บทที่ 4
ผลการทดลอง

การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียย่อยสลายโปรตีน แป้ง และไขมันที่สุ่มเก็บจากบ่อเลี้ยงกุ้ง

ตัวอย่างดิน และน้ำที่เก็บจากบ่อกุ้ง อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา เมื่อวันที่ 13 กันยายน พ.ศ. 2536 สภาพบ่อเป็นบ่อดิน บ่อกุ้งอายุ 2.5 เดือน ขนาดบ่อ 3 ไร่ ลึก 1.50 เมตร น้ำมีค่าพีเอช 8 ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน มีแบคทีเรียทั้งในดินและในน้ำน้อยกว่าบ่อกุ้งอายุ 4.5 เดือน ซึ่งมีขนาดบ่อ 3 ไร่ น้ำมีค่าพีเอช 7.9 ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน และในบ่อกุ้งบ่อเดียวกันจะมีแบคทีเรียในดินมากกว่าในน้ำ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน พวก *Bacillus* sp. ผลแสดงในตารางที่ 2

เก็บตัวอย่างครั้งที่สอง จากบ่อเลี้ยงกุ้งที่ อำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช เมื่อวันที่ 2 มิถุนายน พ.ศ. 2537 ตัวอย่างดิน และน้ำเป็นตัวอย่างที่เก็บจากบ่อกุ้งที่มีสภาพน้ำไม่ดี กุ้งที่เลี้ยงประสบโรคติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ผลผลิตต่อบ่อต่ำ และเป็นบ่อที่ลงกุ้งมาแล้ว 3 ครั้ง สภาพบ่อเป็นบ่อดิน บ่อกุ้งอายุ 3 เดือน ขนาด 6 ไร่ ลึก 1.50 เมตร น้ำมีค่าพีเอช 7.6 ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน มีจำนวนแบคทีเรียน้อยกว่าบ่อกุ้งอายุ 3.5 เดือน ซึ่งมีขนาด 5 ไร่ ลึก 1.50 เมตร พีเอชของน้ำเท่ากับ 7.4 ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน และจำนวนแบคทีเรียในดินจะมีมากกว่าในน้ำ แบคทีเรียที่แยกได้ส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในสภาพที่ไม่มีอากาศ เมื่อทดสอบทางชีวเคมีพบว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม *Vibrio* sp. *Aeromonas* sp. *Halobacterium* sp. จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้แสดงในตารางที่ 3

เก็บตัวอย่างครั้งที่สาม จากบ่อเลี้ยงกุ้งที่ อำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา สภาพบ่อเป็นบ่อดินที่สร้างขึ้นใหม่ บ่อกุ้งอายุ 2 เดือน ขนาดบ่อ 3 ไร่ ลึก 1.50 เมตร น้ำมีค่าพีเอช 8.1 ความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน มีจำนวนแบคทีเรียน้อยกว่าบ่อกุ้งอายุ 3.5 เดือน ซึ่งมีขนาด 3 ไร่ ลึก 1.50 เมตร ค่าพีเอชของน้ำ 8.0 แบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน พวก *Bacillus* sp. ผลแสดงในตารางที่ 4

จากตัวอย่างดินและน้ำที่เก็บจากบ่อกุ้ง นำมาทำ Total count bacteria และแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายแป้ง โปรตีน และไขมัน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar ทดสอบการ

37°ซ เป็นเวลา 48 ชม. ได้จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 160 สายพันธุ์ และสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่เจริญได้อย่างรวดเร็ว และมีการย่อยสลายโปรตีน แป้ง และไขมันได้ดีที่สุด 5 สายพันธุ์ คือ P1 P3 P4 S22 และ S25 ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยที่

S22 S25 ได้จากตัวอย่างดินที่เก็บครั้งแรก

P1 ได้จากตัวอย่างดินที่เก็บครั้งที่สอง

P3 P4 ได้จากตัวอย่างดินที่เก็บครั้งที่สาม

ทั้ง 5 สายพันธุ์ย่อยสลายโปรตีนได้ดี ดังแสดงในรูปที่ 2-3 โดยสังเกตจากบริเวณใสที่อยู่รอบโคโลนี ส่วนรูปที่ 4-5 แสดงผลการย่อยสลายแป้ง โดยจะเกิดบริเวณใสเป็นวงกว้างรอบโคโลนีของแบคทีเรียภายหลังราดด้วยสารละลายไอโอดีน ซึ่งพบได้ในแบคทีเรีย P1 P3 P4 และ S22 ยกเว้น S25 แบคทีเรียที่ย่อยไขมันได้คือ P1 และ P4 โดยสังเกตจากตะกอนขุ่นขาวที่เกิดขึ้นรอบๆ โคโลนีดังแสดงในรูปที่ 6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อกุ้งที่อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา จากบ่อกุ้งอายุ 2.5 เดือน และ 4.5 เดือน

ตัวอย่างที่เก็บจากบ่อกุ้ง	จำนวนแบคทีเรีย (cfu/ml)	
	บ่อกุ้งอายุ 2.5 เดือน	บ่อกุ้งอายุ 4.5 เดือน
ดิน	1.3×10^5	4.2×10^6
น้ำ	2.4×10^3	5.9×10^4

ตารางที่ 3 จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อกุ้งที่อำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช จากบ่อกุ้งอายุ 3 เดือน และ 3.5 เดือน

ตัวอย่างที่เก็บจากบ่อกุ้ง	จำนวนแบคทีเรีย (cfu/ml)	
	บ่อกุ้งอายุ 3 เดือน	บ่อกุ้งอายุ 3.5 เดือน
ดิน	4.5×10^6	7.9×10^7
น้ำ	1.8×10^4	4.4×10^4

ตารางที่ 4 จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อกุ้งที่อำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา จากบ่อกุ้งอายุ 2 เดือน และ 3 เดือน

ตัวอย่างที่เก็บจากบ่อกุ้ง	จำนวนแบคทีเรีย (cfu/ml)	
	บ่อกุ้งอายุ 2 เดือน	บ่อกุ้งอายุ 3 เดือน
ดิน	5.9×10^5	7.8×10^5
น้ำ	1.3×10^4	2.6×10^4

ตารางที่ 5 ชนิดของเอนไซม์ตรวจผล[1]ในแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์

สายพันธุ์	โปรตีเอส[2]	อะไมเลส[3]	ไลเปส[4]
P1	+	+	+
P3	+	+	–
P4	+	+	+
S22	+	+	–
S25	+	–	–

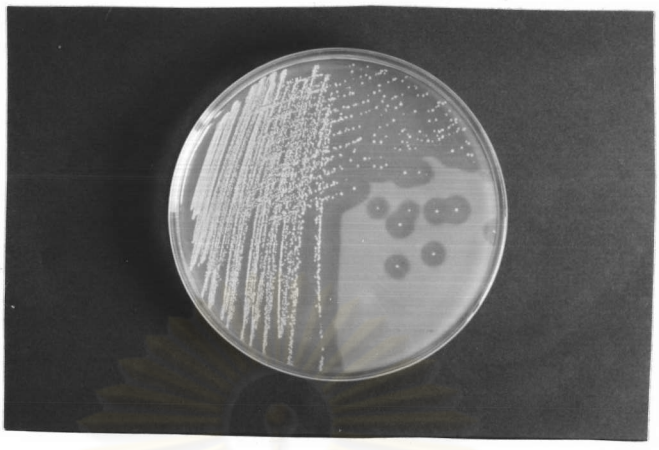
[1] ทำโดยวิธี Agar plate บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชม.

[2] ใช้แป้ง 0.2 % (w/v) เป็นซับสเตรท และราดด้วยสารละลายไอโอดีน เพื่อดูบริเวณใสรอบโคโลนีเชื้อที่ทดสอบ

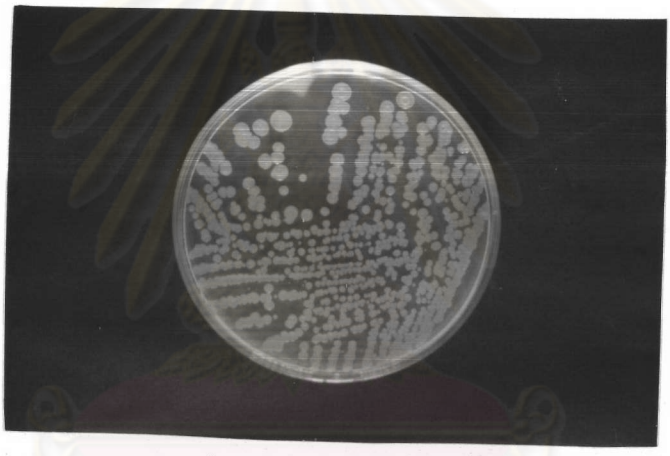
[3] ใช้นมผงพร่องมันเนย 1 % (w/v) เป็นซับสเตรท ดูบริเวณใสรอบโคโลนีเชื้อที่ทดสอบ

[4] ใช้ Tween 80 1 % (w/v) เป็นซับสเตรท ดูตะกอนขุ่นขาวรอบโคโลนีเชื้อที่ทดสอบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



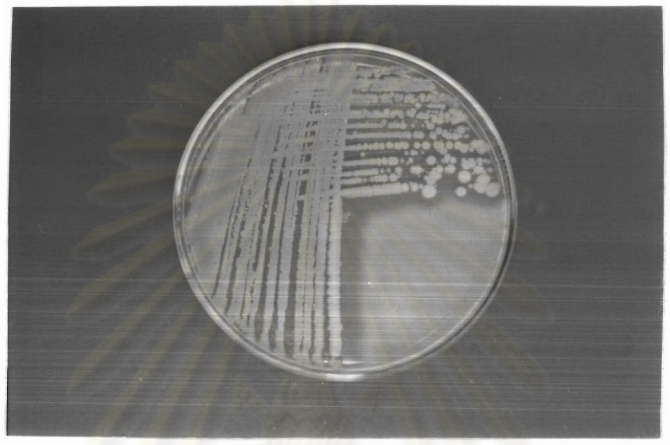
ก



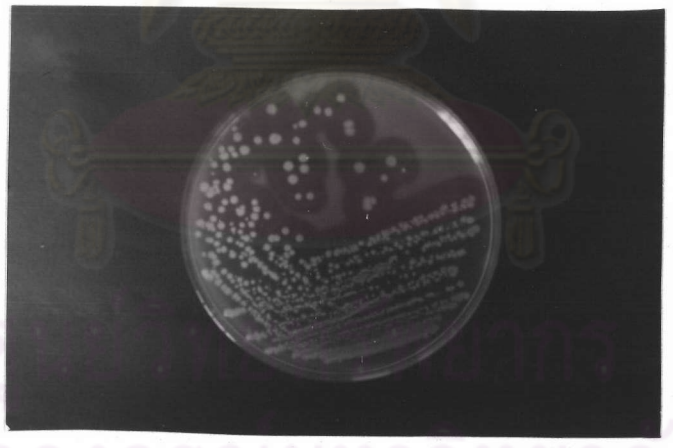
ข

ค

รูปที่ 2 การย่อยสลายโปรตีนของแบคทีเรียที่แยกได้ ก) P1, ข) P3 และ ค) P4 บนอาหาร Skim milk agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ 48 ชม.



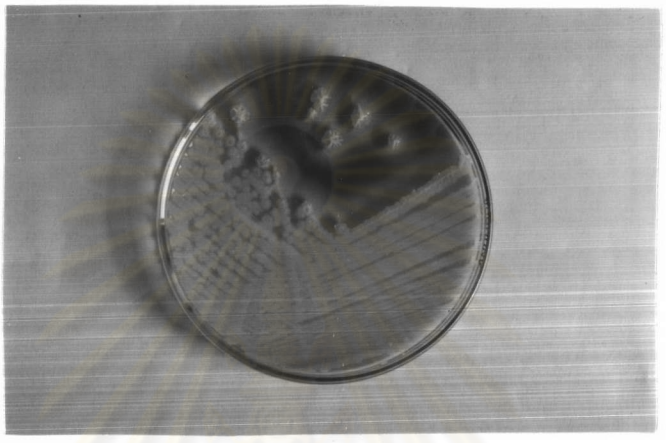
ก



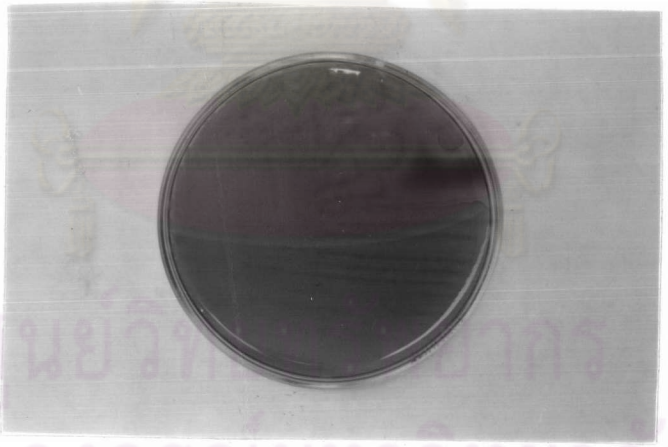
ข

รูปที่ 3 การย่อยสลายโปรตีนของแบคทีเรียที่แยกได้ ก) S22 และ ข) S25 บนอาหาร Skim milk agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ 48 ชม.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



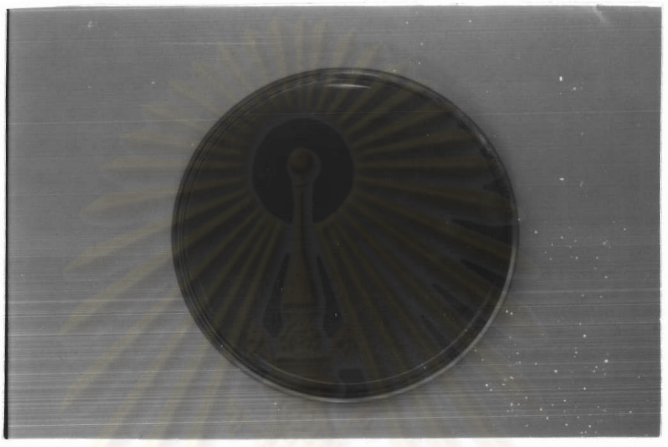
ก



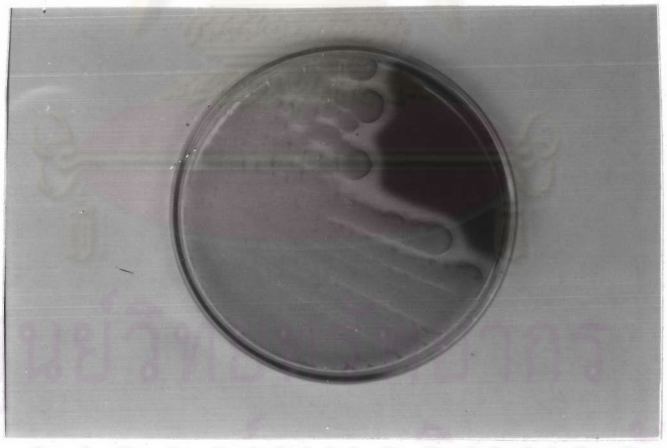
ข

รูปที่ 4 การย่อยสลายแป้งของแบคทีเรียที่แยกได้ คือ ก) P1 และ ข) P3 บนอาหาร Starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ 48 ชม.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



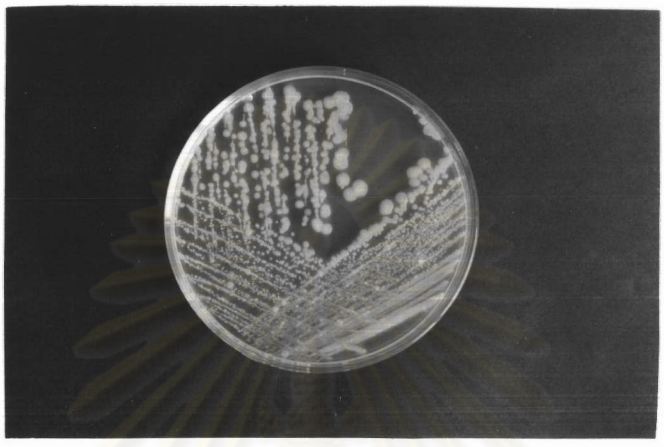
ก



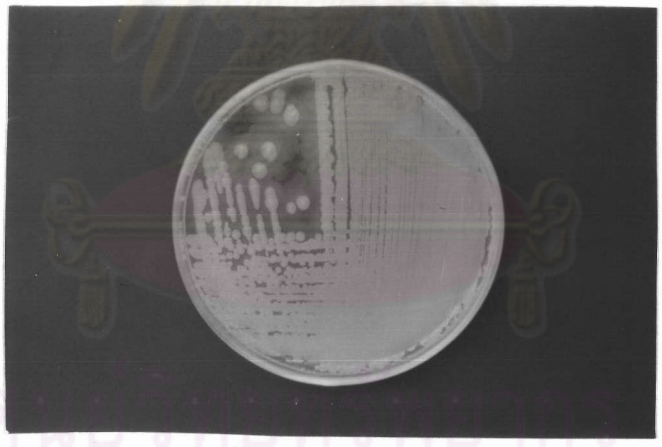
ข

รูปที่ 5 การย่อยสลายแป้งของแบคทีเรียที่แยกได้ คือ ก) P4 และ ข) S22 บนอาหาร Starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ 48 ชม.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก



ข

รูปที่ 6 การย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียที่แยกได้ คือ ก) P1 และ ข) P4 บนอาหาร Tween 80 agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ 48 ชม.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตรวจวัดการเจริญและการย่อยสลายสารอินทรีย์

ผลการตรวจวัดการเจริญและแอคติวิตีของโปรตีเอส

ติดตามการเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 5 สายพันธุ์ คือ P1 P3 P4 S22 และ S25 ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยผงถั่วเหลือง และแป้ง เขย่าเลี้ยงที่ 37°ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที พร้อมทั้งตรวจหาแอคติวิตีของส่วนน้ำใสต่อเวลาของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังแบคทีเรียเจริญในช่วง Late exponential phase พบว่าแบคทีเรีย P4 ผลิตโปรตีเอสได้มากที่สุด (115 U/ml) รองลงมาคือ P1 (85 U/ml) P3 (84 U/ml) S22 (80 U/ml) และ S25 (78 U/ml) ตามลำดับ (รูปที่ 7-8)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์มีการสร้างเอนไซม์ควบคู่ไปกับการเจริญ และจะผลิตโปรตีเอสได้แอคติวิตีสูงในระยะ Late exponential phase และ Stationary phase โดยแต่ละสายพันธุ์จะเจริญในอาหารได้แตกต่างกัน

ผลการตรวจวัดการเจริญและแอคติวิตีของอะไมเลส

การเลี้ยงแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ คือ P1 P3 P4 และ S22 ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยผงถั่วเหลือง และแป้ง เขย่าเลี้ยงที่ 37°ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที พร้อมทั้งตรวจหาแอคติวิตีของส่วนน้ำใสต่อเวลาของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังแบคทีเรียเจริญในช่วง Late exponential phase พบว่า P1 ผลิตอะไมเลสได้มากที่สุด (5 U/ml) รองลงมาคือ P4 (4.77 U/ml) S22 (3.41 U/ml) และ P3 (3.33 U/ml) ตามลำดับ (รูปที่ 9-10) แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์จะผลิตอะไมเลสได้แอคติวิตีสูงในระยะ Late exponential phase และ Stationary phase และเป็นการสร้างเอนไซม์ที่ควบคู่ไปกับการเจริญทั้ง 4 สายพันธุ์ ส่วน S25 ไม่มีการสร้างอะไมเลสในอาหารทดสอบ Starch agar จึงไม่ตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์

ผลการตรวจวัดการเจริญและแอคติวิตีของไลเปส

การวัดการเจริญและแอคติวิตีของไลเปสของแบคทีเรีย P1 และ P4 ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยผงถั่วเหลือง แป้ง และเติม Tween 80 1 % (W/ V) เขย่าเลี้ยงที่ 37°ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที พร้อมทั้งตรวจหาแอคติวิตีของส่วนน้ำใสต่อเวลาของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังแบคทีเรียเจริญในช่วง Late exponential phase พบว่า P4 (0.45 U/ml) สามารถผลิตไลเปสได้มากกว่า P1 (0.166 U/ml) (รูปที่ 11) ซึ่งสร้างเป็นปริมาณมากภายหลังที่อยู่ในระยะ

Late exponential phase และ Stationary phase และมีแนวโน้มว่าจะสร้างต่อไป จึงเป็นการสร้างเอนไซม์ที่ควบคู่ไปกับการเจริญ แต่การเจริญของแบคทีเรียเมื่อเติม Tween 80 1 % (W/V) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลปรากฏว่าการเจริญไม่ดีเท่าที่ควร เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่ได้ใส่ Tween 80 1% (W/V) แสดงว่า Tween 80 1% (W/V) อาจเป็นตัวยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย P4 และ P1 ส่วนแบคทีเรีย P3 S22 และ S25 ไม่มีการสร้างไลเปสในอาหารทดสอบ Tween 80 agar จึงไม่ทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์

ผลการตรวจสอบสมบัติ และรูปร่างลักษณะของแบคทีเรียที่แยกได้

ตารางที่ 6 แสดงสมบัติ และรูปร่างลักษณะของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยหลักการจัดสกุล (Genus) พบว่าทั้ง 5 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน (rod) สร้างสปอร์ (รูปที่ 12-13) ทำให้สามารถจัดแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ อยู่ในสกุล *Bacillus* spp. และจากการทดสอบทางชีวเคมี และวินิจฉัยถึงชนิด (Species) เปรียบเทียบกับ Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2 (Sneath และคณะ, 1986) พบว่า

P1 คือ *Bacillus subtilis*

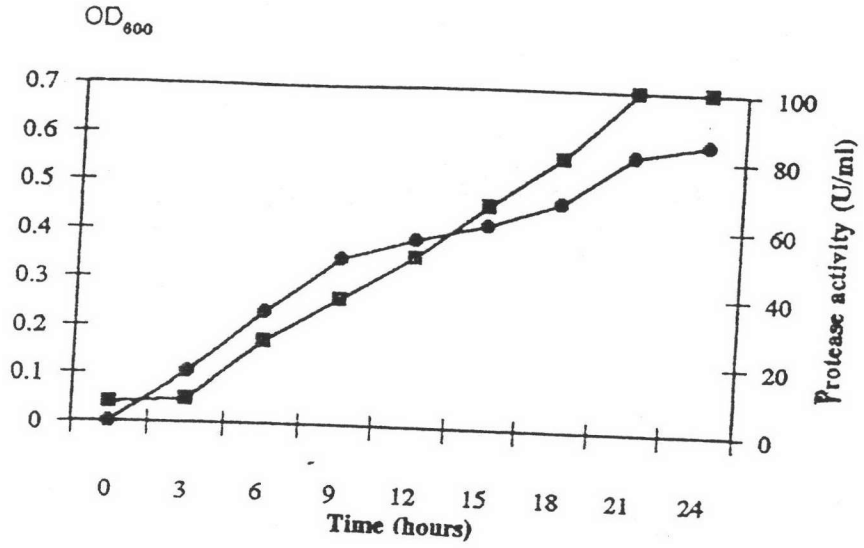
P3 คือ *Bacillus megaterium*

P4 คือ *Bacillus firmus*

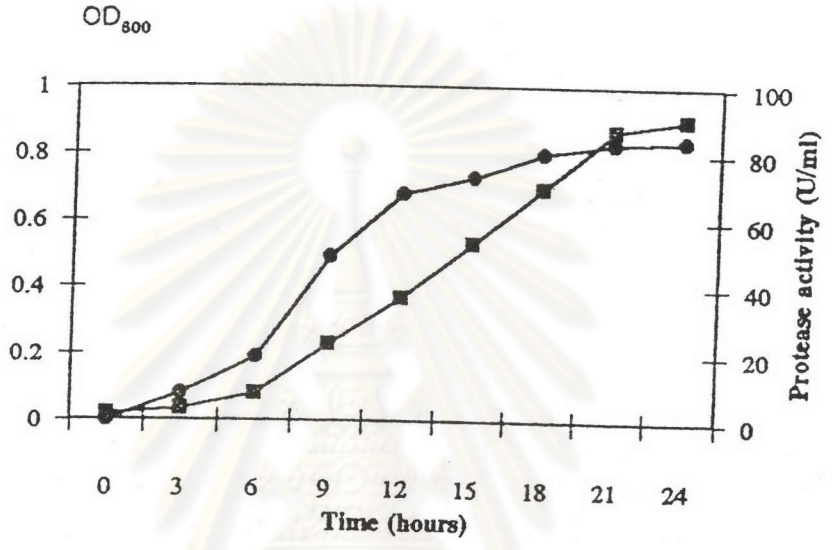
S22 คือ *Bacillus lentus*

S25 คือ *Bacillus marinus*

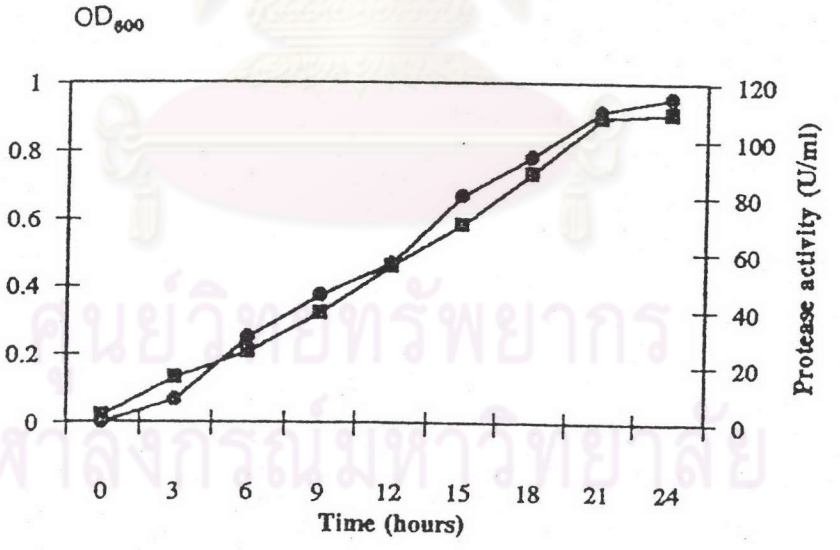
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก



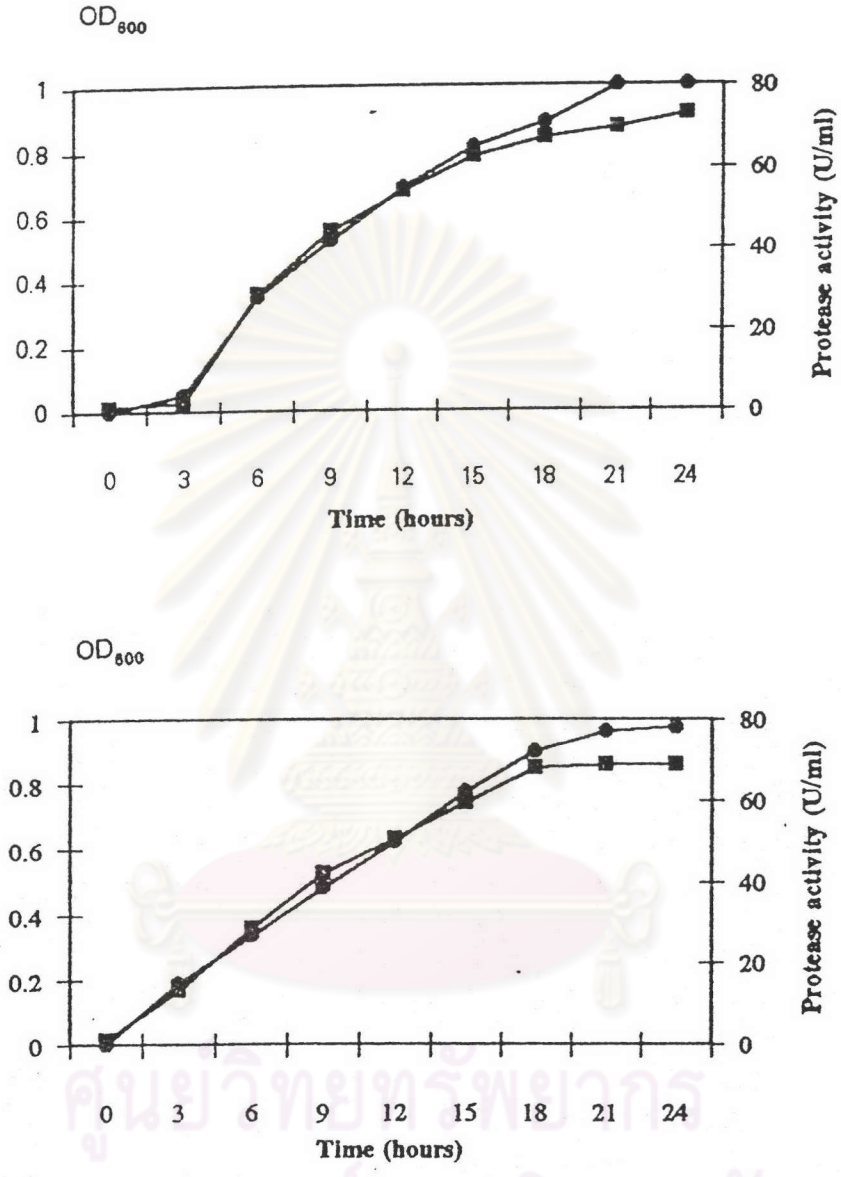
ข



ค

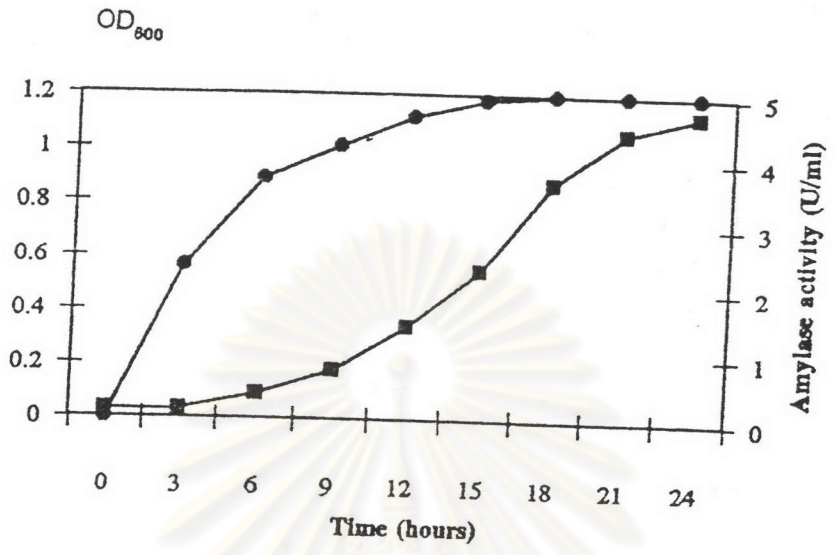
รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียที่ OD_{600} (—■—) และแอคติวิตีของโปรติเอส (U/ml) (—●—) ของ ก) P1 ข) P3 และ ค) P4 ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำของการทดลอง ซึ่งเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยผงถั่วเหลือง และแป้งเป็นส่วนประกอบ ปริมาตร 300 มล. บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มล. เขย่าเลี้ยงที่ 37° ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

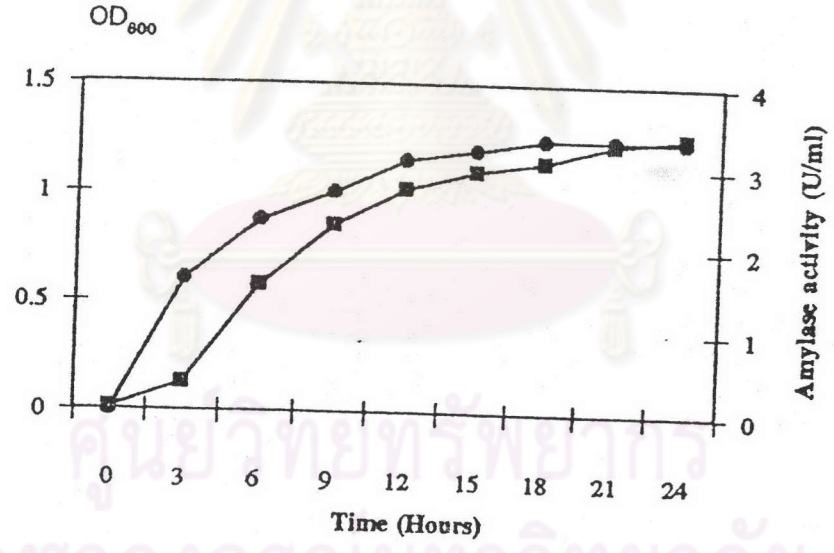


รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียที่ OD_{600} (—■—) และ แอคติวิตีของโปรติเอส (U/ml) (—●—) ของ ก) S22 และ ข) S25 ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำของการทดลอง ซึ่งเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยผงถั่วเหลือง และ แป้งเป็นส่วนประกอบ ปริมาตร 300 มล. บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มล. เขย่าเลี้ยงที่ 37° ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



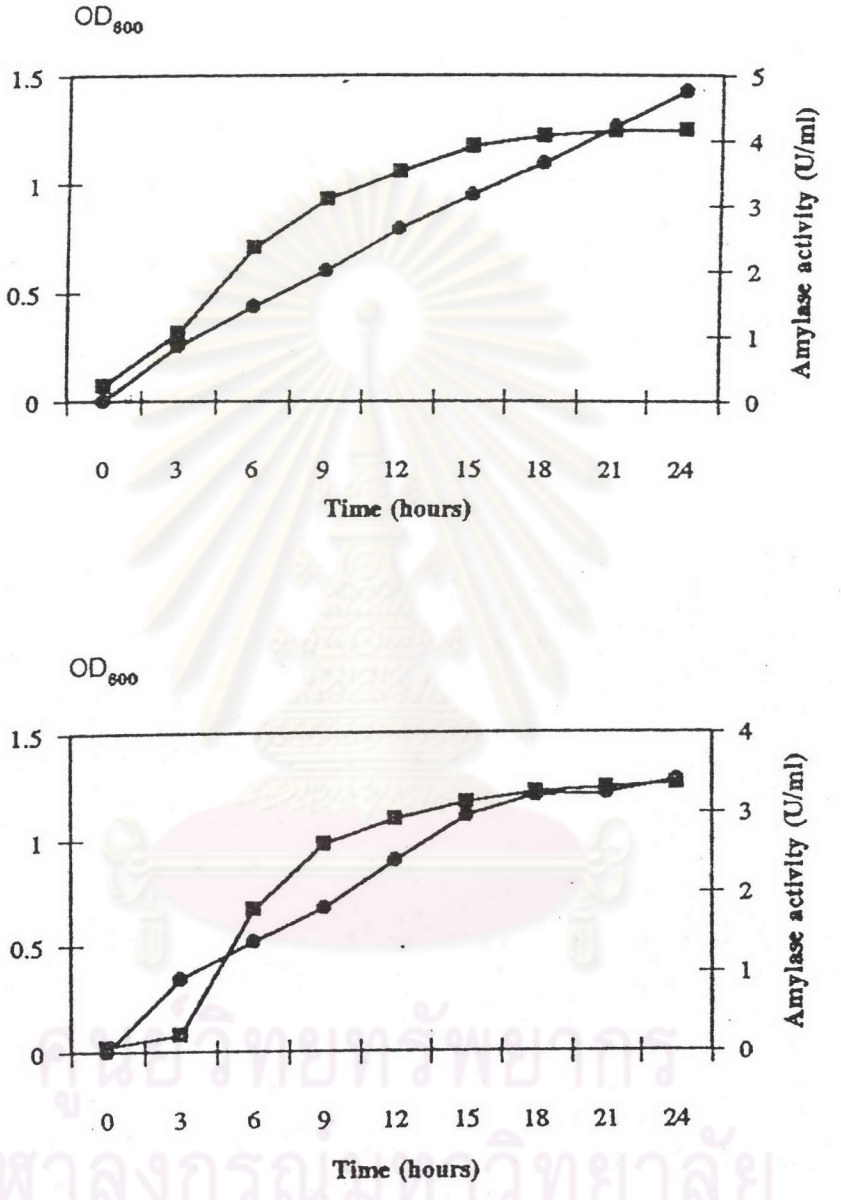
ก



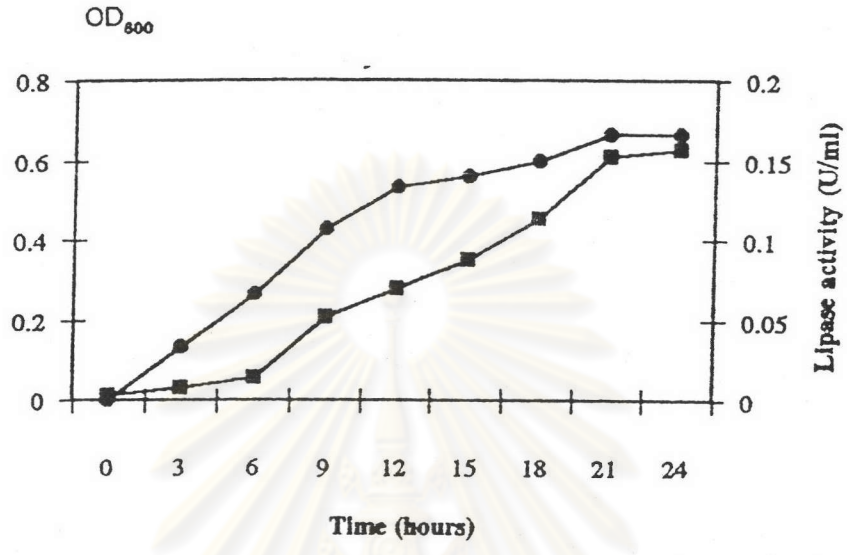
ข

รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียที่ OD $_{600}$ (—■—) และแอคติวิตีของอะไมเลส (U/ml)(—●—) ของ ก) P1 และ ข) P3 ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำของการทดลอง ซึ่งเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยผงถั่วเหลือง และ แป้งเป็นส่วนประกอบ ปริมาตร 300 มล. บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มล. เขย่าเลี้ยงที่ 37° ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม.

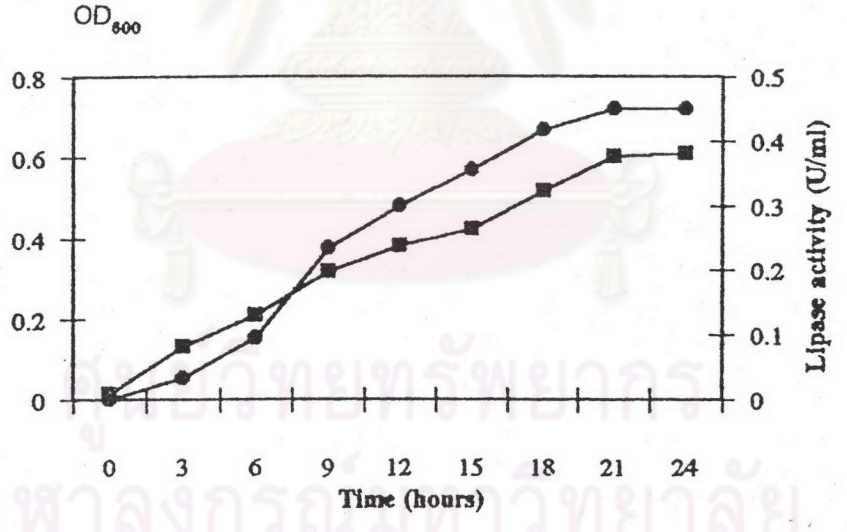
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียที่ OD $_{600}$ (—■—) และแอคติวิตีของอะไมเลส (U/ml)(—●—) ของ ก) P4 และ ข) S22 ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำของการทดลอง ซึ่งเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยผงถั่วเหลือง และแป้ง เป็นส่วนประกอบ ปริมาตร 300 มล. บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มล. เขย่าเลี้ยงที่ 37° ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม.



ก



ข

รูปที่ 11 ความสัมพันธุ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียที่ OD_{600} (—■—) และแอคติวิตีของไลเปส (U/ml) (—●—) ของ ก) P1 และ ข) P4 ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำของการทดลอง ซึ่งเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยผงถั่วเหลือง แป้ง และ Tween 80 1% (W / V) เป็นส่วนประกอบ ปริมาตร 300 มล. บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มล. เขย่าเลี้ยงที่ 37° ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ลักษณะการเจริญ และการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ P1 P3 P4 S22 และ S25

Characteristic	P1	P3	P4	S22	S25
A.Culture characteristic					
Form	irregular	circular	circular	circular	circular
Elevation	raised	raised	convex	raised	raised
Margin	undulate	entire	entire	entire	entire
Surface	ruguse	smooth	smooth	ruguse	smooth
Optical	opaque	opaque	opaque	opaque	opaque
Consistency	brittle	butyrous	brittle	butyrous	butyrous
NA slant	beaded	filiform	filiform	filiform	filiform
NB growth	ring	pellicle	pellicle	pellicle	pellicle
sediment	flaky	flaky	flaky	flaky	flaky
B.Morphological characteristic					
Rod	+	+	+	+	+
Pleomorphic	–	–	–	–	–
Motile	+	–	–	–	–
Spore	+	+	+	+	+
Gram	+	+	+	+	+
C.Physiological characteristic					
Nitrate	+	–	–	–	+
Urea	+	+	–	+	–
Methyl red test	–	–	–	–	–
Voges proskauer test	+	–	–	–	–
Indole	–	–	–	–	–
H_2S	–	–	–	–	–
Starch	+	+	+	+	–
Citrate	–	+	–	–	–
Anaerobe	–	–	–	–	–

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Characteristic	P1	P3	P4	S22	S25
Gelatin	+	–	+	–	+
Casein	+	+	+	+	+
Tween 80	+	–	+	–	–
Catalase	+	+	+	+	+
Oxidase	–	–	–	–	–
Glucose	+	+	+	+	+
Dextrose	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+
L-Sorbose	–	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	–
Mannose	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+
D-sorbital	+	+	+	+	+
NaCl 0%	+	+	+	+	+
1%	+	+	+	+	+
2%	+	+	+	+	+
3%	+	+	+	+	+
4%	+	+	+	+	+
5%	–	–	–	–	+
7%	–	–	–	–	+
10%	–	–	–	–	+

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Characteristic	P1	P3	P4	S22	S25
Temperture 20 ^{0}C	+	+	+	+	+
30 ^{0}C	+	+	+	+	+
40 ^{0}C	+	+	+	+	+
50 ^{0}C	+	–	+	–	+
60 ^{0}C	–	–	–	–	–
pH 3	–	–	–	–	–
4	+	–	–	–	–
5	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	+	–	+	–	+
10	+	–	–	–	+

– = negative , + = positive

Note P1 = *Bacillus subtilis*

P3 = *Bacillus megaterium*

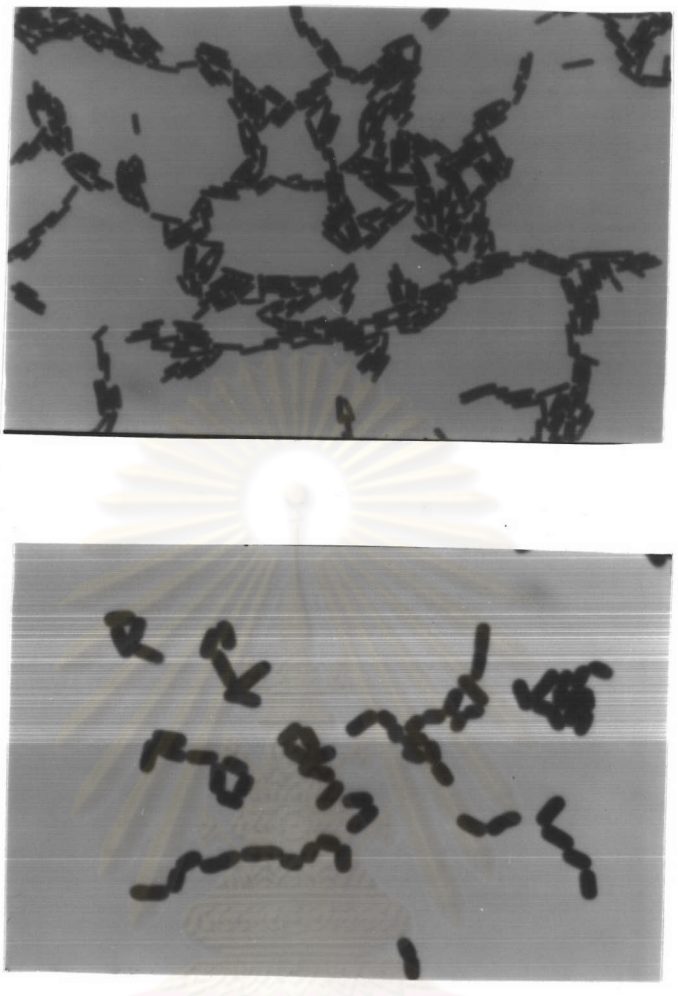
P4 = *Bacillus firmus*

S22 = *Bacillus lentus*

S25 = *Bacillus marinus*

ใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TISTR 1 และ *Bacillus megaterium* TISTR 3 เป็นแบคทีเรียควบคุม ได้ผลการทดสอบเหมือนกับใน Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2 (Sneath และคณะ, 1986)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก

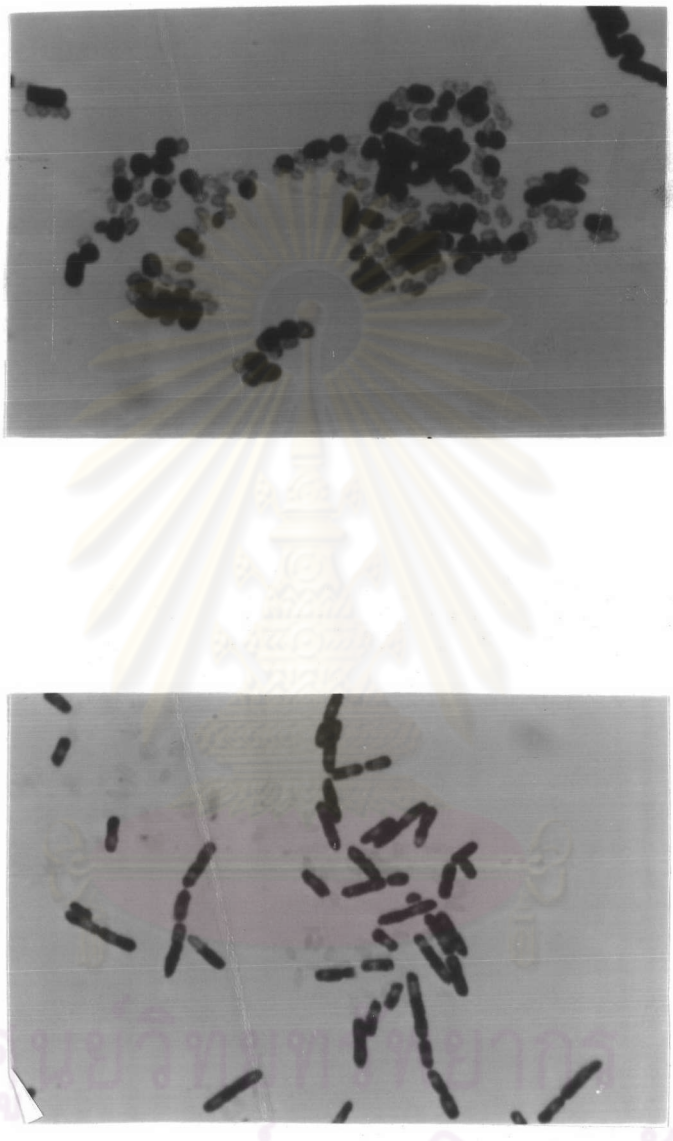
ข

ค

5 μm

รูปที่ 12 การย้อมสีแกรมของแบคทีเรีย ก) P1, ข) P3 และ ค) P4 อายุ 24 ชม. ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ Nikon รุ่น 32 S กำลังขยาย 1000 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 การย้อมสีแกรมของแบคทีเรีย ก) S22 และ ข) S25 อายุ 24 ชม. ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ Nikon รุ่น 32 S กำลังขยาย 1000 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการตรวจสอบการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 5 สายพันธุ์ เลี้ยงในอาหารเหลวนิวเตรียนท์ที่ 37° ซ ให้อยู่ในระยะ log phase นับเซลล์ตั้งต้นได้ดังนี้

S22 = 1.2×10^5 cfu/ml

S25 = 1.7×10^5 cfu/ml

P1 = 3.0×10^5 cfu/ml

P3 = 1.5×10^5 cfu/ml

P4 = 1.4×10^5 cfu/ml

นำแบคทีเรียตั้งต้นมาผสมในอัตราส่วน 1:1 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งนิวเตรียนท์ ที่ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจผลชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่เจริญได้ผลแสดงในตารางที่ 7

จากตารางที่ 7 แสดงให้เห็นถึงปริมาณเชื้อ P1 P3 P4 S22 และ S25 ภายหลังที่เลี้ยงร่วมกันเป็นคู่ๆ ปริมาณของแบคทีเรีย ที่เกิดขึ้นภายหลัง 24 ชม. ของแต่ละสายพันธุ์ไม่ลดจำนวนลงจากปริมาณเซลล์ตั้งต้น จึงแสดงว่าแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ ไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตซึ่งกันและกัน บางคู่ปริมาณเซลล์เพิ่มมากขึ้น แสดงว่าแบคทีเรียที่เลี้ยงเข้าด้วยกันนั้นอาจจะมีส่วนช่วยให้ อีกสายพันธุ์หนึ่งเจริญเติบโตดีขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ชนิดและปริมาณของแบคทีเรีย P1 P3 P4 S22 และ S25 ภายหลังจากการเลี้ยงร่วมกันบนอาหารแข็งนิวเตรียนท์ ที่ 37 ^{O}ซ เป็นเวลา 24 ชม.

จุลินทรีย์	P1	P3	P4	S22	S25
P1&P3	3.3×10^5	1.6×10^5			
P1&P4	3.5×10^5		1.5×10^5		
P1&S22	3.8×10^5			1.3×10^5	
P1&S25	7.0×10^5				1.7×10^5
P3&P4		2.0×10^5	1.6×10^5		
P3&S22		4.0×10^5		1.2×10^5	
P3&S25		1.8×10^5			7.4×10^5
P4&S22			1.5×10^5	1.3×10^5	
P4&S25			1.7×10^5		2.3×10^5
S22&S25				1.2×10^5	5.7×10^5

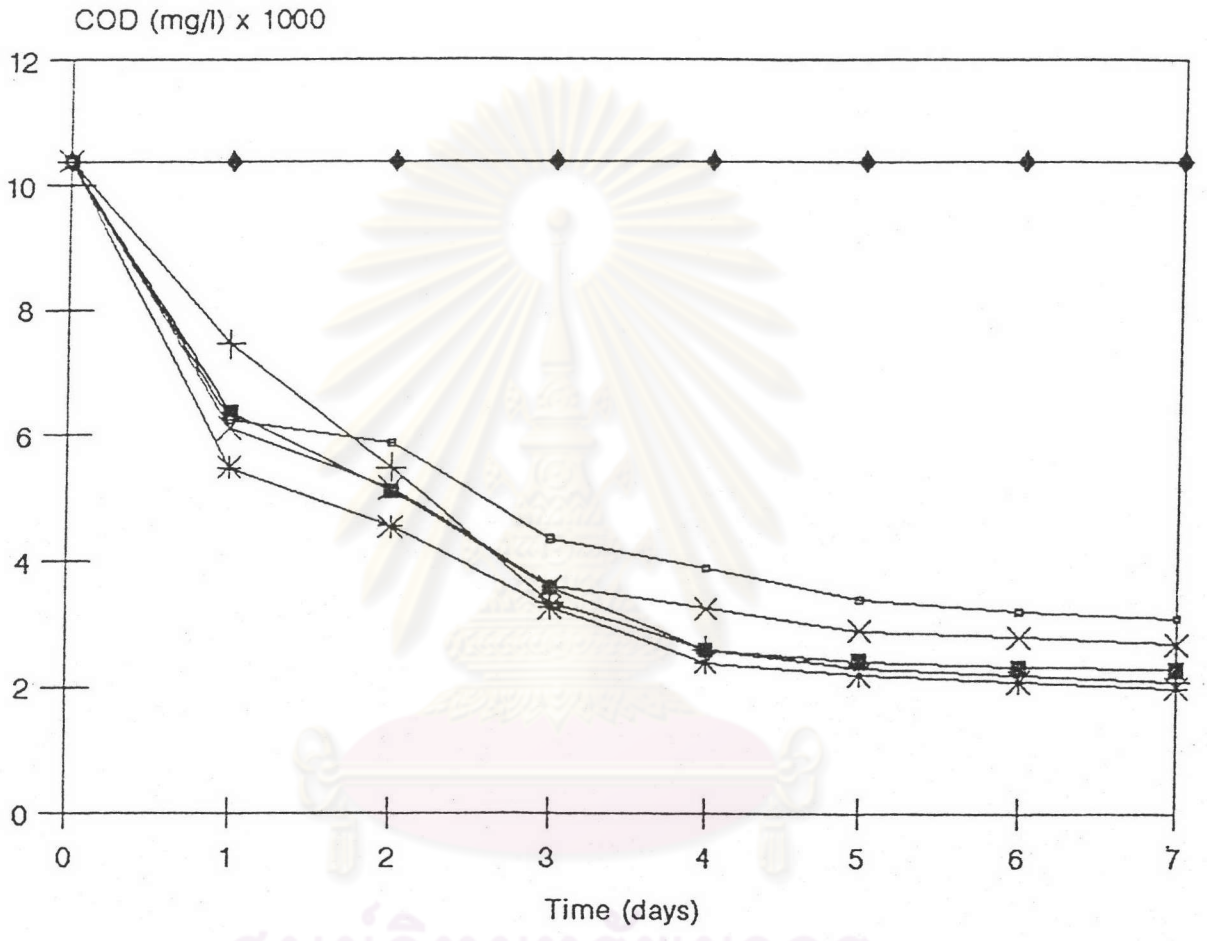
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการตรวจสอบการย่อยสลายสารอินทรีย์

ผลการตรวจสอบการย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยเลี้ยงแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ คือ P1 P3 P4 S22 และ S25 ในน้ำเสียเทียมที่ประกอบด้วยอาหารกุ้ง 1 % (W/V) เปรียบเทียบระหว่างน้ำจืด และน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ที่ 30°ซ เป็นเวลา 7 วัน ผลปรากฏว่าแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ มีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำจืดดีกว่าในน้ำเค็ม คือสามารถลดค่า COD ตั้งต้นลงได้มากกว่าในน้ำเค็ม ยกเว้นแบคทีเรีย S25 ที่ลดค่า COD ตั้งต้นในน้ำทะเลใกล้เคียงกับในน้ำจืด ดังแสดงในรูปที่ 14 และ 15

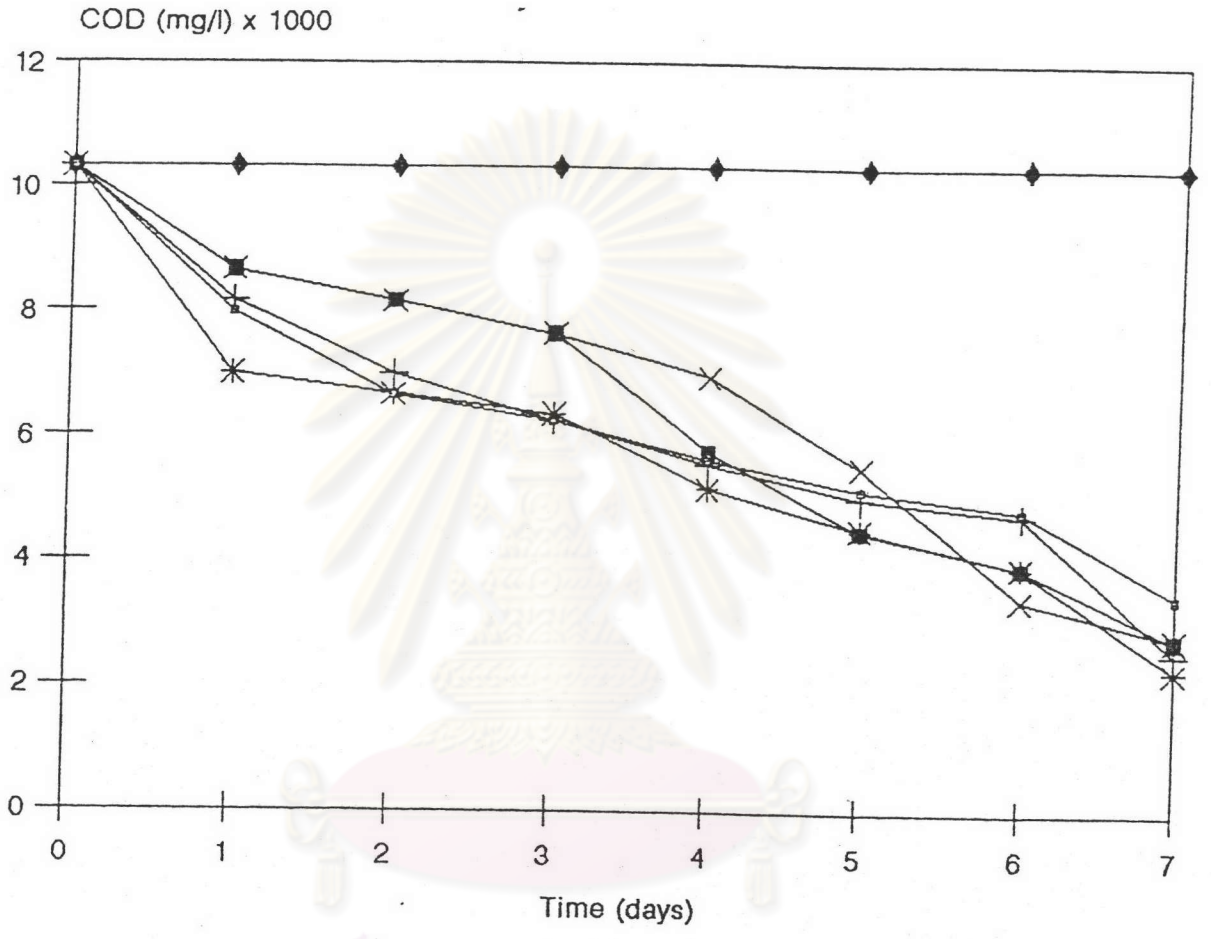
จากการทดสอบการย่อยสลายอินทรีย์ โดยนำแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ P1 P3 P4 S22 และ S25 มาผสมในอัตราส่วนที่เท่ากัน เริ่มจาก 2 สายพันธุ์แรก แล้วเพิ่มทีละสายพันธุ์จนครบ 5 สายพันธุ์ เลี้ยงในน้ำเสียเทียมที่ประกอบด้วยน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน และอาหารกุ้ง 1 % (W/V) เลี้ยงที่ 30°ซ วัดประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ด้วยวิธี COD ผลปรากฏดังรูปที่ 16-19 แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้แบคทีเรียเพียงสายพันธุ์เดียวในการย่อยสลายจะมีอัตราการย่อยสลายไม่ดีเท่ากับเมื่อเพิ่มแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นเข้าไปด้วย โดยดูจากเมื่อเพิ่มเป็น 2 สายพันธุ์ 3 สายพันธุ์ 4 สายพันธุ์ และ 5 สายพันธุ์ การย่อยสลายจะดีขึ้นคือสามารถลดปริมาณสารอินทรีย์ตั้งต้นลงได้มากกว่าการใช้แบคทีเรียเพียงสายพันธุ์เดียว โดยเฉพาะเมื่อใช้แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ P1 P3 P4 S22 และ S25 ในอัตราส่วนที่เท่ากันจะสามารถลดปริมาณสารอินทรีย์ลงได้ถึง 88 % ภายในเวลา 7 วัน

ผลการทดลองการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายของแบคทีเรียที่ผสมในอัตราส่วนที่เท่ากัน 5 สายพันธุ์ เลี้ยงในน้ำเสียเทียมที่ประกอบด้วยน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน กับอาหารกุ้ง 0.5 % 2 % และ 3 % (W/V) เลี้ยงที่ 30°ซ เป็นเวลา 7 วัน ผลปรากฏดังรูปที่ 20-22 จะเห็นว่าเมื่อปริมาณอาหารกุ้งน้อย คือ 0.5 % การย่อยสลายจะเกิดได้อย่างรวดเร็ว โดยแบคทีเรียจะย่อยสลายลดปริมาณสารอินทรีย์ตั้งต้นลงได้ประมาณ 97 % ภายในเวลา 7 วัน แต่เมื่อเพิ่มปริมาณอาหารกุ้งเป็น 2 % การย่อยสลายจะลดปริมาณสารอินทรีย์ลงได้ 88 % ภายในเวลา 7 วัน และเมื่อเพิ่มอาหารกุ้งเป็น 3 % การย่อยสลายจะลดปริมาณสารอินทรีย์ได้ 84 % ภายในเวลา 7 วัน จึงแสดงให้เห็นว่าปริมาณสารอินทรีย์ที่มากเกินไปจะทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายลดลง เนื่องจากปริมาณสารอินทรีย์อาจไปยับยั้งการเจริญหรือมีการสร้างสารที่เป็นพิษยับยั้งการเจริญได้ ทำให้การย่อยสลายไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นการใช้แบคทีเรียในการย่อยสลายอย่างมีประสิทธิภาพควรเริ่มใช้ตั้งแต่มีสารอินทรีย์ปริมาณน้อย เพื่อที่จะได้เกิดการย่อยสลายตลอดเวลา ทำให้ไม่มีการสะสมสารอินทรีย์ที่เป็นสาเหตุทำให้น้ำเน่าเสียได้



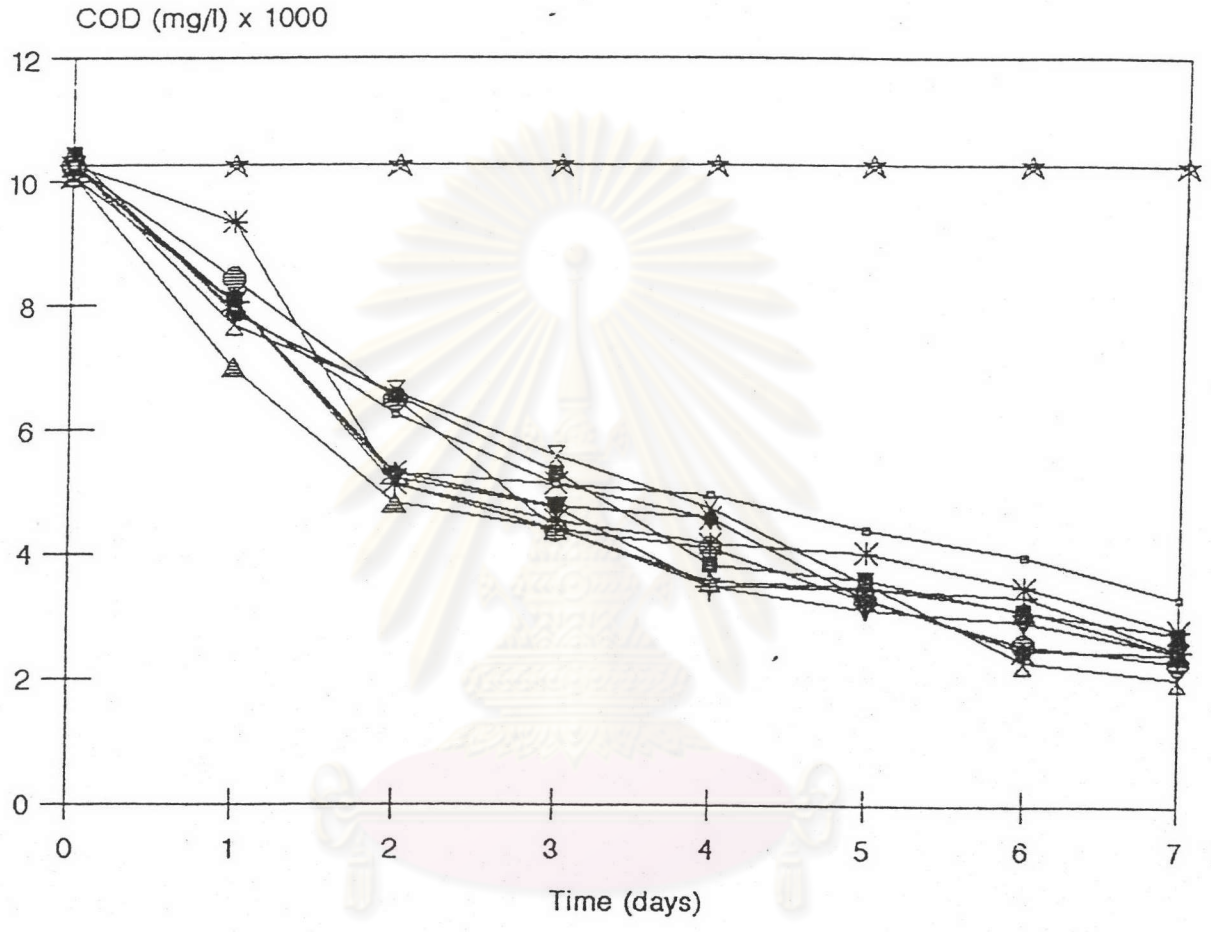
รูปที่ 14 การลดลงของ COD จากน้ำเสียเทียมเตรียมจากน้ำธรรมดาผสมอาหารกุ้ง 1 % (W / V) หลังจากเติมแบคทีเรียช่วงการเจริญ log phase ของ P1 (—▫—) P3 (—+—) P4 (—✳—) S22 (—■—) และ S25 (—x—) ปริมาณ 10^7 เซลล์/มล. ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับค่า COD ของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย (—◆—)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



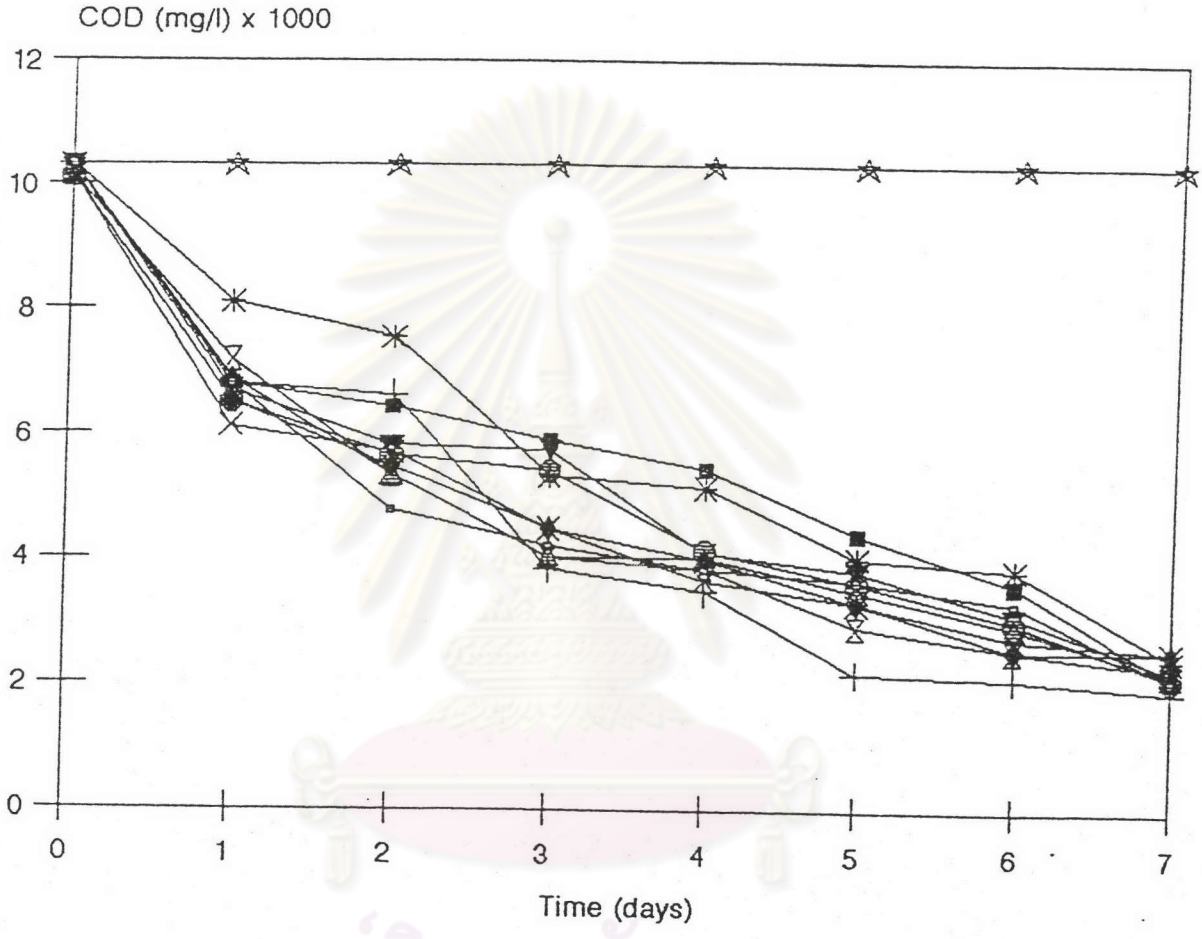
รูปที่ 15 การลดลงของ COD จากน้ำเสียเทียมเตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ผสมอาหารกุ้ง 1% (W / V) หลังจากเติมแบคทีเรียช่วงการเจริญ log phase ของ P1 (—▫—) P 3 (—+—) P4 (—✳—) S22 (—■—) และ S25 (—×—) ปริมาณ 10^7 เซลล์/ มล. ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับค่า COD ของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย (—◆—)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



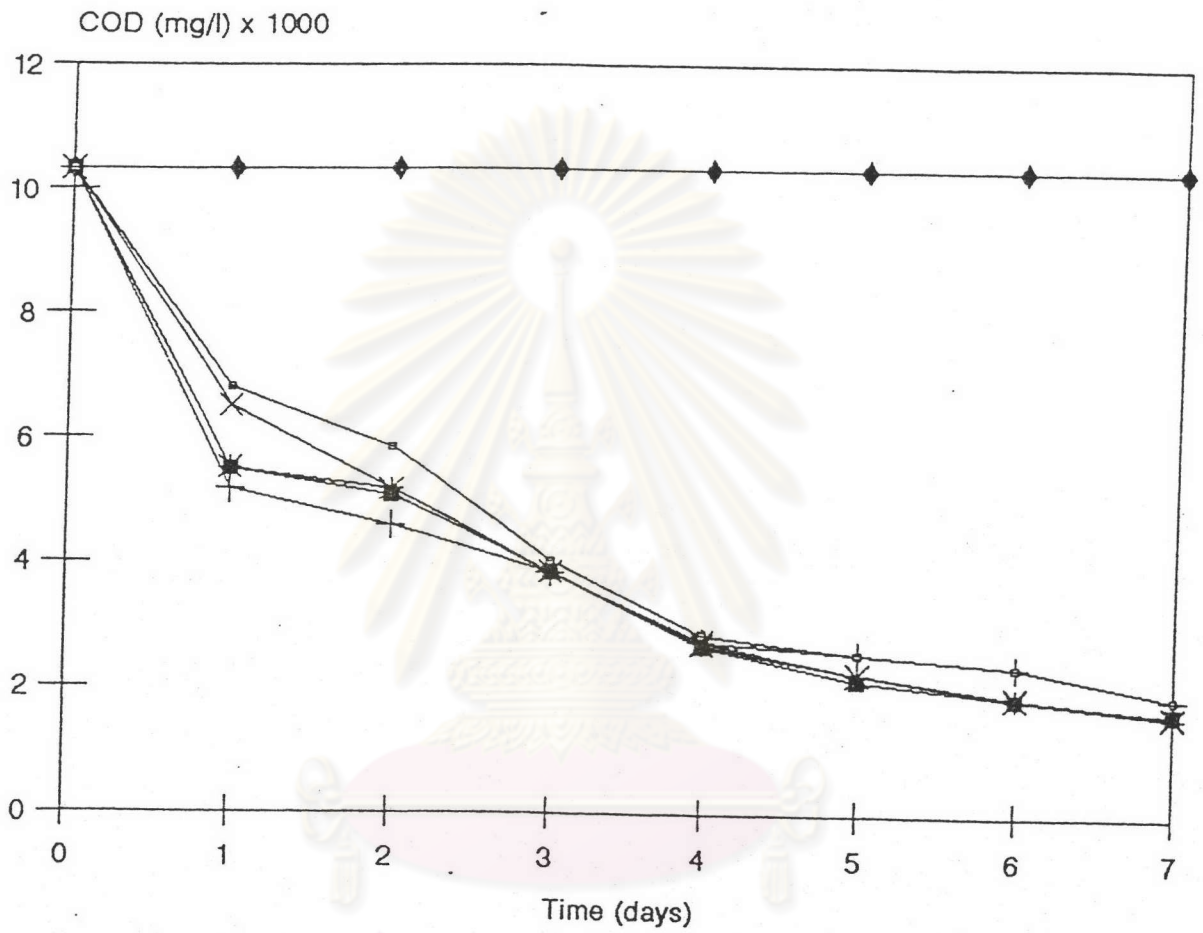
รูปที่ 16 การลดลงของ COD จากน้ำเสียเทียมเตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ผสมอาหารกุ้ง 1% (W / V) หลังจากเติมแบคทีเรียช่วงการเจริญ log phase 2 สายพันธุ์ ในอัตราส่วน 1:1 ของ P1P3 (—▫—) P1P4 (—+—) P1S22 (—✳—) P1S25 (—■—) P3P4 (—×—) P3S22 (—◆—) P3S25 (—▲—) P4S22 (—⧖—) P4S25 (—●—) และ S22S25 (—▼—) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับค่า COD ของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย (—☆—)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

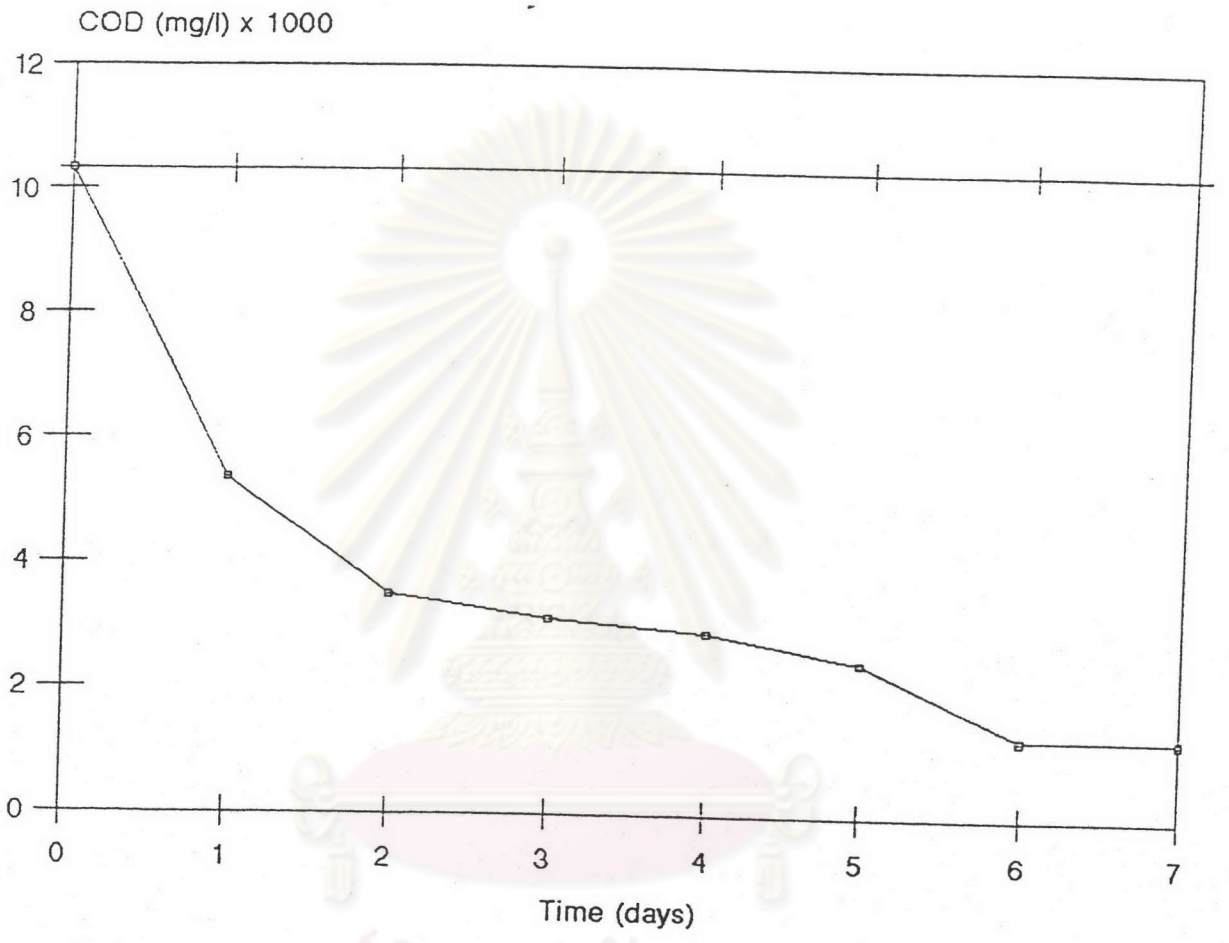


รูปที่ 17 การลดลงของ COD จากน้ำเสียเทียมเตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ผสมอาหารกุ้ง 1 % (W / V) หลังจากเติมแบคทีเรียช่วงการเจริญ log phase 3 สายพันธุ์ ในอัตราส่วน 1:1:1 ของ P1P3P4 (—▫—) P1P3S22 (—+—) P1P3S25 (—✳—) P1P4S22 (—■—) P1P4S25 (—x—) P1S22S25 (—◆—) P3P4S22 (—▲—) P3P4S25 (—⧖—) P3S22S25 (—●—) และ P4S22S25 (—▼—) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เลี้ยงที่ 30° ซ เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับค่า COD ของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย (—☆—)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

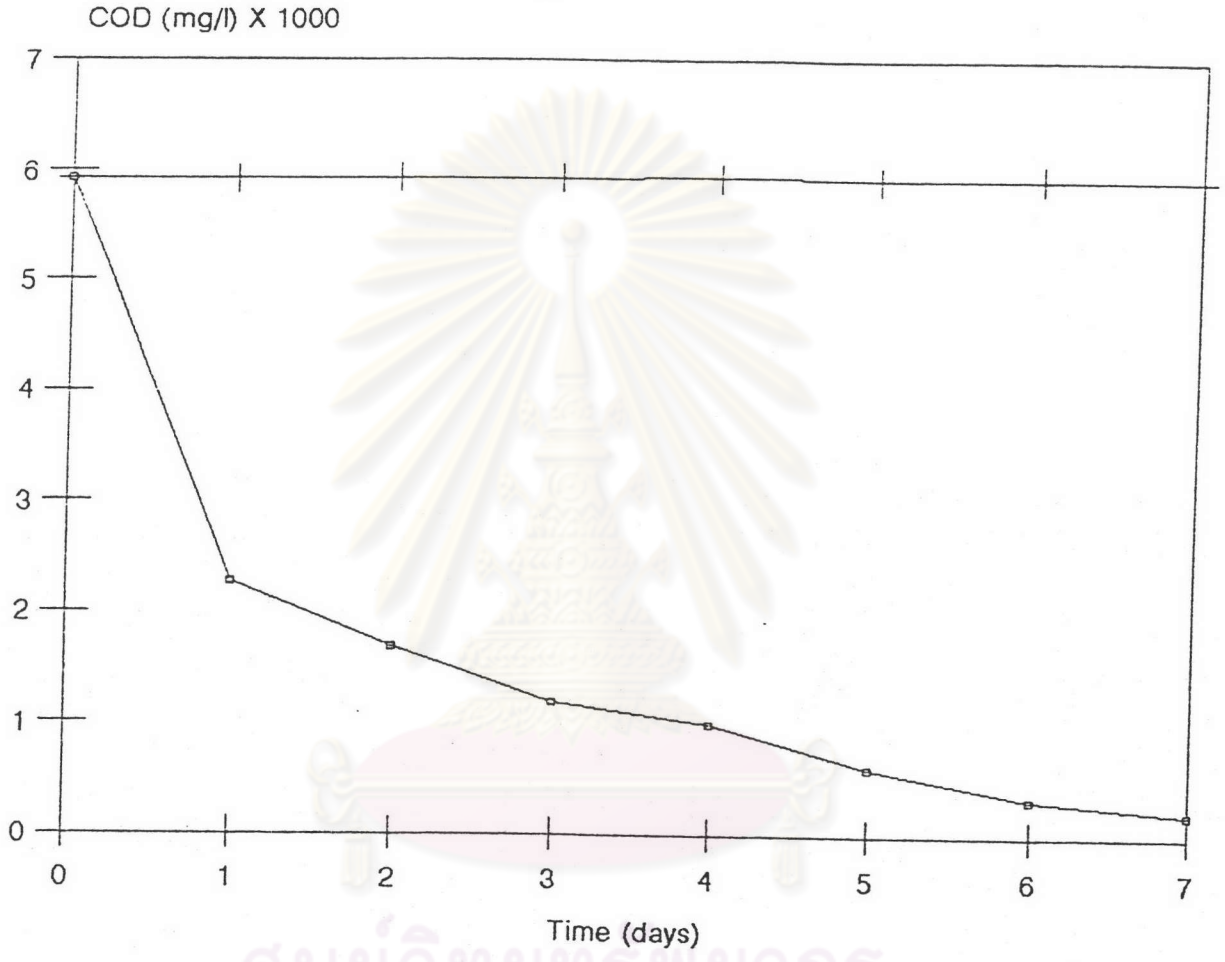


รูปที่ 18 การลดลงของ COD จากน้ำเสียเทียมเตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพัน ส่วน ผสมอาหารกุ้ง 1% (W/V) หลังจากเติมแบคทีเรียช่วงการเจริญ log phase 4 สายพันธุ์ ในอัตราส่วน 1:1:1:1 ของ P1P3P4S22 (—▫—) P1P3P4S25 (—+—) P1P3S22S25 (—*—) P1P4S22S25 (—■—) และ P3P4S22S25 (—x—) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เลี้ยงที่ 30°ซ เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับค่า COD ของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย (—◆—)



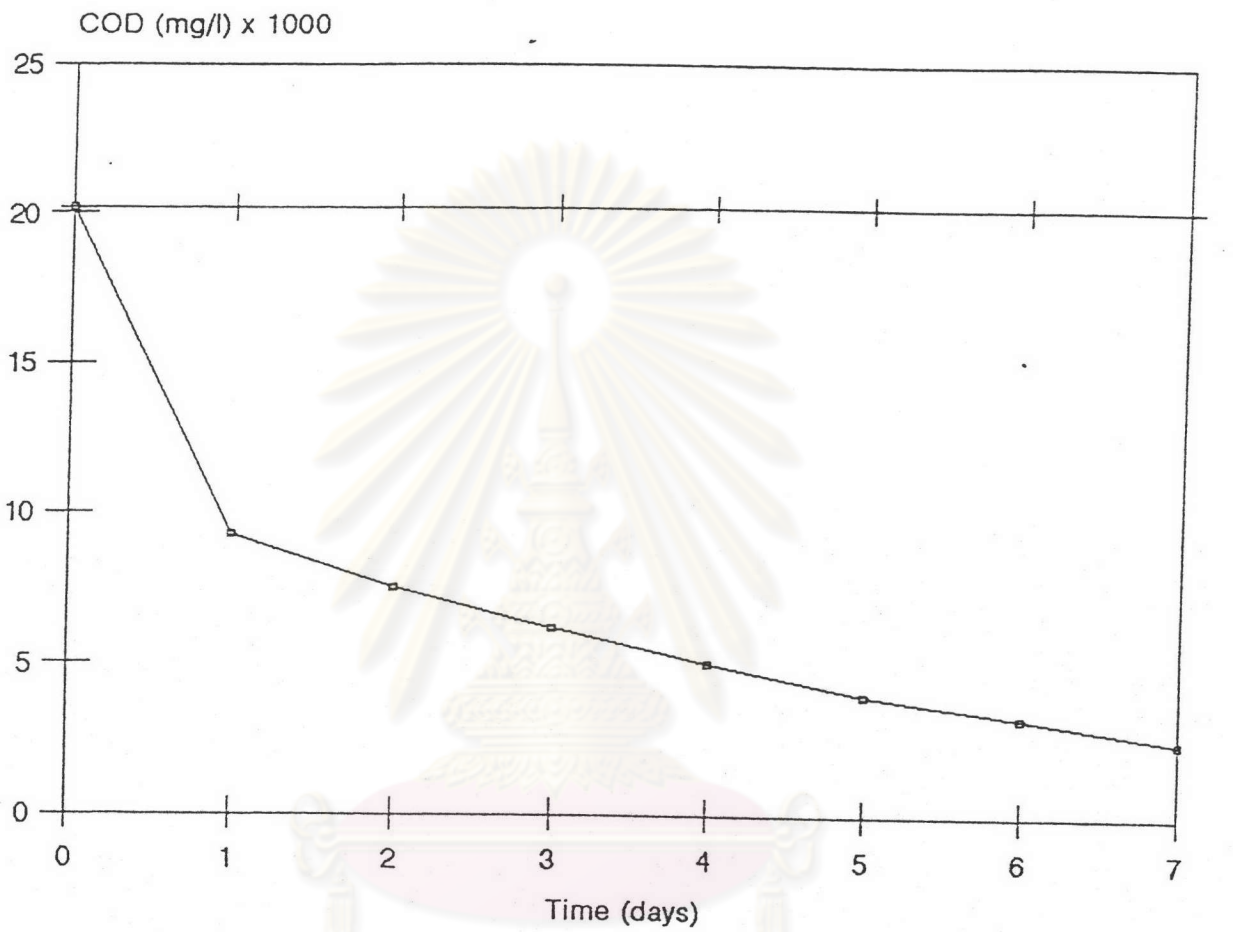
รูปที่ 19 การลดลงของ COD จากน้ำเสียเทียมเตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ผสมอาหารกุ้ง 1% (W/V) หลังจากเติมแบคทีเรีย P1 P3 P4 S22 และ S25 ช่วงการเจริญ log phase ในอัตราส่วน 1:1:1:1:1 (—▫—) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เลี้ยงที่ 30 °ซ เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับค่า COD ของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย (—+—)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



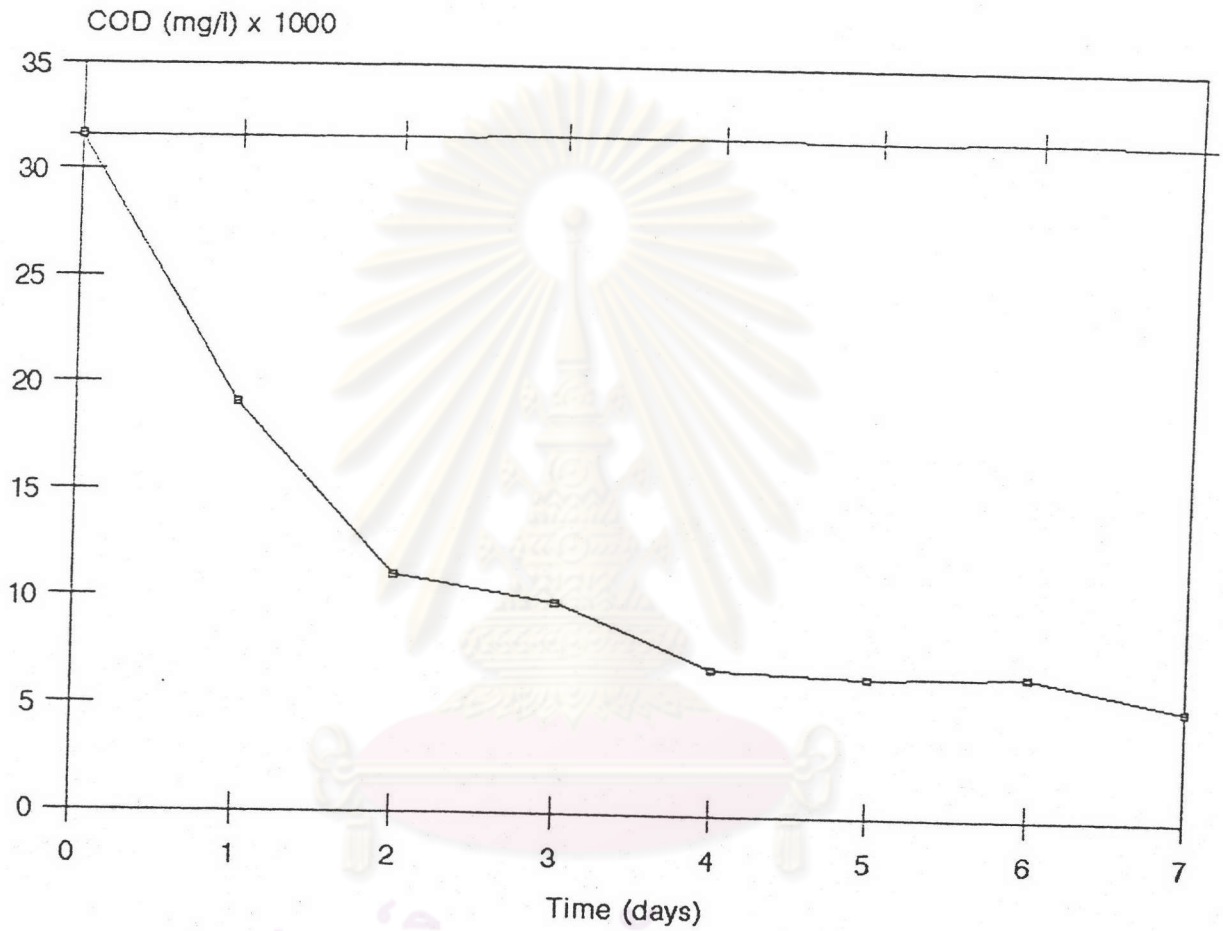
รูปที่ 20 การลดลงของ COD จากน้ำเสียเทียมที่เตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ผสมอาหารกุ้ง 0.5 % (W/V) หลังจากเติมแบคทีเรียผสม 5 สายพันธุ์ ของ P1 P3 P4 S22 และ S25 ในอัตราส่วน 1:1:1:1:1 (—▫—) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เลี้ยงที่ 30°ซ เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับค่า COD ของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย (—+—)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 21 การลดลงของ COD จากน้ำเสียเทียมที่เตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ผสมอาหารกุ้ง 2 % (W / V) หลังจากเติมแบคทีเรียผสม 5 สายพันธุ์ ของ P1 P3 P4 S22 และ S25 ในอัตราส่วน 1:1:1:1:1 (—▫—) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เลี้ยงที่ 30°ซ เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับค่า COD ของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย (—+—)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 22 การลดลงของ COD จากน้ำเสียเทียมที่เตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ผสมอาหารกุ้ง 3 % (W / V) หลังจากเติมแบคทีเรียผสม 5 สายพันธุ์ ของ P1 P3 P4 S22 และ S25 ในอัตราส่วน 1:1:1:1:1 (—▫—) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เลี้ยงที่ 30°ซ เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับค่า COD ของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย (—+—)