บทที่ 2
การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อกลุ่ม Denitrifiers

นำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกกลุ่ม denitrifiers ที่อาจมีบทบาทช่วยในการกำจัดไนเตรทออกจากน้ำเสียของระบบบำบัดมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยพิจารณาในเรื่องของพีเอชเริ่มต้น และ อุณหภูมิ นอกจากนี้ยังดูผลของปัจจัยดังกล่าวต่อการเกิดกระบวนการ denitrification สำหรับพวก denitrifiers โดยที่น้ำเสียของโรงงานแปรรูปน้ำยางพาราที่บางส่วนของกระบวนการผลิตมีการใช้กรดซัลฟูริกจะพบซัลเฟตเป็นส่วนใหญ่ซึ่งถูกใช้โดยกระบวนการหายใจแบบไร้อากาศแล้วเกิดซัลไฟด์ซึ่งจำเป็นต้องใช้เชื้อกลุ่ม sulfur หรือ sulfide oxidizing bacteria แต่อย่างไรก็ตามโรงงานแปรรูปน้ำยางที่ผลิตยางแผ่น หรือน้ำเสียจากโรงงานประเภทอื่นๆ รวมทั้งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งในกระบวนการบำบัดก่อให้เกิดไนเตรทจากกระบวนการ nitrification ซึ่งถ้าหากปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติย่อมก่อให้เกิดปัญหาสาหร่ายเบ่งบาน (eutrophication) ได้ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงพิจารณาเชื้อกลุ่ม denitrifiers ด้วยเพราะอาจเป็นแนวทางที่จะลดการหายใจแบบไร้อากาศที่ใช้ซัลเฟตแล้วก่อให้เกิดมลพิษซัลไฟด์โดยเพิ่มการหายใจแบบใช้ไนเตรทของเชื้อกลุ่ม denitrifiers และควรเป็น denitrifiers ที่สามารถใช้ซัลไฟด์ได้ด้วย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ Denitrifiers

1.1 การหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญ

นำเชื้อ denitrifiers ที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท (D13, D16 และ D20) ซึ่งเจริญในอาหาร nutrient agar (NA) อายุ 24 ชม จำนวน 1 ioopful มาถ่ายเชื้อลงในอาหาร nitrate broth เมื่อครบ 24 ชม ใช้เป็นหัวเชื้อ ใช้หัวเชื้อ 1% ถ่ายลงในอาหาร nitrate broth ปริมาตร 20 มล ในหลอดแก้ว (15x20 มม) ที่มี durham tube อยู่ภายใน โดยที่อาหารมีการปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4 4.5 5 5.5 6 6.5 7 7.5 และ 8 บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ (30±33°C) สังเกตการณ์เกิดแก๊สในหลอดดักแก๊สทุกวัน และวัดการเจริญโดยวัดค่า OD 660 เมื่อครบ 7 วัน (ปริมาตรแก๊สไม่เพิ่มขึ้น) และวัดปริมาณแก๊สที่เกิดในหลอดดักแก๊สโดยวัดความยาวของอากาศที่แทนที่อาหารในหลอดดักแก๊ส แล้วคำนวณเป็นปริมาตรจากสูตร $\pi r^2 H$

1.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.1 เพียงแต่ปรับพีเอชของอาหารให้เป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของแต่ละเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างกันดังนี้ 25 30 35 40 45 และ 50°C วัดการเจริญโดยวัดค่า OD 660 เมื่อครบ 7 วัน และวัดปริมาณแก๊สที่เกิดในหลอดดักแก๊สโดยวิธีการเดียวกับข้อ 1.1

1.3 การลดปริมาณไนเตรทของเชื้อเมื่อเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแต่ละเชื้อในฟลาสก์ขนาด 250 มล ที่มีอาหารอยู่ 100 มล บ่มเชื้อในตู้บ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อโดยไม่มีการเขย่า วัดการเจริญทุกๆ 24 ชม เป็นเวลา 120 ชม แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 6000 rpm นาน 15 นาที แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์ต่อเพื่อวัดปริมาณไนเตรท ไนไตรท์ เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการเกิด denitrification (dissimilatory nitrate reduction) ของเชื้อ และ แอมโมเนียม โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ตรวจสอบปริมาณไนเตรท ไนไตรท์และ แอมโมเนียม โดยใช้ test kit แล้ววัดโดยใช้เครื่อง photometer รุ่น NOVA 60 ของบริษัท Merck

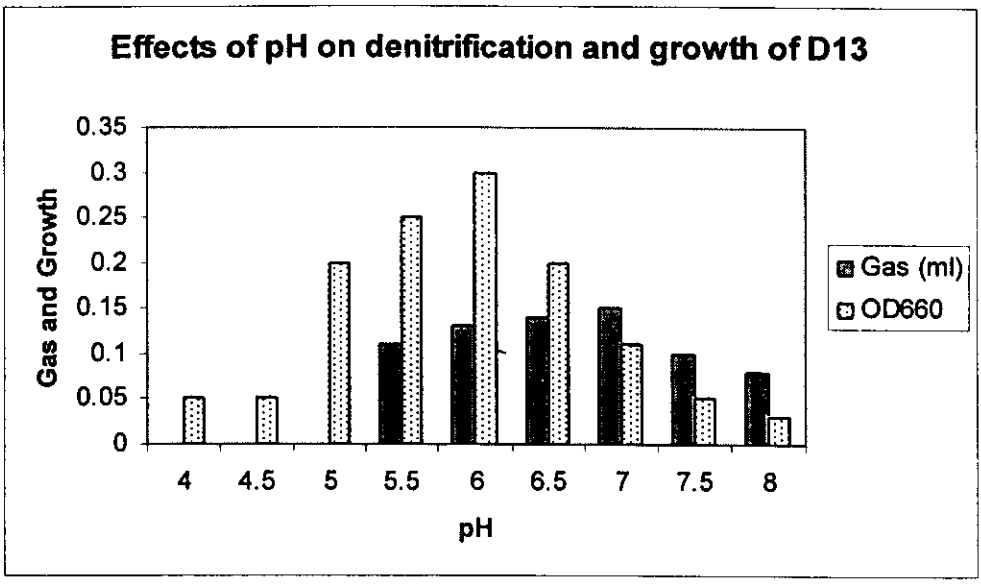
1.4 การทดสอบทางชีวเคมีและสรีรวิทยา

ผลจากการย้อมสีแบบแกรมพบว่าเชื้อที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลทต่างก็ติดสีแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งสั้นๆ ดังนั้นจึงได้ทดสอบการมีหรือไม่มีเอนไซม์ catalase oxidase urease การเคลื่อนที่ (motility test) การใช้สารชีวโมเลกุลและอื่นๆ เช่นการเจริญได้ที่อุณหภูมิ 4 หรือ 41 °C โดยพิจารณาจากการที่เชื้อจัดอยู่ในพวก Gram negative aerobic rod and cocci (Palleroni, 1984) หรืออยู่ในกลุ่ม Gram negative aerobic/microaerophilic rod and cocci (Holt et al. 1994) และวิธีการทดสอบตาม ดวงพร คันธโชติ (2537)

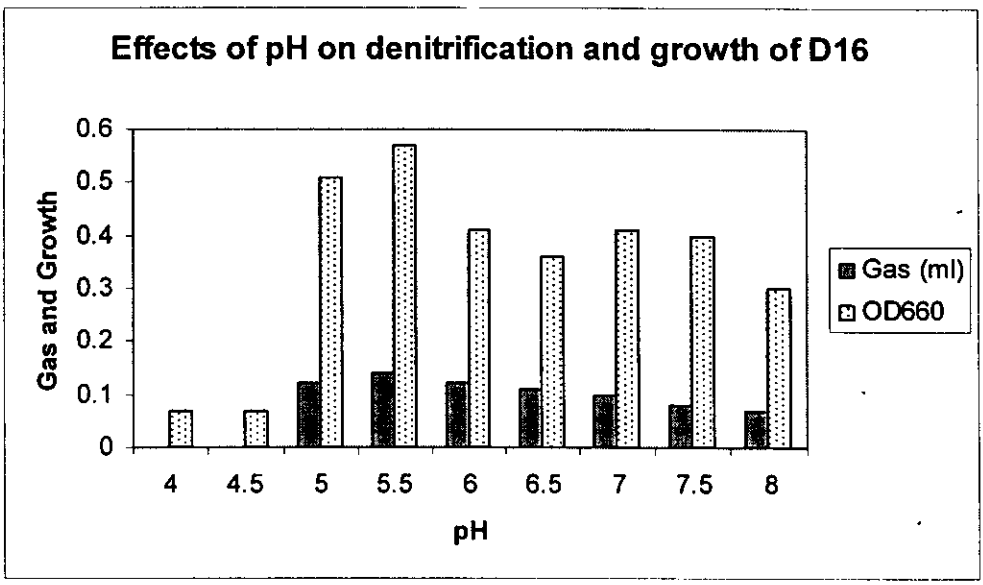
1. ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการเจริญ

1.1 ผลของพีเอชต่อการเจริญ

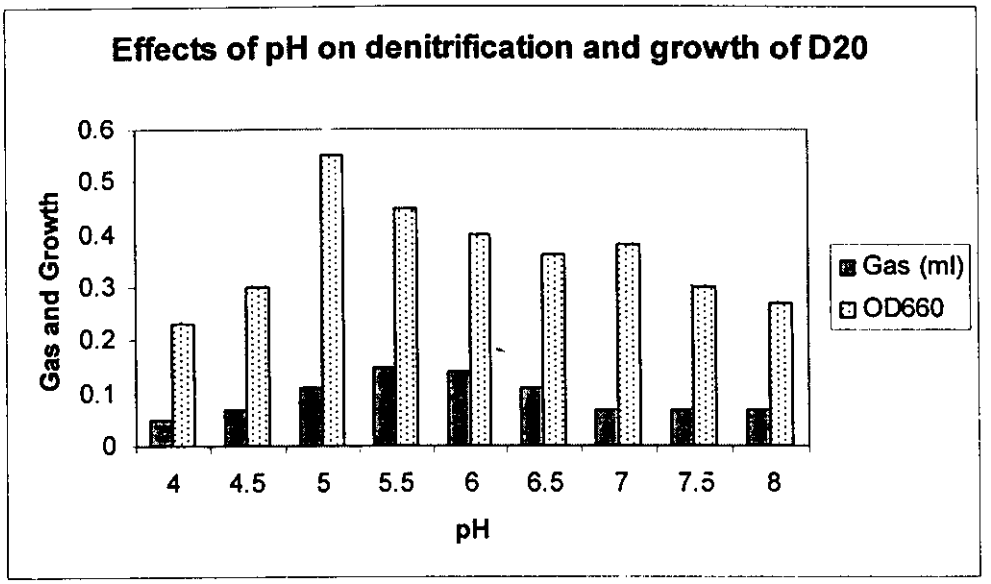
พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทอยู่ในช่วงที่เป็นกรดเล็กน้อยโดยไอโซเลท D13 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 6 และสามารถเจริญได้ดีในช่วงพีเอชระหว่าง 5-6.5 การสร้างแก๊สที่สามารถวัดได้พบที่ค่าพีเอชตั้งแต่ 5.5-8 โดยมีค่าใกล้เคียงกันที่พีเอช 5.5-7.0 (รูปที่ 1) ขณะที่ไอโซเลท D16 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 5.5 รองลงมาที่ พีเอช 5 และพบว่ามีการเจริญได้ใกล้เคียงกันที่พีเอช 6.-7.5 และการสร้างแก๊สมีค่าใกล้เคียงกันที่พีเอช 5-7 ไม่พบการสร้างแก๊สที่ 4-4.5ดังรูปที่ 2 และสำหรับไอโซเลท D20 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 5 รองลงมาคือที่พีเอช 5.5 และการสร้างแก๊สพบว่าดีในช่วง พีเอช 5-6.5 และพบการเกิดแก๊สในทุกค่าของพีเอชที่ทดสอบ ตามรูปที่ 3



รูปที่ 1 ผลของพีเอชต่อการเจริญ และการเกิดกระบวนการ denitrification ของไอโซเลท D13 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน



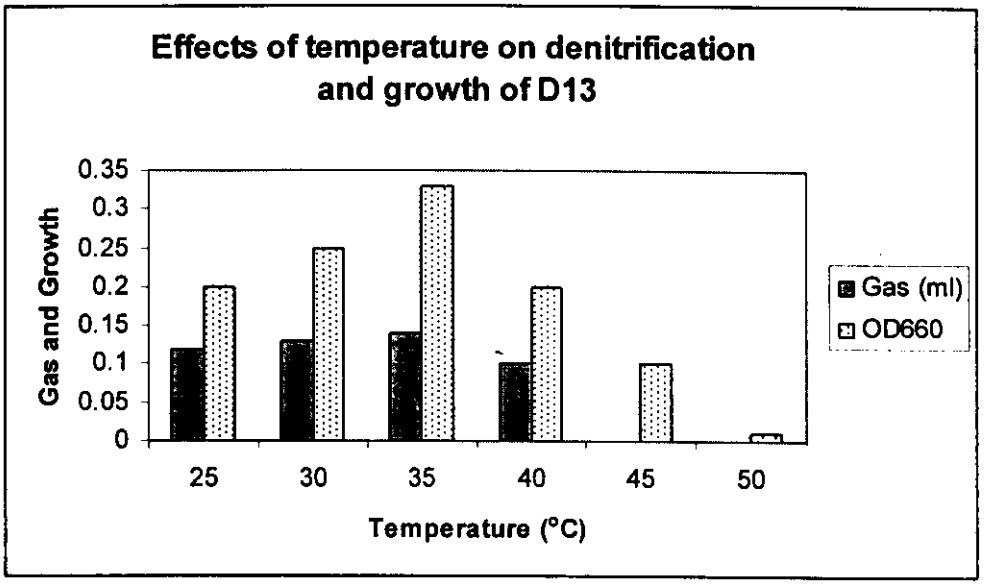
รูปที่ 2 ผลของพีเอชต่อการเจริญ และการเกิดกระบวนการ denitrification ของไอโซเลท D16เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน



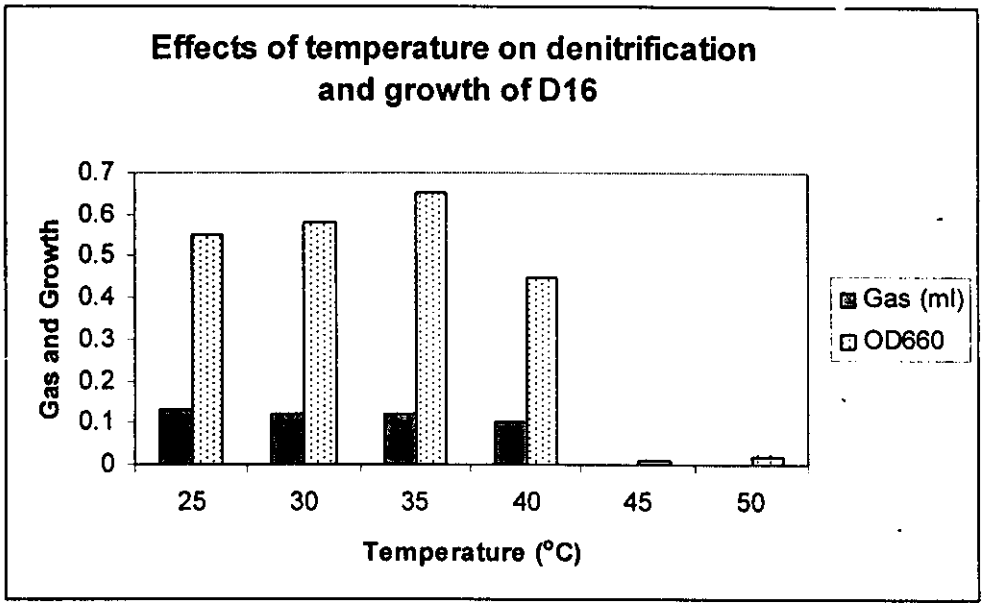
รูปที่ 3 ผลของพีเอชต่อการเจริญ และการเกิดกระบวนการ denitrification ของไอโซเลท D20เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

1.2 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ

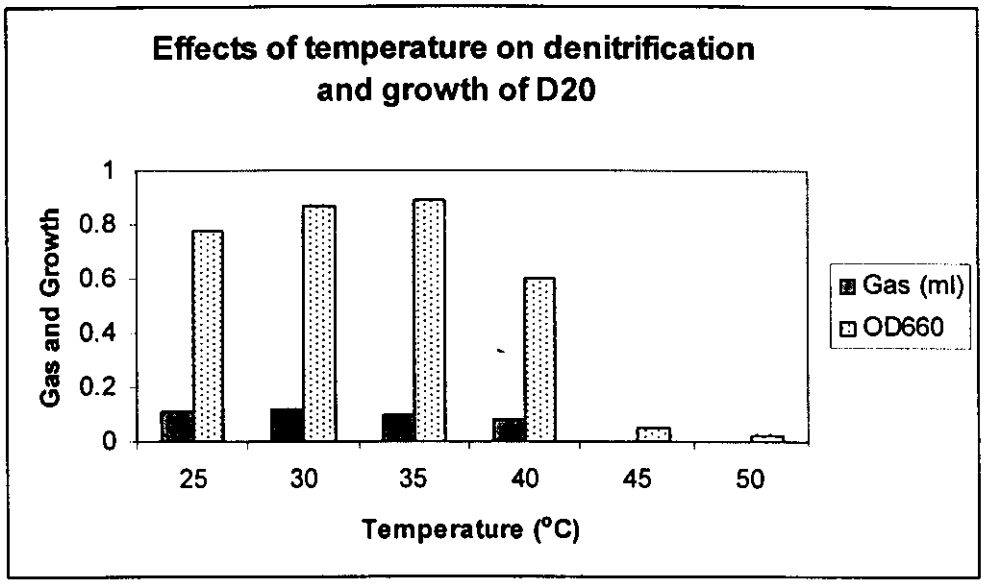
การเจริญภายใต้พีเอชที่เหมาะสม (pH 6) ของไอโซเลท D13 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 35°C และ มีค่า OD660 0.33 รองลงมาคือ 30°C และ เป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างแก๊สด้วย เชื้อมีการเจริญต่ำที่อุณหภูมิ 45°C และต่ำมากที่ 50°C (รูปที่ 4) ขณะที่ไอโซเลท D16 ก็มีอุณหภูมิที่เหมาะสม 35°C (OD660 = 0.66) โดยมีพีเอชที่เหมาะสมคือ 5.5 และการเจริญช่องเชื้อที่ 25 และ 30 °C พอๆกัน และการสร้างแก๊สไม่แตกต่างกันที่อุณหภูมิระหว่าง 25-40°C (รูปที่ 5) ส่วนการเจริญของเชื้อไอโซเลท D20 ภายใต้พีเอชที่เหมาะสม (pH 5) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 30 °C และ 35°C (OD660 = 0.85-0.86) โดยที่การสร้างแก๊สไม่แตกต่างกันที่อุณหภูมิระหว่าง 25-40°C (รูปที่ 6) เช่นเดียวกับไอโซเลท D16



รูปที่ 4 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการเกิดกระบวนการ denitrification ของไอโซเลท D13 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน



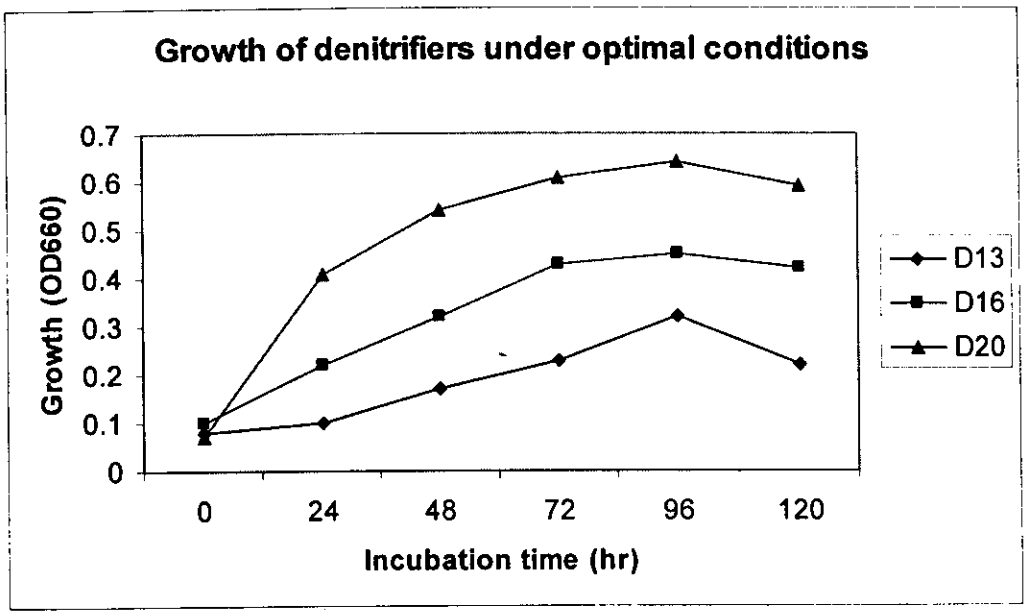
รูปที่ 5 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการเกิดกระบวนการ denitrification ของไอโซเลท D16 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน



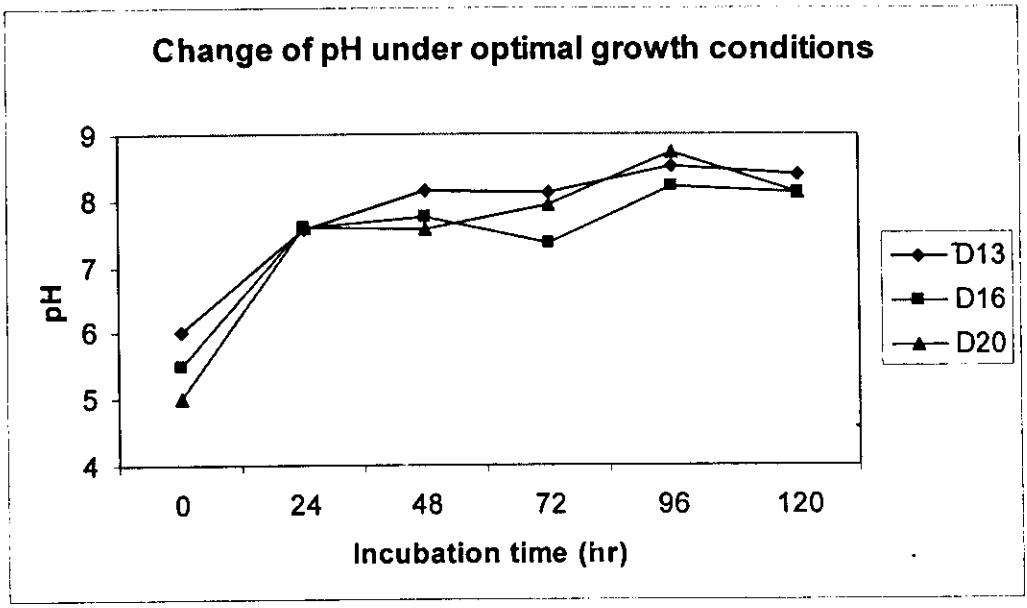
รูปที่ 6 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการเกิดกระบวนการ denitrification ของไอโซเลท D20 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

1.3 ประสิทธิภาพการเกิด Denitrification

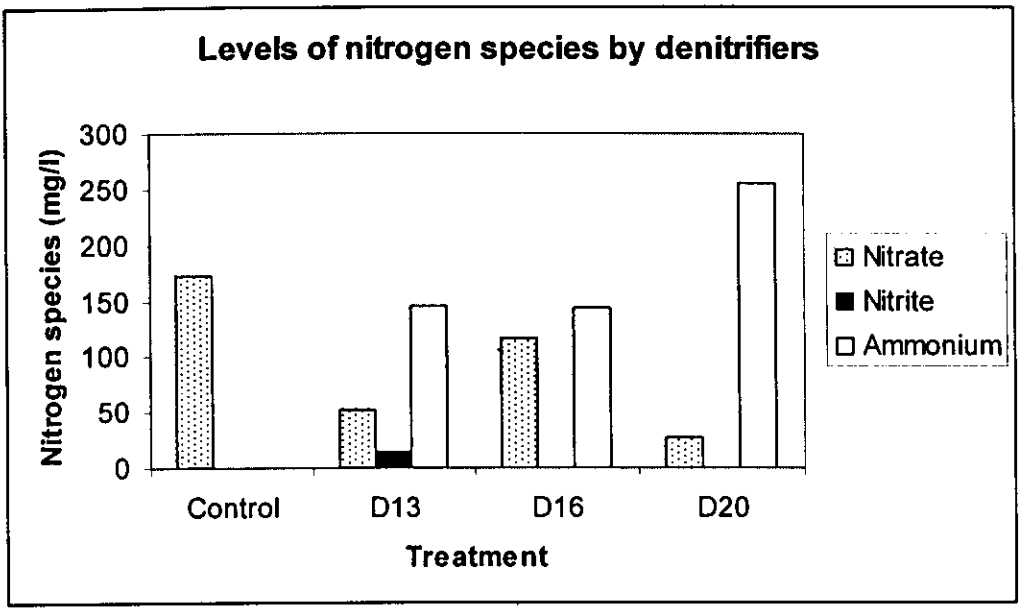
ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ (พีเอช และ อุณหภูมิ) โดยไม่มีการเขย่าของแต่ละไอโซเลทพบว่าไอโซเลท D20 มีการเจริญดีกว่าไอโซเลทอื่นๆ โดยมีค่า OD 660 วัดได้ 0.65 เมื่อเลี้ยงนาน 96 ชม (รูปที่ 7) และผลจากการเจริญทำให้พีเอชมีค่าเพิ่มขึ้นดังรูปที่ 8 โดยมีสาเหตุจากการลดลงของไนเตรทที่ถูกใช้แทนออกซิเจนในการหายใจ (เลี้ยงโดยไม่มีการเขย่า) ขณะเดียวกันก็เป็นเพราะการเกิดแอมโมเนียมโดย denitrifiers ต่างก็ใช้ peptone ในอาหารเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนด้วย ผลจากการย่อยทำให้เกิดแอมโมเนียมขึ้น ซึ่งสอดคล้องกันคือไอโซเลท D20 มีปริมาณแอมโมเนียมสูงสุดเช่นกัน การเกิดแอมโมเนียมอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อ denitrifiers บางชนิดสามารถรีดิวซ์ไนเตรทแบบสังเคราะห์ทำให้เกิดแอมโมเนียมขึ้น ซึ่งจากการศึกษานี้ไอโซเลท D13 อาจมีการรีดิวซ์ไนเตรทแบบสังเคราะห์ทำให้เกิดแอมโมเนียมมากพอๆกับไอโซเลท D16 ซึ่งมีการเจริญดีกว่า (รูปที่ 9) อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้สามารถระบุได้แน่นอนว่าเกิดกระบวนการ denitrification ซึ่งเป็นการรีดิวซ์ไนเตรทแบบสลายเท่านั้น การที่จะทราบว่ามีการรีดิวซ์ไนเตรทแบบสังเคราะห์หรือไม่ต้องออกแบบการทดลองที่จำเพาะขึ้นเช่นใช้แหล่งพลังงานและคาร์บอนที่ไม่เป็นพวกอินทรีย์ไนโตรเจน ผลจากการศึกษานี้พบว่าไอโซเลท D20 มีประสิทธิภาพในการทำให้เกิดกระบวนการ denitrification ได้ดีที่สุดโดยลดปริมาณไนเตรทได้ 84.1% ขณะที่ D13 ลดได้ 69.6% และ D16 ลดได้เพียง 31.9% ดังนั้นถ้าต้องการใช้ denitrifiers เพื่อบำบัดน้ำเสียที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน ไอโซเลท D13 และ D20 มีแนวโน้มว่าสามารถนำไปใช้ได้ แต่ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมว่าเชื้อใดไม่ทำให้เกิดการรีดิวซ์ไนเตรทแบบสังเคราะห์ ก็จะมีความเหมาะสมที่จะนำไปศึกษาต่อเพื่อดูศักยภาพในการนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน



รูปที่ 7 การเจริญของ denitrifiers ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ



รูปที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชของ denitrifiers ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ



รูปที่ 9 การเปลี่ยนแปลงของอนุมูลไนโตรเจนของ denitrifiers ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ

1.4 ผลการทดสอบทางชีวเคมีและสรีรวิทยา

ผลการทดสอบทางชีวเคมี และสรีรวิทยาพบว่าเชื้อไอโซเลท D16 และ D20 คือ *Pseudomonas* sp. ซึ่งตรงตามการเทียบเคียงกับ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1 (Palleroni, 1984) โดยเชื้อทั้งสองต่างก็เป็นแบคทีเรียที่ติดสีแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งสั้น ให้ผลบวกกับเอนไซม์ออกซิเดส และคาตาเลส แต่ให้ผลลบกับการทดสอบการสร้างอินโดล MR-VP ซึ่งเป็นการตัดสินในระดับยีนัสว่าเป็น *Pseudomonas* (ตารางที่ 1) ขณะที่ไอโซเลท D13 ลักษณะส่วนใหญ่ใกล้เคียงมากกับเชื้อ *Pseudomonas* sp. แต่ผลการทดสอบคาตาเลสเป็นลบ และสำหรับผลการเทียบเคียงในระดับ species ดังรายละเอียดในตารางที่ 1 พบว่ายังยากต่อการที่จะระบุว่าอยู่ใน species ใด จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อ D16 มีความน่าสนใจที่จะนำไปศึกษาต่อในการใช้บำบัดน้ำในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพราะมีความสามารถทำให้เกิดกระบวนการ denitrification และย่อยสลายโปรตีนได้ดีและในการเจริญก็ไม่สร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ซึ่งเป็นพิษกับสัตว์น้ำ (พิจารณาผลจากการเจริญในอาหาร TSI ซึ่งพบว่าเชื้อใช้เฉพาะน้ำตาลกูลโคสเท่านั้น ไม่สามารถใช้ซูโครส และ แลกโตสได้ และไม่เกิดแก๊สใดๆจากการเจริญ) แต่สำหรับเชื้อ D20 ซึ่งทำให้เกิดกระบวนการ denitrification ได้ดีที่สุดพบว่าในการเจริญสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ด้วย แต่ก็มีความเป็นไปได้ที่จะนำไปบำบัดน้ำเสียที่มีไนเตรทอยู่สูง และเป็นที่ทราบกันว่าในธรรมชาติเชื้อบางชนิดก็มีความสามารถที่จะนำแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ไปใช้เป็นแหล่งของซัลเฟอร์ หรือเป็นแหล่งของพลังงานได้ (Atlas and Bartha, 1998)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ Denitrifiers ที่คัดเลือกได้

Characteristic	D13	D16	D20
Shape	Short rod	Short rod	Short rod
Catalase	-	+	+
Oxidase	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+
Motility	-	-	-
Urease	-	-	-
Starch hydrolysis	+	-	-
Gelatin hydrolysis	-	+	-
MR-VP	-/-	-/-	-/-
Indole formation	-	-	-
TSI medium	K/A, no gas	K/A, no gas	K/A, H_2S
O-F test	+/-	+/-	+/-
Growth at 4°C	-	+	+
Growth at 41°C	+	+	+
Citrate	+	+	+
Litmus milk curd	+	+	+

บทสรุป

การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อกลุ่ม dentirifiers จำนวน 3 ไอโซเลทได้แก่ D13 D16 และ D20 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการเกิด denitrification ของไอโซเลท D13 คือพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 6 และสร้างแก๊ส N_2 ได้ดีที่พีเอช 5.5-7 ขณะที่อุณหภูมิ 35°C เหมาะสมต่อทั้งการเจริญและการสร้างแก๊ส N_2 และภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ (พีเอชและอุณหภูมิ) เลี้ยงโดยไม่มีการเขย่าพบว่าเชื้อ D13 ลดไนเตรทได้ 69.6% และผลการเทียบเคียงพบว่าไอโซเลท D13 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Pseudomonas* sp. ขณะที่ไอโซเลท D16 เจริญได้ดีที่พีเอช 5.5 และสร้างแก๊ส N_2 ได้ในช่วง pH 5-7 และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 °C แต่สามารถสร้างแก๊ส N_2 ได้ไม่แตกต่างกันที่ช่วงอุณหภูมิ 25-40°C และภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเชื้อสามารถลดไนเตรทได้เพียง 31.9% ผลการเทียบเคียงพบว่า D16 คือ *Pseudomonas* และสำหรับไอโซเลท D20 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 5 และสร้างแก๊ส N_2 ได้ดีในช่วงพีเอช 5-6.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 35°C และสร้างแก๊ส N_2 ได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-40°C ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเชื้อสามารถลดไนเตรทได้ดีที่สุด (84.1%) และผลการเทียบเคียงพบว่าคือ

Pseudomonas sp. การคัดเลือกเชื้อกลุ่ม denitrifiers เพื่อหาแนวทางลดการหายใจแบบไร้อากาศที่ใช้ซัลเฟตแล้วก่อให้เกิดมลพิษซัลไฟด์ เพื่อให้เชื้อ denitrifiers ใช้ไนเตรทเกิดแก๊ส N_2 ทำให้เกิดการแข่งขันระหว่างกลุ่ม denitrifiers และ sulfate reducing bacteria (SRB) และเนื่องจาก denitrifiers ที่คัดเลือกได้เป็น *Pseudomonas* ซึ่งเป็นพวก heterotroph ที่ต้องการสารอินทรีย์ในการเจริญ ดังนั้นเพื่อลดการแข่งขันสารอาหารในขั้นตอนการหมักแก๊สชีวภาพ จึงไม่ได้นำเชื้อดังกล่าวไปทดสอบการกำจัดซัลไฟด์ เพราะวัตถุประสงค์หลักเน้นการกำจัดซัลไฟด์โดย SOB (chemolithoautotroph or mixotroph) ดังนั้นจึงไม่ได้ศึกษาต่อสำหรับเชื้อกลุ่ม denitrifiers

เอกสารอ้างอิง

1. ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพมหานคร.
2. Atlas, R.M and Bartha, R. 1998. Microbial Ecology: Fundamentals and Applications 4th ed. Benjamin/Cummings Science Publishing.
3. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Stalez and Williams, S.T. 1994. Bergey' Manual of Determinative Bacteriology 9th. Baltimore: The Williams and Wilkins Co.
4. Palleroni, N.J. 1984. Family I Pseudomonadaceae. In In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1, pp. 141-214. Krieg, N.R. (Ed.) Williams & Wilkins, Baltimore.