

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเพื่อคัดแยกแบคทีเรียจากดินบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่สามารถในเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไนโตรเจนความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ได้จำนวน 6 สายพันธุ์ และเมื่อทำการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียดังกล่าว พบว่าเป็นแบคทีเรียอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* spp. จำนวน 5 ชนิด โดยมีลักษณะแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน มีสปอร์ ได้แก่ *Bacillus. polymyxa*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. megaterium* และ *B. thuringiensis* (หรือ *B. cereus*) ส่วนอีก 1 ชนิด เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนสั้น จัดอยู่ในกลุ่ม *Oceanisphaera* sp. (หรือชื่อเดิมคือ *Pseudomonas doudoroffii*)

จากผลการทดลองศึกษาประสิทธิภาพการลดไนเตรต ในไนโตรเจน แอมโมเนียและฟอสเฟต ที่มีการใช้น้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยแบคทีเรียผสม 6 ชนิด จากการเปรียบเทียบกัน 3 ชุดการทดลอง คือ ชุดทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมลงไป ชุดควบคุมแบบไม่ใส่เชื้อ และชุดควบคุมแบบฆ่าเชื้อในระยะเวลาการทดลอง 7 วัน (ภาพที่ 8 - 11) ชุดทดลองที่ได้เติมแบคทีเรียผสมลงไปมีความสามารถในการลดความเข้มข้นไนเตรต ในไนโตรเจนและฟอสเฟตได้ดีกว่าชุดควบคุมแบบไม่ใส่เชื้อและชุดควบคุมแบบฆ่าเชื้อ โดยความเข้มข้นของสารดังกล่าวมีเปอร์เซ็นต์การลดลง (ตารางที่ 10) ที่มากกว่า ยกเว้นแอมโมเนียที่เปอร์เซ็นต์การลดลงในชุดทดลองเท่ากับชุดควบคุมแบบไม่ใส่เชื้อ

ผลทดลองศึกษาประสิทธิภาพการลดไนเตรต ในไนโตรเจน แอมโมเนียและฟอสเฟต ที่มีการใช้น้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยแบคทีเรียผสม 2 ชนิด จากจำนวนทั้งหมด 8 คู่ (ตารางที่ 11) สามารถคัดเลือกแบคทีเรียผสมได้จำนวน 3 คู่ คือ T1 กับ A4.2, T1 กับ A7.1 และ T1 กับ A2 ที่มีความสามารถในการลดไนเตรตและไนโตรเจนได้ดี อีกทั้งมีการสะสมของแอมโมเนียและฟอสเฟตในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าแบคทีเรียผสมคู่อื่น ๆ

ประสิทธิภาพการลดไนเตรต ในไนโตรเจน แอมโมเนียและฟอสเฟตโดยแบคทีเรียผสม T1 กับ A4.2 (ภาพที่ 12 - 15) มีความสามารถทำให้ความเข้มข้นของไนเตรตและฟอสเฟตในชุดทดลองลดลงรวมถึงมีเปอร์เซ็นต์การลดลง (ตารางที่ 12) ที่มากกว่าชุดควบคุมแบบไม่ใส่เชื้อ และชุดควบคุมแบบฆ่าเชื้อ แต่กลับทำให้ความเข้มข้นของไนโตรเจนในชุดทดลองเกิดการสะสม

มากที่สุด ส่วนแอมโมเนียกลับมีความเข้มข้นที่มากขึ้นจากความเข้มข้นเริ่มต้นที่เดิมลงไปในวันแรกของการทดลอง (Day 0) ในทุกชุดการทดลอง

ประสิทธิภาพการลดไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนียและฟอสเฟตโดยแบคทีเรียผสม T1 กับ A7.1 (ภาพที่ 16 - 19) ทำให้การลดลงของความเข้มข้นและมีเปอร์เซ็นต์การลดลง (ตารางที่ 13) ของไนเตรตในชุดทดลองและชุดควบคุมแบบไม่ใส่เชื้อนั้นเท่ากัน ส่วนไนไตรต์ในชุดทดลองมีความสามารถในการลดได้ดีกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ แต่ขณะเดียวกันก็ก่อให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียในระดับความเข้มข้นที่มากขึ้นจากความเข้มข้นเริ่มต้นที่เดิมลงไปในวันแรกของการทดลอง (Day 0) ในทุกชุดการทดลอง สำหรับฟอสเฟตมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของความเข้มข้นในชุดทดลองและชุดควบคุมแบบไม่ใส่เชื้อใกล้เคียงกัน

ประสิทธิภาพการลดไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนียและฟอสเฟตโดยแบคทีเรียผสม T1 กับ A2 (ภาพที่ 20 - 23) ทำให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของความเข้มข้น (ตารางที่ 14) ของไนเตรตในชุดทดลองและชุดควบคุมแบบไม่ใส่เชื้อนั้นเท่ากันส่วนไนไตรต์ความเข้มข้นที่ลดลงในชุดทดลองจะเท่ากับชุดควบคุมแบบฆ่าเชื้อ แต่เกิดการสะสมของแอมโมเนียในระดับความเข้มข้นที่มากขึ้น โดยเฉพาะในชุดทดลอง สำหรับฟอสเฟตมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของความเข้มข้นในชุดทดลองมากที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการลดความเข้มข้นของสารทั้ง 4 ชนิด จากการใช้แบคทีเรียผสม 2 ชนิด คือ T1 กับ A4.2, T1 กับ A7.1 และ T1 กับ A2 พบว่าไม่สามารถทำให้ความเข้มข้นของไนเตรต ไนไตรต์และฟอสเฟตที่ลดลงได้แตกต่างกัน และกลับทำให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลองโดยเฉพาะในชุดทดลอง แต่การใช้แบคทีเรียผสม 6 ชนิด จะมีประสิทธิภาพในการลดความเข้มข้นของสารดังกล่าวได้ดีกว่า

ผลทดลองการควบคุมคุณภาพน้ำโดยใช้แบคทีเรียผสม 6 ชนิด ภายในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำลอง พบว่ากลุ่มแบคทีเรียนี้สามารถย่อยสลายไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนียและฟอสเฟตให้อยู่ในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อกุ้งและมีการสะสมอยู่ในปริมาณต่ำกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรียลงไป นอกจากนี้ยังส่งผลเกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์ภายในบ่อเลี้ยงกุลาดำจำลอง ทำให้มีการสะสมของอินทรีย์วัตถุในบ่อเลี้ยงกุลาดำจำลองที่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรียมีปริมาณที่น้อยกว่าแตกต่างจากชุดควบคุมเช่นกัน

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำลอง พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total Plate Count) ในตัวอย่างน้ำของบ่อที่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรียลงไปและบ่อควบคุมมีจำนวนไม่แตกต่างกัน ส่วนในตัวอย่างดินตะกอนของบ่อที่มี

การเติมกลุ่มแบคทีเรียจะมีจำนวนแบคทีเรียมากกว่าชุดควบคุม

จำนวนแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* spp. จะพบแพร่กระจายในตัวอย่างดินตะกอนมากกว่าในน้ำ โดยทั้งในตัวอย่างน้ำและดินตะกอนจำนวนแบคทีเรียจากบ่อที่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรียและบ่อควบคุมนั้นไม่แตกต่างกัน

แบคทีเรียก่อโรคในกลุ่ม *Vibrio* spp. ในตัวอย่างน้ำของบ่อที่มีการเติมแบคทีเรียลงไปมีจำนวน *Vibrio* spp. น้อยกว่าชุดควบคุม ส่วนในตัวอย่างดินตะกอนจำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองและชุดควบคุมนั้นไม่แตกต่างกัน

การเปลี่ยนแปลงจำนวนแอคติโนมัยซีต (*Actinomycetes*) ในตัวอย่างน้ำของบ่อที่เติมกลุ่มแบคทีเรียและบ่อควบคุม พบว่าในตัวอย่างน้ำจำนวนแอคติโนมัยซีตไม่แตกต่างกัน ส่วนในตัวอย่างดินตะกอนของบ่อที่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรียจะมีจำนวนมากกว่าชุดควบคุม

แบคทีเรียในกลุ่ม *Ammonia* Oxidizers ในตัวอย่างน้ำมีการแพร่กระจายในจำนวนที่มากกว่าตัวอย่างดินตะกอน โดยในตัวอย่างน้ำของบ่อที่มีการเติมแบคทีเรียผสมลงไปจะมีจำนวนแบคทีเรียจำนวนมากกว่าในบ่อควบคุม แต่จำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างดินตะกอนของชุดทดลองและชุดควบคุมนั้นไม่แตกต่างกัน

แบคทีเรียในกลุ่ม *Nitrite* Oxidizers จากตัวอย่างดินตะกอนมีการแพร่กระจายในจำนวนที่มากกว่าตัวอย่างน้ำ แต่จำนวนแบคทีเรียในบ่อที่เติมแบคทีเรียผสมและบ่อควบคุมนั้นไม่แตกต่างกัน ส่วนในตัวอย่างน้ำจำนวนแบคทีเรียในกลุ่ม *Nitrite* Oxidizers ของบ่อที่เติมกลุ่มแบคทีเรียมีจำนวนมากกว่าบ่อควบคุม

แบคทีเรียในกลุ่ม *Sulfide* Oxidizers ทั้งในตัวอย่างน้ำและดินตะกอนจำนวนแบคทีเรียของบ่อที่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรียและบ่อควบคุมนั้นไม่แตกต่างกัน

อภิปรายผลการทดลอง

1. ประสิทธิภาพในการลดไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนีย และฟอสเฟต โดยแบคทีเรียผสม 6 ชนิด ภายในขวดซีรัม

แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่คัดแยกได้นี้ จากการจัดจำแนกโดย Buchanan & Gibbons (1974) กล่าวว่า *B. polymyxa*, *B. subtilis*, *B. megaterium* และ *B. thuringiensis* (หรือ *B. cereus*) จัดอยู่ในกลุ่ม *Nitrite* oxidizers มีความสามารถในการออกซิไดซ์ไนไตรต์ไปเป็นไนเตรตซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน ยกเว้น *B. licheniformis* ที่จัดเป็นแบคทีเรีย

ในกลุ่มดีไนตริไฟเออร์ (Denitrifiers) (Hargreaves, 1998) ซึ่งมีความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรตในปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันได้

เปอร์เซ็นต์การลดลงของไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนียและฟอสเฟตจากการทดลองโดยแบคทีเรียผสม 6 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 10 จะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของไนเตรต ไนไตรต์ และฟอสเฟตในชุดทดลองจะมากกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ยกเว้นแอมโมเนียที่เปอร์เซ็นต์การลดลงในชุดทดลองนั้นเท่ากับชุดควบคุมแบบไม่ใส่เชื้อ ซึ่งจากการทดลองนี้อาจจะกล่าวได้ว่าแบคทีเรียผสม 6 ชนิด ที่มีการเติมลงไปนั้นมีความสามารถในการย่อยสลายไนเตรต ไนไตรต์ และฟอสเฟตได้ดีกว่าจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในน้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยง เนื่องจาก แบคทีเรียผสมนั้นมีคุณสมบัติจัดอยู่ทั้งในกลุ่มไนตริไฟเออร์ (Nitrifiers) และดีไนตริไฟเออร์ (Denitrifiers) จึงมีส่วนไปช่วยสนับสนุนการเปลี่ยนแปลงสสารประกอบไนโตรเจนในการทดลองนี้ โดยปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันนั้นเริ่มจากการเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียไปเป็นไนไตรต์ และไนเตรตตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียและไนไตรต์ในชุดการทดลองลดลงแล้ว ความเข้มข้นไนเตรตคงเหลือสะสมอยู่ แต่ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าชุดควบคุมแบบไม่ใส่เชื้อ และชุดควบคุมแบบฆ่าเชื้อ อาจเพราะในแบคทีเรียที่เติมลงไปมี *B. licheniformis* โดยเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มดีไนตริไฟเออร์จึงมีผลต่อการลดลงของไนเตรตจากปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน (Hargreaves, 1998)

จากการตรวจวัดคุณภาพน้ำประกอบด้วยค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ความเค็ม ค่าออกซิเจนละลายน้ำ ค่าความเข้มข้นของไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนียและฟอสเฟต จากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่นำน้ำและดินตะกอนมาทำการศึกษา พบว่าอยู่ในเกณฑ์คุณภาพน้ำที่ดีเหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ดังแสดงในตารางที่ 9 รวมถึงการนำไปใช้ทดลองในครั้งนี้ด้วย

2. ประสิทธิภาพในการลดไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนีย และฟอสเฟต โดยแบคทีเรียผสม 2 ชนิด ภายในขวดซีรัม

จากการทดสอบประสิทธิภาพการลดไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนียและฟอสเฟต โดยแบคทีเรียผสม 2 ชนิด (ตารางที่ 11) เมื่อตรวจวัดความเข้มข้นในวันที่ 3 ของการทดลอง แบคทีเรียผสมทุกคู่มีความสามารถในการลดความเข้มข้นของไนเตรตและไนไตรต์ได้ดี แต่ยังคงมีไนเตรตสะสมอยู่จากการทดลองของแบคทีเรียคู่ของ T6 กับ A2 และ T6 กับ A16 เท่ากับ 0.33 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.23 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนแอมโมเนียและฟอสเฟตยังคงเหลือสะสมอยู่ในทุกชุดการทดลอง จึงได้คัดเลือกคู่แบคทีเรียผสมที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียและฟอสเฟตเหลือน้อยที่สุด และสามารถลดความเข้มข้นของไนเตรตกับไนไตรต์ได้ดีเช่นกัน คือ

T1 กับ A2, T1 กับ A7.1 และ T1 กับ A2 นำมาศึกษาประสิทธิภาพการลดความเข้มข้นของสารดังกล่าวต่อไปโดยจัดการทดลองเช่นเดียวกับการย่อยสลายโดยแบคทีเรียผสม 6 ชนิด

ประสิทธิภาพการลดไนเตรตโดยแบคทีเรียผสม 2 ชนิดนั้นในชุดทดลองจะมีความเข้มข้นลดลงได้ดีโดยเฉพาะแบคทีเรียผสมคู่ T1 กับ A4.2 โดยจะลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 ของการทดลอง หลังจากนั้นจะค่อย ๆ ลดลงจนเหลือ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 อาจเพราะในชุดทดลองปริมาณแบคทีเรียที่เติมลงไปมีคุณสมบัติในการเจริญได้ทั้งในภาวะที่มีทั้งออกซิเจนและในเขตมากกว่าในชุดควบคุมแบบไม่ใส่เชื้อ โดยแบคทีเรียจะมีการเจริญควบคู่ไปกับการใช้ออกซิเจนส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนเริ่มลดลง แบคทีเรียสามารถที่จะเลือกใช้ในเขตมาใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจแทนออกซิเจนได้ทำให้ความเข้มข้นของไนเตรดลดลงไปด้วย (จามรี รักษาบางแหลม และสุศรี สัมภาวะผล, 2547) ส่วนในแบคทีเรียผสมระหว่าง T1 กับ A7.1 และ T1 กับ A2 เปอร์เซ็นต์การลดลงของไนเตรตในชุดทดลองจะเท่ากับชุดควบคุมแบบไม่ใส่เชื้อ แสดงว่าความสามารถในการย่อยสลายไนเตรตโดยแบคทีเรียที่เติมลงไปเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่มีอยู่ในธรรมชาติไม่แตกต่างกัน

ส่วนไนไตรต์ในชุดทดลองความเข้มข้นจะลดลงอย่างรวดเร็วใกล้เคียงกับชุดควบคุมแบบไม่ใส่เชื้อ ซึ่งหลังจากวันที่ 3 ของการทดลองความเข้มข้นของไนไตรต์ในชุดทดลองที่มีการใช้แบคทีเรียผสมและชุดควบคุมแบบไม่ใส่เชื้อจะมีความเข้มข้นของไนไตรต์เพิ่มขึ้น อาจเพราะมีแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียเป็นไนไตรต์โดยปฏิกิริยาแอมโมเนียออกซิเดชัน (Ammonia Oxidation) แต่ไม่มีแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนแปลงไนไตรต์ต่อไปไนเตรตได้โดยปฏิกิริยาไนไตรต์ออกซิเดชัน (Nitrite Oxidation) จึงทำให้เกิดการสะสมของไนไตรต์ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ (พุทธ สองแสงจินดา, 2546) จากการศึกษาประสิทธิภาพในการลดโดยแบคทีเรียผสม 2 ชนิด มีการสะสมของไนไตรต์ในระดับความเข้มข้นที่ยังสามารถนำมาใช้เลี้ยงกุ้งได้ คือแบคทีเรียผสม T1 กับ A4.2 เหลือเท่ากับ 0.54 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียผสม T1 กับ A7.1 คงเหลือเท่ากับ 0.34 มิลลิกรัมต่อลิตร และแบคทีเรียผสม T1 กับ A2 เหลือเท่ากับ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ทั้งนี้อาจมีผลกระทบต่อสุขภาพของกุ้งกุลาดำ เนื่องจากน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีระดับไนไตรต์สูงกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตรไม่ควรนำมาเลี้ยงกุ้ง (กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, 2534) แต่หากยังเหลือไนไตรต์ในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร จะส่งผลให้กุ้งอ่อนแอ ติดเชื้อโรคได้ง่ายและตายในที่สุด (มันลิน ตันทูลเวรน์, 2542)

ผลการทดลองย่อยสลายแอมโมเนียโดยแบคทีเรียผสมทั้ง 3 คู่ ในชุดทดลองและชุดควบคุมแบบไม่ใส่เชื้อมีความเข้มข้นของแอมโมเนียเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ อาจเพราะแบคทีเรียที่มีอยู่ใน

ตัวอย่างน้ำและดินตะกอนจากธรรมชาติ รวมทั้งแบคทีเรียที่เติมลงไปมีคุณสมบัติที่ทำให้ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์ให้เป็นแอมโมเนียโดยปฏิกิริยาแอมโมนิฟิเคชัน (Ammonification) โดยแบคทีเรียจะมีการปลดปล่อยเอนไซม์ในการย่อยสลายโปรตีนออกจากเซลล์เพื่อย่อยสลายโปรตีนไปเป็นกรดอะมิโนแล้วถูกนำเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียขณะที่เกิดปฏิกิริยาแอมโมนิฟิเคชัน (เกรียงศักดิ์ พูนสุข, 2543) หรืออาจจะเกิดจากแบคทีเรียในน้ำและดินมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน โดยมีเอนไซม์ไนโตรจีเนสเป็นตัวช่วยในการเกิดปฏิกิริยานี้และหากในการทดลองนี้อยู่ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจนก็อาจจะเกิดแอมโมเนียขึ้นได้จากปฏิกิริยาไนไตรต์แอมโมนิฟิเคชันเช่นกัน (Nitrite Ammonification) (Atlas & Bartha, 1993)

ความเข้มข้นของฟอสเฟตในชุดทดลองของแบคทีเรียผสมแต่ละคู่จะค่อย ๆ ลดลงตลอดระยะเวลาการทดลองและใกล้เคียงกับชุดควบคุมแบบไม่ใส่เชื้อ อาจเกิดจากกระบวนการที่จุลินทรีย์สามารถนำเอาอนินทรีย์ฟอสเฟตไปใช้ในการเจริญและเพื่อเป็นองค์ประกอบของเซลล์ (Montoya, Lawrence, Grant & Velasco, 2000) หรือเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีของสารในระบบโดยการตกตะกอนและการดูดซับกับอนุภาคของดินตะกอน (สละไบทิพย์ อมรจารุชิต และคณะ, 2543)

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดไนไตรต์ ไนไตรต์ แอมโมเนียและฟอสเฟตระหว่างแบคทีเรียผสมทั้ง 3 คู่ การลดลงของความเข้มข้นมีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือสามารถลดความเข้มข้นของไนไตรต์ได้ดี แต่แบคทีเรียผสม T1 กับ A7.1 และ T1 กับ A2 เมื่อเริ่มต้นการลดลงของไนไตรต์ในชุดทดลองและชุดควบคุมแบบไม่ใส่เชื้อนั้นเท่ากัน ส่วนไนไตรต์มีความเข้มข้นลดลงอยู่ในระดับที่สามารถนำไปใช้เลี้ยงกุ้งได้ มีการสะสมไนไตรต์จากการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันที่ไม่สมบูรณ์ และความเข้มข้นที่ลดลงของฟอสเฟตเกิดได้ดี ยกเว้นแอมโมเนีย เพราะจากการศึกษาโดยแบคทีเรียผสมทั้ง 3 คู่ นั้นทำให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียเพิ่มขึ้นขึ้น โดยแอมโมเนียในน้ำไม่ควรเกิน 0.1 – 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เพราะจะส่งผลให้กุ้งโตช้า เจริญหรือตาย (Jones et al., 2001) เนื่องจากถ้าในน้ำมีแอมโมเนียมากจะเกิดการแพร่กระจายกลับสู่เลือด ทำให้กุ้งไม่สามารถขับแอมโมเนียออกจากตัวได้ ส่งผลให้พีเอชของเลือดสูงกว่าปกติ กุ้งลดการหายใจ เพื่อป้องกันแอมโมเนียเข้าสู่ร่างกายกุ้งจึงเติบโตได้ช้าลง (Gross et al., 2003) หากเปรียบเทียบกันแล้วการใช้แบคทีเรียผสม 6 ชนิด มีประสิทธิภาพในการลดความเข้มข้นของไนไตรต์ ไนไตรต์ แอมโมเนียและฟอสเฟตได้มากกว่า โดยไม่ก่อให้เกิดการสะสมของสารประกอบที่มีความเป็นพิษต่อกุ้งโดยเฉพาะแอมโมเนียและไนไตรต์ เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายทาง

ชีวภาพจะมีความเกี่ยวข้องกับหลาย ๆ ปฏิกริยาอันเกิดจากกลุ่มจุลินทรีย์ที่อยู่ร่วมกันหลาย ๆ ชนิด ซึ่งจะส่งผลให้อัตราการเจริญและการเปลี่ยนแปลง หรือการย่อยสลายสารต่าง ๆ เกิดได้มากขึ้น และจากการที่มีความหลากหลายของจุลินทรีย์มากกว่าก็จะส่งผลให้เกิดกระบวนการ Cometalabolism หรือ Synergism อันจะมีผลให้กระบวนการย่อยสลายเกิดได้ดีขึ้นหรือสมบูรณ์ยิ่งขึ้นกว่าการใช้จุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวหรือ 2 ชนิด (Alexander, 1994)

3. ประสิทธิภาพในการลดไนเตรต ในไนโตรด แอมโมเนีย และฟอสเฟต โดยแบคทีเรียผสม 6 ชนิด ภายในบ่อกึ่งกลาดำจำลอง

จากการตรวจวัดคุณภาพน้ำตลอดระยะเวลาการทดลองประกอบด้วยอุณหภูมิ ความเค็ม พีเอช ค่าออกซิเจนละลายน้ำ และความชื้น ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้นของน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่นำมาทดลองนั้น ค่าความเค็มและพีเอชเพิ่มขึ้น โดยความเค็มและอุณหภูมิของชุดควบคุมและชุดทดลองนั้นอยู่ช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกึ่งกลาดำ ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 25 - 33 องศาเซลเซียส (วิภูษิต มั่นทะจิตร และคณะ, 2534) ค่าพีเอชในชุดควบคุมมีความเป็นด่างสูงกว่าในชุดทดลอง (ตารางที่ 16) โดยไมตรี ดวงสวัสดิ์ และจารุวรรณ สมศิริ (2528) รายงานว่าระดับพีเอชที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำควรอยู่ในช่วง 6.5 - 9.0 ซึ่งค่าพีเอชที่ค่อนข้างสูง (8.4 - 9) จะมีผลให้เกิดการแตกตัวของแอมโมเนียเพิ่มขึ้นในขณะที่แอมโมเนียมีออกซิเจนลดลง (สละปัทมย์ อมรจารุชิต และคณะ, 2543)

การศึกษาประสิทธิภาพการลดไนเตรตโดยแบคทีเรียผสม 6 ชนิด ภายในบ่อเลี้ยงกึ่งกลาดำจำลอง จากภาพที่ 32 จะเห็นว่าในบ่อที่มีการเติมแบคทีเรียผสมลงไปในช่วงสัปดาห์ที่ 4 เปอร์เซ็นต์การลดลงของไนเตรตสูงแตกต่างจากบ่อควบคุมอย่างชัดเจน เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นไนเตรตเป็น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ความสามารถในการย่อยสลายไนเตรตในชุดควบคุมและชุดทดลองใกล้เคียงกันแต่ในชุดทดลองก็มีเปอร์เซ็นต์การลดลงที่มากกว่าในชุดควบคุม หลังจากเพิ่มความเข้มข้นของไนเตรตลงไปในสัปดาห์ที่ 3 เป็น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นจะมีการเปลี่ยนแปลงลดลงแล้วเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อย แต่ความเข้มข้นก็สามารถลดลงได้เป็นอย่างดีจนกระทั่งในวันสุดท้ายของการทดลองมีความเข้มข้นเหลืออยู่เพียง 0.003 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งในบ่อควบคุมยังคงมีไนเตรตสะสมอยู่ถึง 15.33 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรียที่เติมลงไปมีความสามารถในการเปลี่ยนรูปไนเตรตไปเป็นไนโตรด หรือก๊าซไนโตรเจนโดยปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน ส่วนความเข้มข้นของไนเตรตที่ลดลงในชุดควบคุมอาจจะเกิดจากการดูดซับกับอนุภาคแขวนลอยหรือตกตะกอนไปสะสมในดิน (Schulz, Gelbrecht & Rennert, 2001) และแพลงค์ตอนพืชดูดซึมไนเตรตไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต แต่ความเข้มข้นที่สะสมก็ยังคงอยู่ในระดับที่เป็นพิษต่อกุ้ง

ประสิทธิภาพการลดของไนโตรเจนในชุดทดลอง ภายในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำเกิดได้ดี แม้จะมีการเพิ่มความเข้มข้นขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 ของการทดลองเป็น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ กลุ่มแบคทีเรียที่เติมลงไปสามารถทำให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของไนโตรเจนเพิ่มขึ้นก็จะมีประสิทธิภาพในการลดความเข้มข้นของไนโตรเจนได้อย่างรวดเร็วจนเหลือความเข้มข้นเพียง 0.001 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากแบคทีเรียผสมที่เติมลงไปมีประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันได้อย่างสมบูรณ์ เพราะในสภาวะที่มีออกซิเจน แบคทีเรียจะสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ทั้ง Heterotrophic Nitrification และ Aerobic Denitrification เพื่อเปลี่ยนรูปไนโตรเจนซึ่งเป็นสารตัวกลางระหว่างสองปฏิกิริยานี้ (Matsuzaka et al., 2003) จึงไม่ทำให้เกิดการสะสมของไนโตรเจนขึ้น สำหรับชุดควบคุมมีไนโตรเจนสะสมอยู่ถึง 15.86 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำมาก อาจเพราะค่าพีเอชของชุดควบคุมนั้นอยู่ในระดับที่ค่อนข้างสูงมีผลให้เกิดการแตกตัวของแอมโมเนียมไอออนไปเป็นแอมโมเนียเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีผลยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน (WHO, 1986) ในธรรมชาติ นอกจากนี้การสะสมของไนโตรเจนอาจเกิดจากสภาวะไร้ออกซิเจนบริเวณดินตะกอนจึงเกิดปฏิกิริยาไนเตรดรีดักชัน (Nitrate Reduction) เป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากไนเตรตไปเป็นไนโตรเจน ซึ่งในชุดทดลองให้ผลการทดลองที่ตรงกันข้ามกับบทความดังกล่าว เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sakai et al. (1996) พบว่า *Bacillusadius* I-73 จะมีการเจริญควบคู่ไปกับการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นไนโตรเจนให้ไปสะสมอยู่ในรูปของไนเตรต แต่จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้เล็กน้อยถ้าความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรต์ (NaNO_2) เป็น 20 มิลลิโมลาร์ (1,380 มิลลิกรัมต่อลิตร)

แอมโมเนียที่เติมลงในบ่อเลี้ยงกุ้งในวันแรก สัปดาห์ที่ 1 และสัปดาห์ที่ 3 ของการทดลองที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นเช่นเดียวกับไนเตรต และไนโตรเจน ในชุดทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมทั้ง 6 ชนิดลงไปจะมีความเข้มข้นลดลงแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างชัดเจนและมีเปอร์เซ็นต์การลดลงที่เพิ่มมากขึ้น อาจเพราะนอกจากแอมโมเนียที่เติมลงไปแล้วยังมีเศษอาหารกุ้ง สิ่งขับถ่าย ซากสิ่งมีชีวิตที่ตายลงอันเป็นแหล่งให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียโดยแบคทีเรียทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ในโตรเจนผ่านปฏิกิริยาแอมโมนิฟิเคชัน ซึ่งแบคทีเรียที่มีอยู่ในธรรมชาติอาจจะไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการลดความเข้มข้นของแอมโมเนียได้ดีเท่ากับในชุดทดลองทำให้ในวันสุดท้ายของการทดลองมีแอมโมเนียคงเหลืออยู่ในชุดควบคุมสูงถึง 10.78 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ชุดทดลองเหลืออยู่เพียง 0.086 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้เนื่องจากการมีปริมาณออกซิเจนที่ค่อนข้างมากประกอบกับแบคทีเรียที่เติมลงไปมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาแอมโมเนีย

ออกซิเดชัน (Ammonia Oxidation) ได้ดี ทำให้แอมโมเนียเปลี่ยนไปเป็นไนไตรต์ และไนไตรต์ แล้วสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นไนเตรตได้ซึ่งเป็นปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันที่สมบูรณ์จึงไม่ทำให้เกิดการสะสมของไนไตรต์ขึ้น อันจะมีผลไปยังการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันอีกทางหนึ่งได้

(Burrell, Keller & Blackhall, 1999) แต่ทั้งนี้แพลงค์ตอนพืชในบ่อเลี้ยงก็มีบทบาทในการดูดซึมแอมโมเนีย เพื่อใช้สร้างสารอินทรีย์ในกระบวนการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis) ทำให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียในทั้ง 2 ชุดการทดลองลดลงอีกทางหนึ่ง (พุทธ ส่องแสงจินดา และคณะ, 2543) แต่จากการทดลองในชุดควบคุมจะมีสีน้ำที่เขียวกว่าในชุดทดลองอาจเพราะมีแพลงค์ตอนพืชมากเมื่อเกิดการสังเคราะห์แสงในเวลากลางวันจะทำให้น้ำในบ่อเลี้ยงกึ่งมีค่าพีเอชสูงขึ้นและถ้าน้ำมีสีเข้มอยู่เป็นเวลานานจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสมดุลของระบบนิเวศอย่างรวดเร็ว เมื่อแพลงค์ตอนพืชจำนวนมากตายลงพร้อม ๆ กันในบ่อเลี้ยงกึ่งทำให้การสังเคราะห์แสงลดลง การดูดซึมแอมโมเนียไปใช้ลดลงและการผลิตออกซิเจนก็จะลดลงด้วย (Platon, 2002) จึงส่งผลให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียที่มีความเป็นพิษต่อกุ้งในชุดควบคุมมากขึ้นด้วย

การเติมแบคทีเรียผสม 6 ชนิดลงไปในชุดทดลองนั้น จะเห็นว่าตลอดระยะเวลาการทดลองแบคทีเรียผสมที่เติมลงไปมีประสิทธิภาพในการช่วยลดความเข้มข้นของสารประกอบไนเตรต ไนไตรต์และแอมโมเนียได้อย่างมีประสิทธิภาพดีกว่าในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียผสมแม้จะมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารดังกล่าว โดยกิจกรรมหลักซึ่งเกิดจากแบคทีเรียในการลดปริมาณสารประกอบไนโตรเจน คือปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันที่ช่วยเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียไปเป็นไนเตรต และปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันที่เปลี่ยนแปลงไนเตรตต่อไปเป็นไนตริกออกไซด์ ไนตรัสออกไซด์หรือก๊าซไนโตรเจน

ตลอดระยะเวลาการทดลองความเข้มข้นของฟอสเฟตในชุดทดลองและชุดควบคุมมีอัตราลดลงที่ใกล้เคียงกันมาก แสดงว่าแบคทีเรียผสมที่เติมลงไปไม่มีความสามารถในการลดความเข้มข้นของฟอสเฟตได้ดีกว่าแบคทีเรียที่มีอยู่ในธรรมชาติ โดยความเข้มข้นที่ลดลงอาจจะเกิดจากการดูดซึมเอาฟอสเฟตไปใช้โดยแพลงค์ตอนพืชสำหรับการเจริญ เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีและกายภาพโดยการตกตะกอนและการดูดซับกับอนุภาคของดินตะกอนได้ หรือโดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ฟอสฟอรัสไปเป็นสารอนินทรีย์ฟอสเฟตได้ แล้วแบคทีเรียในแหล่งน้ำนำฟอสเฟตไปใช้ในการสร้างส่วนประกอบของเซลล์ (Intrasungkha, Keller & Blackhall, 1999) ซึ่งในวัฏจักรของการทดลองมีฟอสเฟตสะสมอยู่ในชุดทดลองและ

ชุดควบคุมเท่ากับ 1.63 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2.23 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งแหล่งน้ำที่มีฟอสเฟตสูงเกิน 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร จัดว่าเป็นแหล่งน้ำที่มีสารอาหารธรรมชาติมากเกินไป อาจจะทำให้เกิดปัญหายูโทรฟิเคชัน (Eutrofication) ได้ (Thakur & Lin, 2003)

ปริมาณสารอินทรีย์วัตถุภายในบ่อกึ่งกลาดำจำลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมลงไป ลดลงเหลืออยู่ที่ร้อยละ 2.18 ขณะที่บ่อที่ไม่ได้เติมแบคทีเรียมีปริมาณสารอินทรีย์วัตถุคงเหลืออยู่ที่ร้อยละ 4.55 โดยในช่วงแรกทั้ง 2 ชุดการทดลองมีปริมาณสารอินทรีย์วัตถุใกล้เคียงกัน โดยปริมาณสารอินทรีย์วัตถุนั้นอาจเกิดจากเศษอาหาร สิ่งขับถ่าย กุ้ง ซากแพลงก์ตอนพืชและแบคทีเรียที่ตายสะสมอยู่ในดินตะกอนแล้วมีปริมาณการสะสมเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยง โดยในช่วงสัปดาห์ที่ 3 ของการทดลองชุดควบคุมมีปริมาณสารอินทรีย์วัตถุลดลงเพราะกิจกรรมการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยแบคทีเรียตามธรรมชาติ แต่ในชุดทดลองซึ่งมีปริมาณอินทรีย์วัตถุที่ต่ำกว่าชุดควบคุม อาจเพราะแบคทีเรียผสมที่เติมลงไปมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงจากสารอินทรีย์ไปเป็นสารอนินทรีย์ (Mineralization) ร่วมกับภายในบ่อกึ่งกลาดำจำลองมีการให้ออกซิเจนในปริมาณที่เพียงพอทำให้แบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ ออกซิเจนมีการเจริญและย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดีด้วย ซึ่งสมศักดิ์ วงษ์ (2528) กล่าวว่าดินที่มีอินทรีย์วัตถุสูง ๆ จะมีความเป็นพิษโดยตรงต่อแบคทีเรียและทำให้ปริมาณแบคทีเรียลดลงด้วย ซึ่งจะมีผลให้จุลินทรีย์พวกที่ย่อยสลายสารอินทรีย์แก่งแย่งสารอนินทรีย์ในโตรเจนไปใช้ ส่งผลต่อกิจกรรมของแบคทีเรียในกลุ่มไนตริไฟเออร์ (Nitrifiers) ให้ลดลงได้อีกทางหนึ่ง จึงอาจเป็นสาเหตุให้ในชุดควบคุมมีจำนวนของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ลดลงจึงมีการสะสมของแอมโมเนียและไนไตรต์ที่มากกว่าในชุดทดลอง

4. การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ภายในบ่อกึ่งกลาดำจำลอง

การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธี Total Plate Count เป็นการศึกษาแบคทีเรียในกลุ่มเฮเทอโรโทรปจากตัวอย่างน้ำและดินตะกอนของบ่อเลี้ยงกึ่งกลาดำจำลอง พบว่าในชุดทดลองจำนวนแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะมีจำนวนมากกว่าชุดควบคุมและมีจำนวนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการทดลองโดยในวันที่ 30 ของการทดลองตรวจพบจำนวนมากที่สุดใต้น้ำเท่ากับ $8.12 \pm 0.20 \text{ Log cfu/ml}$ และในดินตะกอนเท่ากับ $9.48 \pm 0.22 \text{ Log cfu/g}$ ซึ่งจากการทดลองของ Ghosh, Nagesh & Sasml (2004) พบแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปในระบบเพาะเลี้ยงกึ่งแบบ Semi-Intensive มากที่สุดเท่ากับ $6.33 \pm 0.35 \text{ Log cfu/ml}$ และ $6.53 \pm 0.18 \text{ Log cfu/g}$ ตามลำดับ ส่วนการศึกษาของ Devaraja et al. (2002) กล่าวว่าแบคทีเรียที่โดดเด่นในบ่อเลี้ยงกึ่งคือ *Bacillus* sp. และพบว่าแบคทีเรียในกลุ่มเฮเทอโรโทรปจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการ

เลี้ยงโดยมีจำนวนสูงสุดเท่ากับ $1.24 \times 10^6 \pm 0.27 \times 10^6$ cfu/g สำหรับการทดลองนี้จะเห็นว่าจำนวนเฮเทอโรโทรปในดินตะกอนจะมากกว่าในน้ำอาจจะเนื่องจากในบริเวณดินตะกอนจะเป็นชั้นที่มีการสะสมของสารอาหารที่เกิดจากเศษอาหาร สิ่งขับถ่าย กุ้ง แพลงค์ตอนจำนวนมาก สิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่ตายไป และสารอินทรีย์ที่ถูกย่อยสลาย จึงเป็นบริเวณที่มีสารอาหารอันเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียรวมทั้งทำให้แอมโมเนียในระบบมากขึ้นด้วย ซึ่งจะมีผลให้จำนวนเฮเทอโรโทรปในดินตะกอนมากกว่าในน้ำ (Burford & Lorenzen, 2004) โดยแบคทีเรียผสมที่เติมลงไปในช่วงทดลองนั้นจัดอยู่ในกลุ่มเฮเทอโรโทรปที่สามารถจะทำให้เกิดกระบวนการไนตริฟิเคชัน ซึ่งแบคทีเรียจะได้พลังงานจากการเพิ่มออกซิเจนให้กับอินทรีย์สารแต่ไม่ได้พลังงานจากแอมโมเนีย และสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน ผลที่ได้จากปฏิกิริยาคือไนไตรต์ โดยสมศักดิ์ วงษ์ (2528) กล่าวว่าแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Pseudomonas* spp., *Mycobacterium rubrum*, *Bacillus* sp. และ *Vibrio* sp.

แบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* spp. ในน้ำมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการทดลอง โดยในช่วงควบคุมมีการเพิ่มขึ้นในจำนวนที่มากกว่าในช่วงทดลอง ส่วนดินตะกอนจะมีจำนวนใกล้เคียงกันในช่วงสัปดาห์ที่ 1 ถึง 2 และจะเพิ่มขึ้นจนถึง 8.9 ± 0.12 log cfu/g ในช่วงสัปดาห์ที่ 3 หลังจากนั้นเริ่มมีจำนวนลดลงต่ำกว่าในช่วงควบคุม สำหรับ *Pseudomonas* spp. นั้นจัดเป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งในกลุ่มเฮเทอโรโทรป ซึ่งมีความสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการทดลอง เพราะภายในบ่อ กุ้ง กูลาดำจะมีการสะสมสารอินทรีย์เพิ่มมากขึ้นด้วย โดยในการทดลองของ Chythanya & Karunasagar (2002) พบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* spp. ในระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจะมีความสัมพันธ์กับเหงือก ผิวหนัง และระบบลำไส้ของสัตว์น้ำ โดย *Pseudomonas* 1-2 สามารถผลิตสารจากการหลั่งสารออกมานอกเซลล์ (Extracellular) ที่มีความสามารถต้านไวรัส (Antiviral) ได้ถึง 5 ชนิด คือ *Vibrio harveyi*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. damsela* และ *V. vulnificus*

ตลอดระยะเวลาการทดลองจำนวน *Vibrio* spp. ในน้ำและดินตะกอนของชุดทดลอง และชุดควบคุมจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นแต่ในลักษณะที่ต่ำกว่าชุดควบคุม ซึ่งแบคทีเรียผสมที่เติมลงไปอาจมีความสามารถในการควบคุมจำนวนของแบคทีเรียบางสายพันธุ์ของ *Vibrio* spp. ที่อาจก่อให้เกิดโรคแก่กุ้งกุลาดำได้ เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่เติมลงไปในช่วงทดลองอาจมีการปลดปล่อยสารเคมีที่มีผลฆ่าแบคทีเรียหรือยับยั้งการเจริญของ

จุลินทรีย์อื่น ๆ มีการแข่งขันในการดูดซึมสารอาหารและพลังงาน เพราะแบคทีเรียผสมที่เติมลงไปมี ความสามารถในการเจริญได้ดีกว่า โดยแบคทีเรียอาจจะมีการผลิตสารต้านแบคทีเรีย เช่นผลิต สารปฏิชีวนะ (Antibiotics) แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) ไลโซไซม์ (Lysozymes) เอนไซม์ โปรติเอส (Protease) และเพื่อเพิ่มการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (Bhaskar et al., 1998) นอกจากนี้ในการศึกษาของ Gatesoupe (1999) กล่าวว่า *Bacillus* sp. ที่พบในแหล่งน้ำมี ความสามารถในการต่อต้าน (Antagonism) *Vibrio vulnificus* ส่วน *B. subtilis* สามารถช่วยลด จำนวนเชื้อก่อโรคกลุ่ม *Vibrio* sp. ในดินตะกอนได้ และจากการศึกษาของ Verschuere, Rombaut, Sorgeloss & Verstraete (2000) พบว่า *Bacillus* strain S11 และ *Bacillus* strain BY-9 ที่ปริมาณหัวเชื้อ 10^6 cfu/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* แก่กุ้งกุลาดำใน ระยะ Postlarvae ได้ ซึ่งอาจเกิดจากการขับเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ของแบคทีเรียและ การแข่งขันใช้สารอาหารสำหรับการเจริญ นอกจากนี้สาหร่ายจำพวก Microalgae หลายชนิด สามารถผลิตยาปฏิชีวนะที่ช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและถูกกำจัดโดยการจับกิน โปรโตซัวภายในระบบเพาะเลี้ยง (Thompson et al., 2002)

แอคติโนมายซีท (Actinomycete) ของชุดทดลองทั้งในน้ำและดินตะกอนจะมีจำนวน มากกว่าในชุดควบคุม โดยในทั้ง 2 ชุดการทดลองจะมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนเพิ่มขึ้นและลดลง ตลอดระยะเวลาการทดลอง แอคติโนมายซีทเป็นกลุ่มจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่จัดอยู่ในพวก เฮเทอโรโทรปสามารถเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ในโตรเจนไปเป็นสารอนินทรีย์ในโตรเจนได้จาก ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน เช่น *Nocardia* spp. และ *Streptomyces* spp. นอกจากนี้ยังเป็นจุลินทรีย์ที่ พบได้ในดินทั่วไปซึ่งมีบทบาทสำคัญในการดูดซึมแอมโมเนียม ไนเตรดที่ละลายอยู่ในน้ำ ส่วนที่ ดูดซับอยู่บริเวณผิวของอนุภาคดินเหนียวและส่วนที่ถูกตรึงอยู่ระหว่างอนุภาคดินเหนียวไปใช้สร้าง เซลล์ได้ แต่มีแนวโน้มที่จะใช้แอมโมเนียมก่อนเมื่อแอมโมเนียมหมดแล้วจึงนำไนเตรดไปใช้ (Carter et al., 1995)

แบคทีเรียกลุ่ม Ammonia Oxidizers มีการแพร่กระจายในน้ำค่อนข้างสูงกว่าในดิน ตะกอน โดยชุดทดลองจะมีจำนวนที่มากกว่าชุดควบคุมแตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งในวันแรก ๆ จะมีจำนวนแบคทีเรียค่อนข้างมากแล้วจะลดลงเรื่อย ๆ และในช่วงสัปดาห์ที่ 3 ที่มีการเพิ่มความ เข้มข้นของไนเตรด ไนไตรต์ แอมโมเนียและฟอสเฟตเป็น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนแบคทีเรียก็ เพิ่มขึ้นจนถึง 114.67 ± 39.26 MPN/100ml ส่วนในดินตะกอนแบคทีเรียมีจำนวนที่น้อยกว่า ในน้ำมาก โดยในชุดทดลองจะมีการแพร่กระจายมากในช่วงสัปดาห์ที่ 2 เท่ากับ 30.33 ± 4.04 MPN/100g ซึ่งในชุดควบคุมทั้งในน้ำและดินตะกอน พบว่ามีแบคทีเรียกลุ่มนี้ค่อนข้างน้อย

เนื่องจากการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่ม Ammonia Oxidizers นั้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณแอมโมเนีย (Ghosh et al., 2004) จะเห็นว่าจากผลการทดลองแบคทีเรียจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนีย ในขณะที่เดียวกันจำนวนแบคทีเรียก็จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียในบ่อกึ่งลดลงเช่นกัน ปฏิกริยาไนตริฟิเคชันจะเกิดได้สูงสุดเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีทั้งออกซิเจนและแอมโมเนียซึ่งปฏิกริยานี้จะเกิดมากสุดบริเวณผิวหน้าของดินตะกอนที่ออกซิเจนสามารถซึมผ่านลงไปได้ การเกิดปฏิกริยาไนตริฟิเคชันโดยแบคทีเรียในกลุ่ม Ammonia Oxidizers จะมีผลกระทบโดยทันทีถ้าเกิดการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยเกี่ยวกับอุณหภูมิ การลดลงของสารอาหารที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้และไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hargreaves, 1998) ซึ่งในชุดควบคุมบริเวณดินตะกอนมีสีดำและมีกลิ่นเหม็น อาจเกิดการสะสมของไฮโดรเจนซัลไฟด์ทำให้มีผลกระทบต่อการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มนี้ จึงทำให้ชุดควบคุมมีจำนวนแบคทีเรียในกลุ่มนี้ต่ำกว่าชุดทดลอง

การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียกลุ่ม Nitrite Oxidizers พบว่าบริเวณดินตะกอนมีปริมาณการแพร่กระจายของแบคทีเรียมากกว่าในน้ำ โดยชุดทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสม 6 ชนิด ลงไปในบ่อจะมีปริมาณมากกว่าชุดควบคุม ซึ่งในช่วงวันแรก ๆ ของการทดลองจะมีแบคทีเรียค่อนข้างมาก หลังจากนั้นจะมีจำนวนลดลงเรื่อย ๆ จนกระทั่งวันที่ 22 ของการทดลองและหลังจากนั้นที่มีการเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนเป็น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียในชุดทดลองก็มีจำนวนเพิ่มขึ้นในปริมาณที่มากกว่าในช่วงแรกของการทดลองเป็น 28.33 ± 6.51 MPN/100 ml และ 114.67 ± 39.26 MPN/100 g ในน้ำและดินตะกอน ตามลำดับ อาจจะเป็นเนื่องจากว่าแบคทีเรียกลุ่ม Nitrite Oxidizers จะลดลงตามความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ถูกเปลี่ยนไปเป็นไนเตรตจากปฏิกริยาไนตริฟิเคชันและความเข้มข้นไนโตรเจนที่สูงขึ้นจะไปกระตุ้นให้มีการเจริญเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียได้มากขึ้น ส่วนในชุดควบคุมแบคทีเรียในกลุ่ม Nitrite Oxidizers ที่มีอยู่ในธรรมชาติอาจจะมีปริมาณน้อย หรือมีความสามารถในการทนต่อไนโตรเจนได้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนจะไม่มีการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้น จึงอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ไนโตรเจนไม่สามารถถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นไนเตรตได้จึงเกิดการสะสมของไนโตรเจนในชุดควบคุม และหากมีการสะสมไนโตรเจนในปริมาณที่มากก็จะส่งผลกระทบให้เกิดปฏิกริยาแอมโมเนียออกซิเดชันลดลง (Burford & Lorenzen, 2004) แล้วส่งผลให้เกิดการสะสมแอมโมเนียในชุดควบคุมได้อีกด้วย

แบคทีเรียกลุ่ม Sulfide Oxidizers ในน้ำและดินตะกอนของชุดทดลองจะมีจำนวนมากในช่วงสัปดาห์แรกของการทดลอง หลังจากนั้นแบคทีเรียจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นและลดลงสลับกัน

ตลอดระยะเวลาการทดลอง แต่ในน้ำจะมีจำนวนมากกว่าดินตะกอน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ghosh et al. (2004) พบว่าการเลี้ยงกุ้งแบบกึ่งพัฒนา (Semi – Intensive) จะพบแบคทีเรียกลุ่ม Sulfide Oxidizers ในน้ำมากกว่า ส่วนในชุดควบคุมทั้งในน้ำและดินตะกอนจำนวนแบคทีเรียในกลุ่ม Sulfide Oxidizers จะมีจำนวนลดลงตามระยะเวลาการทดลอง โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสำคัญต่อระบบเพาะเลี้ยงในการทำหน้าที่ให้เกิดปฏิกิริยาซัลไฟด์ออกซิเดชันเพื่อเปลี่ยนแปลงไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่มีความเป็นพิษต่อสัตว์ไปเป็น Elemental Sulfur (S^0) ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน จากการทดลองแบคทีเรียกลุ่ม Sulfide Oxidizers ในชุดทดลองมีปริมาณมากกว่าชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะสีดินตะกอนในชุดควบคุมจะดำและมีกลิ่นเหม็นมากกว่าชุดทดลอง อีกทั้งการสะสมของไฮโดรเจนซัลไฟด์ในชุดควบคุมจะมีผลไปยังการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มไนตริไฟเออร์ (Nitrifier) ส่งผลให้มีการสะสมของแอมโมเนียและไนไตรต์ รวมถึงเกิดการผลิตไนเทรตซึ่งเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันได้ต่ำ (Burford et al., 2003) โดยกลุ่มแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยานี้จะเป็นพวก Chemolithotrophs เช่น *Beggiatoa* และ *Thiothrix* โดยที่จำนวนของแบคทีเรียกลุ่ม Sulfide Oxidizers ในน้ำและดินตะกอนจะถูกจำกัดด้วยการสัมผัสระหว่างไฮโดรเจนซัลไฟด์และออกซิเจน (H_2S/O_2 interface) ที่ปรากฏในชั้นน้ำและบริเวณดินตะกอนที่ออกซิเจนสามารถซึมผ่านไปได้ (Ghosh et al., 2004)

การปรับปรุงคุณภาพน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยแบคทีเรียผสมทั้ง 6 ชนิดนี้สามารถทำให้บ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในชุดทดลองเกิดการย่อยสลายหรือเปลี่ยนแปลงไนเทรต ไนไตรต์ และแอมโมเนีย ทำให้มีความเข้มข้นลดลงจากปฏิกิริยาต่าง ๆ ในวัฏจักรไนโตรเจน โดยเฉพาะปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชัน พร้อมทั้งการแพร่กระจายของแบคทีเรียในกลุ่ม Ammonia Oxidizers และ Nitrite Oxidizers ที่มีมากกว่าชุดควบคุม โดยจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแอมโมเนียและไนไตรต์ที่เพิ่มขึ้น มีการสะสมของสารอินทรีย์ในปริมาณที่ต่ำกว่า สามารถช่วยลดแบคทีเรียก่อโรคในกลุ่ม *Vibrio* sp. และมีจำนวนของ Sulfide Oxidizers ในปริมาณที่มากกว่าทำให้เกิดการสะสมของไฮโดรเจนซัลไฟด์ในปริมาณที่ต่ำกว่าในชุดควบคุม ดังนั้นจากการทดลองสามารถที่จะนำกลุ่มแบคทีเรียนี้ไปพัฒนาเพื่อประโยชน์ในการบำบัดน้ำจากการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ช่วยลดการเปลี่ยนถ่ายน้ำและแก้ไขปัญหาแหล่งน้ำธรรมชาติเสื่อมโทรมจากการมีสารอาหารมากเกินไป ซึ่งจะนำไปสู่ความสมดุลของระบบสิ่งแวดล้อมและการเพาะเลี้ยงกุ้งอย่างยั่งยืนต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาคุนสมบัติของแบคทีเรียแต่ละชนิดต่อไปว่าจัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มใดที่มีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงสารประกอบไนโตรเจน เพื่อการใช้ประโยชน์ที่เหมาะสม
2. ควรศึกษาวิธีการในการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาแบคทีเรีย เพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการนำไปใช้ประโยชน์ในการบำบัดน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ หรือน้ำเสียจากแหล่งอื่นๆ
3. ควรมีการศึกษานำแบคทีเรียผสมไปพัฒนาการนำไปใช้ประโยชน์ เช่นนำไปผลิตเป็นไบโอฟิล์ม หรือใช้ร่วมกับการบำบัดน้ำเสียวิธีอื่น ๆ เช่น การใช้แบคทีเรียผสมร่วมกับการใช้สาหร่าย หรือการใช้แบคทีเรียผสมร่วมกับโคโคซาน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพลดความเข้มข้นของไนเทรต ไนไตรต์ แอมโมเนียและฟอสเฟต
4. ควรศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้แบคทีเรียผสม จากการตรวจติดตามการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่เติมลงไป เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการลดความเข้มข้นของไนเทรต ไนไตรต์ แอมโมเนียและฟอสเฟต โดยไม่ก่อให้เกิดการสะสมของสารอินทรีย์ในปริมาณที่มาก