บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการแยกคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียให้ได้เชื้อบริสุทธิ์นั้น ทำได้ยากเมื่อเปรียบเทียบกับออโตโทรฟิคแบคทีเรียชนิดอื่น เนื่องจาก เป็นแบคทีเรียที่มีขนาดเล็ก และมีจำนวนน้อยในธรรมชาติ (Koops และ Moller, 1991) ดังนั้นในขั้นตอนแรกของการแยกเชื้อ จึงต้องเพิ่มจำนวนในอาหารเหลวที่มีแหล่งอาหารสมบูรณ์ เช่น มีอาหารอนินทรีย์ในโตรเจนได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต หรือเติมโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณที่เหมาะสม และติดตามการเจริญของเชื้อ โดยเติมฟีนอล เรดซึ่งเป็นอินดิเคเตอร์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 8.5 ทำให้สีของฟีนอลเรดเป็นสีแดง และเมื่อมีการเจริญของ คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย ที่สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์ จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรด สีของอินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง ดังรูปที่ 57 และ 58 ในภาคผนวก ง สำหรับการเจริญของโคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งพบว่ามีขนาด 0.5 ถึง 1.0 มิลลิเมตร มีลักษณะใส ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Koops และคณะ (1976) ที่พบว่าคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทะเลมักเป็นแบคทีเรียในสกุล *Nitrosomonas* sp. เช่น *Nitrosomonas marina* *Nitrosomonas halophila* *Nitrosomonas aestuarii* และ *Nitrosomonas cryotolerans* แบคทีเรียในกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียจำพวกแกรมลบมีรูปร่างเป็นแท่งสั้น นอกจากนี้อาจพบแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลมในสกุล *Nitrosococcus* sp. ได้แก่ *Nitrosococcus oceanus* (Koops และคณะ, 1991)

การเพาะเลี้ยงแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียบริสุทธิ์ในอาหารเหลวสูตร 3 ที่ไม่ได้เติมอินดิเคเตอร์ ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ให้อากาศโดยการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน พบว่าการเจริญของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียในอาหารจะมีลักษณะใสไม่มีสี จะทำให้เห็นได้ว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่ง Allison และ Prosser (1992) รายงานว่า การเจริญของ คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียในอาหารเหลวจะไม่ทำให้อาหารขุ่น (barely turbid)

ในการตรวจสอบว่าเป็นคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียนั้น นอกเหนือจากศึกษาลักษณะโครงสร้างสัณฐาณ (morphological structure) (Watson และคณะ ,1989) แล้ว ทำได้โดย การทดสอบ ความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์ ความสามารถในการเจริญในอาหารอินทรีย์ และการยับยั้งโดยไนตราไพริน ซึ่งในงานวิจัยนี้ ได้คัดเลือกเชื้อที่มีรูปร่างเป็นแท่ง และติดสีแกรมลบ ได้ทั้งหมด 9 สายพันธุ์ พบว่ามีเพียง 4 สายพันธุ์ที่สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียได้ คือ แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A1 A3, A4 และ A7 ซึ่ง แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A1 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงจังหวัดชลบุรี ส่วนแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A3, A4 และ A7 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล เมื่อทดสอบความสามารถในการใช้สารอินทรีย์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว พบว่า แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A1 สามารถเจริญได้ในอาหารทุกชนิดคือ อาหารมารีน อาหารนิวเตรียนท์ อาหารทริปติเคส ซอย อาหารฟลูอิด ไธโอไกลคอลเลต และอาหารออร์แกนนิค แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A3 สามารถเจริญได้ในอาหารทริปติเคส ซอย อาหารฟลูอิด ไธโอไกลคอลเลต และอาหารออร์แกนนิค ส่วนแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A4 และแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 สามารถเจริญได้ในอาหารทริปติเคส ซอย และอาหารฟลูอิด ไธโอไกลคอลเลต ซึ่งโดยปรกติคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารอินทรีย์ไนโตรเจน สำหรับการทดลองนี้สามารถอธิบายได้ โดยอาศัยข้อมูลจากการรายงานของ Pan และ Umbreil (1977) ว่าคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสามารถเจริญแบบเฮทเทอโรโทรฟิคแบคทีเรียได้ โดยมีบางสายพันธุ์ที่ใช้อาหารอินทรีย์ในการเจริญได้คือ *Nitrosomonas europaea* ที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีกลูโคส และจากการที่แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A3 , A4 และ A7 สามารถเจริญในอาหารทริปติเคส ซอย และ อาหารฟลูอิด ไธโอไกลคอลเลตได้ เนื่องจากอาหารดังกล่าว เป็นอาหารที่มี กลูโคสเป็นส่วนประกอบ (ภาคผนวก ก) แบคทีเรียจึงใช้กลูโคส เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญ จะเห็นได้ว่าสอดคล้องกับการศึกษาของ Krummel และ Harms (1982) ที่ทดลองเลี้ยงคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารอินทรีย์ ได้แก่ ฟอร์มท อะซิเตท ไพรูเวท กลูโคส และ เปปโตน แทนที่แอมโมเนียมซัลเฟต พบว่า *Nitrosomonas* sp. สามารถเจริญ และสร้างไนไตรท์ได้ ในขณะที่ *Nitrosococcus* sp. ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะเดียวกันดังกล่าว และจากการที่ แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A3 , A4 และ A7 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ อธิบายได้ว่าเป็นเพราะกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียดังกล่าวมีลักษณะที่

แตกต่างจากคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียชนิดอื่น คือสามารถใช้กลูโคสเป็นโคแฟ็คเตอร์ ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ในกระบวนการเมตาบอลิซึม (Krummel และคณะ ,1981) จากผลที่ได้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่า เป็นคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย ดังนั้น จึงได้ทดสอบการถูกยับยั้งการสร้างไนไตรท์โดยใช้ไนตราไพริน ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเฉพาะคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Belser,1979) สำหรับการทดลองในครั้งนี้ได้เติมไนตราไพรินความเข้มข้น 21.9 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 2 มิลลิลิตรต่อลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 และผลจากการทดลองพบว่าแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการสร้างไนไตรท์ด้วยไนตราไพริน ได้แก่ แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A3 , A4 และ A7 ส่วนแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A1 ไม่ถูกยับยั้งด้วยไนตราไพริน จึงจัดได้ว่าแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A3 A4 และ A7 เป็นแบคทีเรียในกลุ่มคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย และยังพบว่ามีการสร้างไนไตรท์ในการทดลองที่เติมไนตราไพรินในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งปรกติไนตราไพรินจะยับยั้งการออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์ จึงไม่ควรจะมีไนไตรท์เกิดขึ้น สำหรับไนไตรท์ที่พบนี้เป็นไนไตรท์ที่ปะปนมากับหัวเชื้อซึ่งได้ผ่านการบ่มเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน เพราะเป็นระยะเวลาที่คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์ได้ (Campbell และ Aleem, 1965) และ (Powell และ Prosser,1986)

จากการศึกษาโครงสร้างของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A3, A4 และ A7 พบว่าทั้ง 3 ชนิด ย้อมติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่ง จึงน่าที่จะจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียจำพวก *Nitrosomonas* sp.

สำหรับการเปรียบเทียบหาคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพของสูงของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียที่แยกได้ คือ A3 , A4 และ A7 ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์ วัดปริมาณไนไตรท์ด้วยวิธี ไดอาโซไทเซชัน พบว่า คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 มีประสิทธิภาพสูงที่สุด รองลงมาคือ คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A3 และ คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A4 ตามลำดับ โดยคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 มีการสร้างไนไตรท์ได้ในปริมาณที่สูงกว่า คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A3 และ A4 3 เท่า ดังนั้นจึงได้น่า คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 มาศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็น

ไนไตรท์ โดยศึกษาผลของแอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมคลอไรด์ ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ รวมทั้งการให้อากาศโดยการเขย่า

จากผลการศึกษาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีผลต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย พบว่ามีการสร้างไนไตรท์ในปริมาณสูงที่สุดคือในสภาวะที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 4 มิลลิโมลาร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 รองลงมาคือ 5 และ 3 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่ง Carlucci และ Strickland (1968) รายงานว่าคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียมีอัตราการออกซิไดซ์เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้น สำหรับการทดลองนี้เมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณ 5 มิลลิโมลาร์ การสร้างไนไตรท์ของ คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 มีปริมาณที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณไนไตรท์ที่เกิดขึ้นในสภาวะที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 4 มิลลิโมลาร์ แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการสร้างไนไตรท์ในสภาวะที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 3 มิลลิโมลาร์ อย่างไรก็ตามพบว่ามีการสร้างไนไตรท์เกิดขึ้นทั้งในสภาวะที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 3, 4 และ 5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นไปตามการรายงานของ Bock Koops และ Harms (1986) ว่า คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียเจริญได้ในช่วงที่มี แอมโมเนียในปริมาณตั้งแต่ 2 ถึง 10 มิลลิโมลาร์ แต่หากปริมาณแอมโมเนียที่สูงเกินไป สามารถยับยั้งการสร้างไนไตรท์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียบางสายพันธุ์ได้

ในการศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการสร้างไนไตรท์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และพบว่า คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 สร้างไนไตรท์ได้ดีในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 รองลงมาคือในสภาวะที่เติมโซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 25 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีการสร้างไนไตรท์เกิดขึ้นในปริมาณที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการสร้างไนไตรท์ของ คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ที่เลี้ยงในสภาวะที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์พบว่ามีปริมาณแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงเห็นได้ว่าคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำกร่อย สามารถสร้างไนไตรท์ได้ทั้งในสภาวะที่เติมและไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ แต่จะมีการสร้างไนไตรท์ดีขึ้นหากมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ 10 หรือ 25 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Koops และคณะ (1976) ว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำกร่อย เจริญได้

ในน้ำจืดและน้ำเค็มได้เช่นกัน จึงแสดงว่าคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียที่แยกได้เป็นสายพันธุ์ที่ต้องการโซเดียมคลอไรด์ และการสร้างไนไตรท์เกิดขึ้นได้ดีเมื่อมีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่พอเหมาะ และอยู่ในช่วงของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทะเล ตามรายงานของ Jones และ Hood (1980) พบว่าคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียจากน้ำทะเลต้องการโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ปริมาณ 1.0 ถึง 2.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำจืดก็ต้องการโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญในปริมาณ 0.3 ถึง 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโซเดียมคลอไรด์เป็นแร่ธาตุที่จำเป็นและสำคัญสำหรับกิจกรรมภายในเซลล์ของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย Koops Harms และ Wehrmann (1976) ได้แยก *Nitrosococcus mobilis* จากน้ำกร่อย พบว่ามีความสามารถในการเจริญได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ หากเพิ่มปริมาณโซเดียมคลอไรด์เป็น 2.5 เปอร์เซ็นต์การเจริญนี้จะลดลงเหลือ 25 เปอร์เซ็นต์

เมื่อศึกษาผลของความเป็นกรดด่างที่มีผลต่อการสร้างไนไตรท์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์ของ คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 คือ 7.0 ถึง 8.0 ซึ่งเป็นสภาวะที่มีความเป็นกลางถึงเป็นด่างเล็กน้อย และสอดคล้องกับการศึกษาของ Koops และคณะ (1976) พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับ *Nitrosococcus mobilis* คือ 7.5 และมีการออกซิไดซ์น้อยในสภาวะที่ค่าความเป็นกรดด่าง 8.8 Jones และ Hood (1980) พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเค็ม คือ 8.0 แต่จากการศึกษาของ Bock และคณะ (1986) พบว่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมคือ 7.5 จะเห็นได้ว่าคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสร้างไนไตรท์ได้ปริมาณสูงในสภาวะที่เป็นกลางหรือเป็นด่างเล็กน้อย สำหรับการศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่มีผลต่อคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย พบว่า ที่ค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 7.0 ถึง 9.0 คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียส่วนใหญ่มีความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนียได้ดี และมีการสร้างไนไตรท์ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่ค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 6 เช่นเดียวกับการศึกษาการออกซิไดซ์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ในภาวะที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6 พบว่ามีการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์ลดลงมากกว่าในสภาวะที่ค่าความเป็นกรดด่าง 9 นอกจากนี้ไม่เคยมีรายงานพบว่าคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียมีการเจริญและมีความสามารถในการออกซิไดซ์ได้ในสภาวะที่เป็นกรด อธิบายได้ว่าความเป็นกรดด่างมีผลต่อการ

ทำงานของเอนไซม์แอมโมเนียโมโนออกซิเจนเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในปฏิกิริยาการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย โดยปรกติเอนไซม์เป็นโปรตีนที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความเป็นกรดด่าง ถ้าหากอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมการทำหน้าที่ของเอนไซม์ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ตามปรกติ จึงทำให้การออกซิไดซ์ไม่สามารถเกิดขึ้นได้เช่นกัน

สำหรับปัจจัยที่มีความสำคัญในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย ให้เป็นไนไตรท์ ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย อีกประการหนึ่ง คือ อุณหภูมิ เมื่อศึกษาการสร้างไนไตรท์ของ A7 พบว่า มีการสร้างไนไตรท์ได้ดีที่สุดในสภาวะที่ทดลองที่อุณหภูมิห้องซึ่งอยู่ในช่วง 28 ถึง 32 องศาเซลเซียส Fdz-Palanco และคณะ (1994) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับ การสร้างไนไตรท์ของ *Nitrosomonas* sp. คือ 30 องศาเซลเซียส แต่มีความสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 10 ถึง 35 องศาเซลเซียส แบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งต่างกันมีความสามารถในการเจริญและออกซิไดซ์ไนไตรท์ได้ที่อุณหภูมิต่างกัน เช่นคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียที่แยกได้จากเขตหนาวคือ *Nitrosomonas cryotolerans* มีการเจริญและมีการออกซิไดซ์ไนไตรท์ได้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (Jones และคณะ, 1988) ในขณะที่คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียที่แยกได้จากเขตร้อนก็จะไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะดังกล่าว จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 เป็นคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียที่แยกได้จากเขตร้อนสามารถเจริญและมีประสิทธิภาพสูงในสภาวะที่อุณหภูมิ 30 ถึง 32 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิลดลงถึง 20 องศาเซลเซียส พบว่ามีการออกซิไดซ์ลดลง 75.19 เปอร์เซ็นต์ จึงสรุปได้ว่า คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 จัดอยู่ในกลุ่มมีโซฟิลิก

นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณออกซิเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญในปฏิกิริยาออกซิไดซ์แอมโมเนีย โดยออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้ายที่ทำให้ปฏิกิริยาแอมโมเนียออกซิเดชันเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ การทดลองนี้ได้ศึกษาในระบบชวดเขย่า พบว่า ปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมสำหรับ คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 คือที่อัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที รองลงมา คือภาวะที่อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ซึ่งมีการสร้างไนไตรท์ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และที่อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาทีพบว่ามีการสร้างไนไตรท์ลดลงเป็น 2 เท่าของอัตราการเขย่าที่ 200 และ 300 รอบต่อนาที ส่วนในสภาวะที่ไม่ได้เขย่า จะเห็นได้ว่ามีการสร้างไนไตรท์เกิดขึ้นในปริมาณที่น้อยกว่าในสภาวะที่ให้ออกซิเจนโดย

วิธีเขย่าชวดในปริมาณที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Ward (1984) ว่าภาวะที่มีออกซิเจนน้อย การออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ เนื่องจากขาดออกซิเจนที่จะทำหน้าที่รับอิเลคตรอนตัวสุดท้ายในปฏิกิริยาแอมโมเนียออกซิเดชัน และแอมโมเนียจึงจะเปลี่ยนเป็นไนตริกออกไซด์

สำหรับแยกเชื้อคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียจากน้ำกร่อย ได้แบคทีเรีย 2 ชนิดที่มีรูปร่างแตกต่างกัน คือ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 มีรูปร่างเป็นรูปลูกแพร์ มีขนาดไม่แน่นอน โดยทั่วไปพบประมาณ 0.5 ถึง 1.0 x 0.2 ถึง 0.5 ไมโครเมตร มีการขยายพันธุ์แบบไบนารีฟิชชัน แต่เนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน ดังนั้นเมื่อมีการขยายพันธุ์ ส่วนใหญ่พบว่าการแบ่งเซลล์ไม่สมมาตรกันทำให้มีรูปร่างคล้ายการแตกหน่อของยีสต์ ขณะที่ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N2 เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม การเรียงตัวพบเป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม การเจริญของ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 และ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมีความแตกต่างกันกล่าวคือ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 มีการเจริญบริเวณรอบขอบของภาชนะ (wall growth) ส่วน คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N2 ไม่มีการเจริญบริเวณดังกล่าว ซึ่ง สอดคล้องกับการรายงานของ Keen และ Prosser (1987) แต่ Bock และคณะ (1990) พบว่า *Nitrobacter* sp. มีการเจริญบริเวณขอบภาชนะ ดังนั้นคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 จึงน่าจะจัดอยู่ในกลุ่ม *Nitrobacter* sp. การทดสอบเปรียบเทียบการสร้างไนเตรทของแบคทีเรียด้วยไดฟีนิลเอมีนรีเอเจนต์ พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ ทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถเปลี่ยนไนไตรท์เป็นไนเตรทได้ และคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 มีประสิทธิภาพในการออกซิไดซ์ไนไตรท์ให้เป็นไนเตรทได้ดีกว่า คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N2 ดังนั้นจึงได้นำคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 มาศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมในการสร้างไนเตรท โดยศึกษาผลกระทบของปริมาณโซเดียมไนไตรท์ โซเดียมคลอไรด์ ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และอัตราการเขย่า

ในการศึกษาปริมาณโซเดียมไนไตรท์ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 พบว่าสามารถออกซิไดซ์ไนไตรท์ได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ที่เติมโซเดียมไนไตรท์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Waterbury (1971) ได้รายงานว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *Nitrobacter*

mobilis คือ 20 มิลลิโมลาร์ และ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 มีการสร้างไนเตรทได้น้อยลงในสภาวะที่มี ปริมาณโซเดียมไนไตรท์ 25 หรือ 30 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ Bock Koops และ Harms (1992) รายงานว่าคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีโซเดียมไนไตรท์ปริมาณ 2 ถึง 30 มิลลิโมลาร์ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มีความต้องการปริมาณไนไตรท์ในปริมาณที่ต่างกัน

ในการศึกษาผลกระทบของโซเดียมคลอไรด์พบว่า คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 มีประสิทธิภาพในการออกซิไดซ์ไนไตรท์ได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร และรองลงมาคือในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 25 กรัมต่อลิตร โดยมีการออกซิไดซ์ไนไตรท์ให้เป็นไนเตรทในปริมาณที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมโซเดียมคลอไรด์คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 มีการสร้างไนเตรทในปริมาณที่สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 มีการสร้างไนเตรทได้ดีในน้ำกร่อย

ในการศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่มีผลต่อการออกซิไดซ์ไนไตรท์ของ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 พบว่า ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 7 และ 8 N1 มีประสิทธิภาพดีที่สุดและมีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับความสามารถในการออกซิไดซ์ไนไตรท์ของ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6 และ 9 พบว่ามีไนเตรทเกิดขึ้นปริมาณน้อย ซึ่งจะเห็นได้ว่าการสร้างไนเตรทของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 จะเกิดขึ้นได้ดีในช่วงของค่าความเป็นกรดด่าง 7 ถึง 8 ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Bock และคณะ (1990) ว่า ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับ *Nitrobacter* sp. คือ 7.6 ถึง 7.8 ในกรณีที่ค่าความเป็นกรดด่างสูงหรือต่ำเกินไป เป็นเหตุให้ประสิทธิภาพลดน้อยลง หรือ แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ เนื่องจากค่าความเป็นกรดด่างมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไนไตรท์ออกซิเดส (nitrite oxidase) ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ในปฏิกิริยาไนไตรท์ออกซิเดชัน ของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียไม่สามารถเปลี่ยนไนไตรท์เป็นไนเตรทได้

นอกจากค่าความเป็นกรดด่างที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แล้ว การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิยังเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการออกซิไดซ์ไนไตรท์ให้เป็นไนเตรทของแบคทีเรีย

Bock และคณะ (1990) รายงานว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย คือ 23 ถึง 28 องศาเซลเซียส สำหรับการทดลองนี้ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์ไนไตรท์ของ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 คือ 32 องศาเซลเซียส และรองลงมาคือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งพบไนเตรทในปริมาณที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส จะมีการสร้างไนเตรทลดลงแสดงว่า คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มมีโซฟิลิก

คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรีย ที่เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (facultative aerobe) ในการศึกษาความเหมาะสมของออกซิเจนในการออกซิไดซ์ไนไตรท์ของ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 โดยวิธีขวดเขย่า พบว่า ที่อัตราการเขย่า 100 และ 200 รอบต่อนาที คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 มีการออกซิไดซ์ไนไตรท์ได้ดี และมีการยับยั้งการออกซิไดซ์ไนไตรท์ และที่อัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Payne (1979) Boon และ Laudelout (1962) ที่รายงานว่า ภายใต้สภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำ *Nitrobacter* sp. ออกซิไดซ์ไนไตรท์ได้ดี ถ้าหากปริมาณออกซิเจนมากเกินไปจะมีผลยับยั้งปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในการที่ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 จะออกซิไดซ์ไนไตรท์ได้นั้น ต้องมีปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสม

การทดสอบประสิทธิภาพในการลดปริมาณแอมโมเนียของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ในระบบบริเซอคูเลชัน โดยเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียและปริมาณของไนไตรท์ในชุดทดลองและชุดควบคุม ซึ่งได้ผลเป็นที่ชัดเจนว่าปริมาณของแอมโมเนียในชุดทดลองลดลงมากกว่าในชุดควบคุม และในทำนองเดียวกันปริมาณของไนไตรท์ในชุดทดลองได้เพิ่มมากกว่าในชุดควบคุม ซึ่งความสัมพันธ์การลดลงของแอมโมเนียและการเพิ่มขึ้นของไนไตรท์เป็นแบบแปรผกผัน แสดงให้เห็นว่า คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 มีประสิทธิภาพในการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์ ซึ่งสามารถยืนยันได้จากลักษณะเซลล์ที่พบบนวัสดุรองซีโอไลท์ภายหลังจากการทดสอบ 30 วัน ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับเซลล์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ที่บริสุทธิ์ ในชุดควบคุมที่ได้ใส่ซีโอไลท์ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วยังพบว่า มีการลดลงของแอมโมเนียและมีการเพิ่มขึ้นของไนไตรท์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเกิดการเจือปนของแบคทีเรียแปลก

ปลอม เนื่องจากน้ำกร่อยที่ใช้ทดสอบไม่ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ แต่เมื่อศึกษาดูวัสดุตรึงซีโอไลท์ในชุดควบคุม ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบแบคทีเรียที่แปลกปลอมมีลักษณะดังรูปที่ 41 เป็นแท่งขนาดยาว 2 ถึง 5 ไมโครเมตร ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ในชุดควบคุมมีการลดลงของแอมโมเนียและมีการเพิ่มขึ้นของไนไตรท์ สำหรับแบคทีเรียที่แปลกปลอมนี้ ยังพบกระจายอยู่บนวัสดุตรึงซีโอไลท์ในชุดทดลองเช่นเดียวกัน

การเปลี่ยนแปลงการลดลงของแอมโมเนียและไนไตรท์ในชุดทดลองและชุดควบคุมเกิดขึ้นเป็นช่วงๆ ตลอดระยะเวลาของการทดลอง 30 วัน แต่ในชุดทดลองจะมีการลดลงของแอมโมเนียและการเพิ่มขึ้นของไนไตรท์ได้เร็วกว่าในชุดควบคุม ค่าความเป็นกรดด่างในชุดทดลองและชุดควบคุมมีการลดลง ทั้งนี้เนื่องจากกรดไนไตรท์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น แต่การลดลงนี้ไม่มากนัก เมื่อวิเคราะห์แล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเป็นเพราะกรดไนไตรท์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น แตกตัวเป็นไฮโดรเจนอิออนและถูกยึดไว้บนวัสดุตรึงซีโอไลท์

การทดสอบประสิทธิภาพในการลดปริมาณไนไตรท์ของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในระบบบริเซอคูเลชัน โดยเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของไนไตรท์และปริมาณของไนเตรทในชุดทดลองและชุดควบคุม ซึ่งได้ผลเป็นที่ชัดเจนว่าปริมาณของไนไตรท์ในชุดทดลองลดลงมากกว่าในชุดควบคุม และ ในทำนองเดียวกันปริมาณของไนเตรทในชุดทดลองได้เพิ่มมากกว่าในชุดควบคุม ซึ่งความสัมพันธ์การลดลงของไนไตรท์และการเพิ่มขึ้นของไนเตรทเป็นแบบแปรผกผัน แสดงให้เห็นว่า คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 มีประสิทธิภาพในการออกซิไดซ์ไนไตรท์ให้เป็นไนเตรท ซึ่งสามารถยืนยันได้จากลักษณะเซลล์ที่พบบนวัสดุตรึงซีโอไลท์ภายหลังจากการทดสอบ 30 วัน ที่มีลักษณะคล้ายกับเซลล์ของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ที่บริสุทธิ์ สำหรับในชุดควบคุมที่ได้ใส่ซีโอไลท์ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วยังพบว่ามีการเจือปนของแบคทีเรียแปลกปลอมเนื่องจากน้ำกร่อยที่ใช้ทดสอบไม่ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ แต่เมื่อศึกษาดูวัสดุตรึงซีโอไลท์ในชุดควบคุมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบแบคทีเรียที่เจือปนมีลักษณะเป็นแท่งขนาดยาว 2 ถึง 5 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเดียวกับแบคทีเรียแปลกปลอมที่กระจายในการทดลองในระบบบริเซอคูเลชันของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7

การเปลี่ยนแปลงการลดลงของไนไตรท์และไนเตรท ในชุดทดลองและชุดควบคุมเกิดขึ้นเป็นช่วง ๆ ตลอดระยะเวลาของการทดลอง 30 วัน แต่ในชุดทดลองจะมีการเปลี่ยนแปลงได้เร็วกว่าในชุดควบคุม ค่าความเป็นกรดด่างในชุดทดลองและชุดควบคุมไม่มีการเปลี่ยนแปลง การลดลงของไนไตรท์และการเพิ่มขึ้นของไนเตรทมากนัก

เมื่อเปรียบเทียบการสร้างไนไตรท์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ในการทดลองระดับชวดเขย่า กับ การสร้างไนไตรท์คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ที่ตรึงบนวัสดุตรึงซิโอไลท์ในการทดลองในระบบรีเซอคูเลชัน พบว่า การสร้างไนไตรท์ในการทดลองระดับชวดเขย่ามีปริมาณน้อยกว่าการสร้างไนไตรท์ในการทดลองในระบบรีเซอคูเลชัน และการสร้างไนเตรทของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในระดับชวดเขย่ามีปริมาณน้อยกว่า การสร้างไนเตรท ในระบบรีเซอคูเลชัน เช่นเดียวกัน อธิบายได้ว่า เนื่องจาก ในระบบรีเซอคูเลชันมีการตรึงคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ทำให้แบคทีเรียดังกล่าวยึดเกาะกับวัสดุตรึง และวัสดุตรึงมีลักษณะเป็นรูพรุนซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการยึดเกาะของแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียสามารถสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) (Takamizawa และคณะ, 1993) ที่มีคุณสมบัติเป็นโพลิเมอร์ (extracellular polymer) ออกมานอกเซลล์ Bock และคณะ (1990) รายงานว่า ไบโอฟิล์มของคีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรีย คือ poly - β - hydroxybutarate โดยไบโอฟิล์มสามารถต้านการเคลื่อนที่ของอิออนที่แพร่กระจายอยู่ในน้ำ เช่น แอมโมเนีย หรือ ไนไตรท์ ดังนั้นการเคลื่อนที่ของอิออนจึงช้าลง และสัมผัสกับไบโอฟิล์มของคีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรีย ทำให้คีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรียที่ยึดเกาะบนวัสดุตรึงสามารถนำ แอมโมเนีย หรือ ไนไตรท์ไปใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ดีกว่าเซลล์อิสระในอาหารเหลวในการทดลองโดยวิธีชวดเขย่า และเหตุผลอีกประการหนึ่งคือในระบบเปิดอาจมีแบคทีเรียชนิดอื่นเจริญได้ ที่มีผลกระตุ้นปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ของคีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรียได้ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Steinmuller และ Bock (1976) Blanc และ คณะ (1986) พบว่าการสร้างไนเตรทของ *Nitrobacter* sp. ในสภาวะที่มีเฮทเทอโรฟิคแบคทีเรีย เช่น *Pseudomonas* sp เจือปนอยู่จะมีอัตราการสร้างไนเตรทได้ดีกว่าในสภาวะที่มี *Nitrobacter* sp. บริสุทธิ์ เนื่องจาก *Pseudomonas* sp. อาจสร้างสารบางอย่างมากระตุ้นการเจริญของ *Nitrobacter* sp. หรือสามารถกำจัดสารพิษที่เป็นสารยับยั้งการสร้างไนเตรทของ *Nitrobacter* sp. ได้

การทดสอบประสิทธิภาพในการออกซิไดซ์แอมโมเนียของเชื้อผสมคีโมออโตโทรพิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และ คีโมออโตโทรพิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในการทดลองระบบรีเซอคูเลชัน โดยเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย ปริมาณของไนไตรท์ และปริมาณไนเตรท ในชุดทดลองและชุดควบคุม ซึ่งได้ผลเป็นที่ชัดเจนว่าปริมาณของแอมโมเนียในชุดทดลองลดลงมากกว่าในชุดควบคุม และในทำนองเดียวกันปริมาณของไนเตรทในชุดทดลองได้เพิ่มมากกว่าในชุดควบคุม ในขณะที่ปริมาณไนไตรท์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก ซึ่งความสัมพันธ์การลดลงของแอมโมเนียและ การเพิ่มขึ้นของไนเตรทเป็นแบบแปรผกผัน แสดงให้เห็นว่า คีโมออโตโทรพิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 มีประสิทธิภาพในการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์ และคีโมออโตโทรพิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 มีประสิทธิภาพในการออกซิไดซ์ไนไตรท์ให้เป็นไนเตรท ซึ่งสังเกตได้จากการลดลงของแอมโมเนียในชุดทดลอง การเพิ่มขึ้นของไนเตรทในชุดทดลอง และการที่ไม่พบการสะสมของไนไตรท์ในชุดทดลอง แสดงว่าเมื่อคีโมออโตโทรพิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์ และคีโมออโตโทรพิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 สามารถรับถ่ายทอดไนไตรท์และออกซิไดซ์ให้เป็นไนเตรทได้ทันทีจึงทำให้ไม่มีการสะสมหรือตกค้างของไนไตรท์เป็นจำนวนมาก จึงแสดงให้เห็นว่าการทำงานระหว่างคีโมออโตโทรพิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และคีโมออโตโทรพิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 มีความสัมพันธ์ในลักษณะคอมเมนซาลิซึม (Comensalism) เกื้อหนุนและอาศัยอยู่ร่วมกัน ซึ่งสามารถยืนยันได้จากการตรวจพบลักษณะเซลล์บนวัสดุตรึงซีโอไลท์ภายหลังจากการทดสอบ 60 วัน ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับเซลล์ของคีโมออโตโทรพิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ที่บริสุทธิ์ และไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ที่บริสุทธิ์ ในขณะที่ไม่พบเซลล์ที่มีลักษณะดังกล่าวในชุดควบคุม และปรากฏการณ์หนึ่งที่เกิดขึ้นคือ ในวันที่ 42 ในชุดทดลองมีการเจริญของสาหร่ายในเกิดขึ้นเร็วมาก โดยสังเกตจากน้ำกร่อยในถังพักเปลี่ยนเป็นสีเขียว ซึ่งเกิดขึ้นในชุดทดลองเท่านั้น ไม่ปรากฏในชุดควบคุม ในช่วงนี้จะพบว่า มีปริมาณไนเตรทเกิดขึ้นสูงสุด โดยวัดได้ 19.70 มิลลิกรัมต่อลิตร การที่ไนเตรทเกิดขึ้นมากนี้ จึงไปกระตุ้นให้มีการเจริญของสาหร่ายเกิดขึ้น ภายหลังที่สาหร่ายเกิดขึ้นแล้วปริมาณไนเตรทลดลงเหลือ 10.78 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากสาหร่ายใช้ไนเตรทเป็นอาหารในการเจริญ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Abeliovich (1985) ได้รายงานการเจริญของสาหร่ายในบ่อบำบัดน้ำทิ้ง พบว่ามีสาหร่ายหลายชนิด ได้แก่ *Oscillatoria* sp. *Chamydomonas* sp. และ *Euglena* sp. ซึ่งการเจริญของสาหร่ายสามารถเกิดขึ้นได้ดีในสภาวะที่มีแสงสว่าง มีปริมาณออกซิเจนเพียงพอ และมีสารอาหารเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญ เช่น ไนเตรท ฟอสเฟต เป็นต้น สำหรับการ

เกิดสาหร่ายในการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ในระบบมีแอมโมเนียในปริมาณน้อยที่ไม่เป็นพิษต่อการเจริญของสาหร่าย และมีไนเตรทมากพอที่จะทำให้สาหร่ายใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญ ซึ่งโดยปรกติ แอมโมเนียเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ จะยับยั้งการเจริญของสาหร่าย จากการรายงานของ Steel (1971) พบว่า สาหร่ายสามารถใช้ ไนเตรทปริมาณ 525 ไมโครกรัมต่อลิตร และ ฟอสเฟต ปริมาณ 9 ไมโครกรัมต่อลิตร งานวิจัยนี้ได้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Abeliovich (1985) ซึ่งรายงานว่าการเกิดไนตริฟิเคชันของ *Nitrosomonas* sp. และ *Nitrobacter* sp. ภายใน 30 วันแรกของการทดลอง แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสามารถสร้างไนไตรท์ได้ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบไนเตรท 15 มิลลิกรัมต่อลิตรและหลังจากนี้พบว่าปริมาณไนเตรทเพิ่มขึ้นและมีปริมาณสูงที่สุดในวันที่ 40 ของการทดลอง โดยพบปริมาณไนเตรท 160 มิลลิกรัมต่อลิตร และลดลงเหลือ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 50 ของการทดลอง โดยที่ปริมาณแอมโมเนียและปริมาณไนไตรท์ลดลงเช่นเดียวกัน

สรุปผลการทดลอง

1. ลักษณะโครงสร้างของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียที่แยกได้ สายพันธุ์ A7 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น ขนาด 0.5 x 1.0 ไมโครเมตร มีการแบ่งเซลล์แบบไบนาริฟิชชัน การสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งใช้เวลานาน 2 ถึง 4 สัปดาห์ ลักษณะโคโลนีใส มีขนาด 0.5 ถึง 1.0 มิลลิเมตร การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมี ลักษณะใส สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์ได้ จึงน่าจะจัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Nitrosomonas*

2. การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์ ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 พบว่า มีประสิทธิภาพสูงสุดที่ อุณหภูมิ 30 ถึง 32 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 7 ถึง 8 ที่อัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที ในสภาวะที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 4 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3

3. ลักษณะโครงสร้างของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่แยกได้ สายพันธุ์ N1 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่มีรูปร่างเป็นรูปลูกแพร์ ขนาด 0.5 ถึง 0.8 x 1.0 ถึง 2.0 ไมโครเมตร มีการแบ่งเซลล์คล้ายการแตกหน่อของยีสต์ การสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งใช้เวลานาน 2 ถึง 4 สัปดาห์ ลักษณะโคโลนีขุ่น มีขนาด 1.0 มิลลิเมตร การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว มีลักษณะใส พบการเจริญบนขอบภาชนะ สามารถออกซิไดซ์ไนไตรท์เป็นไนเตรทได้ จึงน่าจะเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Nitrobacter*

4. การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์ไนไตรท์ให้เป็นไนเตรทของ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 พบว่า มีประสิทธิภาพสูงสุดที่ อุณหภูมิ 30 ถึง 32 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 7 ที่อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที ในสภาวะที่เติมโซเดียมไนไตรท์ 20 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 4

5. การศึกษาประสิทธิภาพในการลดปริมาณแอมโมเนียในน้ำกร่อยของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A1 ในระบบบริเซอคูเลชันในเวลา 30 วัน พบว่าในชุดทดลองมีปริมาณแอมโมเนียลดลงมากกว่าในชุดควบคุม 2 เท่า และมีการสร้างไนไตรท์เกิดขึ้นปริมาณมากกว่าชุดควบคุม 3.5 เท่า

6. การศึกษาประสิทธิภาพในการลดปริมาณไนไตรท์ในน้ำกร่อย ของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในระบบบริเซอคูเลชันในเวลา 30 วัน พบว่าในชุดทดลองปริมาณไนไตรท์ลดลงมากกว่าในชุดควบคุม 2 เท่า และมีการสร้างไนเตรทเกิดขึ้นมากกว่าในชุดควบคุม 8 เท่า

7. การศึกษาประสิทธิภาพในการลดปริมาณแอมโมเนียในน้ำกร่อยของเชื้อผสม คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในระบบบริเซอคูเลชันในเวลา 60 วัน พบว่าในชุดทดลองมีปริมาณแอมโมเนียลดลง 3.5 เท่าและมีการสร้างไนเตรทเกิดขึ้น 23 เท่า และไม่พบไนไตรท์สะสมในน้ำในชุดทดลอง มีปริมาณสูงสุดคือ 1.32 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกับการเกิดขึ้นของไนไตรท์ในชุดควบคุม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย