

การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้ง

SCREENING OF EFFECTIVE MICROORGANISMS TO DECOMPOSE
ORGANIC MATTERS IN SHRIMP POND

กมลทิพย์ บุรณเรสุคนธ์
KAMOLTIP BURANASUKON

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2547

ISBN 974-9700-52-7

การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้ง

SCREENING OF EFFECTIVE MICROORGANISMS TO DECOMPOSE
ORGANIC MATTERS IN SHRIMP POND

กมลทิพย์ บุระณะสุคนธ์

KAMOLTIP BURANASUKON

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2547

ISBN 974-9709-52-7

**SCREENING OF EFFECTIVE MICROORGANISMS TO DECOMPOSE
ORGANIC MATTERS IN SHRIMP POND**

KAMOLTIP BURANASUKON

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2004

ISBN 974-9709-52-7

COPYRIGHT 2004

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้ง
นักศึกษา	นางสาวกมลทิพย์ บุรณะสุคนธ์
รหัสประจำตัว	43065212
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2547
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. คุณณี ชนะบริพัฒน์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. เขียวพา สุวัตติ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งจากอำเภอบางป่อ และอำเภอกลองสวน จังหวัดสมุทรปราการ เพื่อคัดเลือกหาจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ จากการตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $1.72 \times 10^3 - 8.10 \times 10^4$ CFU / มิลลิลิตร ปริมาณเชื้อยีสต์และราทั้งหมดอยู่ในช่วง 5.5 - 25.5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างได้ทั้งหมด 83 ไอโซเลท สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ดังกล่าวได้ดีที่สุด 3 สายพันธุ์ คือ Sb 23 สามารถย่อยสลายโปรตีนและแป้งได้ดี Sb 27 และ Sb 46 สามารถย่อยสลายโปรตีนได้ดี จากการทดสอบทางชีวเคมี และพิสูจน์เอกลักษณ์ทางสายพันธุ์โดยวิธี 16S rDNA พบว่าเชื้อรหัส Sb 23 คือ *Knoellia sinensis* DSM12331 และเชื้อรหัส Sb 27 และ Sb 46 พบว่าเป็นเชื้อเดียวกันคือ *Bacillus* sp. DIT030428 เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการลดค่าซีโอดีแบบ *in vitro* พบว่าการใช้แบคทีเรียผสม 2 สายพันธุ์ในอัตราส่วนที่เท่ากันสามารถลดค่าซีโอดีได้ดีกว่าการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์เดียว โดยสามารถลดค่าซีโอดีของอาหารเลี้ยงกุ้งความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ได้ 66 เปอร์เซ็นต์

Thesis Title	Screening of Effective Microorganisms to Decompose Organic Matters in Shrimp Pond
Student	Miss Kamoltip Buranasukon
Student ID.	43065212
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2004
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Dusanee Thanaboripat
Thesis Co-advisor	Dr. Yaowapa Suvathi

ABSTRACT

The effective microorganisms from shrimp ponds were studied. The water samples were collected from Bangbo and Klongsuan Districts, Samutprakarn Province. It was found that the total aerobic bacteria were $1.72 \times 10^3 - 8.10 \times 10^4$ CFU/ml and the total yeasts and molds were 5.5 - 25.5 CFU/ml. Eighty-three isolates of bacteria were screened for organic matters decomposition. Three strains were found to be the most effective for the protein, starch and lipid decomposition and designated as Sb 23 (the protein and starch hydrolysing strain), Sb 27 and Sb 46 (the protein hydrolysing strains). The biochemical test was used for the primary screening and the partial 16S rDNA sequence analysis was used for the identification. The isolate NO. Sb 23 was identified as *Knoellia sinensis* DSM12331 and the isolates NO. Sb 27 and Sb 46 were found to be the same species and were identified as *Bacillus* sp. DIT030428. The *in vitro* efficiency test for the organic matters degradation was investigated. The mixed cultures of *Knoellia sinensis* DSM12331 and *Bacillus* sp. DIT030428 decreased the COD values of the water with 1% (w/v) of shrimp feed was decreased to 66% which was lower than the COD values obtained from the individual strain.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ โดยได้รับความกรุณาจากรองศาสตราจารย์ ดร.คุณฉนิ ฐนะบริพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. เขียวพา สุวดี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม จากสถาบันวิจัยและ พัฒนา องค์การเภสัชกรรม ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นในการทำวิจัย และ ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นवलพรรณ ณ ระนอง ประธานกรรมการ วิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล กรรมการวิทยานิพนธ์ผู้ทรงคุณวุฒิภายใน ภาควิชา และรองศาสตราจารย์ ศักดิ์ชัย ชูโชติ กรรมการวิทยานิพนธ์ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกภาค วิชา ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบและช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม ที่กรุณา ให้ใช้เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ และเพื่อนๆ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบัน เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง รวมทั้งเจ้าหน้าที่ และพี่ๆ สถาบันวิจัยและ พัฒนา องค์การเภสัชกรรม และบุคคลอื่นๆ ที่ได้กล่าวนามในที่นี้ที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจ ต่อผู้วิจัยเสมอมา จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่น้อง ที่ช่วยเหลือ สนับสนุน และเป็นกำลังใจที่ดี ในการทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

กมลทิพย์ บุรณะสุคนธ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VII
สารบัญรูป.....	VIII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 การเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย.....	3
2.2 กุ้งกุลาดำ.....	3
2.3 การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในเขตพื้นที่น้ำจืด.....	11
2.4 มลภาวะและแนวทางแก้ปัญหาหมอกควันที่เกิดในบ่อเลี้ยงกุ้ง.....	12
2.5 สารอินทรีย์.....	13
2.6 จุลินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ.....	16
2.7 การย่อยสลายสารอินทรีย์ของจุลินทรีย์.....	20
2.8 การตรวจวัดคุณภาพน้ำ.....	24
บทที่ 3 วิธีการวิจัย.....	26
3.1 อุปกรณ์การทดลอง.....	26
3.2 เคมีภัณฑ์สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	26
3.3 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์บีโอดี.....	27
3.4 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์ซีโอดี.....	27

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5 การเก็บตัวอย่างและการศึกษาสมบัติทางกายภาพ และทางเคมีของน้ำ.....	27
3.6 การตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์.....	28
3.7 การแยกเชื้อและทำให้เชื้อบริสุทธิ์.....	28
3.8 การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ ในการย่อยสลายสารอินทรีย์.....	28
3.9 การจำแนกลักษณะและศึกษาสมบัติบางประการ ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้.....	29
3.10 การเก็บรักษาแบคทีเรียโดยวิธีไลโอไฟไลเซชัน.....	32
3.11 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลาย สารอินทรีย์ในน้ำเลี้ยงกุ้ง.....	32
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	34
4.1 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง.....	34
4.2 การตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์.....	36
4.3 การแยกเชื้อและทำให้เชื้อบริสุทธิ์.....	37
4.4 การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ ในการย่อยสลายสารอินทรีย์.....	46
4.5 หลักในการคัดเลือกจุลินทรีย์.....	57
4.6 การจำแนกลักษณะและศึกษาสมบัติบางประการ ของเชื้อที่คัดเลือกได้.....	61
4.7 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลาย สารอินทรีย์ในน้ำเลี้ยงกุ้ง.....	67
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	73
บรรณานุกรม.....	75

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก.....	82
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์.....	83
ภาคผนวก ข สีย้อมและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	87
ภาคผนวก ค วิธีวิเคราะห์คุณภาพน้ำ.....	89
ภาคผนวก ง การเก็บรักษาจุลินทรีย์โดยวิธีไลโอไฟล์เซชัน (Lyophilization).....	93
ประวัติผู้เขียน.....	96

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ตารางเปรียบเทียบรูปแบบการเลี้ยงกุ้งที่ต่างกันของทั้ง 3 ระบบ.....	7
2.2 ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ.....	11
2.3 แหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....	22
4.1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดสมุทรปราการ.....	34
4.2 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดสมุทรปราการ.....	36
4.3 ลักษณะและรูปร่างของแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดสมุทรปราการ.....	37
4.4 ลักษณะและรูปร่างของยีสต์และราที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดสมุทรปราการ.....	43
4.5 ความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ของเชื้อจุลินทรีย์.....	48
4.6 ความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรีย.....	53.
4.7 ลักษณะรูปร่าง การติดสีแกรม ความสามารถในการสร้างสปอร์ และความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนบนอาหาร Skim milk agar ของแบคทีเรีย 83 ไอโซเลท.....	54
4.8 ลักษณะรูปร่าง การติดสีแกรม ความสามารถในการสร้างสปอร์ และความสามารถในการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Starch agar ของแบคทีเรีย 83 ไอโซเลท.....	55
4.9 ลักษณะรูปร่าง การติดสีแกรม ความสามารถในการสร้างสปอร์ และความสามารถในการย่อยสลายไขมันบนอาหาร Tween 80 agar ของแบคทีเรีย 83 ไอโซเลท.....	56
4.10 ความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ของยีสต์.....	57
4.11 ลักษณะการเจริญและการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ SB23, SB 27 และ SB46.....	61
4.12 ค่า COD เฉลี่ยของน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ หลังการเติมแบคทีเรีย สายพันธุ์เดียว แบคทีเรียผสมและไม่เติมแบคทีเรีย เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 7 วัน.....	69
4.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การลดลงของค่า COD ในเวลา 7 วัน.....	72
4.14 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การลดลงของค่า COD ในเวลา 7 วัน.....	72

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะและส่วนต่างๆของกึ่งกลาคำ.....	4
2.2 วิวัฒนาการของกึ่งกลาคำ.....	5
2.2 ความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์แบบลูกโซ่อาหารในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ.....	19
4.1 การย่อยสลายสารอินทรีย์ของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารทดสอบชนิดต่างๆ โดยการทำให้ point inoculation บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7	47
4.2 ลักษณะและรูปร่างของแบคทีเรียหัด SB23.....	58
4.3 ลักษณะและรูปร่างของแบคทีเรียหัด SB27.....	59
4.4 ลักษณะและรูปร่างของแบคทีเรียหัด SB46.....	60
4.5 ลำดับเบสเบสดีเอ็นเอของแบคทีเรียหัด SB23.....	64
4.5 ลำดับเบสเบสดีเอ็นเอของแบคทีเรียหัด SB27.....	65
4.5 ลำดับเบสเบสดีเอ็นเอของแบคทีเรียหัด SB46.....	66
4.8 ค่า COD ของน้ำจากบ่อเลี้ยงกึ่งกลาคำผสมอาหารกึ่ง 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หลังการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์เดียว แบคทีเรียผสม และไม่เติมแบคทีเรีย ปริมาณ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำที่ทดลอง 3 ซ้ำ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเวลา 7	70
4.9 เปอร์เซ็นต์การลดลงของค่า COD หลังการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์เดียว แบคทีเรียผสมและไม่เติมแบคทีเรีย เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเวลา 7 วัน.....	71
ง.1 ลักษณะและส่วนประกอบของเครื่อง Freeze - dryer ที่ใช้ในการทดลอง	95

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

กุ้งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีความสำคัญสำหรับการบริโภคทั้งภายในประเทศและส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ ประเทศไทยได้เริ่มมีการเลี้ยงกุ้งมานานหลายปี ในระยะหลังมีการขยายตัวอย่างรวดเร็วของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนากำลังเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย การเลี้ยงแต่ละรุ่นจะปล่อยกุ้งอย่างหนาแน่น มีการให้อาหารสำเร็จรูป มีสูตรการให้อาหารที่เพิ่มจำนวนมือและจำนวนอาหาร เพื่อช่วยเร่งการเจริญเติบโต เพื่อให้ได้ผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่สูงสุด ภายในระยะเวลาที่สั้นที่สุดเท่าที่จะทำได้ (ลีลา เรื่องแป้น. 2534) การเลี้ยงที่ขาดการจัดการและการวางแผนอย่างเหมาะสมเป็นสาเหตุทำให้คุณภาพน้ำเสื่อมลงอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมในน้ำ การที่มีสารอินทรีย์หรือสารที่เป็นของเสียตกค้างอยู่ในบ่อเป็นจำนวนมาก ทำให้ผลผลิตของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำลดลงได้ (Harris. 1981) ของเสียที่เกิดจากการเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ เศษอาหารที่เหลือจากการให้ที่มากเกินไป ซากของสิ่งมีชีวิตในน้ำ เช่น แพลงก์ตอน รวมทั้งของเสียที่ถูกขับออกมาจากตัวกุ้ง เกิดการสะสมและเน่าสลายในบ่อ แนวทางในการแก้ปัญหาน้ำเน่าเสียที่เกิดขึ้น ส่วนใหญ่จะแก้ไขโดยการเปลี่ยนถ่ายน้ำให้มากขึ้น มีการใช้ปูนหรือสารเคมีต่างๆ แต่วิธีนี้จะเกิดปัญหาตามมาภายหลัง คือจะทำให้สภาพแวดล้อมใกล้เคียงเน่าเสียตามไปด้วยและอาจเกิดการตกค้างของสารเคมีต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้สารปฏิชีวนะเพื่อนำเชื้อโรคในบ่อกุ้ง ถ้าใช้ไม่ถูกวิธีจะทำให้เกิดสารตกค้างในตัวกุ้ง ส่งผลเสียและเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

การจัดการสิ่งแวดล้อมในการเลี้ยงให้เกิดสภาพสมดุล โดยมีการจัดการที่เหมาะสมผสมผสานกับกระบวนการทางธรรมชาติ น่าจะเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหามลพิษน้ำและการสะสมสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยการคัดเลือกเชื้อจากธรรมชาติที่มีความสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ให้มีมากขึ้นในบ่อเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ตกค้างที่ต้องการกำจัดให้มีปริมาณลดน้อยลง โดยจะต้องมีการจัดการที่เหมาะสมที่ควบคู่กันไปด้วย เช่น การให้อาหารที่พอเหมาะ การให้อากาศเพียงพอสำหรับสิ่งมีชีวิตในบ่อ เชื้อจุลินทรีย์ที่เติมลงไป การสร้างบ่อที่สามารถกำจัดตะกอนของเสียที่พื้นบ่อออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ และที่สำคัญควรหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีที่จะทำให้ดินและน้ำสูญเสียสภาพสมดุลตามธรรมชาติโดยไม่จำเป็น

Horan (1990) พบว่าสารอินทรีย์ที่สะสมในบ่อเลี้ยงกุ้งจะทำให้ น้ำมีคุณภาพลดลง แต่มี จุลินทรีย์บางกลุ่มสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์เหล่านั้นเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหาร พลังงาน และ การเจริญ ส่งผลให้ปริมาณสารอินทรีย์ที่ตกค้างอยู่ลดลง และยังสามารถควบคุมปริมาณพืชน้ำ ไม่ให้มีมากเกินไป ทำให้ค่าปริมาณออกซิเจนในน้ำไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ดังนั้นประเด็นนี้ทำให้น่าสนใจที่จะศึกษาการนำจุลินทรีย์มาใช้ในการเลี้ยงกุ้งเพื่อลดปริมาณสารอินทรีย์ที่ตกค้างในบ่ออัน ก่อให้เกิดมลภาวะในบ่อเลี้ยงและสภาพแวดล้อมใกล้เคียง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์ในน้ำของบ่อเลี้ยงกุ้ง
- 1.2.2 เพื่อศึกษาลักษณะและคุณสมบัติทางชีววิทยาและชีวเคมีของจุลินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้ง
- 1.2.3 เพื่อคัดเลือกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้ง
- 1.2.4 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้ง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ตกค้างในบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยคัดเลือกเชื้อ จุลินทรีย์จากน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งในเขตจังหวัดสมุทรปราการที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน นำมาศึกษาลักษณะและคุณสมบัติทางชีววิทยา และชีวเคมี รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้ง ได้ดี เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาจุลินทรีย์เพื่อใช้เพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียต่อไปในอนาคต

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย

การเลี้ยงกุ้งทะเลหรือการทำนากุ้งตามแนวชายฝั่งทะเลของประเทศไทยมีมานานกว่า 50 ปีมาแล้ว แหล่งเลี้ยงกุ้งในช่วงแรกนั้นอยู่บริเวณอ่าวไทยตอนในแถบจังหวัดสมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม โดยดัดแปลงมาจากการทำนาข้าว การทำนาเกลือ ทั้งนี้เนื่องจากถูกกุ้งที่ทำการเลี้ยงเหล่านี้เป็นกุ้งจากธรรมชาติที่ลอยติดมากับน้ำทะเลที่ท่วมเข้าสู่แปลงนาในช่วงฤดูมรสุมแล้วกักถูกกุ้งไว้ในแปลงนาประมาณ 3-4 เดือน(จนกระทั่งได้ขนาดกุ้งที่ต้องการ) จึงทำการระบายน้ำออกจากแปลงนาโดยใช้ถุงอวนคัดรวบรวมกุ้งที่บริเวณประตูระบายน้ำ ประกอบกับเกษตรกรประสบปัญหาหาคาข้าว ราคาเกลือตกต่ำ และความต้องการกุ้งทะเลของตลาดเพิ่มมากขึ้น รายได้จากการขายกุ้งทะเลก็สูงกว่ารายได้จากการขายข้าวและเกลือ เกษตรกรเหล่านี้จึงดัดแปลงที่ดินไปทำนากุ้งและยึดเป็นอาชีพมาจนถึงปัจจุบัน (ศิริพรธม สุชัยคนารักษ์. 2534) ในช่วงประมาณ 10 ปีที่ผ่านมาประเทศไทยประสบความสำเร็จในการเพาะพันธุ์ลูกกุ้งทะเล เพื่อใช้ทดแทนพันธุ์ลูกกุ้งจากธรรมชาติ ทำให้อาชีพการทำนากุ้งในประเทศไทยได้แพร่กระจายออกไปจากบริเวณอ่าวไทยตอนในสู่จังหวัดต่างๆ ที่มีชายฝั่งทะเล

กุ้งทะเลที่ได้รับความสนใจจากเกษตรกรผู้เลี้ยงมี 4 ชนิด คือ กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) กุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguensis* de Man) กุ้งตะกาด (*Metapenaeus brevicornis* H.Milne Edwards) และกุ้งหัวมัน (*Metapenaeus monoceros* Fabricius) กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งทะเลที่นิยมเลี้ยงกันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน เพราะเติบโตเร็วและทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดีและกำลังเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและภายนอกประเทศ (ประจวบ หล้าอุบล. 2532)

2.2 กุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำ (giant tiger prawn) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Penaeus monodon* Fabricius เป็นกุ้งทะเลชนิดหนึ่งที่นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย สามารถเลี้ยงในน้ำกร่อยแถบป่าชายเลนได้ดี หรือแม้ปรับสภาพการเลี้ยงให้อยู่ในน้ำจืดในปัจจุบันก็สามารถเลี้ยงได้ ตลาดส่งออกที่สำคัญได้แก่ อเมริกา ญี่ปุ่น และยุโรป มีอนุกรมวิธานดังนี้ (Motoh. 1980)

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Superorder Eucarida

Order Decapoda

Suborder Natantia

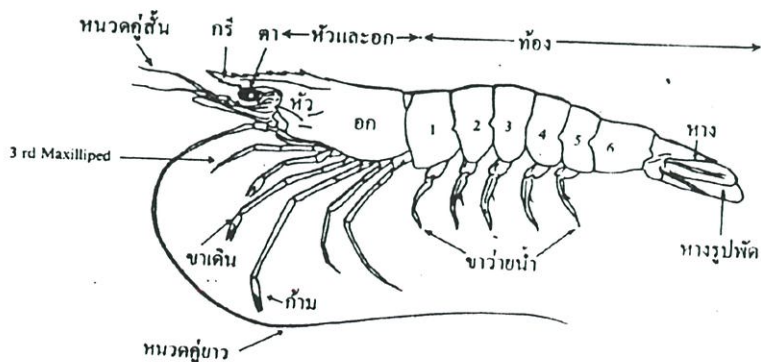
Infraorder Penaeidea

Family Penaeidea

Genus *Penaeus*

Species *monodon*

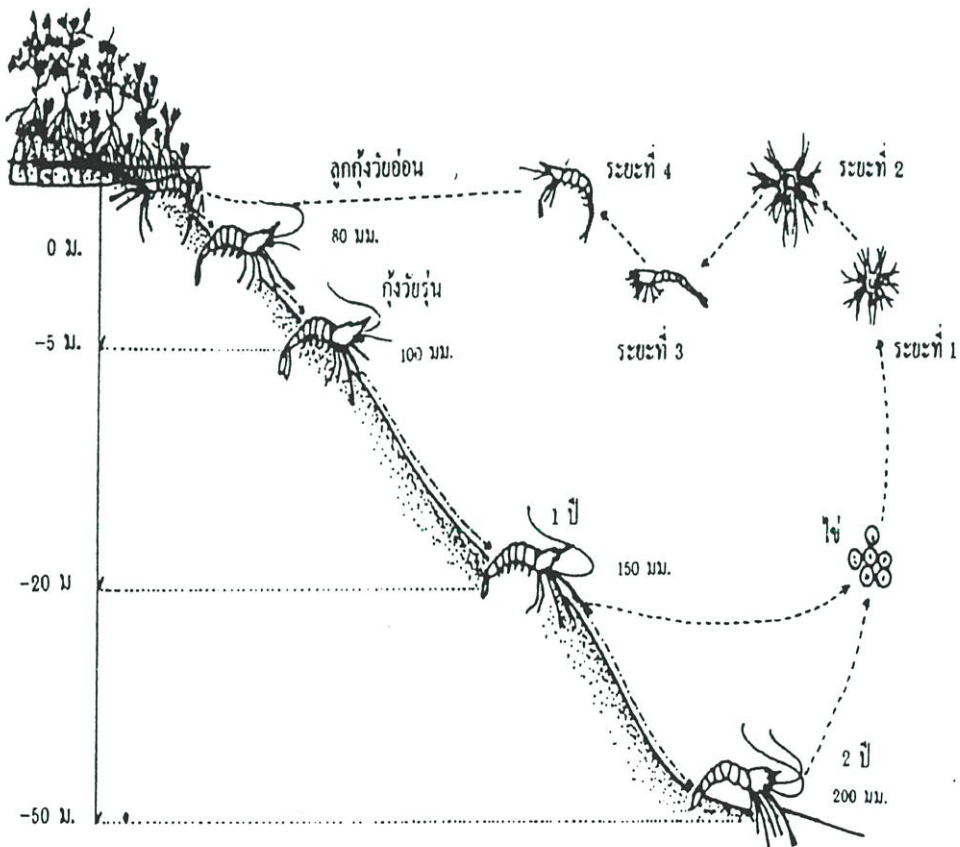
ลักษณะของกุ้งกุลาดำมีดังนี้ ลักษณะภายนอก เป็นกุ้งเปลือกแข็ง มีหนวดสีดา ฟันกรีด้านบนมี 7-8 ซี่ ช่วงข้างกรีดทั้งสองข้างแคบและยาวไม่ถึงฟันกรีดที่สุดท้าย ลำตัวมีสีน้ำเงินแถบม่วง แถบดำพาดขวางลำตัว ตามปล้องและปลายโคนหาง ขาวว่ายน้ำมีสีเหลืองพาดขวาง ปลายขาสำหรับเดินคู่ที่ 1-2 เป็นสีส้ม (ประจวบ หล้าอุบล. 2532) (รูปที่ 2.1) มีแหล่งกำเนิดอยู่ในทะเลแถบอินโดแปซิฟิกตะวันออก แอฟริกาตะวันออก แอฟริกาตะวันตกเฉียงใต้ และคาบสมุทรอินเดีย กุ้งกุลาดำเมื่อวัยอ่อนจะอาศัยตามปากแม่น้ำและเมื่อโตอาศัยในทะเลที่มีพื้นเป็นโคลนปนทราย สามารถวางไข่สืบพันธุ์ได้ตลอดปี แต่วางไข่ชุกชุมช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคมในแถบน้ำกร่อย สามารถกินได้ทั้งพืชและสัตว์ มีความแข็งแรงทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงระดับความเค็ม จึงเป็นที่นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายทั้งในพื้นที่ความเค็ม น้ำกร่อยหรือปรับสภาพเลี้ยงในน้ำจืดก็สามารถเลี้ยงประสบความสำเร็จเช่นกัน (จรัญ อรุณพันธุ์. 2540)



รูปที่ 2.1 ลักษณะและส่วนต่างๆของกุ้งกุลาดำ

ที่มา : Kungvankij. (1976)

วิวัฒนาการของกุ้งกุลาดำ (รูปที่ 2.2) มี 5 ระยะ (Motoh, 1980) คือระยะแรกเป็นระยะวัยอ่อนในไข่ (embryo) เริ่มตั้งแต่ไข่ที่ได้รับการผสมแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์จนฟักเป็นตัวใช้ระยะเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง ระยะเวลาต่อมาเป็นระยะลูกกุ้งวัยอ่อน (larva) เริ่มจากลูกกุ้งวัยอ่อนระยะแรก หรือ Nauplius I พัฒนาเป็น Nauplius VI และ Protozoa I ใช้เวลาประมาณ 36 ชั่วโมง ประมาณ 5 วัน จะพัฒนาจาก Protozoa II, III เป็น Mysis I แล้วพัฒนาต่อไปเป็น Mysis I, III ตู Postlarva โดยใช้เวลา 4-5 วัน จึงเข้าสู่ระยะกุ้งวัยรุ่น (juvenile) หรือกุ้ง Postlarva กุ้งระยะนี้มีระบบเหงือกสมบูรณ์ เมื่อเลี้ยงต่อไปร่างกายเริ่มมีสัดส่วนความยาวของท่อนหัว กลางลำตัวและท่อนหางเหมือนกุ้งใหญ่และเริ่มมีอวัยวะเพศ ระยะนี้กินเวลา 4 เดือน โดยมากจะมีการเลี้ยงกุ้งในระยะนี้ จากระยะวัยรุ่นจะเจริญเข้าสู่ระยะก่อนตัวเต็มวัย (subadult) เป็นระยะที่กุ้งมีการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์แต่ยังไม่สมบูรณ์ และระยะสุดท้ายคือ ระยะตัวเต็มวัย (adult) เป็นระยะที่กุ้งมีการพัฒนาระบบสืบพันธุ์สมบูรณ์เต็มที่



รูปที่ 2.2 วิวัฒนาการของกุ้งกุลาดำ

ที่มา : Kungvankij. (1976)

2.2.1 รูปแบบการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

ในปี พ.ศ. 2510 กรมประมงได้ส่งเสริมการเลี้ยงกุ้งทะเล เนื่องจากกุ้งกุลาดำเลี้ยงง่าย มีอัตราการเติบโตสูงกว่ากุ้งทะเลชนิดอื่นจึงมีผู้นิยมเลี้ยงกันมาก รูปแบบการเลี้ยงในประเทศไทยมี 3 รูปแบบ (ตารางที่ 2.1) (พนมรักษ์ ผดุงกุล. 2535)

1. แบบธรรมชาติหรือแบบดั้งเดิม (Extensive tradition system) ผู้เลี้ยงกุ้งอาศัยลูกกุ้งจากธรรมชาติโดยตรง ลูกกุ้งจะเข้ามากับน้ำทะเลในขณะที่ระบายน้ำเข้าบ่อหรือนา ไม่มีการให้อาหารเสริม ลูกกุ้งเข้าบ่อขณะน้ำขึ้นและปิดประตูกักน้ำไว้เมื่อน้ำลดและจะเปิดน้ำเข้าบ่อทุกครั้งที่มีระดับน้ำภายนอกสูงกว่าระดับน้ำภายในบ่อ เป็นการเปลี่ยนถ่ายน้ำโดยการใช้ตะแกรงตาถี่เพื่อไม่ให้กุ้งตัวโตหลุดออกไปแต่สามารถให้กุ้งตัวเล็กเข้ามาได้ วิธีนี้ลงทุนน้อยแต่ผลผลิตที่ได้จะไม่แน่นอนและเป็นการเสียโอกาสในการใช้ทรัพยากรที่ดิน

2. แบบกึ่งพัฒนา (Semi-intensive system) คล้ายคลึงกับแบบธรรมชาติแต่มีการปล่อยลูกกุ้งจากโรงเพาะเสริมลงไปบ่อ ให้อาหารเสริม ปรับปรุงรูปบ่อให้เป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า หรือสี่เหลี่ยมจตุรัส มีการป้องกันกำจัดศัตรูกุ้ง การเปลี่ยนถ่ายน้ำ การควบคุมโรคและมีการคาดหวังผลผลิตสูงขึ้น

3. แบบพัฒนาหรือแบบหนาแน่น (Intensive system) เป็นแบบที่มีการพัฒนามากกว่าแบบที่ 2 มีขนาดของบ่อเล็กลงมีการใช้ลูกกุ้งจากโรงเพาะฟักทั้งหมด โดยมีการป้องกันไม่ให้ลูกกุ้งหรือสัตว์อื่นๆ เข้ามาในบ่อได้ มีการให้อาหารเสริมได้แก่พวกอาหารสำเร็จรูป (pellet) มีการจัดการที่ดีในเรื่องการเปลี่ยนถ่ายน้ำ การกำจัดศัตรูกุ้ง การควบคุมโรค มีเครื่องให้อากาศและผลผลิตต่อพื้นที่สูง

การเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาก่อให้เกิดปัญหาเรื่องความเสื่อมโทรมของบ่อเลี้ยงและเกิดโรคระบาดซึ่งเป็นปัญหาใหญ่ของการเลี้ยงกุ้งชนิดนี้ เนื่องจากอัตราการปล่อยที่สูงและเป็นระบบปิด มีการให้อาหารเม็ดที่มีโปรตีนค่อนข้างสูงจึงก่อให้เกิดสารอินทรีย์หรือก๊าซพิษตามมาซึ่งจะส่งผลกระทบต่อกุ้งกุลาดำ อัตราการปล่อยกุ้งกุลาดำที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 50,000 - 70,000 ตัวต่อไร่ และเมื่อเริ่มเลี้ยงควรให้อาหารประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน หลังจากนั้นปรับปริมาณอาหารเพิ่มขึ้นหรือลดลงให้เหมาะสม อาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำใช้ทั้งอาหารสดและอาหารเม็ดควรมีโปรตีนอยู่ระหว่าง 40 - 50 เปอร์เซ็นต์ (มะลิ บุญขรัตนผลิน. 2531)

ตารางที่ 2.1 ตารางเปรียบเทียบรูปแบบการเลี้ยงกุ้งที่ต่างกันของทั้ง 3 ระบบ

ลักษณะ	ระดับความหนาแน่น		
	ธรรมชาติ	กึ่งพัฒนา	พัฒนา
ระดับความสูงของที่ดิน	0 ถึง 1.4 MSL	MSL	MSL
ขนาดบ่อ (ไร่)	มากกว่า 30	5 ถึง 15	6 หรือน้อยกว่า
การให้อากาศ	ธรรมชาติ	มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ หรือใช้เครื่องจักร	มีการใช้เครื่องจักร พอกอากาศอย่างต่อเนื่อง
อัตราความหนาแน่น (ตัว / ตารางเมตร / รุ่น)	มากกว่า 5	5 ถึง 15	20 หรือมากกว่า
อาหาร	ธรรมชาติ	ธรรมชาติ-อาหารเสริม	สำเร็จรูป
ปริมาณผลผลิต (กิโลกรัม / ไร่ / ปี)	20 ถึง 50	100 ถึง 300	มากกว่า 900

หมายเหตุ : MSL ระดับน้ำทะเลเฉลี่ย

ที่มา : พนมรักษ์ ผดุงกุล (2535)

2.2.2 หลักการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำควรมีการควบคุมปัจจัยต่างๆดังต่อไปนี้ (เปรมสุดา สมาน. 2539; Smith and Piedrahita. 1988 ; Thongrak. 1992)

1. ต้องมีการเตรียมบ่อที่ดี พื้นบ่อต้องสะอาด มีการกำจัดตะกอนเลนที่ก้นบ่อ สภาพดินควรเป็นดินเหนียวปนทราย มีพีเอชที่เหมาะสมและตากแดดเป็นเวลานาน ขนาดบ่อไม่ควรเกิน 5 ไร่ เพื่อสะดวกในการจัดการและดูแล ระดับความลึกควรประมาณ 2 เมตร ซึ่งสามารถกักเก็บน้ำได้ประมาณ 1.80 เมตร บ่ออาจเป็นบ่อสี่เหลี่ยมผืนผ้า หรือรูปแบบอื่นได้ตามความเหมาะสมและควรมีบ่อพักน้ำพื้นที่ 20-30 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เลี้ยง เพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำเพื่อใช้เลี้ยงกุ้ง

2. ต้องเลือกลูกกุ้งที่มีคุณภาพดี ลูกกุ้งที่ได้จากไข่ชุดแรกของแม่กุ้งจะเป็นลูกกุ้งที่แข็งแรงและเจริญเติบโตดี ขนาดลูกกุ้งต้องเสมอกัน ลำตัวสะอาดขาว ก่อนปล่อยลูกกุ้งควรปรับความเค็มให้เท่ากับในบ่อเลี้ยงโดยให้ทางโรงเพาะฟักปรับมาให้เรียบร้อย อัตราการปล่อยลูกกุ้งที่เหมาะสมประมาณ 30 ตัวต่อตารางเมตร

3. เตรียมดินน้ำให้เหมาะสม การเตรียมดินน้ำให้อยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มอัตราการรอดของกุ้งได้ และจะทำให้กุ้งได้รับอาหารธรรมชาติด้วย แพลงค์ตอนที่มีจำนวนเหมาะสมในบ่อนอกจากจะให้ผลผลิตสุทธิ (net primary production) ในรูปของออกซิเจนได้สูงแล้วยัง

สามารถลดความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ละลายในน้ำโดยการดูดซับเข้าไปในเซลล์ ซึ่งอัตราการดูดซับจะมากขึ้นเมื่อออกซิเจนถูกผลิตออกมามากขึ้น

4. มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำอย่างเหมาะสม อัตราการเปลี่ยนน้ำและระยะเวลาลดน้ำภายในบ่อควรดำเนินการตั้งแต่เลี้ยงจากเดือนที่ 2 โดยถ่ายเทน้ำในเดือนที่ 2 ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มขึ้นเป็น 30 เปอร์เซ็นต์ ในเดือนที่ 3 และเดือนที่ 4

5. มีการให้อากาศอย่างเพียงพอ ควรวางตำแหน่งเครื่องตีน้ำให้เหมาะสมเพื่อให้น้ำไหลเวียนได้ทั่วทั้งบ่อ โดยใช้เครื่องตีน้ำ 1 ตัวต่อพื้นที่บ่อเลี้ยง 1 ไร่ ในระยะเวลาการเลี้ยงเดือนที่ 3 เป็นต้นไป การติดตั้งเครื่องตีน้ำเพียงอย่างเดียวอาจจะไม่สามารถทำให้ก๊าซออกซิเจนแพร่กระจายบริเวณก้นบ่อได้ทั่วถึง จึงต้องมีเครื่องให้อากาศเพิ่มเติม

6. ให้อาหารที่มีคุณภาพดี และให้อาหารได้ตรงกับปริมาณกุ้งที่มีอยู่จริง ถ้าให้อาหารที่มากเกินไปกุ้งจะกินไม่หมด ทำให้เกิดการสะสมของเศษอาหารเป็นสาเหตุให้น้ำในบ่อเกิดการเน่าเสียได้

2.2.3. คุณภาพน้ำสำหรับการเลี้ยงกุ้ง

คุณภาพน้ำเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (ตารางที่ 2.2) ถ้าหากมีการจัดการคุณภาพน้ำไม่ดีพอ กุ้งจะกินอาหารได้น้อยลง ติดโรคได้ง่าย และอาจจะมีอัตราการอดตาย (Boyd and Fast, 1992) ผลผลิตกุ้งในบ่อจึงถูกจำกัดโดยความเสื่อมโทรมของคุณภาพน้ำ (Boyd, 1989) คุณภาพของน้ำขึ้นอยู่กับ

1. ความเค็ม ควรอยู่ในช่วง 15-30 ส่วนในพันส่วน (ppt) ตลอดปี ในฤดูร้อนจะมีปัญหาเกี่ยวกับการเจริญของกุ้ง คือน้ำที่มีความเค็มสูงจะจำกัดอาหารธรรมชาติของกุ้งซึ่งเป็นแพลงค์ตอน ถ้าระดับน้ำมีความเค็มต่ำๆ ก็สร้างปัญหาได้เช่นกันคือเชื้อโรคจำพวกแบคทีเรีย โปรโตซัวจะเจริญได้ง่ายและสภาพก้นบ่อจะเสียเร็ว

กุ้งกุลาดำสามารถดำรงชีพและเจริญเติบโตได้ดีที่ความเค็มต่ำกว่า 15 ส่วนในพันส่วน (Boyd, 1987) และยังสามารถทนทานอยู่ในน้ำจืดได้ประมาณ 1 เดือน (Boyd, 1989) โดยความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำมากที่สุดที่อยู่ระหว่าง 10—15 ส่วนในพันส่วน

2. ความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำ ควรจะอยู่ในช่วง 7.5-8.5 ค่าพีเอชจะเปลี่ยนแปลงเนื่องจากแอมโมเนียที่อยู่ในน้ำ ถ้ามีแอมโมเนียสูงพีเอชจะเป็นค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นพิษต่อกุ้งโดยตรงทำให้กุ้งอ่อนแอ ในเวลากลางวันแพลงค์ตอนจะใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้พีเอชของน้ำสูงขึ้น เมื่อถึงเวลากลางคืนแพลงค์ตอนไม่ใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แต่สิ่งมีชีวิตต่างๆจะหายใจแล้วปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ก๊าซนี้ทำปฏิกิริยากับคาร์บอนตและน้ำกลายเป็นไบคาร์บอนเนตทำให้น้ำมีค่าพีเอชลดลง การแก้ไขคือการใส่วัสดุปูนต่างๆ เพื่อปรับค่าพีเอชให้

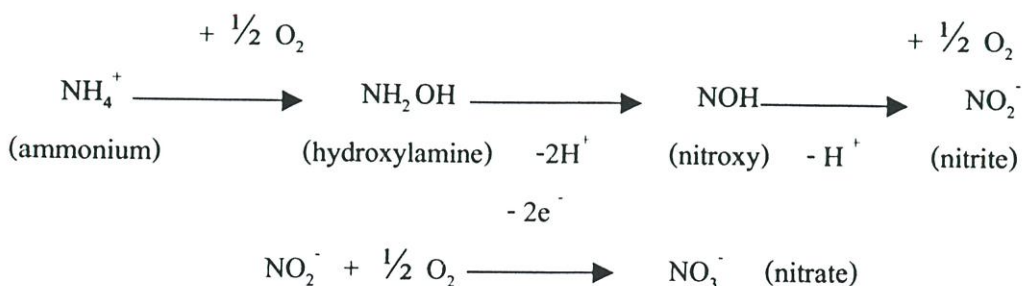
เหมาะสม Chiang *et al.* (1989) รายงานว่าระดับพีเอชที่เหมาะสมที่สุดสำหรับกุ้งกุลาค่าอยู่ระหว่าง 7.3 – 8.8

3. อุณหภูมิของน้ำ มีผลอย่างยิ่งในการลอกคราบและการกินอาหารของกุ้ง อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของกุ้งควรอยู่ในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงกว่านี้จะทำให้กุ้งซ็อก และถ้าน้ำเย็นเกินไปคือต่ำกว่า 24 องศาเซลเซียสจะทำให้อัตราการลอกคราบของกุ้งช้า กุ้งจะหยุดการเจริญเติบโต กินอาหารน้อยลง ไม่ว่ายน้ำและฝังตัวอยู่กับบ่อ Boyd and Fast (1992) พบว่าโดยทั่วไปกุ้งสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิระหว่าง 25 - 30 องศาเซลเซียส กุ้งบางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียสเล็กน้อย แต่ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่ากุ้งจะตาย

4. ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ เป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดของคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยง การละลายของออกซิเจนจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของน้ำ ความกดอากาศและความเค็ม การละลายของออกซิเจนจะลดลงเมื่ออุณหภูมิของน้ำสูงขึ้น โดยทั่วไปปริมาณออกซิเจนจะมีค่าต่ำสุดในช่วงเช้ามืด ส่วนเวลากลางวันการสังเคราะห์แสงจะทำให้ปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้นและสูงสุดในตอนบ่าย ในเวลากลางคืนการสังเคราะห์แสงจะหยุดแต่มีการหายใจโดยสิ่งมีชีวิตในบ่อต้องการออกซิเจน จึงทำให้ปริมาณออกซิเจนลดต่ำลง ในการเลี้ยงกุ้งปริมาณออกซิเจนไม่ควรต่ำกว่า 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าต่ำกว่านี้จะทำให้กุ้งอ่อนแอและตาย โดยเฉพาะกุ้งที่กำลังลอกคราบใหม่ เพราะกุ้งในช่วงนี้ต้องการออกซิเจนมากกว่าปกติ

5. แอมโมเนีย แอมโมเนียในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้น เกิดจากผลพลอยได้ของกระบวนการเมแทบอลิซึมของสัตว์น้ำ และการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยแบคทีเรีย (Boyd, 1989) เนื่องจากในอาหารเลี้ยงกุ้งมีปริมาณไนโตรเจนสูง ในโตรเจนเหล่านี้จะถูกขับถ่ายออกมาประมาณ 13 - 32 เปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนทั้งหมดที่กุ้งบริโภคเข้าไปและไนโตรเจนที่ขับถ่ายออกมานี้ 40 - 90 เปอร์เซ็นต์ หรือประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ จะอยู่ในรูปของแอมโมเนีย (Parry, 1960) ซึ่งกุ้งทะเลจะขับถ่ายสารประกอบไนโตรเจนออกมาภายใน 4 - 8 ชั่วโมง ภายหลังจากกินอาหาร (Wasbort *et al.* 1989)

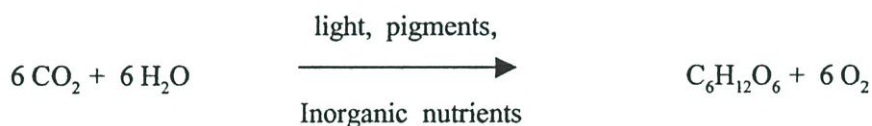
6. ไนไตรต์ แอมโมเนียที่เกิดขึ้นจะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นไนไตรต์ (NO_2^-) และสุดท้ายก็ถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็นไนเตรต (NO_3^-) โดยกระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification) (Stevenson, 1986)



ไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงกุ้งโดยทั่วไปมีความเข้มข้นไม่สูงพอที่จะนำกุ้งได้ (Boyd and Fast. 1992) แต่ในสถานะที่มีออกซิเจนจำกัดไนโตรเจนจะเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ โดยเปลี่ยนฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ในเม็ดเลือดไปเป็นเมทีโมโกลบิน (methemoglobin) ซึ่งไม่สามารถนำพาออกซิเจนได้ ทำให้สัตว์น้ำตายในที่สุด (Wetzel. 1975) จากการทดลองความเป็นพิษของไนโตรเจนต่อลูกกุ้งกุลาดำขนาด 1.36 เซนติเมตร พบว่ามีระดับความเข้มข้นที่ปลอดภัยเท่ากับ 0.41 มิลลิกรัมต่อลิตร (Tookwinas. 1986)

7. ธาตุอาหารพืช ธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับแพลงก์ตอนพืช ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส คลอไรด์ โบรอน โมลิบดีนัม แคลเซียม แมกนีเซียม โซเดียม โพแทสเซียม สังกะสี ทองแดง เหล็ก และแมงกานีส แต่เพียงเฉพาะไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเท่านั้นที่เป็นปัจจัยในการจำกัดการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชในแหล่งน้ำ เพราะเมื่อเทียบกับความต้องการของแพลงก์ตอนพืชแล้ว ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจะมีอยู่จำกัดกว่าธาตุอื่นๆ (Boyd. 1989)

8. แพลงก์ตอนพืช เป็นปัจจัยสำคัญในการทำให้เกิดความขุ่นของน้ำ รวมทั้งเป็นผลผลิตเบื้องต้นของระบบห่วงโซ่อาหาร เพิ่มปริมาณออกซิเจนละลายในแหล่งน้ำและดูดซึมสารอันตรายต่างๆ ในแหล่งน้ำแพลงก์ตอนพืชจะใช้ธาตุอาหารและแสงแดดผลิตสารอินทรีย์โดยกระบวนการสังเคราะห์แสง ดังสมการต่อไปนี้ (Boyd. 1989)



ถ้าในบ่อเลี้ยงกุ้งมีปริมาณแพลงก์ตอนพืชหนาแน่นมากเกินไป จะทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงและการหายใจเกิดขึ้นสูง อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดเป็นด่างในรอบวันในช่วงกว้าง และเมื่อแพลงก์ตอนบางส่วนตายลงจะเกิดการเน่าเปื่อย ทำให้ความต้องการออกซิเจนของบ่อเลี้ยงกุ้งมีเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์และแอมโมเนียออกมา ซึ่งจะเป็นอันตรายต่อกุ้งที่เลี้ยงได้

9. ความขุ่น สารแขวนลอยต่างๆในน้ำ ได้แก่ อนุภาคตะกอนขนาดเล็ก ซากพืชซากสัตว์ เศษอาหาร แพลงก์ตอน แบคทีเรีย รา และสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กอื่นๆ เป็นองค์ประกอบที่ทำให้น้ำมีความขุ่น แต่ในบ่อเลี้ยงกุ้งโดยทั่วไปความขุ่นของน้ำจะเกิดจากปัจจัยพื้นฐานสำคัญ 2 ประการ คือ การเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของแพลงก์ตอนพืช และอนุภาคดินแขวนลอย (Boyd. 1989) ความขุ่นของน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งสามารถวัดได้ด้วยวิธีการง่ายๆ โดยการใช้แผ่นวงกลมวัดความโปร่งแสง (secchi disc) ซึ่งความโปร่งแสงที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำนั้นควรอยู่

ระหว่าง 30—40 เซนติเมตร สำหรับน้ำที่เป็นสีเขียว และ 35—45 เซนติเมตร สำหรับน้ำที่เป็นสีน้ำตาล

10. ไม่มีสารพิษต่างๆ เช่น ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช ตลอดจนก๊าซพิษที่ทำอันตรายต่อกุ้ง เช่น แอมโมเนีย (NH_3) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S)

ตารางที่ 2.2 ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

ปัจจัย	ค่ามาตรฐาน
อุณหภูมิ	อยู่ระหว่าง 28-30 องศาเซลเซียส
ความโปร่งแสง	อยู่ระหว่าง 35-50 เซนติเมตร
ความเค็ม	อยู่ระหว่าง 15-25 ส่วนในพันส่วน (ppt)
ออกซิเจนละลายน้ำ	อยู่ระหว่าง 5.0-7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm)
ความเป็นกรดเป็นด่าง	อยู่ระหว่าง 7.5-8.3
ความเป็นด่าง	อยู่ระหว่าง 100-150 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm)
แอมโมเนีย	ไม่สูงกว่า 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm)
ไนไตรต์	ไม่สูงกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm)
ไนเตรต	อยู่ระหว่าง 0.01-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm)
ไฮโดรเจนซัลไฟด์	ไม่สูงกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm)
ค่า B.O.D	ไม่สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm)

ที่มา: โสภณ อ่อนคง (2542)

2.3 การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในเขตพื้นที่น้ำจืด

2.3.1 รูปแบบการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในเขตพื้นที่น้ำจืด

จากการศึกษาของชวนพิศ สิทธิมงคลและคณะ (2539) พบว่าการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในเขตพื้นที่น้ำจืดของเกษตรกร สามารถจำแนกออกได้เป็น 3 รูปแบบ ดังนี้

1. การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในพื้นที่ดินจืดด้วยน้ำทะเล ผู้เลี้ยงจะชื้อน้ำทะเลซึ่งโดยมากจะเป็นน้ำจากนาเกลือที่มีความเค็มประมาณ 200 - 300 ส่วนในพันส่วน มาผสมกับน้ำจืดเพื่อให้ความเค็มลดลงและสามารถใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำได้ โดยมีความเค็มเริ่มต้นที่ระดับ 5 - 7 ส่วนในพันส่วน ในระหว่างการเลี้ยงมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำและ/หรือเติมน้ำจืดหรือน้ำทะเลเพิ่มเป็นระยะๆ โดยพิจารณาจากความเค็มของน้ำที่ตรวจสอบและกุ้งสามารถมีชีวิตอยู่ได้ ระยะเวลาการเลี้ยงประมาณ 3.5 - 4 เดือน

2. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในพื้นที่ดินจืดด้วยการเติมเกลือ ผู้เลี้ยงจะใส่เกลือลงผสมกับน้ำจืดในบ่อเลี้ยงให้ได้ความเค็มเริ่มต้นที่ระดับ 5—7 ส่วนในพันส่วน ในระหว่างการเลี้ยงมีการเปลี่ยนถ่ายและ/หรือเติมน้ำจืดหรือน้ำทะเลเพิ่มเป็นระยะๆ ระยะเวลาการเลี้ยงประมาณ 3.5 - 4 เดือน

3. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในพื้นที่ดินเค็ม อาจมีน้ำกร่อยเข้าถึงบ้างในบางระยะเวลาและบางสถานที่ โดยในบางเดือนจะเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยน้ำจืดและให้ความเค็มที่มีอยู่ในดินละลายออกมาอยู่ในน้ำทำให้สามารถใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำได้ สำหรับบางเดือนที่มีน้ำกร่อยเข้าถึงก็จะเลี้ยงด้วยน้ำกร่อย โดยพิจารณาความเค็มของน้ำเป็นหลักในการเปลี่ยนถ่ายน้ำและ/หรือเติมน้ำตามความเหมาะสม ระยะเวลาการเลี้ยงประมาณ 3.5 - 4 เดือน

2.3.2 ผลกระทบที่อาจจะเกิดขึ้นจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในเขตพื้นที่น้ำจืด

ปัญหาสำคัญของการเลี้ยงกุ้งทะเลในเขตพื้นที่น้ำจืด คือ การแพร่กระจายของเกลือและของเสียจากฟาร์มกุ้งออกสู่สิ่งแวดล้อมซึ่งผลกระทบที่อาจจะเกิดขึ้น สิริ ทุกข์วินาศและคณะ (2540) ได้สรุปไว้ดังนี้

1. ความเค็มและไอออนจากบ่อเลี้ยงกุ้งสามารถรุกเข้าสู่คลองน้ำจืด ดินและน้ำใต้ดิน ซึ่งอาจจะส่งผลกระทบโดยตรงต่อการบริโภคน้ำจืด และพื้นที่เกษตรกรรม
2. น้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งจะประกอบด้วยสารอินทรีย์ในปริมาณสูง ซึ่งสามารถส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้
3. หลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต ตะกอนที่สะสมอยู่บนก้นบ่ออาจถูกสูบลงสู่คลองน้ำจืดและพื้นที่การเกษตร ซึ่งอาจมีผลกระทบจากไอออนและของเสียที่อยู่ในตะกอน
4. โรคจากบ่อเลี้ยงกุ้งสามารถระบาดออกสู่ระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดอื่นๆ ในพื้นที่ใกล้เคียงได้

2.4 มลภาวะและแนวทางแก้ปัญหามลภาวะที่เกิดในบ่อเลี้ยงกุ้ง

ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งกุลาดำประสบปัญหาต่างๆ มากมาย เช่น เลี้ยงกุ้งไม่โตและกุ้งเป็นโรค สาเหตุส่วนใหญ่เนื่องมาจากมลพิษทางน้ำ ตลอดจนสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม ปัญหาสำคัญเกิดจากการที่น้ำที่ใช้เลี้ยงเกิดการเน่าเสีย เนื่องจากมีการเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่นทำให้มีการสะสมของสารอินทรีย์ต่างๆ ส่งผลกระทบไปสู่แหล่งน้ำและสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก (เปรมสุดา สมาน. 2539) ของเสียที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นปัญหารุนแรงปัญหาหนึ่งในการทำฟาร์มเลี้ยงสัตว์สารอินทรีย์ที่ตกค้างภายในบ่อจะเกิดการเน่าเสีย ทำให้สภาพน้ำไม่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง (Taiganides. 1967) สารอินทรีย์ที่เป็นของเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งเกิดจากเศษอาหารที่เหลือจาก

การกินของกุ้ง สิ่งขับถ่ายของกุ้ง ซากสิ่งมีชีวิตต่างๆที่ตายอยู่ในน้ำและตะกอนต่างๆที่ติดกับน้ำ แต่ที่เป็นสารอินทรีย์มากที่สุดคืออาหารที่กุ้งกินเหลือ เพราะปัจจุบันมีการเลี้ยงกุ้งอย่างหนาแน่น ต้องใช้อาหารมากตามจำนวนกุ้ง ทำให้มีโอกาสมันจะมีอาหารตกค้างภายในบ่อเกิดขึ้นจำนวนมาก อาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งมีส่วนประกอบของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในปริมาณสูง (Degain and Gallagher. 1985) พบว่ามีรายงานว่าประมาณ 88 เปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนที่เข้าไปสู่บ่อกุ้งนั้น มาจากอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้ง (Wang. 1990) และไนโตรเจนเหล่านี้จะถูกขับถ่ายออกมาประมาณ 13-32 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่กุ้งบริโภคเข้าไปจะขับถ่ายออกมาในรูปแอมโมเนียถึงประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ (Wickins. 1985) นอกจากนี้อาหารที่เหลือตกค้างที่พื้นบ่อจะเพิ่มปริมาณตามปริมาณอาหารที่ให้ ซึ่งทำให้ปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในดินเพิ่มขึ้นตามไปด้วย

ของเสียที่เกิดขึ้นภายในบ่อเลี้ยงกุ้งประกอบด้วย 2 ส่วนใหญ่ๆ ส่วนแรกคือตะกอนเลน ก้นบ่อ และส่วนที่สองคือน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยง ดินเลนหรือตะกอนเลนก้นบ่อนิยมกำจัดออกโดยการฉีดเลน โดยใช้แรงของน้ำดันเลนออกทางประตูระบายน้ำสู่แหล่งน้ำภายนอกหรือแยกเก็บไว้ในร่องเลนต่างหาก ส่วนที่สองคือน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงส่วนใหญ่ประกอบด้วย แพลงก์ตอนพืช ชาติอาหาร และตะกอนแขวนลอยต่างๆ ในการปรับสภาพน้ำมักแก้ไขโดยการเปลี่ยนถ่ายน้ำให้มากขึ้น มีการใช้วัสดุปูน ยามาเชื้อโรค หรือสารเคมีต่างๆ เพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำ หากขาดการจัดการและการดูแลอย่างเหมาะสมจะก่อให้เกิดการตกค้างของสารเคมีต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้สารปฏิชีวนะเพื่อฆ่าเชื้อโรคในบ่อกุ้ง เช่น ออกซิเตตราซัยคลิน ออกโซลินิกแอซิด ไนโตรฟราไซน มาลาไคท์กรีน และคลอแรมฟินิคอล ถ้าใช้ไม่ถูกวิธีจะทำให้เกิดการตกค้างในเนื้อกุ้งซึ่งจะเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค นอกจากนี้การปล่อยอินทรีย์สารลงในแหล่งน้ำ จะทำให้แพลงค์ตอนเจริญอย่างรวดเร็วซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อการเพาะเลี้ยงกุ้ง (เปรมสุภา สมาน. 2539)

เมื่อพิจารณาถึงสารอินทรีย์ที่อยู่ในบ่อกุ้ง พบว่าสารอินทรีย์เหล่านั้นสามารถถูกย่อยสลายโดยกระบวนการทำงานของจุลินทรีย์ได้ โดยจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายกลุ่มใหญ่จะเป็นแบคทีเรีย ยีสต์ และราเป็นกลุ่มที่มีความสามารถลงมา (Horan. 1990)

2.5 สารอินทรีย์

สารอินทรีย์ที่อยู่บนโลกส่วนใหญ่เกิดจากสิ่งมีชีวิตที่อยู่บนบกและในน้ำ สารอินทรีย์เหล่านี้มีธาตุที่เป็นองค์ประกอบสำคัญ คือ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน และสารอื่นๆ Pierce and Felbeck (1972) ได้จำแนกสารอินทรีย์ในน้ำและในดินออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. Non humic substance ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ซึ่งจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว

2. Humic substance ได้แก่ ซากพืช ซากสัตว์ ซึ่งจุลินทรีย์ย่อยสลายได้ช้ากว่า

2.5.1 การสลายตัวของสารอินทรีย์

การสลายตัวของสารอินทรีย์ในดินที่มีการถ่ายเทอากาศได้ดี (aerobic condition) มักมีสาร Intermediate Product เกิดขึ้นเสมอ สารที่เกิดขึ้น ได้แก่ กรดต่างๆ และแอลกอฮอล์จะสะสมอยู่ไม่นานและจะถูกสลายต่อโดยจุลินทรีย์ ส่วนดินที่มีการถ่ายเทอากาศไม่ดี (anaerobic condition) สารอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากการสลายจะสะสมอยู่เป็นเวลานาน ได้แก่ กรดแอสिटิก กรดฟอร์มิก และสารอินทรีย์ง่ายๆ (simple organic) ตัวอื่นๆ (สมศักดิ์ วังใน. 2528)

ความยากง่ายของการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีองค์ประกอบทางเคมีต่างกันนั้น จุลินทรีย์ในดินจะย่อยสลายน้ำตาล แป้งและโปรตีนในอัตราเร็ว และย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสในอัตราปานกลาง ส่วนการย่อยสลายเซลลูโลส ลิกนิน และไขมัน จะถูกย่อยสลายในอัตราที่ช้า (สมเจตน์ จันทวัฒน์และคณะ. 2526) ปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่ควบคุมการสลายตัวของสารอินทรีย์ ได้แก่

1. การถ่ายเทอากาศในดิน การสลายตัวของสารอินทรีย์ถ้าเกิดในสภาพที่มีอากาศเพียงพอ เช่น ดินที่มีอากาศถ่ายเทได้ดี การย่อยสลายจะค่อนข้างสมบูรณ์ องค์ประกอบที่สลายตัวได้ง่ายจะถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Waksman. 1952) แต่ในทางกลับกันถ้าการสลายตัวเป็นไปในสภาพที่มีอากาศไม่เพียงพอ นอกจากการย่อยสลายจะให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แล้วยังมีสารประกอบพวกกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลกติก กรดแอสिटิก กรดบิวไทริก และเกิด intermediate อื่นๆเกิดขึ้นด้วย (สมเจตน์ จันทวัฒน์และคณะ. 2526) การถ่ายเทอากาศในดินควบคุมอัตราการสลายตัวโดยตรงเพราะจุลินทรีย์จะใช้ออกซิเจนที่มีอยู่ในดินเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ถ้าดินมีออกซิเจนจำกัด เช่น ดินที่มีน้ำขังจะมีอัตราการย่อยสลายของสารอินทรีย์ช้าลงและไม่สมบูรณ์ (Alexander. 1961)

2. ความชื้น การสลายตัวของสารอินทรีย์จะดีขึ้นเมื่อดินมีความชื้นสูงในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงพอ แต่ถ้ามีความชื้นมากเกินไปการสลายตัวจะเกิดขึ้นไม่ดีเพราะดินที่มีความชื้นสูงย่อมมีออกซิเจนที่ละลายอยู่น้อยลงไป การย่อยสลายของสารอินทรีย์เกิดขึ้นเร็วสุดเมื่อดินมีความชื้น 60—80 W.H.C. (Water Holding Capacity of the Soil) (สมศักดิ์ วังใน. 2528)

3. อุณหภูมิ ที่อุณหภูมิต่ำการทำงานของจุลินทรีย์จะช้ากว่าที่อุณหภูมิสูง การสลายตัวของสารอินทรีย์เกิดขึ้นได้ดีที่อุณหภูมิ 30—40 องศาเซลเซียส (สมศักดิ์ วังใน. 2528)

4. พีเอช (ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง) จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอินทรีย์ต้องการค่าพีเอชที่เหมาะสม แบคทีเรียสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดีในสภาพที่เป็นกรดอ่อนและเป็นกลาง (สมเจตน์ จันทวัฒน์และคณะ. 2526)

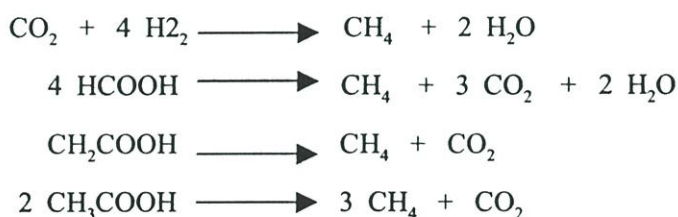
5. อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจนในสารอินทรีย์กลุ่มต่างๆ สารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนน้อยจะเกิดการสลายที่ค่อนข้างช้า ยกเว้นรอบๆข้างนั้นมีสารอินทรีย์ในโตรเจนสูงอยู่ (Boyd. 1989)

2.5.2 การย่อยสลายสารอินทรีย์

การย่อยสลายสารอินทรีย์เกิดขึ้นจากการกระทำของจุลินทรีย์ในดินซึ่งได้แก่ แบคทีเรีย รา และสาหร่ายเซลล์เดียว แต่ส่วนใหญ่เป็นกิจกรรมของแบคทีเรีย (สมศักดิ์ วังใน. 2528) การสลายตัวของสารอินทรีย์ที่มีอนุภาคเล็กจะเกิดขึ้นก่อนสารอินทรีย์ที่มีอนุภาคใหญ่ สารอินทรีย์กลุ่มน้ำตาล โปรตีน และไขมัน จะย่อยสลายได้เร็วกว่าสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลซับซ้อน เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน แทนนิน (Boyd. 1989) ยอคยง เทพธรรานนท์(2533) ได้แบ่งการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยแบคทีเรียซึ่งรวมทั้งของเสียในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ เป็น 2 กรณีคือการย่อยสลายโดยแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน (aerobic condition) และการย่อยสลายโดยแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic condition) การย่อยสลายสารอินทรีย์โดยแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนจะเกิดขึ้นเมื่อมีปริมาณออกซิเจนในน้ำเพียงพอ ส่วนการย่อยสลายโดยแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนจะเกิดขึ้นเมื่อน้ำขาดออกซิเจนหรือในน้ำมีออกซิเจนต่ำ

2.5.3 ผลที่ได้จากการสลายตัวของสารอินทรีย์

ในการสลายตัวของสารอินทรีย์ในสภาวะที่มีอากาศเพียงพอ เช่น ในดินที่มีการถ่ายเทอากาศได้ดี สารอินทรีย์จะถูกพวก Hetero-aerobe ย่อยสลาย ผลที่ได้คือ คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ ฮิวมัสและสารอื่นๆ ส่วนการย่อยสลายที่เกิดในสภาวะที่มีอากาศถ่ายเทไม่ดี เช่น สภาพน้ำขัง ผลที่ได้มีสาร Intermediate Product เพิ่มมากขึ้น (สมเจตน์ จันทวัฒน์และคณะ. 2526) ก๊าซมีเทน (CH_4) อาจถูกปลดปล่อยออกมาได้จากการย่อยสลายของสารอินทรีย์ที่เกิดขึ้นในสภาวะที่มีอากาศไม่เพียงพอ (ยอคยง เทพธรรานนท์. 2533) การปลดปล่อยก๊าซมีเทนจากการสลายตัวของสารอินทรีย์อย่างน้อยต้องมีจุลินทรีย์ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกจะย่อยสลายสารอินทรีย์เป็นกรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์ กลุ่มที่ 2 จะเปลี่ยนจากกรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์เป็นก๊าซมีเทน ดังสมการ (สมศักดิ์ วังใน. 2528)



2.5.4 สารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้ง

สารอินทรีย์ที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้งส่วนมากเป็นสารประกอบอินทรีย์ ไนโตรเจนและคาร์บอนแหล่งของสารอินทรีย์ที่สำคัญในบ่อเลี้ยงกุ้งมาจากสารแขวนลอยในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งตามธรรมชาติ พบว่าส่วนใหญ่มาจากอาหารที่กุ้งกินเหลือและของเสียที่กุ้งขับถ่ายออกมา (ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ์.

2531) เนื่องจากอาหารกุ้งประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 35-45 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรตประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ ไขมันประมาณ 6-9 เปอร์เซ็นต์ และเส้นใยประมาณ 3.5 เปอร์เซ็นต์ (มะลิ บุญขจรตผลิน. 2531) และยังพบว่ามากกว่า 14 เปอร์เซ็นต์ของสารประกอบอินทรีย์ในโตรเจนในน้ำเกิดจากการขับถ่ายของสัตว์น้ำ โดยเฉพาะพวก Crustaceans สามารถขับถ่ายของเสียออกมาในรูปของแอมโมเนีย และกรดอะมิโนบางชนิด (Colwell and Morita. 1974)

2.6 จุลินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

การดำรงชีวิตของแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงกุ้งมีทั้งที่เป็นออโตโทรปและเฮเทอโรโทรป แต่แบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรปจะมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดีที่สุด เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ต้องอาศัยสารอินทรีย์เป็นแหล่งของพลังงานและคาร์บอน จึงทำให้แบคทีเรียพวกนี้เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดการเน่าเปื่อยสลายสารอินทรีย์ให้เป็นสารอนินทรีย์ Pike (1975) รายงานว่าประมาณ 90—95 เปอร์เซ็นต์ ของแบคทีเรียที่พบในบ่อเพาะเลี้ยงที่มีสภาพเป็น aerobic pond จะเป็นแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp. และ *Achromobacter* sp.

ศุภชัย ประพัศพร (2538) รายงานว่าแบคทีเรียที่พบในดินพื้นบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., และ *Vibrio* sp. และการเก็บตัวอย่างดินในช่วงก่อนปล่อยกุ้ง หลังปล่อยกุ้ง กุ้งอายุ 1, 2, 3, 4 เดือน และหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต พบแบคทีเรียทั้งหมดเป็นจำนวน 8.2×10^7 , 1.3×10^8 , 2.3×10^8 , 1.6×10^9 , 1.2×10^9 และ 2.7×10^7 เซลล์ต่อกรัมตามลำดับ

2.6.1 การใช้ Probiotic กับการเลี้ยงสัตว์น้ำ

Probiotic คือกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อเข้าไปอยู่ในระบบของร่างกายมนุษย์และสัตว์แล้วจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ได้จากการค้นพบโดย Elie Metchnikoff นักวิทยาศาสตร์ชาวรัสเซีย และจากการค้นพบครั้งนี้ทำให้เขาได้รับรางวัลโนเบลในปี ค.ศ. 1988 นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์กลุ่มนี้ที่ตายแล้วหรือองค์ประกอบบางส่วนของเซลล์จุลินทรีย์มาประยุกต์ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพสำหรับมนุษย์และสัตว์ ทำให้มีคำจำกัดความของ Probiotic ครอบคลุมถึงจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต (Salminen *et al.* 1999)

นอกจากนี้ Probiotic ยังจัดเป็นการใช้จุลินทรีย์เพื่อเสริมการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกันให้แก่กุ้ง หลักการของ Probiotic คือการใช้จุลินทรีย์เสริมในอาหารสัตว์เพื่อให้เกิด

สมดุลในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งปกติจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้มีทั้งดีและไม่ดีต่อตัวกุ้ง เมื่อมีการเสียสมดุลและมีแบคทีเรียที่ไม่ดีมีปริมาณมากกว่าจะทำให้กุ้งเกิดโรค จุลินทรีย์เหล่านี้บางชนิดสามารถสร้างสารบางอย่างเพื่อถูกดูดซึมเข้าสู่ตัวกุ้งและกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้มากขึ้น บางชนิดก็ไปแย่งอาหารจากจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในตับและลำไส้กุ้ง กันไม่ให้จุลินทรีย์ที่ร้ายแรงเกาะติดผนังลำไส้และตับได้ มีผลทำให้เกิดความสมดุลในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ชนิดนั้น จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็น Probiotic มีหลายชนิด เช่น *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp., ยีสต์ และเชื้อราบางชนิด เป็นต้น บางชนิดสามารถทำลายจุลินทรีย์หรือไวรัสที่ร้ายแรงได้ (วลัยพร ทิมบุญธรรม. 2544)

จุลินทรีย์มีคุณสมบัติในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่พื้นบ่อและมีความสามารถในการแย่งอาหารและที่อยู่รวมทั้งปริมาณออกซิเจนจากแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค (pathogenic bacteria) ที่มีการใช้ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เช่น *Bacillus subtilis* ซึ่งมีหลักการทำงาน 2 แบบ (นิรนาม. 2538)

1. ก่อให้เกิดขบวนการ Competitive exclusions คือการใช้จุลินทรีย์ที่ไม่เป็นโทษและมีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วและเข้าไปแย่งพื้นที่ แย่งอาหารรวมถึงปริมาณออกซิเจนจากแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค (pathogen)

2. ก่อให้เกิดกระบวนการ Colonization หรือ Ectoprobiotic คือการสร้างกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นโทษเคลือบหรือสร้างเกราะปกคลุมเนื้อเยื่อผิวกุ้งรวมถึงปกคลุมในทางเดินอาหารด้วย ป้องกันไม่ให้แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค (pathogenic bacteria) เข้าทำอันตรายได้ง่าย

Moriarty *et al.* (1997) รายงานการใช้ Probiotic กับเชื้อโรคที่ทำให้เกิดโรค Vibriosis ที่พบมากในทางเดินอาหารของกุ้งโดยใช้แบคทีเรีย *Bacillus* ทำการเปรียบเทียบระหว่างฟาร์มที่มีการใช้กับไม่ใช้แบคทีเรีย พบว่าฟาร์มที่ไม่ใช้แบคทีเรีย *Bacillus* ส่วนใหญ่จะประสบความล้มเหลวในการเลี้ยงหลังจากเลี้ยงได้ประมาณ 80 วัน ในขณะที่ฟาร์มที่ใช้แบคทีเรีย *Bacillus* ทำการเลี้ยงนานกว่า 160 วันไม่พบปัญหาตลอดการเลี้ยง และปริมาณ *Vibrio harveyi* ในน้ำลดลง

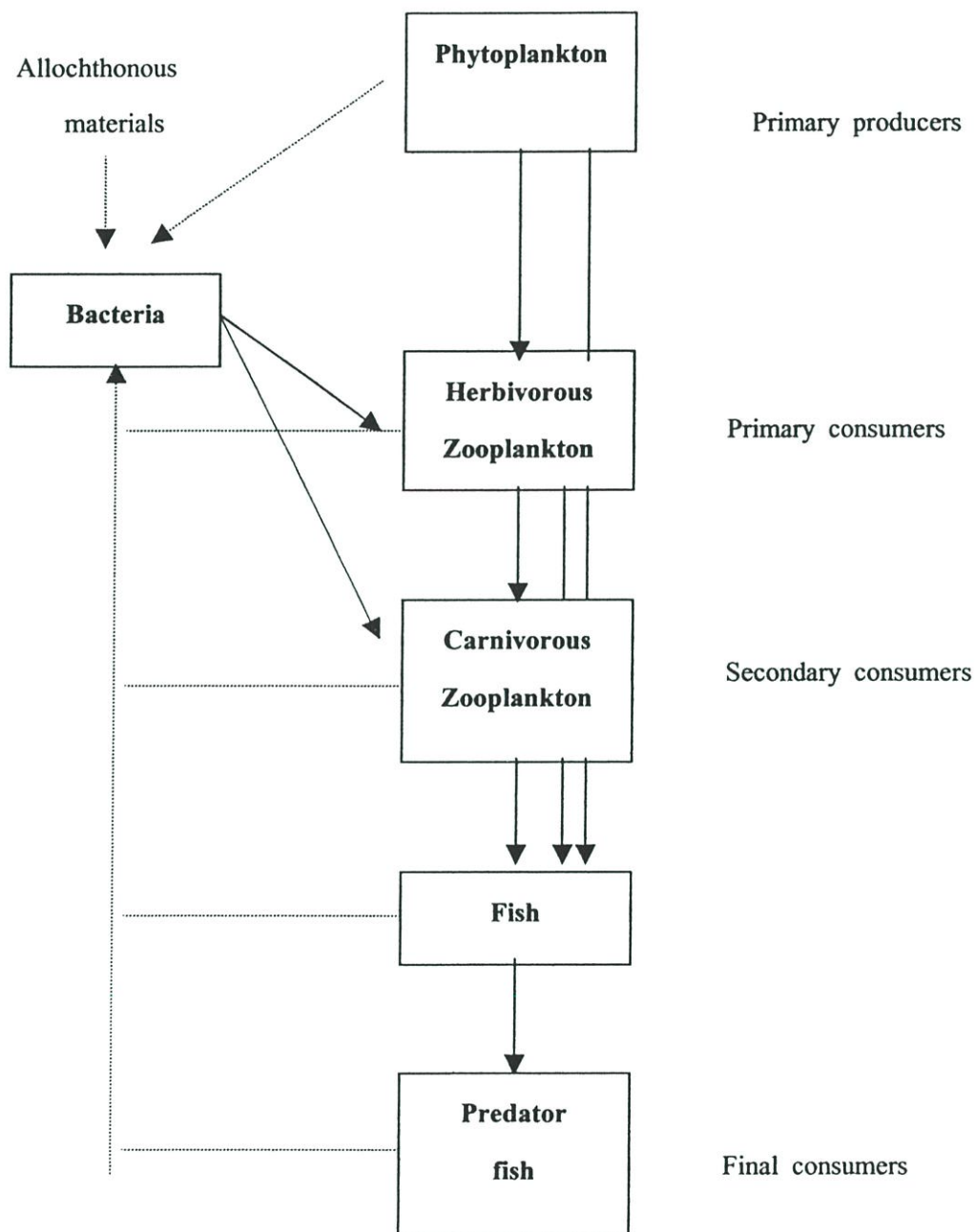
Phianphak *et al.* (1997) ทำการทดลองโดยนำ *Bacillus* มาผสมกับอาหารกุ้งเพื่อใช้เป็น Probiotic ให้ลูกกุ้งกุลาดำกินในอัตราส่วนต่างๆกัน พบว่าลูกกุ้งที่ได้รับ Probiotic มีอัตราการรอดตายจากโรคที่เกิดโดย *Vibrio harveyi* สูงถึงร้อยละ 100 โดยกุ้งทดลองมีสุขภาพแข็งแรงและเจริญเติบโตได้ดี ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดตายเพียงร้อยละ 26 และมีอาการผิดปกติในตับ ตับอ่อน และลำไส้

2.6.2 การใช้จุลินทรีย์ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำ

คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีผลต่อการอยู่รอดและอัตราการเติบโตของกุ้งกุลาดำและที่สำคัญการเลี้ยงกุ้งในปัจจุบันเป็นการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาที่มีการเลี้ยงแบบหนาแน่น และมีการให้อาหารเม็ดที่มีโปรตีนสูงทำให้มีการสะสมของสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำมากและมีผลต่อคุณสมบัติของน้ำด้านอื่นๆ ทำให้กุ้งเกิดความเครียดและหากไม่สามารถควบคุมได้จะทำให้กุ้งอ่อนแอและติดเชื้อโรคในที่สุด สารอินทรีย์ในแหล่งน้ำมีบทบาทต่อปริมาณแอมโมเนียซึ่งเป็นอันตรายสำหรับกุ้ง ดังนั้นในการลดปริมาณแอมโมเนียคือการควบคุมปริมาณสารอินทรีย์ โดยพยายามให้เกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์อย่างสมบูรณ์ ซึ่งเป็นบทบาทของจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียที่ใช้สารประกอบไนโตรเจนเป็นแหล่งอาหาร ซึ่งโดยทั่วไปแบคทีเรียพวกนี้จะมีอยู่แล้วในบ่อเลี้ยง แต่ปริมาณไม่คงที่อันเนื่องจากการแก่งแย่งปัจจัยต่างๆ จากแบคทีเรียกลุ่มอื่น (Boyd. 1990)

ในการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพมักจะใช้จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ในการย่อยสลายเพราะจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสลายสารได้ต่างกัน ดังนั้นการนำจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์มาใช้ในการบำบัดน้ำเสีย จะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายของเสียในน้ำดีขึ้น จุลินทรีย์ที่อยู่ในน้ำจะย่อยสลายสารอินทรีย์โดยจะสร้างเอนไซม์แล้วปล่อยออกมาย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ เอนไซม์ที่สำคัญมีหลายชนิด เช่น Amylase, Glucose isomerase, Protease, Lipase, Rennet Pectinase และ Glucose oxidase แหล่งในการสร้างเอนไซม์ส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อรา และ *Bacillus* sp. (Staley and Stanley. 1986) โดยเฉพาะ *Bacillus* sp. จะพบในน้ำทะเล น้ำจืด หรือในดินตะกอน มักจะสร้างเอนไซม์ที่มีประโยชน์ในการที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ รวมทั้งอุตสาหกรรมการบำบัดน้ำเสีย (Taylor and Richardson. 1979)

การใช้แบคทีเรียในการปรับปรุงคุณภาพน้ำ จะทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ตรวจพบในบ่อที่ปริมาณเพียงพอหรือเหมาะสมในการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ Boyd *et al.* (1984) ได้รายงานว่าการใช้แบคทีเรียร่วมกับการเลี้ยงสัตว์น้ำ จะทำให้ผลผลิตของสัตว์น้ำมีค่าสูงกว่าบ่อที่ไม่ได้ใช้แบคทีเรียถึง 5 เปอร์เซ็นต์ กล่าวคือการควบคุมปริมาณพืชน้ำไม่ให้มีมากเกินไปจะทำให้ค่าออกซิเจนในบ่อไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก และผลผลิตของแบคทีเรียยังเป็นอาหารของสัตว์น้ำหน้าดินชนิดอื่นๆ ตามห่วงโซ่อาหาร (รูปที่ 2.3) Schroeder (1983) กล่าวว่า การเลี้ยงสัตว์น้ำร่วมชนิดกัน เช่น เลี้ยงปลากับกุ้ง แบคทีเรียจะมีส่วนช่วยให้ห่วงโซ่อาหารสมบูรณ์แบบยั่งยืน จึงเป็นการปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมในการเลี้ยงสัตว์น้ำได้



รูปที่ 2.3 ความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์แบบดุกโซ่อาหารในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ
ที่มา : Rheinheimer (1991)

สมาน กุจิ (2538) ศึกษาการใช้แบคทีเรียในการปรับปรุงคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาค่า โดยใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรีย 2 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยชนิดน้ำเมื่อทำการวิเคราะห์พบเชื้อ *Bacillus licheniformis*, *B. pulmilus* และ *B. thuringiensis* และผลิตภัณฑ์ชนิดผงประกอบด้วย *B. licheniformis*, *B. subtilis* และ *B. sphaericus* โดยทดลองใช้กับกุ้งกุลาค่าขนาด 12.86 กรัม ในตู้กระจกเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ทำการเปรียบเทียบกลุ่มทดลองที่ใช้แบคทีเรียและไม่ใช้แบคทีเรีย พบว่าคุณภาพน้ำด้านต่างๆ ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ แอมโมเนีย ฟิเอช ไนโตรเจน และไฮโดรเจนซัลไฟด์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และให้เหตุผลว่าเป็นเพราะระหว่างการเลี้ยงจะมีการถ่ายน้ำ 5 เปอร์เซ็นต์ทุกวัน จึงทำให้การสะสมของสารอินทรีย์มีปริมาณน้อย บทบาทของจุลินทรีย์จึงไม่แน่ชัด

Pruder (1986) ได้ทดลองใช้จุลินทรีย์ Autotroph และ Heterotroph ปรับปรุงคุณภาพน้ำในโครงการ Sea Grant Aquaculture Plan 1983—1987 Research โดยมีการควบคุมระบบน้ำ การให้อากาศ การให้อาหาร ควบคุมโรค ผลผลิตปลาที่ได้มีปริมาณมากกว่าบ่อที่ไม่ได้ใช้จุลินทรีย์ถึง 6 เท่า ระบบการเพาะเลี้ยงได้มีการพัฒนาเพิ่มมากขึ้นโดยมีการเลี้ยงหอย เช่น หอยนางรมเพื่อเป็นตัวกรองสารอินทรีย์ต่างๆ รวมทั้งสาหร่ายที่มากเกินไป (Wang. 1990)

2.7 การย่อยสลายสารอินทรีย์ของจุลินทรีย์

ทวี จิตไมตรี (2528) ได้กล่าวถึงการย่อยสลายสารอินทรีย์ ซึ่งสามารถแบ่งการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้เป็น 3 ขั้นตอน คือ สารอินทรีย์จะถูกย่อยสลายโดยที่จุลินทรีย์จะสร้างน้ำย่อยขึ้นมาย่อยสลาย ในเวลาเดียวกันจะมีการสร้างเซลล์ใหม่ซึ่งเป็นการเพิ่มโปรตีน พอลิแซ็กคาไรด์ และกรดนิวคลีอิก และสารที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการย่อยสลายจะถูกปลดปล่อยออกมา อาจมีการสะสมหรือมีการย่อยสลายต่อไปอีก

Simon (1985) และ Goulter (1977) พบว่าอนุภาคของสารอินทรีย์ที่แขวนลอยอยู่บริเวณผิวน้ำดินที่มีแบคทีเรียเกาะอยู่จะถูกย่อยสลายได้เร็วกว่าที่อยู่อย่างอิสระ เนื่องจากแบคทีเรียสามารถผลิต exoenzyme ออกมาทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำซึ่งสามารถดูดซึมไปใช้ได้ จึงทำให้ความเข้มข้นของสารอินทรีย์มากที่สุดที่บริเวณผิวดินและจะลดลงเมื่อความลึกของน้ำเพิ่มขึ้น

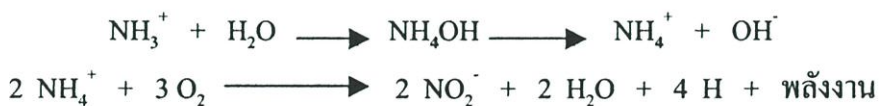
2.7.1 กระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์

จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กและสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ ด้วยเหตุนี้ปัจจุบันจึงได้มีการสนใจที่จะนำจุลินทรีย์มาควบคุมปริมาณสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาค่า กระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำโดยแบคทีเรียมี 4 ขั้นตอนที่สำคัญ (Ehlich *et al.* 1990) ดังนี้

1. การย่อยสลายสารอินทรีย์โดยแบคทีเรียซึ่งจะผลิต extracellular enzyme และปล่อยออกมาออกเซลล์เพื่อทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลใหญ่ให้เป็นโมเลกุลเล็กที่ละลายน้ำได้ ซึ่งแบคทีเรียสามารถนำสารอินทรีย์ในรูปนี้เข้าสู่เซลล์และใช้เป็นอาหารได้ สารอินทรีย์ที่ถูกย่อยสลายนี้จะเปลี่ยนรูปเป็น Carbonaceous BOD, แอมโมเนีย และฟอสเฟต ซึ่งจะเปลี่ยนรูปไปนั้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของสารอินทรีย์ที่ถูกย่อยสลาย เช่น โปรตีนย่อยสลายได้กรดอะมิโนชนิดต่างๆ

2. การแปรสภาพของสารประกอบอินทรีย์ที่ถูกย่อย แบคทีเรียแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ heterotrophic bacteria และ autotrophic bacteria โดยแบคทีเรียชนิด heterotroph จะใช้สารอินทรีย์คาร์บอนจากโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนแบคทีเรียชนิด autotroph จะใช้สารอนินทรีย์คาร์บอน เช่น คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน

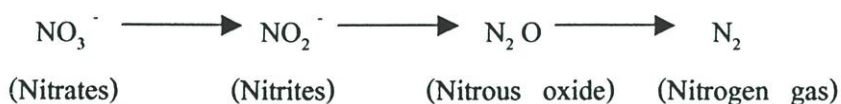
3. การเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียให้เป็นไนเตรตโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ ในกระบวนการนี้ต้องการสภาพที่มีออกซิเจนอย่างเพียงพอ และถ้ามีปริมาณสารอินทรีย์ละลายอยู่ในน้ำที่สูงจะสามารถยับยั้งกระบวนการนี้ได้ (โดยทั่วไปกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นค่า BOD ของน้ำต้องต่ำกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร) กระบวนการไนตริฟิเคชันเป็นการทำงานของ Nitrifying bacteria ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนที่หนึ่ง แอมโมเนียหรือแอมโมเนียมไอออนถูกออกซิไดซ์ไปเป็นไนไตรต์ซึ่งจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ *Nitrosomonas*



ขั้นตอนที่สอง ไนไตรต์เปลี่ยนเป็นไนเตรต โดยจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง เช่น *Nitrobacter*, *Nitrospira*



4. กระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (denitrification) เป็นการเปลี่ยนแปลงไนโตรดให้ เป็นก๊าซไนโตรเจนซึ่งเกิดใสสภาพไม่มีออกซิเจน จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ *Pseudomonas*, *Achromonas*, *Bacillus*, *Micrococcus* และ *Thiobacillus* ดังสมการ



เนื่องจากบทบาทของจุลินทรีย์มีความสำคัญอย่างมากในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ซึ่งเป็นตัวเริ่มต้นในการสร้างก๊าซพิษต่างๆ ที่อาจส่งผลกระทบต่อร้ายแรงกับกุ้งได้ จึงมีการนำจุลินทรีย์มาใช้เพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำในการเลี้ยงให้ดีขึ้น ให้เกิดปริมาณก๊าซพิษมีปริมาณต่ำเพื่อให้เกิดผลกระทบต่อกุ้งน้อยที่สุด

2.7.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์ (เปรมสุดา สมาน. 2539)

1) แหล่งพลังงานและอาหาร (energy and substrate source) สำหรับแหล่งพลังงาน จุลินทรีย์จะได้พลังงานจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบเคมี (chemotroph) หรือได้รับพลังงานจากแสง (phototroph) ดังนั้นจึงสามารถแบ่งจุลินทรีย์โดยอาศัยแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอนเป็นหลักดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	แหล่งพลังงาน ในการสร้าง ATP	แหล่งคาร์บอน ในการสร้างส่วนประกอบของเซลล์
Photoautotroph (Photolithotroph)	แสง (light)	คาร์บอนไดออกไซด์ (CO ₂)
Chemoautotroph (Chemolithotroph)	สารประกอบอนินทรีย์ (inorganic compounds)	คาร์บอนไดออกไซด์ (CO ₂)
Photoheterotroph (Photoorganotroph)	แสง (light)	สารประกอบอินทรีย์ (organic compounds)
Heterotroph (Chemoorganotroph)	สารประกอบอินทรีย์ (organic compounds)	สารประกอบอินทรีย์ (organic compounds)

ที่มา : Grega *et al.* (1994)

2) กระบวนการทำงานของเอนไซม์ (enzymatic processes) จุลินทรีย์ย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ โดยการสร้างเอนไซม์ซึ่งจะปล่อยออกภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อย่อยสลายสารต่างๆ เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ โปรติเอส อะไมเลส และไลเปส

3) ความสามารถในการย่อยสลายอาหาร (substrate biodegradability) ในการย่อยสลายสารนั้นโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบต่างๆ จะมีผลอย่างยิ่งในการย่อยสลาย ถ้าเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างทางเคมีที่จำเพาะและซับซ้อนก็จะทำให้การย่อยสลายเกิดขึ้นได้ยาก (Robert. 1979) เช่นสารประกอบที่เป็นพวกฮาโลเจน (halogen) สารประกอบที่มีหมู่ฮาโลเจนประกอบอยู่มาก (large number of halogens) สารประกอบที่ละลายน้ำได้น้อย (low solubility in water) สารประกอบที่มีหลายพันธะ (highly branched compound) และสารประกอบที่มีประจุแตกต่างกัน (atomic charge difference)

4) ตัวยับยั้งและความเป็นพิษ (inhibitor and toxicity) ภาวะแวดล้อมจะมีผลโดยตรงต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยถ้าระดับพีเอช อุณหภูมิ ความเค็ม ตลอดจนสารเคมีต่างๆ ถ้าอยู่ในภาวะที่ไม่เหมาะสมแล้วการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ ก็จะไม่ดีเท่าที่ควร และอาจทำให้เซลล์จุลินทรีย์ตายได้ Bettina and Kalff (1993) รายงานว่าจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติหรือในทะเล จะมีอัตราการสร้างเซลล์สัมพันธ์กับมวลชีวภาพและปริมาณของจุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอนจากสาหร่าย ความเข้มข้นของฟอสฟอรัส สิ่งมีชีวิตที่กินจุลินทรีย์เป็นอาหาร ตะกอนของสารอินทรีย์ อุณหภูมิ รวมทั้งคลอโรฟิลล์เอ ถ้าอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมจะทำให้การย่อยสลายและการสร้างเซลล์ของจุลินทรีย์เกิดอย่างไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ก็มีผลต่อการย่อยสลาย Zaidi *et al.* (1988) ศึกษาพบว่าในแหล่งน้ำที่มีความเข้มข้นของสารอินทรีย์ต่ำเกินไป จะมีผลต่อการย่อยสลายของสารอินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะไม่สามารถแบ่งตัวแบบทวีคูณได้ ทำให้สารประกอบที่มีอยู่ไม่ถูกย่อยสลายจึงทำให้เซลล์จุลินทรีย์ตายในที่สุด

5) กลุ่มจุลินทรีย์ (microbial community) กระบวนการย่อยสลายในทางชีวภาพจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาต่างๆที่เกิดขึ้นโดยกลุ่มจุลินทรีย์ต่างๆ ที่ปะปนกัน อัตราการเจริญและการย่อยสลายสารต่างๆจะมีเปอร์เซ็นต์ความถี่สูงขึ้นเมื่อมีจุลินทรีย์หลายชนิดผสมกัน จุลินทรีย์ชนิดแรกสามารถย่อยสลายสารตั้งต้นได้ให้ผลผลิตเป็นสารที่ถูกย่อยเกิดขึ้น แล้วมีจุลินทรีย์ชนิดที่สองสามารถย่อยสลายสารที่เกิดขึ้นต่อไปได้ จึงเป็นการเกี่ยวข้องกันทางเมแทบอลิซึม (metabolism) ที่เรียกว่า โคเมแทบอลิซึม (cometabolism) ทำให้การย่อยสลายสมบูรณ์แบบยิ่งยวด (Stoner. 1994) ในการย่อยสลายสารนั้นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญได้แก่ Autotrophic microorganism และ Heterotrophic microorganism การที่จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์มาอยู่ร่วมกันนั้น จะมีการย่อยสลายสารต่างๆแล้วสร้างเป็นกรดอะมิโน เปปไทด์ น้ำตาล พอลิแอลกอฮอล์ วิตามิน เอนไซม์

สารควบคุมการเจริญ (growth factor) สารปฏิชีวนะและสารพิษ (Murakami and Alexander. 1989) ซึ่งจะมีผลช่วยกระตุ้นให้การย่อยสลายเกิดขึ้นหรือไม่ก็ยับยั้งการย่อยสลาย

Steffensen and Alexander (1995) ได้รายงานว่าการย่อยสลายของจุลินทรีย์เกิดขึ้นได้จาก เนื่องจากจุลินทรีย์ต้องการสารบางอย่างในการเจริญ โดยทำการทดลองใช้ *Pseudomonas putida* ย่อยสลาย Benzylamine และ Caprolactum การย่อยสลายจะเกิดขึ้นได้ไม่คืนัก แต่เมื่อเติมฟอสฟอรัส ลงไป การย่อยสลายจะเกิดอย่างรวดเร็ว เมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ร่วม ด้วย โดยไม่ใส่ฟอสฟอรัส ประสิทธิภาพในการย่อยสลาย Benzylamine ก็จะดีเหมือนกับการเติม ฟอสฟอรัสลงไปด้วย แสดงให้เห็นว่า *P. aeruginosa* มีส่วนช่วยให้การย่อยสลาย Benzylamine เกิดขึ้น

2.8 การตรวจวัดคุณภาพน้ำ

การวัดคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำส่วนใหญ่จะวัดค่าพีเอช อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน ที่ละลายน้ำ ความเค็ม ความขุ่น ปริมาณไนโตรเจน ไนไตรต์ ไนไตรด แอมโมเนีย ฟอสฟอรัส ไฮโดรเจนซัลไฟด์ และปริมาณสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำ (Lee et al. 1986)

การวัดปริมาณสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำนิยมนำค่า บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand, BOD) และซีโอดี (Chemical Oxygen Demand, COD) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้วัดปริมาณ ออกซิเจนที่ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์

2.8.1 บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand, BOD)

BOD คือค่าความต้องการออกซิเจนของน้ำทิ้งที่วัดโดยกระบวนการทางชีววิทยา ปกติ นิยมวัดค่าที่ 5 วัน (BOD_5) และที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

วิธีวิเคราะห์หาค่า BOD เป็นขั้นตอนทางชีววิเคราะห์ที่จำเป็นอย่างยิ่งในการวัดการใช้ ออกซิเจนโดยสิ่งมีชีวิต (ส่วนใหญ่หมายถึงแบคทีเรีย) โดยการใช้ประโยชน์จากอินทรีย์สารที่พบ ภายใต้งี้อ่อนไขในสภาพใกล้เคียงกับธรรมชาติ วิธีวิเคราะห์ค่า BOD จะต้องเก็บน้ำตัวอย่างบ่ม ไว้ในที่มืดอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน (APHA. 1975) ค่า BOD นี้ใช้ได้โดยตรงในการประมาณจำนวนสารอินทรีย์ในน้ำ แต่มีข้อจำกัดเนื่องจากปริมาณออกซิเจนในน้ำ สามารถละลายได้ถึงจุดอิ่มตัวประมาณ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 20 องศา เซลเซียส ดังนั้นถ้าน้ำเสียมีความสกปรกมากกว่าคือมีค่า BOD เกินกว่า 9 มิลลิกรัมต่อลิตร ออกซิเจนที่มีอยู่จะถูกใช้หมดไปไม่มีเหลืออยู่หลังจากครบ 5 วัน ทำให้การคำนวณค่า BOD ไม่สามารถทำได้ จึงต้องเจือจางตัวอย่างน้ำให้มีค่า BOD ไม่เกิน 9 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ การหาค่า BOD เป็นวิธีทางชีววิทยาจึงต้องมีการปรับสภาวะแวดล้อมของน้ำตัวอย่างให้เหมาะสม

ต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ กล่าวคือไม่มีสารพิษ แต่มีอาหารเสริมเพียงพอสำหรับจุลินทรีย์ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส รวมทั้งแร่ธาตุต่างๆที่จำเป็นต่อการเจริญ และการย่อยสลายสารอินทรีย์ให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำกระทำโดยจุลินทรีย์หลายชนิด ถ้าไม่มีหรือมีปริมาณน้อยเกินไปจำเป็นต้องเติมจุลินทรีย์ซึ่งเรียกว่าหัวเชื้อลงไปด้วย (ธงชัย พรรณสวัสดิ์และอุษา วิเศษสุน. 2535)

2.8.2 ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand, COD)

COD คือค่าความต้องการออกซิเจนในการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยวิธีทางเคมี การวิเคราะห์ค่า COD เป็นการวัดความสกปรกของน้ำโดยคิดเปรียบเทียบในรูปของออกซิเจนที่ต้องการใช้ในการย่อยสลายสารทั้งหมดทั้งที่จุลินทรีย์ย่อยได้และย่อยไม่ได้ โดยการกลั่นกลับคืน (reflux) สารเคมีที่มีอำนาจในการออกซิไดซ์สูง คือ โพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ในสารละลายที่เป็นกรด ดังสมการ



หลังจากการกลั่นประมาณ 2 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณโพแทสเซียมไดโครเมตที่เหลืออยู่ (เนื่องจากระหว่างการกลั่นโพแทสเซียมไดโครเมตบางส่วนจะถูกใช้ในการออกซิไดซ์สารอินทรีย์) ด้วยการไทเทรตกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$) โดยใช้เฟอร์โรอิน (Ferroin) เป็นอินดิเคเตอร์ จะเกิดปฏิกิริยาดังสมการ



ค่า COD และ BOD ใช้ในการวัดคุณภาพของแหล่งน้ำต่างๆ รวมทั้งใช้วัดในระบบบำบัดน้ำเสีย Avnimelech *et al.* (1995) พบว่าค่าทั้งสองจะมีความสัมพันธ์กันในบ่อเลี้ยงปลาและบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำต่างๆ โดยทั่วไปค่า COD จะสูงกว่าค่า BOD เสมอ ในการวัดค่า BOD ค่าที่ได้ค่อนข้างหยาบเนื่องจาก BOD ต้องใช้เวลาวัดถึง 5 วันและมีอัตราการย่อยสลายที่ไม่จำเพาะ เนื่องจากขึ้นอยู่กับความสามารถในการย่อยสลายของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารต่างๆ ทำให้ค่าที่ได้คลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริง ดังนั้นจึงนิยามหาปริมาณสารอินทรีย์ทั้งหมดที่มีอยู่ด้วยวิธี COD ซึ่งให้ผลแน่นอนมากกว่า

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) รุ่น 370 (Orion)
ตู้อบความร้อน (hot air oven) รุ่น ULM 700 (Mettmert)
ตู้อบเชื้อ (incubator) รุ่น BE 400 (Mettmert)
เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controled incubator shaker) รุ่น innova 4330 (Scientific Promotion Co.,Ltd)
เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) รุ่น vortex genie 2 (Scientific industries,inc)
หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) รุ่น EC 315 (Tommy)
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น PG 5002 (Mettler-toledo)
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น Model AT 200 (Mettler-toledo)
กล้องจุลทรรศน์ (bright – field microscope) รุ่น Alphaphot YS (type 102) (Nikon)
เครื่อง Freeze Dry รุ่น super modulyo (Edwards)
เครื่องกลั่น (distillation) Gerhardt รุ่น Vapodest 30 (Scientific Promotion Co.,Ltd)
เครื่องวัดความเค็ม (Refracto salinometer) รุ่น S/Mill-E 0-100 ppt (Atato)
เครื่องแก้ว (พลาสติก หลอดทดลอง กรวย ฯลฯ)
อุปกรณ์วัดปริมาตร (ปิเปตต์ ไมโครปิเปตต์ กระบอกตวง ฯลฯ)
เทอร์โมมิเตอร์

3.2 เคมีภัณฑ์สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) (ภาคผนวก ก ข้อ 2)
อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)
อาหารนมผงพร่องมันเนย (skim milk) (ภาคผนวก ก ข้อ 1)
อาหารแป้ง (soluble starch) (ภาคผนวก ก ข้อ 5)
อาหารทวิน 80 (tween 80) (ภาคผนวก ก ข้อ 6)

3.3 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์บีโอดี

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
 โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตาไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)
 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
 แอนไฮดรัสแคลเซียมคลอไรด์ (anhydrous CaCl_2)
 เฟอร์รัสไอออน (III) คลอไรด์เฮกซาไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
 แมงกานีสซัลเฟตเตตราไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
 โซเดียมไฮดรอกไซด์
 โซเดียมไอโอดाइด์ (NaI)
 โซเดียมไทโอซัลเฟต ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

3.4 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์ซีโอดี

โพแทสเซียมไดโครเมต ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)
 ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4)
 กรดซัลฟูริก
 เฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
 พานอฟโทลีนโมโนไฮเดรต ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
 เฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

3.5 การเก็บตัวอย่างและการศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำ

เก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งในอำเภอบางบ่อ และอำเภอดอนสวน จังหวัดสมุทรปราการ จำนวน 10 บ่อ เก็บตัวอย่างน้ำในช่วงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2545 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2546 เวลา 11.00 ถึง 13.00 น. โดยเก็บบริเวณขอบบ่อทั้ง 4 ด้านและมุมบ่อ ใส่ขวดแก้วที่ล้างมา เชื้อแล้ว นำไปตรวจนับปริมาณเชื้อทั้งหมดทันทีหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส วัดอุณหภูมิตามจุดที่เก็บตัวอย่างด้วยเทอร์โมมิเตอร์ วัดพีเอชโดยใช้ pH meter วัดความเค็มโดยเครื่อง refracto salinometer วัดค่าบีโอดี (BOD) และค่าซีโอดี (COD)

3.6 การตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์

วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดโดยวิธี standard plate count นำตัวอย่างน้ำมาเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ เจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสม ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียโดยใช้อาหาร TSA นำจานเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี นำค่าเฉลี่ยมาคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดต่อตัวอย่างน้ำ 1 มิลลิลิตร ตรวจสอบเชื้อราและเชื้อยีสต์โดยเลี้ยงในอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5-7 วันแล้วนำมาตรวจนับโคโลนี

3.7 การแยกเชื้อและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์

เลือกเก็บเชื้อจากงานเลี้ยงเชื้อที่นับจำนวนแล้ว โดยอาศัยความแตกต่างของสี รูปร่าง และลักษณะของโคโลนีมาทำ cross streak เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ นำไปตรวจสอบรูปร่างและการติดสีแกรม

3.7.1 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยา

สังเกตลักษณะของรูปร่าง ลักษณะการสร้างสีของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร Nutrient Agar (NA) (ภาคผนวก ก ข้อ 3) และลักษณะการเจริญในอาหาร Nutrient Broth (NB) (ภาคผนวก ก ข้อ 4)

3.7.2 การติดสีแกรม

แบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NA อายุ 24 ชั่วโมง นำไปย้อมแกรมดูรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

3.7.3 การย้อมเอ็นโดสปอร์

แบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NA อายุ 48 ชั่วโมง นำไปย้อมเอ็นโดสปอร์ นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า สปอร์จะติดสีเขียวส่วนเซลล์จะติดสีแดง

3.8 การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทำ point inoculation บนอาหารชนิดต่างๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 3-5 วัน ตรวจสอบผลทุกวัน (สมพร ธนวิริยะกุล. 2535)

3.8.1 การย่อยโปรตีน

นำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารแข็งนมพร่องไขมัน (Skim Milk Agar) คูผลการทดลองโดยเชื้อที่ย่อยโปรตีนได้จะเกิดบริเวณใส (clear zone) วัตถุประสงค์ของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อและบริเวณใสที่เกิดขึ้น

3.8.2 การย่อยแป้ง

นำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารแข็งแป้ง (Starch Agar) คูผลการทดลองโดยราดสารละลายไอโอดีนลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีเชื้อที่เจริญแสดงว่าเชื้อย่อยแป้ง วัตถุประสงค์ของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อและบริเวณใสที่เกิดขึ้น

3.8.3 การย่อยไขมัน

นำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารแข็งทวิน 80 (Tween 80 Agar) คูผลการทดลองโดยเชื้อที่ย่อยสลายไขมันได้จะเกิดตะกอนขุ่นขาวรอบโคโลนี วัตถุประสงค์ของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อและตะกอนขุ่นขาวที่เกิดขึ้น

นำผลการทดสอบทั้ง 3 ชนิดมาเปรียบเทียบ แล้วทำการคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายสารอาหารดังกล่าวไว้ศึกษาต่อไป

3.9 การจำแนกลักษณะและศึกษาสมบัติบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ (Sneath *et al.* 1986)

3.9.1 การทดสอบการเคลื่อนที่

ปลูกเชื้อลงบนอาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility Test Medium) (ภาคผนวก ก ข้อ 7) โดยแทงเข็มเขี่ยเชื้อลงไปจนสุดหลอดทดลองบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ถ้าเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้จะมีรอยการเจริญออกจากรอยที่แทงไว้

3.9.2 การผลิตเอนไซม์แคตาเลส (Catalase)

นำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NA อายุ 24 ชั่วโมง มาเกลี่ยลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (3 % H₂O₂) ลงบนเชื้อ ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างแคตาเลสได้ให้ผลเป็นบวก แต่ถ้าไม่เกิดฟองก๊าซแสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างแคตาเลสได้ให้ผลเป็นลบ

3.9.3 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดส (Oxidase)

หยคสารละลายเตตระเมทิลพาราไดเอมีนไดไฮโดรคลอไรด์ เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (1 % tetramethyl paraphenyldiamine dihydrochloride) ลงบนกระดาษกรองจนชุ่มแล้วใช้จวดเขี่ยเชื้อจากอาหารแข็ง NA ป้ายบนกระดาษกรอง ถ้าเกิดสีม่วงขึ้นภายใน 10 วินาที แสดงว่าให้ผลเป็นบวก สีเกิดขึ้นเนื่องจากแบคทีเรียมีการสร้าง Cytochrome oxidase โดย Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride ถูกออกซิไดซ์โดย Oxidized cytochrome c จะเกิดสีม่วงของ Nurster's blue ถ้าไม่เกิดสีม่วงแสดงว่าแบคทีเรียไม่สร้างเอนไซม์ Cytochrome oxidase

3.9.4 การทดสอบการสร้างอินโดล (Indole)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลวทริปโตเฟน (Tryptophane Broth) (ภาคผนวก ก ข้อ 8) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบการสร้างอินโดลโดยหยคสารละลายโคแวกส์ (Kovac's reagent) 1-2 หยด ถ้ามีสีชมพูเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ Tryptophanase ย่อยสลายทริปโตเฟนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อินโดล ถ้าไม่เกิดสีให้ผลเป็นลบ

3.9.5 การใช้ซิเตรต

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารซิมมอนส์ซิเตรต (Simmon's Citrate Agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 9) บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-7 วัน เชื้อที่สามารถใช้ซิเตรตได้ จะเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ในอาหารจากสีเขียวกลายเป็นสีน้ำเงิน เนื่องจากเชื้อสามารถใช้โซเดียมซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ทำให้ได้แอมโมเนียที่มีคุณสมบัติเป็นเบส ทำให้บรอมไทมอลบลูเปลี่ยนสีจากสีเขียวกลายเป็นสีน้ำเงิน ถ้าเชื้อไม่สามารถใช้โซเดียมซิเตรตได้ อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีเขียวเหมือนเดิม

3.9.6 การทดสอบเมทิลเรด (Methyl Red Test)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเอ็มอาร์-วีพี (MR-VP Medium) (ภาคผนวก ก ข้อ 10) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบโดยหยคสารละลายเมทิลเรด 5-6 หยด ถ้าเกิดสีแดงขึ้นแสดงว่าแบคทีเรียสร้างกรดออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แอซิติก แลคติก หรือฟอร์มิกจากกลูโคส เนื่องจากเมทิลเรดจะเปลี่ยนสีในช่วงพีเอช 6.0 (สีเหลือง) และพีเอช 4.4 (สีแดง) แสดงว่าให้ผลเป็นบวก ถ้าเกิดสีเหลืองให้ผลเป็นลบ

3.9.7 การทดสอบเมทิลคาร์บินอล (Voges Proskauer Test)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเอ็มอาร์-วีพี (MR-VP Medium) (ภาคผนวก ข้อ 10) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบโดยการเติมแอลฟาแนฟทอล 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ก่อนจึงใส่สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นภายใน 10 นาที หรือ 24 ชั่วโมง แสดงว่า

แบคทีเรียมีการผลิตอะซิโตอิน (acetoin) จากวัฏจักรบิวทีรีนไกลคอล (butylene glycol pathway) ซึ่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซ็นต์ จะเปลี่ยนกลับให้อะซิโตอินกลายเป็นไดอะซิติก (diacetyl) และเกิดสารประกอบสีแดง โดยการเร่งปฏิกิริยาของแอลฟาแนฟทอล ให้อันที่ผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดสีแดงให้ผลเป็นลบ

3.9.8 การสร้างยูเรียเอส

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารคริสเตนส์ยูเรีย (Christensen's Urea) (ภาคผนวก ก ข้อ 11) บ่มเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-4 วัน ถ้าปรากฏสีชมพูสดบนอาหาร แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างยูเรียเอสย่อยสลายยูเรียให้แอมโมเนียออกมาทำให้อาหารมีสภาพเป็นด่างจึงเปลี่ยนสีฟีนอลเรดจากสีส้ม (พีเอช 6.8) กลายเป็นสีชมพูเข้ม (พีเอช 8.1) ให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เปลี่ยนสีอาหารให้ผลเป็นลบ

3.9.9 การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารแฉิ่งทีเอสไอ (TSI Agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 12) ครั้งแรกจะแทงลงไปในการที่เอียงจนสุดหลอด ครั้งที่สองจะลากไปบนผิวหน้าอาหารที่เอียง บ่มเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร เชื้อที่ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้จะให้สีค้ำของเฟอร์รัสซัลไฟด์ตามรอยที่ปลูกเชื้อ อ่านผลเป็นบวก นอกจากนี้ อาหาร TSI agar ยังสามารถทดสอบได้ 2 ชนิด คือ การทดสอบการใช้น้ำตาล และการทดสอบการเกิดก๊าซ เพราะในอาหารมีน้ำตาล 3 ชนิด คือ กลูโคส 1 ส่วน แล็กโทส 10 ส่วน และซูโครส 10 ส่วน มีฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ ดังนั้นถ้าแบคทีเรียใช้น้ำตาลในกระบวนการหมัก (oxidation) จะมีการเจริญที่ผิวหน้าของอาหาร แบคทีเรียที่ใช้กลูโคสได้อย่างเดียวในกระบวนการหมักจะทำให้มีกรดเกิดขึ้นจึงมีสีเหลืองเฉพาะที่ก้นหลอด ส่วนที่ผิวจะมีสีแดง ถ้าใช้ซูโครส หรือแล็กโทสด้วยจะมีสีเหลืองที่ผิวอาหารเพราะมีกรดเกิดจำนวนมาก ถ้าไม่มีการเปลี่ยนสีแสดงว่าไม่มีการหมัก และถ้ามีก๊าซเกิดขึ้นจากการใช้น้ำตาล ฟองก๊าซจะอยู่ในวุ้นอาหาร

3.9.10 การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาล

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทดสอบการใช้น้ำตาล (Phenol Red Broth Base) (ภาคผนวก ก ข้อ 13) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลที่ใช้ทดสอบ 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตการสร้างกรด ถ้าเชื้อสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้ จะสร้างกรดขึ้นมา ทำให้อินดิเคเตอร์ฟีนอลเรดในอาหารเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีเหลืองให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เปลี่ยนสีให้ผลเป็นลบ

3.9.11 การทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB บ่มเลี้ยงที่ 20 - 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อโดยดูความขุ่นของเชื้อที่ค่าการดูดกลืนแสง 660 นาโนเมตร ถ้าเชื้อเจริญเกิดความขุ่นให้ผลเป็นบวก ถ้าเชื้อไม่เจริญให้ผลเป็นลบ

3.9.12 การทดสอบความสามารถในการเจริญที่พีเอชต่างๆ

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่ปรับพีเอชเป็น 3-10 บ่มเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อโดยดูความขุ่นของเชื้อที่ค่าการดูดกลืนแสง 660 นาโนเมตร ถ้าเชื้อเจริญเกิดความขุ่นให้ผลเป็นบวก ถ้าเชื้อไม่เจริญให้ผลเป็นลบ

3.10 การเก็บรักษาแบคทีเรียโดยวิธีไลโอไฟล์เซชัน (lyophilization)

นำแบคทีเรียที่ต้องการศึกษาเลี้ยงในอาหาร NA slant บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ถึง 48 ชั่วโมง ล้างเชื้อด้วย 10% skim milk (suspending medium) แล้วใช้ปิเปตต์ปลอดเชื้อ ถ่ายสารละลายผสมใส่ขวดแก้วทรงกรวยปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปเข้าเครื่อง Freeze Dry จนสารละลายแห้ง นำผงเชื้อ (powder culture) ที่ได้เก็บในตู้เย็นนำมาตรวจนับปริมาณเชื้อทั้งหมดโดยวิธี pour plate โดยเจือจางตัวอย่างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความเจือจางที่เหมาะสมเลี้ยงด้วยอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ถึง 48 ชั่วโมง ตรวจสอบนับโคโลนีที่เกิดขึ้น

3.11 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเลี้ยงกุ้ง

3.11.1 ถ่ายแบคทีเรียที่คัดเลือกได้แต่ละสายพันธุ์เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ให้มีปริมาณเชื้อ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาค่าอายุ 3 เดือนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 400 มิลลิลิตร บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เติมหาอาหารกุ้ง 1 เปอร์เซ็นต์ เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างน้ำทุกวันตั้งแต่วันเริ่มต้นไปจนครบ 7 วัน นำไปหาค่า COD

3.11.2 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยใช้แบคทีเรียผสม (mixed culture) นำแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ให้มีปริมาณเชื้อ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มาผสมในอัตราส่วนที่เท่ากัน (1 : 1) นำแบคทีเรียผสมที่ได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำอายุ 3 เดือนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 400 มิลลิลิตร บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เติมอาหารกุ้ง 1 เปอร์เซ็นต์ เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างน้ำทุกวันตั้งแต่วันเริ่มต้นไปจนครบ 7 วัน นำไปหาค่า COD

การทดลองข้อ 3.1.1.1 และ 3.1.1.2 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ทรีทเมนต์ละ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของคั่นคั่น (Duncan's New Multiple Range Test) (สิทธิชัย เจริญเศรษฐศิลป์. 2542)

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง

เก็บตัวอย่างน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งจำนวน 10 ตัวอย่าง จากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาคำในอำเภอบางบ่อและคลองสวน จังหวัดสมุทรปราการ เป็นพื้นที่ที่มีการเลี้ยงกุ้งมานานกว่า 10 ปี สภาพบ่อเป็นบ่อดินรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า เป็นการเลี้ยงด้วยน้ำจืด โดยในการเลี้ยงระยะแรกจะเติมน้ำทะเลหรือเกลือให้น้ำมีความเค็มใกล้เคียงกับความเค็มจากฟาร์มลูกกุ้ง (ประมาณ 5 ส่วนในพันส่วน) เพื่อให้ลูกกุ้งปรับตัวหลังจากนั้นเติมน้ำจืดลงไป เป็นการเลี้ยงแบบพัฒนาหรือแบบหนาแน่น เก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2545 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2546 เก็บในช่วงเวลา 11.00 ถึง 13.00 น. กุ้งมีอายุระหว่าง 1 เดือนครึ่งถึง 3 เดือน ขนาดบ่อประมาณ 3 ไร่ ลึก 1.5 เมตร นำตัวอย่างน้ำมาตรวจวัดอุณหภูมิ พีเอช ค่าบีโอดี ค่าซีโอดี ผลแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดสมุทรปราการ

แหล่งที่มา	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	พีเอช	BOD (มิลลิกรัมต่อลิตร)	COD (มิลลิกรัมต่อลิตร)
1. อำเภอบางบ่อ	31	7.91	13.5	440
2. อำเภอบางบ่อ	31	7.89	5.2	1,784
3. อำเภอบางบ่อ	30	7.91	12.0	2,676
4. อำเภอบางบ่อ	31	8.21	11.0	3,520
5. อำเภอบางบ่อ	30	8.35	6.0	1,760
6. อำเภอบางบ่อ	30	8.14	13.3	2,640
7. อำเภอบางบ่อ	31	8.18	10.6	3,080
8. อำเภอคลองสวน	30	8.31	21.0	1,840
9. อำเภอคลองสวน	30	8.36	24.0	460
10. อำเภอคลองสวน	30	8.19	17.0	460

จากผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิของน้ำอยู่ระหว่าง 29 -31 องศาเซลเซียส พีเอชของน้ำมีค่าระหว่าง 7.89 - 8.36 ซึ่งผลสอดคล้องกับรายงานของ Chiang *et al.* (1989) ที่พบว่าอุณหภูมิของน้ำที่ทำให้กุ้งเจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือระหว่าง 25 - 32 องศาเซลเซียส และค่าพีเอชที่ดีสำหรับกุ้งกุลาดำอยู่ระหว่าง 7.3-8.8 พบว่าอุณหภูมิและพีเอชทั้ง 10 บ่อ มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่เหมาะสมต่อการเติบโตของกุ้งกุลาดำ พีเอชในช่วง 7 - 9 เหมาะต่อการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน (nitrification/denitrification) เป็นปฏิกิริยาที่ใช้กำจัดไนโตรเจนโดยการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนเตรต หลังจากนั้นจะรีดิวซ์ไนเตรตเป็นก๊าซไนโตรเจนกลับคืนสู่บรรยากาศ (Boyd. 1987) จากการวัดความเค็มพบว่าไม่มีความเค็มเพราะเลี้ยงด้วยน้ำจืด ค่า BOD และค่า COD เป็นการวิเคราะห์เพื่อที่จะทราบถึงความสกปรกของน้ำ โดยค่า BOD จะคิดเปรียบเทียบในรูปของปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ น้ำที่สกปรกมากจะมีค่าบีโอดีสูง โดยค่า BOD ของน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งมีค่าระหว่าง 5.2 - 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยน้ำจากบ่อที่มีกุ้งอายุมากมีค่า BOD สูงกว่าในบ่อที่มีกุ้งอายุน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ ยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตรและคณะ (2532) พบว่าค่า BOD ของบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบหนาแน่นมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้น โดยเพิ่มสูงสุดในเดือนที่ 3 ของการเลี้ยง ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงมีค่า BOD อยู่ระหว่าง 2.8 - 20.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยให้เหตุผลว่าค่า BOD เพิ่มขึ้นตามอายุของกุ้ง เนื่องจากปริมาณอาหารที่ให้เพิ่มขึ้นเป็นผลให้เกิดอาหารตกค้างมากขึ้น ของเสียที่กุ้งขับถ่ายออกมามีปริมาณเพิ่มขึ้น เป็นต้น และรายงานของพลาวุธ น้อยเคียง (2543) ทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในพื้นที่น้ำจืด 5 จังหวัดในเขตภาคตะวันออก พบว่าอุณหภูมิของน้ำมีค่าระหว่าง 25.6 - 35.5 องศาเซลเซียส และค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 6.9-9.6 ความสกปรกของน้ำในรูป BOD มีค่าอยู่ระหว่าง 2.0 - 12.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่า COD คือค่าความต้องการของปริมาณออกซิเจนในการที่จะทำปฏิกิริยาออกซิไดซ์กับอินทรีย์สารในน้ำอย่างสมบูรณ์จนได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ (Boyd. 1989) โดยค่า COD ของน้ำเลี้ยงกุ้งทั้ง 10 บ่ออยู่ระหว่าง 440 - 3,520 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของสุริยัน รัชฎกิจจานุกิจ (2532) พบค่า COD ในบ่อเลี้ยงกุ้งที่ 1 มีค่าระหว่าง 97.9 - 3,121.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และบ่อเลี้ยงกุ้งที่ 2 มีค่าระหว่าง 101.5 - 2,894.3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยค่า COD จะเพิ่มขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 8 หลังจากนั้นแนวโน้มลดลงเรื่อยๆจนถึงช่วงการจับกุ้ง Boyd (1989) ได้เสนอว่าค่า COD ในน้ำของบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำจะได้รับจากการให้อาหารและปริมาณอินทรีย์สารที่ผลผลิตของกระบวนการสังเคราะห์แสง หรือจากพวกแพลงก์ตอน ในขณะที่การสูญเสียของค่า COD จะได้จากการหายใจหรือใช้ไปโดยสิ่งมีชีวิตในบ่อ ซึ่งรายงานของ Lewis *et al.* (1984) พบว่าค่า COD จะลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 2-3 วันแรก และจะลดน้อยลงไปเรื่อยๆ จนครบ 7 วัน การที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากแบคทีเรียจะใช้สารอินทรีย์เป็นอาหารอย่างรวดเร็ว ดังนั้นสารอินทรีย์และแร่ธาตุต่างๆจะ

เริ่มลดน้อยลง ประกอบกับมีการสร้างผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย จึงทำให้ค่า COD ที่วัดได้ลดลง

4.2 การตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์

นำตัวอย่างน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาที่มีกุ้งอายุแตกต่างกันมาวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ โดยวิธี Standard plate count โดยใช้อาหาร TSA สำหรับตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย และใช้อาหาร PDA ตรวจสอบเชื้อยีสต์และรา พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด $1.72 \times 10^3 - 8.10 \times 10^4$ CFU/มิลลิลิตร ซึ่งน้ำจากบ่อที่มีกุ้งอายุน้อยมีปริมาณแบคทีเรียในน้ำน้อยกว่าบ่อที่มีกุ้งอายุมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของเปรมสุดา สมาน (2539) พบปริมาณแบคทีเรียในดินก้นบ่อเลี้ยงกุ้งมีมากกว่าที่ตรวจพบในน้ำ และบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีกุ้งอายุมากจะพบแบคทีเรียทั้งในดินและน้ำมากกว่าในบ่อเลี้ยงกุ้งอายุน้อย โดยแต่ละบ่อมีกุ้งอายุต่างๆ กัน คือ 2.5, 3, 3.5 และ 4.5 เดือน พบปริมาณแบคทีเรียในน้ำมีค่าเท่ากับ 2.4×10^3 , 1.8×10^4 , 4.4×10^4 และ 5.9×10^4 CFU/มิลลิลิตรตามลำดับ และรายงานของพรชัย รุ่งศรี (2545) พบว่าจากการศึกษาน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนามีปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ระหว่าง $10^4 - 10^6$ CFU/มิลลิลิตร ส่วนปริมาณเชื้อยีสต์และรามีค่าระหว่าง 5.5 - 25.5 CFU/มิลลิลิตร โดยตัวอย่างน้ำทั้ง 10 บ่อมีเชื้อยีสต์และราในปริมาณเล็กน้อย (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดสมุทรปราการ

อายุกุ้ง	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/มิลลิลิตร)	
	แบคทีเรีย	เชื้อยีสต์และรา
2 เดือน	8.10×10^4	12.0
1.5 เดือน	8.30×10^3	20.0
2.5 เดือน	6.85×10^3	24.5
2.5 เดือน	5.40×10^3	14.0
1.5 เดือน	3.95×10^3	10.5
2 เดือน	5.60×10^3	7.5
2 เดือน	3.05×10^3	25.5
1.5 เดือน	7.35×10^3	14.5
3 เดือน	9.0×10^3	11.5
3 เดือน	1.72×10^3	5.5

4.3 การแยกเชื้อและทำให้เชื้อบริสุทธิ์

เลือกเก็บโคโลนีของเชื้อจากจานอาหารที่นับเชื้อแล้ว โดยอาศัยความแตกต่างของสี รูปร่างและลักษณะโคโลนี มาแยกให้บริสุทธิ์ โดยนำมาลาก (streak) บนอาหารแข็ง NA สำหรับแบคทีเรีย และอาหารแข็ง PDA สำหรับเชื้อยีสต์และรา ผลการแยกแบคทีเรียจากน้ำบ่อเลี้ยงกุ้ง 10 ตัวอย่าง พบว่าได้แบคทีเรียทั้งหมด 83 ไอโซเลท จากการศึกษาลักษณะรูปร่าง การเรียงตัวของเซลล์ การติดสีแบบแกรมและการสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สามารถจำแนกแบคทีเรียออกเป็น 4 กลุ่มดังนี้ แบคทีเรียรูปแท่งแกรมบวกสร้างสปอร์ 32 ไอโซเลท แบคทีเรียรูปแท่งแกรมบวกไม่สร้างสปอร์ 6 ไอโซเลท แบคทีเรียรูปกลมแกรมบวก 9 ไอโซเลท และแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ 36 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.3) ส่วนเชื้อยีสต์และราแยกได้ทั้งหมด 42 ไอโซเลท เป็นยีสต์ 30 ไอโซเลท และรา 12 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.3 ลักษณะและรูปร่างของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดสมุทรปราการ

แหล่งที่มา	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนีและรูปร่าง
อ. บางบ่อ	SB11	สีขาวใส ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SB12	สีขาว ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมบวกรูปแท่งไม่สร้างสปอร์
	SB13	สีขาว ผิวหน้าขรุขระไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB14	สีขาวครีม ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB15	สีเหลือง ผิวหนานูนไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB16	สีส้ม ผิวหนานูนไม่มัน รูปร่างกลม ขอบเรียบ เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปกลม
	SB17	สีขาวใส ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB18	สีขาวครีม ผิวหน้าขรุขระไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ลักษณะและรูปร่างของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดสมุทรปราการ

แหล่งที่มา	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนีและรูปร่าง
	SB21	สีขาวใส ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบเรียบ เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SB22	สีเหลือง ผิวหน้านูนไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่ในเนื้อวุ้น แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB23	สีเหลือง ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบเรียบ เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมบวกรูปกลม
	SB24	สีขาวครีม ผิวหน้าขรุขระไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB25	สีส้ม ผิวหน้านูนไม่มัน รูปร่างกลม ขอบเรียบ เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปกลม
	SB26	สีขาวครีม ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SB27	สีขาว ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบเรียบ เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB28	สีเหลือง ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวอาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SB31	สีขาวใส ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบเรียบ เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SB32	สีขาวครีม ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB33	สีขาว ผิวหน้าขรุขระมัน รูปร่างกลม ขอบเรียบ เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB34	สีขาวใส ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SB35	สีขาวครีม ผิวหน้าขรุขระไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB36	สีขาวใน ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบเรียบ เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ลักษณะและรูปร่างของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดสมุทรปราการ

แหล่งที่มา	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนีและรูปร่าง
	SB37	สีส้ม ผิวหนานูนไม่มัน รูปร่างกลม ขอบเรียบ เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปกลม
	SB41	สีขาวใส ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SB42	สีขาว ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SB43	สีเหลือง ผิวหนานูนไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB44	สีขาวใส ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบเรียบ เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SB45	สีขาวครีม ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SB46	สีขาว ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบเรียบ เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB47	สีขาวครีม ผิวหน้าขรุขระไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB48	สีขาวใส ผิวหนานูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB51	สีขาว ผิวหนานูนไม่มัน รูปร่างกลม ขอบเรียบ เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SB52	สีขาว ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งไม่สร้างสปอร์
	SB53	สีขาวใส ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบเรียบ เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SB54	สีขาวครีม ผิวหน้าขรุขระไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB55	สีส้ม ผิวหนานูนไม่มัน รูปร่างกลม ขอบเรียบ เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปกลม

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ลักษณะและรูปร่างของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดสมุทรปราการ

แหล่งที่มา	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนีและรูปร่าง
	SB56	สีขาว ผิวหน้าขรุขระมัน รูปร่างกลม ขอบเรียบ เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB61	สีเหลืองใส ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB62	สีเหลือง ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB63	สีส้ม ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบเรียบ เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปกลม
	SB64	สีเหลืองใส ผิวหน้านูนไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SB65	สีขาวครีม ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB66	สีเหลือง ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมบวกรูปแท่งไม่สร้างสปอร์
	SB67	สีขาวครีม ผิวหน้านูนไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB68	สีขาว ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SB69	สีขาวครีม ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบเรียบ เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปกลม
	SB71	สีเหลืองใส ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB72	สีเหลือง ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB73	สีขาวครีม ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SB74	สีส้ม ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปกลม

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ลักษณะและรูปร่างของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดสมุทรปราการ

แหล่งที่มา	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนีและรูปร่าง
อ. คลองสวน	SB75	สีขาวครีม ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบเรียบ เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SB76	สีส้มอ่อน ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB77	สีเหลืองใส ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมบวกรูปแท่งไม่สร้างสปอร์
	SB78	สีเหลืองใส ผิวหน้านูนไม่มัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SB79	สีเหลือง ผิวหน้านูนไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SB710	สีขาวครีม ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบเรียบ เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปกลม
	SB711	สีส้มอ่อน ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SB712	สีขาวครีม ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบเรียบ เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SK81	สีส้มอ่อน ผิวหน้านูนไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SK82	สีขาวครีม ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบเรียบ เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SK83	สีขาว ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SK84	สีส้มอ่อน ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบเรียบ เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SK85	สีขาวครีม ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SK86	สีขาว ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมลบรูปแท่ง

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ลักษณะและรูปร่างของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดสมุทรปราการ

แหล่งที่มา	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนีและรูปร่าง
	SK87	สีเหลือง ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบเรียบ เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SK91	สีส้มอ่อน ผิวหน้านูนไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SK92	สีเหลืองใส ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SK93	สีขาวครีม ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบเรียบ เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SK94	สีเหลือง ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SK95	สีขาวเหลือง ผิวหน้าขรุขระมัน รูปร่างกลม ขอบเรียบ เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SK96	สีเหลืองอ่อน ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SK97	สีขาวครีม ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบเรียบ เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SK98	สีส้ม ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งไม่สร้างสปอร์
	SK99	สีขาวใส ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SK101	สีส้มอ่อน ผิวหน้านูนไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SK102	สีขาวครีม ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบเรียบ เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SK103	สีเหลืองอ่อน ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SK104	สีเหลืองใส ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบเรียบ เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมลบรูปแท่ง

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ลักษณะและรูปร่างของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดสมุทรปราการ

แหล่งที่มา	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนีและรูปร่าง
	SK105	สีส้มอ่อน ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบเรียบ เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SK106	สีขาวใส ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลมเล็ก ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมลบรูปแท่ง
	SK107	สีเหลือง ผิวหน้าขรุขระไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่ในเนื้ออาหาร แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์
	SK108	สีส้ม ผิวหนานูนไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมบวกรูปแท่งไม่สร้างสปอร์
	SK109	สีเหลือง ผิวหน้าเรียบไม่มัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร แกรมลบรูปแท่ง

ตารางที่ 4.4 ลักษณะและรูปร่างของยีสต์และราที่แยกได้จากน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดสมุทรปราการ

แหล่งที่มา	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนีและรูปร่าง
อ. บางบ่อ	(ยีสต์) YB11	สีครีม ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YB12	สีขาว ผิวหนานูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YB13	สีเหลือง ผิวหนานูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YB21	สีครีม ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YB22	สีเหลือง ผิวหนานูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YB23	สีส้มใส ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบเรียบ เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YB31	สีครีม ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ลักษณะและรูปร่างของยีสต์และราที่แยกได้จากน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดสมุทรปราการ

แหล่งที่มา	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนีและรูปร่าง
	YB32	สีขาวใส ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YB33	สีเหลือง ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YB41	สีเหลือง ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YB42	สีครีม ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YB51	สีครีม ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YB52	สีขาว ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญ อยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YB61	สีครีม ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YB62	สีขาว ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญ อยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YB63	สีเหลือง ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YB64	สีส้มใส ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YB71	สีครีม ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YB72	สีขาวใส ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YB73	สีเหลือง ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YB74	สีขาว ผิวหน้านูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญ อยู่บนผิวหน้าอาหาร

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ลักษณะและรูปร่างของยีสต์และราที่แยกได้จากน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดสมุทรปราการ

แหล่งที่มา	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนีและรูปร่าง
อ. คลองสวน	YK81	สีครีม ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YK82	สีเหลือง ผิวหนานูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YK83	สีส้มใส ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YK91	สีครีม ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YK92	สีขาวใส ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YK93	สีเหลือง ผิวหนานูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YK101	สีครีม ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YK102	สีขาวใส ผิวหน้าเรียบมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
	YK103	สีเหลือง ผิวหนานูนมัน รูปร่างกลม ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร
อ. บางบ่อ	(รา) MB21	เส้นใยสีขาว
	MB22	เส้นใยสีส้ม
	MB31	เส้นใยสีขาว
	MB32	เส้นใยสีส้ม
	MB33	เส้นใยสีดำ
	MB41	เส้นใยสีส้ม
	MB51	เส้นใยสีส้ม
	MB61	เส้นใยสีดำ
	MB62	เส้นใยสีขาว

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ลักษณะและรูปร่างของยีสต์และราที่แยกได้จากน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดสมุทรปราการ

แหล่งที่มา	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนีและรูปร่าง
อ. คลองสวน	MK81	เส้นใยสีขาว
	MK91	เส้นใยสีดำ
	MK92	เส้นใยสีขาว

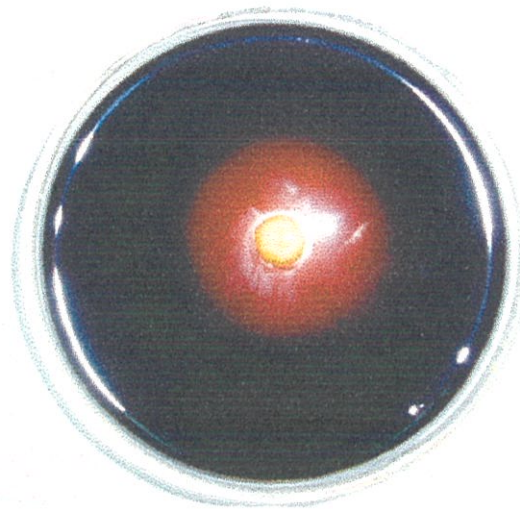
แบคทีเรียที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแบคทีเรียรูปแท่งแกรมบวกสร้างสปอร์ (คิดเป็นร้อยละ 38.55) และแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ (คิดเป็นร้อยละ 43.37) ซึ่งตรงกับที่ Wood (1965) ได้ศึกษาแบคทีเรียในบริเวณน้ำกร่อยและพบว่า *Bacillus* sp. มีปริมาณมากที่สุด ซึ่งพบทั้งที่ผิวน้ำและดินตะกอน แบคทีเรียที่พบว่ามีปริมาณรองลงมาคือ แบคทีเรียรูปแท่งแกรมบวกไม่สร้างสปอร์ แบคทีเรียรูปกลมแกรมบวก และแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสมพร ธนวิริยะกุล (2535) ที่ศึกษาชนิดและปริมาณแบคทีเรียเฮเทอโรโทรปที่พบในดินและน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งรอบบริเวณอ่าวไทยรวม 10 จังหวัด พบแบคทีเรียทั้งหมด 151 ไอโซเลท แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือกลุ่มแบคทีเรียรูปแท่งแกรมบวกสร้างสปอร์ 81 ไอโซเลท กลุ่มแบคทีเรียรูปแท่งแกรมบวกไม่สร้างสปอร์ 35 ไอโซเลท กลุ่มแบคทีเรียรูปกลมแกรมบวก 12 ไอโซเลท และกลุ่มแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ 23 ไอโซเลท ในจำนวนทั้งหมดนี้พบว่าแบคทีเรียรูปแท่งแกรมบวกสร้างสปอร์ เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญเนื่องจากมีปริมาณมาก และมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำและดิน โดยมีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนได้ดีที่สุด รองลงมาคือ แป้งและไขมัน (Alexander. 1961)

4.4 การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์

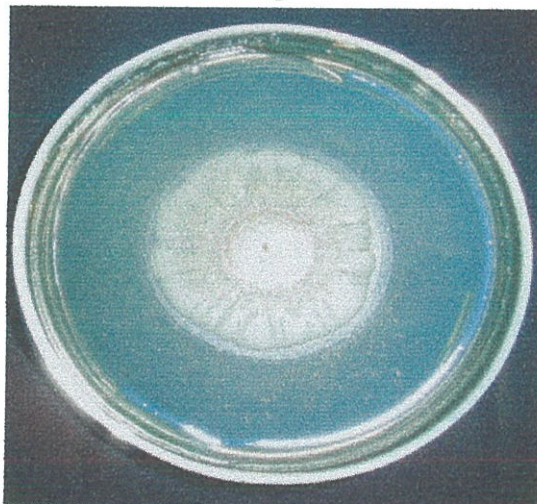
นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 4.3 โดยแบ่งเป็นแบคทีเรียจำนวน 83 ไอโซเลท ยีสต์จำนวน 30 ไอโซเลท มาทำ point inoculation บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดซึ่งเป็นตัวแทนของสารอินทรีย์ บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน (รูปที่ 4.1) เพื่อดูความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายสารอินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยวัดผลต่างของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อและบริเวณใสรอบโคโลนี (ดังแสดงในตารางที่ 4.5) ใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *B. circulans*, *B. lechinoxymis* เป็นแบคทีเรียควบคุม ส่วนเชื้อราไม่นำมาวิเคราะห์เนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแบคทีเรียยีสต์ และราเป็นกลุ่มที่มีความสามารถรองลงมา (Horan. 1990)



ก



ข



ค

รูปที่ 4.1 การย่อยสลายสารอินทรีย์ของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารทดสอบชนิดต่างๆ โดยการทำ point inoculation บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน
 ก. อาหาร Skim milk agar ข. อาหาร Starch agar ค. อาหาร Tween 80 agar

ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ของเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์	รหัส ตัวอย่าง	อาหาร Skim Milk Agar ¹ (มิลลิเมตร)	อาหาร Starch Agar ² (มิลลิเมตร)	อาหาร Tween 80 Agar ³ (มิลลิเมตร)
แบคทีเรีย	SB11	--	--	6.9
	SB12	4.3	13.6	--
	SB13	1.2	3.1	--
	SB14	8.3	--	7.4
	SB15	4.1	33.4	10.2
	SB16	--	--	1.3
	SB17	7.2	--	3.6
	SB18	6.2	6.6	0.9
	SB21	0.8	--	4.7
	SB22	2.0	34.6	7.5
	SB23	24.4	34.0	--
	SB24	1.2	4.5	0.4
	SB25	2.1	6.2	--
	SB26	--	--	--
	SB27	12.5	--	--
	SB28	0.9	--	12.1
	SB31	0.7	9.7	5.6
	SB32	0.6	--	--
	SB33	1.4	13.4	--
	SB34	10.1	--	2.8
	SB35	2.5	2.2	2.8
	SB36	0.9	9.3	2.6
	SB37	0.9	10.2	--
	SB41	1.5	--	5.5
	SB42	0.9	--	1.7
	SB43	3.1	26.8	9.8
	SB44	--	--	2.1
	SB45	--	--	--

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ของเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์	รหัส ตัวอย่าง	อาหาร Skim Milk Agar ¹ (มิลลิเมตร)	อาหาร Starch Agar ² (มิลลิเมตร)	อาหาร Tween 80 Agar ³ (มิลลิเมตร)
	SB46	12.0	--	--
	SB47	3.2	8.3	3.4
	SB48	1.3	3.6	2.1
	SB51	--	4.2	3.0
	SB52	--	12.7	6.0
	SB53	0.7	11.0	2.9
	SB54	0.9	7.8	1.6
	SB55	--	--	0.8
	SB56	1.5	17.2	11.7
	SB61	0.9	0.5	--
	SB62	1.6	--	2.6
	SB63	--	17.4	--
	SB64	--	--	9.3
	SB65	1.8	4.2	--
	SB66	3.0	0.8	6.3
	SB67	2.3	--	--
	SB68	--	12.3	--
	SB69	--	--	1.1
	SB71	3.4	0.2	--
	SB72	4.6	--	2.0
	SB73	--	--	3.1
	SB74	--	12.9	--
	SB75	--	10.2	--
	SB76	2.5	1.8	--
	SB77	4.2	1.2	7.1
	SB78	4.7	--	--
	SB79	--	10.6	--

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ของเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์	รหัส ตัวอย่าง	อาหาร Skim Milk Agar ¹ (มิลลิเมตร)	อาหาร Starch Agar ² (มิลลิเมตร)	อาหาร Tween 80 Agar ³ (มิลลิเมตร)
	SB710	--	--	3.0
	SB711	--	0.7	--
	SB712	0.6	--	6.0
	SK81	--	16.4	2.2
	SK82	--	17.4	4.3
	SK83	--	14.5	3.8
	SK84	--	11.5	4.7
	SK85	1.9	10.0	1.9
	SK86	--	18.3	--
	SK87	0.2	--	--
	SK91	--	16.0	2.5
	SK92	--	13.6	--
	SK93	--	9.6	1.9
	SK94	--	14.1	--
	SK95	--	12.7	1.2
	SK96	1.7	--	--
	SK97	2.0	--	--
	SK98	--	3.9	--
	SK99	--	19.1	--
	SK101	--	16.9	3.1
	SK102	--	12.6	5.9
	SK103	--	--	3.5
	SK104	--	12.7	4.8
	SK105	--	11.1	4.7
	SK106	--	16.4	--
	SK107	2.6	--	3.6
	SK108	1.6	4.4	--
	SK109	--	10.2	6.2

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ของเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์	รหัส ตัวอย่าง	อาหาร Skim Milk Agar ¹ (มิลลิเมตร)	อาหาร Starch Agar ² (มิลลิเมตร)	อาหาร Tween 80 Agar ³ (มิลลิเมตร)
ยีสต์	YB11	2.6	7.6	6.5
	YB12	1.7	5.4	0.4
	YB13	2.0	5.9	4.0
	YB21	2.2	6.4	5.3
	YB22	0.4	--	--
	YB23	--	--	0.8
	YB31	0.7	6.2	0.8
	YB32	1.6	13.1	--
	YB33	--	1.4	1.8
	YB41	0.6	--	--
	YB42	--	9.6	0.4
	YB51	--	14.1	2.1
	YB52	--	12.5	--
	YB61	--	4.8	--
	YB62	2.0	3.2	1.2
	YB63	1.1	2.6	--
	YB64	--	--	0.2
	YB71	--	--	--
	YB72	--	2.2	1.5
	YB73	2.0	3.0	--
	YB74	1.7	3.5	--
	YK81	2.1	5.2	--
	YK82	--	--	--
	YK83	1.7	3.2	3.8
	YK91	0.3	4.2	4.0
	YK92	0.2	--	--
	YK93	--	--	1.7

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ของเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์	รหัส ตัวอย่าง	อาหารSkim Milk Agar ¹ (มิลลิเมตร)	อาหารStarch Agar ² (มิลลิเมตร)	อาหาร Tween 80 Agar ³ (มิลลิเมตร)
	YK101	--	1.3	2.2
	YK102	--	--	--
	YK103	0.4	2.4	--
<i>B. subtilis</i>		30.4	20.9	15.0
<i>B. circulans</i>		35.2	33.2	2.7
<i>B.lechinofomis</i>		29.5	34.5	8.7

หมายเหตุ ¹ หมายถึง ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนตรวจสอบได้จากการวัดผลต่างของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อและบริเวณใสรอบโคโลนี

² หมายถึง ความสามารถในการย่อยสลายแป้งตรวจสอบได้จากการละลายไอโอดีนวัดผลต่างของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อและบริเวณใสรอบโคโลนี

³ หมายถึง ความสามารถในการย่อยสลายไขมันตรวจสอบได้จากการวัดผลต่างของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อและตะกอนขุนขาวรอบโคโลนี

-- หมายถึง ไม่มีบริเวณใสหรือตะกอน

4.4.1 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรีย

4.4.1.1 ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากข้อ 4.3 มาทดสอบการย่อยสลายโปรตีน โดยใช้อาหารทดสอบ Skim Milk Agar เลี้ยงที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน เชื้อที่ย่อยสลายโปรตีนได้จะสังเกตจากบริเวณใสที่เกิดรอบโคโลนี ซึ่งเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ย่อยโปรตีนนมรอบๆโคโลนีจนหมด อาหารเลี้ยงเชื้อนี้จึงเหมาะสมที่จะใช้เป็นอาหารคัดเลือกเชื้อที่สามารถย่อยสลายโปรตีน เนื่องจากเห็นผลชัดเจนและรวดเร็ว ผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรียทั้งหมด 83 ไอโซเลท สามารถย่อยสลายโปรตีนได้ 46 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 55.42 ในจำนวนนี้มี 3 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนได้สูงสุด คือเชื้อรหัส SB23, SB27 และ SB46 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากน้ำบ่อกุ้งในอำเภอบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ และมีแบคทีเรีย 37 ไอโซเลทที่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีน คิดเป็นร้อยละ 44.58 ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรีย

เชื้อจุลินทรีย์	ชนิดของสารอินทรีย์	ความสามารถในการย่อยสลาย	จำนวนไอโซเลท	คิดเป็นร้อยละ
แบคทีเรีย	โปรตีน	+	46	55.42
		-	37	44.58
	แป้ง	+	53	63.86
		-	30	36.14
	ไขมัน	+	50	60.24
		-	33	39.76

หมายเหตุ + หมายถึง สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์

- หมายถึง ไม่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์

ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีน พบว่าแบคทีเรียรูปแท่งแกรมบวกสร้างสปอร์สามารถย่อยสลายโปรตีนได้ทุกไอโซเลท กลุ่มแบคทีเรียรูปแท่งแกรมบวกไม่สร้างสปอร์สามารถย่อยสลายโปรตีนได้น้อยกว่าในกลุ่มแรกมี 4 ไอโซเลทที่ย่อยสลายโปรตีนได้ อีก 2 ไอโซเลทย่อยสลายไม่ได้ แบคทีเรียรูปกลมแกรมบวกสามารถย่อยสลายโปรตีนได้ 3 ไอโซเลท ย่อยสลายโปรตีนไม่ได้ 6 ไอโซเลท ส่วนแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบพบว่าส่วนใหญ่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนได้มีเพียง 7 ไอโซเลทที่ย่อยสลายโปรตีนได้ ย่อยสลายไม่ได้ 29 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.7) แบคทีเรียที่ย่อยสลายโปรตีนได้ดีที่สุดคือ SB23 (บริเวณใส 24.4 มิลลิเมตร) เป็นแบคทีเรียรูปกลมแกรมบวก รองลงมาคือ เชื้อรหัส SB27 (บริเวณใส 12.5 มิลลิเมตร) และ SB46 (บริเวณใส 12.0 มิลลิเมตร) เป็นแบคทีเรียในกลุ่มรูปแท่งแกรมบวกสร้างสปอร์ จากรายงานของเปรมสุภา สมาน (2539) ได้ทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรียในดินก้นบ่อและในน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งในจังหวัดสงขลา นครศรีธรรมราช และฉะเชิงเทรา พบแบคทีเรียจำนวน 160 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้เชื้อรหัส S22, S25, P1, P3 และ P4 เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนได้ดีที่สุด จากการตรวจสอบลักษณะและสมบัติต่างๆ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มรูปแท่งแกรมบวกสร้างสปอร์ จุลินทรีย์ย่อยสลายโปรตีนได้โดยอาศัยเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ซึ่งจะย่อยสลายโปรตีนโมเลกุลใหญ่ให้เป็นเปปไทด์และกรดอะมิโน จากนั้นกรดอะมิโนจะถูกย่อยสลายต่อไปเป็นเอมีน กรดคีโต แอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์ แบงเอนไซม์โปรตีเอส ที่ได้จากจุลินทรีย์เป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ คือ แอซิดโปรตีเอส (acid Protease) ส่วนใหญ่ได้จากพวกเชื้อราและยีสต์ อัลคาลีนโปรตีเอส (alkaline protease) พบมากในแบคทีเรียตระกูล *Bacillus* sp และนิวทรัลโปรตีเอส (neutral protease) พบทั่วไปในแบคทีเรียและรา (Keay. 1971)

ตารางที่ 4.7 ลักษณะรูปร่าง การคิดสีแกรม ความสามารถในการสร้างสปอร์ และความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนบนอาหาร Skim Milk Agar ของแบคทีเรีย 83 ไอโซเลท

ความสามารถในการย่อยสลาย	จำนวนแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่างต่างๆ			
	รูปร่างแกรมบวกสร้างสปอร์	รูปร่างแกรมบวกไม่สร้างสปอร์	รูปกลมแกรมบวก	รูปร่างแกรมลบ
+	32	4	3	7
-	0	2	6	29
รวม	32	6	9	36

หมายเหตุ + หมายถึง สามารถย่อยสลายโปรตีน

- หมายถึง ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีน

4.4.1.2 ความสามารถในการย่อยสลายแป้ง

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากข้อ 4.3 มาทดสอบการย่อยสลายแป้ง โดยใช้อาหารทดสอบ Starch Agar เลี้ยงที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน สังเกตผลโดยเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อภายหลังรดด้วยสารละลายไอโอดีน วิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วในการทดสอบ แต่ในการตรวจผลนั้น ภายหลังที่รดด้วยสารละลายไอโอดีนควรตรวจผลทันที ไม่ควรทิ้งไว้นาน เนื่องจากสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นจะจางลงได้ ทำให้การตรวจผลไม่ชัดเจน ผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรียทั้งหมดสามารถย่อยสลายแป้งได้ 53 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 63.86 ในจำนวนนี้เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้สูงสุด คือ เชื้อรหัส SB22, SB23, SB15 และ SB43 ตามลำดับ โดยมีบริเวณใสที่เกิดขึ้นมากกว่า 30 มิลลิเมตร เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์แยกจากน้ำบ่อกึ่งในอำเภอบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ และแบคทีเรียจำนวน 30 ไอโซเลทที่ไม่สามารถย่อยสลายแป้งได้ คิดเป็นร้อยละ 36.14 ดังแสดงในตารางที่ 4.6

จากการศึกษาลักษณะรูปร่างการคิดสีแกรม ความสามารถในการสร้างสปอร์และ ความสามารถในการย่อยสลายแป้งของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียรูปร่างแกรมบวกสร้างสปอร์สามารถย่อยแป้งได้ 18 ไอโซเลท โดยเชื้อรหัส SB22 (บริเวณใส 34.6 มิลลิเมตร) มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแป้งได้สูงสุด รองลงมาคือ เชื้อรหัส SB15 (บริเวณใส 33.4 มิลลิเมตร) และ SB43 (บริเวณใส 26.8 มิลลิเมตร) ตามลำดับ และอีก 14 ไอโซเลทไม่สามารถย่อยสลายแป้งได้ กลุ่มแบคทีเรียรูปร่างแกรมบวกไม่สร้างสปอร์สามารถย่อยสลายแป้งได้ทุกไอโซเลทแต่ประสิทธิภาพน้อยกว่ากลุ่มแรก แบคทีเรียรูปกลมแกรมบวกพบในปริมาณน้อยและมีความสามารถในการย่อยสลายแป้งน้อย สามารถย่อยสลายแป้งได้ 5 ไอโซเลทและย่อยสลายไม่ได้ 4 ไอโซเลท แต่มีเชื้อรหัส SB23 ที่สามารถย่อยสลายแป้งได้ดี (บริเวณใส

34.0 มิลลิเมตร) ส่วนแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบมี 24 ไอโซเลทที่ย่อยสลายแป้งได้ อีก 12 ไอโซเลทที่ย่อยสลายแป้งไม่ได้ (ตารางที่ 4.8) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของสมพร ธนวิริยะกุล (2535) พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากดินก้นบ่อเลี้ยงกุ้งจำนวน 151 ไอโซเลท แบคทีเรียรูปแท่งแกรมบวกสร้างสปอร์เป็นกลุ่มที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายแป้งได้ดีที่สุด ส่วนแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายแป้งในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น การย่อยสลายแป้งเกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์อะไมเลส (amylase) ซึ่งจะย่อยสลายพันธะแอลฟา 1,4 กลูโคซิดิกของพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น แป้ง ไกลโคเจนหรือโอลิโกแซ็กคาไรด์ กลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้แก่ *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Bacillus* sp. เป็นต้น (Windish and Mhatre. 1965)

ตารางที่ 4.8 ลักษณะรูปร่าง การติดสีแกรม ความสามารถในการสร้างสปอร์ และความสามารถในการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Starch Agar ของแบคทีเรีย 83 ไอโซเลท

ความสามารถในการย่อยสลาย	จำนวนแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่างต่างๆ			
	รูปแท่งแกรมบวกสร้างสปอร์	รูปแท่งแกรมบวกไม่สร้างสปอร์	รูปกลมแกรมบวก	รูปแท่งแกรมลบ
+	18	6	5	24
-	14	0	4	12
รวม	32	6	9	36

หมายเหตุ + หมายถึง สามารถย่อยสลายแป้ง

- หมายถึง ไม่สามารถย่อยสลายแป้ง

4.4.1.3 ความสามารถในการย่อยสลายไขมัน

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากข้อ 4.3 มาทดสอบการย่อยสลายไขมัน โดยใช้อาหารทดสอบ Tween 80 Agar เลี้ยงที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน สังเกตการย่อยสลาย Tween 80 ซึ่งเป็นแหล่งไขมันในอาหารจากตะกอนขุนขาวที่เกิดขึ้นรอบๆโคโลนี เนื่องจากแคลเซียมที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำปฏิกิริยากับกรดไขมันที่เกิดจากการย่อยสลายของเชื้อจุลินทรีย์เกิดเป็น calcium soap จึงเห็นเป็นตะกอนขุนขาวในอาหารวุ้น ผลการทดสอบพบว่า มีแบคทีเรีย 50 ไอโซเลทที่สามารถย่อยสลายไขมันได้คิดเป็นร้อยละ 60.24 แต่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันได้น้อย (เกิดบริเวณใสเล็กน้อย) เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันได้สูงสุด คือ เชื้อรหัส SB56, SB15 และ SB43 ตามลำดับ โดยเป็นเชื้อที่แยกได้จากน้ำบ่อกุ้งในอำเภอบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ ส่วนแบคทีเรียอีก 33 ไอโซเลทไม่สามารถย่อยสลายไขมันคิดเป็นร้อยละ 39.76 ดังแสดงในตารางที่ 4.6

จากการศึกษาลักษณะรูปร่างการติดสีแกรม ความสามารถในการสร้างสปอร์และ ความสามารถในการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียกลุ่มรูปแท่งแกรมบวกสร้าง สปอร์ รูปแท่งแกรมบวกไม่สร้างสปอร์ รูปกลมแกรมบวก และรูปแท่งแกรมลบมีเชื้อที่ สามารถย่อยสลายไขมันได้จำนวน 18, 3, 4 และ 25 ไอโซเลท ตามลำดับ ส่วนเชื้อที่เหลือ จำนวน 33 ไอโซเลท ไม่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน (ตารางที่ 4.9) ซึ่งสอดคล้องกับ การศึกษาของสมพร ธนวิริยะกุล (2535) พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากดินก้นบ่อเลี้ยงกุ้งจำนวน 151 ไอโซเลท เชื้อทั้งหมดที่แยกได้มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายไขมันได้น้อย มาก การย่อยสลายไขมันเกิดโดยเอนไซม์ไลเปส (lipase) ไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโมเลกุล ของไตรกลีเซอไรด์ ได้กลีเซอรอล กรดไขมัน และ partial glycerides โดยที่ไลเปสจะเร่ง ปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ (ester bond) ที่พันธะระหว่างกรดไขมันโมเลกุลยาวกับ กลีเซอรอลของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ไลเปสจะทำปฏิกิริยาดังกล่าวได้เมื่อไตรกลีเซอไรด์อยู่ใน สภาพ oil-water interface (Jensen. 1983)

ตารางที่ 4.9 ลักษณะรูปร่าง การติดสีแกรม ความสามารถในการสร้างสปอร์ และความสามารถ ในการย่อยสลายไขมันบนอาหาร Tween 80 Agar ของแบคทีเรีย 83 ไอโซเลท

ความสามารถใน การย่อยสลาย	จำนวนแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่างต่างๆ			
	รูปแท่งแกรมบวก สร้างสปอร์	รูปแท่งแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์	รูปกลมแกรมบวก	รูปแท่งแกรมลบ
+	18	3	4	25
-	14	3	5	11
รวม	32	6	9	36

หมายเหตุ + หมายถึง สามารถย่อยสลายไขมัน

- หมายถึง ไม่สามารถย่อยสลายไขมัน

4.4.2 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ของยีสต์

นำเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากข้อ 4.3 มาทดสอบการย่อยสลายโปรตีน แป้ง และไขมัน โดยใช้อาหารทดสอบ Skim Milk Agar, Starch Agar และ Tween 80 Agar เลี้ยงที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน จากการทดลองพบว่ามีเชื้อที่สามารถย่อยสลายโปรตีน แป้ง และไขมันมี จำนวน 17 (ร้อยละ 56.67), 20 (ร้อยละ 66.67) และ 16 (ร้อยละ 53.33) ตามลำดับ ส่วนเชื้อจำนวน 13, 10 และ 14 ไอโซเลท ไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อย สลายอาหารทดสอบ โดยคิดเป็นร้อยละ 43.33, 33.34 และ 46.66 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10)

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มแบคทีเรียพบว่า ยีสต์มีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้น้อยกว่า (Horan. 1990)

ตารางที่ 4.10 ความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ของยีสต์

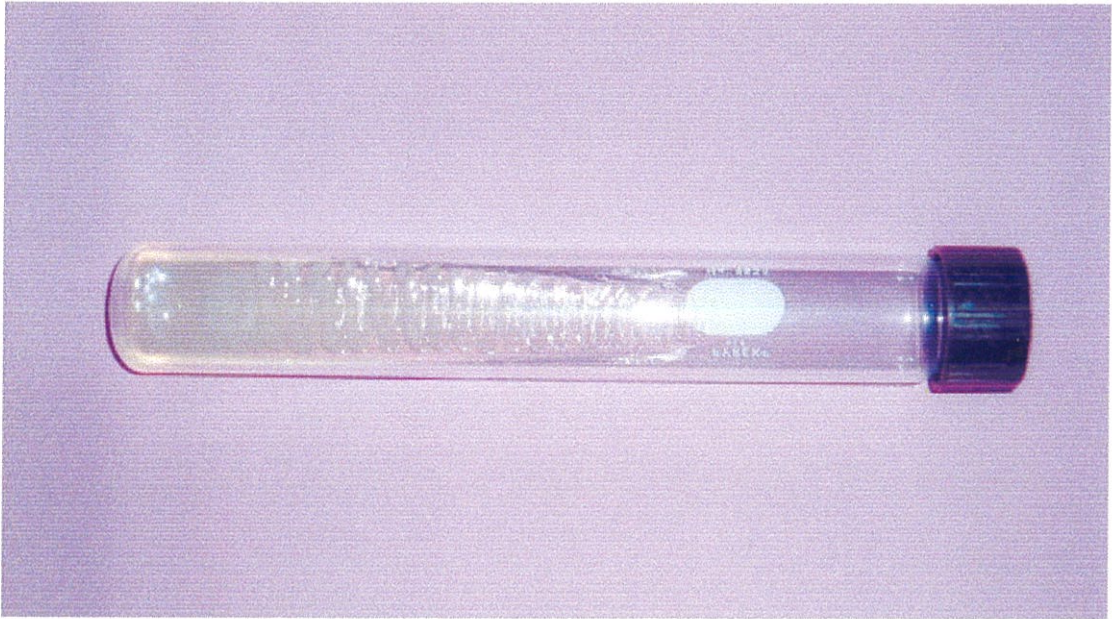
เชื้อจุลินทรีย์	ชนิดของสารอินทรีย์	ความสามารถในการย่อยสลาย	จำนวนไอโซเลท	คิดเป็นร้อยละ
ยีสต์	โปรตีน	+	17	56.67
		-	13	43.33
	แป้ง	+	20	66.67
		-	10	33.34
	ไขมัน	+	16	53.33
		-	14	46.66

หมายเหตุ + หมายถึง สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์

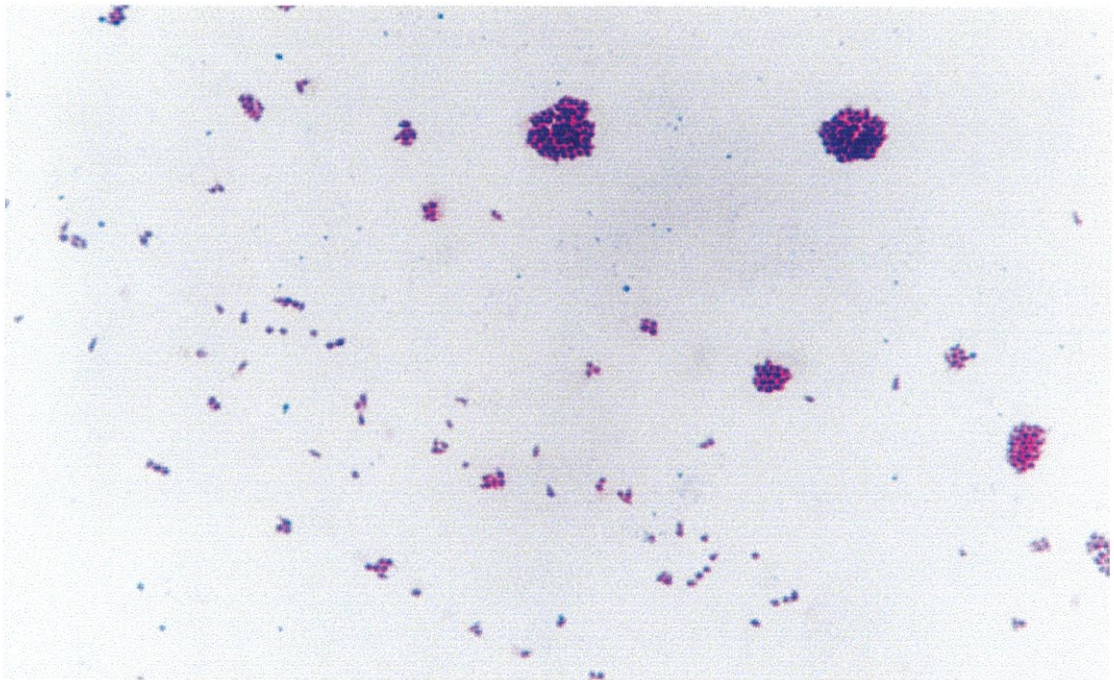
- หมายถึง ไม่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์

4.5 หลักในการคัดเลือกจุลินทรีย์

หลักในการคัดเลือกจุลินทรีย์จะเลือกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายโปรตีนได้ดีเป็นหลัก เนื่องจากมีรายงานว่าสารอินทรีย์ที่ตกค้างในบ่อเลี้ยงกุ้ง ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากอาหารกุ้งที่กินเหลือ (Millamena. 1990) โดยส่วนประกอบหลักของอาหารกุ้งเป็นสารพวกโปรตีน จากผลการทดลองสามารถคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญได้อย่างรวดเร็ว และมีการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดีที่สุด 3 สายพันธุ์ คือ SB23, SB 27 และ SB46 เป็นเชื้อที่ได้จากตัวอย่างน้ำในอำเภอบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ โดยเชื้อรหัส SB23 ย่อยสลายโปรตีนและแป้งได้ดี (รูปที่ 4.2) เชื้อรหัส SB 27 (รูปที่ 4.3) และ SB46 (รูปที่ 4.4) ย่อยสลายโปรตีนได้ดี แต่เชื้อที่คัดเลือกได้นี้ยังมีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้น้อยกว่าแบคทีเรียควบคุมทั้ง 3 ชนิด



ก



ข

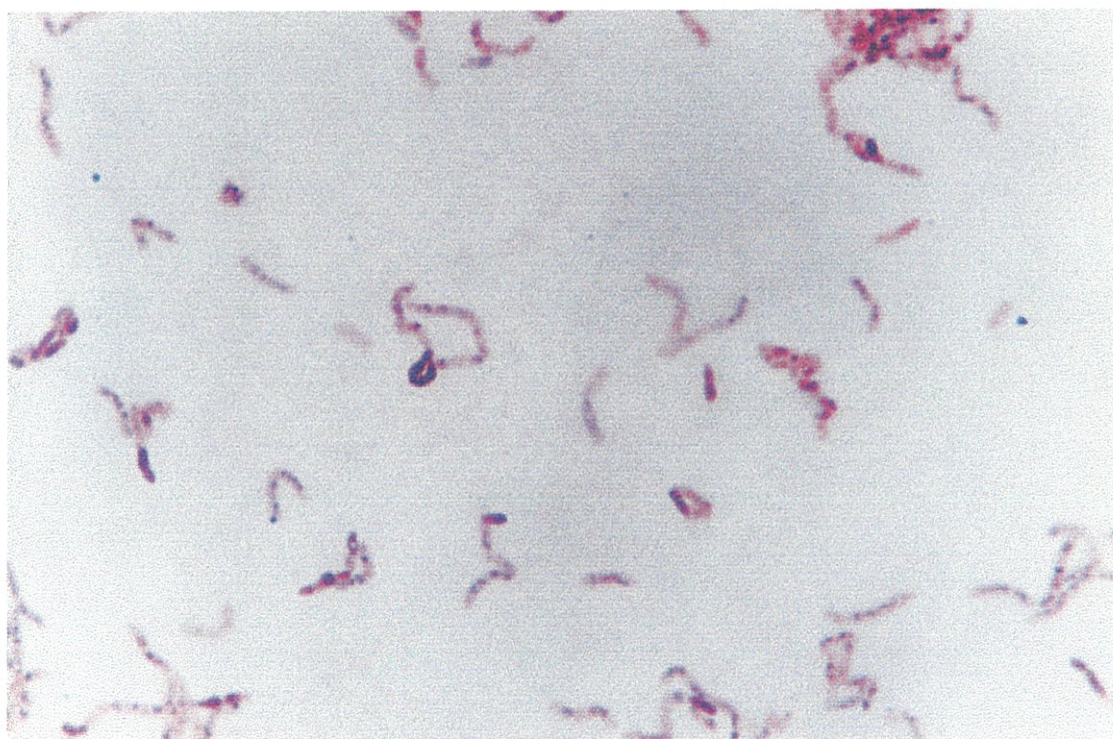
รูปที่ 4.2 ลักษณะและรูปร่างของแบคทีเรียรหัส SB23

ก. ลักษณะของแบคทีเรียบนอาหาร NA

ข. รูปร่างของแบคทีเรีย (ภาพถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า)



ก

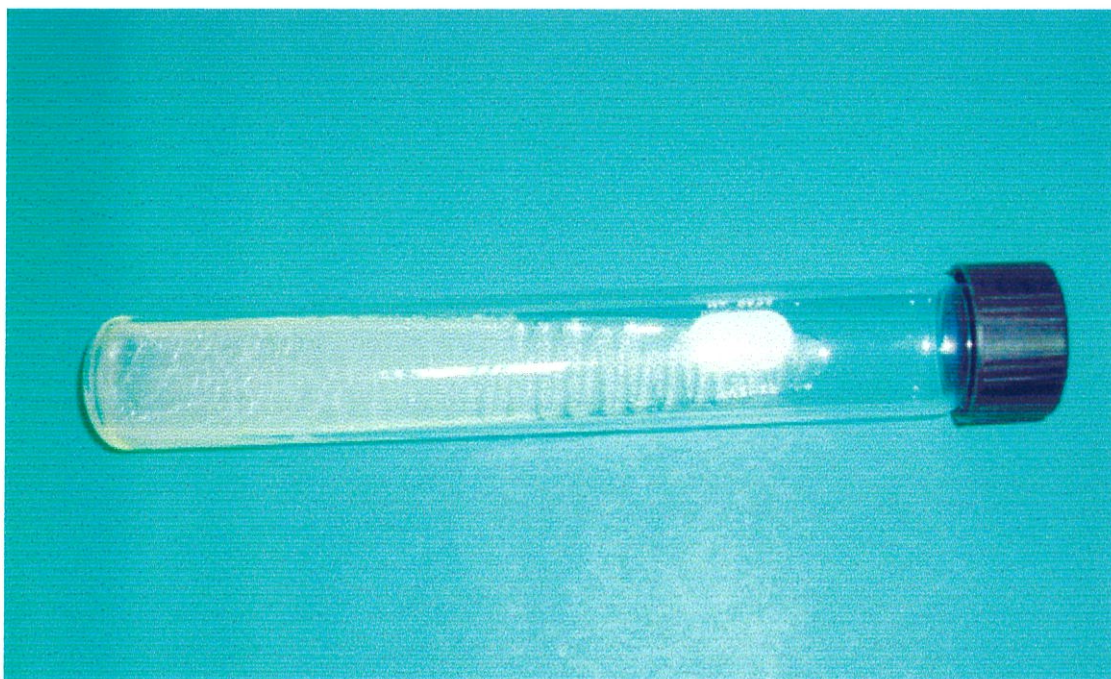


ข

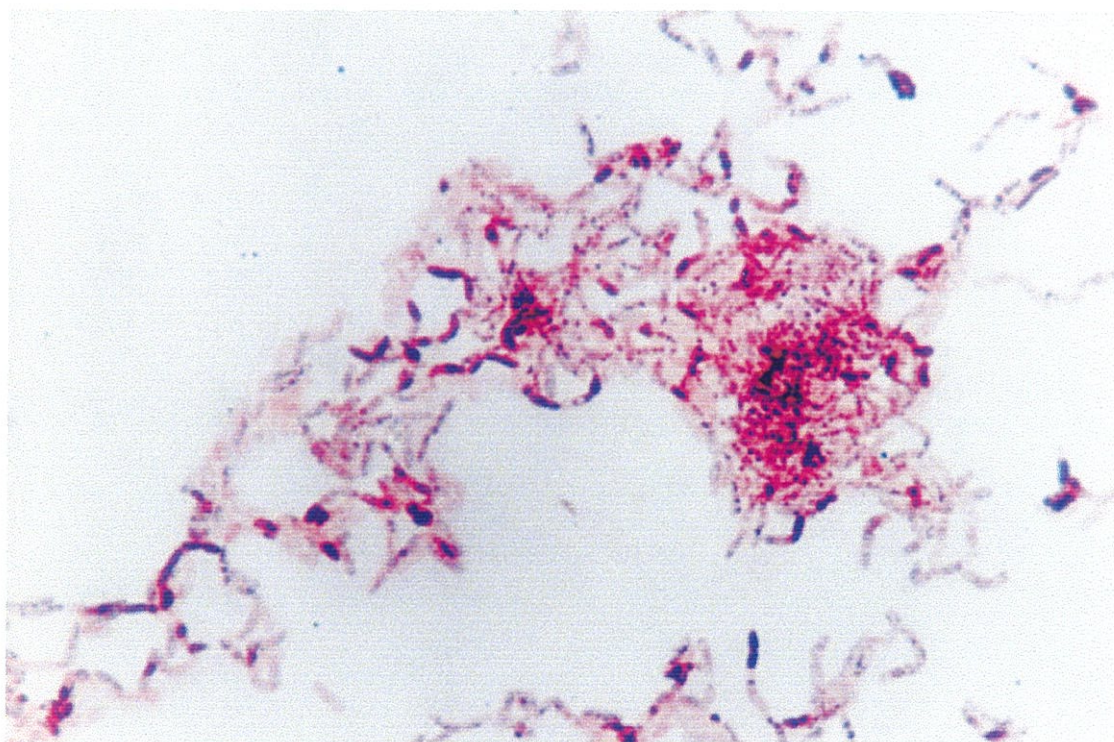
รูปที่ 4.3 ลักษณะและรูปร่างของแบคทีเรียหัด SB27

ก. ลักษณะของแบคทีเรียบนอาหาร NA

ข. รูปร่างของแบคทีเรีย (ภาพถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า)



ก



ข

รูปที่ 4.4 ลักษณะและรูปร่างของแบคทีเรียหัด SB46

ก. ลักษณะของแบคทีเรียบนอาหาร NA

ข. รูปร่างของแบคทีเรีย (ภาพถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า)

4.6 การจำแนกลักษณะและศึกษาสมบัติบางประการของเชื้อที่คัดเลือกได้

เมื่อนำแบคทีเรียสายพันธุ์ SB23, SB 27 และ SB46 ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดี มาทำการจำแนกลักษณะทางสรีรวิทยา สมบัติทางชีววิทยาและชีวเคมีบางประการพบว่า สายพันธุ์ SB23 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ส่วนสายพันธุ์ SB 27 และ SB46 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง สร้างสปอร์ เมื่อทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีของเบอร์เกีย (Bergey' Manual of Systematic Bacteriology) (Sneath *et al.* 1986) แสดงผลดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ลักษณะการเจริญและการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ SB23, SB 27 และ SB46

ลักษณะ	SB23	SB27	SB46
โคโลนี	สีเหลือง ผิวหน้าเรียบ ไม่มัน รูปร่างกลม	สีขาว ผิวหน้าเรียบ ไม่มัน รูปร่างกลม	สีขาว ผิวหน้าเรียบ ไม่มัน รูปร่างกลม
รูปร่าง	กลม	แท่ง	แท่ง
แกรม	บวก	บวก	บวก
การเคลื่อนที่	ไม่เคลื่อนที่	เคลื่อนที่	เคลื่อนที่
การสร้างสปอร์	ไม่สร้างสปอร์	สร้าง	สร้าง
แคตาเลส	+	+	+
ออกซิเดส	-	-	-
การสร้างอินโดล	-	-	-
การใช้ซิเตรท	-	-	-
การทดสอบเมทิลเรด	-	-	-
การทดสอบเมทิลคาร์บินอล	-	-	-
การสร้างยูรีเอส	-	-	-
การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์	-	-	-
การย่อยสลายโปรตีน	+	+	+
การย่อยสลายแป้ง	+	-	-
การย่อยสลายไขมัน	-	-	-

ตารางที่ 4.11 (ต่อ) ลักษณะการเจริญและการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ SB23, SB 27 และSB46

ลักษณะ	SB23	SB27	SB46
การใช้น้ำตาล			
กลูโคส	+	+	+
กาแลกโทส	-	-	-
เดกซ์โทส	-	+	+
ซูโครส	+	-	-
มอลโทส	+	+	+
แลคโทส	-	-	-
ราฟฟิโนส	+	+	+
อร่าบิโนส	-	-	-
การเจริญที่อุณหภูมิ ต่างๆ (องศาเซลเซียส)			
20	+	+	+
30	+	+	+
40	+	+	+
50	+	+	+
60	-	-	-
การเจริญที่พีเอชต่างๆ			
4.0	-	-	-
5.0	+	-	-
6.0	+	+	+
7.0	+	+	+
8.0	+	+	+
9.0	+	+	+
10.0	+	+	+

หมายเหตุ + หมายถึง เชื้อเจริญหรือเกิดปฏิกิริยา

- หมายถึง เชื้อไม่เจริญหรือไม่เกิดปฏิกิริยา

จากการจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธี partial 16S rDNA sequence analysis ที่โครงการพัฒนาวิชาการ KU-VECTOR ศูนย์พัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีร่วมเอกชน (สรอ.) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พบว่าเชื้อรหัส SB23 (มีลำดับเบสชนิดเอ็นเอคังรูปที่ 4.5) คือ *Knoellia sinensis* DSM12331 ส่วนเชื้อรหัส SB 27 (มีลำดับเบสชนิดเอ็นเอคังรูปที่ 4.6) และ SB46 (มีลำดับเบสชนิดเอ็นเอคังรูปที่ 4.7) คือ *Bacillus* sp. DIT030428

จากรายงานของ Groth *et al.* (2002) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินในถ้ำประเทศจีน พบแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Actinobacteria ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้พบทั่วไปในดินและในน้ำจืด จากการตรวจสอบพบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์มีรูปร่างเป็นทรงกลม แกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เจริญในสภาวะที่มีอากาศ และใช้สารประกอบอินทรีย์ในการเติบโต เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยวิธี partial 16S rDNA sequence Analysis พบว่าแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์มีลักษณะใกล้เคียงระหว่างจันัส *Janibacteria* และ *Tetrasphaera* แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและคุณสมบัติทางเคมีใกล้เคียงกัน จึงได้เสนอให้ทั้ง 2 สายพันธุ์อยู่ในจันัสใหม่ คือ *Knoellia sinensis* HKI 0119T และ *Knoellia sinensis* HKI 0120T ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์มีลำดับเบสชนิดเอ็นเอคล้ายกับ *Knoellia sinensis* DSM 12331T และ *Knoellia sinensis* DSM 12332T ในรายงานของ Stackebrandt (2000) ประเทศเยอรมัน

รายงานของ Zhang and Fang (2003) ทำการแยกแบคทีเรียจากแหล่งน้ำดื่มธรรมชาติในประเทศจีน พบแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่จัดอยู่ในจันัส *Bacillus* sp. ให้ชื่อสายพันธุ์นี้ว่า *Bacillus* sp. DIT 030428 ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. สามารถแยกได้ตามแหล่งน้ำธรรมชาติทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม รวมทั้งในดินตะกอนต่างๆ (Taylor and Richardson. 1979) แบคทีเรีย *Bacillus* sp. มีความสามารถสูงในการย่อยสลายสารอินทรีย์ มีการเจริญอย่างรวดเร็วทนต่อภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้ดีและสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด โดย Sonenshein *et al.* (1993) รายงานว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. จะเป็นแหล่งสร้างเอนไซม์ที่สำคัญ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้มากมาย รวมทั้งอุตสาหกรรมบำบัดน้ำเสีย จากรายงานของเปรมสุดาสมาน (2539) ได้คัดเลือกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินและน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งในจังหวัดฉะเชิงเทรา สงขลา และนครศรีธรรมราช พบว่าแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดีเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp.

ATTGGGCGTA	AAGAGCTTGT	AGGCGGCTTT	TCGCGTCTGC
TGTGAAAATC	CGAGGCTCAA	CCTCGGACTT	GCAGTGGGTA
CGGGCAGGCT	AGAGTGTGGT	AGGGGAGACT	GGAATTCCTG
GTGTAGCGGT	GAAATGCGCA	GATATCAGGA	GGAACACCGA
TGGCGAAGGC	AGGTCTCTGG	GCCATAACTG	ACGCTGAGAA
GCGAAAGCAT	GGGGAGCGAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA
GTCCATGCCG	TAAACGTTGG	GCGCTAGGTG	TGGGACCCAT
TCCACGGGTT	CCGTGCCGCA	GCTAACGCAT	TAAGCGCCCC
GCCTGGGGAG	TACGGCCGCA	AGGCTAAAAC	TCAAAGGAAT
TGACGGGGGC	CCGCACAAGC	GGCGGAGCAT	GCGGATTTAA
TCGATGCAAC	GCGAAGAACC	TTACCAAGGC	TTGACATACA
CCGGAAACAT	CCAGAGATGG	GTGCCCCGCA	AGGTCGGTGT
ACAGGTGGTG	CATGGTTGTC	GTCAGCTCGT	GTCGTGAGAT
GTTGGGTAA	GTCCCGCAAC	GAGCGCAACC	C

รูปที่ 4.5 ลำดับเบสบนดีเอ็นเอของแบคทีเรียรหัส SB23

ATTGGGCGTA	AAGCGCGCGC	AGGCGGTTC	TTAAGTCTGA
TGTGAAAGCC	CACGGCTCAA	CCGTGGAGGG	TCATTGGAAA
CTGGGGGACT	TGAGTGCAGG	AGAGAAAAGT	GGAATTCCAC
GTGTAGCGGT	GAAATGCGTA	GAGATGTGGA	GGAACACCAG
TGGCGAAGGC	GGCTTTTTGG	CCTGTAACTG	ACGCTGAGGC
GCGAAAGCGT	GGGGAGCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA
GTCCACGCCG	TAAACGATGA	GTGCTAGGTG	TTGGGGGGTT
CCACCCTCAG	TGCTGACGTT	AACACATTAA	GCACTCCGCC
TGGGGAGTAC	GGCCGCAAGG	CTGAAACTCA	AAGGAATTGA
CGGGGGCCCG	CACAAGCAGT	GGAGCATGTG	GTTTAATTCG
AAGCAACGCG	AAGAACCTTA	CCAGGTCTTG	ACATCCTCTG
ACCACTTGAG	AGATCAAGCT	TTCCCCTTCG	GGGGACAGAG
TGACAGGTGG	TGCATGGTTG	TCGTCAGCTC	GTGTCGTGAG
ATGTTGGGTT	AAGTCCCGCA	ACGAGCGCAA	CCC

รูปที่ 4.6 ลำดับเบสบนดีเอ็นเอของแบคทีเรียรหัส SB27

ATTGGGCGTA	AAGCGCGCGC	AGGCGGTTCC	TTAAGTCTGA
TGTGAAAGCC	CACGGCTCAA	CCGTGGAGGG	TCATTGGAAA
CTGGGGGACT	TGAGTGCAGG	AGAGAAAAGT	GGAATTCCAC
GTGTAGCGGT	GAAATGCGTA	GAGATGTGGA	GGAACACCAG
TGGCGAAGGC	GGCTTTTTGG	CCTGTAACTG	ACGCTGAGGC
GCGAAAGCGT	GGGGAGCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA
GTCCACGCCG	TAAACGATGA	GTGCTAGGTG	TTGGGGGGTT
CCACCCTCAG	TGCTGACGTT	AACACATTAA	GCACTCCGCC
TGGGGAGTAC	GGCCGCAAGG	CTGAAACTCA	AAGGAATTGA
CGGGGGCCCG	CACAAGCAGT	GGAGCATGTG	GTTTAATTCG
AAACAACGCG	AAGAACCTTA	CCAGGTCTTG	ACATCCTCTG
ACCACTTGAG	AGATCAAGCT	TTCCCCTTCG	GGGGACAGAG
TGACAGGTGG	TGCATGGTTG	TCGTCAGCTC	GTGTCGTGAG
ATGTTGGGTT	AAGTCCCGCA	ACGAGCGCAA	CCC

รูปที่ 4.7 ลำดับเบสบนดีเอ็นเอของแบคทีเรียรหัส SB46

4.7 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเลี้ยงกุ้ง

จากการทดสอบการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้แบบ *in vitro* โดยใช้น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำอายุ 3 เดือนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติมอาหารกุ้ง 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำมาหาค่า COD ซึ่งเป็นวิธีทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่สะดวก รวดเร็ว และให้ผลที่แน่นอน ในการทดลองนี้เลือกใช้อาหารกุ้ง 1 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมีรายงานว่าสารอินทรีย์ที่เป็นสาเหตุให้สภาพน้ำเน่าเสียมากที่สุดคืออาหารกุ้ง (Millamena. 1990) และรายงานของเปรมสุภา สมาน (2539) ทำการวัดประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นของอาหารกุ้ง 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียผสมสามารถลดปริมาณสารอินทรีย์ตั้งต้นภายในเวลา 7 วันได้ 88, 88 และ 84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณสารอินทรีย์ที่มากเกินไปจะทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ลดลง ประกอบกับสถานะนี้อาจมีการสร้างสารที่เป็นพิษต่อการเจริญของแบคทีเรียทำให้จำนวนเซลล์ลดลง (Pahm and Alexander. 1993) โดยการทดลองนี้เปรียบเทียบผลระหว่างการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกับแบคทีเรียผสม โดยมีชุดควบคุม คือ น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่เติมแบคทีเรียกับน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่เติมแบคทีเรีย

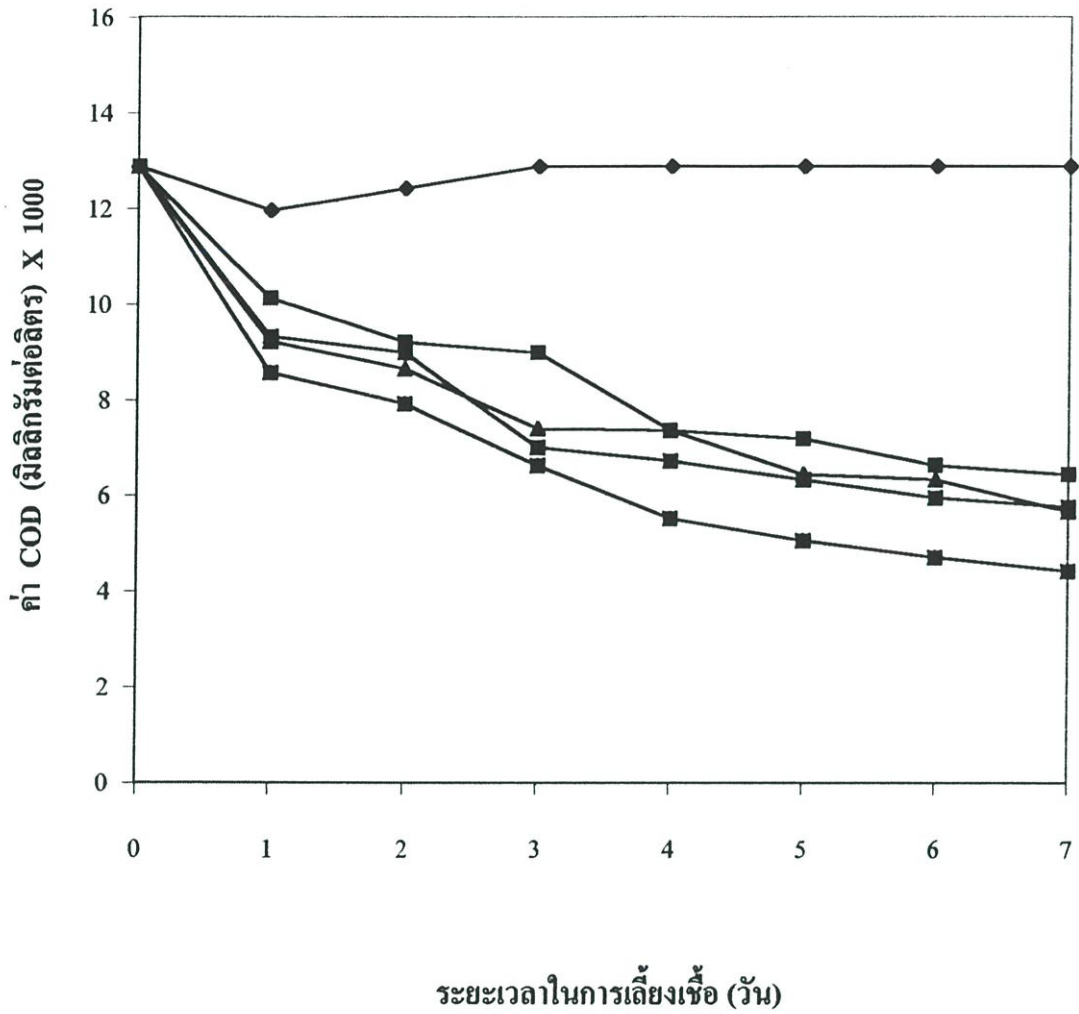
ผลการทดลองพบว่าค่า COD (ตารางที่ 4.12) ของการทดลองที่ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกับแบคทีเรียผสมต่างก็ลดลงทุกชุดการทดลอง (รูปที่ 4.8) โดยลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 1-3 วันแรกและจะลดน้อยลงไปเรื่อยๆ จนครบ 7 วัน การทดลองที่เติมแบคทีเรีย *Knoellia sinensis* DSM12331 และเติมแบคทีเรีย *Bacillus* sp. DIT030428 มีค่า COD ใกล้เคียงกันเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แบคทีเรียผสมมีค่า COD ต่ำกว่าสายพันธุ์เดียว เมื่อนำไปเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงของค่า COD ในเวลา 7 วัน (รูปที่ 4.9) พบว่าการทดลองที่ใช้แบคทีเรียผสมมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของค่า COD สูงกว่าการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์เดียวตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยค่า COD สามารถลดลงได้ประมาณ 66 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7 ของการเลี้ยง ส่วนการทดลองที่เติม *Knoellia sinensis* DSM12331 และ *Bacillus* sp. DIT030428 ค่า COD สามารถลดลงได้ใกล้เคียงกันคือ ประมาณ 56 และ 55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในชุดควบคุม คือน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่เติมแบคทีเรีย พบว่าค่า COD ในน้ำไม่มีการลดลงตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงวันที่ 7 ส่วนในชุดที่น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่เติมแบคทีเรีย พบว่าค่า COD สามารถลดได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ จากการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การลดลงของค่า COD ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าการใช้

แบคทีเรียผสมให้ผลเปอร์เซ็นต์การลดลงของค่า COD แตกต่างจากการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์เดียว ส่วนการใช้ *Knoellia sinensis* DSM12331, *Bacillus* sp. DIT030428 และชุดควบคุมคือน้ำไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่เติมแบคทีเรียให้ผลเปอร์เซ็นต์การลดลงของค่า COD ไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.13 และ 4.14)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้แบคทีเรียเพียงสายพันธุ์เดียวในการย่อยสลายสารอินทรีย์จะมีอัตราการย่อยสลายไม่ดีเท่ากับเมื่อเพิ่มแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นเข้าไปด้วย การย่อยสลายจะดีขึ้นคือค่า COD สามารถลดได้มากกว่าการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์เดียว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของเปรมสุดา สมาน (2539) โดยนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาทดสอบการย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยผสมเชื้อที่ละสายพันธุ์เข้าด้วยกันจนครบ 5 สายพันธุ์ ในน้ำเสียเทียมที่ประกอบด้วยน้ำทะเลผสมอาหารกุ้ง 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ที่ผสมในอัตราส่วน 1:1:1:1:1 จะสามารถลดปริมาณสารอินทรีย์ได้ดีที่สุดคือสามารถลดลงได้ 88 เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา 7 วัน การที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ มีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อนำแต่ละสายพันธุ์มาผสมกันทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ดีขึ้น โดย Stoner (1994) กล่าวว่าอัตราการเจริญและการย่อยสลายสารต่างๆ จะมีความถี่สูงขึ้นเมื่อใช้จุลินทรีย์หลายชนิดผสมกัน โดยจุลินทรีย์ที่ผสมกันนั้นจะมีความสัมพันธ์กันทางเมแทบอลิซึม ทำให้การย่อยสลายสมบูรณ์แบบยิ่งขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Steffesen และ Alexander (1995) ที่ได้ใช้แบคทีเรียหลายชนิดผสมกันทำให้อัตราการย่อยสลายคราบไขมันและสารประกอบฟีนอลลดลงอย่างรวดเร็ว ส่วนในชุดควบคุม คือน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่เติมแบคทีเรีย พบว่าสารอินทรีย์ในน้ำไม่มีการลดลงตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงวันที่ 7 เนื่องจากไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ลงไปย่อยสารอาหารกุ้ง ส่วนในชุดที่น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่เติมแบคทีเรีย พบว่าสามารถลดปริมาณสารอินทรีย์ได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ซึ่งผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกับชุดที่ใช้สายพันธุ์เดียว อาจเนื่องมาจากในน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งมีเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติอยู่และมีอยู่หลายชนิด แต่เชื้อเหล่านั้นอาจยับยั้งการเจริญกันเองหรือเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายอินทรีย์ไม่ดีเท่าที่ควร

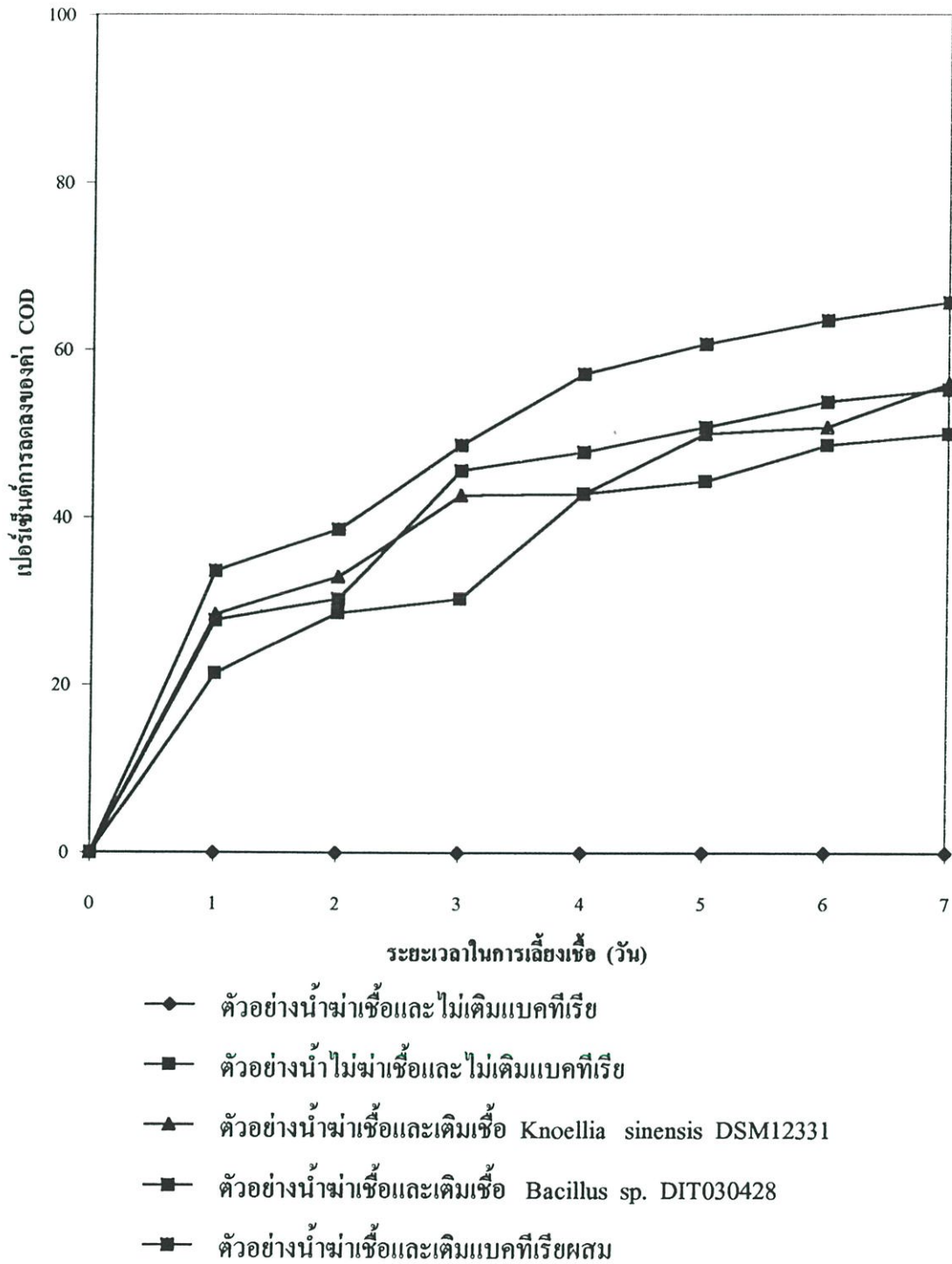
ตารางที่ 4.12 ค่า COD เฉลี่ยของน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ หลังการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยว
แบคทีเรียผสมและไม่เติมแบคทีเรีย เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 7 วัน

แบคทีเรีย	ค่า COD (มิลลิกรัมต่อลิตร) X 1000							
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และไม่เติม แบคทีเรีย	12.88	11.96	12.42	12.88	12.88	12.88	12.88	12.88
น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง ที่ไม่ผ่านการฆ่า เชื้อและไม่เติม แบคทีเรีย	12.88	10.12	9.20	8.98	7.36	7.18	6.62	6.44
น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และเติมเชื้อ <i>Knoellia sinensis</i> DSM12331	12.88	9.22	8.64	7.39	7.36	6.44	6.34	5.66
น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และเติมเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. DIT030428	12.88	9.31	8.98	7.01	6.72	6.34	5.95	5.76
น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และเติมแบคทีเรีย ผสม	12.88	8.56	7.91	6.62	5.52	5.06	4.70	4.42



- ◆— ตัวอย่างน้ำฆ่าเชื้อและไม่เติมแบคทีเรีย
- ตัวอย่างน้ำไม่ฆ่าเชื้อและไม่เติมแบคทีเรีย
- ▲— ตัวอย่างน้ำฆ่าเชื้อและเติมเชื้อ *Knoellia sinensis* DSM12331
- ตัวอย่างน้ำฆ่าเชื้อและเติมเชื้อ *Bacillus* sp. DIT030428
- ตัวอย่างน้ำฆ่าเชื้อและเติมแบคทีเรียผสม

รูปที่ 4.8 ค่า COD ของน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำผสมอาหารกุ้ง 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หลังการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์เดียว แบคทีเรียผสมและไม่เติมแบคทีเรีย ปริมาณ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.9 เปอร์เซ็นต์การลดลงของค่า COD หลังการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์เดียว แบคทีเรียผสมและไม่เติมแบคทีเรีย เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเวลา 7 วัน

ตารางที่ 4.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การลดลงของค่า COD ในเวลา 7 วัน

แหล่งความแปรผัน	df	SS	MS	F
ชนิดของแบคทีเรีย	4	8114.487	2028.622	177.804*
ความคลาดเคลื่อน	10	114.093	11.409	
ผลรวม	14	8228.580		

หมายเหตุ * หมายถึง ความแตกต่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4.14 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การลดลงของค่า COD ในเวลา 7 วัน

แบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การลดลงของค่าซีโอดี ในเวลา 7 วัน
น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ เติมแบคทีเรีย	0 ^c
น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและ ไม่เติมแบคทีเรีย	50 ^b
น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อและ เติม <i>Knoellia sinensis</i> DSM12331	56 ^b
น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อและ เติม <i>Bacillus</i> sp. DIT030428	55 ^b
น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อและ เติมแบคทีเรียผสม	66 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง เปอร์เซ็นต์การลดลงของค่า COD ไม่มีความแตกต่างกันที่
ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง เปอร์เซ็นต์การลดลงของค่า COD มีความแตกต่างกันที่
ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาค่าในอำเภอบางบ่อ และอำเภอคลองสวน จังหวัดสมุทรปราการ 10 บ่อ พบว่าอุณหภูมิของน้ำมีค่าระหว่าง 29 - 31 องศาเซลเซียส พีเอชมีค่าระหว่าง 7.89 - 8.36 น้ำไม่มีความเค็ม ค่าบีโอดีของน้ำอยู่ระหว่าง 5.2 - 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าซีโอดีมีค่าระหว่าง 440 - 3,520 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. การตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำทั้งหมดโดยวิธี Standard plate count พบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมีค่าระหว่าง $1.72 \times 10^3 - 8.10 \times 10^4$ CFUต่อมิลลิลิตร และปริมาณยีสต์และราทั้งหมดมีค่าระหว่าง 5.5 - 25.5 CFUต่อมิลลิลิตร

3. การแยกเชื้อที่ได้จากตัวอย่างน้ำทั้งหมด พบแบคทีเรียจำนวน 83 ไอโซเลทแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ แบคทีเรียรูปแท่งดิดีแกรมบวกสร้างสปอร์ 32 ไอโซเลท แบคทีเรียรูปแท่งดิดีแกรมบวกไม่สร้างสปอร์ 6 ไอโซเลท แบคทีเรียรูปกลมดิดีแกรมบวก 9 ไอโซเลท และแบคทีเรียรูปแท่งดิดีแกรมลบ 36 ไอโซเลท ส่วนเชื้อราและยีสต์พบ 42 ไอโซเลท แบ่งเป็นเชื้อรา 12 ไอโซเลทและยีสต์ 30 ไอโซเลท

4. จากเชื้อบริสุทธิ์ทั้งหมดที่แยกได้ สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ย่อยสลายสารอินทรีย์คือ โปรตีน แป้ง และไขมันได้ดีที่สุด 3 สายพันธุ์ คือ แบคทีเรียรหัส SB23 SB27 และ SB46 โดยแบคทีเรียทั้งหมดแยกได้จากน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งในอำเภอบางบ่อ เชื้อรหัส SB23 ย่อยสลายโปรตีนและแป้งได้ดี ส่วนเชื้อรหัส SB27 และ SB46 ย่อยสลายโปรตีนได้ดี

5. การตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยา สมบัติทางชีววิทยาและชีวเคมีบางประการและจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยวิธี partial 16S rDNA sequence analysis ผลรายงานว่า เชื้อรหัส SB23 คือ *Knoellia sinensis* DSM12331 ส่วนเชื้อรหัส SB 27 และ SB46 คือ *Bacillus* sp. DIT030428

6. ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ พบว่าการใช้แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ผสมในอัตราส่วนที่เท่ากัน จะให้ผลการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดีกว่าการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์เดียว โดยสามารถลดคปริมาณสารอินทรีย์ตั้งต้นของอาหารกุ้ง 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ได้ถึง 66 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 7 วัน

ข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยครั้งนี้ พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งยังมีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ยังไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นควรทำการศึกษาต่อไปดังนี้

1. ศึกษาเชื้อจุลินทรีย์จากดินตะกอนก้นบ่อ เพราะจะได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดีกว่านี้
2. ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกออกมาได้ โดยอาจศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์ เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์และเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายให้ดียิ่งขึ้น
3. ศึกษาเกี่ยวกับรูปแบบต่างๆในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการบำบัดน้ำเสียในบ่อกุ้งได้อย่างสะดวกและมีประสิทธิภาพ

บรรณานุกรม

- จรัญ อรุณพันธุ์. 2540. เพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำงานทำเงิน. น. 25-29. ใน สุภชัย นิลวานิช (ผู้รวบรวม). กุ้งกุลาดำทางเลือก-ทางรอด. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มติชน.
- ชวนพิศ สิทธิมั่งคั่ง, มลฤดี นิพันธ์พงษ์ และณาคยา ศรีจันทิก. 2539. การศึกษาวิเคราะห์ธุรกิจการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในเขตพื้นที่น้ำจืด. ใน เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2539. กรุงเทพฯ : กองเศรษฐกิจการประมง กรมประมง.
- ตีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2531. ระบบน้ำและของเสียในบ่อกุ้ง. กรุงเทพฯ : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ทวี จิตไมตรี. 2528. แบบที่เรียทั่วไปและปฏิบัติการสำหรับวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพฯ : ภาควิชาวิศวกรรมสุขาภิบาล คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ธงชัย พรรณสวัสดิ์ และอุษา วิเศษสุนน. 2535. คู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สมาคมวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย.
- นิรนาม. 2538. ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีเกี่ยวกับจุลินทรีย์ในปัจจุบัน. กุ้งธุรกิจ 2 (1) : 6.
- ประจวบ หล้าอุบล. 2532. ความรู้เรื่องการเลี้ยงกุ้ง. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : ฝ่ายการศึกษา สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เปรมสุภา สมาน. 2539. จุลินทรีย์สำหรับบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งทะเล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พนมรักษ์ ผดุงกุล. 2535. การผลิตอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) วัยรุ่น. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พรชัย รุ่งศรี. 2545. การใช้สารประกอบจุลินทรีย์ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำและประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสกุล*Vibrio*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พลาวุธ น้อยเคียง. 2543. การศึกษาคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในภาคตะวันออกของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มะลิ บุญขรัตผลิน. 2531. อาหารและการให้อาหารกุ้งกุลาดำ. กรุงเทพฯ : สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตร, เพิ่มศักดิ์ เพ็งมาก, พุทธ ส่องแสงจินดา, สุภโชค สุวรรณมณี และวิชาญ ชูสุวรรณ. 2532. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา. ใน เอกสารวิชาการฉบับที่ 10/2532. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 20 น.

- ยอดยิ่ง เทพธรานนท์. 2533. การปรับปรุงสภาวะดินกรด สภาพก้นบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำและคุณภาพน้ำ. ใน เอกสารสัมมนาเรื่องแนวทางสู่สถานการณ์กุ้งกุลาดำ. กรุงเทพฯ : สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ.
- ลิตา เรื่องแป้น. 2534. วิธีการใช้ยาในการเพาะเลี้ยงกุ้งอย่างมีประสิทธิภาพ. วารสารการประมง 1 : 27-29.
- วลัยพร ทิมบุญธรรม. 2544. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศิริพรรณ สุขัคณนาร์ภย์. 2534. การศึกษาการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาเพื่อให้ได้ผลตอบแทนสูงสุด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศุภชัย ประพัศพร. 2538. แบคทีเรียในดินบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ และการคือยาของเชื้อ *Vibrio* sp. ต่อยาด้านจุลชีพ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมพร วิริยกุล. 2535. การคัดเลือกแบคทีเรียเฮดเทอโรโทรปจากธรรมชาติและความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมศักดิ์ วัจโน. 2528. จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช.
- สมาน กุจิ. 2538. การศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีและแบคทีเรียที่ใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมเจตน์ จันทวัฒน์, ศุภมาส พนิชศักดิ์พัฒนา, จงรักษ์ จันทรเจริญสุข, วิโรจน์ อิมพิทักษ์ และ อัญชลี สุทธิปรากการ. 2526. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. กรุงเทพฯ : ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สิทธิชัย เจริญเศรษฐศิลป์. 2542. การวางแผนการทดลอง. ภาควิชาสถิติประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- สิริ ทุกข์วินาศ, รังสีไชย ทับแก้ว และประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภูมิ. 2540. การศึกษาผลกระทบจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในเขตพื้นที่น้ำจืดจังหวัดสุพรรณบุรี. วารสารการประมง. 50 (2) : 153-164.
- สุริยัน รัชฎกิจจานุกิจ. 2532. การเปลี่ยนแปลงของปริมาณออกซิเจนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบหนาแน่น. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- โสภณ อ่อนคง. 2542. แนวทางการจัดการเพื่อป้องกันและแก้ไขปัญหาคาการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา. สตูล : ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสตูล.
- Alexander, M. 1961. **Introduction to Soil Microbiology.** John Wiley and Sons, Inc., New York.

- APHA, AWWA and WPCF. 1975. **Standard Methods for the Examination of Water and Waste water**. American Public Health Association, Washington D. C. USA.
- Avnimelech, Y., Mozes, N., Diab, S. and Kochba, M. 1995. "Rate of organic carbon and nitrogen degradation in intensive fish ponds." **Aquaculture**. 134 : 211–216.
- Bettina, C. S. and Kalff, J. 1993. "Factors controlling bacteria production in marine and freshwater sediments." **Microb. Ecol.** 26 : 79–99.
- Boyd, C. E. 1987. Evaluation of Water Quality and Water Quality Management Techniques for Brackishwater in Ponds in Thailand. **Report for the Asian Development Bank**. Manila.
- Boyd, C. E. 1989. **Water Quality Management and Aeration in Shrimp Farming**. Development of Fisheries and Allied Aquacultures. Auburn University, Alabama.
- Boyd, C. E. 1990. **Water Quality in Ponds for Aquaculture**. Alabama Agriculture Experiment station, Auburn University, Alabama.
- Boyd, C. E. and A. W. Fast. 1992. Pond monitoring and management. 497-513. in A. W. Fast and L. J. Lester (eds.). **Marine Shrimp Culture : Principles and Practices**. Elsevier Science B. V., Amsterdam, Netherlands.
- Boyd, C. E., Hollerman, W. D., Plum, J. A. and Saeed, M. 1984. **Progres. Fish Culture**. 46 : 36-40.
- Chiang, P., Huo, C. H. and Liu, C. F. 1989. Pond Preparation for Shrimp Grow-out. **Paper Presented at Shrimp Farmer Workshop**. August 8-10, Songkhla Thailand.
- Colwell, R. R. and R. Y. Morita. 1974. **Effect of Ocean Environment on Microbial Activites**. University Park Press, Baltimore.
- Degain, G. and Gallagher, M. L. 1985. "The relationship between growth, food conversion and oxygen consumption in developed and undeveloped American eels (*Arguilla rostrata* L.)." **J. Fish Biol.** 27 : 635–641.
- Ehrlich, K. F., Turcotte, A. and Dery, C. 1990. **Biotechnology in aquaculture : Letting mother nature work for you**. Presented to Scottish Fish Farming Conference, 15th, Feb.
- Grega, M. D. L., Buckingham, P. L. and Evans, J. C. 1994. **Hazardous Waste Management**. USA : MC Graw-Hill.

- Groth, I., Schumann, P., Schutze, B., Augsten, K. and Stackebrandt, E. 2002. "*Knoellia sinensis* gen. Nov., sp. Nov. and *Knoellia subterranea* sp. Nov., two novel actinobacteria isolated from a cave." **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 52 (Pt 1) : 77-84.
- Goulter, R. 1977. "Attached and free bacteria in an estuary with abundant suspended solids." **J. Appl. Bacteriol.** 43 : 399 – 405.
- Harris, J. 1981. "Bio-engineering Symposium of Fish Culture." **FCS. Amer. Fish. Soc. Publ.** 1 : 157-161.
- Horan, N. J. 1990. **Biological Wastewater Treatment Systems.** Chichester : John Wiley & Son
- Iwai, M. and Y. Tsujisaka. 1974. "Interconversion of two lipase from *Rhizopus delemar*." **Agr. Biol. Chem.** 38 : 1249-1254.
- Jensen, R. G. 1983. "Detection and determination of lipase (acyl glycerol hydrolase) activity from various sources." **Lipids.** 18 : 650-651.
- Keay, L. 1971. "Microbial protease." **Process. Biochem.** August : 17-21.
- Kungvankij, P. 1976. Early development stage of jumbo tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). **Phuket Mar. Fish Countrib.** No.6.
- Lee, J. J., Sweeney, J. N. and Richards, J. W. K. 1986. "Marine shrimp aquaculture : a novel waste treatment system." **Aquacultural Eng.** 5 : 147-160.
- Lewis, D. L., Hodson, R. E. and Freeman, L. F. 1984. "Effect of microbial community interactions on transformation rates of xenobiotic chemical." **Appl. Environ. Microbiol.** 43 : 561-565.
- Millamena, O. M., 1990. "Organic pollution resulting from excess feed and metabolite build-up : effect on *Penaeus monodon* postlarvae." **Aquacultural Eng.** 9 : 143-150.
- Moriarty, D. W. J., Withyachumnarnkul, B., Pratanpipat, P. and Nitimethachoke, C. 1997. Managing microbial disease in aquaculture with probiotic bacteria : biotechnology for sustainable aquaculture. In **Abstracts of the 2nd Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference and 3rd Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnolgy.** May 7-10, 1997. Phuket, Thailand.
- Motoh, H. 1980. **Studies on the Fisheries Biology of the Giant Tiger Prawn.** Aquaculture Department Southeast Asian Fisheries Department Center, The Philippines.

- Murakami, Y. and Alexander, M. 1989. "Destruction and formation of toxins by one bacteria species affect biodegradation by a second species." **Biotech. and Bioeng.** 33 : 832-838.
- Pahm, M. A. and Alexander, M. 1993. "Selecting inocula for the biodegradation of organic compounds at low concentrations." **Microb. Ecol.** 25 : 275-286.
- Parry, G. 1960. Excretion. 341-366. in T.H. Waterman (ed.). **The Physiology of Crustacea, Vol. I.** Academic Press, New York.
- Phianphak, W. S., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P. and Rengpipat, S. 1997. Use of probiotic in *Penaeus monodon*. 91-96. In **Proceedings of the 2nd Asia-Pacific Marin Biotechnology Conference and 3rd Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology.** May 7-10, 1997. Phuket, Thailand.
- Pierce, R. H. and Felbeck, G. T. 1972. A Comparison of three methods of extracting organic matter from soils and marine sediments. Pp. 314-337. In D. Povaledo and H.L. Colterman (eds). **Humic Substances, their Structure and Function in the Biosphere.** Center for Agriculture Publishing Documentation, Wageningen.
- Pike, E. B. 1975. Aerobic bacteria. In C. R. Curds and H. A. Hawkes (eds.) **Ecological aspects of used-water treatment. vol. 1 : The organisms and their ecology.** Academic Press, London.
- Pruder, G. P. 1986. "Aquaculture and controlled Eutrophication : Photoautotrophic / Heterotrophic Interaction and Water Quality." **Aquacultural Eng.** 5 : 115-121.
- Rheinheimer, G. 1991. **Aquatic Microbiology.** 4th ed. New York : John Wiley & Sons.
- Robert, S. 1979. "Effect of concentrations of organic chemical on their biodegradation by natural microbial communities." **Appl. Environ. Microbiol.** 37 : 1222 — 1216.
- Salminen, S., Ouwehanh, A., Benno, Y. and Lee, Y. K. 1999. "Probiotics : how should they be defined.?" **Trends in Food Sci & Tech.** 10 : 107-110.
- Schroeder, G. L. 1983. "Sources of fish and prawn growth in polyculture ponds as indicated by C analysis." **Aquacultural.** 35 : 29-42.
- Simon, M. 1985. "Specific uptake rates of amino acid by attached and free-living bacteria in a mesotrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 : 1254 — 1259.
- Smith, D. W. and Piedrahita, R. H. 1988. "The relation between phytoplankton and dissolved oxygen in fish ponds." **Aquacultural.** 68 : 249-265.

- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. 1986. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2.** Baltimore. : Williams & Wilkins.
- Sonenshein, A. L., Hoch, J. A. and Losick, R. 1993. **Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria : biochemistry, physiology and molecular genetics.** Washington, DC : American Society for Microbiology.
- Stackebrandt, E. 2003. **Direct Submission. Submitted (23-AUG-2000)** Stackebrandt, E., Molecular systematics, Dsmz, Mascheroder Weg 1B, 38124 Braunschweig, GERMANY.
- Staley, J. T. and Stanley, P. M. 1986. "Potential commercial applications in aquatic microbiology." **Microb. Ecol.** 12 : 79-100.
- Steffensen, W. S. and Alexander, M. 1995. "Role of competition for inorganic nutrients in the biodegradation of mixtures of substrates." **Appl. Environ. Microbiol.** 61 : 2859 — 2862.
- Stevenson, F. J. 1986. **Cycles of Soil.** John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Stoner, P. L. 1994. **Biotechnology for the Treatment of Hazardous Waste.** USA : CRC Press.
- Taiganides, E. P. 1967. Animal Waste Disposal Problem. in Nyle C. Brady (ed.) **Agriculture and the quality of our environment.** Washington D.C. : American Association for the Advancement of Science.
- Taylor, M. J. and Richardson, T. 1979. "Applications of microbial enzymes in food systems and biotechnology." **Adv. Appl. Microbiol.** 25 : 7-35.
- Thongrak, S. 1992. "Songklanakalin." **J. Sci. Technol.** 2 : 199-204.
- Tookwinas, S. 1986. Effect of nitrite-nitrogen and ammonia-nitrogen on the fry tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and seabass (*Lates calcarifer*). 120-124. in **The Report of Thailand and Japan Joint Coastal Aquaculture Research Project No. 2., JICA.**
- Waksman, S.A. 1952. **Soil Microbiology.** John Wiley & Sons, Inc., New York. 356 p.
- Wang, J. K. 1990. "Managing shrimp pond water to reduce discharge problems." **Aquacultural Eng.** 9 : 61-73.

- Wasbort, N., Krom, M. D., Gosith, A. and Samocha, T. 1989. "Ammonia excretion of green tiger prawn (*Penaeus semisulcatus*) as a possible limit on the biomass." **Aquacultural**. 41 (4) : 159-164.
- Wetzel, R.G. 1975. **Limnology**. W. B. Saunders Co., Philadelphia.
- Wickins, J. F. 1985. "Ammonia production and oxidation during the culture of marine prawns and lobsters in laboratory recirculation systems." **Aquacultural Eng.** 4 : 155-174.
- Windish, W. W. and Mhatre, N. S. 1965. **Microbial Amylase**. in Unbreit, W. W. (ed.) **Advance in Applied Microbiology**. Vol. 7. New York : Academic Press.
- Wood, E. J. F. 1965. **Marine Microbial Ecology**. Chapman and Hall Ltd., London. 243 p.
- Zaidi, B. R., Murakami, Y. and Alexander, M. 1988. "Factor limiting success of inoculation to enhance biodegradation of low concentration of organic chemical." **Environ. Sci. Techno.** 22 : 1419-1425.
- Zhang, T. and Fang, H. H.P. 2003. **A New Filamentous Bacillus Species Isolated from a Subtropical Drinking Water System. Submitted (23-AUG-2000)** Center for Environmental Engineering Research, Department of Civil Engineering, The University of Hong Kong, Pokfulam Rond, Hong Kong, SAR, P. R. China.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

1. อาหารนมผงพร่องมันเนย (Skim Milk Agar)

นมผงพร่องมันเนย (skim milk)	2.0	กรัม
กลูโคส	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 6H_2O$)	0.2	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	เล็กน้อย	
วุ้นผง	15.0	กรัม

ผสมส่วนประกอบต่างๆ ลงในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตรเข้าด้วยกัน ยกเว้นนมผงพร่องมันเนยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็นจนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จึงนำมาผสมกับนมผงพร่องมันเนย 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 มิลลิลิตร นาน 10 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar

เคซีนเปปโตน (casein peptone)	15.0	กรัม
โซยาเปปโตน (soya peptone)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
ปรับพีเอชเป็น 7.3 - 0.2		

3. อาหารแข็งนิวเตรียนท์ (Nutrient Agar)

เปปโตน (peptone)	5.0	กรัม
ผงสกัดจากเนื้อ (beef extract)	3.0	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
ปรับพีเอชเป็น 6.8 - 7.0		

4. อาหารเหลวนิวเตรียนท์ (Nutrient Broth)

เปปโตน (peptone)	5.0	กรัม
ผงสกัดจากเนื้อ (beef extract)	3.0	กรัม
ปรับพีเอชเป็น 6.8 - 7.0		

5. อาหารแป้ง (Starch Agar)		
แป้ง (soluble starch)	2.0	กรัม
ผงสกัดจากเนื้อ (beef extract)	3.0	กรัม
เปปโตน (peptone)	5.0	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
ปรับพีเอชเป็น 7.0		
6. อาหารแจึงทวิน 80 (Tween 80 Agar)		
เปปโตน (peptone)	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม
ทวิน 80 (tween 80)	10.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	15.0	กรัม
7. อาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility Medium)		
ทริปโตน (tryptone)	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
วุ้นผง	5.0	กรัม
ปรับพีเอชเป็น 7.2 - 0.2		
8. อาหารทริปโตเฟน (Tryptophane Broth)		
ทริปโตน (tryptone)	8.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	2.5	กรัม
9. อาหารซิมมอนส์ซิเตรต (Simmon's Citrate Agar)		
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2	กรัม
แอมโมเนียซัลเฟต ($\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0	กรัม
ไดโพแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัม
โซเดียมซิเตรต ($\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2$)	2.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
บรอมไทมอลบลู (bromthymol blue)	0.08	กรัม

วุ้นผง	15.0	กรัม
ปรับพีเอชเป็น 6.8		

10. อาหารเอ็มอาร์-วีพี (MR-VP Medium)

บัฟเฟอร์เปปโตน (buffer peptone)	7.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	5.0	กรัม
กลูโคส	5.0	กรัม
ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 6.9		

11. อาหารคริสเตนยูเรีย (Christen's Urea)

เปปโตน (peptone)	1.0	กรัม
กลูโคส	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.0	กรัม
ฟีนอลเรด (phenol red)	0.012	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม

12. อาหารที เอส ไอ (TSI Agar)

เคซีน (casein)	10.0	กรัม
เปปโตน (peptone)	10.0	กรัม
กลูโคส	1.0	กรัม
แล็กโทส	10.0	กรัม
ซูโครส	10.0	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$)	0.3	กรัม
ฟีนอลเรด (phenol red)	0.024	กรัม
วุ้นผง	13.0	กรัม
ปรับพีเอชเป็น 7.0		

13. อาหารทดสอบน้ำตาล (Phenol Red Broth Base)

ผงสกัดจากเนื้อ (beef extract)	1.0	กรัม
โปรติโอสเปปโตน เบอร์ 3 (proteose peptone No.3)	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ฟีนอลเรด (phenol red)	0.018	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดคือน้ำ แบ่งเป็นส่วนๆ เพื่อเติมน้ำตาลที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ กลูโคส อราบิโนส กาแล็กโทส แล็กโทส มอลโทส ราฟฟิโนส ซูโครส และเดกซ์โทส โดยเติม 1 เปอร์เซ็นต์ นำไปปรับพีเอชเป็น 7.4

14. อาหารกึ่ง (เทอร์โบ 8004 เอส)

โปรตีน	45	เปอร์เซ็นต์
ไขมัน	5	เปอร์เซ็นต์
ความชื้น	11	เปอร์เซ็นต์
กาก	3	เปอร์เซ็นต์

ส่วนประกอบ ปลาป่น ปลาหมึกป่น กากถั่วเหลือง ปลาขี้ขาว วิตามิน เกลือป่น และสารถนอมคุณภาพอาหารสัตว์

หมายเหตุ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร นำไปปรับพีเอช จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้นอาหารเลี้ยงเชื้อบางสูตรที่ระบุไว้เฉพาะ

ภาคผนวก ข

สีย้อมและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's iodine solution)

ไอโอดีนคริสตอล	1.0	กรัม
โพแทสเซียมไอโอไดด์	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

ละลายไอโอดีนและโพแทสเซียมไอโอไดด์ในน้ำกลั่นปริมาณน้อยๆก่อน แล้วเติมน้ำให้ครบเก็บไว้ในขวดสีชา

2. สารละลายแอมโมเนียมออกซาเลตคริสตอลไวโอเล็ต (Amonium oxalate crystal violet solution)

สารละลาย ก

คริสตอลไวโอเล็ต	3.0	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 95 %	20.0	มิลลิลิตร

สารละลาย ข

แอมโมเนียมออกซาเลต	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย ก และ ข เข้าด้วยกัน กรองก่อนนำไปใช้

3. สารละลายอะซีโตนแอลกอฮอล์ (Acetone alcohol solution)

เอทิลแอลกอฮอล์ 95 %	400.0	มิลลิลิตร
อะซีโตน	300.0	มิลลิลิตร

4. สารละลายซาฟรานิน (Safranin solution)

ซาฟรานิน	0.25	มิลลิลิตร
เอทิลแอลกอฮอล์ 95 %	20.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลายซาฟรานินด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ เติมน้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน กรองก่อนนำไปใช้

5. สีย้อมสปอร์ (Endospore stain)

มาลาไคท์ กรีน	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลายสีในน้ำกลั่น หากมีตะกอนต้องกรองก่อนการใช้ทุกครั้ง

6. สารละลายโคแวกซ์ (Kovac's reagent)

พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์	3.0	กรัม
บิวทานอล (Butanol)	75.0	มิลลิลิตร
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	25.0	มิลลิลิตร

ละลายพาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ในบิวทานอลที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส
ทิ้งให้เย็นแล้วเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นลงไป เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. สารละลายเมทิลเรด (Methyl red test)

เมทิลเรด (Methyl red)	1.0	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 95 %	300.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	200.0	มิลลิลิตร

ละลายเมทิลเรดในเอทิลแอลกอฮอล์ เติมน้ำกลั่นจนครบ เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4
องศาเซลเซียส

8. สารละลายทดสอบเมทิลคาร์บินอล (Voges proskauer test)

สารละลาย ก

แอลฟาเนฟทอล	5.0	มิลลิลิตร
เอทิลแอลกอฮอล์ 95 %	100.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลาย ข

โพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์	40.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ก
วิธีวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

1. การวิเคราะห์ค่าซีโอดีโดยวิธี Dichromate reflux method (APHA, AWWA and WPCF.1992)

สารละลายที่ใช้ทดสอบ

1. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) 0.25 N : ละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ที่อบแห้งดีแล้ว 12.259 กรัมในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

2. กรดซัลฟิวริกเอเจนท์ (Sulfuric acid reagent) : ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) 22 กรัม ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น บรรจุขวดขนาด 9 ปอนด์ (2.65 ลิตร) เนื่องจากซิลเวอร์ซัลเฟตละลายยากอาจใช้เวลา 1-2 วัน จึงละลายหมด

3. สารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตไตเตรนต์ (Standard ferrous ammonium sulfate titrant) 0.1 N : ละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$) ชนิด เออาร์ 39 กรัม ในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทำให้เย็นแล้วเจือจางเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้ต้องหาความเข้มข้นที่แน่นอนทุกครั้งที่ใช้ โดยไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต

การหาความเข้มข้นของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต

เจือจางสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 10 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริก 30 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 5 นาที ปล่อยให้เย็นแล้วนำไปไทเทรตกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต โดยใช้เฟอร์โรอิน (Ferrouin) จำนวน 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์

การคำนวณ

$$\text{นอร์มัลลิตี (normality)} = \frac{\text{มิลลิลิตรของโพแทสเซียมไดโครเมต} \times 0.250}{\text{มิลลิลิตรของเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต}}$$

4. สารละลายเฟอร์โรอิน อินดิเคเตอร์ (Ferrouin indicator solution) : ละลาย 1,10 Phananthroline monohydrate ($C_{12}H_{12}N_2 \cdot H_2O$) 1.485 กรัม พร้อมกับเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.695 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางเป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

1. เติมน้ำตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร หรือส่วนของน้ำตัวอย่างที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดกลั่นขนาด 500 มิลลิลิตร ใส่ลูกแก้วลงไป 5-10 ลูก
2. เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 0.25 N 10 มิลลิลิตร
3. ค่อยๆเติมกรดซัลฟิวริกเอเจนท์ 30 มิลลิลิตร
4. ผสมให้เข้ากันกลั่นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นแล้วฉีดล้างส่วนที่อยู่ในเครื่องควบแน่นด้วยน้ำกลั่นก่อนถอดขวดกลั่นออก
5. เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 140 มิลลิลิตร ปล่อยให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง
6. ไทเทรตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตที่เหลือจากปฏิกิริยาคด้วยสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้เฟอร์โรอินเป็นอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด จนกระทั่งส่วนผสมเปลี่ยนจากสีน้ำเงินแกมเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง แสดงว่าถึงจุดยุติ
7. ทำแบลนด์โดยใช้น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แทนน้ำตัวอย่างและทำเช่นเดียวกับน้ำตัวอย่างทุกประการ

การคำนวณ

$$\text{COD (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{(a - b) \times c \times 8000}{\text{ปริมาณของตัวอย่างน้ำ (มิลลิลิตร)}}$$

เมื่อ a = ปริมาณเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มิลลิลิตร) ที่ใช้กับแบลนด์

b = ปริมาณเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มิลลิลิตร) ที่ใช้กับน้ำตัวอย่าง

c = นอร์มัลลิตีของเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต

2. การวิเคราะห์ค่าบีโอดี (APHA, AWWA and WPCF.1992)

สารละลายที่ใช้ทดสอบ

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ : ละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 8.5 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 21.75 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตาไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 33.4 กรัม และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 1.7 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร สารละลายนี้มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.2

2. สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต : ละลายแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 22.5 กรัมในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร

3. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ : ละลายแอนไฮดรัสแคลเซียมคลอไรด์ (anhydrous CaCl_2) 27.5 กรัมในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร

4. สารละลายไอร์ออน (III) คลอไรด์ : ละลายไอร์ออน(III) คลอไรด์เฮกซาไฮเดรต ($\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.25 กรัมในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร
5. สารละลายแมงกานีสซัลเฟต : ละลายแมงกานีสซัลเฟตเตตราไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 480 กรัม หรือแมงกานีสซัลเฟตไดไฮเดรต ($\text{MnSO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 400 กรัม หรือแมงกานีสซัลเฟต โมโนไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 364 กรัมในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร
6. สารละลายอัลคาล-ไอโอไดค์-เอไซด์ : ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 500 กรัม และโซเดียมไอโอไดค์ (NaI) 135 กรัมในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมโซเดียมเอไซด์ (NaN_3) 10 กรัม ซึ่งละลายน้ำกลั่น จำนวน 40 มิลลิลิตร
7. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น
8. น้ำแป้ง : ละลายแป้ง (soluble starch) 2 กรัม ในน้ำกลั่นที่ร้อน 100 มิลลิลิตร
9. สารละลายมาตรฐานไบโอไอเคต 0.0021 โมลต่อลิตร : ละลาย $\text{KH}(\text{IO}_3)_2$ 812.4 มิลลิกรัมในน้ำกลั่นแล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร
10. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.025 โมลต่อลิตร : ละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 6.205 กรัมในน้ำกลั่นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 โมลต่อลิตร จำนวน 1.5 มิลลิลิตร แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร สารละลายนี้ต้องนำมาหาความเข้มข้นที่แน่นอนด้วยสารละลายมาตรฐานไบโอไอเคต

การหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต

ละลาย KI ประมาณ 2 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 100-150 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2-3 หยด และสารละลายมาตรฐานไบโอไอเคต 20.00 มิลลิลิตร แล้วทำให้เจือจางเป็น 200 มิลลิลิตร ไทเทรตไอโอดีนซึ่งถูกขับออกมาด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟตที่เตรียมไว้เติมน้ำแป้งเมื่อใกล้จะถึงจุดยุติ สังเกตจากสีของสารละลายมีสีเหลืองอ่อน

วิธีทำให้เจือจาง ใช้ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมีความสกปรกสูง (มีค่าบีโอดีมากกว่า 7 มิลลิกรัมต่อลิตร) จำเป็นต้องทำให้ตัวอย่างน้ำเจือจางลงโดยใช้น้ำผสมเจือจาง

การเตรียมน้ำผสมเจือจาง

- นำน้ำกลั่นมาปรับคุณภาพให้เหมาะสมกับการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ โดยเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แมกนีเซียมซัลเฟต แคลเซียมคลอไรด์ และไอร์ออน (III) คลอไรด์ อย่างละ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นเติมอากาศให้มือออกซิเจนละลายอิมตัว
- เจือจางตัวอย่างน้ำด้วยน้ำกลั่นที่เตรียมไว้ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จนครบ 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้กัน

- ค่อยๆรินตัวอย่างน้ำลงในขวดบีโอดีจนเต็ม 3 ขวด ปิดจุกให้สนิท ขวดหนึ่งนำไปวิเคราะห์หาค่าออกซิเจนละลายวันแรก อีกสองขวดนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน ก่อนนำไปบ่มให้ตรวจว่ามีน้ำหล่อที่ปากขวด และควรตรวจดูทุกวันอย่าให้น้ำแห้ง (ถ้าแห้งให้เติมน้ำผสมเจือจาง) หลังจากนั้นนำมาหาค่าการใช้ออกซิเจน โดยนำผลต่างของค่าออกซิเจนละลายก่อนและหลัง 5 วันที่ 20 องศาเซลเซียส ไม่ควรเกิน 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และยิ่งดีถ้าไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีวิเคราะห์

1. เติมน้ำสารละลายแมงกานีสซัลเฟต และอัลคาไล-ไฮโดรคลอไรด์-เอไซด์ อย่างละ 1 มิลลิกรัม ลงในขวดบีโอดีที่ใส่ตัวอย่างน้ำ โดยให้ปลายปิเปตอยู่ใต้ผิวของตัวอย่างน้ำ ปิดจุกขวดระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ผสมให้เข้ากันโดยคว่ำขวดขึ้นลงอย่างน้อย 15 ครั้ง
2. ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนจนได้ปริมาณน้ำใส 1/2 ของขวด
3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิกรัม โดยให้กรดค่อยๆไหลลงไปข้างๆ ขอบขวด ปิดจุกผสมให้เข้ากัน โดยคว่ำขวดขึ้นลงจนกระทั่งตะกอนละลายหมด
4. ถ้าใช้ขวดบีโอดีที่มีความจุ 300 มิลลิกรัม จะใช้ตัวอย่างน้ำจากขวดบีโอดีเท่ากับ 201 มิลลิกรัม เพื่อนำไปไทเทรต (ปริมาตรตัวอย่างนี้มีค่าเท่ากับปริมาตรตัวอย่างน้ำเริ่มต้น 200 มิลลิกรัม เนื่องจากมีการสูญเสียตัวอย่างน้ำจากขวดบีโอดี โดยการแทนที่ของสารละลายเคมีที่เติมลงไปทั้งสิ้น 2 มิลลิกรัม) ดังนั้นปริมาตรตัวอย่างซึ่งใช้ในการไทเทรตจึงควรเท่ากับ

$$\frac{200 \times 300}{(300 - 2)} = 201 \text{ มิลลิกรัม}$$

5. ไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.025 โมลต่อลิตร จนกระทั่งสารละลายมีสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแข็ง 2-3 หยด จะได้สีน้ำเงินเข้ม ไทเทรตต่อไปจนกระทั่งสีน้ำเงินหายไป อ่านปริมาตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้

การคำนวณ

$$\text{บีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{D_1 - D_2}{P}$$

เมื่อ D_1 = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต (มิลลิกรัม) ที่ใช้กับขวดบีโอดีในวันแรก

D_2 = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต (มิลลิกรัม) ที่ใช้กับขวด บีโอดีในวันที่ 5

P = ค่า dilution fracter ของตัวอย่างน้ำ

ภาคผนวก ง

การเก็บรักษาจุลินทรีย์โดยวิธีไลโอไฟล์เซชัน (Lyophilization)

การเก็บรักษาจุลินทรีย์วิธีหนึ่งที่มีผู้นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือวิธี Lyophilization หรือ Freeze-drying เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้ได้เหมาะสมกับจุลินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา วิธีการนี้เหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับงานด้านการเก็บรักษาจุลินทรีย์เพื่อให้บริการเพราะเก็บได้นานมากถึงสิบปีขึ้นไป ไม่ต้องพะวงเรื่องการดูแลเปลี่ยนอาหาร ประหยัดเนื้อที่ในการเก็บ สะดวกในการขนส่งและที่สำคัญคือ สามารถรักษาคุณสมบัติทางพันธุกรรมไว้ได้คงเดิม แม้จะเก็บไว้นานเพียงไรก็ตาม

ทฤษฎี

โดยทั่วไปกระบวนการ freezing จะทำให้เซลล์ของสิ่งมีชีวิตแตกสลาย เนื่องจากน้ำในเซลล์ถูกเปลี่ยนสถานะเป็นน้ำแข็งและปริมาตรขยายขึ้น และคั่นผนังเซลล์แตกสลายได้ ในขณะที่กระบวนการ drying จะดึงน้ำออกจากเซลล์ของจุลินทรีย์ จะมีผลทำให้ปริมาณความเข้มข้นของสารจำพวก electrolytes ในเซลล์สูงขึ้น จนทำลายสารจำพวกโปรตีนและ DNA ในเซลล์ จึงเป็นอันตรายต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอย่างยิ่ง และไม่สามารถกลับมาสู่สภาพเดิมได้อีก

หลักการของ Lyophilization หรือ freeze-drying คือการทำให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาพแข็งตัวโดยการลดอุณหภูมิ ลดความดัน และปรับสภาพแวดล้อมให้เป็นสุญญากาศ และขณะเดียวกันก็ดึงน้ำออกจากเซลล์โดยการระเหิด กระบวนการเช่นนี้จุลินทรีย์จะคงรูปอยู่ได้ในสภาพเดิมเนื่องจากเซลล์ถูกตรึงในสภาพแข็งตัว และการดึงน้ำออกจากเซลล์ในสภาพแข็งเช่นนี้เป็นการป้องกันไม่ให้เซลล์เกิดความเสียหาย อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารจำพวก electrolytes ถึงแม้วิธีนี้จะได้ผลในการรักษาชีวิตของจุลินทรีย์ แต่อัตรการตายก็ยังคงเกิดขึ้นมาก ดังนั้นการใช้สารป้องกันเซลล์แตกสลายระหว่างกระบวนการจึงจำเป็นต้องใช้เพื่อลดอัตราการตายของจุลินทรีย์

การเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง Freeze - dryer
2. หลอด ampoule เป็นหลอดแก้วเล็กๆ ชนิด neutral หรือ soft glass และไม่เป็น alkaline ไม่นิยมใช้ pyrex เพราะเนื้อแก้วทนไฟกว่าทำให้ยุ่งยากตอนใช้ไฟลนปิดหลอด หลอด ampoule จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางรอบในประมาณ 6 มิลลิเมตร ยาว 10 มิลลิเมตร และตรงขอบปากจะสอบแคบเข้าเล็กน้อย ส่วนท้ายของหลอดจะโค้งมน ปากหลอดต้องเรียบและไม่มียอย

ร้าว หลอด ampoule ทุกหลอดที่จะนำไปใช้ต้องล้างให้สะอาดโดยแช่ไว้ใน 2% HCl หนึ่งคืน แล้วล้างด้วยน้ำประปา 3 ครั้ง และน้ำกลั่นอีก 1 ครั้ง นำไปอบให้แห้ง

3. ฉลาก (labels) การติดป้ายชื่อจุลินทรีย์ ไม่นิยมใช้ปากกาเขียนบนหลอด เพราะอาจลบเลือน เมื่อเก็บเป็นเวลานานๆ ทำให้เกิดการสับสน นิยมใช้พิมพ์รหัสจุลินทรีย์บนกระดาษกรอง โดยพิมพ์รหัสไว้ด้านบน พิมพ์วันที่ไว้ด้านล่าง ตัดให้มีขนาด 4 มิลลิเมตร X 25 มิลลิเมตร สอดเข้าไปใน หลอด ampoule โดยหันด้านเลขรหัสขึ้นด้านบน

4. Suspending medium หมายถึงของเหลวที่ใช้ผสมกับเซลล์จุลินทรีย์ก่อนนำไปเข้ากระบวนการ Lyophilization โดยมีคุณสมบัติที่ช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์แตกสลาย และสามารถละลายกลับคืนสู่สภาพเดิมได้อย่างง่ายดาย คุณสมบัติของ suspending medium ที่ควรมี คือ

4.1 เป็นสารซึ่งสามารถดึงปริมาณน้ำในเซลล์จุลินทรีย์ให้เหลือไว้อย่างน้อย 1 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากน้ำที่เหลือมีความสำคัญต่ออายุการเก็บรักษาจุลินทรีย์เป็นอย่างมาก ถ้าหากน้ำที่เหลือมีมากหรือไม่เหลือเลย จุลินทรีย์จะมีอายุการเก็บน้อยลง เช่น คาร์โบไฮเดรต

4.2 มีคุณสมบัติในการ neutralize พิษจากอนุภาค Carbonyl ทั้งที่มีอยู่ในเซลล์ของจุลินทรีย์และในสารละลายรอบๆเซลล์ เช่น สารผสมจำพวก amino-group glutamic acid

4.3 ไม่เป็นสาร electrolytes

4.4 มีคุณสมบัติที่เมื่อทำให้แห้งแล้วจะเป็นก้อนแข็ง สามารถป้องกันเซลล์ของจุลินทรีย์ไม่ให้แตกสลายจากกระบวนการ drying ช่วยการระเหิดของของเหลว และไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเปิดหลอด ampoule ที่เป็นสุญญากาศ เช่น skim milk

5. จุลินทรีย์ อายุการเจริญของจุลินทรีย์จะมีผลต่ออายุของการเก็บรักษา กล่าวคือ ถ้าจุลินทรีย์อายุน้อยเกินไปหรือมากเกินไป อัตราการตายในระหว่างกระบวนการ Lyophilization จะสูงมาก โดยอายุที่เหมาะสมคือ ระยะที่ผ่าน logarithmic phase ไปแล้วหรือระยะที่เริ่มต้นของ stationary phase

เครื่อง Freeze - dryer ที่ใช้ในการทดลองเป็นรุ่น super modulyo (Edwards) แสดงดังรูปที่ ง. 1 มีหลักการทำงานดังนี้

1. ตรวจสอบความเรียบร้อยของเครื่อง
2. นำตัวอย่างแช่แข็งในตู้เย็น อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง
3. เปิด Main switch และ Freeze switch รอจนอุณหภูมิเครื่องลดลงต่ำกว่า - 40 องศาเซลเซียส
4. นำตัวอย่างที่แช่แข็งที่ - 80 องศาเซลเซียส ใส่ในเครื่อง
5. เปิด Pump switch (เพื่อดูดอากาศให้ภายในเครื่องเป็นสุญญากาศ)

6. รอจนตัวอย่างแห้ง แล้วนำออกจากเครื่องโดยการเปิด Pump switch และเปิดวาล์วด้านล่างให้อากาศเข้า
7. ปิด switch ทั้งหมด
8. ทำความสะอาด



รูปที่ ง.1 ลักษณะและส่วนประกอบของเครื่อง Freeze - dryer ที่ใช้ในการทดลอง

ประวัติผู้เขียน

นางสาวกมลทิพย์ บุรณะสุคนธ์ เกิดเมื่อวันที่ 3 เมษายน 2521 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จ การศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย หอการค้าไทย ในปีการศึกษา 2542 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาวิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง