บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. **การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และระยะเวลาในการบ่มเชื้อ (Incubation period) เพื่อใช้ในการแยกเชื้อจากน้ำปลา**

จากการทดลองหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำปลาจะพบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แต่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียเจริญได้ดีมีอยู่ 3 ชนิด(ตารางที่ 10)คือ Tryptone yeast

ตารางที่ 10 จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดที่แยกได้จากน้ำปลาอายุ 1 เดือน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆผสมโซเดียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อผสม	จำนวนแบคทีเรีย/มิลลิลิตร	
โซเดียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์	สภาพที่มีออกซิเจน	สภาพที่ไม่มีออกซิเจน
Tryptone yeast extract agar	4.15×10^4	3.40×10^4
Complex medium of dundus	3.90×10^4	4.00×10^4
Tryptic soy agar	2.80×10^4	1.60×10^4
Brain heart infusion agar	1.00×10^4	9.00×10^3
Nutrient agar	7.33×10^3	4.00×10^3
Proteose peptone agar	5.50×10^3	3.33×10^3
Lochhead's skim milk agar	1.00×10^3	1.00×10^3

หมายเหตุ อาหารเลี้ยงเชื้อผสมโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีเชื้อขึ้นเลย

extract agar ; Complex medium of dundus และ Tryptic soy agar ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นๆ มีแบคทีเรียเจริญได้น้อยมาก

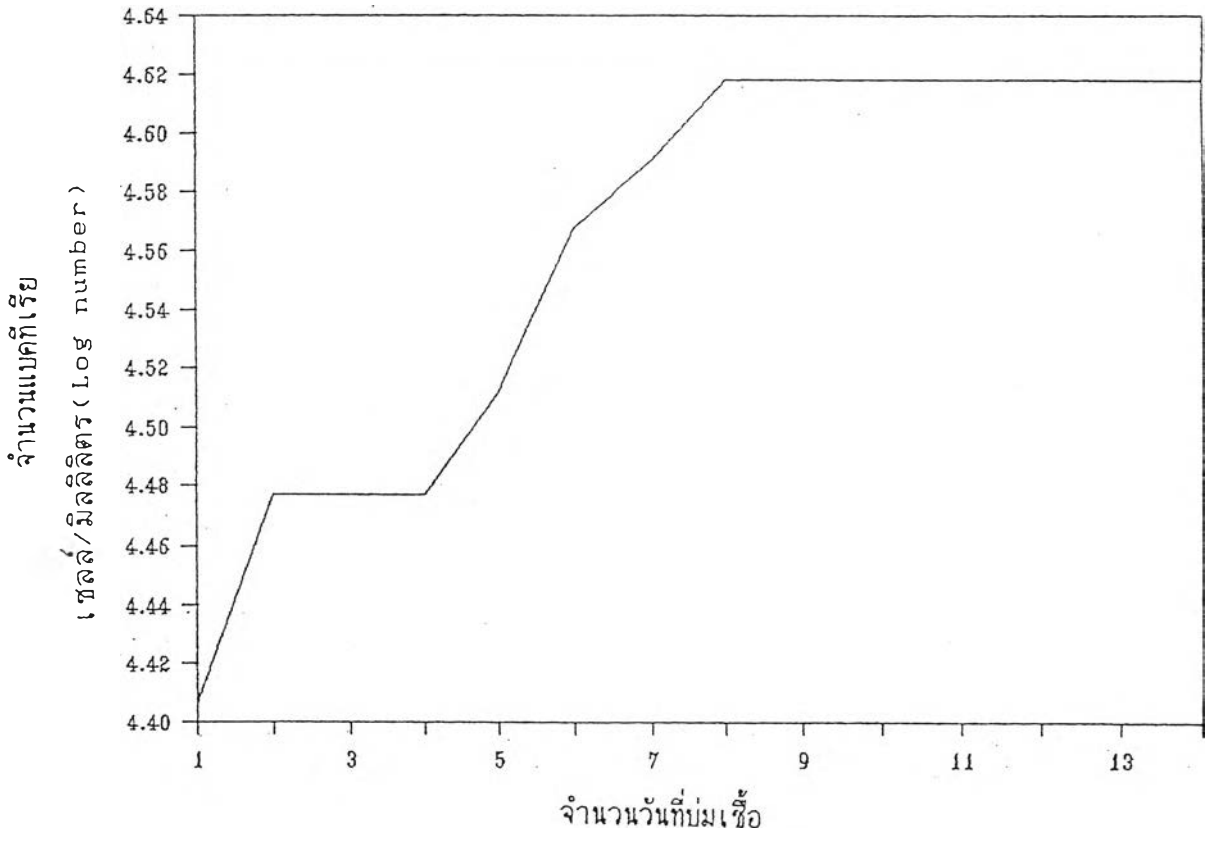
เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่แบคทีเรียสามารถเจริญได้ดี คือ Tryptone yeast extract agar ; Complex medium of dundus และ Tryptic soy agar ทั้ง 3 ชนิดมีปริมาณแบคทีเรียที่เจริญใกล้เคียงกัน โดยในสภาพที่มีออกซิเจนนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone yeast extract agar มีแบคทีเรียเจริญเป็นจำนวนมากที่สุดคือ 4.15×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร รองลงมาคือ Complex medium of dundus มีจำนวน 3.90×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร และTryptic soy agar มีแบคทีเรียเจริญเป็นจำนวนน้อยที่สุด 2.80×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ส่วนในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อ Complex medium of dundus มีแบคทีเรียเจริญเป็นจำนวนมากที่สุดคือ 4.0×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร รองลงมาคือ Tryptone yeast extract agar มีจำนวน 3.4×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร และ Tryptic soy agar มีแบคทีเรียเจริญเป็นจำนวนน้อยที่สุดคือ 1.6×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone yeast extract agar และ Complex medium of dundus มีแบคทีเรียเจริญเป็นจำนวนที่ใกล้เคียงกันมาก แต่เมื่อพิจารณาดูความแตกต่างของโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้แล้วจะพบว่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone yeast extract agar นั้นมีแบคทีเรียที่มีโคโลนีลักษณะแตกต่างกันมากชนิดกว่า ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ Complex medium of dundus นั้นพบว่ามีแบคทีเรียจำนวนน้อยชนิดกว่าแต่มีชนิดเดียวที่เจริญเป็นจำนวนมาก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือก Tryptone yeast extract agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับใช้แยกเชื้อจากน้ำปลาเพื่อให้ได้แบคทีเรียมากชนิดที่สุด เมื่อพิจารณาจากส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone yeast extract agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 20) จะเห็นว่าประกอบด้วย Tryptone และ Yeast extract ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่สมบูรณ์ของจุลินทรีย์หลายชนิด ส่วน $MgSO_4$; $CaCl_2$ และ NaCl นั้นพบว่าเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของน้ำทะเลซึ่งปลาและเกลือล้วนได้มาจากทะเลทั้งสิ้นดังนั้นเชื้อที่ปนเปื้อนมากับปลาและเกลือจึงควรเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ ซึ่งตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (67) แนะนำว่าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของพวก Halobacterium และ Halococcus นอกจากนี้ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อของ Tryptone yeast extract agar ใกล้เคียงกับ

Halobacterium medium agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) ซึ่งกฤษดา (19) ใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อพวก Halophilic bacteria ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จึงน่าจะใช้เลี้ยงเชื้อพวก Halophilic bacteria ได้อีกด้วย แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซ็นต์นั้นไม่มีเชื้อใด ๆ ขึ้นเลย ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าตัวอย่างน้ำปลาที่นำมาใช้แยกเชื้อซึ่งมีอายุประมาณ 1 เดือนอาจเป็นช่วงที่แบคทีเรียพวก halophile ตายไปแล้วหรือยังไม่เกิดขึ้นหรือเกิดขึ้นแล้วแต่ยังไม่มีปริมาณมากพอและในขั้นตอนการแยกเชื้อนั้นอาจทำการเจือจางมากเกินไป

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่าง การบ่มเชื้อในสภาพที่มีออกซิเจน และในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนจะพบว่าแบคทีเรียที่ขึ้นในสภาพไม่มีออกซิเจนมีจำนวนและชนิดใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ขึ้นในสภาพมีออกซิเจนและเมื่อพิจารณาถึงชนิดของแบคทีเรียอย่างคร่าวๆ โดยดูจากลักษณะของโคโลนี สี ขนาด แล้วจะพบว่า แบคทีเรียที่เจริญในสภาพไม่มีออกซิเจนนั้นก็จะพบว่า มีการเจริญในสภาพที่มีออกซิเจนด้วยเช่นกัน ดังนั้น แบคทีเรียที่เจริญในสภาพไม่มีออกซิเจนนั้น น่าจะเป็นแบคทีเรียพวก Facultative anaerobe มากกว่า สิทธิพันธ์(57)พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนเมื่อนำมาเลี้ยงในสภาพที่มีออกซิเจนแล้ว ยังคงขึ้นได้ดีทุกตัวแสดงว่าแบคทีเรียเหล่านี้เป็นพวก Facultative anaerobe คือเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกทำเฉพาะในสภาพที่มีออกซิเจนเท่านั้น ส่วนในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนควรจะได้มีการศึกษาโดยละเอียดต่อไป

จากรูปที่ 2 พบว่าแบคทีเรียทนเค็มได้เล็กน้อยเหล่านี้ ส่วนใหญ่จะเจริญเป็นโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งได้ภายใน 1 วันเท่านั้น ในช่วงวันที่ 5 ถึง 8 จะมีจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อย หลังจากวันที่ 8 ไปแล้วไม่มีแบคทีเรียเพิ่มจำนวนขึ้นอีก ดังนั้นในการทดลองนี้จะใช้เวลาในการบ่มเชื้อ 7 ถึง 8 วันสำหรับแบคทีเรียพวกที่ทนเค็มได้เล็กน้อย ส่วนแบคทีเรียพวกที่ทนเค็มได้สูงนั้นเนื่องจากเป็นพวกที่เจริญได้ค่อนข้างช้าซึ่งต้องใช้เวลาในการบ่มเชื้อไม่น้อยกว่า 14 วัน(67) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงยืดเวลาบ่มเชื้อไปจนถึงวันที่ 20

รูปที่ 2 แสดงการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone yeast extract agar เติมเกลือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงระยะเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง



2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทั้งปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในช่วงระยะ 253 วันของกระบวนการหมัก

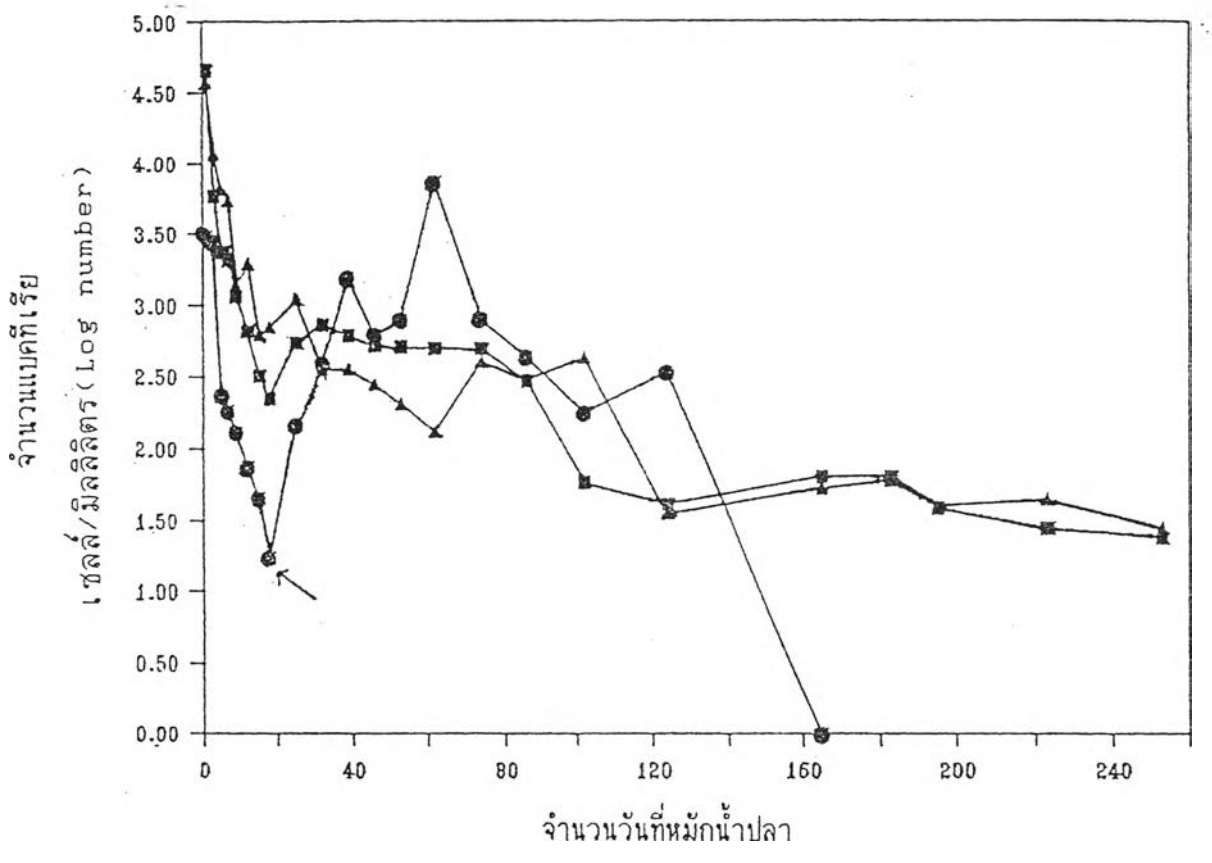
ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทั้งปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในระยะ 253 วันแรกของกระบวนการหมักน้ำปลาซึ่งหมักโดยใช้ปลาผสมเกลือเม็ดในอัตราส่วนปลา: เกลือเท่ากับ 3:1 โดยน้ำหนัก หรือปลา 15 กิโลกรัมต่อเกลือ 5 กิโลกรัม ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ค ตารางที่ 16

2.1. <u>การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมด (Total count) ที่แยกจากน้ำปลาหมักในช่วงระยะเวลา 253 วัน</u> (รูปที่ 3)

ปริมาณแบคทีเรียที่แยกจากน้ำปลา โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือ พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียตั้งแต่ 24 - 4.50×10^{4} เซลล์/มิลลิลิตร โดยมีปริมาณมากที่สุดในวันแรกของการหมักคือ 4.50×10^{4} เซลล์/มิลลิลิตร และจะลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วจนเหลือ 233 เซลล์/มิลลิลิตรในวันที่ 18 จากนั้นจะค่อยๆลดจำนวนลงจนเหลือ 24 เซลล์/มิลลิลิตรเท่านั้นในวันสุดท้ายของการทดลอง (เป็นกลุ่มเชื้อที่มีความสัมพันธ์แบบตรงกันข้ามกับไนโตรเจนทั้งหมดและไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์และกับแอมโมเนียคัลไนโตรเจนแต่ไม่มีนัยสำคัญ)(ภาคผนวก ค ตารางที่ 18) ซึ่งหมายความว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิดที่พบในน้ำหมักปลา

ปริมาณแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียตั้งแต่ 28 - 3.74×10^{4} เซลล์/มิลลิลิตรโดยมีปริมาณมากที่สุดคือ 3.74×10^{4} เซลล์/มิลลิลิตรในวันแรกของการหมัก จะลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วจนเหลือ 567 เซลล์/มิลลิลิตร จากนั้นจะค่อยๆลดจำนวนลงจนเหลือ 28 เซลล์/มิลลิลิตร ในวันสุดท้ายของการทดลอง (เป็นกลุ่มเชื้อที่มีความสัมพันธ์แบบตรงกันข้ามกับไนโตรเจนทั้งหมดและไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ และกับแอมโมเนียคัลไนโตรเจนที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์) (ภาคผนวก ค ตารางที่ 18) ซึ่งหมายความว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิด ที่พบในน้ำหมักปลาเช่นเดียวกับแบคทีเรียกลุ่มที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือ

รูปที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียทั้งหมด (Total count) ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone yeast extract agar ไม่เติมเกลือ เติมเกลือ 5 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงระยะเวลา 253 วันของกระบวนการหมักน้ำปลา



■ = แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone yeast extract agar ไม่เติมเกลือ

▲ = แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อTryptone yeast extract agar เติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์

● = แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อTryptone yeast extract agar เติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์

หมายเหตุ ปลายลูกศรชี้ กลุ่มเชื้อโคโลนีสีแดงซึ่งเป็นกลุ่มที่พบมากเริ่มปรากฏ

จะเห็นได้ว่ารูปแบบ (pattern) ของการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อทั้งหมดที่แยกได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือและเติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ นั้นมีลักษณะคล้ายกันมากตั้งแต่เริ่มหมักจนสิ้นสุดการทดลอง โดยจำนวนแบคทีเรียจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 2 สัปดาห์แรกของการหมักหลังจากนั้นอัตราการลดจำนวนลงจะเป็นไปอย่างช้าๆจนแทบไม่พบแบคทีเรียเลยเมื่อหมักครบ 253 วัน

เมื่อพิจารณาจากลักษณะรูปร่างของโคโลนี ขนาด และสี จะพบว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่มีลักษณะดังแสดงในตารางที่ 11 เมื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียดังกล่าวระหว่างพวกที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมเกลือและเติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์จะพบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกันมาก

กลุ่มเชื้อที่พบเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือและเติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ นี้มีความใกล้เคียงกันทั้งในแง่ปริมาณและลักษณะของโคโลนี และเมื่อหาความสัมพันธ์ในแง่จำนวนระหว่างเชื้อแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มนี้พบว่ามีค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ +0.974** (ภาคผนวก ค ตารางที่ 17) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ จึงอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียดังกล่าวเป็นกลุ่มเดียวกันคือเป็นพวกที่ไม่ชอบเค็มแต่สามารถทนเค็มได้บ้าง และทั้ง 2 กลุ่มนี้มีความสัมพันธ์แบบตรงกันข้ามกับสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิด ที่พบในน้ำหมักปลา ดังนั้นจึงเป็นกลุ่มที่ไม่น่ามีความสำคัญในกระบวนการหมักน้ำปลา

จำนวนแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีปริมาณตั้งแต่ 0 - 7.26×10^3 เซลล์/มิลลิลิตร โดยเมื่อเริ่มต้นหมักวันแรกมีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 3.00×10^3 เซลล์/มิลลิลิตร จะลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วมากเหลือเพียง 233 เซลล์/มิลลิลิตรในวันที่ 5 และเหลือเพียง 18 เซลล์/มิลลิลิตรในวันที่ 18 ลักษณะของแบคทีเรียดังแสดงในตาราง 11 แบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวนี้มีลักษณะที่ค่อนข้างจะแตกต่าง ไปจากกลุ่มที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือและเติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาเดียวกัน หลังจากวันที่ 18 ไปจะไม่พบแบคทีเรียกลุ่มนี้ แต่จะมีแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นมาแทนที่ แบคทีเรียกลุ่มหลังนี้มีลักษณะของโคโลนีดังแสดงในตาราง 11 เป็นพวกที่มีโคโลนีค่อนข้างโปร่งแสง สีแดงเป็นส่วนใหญ่ สีส้มเล็กน้อย และสีแดงอมชมพูทึบแสงอีกเล็กน้อย ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเล็กมากยกเว้น

ตารางที่ 11 แสดงลักษณะของโคโลนี สี ขนาด ของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone yeast extract agar ไม่เติมเกลือ เติมเกลือ 5 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงระยะเวลา 253 วันของกระบวนการหมักน้ำปลา

ช่วงวันที่	บนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือและเติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์	
	พวกที่เจริญบนผิววุ้น	พวกที่เจริญใต้วุ้น
1 - 18	ลักษณะโคโลนี กลม นูน หรือแบนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 - 4 มิลลิลิตร สีเหลือง น้ำตาลเข็น ส่วนใหญ่ผิวมันทึบแสงที่โปร่งแสงพบน้อย พวกโคโลนีแผ่กระจายผิวย่นพบน้อย	ลักษณะโคโลนีกลมขอบเรียบเอียงอยู่ใต้วุ้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 - 2 มิลลิเมิตร สีครีม เหลือง และน้ำตาล ทึบแสง
18 - 253	ลักษณะเหมือนช่วง 18 วันแรกแต่จำนวนลดน้อยลง ส่วนพวกที่มีโคโลนีแผ่กระจายผิวย่น สีครีม มีจำนวนมากขึ้น	ลักษณะเหมือนช่วง 18 วัน แรก แต่จำนวนลดน้อยลง มีพวกที่มีโคโลนีแผ่กระจายบางๆ สีขาว เจริญมากขึ้น
ช่วงวันที่	บนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์	
	พวกที่เจริญบนผิววุ้น	พวกที่เจริญใต้วุ้น
1 - 18	โคโลนีกลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันทึบแสง สีขาวเข็นส่วนใหญ่ สีเหลืองสดมีจำนวนน้อยกว่า ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี 2 - 3 มิลลิเมตร และมีพวกโคโลนีขนาดใหญ่เส้นผ่าศูนย์กลาง 4 - 5 มิลลิเมตร สีน้ำตาล กลม แบน ขอบเรียบ ค่อนข้างโปร่งแสงแต่มีจำนวนน้อย ส่วนใหญ่เข็นพวกรูปกลมแกรมบวก รูปแท่งแกรมบวกเข็นส่วนน้อย	ลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ ทึบแสง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 - 1.5 มิลลิเมตร สีครีมเข็นส่วนใหญ่
18 - 253	ลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ ค่อนข้างโปร่งแสง สีแดงเข็นส่วนใหญ่สีส้มเล็กน้อย สีแดงอมชมพูทึบแสงอีกเล็กน้อย เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 - 2.0 มิลลิลิตรเข็นพวกรูปกลมแกรมบวก	ลักษณะเดียวกันกับที่พบเจริญบนผิววุ้น

พวกสีแดงอมชมพูที่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีค่อนข้างใหญ่แต่ไม่เกิน 2 มิลลิเมตร เมื่อย้อมติดสีแกรมดูปรากฏว่า เป็นพวกที่มีเซลล์รูปร่างกลม(coccus) ทั้งหมด เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่มสีม่วงอมแดงจึงจัดให้อยู่ในกลุ่มแกรมบวก พวกกลุ่มสีแดงเหล่านี้จะเริ่มปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 12 เพียง 1 - 2 เซลล์/มิลลิลิตร และเริ่มปรากฏมากขึ้นเรื่อยๆจนมีจำนวนสูงสุดเท่ากับ 7.26×10^{3} เซลล์/มิลลิลิตรในวันที่ 62 จากนั้นจะค่อยๆ ลดจำนวนลง (แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์ ทั้งหมด ไม่พบอีกเลยตั้งแต่วันที่ 165 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง)

จะเห็นได้ว่ากลุ่มเชื้อที่พบเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์ นี้มีลักษณะของเชื้อที่แตกต่างไปจากกลุ่มเชื้อที่พบ เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือ และเติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ อย่างเห็นได้ชัดเจนทั้งลักษณะของโคโลนีและในแง่จำนวนโดยจำนวนมีความสัมพันธ์กับกลุ่มเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือและเติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาคผนวก ค ตารางที่ 17) ซึ่งหมายความว่าเป็นคนละกลุ่มกัน เชื้อในกลุ่มที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์นี้ยังแบ่งได้เป็น 2 พวกคือ พวกแรกเป็นพวกที่เจริญในช่วง 18 วันแรกซึ่งจะตายลงอย่างรวดเร็วมีลักษณะของโคโลนีกลมนูนสีขาว และเหลือง คล้ายกับที่กฤษดา (19) แยกได้ในช่วง 7 ถึง 28 วัน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ HMA เติมเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ จึงคาดว่าเป็นพวกที่ชอบเค็มปานกลาง พวกที่สองคือพวกกลุ่มโคโลนีสีแดงที่พบเจริญในช่วงประมาณวันที่ 12 ถึง 165 วัน เป็นพวกเดียวที่สามารถเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ในถังหมักน้ำปลาที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ นี้ได้จึงควรจะเป็นพวก Extremely halophile พบว่ามีความสัมพันธ์แบบตามกันกับไนโตรเจนทั้งหมด ไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนและแอมโมเนียคัลไนโตรเจน โดยมีค่าสหสัมพันธ์(r)เท่ากับ 0.55 ,0.59 และ 0.56 ตามลำดับ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาคผนวก ค ตารางที่ 18) ซึ่งหมายความว่าอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิดที่พบในน้ำหมักปลา นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียในกลุ่มสีแดงดังกล่าวบางตัวยังสามารถย่อย Skimmed milk และเจลลาตินได้ จึงเป็นข้อบ่งชี้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับการเกิดสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนที่พบในน้ำหมักปลาแน่นอน แต่ที่ไม่มีนัยสำคัญอาจเป็นเพราะว่าการเกิดสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนส่วนใหญ่มาจากกระบวนการย่อยตัวเองของปลามากกว่าที่เกิดจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ อย่างไรก็ตามก็นับได้ว่าเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่น่าสนใจกว่ากลุ่มอื่น ๆ เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการคือชอบเค็มและย่อยโปรตีนได้

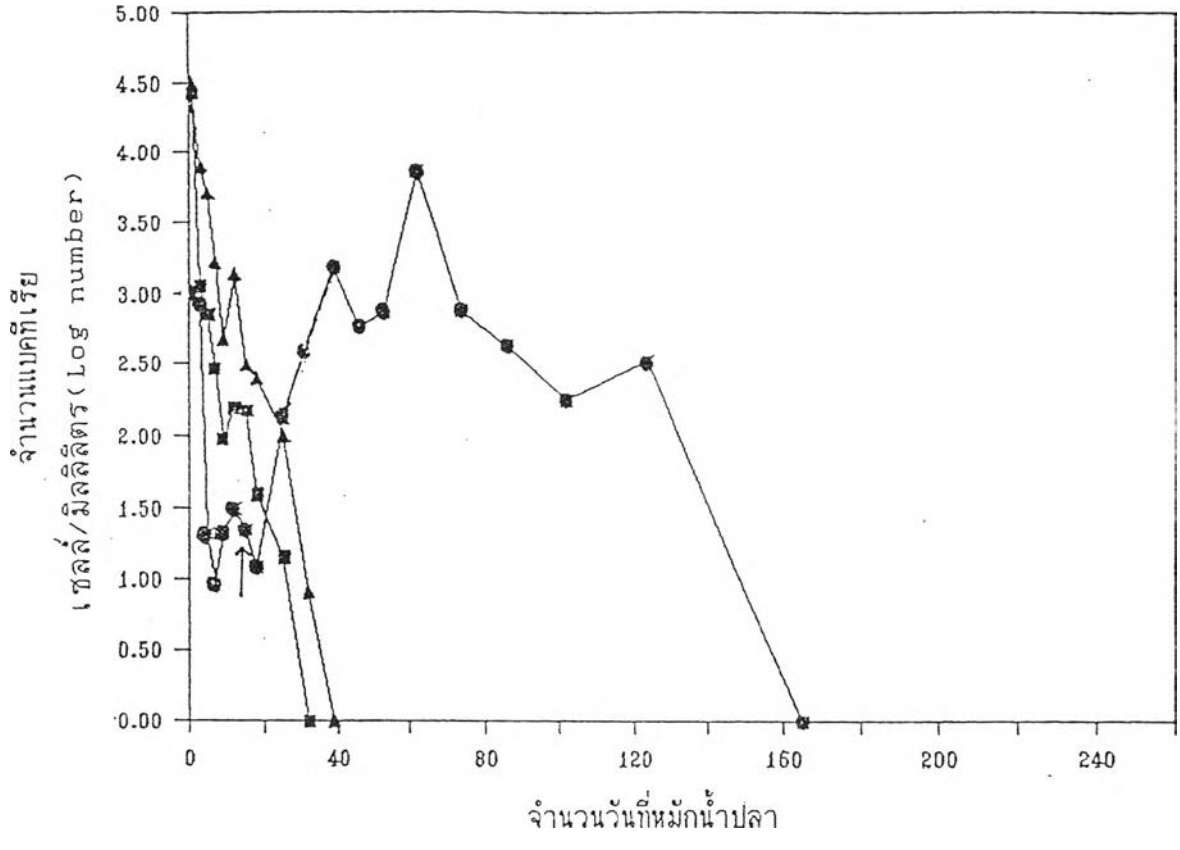
2.2. <u>การเปลี่ยนแปลงชนิดของแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากน้ำปลาหมักในช่วงระยะเวลา 253 วัน</u> (ภาคผนวก ค ตารางที่ 16 รูปที่ 4 , 5 ,6)

นำแบคทีเรียทั้งหมดที่พบเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือ เติมเกลือ 5 และ 20 เปอร์เซ็นต์ มาจัดพวกโดยการย้อมสีแกรมแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะแบ่งได้เป็น 3 พวกใหญ่ๆ ตามรูปร่างของเซลล์และการติดสีแกรม คือ 1) พวกรูปกลม (coccus) ติดสีแกรมบวก (C^+) 2) พวกรูปแท่ง (rod) ติดสีแกรมบวก (R^+) 3) พวกรูปแท่ง (rod) ติดสีแกรมลบ (R^-)

จากตารางที่ 16 ภาคผนวก ค จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียที่ติดมากับปลาส่วนใหญ่เป็นพวก C^+ ที่ทนเค็มได้ต่ำ โดยมีจำนวนถึง 99 และ 76 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือและเติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์ นั้นพบเพียง 38 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น สำหรับแบคทีเรียที่ติดมากับเกลือส่วนใหญ่เป็นพวก C^+ เช่นกัน ซึ่งมีจำนวนถึง 95, 75 และ 78 เปอร์เซ็นต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือ เติมเกลือ 5 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อหมักปลา และเกลือเข้าด้วยกันแล้วพบว่า แบคทีเรีย C^+ ที่พบทั้ง 3 ระดับเปอร์เซ็นต์เกลือนี้จะตายลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 4)และหายไปในช่วง 25 ถึง 32 วัน แล้วจะมี C^+ (คือกลุ่มโคโลนีสีแดง) ซึ่งพบเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้นเจริญเพิ่มจำนวนจนมีจำนวนมาก พบในช่วง 12 - 165 วัน ย่อย Skimmed milk และเจลลาตินได้ ซึ่งเป็นข้อชี้บ่งว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้สร้างโปรติเอส ดังนั้นแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงอาจมีบทบาทต่อกระบวนการหมักน้ำปลาได้

แบคทีเรียอีกพวกหนึ่งได้แก่พวกรูปแท่งแกรมบวก (R^+) ซึ่งพบว่าปนเปื้อนมากับวัตถุดิบในปริมาณค่อนข้างน้อยโดยปนเปื้อนมากับปลาประมาณ 1, 13 และ 19 เปอร์เซ็นต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือ เติมเกลือ 5 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และปนเปื้อนมากับเกลือประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือ และ 11 เปอร์เซ็นต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 5 และ 20 เปอร์เซ็นต์ พวกนี้จะตายลงอย่างรวดเร็วในช่วง 2 สัปดาห์แรก (รูปที่ 5) และจะค่อย ๆ ลดจำนวนลงเมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้น พบว่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์ นั้นแบคทีเรียพวกนี้จะหายไปในราววันที่ 165 แต่บนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือและ

รูปที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียพวกรูปกลม(Coccus) แกรมบวก(C^+) ในช่วงระยะเวลา 253 วันของกระบวนการหมักน้ำปลา



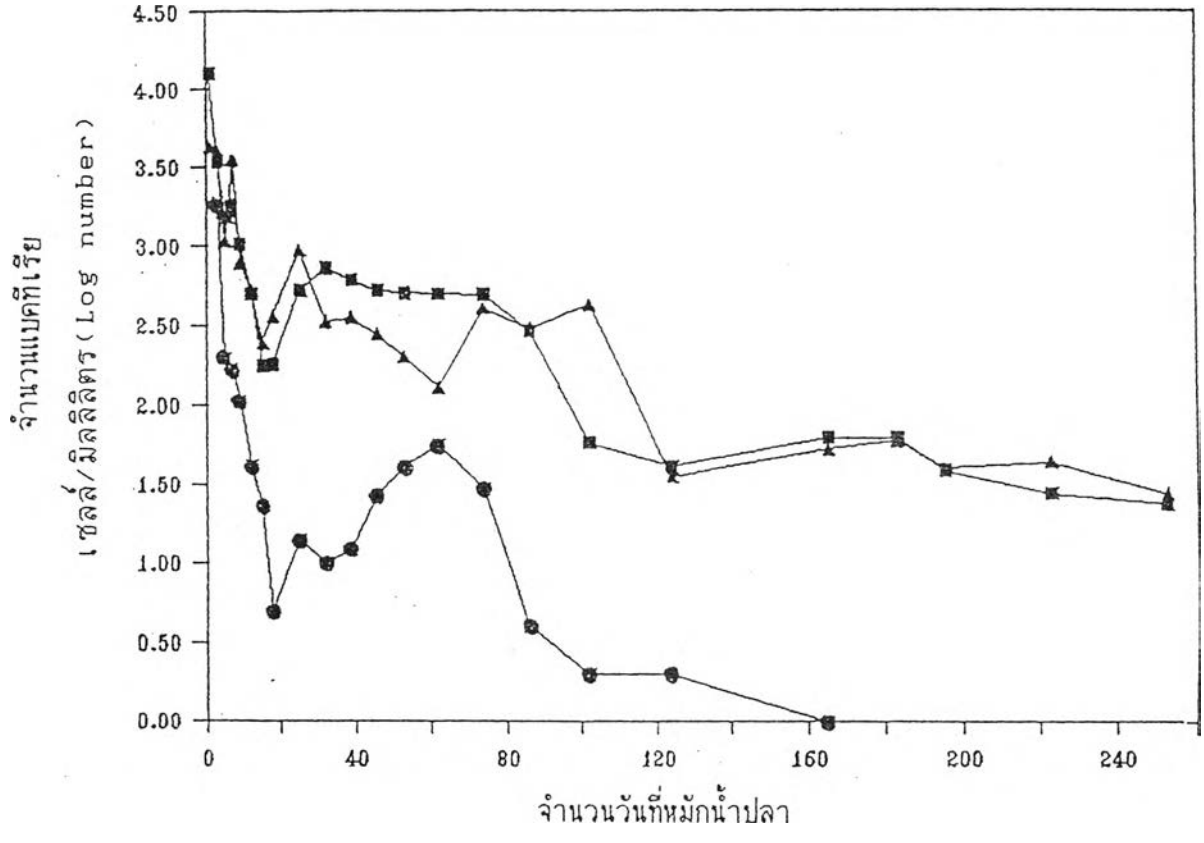
■ = แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone yeast extract agar ไม่เติมเกลือ

▲ = แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อTryptone yeast extract agar เติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์

● = แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อTryptone yeast extract agar เติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์

หมายเหตุ ปลายลูกศรชี้ กลุ่มเชื้อโคโลนีสีแดงซึ่งเป็นกลุ่มที่พบมากเริ่มปรากฏ

รูปที่ 5 แสดงการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียพวกรูปแท่ง (Rod) แกรมบวก (R^+) ในช่วงระยะเวลา 253 วันของกระบวนการหมักน้ำปลา

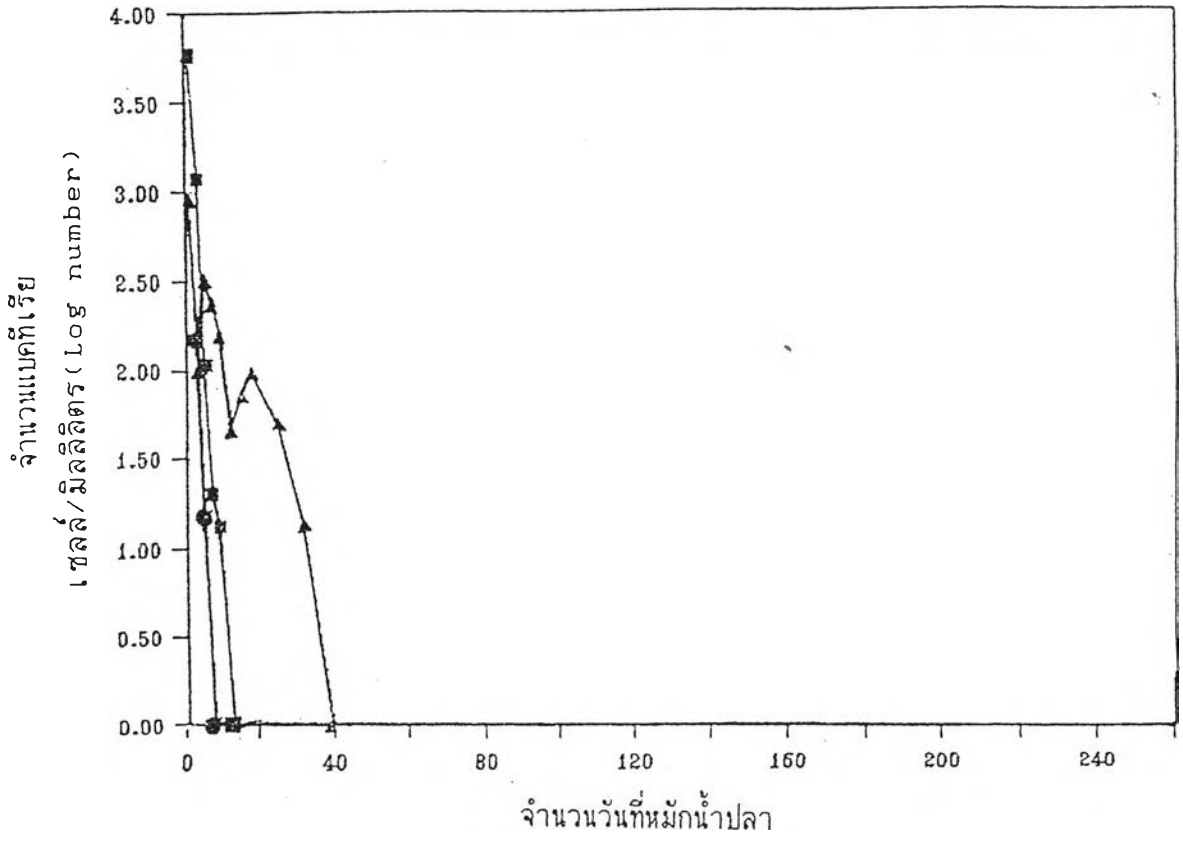


■ = แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone yeast extract agar ไม่เติมเกลือ

▲ = แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อTryptone yeast extract agar เติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์

● = แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อTryptone yeast extract agar เติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์

รูปที่ 6 แสดงการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียพวกรูปแท่ง (Rod) แกรมลบ (R^-) ในช่วงระยะเวลา 253 วันของกระบวนการหมักน้ำปลา



■ = แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone yeast extract agar ไม่เติมเกลือ

▲ = แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อTryptone yeast extract agar เติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์

● = แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อTryptone yeast extract agar เติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์

เติมเกลือ 5เปอร์เซ็นต์ นั้นยังคงพบตลอดระยะเวลาในการหมักในปริมาณน้อย ในวันสุดท้ายของการหมักพบเพียง 24 และ 28 เซลล์/มิลลิลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือและเติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แบคทีเรีย R^+ ที่ยังคงพบตลอดระยะเวลาในการหมักในปริมาณค่อนข้างคงที่เหล่านี้เมื่อย้อมสปอร์ดูปรากฏว่าสร้างสปอร์ได้ทั้งสิ้น

แบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ(R^-) เป็นอีกพวกหนึ่งที่พบในถังหมักน้ำปลา พบว่าติดมากับปลาและเกลือในปริมาณค่อนข้างต่ำและตายลงอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในถังหมัก โดยเฉพาะพวกที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือและเติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์ จะหายไปในราววันที่ 9 และ 5 วันตามลำดับ (รูปที่ 6) ส่วนพวกที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ จะหายไปในช่วง 32 วัน เนื่องจากมีปริมาณน้อยและตายเร็วจึงไม่ควรจะมีความสำคัญในกระบวนการหมัก

จากผลดังกล่าวมาทั้งหมด ทำให้พอสรุปการเปลี่ยนแปลงชนิดของแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากน้ำปลาหมักในระยะเวลา 253 วันนี้ได้ว่า แบคทีเรียที่ติดมากับวัตถุดิบและพบในช่วง 2 สัปดาห์แรกของการหมักนั้นเป็นพวกที่ทนเค็มได้ไม่มากนักและส่วนใหญ่เป็นพวกรูปกลมแกรมบวก มีพวกรูปแท่งแกรมบวกและแกรมลบเล็กน้อย ซึ่งรูปแท่งแกรมบวกยังคงพบตลอดระยะเวลาในการหมักในปริมาณน้อยแต่ค่อนข้างคงที่ หลังจากแบคทีเรียเหล่านี้ลดจำนวนลงมากแล้วจะเกิดแบคทีเรียกลุ่มใหม่ขึ้นมาแทนที่ซึ่งเป็นกลุ่มที่ชอบเค็มสูงและสามารถเจริญเพิ่มจำนวนในถังหมักได้ ลักษณะโคโลนีเป็น สีแดง รูปร่างของเซลล์กลม(coccus)ติดสีแกรมบวก มัทนาและสมศักดิ์ (3) รายงานว่าระยะแรกของการหมักน้ำปลาจะพบแบคทีเรียรูปกลมมากกว่ารูปแท่ง กฤษดา(19)รายงานว่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ HMA เติมเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ มีแบคทีเรียมากที่สุดในวันแรกของการหมักคือ 1.46×10^3 เซลล์/มิลลิลิตรและจำนวนจะลดลงเรื่อยๆเมื่ออายุการหมักนานขึ้น แบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่เป็นพวกรูปกลม(coccus) ติดสีแกรมบวก โคโลนีกลม นูน มีทั้งสีขาว เหลือง ทึบแสง เป็นพวกที่ชอบเค็มปานกลาง (ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่พบในช่วง 18 วันแรก) ส่วนบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 25 เปอร์เซ็นต์ นั้นมีปริมาณแบคทีเรียมากที่สุดในช่วง 4 สัปดาห์ และจะลดจำนวนลงเมื่ออายุการหมักนานขึ้นแบคทีเรียที่ชอบเค็มสูงเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็น พวกรูปแท่งแกรมลบโคโลนีเล็กมาก กลม นูน สีแดงโปร่งแสง และพวกรูปกลม แกรมบวก โคโลนีเล็ก กลมนูนสีส้ม ชมพูทึบแสง

จากรายงานเหล่านี้ จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียที่พบในช่วงแรกนั้น ส่วนใหญ่เป็นพวกรูปกลม (coccus)และคาดว่าเป็นพวกที่ชอบเค็มปานกลาง ส่วนแบคทีเรียที่ชอบเค็มสูงได้แก่กลุ่มโคโลนีสีแดงพบในช่วงถัดมาเช่นเดียวกันแต่ส่วนใหญ่เป็นช่วงรูปแท่ง แกรมลบ ไม่ใช่รูปกลม แกรมบวกดังที่พบในการทดลองนี้ทั้งนี้เนื่องมาจากเป็นคนละการทดลองกัน วัตถุดิบที่ใช้ได้แก่ปลาและเกลือมาจากแหล่งที่แตกต่างกัน ดังนั้นทั้งชนิดและจำนวนของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาจึงแตกต่างกันไปแต่รูปแบบของการเปลี่ยนแปลงทั้งชนิดและจำนวนของแบคทีเรียที่พบในกระบวนการหมักนั้นเหมือนกัน คือเมื่อแบคทีเรียกลุ่มแรกที่ปนเปื้อนมาตายลงเป็นส่วนใหญ่แล้วจะมีกลุ่มแบคทีเรียที่ชอบเค็มสูงเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นมาแทนที่

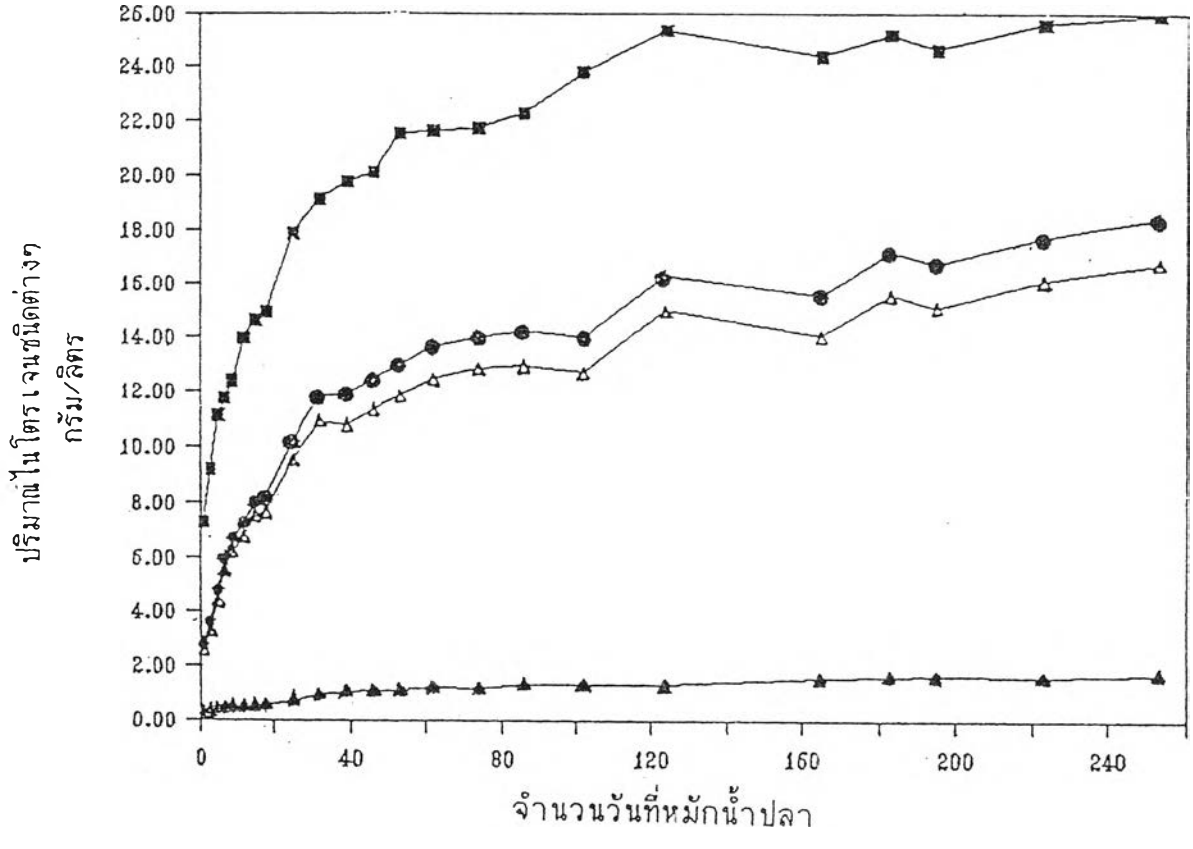
ข้อที่น่าสังเกตคือ แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือและเติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ นั้น ไม่ว่าจะเป็น C^+, R^+ หรือ R^- แต่ละชนิดจะมีจำนวนและลักษณะของการเปลี่ยนแปลง(pattern)ที่คล้ายกัน แต่ละชนิดของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือทั้ง 2 ระดับนี้มีความสัมพันธ์กันอย่างสูงที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นพวก R^- ที่ระดับ 5 เปอร์เซ็นต์(ภาคผนวก ค ตารางที่ 20) จึงเป็นข้อสนับสนุนที่ว่าแบคทีเรียที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือและเติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์น่าจะเป็นกลุ่มเดียวกัน โดยระดับความเข้มข้นของเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์นี้ อาจเป็นความเข้มข้นที่น้อยเกินไปที่จะทำให้เห็นความแตกต่างของเชื้อไปจากกลุ่มที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือ

3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในช่วงระยะ 253 วันแรกของกระบวนการหมักน้ำปลา

3.1. <u>การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด</u> (Total nitrogen)(รูปที่ 7) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ในน้ำปลาในช่วงระยะเวลาของการหมัก 253 วันพบว่ามีปริมาณเท่ากับ 25.94 กรัม/ลิตร ซึ่งสูงกว่าค่ามาตรฐานที่สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกำหนดไว้ให้มีค่าไม่ต่ำกว่า 20 กรัม/ลิตร (22) ในขณะที่ใช้เวลาเพียง 46 วัน ก็จะได้น้ำปลาที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 20 กรัม/ลิตรตามค่ามาตรฐาน

การเพิ่มปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดแบ่งได้เป็น 2 ระยะ คือระยะแรกตั้งแต่วันที่เริ่มหมักจนถึงประมาณวันที่ 53 อัตราการเพิ่มปริมาณเป็นไปอย่างรวดเร็วถึง 83 เปอร์เซ็นต์ ของค่าสูงสุดที่มี

รูปที่ 7 แสดงการเปลี่ยนแปลงของ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน แอมโมเนียคัลไนโตรเจน และไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน ในช่วงระยะเวลาการหมัก 253 วัน ของกระบวนการหมักน้ำปลา



■ = ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

● = ฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน

▲ = แอมโมเนียคัลไนโตรเจน

△ = ไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน

ในวันสุดท้ายของการหมัก คือเพิ่มจาก 7.29 เป็น 21.54 กรัม/ลิตรภายใน 53 วัน โดยเฉลี่ยเพิ่มขึ้นประมาณวันละ 0.27 กรัม/ลิตร การเพิ่มปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในระยะแรกนี้คาดว่าส่วนใหญ่เกิดจากกระบวนการย่อยตัวเองของเซลล์เนื้อปลา ในระยะนี้แบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาแต่แรกซึ่งส่วนใหญ่เป็นพวกที่ทนเค็มต่ำและจะตายลง การเพิ่มปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดระยะที่ 2 พบอยู่ในช่วงวันที่ 74 ถึง 124 โดยเพิ่มอย่างช้าๆจาก 21.74 เป็น 25.32 กรัม/ลิตรหรือเฉลี่ยประมาณวันละ 0.07 กรัม/ลิตร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Thongthai and Okada (48) ที่พบว่าการเปลี่ยนแปลงของ Total soluble nitrogen ระหว่าง 10 เดือนแรกของกระบวนการหมักน้ำปลานั้นมีการเพิ่มปริมาณเป็น 2 ระยะ โดยระยะแรกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่เริ่มหมักจนถึงประมาณ 28 ถึง 35 วัน จากนั้นจะเพิ่มอย่างช้าๆ อีกครั้งหนึ่งราววันที่ 140

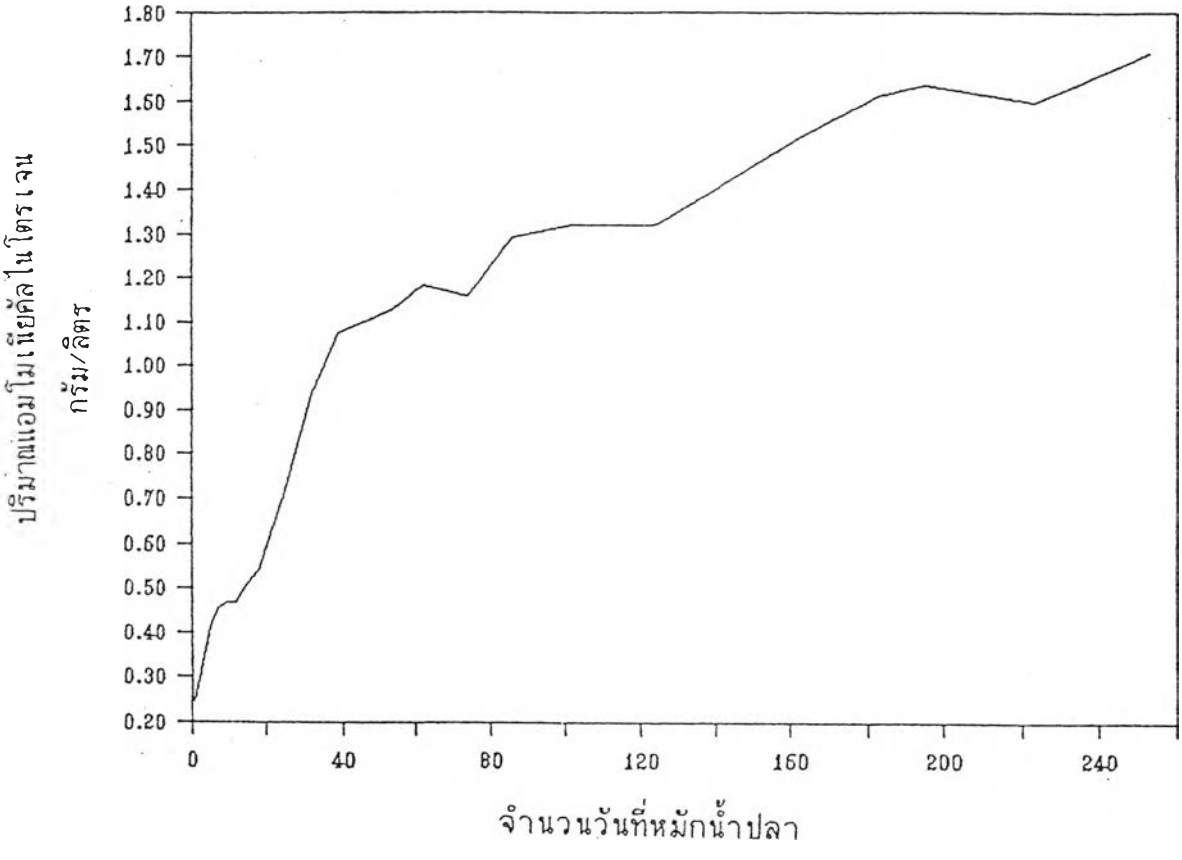
3.2. <u>การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน</u> (Amino acid nitrogen) (รูปที่ 7) ค่าสูงสุดของปริมาณไนโตรเจนในรูปของกรดอะมิโนจะพบในน้ำปลาหมักอายุ 253 วัน คือ 16.77 กรัม/ลิตร ซึ่งสูงกว่าค่ามาตรฐานของน้ำปลาตามที่สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกำหนดให้ (มีไม่ต่ำกว่า 10 กรัม/ลิตร)(22) พบว่าไนโตรเจนในรูปของกรดอะมิโนมีค่าสูงเท่ามาตรฐานกำหนดใช้เวลาเพียง 32 วันเท่านั้น ตามรูปที่ 7 จะเห็นว่ามีการเพิ่มปริมาณเป็น 2 ระยะเช่นกัน โดยระยะแรกตั้งแต่เริ่มหมักจนถึงประมาณวันที่ 53 เพิ่มขึ้น 71 เปอร์เซ็นต์ของค่าสูงสุดที่พบ โดยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 2.57 เป็น 11.86 กรัม/ลิตร หรือเฉลี่ยประมาณวันละ 0.18 กรัม/ลิตร การเพิ่มของปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนระยะนี้คงเป็นผลเนื่องมาจากการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์ในเนื้อปลาเองเป็นส่วนใหญ่จึงมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว การเพิ่มระยะที่ 2 อยู่ในช่วง 102 ถึง 124 วันโดยเพิ่มจาก 12.70 เป็น 15.00 กรัม/ลิตรหรือเฉลี่ยประมาณวันละ 0.10 กรัม/ลิตร หลังจาก 124 วันจนถึงสิ้นสุดการทดลองมีการเพิ่มปริมาณบ้างแต่ค่อนข้างน้อย เฉลี่ยประมาณวันละ 0.01 กรัม/ลิตร ข้อที่น่าสังเกตคือช่วงที่มีการเพิ่มจำนวนของทั้งปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณไนโตรเจนในรูปของกรดอะมิโนนี้เป็นระยะที่เชื้อกลุ่มสีแดงยังเจริญอยู่ และหลังจากที่เชื้อกลุ่มนี้เริ่มหายไปในราวประมาณวันที่ 124 การเพิ่มปริมาณของสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนทั้งสองชนิดมีบ้างแต่น้อยมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการตายของแบคทีเรียกลุ่มสีแดงทำให้มีการปลดปล่อยสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนในรูปแบบอื่นๆออกมา ขั้นตอนในการย่อยสลายโปรตีนนั้นเพียงระยะเวลา 124 วันหรือประมาณ 4 เดือนนี้น่าจะเพียงพอแล้ว เนื่อง

จากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนหลังจาก 124 วันไปแล้วค่อนข้างคงที่

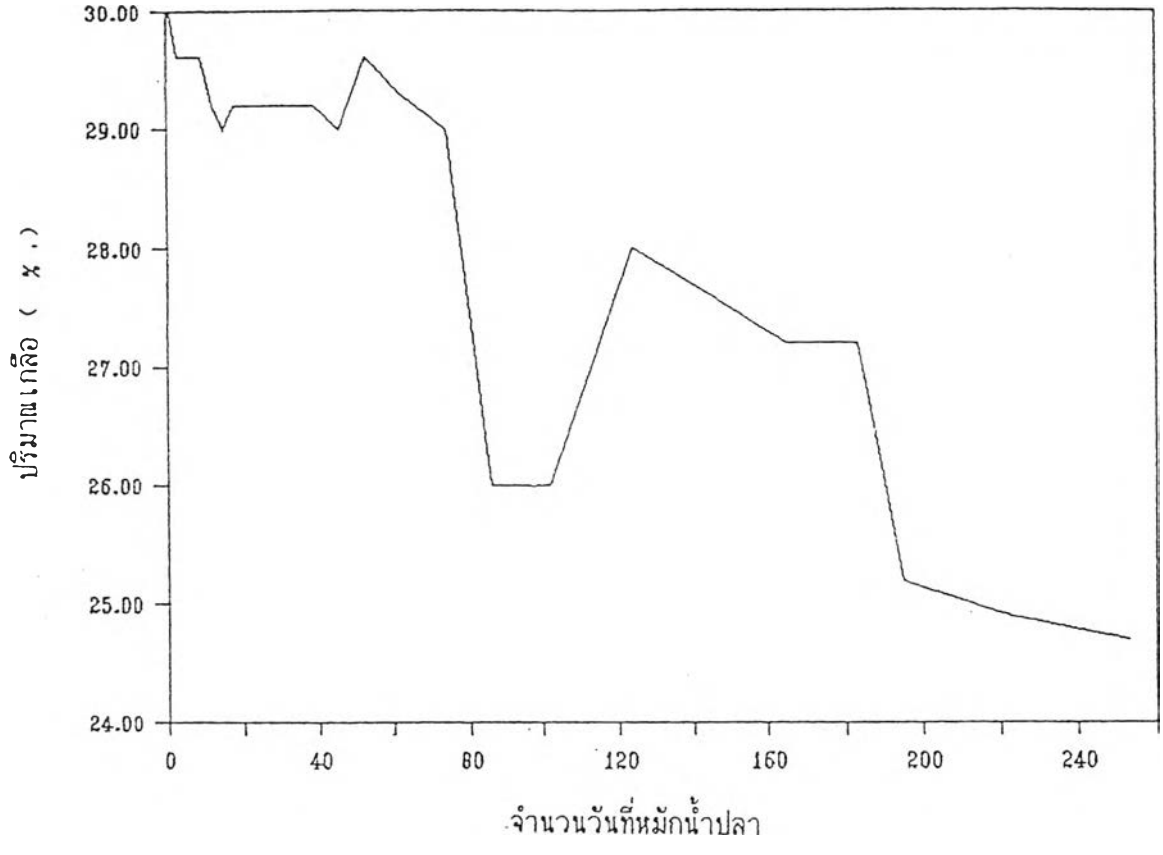
3.3. <u>การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียคัลไนโตรเจน</u> (Ammoniacal nitrogen)(รูปที่ 8)พบว่ามีการเพิ่มจำนวนเป็น 2 ระยะด้วยเช่นกัน ระยะแรกเพิ่มขึ้นด้วยอัตราที่รวดเร็วภายใน 39 วันแรกของกระบวนการหมักสูงถึง 63 เปอร์เซ็นต์ ของค่าสูงสุดที่พบคือเพิ่มจาก 0.25 เป็น 1.07 กรัม/ลิตรหรือเฉลี่ยประมาณวันละ 0.02 กรัม/ลิตร การเพิ่มของแอมโมเนียคัลไนโตรเจนอย่างรวดเร็วในระยะนี้คาดว่าเนื่องมาจากการย่อยสลายของเซลล์เนื้อปลาและจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมา การย่อยสลายของเซลล์เนื้อปลาโดยกระบวนการ ATP. degradation ทำให้ได้แอมโมเนียและน้ำตาลไรโบสและจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาบางชนิดสามารถสร้างแอมโมเนีย เอมีน และด่างที่ระเหยได้อื่นๆ (29) ช่วง 39 ถึง 124 วันการเพิ่มของแอมโมเนียคัลไนโตรเจนน้อยมาก เฉลี่ยประมาณวันละ 0.002 กรัม/ลิตร การเพิ่มระยะที่ 2 อยู่ในช่วงวันที่ 124 ถึง 195 วัน แอมโมเนียคัลไนโตรเจนจะสูงขึ้นอีกครั้งหนึ่ง(รูปที่ 8)โดยเพิ่มเฉลี่ยประมาณวันละ 0.004 กรัม/ลิตร จะเห็นได้ว่าในช่วงที่แบคทีเรียกลุ่มโคโลนีสีแดงกำลังเจริญสูงสุดนั้นการเพิ่มของแอมโมเนียคัลไนโตรเจนค่อนข้างน้อย แต่เมื่อแบคทีเรียกลุ่มนี้เริ่มตายไปแอมโมเนียคัลไนโตรเจนในถังหมักกลับสูงขึ้นอีกครั้งหนึ่งแต่ไม่มากนัก อาจเป็นไปได้ว่าเนื่องมาจากการย่อยสลายของเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ซึ่งก็อาจเป็นเหตุให้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนมีการเพิ่มปริมาณขึ้นบ้างเล็กน้อยเช่นกัน

3.4. <u>การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเกลือในกระบวนการหมัก</u> (รูปที่ 9) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 30.0 ถึง 24.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าค่ากำหนดมาตรฐานของน้ำปลาซึ่งกำหนดให้มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ไม่น้อยกว่า 230 กรัม/ลิตร หรือ 23 เปอร์เซ็นต์(22) โดยปริมาณเกลือจะมีค่าสูงสุดในวันที่ 1 ของการหมัก ความเข้มข้นจะเปลี่ยนแปลงขึ้นลงบ้างแต่มีแนวโน้มในทางลดลงตลอดเวลาจนวันสุดท้ายของการหมักจะมีความเข้มข้นต่ำสุดคือ 24.7 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากเกิดการออสโมซิสของเกลือเข้าไปในตัวปลา ขณะเดียวกันน้ำและของเหลวภายในจะซึมออกมาภายนอกตัวปลา และเป็นผลมาจากการย่อยสลายเนื้อปลาซึ่งเป็นของแข็งเช่นโปรตีนและไขมันให้เป็นสารประกอบที่ละลายได้จึงทำให้ความเข้มข้นของเกลือในน้ำปลาลดต่ำลงเรื่อยๆ จะเห็นได้ว่าจากวันที่ 1 ถึง 74 ความเข้มข้นของเกลือเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 30 ถึง 29 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 86

รูปที่ 8 แสดงการเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียคัลไนโตรเจนในช่วงระยะเวลา 253 วันของกระบวนการหมักน้ำปลา



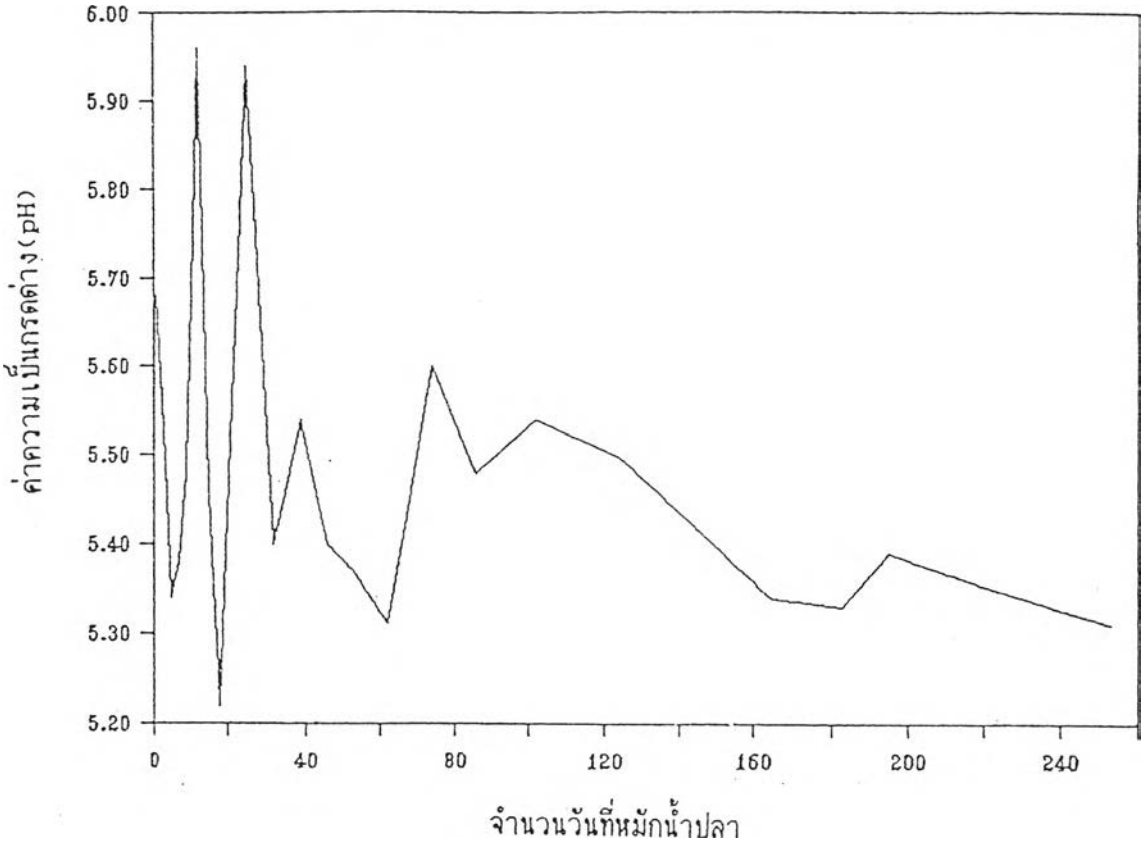
รูปที่ 9 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเกลือในช่วงระยะเวลา 253 วันของกระบวนการหมักน้ำปลา



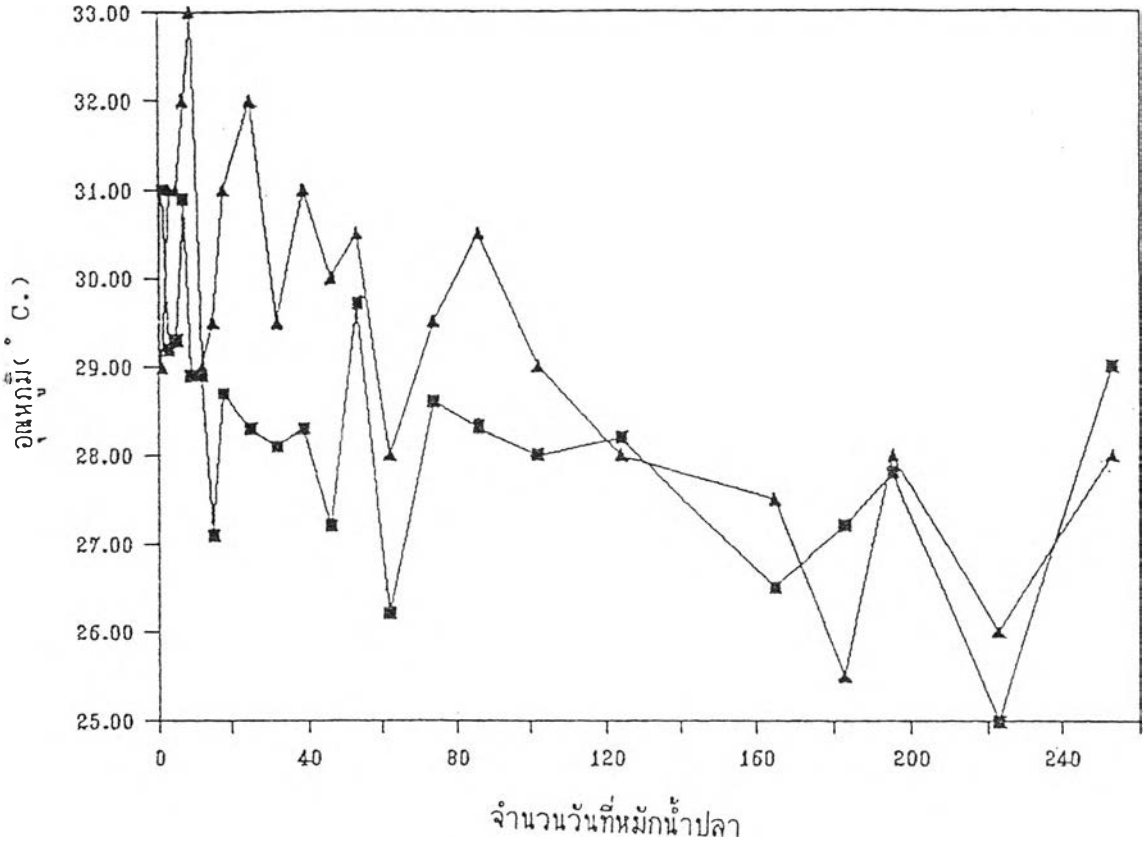
หลังจากหมัก ความเข้มข้นของเกลือจะลดลงอย่างเห็นได้ชัด จาก 29 เปอร์เซ็นต์ลดลงเหลือ 26 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นระยะที่ใกล้เคียงกับระยะที่แบคทีเรียกลุ่มลิแดงกำลังเจริญสูงสุด ทำให้คาดหมายว่าในช่วงระยะเวลา 86 นี้ผนังเซลล์ของเนื้อปลาส่วนใหญ่ถูกทำลายโดยทั้งจากเอนไซม์ภายในตัวปลาเองและจากแบคทีเรียดังกล่าวทำให้ของเหลวภายในเซลล์ไหลออกมามากรวมทั้งโปรตีน ซึ่งเป็นส่วนที่เป็นของแข็งของตัวปลาถูกย่อยไปเป็นโปรตีนที่ละลายได้เป็นส่วนใหญ่แล้ว (จากรูปที่ 7 จะเห็นได้ว่าระยะนี้ทั้งปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนมีค่าเกือบสูงสุดแล้ว) เป็นเหตุให้ความเข้มข้นของเกลือลดต่ำลงอย่างเห็นได้ชัด ในช่วง 102 ถึง 124 วันความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นอีกครั้งหนึ่งจาก 26 เปอร์เซ็นต์เป็น 28 เปอร์เซ็นต์นั้น อาจเป็นเพราะว่าของเหลวที่ออกมานั้นไปละลายผลึกเกลือซึ่งมีมากเกินพอและยังไม่ละลายให้ละลายออกมาอีก เป็นเหตุให้ความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้น หลังจาก 124 วันไปแล้วปริมาณเกลือมีแนวโน้มลดลงทีละน้อยจนถึง 24.7 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 253 ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนที่ยังคงเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยเช่นกัน ซึ่งพบว่าความสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณเกลือกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนนี้มีความสัมพันธ์เป็นแบบตรงกันข้ามที่ระดับความเชื่อมั่นสูง (ภาคผนวก ค ตารางที่ 19)

3.5. <u>การเปลี่ยนแปลงของค่าเป็นกรดด่างของน้ำปลาในกระบวนการหมัก</u> (pH) (รูปที่ 10) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 5.22 - 5.96 และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.47 กฤษดา(19) ศึกษา pH ของน้ำปลาในช่วง 16 สัปดาห์ พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 5.45 - 5.75 หรือมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.60 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมที่กำหนดมาตรฐานของน้ำปลาแท้ให้มีค่าความเป็นกรดด่าง(pH)อยู่ระหว่าง 5.0 - 6.0 (22) ค่า pH ของน้ำปลาในวันแรกของการหมักคือ 5.68 จะลดลงและเพิ่มขึ้นอยู่ตลอดระยะเวลา 86 วันจะเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 5.22 - 5.96 (รูปที่ 10) ค่า pH เปลี่ยนแปลงขึ้นลงในช่วงแรกนี้อาจเนื่องจากการปลดปล่อยกรดอะมิโนอิสระและแอมโมเนียจากกระบวนการย่อยตัวเองของปลา จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาบางชนิดสามารถสร้างกรดทั้งที่ระเหยได้และระหยไม่ได้ แอมโมเนีย เอมีนและด่างที่ระเหยได้อื่นๆ หลังจาก 102 วันไปแล้วจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ตายลง pH มีแนวโน้มค่อยลดลงทีละน้อยจนถึง 5.31 ในวันที่ 253 คาดว่ายังมีการปลดปล่อยกรดอะมิโนออกมาอีกบ้างเล็กน้อยและการเกิดกรดอินทรีย์อื่นๆ เช่น กรดแลคติคจากเมตะโบไลท์ของจุลินทรีย์พวกที่ทนเค็มได้(36,45,59,76) โดยมีความสัมพันธ์แบบ

รูปที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ในช่วงระยะเวลา 253 วันของกระบวนการหมักน้ำปลา



รูปที่ 11 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิทั้งภายนอกและภายในถังหมักในช่วงระยะเวลา 253 วัน ของกระบวนการหมักน้ำปลา



■ = อุณหภูมิภายนอกถังหมัก

▲ = อุณหภูมิภายในถังหมัก

ตรงกันข้ามกับปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนแต่ไม่มีนัยสำคัญ

3.6. <u>การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิตลอดระยะเวลาในการหมัก</u> (รูปที่ 11) ความแตกต่างของอุณหภูมิภายในถังหมักและภายนอกถังหมัก จะมีความแตกต่างกันมากในช่วง 124 วัน ในช่วงนี้อุณหภูมิภายในถังหมักจะสูงกว่าภายนอกถังหมักตลอดเวลา(ยกเว้นในวันที่ 1) ซึ่งเฉลี่ยประมาณ 1.95 °C. เป็นค่าที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค ตารางที่ 21) หลังจาก 124 วันไปแล้ว อุณหภูมิภายนอกและภายในถังหมักมีค่าใกล้เคียงกันมากโดยภายในถังหมักจะต่ำกว่าภายนอกถังหมักเล็กน้อยเฉลี่ยประมาณ Ø.1 °C. ซึ่งความแตกต่างนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ(ภาคผนวก ค ตารางที่ 21) ทั้งนี้เนื่องจากในช่วงแรกของกระบวนการหมักนั้นจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาเป็นจำนวนมากมายต่างก็มีกิจกรรมต่างๆรวมทั้งการย่อยตัวเอง(Autolysis)ของปลาทำให้มีการปลดปล่อยพลังงานออกมามาก เป็นผลให้อุณหภูมิภายในถังหมักสูงเมื่อกิจกรรมต่างๆหมดไปอุณหภูมิภายในถังหมักจึงไม่ต่างจากภายนอก ข้อที่น่าสังเกตคือ ช่วงที่อุณหภูมิไม่มีความแตกต่างกันนั้นตรงกับช่วงที่แบคทีเรียกลุ่มที่มีโคโลนีสีแดงเริ่มหายไปจากถังหมัก

3.7 <u>การเปลี่ยนแปลงปริมาณของกรดอะมิโนอิสระทั้งหมด</u> (Total free amino acid) รูปที่ 12 ตารางที่ 12)

ผลจากการหมักน้ำปลาไส้ตันในครั้งนี้พบกรดอะมิโนประมาณ 17 ชนิดได้แก่ กรดแอสปาร์ติค กรดกลูตามิค เซรีน ไกลซีน ฮิสติดีน อาร์จินีน ธรีโอนีน อะลานีน โปรลีน ไทโรซีน เวลีน ซิสเตอีน เมไธโอนีน ไอโซลูซีน ลูซีน เฟนิลอะลานีน และไลซีน โดยกรดอะมิโนที่พบปริมาณมากได้แก่ ไลซีน กรดกลูตามิค และอะลานีน ในขณะที่พวกที่พบในปริมาณค่อนข้างน้อยได้แก่ ซิสเตอีน และไทโรซีน (38)พบว่ากรดอะมิโนชนิดที่มีปริมาณมากที่พบในน้ำปลาได้แก่ เมไธโอนีน ไลซีน และฮิสติดีน ชนิดที่มีปริมาณน้อยได้แก่ ซิสเตอีน และ เซรีน ความแตกต่างนี้ควรขึ้นอยู่กับโปรตีนเนื้อปลาที่นำมาใช้ทำน้ำปลา (Originated protein)

ปริมาณกรดอะมิโนอิสระรวมทั้งหมดที่พบในวันแรกของการหมักมีค่าเท่ากับ 16.Ø7 กรัม/ลิตร และเพิ่มขึ้นสูงสุดเป็น 453.77 กรัม/ลิตรในวันที่ 165 ของการหมัก จากรูปที่ 12 และ

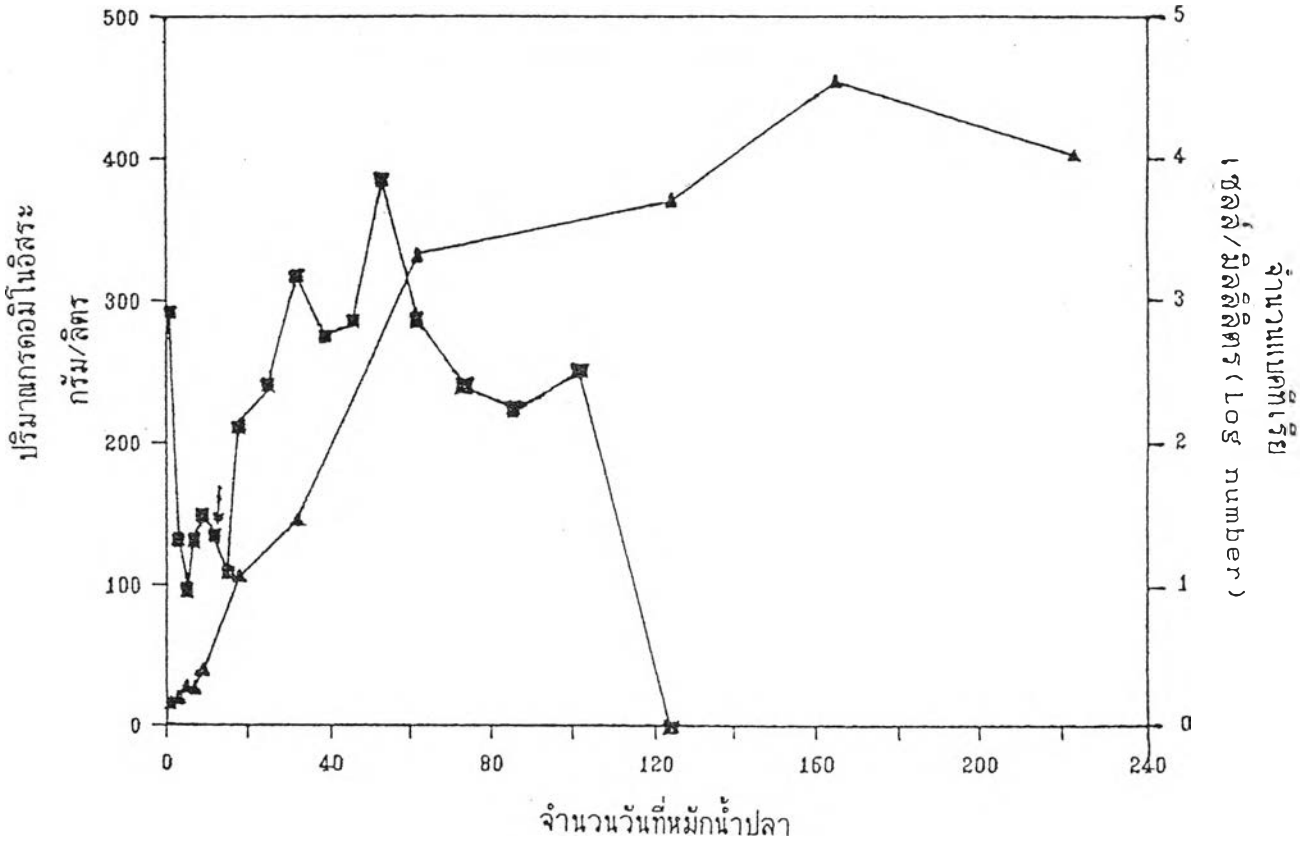
ตารางที่ 12 พบว่ามีการเพิ่มปริมาณของกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดเป็น 3 ระยะ ระยะแรกคือช่วง 1 ถึง 9 วันโดยเพิ่มจาก 16.07 เป็น 39.85 กรัม/ลิตรหรือเฉลี่ยเพิ่มขึ้นประมาณวันละ 2.64 กรัม/ลิตร ระยะที่ 2 คือช่วง 9 ถึง 62 วันโดยเพิ่มจาก 39.85 เป็น 332.63 กรัม/ลิตรหรือเฉลี่ยประมาณวันละ 5.52 กรัม/ลิตร ระยะที่ 3 คือช่วงวันที่ 62 ถึง 223 โดยเพิ่มจาก 332.63 เป็น 402.94 กรัม/ลิตรหรือเฉลี่ยประมาณวันละ 0.44 กรัม/ลิตร

เมื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดอะมิโนรวมที่ปลดปล่อยออกมาสู่น้ำปลากับชนิดของแบคทีเรียที่พบในเวลานั้นๆ พบว่าในช่วง 1 ถึง 9 วัน อัตราการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนค่อนข้างต่ำ คือประมาณวันละ 2.64 กรัม/ลิตร แต่แบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาในช่วงนี้มีจำนวนค่อนข้างสูงซึ่งส่วนใหญ่เป็นพวกไม่ชอบเค็มจะตายลงอย่างรวดเร็ว มีความสัมพันธ์แบบตรงกันข้ามกับกรดอะมิโนอิสระแต่ไม่มีนัยสำคัญ(ภาคผนวก ค ตารางที่ 22) จึงอาจไม่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนในช่วงนี้

ตารางที่ 12 แสดงปริมาณกรดอะมิโนอิสระและอัตราการเพิ่มปริมาณเฉลี่ยต่อวัน ในช่วงระยะเวลา 223 วันของการหมัก

ช่วงวันที่	ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (กรัม/ลิตร)	อัตราเพิ่มเฉลี่ยต่อวัน (กรัม/ลิตร)
1 - 9	16.07 - 39.85	2.64
9 - 62	39.85 - 332.63	5.52
62 - 223	332.63 - 402.94	0.44

รูปที่ 12 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอะมิโนอิสระ โดยเปรียบเทียบกับจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคโลนีสีแดงชอบเค็ม ที่พบกระบวนการหมักน้ำปลา



■ = แบคทีเรียกลุ่มโคโลนีสีแดง

▲ = ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ

ช่วง 9 ถึง 18 วัน เป็นช่วงที่แบคทีเรียส่วนใหญ่ตายลงเกือบหมด ถึงแม้ว่าแบคทีเรียชอบเค็มโคโลนีสีแดงที่สร้างโปรติเอสได้จะเกิดขึ้นแล้ว แต่มีจำนวนน้อยมากคือ ประมาณ 12 เซลล์/มิลลิลิตรในวันที่ 18 แต่ปรากฏว่าช่วงนี้การเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดอะมิโนอิสระมีอัตราสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเฉลี่ยประมาณวันละ 5.52 กรัม/ลิตร การเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนอิสระในช่วงนี้จึงไม่ควรเกี่ยวข้องกับแบคทีเรียกลุ่มโคโลนีสีแดง แต่อาจเนื่องมาจากช่วงนี้ผนังช่องท้องของปลาเริ่มแตกจึงทำให้เอนไซม์ภายในช่องท้องรวมทั้งกรดอะมิโนซึ่งเกิดจากการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์ภายในอยู่ก่อนแล้วละลายออกสู่ของเหลวภายนอกตัวปลา จึงทำให้พบว่าปริมาณกรดอะมิโนอิสระสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงนี้ แต่ภายนอกตัวปลานั้นความเข้มข้นของเกลือสูงประมาณ 29.2 เปอร์เซ็นต์ซึ่ง Tagahashi(27)รายงานว่าประสิทธิภาพของเอนไซม์จากกระเพาะจะลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ในที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง 20 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นอัตราการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนควรจะลดลงตามลำดับเมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้น(รูปที่ 12 กราฟของกรดอะมิโนอิสระควรจะลดลงตามลำดับ) แต่ปรากฏว่า(จากรูปที่ 12)การเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนในอัตราที่ค่อนข้างสูงนี้ยังคงดำเนินต่อไปจนถึงวันที่ 62 ซึ่งระยะ 32 ถึง 62 วันเป็นระยะที่แบคทีเรียกลุ่มโคโลนีสีแดงชอบเค็มซึ่งสร้างโปรติเอสได้กำลังมีการเจริญเพิ่มจำนวนอย่างสูง(เป็นระยะ Log phase ของแบคทีเรีย , รูปที่ 12) และหลังจาก 62 วันไปแล้วแบคทีเรียกลุ่มนี้เริ่มลดจำนวนลงและหายไปหลังจากวันที่ 124 ขณะเดียวกันอัตราการเพิ่มของกรดอะมิโนก็ลดลงอย่างเห็นได้ชัดคืออัตราการเพิ่มจำนวนลดลงเหลือประมาณวันละ 0.44 กรัม/ลิตร จึงอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มีส่วนช่วยให้มีการปลดปล่อยกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้นในช่วงที่มันเกิดขึ้น เมื่อหาค่าสหสัมพันธ์(r)ระหว่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ในช่วงที่เริ่มปรากฏจนมีจำนวนสูงสุดกับปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.9501* ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จึงช่วยให้มั่นใจว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มีส่วนช่วยในการปลดปล่อยกรดอะมิโนอิสระในช่วงดังกล่าว

4. การคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มที่สร้างโปรติเอสได้ดีที่สุด

แบคทีเรียชอบเค็มสูงและสามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ในถังหมักได้แก่แบคทีเรีย กลุ่มที่มีโคโลนีสีแดง แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีอยู่ 4 ลักษณะ คือ พวกที่มีโคโลนีสีแดงให้เป็นเชื้อ Isolate 1 สีแดงอมชมพูให้เป็นเชื้อ Isolate 2 สีส้มเส้นผ่าศูนย์ของโคโลนีกลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตรให้เป็นเชื้อ Isolate 3 และสีส้มเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 2 มิลลิเมตรให้เป็นเชื้อ Isolate 4 ผลการมาทดสอบการสร้างโปรติเอสและเจลลาติเนส ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ของ Isolate ทั้ง 4 ได้แสดงไว้ในตารางที่ 13

แบคทีเรีย Isolate 1 เป็นเชื้อที่มีความสามารถย่อยเจลลาตินได้ดีกว่าตัวอื่นนอกจากนี้ยังสามารถย่อย Skim milk ได้ด้วยจึงได้คัดเลือกเชื้อ Isolate 1 เพื่อใช้ในการทดลองข้อที่ 5 จากการศึกษาลักษณะอื่นๆของเชื้อนี้พบว่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ HMA เติมเกลือ 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเชื้อที่มีลักษณะโคโลนี กลม นูนเล็กน้อย ขอบเรียบค่อนข้างโปร่งแสง เซลล์รูปร่างกลม(coccus) เกาะกันเป็นกลุ่มไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ เมื่อย้อมแกรมจะติดสีม่วงแดงจึงจัดให้อยู่ในกลุ่มแกรมบวก บนอาหารเลี้ยงเชื้อ HMA เติมเกลือ 25 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 38 - 40 °C.จะเจริญให้เห็นเป็นโคโลนีภายใน 5 วัน คุณสมบัติอื่นๆดังในตารางที่ 13 ซึ่งลักษณะดังกล่าวใกล้เคียงกับลักษณะของแบคทีเรียในสกุล Halococcus ได้แก่ *H. morrhuae* ตาม Bergey mannual of systematic bacteriology Vol.1 (67) บรรยายว่าแบคทีเรียในสกุล Halococcus เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่างกลมอยู่กันเป็นคู่ สี่เซลล์ ลูกบาศก์ หรือเป็นกลุ่มไม่สร้างสปอร์ไม่เคลื่อนที่ ต้องการออกซิเจน(Strictly aerobe) โคโลนีมีสีแดงถึงส้ม คาตาเลส ออกซิเดสเป็นบวก ต้องการเกลือไม่ต่ำกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 20 - 26 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาของการแบ่งเซลล์ประมาณ 14 ชั่วโมงติดสีแกรมลบซึ่งเป็นลักษณะที่แตกต่างไปจากที่พบ แต่ Breed et.al.(77)จัดให้เป็น *Sarcina literalis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมเปลี่ยนแปลงแต่มักพบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ นอกจากนี้ *H. morrhuae* ยังเป็นพวกที่ต้องการกรดอะมิโนเป็นแหล่งพลังงานไม่ให้กรดและแก๊สจากการใช้กลูโคส สามารถรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์จากไธโอซัลเฟตและซิสเตอีน ยูรีเอสเป็นลบ บางสายพันธ์สร้างอินโดล ย่อยเจลลาติน และแบ้งได้ ได้นำลักษณะบางลักษณะของ *H. morrhuae* แสดงเปรียบเทียบกับลักษณะของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี บางประการของเชื้อแบคทีเรีย isolate 1,2,3 และ 4 ที่แยกได้จากน้ำปลา

ลักษณะบางประการแบคทีเรีย	Isolate 1	Isolate 2	Isolate 3	Isolate 4	H.morrhuae(67)
โปรติเอส	1.5*	1.5*	-	-	
เจลลาติเนส	6.0*	2.0*	1.0*	3.0*	บางสายพันธุ์
รูปร่างของเซล	รูปกลม	รูปกลม	รูปกลม	รูปกลม	รูปกลม
การติดสีแกรม	+	+	+	+	-
เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี	1-1.5 มม.	1-1.5 มม.	1 มม.	2-2.5 มม.	
สีของโคโลนี	แดง	แดงอมชมพู	ส้ม	ส้ม	สีแดง ส้ม ชมพู
คาตาเลส	+	+	+	+	+
ออกซิเดส	+	+	+	+	+
ยูรีเอส	-	-	-	-	-
ไลเปส	-	-	-	-	
อะไมเลส	-	-	-	-	บางสายพันธุ์
การทดสอบ O/F	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
การรีดิวส์ไนเตรท	-	-	-	-	+
อินโดล	-	-	+	+	+
MR/VP	-/-	-/-	-/-	-/-	
การสร้าง NH_3 จากอาร์จินีน	-	+	+	+	
การใช้ซิเตรท	-	-	-	-	
TSI/TGA	-/-	-/-	-/-	-/-	
การเกิดกรดจากการใช้น้ำตาลทุก	ทุก Isolate ไม่ให้กรดจากการใช้น้ำตาลทุกชนิด				ไม่ให้กรดกับกลูโคส

หมายเหตุ * อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสและเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี

5. การนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาเพิ่มจำนวนและหมักกับปลาโดยเปรียบเทียบการย่อยเนื้อปลากับการหมักตามธรรมชาติ

จากการทดลองหมักน้ำปลาโดยเติมเชื้อลงไปเปรียบเทียบกับการหมักตามธรรมชาตินี้ทั้งในโหลควบคุมและโหลที่เติมเชื้อใช้ปลาและเกลือจากแหล่งเดียวกันในอัตราส่วนเท่ากันคือ ปลา 750 กรัม : เกลือ 250 กรัม หมักในโหลหมักขนาดเดียวกัน โดยโหลที่เติมเชื้อจะเติมเชื้อ Isolate 1 ในรูปของเซลล์เปียกจำนวน 1 กรัม หรือประมาณ 3.37×10^{12} เซลล์/มิลลิลิตร ใช้เวลาหมัก 73 วัน ตลอดระยะเวลาในการหมักได้ตรวจสอบและเปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน ปริมาณแอมโมเนียคัลไนโตรเจน ค่าความเป็นกรดด่าง(pH) ปริมาณเกลือ และปริมาณเชื้อทั้งหมด ได้ผลดังแสดงไว้ในตารางที่ 14 และในภาคผนวก ค ตารางที่ 23,24,25

ความแตกต่างของสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนต่างๆ ระหว่างโหลควบคุมและโหลที่ใส่เชื้อเริ่มเห็นได้ชัดในราว 14 ถึง 20 วันเป็นต้นไป เมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 73 พบว่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน และแอมโมเนียคัลไนโตรเจน ในโหลควบคุมมีค่าเท่ากับ 15.72, 7.29 และ 4.16 กรัม/ลิตรตามลำดับ ส่วนในโหลที่เติมเชื้อมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนและแอมโมเนียคัลไนโตรเจนเท่ากับ 16.61, 7.50 และ 3.78 กรัม/ลิตรตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้ t - test (ตารางที่ 14) พบว่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนในโหลที่เติมเชื้อมีค่าสูงกว่าโหลควบคุมเฉลี่ยเท่ากับ 0.28 และ 0.22 กรัม/ลิตรที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า มีหนทางเป็นไปได้ ที่จะนำเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติชอบเค็มสูง และสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้เหล่านี้ เติมลงไปในถังหมักเพื่อช่วยลดระยะเวลาในการหมักให้สั้นลง ส่วนปริมาณแอมโมเนียคัลไนโตรเจนนั้น พบว่า ในโหลควบคุมมีค่าสูงกว่าในโหลที่เติมเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 0.1205 กรัม/ลิตร ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่ทำให้ค่า pH มีความแตกต่างกันในทางสถิติ (ตารางที่ 14) เชื้อกลุ่มโคโลนีสีแดงเหล่านี้อาจเกี่ยวข้องกับการหายไปของแอมโมเนีย

ตารางที่ 14 แสดงความแตกต่างเฉลี่ยของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ,ไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน , แอมโมเนียคัลไนโตรเจน ,ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ,ปริมาณเกลือ และเชื้อในโหลควบคุมและโหลที่เติมเชื้อ Isolate 1

รายการ	ค่าความแตกต่างเฉลี่ย
1. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด	+ 0.2827** กรัม/ลิตร
2. ปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน	+ 0.2185** "
3. ปริมาณแอมโมเนียคัลไนโตรเจน	- 0.1205** "
4. pH	+ 0.0138^{NS} "
5. ปริมาณเกลือ	- 0.0729^{NS} "
6. ปริมาณเชื้อทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 25 เปอร์เซ็นต์	+ 4.00 x 108 * เซลล์/มล.
7. ปริมาณเชื้อเฉพาะกลุ่มที่มีโคโลนีสีแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 25 %	+ 3.42 x 108 * เซลล์/มล.

+ = โหลเติมเชื้อ > โหลควบคุม

- = โหลเติมเชื้อ < โหลควบคุม

* = ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

** = ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

^{NS} = ไม่มีนัยสำคัญ

หมายเหตุ ตารางที่ 14 นี้ได้จากการคำนวณโดยใช้ข้อมูลจากตารางที่ 25 ในภาคผนวก ค)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อทั้งหมดที่พบในโหลหมักทั้ง 2 (ตารางที่ 14) พบว่าในโหลที่เติมเชื้อมีปริมาณเชื้อสูงกว่าในโหลควบคุมจริง โดยปริมาณเชื้อทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 25 เปอร์เซ็นต์ ในโหลเติมเชื้อมีมากกว่าในโหลควบคุมเฉลี่ย 4.0×10^{8} เซลล์/ลิตร ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ หรือเฉพาะปริมาณเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีเป็นสีแดงเท่านั้นในโหลที่เติมเชื้อมีมากกว่าในโหลควบคุมเท่ากับ 3.42×10^{8} เซลล์/ลิตร ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ข้อที่น่าสังเกตคือแม้ว่าความแตกต่างของเชื้อจะต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น แต่ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนกลับมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

เมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของเกลือในโหลหมักทั้งสอง (ตารางที่ 14 รูปที่ 16) พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ไม่มีความผิดพลาดอันเนื่องมาจากความเข้มข้นของเกลือไม่เท่ากัน

ข้อที่น่าสังเกตคือ ในการหมักเพื่อเปรียบเทียบในครั้งนี้ ใช้ปลาหมักกับเกลือเพียง 1 กิโลกรัมเพราะฉะนั้นสภาพของโหลหมักจึงค่อนข้างจะเป็น Aerobe และเชื้อกลุ่มสีแดงดังกล่าวมีการเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีมากจนกระทั่งเห็นเนื้อปลาเป็นสีแดงอย่างชัดเจน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อชนิดนี้เป็นพวกที่ชอบออกซิเจนจึงเจริญเพิ่มจำนวนได้สูงมาก จำนวนของเชื้อที่พบในทั้ง 2 โหลมีมากถึง 10^{9} เซลล์/ลิตรซึ่งเป็นจำนวนที่หนาแน่นมา