บทที่ 2

วารสารปริทรรศน์

ในระบบนิเวศน์ของแหล่งน้ำมีการปนเปื้อนของสารอินทรีย์ไนโตรเจน ที่อยู่ในรูปของ สารประกอบโปรตีน หรือกรดอะมิโน ซึ่งถูกย่อยสลายโดยรา ได้แก่ *Aspergillus* sp. และ เฮทเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย ได้แก่ *Clostridium* sp. *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus* sp. เป็นต้น โดยจุลินทรีย์ดังกล่าวสร้างเอนไซม์โปรติเอส (protease) มาย่อยสลายโปรตีนในกระบวนการมิเนอรัลไลเซชัน (mineralization) ได้เป็นกรดอะมิโน และกรดอะมิโนถูกย่อยด้วยเอนไซม์อะมิโนเอซิดดีอะมิเนส (amino acid deaminase) ในขั้นตอนนี้ได้แอมโมเนียเป็นผลิตภัณฑ์ (Michael Chang และ Krig, 1991) ถ้าแอมโมเนียสะสมในน้ำเสีย ปริมาณมากกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเป็นพิษต่อสัตว์น้ำเพราะทำให้สัตว์น้ำไม่สามารถขับถ่ายแอมโมเนียออกจากกระแสเลือดได้ ระดับแอมโมเนียในเลือดและในเนื้อเยื่อจึงเพิ่มขึ้น เป็นผลให้เลือดมีความเป็นด่างเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นผลเสียต่อปฏิกิริยาชีวเคมีในร่างกาย ทำให้สัตว์น้ำอ่อนแอ ติดโรคง่าย และตายในที่สุด (Spotte, 1979) อย่างไรก็ตามแอมโมเนียสูญหายไปจากแหล่งน้ำโดยวิธีต่างๆ ดังนี้

1. พืชน้ำสามารถนำแอมโมเนียไปใช้ได้โดยตรง
2. ระเหยสู่บรรยากาศ เมื่อสภาพแวดล้อมเป็นกรด (มั่นสิน , 2538)
3. เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน คือการเปลี่ยนแอมโมเนียให้อยู่ในรูปของไนเตรท โดยวิธีทางชีวภาพ

ในกระบวนการดังกล่าวปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน น่าจะเป็นวิธีที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการกำจัดแอมโมเนียออกจากน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

1. **คีโมออโตโทรฟิค ไนตริฟิเคชัน** (chemoautotrophic nitrification)

เป็นปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันที่เกิดขึ้นโดย จุลินทรีย์ในกลุ่มคีโมออโตโทรฟิคแบคทีเรีย ซึ่งใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน และได้พลังงานจากการออกซิไดซ์สารอนินทรีย์คือ แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์ และออกซิไดซ์ไนไตรท์ให้เป็นไนเตรท ปฏิกิริยาแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

1.1 **ปฏิกิริยาแอมโมเนียออกซิเดชัน** (ammonia oxidation) เป็นปฏิกริยาการออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์ โดย คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย ดังสมการ

$$NH_3 + O_2 + NADH + H^+ \longrightarrow NH_2OH + H_2O + NAD^+$$

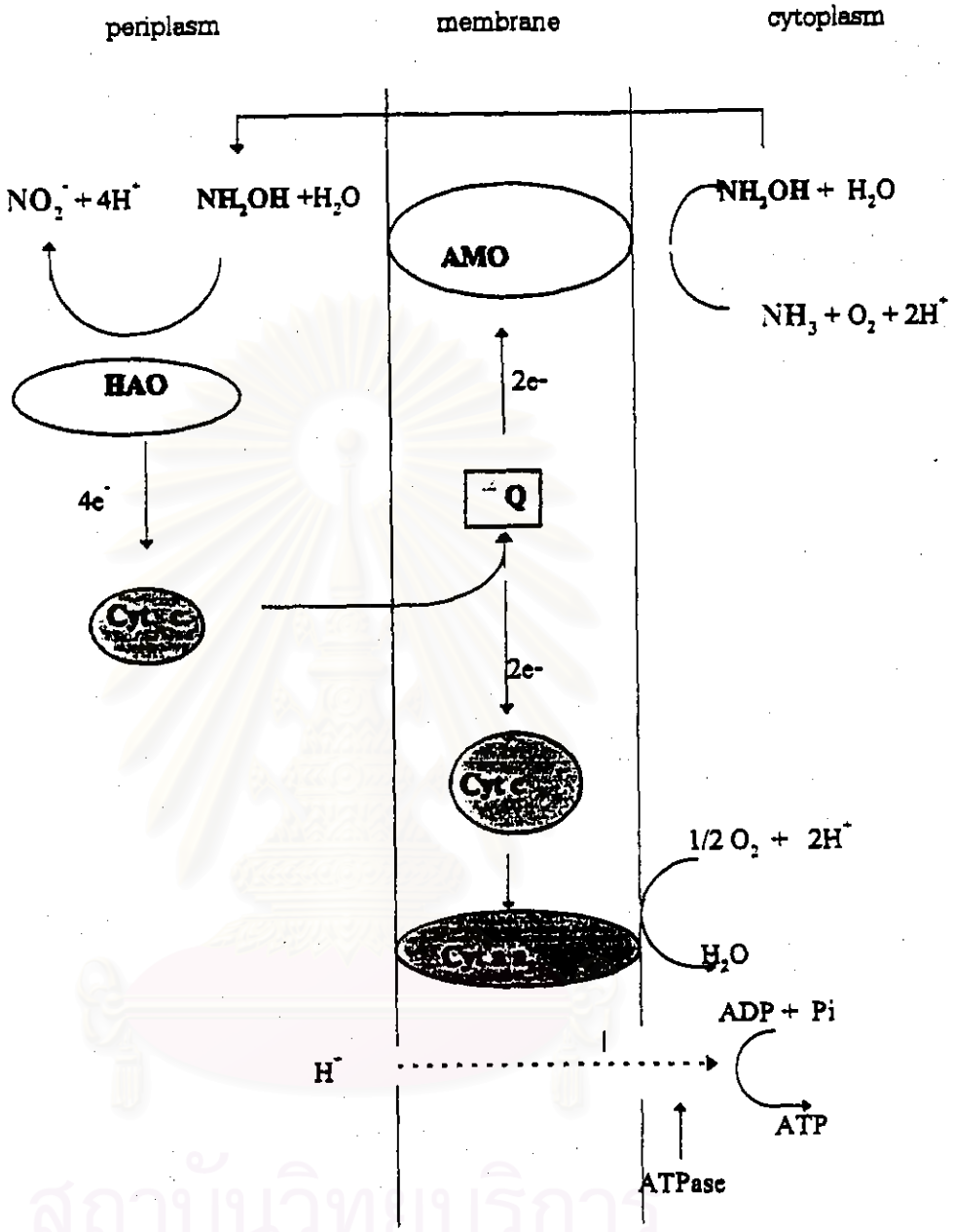
$$NH_2OH + O_2 \longrightarrow NO_2^- + H_2O + H^+$$

จะได้ $NH_3 + 2O_2 + NADH \longrightarrow NO_2^- + 2H_2O + NAD^+$

ปฏิกิริยานี้จำเป็นต้องเกิดขึ้นในภาวะที่มีออกซิเจนอย่างเพียงพอ เกิดขึ้นบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย โดยมี แอมโมเนียเป็นตัวให้อิเลคตรอน (electron donor) และมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้าย (terminal electron acceptor) เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์แอมโมเนียโมโนออกซิเจนเนส (ammonia monooxygenase ,AMO) ทำหน้าที่ออกซิไดซ์ แอมโมเนีย ให้ได้เป็น ไฮดรอกซิลเอมีน (NH_2OH) และได้น้ำเป็นผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนแรก ในขั้นตอนนี้จะไม่ได้พลังงาน ไฮดรอกซิลเอมีน ถูกออกซิไดซ์ต่อไป ได้ไนไตรท์เป็นผลิตภัณฑ์ โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไฮดรอกซิลเอมีน ออกซิโดรีดักเทส (hydroxylamine oxidoreductase, HAO) ซึ่งในขั้นตอนนี้ได้พลังงานเกิดขึ้น และมีการขนส่งอิเลคตรอน โดยไซโตโครม (Brock และ Madigan . 1991) ดังรูปที่ 1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



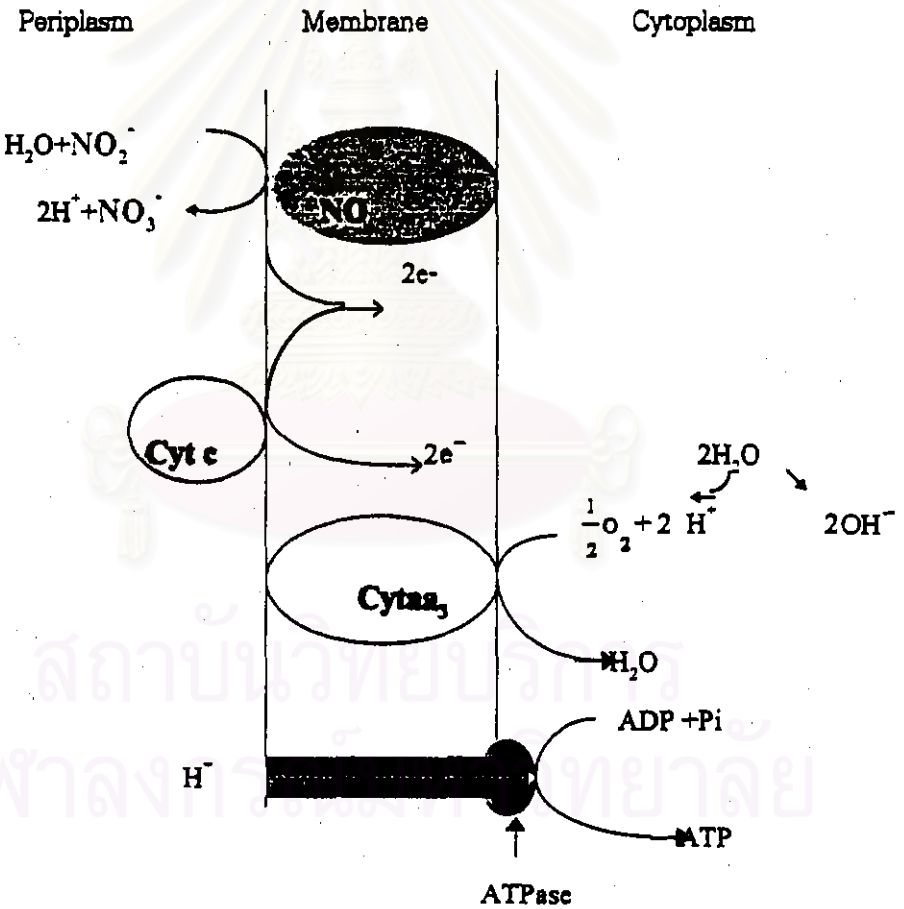
รูปที่ 1 ปฏิกริยาออกซิเดชันของแอมโมเนียและการขนส่งอิเลคตรอนของคีโมออโตโทรฟิค แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Brock และ Madigan , 1991)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2. **ปฏิกิริยาไนไตรท์ออกซิเดชัน** (nitrite oxidation) คือ ปฏิกิริยาของการออกซิไดซ์ไนไตรท์ ให้เป็นไนเตรท โดยคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย ดังสมการ

$$NO_2^- + \frac{1}{2}O_2 \longrightarrow NO_3^-$$

ปฏิกิริยาเกิดบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย โดยไนไตรท์ เป็นตัวให้อิเลคตรอน และมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้าย ดังนั้นปฏิกิริยาจึงต้องเกิดในภาวะที่มีออกซิเจน โดยมีเอนไซม์ ไนไตรท์ออกซิเดส (nitrite oxidase, NO) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา การออกซิไดซ์ไนไตรท์ให้เป็น ไนเตรท เกิดขึ้นในขั้นตอนเดียว เป็นการถ่ายอิเลคตรอนที่สั้นมาก ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไนไตรท์และการขนส่งอิเลคตรอนโดยคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Brock และ Madigan, 1991)

2 **เฮทเทอโรโทรฟิค ไนตริฟิเคชัน** (heterotrophic nitrification)

เป็นปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันที่เกิดขึ้นโดย จุลินทรีย์ในกลุ่มเฮทเทอโรโทรฟิค ซึ่งสามารถใช้ทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ไนโตรเจน เป็นแหล่งพลังงาน เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน จะได้ ไนเตรท เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายเหมือนกัน

ปฏิกิริยาการออกซิไดซ์สารอนินทรีย์ไนโตรเจนให้เป็นไนเตรท ซึ่งจะมีสารไฮดรอกซิลเอมีนและไนไตรท์เป็นสารตัวกลาง ดังสมการ

$$NH_4^+ \longrightarrow NH_2OH \longrightarrow NOH \longrightarrow NO_2^- \longrightarrow NO_3^-$$

ปฏิกิริยาการออกซิไดซ์สารอินทรีย์ไนโตรเจนให้เป็นไนเตรท ซึ่งจะมีสารเอมีนหรือ เอไมด์ และสารประกอบไนโตร เป็นสารตัวกลาง ดังสมการ

$$R\text{-}NH_2 \longrightarrow R\text{-}NHOH \longrightarrow R\text{-}NO \longrightarrow R\text{-}NO_2 \longrightarrow NO_3^-$$

จุลินทรีย์ในกลุ่มเฮทเทอโรโทรฟิคที่มีความสำคัญในปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน ได้แก่ แบคทีเรียจำพวก *Arthrobacter* sp. *Microbacterium* sp. และ *Pseudomonas* sp. และราในกลุ่ม *Penicillium* sp. (Aleem, 1975)

จากการศึกษาความสำคัญของปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันในการกำจัดแอมโมเนีย พบว่า คีโมออโตโทรฟิคไนตริฟิเคชัน มีความสำคัญมากกว่าเฮทเทอโรโทรฟิคไนตริฟิเคชัน ซึ่ง Focht และ Verstraete (1977) รายงานว่า การออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนเตรทของโดยเฮทเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียเกิดขึ้นน้อย และความสำคัญน้อยกว่าปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันที่เกิดโดยออโตโทรฟิคแบคทีเรีย ดังตารางที่ 1 ดังนั้นจึงจะกล่าวถึง คีโมออโตโทรฟิคไนตริฟิเคชัน

ตารางที่ 1 อัตราการเกิดไนตริฟิเคชันของเฮทเทอโรโทรฟิคและออโตโทรฟิคแบคทีเรีย (Focht และ Verstraete , 1977)

organism	substrate	product	rate of formation (μgN/day/g dry cell)	Max. product accumulation (μgN/ml)
Arthrobacter (heterotroph)	NH_4^+	nitrite	375-9000	0.2-1.0
Arthrobacter (heterotroph)	NH_4^+	nitrate	250-650	2.0-4.5
Aspergillus (heterotroph)	NH_4^+	nitrate	1350	75
Nitrosomonas (autotroph)	NH_4^+	nitrite	1-30 million	2000-4000
Nitrobacter (autotroph)	NO_2^-	nitrate	5-70 million	2000-4000

ลักษณะและชนิดของคีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรีย

คีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรีย แบ่งเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะของปฏิกิริยาออกซิเดชัน คือ คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์ แบคทีเรียในกลุ่มนี้มักพบในสกุล *Nitrosomonas* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ขนาดเล็ก รูปร่างเป็นแท่ง นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียสกุลอื่นๆที่สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์เช่นเดียวกัน ได้แก่ *Nitrosococcus* sp. *Nitrosospira* sp. *Nitrosovibrio* sp. และ *Nitrosolobus* sp. สำหรับ คีโมออโตโทรฟิคออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรีย ในกลุ่มไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซไนไตรท์ให้เป็นไนเตรท มักพบในสกุล *Nitrobacter* sp. และยังพบไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียในสกุลอื่นที่สามารถออกซิไดซ์ไนไตรท์ให้เป็นไนเตรทเช่นเดียวกัน ได้แก่ *Nitrospira* sp. *Nitrococcus* sp. และ *Nitrospina* sp. ปัจจุบันจัดออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรียอยู่ใน วงศ์ Nitrobacteraceae ตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 1994 โดยพบคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย 5 สกุล (genus) และคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย 4 สกุล ดังนี้

คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย

1. **สกุล *Nitrosomonas*** เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น ส่วนปลายของแท่งจะกลมมน ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ด้วย มีบางชนิดไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ การจัดเรียงตัวของไซโตพลาสมิคเมมเบรน เป็นแบบ flattened vesicles ในส่วนของ peripheral เซลล์ขยายพันธุ์โดยการแบ่งเป็นสอง (binary fission) ดังรูปที่ 3 สกุล *Nitrosomanas* sp. จัดจำแนกตามลักษณะโครงสร้างของเซลล์ และ ส่วนประกอบของ DNA แบ่งได้ 10 ชนิด ดังนี้

1.1. ***Nitrosomonas communis***(Watson,1989)

รูปร่างเป็นแท่งมีขนาด 1.0 ถึง 1.4 x 1.7 ถึง 1.2 ไมโครเมตร มีส่วนประกอบของ G + C 45.8 โมลเปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถใช้ยูเรีย (urea) เป็นแหล่งพลังงาน พบในดิน

1.2. ***Nitrosomanas urea*** (Watson,1989)

รูปร่างเป็นแท่ง ส่วนปลายมน มีขนาด 0.9 ถึง 1.1 x 1.5 ถึง 2.5 ไมโครเมตร ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถใช้ยูเรีย เป็นแหล่งพลังงาน มีส่วนประกอบของ G + C 45.8 โมลเปอร์เซ็นต์ พบในดิน

1.3. ***Nitrosomonas europaea*** (Wincgradsky, 1892)

รูปร่างเป็นแท่งสั้น มีขนาด 0.8 ถึง 1.1 x 1.0 ถึง 1.7 ไมโครเมตร ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ มีส่วนประกอบของ G + C 51.0 โมลเปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถใช้ยูเรีย เป็นแหล่งพลังงาน พบในดิน

1.4. ***Nitrosomonas nitrosa*** (Watson,1989)

รูปร่างกลม หรือเป็นแท่งส่วนปลายมน มีขนาด 1.3 ถึง 1.5 x 1.4 ถึง 2.2 ไมโครเมตร ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ มีส่วนประกอบของ G + C 47.9 โมลเปอร์เซ็นต์ และสามารถใช้ยูเรีย เป็นแหล่งพลังงาน พบในน้ำจืด

1.5. ***Nitrosomonas europha*** (Watson,1989)

รูปร่างไม่แน่นอน พบเป็นแท่ง รูปลูกแพร์ หรือกลม บางครั้งพบว่ามีการเรียงตัวเป็นสายสั้นๆ มีขนาด 1.0 ถึง 1.3 x 1.6 ถึง 2.3 ไมโครเมตร ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ มีส่วนประกอบของ G + C 48.2 โมลเปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถใช้ยูเรีย เป็นแหล่งพลังงาน พบในน้ำจืด

1.6. ***Nitrosomonas oligotropha*** (Watson,1989)

รูปร่างเป็นแท่งมีส่วนปลายมน หรือรูปร่างกลม มีขนาด 0.8 ถึง 1.2 x 1.1 ถึง 2.4 ไมโครเมตร ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ มีส่วนประกอบของ G + C 49.7 โมลเปอร์เซ็นต์ และสามารถใช้ยูเรีย เป็นแหล่งพลังงาน พบในน้ำจืด

1.7. ***Nitrosomonas halophila*** (Watson,1989)

รูปร่างเป็นแท่งสั้น มีขนาด 1.1 ถึง 1.5 x 1.5 ถึง 2.2 ไมโครเมตร ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ในการเจริญต้องการโซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 300 มิลลิโมลาร์ มีส่วนประกอบของ G + C 53.8 โมลเปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถใช้ยูเรีย เป็นแหล่งพลังงาน พบในน้ำทะเล

1.8. ***Nitrosomonas marina*** (Watson,1989)

รูปร่างเป็นแท่งมีส่วนปลายมน มีขนาด 0.7 ถึง 0.9 x 1.4 ถึง 2.3 ไมโครเมตร ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ต้องการโซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 350 มิลลิโมลาร์ มีส่วนประกอบของ G + C 47.7 โมลเปอร์เซ็นต์ และสามารถใช้ยูเรีย เป็นแหล่งพลังงาน พบในน้ำทะเล

1.9. ***Nitrosomonas aestuarii*** (Watson,1989)

รูปร่างเป็นแท่งมีส่วนปลายมน มีขนาด 1.6 ถึง 1.8 x 1.4 ถึง 2.0 ไมโครเมตร ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ต้องการโซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 300 มิลลิโมลาร์ มีส่วนประกอบของ G + C 45.8 โมลเปอร์เซ็นต์ และสามารถใช้ยูเรีย เป็นแหล่งพลังงาน พบในน้ำทะเล

1.10. ***Nitrosomonas cryotolerans*** (Jones, Morita, Koops และ Watson, 1988)

รูปร่างเป็นแท่งมีส่วนปลายมน มีขนาด 1.2 ถึง 2.2 x 2.0 ถึง 4.0 ไมโครเมตร ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ต้องการโซเดียมคลอไรด์ และมีส่วนประกอบของ G + C 45.8 โมลเปอร์เซ็นต์ พบในน้ำทะเล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 ภาพถ่ายอิเลคตรอนไมโครกราฟของ *Nitrosomonas sp.* (Bock และคณะ, 1986)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2 สกุล ***Nitrosococcus*** เซลล์ในสกุลนี้ มีรูปร่างกลม ดังรูปที่ 4 มีทั้งชนิดที่เคลื่อนที่ได้และไม่ได้ เรียงตัวของเซลล์มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ คู่ หรือเรียงตัวเป็น 4 เซลล์ สามารถอยู่เป็นอิสระในอาหารเหลว หรือตรึงติดกับวัสดุอื่น พบในน้ำเค็มและดิน มีส่วนประกอบของ G + C 50.5 ถึง 51.0 โมลเปอร์เซ็นต์ สกุล *Nitrosococcus* sp. จัดจำแนกตามลักษณะโครงสร้างของเซลล์ และ ส่วนประกอบของ DNA แบ่งได้ 3 ชนิด ดังนี้

2.1 ***Nitrosococcus nitrosus*** (Buchanan, 1925)

รูปร่างกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1.5 ถึง 1.9 ไมโครเมตร ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ มีส่วนประกอบของ G + C 49.7 โมลเปอร์เซ็นต์ พบในดิน

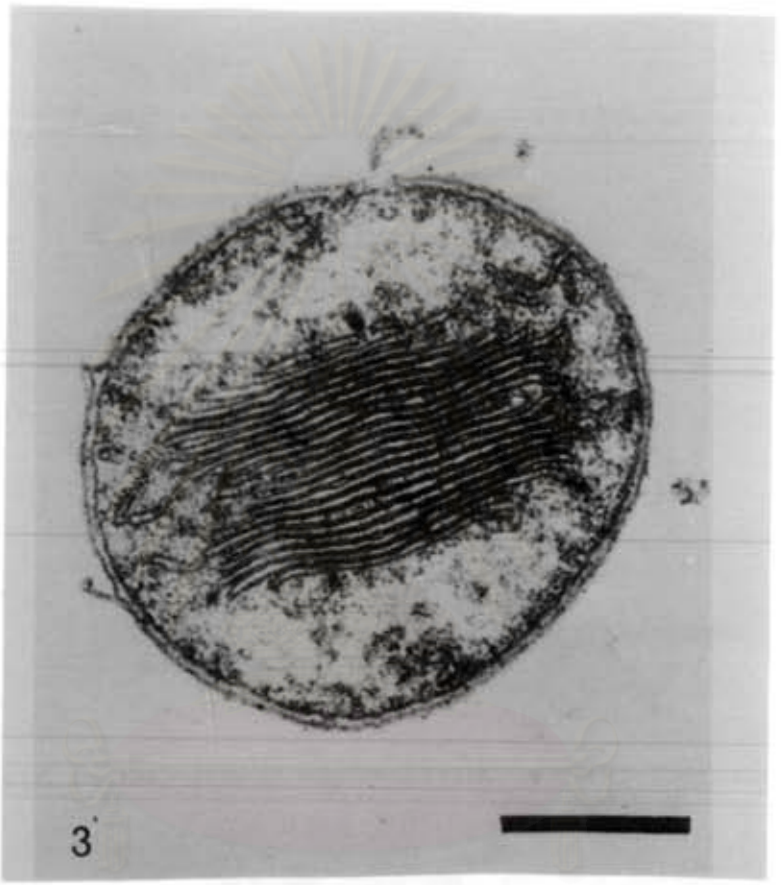
2.2 ***Nitrosococcus oceanus*** (Watson, 1965)

รูปร่างกลม พบเป็นเซลล์เดี่ยว หรือคู่ มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1.8 ถึง 2.2 ไมโครเมตร มีส่วนประกอบของ G + C 50.0 โมลเปอร์เซ็นต์ พบในน้ำทะเล

2.3 ***Nitrosococcus mobilis*** (Koops, 1976)

รูปร่างกลม พบเป็นเซลล์เดี่ยว หรือคู่ และอาจพบการเรียงตัวเป็นสายสั้นๆ เซลล์มีขนาดไม่แน่นอน เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1.2 ถึง 1.9 ไมโครเมตร มีส่วนประกอบของ G + C 49.5 โมลเปอร์เซ็นต์ พบในน้ำทะเล

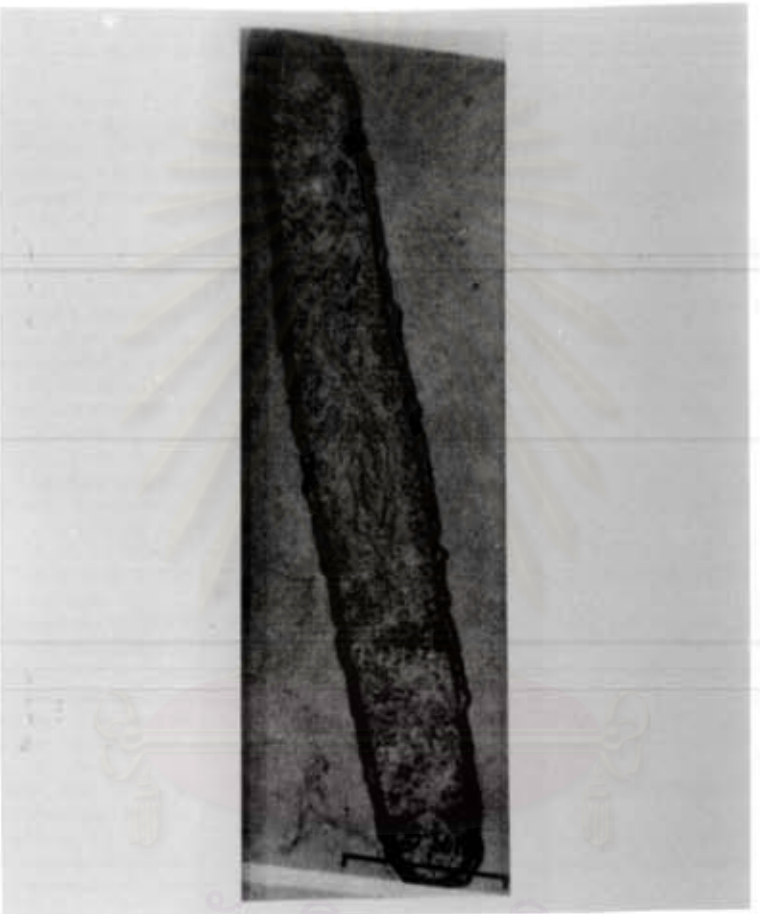
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 ภาพถ่ายอิเลคตรอนไมโครกราฟของ *Nitrosococcus oceanus* (Bock และคณะ,1986)

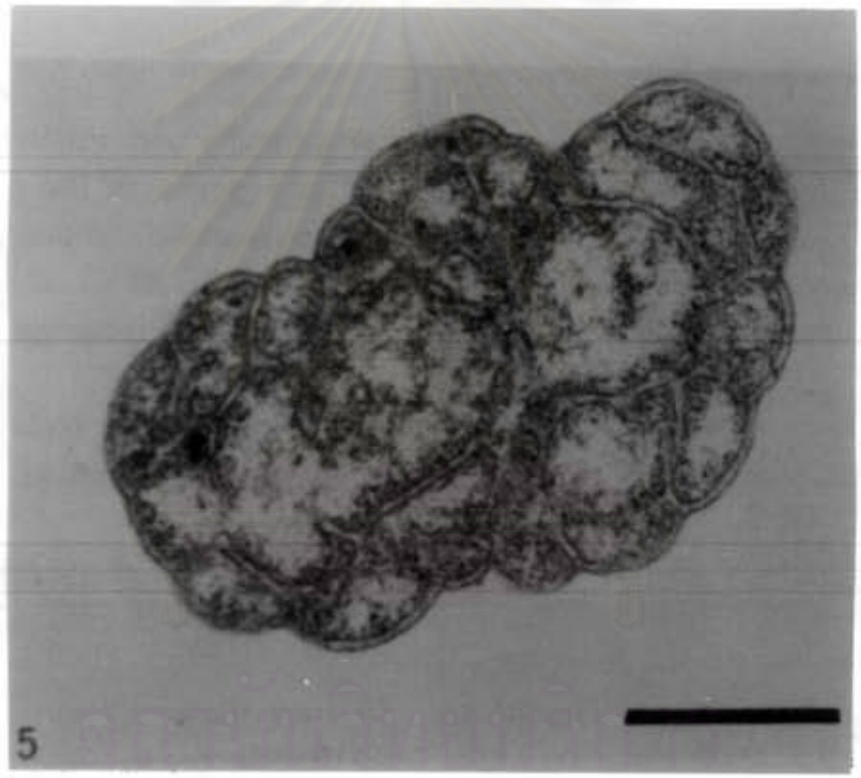
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3 สกุล ***Nitrosospira*** เซลล์มีรูปร่างเป็นเกลียว ถ้าเป็นเกลียวสั้นจะเห็นเป็นแท่งสั้น ดังรูปที่ 5 มีไซโตโครมในเซลล์ปริมาณมาก เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเหลืองหรือสีแดง ในสกุลนี้มีเพียง 1 ชนิดคือ ***Nitrosospira briensis*** (Bock และคณะ,1986) มีส่วนประกอบของ G+C content 54.1 โมลเปอร์เซ็นต์ พบในดิน



รูปที่ 5 ภาพถ่ายอิเลคตรอนไมโครกราฟของ *Nitrosospira briensis.* (Bock และคณะ, 1986)

4. สกุล ***Nitrosolobus*** เซลล์มีรูปร่างไม่แน่นอน มีลักษณะเป็นก้อน พู ดังรูปที่ 6 มีการแบ่งเซลล์โดยการหลุดออกของพู ในสกุลนี้มีเพียง 1 ชนิด แยกได้จากดินและน้ำเสีย คือ ***Nitrosolobus multiformis*** (Bock และคณะ,1986) ลักษณะเซลล์ มีรูปร่างคล้ายสมอง (brain- like) ขนาด 1.0 ถึง 1.5 x 1.0 ถึง 2.5 ไมโครเมตร ภายในเซลล์มีส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์แทรกเข้าไป ทำให้แบ่งเป็นพูประมาณ 1 ถึง 5 พูต่อเซลล์ มีส่วนประกอบของ G + C 55.1 โมลเปอร์เซ็นต์



รูปที่ 6 ภาพถ่ายอิเลคตรอนไมโครกราฟของ *Nitrosolobus multiformis* (Bock และคณะ,1986)

5 สกุล ***Nitrosovibrio*** เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งโค้ง หรือแท่งยาว ขนาด 0.3 ถึง 0.4 x 1.1 ถึง 3.0 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 7 เคลื่อนที่ได้ ไม่มี ไซโตพลาสมิคเมมเบรน ในช่วงแรกของการเติบโตเซลล์มีรูปร่างกลมขนาด 1.0 ถึง 1.2 ไมโครเมตร มี ส่วนประกอบ G + C 53.6 ถึง 54.2 โมลเปอร์เซ็นต์ แยกได้จากดิน สกุลนี้มีเพียง 1 ชนิดคือ ***Nitrosovibrio tenuis*** (Bock และคณะ,1986) พบในดิน

รูปที่ 7 ภาพถ่ายอิเลคตรอนไมโครกราฟของ *Nitrosovibrio tenuis* (Bock และคณะ, 1986)

ไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย

1. **สกุล *Nitrobacter*** เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น รูปลิ่ม หรือ รูปลูกแพร์ มีการยืดขยายในด้านใดด้านหนึ่ง ของไซโตเมมเบรน เพื่อที่จะแบ่งออกเป็นสองเซลล์ การขยายพันธุ์โดยวิธีแตกหน่อ (budding) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียสกุลนี้ มีขนาด 0.6 ถึง 0.8 x 1.2 ถึง 2.0 ไมโครเมตร แบ่งเป็น 4 ชนิดดังนี้

1.1. ***Nitrobacter winogradsky*** (Winogradsky, 1892)

เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น รูปลิ่ม หรือ รูปลูกแพร์ มีขนาด 0.6 ถึง 0.8 x 1.2 ถึง 2.0 ไมโครเมตร มีการเจริญได้ทั้งในอาหารอินทรีย์ และ อาหารอนินทรีย์ ส่วนประกอบของ G + C ในเซลล์ 61.7 โมลเปอร์เซ็นต์ พบในน้ำจืด และน้ำทะเล

1.2. ***Nitrobacter hamburgensis*** (Bock และคณะ, 1983)

เซลล์มีรูปร่างไม่แน่นอน ดังรูปที่ 8 มีการเจริญได้ทั้งในอาหารอินทรีย์และอาหารอนินทรีย์ ส่วนประกอบของ G + C ในเซลล์ 59.2 โมลเปอร์เซ็นต์ พบในดิน

1.3. ***Nitrobacter agilis*** (Bock และคณะ, 1983)

เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง มีขนาดไม่แน่นอน แบ่งตัวโดยการแตกหน่อ สามารถเคลื่อนที่ได้ พบในดิน

1.4. ***Nitrobacter vulgaris*** (Bock Harms และ Rudert, 1990)

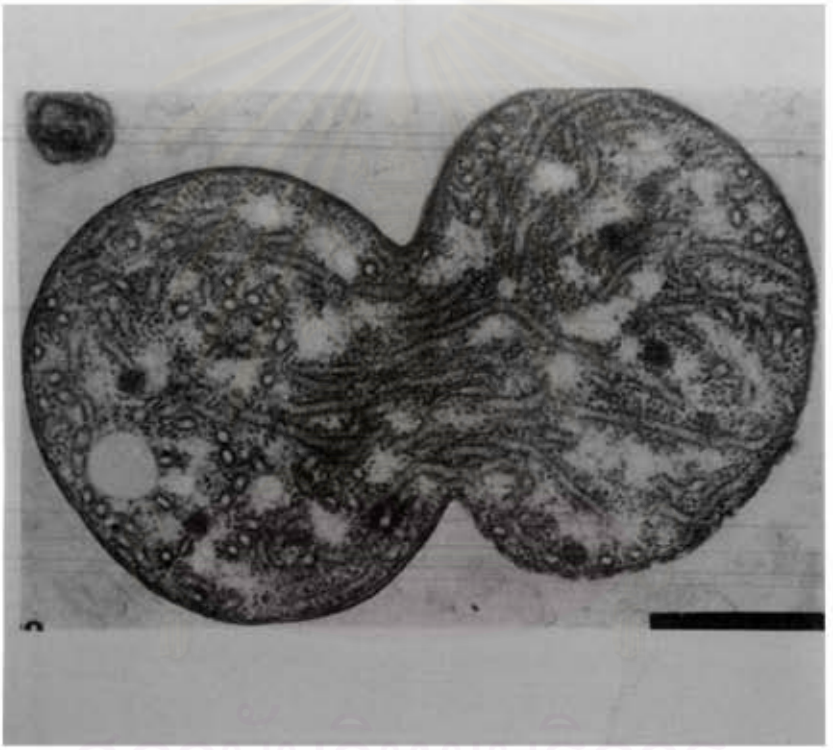
เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง มีขนาดไม่แน่นอน 0.5 ถึง 0.8 x 1.0 ถึง 2.0 ไมโครเมตร แบ่งตัวโดยการแตกหน่อ สามารถเคลื่อนที่ได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวพบว่ามีการสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งเป็นสาร โพลีเบต้าไฮดรอกซิบิวทาเรท (Poly - β - hydroxybutarate) เกาะติดกับผิวของขวดรูปชมพู่ พบในน้ำจืด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 ภาพถ่ายอิเลคตรอนไมโครกราฟของ *Nitrobacter hamburgensis* (Bock และคณะ,1986)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

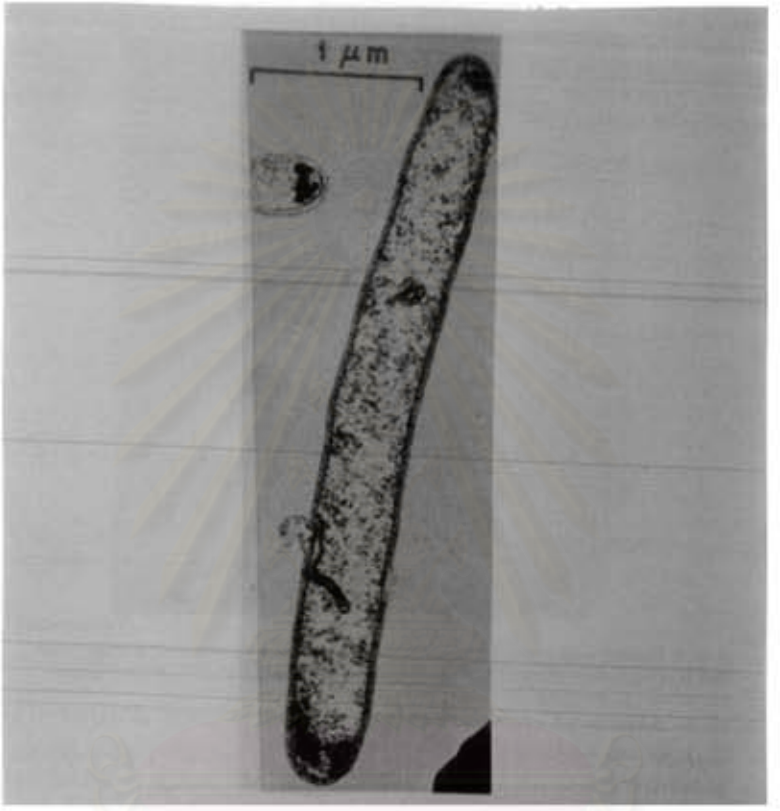
2 สกุล ***Nitrococcus*** เซลล์มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ไมโครเมตร หรือมากกว่า เคลื่อนที่ได้ มี ไซโตโครมในเซลล์ มาก จึงเห็นเป็นสีของอาหารเหลวที่มีเซลล์ ไม่ใช่เกิดจากเม็ดสี ต้องการออกซิเจน เติบโตได้ในน้ำเค็ม 70 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น อาจพบเป็นเซลล์อิสระในอาหารเหลว หรืออยู่เป็นกลุ่มเล็กๆ ตั้งแต่ 100 เซลล์ขึ้นไป มี ส่วนประกอบ ของ G + C 61.2 โมลเปอร์เซนต์ มีเพียง 1 ชนิดเท่านั้น คือ ***Nitrococcus mobilis*** (Bock และคณะ, 1986) ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 ภาพถ่ายอิเลคตรอนไมโครกราฟของ *Nitrococcus mobilis* (Bock และคณะ, 1986)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3 สกุล ***Nitrospina*** เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งยาวตรง ขนาด 0.3 ถึง 0.4 x 2.7 ถึง 6.5 ไมโครเมตรไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ แยกได้จากน้ำทะเล มี ส่วนประกอบของ G + C 57.7 โมลเปอร์เซนต์ ในสกุลนี้มีเพียง 1 ชนิด คือ ***Nitrospina gracilis*** (Bock และคณะ,1986) ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 ภาพถ่ายอิเลคตรอนไมโครกราฟของ *Nitrospina gracilis* (Bock และคณะ,1986)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4 สกุล ***Nitrospira*** เซลล์มีลักษณะเป็นแท่งโค้ง หรือม้วนเป็นเกลียว 1 ถึง 12 รอบ ดังรูปที่ 11 ไม่พบไซโตพลาสมิคเมมเบรน แยกได้จากน้ำเค็มเท่านั้น มีส่วนประกอบของ G + C 50.0 ถึง 50.5 โมลเปอร์เซนต์ ในสกุลนี้มี 1 ชนิด คือ ***Nitrospira marina*** (Bock และคณะ,1986)

รูปที่ 11 ภาพถ่ายอิเลคตรอนไมโครกราฟของ *Nitrospira marina* (Bock และคณะ 1986)

การเจริญและการกระจายของคีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรีย

คีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่มีอัตราการเจริญช้า Skinner และ Walker (1968) รายงานว่า การเจริญของ *Nitrosomonas* sp. และ *Nitrobacter* sp. ในธรรมชาติ มี generation time ประมาณ 20 ถึง 40 ชั่วโมง แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียดังกล่าวพบว่า มี generation time เพียง 8 ชั่วโมง เนื่องจากในการเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ได้ควบคุมปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ เช่น ค่าความเป็นกรดด่าง ออกซิเจน ปริมาณสารอนินทรีย์ไนโตรเจน และ อุณหภูมิ เป็นต้น ในขณะที่ในธรรมชาติไม่ได้มีการควบคุมปัจจัยดังกล่าว รวมทั้งการถูกแก่งแย่งสารอาหารโดยเฮทเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย และผลของสารเคมีที่อาจยับยั้งการเจริญได้ ดังนั้นอัตราการเจริญของไนตริฟายอิงแบคทีเรียในธรรมชาติจึงช้ากว่าเชื้อบริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังพบว่าแหล่งที่อยู่ของแบคทีเรียในธรรมชาติมีผลต่อการกระจายของแบคทีเรีย ซึ่ง Matulewich และคณะ (1978) ศึกษาการกระจายของคีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรียในแหล่งน้ำโดยวิธี most probable number (MPN) พบว่า มีจำนวนมากที่สุดบริเวณรากของพืชน้ำ รองลงมาคือสาหร่าย หิน ในตะกอน และในน้ำ ตามลำดับ สำหรับในตะกอนพบว่า ที่ความลึกของตะกอน 5 เซ็นติเมตร มีจำนวนคีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรียมากกว่า บริเวณผิวตะกอน

การคัดเลือกและแยกเชื้อคีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรีย

ในการแยกและคัดเลือกคีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรียนั้น ค่อนข้างทำได้ยาก เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่มีขนาดเล็ก การเจริญช้า มีปริมาณน้อยในธรรมชาติ และ มักถูกปนเปื้อนโดยแบคทีเรียอื่นโดยเฉพาะเฮทเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย ดังนั้นในการแยกเชื้อ ต้องเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมสำหรับ คีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรีย

1. **การคัดเลือกและแยกคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย**

ในการแยกและคัดเลือกคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำ ซึ่งมีจำนวนเชื้อน้อย และเจริญช้า ดังนั้นจึงต้องเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งอาหารสมบูรณ์และแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็งเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว โดยอาหาร 2 สูตรที่แตกต่างกันคือ

Enrichment medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ใช้ในการเพิ่มจำนวนประชากรของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียให้มีจำนวนมากขึ้น ที่มีส่วนประกอบที่สำคัญคือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่ง

คาร์บอน และเติมฟีนอลเรด (phenol red) เป็นอินดิเคเตอร์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับค่าความเป็นกรดด่าง ให้ได้ 8.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจน

สูตรอาหาร Enrichment Medium ที่นิยมใช้ในการเพิ่มจำนวนคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียมีหลายสูตรดังนี้

1. Ammonia Oxidizing Medium ตามสูตรของ MacDonald และ Spoke (1980) .

$(NH_4)_2SO_4$	0.5	กรัม
KH_2PO_4	0.2	กรัม
$CaCl_2$	0.02	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.04	กรัม
FeNaEDTA	0.1	มิลลิลิตร
phenol red	2.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

2. Ammonia Oxidizing Medium ตามสูตรของ Watson (1975)

$(NH_4)_2SO_4$	1.32	กรัม
K_2HPO_4	0.114	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.02	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
Fe citrate	0.12	กรัม
$Na_2MoO_4.2H_2O$	1.0	ไมโครกรัม
$MnCl_2.4H_2O$	2.0	ไมโครกรัม
$CoCl_2.6H_2O$	2.0	ไมโครกรัม
$CuSO_4.5H_2O$	20	ไมโครกรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	100	ไมโครกรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

3. Ammonia Oxidizing Medium ตามสูตรของ Atlas (1981)

$(NH_4)_2SO_4$	1.0	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
NaCl	2.0	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.05	กรัม

$CaCO_3$	6.0	กรัม
trace element solution	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

trace element solution ประกอบด้วย

H_3BO_3	2.0	มิลลิกรัม
$NaMoO_4.2H_2O$	0.5	มิลลิกรัม
$MnCl_2.4H_2O$	0.4	มิลลิกรัม
$CoCl_2.6H_2O$	10	ไมโครกรัม
$CuSO_4.5H_2O$	0.4	ไมโครกรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	50	ไมโครกรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

4. Ammonia Oxidizing Medium (Marine) ตามสูตรของ Atlas (1981)

$(NH_4)_2SO_4$	1.32	กรัม
K_2HPO_4	0.114	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.02	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
Fe citrate	0.12	กรัม
$Na_2MoO_4.2H_2O$	1.0	ไมโครกรัม
$MnCl_2.4H_2O$	2.0	ไมโครกรัม
$CoCl_2.6H_2O$	2.0	ไมโครกรัม
$CuSO_4.5H_2O$	20	ไมโครกรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	100	ไมโครกรัม
น้ำทะเล	1000	มิลลิลิตร

5. Ammonia Oxidizing Medium ตามสูตรของ Koops Harms และ Wehrmann (1970)

$CaCO_3$	5.0	กรัม
NH_4Cl	0.5	กรัม
KH_2PO_4	0.05	กรัม
น้ำทะเล	400	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	600	มิลลิลิตร

6. Ammonia Oxidizing Medium ตามสูตรของ Atlas (1981)

$(NH_4)_2SO_4$	1.32	กรัม
K_2HPO_4	100	มิลลิกรัม
$CaCl_2.2H_2O$	8.0	มิลลิกรัม
$MgSO_4.7H_2O$	60	มิลลิกรัม
$FeSO_4.7H_2O$	8	มิลลิกรัม
$NaHCO_3$	240	มิลลิกรัม
Na_2CO_3	340	มิลลิกรัม
trace element	0.1	มิลลิลิตร
น้ำทะเล	1000	มิลลิลิตร
trace element ประกอบด้วย		
$Na_2MoO_4.2H_2O$	100	มิลลิกรัม
$MnCl_2.4H_2O$	1000	มิลลิกรัม
$CoCl_2.6H_2O$	30	มิลลิกรัม
$CuSO_4.5H_2O$	50	มิลลิกรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	700	มิลลิกรัม
KCL	100	มิลลิกรัม
$KAl(SO_4).2H_2O$	100	มิลลิกรัม
EDTA	975	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

7. *Nitrosomonas* Medium ตามสูตรของ Abeliovich(1987)

$(NH_4)_2SO_4$	3.0	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.004	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.05	กรัม
chelate iron	0.1	มิลลิกรัม
cresol red (0.0005% solution)	25	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

8. *Nitrosomonas europaea* Medium ตามสูตรของ Atlas (1981)

$(NH_4)_2SO_4$	1.7	กรัม
K_2HPO_4	0.015	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.02	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
ferric EDTA	1.0	มิลลิกรัม
trace element solution		
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.02	กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	0.02	กรัม
$CoCl_2.6H_2O$	0.2	มิลลิกรัม
$CuSO_4.5H_2O$	2.0	มิลลิกรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

9. *Nitrosococcus* Medium ตามสูตรของ Atlas (1981)

$(NH_4)_2SO_4$	1.32	กรัม
K_2HPO_4	8.7	มิลลิกรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.02	กรัม
chelate iron	1.0	มิลลิกรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.38	กรัม
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.1	มิลลิกรัม
$MnCl_2.4H_2O$	0.2	มิลลิกรัม
$CoCl_2.6H_2O$	2	ไมโครกรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.1	มิลลิกรัม
phenol red (0.04% solution)	3.25	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

10. *Nitrosolobus* Medium ตามสูตรของ Atlas (1981)

$(NH_4)_2SO_4$	1.32	กรัม
K_2HPO_4	8.7	มิลลิกรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.02	กรัม
chelate iron	1.0	มิลลิกรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.38	กรัม
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.1	มิลลิกรัม
$MnCl_2.4H_2O$	0.2	มิลลิกรัม
$CoCl_2.6H_2O$	2.0	ไมโครกรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.1	มิลลิกรัม
phenol red (0.5% solution)	0.25	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

11. *Nitrosomonas* Medium ตามสูตรของ Watson (1971)

$(NH_4)_2SO_4$	2.0	กรัม
K_2HPO_4	0.0159	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.02	กรัม
chelate iron	1.0	มิลลิกรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$Na_2MoO_4.2H_2O$	100	ไมโครกรัม
$MnCl_2.4H_2O$	200	ไมโครกรัม
$CoCl_2.6H_2O$	2	ไมโครกรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	100	ไมโครกรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

Isolation medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการแยกเชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งมีส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเหมือนกับ enrichment medium และเติมวุ้นบริสุทธิ์โนเบิลอาการ์ (noble agar) 15 กรัมต่อลิตร เป็นต้นกำเนิดของคาร์บอนไดออกไซด์ และ เพื่อรักษาระดับของค่าความเป็นกรดด่างให้คงที่ การสร้างโคโลนีของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจะเกิดขึ้นภายในระยะเวลา 2 ถึง 4 สัปดาห์ ในการทดสอบเพื่อคัดเลือกแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย ทำได้โดย

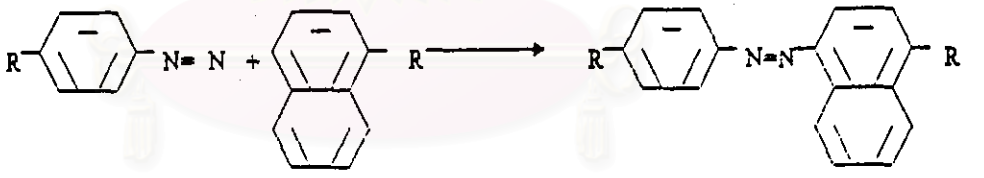
การทดสอบความสามารถในการสร้างไนไตรท์

การทดสอบความสามารถในการสร้างไนไตรท์ของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย โดยตรวจหาไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่ง ทดสอบด้วย Greiss-Ilosvay reagent (Schmidt และ Belser, 1982) ที่ประกอบด้วย สารละลาย 2 ชนิดคือ สารละลาย ของกรดซัลฟานิลิก ใน 30 เปอร์เซ็นต์ ของกรดอะซิติก และสารละลาย ของ อัลฟา-เนฟธิลเอมีนในกรดอะซิติกเข้มข้น โดย สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อหยดสารทดสอบลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติบโตของเชื้อ หากพบไนไตรท์อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพูหรือสีแดง เนื่องจากไนไตรท์ที่เกิดขึ้น จากการออกซิเดชันของเชื้อ ทำปฏิกิริยากับสารประกอบอะโรมาติกเอมีน (diazotizing reagent) ในสารละลายที่เป็นกรด โดยเกลือไดอาโซเนียม(diazonium) ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับสารประกอบอะโรมาติก ซึ่งมีกลุ่มอะมิโนหรือไฮดรอกไซด์ (coupling reagent) แล้วทำให้เกิดสีแดงขึ้น ดังสมการ

ก)

(1)

ข)



(2)

ก) ปฏิกิริยา diazotization (1) sulfanilamide (R= $-SO_2 \cdot NH_2$)

ข) ปฏิกิริยา coupling (2) [*N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine] (R = $-NH \cdot CH_2CH_2 \cdot NH_2$)

วิธี Greiss- Ilosvay เป็นวิธีที่มีความไว ความจำเพาะ และไม่ถูกรบกวนด้วยอิออนในภาวะที่มีความเข้มข้นสูง (Rider และ Mellon,1946) และเหมาะสมที่จะทดสอบสารปริมาณน้อย

การทดสอบคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย

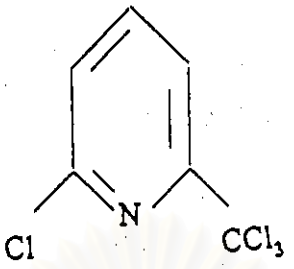
ก. **ความสามารถในการใช้สารอินทรีย์**

การทดสอบเพื่อยืนยันว่าแบคทีเรียที่แยกได้เป็นคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย ทำได้โดยการเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบ ตามวิธีของ Suwa (1994) ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนิวเตรียนท์ (nutrient broth) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปทิเคส ซอย (trypticase soy broth) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเด็กโตรส (dextrose broth) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปโตน กลูโคส บีฟสกัด (tryptone - glucose - beef extract broth) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเปปโตน ยีสต์สกัด (peptone - yeast extract broth) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลววายเอ็ม (YM broth) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวฟลูอิด ไธโอไกลคอลเลต (fluid thioglycollate broth) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์สกัด มอลท์สกัด (yeast extract - malt extract broth) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ซาแพ็ค ด็อก (Czapek - Dox broth) โดยปรกติแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารอินทรีย์ที่ไม่มีแอมโมเนียเป็นองค์ประกอบ เนื่องจาก แอมโมเนียเป็นโคเฟ็คเตอร์ ของเอนไซม์ NADH ออกซิเดส และถ้าขาดแอมโมเนีย เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ (Krummel และคณะ ,1981)

ข. **สารยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน**

ไนตราไพริน หรือ 2 - chloro -6 - (trichloromethyl) pyridine มีชื่อทางการค้าว่า N - serve เป็นสารเคมีสังเคราะห์อะโรมาติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการออกซิไดซ์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียโดยเฉพาะ แต่จะไม่มีผลต่อเฮทเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย จึงนิยมใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างคีโมออโตโทรฟิคแบคทีเรียกับเฮทเทอโรโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (Belser,1979) คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมไนตราไพริน โดยไนตราไพรินมีผลยับยั้งปฏิกิริยาการออกซิไดซ์แอมโมเนีย เป็น ไฮดรอกซิลเอมีน ซึ่ง เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาแอมโมเนียออกซิเดชัน

โครงสร้างของสารยับยั้งไนตราไพรินเป็นอะโรมาติก (Vannelli และ Hoopers, 1993) ได้แสดงไว้ ดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 โครงสร้างทางเคมีของ 2-chloro-6-(trichloromethyl) pyridine (Vannelli และ Hoopers, 1993)

Hooper (1978) และ Vanneili และ Hooper (1993) รายงานว่า ปฏิกิริยาการยับยั้งเกิดขึ้นโดยกลุ่มไตรคลอโรเมทธิลของไนตราไพรินไปจับกับกลุ่มเมทธิล ของเอนไซม์แอมโมเนียโมโนออกซิเจนเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาแอมโมเนียออกซิเดชัน ดังสมการ

เอนไซม์แอมโมเนียโมโนออกซิเจนเนส

แอมโมเนีย ⟶ ไฮดรอกซิลเอมีน

เอนไซม์ ดิไฮโดรจิเนส ไฮดรอกซิลเอมีน ออกซิโดรีดักเทส

ไฮดรอกซิลเอมีน ⟶ ไนไตรท์

เมื่อไนตราไพรินจับกับแอคติฟไซต์ของเอนไซม์ ทำให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไปไม่ได้จึงยับยั้งการสร้างไฮดรอกซิลเอมีน ทำให้แอมโมเนียออกซิเดชันไม่สมบูรณ์ และไม่มีไนไตรท์เกิดขึ้น

2. การคัดเลือกและแยกคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย

การแยกเชื้อไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวก่อน ซึ่งประกอบด้วยส่วนประกอบที่สำคัญคือ โซเดียมไนไตรท์เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าความเป็นกรดด่าง ให้ได้ 7.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในภาวะที่มีออกซิเจน คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียจะใช้โซเดียมไนไตรท์ เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเจริญ เมื่อมีการเจริญของเชื้อจึงแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีองค์ประกอบเหมือนเดิม และเติมวุ้นบริสุทธิ์โนเบิลอาการ์ 15 กรัมต่อลิตร ในการเจริญของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียไม่ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างเปลี่ยนแปลงมากนัก และคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสามารถในการใช้สารอินทรีย์ ในการเจริญ จากการศึกษาของ Bock Koops และ Harm (1992) รายงานว่า จำนวนเซลล์ของ *Nitrobacter* sp. เพิ่มขึ้น ถ้าหากมีสารอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น อาหารที่เติมยีสต์สกัด (yeast extract) แทนโซเดียมไนไตรท์ โดยปรกติไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสามารถเจริญได้แบบเฮทเทอโรโทรฟิคแบคทีเรีย กล่าวคือ ความสามารถในการใช้สารอินทรีย์ เช่น อะซีเตท (Smith และ Hoare, 1968) หรือไพรูเวท (Bock,1976) โดยแบคทีเรียใช้สารอินทรีย์ดังกล่าวเป็นตัวให้อิเลคตรอน และใช้ไนเตรทหรือออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอน (Bock และคณะ, 1990)

สูตรอาหาร Enrichment Medium ที่นิยมใช้ในการเพิ่มจำนวนคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียมีดังนี้

1. Nitrite Oxidizing Medium ตามสูตรของ Atlas (1981)

$NaNO_2$	0.1	กรัม
$CaCO_3$	6.0	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.005	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

2. *Nitrobacter agilis* Medium ตามสูตรของ Atlas (1981)

KNO_2	0.17	กรัม
$CaCO_3$	10.0	กรัม
K_2HPO_4	0.14	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.14	กรัม

$FeSO_4.7H_2O$	0.03	กรัม
NaCl	0.3	กรัม
Na_2CO_3	0.25	กรัม
Biotin solution	10.0	มิลลิลิตร (0.015 %)
$MnSO_4.4H_2O$	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

3. *Nitrobacter* Medium B ตามสูตรของ Atlas (1981)

$NaNO_2$	1.0	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	5.0	มิลลิกรัม
NaCl	0.3	กรัม
MnSO4	2.0	มิลลิกรัม
Marble chips		
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

5. *Nitrobacter* Medium ตามสูตรของ Atlas (1981)

$NaNO_2$	5.0	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.07	มิลลิกรัม
$MnSO_4.H_2O$	0.07	มิลลิกรัม
KH_2PO_4	196	มิลลิกรัม
$(NH_4)_6Mo_2O_{24}.6H_2O$	0.004	มิลลิกรัม
10mM $CuSO_4$	0.003	มิลลิลิตร
1M $CaCl_2$	0.09	มิลลิลิตร
1M $MgSO_4$	0.09	มิลลิลิตร
K_2HPO_4	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

6. Nitrite Oxidizing Medium ตามสูตรของ Watson (1968)

$NaNO_2$	0.07	กรัม
$MnSO_4.H_2O$	0.1	กรัม
KH_2PO_4	0.02	กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$CaCl_2.6H_2O$	0.006	กรัม
Supplied water	700	มิลลิลิตร
Distilled water	300	มิลลิลิตร

7. Nitrite Oxidizing Medium ตามสูตรของ Alexander (1958)

KNO_2	0.3	กรัม
$MnSO_4.H_2O$	0.1875	กรัม
KH_2PO_4	0.5	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
$KHCO_3$	1.5	กรัม
$CaCl_2.6H_2O$	0.0125	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
NaCl	0.1875	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

8.Nitrite Oxidizing Medium ตามสูตรของ Schmidt (1973)

$NaNO_2$	1.4	กรัม
$MnSO_4.H_2O$	0.02	กรัม
KH_2PO_4	0.5	กรัม
Na_2HPO_4	5.1	กรัม
FeNaEDTA	5.0	มิลลิลิตร
trace element	1.0	มิลลิลิตร
น้ำทะเล	1000	มิลลิลิตร

trace element ประกอบด้วย

$Na_2MoO_4.2H_2O$	2	มิลลิกรัม
$CuSO_4.5H_2O$	2	มิลลิกรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	2	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัจจัยสำคัญในการเจริญของคีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรีย

1. **ปริมาณแอมโมเนียและไนไตรท์**

คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียต้องการสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในการเจริญในปริมาณที่ต่างกัน Jones และ Hood (1980) รายงานว่า *Nitrosomonas* sp. ที่แยกได้จากน้ำจืด ต้องการแอมโมเนีย 0.5 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ *Nitrosomonas* sp. ที่แยกได้จากน้ำกร่อยต้องการแอมโมเนีย ในการเจริญ 0.2 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ Bock Koops และ Harms (1986) รายงานว่าปริมาณแอมโมเนียที่เหมาะสม สำหรับการเจริญของ แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย คือ 2 ถึง 10 มิลลิโมลาร์ และ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย เจริญได้ในภาวะที่มีโซเดียมไนไตรท์ 2 ถึง 30 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาแอมโมเนียออกซิเดชันของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย คือ ไนไตรท์ มีผลให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพเป็นกรด สามารถยับยั้งการเจริญของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย ในขณะที่การเพิ่มขึ้นของปริมาณไนเตรทจากการออกซิไดซ์ไนไตรท์ของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย พบว่าไม่มีผลการยับยั้งคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย หรือ *Nitrobacter* sp. (Boon และ Laudelout,1962)

2. **ความเป็นกรดด่าง (pH)**

ค่าความเป็นกรดด่าง มีผลต่อเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันของคีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรีย ได้แก่ เอนไซม์แอมโมเนียโมโนออกซิเจนเนส เอนไซม์ไฮดรอกซิลเอมีน ออกซิโดริดักเทส และ เอนไซม์ไนไตรท์ออกซิเดส เป็นต้น ถ้าหากค่าความเป็นกรดด่างไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ จะมีผลยับยั้งการเจริญและปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน โดยปรกติ คีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรียสามารถเจริญได้ในช่วง 7 ถึง 9 ซึ่งเป็นภาวะที่เป็นกลางถึงด่างเล็กน้อย แต่เกิดปฏิกริยาไนตริฟิเคชันได้ดีในช่วง 7.5 ถึง 8.5 จากการรายงานของ Mayerhof (1961) พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Nitrosomonas* sp. คือ pH 8.3 ถึง 9.3 Downing และคณะ (1964) พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับ คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียอยู่ในช่วง 7.5 ถึง 8.5 และหากมีค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 6.5 หรือสูงกว่า 10 ทำให้อัตราการเกิดไนตริฟิเคชันต่ำ Jones และ Hood (1980) พบว่าปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการเกิดออกซิไดซ์แอมโมเนียของ *Nitrosomonas* sp. ที่แยกได้จากน้ำจืด คือค่าความเป็นกรดด่างที่ 8.5 ส่วนสายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำกร่อยค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมคือ 8 Sauter และ Alleman (1981) ศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย พบว่าค่าความ

เป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *Nitrobacter* sp. อยู่ในช่วง 6.8 ถึง 8.4 และ ในปี 1990 Bock และคณะ รายงานว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับ *Nitrobacter* sp. คือ 7.6 ถึง 7.8

3. **อุณหภูมิ (temperature)**

นอกจากค่าความเป็นกรดด่าง แล้วอุณหภูมิก็มีผลต่อเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน ซึ่งคีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับแหล่งที่พบและความจำเพาะของคีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรีย โดยทั่วไป คีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรียสามารถเติบโตและมีแอคติวิตีได้ในช่วงกว้างตั้งแต่อุณหภูมิ 10 ถึง 40 องศาเซลเซียส (Fdz-Panco Villaverde และ Garcia , 1994) Jones และ Hood (1980) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *Nitrosomonas* sp. พบว่าสายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำจืด คือ 35 องศาเซลเซียส ส่วนสายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำกร่อยเจริญ ได้ที่ อุณหภูมิ 35 ถึง 40 องศาเซลเซียส ในขณะที่ Jones และคณะ (1988) ศึกษาความสามารถในการเจริญของ *Nitrosomonas cryotolerans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากเขตหนาว พบว่าเจริญได้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส สำหรับการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย ของ Alleman (1984) และ Fdz-Polano และ คณะ (1994) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่ดีที่สุดอยู่ในช่วง 30 ถึง 35 องศาเซลเซียส

4. **ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)**

โซเดียมคลอไรด์เป็นแร่ธาตุที่จำเป็นสำหรับกิจกรรมภายในเซลล์ ของคีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเล มีความต้องการโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญมากกว่าแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด Koops และคณะ (1976) พบว่า *Nitrosococcus mobilis* ที่แยกได้จากน้ำกร่อย เจริญได้ดีในภาวะที่มี โซเดียมคลอไรด์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ Jones และ Hood (1980) พบว่า *Nitrosomonas* sp ที่แยกได้จากน้ำจืดต้องการโซเดียมคลอไรด์ 0.3 ถึง 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำกร่อยต้องการโซเดียมคลอไรด์ 0.5 ถึง 1.0 เปอร์เซ็นต์ Stehr และคณะ (1995) รายงานว่า *Nitrosomonas* sp. ต่างชนิดกันสามารถทนต่อโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยพบว่า *Nitrosomonas oligotropha* ไม่เจริญในภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์มากกว่า 10 มิลลิโมลาร์ ขณะที่

Nitrosomonas europaea และ *Nitrosomonas eutropha* ทนต่อโซเดียมคลอไรด์ได้ในปริมาณมากถึง 200 และ 400 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ

5. **การให้อากาศ (aeration)**

ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันที่เกิดขึ้นในภาวะที่มีออกซิเจน โดยคีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรียใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้ายในปฏิกิริยาการออกไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์ และปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ไนไตรท์ให้เป็นไนเตรท ดังนั้นคีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรียจึงต้องการออกซิเจนที่เหมาะสม ถ้าหากมีปริมาณออกซิเจนมากเกินไปมีผลยับยั้งปฏิกิริยาได้ จากการศึกษาของ Boon และ Laudelot (1962) พบว่า *Nitrobacter* มีแอคติวิตีดีภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจนน้อย Nagel และ Haworth (1969) ในระบบ activated sludge พบว่าจุลินทรีย์มีความต้องการออกซิเจนน้อยเพียง 0.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็สามารถทำให้เกิดไนตริฟิเคชันได้ 90 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Painter และ King (1976) รายงานว่า การละลายของออกซิเจนในปริมาณสูง จะยับยั้งไนตริฟิเคชันในระบบ activated sludge ได้ Wood และคณะ (1976) รายงานว่าปริมาณออกซิเจนที่สูงถึง 35 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่ได้ทำให้มีแอคติวิตีสูงเกินกว่า การละลายของออกซิเจนที่ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร Goreau และ คณะ (1980) ได้ศึกษาปริมาณออกซิเจน ที่มีผลต่อ คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย ในการเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนไตรท์พบว่าในภาวะที่ออกซิเจนน้อย จะยับยั้ง ปฏิกิริยาการเกิดไนไตรท์แต่เปลี่ยนเป็นไนตรัสออกไซด์เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน Mine (1983) รายงานว่าปริมาณออกซิเจนต่ำมีผลยับยั้งปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันโดยเฉพาะปฏิกิริยาการออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์ ในภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดทำให้ไม่เพียงพอในการรับอิเลคตรอน ดังนั้นในปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน จึงต้องมีปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย