บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง

การแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน และน้ำจากบ่อกุ้งที่เก็บจากอำเภอระโนด จังหวัดสงขลา อำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช และที่อำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา ได้ตัวอย่างทั้งหมด 70 ตัวอย่าง แยกเชื้อบริสุทธิ 160 สายพันธุ์ แบคทีเรียที่แยกได้ มีรูปร่างลักษณะแตกต่างกันทั้งแกรมลบและแกรมบวก บ่อกุ้งที่อำเภอระโนดเป็นบ่อที่อยู่ในสภาพดี ผลผลิตต่อไร่สูง (4 ตันต่อไร่) แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่แยกได้เป็น *Bacillus* sp. ซึ่งมีทั้งในดินและในน้ำ แต่จะพบในดินตะกอนบ่อกุ้งมีปริมาณมากกว่า เนื่องจากดินก้นบ่อมีการสะสมตะกอนของสารอินทรีย์ต่างๆ เช่น สิ่งขับถ่ายของกุ้ง ซากแพลงค์ตอนที่ตาย รวมทั้งอาหารกุ้งที่เหลือตกค้างเป็นปริมาณมาก แบคทีเรียจึงใช้สารอินทรีย์เหล่านี้เป็นอาหารเพื่อการเจริญ ซึ่งในน้ำจะมีปริมาณสารอินทรีย์น้อยกว่า จึงพบปริมาณแบคทีเรียในน้ำน้อยกว่าในชั้นของดินตะกอน (Rheinhrimer, 1991)

บ่อกุ้งที่อำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช เลี้ยงกุ้งมาแล้ว 3 ครั้ง สภาพน้ำภายในบ่อไม่ดี กุ้งติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง แบคทีเรียที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนไม่สร้างสปอร์ เมื่อทดสอบทางชีวเคมีพบว่าประกอบด้วยเชื้อ *Vibrio* sp. *Aeromonas* sp. และ *Halobacterium* sp. ซึ่งเชื้อเหล่านี้บางสายพันธุ์จะเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในกุ้ง Lightner และ Lewis (1975) ได้รายงานว่าโรคติดเชื้อที่ทำความเสียหายให้แก่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจะเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โดยเฉพาะกลุ่ม *Vibrio* sp. ซึ่ง Kaper และคณะ (1983) ได้แยกเชื้อ *Vibrio* sp. ได้จากแหล่งต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นสาหร่าย ปลา กุ้ง หรือน้ำทะเล เชื้อ *Vibrio* sp. ที่พบในกุ้งได้บ่อย เช่น *Vibrio alginolyticus V. anguillarum V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* แบคทีเรียในกลุ่ม *Aeromonas* sp. สามารถพบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำต่างๆ เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์เลือดอุ่นและสัตว์เลือดเย็น (Janda, 1991) และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อในปลาและในกุ้ง (Trust, 1986) ได้แก่ *Aeromonas hydrophila* (Mateos และ Paniagua, 1995) *A. caviae A. jandaei* และ *A. sobria* (Sugita และคณะ, 1995) เชื้อต่างๆ เหล่านี้จะมีอยู่แล้วตามธรรมชาติ แต่เมื่อใดก็ตามที่สภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม เกิดการสะสมของสารอินทรีย์ต่างๆ ที่ทำให้คุณภาพน้ำเสื่อมลง ทำให้กุ้งหรือสัตว์น้ำต่างๆ เกิดความเครียด อ่อนแอ จึงเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ได้ง่าย โดยเฉพาะการติดเชื้อไวรัสจะทำให้มีอัตราการตายของกุ้งสูงถึง 100 % (Halder, Ahne และ Thomson, 1989) สภาพการเช่นนี้สอดคล้องกับรายงานของ Snieszko (1974) ที่ว่าการที่สภาพบ่อ

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเกิดมลพิษขึ้น เนื่องจากการสะสมของสารอินทรีย์ต่างๆ จะทำให้แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคเจริญอย่างรวดเร็ว เกิดการติดเชื้อในสัตว์น้ำและตายในที่สุด

บ่อกุ้งที่อำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา เป็นบ่อกุ้งที่สร้างขึ้นใหม่ เลี้ยงกุ้งโดยขนน้ำทะเลจากนาเกลือ แล้วปรับสภาพน้ำให้เหมาะสมประมาณ 20 ส่วนในพันส่วน สภาพบ่อจึงยังไม่มีการสะสมของสารอินทรีย์มากนัก แบคทีเรียที่แยกได้มีทั้งแกรมลบและแกรมบวก ส่วนใหญ่จะแยกได้แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน และสร้างสปอร์ ซึ่งตรวจพบว่าเป็น *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากดินตะกอนก้นบ่อ

ในการแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายโปรตีน แป้งและไขมันนั้น สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและย่อยสลายได้ดีที่สุด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ P1 P3 P4 S22 และ S25 ซึ่ง S22 และ S25 แยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บครั้งแรก P1 แยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บครั้งที่สอง และ P3 P4 แยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บครั้งที่สาม

การทดสอบการย่อยสลายโปรตีน โดยใช้อาหารทดสอบ Skim milk agar เลี้ยงที่ 37^{0}ซ 48 ชม. พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายโปรตีนได้เป็นอย่างดี โดยสังเกตจากบริเวณใสที่เกิดรอบโคโลนี ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียย่อยโปรตีนนมรอบๆ โคโลนีจนหมด อาหารเลี้ยงเชื้อนี้จึงเหมาะสมที่จะใช้เป็นอาหารคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีน เนื่องจากเห็นผลได้ชัดเจนและรวดเร็ว

การทดสอบการย่อยแป้ง ใช้อาหารทดสอบคือ Starch agar เลี้ยงที่ 37^{0}ซ 48 ชม. พบว่าแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ คือ P1 P3 P4 และ S22 สามารถย่อยสลายแป้งได้ดี โดยดูจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นภายหลังราดด้วยสารละลายไอโอดีน วิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วในการทดสอบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง แต่ในการตรวจผลนั้น ภายหลังที่ราดด้วยสารละลายไอโอดีนควรตรวจผลทันที ไม่ควรทิ้งไว้นานเนื่องจากสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นจะจางลงได้ ทำให้การตรวจผลไม่ชัดเจน

การทดสอบการย่อยสลายไขมัน ใช้ Tween 80 agar เป็นอาหารทดสอบ เลี้ยงที่ 37^{0}ซ 48 ชม. ตรวจพบว่า แบคทีเรีย P1 และ P4 สามารถย่อยสลาย Tween 80 ซึ่งใช้เป็นแหล่งไขมันในอาหารได้เป็นอย่างดี โดยสังเกตจากตะกอนขุ่นขาวที่เกิดขึ้นรอบๆ โคโลนีเนื่องจากแคลเซียมที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำปฏิกิริยากับกรดไขมันที่เกิดจากย่อยสลายของแบคทีเรียเกิดเป็น calcium soap จึงเห็นเป็นตะกอนขุ่นขาวในอาหารวุ้น

การวัดการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์ของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรีย P1 P3 P4 S22 และ S25 จะมีลักษณะการเจริญและการสร้างเอนไซม์แตกต่างกันออกไป

ในการวัดแอคติวิตีของโปรตีเอส ใช้ผงถั่วเหลือง (Soy bean meal) และแป้ง (Soluble starch) เป็นแหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอนที่สำคัญในการผลิตเอนไซม์ โดยจากการศึกษาของ เกษม พงษ์มณี (2536) ได้ทดสอบหาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสของ *Bacillus* spp. พบว่ากากถั่วเหลืองและแป้งเป็นแหล่งอาหารที่ให้โปรตีเอสปริมาณมาก และจากการทดลองของ พิเชฐ อิฐกอ (2528) พบว่ากากถั่วเหลือง 4%(W/V) และแป้ง 3% (W/V) จะเป็นแหล่งอาหารที่ดีที่สุดสำหรับการสร้างเอนไซม์ โดยเลี้ยงที่ 37^0 ซ ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมมีค่าเท่ากับ 7 จะเป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญของแบคทีเรีย ตลอดจนถั่วเหลืองและแป้งจะเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในอาหารกุ้ง ซึ่งจะเป็นตัวที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายของแบคทีเรีย จึงได้เลือกผงถั่วเหลืองและแป้งเป็นแหล่งอาหารในการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์

ในการทดลองนี้ใช้เคซีน (Casein hammerstein) เป็นซับเสตรทในการหาแอคติวิตีของโปรตีเอส เพราะได้มีรายงานว่าโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการหาแอคติวิตีของโปรตีเอสคือ Casein hammerstein ซึ่งสามารถละลายได้ง่ายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ นอกจากนี้ได้เติมแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ในการตรวจวัดแอคติวิตีด้วย เนื่องจากแคลเซียมอิออนจะทำให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น (Yosunobu และ Mc Conn, 1970)

ผลการวัดการเจริญและแอคติวิตีของโปรตีเอสของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่า P4 จะผลิตโปรตีเอสได้มากที่สุด รองลงมาคือ P1 P3 S22 และ S25 ตามลำดับ และพบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์จะสร้างโปรตีเอสควบคู่ไปกับการเจริญ (Growth associated) คือเมื่อแบคทีเรียเจริญมากขึ้นแอคติวิตีของโปรตีเอสก็จะมากขึ้นด้วย และจะผลิตได้สูงสุดเมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ระยะ Late exponential phase และ Stationary phase ซึ่งเป็นระยะที่แบคทีเรียมีการเจริญสูงสุด

การวัดแอคติวิตีของอะไมเลสใช้ผงถั่วเหลืองและแป้งเป็นแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนตามลำดับ เนื่องจากได้มีรายงานว่าถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะต่อการสร้างอะไมเลส และใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน (Nomura และคณะ 1956) นอกจากนี้เกลืออนินทรีย์จะมีผลต่อการผลิตแอลฟาอะไมเลสของแบคทีเรีย มีรายงานว่าฟอสเฟตเป็นตัวกระตุ้นการสร้างแอลฟาอะไมเลสที่สำคัญ (Fukumoto, Yamamoto และ Tsuru, 1957) Mn^{2+} Zn^{2+} Na^{+} และ Fe^{3+} จะกระตุ้นการสร้างแอลฟาอะไมเลสรวมทั้ง Ca^{2+} จะเป็นอิออนสำคัญมากต่อการผลิตแอลฟาอะไมเลส เนื่องจากแอลฟาอะไมเลสเป็นเมตัลโลเอนไซม์ที่มีแคลเซียมเป็นโคแฟคเตอร์ การเติมแคลเซียมคลอไรด์จึงมีผลทำให้การสร้างแอลฟาอะไมเลสสูงขึ้น (Hamada, Yamamoto และ Fukumoto, 1967) ซึ่งจากการสำรวจของ Priest (1954) พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. จะเป็นแอลฟาอะไมเลส

ผลการทดลองการวัดการเจริญและแอคติวิตีของอะไมเลสพบว่า P1 สร้างอะไมเลสได้มากที่สุด รองลงมาคือ P4 S22 และ P3 ตามลำดับ ทั้ง 4 สายพันธุ์มีการสร้างเอนไซม์ควบคู่ไปกับการเจริญและจะสร้างได้สูงเมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ระยะ Late exponential phaes และ Stationary phase ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Coleman และ Elliott (1962) ที่พบว่าแบคทีเรียบางชนิด เช่น *B. subtilis* และ *B. stearothermophilus* จะสร้างแอลฟาอะไมเลสในระยะที่แบคทีเรียมีการเจริญทวีคูณ (Exponential phase) และจะเพิ่มควบคู่ไปกับการเจริญของแบคทีเรีย

ผลการวัดแอคติวิตีของไลเปสโดยใช้ถั่วเหลืองและแป้งเป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนตามลำดับ พบว่าไม่สามารถตรวจวัดปริมาณไลเปสได้ เนื่องจากไม่มีการผลิตไลเปสเกิดขึ้น จึงได้เติม Tween 80 (Oleic acid ester) 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงสามารถตรวจวัดแอคติวิตีของไลเปสได้ แสดงว่าไลเปสที่ผลิตโดยแบคทีเรียนี้ เป็น Inducible enzyme ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Omar, Hayashi และ Nagai (1987) ที่พบว่าเชื้อรา *Humicola lanuginosa* จะผลิตไลเปสได้น้อยมากถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไตรกลีเซอไรด์ เนื่องจากไตรกลีเซอไรด์ปริมาณเล็กน้อยจะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นที่สำคัญให้เชื้อราผลิตไลเปส นอกจากนี้ Kosugi และ Kamibayashi (1971) และ Suzuki และคณะ (1988) พบว่าถ้าเติมไตรกลีเซอไรด์ปริมาณเล็กน้อยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้จุลินทรีย์ผลิตไลเปสได้มากกว่าการไม่เติมไตรกลีเซอไรด์เลย นอกจากนี้การเติมแร่ธาตุบางชนิด เช่น Ca^{2+} จะมีผลต่อการทำงานของไลเปสโดยพบว่าถ้ามีการเติม Ca^{2+} ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้ไลเปสทำงานได้ดีขึ้น เนื่องจากกรดไขมันซึ่งเป็นผลผลิตจากการทำงานของไลเปสจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง มีผลทำให้ประสิทธิภาพของไลเปสลดลง แต่ Ca^{2+} จะทำปฏิกิริยากับกรดไขมันเกิดเป็นเกลือแคลเซียมในรูปสบู่ (Insoluble calcium soap) และตกตะกอนทำให้กรดไขมันลดลง ค่าความเป็นกรด-ด่างไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นการทำงานของไลเปสจึงเป็นไปอย่างต่อเนื่อง (Shahani, 1975)

ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของไลเปสได้ใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งอาหารและใช้กัมอราบิคเป็น Emulsifier เพื่อช่วยให้เพิ่มพื้นที่ผิว oil/water interface เนื่องจากไลเปสจะทำการย่อยซับสเตรทก็ต่อเมื่ออยู่ในรูปของน้ำมันแขวนลอย (Emulsion) ซึ่งการทำให้ซับเสตรทอยู่ในรูปของ Emulsion จึงมีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของไลเปส

ผลการวัดแอคติวิตีของแบคทีเรีย P1 และ P4 พบว่า P4 สร้างไลเปสได้มากกว่า P1 และการสร้างไลเปสจะควบคู่ไปกับการเจริญ ซึ่งจะมีการสร้างปริมาณมากเมื่อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์เข้าสู่ระยะ Late exponential phase ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากในการสร้าง Extracellular enzyme ถ้าเลี้ยงแบคทีเรียให้อยู่ในสภาพกึ่งอดอาหาร จะเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์มากเพราะ

Extracellular enzyme ส่วนมากจะถูกปล่อยออกมามากที่สุดในช่วง Late หรือ Post exponential growth phase ซึ่งสภาพนั้นซับเสตรทที่สำคัญเริ่มขาดแคลน

ผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบการเจริญ ของแบคทีเรีย ที่มีการเติม Tween 80 1%(W/V) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อของ P1 และ P4 กับอาหารที่ไม่ได้เติม Tween 80 พบว่าการเจริญของแบคทีเรียในอาหารที่มีการเติม Tween 80 1% จะเจริญได้น้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติม Tween 80 การที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก Tween 80 1% (W/V) มีผลกระตุ้นให้มีการสร้างไลเปสแต่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ ได้มีรายงานว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่จะผลิตไลเปสในลักษณะ Inducible enzyme แต่ถ้าเลี้ยงแบคทีเรียในสภาพที่มีน้ำมันมากเกินไปก็จะมีผลยับยั้งการเจริญและการสร้างเอนไซม์ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Suzuki และคณะ (1988) ที่พบว่าการเติมน้ำมันลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลทำให้แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ผลิตไลเปสได้สูงกว่าอาหารที่ไม่มีน้ำมันเป็นส่วนประกอบ แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีน้ำมันมากเกินไปก็จะมี ผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและการสร้างเอนไซม์ โดยพบว่าการเติมปริมาณน้ำมันน้อยๆ (0.3%W/V) จะทำให้การสร้างไลเปสมีปริมาณสูงขึ้น แต่ถ้าปริมาณน้ำมันมากเกินไป (2 % W/V) จะทำให้การสร้างไลเปสและการเจริญของแบคทีเรียลดลง

การทดสอบทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ คือ P1 P3 P4 S22 และ S25 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน สร้างสปอร์ และต้องการอากาศในการเจริญ จึงจัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. (O ′ Leary, 1987) ทั้ง 5 สายพันธุ์มีรูปร่างลักษณะแตกต่างกันเมื่อทดสอบทางชีวเคมี เพื่อจำแนกสายพันธุ์พบว่า P1 P3 P4 S22 และ S25 คือ *B. subtilis* *B. megaterium* *B. firmus* *B. lentus* และ *B. marinus* ตามลำดับ ซึ่ง *Bacillus* sp. เหล่านี้แยกได้จากดินตะกอนในบ่อกุ้ง โดยมีรายงานว่า *Bacillus* spp. เหล่านี้สามารถแยกได้ตามแหล่งน้ำธรรมชาติทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม รวมทั้งในดินตะกอนต่างๆ (Taylor และ Richardson, 1979) แบคทีเรีย *Bacillus* spp. จะทนต่อภาวะแวดล้อมต่างๆในช่วงกว้าง รวมทั้งมีอัตราการเจริญและการย่อยสลายอย่างรวดเร็ว และเป็นแหล่งในการสร้างเอนไซม์ต่างๆที่สำคัญที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ ได้มากมาย

ในการทดสอบทางชีวเคมีได้เปรียบเทียบกับแบคทีเรียมาตรฐาน คือ *B. subtilus* TISTR 1 และ *B. megaterium* TISTR 3 ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Bergey ′ s Manual of Systematic Bacteriology (Sneath และคณะ, 1986) และเพื่อเป็นการศึกษาสมบัติของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น ควรมีการศึกษาหาปริมาณ Guanine + Cytosine (%mole) เปรียบเทียบกับแบคทีเรียมาตรฐาน *Bacillus* spp. แต่ละชนิดเพื่อความถูกต้องและชัดเจนยิ่งขึ้น

ผลการทดสอบการอยู่ร่วมกันโดยเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียตั้งต้นของแต่ละสายพันธุ์กับการเลี้ยงร่วมกันเป็นคู่ๆ ในอาหารแข็งนิวเตรียนท์ ที่ 37 ^{0}ซ 24 ชม. ผลปรากฏว่าปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้นภายหลังจากการเลี้ยงร่วมกันนั้นจะเจริญได้ดี และเพิ่มปริมาณมากกว่าปริมาณเซลล์ตั้งต้น แสดงว่าแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ จะไม่ยับยั้งการเจริญแต่จะช่วยส่งเสริมการเจริญซึ่งกันและกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lewis และคณะ (1984) ที่กล่าวว่าการที่จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์มาอยู่รวมกัน เมื่อมีการย่อยสลายสารอาหารต่างๆ แล้วผลิตกรดอะมิโน เปปไทด์ น้ำตาล โพลีแอลกอฮอล์ วิตามิน แร่ธาตุต่างๆที่จำเป็นต่อการเจริญ สารปฏิชีวนะ รวมทั้งสารพิษ โดยสารเหล่านี้บางชนิดมีผลช่วยกระตุ้นการเจริญและเพิ่มอัตราการย่อยสลาย หรือไม่ก็ยับยั้งการเจริญ แต่จากผลการทดลองเป็นแบบที่ช่วยให้การเจริญของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้อีก 4 สายพันธุ์เจริญได้ดีขึ้น จึงเป็นผลดีในการที่จะใช้แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ นี้เพื่อประโยชน์ในงานต่างๆ โดยเฉพาะการย่อยสลายสารอินทรีย์ เพราะทั้ง 5 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายสารอินทรีย์ มีการเจริญอย่างรวดเร็ว ทนทานต่อภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้ดี และสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารต่างๆ ดีขึ้น โดย Sonenshein, Hoch และ Losick (1993) ได้รายงานว่า แบคทีเรีย *Bacillus* sp. จะเป็นแหล่งในการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้มากมาย ซึ่งก็ร่วมทั้งอุตสาหกรรมการบำบัดน้ำเสีย

การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้เลือกใช้อาหารกุ้ง 1 % (W/V) เป็นแหล่งสารอินทรีย์ เนื่องจากมีรายงานว่าอินทรีย์สารที่เป็นสาเหตุที่ทำให้สภาพน้ำเน่าเสียมากที่สุดคืออาหารกุ้ง (Millamena,1990) ดังนั้นจึงใช้อาหารกุ้งเป็นแหล่งสารอินทรีย์ โดยผสมกับน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วนเพื่อให้คล้ายกับสภาพในบ่อกุ้งมากที่สุด

วิธีการตรวจวัดประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้เลือกใช้วิธี COD เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และให้ผลที่แน่นอน แต่มีข้อเสียบางประการคือ สารเคมีที่ใช้มีราคาแพง ประกอบกับสารเคมีบางชนิด เช่น กรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น และโพแทสเซียมไดโครเมต ต้องใช้อย่างระมัดระวังเนื่องจากเป็นสารพิษที่ทำอันตรายแก่ร่างกายได้

ผลการวัดประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 5 สายพันธุ์ เปรียบเทียบระหว่างน้ำจืดและน้ำเค็มโดยใช้อาหารกุ้ง 1 % (W/V) ปรากฏว่าแบคทีเรีย P1 P3 P4 และ S22 สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำจืดได้ดีกว่าในน้ำเค็ม การที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมา

จากความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน มีผลต่อการเจริญและการย่อยสลายสารอินทรีย์ซึ่งเกี่ยวข้องกับ Osmotic pressure ของเซลล์ ทำให้ปฏิกริยาต่างๆ ภายในเซลล์เกิดช้าลง Csonka (1989) ได้รายงานว่า เมื่อแบคทีเรียอยู่ในภาวะ hypoosmotic แบคทีเรียจะสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ จึงทำให้ปริมาณไซโตรพลาสซึมลดปริมาตรลง มีผลทำให้อัตราการใช้อาหารเพื่อสร้างพลังงานหรือการสังเคราะห์สารลดลง แต่จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบแล้วผลที่ได้แตกต่างกันไม่มาก เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ มีความสามารถในการทนเกลือได้สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง S25 มีความสามารถในการทนเกลือได้ถึง 100 ส่วนในพันส่วน และสามารถเจริญได้ดีทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม การย่อยสลายจึงไม่แตกต่างกัน

จากผลการทดลองการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ เมื่อวัดปริมาณสารอินทรีย์โดยวิธี COD พบว่าค่า COD จะลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 2-3 วันแรก และจะลดน้อยลงไปเรื่อยๆ จนครบ 7 วัน การที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากแบคทีเรียจะใช้สารอินทรีย์เป็นอาหารอย่างรวดเร็ว ดังนั้นสารอินทรีย์และแร่ธาตุต่างๆ จะเริ่มลดน้อยลง ประกอบกับอาจมีการสร้างผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย จึงทำให้ค่า COD ที่วัดได้เริ่มลดช้าลง (Lewis และคณะ, 1984)

การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยผสมทีละสายพันธุ์เข้าด้วยกันจนครบ 5 สายพันธุ์ ในน้ำเสียเทียมที่ประกอบด้วยน้ำทะเลผสมอาหารกุ้ง 1 % (W/V) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้แบคทีเรียผสมทั้ง 5 สายพันธุ์ผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1:1:1 จะสามารถลดปริมาณสารอินทรีย์ได้ดีที่สุดคือสามารถลดลงได้ 88 % ภายในเวลา 7 วัน การที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ มีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อนำแต่ละสายพันธุ์มาผสมกันจะทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ดีมากขึ้น โดย Stoner (1994) ได้กล่าวว่า อัตราการเจริญและการย่อยสลายสารต่างๆ จะมีความถี่สูงขึ้นเมื่อใช้จุลินทรีย์หลายชนิดผสมกัน โดยจุลินทรีย์ที่ผสมกันนั้นจะมีความสัมพันธ์กันทาง เมตาบอลิซึม ที่เรียกว่า โคเมตาบอลิซึม ทำให้การย่อยสลายสมบูรณ์แบบยิ่งขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Steffesen และ Alexander (1995) รวมทั้งการทดลองของ Murakami และ Alexander (1989) ที่ได้ใช้แบคทีเรียหลายชนิดผสมกันทำให้อัตราการย่อยสลาย คราบน้ำมัน และสารประกอบฟีนอลลดลงอย่างรวดเร็ว

ในการวัดประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรียผสม 5 สายพันธุ์ ในอัตราส่วน 1:1:1:1:1 ในระดับความเข้มข้นของสารอินทรีย์โดยใช้อาหารกุ้ง 0.5 % 2 % และ 3% (W/V) ผลปรากฏว่า แบคทีเรียผสมสามารถลดปริมาณสารอินทรีย์ตั้งต้นในระดับ 0.5% (W/V) ลงได้ 97 % ภายในเวลา 7 วัน เมื่อเพิ่มสารอินทรีย์เป็น 2 % (W/V) สามารถลดลงได้ 88 % เท่าภายในเวลา 7 วัน และเมื่อเพิ่มปริมาณสารอินทรีย์เป็น 3 % (W/V) สามารถลดลงได้ 84% ภายในเวลา 7 วัน การที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก ปริมาณสารอินทรีย์ที่มากเกินไปจะทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ลดลง ประกอบกับภาวะนี้อาจมีการสร้างสารที่เป็นพิษต่อการเจริญของแบคทีเรียทำให้จำนวนเซลล์ลดลงได้ (Pahm และ Alexander, 1993) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Marxsen และ Witzer (1991) ได้พบว่าความเข้มข้นของซับสเตรทที่มากเกินไปสามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์ในแหล่งน้ำธรรมชาติ ทำให้อัตราการย่อยสลายของจุลินทรีย์ในแหล่งน้ำลดลงได้

จากการคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียในบ่อกุ้งสามารถแยกแบคทีเรียได้ 5 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis* *B. megaterium* *B. lentus* *B. firmus* และ *B. marinus* ทั้ง 5 สายพันธุ์ มีการเจริญอย่างรวดเร็ว สามารถสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด และทนต่อภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้ในช่วงกว้าง ซึ่งเป็นสมบัติที่ดีที่จะนำไปใช้ย่อยสลายของเสียในบ่อกุ้ง เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งภายในประเทศ จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้บำบัดของเสียในบ่อเลี้ยงกุ้งต่างๆ ทดแทนสินค้าจุลินทรีย์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาแพงคือประมาณ 500-5000 บาทต่อกิโลกรัม ประกอบกับปริมาณสินค้าจุลินทรีย์เป็นที่ต้องการของเกษตรกรเป็นอย่างมาก ซึ่งมีเพียงประมาณร้อยละ 2.6 ของปริมาณความต้องการทั้งหมด สาเหตุที่มีการใช้น้อยเนื่องจากจุลินทรีย์มีราคาแพง ผู้ใช้ขาดความรู้ และความเข้าใจเกี่ยวกับประโยชน์และหลักการในการใช้ รวมทั้งขาดความเชื่อมั่นในเรื่องคุณภาพของสินค้าซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกจากต่างประเทศ จึงไม่เหมาะกับสภาพแวดล้อมในประเทศไทย และมักเป็นสายพันธุ์ที่ลอกเลียนแบบกันมา ไม่มีจุลินทรีย์เฉพาะที่ใช้สำหรับกำจัดของเสียแต่ละประเภท และเจริญไม่ดีในน้ำทะเล ดังนั้นสายพันธุ์ที่แยกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ย่อยสลายของเสียในบ่อกุ้ง และทดแทนจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศได้เป็นอย่างดี