บทนำ

ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาในผลส่วนแรกของงานวิจัยนี้ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของแบคทีเรียในวัฏจักรไนโตรเจนของบ่อเพาะเลี้ยงกุลาดำแบบหนาแน่นพบว่าคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งในบางช่วงของการเลี้ยงเช่นมีแอมโมเนียมสูงเกินไปส่งผลให้ผลผลิตกุ้งไม่สูงเท่าที่ควร โดยมีสาเหตุมาจากการที่ไม่พบหรือพบแบคทีเรียกลุ่ม nitrifier (nitrifying bacteria) ในปริมาณต่ำเนื่องจากไวต่อสภาวะที่เปลี่ยนไปของบ่อ ดังนั้นงานในส่วนหลังนี้จึงนำเชื้อ nitrifier ที่แยกได้จากดินเลนและน้ำของบ่อที่ศึกษาซึ่งยังรอดชีวิตอยู่ (เป็นธรรมชาติของเชื้อกลุ่มนี้ที่มักตายระหว่างการเก็บรักษาไว้) มาคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมดีในการออกซิไดซ์แอมโมเนียมเป็นไนไตรท์ (ammonium-oxidizing bacteria) และ ไนไตรท์เป็นไนเตรท (nitrite-oxidizing bacteria) ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มทำให้เกิดกระบวนการ nitrification ซึ่งเป็นกระบวนหนึ่งในหลายกระบวนการของวัฏจักรไนโตรเจนที่มักพบเสมอว่าเป็นสาเหตุให้เกิดปัญหากับระบบนิเวศน์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำด้วย กระบวนการนี้ดำเนินการไปไม่ได้ดีเท่าที่ควรดังเหตุผลที่กล่าวมาแล้ว

วัตถุประสงค์

1. ศึกษากิจกรรมในกระบวนการ Nitrification ของแบคทีเรียที่แยกได้
2. หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้
3. เพื่อเทียบเคียงแบคทีเรียกลุ่ม Nitrifying bacteria ที่แยกได้

วัสดุอุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ
   - Nitrite-formation broth
   - Nitrate-formation broth
   - Nitrite-formation agar
   - Nitrate -formation agar
2. น้ำยาทดสอบ
   - Diphenylamine
   - œ-Naphthylamine
   - Sulfanilic acid 1 %
   - ชุดทดสอบ Nitrite Cell Test

- Reagent NO_3-1A

- Reagent NO_3-2A

3. Photometer ของบริษัท MERCK รุ่น NOVA 60

4. แบคทีเรียกลุ่ม nitrifying bacteria ที่ใช้ในการศึกษา

4.1 เชื้อกลุ่ม Ammonia-oxidizing bacteria จำนวน 21 ไอโซเลท คือ AM 613, AM 813, AM 411, AM 311, AM 213, AM 712, AM 121, AM 322, AM 310, AM 410, AM 224, AM 123, AM 112, AM 104, AM 424, AM 514, AM 114, AM 912, AM 110, AM 510, AM 210

4.2 เชื้อกลุ่ม Nitrite-oxidizing bacteria จำนวน 21 ไอโซเลท คือ N 210, N 422, N 110, N 410, N 310, N 813, N 713, N 510, N 414, N 323, N 104, N 214, N 513, N 222, N 614, N 220, N 124, N 112, N 912, N 313, N 412

วิธีการทดลอง

1. ตรวจสอบความบริสุทธิ์และดูลักษณะรูปร่าง

1.1 ตัวอย่างเชื้อกลุ่ม Ammonia-oxidizing bacteria

นำเชื้อแต่ละไอโซเลท ปริมาตร 0.1 ml ใส่ในอาหาร Nitrite-formation broth ปริมาตร 10 ml นำไปบ่มในตู้ incubator อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วันแล้วนำออกมาย้อมสีแกรม ตรวจดูลักษณะรูปร่างการเรียงตัวของเซลล์ ตลอดจนความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยกล้องจุลทรรศน์

1.2 ตัวอย่างเชื้อกลุ่ม Nitrite-oxidizing bacteria

นำเชื้อแต่ละไอโซเลท ปริมาตร 0.1 ml ใส่ลงในอาหาร Nitrate-formation broth ปริมาตร 10 ml นำไปบ่มในตู้ incubator อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วันแล้วนำมาย้อมสีแกรม ตรวจดูลักษณะรูปร่างการเรียงตัวของเซลล์ ตลอดจนความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยกล้องจุลทรรศน์

การเทียบเคียง (identify) เชื้อกลุ่ม nitrifying bacteria จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) เป็นหลัก โดยการดูรูปร่างเซลล์ การจัดเรียงตัว และในบางกรณีจำเป็นต้องใช้ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเพื่อให้ได้รายละเอียดของการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนว่าเป็นแบบ binary fission หรือ budding รวมถึงการจัดเรียงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma-membrane) (Stanley, 1989) แต่ในการศึกษานี้ไม่ได้ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2. การคัดเลือกเชื้อเบื้องต้น

2.1 การคัดเลือกเชื้อที่มีกิจกรรมดีในการออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์

ทดสอบการเกิดไนไตรท์

1. ปิเปตไอโซเลทที่เลี้ยงเชื้อไว้แล้วจากข้อ 1.1 และพบว่าเป็นเชื้อบริสุทธ์ ไอโซเลทละ 1 mlใส่ในหลอดทดลอง
2. หยด sulfanilic acid ลงไปจำนวน 2 หยด
3. หยด œ-nepthylamine ลงไปจำนวน 2 หยด ผสมให้เข้ากัน หากมีไนไตรท์จะเกิดสีแดงหรือสีชมพู
4. เลือกไอโซเลทที่เกิดไนไตรท์มากที่สุดซึ่งให้สีแดงเข้มที่สุดโดยการสังเกตด้วยตา

2.2 การคัดเลือกเชื้อที่มีกิจกรรมดีในการออกซิไดซ์ไนไตรท์เป็นไนเตรท

ทดสอบการเกิดไนเตรท

1. ปิเปตไอโซเลทที่เลี้ยงเชื้อไว้แล้วจากข้อ 1.2 และพบว่าเป็นเชื้อบริสุทธ์ ไอโซเลทละ 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง
2. นำไปทดสอบเหมือนการทดลองที่ 2 เพื่อทดสอบว่ามีไนไตรท์อยู่หรือไม่ หากหลอดใดไม่มีไนไตรท์แสดงว่าไนไตรท์ถูกออกซิไดซ์ไปเป็นไนเตรทโดยสมบูรณ์
3. ทดสอบการเกิดไนเตรทโดยหยด diphenylamine 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน หากมีไนเตรทจะเกิดสีน้ำเงินขึ้น
4. หากหลอดใดยังมี ไนไตรท์อยู่ให้ทำการทดสอบการเกิดไนเตรทอีกครั้งในสัปดาห์ต่อไป
5. เลือกตัวอย่างที่มีไนเตรทมากที่สุดซึ่งให้สีน้ำเงินเข้มที่สุด

3. การคัดเลือกเชื้อโดยทดสอบหาปริมาณของไนไตรท์ และไนเตรทที่ได้

3.1 การทดสอบหาปริมาณไนไตรท์ด้วยชุดทดสอบ

การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrite-formation broth ปริมาตร 10 ml แล้วถ่ายเชื้อในกลุ่ม Ammonia-oxidizing bacteria ลงไปปริมาตร 1 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrite-formation medium ปริมาตร 25 ml
2. เติมเชื้อลงไป 10% ซึ่งมีปริมาตรเท่ากับ 2.5 mlในอาหารเลี้ยงเชื้อ
3. นำไปใส่ในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน
4. เมื่อครบเวลาแล้วนำไปทดสอบหาปริมาณไนไตรท์โดยใส่ไอโซเลทละ 0.5 ml ลงไปในชุดทดสอบ แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
5. นำไปใส่ในเครื่อง photometer ที่ OD 600 nm จดค่าที่ได้นั้นซึ่งเป็นค่าของไนไตรท์ที่เกิดขึ้น

3.2 การทดสอบหาปริมาณไนเตรทด้วยชุดทดสอบ

การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrate-formation broth ปริมาตร 10 ml แล้วถ่ายเชื้อในกลุ่ม Nitrite-oxidizing bacteria ลงไปปริมาตร 1 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrate-formation broth ปริมาตร 25 ml
2. เติมเชื้อลงไป 10% ซึ่งมีปริมาตรเท่ากับ 2.5 ml ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ
3. นำไปใส่ในเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 100 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน
4. เมื่อครบเวลาแล้วนำไปทดสอบหาปริมาณไนเตรท
5. เติม reagent NO_3 1A ปริมาตร 1 ช้อนลงในหลอดทดลอง
6. แล้วเติม Reagent NO_3-2A ลงไปปริมาตร 5.0 ml เขย่าให้เข้ากันประมาณ 1 นาที
7. เติมเชื้อที่ต้องการทดสอบลงไปปริมาตร 1.5 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
8. แล้วนำไปวัดค่าปริมาณไนเตรทด้วยเครื่อง photometer ที่ OD 600 nm หากเครื่องไม่สามารถอ่านค่าได้ให้ทำ dilution จนเครื่องสามารถอ่านค่าได้ แล้วจึงคูณ ค่า dilution นั้นกลับไปจึงจะได้ค่าไนเตรทที่แท้จริง

4. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Nitrifying bacteria ที่ผ่านการคัดเลือก

4.1 ผลของ pH ต่อการเจริญของเชื้อที่คัดเลือกได้

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrite-formation broth และ Nitrate-formation broth แล้วปรับ pH ให้ได้ตามที่กำหนดคือ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 แล้วถ่ายลงในหลอดทดลองขนาด 16x150 mm ปริมาตร 5 ml อย่างละ 3 หลอด แล้วถ่ายเชื้อ AM 210 และ N 410, N 310, N 412 ตามลำดับลงไปในหลอดปริมาตร 0.1 ml ในแต่ละหลอด ไอโซเลทละ 3 หลอดเช่นกันเขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในตู้ incubator ปรับอุณหภูมิให้ได้ 30°C ใช้เวลาในการบ่มเชื้อเป็นเวลา 7 วันแล้วนำไปเลี้ยงในอาหารแข็งเพื่อนับ colony หาจำนวนเซลล์ที่เจริญโดยวิธี spread plate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 12 วัน เชื้อ nitrifier ไม่สามารถวัดการเจริญโดยการวัดความขุ่นเพราะลักษณะปกติของอาหารที่เลี้ยงจะมีตะกอนเล็กน้อยและเป็นเชื้อที่มีอัตราการเจริญต่ำ (autotroph) ถึงแม้เชื้อเจริญดีแล้วก็ยังไม่ปรากฏความขุ่นให้เห็นได้อย่างชัดเจนเหมือนพวก autotroph (Stanley, 1989)

วิธีการทำ spread plate

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrite-formation medium และเติมวุ้นลงไป 1.5% แล้วนำไปถ่ายลงใน plate ละ 15-20 ml รอจนอาหารแข็งแล้วนำไป spread plate โดยใส่เชื้อลงไปในอาหารแข็งดังกล่าวปริมาตร 0.1 ml แล้วนำแท่งแก้วงอรูปสามเหลี่ยมไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยจุ่มในแอลกอฮอล์ 95% และลนไฟหลังจากนั้นใช้แท่งแก้วนี้เกลี่ยเชื้อให้ทั่วบริเวณผิวหน้าอาหารเพื่อ

เป็นการกระจายให้เซลล์ต่างๆแยกและกระจายออกจากกัน แล้วนำไปบ่มในตู้ incubator ปรับอุณหภูมิให้ได้ 30°C เป็นเวลา 12 วันหลังจากนั้นนำออกมานับ colony เพื่อดูการเจริญของเชื้อใน pH ต่างๆ

4.2 การเจริญในอุณหภูมิ 25, 30, 35, 40 องศาเซลเซียส

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrite-formation broth และ Nitrate-formation broth ถ่ายลงในหลอดทดลองขนาด 16x150 mm ปริมาตร 5 ml แล้วเติมเชื้อตัวอย่างลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 0.1 ml ในแต่ละหลอดเขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, และ 40°C ไอโซเลทละ 3 ซ้ำ เป็นเวลา 7 วันแล้วนำออกมาทำ spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 12 วัน แล้วนำออกมานับ colony

4.3 การเลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100, 150, 200 และที่ไม่มีการเขย่า

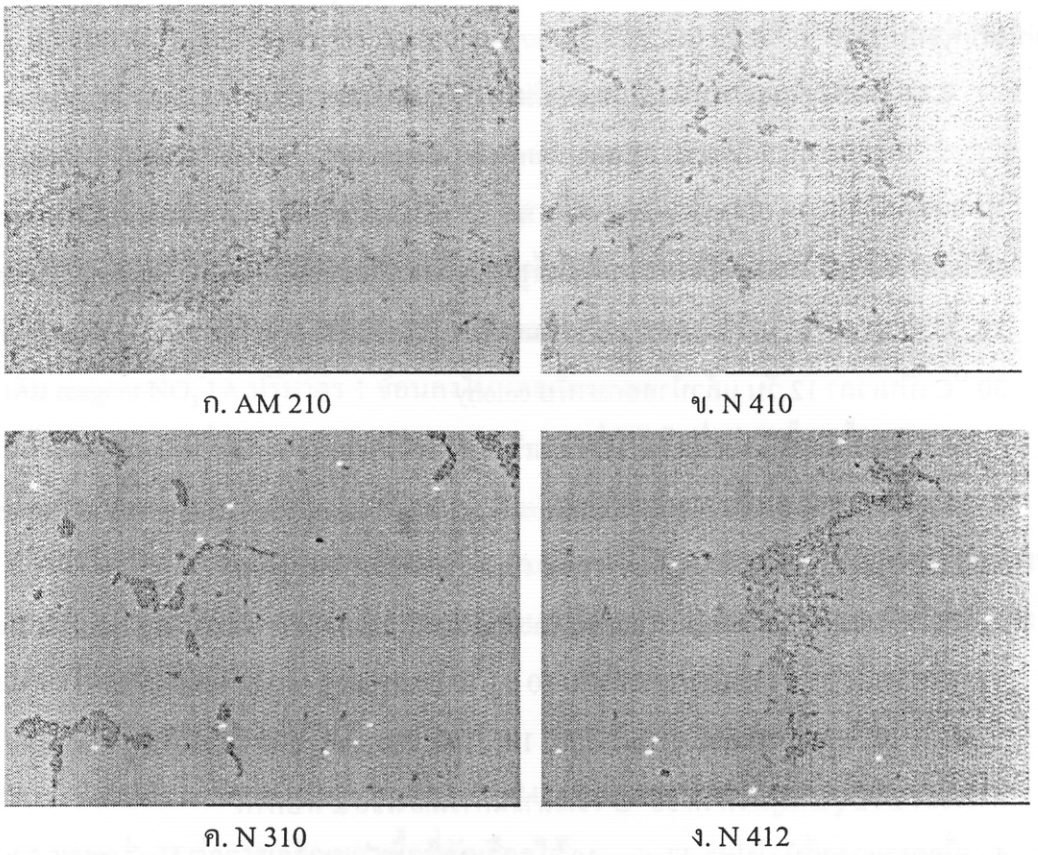
1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrite-formation broth และ Nitrate-formation broth เตรียมใส่ใน flask ขนาด 250 ml ปริมาตร 100 ml อย่างละ 3 flask ในแต่ละการทดสอบ
2. ใส่เชื้อในกลุ่ม Ammonia oxidizing bacteria และ กลุ่ม Nitrite oxidizing bacteria ลงไป 10% ของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีปริมาตรเท่ากับ 10 ml ไอโซเลทละ 3 ซ้ำ เขย่าให้เข้ากัน
3. นำไปใส่ในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100, 150, 200 rpm และ วางไว้ในตู้ incubator โดยไม่มีการเขย่า ปรับอุณหภูมิให้ได้ 30°C ใช้เวลาในการเลี้ยงเชื้อ 2 สัปดาห์
4. เมื่อครบเวลาก็นำไปทำ dilution 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ spread plate ที่ dilution 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}
5. นำไปบ่มในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 12 วันแล้วนำออกมานับ colony ที่ขึ้นบน plate เพื่อหาจำนวนเซลล์ดูการเจริญของเชื้อ

1. ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์และลักษณะรูปร่างเพื่อการเทียบเคียง

1.1 ตัวอย่างเชื้อในกลุ่ม Ammonia-oxidizing bacteria

จากการนำเชื้อในกลุ่ม Ammonia oxidizing bacteria ทั้ง 21 ไอโซเลทมาศึกษา โดยมาเลี้ยงในอาหาร Nitrite-formation broth ซึ่งแบคทีเรียพวกนี้สามารถที่จะเจริญในอาหารเหลวได้ดีมากกว่าในอาหารแข็งเพราะลักษณะโคโลนีที่ขึ้นมีขนาดเล็กมากๆ และต้องใช้เวลา 10 วันเป็นอย่างต่ำ แบคทีเรียในกลุ่มนี้เป็นแกรมลบ รูปเป็นแท่ง มีการจัดเรียงตัวแบบเดี่ยวๆ คู่ และเป็นกลุ่มก้อน ซึ่งทั้ง 21 ไอโซเลทเป็นเชื้อบริสุทธิ์ ในรูปที่ 1ก แสดงรูปร่างไอโซเลท AM 210 (ที่ผ่านการคัดเลือกโดยจะกล่าวในภายหลัง) ซึ่งมีรูปร่างเป็นแท่งสั้นเล็ก ดังนั้นไอโซเลท AM 210 น่าจะเป็น *Nitrosomonas* (Stanley

et al., 1989) เพราะยังขาดรายละเอียดการแบ่งตัวของเซลล์ ส่วนไอโซเลทอื่นๆ ก็มีลักษณะรูปร่างของเซลล์ผลดังตารางที่ 1



ก. AM 210 ข. N 410

ค. N 310 ง. N 412

รูปที่ 1 รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ของ Nitrifying bacteria

1.2 ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่ม Nitrite-oxidizing bacteria

กลุ่ม Nitrite oxidizing bacteria มาเลี้ยงในอาหาร Nitrate-formation broth ซึ่งแบคทีเรียพวกนี้สามารถเจริญในอาหารเหลวได้ดีกว่าในอาหารแข็งเช่นเดียวกับแบคทีเรียในกลุ่ม Ammonium-oxidizing bacteria เพราะลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็งมีขนาดเล็กมากแล้วนำมาย้อมสีแกรมเพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ได้ผลดังตารางที่ 2 แบคทีเรียในกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง แท่งสั้น จัดเรียงตัวแบบเดี่ยวๆ คู่ และ สายขณะที่รูปที่ 1 (ข-ง) เป็นกลุ่มของ nitrite-oxidizing bacteria ต่างก็มีรูปร่างเป็นแท่ง ไม่ว่าจะเป็นไอโซเลท N 410, N 310 และ N 412 (ผ่านการคัดเลือกโดยจะกล่าวในภายหลัง) โดยมีการจัดเรียงตัวของเซลล์อยู่เดี่ยวๆ เป็นคู่ และเป็นสาย ดูรายละเอียดในรูป ดังนั้นเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทน่าจะเป็น *Nitrobacter* เพราะว่าเมื่อเลี้ยงไว้เป็นระยะนาน (old culture) รูปร่างก็ยังเป็นแท่งไม่เปลี่ยนเป็นรูปเกลียว (Stanley et al., 1989)

ตารางที่ 1 การติดสีย้อมแกรมและรูปร่างของแบคทีเรียในกลุ่ม Ammonia-oxidizing bacteria

ลำดับที่	ไอโซเลท	การติดสีแกรม	ลักษณะรูปร่าง	การจัดเรียงตัว
1	AM 613	แกรมลบ	แท่ง	เดี่ยว, คู่
2	AM 813	แกรมลบ	แท่ง	เดี่ยว
3	AM 411	แกรมลบ	แท่งยาว	เดี่ยว
4	AM 311	แกรมลบ	แท่ง	เดี่ยว
5	AM 213	แกรมลบ	แท่ง	เดี่ยว, คู่
6	AM 712	แกรมลบ	แท่ง	เดี่ยว, คู่
7	AM 121	แกรมลบ	แท่ง	เดี่ยว, สาย, คู่
8	AM 322	แกรมลบ	แท่ง	เดี่ยว
9	AM 310	แกรมลบ	แท่งสั้นๆ	เดี่ยว, กลุ่ม, คู่
10	AM 410	แกรมลบ	กลม	คู่, เดี่ยว
11	AM 224	แกรมลบ	แท่งสั้น	เดี่ยว, คู่
12	AM 123	แกรมลบ	แท่งสั้น	คู่
13	AM 112	แกรมลบ	แท่งสั้น	เดี่ยว, คู่, สาย
14	AM 104	แกรมลบ	แท่งยาว	เดี่ยว, คู่, กลุ่ม
15	AM 424	แกรมลบ	แท่ง, แท่งสั้น	เดี่ยว, คู่
16	AM 514	แกรมลบ	แท่งสั้น	เดี่ยว, คู่
17	AM 114	แกรมลบ	แท่ง	เดี่ยว, คู่
18	AM 912	แกรมลบ	แท่งยาว	เดี่ยว, คู่
19	AM 110	แกรมลบ	แท่ง	เดี่ยว, คู่, สาย,กลุ่ม
20	AM 510	แกรมลบ	แท่งสั้น	เดี่ยว, คู่
21	AM 210	แกรมลบ	แท่งสั้นๆ	เดี่ยว

ตารางที่ 2 การติดสีย้อมแกรมและรูปร่างของแบคทีเรียในกลุ่ม Nitrite-oxidizing bacteria

ลำดับที่	ไอโซเลท	การติดสีแกรม	ลักษณะรูปร่าง	การจัดเรียงตัว
1	N 210	แกรมลบ	แท่งสั้น	เดี่ยว, คู่
2	N 422	แกรมลบ	แท่งยาว	เดี่ยว
3	N 110	แกรมลบ	แท่งสั้น	เดี่ยว, คู่, สาย
4	N 410	แกรมลบ	แท่งสั้น	เดี่ยว, คู่
5	N 310	แกรมลบ	แท่ง	เดี่ยว
6	N 813	แกรมลบ	แท่ง	เดี่ยว, คู่
7	N 713	แกรมลบ	แท่ง	เดี่ยว, คู่
8	N 510	แกรมลบ	แท่ง	เดี่ยว, คู่
9	N 414	แกรมลบ	แท่งสั้น	เดี่ยว
10	N 323	แกรมลบ	แท่งสั้น	เดี่ยว, คู่
11	N 104	แกรมลบ	แท่งสั้น	เดี่ยว, คู่
12	N 214	แกรมลบ	แท่ง	คู่, สาย
13	N 513	แกรมลบ	แท่งสั้น	เดี่ยว
14	N 222	แกรมลบ	แท่งสั้น	เดี่ยว, คู่
15	N 614	แกรมลบ	แท่งสั้น	เดี่ยว
16	N 220	แกรมลบ	แท่งสั้น	เดียว, คู่
17	N 124	แกรมลบ	แท่ง	เดี่ยว, คู่
18	N 112	แกรมลบ	แท่งสั้น	เดี่ยว, คู่, สาย
19	N 912	แกรมลบ	แท่ง	เดี่ยว
20	N 313	แกรมลบ	แท่ง	เดี่ยว, คู่
21	N 412	แกรมลบ	แท่งสั้น	เดี่ยว, คู่, สาย

2. การคัดเลือกเชื้อเบื้องต้น

2.1 ผลการคัดเลือกเชื้อที่มีกิจกรรมดีในการออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์

กิจกรรมการเกิดไนไตรท์ของเชื้อที่ทดลองมีอยู่ 3 ระดับคือระดับต่ำ (เกิดไนไตรท์น้อย) มีอยู่ถึง 12 ไอโซเลท ระดับปานกลางมี 8 ไอโซเลท และระดับดีมีเพียง 1ไอโซเลท คือไอโซเลท AM 210 ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 กิจกรรมการเกิดไนไตรท์ในตัวอย่างกลุ่มAmmonia-oxidizing bacteria

ลำดับที่	ไอโซเลท	ผลการทดสอบการออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์
1	AM 613	+
2	AM 813	++
3	AM 411	++
4	AM 311	+
5	AM 213	+
6	AM 712	+
7	AM 121	++
8	AM 322	++
9	AM 310	+
10	AM 410	+
11	AM 224	++
12	AM 123	++
13	AM 112	++
14	AM 104	+
15	AM 424	+
16	AM 514	+
17	AM 114	+
18	AM 912	+
19	AM 110	+
20	AM 510	++
21	AM 210	+++

หมายเหตุ + เกิดสีแดงอ่อน ++ เกิดสีแดงปานกลาง +++ เกิดสีแดงเข้ม

2.2 ผลการคัดเลือกเชื้อที่มีกิจกรรมดีในการออกซิไดซ์ไนไตรท์เป็น ไนเตรท

ผลทดสอบพบว่ากิจกรรมการเกิดไนเตรทมีเพียง 2 ระดับคือปานกลางอยู่ 10 ไอโซเลท และดีอยู่ถึง 12 ไอโซเลท ได้แก่ N 110, N 410, N 310, N 210, N 813, N 510, N 104, N 614, N 220, N 124, N 112 และ N 412 ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 กิจกรรมการเกิดไนเตรทในตัวอย่างกลุ่ม Nitrite-oxidizing bacteria

ลำดับที่	ไอโซเลท	การทดสอบการออกซิไดซ์ไนไตรท์เป็นไนเตรท
1	N 210	++
2	N 422	++
3	N 110	+++
4	N 410	+++
5	N 310	+++
6	N 210	+++
7	N 813	+++
8	N 713	++
9	N 510	+++
10	N 414	++
11	N 323	++
12	N 104	+++
13	N 214	++
14	N 513	++
15	N 222	++
16	N 614	+++
17	N 220	+++
18	N 124	+++
19	N 112	+++
20	N 912	++
21	N 313	++
22	N 412	+++

หมายเหตุ + เกิดสีน้ำเงินอ่อน, ++ เกิดสีน้ำเงินปานกลาง, +++ เกิดสีน้ำเงินเข้ม

3. การทดสอบหาปริมาณของไนไตรท์ และไนเตรท

3.1 ผลการทดสอบหาปริมาณไนไตรท์

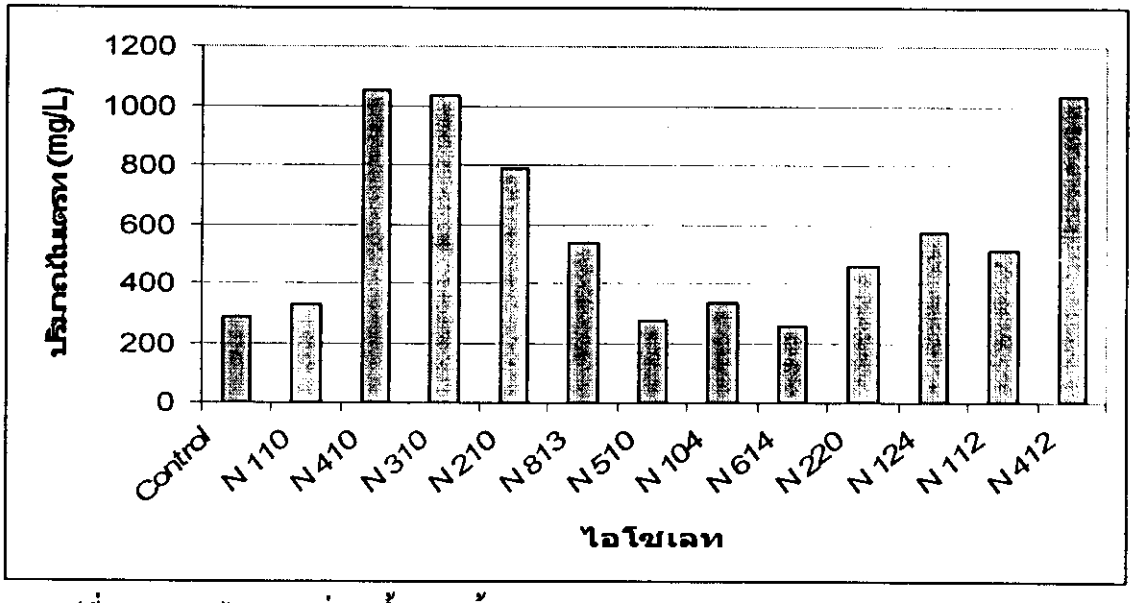
จากผลการทดสอบเชิงคุณภาพได้นำไอโซเลทที่ให้ค่าไนไตรท์ที่สูงกว่าไอโซเลทอื่นๆมาหาปริมาณไนไตรท์ดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่าในหลอดที่เลี้ยงไอโซเลท AM 210 มีไนไตรท์อยู่ 0.38 mg/L ซึ่งใน control (uninoculated medium) ก็มีไนไตรท์ปนเปื้อนอยู่ในระดับหนึ่งแสดงว่าเชื้อทำให้เกิดไนไตรท์ได้ 0.20 mg/L

ตารางที่ 5 กิจกรรมการเกิดไนไตรท์ของแบคทีเรียในกลุ่ม Ammonia oxidizing bacteria

ไอโซเลท	ปริมาณไนไตรท์ที่วัดได้ (mg/L)			
	1	2	3	เฉลี่ย
Control	0.18	0.18	0.18	0.18
AM 210	0.36	0.39	0.38	0.38

3.2 ผลการทดสอบหาปริมาณไนเตรท

ผลการทดสอบการเกิดไนเตรทดังรูปที่ 2 โดยพบว่า control ก็มีไนเตรทปนเปื้อนอยู่ในระดับหนึ่งแล้ว (290 mg/L) ขณะที่ไอโซเลท N 110, N 410, N 310, N 210, N 813, N 510, N 104, N 614, N 220, N 124, N 112 และ N 412 พบปริมาณไนเตรท 326.7, 1052.3, 1031.3, 790, 536, 275, 36, 256.7, 460, 571.7, 514, 1034 mg/L ตามลำดับ โดยพบว่ามีเพียง 3 ไอโซเลท ที่มีกิจกรรมดี ได้แก่ N 310 N 410 N 412 โดยเกิดไนเตรทประมาณ 800 mg/L ดังรูปที่ 2 จึงนำไปศึกษาต่อ

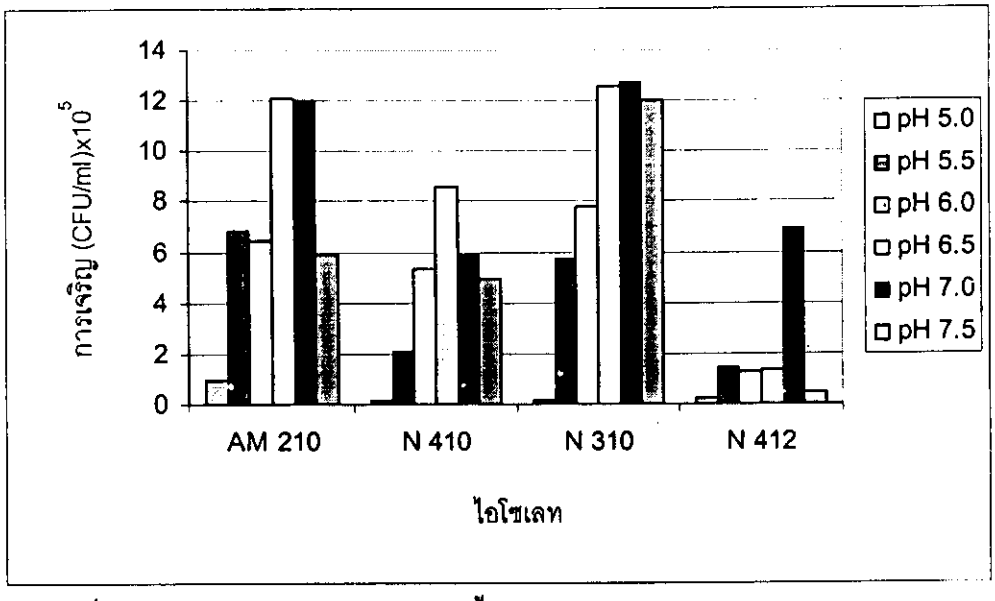


รูปที่ 2 ปริมาณไนเตรทที่เกิดขึ้นโดยเชื้อในกลุ่ม Nitrite-oxidizing bacteria

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Nitrifying bacteria ที่ผ่านการคัดเลือก

4.1 ผลของ pH ต่อการเจริญของเชื้อที่คัดเลือกได้

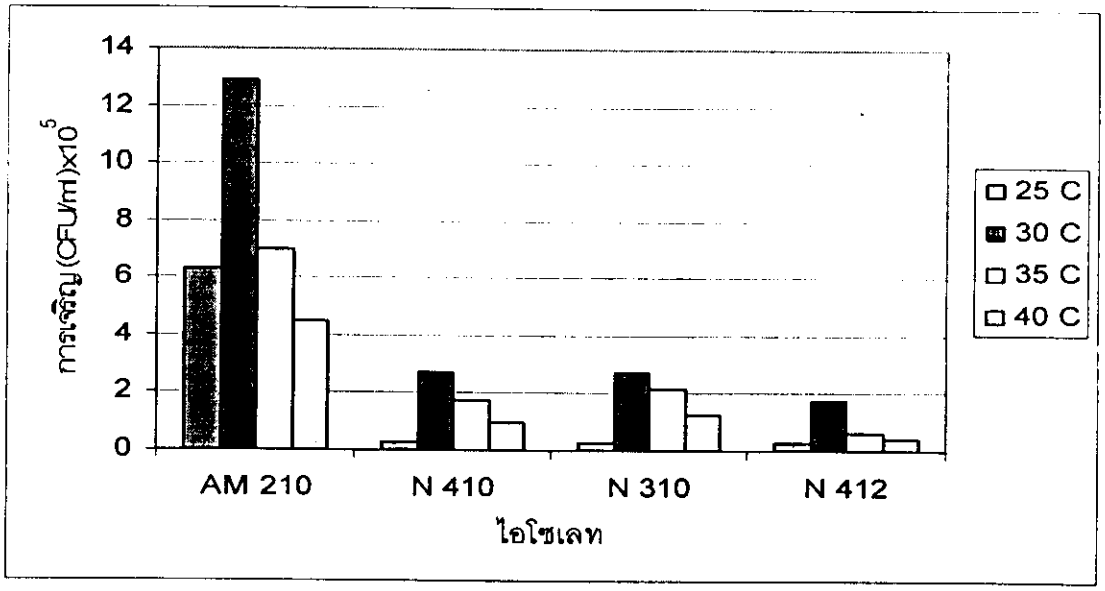
การเจริญของเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลทที่ pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 ซึ่งได้ทำการทดลองไอโซเลทละ 3 ซ้ำให้ผลการทดลองดังรูปที่ 3 พบว่าไอโซเลท AM 210 (Ammonia-oxidizing bacteria) สามารถเจริญได้ดีที่ pH 6.5-7.0 ส่วนไอโซเลท N 410, N 310 และ N 412 (Nitrite-oxidizing bacteria) ก็เจริญได้ดีในช่วง pH 6.5-7.0 เช่นกัน ยกเว้นไอโซเลท N 412 ที่สามารถเจริญได้ดีที่ pH 7.0 เท่านั้น แต่ที่ pH อื่นๆเชื้อก็สามารถเจริญได้เช่นกันแต่ไม่ดี



รูปที่ 3 ผลของ pH ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Ammonia-oxidizing bacteria และกลุ่ม Nitrite-oxidizing bacteria ที่ อุณหภูมิ 30°C

4.2 ผลการเจริญที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40 °C

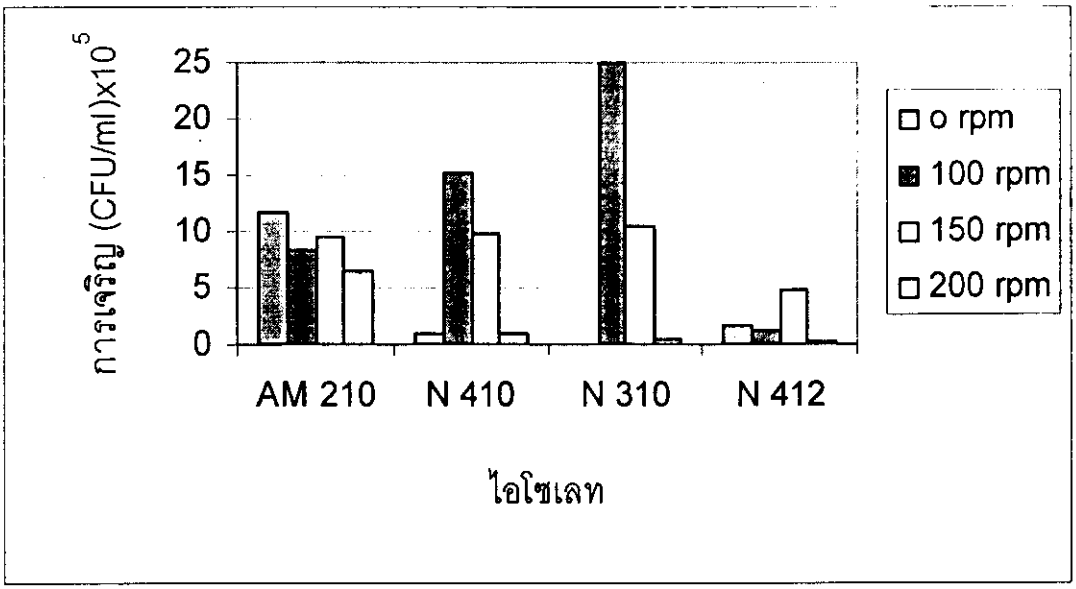
การเจริญของแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลทที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40°C ซึ่งได้ทำการทดลองไอโซเลทละ 3 ซ้ำให้ผลการทดลองดังรูปที่ 4 ทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30°C แต่ที่อุณหภูมิ 25 35 และ 40°C เชื้อพวกนี้ก็สามารถเจริญได้เช่นกันแต่เจริญได้ในปริมาณที่ต่ำกว่า โดยที่อุณหภูมิ 40°C ทุกเชื้อมีการเจริญต่ำสุด จากผลของการทดลองนี้ ทั้ง 3 ไอโซเลทของเชื้อกลุ่มหลังมีการเจริญที่ต่ำกว่าเชื้อกลุ่มแรกสาเหตุจากการใช้กล้าเชื้อที่มีอายุมากมาศึกษาสำหรับเชื้อกลุ่มหลัง



รูปที่ 4 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Ammonia-oxidizing bacteria และกลุ่ม Nitrite-oxidizing bacteria ในอาหารที่มี pH 6.5

4.3 การเลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100, 150, 200 และที่ไม่มีการเขย่า

เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท ระหว่างที่ไม่มีการเขย่าและในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100, 150, 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C ซึ่งได้ทำการทดลองไอโซเลทละ 3 ซ้ำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ให้ผลการทดลองดังรูปที่ 5 ไอโซเลท AM 210 สามารถเจริญได้ใกล้เคียงกันทั้งในสภาพการเลี้ยงปกติที่ไม่มีการเขย่าและมีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 และ 150 rpm โดยที่การไม่เขย่าเชื้อก็เจริญได้ดีเช่นกัน แต่เชื้อกลุ่มหลังเจริญได้ดีขึ้นเมื่อมีการเขย่าที่ความเร็วรอบระหว่าง 100 – 150 rpm โดยไอโซเลท N 410, N 310 เจริญได้ดีเมื่อมีการเขย่าด้วยความเร็ว 100 และ 150 rpm และ N 412 เจริญได้ดีเมื่อมีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm



รูปที่ 5 ผลของการเขย่าต่อการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม Ammonia-oxidizing bacteria และ Nitrite-oxidizing bacteria ที่อุณหภูมิ 30°C และ pH 6.5

สรุปและวิจารณ์การทดลอง

ผลการศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Ammonia-oxidizing bacteria (ออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์) ซึ่งคัดเลือกมาจากเลนและน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งขณะที่ศึกษาเหลืออยู่จำนวน 21 ไอโซเลท ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง แท่งสั้น และกลม การจัดเรียงตัวแบบ เดี่ยวๆ คู่ และ เป็นกลุ่มก้อนเมื่อทำการทดสอบการเกิดไนไตรท์ซึ่งเป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพแล้วสามารถคัดแยกเชื้อได้เพียง 1 ไอโซเลท ได้แก่ AM 210 และให้ค่าของปริมาณไนไตรท์ (การทดสอบเชิงปริมาณ) เท่ากับ 0.20 mg/L คาดว่าแบคทีเรียดังกล่าวจัดอยู่ใน Genus *Nitrosomonas* และเมื่อทดสอบสภาวะการเจริญของเชื้อ AM 210 พบว่าสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30-35°C แต่เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30°C และ pH ที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อนี้ คือ 6.5-7.0 แต่จากการทดลองพบว่าที่ pH 7.0 เชื้อสามารถเจริญได้ดีกว่าที่ pH 6.5 และเชื้อเจริญได้ดีทั้งที่ไม่มีการเขย่าและมีการเขย่า

เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Nitrite-oxidizing bacteria (ออกซิไดซ์ไนไตรท์เป็นไนเตรท) ที่คัดแยกมาจากน้ำและเลนในบ่อเลี้ยงกุ้งขณะที่ศึกษาเหลืออยู่จำนวน 21 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมลบมีลักษณะเป็นแท่ง แท่งสั้น การเรียงตัวของเชื้อดังกล่าวเป็นไปในลักษณะเดียวกันนั่นคืออยู่กันเป็นสายคู่ และอยู่เดี่ยวๆ เมื่อทดสอบหาปริมาณการเกิดไนเตรทซึ่งเป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพสามารถคัดแยกไอโซเลทที่ให้ค่าของไนเตรทที่สูงกว่าไอโซเลทอื่นๆทั้งหมด 12 ไอโซเลท และเมื่อทำปริมาณไนเตรทในเชิงปริมาณแล้วสามารถคัดเลือกเชื้อได้ 3 ไอโซเลท คือ N 410, N 310 และ N 412 โดยให้ค่าของไนไตรทในปริมาณที่ใกล้เคียงกันประมาณ 800 mg/L คาดว่าไอโซเลทที่ได้ในกลุ่มนี้ เป็น Genus

Nitrobacter สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของไอโซเลททั้ง 3 คือสามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30°C แต่ที่อุณหภูมิ 35 และ 40°C เชื้อก็สามารถเจริญได้เช่นกัน สภาวะที่มีการเขย่าทำให้เชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 เจริญได้ดียิ่งขึ้นนั่นคือที่ความเร็วรอบ 100 rpm เชื้อ N 410 และ N 310 เจริญได้ดี ส่วน N 412 เจริญที่ความเร็วของการเขย่า 150 rpm ได้ดีกว่า ส่วน pH ที่เหมาะสมของไอโซเลททั้ง 3 อยู่ในช่วง 6.5- 7.0 แต่พบว่าสำหรับ N 310 สามารถเจริญได้ที่ pH 7.5 ซึ่งมีการเจริญใกล้เคียงกัน

ไอโซเลททั้ง 4 ของ Nitrifier ที่แยกได้มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเช่นเดียวกับที่มีรายงานไว้ เป็นที่ทราบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียกลุ่ม Nitrifying bacteria คือ 30°C (Bitton, 1994) แต่ช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่คัดเลือกได้อยู่ในช่วง 6.5-7.5 ซึ่งโดยทั่วไปเชื้อเหล่านี้เจริญได้ดีในช่วง 7.5-8.5 และ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Nitrobacter* ซึ่งเป็นพวกที่ออกซิไดซ์ไนไตรท์อยู่ระหว่าง 7.2 และ 7.8 (U.S.EPA, 1975) อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อดังกล่าวแยกมาจากดินเลนของบ่อเลี้ยงกุ้งซึ่งมีลักษณะเป็นดินกรดรุนแรงดังได้กล่าวมาแล้ว ผลการทดลองในส่วนหลังยืนยันว่าทำไมจึงมีแอมโมเนียมสูงเกินไปในบางช่วงของการเลี้ยงกุ้งจนส่งผลเสียต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง เป็นเพราะกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียมเป็นไนไตรท์มีค่าต่ำ และสมาชิกของกลุ่มแรกผลการคัดเลือกได้เพียง 1 ไอโซเลทซึ่งก็มีกิจกรรมต่ำ แต่เมื่อเทียบกับเชื้อกลุ่มหลังมีกิจกรรมดีและคัดเลือกได้ถึง 3 ไอโซเลท สะท้อนให้ทราบถึงกิจกรรมได้บ่อเลี้ยงกุ้งได้ ซึ่งพบว่ามีปริมาณของไนไตรท์ต่ำตลอดขณะที่แอมโมเนียมมากเกิน งานที่ผู้วิจัยจะศึกษาต่อในอนาคตคือหาวิธีการเก็บรักษาเชื้อที่คัดเลือกได้เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับปรับคุณภาพน้ำของบ่อเพาะเลี้ยงในกรณีที่มีความจำเป็นต้องใช้ แต่อย่างไรก็ตามสำหรับเชื้อในกลุ่มแรกที่ยังมีกิจกรรมต่ำอยู่จำเป็นต้องคัดเลือกให้ได้สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมดีมากกว่าที่มีอยู่