์ตอนมีจำนวนมากขึ้นจะทำให้เกิดการบดบังแสงกันเองและตายในที่สุด

จากการสืบค้นข้อมูล พบว่า มีการศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวางในการบำบัดน้ำเพื่อกำจัดของเสียไนโตรเจนดังกล่าว ตัวอย่างเช่น การใช้สาหร่ายเซลล์เดียวในการกำจัดของเสียไนโตรเจน โดยสาหร่ายเซลล์เดี่ยวนี้อาจใช้ของเสียดังกล่าวเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญเติบโต ดังนั้นการแยกสาหร่ายเซลล์เดียวออกจากระบบน้ำเลี้ยงกุ้งจึงเป็นการกำจัดของเสียไนโตรเจนออกจากระบบด้วยโดยข้อดีของการใช้สาหร่ายเซลล์เดียวคือกระบวนการไม่ยุ่งยากซับซ้อน แต่ข้อเสียก็คือสาหร่ายเซลล์เดียวจะมีขนาดเล็กมากซึ่งยากแก่การกำจัดออกจากระบบน้ำด้วยวิธีการกรองทั่วไป และหาก

ในระบบมีสาหร่ายมากเกินไปจะทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดลง อันเนื่องมาจากการหายใจของสาหร่ายในเวลากลางคืน และเมื่อสาหร่ายตายลงก็จะย่อยสลายและปลดปล่อยสารประกอบไนโตรเจนกลับคืนมาอยู่ในน้ำ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอีกมากมายที่พยายามศึกษาถึงวิธีการบำบัดสารประกอบไนโตรเจนออกจากริ่่น้ำด้วยวิธีการอื่นๆ เช่น การใช้สารช่วยในการตกตะกอนชนิดต่างๆ (Pan et al., 2006) และการใช้แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายของเสียในโตรเจนในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ (Liu et al., 2000)

2.2 การบำบัดในโตรเจนทางชีวภาพ

การบำบัดสารประกอบอินทรีย์ในโตรเจนในน้ำซึ่งสามารถทำได้โดยใช้วิธีการทางชีวภาพด้วยกระบวนการแอมโมนิฟิเคชัน ซึ่งอาศัยการทำงานของแบคทีเรีย เชื้อราและแบคทีเรียเส้นใยบางกลุ่ม โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะเปลี่ยนรูปสารประกอบอินทรีย์ในโตรเจนให้อยู่ในรูปของแอมโมนีในโตรเจนที่มีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องกำจัดแอมโมนีโดยผ่านกระบวนการไนตริฟิเคชันซึ่งไนตริฟายอิงแบคทีเรียจะออกซิไดซ์แอมโมนีให้เป็นไนไตรต์และไนเตรต ตามลำดับ ในสภาวะที่มีการเติมออกซิเจน จากนั้นจะเกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันต่อ โดยการทำงานของดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย ซึ่งไนเตรตที่เกิดขึ้นจะถูกลดรูปให้เป็นก๊าซไนโตรเจนในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน โดยรายละเอียดสำหรับแต่ละกระบวนการที่เกิดขึ้น มีดังนี้

2.2.1 กระบวนการแอมโมนิฟิเคชัน (Ammonification)

เป็นกระบวนการเปลี่ยนรูปสารประกอบอินทรีย์ในโตรเจนพวกเศษอาหารที่เหลือ เซลล์สัตว์ที่ตายแล้ว ซึ่งอยู่ในรูปโปรตีน โพลีเปปไทด์ และกรดอะมิโน ไปอยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์โดยแบคทีเรียที่มีบทบาทในขั้นตอนนี้ส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรฟ (Heterotroph) ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในชั้นน้ำและดินตะกอนก้นบ่อ แอมโมนิฟิเคชันสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจนและสภาวะไร้ออกซิเจน แต่เนื่องจากสารอินทรีย์และแบคทีเรียมักพบมากในดินตะกอน การผลิตแอมโมนีส่วนใหญ่จึงเกิดขึ้นที่ผิวชั้นดินตะกอนใต้น้ำ ส่วนแอมโมนีที่เกิดในชั้นน้ำจะถูกพืชน้ำจืดซึมไปใช้เป็นอาหาร และบางส่วนจะถูกแบคทีเรียเปลี่ยนเป็นไนเตรตด้วยกระบวนการไนตริฟิเคชัน

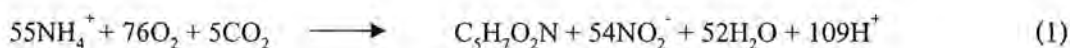
สำหรับกระบวนการแอมโมนิฟิเคชันในบ่อเลี้ยงกุ้งจะเกิดขึ้นเมื่อมีการให้อาหารกับกุ้ง โดยกุ้งที่เลี้ยงในบ่อจะต้องได้รับออกซิเจนในปริมาณที่พอเพียง โดยในน้ำควรมีปริมาณออกซิเจนมากกว่า 4 มก.ต่อลิตร (ชลอ ลิมสุวรรณ, 2535) เพื่อให้กุ้งสามารถสร้างพลังงานสำหรับการ

ดำรงชีวิตและมีการเจริญเติบโตที่ดี ซึ่งผลจากการเผาผลาญโปรตีนเพื่อการเจริญเติบโตของกุ้งจะมีผลทำให้เกิดแอมโมเนียซึ่งจะเป็นพิษกับสิ่งมีชีวิต ดังนั้นกุ้งจึงต้องขับแอมโมเนียออกจากร่างกาย

2.2.2 กระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification)

เป็นกระบวนการชีวภาพที่เปลี่ยนแอมโมเนียหรือแอมโมเนียมไอออนซึ่งมีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์น้ำให้เป็นไนเตรตภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน โดยอาศัยการทำงานของแบคทีเรีย 2 กลุ่ม ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มออกซิโทโทรฟที่ใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์หรือไบคาร์บอเนตและได้พลังงานออกมา โดยปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันมี 2 กระบวนการย่อยดังนี้

1) กระบวนการไนโทรติฟิเคชันหรือแอมโมเนียมออกซิเดชัน เป็นกระบวนการเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรต์ ซึ่งอาศัยการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มแอมโมเนียมออกซิไดซิงหรือ AOB (Ammonium Oxidizing Bacteria) ดังสมการที่ 1



2) กระบวนการไนเตรติฟิเคชันหรือไนไตรต์ออกซิเดชัน เป็นกระบวนการเปลี่ยนไนไตรต์ไปเป็นไนเตรต ซึ่งอาศัยการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มไนไตรต์ออกซิไดซิงหรือ NOB (Nitrite Oxidizing Bacteria) ดังสมการที่ 2



จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในกระบวนการไนตริฟิเคชัน ได้แก่ ไนตริฟายอิงแบคทีเรียหรือไนตริฟายเออร์ (Nitrifying bacteria or Nitrifier) ซึ่งพบได้ทั้งในดิน น้ำจืด น้ำทะเล หรือน้ำเสีย แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญเติบโตได้โดยใช้ออกซิเจนในการหายใจ แหล่งคาร์บอนได้จากสารอนินทรีย์ คาร์บอนไดออกไซด์หรือไบคาร์บอเนต และใช้การออกซิไดซ์สารประกอบไนโตรเจนให้เป็นพลังงาน เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่เจริญเติบโตช้า โดยเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 °ซ และพีเอช ในช่วง 7.5-8.0 โดยจะหยุดการเจริญเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 5 °ซ หรือสูงกว่า 42 °ซ ไนตริฟายอิงแบคทีเรียสามารถแบ่งตามการทำงานออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ

1) แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (*Ammonia-oxidizing Bacteria: AOB*) แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรต์ที่รู้จักกันดีคือ สกุล *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus* และ *Nitrosolobus* ปริมาณและสกุลที่พบเป็นชนิดเด่นขึ้นอยู่กับลักษณะของน้ำเสียในระบบบำบัด

AOB เป็นแบคทีเรียเคมีโพลิโทโทรฟชนิดเค็ดขาด (Obligate chemolithotroph) แต่บางครั้ง AOB สามารถใช้สารประกอบอินทรีย์ได้ ปัจจุบันพบว่า AOB บางชนิดเมื่ออยู่ในสภาวะออกซิเจนต่ำ สามารถใช้ในไนไตรต์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนเกิดเป็นไนตรัสออกไซด์ (N_2O) หรือไนตริกออกไซด์ (NO) ตัวอย่างเช่น *Nitrosomonas eutropha* และ *Nitrosomonas europaea* สามารถทำให้เกิดได้ทั้งปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันเมื่อเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด โดยสามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรต์ได้ภายใต้สภาวะแอน็อกซิก (Anoxic)

2) ไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย (*Nitrite-oxidizing Bacteria : NOB*) ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มที่สามารถออกซิไดซ์ไนไตรต์ให้เป็นไนเตรต ได้แก่ แบคทีเรียสกุล *Nitrococcus* *Nitrobacter* และ *Nitrospira* โดยสกุลที่รู้จักกันดีคือ *Nitrobacter* ในปัจจุบันพบว่า สกุลที่มีบทบาทมากในน้ำทะเลคือ *Nitrospira* ซึ่งไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตในสิ่งแวดล้อมหรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณไนไตรต์ที่ต่างกัน โดย *Nitrobacter* จะเจริญในที่ที่มีปริมาณไนไตรต์สูง (ทนได้ถึง 14 มิลลิโมลาร์ หรือประมาณ 196 มก.ไนไตรต์ในโตรเจนต่อลิตร) แต่ *Nitrospira* จะเจริญในที่ที่มีปริมาณไนไตรต์ต่ำๆ (ทนได้ 0.5 มิลลิโมลาร์ หรือประมาณ 7 มก.ไนไตรต์ในโตรเจนต่อลิตร) สภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของ *Nitrospira moscoviensis* คือในอาหารที่มีปริมาณไนไตรต์ 0.35 มิลลิโมลาร์ (ประมาณ 4.9 มก.ไนไตรต์ในโตรเจนต่อลิตร) พีเอช 7.6-8.0 ที่อุณหภูมิ 39 °ซ (Ehrich et al. ,1995)

NOB บางชนิดเป็นออโตโทรฟ (Autotrophs) และแอนแอโรบิก โดยสามารถใช้สารอินทรีย์ เช่น ไพรูเวตได้ และ *Nitrobacter* มีความสามารถในการรีดิวซ์ไนไตรต์เป็นไนเตรตในปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันได้

2.2.3 กระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification)

กระบวนการดีไนตริฟิเคชันเป็นกระบวนการรีดิวซ์ไนเตรต ไนไตรต์ให้อยู่ในรูปของก๊าซไนโตรเจนหรือไนตรัสออกไซด์ออกสู่บรรยากาศ โดยอาศัยการทำงานของดีไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Denitrifying bacteria) ซึ่งประกอบด้วย *Pseudomonas* *Achromobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*

และ *Thiobacillus denitrificans* เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวต้องการสารอินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ดังนั้นจึงต้องมีการเติมสารอินทรีย์คาร์บอนลงสู่ระบบเนื่องจากความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในน้ำเสียอาจไม่เพียงพอสำหรับการเกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน และแบคทีเรียจะต้องใช้คาร์บอนนี้ไปลดรูปออกซิเจนของไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ (NO_2) ก๊าซไนตริกออกไซด์ (NO) ก๊าซไนตรัสออกไซด์ (N_2O) จนถึงก๊าซไนโตรเจน (N_2) โดยสารอินทรีย์คาร์บอนที่มีการใช้กันโดยทั่วไป ได้แก่ เมธานอล โซเดียมอะซิเตท อาหารกุ้งหรือกากน้ำตาล เป็นต้น

2.3 การควบคุมคุณภาพน้ำโดยตัวกรองชีวภาพ

การพัฒนากระบวนการกรองชีวภาพไนตริฟิเคชัน (Nitrification biofilter) มีการศึกษากันมากในระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยมีการใช้วัสดุตัวกรอง (Filtering media) เป็นที่ยึดเกาะของไนตริฟิเคชันแบคทีเรียซึ่งเรียกว่า การตรึง (Immobilization) โดยการยึดเกาะจนเกิดเป็นชั้นเรียกว่า ฟิล์มชีวภาพ (Biofilm) ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่ไหลผ่านตัวกรองชีวภาพได้ (Leonard et al., 2000) ซึ่งมีรูปแบบของระบบที่หลากหลาย เช่น ตัวกรองชีวภาพแบบใต้น้ำ (Submerged filters) แบบโปรยกรอง (Trickling filter) แบบตัวกรองหมุน (Rotating media filters) และแบบฟลูอิดไดส์ (Fluidized bed) เป็นต้น สำหรับกลไกการบำบัดน้ำเสียด้วยตัวกรองชีวภาพจะเกิดขึ้นโดยสารอินทรีย์ที่ละลายในน้ำเสียหรือสารอินทรีย์แขวนลอยจะถูกย่อยสลายจนได้โมเลกุลเล็กๆ บริเวณผิวฟิล์มแบคทีเรีย จากนั้นน้ำเสียจะไหลผ่านชั้นฟิล์มแบคทีเรียด้วยวิธีการแพร่โมเลกุล (Molecular Diffusion) แล้วถูกแบคทีเรียเปลี่ยนรูปหรือย่อยสลายต่อไป

การเจริญเติบโตของแบคทีเรียเป็นฟิล์มชีวภาพซึ่งอยู่ที่ผิวของตัวกรองจะเกิดขึ้นจากการยึดเกาะของแบคทีเรีย 2 กลุ่ม คือ (1) กลุ่มเฮเทอโรโทรฟ ซึ่งใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งของคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยจะใช้ ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ซึ่งปริมาณออกซิเจนที่ใช้จะอยู่ในรูปของค่าบีโอดี และ (2) กลุ่มออโตโทรฟ ซึ่งใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงานและไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบในการสร้างเซลล์ ทำให้เกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันขึ้นบนตัวกรองชีวภาพ แอมโมเนียจะถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรต์โดยแบคทีเรียกลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียและไนไตรต์จะถูกเปลี่ยนเป็นไนเตรตโดยแบคทีเรียกลุ่มไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย ซึ่งสารประกอบไนเตรตที่เกิดขึ้นจะมีความเป็นพิษน้อยกว่าแอมโมเนียและไนไตรต์

ระบบบำบัดประเภทนี้โดยทั่วไปถูกออกแบบสำหรับกระบวนการไนตริฟิเคชัน ระบบบำบัดจะถูกออกแบบให้แบคทีเรียสามารถยึดเกาะกับตัวกรองชีวภาพ (Biofilter) ตัวอย่างของวัสดุตัวกรอง

ชีวภาพที่ใช้ในปัจจุบันได้แก่ หิน ทราช หรือเปลือกหอย จะมีราคาถูก แต่จะมีปัญหาเรื่องน้ำหนักที่มากหรือการอุดตันของตัวกรอง เนื่องจากช่องว่างระหว่างตัวกรองมีน้อย ส่วนวัสดุกรองที่ทำจากพลาสติก เช่น พีวีซี Polyethylene หรือ Polypropylene ซึ่งจะมีความคงทน มีปัญหาการอุดตันน้อย และไม่ทำปฏิกิริยากับสารประกอบในน้ำ อย่างไรก็ตามวัสดุกรองที่ทำจากพลาสติกมักมีราคาแพงและย่อยสลายได้ยากในธรรมชาติ คุณลักษณะที่สำคัญของวัสดุตัวกรองชีวภาพคือต้องมีพื้นที่ผิวสูง มีความพรุนหรือขรุขระมาก เพื่อให้ไนตริฟายอิงแบคทีเรียมายึดเกาะและเติบโตในปริมาณที่เพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน ได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งทำให้สามารถแก้ไขปัญหาเกี่ยวกับอัตราการเติบโตที่จำกัดของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้

2.4 สารประกอบไนโตรเจน

2.4.1 แอมโมเนีย

แอมโมเนียที่พบในน้ำมี 2 รูป คือ แอมโมเนียมไอออน (Ammonium ion, NH_4^+) และแอมโมเนียที่ไม่มีไอออน (Un-ionized ammonia, NH_3) แอมโมเนียมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ โดยพิษของแอมโมเนียจะมีผลต่อการเจริญเติบโต ระบบประสาท สมดุลแร่ธาตุ กระบวนการเมตาบอลิซึม และอัตราการรอดของกุ้ง (Heath, 1995) ซึ่งการเกิดแอมโมเนียทั้ง 2 รูปแบบขึ้นอยู่กับความสมดุลของอุณหภูมิและค่าพีเอชของน้ำ โดยในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำปริมาณแอมโมเนียรวม (Total ammonia) ไม่ควรเกิน 1 มก. ในโตรเจนต่อลิตร

2.4.2 ไนไตรต์

ไนไตรต์เป็นสารตัวกลางของปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน ซึ่งการสะสมของไนไตรต์ภายในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำเกิดจากกระบวนการไนตริฟิเคชันที่ไม่สมบูรณ์โดยส่วนใหญ่มักพบในบ่อไร้อินกลางแจ้ง (มะลิวัลย์ คุตะ โค และคณะ, 2550) โดยความเป็นพิษของไนไตรต์เกิดจากไนไตรต์ไปออกซิไดซ์เหล็กที่เป็นองค์ประกอบของฮีโมไซยานินให้เป็นเมทธิโมไซยานิน ทำให้ไม่สามารถขนถ่ายออกซิเจนส่งผลให้เกิดสภาวะขาดออกซิเจนในเนื้อเยื่อ ทั้งยังมีผลต่อระบบการหายใจและลดความทนทานต่ออุณหภูมิของตัวกุ้งด้วย โดยในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเลไม่ควรมีไนไตรต์เกิน 0.1 มก. ในโตรเจนต่อลิตร (Chen and Chin, 1992)

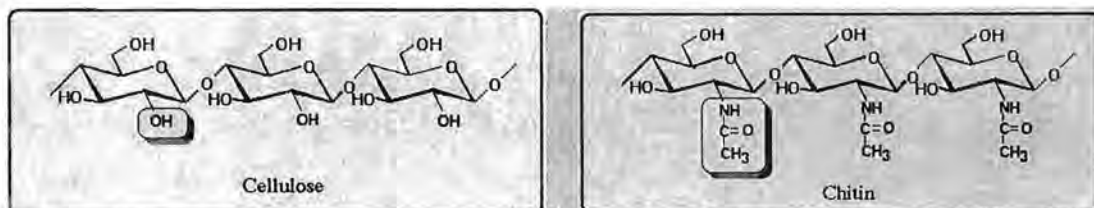
2.4.3 ไนเตรต

ไนเตรตเป็นผลผลิตสุดท้ายของกระบวนการไนตริฟิเคชันที่สมบูรณ์โดยเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่มีความเสถียรที่สุด ซึ่งระดับของไนเตรตที่ยอมรับว่าปลอดภัยต่อสัตว์น้ำคือไม่เกิน 50 มก. ไนโตรเจนต่อลิตร แต่ถ้าไนเตรตมีความเข้มข้นเกิน 75 มก. ไนโตรเจนต่อลิตร จะมีผลต่ออัตราการผสมพันธุ์ การฟักไข่ทำให้ล่าช้าขึ้น ปริมาณไข่ลดลง ทั้งยังส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนด้วย (Gutierrez-Wing and Malone, 2006)

2.5 ไคโตซาน

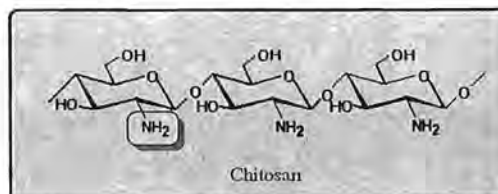
2.5.1 ลักษณะทั่วไปของไคตินและไคโตซาน

ไคตินเป็นพอลิเมอร์ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของคาร์โบไฮเดรต ประกอบด้วยอนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคสที่มีธาตุไนโตรเจนเกาะอยู่ภายในโมเลกุล โดยไคตินมีชื่อทางเคมีว่า poly- $[\beta-(1\rightarrow4)-2\text{-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose}]$ และโครงสร้างของไคตินจะคล้ายกับเซลลูโลส ต่างกันตรงที่หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-2 ของเซลลูโลสถูกแทนที่ด้วยหมู่อะซิทามิโด (acetamido group) ดังแสดงในภาพที่ 2.2(ก) และ 2.2(ข) ในธรรมชาติจะพบไคตินในโครงสร้างของสัตว์ที่มีข้อปล้องได้แก่ เปลือกกุ้ง กระจกปู แคนปลาหมึก ปีกแมลงและผนังเซลล์ของเห็ดราบางชนิดนอกจากนี้ยังพบว่าไคตินมีมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส (สุวดี จันทร์กระจ่าง, 2543)



(ก) เซลลูโลส

(ข) ไคติน



(ค) ไคโตซาน

ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส ไคติน และไคโตซาน (กมลศิริ พันธนิยะ, 2546)

ไคโตซานหรือ poly- $[\beta\text{-}(1\rightarrow4)\text{-}2\text{-amino-}2\text{-deoxy-D-glucopyranose}]$ เป็นอนุพันธ์ของไคตินที่เกิดจากปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิทิล (deacetylation) ของไคตินด้วยด่างเข้มข้น ทำให้โครงสร้างของไคตินบางส่วนเปลี่ยนแปลงไป โดยเฉพาะหมู่ฟังก์ชันที่มีธาตุไนโตรเจนในรูปของหมู่อะซิทามิโด ($-\text{NHCOCH}_3$) เปลี่ยนไปเป็นรูปของหมู่เอมิโน ($-\text{NH}_2$) ที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 2 ดังแสดงในภาพที่ 2.2(ค)

2.5.2 สมบัติของไคตินและไคโตซาน

2.5.2.1 การละลาย (Solubility)

ไคตินเป็นพอลิเมอร์ที่มีลักษณะกึ่งผลึก (Semicrystalline) เนื่องจากมีโครงสร้างที่จับกันโดยพันธะไฮโดรเจน ด้วยสมบัติทางกายภาพนี้ทำให้ไคตินยากต่อการละลายในกรดเจือจางหรือด่างเจือจางและตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ ในสภาวะปกติ ความยากในการละลายของไคตินในตัวทำละลายต่างๆ มีผลมาจากสายโซ่โมเลกุลที่อยู่กันหนาแน่น มีพันธะเกิดขึ้นทั้งภายในและระหว่างโมเลกุล เนื่องจากหมู่ฟังก์ชันที่ต่างกัน หมู่ไฮดรอกซิล และหมู่อะซิทามิโด อย่างไรก็ตามไคตินสามารถละลายได้ในกรดฟอร์มิก กรดซัลโฟนิคและส่วนผสมของ 1,2 ไดคลอโรอีเทน (1,2-dichloroethane) และไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic) (35:36) แต่ตัวทำละลายเหล่านี้มีความเป็นพิษและทำให้สมบัติของไคตินเปลี่ยนแปลงไป การกำจัดหมู่อะซิทิลในสภาวะที่เป็นด่างเป็นการเปลี่ยนจากไคตินเป็นไคโตซาน ซึ่งจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้โครงสร้างของไคโตซานมีหมู่เอมิโนอิสระและมีความสามารถในการละลายที่พีเอชต่ำกว่า 6.5 ดังนั้นการเตรียมเป็นสารละลายสามารถเตรียมในสารละลายกรดอินทรีย์เจือจาง ได้แก่ กรดฟอร์มิกและกรดอะซิติก เป็นต้น (Austin, 1988)

2.5.2.2 ความหนืด (Viscosity)

ความหนืดของสารละลายไคโตซานขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ อาทิ ระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล น้ำหนักโมเลกุล ความเข้มข้น ค่าพีเอช และอุณหภูมิ โดยทั่วไปความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น นอกจากนี้ชนิดของกรดที่ใช้ และการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของสารละลายพอลิเมอร์ส่งผลให้สารละลายมีความหนืดที่แตกต่างกัน เช่น ความหนืดของไคโตซานในกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นเมื่อ

สารละลายมีค่าพีเอชลดลง ในขณะที่ความหนืดของไคโตซานในกรดไฮโดรคลอริก เพิ่มขึ้นเมื่อค่าพีเอชของสารละลายเพิ่มขึ้น (ปิยรัตน์ บำรุงสาถิ, 2550)

2.5.2.3 สมบัติพอลิอิเล็กโทรไลต์ (Polyelectrolyte properties)

ไคโตซานเป็นสายพอลิเมอร์ของแอนไฮโดรไกลูโคซามีน (Anhydroglucosamine) และเป็นสายพอลิอิเล็กโทรไลต์ที่สภาวะเป็นกรดมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.5 ไคโตซานในสารละลายมีประจุเป็นบวก เนื่องจากไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่มีความหนาแน่นของประจุบวกสูง จึงมีศักยภาพในการนำไปใช้ในหลายๆ ด้าน ทั้งนี้เนื่องจากประจุบวกของไคโตซานจะจับกับประจุลบบนผิวของจุลินทรีย์ทำให้เกิดความเป็นกลาง ดังนั้นการจับของไคโตซานกับเซลล์สิ่งมีชีวิตเป็นสมบัติที่สำคัญมากในการนำไปใช้ในทางการแพทย์ และการบำบัดน้ำ (Hon, 1996)

2.5.2.4 น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight)

ความยาวของสายโซ่โมเลกุลมีความสำคัญในการพิจารณาสมบัติของพอลิเมอร์ พอลิเมอร์ทั่วไปมีขนาดใหญ่ แต่ไม่จำเป็นต้องมีความยาวเท่ากัน การนำไคโตซานไปใช้ประโยชน์ต่างๆ มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุล ระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล ซึ่งมีผลต่อกลไกการทำงานและสมบัติทางเคมี เมื่อใช้ไคโตซานในการผลิตฟิล์ม เมมเบรน และเส้นใยต่างๆ น้ำหนักโมเลกุลสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของไคตินคือ 1.03×10^6 ถึง 2.50×10^6 คาลตัน และน้ำหนักโมเลกุลของคาร์บอกซีเมทิลไคติน (Carboxymethylchitin) ประมาณ 1.33×10^6 คาลตัน (Muzzarelli, 1977) โดยทั่วไปน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของไคโตซานที่สกัดได้จากเปลือกกุ้งมีค่าประมาณ $4.40-5.00 \times 10^5$ คาลตัน และของปูมีค่าประมาณ $5.00-8.50 \times 10^5$ คาลตัน (เขวภา ไหวพริบ, 2534)

2.5.2.5 ระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล (Degree of deacetylation)

สิ่งที่ต้องคำนึงเมื่อนำไคโตซานมาใช้ประโยชน์ คือ ระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล ซึ่งเป็นตัวบ่งถึงคุณภาพของไคโตซาน ดังนั้นจึงมีการวัดระดับอะซิทิลของไคโตซาน เพื่อพิจารณาถึงการใช้งาน ซึ่งการวิเคราะห์มีหลายวิธี ได้แก่ อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Infrared spectroscopy; IR) เซอคลิกวาร์ไคโครลิซึม (Circular dichroism; CD)

การวิเคราะห์ธาตุ (Elemental analysis; EA) การไทเทรต และอัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปี (First derivation ultraviolet spectroscopy) การศึกษาแบบ IR จะทำการวิเคราะห์ได้ยาก และผลที่ได้มีแนวโน้มที่คลาดเคลื่อน การศึกษาแบบ CD มีข้อจำกัดในการละลายของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงไม่สามารถวิเคราะห์พวกที่ไม่ละลาย และพวก Highly acetylated polymeric compound ได้ วิธีการไทเทรตมีความยุ่งยากและใช้เวลานาน ส่วนการตรวจสอบพวกกลุ่มอะมิโนอิสระ โดยการใช้ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence) มีการตอบสนองเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคซามีนแบบไม่เป็นเส้นตรง และการวัดตัวอย่างอาจมีการเจือจางขึ้นอยู่กับค่าที่ต้องการวัด (Miyoshi et al., 1992)

2.5.3 การใช้ประโยชน์จากไคโตซาน

จากสมบัติที่โดดเด่นของไคโตซาน อาทิ มีความเป็นประจุบวกสูงในสภาวะกรดอ่อน สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Plascencia et al., 2000; Seo et al., 1992) ทำให้ไคโตซานถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวาง ตัวอย่างเช่น ใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Seo et al., 1992) เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. coli* เป็นสารตกตะกอนและสารดูดซับสีในอุตสาหกรรมน้ำตาล (Pan et al., 1998) นอกจากนี้ไคโตซานยังสามารถใช้ในการตกตะกอนน้ำเสียในโรงงานที่มีการรีไซเคิลกระดาษ (Ramos et al., 1997) และในการบำบัดน้ำในแม่น้ำเพื่อใช้ในการบริโภค (Divakaran and Pillai, 2002) และสามารถใช้เป็นสารสำหรับดักจับโลหะหนัก (Cárdenas et al., 2001) สำหรับกระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบกระบวนการขึ้นตะกอนจุลินทรีย์ไร้อากาศแบบไหลขึ้น (Upflow Anaerobic Sludge Bed System, UASB) พบว่าไคโตซานสามารถเพิ่มศักยภาพและลดระยะเวลาในการเกาะตัวกันเป็นเม็ดของจุลินทรีย์ (Kaseamchochoung et al., 2006; Lertsittichai et al., 2007) นอกจากนี้พบว่าไคโตซานและไคโตซานดัดแปรสามารถใช้ในการตกตะกอนสารแขวนลอย (Wang et al., 2006) รวมไปถึงเพลงก่ต่อนพืช (Lertsutthiwong et al., 2009) นอกจากนี้ไคโตซานสามารถใช้ร่วมกับสารสังเคราะห์โพอลิอะลูมิเนียมคลอไรด์ (Polyaluminum chloride: PACl) ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการลดปริมาณการใช้ PACl ในกระบวนการ โคแอกกูเลชัน (Pan et al., 1999)

2.6 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.6.1 ปัจจัยของไคโตซานต่อการตรึงเชื้อ

Kaseamchochoung et al. (2006) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของไคโตซานและสภาวะแวดล้อมต่อการตกตะกอนสารแขวนลอยจุลินทรีย์ไร้อากาศ (anaerobic sludge) พบว่า ไคโตซานสามารถช่วยในการตกตะกอนสารแขวนลอยจุลินทรีย์ โดยประสิทธิภาพในการตกตะกอนขึ้นอยู่กับระดับการกำจัดหมู่อะซิติกและน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน นอกจากนี้ยังพบว่าไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติกร้อยละ 85 มีประสิทธิภาพในการตกตะกอนมากกว่าไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติกร้อยละ 70 และเมื่อเปรียบเทียบผลของน้ำหนักโมเลกุลพบว่า ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตกตะกอนได้ดีกว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง นอกจากนี้การเพิ่มความแรงของออสโม (สูงถึง 0.1 โมลาร์) ในสารแขวนลอยจุลินทรีย์สามารถลดระดับการแตกของฟล็อกในสภาวะที่เติมไคโตซานมากเกินไป

Chen et al. (1998) รายงานว่า การกำจัดสาหร่ายออกจากแหล่งน้ำด้วยเทคนิคการทำให้ลอย โดยการเติมอากาศควบคู่กับการใช้สารพอลิเมอร์ประจุบวกไคโตซานเป็นตัวทำให้สาหร่ายจับตัวกันนั้นให้ผลดีกว่าการใช้เทคนิคดังกล่าวควบคู่กับพอลิเมอร์ประจุลบและพอลิเมอร์ที่ไม่มีประจุ นอกจากนี้ยังพบว่าตัวแปรที่มีผลต่อการกำจัดสาหร่ายออกจากแหล่งน้ำ ได้แก่ พีเอช ความแรงออสโม อัตราการเติมอากาศ และค่าสภาพต่าง

2.6.2 การใช้ไคโตซานในการบำบัดคุณภาพน้ำ

สุทธิทิรา บัวนาค (2547) ศึกษาการใช้เกลือไคโตซานจากเปลือกกุ้งในการกำจัดโครเมียม (เฮกซะเวเลนซ์) นิกเกิล และตะกั่วในน้ำเสียอุตสาหกรรม โดยไคโตซานที่ใช้มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติกร้อยละ 90 และมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 1.8×10^5 ดาลตัน ความเข้มข้นของโครเมียม (เฮกซะเวเลนซ์) นิกเกิล และตะกั่วในน้ำเสียอุตสาหกรรมเท่ากับ 50-80 มก.ต่อลิตร 30-50 มก.ต่อลิตร และ 1.5-3.5 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด คือ ปรับพีเอชของน้ำเสียให้เท่ากับ 4 ใช้เกลือไคโตซานขนาด 710-850 ไมโครเมตร ในปริมาณ 20 กรัมต่อน้ำเสีย 1 ลิตร กวนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และทิ้งให้ตกตะกอนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี โครเมียม (เฮกซะเวเลนซ์) นิกเกิล และตะกั่วได้ร้อยละ 84.65, 85.45, 93.54 และ 94.32 ตามลำดับ แต่ความเข้มข้นของโครเมียม (เฮกซะเวเลนซ์) และนิกเกิล ยังไม่ผ่านมาตรฐานน้ำทิ้งอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงทำการบำบัดซ้ำอีก 1 ครั้ง เพื่อให้ได้คุณภาพน้ำทิ้งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน

จุลชาติพืช คชนทร์มาศ (2549) ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไว้กับอนุภาคไคโตซานในการบำบัดน้ำเสียสีเขียวโดยใช้ไคโตซานเกล็ด ไคโตซานเม็ด และไคโตซานเม็ดที่ยึดเกาะด้วยเอนไซม์ ที่พีเอช 5.52 ระยะเวลา 5 ชั่วโมง พบว่าไคโตซานเกล็ดสามารถลดสีดำ (Reactive black 5) มากที่สุดคือ ร้อยละ 93.8 รองลงมาคือ สีแดง (Reactive red 198) และสีเหลือง (Reactive yellow 176) มีประสิทธิภาพการลดสีร้อยละ 66 และ 59.4 ตามลำดับ ความเข้มข้นของเกล็ดมีผลต่อการลดสีของไคโตซานเกล็ดน้อยมาก ส่วนไคโตซานเม็ดและไคโตซานเม็ดที่ผ่านการตรึงด้วยเอนไซม์ พบว่ามีประสิทธิภาพการลดสีมีค่าใกล้เคียงกัน

จิตรวนา จันทร์ขอนแก่น (2550) ศึกษาการดูดซับสีเขียวผ้าประเภทรีแอกทีฟด้วยมวลชีวภาพที่ไรซ์วิตของ *Rhizopus arrhizus* ที่ถูกตรึงอยู่ในเม็ดเจลไคโตซาน โดยทำการตรึงสปอร์แรงจิโอสปอร์ในเม็ดเจลไคโตซานแล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเพื่อเพิ่มมวลชีวภาพของเชื้อราจากนั้นนำมาทดสอบการดูดซับสีเขียว โดยใช้สีเขียวประเภทรีแอกทีฟ 2 ชนิดได้แก่ สีริมาซอล โกลเดิน เบลโล่และซีบากรอนเทอร์ควอยซ์ เอชจีเอ็น โดยทดสอบการดูดซับด้วยมวลชีวภาพราที่ตรึงในเม็ดเจลไคโตซานที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 50 มก.ต่อลิตร จากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับที่ค่าพีเอชตั้งแต่ 1-10 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับมากที่สุด คือพีเอช 3 โดยสมมูลของการดูดซับของมวลชีวภาพราที่ตรึงในเม็ดเจลไคโตซานมีประสิทธิภาพการดูดซับสูงสุด (q_{max}) ของมวลชีวภาพราที่ตรึงในเม็ดเจลไคโตซานเท่ากับ 294.12 มก.ต่อกรัม สำหรับสีริมาซอล โกลเดิน เบลโล่ อาร์จีบี และเท่ากับ 278 มก.ต่อกรัม สำหรับสีซีบากรอน เทอร์ควอยซ์ เอชจีเอ็น ผลการทดสอบสมมูลการดูดซับสำหรับสีริมาซอล โกลเดิน เบลโล่ อาร์จีบี สอดคล้องกับสมการของเฟรנדลิช ส่วนสีซีบากรอน เทอร์ควอยซ์ เอชจีเอ็น สอดคล้องกับสมการของแลงเมียร์ และเฟรנדลิช

El-Mamouni et al. (1998) ศึกษาประสิทธิภาพของตัวเร่งให้เกิดเม็ดตะกอนในระบบ UASB โดยเปรียบเทียบระหว่างพอลิเมอร์ธรรมชาติ คือไคโตซาน และพอลิเมอร์สังเคราะห์ พบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชมีผลต่อไคโตซานอย่างมาก โดยค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับไคโตซานอยู่ในช่วง 4-6 ส่วนพอลิเมอร์สังเคราะห์นั้นพีเอชส่งผลกระทบต่อปริมาณที่เหมาะสมของไคโตซานอยู่ที่ 25 มก. ไคโตซานต่อกรัมของแข็งแขวนลอย และพอลิเมอร์สังเคราะห์อยู่ที่ 2 มก.ต่อกรัมของแข็งแขวนลอย พอลิเมอร์ทั้งสองชนิดสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการจับตัวเป็นก้อนของสารแขวนลอยจุลินทรีย์ในถัง UASB

Lertsittichi et al. (2007) ทำการศึกษาผลของไคโตซานในการปรับปรุงระบบถังบำบัดน้ำเสียแบบ UASB โดยใช้น้ำเสียจากโรงงานผลไม้กระป๋องจากผลการทดลองพบว่า ถึง UASB ที่มีการใช้ไคโตซานจะมีขนาดของสารแขวนลอยจุลินทรีย์ใหญ่กว่าถังที่ไม่ใช้ไคโตซานประมาณร้อยละ 24-

37 นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดด้วยถังที่ใช้โคโคซานจะมีค่าการกำจัดซีโอดีและอัตราการผลิตแก๊สชีวภาพสูงกว่าถัง UASB ที่ไม่ใช่โคโคซานประมาณร้อยละ 4-10 และ 35 ตามลำดับ

บทที่ 3 วิธีการวิจัย

3.1 จัดหาวัตถุดิบและวิเคราะห์สมบัติ

ไคตินและไคโตซานจำนวน 6 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ 1-4 สั่งซื้อมาจากบริษัท เอ เอ็น แล็บ จำกัด ตัวอย่างที่ 5 ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท อีแลนค์ คอปเปอร์เรชัน จำกัด และตัวอย่างที่ 6 สกัดขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ ดังแสดงในตารางที่ 3.1 พร้อมทำการวิเคราะห์สมบัติของไคโตซานทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ ความชื้นโดยดัดแปลงวิธีมาจาก AOAC (2000), ระดับการกำจัดหมู่อะซิทธิลวิเคราะห์ด้วยวิธี UV-Spectroscopy และน้ำหนักโมเลกุลวิเคราะห์โดยใช้ Gel Permeation Chromatography

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างไคโตซานทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่างที่	ชื่อไคโตซาน	แหล่งที่มา
1	Chitin_21/4/09	สั่งซื้อจากบริษัท เอ เอ็น แล็บ จำกัด
2	Chitosan D82	
3	Chitosan EX II	
4	Chitosan_10/01/11	
5	Chitosan Lot A	ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท อีแลนค์ คอปเปอร์เรชัน จำกัด
6	Chitosan B	สังเคราะห์ขึ้นเองในงานวิจัยนี้

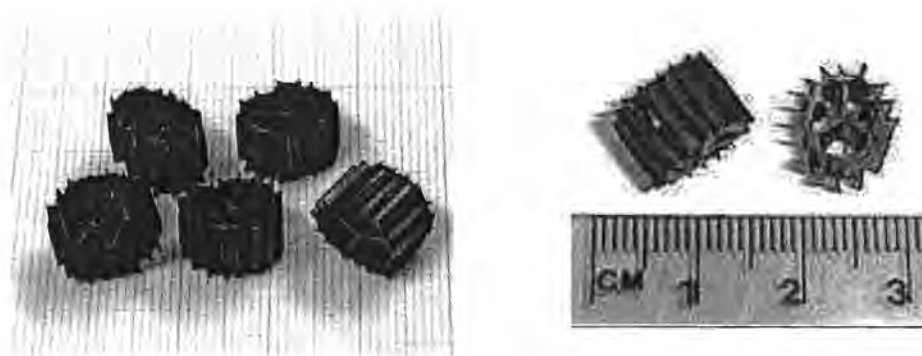
หมายเหตุ: การศึกษาผลของระดับการกำจัดหมู่อะซิทธิลและน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานจะดำเนินการในปีที่ 2

3.2 ศึกษาปัจจัยและสภาวะที่มีผลต่อการตรึงเชื้อในไพรต้ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนไคโตซาน

3.2.1 การเตรียมสภาพของตัวกรองชีวภาพในตรีฟิเคชัน

- ตัวกลางพลาสติกและการเตรียมตัวกลางก่อนการใช้งาน

ตัวกลางพลาสติกที่ใช้ในการทดลองเป็นวัสดุพลาสติกโพลีเอทิลีน (PE) ชนิดช่วยกระจายการไหลของน้ำให้ทั่วทั้งพื้นผิว (Random Flow Plastic Media) รุ่น BCN-009 (2H, Germany) ดังแสดงในภาพที่ 3.1 มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มม. สูง 8 มม. มีค่าพื้นที่ผิวจำเพาะเท่ากับ 864 ตร.ม.ต่อลบ.ม. โดยก่อนใช้ในการทดลองจะนำตัวกลางพลาสติกไปฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน และนำมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70-80 °ซ



ภาพที่ 3.1 วัสดุพลาสติกโพลีเอทิลีน รุ่น BCN-009

- การตรึงหัวเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียจากระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ทำการตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นบนตัวกลางพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยบรรจุในถุงตาข่ายแล้วนำไปแช่ในบ่อเลี้ยงกุ้งระบบปิด ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ระดับความลึกประมาณ 10 ซม. จากผิวน้ำเป็นเวลา 45 วัน เพื่อให้เกิดการเกาะติดของหัวเชื้อผสมไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Ammonia-oxidizing Bacteria ; AOB และ Nitrite-oxidizing Bacteria ; NOB) (Sesuk et al., 2009) จากนั้นนำตัวกลางพลาสติกที่ผ่านการตรึงหัวเชื้อแล้วมาเลี้ยงต่อเพื่อคัดเลือกให้เหลือเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม NOB ในถังปฏิกรณ์พลาสติกขนาด 6 ลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

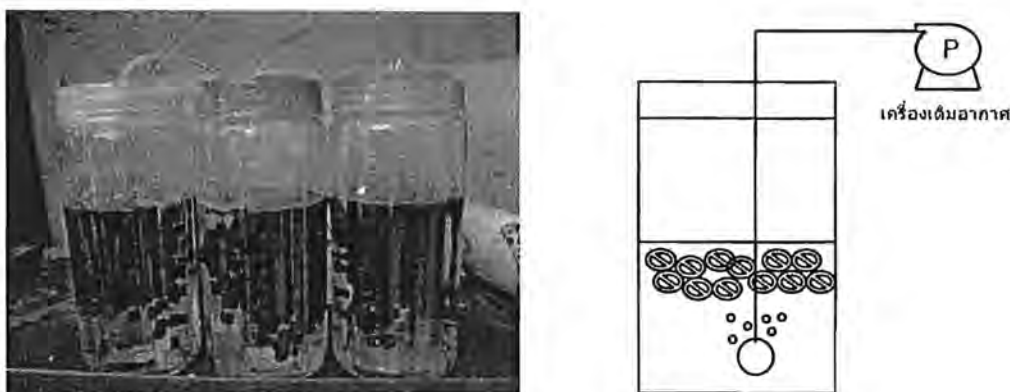
ไนโตรดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและปรับค่าความเค็มเป็น 30 พีเอสยู เดิมโซเดียมไนโตรดเพื่อเป็นแหล่งไนโตรดโดยควบคุมให้มีความเข้มข้น 10 มก.ไนโตรเจนต่อลิตรตลอดการทดลอง ในสถานะที่มีการเติมอากาศในน้ำด้วยหัวทรายตลอดเวลา (ภาพที่ 3.2) ทดสอบประสิทธิภาพของตัวกลางพลาสติกที่คัดเลือกให้เหลือเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม NOB โดยการตรวจวัดอัตราการบำบัดไนโตรดเป็นระยะ



ภาพที่ 3.2 ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการคัดเลือกไนโตรไฟอิงแบคทีเรียกลุ่ม NOB บนตัวกลางพลาสติก

- การตรวจวัดอัตราการบำบัดไนโตร

นำตัวกลางพลาสติกที่ผ่านการตรึงเชื้อแล้วมาแยกใส่ลงในขวดโหลพลาสติกใส ที่บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 30 พีเอสยู และผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 1 ลิตร เติมโซเดียมไนไตรต์ความเข้มข้น 2 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร และ โซเดียมไบคาร์บอเนตเพื่อเพิ่มค่าสภาพต่างของน้ำให้อยู่ในช่วง 100-150 มก.ต่อลิตร ทำการเติมอากาศด้วยหัวทรายพ่นอากาศที่ต่อเข้ากับชุดเครื่องเติมอากาศ (Aqua Tech, Model A-T 2001) ที่มีไส้กรองอากาศขนาด 0.3 ไมครอน (PURE PE Capsile Filter) เพื่อให้อากาศที่เข้าถึงปฏิกรณ์อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อ (ภาพที่ 3.3) โดยทำการทดลองจำนวน 3 ชั่วโมง ตรวจวัดคุณภาพน้ำในโหลพลาสติกเป็นระยะ เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน โดยความถี่ในการเก็บตัวอย่างน้ำจะขึ้นอยู่กับอัตราการลดลงของความเข้มข้นไนโตรเจน และหยุดเก็บตัวอย่างน้ำเมื่อไม่สามารถตรวจวัดค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนในน้ำได้



ภาพที่ 3.3 การติดตั้งอุปกรณ์สำหรับการตรวจวัดอัตราการบำบัดไนโตรเจนของตัวกลางพลาสติกที่ผ่านการตรึงเชื้อและคัดลอกให้เหลือเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม NOB

- การตรึงเชื้อไนโตรเจนออกซิไดซิงแบคทีเรียบนไคโตซาน

บรรจุวัสดุตัวกลางพลาสติก BCN-009 ที่มีหัวเชื้อ NOB เจริญบนพื้นผิวจำนวน 20 ชิ้น ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไนโตรเจนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 40 มล. จากนั้นทำการ sonication และเขย่าหลอดทดลองบนเครื่องเขย่า (Vortex-Genie mixers) เป็นเวลา 4 นาที แยกตัวกลางพลาสติกออกก่อนที่จะนำหัวเชื้อ NOB ที่ละลายอยู่ในอาหารเหลวมาเขย่ารวมกับไคโตซานปริมาณ 0.60 กรัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายเอทานอล 70% ปริมาตร 20 มล. เป็นเวลา 2 นาที และทำการปรับพื้นผิวด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 20 มล. เป็นเวลา 2 นาทีแล้ว จากนั้นเติมโซเดียมไนโตรเจนให้มีความเข้มข้น 2 มก. ไนโตรเจนต่อลิตร ทำการบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 °C เพื่อให้หัวเชื้อ NOB เกาะติดบนไคโตซาน

3.2.2 ระยะเวลาในการตรึงเชื้อ

นำไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะมิโนร้อยละ 91.13 ± 0.57 ไปบดและร่อนผ่านตะแกรงเพื่อคัดขนาดให้อยู่ในช่วง 1-2 มม. จากนั้นนำไคโตซานดังกล่าวจำนวน 0.60 กรัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการแช่ใน 70% เอทานอลและปรับพื้นผิวของไคโตซานด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.5 ไปตรึงเชื้อไนโตรเจนออกซิไดซิงแบคทีเรียที่เวลาต่างๆ ดังนี้ คือ 0 3 6 12 24 และ 72 ชม. จากนั้นตรวจสอบการเกาะติดของแบคทีเรียบนผิวไคโตซานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดไนโตรเจนเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเชื้อไนโตรเจนออกซิไดซิงแบคทีเรียบนไคโตซาน

3.2.3 ผลของการปรับพื้นผิวของโคโคซาน

นำโคโคซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลร้อยละ 91.13 ± 0.57 ขนาดที่เหมาะสม จากผลการทดลองที่ผ่านมามีจำนวน 0.60 กรัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการแช่ใน 70% เอทานอล ไปทำการปรับพื้นผิวของโคโคซานด้วยบัพเฟอร์ที่พีเอชแตกต่างกัน 3 ระดับ ดังนี้ คือ พีเอช 5.5 (ใช้อะซิเตตบัพเฟอร์ในการปรับพื้นผิวของโคโคซาน) และ พีเอช 6.5 และ 7.5 (ใช้ฟอสเฟตบัพเฟอร์ในการปรับพื้นผิวของโคโคซาน) ส่วนชุดควบคุมจะแช่ใน น้ำกลั่นแทนบัพเฟอร์ จากนั้นนำไปตรึงเชื้อในไทรด้ออกซิโคซิงแบคทีเรียด้วยช่วงเวลาที่เหมาะสม และตรวจสอบประสิทธิภาพการบำบัดในไทรด เพื่อหาสภาวะการปรับพื้นผิว โคโคซานที่เหมาะสมในการตรึงเชื้อในไทรด้ออกซิโคซิงแบคทีเรียบนโคโคซาน

3.2.4 ขนาดอนุภาคของโคโคซาน

นำโคโคซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลร้อยละ 91.13 ± 0.57 ไปบดและร่อน ผ่านตะแกรงเพื่อคัดขนาดให้ได้ 3 ระดับ ได้แก่ ขนาดเล็ก (อยู่ในช่วง 1-2 มม.) ขนาดกลาง (อยู่ในช่วง 3-5 มม.) และขนาดใหญ่ (อยู่ในช่วง 8-10 มม.) จากนั้นนำโคโคซานแต่ละ ขนาดจำนวน 0.60 กรัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการแช่ใน 70% เอทานอลและปรับพื้นผิวของ โคโคซานด้วยฟอสเฟตบัพเฟอร์พีเอช 6.5 ไปตรึงเชื้อในไทรด้ออกซิโคซิงแบคทีเรียตาม เวลาที่เหมาะสมที่ได้จากการแปรค่าระยะเวลาในการตรึงเชื้อ และตรวจสอบประสิทธิภาพ การบำบัดในไทรด เพื่อหาขนาดของโคโคซานที่เหมาะสมในการตรึงเชื้อในไทรด้ออกซิ โคซิงแบคทีเรียบนโคโคซาน

3.2.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการบำบัดในไทรด

ประสิทธิภาพในการบำบัดในไทรดนั้นเป็นการเปรียบเทียบอัตราการบำบัดในไทรด ต่อกรัมต่อวัน

3.2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การศึกษาในครั้งนี้ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย และค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐาน นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ analysis of variance with a further Duncan's multiple range test

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

ตารางที่ 4.1 แสดงสมบัติของไคตินและไคโตซานที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยแบ่งออกเป็น 6 ตัวอย่างดังนี้ ตัวอย่างที่ 1 เป็นไคตินที่มีความชื้นอยู่ที่ประมาณ 6% ตัวอย่างที่ 2 และ 3 เป็นตัวอย่างไคโตซานที่นำมาใช้ในการศึกษาผลของระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลต่อประสิทธิภาพในการตรึงเชื้อไนโทรค็อกซิไดซิงแบคทีเรีย โดยควบคุมน้ำหนักโมเลกุลให้อยู่ในช่วง 3.10×10^5 - 4.10×10^5 คาลตัน และตัวอย่างที่ 4-6 เป็นตัวอย่างไคโตซานที่นำมาใช้ในการศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลต่อประสิทธิภาพในการตรึงเชื้อไนโทรค็อกซิไดซิงแบคทีเรีย โดยควบคุมระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลให้อยู่ที่ประมาณ $90 \pm 5\%$

ตารางที่ 4.1 สมบัติของไคโตซานที่ใช้ในการศึกษา

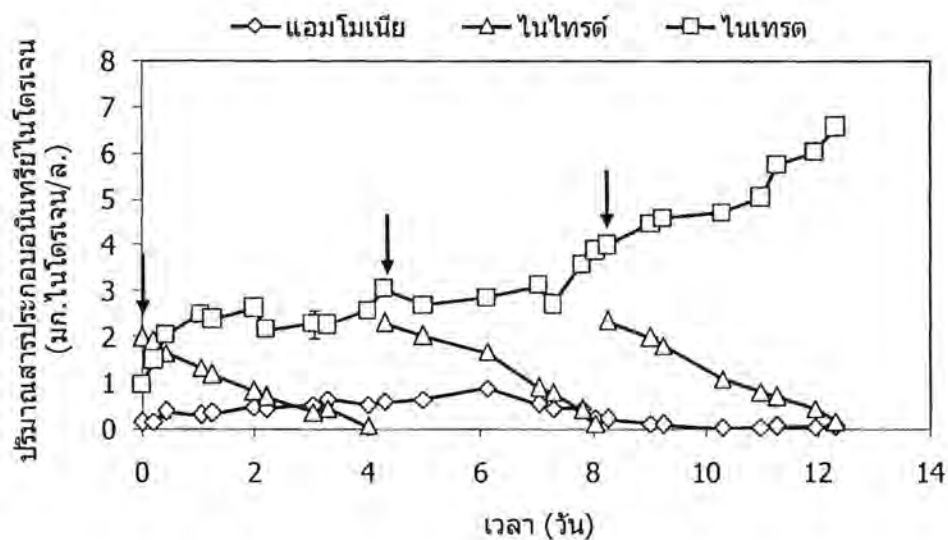
ตัวอย่างที่	ชื่อไคโตซาน	ค่าความชื้น (%)	ระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล (%)	น้ำหนักโมเลกุล (คาลตัน)
1	Chitin_21/4/09	5.83±1.15	-	-
2	Chitosan Lot A	10.21±0.85	91.13 ±0.57	4.10×10^5
3	Chitosan D82	8.63±0.19	82.20±0.71	3.10×10^5
4	Chitosan EX II	13.13±1.02	85.41±0.73	5.80×10^5
5	Chitosan_10/01/11	11.64±1.21	91.72±0.32	7.10×10^5
6	Chitosan B	12.71±0.41	92.43±0.61	2.00×10^5

หมายเหตุ: การศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลและระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลของไคโตซานจะดำเนินการหลังจากได้รับทุนในปีที่ 2

4.1 ปัจจัยและสถานะที่มีผลต่อการตรึงเชื้อไนโทรค็อกซิไดซิงแบคทีเรียบนไคโตซาน

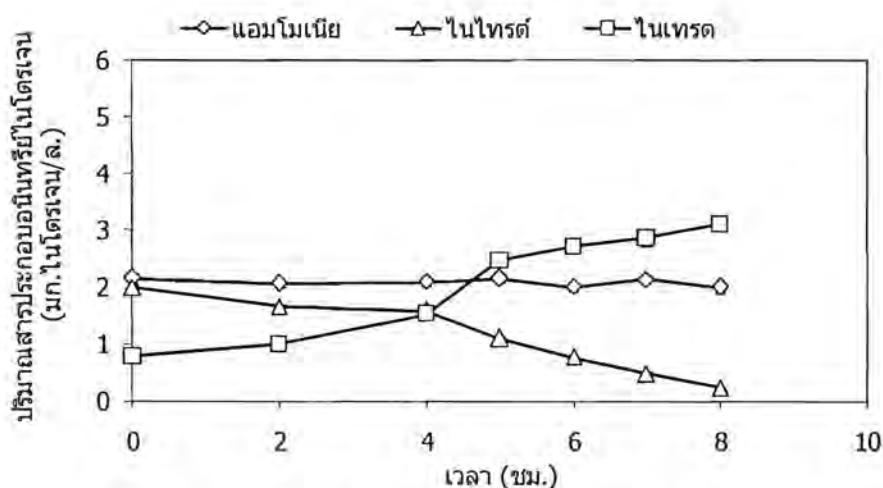
เมื่อนำตัวกลางพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนำไปแช่ในบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดที่มีกระบวนการไนตริฟิเคชันสมบูรณ์เป็นเวลา 45 วัน เพื่อให้เกิดการเกาะติดของหัวเชื้อผสมไนตริฟายอิงแบคทีเรีย พบว่า ตัวกรองมีชั้นฟิล์มบางๆ จนแทบมองไม่เห็นเคลือบอยู่บนผิวของวัสดุตัวกรอง จากนั้นนำตัวกรองซึ่งสภาพมาเลี้ยงต่อในถังปฏิกรณ์พลาสติกเพื่อคัดเลือกให้เหลือเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม NOB และทำการตรวจวัดปริมาณแอมโมเนีย ไนโตรค็อกซิไดซิง และไนเตรตเป็นระยะ ผลการทดลองพบว่าหลังจากเติมโซเดียมไนโตรค็อกซิไดซิงความเข้มข้นเริ่มต้น 2 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร อัตราการ

บำบัดไนไตรต์ของตัวกรองชีวภาพเกิดขึ้นอย่างชัดเจน ทำให้ความเข้มข้นของไนไตรต์ลดลงเหลือน้อยกว่า 0.10 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร ภายในระยะเวลา 4 วัน ในขณะที่ความเข้มข้นของไนเตรดมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และความเข้มข้นของแอมโมเนียมีค่าสูงขึ้นจาก 0.13 มก.ไนโตรเจนต่อลิตรเป็น 0.87 มก.ไนโตรเจนต่อลิตรในวันที่ 6 ของการทดลอง เนื่องจากเกิดการปลดปล่อยแอมโมเนียที่เป็นผลมาจากการย่อยสลายสารอินทรีย์และซากสิ่งมีชีวิตทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของแอมโมเนียในน้ำ ดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรด ของตัวกรองชีวภาพไนไตร์ฟิเคชันในถังคัดเลือกเชื้อ NOB โดย (↓) แสดงวันที่ทำการเติมไนไตรต์ไปจนถึงปฏิกรณ์พลาสติกขนาด 6 ลิตร

เมื่อทำการสูบลู่ว่างตัวกรองชีวภาพออกมาทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดไนไตรต์ พบว่าหลังจากเติม โซเดียม ไนไตรต์ความเข้มข้นเริ่มต้น 2 มก.ไนโตรเจนต่อลิตรลงในขวดโหลพลาสติกใส ไนไตรต์ถูกบำบัดลดลงจนมีค่าต่ำกว่า 0.5 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร ภายในระยะเวลา 7 ชม. โดยมีอัตราการบำบัดไนไตรต์เฉลี่ย 28.09 ± 0.58 มก.ไนโตรเจนต่อตร.ม.ต่อวัน ในขณะที่ความเข้มข้นของไนเตรดมีค่าเพิ่มมากขึ้นจาก 0.78 มก.ไนโตรเจนต่อลิตรเป็น 3.10 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร และความเข้มข้นของแอมโมเนียก่อนทำการทดลองและเสร็จสิ้นการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก ดังแสดงในภาพที่ 4.2



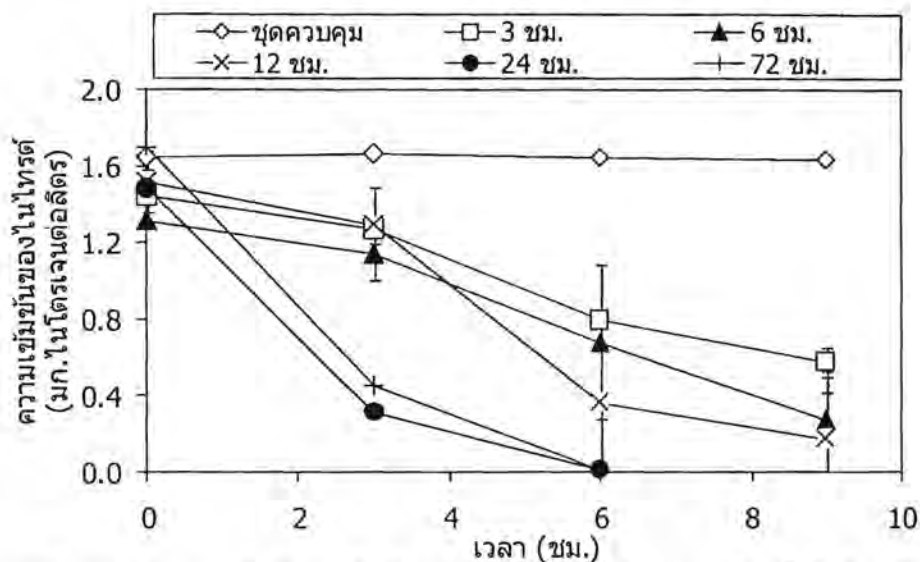
ภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรต ระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของตัวกรองชีวภาพไนตริไฟเคชันที่ทำกรคัดเลือกให้เหลือแต่เชื้อ NOB

4.1.1 ผลของระยะเวลาในการตรึงเชื้อ

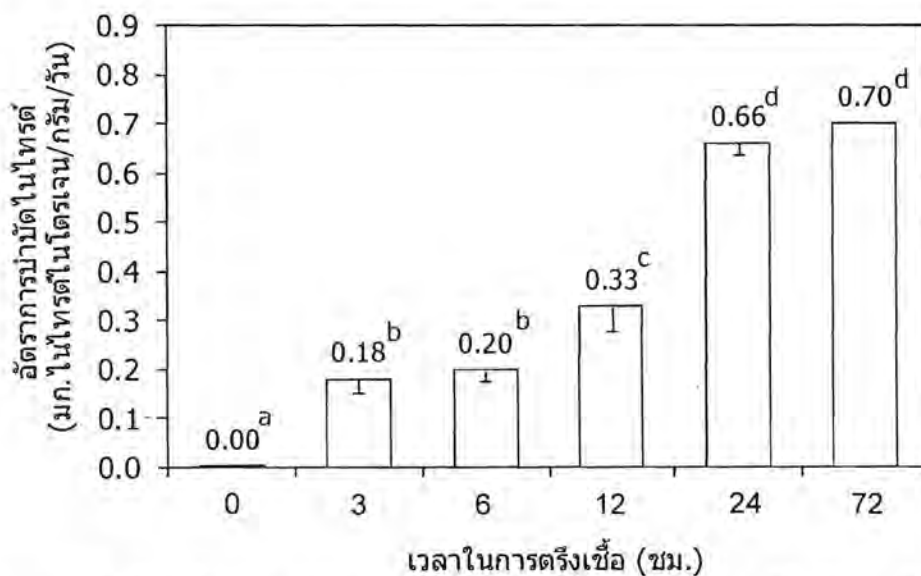
ตัวอย่างไคโตซานที่ใช้ในการศึกษาระยะเวลาในการตรึงเชื้อ คือ Chitosan Lot A เนื่องจาก chitosan Lot A มีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลสูงกว่าไคโตซานตัวอื่นๆ โดยระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลนี้แสดงถึงจำนวนหมู่อะมิโนบนโครงสร้างไคโตซาน ซึ่งในสภาวะกรดอ่อน ไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลสูงกว่าจะรับโปรตอนได้มากกว่า ทำให้มีความเป็นประจุบวกสูงกว่า และเมื่อไคโตซานมีความเป็นประจุบวกที่สูงกว่าจะโอกาสในการตรึงเชื้อแบคทีเรียซึ่งมีประจุลบได้ดีกว่า

จากนั้น Chitosan Lot A ซึ่งมีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลร้อยละ 91 ขนาด 1-2 มม. จำนวน 0.60 กรัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการแช่ใน 70% เอทานอลและปรับพื้นผิวของไคโตซานด้วยบัพเฟอร์พีเอช 6.5 ไปตรึงเชื้อไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียเป็นเวลาต่างๆ ได้แก่ 3 6 12 24 และ 72 ชม. เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่ตรึงเชื้อ) และทำการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดไนไตรต์ของไคโตซานที่ผ่านการตรึงเชื้อแล้ว พบว่า ไคโตซานที่ผ่านการตรึงเชื้อเป็นเวลาเท่ากับ 72 ชม. สามารถบำบัดไนไตรต์จาก 1.70 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร ลดลงเหลือ 0.46 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร ภายในระยะเวลาประมาณ 3 ชม. โดยมีอัตราการบำบัดไนไตรต์เฉลี่ยเท่ากับ 0.70 ± 0.02 มก.ไนโตรเจนต่อกรัมต่อวัน ในขณะที่ไคโตซานที่ผ่านการตรึงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. สามารถบำบัดไนไตรต์จาก 1.48 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร ลดลงเหลือน้อยกว่า 0.40 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร ภายในระยะเวลาประมาณ 3 ชม. โดยมีอัตราการบำบัดไนไตรต์เฉลี่ยเท่ากับ 0.66 ± 0.02 มก.ไนโตรเจนต่อกรัมต่อวัน ส่วนไคโตซาน

ที่ผ่านการตรึงเชื้อเป็นเวลา 3 6 12 ชม. ใช้เวลาในการบำบัดไนโตรเจนมากกว่า 6 ชม. โดยมีอัตราการบำบัดไนโตรเจนเฉลี่ยเท่ากับ 0.18 ± 0.03 0.20 ± 0.03 และ 0.33 ± 0.05 มก.ไนโตรเจนต่อกรัมต่อวันตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.3 และ 4.4



ภาพที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจนด้วยโคโคซานที่ผ่านการตรึงเชื้อไนโตรเจนออกซิโดซิงแบคทีเรียเป็นเวลา 3 6 12 24 และ 72 ชม. เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่ตรึงเชื้อ)

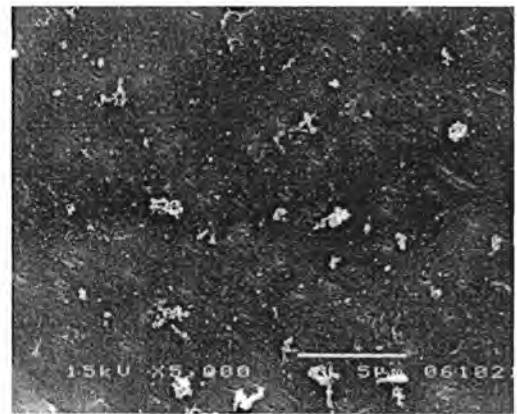


ภาพที่ 4.4 อัตราการบำบัดไนโตรเจนของโคโคซานที่ผ่านการตรึงเชื้อไนโตรเจนออกซิโดซิงแบคทีเรียเป็นเวลา 3 6 12 24 และ 72 ชม. เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่ตรึงเชื้อ) โดยตัวอักษร a-d แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

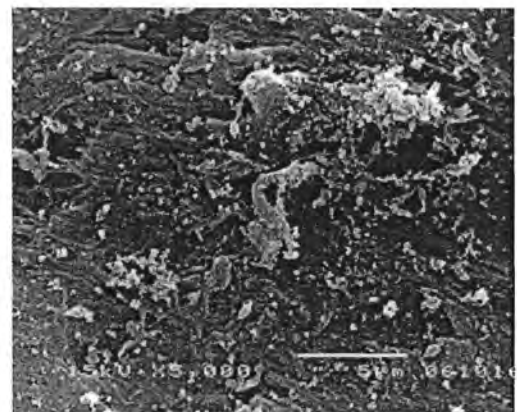
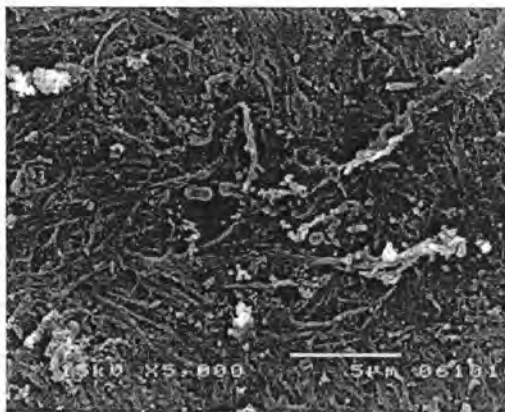
จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าไคโตซานที่ผ่านการตรึงเชื้อเป็นเวลา 72 และ 24 ชม. มีอัตราการบำบัดไนโตรเจนสูงกว่าไคโตซานที่ผ่านการตรึงเชื้อเป็นเวลา 3-12 ชม. อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการเพิ่มระยะเวลาในการตรึงเชื้อของ NOB จะเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการถ่ายเทเชื้อที่เติบโตอยู่ที่ผิวของวัสดุตัวกรองพลาสติกมาสู่ไคโตซาน โดยไม่มีผลจากการเติบโตเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย เนื่องจาก NOB เป็นแบคทีเรียที่มีอัตราการเติบโตต่ำมาก ระยะเวลา 24 ชั่วโมงจึงอนุมานได้ว่าเซลล์ไม่มีการเพิ่มจำนวนขึ้น เมื่อมีจำนวน NOB ที่หลุดออกจากตัวกรองพลาสติกติดอยู่กับไคโตซานมากขึ้น จึงส่งผลทำให้อัตราการบำบัดไนโตรเจนมีค่าสูงขึ้น

ตามปกติแล้วการเตรียมตัวกรองชีวภาพไนตริฟิเคชันพร้อมใช้งาน จะต้องใช้เวลาในการตรึงหัวเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียไม่น้อยกว่า 30-45 วัน เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้มีอัตราการเติบโตที่ค่อนข้างต่ำ (Ruiz et al., 2006) และมีปริมาณน้อย ซึ่งการนำไคโตซานมาตรึงเชื้อสามารถลดระยะเวลาในการเตรียมตัวกรองชีวภาพไนตริฟิเคชันได้ ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวเกิดจากพื้นผิวของไคโตซานที่ถูกปรับสภาพด้วยพีเอช 6.5 มีประจุเป็นบวก และสามารถเกิดพันธะอิเลคโตรสแตติก (Electrostatic Interaction) กับประจุลบบนพื้นผิวของแบคทีเรียได้ดีกว่าวัสดุสังเคราะห์หรือพลาสติกที่ใช้ในปัจจุบันที่ไม่มีประจุ ผลจากการทดลองนี้อาจสรุปได้ว่าระยะเวลาในการตรึงเชื้อที่ 24 ชม. เป็นสภาวะที่เหมาะสมเพื่อลดระยะเวลาในการตรึงเชื้อลง ทั้งนี้เนื่องจากมีอัตราการบำบัดไนโตรเจนไม่แตกต่างกับที่เวลา 72 ชม. อย่างมีนัยสำคัญ

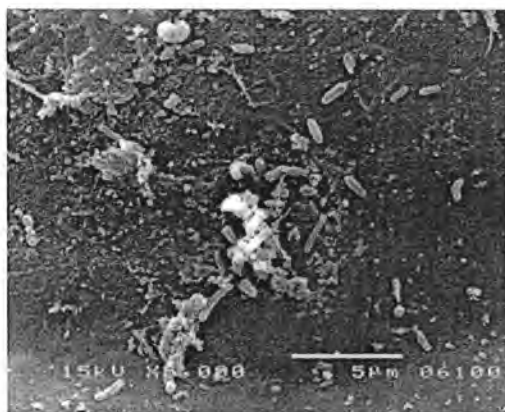
เมื่อทำการตรวจสอบลักษณะของเชื้อ NOB ที่เกาะติดบนผิวของไคโตซานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า รูปร่างแบคทีเรียที่ตรึงบนผิวของไคโตซานเป็นเวลา 3 และ 24 ชม. มีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยพบแบคทีเรียรูปท่อน (Rod) แต่ปริมาณการเกาะติดของแบคทีเรียแตกต่างกัน โดยพบว่า ระยะเวลาในการตรึง 3 ชม. มีปริมาณแบคทีเรียที่เกาะติดบนผิวไคโตซานน้อยกว่าที่เวลา 24 ชม. (ภาพที่ 4.5)



(ก) ชุดควบคุม



(ข) ระยะเวลาในการตรึง 3 ชม.

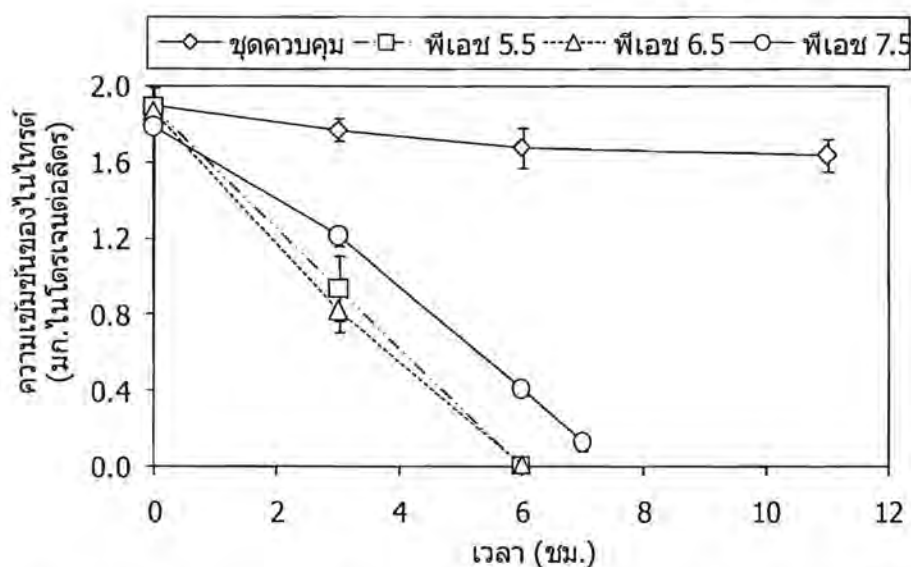


(ค) ระยะเวลาในการตรึง 24 ชม.

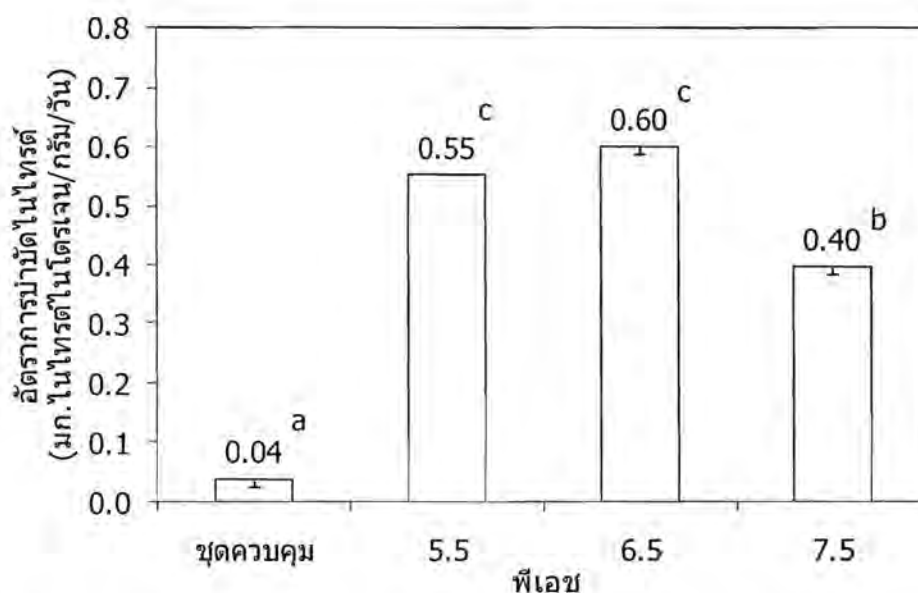
ภาพที่ 4.5 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงพื้นผิวของไคโตซานที่ไม่ผ่านการตรึงเชื้อ (ชุดควบคุม) และไคโตซานที่ผ่านการตรึงเชื้อในไตรด้ออกซิไดซิงแบบที่เรียเป็นเวลา 3 และ 24 ชม. (กำลังขยาย 5,000 เท่า)

4.1.2 ผลของการปรับพื้นผิวของไคโตซาน

ตัวอย่างไคโตซานที่ใช้ในการศึกษาผลของการปรับพื้นผิวไคโตซาน คือ Chitosan Lot A ซึ่งมีระดับการกำจัดหมู่อะซีทิลร้อยละ 91.13 ± 0.57 ขนาด 1-2 มม. จำนวน 0.60 กรัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการแช่ใน 70% เอทานอล ไปทำการปรับพื้นผิวของไคโตซานด้วยบัพเฟอร์ที่พีเอชแตกต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 5.5 6.5 และ 7.5 ส่วนของชุดควบคุมจะแช่ในน้ำกลั่นแทนบัพเฟอร์ จากนั้นนำไปตรึงเชื้อในไทรศ็อกซิไคซิงแบคที่เรียเป็นเวลา 24 ชม. และทำการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดในไทรศ็อกซิไคโตซานที่ผ่านการตรึงเชื้อแล้ว พบว่าไคโตซานที่ปรับพื้นผิวด้วยบัพเฟอร์ที่พีเอช 5.5 และ 6.5 สามารถลดความเข้มข้นของไนโตรเจนเหลือน้อยกว่า 0.10 มก. ในโตรเจน ภายในระยะเวลาเพียง 6 ชม. โดยมีอัตราการบำบัดในไทรศ็อกซิไคโตซานเท่ากับ 0.55 ± 0.05 และ 0.60 ± 0.05 มก. ในโตรเจนต่อกรัมต่อวัน ตามลำดับ ในขณะที่พีเอช 7.5 ใช้เวลาในการบำบัดในไทรศ็อกซิไคโตซานมากกว่า 6 ชม. โดยมีอัตราการบำบัดในไทรศ็อกซิไคโตซานเท่ากับ 0.40 ± 0.01 มก. ในโตรเจนต่อกรัมต่อวัน ดังภาพที่ 4.6 และ 4.7 จากการทดสอบทางสถิติพบว่า การปรับพื้นผิวของไคโตซานด้วยบัพเฟอร์ที่พีเอช 5.5 และ 6.5 มีอัตราการบำบัดในไทรศ็อกซิไคโตซานไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากในสถานะที่เป็นกรดอ่อน ไคโตซานจะมีความเป็นประจุบวกสูง จึงสามารถจับกับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีประจุเป็นลบได้ โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Strand et al. (2003) พบว่าการดูดซับ *E. coli* บนไคโตซานขึ้นอยู่กับพีเอช เนื่องจากไคโตซานเป็นพอลิอิเล็กโตรไลต์แบบอ่อน ดังนั้นความหนาแน่นของประจุจึงขึ้นอยู่กับค่าพีเอช อย่างไรก็ตามเพื่อให้เหมาะสมกับการนำไปใช้ในบ่อเลี้ยงกุ้งซึ่งมีพีเอชประมาณ 6-9 จึงเลือกที่จะปรับพื้นผิวของไคโตซานด้วยบัพเฟอร์ที่พีเอช 6.5 ซึ่งมีอัตราการบำบัดในไทรศ็อกซิไคโตซานสูงที่สุดเป็นสถานะที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองลำดับต่อไป



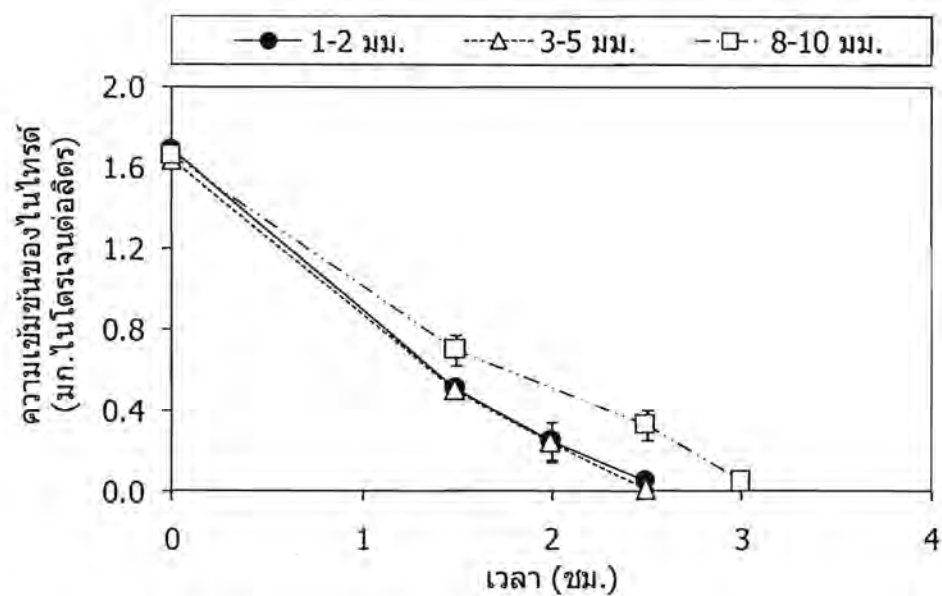
ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจนในไทรตด้วยโคโคซานที่ทำการปรับพื้นผิวด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอช 5.5 6.5 และ 7.5 หลังนำไปตรึงเชื้อไนโตรดออกซิโดซิงแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชม. เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (แช่น้ำกลั่น)



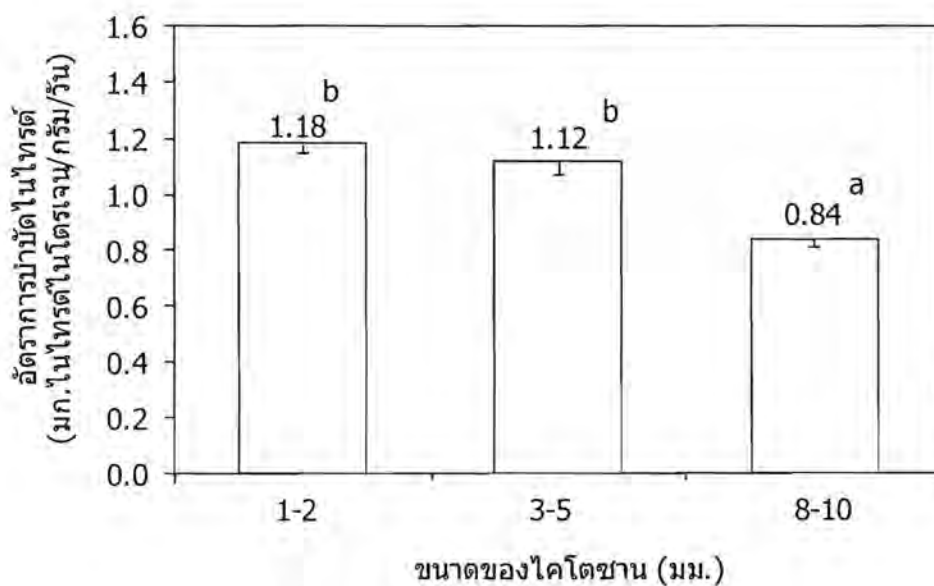
ภาพที่ 4.7 อัตราการบำบัดไนโตรเจนของโคโคซานที่ทำการปรับพื้นผิวด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอช 5.5 6.5 และ 7.5 หลังนำไปตรึงเชื้อไนโตรดออกซิโดซิงแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชม. เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (แช่น้ำกลั่น) โดยตัวอักษร a-c แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

4.1.3 ขนาดอนุภาคของไคโตซาน

ตัวอย่างไคโตซานที่ใช้ในการศึกษาผลของขนาดอนุภาคของไคโตซาน คือ Chitosan Lot A ซึ่งมีระดับการกำจัดหุ้จะซีทิลร้อยละ 91.13 ± 0.57 และมีขนาด 3 ระดับดังนี้ คือ ขนาดเล็ก (อยู่ในช่วง 1-2 มม.) ขนาดกลาง (อยู่ในช่วง 3-5 มม.) และขนาดใหญ่ (อยู่ในช่วง 8-10 มม.) จากนั้นนำไคโตซานแต่ละขนาดจำนวน 0.60 กรัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการแช่ใน 70% เอทานอล และปรับพื้นที่ผิวของไคโตซานด้วยบัฟเฟอร์พีเอช 6.5 ไปตรึงเชื้อในไทรด์ออกซิโดซิงแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชม. และทำการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดในไทรด์ของไคโตซานที่ผ่านการตรึงเชื้อแล้วพบว่าไคโตซานขนาด 1-2 มม. และ 3-5 มม.สามารถบำบัดในไทรด์ลดลงเหลือน้อยกว่า 0.30 มก. ไนโตรเจนต่อลิตร ภายในระยะเวลาเพียง 2 ชม. โดยมีอัตราการบำบัดในไทรด์เฉลี่ยเท่ากับ 1.18 ± 0.03 และ 1.12 ± 0.05 มก. ไนโตรเจนต่อกรัมต่อวัน ตามลำดับ ในขณะที่ไคโตซานขนาด 8-10 มม. ใช้เวลาในการบำบัดในไทรด์มากกว่า 2 ชม. โดยมีอัตราการบำบัดในไทรด์เฉลี่ยเท่ากับ 0.84 ± 0.03 มก. ไนโตรเจนต่อกรัมต่อวัน ดังแสดงในภาพที่ 4.8 และ 4.9 ทั้งนี้อาจสรุปได้ว่าขนาดของไคโตซานมีผลต่อการตรึงเชื้อ นั้นหมายถึงเมื่อนำไคโตซานเล็กลงทำให้มีพื้นที่ผิวจำเพาะมากขึ้น อย่างไรก็ตามจากการทดสอบทางสถิติพบว่าไคโตซานขนาด 1-2 มม. และ 3-5 มม. มีอัตราการบำบัดในไทรด์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เนื่องจากพื้นที่ผิวจำเพาะของไคโตซานขนาด 1-2 มม. และ 3-5 มม. มีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.41 และ 2.39 ตร.ม.ต่อกรัม ตามลำดับ จากการรายงานของ Manju et al. (2009) ที่ได้ทดลองตรึงเชื้อในทริฟายอิงแบคทีเรียบนอนุภาคของไม้ที่แตกต่างกัน 5 ขนาด และนำไปบำบัดในไทรด์ พบว่าอนุภาคเนื้อไม้ขนาด 0.3-1.5 มม. ซึ่งมีพื้นที่ผิว 1.87 ตร.ม.ต่อกรัม มีประสิทธิภาพในการบำบัดในไทรด์ได้ดีที่สุด จากผลการทดลองนี้จึงเลือกใช้ไคโตซานขนาด 1-2 มม. เป็นขนาดที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองลำดับต่อไป



ภาพที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนไตรต์ด้วยโคโตซาน 3 ขนาด ภายหลังจากนำไปตรึงเชื้อไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชม.



ภาพที่ 4.9 อัตราการบำบัดไนไตรต์ของโคโตซาน 3 ขนาด ภายหลังจากนำไปตรึงเชื้อไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชม. โดยตัวอักษร a และ b แสดงถึงค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

บทที่ 5

ข้อสรุป

ไคโตซานมีศักยภาพใช้เป็นวัสดุในการตรึงเชื้อไนโตรด็อกซีไดซิงแบคทีเรีย โดยประสิทธิภาพในการตรึงขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการตรึงเชื้อ พีเอชที่ใช้ในการปรับสภาพผิวของไคโตซานและขนาดอนุภาค โดยสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงได้แก่ ขนาดอนุภาคของไคโตซานเท่ากับ 1-5 มม. ผิวของไคโตซานควรปรับสภาพด้วยบัฟเฟอร์ พีเอช 6.5 และเวลาที่ใช้ในการตรึงเท่ากับ 24 ชั่วโมง

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ายังมีปัจจัยอื่นๆ ที่ควรศึกษาต่อเพื่อให้งานวิจัยนี้มีความสมบูรณ์มากขึ้นและสามารถเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบพร้อมใช้งาน โดยสามารถสรุปข้อเสนอแนะดังนี้

1. ควรศึกษาผลของระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลและน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานต่อประสิทธิภาพในการตรึงเชื้อไนโตรด็อกซีไดซิงแบคทีเรีย (แผนดำเนินการในปีที่ 2)
2. ควรการศึกษาผลของปริมาณ nitrite-oxidizing bacteria (NOB) และวิธีการเตรียมหัวเชื้อต่อการตรึงเชื้อ NOB บนวัสดุไคโตซาน
3. ควรเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนไคโตซานกับวัสดุชนิดอื่นๆ ตลอดจนการประเมินค่าใช้จ่ายในการตรึงเชื้อ
4. ควรศึกษาวิธีการควบคุมคุณภาพ พร้อมประสิทธิภาพของเชื้อไนโตรด็อกซีไดซิงแบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุไคโตซานหลังการเก็บรักษาในสภาวะต่างๆ
5. ควรทำการขยายสเกลการเตรียมเชื้อไนโตรด็อกซีไดซิงแบคทีเรียบนวัสดุไคโตซาน โดยใช้สภาวะที่ได้จากปีที่ 1
6. ควรทำการศึกษาในระดับภาคสนามถึงประสิทธิภาพของไคโตซานที่ผ่านการตรึงเชื้อไนโตรด็อกซีไดซิงแบคทีเรียในการควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กมลศิริ พันชนียะ. 2546. ไคติน-ไคโตซาน [ออนไลน์]. วิทยาศาสตร์ทั่วไป. แหล่งที่มา: <http://guru.sanook.com/pedia/topic/ไคติน-ไคโตซาน/> [2552, กุมภาพันธ์ 17]
- กรมอุตสาหกรรม. 2551. ปริมาณและมูลค่าการส่งออกกุ้งประเภทต่างๆ ปี 2542-2550 [ออนไลน์]. สถิติการส่งออกกุ้ง. แหล่งที่มา: <http://www.thailandshrimp.com/stat.html> [2552, กุมภาพันธ์ 10]
- จิตรวรา จันทร์ขอนแก่น. 2550. การดูดซับสีข้อมผ้าประเภทรีแอกทีฟด้วยมวลชีวภาพที่ไร้ชีวิตของ *Rhizopus arrhizus* ที่ถูกตรึงอยู่ในเม็ดเจลไคโตซาน. วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์.
- จุฑาทิพย์ คชนทร์มาศ. 2549. การใช้ไคโตซานที่ยึดเกาะด้วยเอนไซม์ในกระบวนการลดสีในน้ำเสียจากโรงงานฟอกย้อม. วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต, ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชลอ ลีสมสุวรรณ. 2535. สัมฤทธิ์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: บริษัทฐานเศรษฐกิจ จำกัด.
- ปิยรัตน์ บำรุงสาตี. 2550. การย่อยสลายของไคโตซานในดินภายหลังจากการดูดซับสีข้อมแอซิดกรีน 25. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พุทธ ส่องแสงจินดา. 2549. การจัดการสารประกอบไนโตรเจนในฟาร์มเลี้ยงกุ้งระบบเปิด [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.allvetgroup.com/KungThai/con_detail.php [2551, ตุลาคม 31]
- มะลิวัลย์ กุดะโค, นุสรา ศรีสัมฤทธิ์, สรวิศ เผ่าทองสุข และเปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต. 2550. การใช้ตัวกรองชีวภาพไนตริไฟเคชันในการบำบัดไนโตรเจนในอึ่งเลี้ยงสัตว์น้ำกลางแจ้ง. วารสารวิจัยสภาวะแวดล้อม 29: 23-45.
- เยาวภา ไหวพริบ. 2534. การผลิตไคตินและไคโตซานจากเปลือกกุ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุทธิทิรา บัวนาถ. 2547. การกำจัดโครเมียม (เฮกซะเวเลนซ์) นิกเกิล และตะกั่วในน้ำเสียอุตสาหกรรม โดยใช้เกล็ดไคโตซานจากเปลือกกุ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2543. ภาพรวมการใช้สารไคติน/ไคโตซานในประเทศไทย. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาเรื่อง เกษตรยุคใหม่กับไคติน-ไคโตซาน ภาค 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ภาษาอังกฤษ

- AOAC International. 2000. Official Methods of Analysis. 17th edition. Gaithersburg, MD: AOAC Int.
- Austin, P. R. 1988. Chitin solution and purification of chitin. Method in Enzymology 61: 403-407.
- Cárdenas, G., Orlando, P., and Edelio, T. 2001. Synthesis and applications of chitosan mercaptanes as heavy metal retention agent. Biological Macromolecules 28: 167-174.
- Chen, J. C., and Chin, S. E. 1992. Accumulation of nitrite in the haemolymph of *Penaeus monodon* exposed to ambient nitrite. Comparative Biochemistry and Physiology 103c: 477-481. Cited in Alcaraz, G., Chiappa-Carrara, X., and Vanegas, C. 1997. Temperature tolerance of *Penaeus setiferus* postlarvae exposed to ammonia and nitrite. Aquatic Toxicology 39(3-4): 345-353.
- Chen, Y. M., Liu, J.C., and Yih-Hsu, J. 1998. Flootation removal of algae from water. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 12: 49-55.
- Divakaran, R., and Pillai, V. N. S. 2002. Flocculation of river silt using chitosan. Water Research 36: 2414-2418.
- Ehrich, S., Behrens, D., Lebedeva, E., Ludwig, W., and Bock, E. 1995. A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. Archives of Microbiology 164: 16-23.
- El-Mamouni, R., Leduc, R., and Guiot, S. R. 1998. Influence of synthetic and natural polymers on the anaerobic granulation process. Water Science and Technology 38(8-9): 341-347.
- Gutierrez-Wing, M. T., and Malone, R. F. 2006. Biological filters in aquaculture: trends and research direction for fresh water and marine applications. Aquacultural Engineering 34(3): 163-171.

- Heath, A. G. 1995. Osmotic and ionic regulation. Water Pollution and fish Physiology 141-170. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. Cited in Wicks, B. J., Joensen, R., Tang, Q., and Randall, D. J. 2002. Swimming and ammonia toxicity in salmonids: the effect of sublethal ammonia exposure on the swimming performance of coho salmon and the acute toxicity of ammonia in swimming and resting rainbow trout. Aquatic Toxicology 59: 55-69.
- Hon, D. N. S. 1996. Chitin and chitosan: Medical application. In Polysaccharides in Medicinal Application. pp. 631-649. New York: Marcel Dekker.
- Kaseamchochoung, C., Lertsutthiwong, P., and Phalakornkule, C. 2006. Influence of chitosan characteristics and environmental conditions on flocculation of anaerobic sludge. Water Environment Research 78(11): 2210-2216.
- Leonard, N., Blancheton, J. P., and Guiraud, J. P. 2000. Population of heterotrophic bacteria in an experimental recirculating aquaculture system. Aquacultural Engineering 22: 109-120.
- Lertsittichai, S., Lertsutthiwong, P., and Phalakornkule, C. 2007. Improvement of Upflow Anaerobic Sludge Bed Performance Using Chitosan. Water Environment Research 79: 801-807.
- Lertsutthiwong, P., How, N., Chandkrachang, S., and Stevens, W. 2002. Effect of chemical treatment on the characteristics of shrimp chitosan. Metals, Materials and Minerals 12: 11-18.
- Lertsutthiwong, P., Sutti, S., and Powtongsook, S. 2009. Optimization of chitosan flocculation for phytoplankton removal in shrimp culture ponds. Aquacultural Engineering 41: 188-193
- Liu, C., Honda, H., Ohshima, A., Shinkai, M., and Kobayashi, T. 2000. Development of chitosan-magnetite aggregates containing *Nitrosomonas europaea* cells for nitrification enhancement. Bioscience and Bioengineering 89 (5): 420-425.
- Manju, N. J., Deepesh, V., Achuthan, C., Rosamma, P., and Bright Singh, I. S. 2009. Immobilization of nitrifying bacterial consortia on wood particles for bioaugmenting. Aquaculture 294: 65-75.
- Miyoshi, H., Shimura, K., and Kasuki, O. 1992. Characterization of some fungal chitosan. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 56: 1901-1905.

- Muzzarelli, R. A. A. 1977. Enzymatic synthesis of chitin and chitosan. Occurrence of chitin. In: Chitin (Muzzarelli R.A.A. edition). New York: Pergamon Press.
- Pan, G., Zou, H., Chen, H., and Yuan, X. 2006. Removal of harmful cyanobacteria blooms in Taihu Lake using local soils III. Factors affecting the removal efficiency and an in situ field experiment using chitosan-modified local soils. Environmental Pollution 357: 206-212.
- Pan, J. R., Huang, C., Chen, S., and Chung, Y. C. 1999. Evaluation of a modified chitosan biopolymer for coagulation of colloidal particles. Colloids and Surface 147: 359-364.
- Pan, Y., Montet, D., Rakshit, S.K., Nuchnoi, P., Chandkrachang, S., and Stevens, W.F. 1998. Utilization of Partially Deacetylated Chitin and Chitosan as Flocculent and Decolorant in Refining Sugar. Advances Chitin Science. Taiwan 3: 481-488.
- Plascencia, M., et al. 2000. Effect of chitosan on fungal growth using morphometric evaluation. Proceeding of eight International Chitin and Chitosan Conference and the forth Asia Pacific Chitin and Chitosan Symposium. pp. 256-259. Japan: Yamaguchi.
- Ramos, V. M., Pistonesi, M.F., Tombesi, N.B., Freije, R.H., Laurencena, B.R., and Agulló, Y.E. 1997. Advances Chitin Science Lyon 2: 853-855.
- Ruiz, G., Jeison, D., Rubilar, O., Ciudad, G., and Chamy, R. 2006. Nitrification-denitrification via nitrite accumulation for nitrogen removal from wastewaters. Bioresource Technology 97(2): 330-335.
- Seo, H., Mitsuhashi, K., and Tanibe, H. 1992. Antimicrobial and Antifungal Fiber Blended by Chitodan. Advances in Chitin and Chitosan. by Brine, C. J., Sandford, P. A., and Zikakis, J. P.: 34-40.
- Sesuk, T., Powtongsook, S., and Nootong, K. 2009. Inorganic nitrogen control in a novel zero-water exchanged aquaculture system integrated with airlift-submerged fibrous nitrifying biofilters. Bioresource Technology 100: 2088-2094.
- Strand, S. P., Varum, K. M., and Ostgaard, K. 2003. Interactions between chitosans and bacterial suspensions: adsorption and flocculation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 27:71-81.
- Wang, J. P., Chen, Y. Z., Ge, X. W., and Yu, H. Q. 2006. Gamma radiation-induced grafting of a cationic monomer onto chitosan as a flocculant. Chemosphere 66: 1752-1757.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

ก.1 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไนไตรต์ (Nitrite broth)

NaNO ₂	1.0	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
NaCO ₃	1.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	1.0	กรัม
MgSO ₄	0.3	กรัม
FeSO ₄	0.01	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ซังสารเคมีต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตามสัดส่วน นำมาละลายน้ำให้ละลายและเข้ากันดี ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 7-8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อปรับความดันที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

หมายเหตุ อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นไนไตรต์ประมาณ 203 มก.ไนไตรต์ในโคโรเจนต่อลิตร

วิธีวิเคราะห์สมบัติของไลโคซาน

ก.2 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (พัฒนาเทคนิคและดัดแปลงวิธีมาจาก AOAC, 2000)

1. ออบ crucible ในตู้อบอุณหภูมิ 105 °ซ อย่างน้อย 2 ชั่วโมง
2. นำ crucible ดังกล่าวมาใส่ใน desiccator และทิ้งไว้ให้เย็นลง ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30 - 60 นาที ก่อนชั่งน้ำหนัก
3. ชั่งตัวอย่างไลโคซานประมาณ 1 กรัม ใส่ใน crucible ดังกล่าว และจดบันทึกน้ำหนัก ก่อนนำไปอบที่ 105 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. นำมาใส่ใน desiccator ให้อุณหภูมิลดลงถึงอุณหภูมิห้อง ซึ่งใช้เวลาประมาณ 30 - 60 นาที และทำการชั่งน้ำหนัก

คำนวณปริมาณความชื้นดังสมการข้างล่างนี้:

$$\text{ความชื้น (\%)} = \frac{(B - C) \times 100}{(B - A)}$$

- โดยที่ A = น้ำหนัก crucible หลังอบที่ 105 °ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง
- B = น้ำหนัก crucible ที่มีตัวอย่างไลโคซานอยู่ก่อนอบที่ 105 °ซ
- C = น้ำหนัก crucible ที่มีตัวอย่างไลโคซานอยู่หลังอบที่ 105 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ: การชั่งน้ำหนักจะใช้ทศนิยม 4 ตำแหน่ง ตลอดการทดลอง

ก.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการละลาย (solubility) (พัฒนาเทคนิคและดัดแปลงวิธีมาจาก Roberts, 1992)

1. ชั่งโคโคซาน 1 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. จากนั้นเติมสารละลายกรด อะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 100 มล. และปิดปากขวดด้วยพาราฟิล์มหรือพลาสติก
2. นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25 °ซ) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ทำการอบกระดาศกรอง GF/C ที่ 105 °ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักกระดาศกรองหลังทิ้งให้เย็นลงใน desiccator เป็นเวลาประมาณ 30 นาที
4. เมื่อเขย่าสารละลายโคโคซานครบ 24 ชั่วโมง นำสารละลายดังกล่าวมากรองด้วยกระดาศกรองที่เตรียมไว้ โดยใช้ suction ช่วยในการกรอง
5. นำกระดาศกรองที่มีโคโคซานเจลและสิ่งเจือปนที่กรองได้ไปอบที่ 105 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. นำมาใส่ไว้ใน desiccator ประมาณ 30 - 60 นาที ก่อนชั่งน้ำหนัก

คำนวณความสามารถในการละลายดังสมการข้างล่างนี้:

$$\text{ความสามารถในการละลาย (\%)} = \left(1 - \frac{(B - A)}{C} \right) \times 100$$

โดยที่ A = น้ำหนักกระดาศกรอง (กรัม)
 B = น้ำหนักส่วนที่กรองได้และกระดาศกรองหลังอบที่ 105 °ซ นาน 24 ชั่วโมง (กรัม)
 C = น้ำหนักโคโคซานเริ่มต้น (กรัม)

หมายเหตุ: การชั่งน้ำหนักจะใช้ตลับน้ำหนัก 4 ตำแหน่งตลอดการทดลอง

ก.4 การเตรียมตัวอย่างเพื่อหาค่าระดับการกำจัดหมู่อะซิติก (Degree of Deacetylation) (พัฒนาเทคนิคและดัดแปลงมาจาก Muzzarelli และ Rocchetti, 1985)

1. ละลาย 0.2 กรัม ของตัวอย่างไคโตซาน ใน 100 มล. ของ 0.2 โมลาร์กรดอะซิติก โดยนำมาเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าไคโตซานจะละลาย
2. นำสารละลายไคโตซานดังกล่าวมา 5 มล. และเติมน้ำให้ได้ 100 มล. ใน volumetric flask ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายไคโตซาน คือ 0.01 กรัม ไคโตซานใน 100 มล. ของ 0.01 โมลาร์กรดอะซิติก
3. นำสารละลายที่ได้หา the first derivative โดยใช้เครื่อง spectrophotometer และหาค่า H เพื่อนำมาหาค่าความเข้มข้นของ N-acetyl-D-glucosamine จากสมการความสัมพันธ์ของกราฟมาตรฐาน (standard calibration curve) ของ N-acetyl-D-glucosamine

คำนวณค่า degree of deacetylation ดังสมการข้างล่างนี้:

$$\% \text{ degree of deacetylation (\%DD)} = \left(1 - \left(\frac{A}{\frac{((10 \times W) - 204 A) + A}{161}} \right) \right) \times 100$$

โดยที่ A = ความเข้มข้นของ N-acetyl-D-glucosamine ที่วัดได้ (กรัมต่อลิตร) หารด้วย 204

W = น้ำหนักของตัวอย่างไคโตซาน (กรัม) ใน 100 มล. ของ 0.01 โมลาร์ กรดอะซิติก

204 = น้ำหนักโมเลกุลของ N-acetyl-D-glucosamine

161 = น้ำหนักโมเลกุลของ D-glucosamine

ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ข.1 วิธีวิเคราะห์แอมโมเนีย

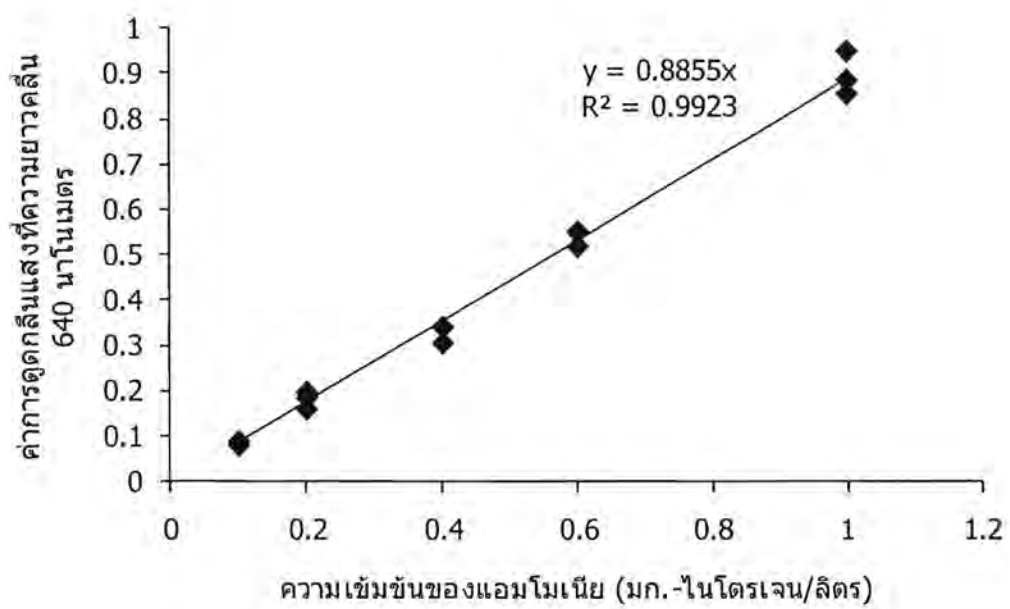
การวิเคราะห์ความเข้มข้นของแอมโมเนียในน้ำใช้วิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่อ้างอิงจาก Strickland และ Parsons (1972) โดยเก็บตัวอย่างน้ำมาทำการกรองก่อนเก็บใส่ขวดพลาสติกขนาด 30 มล. ควรทำการวิเคราะห์ทันทีหลังเก็บตัวอย่าง แต่หากยังไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ทันทีควรนำตัวอย่างน้ำแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -15°C

- การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายฟีนอล เตรียมโดยการละลายฟีนอล 20 กรัม ใน 95 เปอร์เซ็นต์เอทิลแอลกอฮอล์ และปรับให้ได้ปริมาตร 200 มล.
2. สารละลายโซเดียมไนโตรพัสไซด์ เตรียมโดยละลาย $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 กรัม ในน้ำ D.I. และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 200 มล.
3. สารละลายออกซิโคซ์ซิงค์ เตรียมโดยการผสมอัลคาไลนรีเอเจนต์ (ละลายโซเดียมซิงค์เตรต 100 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 กรัม ในน้ำ D.I. ปริมาตร 500 มล.) กับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (ใช้สารละลายไฮโปคลอไรด์ทางการค้าซึ่งมีความเข้มข้น 1.5 นอร์มอล) ในอัตราส่วน 4 ต่อ 1

- ขั้นตอนการวิเคราะห์

ปิเปตน้ำตัวอย่าง 5 มล. ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายฟีนอลปริมาตร 0.2 มล. และสารละลายโซเดียมไนโตรพัสไซด์ปริมาตร 0.2 มล. ตามลำดับ จากนั้นเติมสารละลายออกซิโคซ์ซิงค์ แล้วจึงปิดฝาหลอดทดลองด้วยฟาราฟิล์มและเขย่าให้เข้ากัน (ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ข้าง) ตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม. ก่อนทำการวิเคราะห์ สำหรับ Blank ใช้น้ำกลั่น (De-ionized water) ที่ใส่สารเคมีแบบเดียวกับตัวอย่างน้ำ จากนั้นจึงนำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร สำหรับสารละลายแอมโมเนียมาตรฐานเตรียมที่ความเข้มข้น 0.1 0.2 0.4 0.6 และ 1.0 มก.-ในโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ จากสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียเข้มข้น (ความเข้มข้น 100 มก.-ในโตรเจนต่อลิตร) ดังแสดงในรูปที่



รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานสำหรับแอมโมเนีย

ข.2 วิธีวิเคราะห์ไนไตรต์

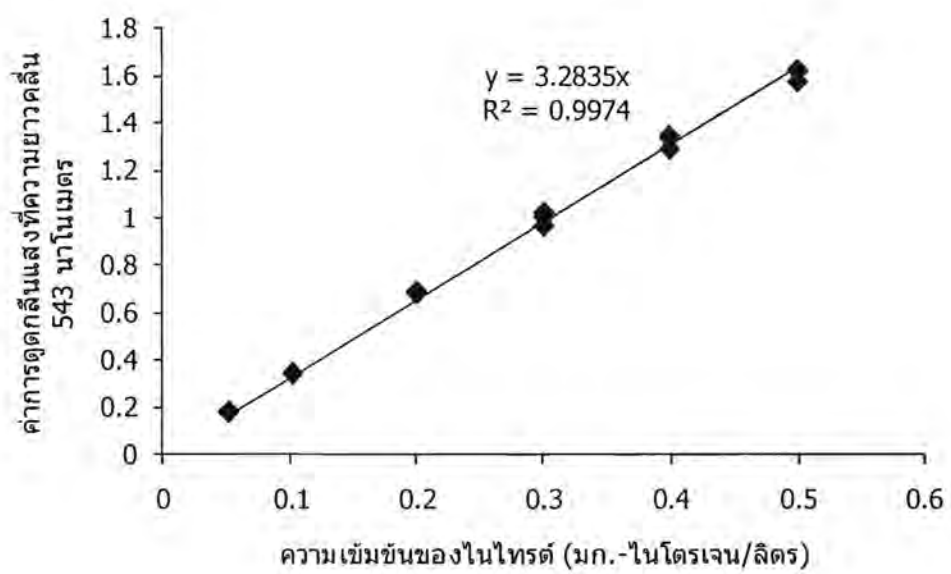
การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนไตรต์ในน้ำ ใช้วิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่อ้างอิงมาจาก Strickland และ Parsons (1972) โดยเก็บตัวอย่างน้ำมาทำการกรองก่อนเก็บใส่ขวดพลาสติกขนาด 30 มล. ควรทำการวิเคราะห์ทันทีหลังเก็บตัวอย่าง แต่หากยังไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ทันทีควรนำตัวอย่างน้ำแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -15°C

- การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายซัลฟานิลาไมด์ เตรียมโดยละลายซัลฟานิลาไมด์ 5 กรัม ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 50 มล. จากนั้นเติมน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เท่ากับ 500 มล. เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 2 ถึง 8 นาที
2. สารละลายเอ็นเอ็นอีดี เตรียมโดยละลาย N-(1-Naphthyl)-Ethylenediamine Dihydrochloride 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 500 มล.

- ขั้นตอนการวิเคราะห์

ปีเปิดน้ำตัวอย่าง 5 มล. ใส่ลงในหลอดทดลอง ทำการเติมสารละลายซัลฟานิลาไมด์ ปริมาตร 0.1 มล. และสารละลายเอ็นเอ็นอีดีปริมาตร 0.1 มล. ตามลำดับ ปิดหลอดทดลองด้วยพาราฟิล์มและเขย่าให้เข้ากัน (ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ) ตั้งตัวอย่างทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการวิเคราะห์ โดยใช้ น้ำกลั่น (De-ionized water) เป็น Blank และใส่สารเคมีแบบเดียวกันกับตัวอย่างน้ำ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร สำหรับสารละลายไนไตรต์มาตรฐานเตรียมที่ความเข้มข้น 0.05 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มก.-ใน โครเจนต่อลิตร ตามลำดับ จากสารละลายมาตรฐานไนไตรต์เข้มข้น (ความเข้มข้น 100 มก.-ใน โครเจนต่อลิตร) ดังแสดงในรูปที่ ข-2

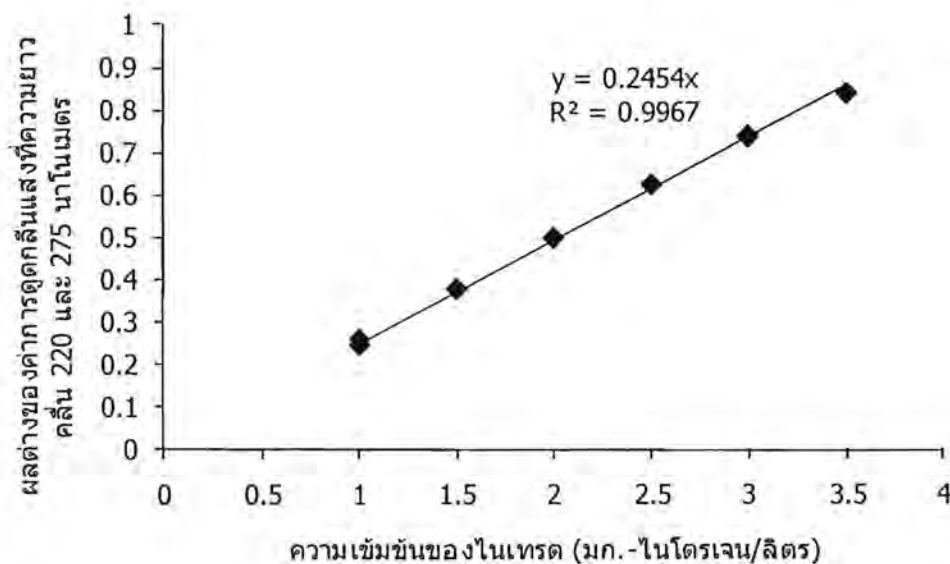


รูปที่ ข-2 กราฟมาตรฐานสำหรับไนไตรต์

ข.3 วิธีวิเคราะห์ไนเตรต

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนเตรตใช้วิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่อ้างอิงมาจาก Strickland และ Parsons (1972) โดยเก็บตัวอย่างน้ำมาทำการกรองก่อนเก็บใส่ขวดพลาสติกขนาด 30 มล. ควรทำการวิเคราะห์ทันทีหลังเก็บตัวอย่าง แต่หากยังไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ทันทีควรนำตัวอย่างน้ำแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -15°C

การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของไนเตรตดำเนินการโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 220 และ 275 นาโนเมตร ตามลำดับ และใช้น้ำกลั่นเป็น Blank โดยไม่มีการเติมสารเคมี จากนั้นจึงนำผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงทั้งสองค่าไปใช้ในการคำนวณหาปริมาณไนเตรต ซึ่งค่าไนเตรตที่คำนวณได้ต้องนำไปลบด้วยปริมาณไนไตรต์ในตัวอย่างน้ำเดียวกัน เนื่องจากการวิเคราะห์ไนเตรตด้วยวิธีนี้จะเป็นการวิเคราะห์ไนไตรต์รวมไปด้วย สำหรับสารละลายไนเตรตมาตรฐานได้เตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 และ 3.5 มก.-ไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ จากสารละลายมาตรฐานไนเตรตเข้มข้น (ความเข้มข้น 100 มก.-ไนโตรเจนต่อลิตร) ดังแสดงในรูปที่ ข-3



รูปที่ ข-3 กราฟมาตรฐานสำหรับไนเตรต

ข.4 วิธีวิเคราะห์ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมดในน้ำ

วิเคราะห์ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมดด้วยวิธีการซึ่งอ้างอิงมาจาก Standard Method (1998) โดยการนำกระดาษกรอง GF/C ขนาด 47 มม. มาอบและชั่งน้ำหนักจนคงที่ จากนั้นนำน้ำตัวอย่างมากรองผ่านกระดาษกรอง แล้วจึงนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. เมื่อนำกระดาษกรองออกจากตู้อบให้นำไปใส่ไว้ในโถดูดความชื้นจนกระดาษกรองเย็นลง แล้วจึงนำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง เพื่อหาค่าน้ำหนักของของแข็งแขวนลอยทั้งหมดในน้ำ ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด} = \frac{\text{นน.กระดาษกรองหลังกรองน้ำ} - \text{นน.กระดาษกรองก่อนกรองน้ำ} \times 10^6}{\text{ปริมาตรน้ำที่กรอง (มล.)}}$$

ภาคผนวก ค
ผลลัพธ์ที่ได้จากงานวิจัย

1. บัณฑิตในระดับปริญญาโทสาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์:
นางสาวดวงชีวัน บุญเฟือก
หัวข้อวิทยานิพนธ์: การตรึงไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนไคโตซานเพื่อใช้ในการบำบัด
น้ำในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ
2. บทความวิชาการในระดับนานาชาติที่มี impact factor:
Lertsutthiwong, P., Boonpuak, D., Pungrasmi, W., Powtongsook, S. Immobilization of
Nitrite Oxidizing Bacteria using Biopolymeric Chitosan Media. *Journal of Environmental
Sciences*. 2013, **25(2)**: 262–267
3. เผยแพร่ผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ:
Boonpuak, D., Pungrasm, W., **Lertsutthiwong, P.,** Powtongsook, S. Effects of
Immobilization Time and pH adjustment on the Immobilization of Nitrite-oxidizing Bacteria
on Chitosan. The 2010 International Conference on Biology, Environment and Chemistry
(ICBEC 2010), Hong Kong, 28-30 December, 2010.



Immobilization of nitrite oxidizing bacteria using biopolymeric chitosan media

Pranee Lertsutthiwong^{1,*}, Duangcheewan Boonpuak², Wiboonluk Pungrasmi²,
Sorawit Powtongsook^{3,4}

1. Metallurgy and Materials Science Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. E-mail: Pranee.L@chula.ac.th

2. Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

3. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Pathum Thani 12120, Thailand

4. Center of Excellence for Marine Biotechnology, Department of Marine Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Received 30 May 2012; revised 23 August 2012; accepted 24 August 2012

Abstract

The effects of chitosan characteristics including the degree of deacetylation, molecular weight, particle size, pH pretreatment and immobilization time on the immobilization of nitrite-oxidizing bacteria (NOB) on biopolymeric chitosan were investigated. Nitrite removal efficiency of immobilized NOB depended on the degree of deacetylation, particle size, pH pretreatment on the surface of chitosan and immobilization time. Scanning electron microscope characterization illustrated that the number of NOB cells attached to the surface of chitosan increased with an increment of immobilization time. The optimal condition for NOB immobilization on chitosan was achieved during a 24-hr immobilization period using chitosan with the degree of deacetylation larger than 80% and various particle size ranges between 1–5 mm at pH 6.5. In general, the NOB immobilized on chitosan flakes has a high potential to remove excess nitrite from wastewater and aquaculture systems.

Key words: chitosan; immobilization; nitrite-oxidizing bacteria; pH adjustment

DOI: 10.1016/S1001-0742(12)60059-X

Introduction

Over the last decade, outdoor-lining ponds have become an alternative aquaculture system instead of earthen ponds because of the low risk of water leakage and ease of cleaning after each crop. However, the accumulation of nitrogenous waste, especially nitrite which is commonly found in outdoor-lining ponds can directly harm aquatic animals and this is claimed to be a drawback of this lining pond system. To solve this problem, several techniques have been applied, for example, nitrogen uptake by phytoplankton (Chuntapa et al., 2003; Hargreaves, 2006; Lertsutthiwong et al., 2009) has been applied for nitrogen removal in aquaculture systems but planktonic algae cells are difficult to remove from aquaculture systems by conventional gravity or filtration. Consequently, the high density of algae in the pond also depletes dissolved oxygen in the pond at night time. Hence, the most common technique for nitrogenous waste removal is water exchange but it leads not only to an increase in production costs and the risk of pathogen outbreak but also to water discharge polluting the water resources. Among several techniques

applied for nitrogen removal from aquaculture systems (Crab et al., 2007; De Schryver et al., 2008; De Schryver and Verstraete, 2009; Fierro et al., 2008; Liu et al., 2000; Ruiz et al., 2006), biofiltration using nitrification process is accepted as the most feasible nitrogen treatment process.

Biofiltration or the conversion of ammonia to nitrate by nitrifying bacteria is one of the most efficient processes for nitrogen treatment in recirculating aquaculture systems (RAS). Nitrification takes place with two groups of autotrophic bacteria, ammonia oxidizing bacteria (AOB) and nitrite oxidizing bacteria (NOB), both of which comprise slow-growing species and are highly sensitive to the changing environment. Setting up a new RAS requires a long bacteria acclimation period, e.g. 3–4 weeks, until both the AOB and NOB are fully activated (Shan and Obbard, 2001). Without complete acclimation, an accumulation of highly toxic nitrite is generally found due to the incomplete nitrification process. Biofiltration in the RAS represents an immobilization of AOB and NOB on a certain media in order to maintain the water quality in aquaculture system (Dong et al., 2011; Manju et al., 2009; Sumino et al., 1992). Moreover, most of the biofilter devices are applied to indoor RAS such as aquariums or indoor intensive

* Corresponding author. E-mail: Pranee.L@chula.ac.th

fish tanks. Conventional biofiltration RAS using nitrifying bacteria immobilized on plastic or other materials such as ceramic or beads is not applicable for outdoor lining-ponds which are generally large (up to 1 Hectare) and exposed to direct sunlight. Other immobilization techniques based on microbial cell entrapment were also reported. For example, poly(vinyl alcohol) matrices in the forms of particle (Rosstron et al., 2001), cryogel (Lozinsky and Plieva, 1998) and hydrogel (Nishio et al., 1998) were developed using freeze-thawing technique. Although poly(vinyl alcohol) matrices performed good cell immobilization, but the preparation by freeze-thawing technique is quite expensive and may danger to some bacteria that sensitive to temperature (Lozinsky and Plieva, 1998). Moreover, these entrapment cells are not suitable for the mass production. Hence, this study proposes the use of nitrifying bacterial immobilizing on biopolymeric materials as an alternative biofilter for large aquaculture ponds.

Biopolymeric chitosan or poly [β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose] is mainly extracted from shrimp biowaste (Lertsutthiwong et al., 2002). It is composed of *N*-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine units linked by β -(1 \rightarrow 4)-glycosidic bonds as shown in Fig. 1. Due to its properties such as biodegradability, biocompatibility, cationic character and non-toxicity, chitosan can be used in various applications including water and wastewater treatments (Franco and Peter, 2011; Rinaudo, 2006). For example, chitosan can form complexes with microorganism (El-Mamouni et al., 1998; Strand et al., 2003) due to its cationic character. Various studies have focused on flocculation and the immobilization of microorganisms (Fierro et al., 2008; Kaseamchochoung et al., 2006; Lertsittichai et al., 2007; Lertsutthiwong et al., 2009; Wang et al., 2008), but the use of chitosan as a biofilter media for NOB immobilization has not been evaluated. Therefore, the present work was undertaken to optimize immobilization conditions by investigating the effects of chitosan characteristics, pH pretreatment and the immobilization time on the nitrite removal rate of NOB immobilized chitosan. The chitosan with attached nitrifying bacteria is therefore a novel practical technique for water quality control in outdoor-lining aquaculture ponds because it can be directly added into the pond to enhance nitrification process so the toxic ammonia and nitrite during the first month of the crop could be controlled.

1 Materials and method

1.1 Chitosan

Chitosan with a degree of deacetylation (DD) of 91% and

molecular weight of 410,000 g/mol was supplied by Ebase (Bangkok, Thailand). Chitosan with molecular weight of 310,000 and 580,000 g/mol and chitin were supplied by A.N. Laboratory (Samut Sakorn, Thailand). The DD of these chitosans was controlled at $85\% \pm 5\%$. Chitosan with a DD of 92% having molecular weight of 200,000 g/mol was prepared by alkaline deacetylation of shrimp chitin (Lertsutthiwong et al., 2002). Prior to use, the chitosan flakes were sterilized with 70% ethanol for 2 min and their surface charges modified by soaking with buffer at the required pH.

1.2 Nitrifying bacteria

The mix-culture of nitrifying bacteria naturally attached as biofilm on polyethylene media (BCN-009, 2H GmbH, Germany) was collected from an indoor recirculating shrimp tank with 30 PSU salinity at the Center of Excellence for Marine Biotechnology, Chulalongkorn University in Bangkok, Thailand. This media was porous plastic with a 10 mm diameter, 8 mm in height and $864 \text{ m}^2/\text{m}^3$ in specific surface area. Incubation of the NOB in the laboratory at $28 \pm 3^\circ\text{C}$ was performed by mixing the biofilter media from the shrimp tank with the new filter media in 30 PSU seawater. The new biofilter media was disinfected with chlorine before being incubated with natural nitrifying bacteria population under selective conditions for NOB in which 10 mg-N/L sodium nitrite was added as the sole nitrogen source. Alkalinity in the water was maintained between 100–120 mg/L and oxygen was continuously supplied to the system by aeration.

1.3 Immobilization of NOB on chitosan

Twenty pieces of plastic biofilter media (BCN-009) with active NOB biofilm were transferred into a container containing 40 mL of sterilized 30 PSU seawater with 2 mg-N/L nitrite and sonicated for 4 min to the detached NOB cells. Thereafter, the biofilter media were replaced with 0.60 g of sterilized chitosan flakes under 150 r/min agitation at 25°C . With this immobilization process, a significant number of bacterial cells could be transferred from the biofilter media to the chitosan flakes. The chitosan agitation period was varied at 3, 6, 12 and 24 hr. The efficiency of NOB immobilized chitosan on nitrite removal was determined by placing 0.60 g of NOB immobilized chitosan flakes in 40 mL seawater containing 2 mg N/L of nitrite. The decrease in nitrite concentration was monitored using the standard method of seawater analysis (Strickland and Parson, 1972). Moreover, bacterial attachment on the surface of the chitosan flakes was visualized by scanning electron microscope (SEM).

To study the effect of pH pretreatment on NOB immobilization, the sterilized chitosan was soaked in a buffer solution at pH 5.5, 6.5 or 7.5 for 2 min before immobilizing with NOB as mentioned above. Nitrite removal rates were then evaluated to find an appropriate condition for bacterial

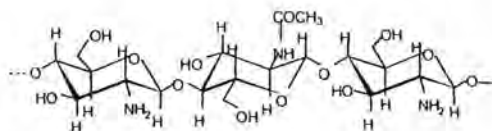


Fig. 1 Chemical structure of chitosan.

immobilization. After achieving a suitable condition, the effect of DD (i.e. 82% and 91%), molecular weight (i.e. 200,000, 410,000 and 580,000 g/mol) and size of chitosan (i.e. 1–2, 3–5 and 8–10 mm) were then investigated.

1.4 Statistical analysis

All of the tests were performed in triplicate and data was expressed as mean values \pm standard deviation. Statistical analysis was performed by analysis of variance with a further Duncan's multiple range test.

2 Results and discussion

Mixed culture of nitrifying bacteria from RAS biofilters was immobilized on plastic media after 45 days incubation in shrimp culture tanks. This was following by NOB selection in nitrite broth under laboratory conditions. The desired condition for NOB selection is presented in **Table 1** (Hart and O'sullivan, 1993; Lawson, 1995; Satoh et al., 2000; Timmons and Losordo, 1994). The activity of selected NOB on plastic media is shown in **Fig. 2**. It was found that nitrite concentration in the water was reduced to 0.20 mg-N/L within 8 hr and nitrite removal rate was about 28.09 ± 0.58 mg-N/(m²·day). Consequently, nitrate concentration in the test chamber increased in proportion to the decrease of nitrite while ammonia remained constant. This indicated the complete nitrite oxidation process.

2.1 Effect of immobilization time

The results in **Fig. 3** illustrate that the variation of immobilization time influenced the nitrite removal efficiency of the NOB immobilized chitosan. The reduction of nitrite

Table 1 Quality of nitrite broth used for selection of nitrite-oxidizing bacteria (NOB)

Parameter	Value
Alkalinity (mg/L)	113.33 \pm 8.16
Salinity (PSU)	30.33 \pm 0.52
Temperature (°C)	26.50 \pm 0.15
Dissolved oxygen (mg/L)	5.43 \pm 0.21
pH	7.34 \pm 0.18

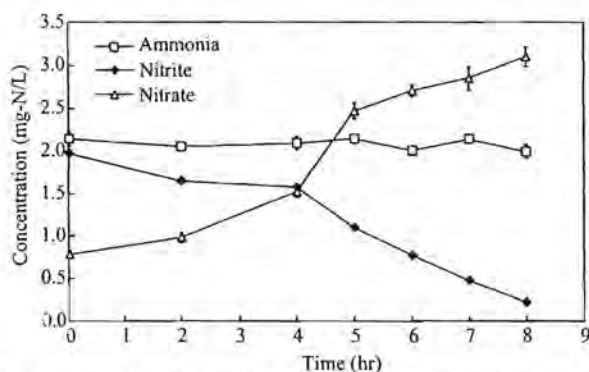


Fig. 2 Activity of selected NOB stock culture in terms of ammonia, nitrite and nitrate concentrations.

concentration was a function of incubation time (**Fig. 3a**). A longer immobilization time exhibited a faster nitrite removal rate (**Fig. 3b**). As expected, a greater immobilization time allowed more NOB cells to be attached to the surface of chitosan. This was confirmed by SEM analysis as shown in **Fig. 4**. It was clear that a higher number of NOB were found on the chitosan surface after 24 hr immobilization time, hence a higher nitrite removal rate was the result of cell coverage on chitosan surface.

In general, the incubation period of NOB on conventional nitrification biofilter media takes about 30–45 days because of the limitation of NOB cells in natural waters and the substantially lower growth rate of the nitrifying bacteria (Ruiz et al., 2006). According to the results of this study (**Fig. 3**), the use of chitosan as a biofilter media can reduce the immobilization time by the immediate transfer of NOB from pre-acclimated stock of NOB into the chitosan flakes. This phenomenon might be explained by the cationic character of chitosan in slightly acidic conditions. In the beginning, sterilized chitosan modified its surface through soaking in buffer at pH 6.5 that resulted in high cationic charges on the chitosan surface. Consequently, this treated chitosan could interact with the anionic charges of the bacterial cell wall (Lertsutthiwong et al., 2009; Strand et al., 2003). On the other hand, conventional plastic biofilter media are non-ionic polymers, so the attachment of NOB to plastic surfaces without electrostatic interaction requires a longer time with, probably, a lower in adhesion strength.

2.2 Effect of pH pretreatment

As expected, the nitrite removal efficiency of NOB immobilized on chitosan strongly depended on the pH pretreatment of the chitosan surface (**Fig. 5**). Compared with the control (without pH adjustment), pH adjustment between 5.5 to 7.5 significantly affected nitrite removal of the immobilized NOB on chitosan. Statistical analysis revealed that the pH adjustment to acidic (pH 5.5–6.5) could enhance the NOB attachment to the chitosan surface and, hence, nitrite removal was significantly enhanced. This might be explained by the fact that more protons are available at lower pH and resulting in more positive charge on $-NH_2$ on the chitosan molecules (Chatterjee et al., 2007). In the other words, the charge density of chitosan depends on pH pretreatment (Kasemchochoung et al., 2006). With a pH of less than 7, chitosan contains high cationic charges which allow ionic bonding to anionic cell wall of the bacteria. In practice, chitosan surface should be treated with the buffer at pH 6.5 before the NOB immobilization process.

2.3 Effect of particle size of chitosan

Figure 6 illustrates the reduction of nitrite concentration as a function of the particle size of chitosan. NOB immobilized on chitosan with a size of 1–2 mm and 3–5 mm

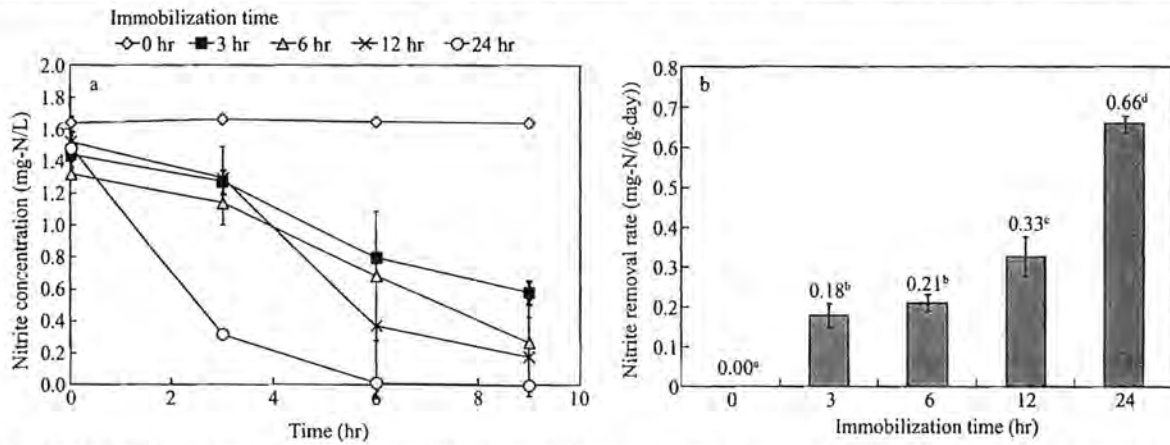


Fig. 3 Effect of immobilization time on nitrite concentration (a) and nitrite removal rate (b). The different letters in a graph under each immobilization time represent a significant difference ($P < 0.05$).



Fig. 4 SEM images of bacteria immobilizing on chitosan after immobilization for 0, 3 and 24 hr.

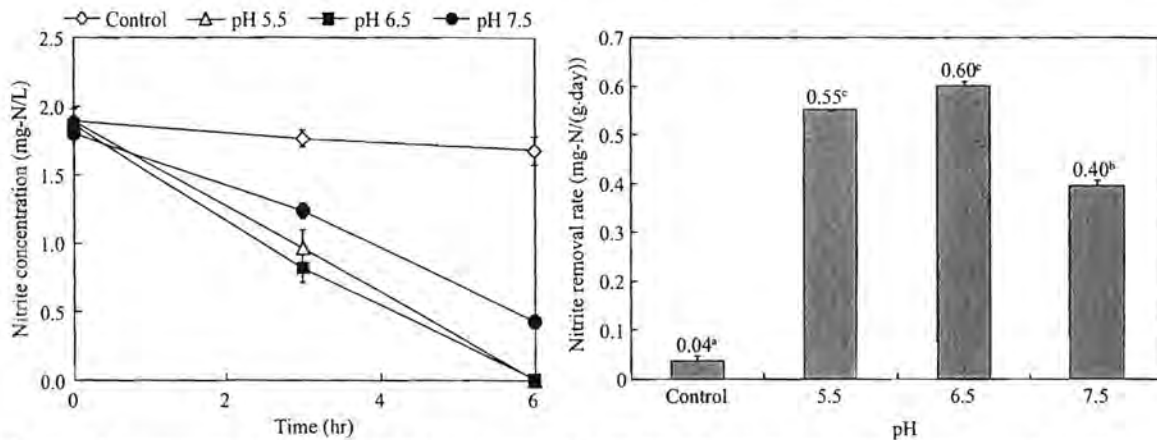


Fig. 5 Effect of pH pretreatment on nitrite concentration and nitrite removal rate. The different letters in a graph represent a significant difference ($P < 0.05$).

could reduce almost 100% of nitrite concentration within 2.5 hr (Fig. 6a) with a nitrite reduction rate of 1.18 ± 0.03 and 1.12 ± 0.05 mg-N/(g-day) (Fig. 6b), respectively. However, chitosan with a size of 8–10 mm took about 3 hr to remove nitrite with a rate of 0.84 ± 0.03 mg-N/(g-day). Similar results were also observed in nitrifying bacteria immobilized on wood particles reported by Manju et al. (2009). Wood particles with a size of 0.3–1.5 mm gave the best efficiency of nitrite removal. However, statistical analysis did not show a significant difference between

chitosan with a size of 1–2 mm and 3–5 mm ($P > 0.05$) but these two particle sizes showed significant difference from those sized 8–10 mm ($P < 0.05$). According to the results, the optimal size of chitosan used for the immobilization of NOB should be lower than 5 mm.

2.4 Effect of degree of deacetylation of chitosan

It was clear that deacetylation enhanced the NOB attachment to the chitosan surface. Figure 7 demonstrates that NOB immobilized on chitosan with either DD 82% or DD

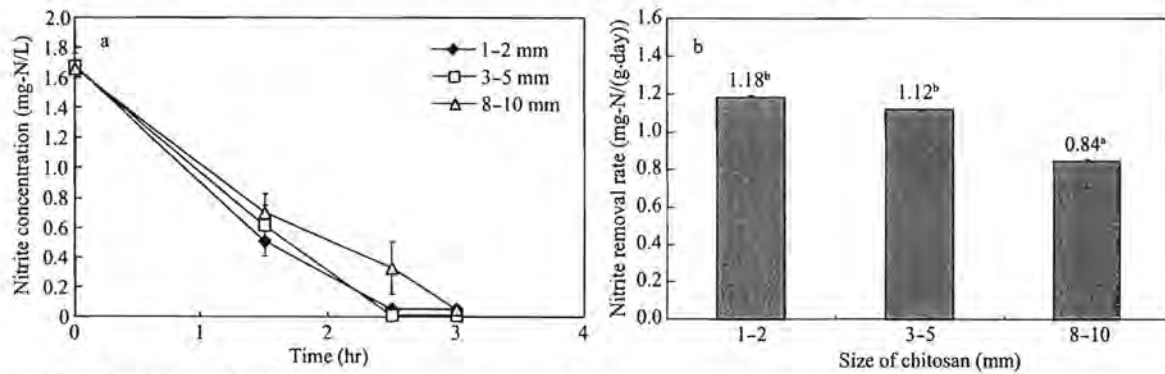


Fig. 6 Effect of particle size of chitosan on nitrite concentration (a) and nitrite removal rate (b). The different letters in a graph represent a significant difference ($P < 0.05$).

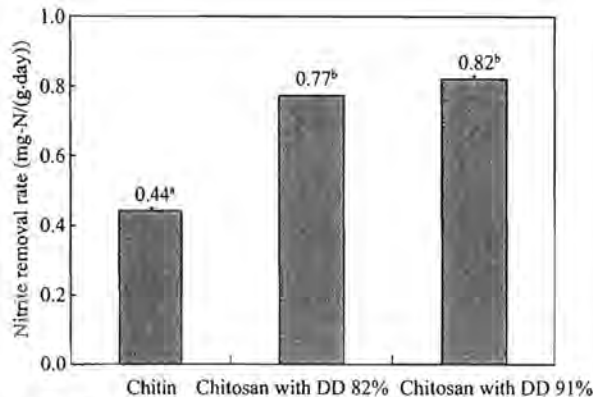


Fig. 7 Effect of degree of deacetylation of chitosan on nitrite removal rate. The different letters in a graph represent a significant difference ($P < 0.05$). DD: degree of deacetylation.

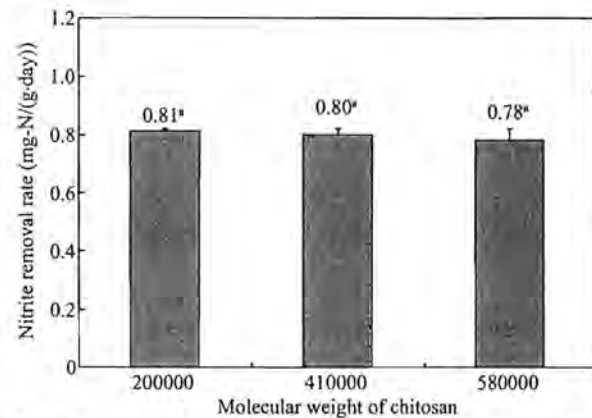


Fig. 8 Effect of molecular weight of chitosan on nitrite removal rate. The letters in a graph represent no significant difference ($P > 0.05$).

91% (molecular weight of 310,000–410,000 g/mol) had a significantly higher nitrite removal rate compared to that of chitin. For example, NOB immobilized on chitosan with a DD of 91% could remove nitrite at a rate of 0.82 ± 0.05 mg-N/(g-day) whereas NOB immobilized on chitin only managed 0.44 ± 0.03 mg-N/(g-day). From the statistical analysis, chitosan with DD of 82% and 91% did not have a significant effect on nitrite removal rate ($P > 0.05$). In other words, chitosan used as a biofilter should contain DD at above 80%. This observation can be explained by charge density. After adjusting the surface of chitosan with a buffer at pH 6.5, chitosan with a DD above 80% contains higher cationic charges than chitin which has DD 10%–15% (Lertsutthiwong et al., 2002). This results in more ionic bonding with the anionic surface of the bacterial cell wall.

2.5 Effect of molecular weight of chitosan

As shown in Fig. 8, the molecular weight of chitosan between 200,000–600,000 g/mol (controlled DD of $85\% \pm 5\%$) gave a similar nitrite removal rate of approximately 0.80 mg-N/(g-day) ($P > 0.05$). It may be concluded that the molecular weight of chitosan did not affect the nitrite removal efficiency of NOB immobilized on chitosan whereas the degree of deacetylation had a significant effect on the

nitrite removal rate as discussed above.

3 Conclusions

Chitosan is a promising biopolymer that can be used as an alternative biofilter media for nitrite oxidizing bacteria (NOB). The immobilization of NOB on the surface of chitosan flakes depends on immobilization time, pH pretreatment, particle size and degree of the deacetylation of chitosan. On the other hand, the molecular weight of chitosan did not affect nitrite removal efficiency. With this study, the optimal immobilizing process was the use of chitosan flakes with a size between 1–5 mm with a degree of deacetylation higher than 80% and the chitosan pretreated with a buffer at pH 6.5 to modify surface charges. An optimal immobilization period of 24 hr is required. The NOB immobilized on chitosan flakes has a high potential to remove excess nitrite from wastewater and aquaculture ponds.

Acknowledgments

This study was financially supported by the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund. The authors would like to thank the Metallurgy and Materials Science

Research Institute and the Center of Excellence for Marine Biotechnology, Chulalongkorn University for providing facilities. Special thanks to A.N. Laboratory Co., Ltd. (Samut Sakorn, Thailand) and Ebase (Bangkok, Thailand) for supplying the chitosan materials.

References

- Chuntapa B, Powtongsook S, Menasveta P, 2003. Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks. *Aquaculture*, 220(1-4): 355-366.
- Crab R, Avnimelech Y, Defoirdt T, Bossier P, Verstraete W, 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, 270(1-4): 1-14.
- Chatterjee S, Chatterjee S, Chatterjee B P, Guha A K, 2007. Adsorptive removal of congo red, a carcinogenic textile dye by chitosan hydrobeads: binding mechanism, equilibrium and kinetics. *Colloids Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 299(1-3): 146-152.
- De Schryver P, Crab R, Defoirdt T, Boon N, Verstraete W, 2008. The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277(3-4): 125-137.
- De Schryver P, Verstraete W, 2009. Nitrogen removal from aquaculture pond water by heterotrophic nitrogen assimilation in lab-scale sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*, 100(3): 1162-1167.
- Dong Y M, Zhang Z J, Jin Y W, Li Z R, Lu J, 2011. Nitrification performance of nitrifying bacteria immobilized in waterborne polyurethane at low ammonia nitrogen concentrations. *Journal of Environmental Sciences*, 23(3): 366-371.
- El-Mamouni R, Leduc R, Guiot S R, 1998. Influence of synthetic and natural polymers on the anaerobic granulation process. *Water Science and Technology*, 38(8-9): 341-347.
- Fierro S, Sánchez-Saavedra M D P, Copalcúa C, 2008. Nitrate and phosphate removal by chitosan immobilized *Scenedesmus*. *Bioresource Technology*, 99(5): 1274-1279.
- Franco T T, Peter M G, 2011. Advances in chitin and chitosan research. *Polymer International*, 60(6): 873-874.
- Hargreaves J A, 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 34(3): 344-363.
- Hart P, O' sullivan D, 1993. Recirculation Systems: Design, Construction and Management. Aquaculture Sourcebook, Tasmania.
- Kaseamchochoung C, Lertsutthiwong P, Phalakornkule C, 2006. Influence of chitosan characteristics and environmental conditions on flocculation of anaerobic sludge. *Water Environment Research*, 78(11): 2210-2216.
- Lawson T B, 1995. Fundamentals of Aquacultural Engineering. Chapman & Hall, New York.
- Lertsittichai S, Lertsutthiwong P, Phalakornkule C, 2007. Improvement of upflow anaerobic sludge bed performance using chitosan. *Water Environment Research*, 79(7): 801-807.
- Lertsutthiwong P, How N C, Chandkrachang S, Stevens W F, 2002. Effect of chemical treatment on the characteristics of shrimp chitosan. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, 12(1): 11-18.
- Lertsutthiwong P, Sutti S, Powtongsook S, 2009. Optimization of chitosan flocculation for hytoplankton removal in shrimp culture ponds. *Aquacultural Engineering*, 41(3): 188-193.
- Liu C, Honda H, Ohshima A, Shinkai M, Kobayashi T, 2000. Development of chitosan-magnetite aggregates containing *Nitrosomonas europaea* cells for nitrification enhancement. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(5): 420-425.
- Lozinsky V I, Plieva F M, 1998. Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. *Enzyme and Microbial Technology*, 23(3-4): 227-242.
- Manju N J, Deepesh V, Achuthan C, Rosamma P, Bright Singh I S, 2009. Immobilization of nitrifying bacterial consortia on wood particles for bioaugmenting nitrification in shrimp culture systems. *Aquaculture*, 294(1-2): 65-75.
- Nishio T, Yoshikura T, Mishima H, Inouye Z, Itoh H, 1998. Conditions for nitrification and denitrification by an immobilized heterotrophic nitrifying bacterium *Alcaligenes faecalis* OKK 17. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(4): 351-356.
- Rinaudo M, 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7): 603-632.
- Rostron W M, Stuckey D C, Young A A, 2001. Nitrification of high strength ammonia wastewaters: comparative study of immobilization media. *Water Research*, 35(5): 1169-1178.
- Ruiz G, Jeison D, Rubilar O, Ciudad G, Chamy R, 2006. Nitrification-denitrification via nitrite accumulation for nitrogen removal from wastewaters. *Bioresource Technology*, 97(2): 330-335.
- Satoh H, Okabe S, Norimatsu N, Watanabe Y, 2000. Significance of substrate C/N ratio on structure and activity of nitrifying biofilms determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Water Science and Technology*, 41(4-5): 317-321.
- Shan H, Obbard J P, 2001. Ammonia removal from prawn aquaculture water using immobilized nitrifying bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(5-6): 791-798.
- Strand S P, Vårum K M, Østgaard K, 2003. Interactions between chitosans and bacterial suspensions: adsorption and flocculation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 27(1): 71-81.
- Strickland J D H, Parson T R, 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis (2nd ed.). Fisheries Research Board of Canada, Ottawa.
- Sumino T, Nakamura H, Mori N, Kawaguchi Y, 1992. Immobilization of nitrifying bacteria by polyethylene glycol prepolymer. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 73(1): 37-42.
- Timmons M B, Losordo T M, 1994. Aquaculture Water Reuse Systems: Engineering Design and Management. Elsevier, New York.
- Wang J P, Chen Y Z, Zhang S J, Yu H Q, 2008. A chitosan-based flocculant prepared with gamma-irradiation-induced grafting. *Bioresource Technology*, 99(9): 3397-3402.

Effects of Immobilization Time and pH Adjustment on the Immobilization of Nitrite-oxidizing Bacteria on Chitosan

Duangcheewan Boonpuak, Wiboonluk Pungrasmi
Department of Environmental Engineering,
Faculty of Engineering, Chulalongkorn University,
Bangkok 10330, Thailand.
e-mail: namwaan_du8@msn.com,
wiboonluk.p@chula.ac.th

Pranee Lertsutthiwong^a
Center for Chitin-Chitosan Biomaterials, Metallurgy and
Materials Science Research Institute, Chulalongkorn
University, Bangkok 10330, Thailand.

^a Corresponding author: Pranee.L@chula.ac.th

Sorawit Powtongsook^{b,c}
^b National Center for Genetic Engineering and
Biotechnology, Thailand Science Park, 113 Pathumthani
Road, Klong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand.
^c Center of Excellence for Marine Biotechnology,
Department of Marine Science, Chulalongkorn
University, Bangkok 10330, Thailand.
e-mail: sorawit@biotec.or.th

Abstract — Influence of immobilization time and pH adjustment on the surface of chitosan on the immobilization of nitrite-oxidizing bacteria (NOB) was investigated. The results indicated that immobilization of NOB on chitosan surface depends on immobilization time and chitosan surface modification by pH adjustment. The amount of NOB attached on chitosan surface increased with increasing immobilization time. Immobilization of chitosan with NOB for 24 hr and surface adjustment with buffer pH between 5.5 and 6.5 appeared as an optimal condition.

Keywords: Chitosan; Immobilization; Nitrite-oxidizing bacteria; pH adjustment

1. INTRODUCTION

Outdoor-lining pond is now widely used in aquacultures because it prevents water leakage and eases of pond cleaning. A common problem associated with lining ponds is an accumulation of nitrogenous compounds especially ammonia and nitrite, which are harmful toward aquatic animals. To overcome this problem, water exchange is needed, leading to higher production cost and increasing risk of pathogen outbreak.

Biofiltration integrating with nitrification process is effective for nitrogen treatment in recirculating aquaculture systems. Nitrification is responsible by two groups of autotrophic bacteria namely ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and nitrite-oxidizing bacteria (NOB), both of which possess slow growth rate and are sensitive to changing environment. Both bacterial populations naturally exist in culture water but are easily washed out by the frequent water exchange during the production cycle [1]. Microbial immobilization on the surface of certain media was suggested as means to retain slow-growing nitrifiers and consequently improving water quality in aquaculture systems [2]. Conventional materials for immobilized media are plastic or artificial fiber, which are difficult to degrade and may pose environmental concern during their disposal.

Therefore, the use of natural materials may be a good alternative to avoid those problems.

Chitosan is a naturally occurring polymer, which can be extracted from shrimp biowaste. From the distinctive characteristics of chitosan including biodegradability, high positive charges and environmental friendly character, chitosan should be attractive for the treatment of wastewater from aquacultures [3, 4]. Literature review indicated that limited research had focused on parameters affecting the immobilization of nitrifiers on chitosan. Therefore, this study aims to evaluate the effects of immobilization time and pH adjustment on the ability of chitosan surface to mediate the nitrite removal.

II. MATERIALS AND METHODS

A. Chitosan

Chitosan with degree of deacetylation of 90% and molecular weight of 4.1×10^5 dalton was provided by A.N. Laboratory Co., Ltd., Samutprakan, Thailand. The size of chitosan was about 1-2 mm.

B. Nitrifying bacteria

Nitrifying bacteria used in this study was the mix-culture collected from indoor recirculating tanks for shrimp cultivation (30 ppt salinity) at the Center of Excellence for Marine Biotechnology, Chulalongkorn University. Nitrifying bacterial sample was incorporated with biofilm on BCN-009 polyethylene media (2H GmbH, Germany; diameter 10 mm; height 8 mm; specific surface area $864 \text{ m}^2/\text{m}^3$). Nitrifying bacteria are residing in biofilm, which is attached on surface of BCN-009. New biofilter media were disinfected with chlorine before acclimated with natural nitrifying bacterial population under specific condition favoring NOB growth (i.e., Sodium nitrite 10 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$; alkalinity 100 – 120 mg CaCO_3/L ; pH = 7.5-8, Temperature = 25°C). Furthermore, oxygen was continuously supplied to the system by aeration through air stones.

C. Immobilization of NOB on chitosan

Twenty pieces of NOB immobilized BCN-009 media were transferred into a test tube containing 40 mL of sterilized nitrite broth and sonicated for 4 minutes. Thereafter, biofilter media were removed from the test tube and replaced with 0.60 g of sterilized chitosan flake (pH 6.5) under 150 rpm agitation in a rotary shaker at 25°C. Chitosan acclimation period was varied at 3, 6, 12 and 24 hr. Bacterial attachment on chitosan surface was confirmed using the Scanning Electron Microscope (SEM).

The effect of pH adjustment on NOB immobilization on chitosan was determined at pH 5.5, 6.5, and 7.5. It was conducted by soaking sterilized chitosan in buffer solution at the indicated pH for 2 minutes before proceeding with NOB immobilization mentioned earlier.

D. Nitrite removal rate

Nitrite removal experiment was conducted to determine the effect of immobilization time and pH adjustment on NOB immobilization on chitosan surface. Nitrite removal rate was determined by placing immobilized chitosan in 2.0 mg-N/L nitrite and 30 g/L NaCl solution. Nitrite concentration was measured according to Strickland and Parsons [5]. All tests were performed in triplicate. Analysis of variance (ANOVA) with further Duncan's multiple-range test was used to compare the differences between treatments.

III. RESULTS AND DISCUSSION

The extent of nitrite reduction was clearly influenced by acclimation period of chitosan (Fig. 1). The maximum nitrite reduction rate was observed when chitosan was acclimated for 24 hr. At this condition (i.e., 24 hr acclimation), NOB immobilized on chitosan surface could remove almost 100% of nitrite within 6 hr. SEM results also indicated a larger number of bacteria on chitosan surface after 24 hr of incubation compared to other treatments (Fig. 2).

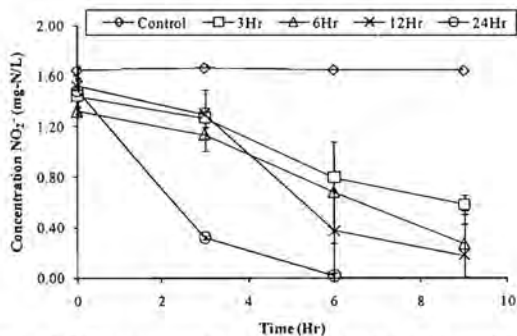
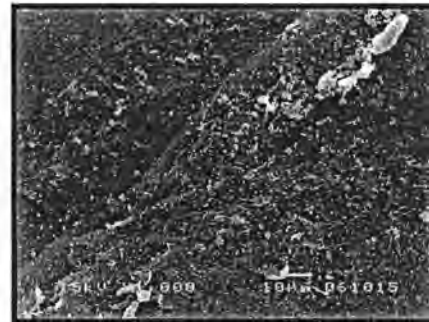


Figure 1. Nitrite concentrations after being treated with immobilized NOB on chitosan surface.



(a)



(b)



(c)

Figure 2. Scanning electron micrographs of bacteria immobilized on the surface of chitosan after incubation for (a) control, (b) 3 hr and (c) 24 hr.

The nitrite removal rate by NOB immobilized on chitosan surface increased significantly with incubation time (Fig 3).

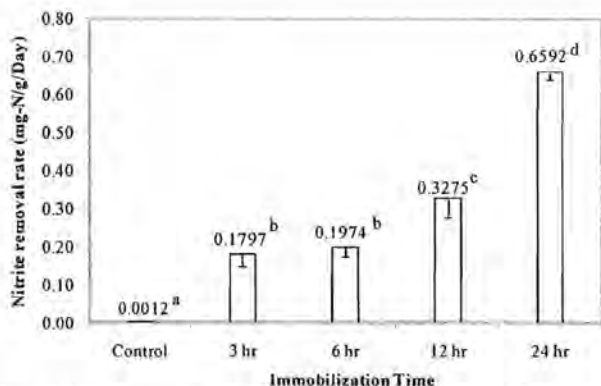


Figure 3 Nitrite removal rates of NOB immobilized chitosan as a function of immobilization time, the letter a, b and c indicate significant differences in statistics ($P > 0.05$) of the data.

Fig. 4 indicates the extent of nitrite reduction as a function of pH adjustment of chitosan surface. The pH adjustment between 5.5 and 6.5 yielded a comparable nitrite reduction rate ranged from 0.3177 - 0.3498 mg-N/L/hr while increasing the pH to 7.5 reduced the nitrite reduction rate to 0.2382 mg-N/L/hr. This observation was probably due to the charge density of chitosan after pH adjustment [6]. With the pH less than 7.0 chitosan contains high cationic charges, which make an ionic bonding to anionic cell wall of bacteria.

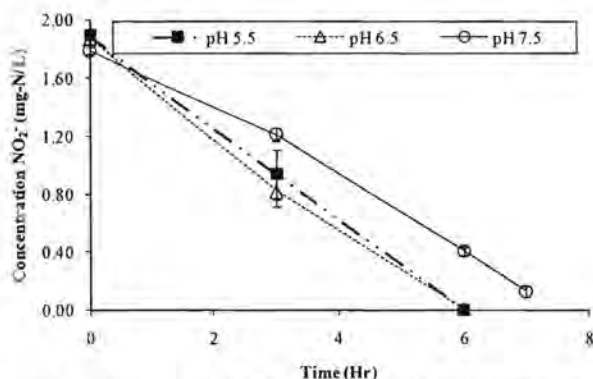


Figure 4. Nitrite concentration after being treated with immobilized NOB on chitosan surface at pH 5.5, 6.5 and 7.5.

IV. CONCLUSIONS

Chitosan can be employed to immobilize NOB. The extent of NOB immobilization on chitosan surface depends on immobilization time and pH adjustment on the surface of chitosan. In this experiment, immobilization time of 24 hr and surface adjustment with the pH between 5.5 and 6.5 yielded the maximum nitrite reduction rate.

ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by The National Research Council of Thailand and received a partially financial supported by the graduate thesis grant, Chulalongkorn University. All the equipments and facilities in this research were provided by the Center of Excellence for Marine Biotechnology, Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, the Center for Chitin-Chitosan Biomaterials, Metallurgy and Materials Science Research Institute and Dr.Kasidit Nootong for his comment on this manuscript.

REFERENCES

- [1] H. Shan and J.P. Obbard, "Ammonia removal from prawn aquaculture water using immobilized nitrifying bacteria," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 57, pp. 791-798, 2001.
- [2] N.J. Manju, V. Deepesh, C. Achuthan, P. Rosamma, and I.S. Bright Singh, "Immobilization of nitrifying bacterial consortia on wood particles for bioaugmenting nitrification in shrimp culture systems," *Aquaculture*, vol. 294, pp. 65-75, 2009.
- [3] S. Lertsittichai, P. Lertsuthiwong, and C. Phalakornkule, "Improvement of upflow anaerobic sludge bed performance using chitosan," *Water Environment Research*, vol. 79, 2007.
- [4] J.P. Wang, Y.Z. Chen, X.W. Ge, and H.Q. Yu, "Gamma radiation-induced grafting of a cationic monomer onto chitosan as a flocculant," *Chemosphere*, vol. 66, pp. 1752-1757, 2006.
- [5] J.D.H. Strickland and T.R. Parsons, *A practical handbook of seawater analysis*, 2nd ed., Ottawa: Fisheries research board of Canada, 1972.
- [6] C. Kasemchochung, P. Lertsuthiwong, and C. Phalakornkule, "Influence of chitosan characteristics and environmental conditions on flocculation of anaerobic sludge," *Water Environment Research*, vol. 78(11), pp. 2210-2216, 2006.