

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

ตารางที่ 4.1 แสดงสมบัติของไคตินและไคโตซานที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยแบ่งออกเป็น 6 ตัวอย่างดังนี้ ตัวอย่างที่ 1 เป็นไคตินที่มีความชื้นอยู่ที่ประมาณ 6% ตัวอย่างที่ 2 และ 3 เป็นตัวอย่างไคโตซานที่นำมาใช้ในการศึกษาผลของระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลต่อประสิทธิภาพในการตรึงเชื้อในไทรต้ออกซิไดซิงแบคทีเรีย โดยควบคุมน้ำหนักโมเลกุลให้อยู่ในช่วง 3.10×10^5 - 4.10×10^5 ดาลตัน และตัวอย่างที่ 4-6 เป็นตัวอย่างไคโตซานที่นำมาใช้ในการศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลต่อประสิทธิภาพในการตรึงเชื้อในไทรต้ออกซิไดซิงแบคทีเรีย โดยควบคุมระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลให้อยู่ที่ประมาณ $90 \pm 5\%$

ตารางที่ 4.1 สมบัติของไคโตซานที่ใช้ในการศึกษา

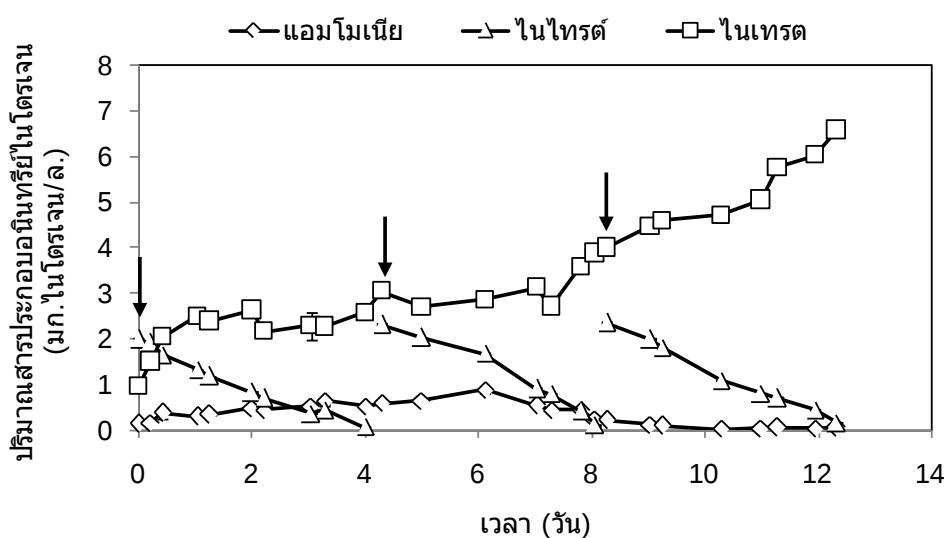
ตัวอย่างที่	ชื่อไคโตซาน	ค่าความชื้น (%)	ระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล (%)	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)
1	Chitin_21/4/09	5.83 ± 1.15	-	-
2	Chitosan Lot A	10.21 ± 0.85	91.13 ± 0.57	4.10×10^5
3	Chitosan D82	8.63 ± 0.19	82.20 ± 0.71	3.10×10^5
4	Chitosan EX II	13.13 ± 1.02	85.41 ± 0.73	5.80×10^5
5	Chitosan_10/01/11	11.64 ± 1.21	91.72 ± 0.32	7.10×10^5
6	Chitosan B	12.71 ± 0.41	92.43 ± 0.61	2.00×10^5

หมายเหตุ: การศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลและระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลของไคโตซานจะดำเนินการหลังจากได้รับทุนในปีที่ 2

4.1 ปัจจัยและสถานะที่มีผลต่อการตรึงเชื้อในไทรต้ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนไคโตซาน

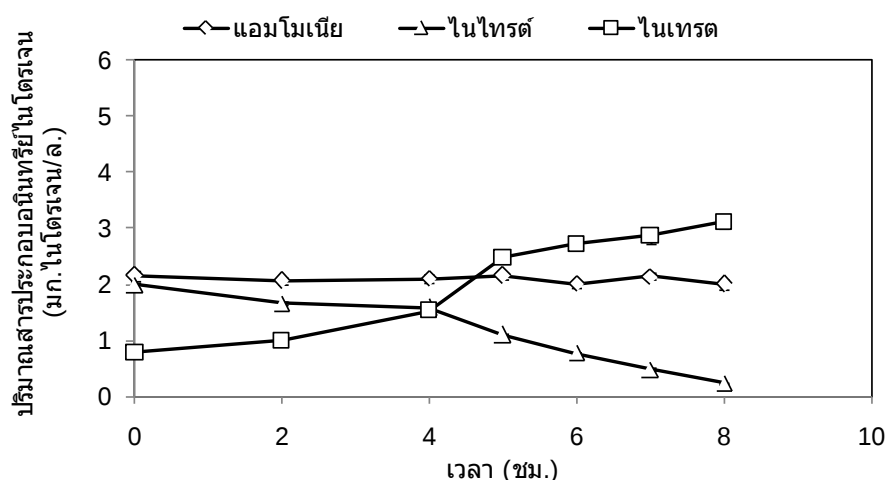
เมื่อนำตัวกลางพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนำไปแช่ในบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดที่มีกระบวนการไนตริฟิเคชันสมบูรณ์เป็นเวลา 45 วัน เพื่อให้เกิดการเกาะติดของหัวเชื้อผสมไนตริฟายอิงแบคทีเรีย พบว่า ตัวกรองมีชั้นฟิล์มบางๆ จนแทบมองไม่เห็นเคลือบอยู่บนผิวของวัสดุตัวกรอง จากนั้นนำตัวกรองชีวภาพมาเลี้ยงต่อในถังปฏิกรณ์พลาสติกเพื่อคัดเลือกให้เหลือเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม NOB และทำการตรวจวัดปริมาณแอมโมเนีย ในไทรต์ และไนเตรตเป็นระยะ ผลการทดลองพบว่าหลังจากเติมโซเดียมไนไตรต์ความเข้มข้นเริ่มต้น 2 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร อัตราการ

บำบัดไนไตรต์ของตัวกรองชีวภาพเกิดขึ้นอย่างชัดเจน ทำให้ความเข้มข้นของไนไตรต์ลดลงเหลือน้อยกว่า 0.10 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร ภายในระยะเวลา 4 วัน ในขณะที่ความเข้มข้นของไนเตรดมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และความเข้มข้นของแอมโมเนียมีค่าสูงขึ้นจาก 0.13 มก.ไนโตรเจนต่อลิตรเป็น 0.87 มก.ไนโตรเจนต่อลิตรในวันที่ 6 ของการทดลอง เนื่องจากเกิดการปลดปล่อยแอมโมเนียที่เป็นผลมาจากการย่อยสลายสารอินทรีย์และซากสิ่งมีชีวิตทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของแอมโมเนียในน้ำ ดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรด ของตัวกรองชีวภาพไนตริไฟเคชันในถังคัดเลือกเชื้อ NOB โดย (↓) แสดงวันที่ทำการเติมไนไตรต์ไปในถังปฏิกรณ์พลาดิกขนาด 6 ลิตร

เมื่อทำการสุ่มตัวอย่างตัวกรองชีวภาพออกมาทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดไนไตรต์ พบว่าหลังจากเติมไซโตแบคทีเรียไนไตรต์ความเข้มข้นเริ่มต้น 2 มก.ไนโตรเจนต่อลิตรลงในขวดโหลพลาสติกใส ไนไตรต์ถูกบำบัดลดลงจนมีค่าต่ำกว่า 0.5 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร ภายในระยะเวลา 7 ชม. โดยมีอัตราการบำบัดไนไตรต์เฉลี่ย 28.09 ± 0.58 มก.ไนโตรเจนต่อตร.ม.ต่อวัน ในขณะที่ความเข้มข้นของไนเตรดมีค่าเพิ่มมากขึ้นจาก 0.78 มก.ไนโตรเจนต่อลิตรเป็น 3.10 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร และความเข้มข้นของแอมโมเนียก่อนทำการทดลองและเสร็จสิ้นการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก ดังแสดงในภาพที่ 4.2



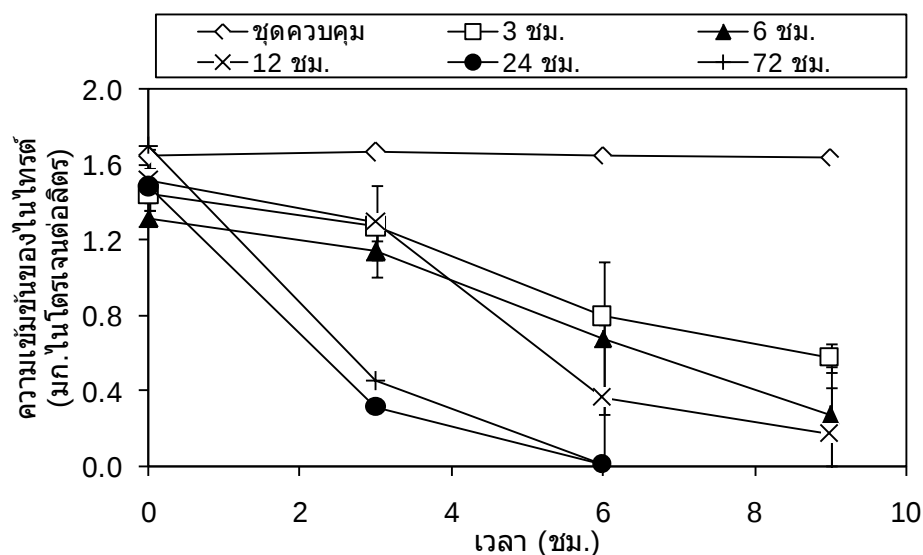
ภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรด ระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของตัวกรองชีวภาพไนตริฟิเคชันที่ทำการคัดเลือกให้เหลือแต่เชื้อ NOB

4.1.1 ผลของระยะเวลาในการตรึงเชื้อ

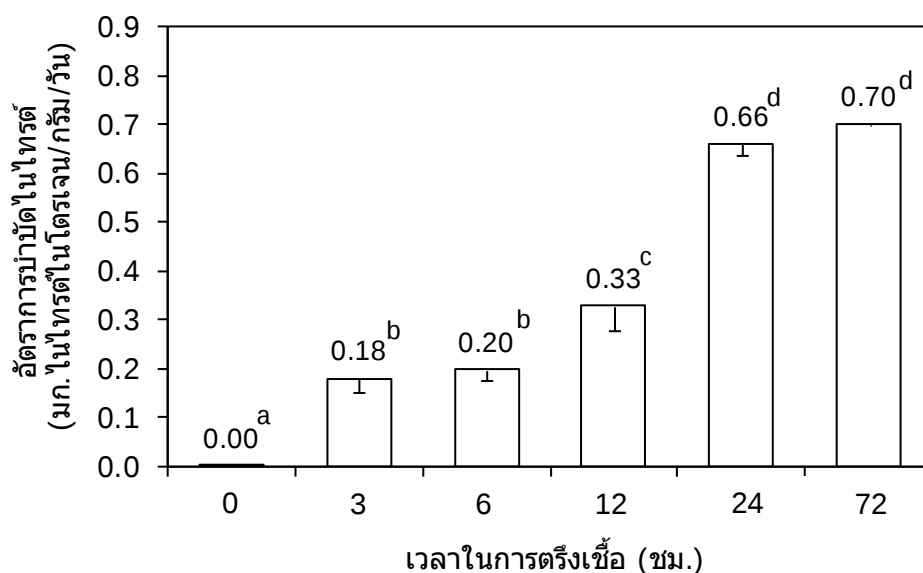
ตัวอย่างไคโตซานที่ใช้ในการศึกษาระยะเวลาในการตรึงเชื้อ คือ Chitosan Lot A เนื่องจาก chitosan Lot A มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติกสูงกว่าไคโตซานตัวอื่นๆ โดยระดับการกำจัดหมู่อะซิติกนี้แสดงถึงจำนวนหมู่เอมีโนบนโครงสร้างไคโตซาน ซึ่งในสภาวะกรดอ่อน ไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติกสูงกว่าจะรับโปรตอนได้มากกว่า ทำให้มีความเป็นประจุบวกสูงกว่า และเมื่อไคโตซานมีความเป็นประจุบวกที่สูงกว่าจะโอกาสในการตรึงเชื้อแบคทีเรียซึ่งมีประจุลบได้ดีกว่า

จากนั้น Chitosan Lot A ซึ่งมีระดับการกำจัดหมู่อะซิติกร้อยละ 91 ขนาด 1-2 มม. จำนวน 0.60 กรัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการแช่ใน 70% เอทานอลและปรับพื้นผิวของไคโตซานด้วยบัฟเฟอร์พีเอช 6.5 ไปตรึงเชื้อไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียเป็นเวลาต่างๆ ได้แก่ 3 6 12 24 และ 72 ชม. เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่ตรึงเชื้อ) และทำการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดไนไตรต์ของไคโตซานที่ผ่านการตรึงเชื้อแล้ว พบว่า ไคโตซานที่ผ่านการตรึงเชื้อเป็นเวลาเท่ากับ 72 ชม. สามารถบำบัดไนไตรต์จาก 1.70 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร ลดลงเหลือ 0.46 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร ภายในระยะเวลาประมาณ 3 ชม. โดยมีอัตราการบำบัดไนไตรต์เฉลี่ยเท่ากับ 0.70 ± 0.02 มก.ไนโตรเจนต่อกรัมต่อวัน ในขณะที่ไคโตซานที่ผ่านการตรึงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. สามารถบำบัดไนไตรต์จาก 1.48 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร ลดลงเหลือน้อยกว่า 0.40 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร ภายในระยะเวลาประมาณ 3 ชม. โดยมีอัตราการบำบัดไนไตรต์เฉลี่ยเท่ากับ 0.66 ± 0.02 มก.ไนโตรเจนต่อกรัมต่อวัน ส่วนไคโตซาน

ที่ผ่านการตรึงเชื้อเป็นเวลา 3 6 12 ชม. ใช้เวลาในการบำบัดไนโทรต์มากกว่า 6 ชม. โดยมีอัตราการบำบัดไนโทรต์เฉลี่ยเท่ากับ 0.18 ± 0.03 0.20 ± 0.03 และ 0.33 ± 0.05 มก.ไนโตรเจนต่อกรัมต่อวัน ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.3 และ 4.4



ภาพที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโทรต์ด้วยโคโตซานที่ผ่านการตรึงเชื้อไนโทรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่เป็นเวลา 3 6 12 24 และ 72 ชม. เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่ตรึงเชื้อ)

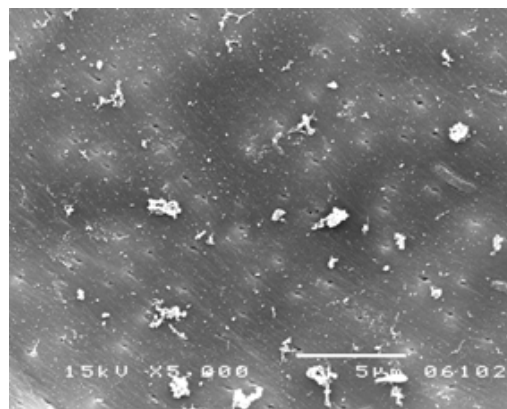
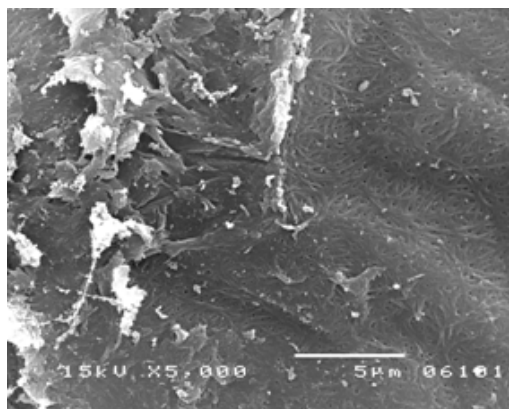


ภาพที่ 4.4 อัตราการบำบัดไนโทรต์ของโคโตซานที่ผ่านการตรึงเชื้อไนโทรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียเป็นเวลา 3 6 12 24 และ 72 ชม. เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่ตรึงเชื้อ) โดยตัวอักษร a-d แสดงถึงค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

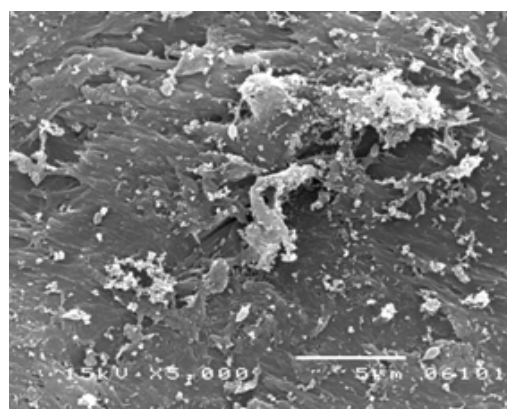
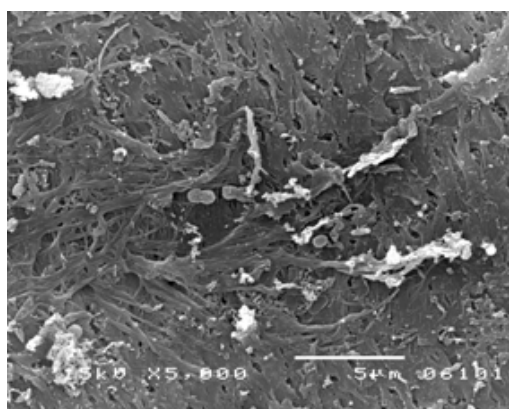
จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าไคโตซานที่ผ่านการตรึงเชื้อเป็นเวลา 72 และ 24 ชม. มีอัตราการบำบัดไนโตรเจนสูงกว่าไคโตซานที่ผ่านการตรึงเชื้อเป็นเวลา 3-12 ชม. อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการเพิ่มระยะเวลาในการตรึงเชื้อของ NOB จะเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการถ่ายเทเชื้อที่เติบโตอยู่ที่ผิวของวัสดุตัวกรองพลาสติกมาสู่ไคโตซานโดยไม่มีผลจากการเติบโตเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย เนื่องจาก NOB เป็นแบคทีเรียที่มีอัตราการเติบโตต่ำมาก ระยะเวลา 24 ชั่วโมงจึงอนุมานได้ว่าเซลล์ไม่มีการเพิ่มจำนวนขึ้น เมื่อมีจำนวน NOB ที่หลุดออกจากตัวกรองพลาสติกมาติดอยู่กับไคโตซานมากขึ้น จึงส่งผลทำให้อัตราการบำบัดไนโตรเจนมีค่าสูงขึ้น

ตามปกติแล้วการเตรียมตัวกรองชีวภาพไนตริไฟเคชันพร้อมใช้งาน จะต้องใช้เวลาในการตรึงหัวเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียไม่น้อยกว่า 30-45 วัน เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้มีอัตราการเติบโตที่ค่อนข้างต่ำ (Ruiz et al., 2006) และมีปริมาณน้อย ซึ่งการนำไคโตซานมาตรึงเชื้อสามารถลดระยะเวลาในการเตรียมตัวกรองชีวภาพไนตริไฟเคชันได้ ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวเกิดจากพื้นผิวของไคโตซานที่ถูกปรับสภาพด้วยพีเอช 6.5 มีประจุเป็นบวก และสามารถเกิดพันธะอิเลคโตรสแตติก (Electrostatic Interaction) กับประจุลบบนพื้นผิวของแบคทีเรียได้ดีกว่าวัสดุสังเคราะห์หรือพลาสติกที่ใช้ในปัจจุบันที่ไม่มีประจุ ผลจากการทดลองนี้อาจสรุปได้ว่าระยะเวลาในการตรึงเชื้อที่ 24 ชม. เป็นสถานะที่เหมาะสมเพื่อลดระยะเวลาในการตรึงเชื้อลง ทั้งนี้เนื่องจากมีอัตราการบำบัดไนโตรเจนไม่แตกต่างกับที่เวลา 72 ชม. อย่างมีนัยสำคัญ

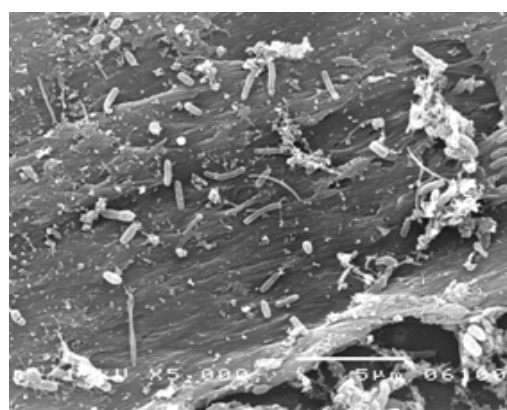
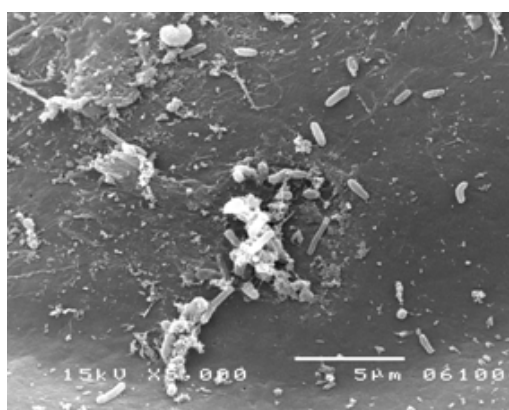
เมื่อทำการตรวจสอบลักษณะของเชื้อ NOB ที่เกาะติดบนผิวของไคโตซานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า รูปร่างแบคทีเรียที่ตรึงบนผิวของไคโตซานเป็นเวลา 3 และ 24 ชม. มีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยพบแบคทีเรียรูปท่อน (Rod) แต่ปริมาณการเกาะติดของแบคทีเรียแตกต่างกัน โดยพบว่า ระยะเวลาในการตรึง 3 ชม. มีปริมาณแบคทีเรียที่เกาะติดบนผิวไคโตซานน้อยกว่าที่เวลา 24 ชม. (ภาพที่ 4.5)



(ก) ชุดควบคุม



(ข) ระยะเวลาในการตรึง 3 ชม.

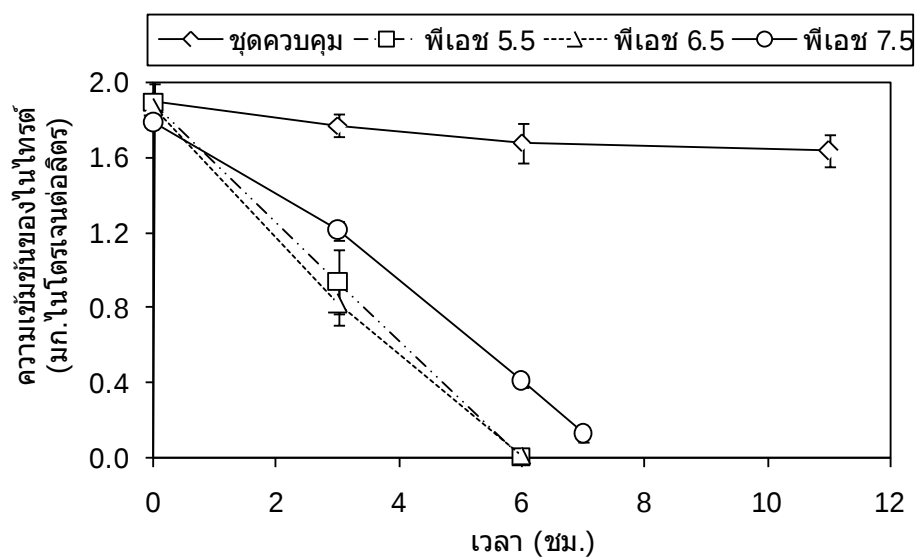


(ค) ระยะเวลาในการตรึง 24 ชม.

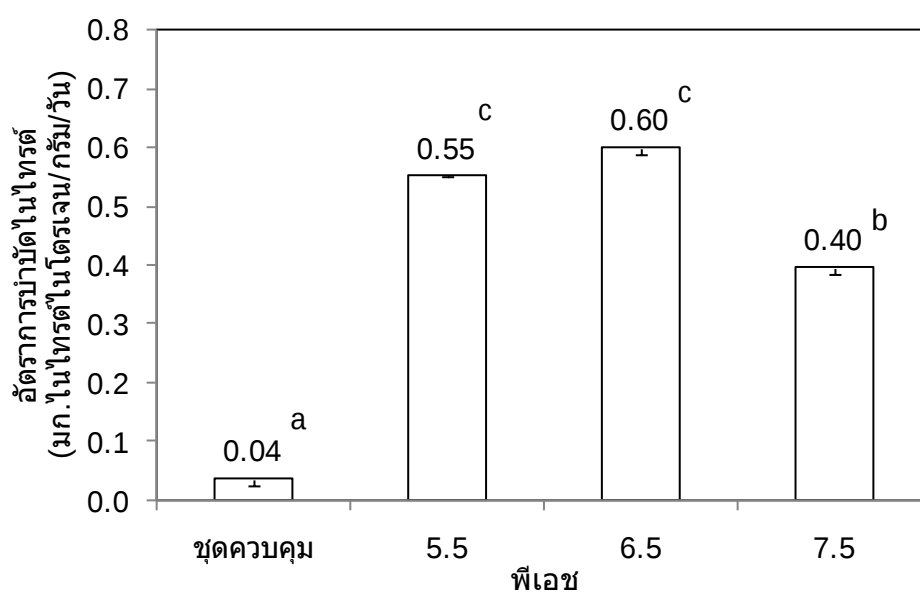
ภาพที่ 4.5 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงพื้นผิวของไคโตซานที่ไม่ผ่านการตรึงเชื้อ (ชุดควบคุม) และไคโตซานที่ผ่านการตรึงเชื้อในไทรต้ออกซิไดซิงแบบคทีเรียเป็นเวลา 3 และ 24 ชม. (กำลังขยาย 5,000 เท่า)

4.1.2 ผลของการปรับพื้นผิวของไคโตซาน

ตัวอย่างไคโตซานที่ใช้ในการศึกษาผลของการปรับพื้นผิวไคโตซาน คือ Chitosan Lot A ซึ่งมีระดับการกำจัดหมู่อะซิตรายละ 91.13 ± 0.57 ขนาด 1-2 มม. จำนวน 0.60 กรัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการแช่ใน 70% เอทานอล ไปทำการปรับพื้นผิวของไคโตซานด้วยบัพเฟอร์ที่พีเอชแตกต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 5.5 6.5 และ 7.5 ส่วนของชุดควบคุมจะแช่ในน้ำกลั่นแทนบัพเฟอร์ จากนั้นนำไปตรึงเชื้อในไทรด์ออกซิไคซิงแบคที่เรียเป็นเวลา 24 ชม. และทำการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดในไทรด์ของไคโตซานที่ผ่านการตรึงเชื้อแล้ว พบว่าไคโตซานที่ปรับพื้นผิวด้วยบัพเฟอร์ที่พีเอช 5.5 และ 6.5 สามารถลดความเข้มข้นของในไทรด์ลงเหลือน้อยกว่า 0.10 มก. ในโตรเจน ภายในระยะเวลาเพียง 6 ชม. โดยมีอัตราการบำบัดในไทรด์เฉลี่ยเท่ากับ 0.55 ± 0.05 และ 0.60 ± 0.05 มก. ในโตรเจนต่อกรัมต่อวัน ตามลำดับ ในขณะที่พีเอช 7.5 ใช้เวลาในการบำบัดในไทรด์มากกว่า 6 ชม. โดยมีอัตราการบำบัดในไทรด์เฉลี่ยเท่ากับ 0.40 ± 0.01 มก. ในโตรเจนต่อกรัมต่อวัน ดังภาพที่ 4.6 และ 4.7 จากการทดสอบทางสถิติพบว่า การปรับพื้นผิวของไคโตซานด้วยบัพเฟอร์ที่พีเอช 5.5 และ 6.5 มีอัตราการบำบัดในไทรด์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากในสถานะที่เป็นกรดอ่อนไคโตซานจะมีความเป็นประจุบวกสูงจึงสามารถจับกับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีประจุเป็นลบได้ โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Strand et al. (2003) พบว่าการดูดซับ *E. coli* บนไคโตซานขึ้นอยู่กับพีเอช เนื่องจากไคโตซานเป็นพอลิอิเล็กโตรไลต์แบบอ่อน ดังนั้นความหนาแน่นของประจุจึงขึ้นอยู่กับค่าพีเอช อย่างไรก็ตามเพื่อให้เหมาะสมกับการนำไปใช้ในบ่อเลี้ยงกุ้งซึ่งมีพีเอชประมาณ 6-9 จึงเลือกที่จะปรับพื้นผิวของไคโตซานด้วยบัพเฟอร์ที่พีเอช 6.5 ซึ่งมีอัตราการบำบัดในไทรด์สูงที่สุดเป็นสถานะที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองลำดับต่อไป



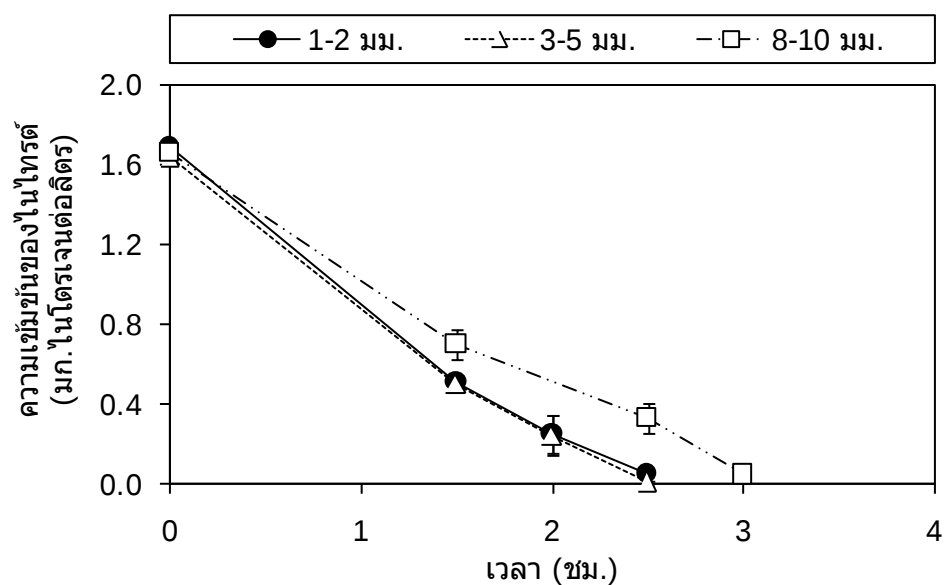
ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจนของใบไทรดด้วยไคโตซานที่ทำการปรับพื้นผิวด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอช 5.5 6.5 และ 7.5 หลังนำไปตรึงเชื้อไนโตรดออกซิไดซิงแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชม. เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (แช่น้ำกลั่น)



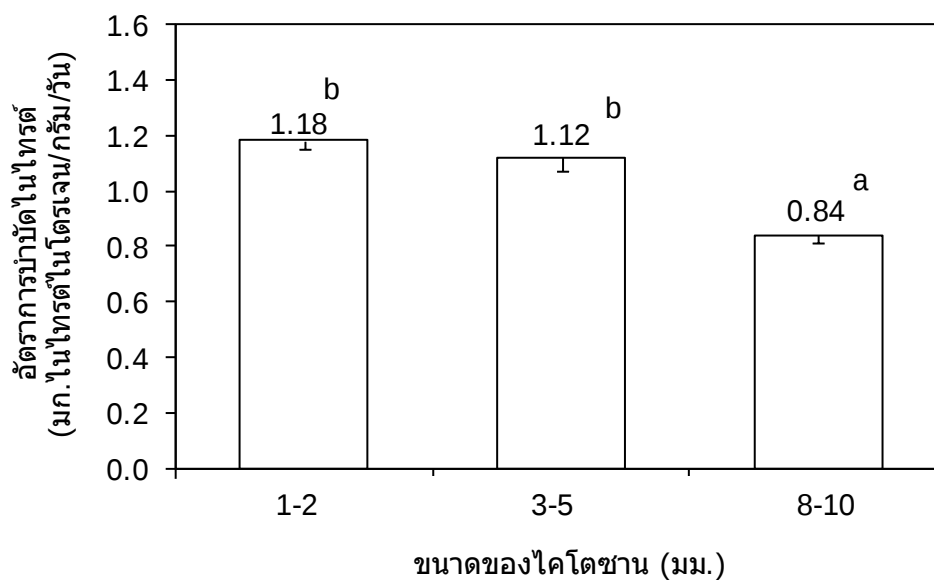
ภาพที่ 4.7 อัตราการบำบัดไนโตรเจนของไคโตซานที่ทำการปรับพื้นผิวด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอช 5.5 6.5 และ 7.5 หลังนำไปตรึงเชื้อไนโตรดออกซิไดซิงแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชม. เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (แช่น้ำกลั่น) โดยตัวอักษร a-c แสดงถึงค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

4.1.3 ขนาดอนุภาคของไคโตซาน

ตัวอย่างไคโตซานที่ใช้ในการศึกษาผลของขนาดอนุภาคของไคโตซาน คือ Chitosan Lot A ซึ่งมีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลร้อยละ 91.13 ± 0.57 และมีขนาด 3 ระดับดังนี้ คือ ขนาดเล็ก (อยู่ในช่วง 1-2 มม.) ขนาดกลาง (อยู่ในช่วง 3-5 มม.) และขนาดใหญ่ (อยู่ในช่วง 8-10 มม.) จากนั้นนำไคโตซานแต่ละขนาดจำนวน 0.60 กรัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการแช่ใน 70% เอทานอล และปรับพื้นผิวของไคโตซานด้วยบัพเฟอร์พีเอช 6.5 ไปตรึงเชื้อในหลอดออกซิไดซิงแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชม. และทำการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดในหลอดของไคโตซานที่ผ่านการตรึงเชื้อแล้วพบว่าไคโตซานขนาด 1-2 มม. และ 3-5 มม.สามารถบำบัดในหลอดลดลงเหลือน้อยกว่า 0.30 มก. ในโตรเจนต่อลิตร ภายในระยะเวลาเพียง 2 ชม. โดยมีอัตราการบำบัดในหลอดเฉลี่ยเท่ากับ 1.18 ± 0.03 และ 1.12 ± 0.05 มก. ในโตรเจนต่อกรัมต่อวัน ตามลำดับ ในขณะที่ไคโตซานขนาด 8-10 มม. ใช้เวลาในการบำบัดในหลอดมากกว่า 2 ชม. โดยมีอัตราการบำบัดในหลอดเฉลี่ยเท่ากับ 0.84 ± 0.03 มก. ในโตรเจนต่อกรัมต่อวัน ดังแสดงในภาพที่ 4.8 และ 4.9 ทั้งนี้อาจสรุปได้ว่าขนาดของไคโตซานมีผลต่อการตรึงเชื้อ นั้นหมายถึงเมื่อขนาดไคโตซานเล็กลงทำให้มีพื้นที่ผิวจำเพาะมากขึ้น อย่างไรก็ตามจากการทดสอบทางสถิติพบว่าไคโตซานขนาด 1-2 มม. และ 3-5 มม. มีอัตราการบำบัดในหลอดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เนื่องจากพื้นที่ผิวจำเพาะของไคโตซานขนาด 1-2 มม. และ 3-5 มม. มีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.41 และ 2.39 ตร.ม.ต่อกรัม ตามลำดับ จากการรายงานของ Manju et al. (2009) ที่ได้ทดลองตรึงเชื้อในไตรฟายอิงแบคทีเรียบนอนุภาคของไม้ที่แตกต่างกัน 5 ขนาด และนำไปบำบัดในหลอด พบว่าอนุภาคนื้อไม้ขนาด 0.3-1.5 มม. ซึ่งมีพื้นที่ผิว 1.87 ตร.ม.ต่อกรัม มีประสิทธิภาพในการบำบัดในหลอดได้ดีที่สุด จากผลการทดลองนี้จึงเลือกใช้ไคโตซานขนาด 1-2 มม. เป็นขนาดที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองลำดับต่อไป



ภาพที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของน้ำในไทรด์ด้วยไคโดซาน 3 ขนาด ภายหลังจากนำไปตรึงเชื้อในไทรด์ออกซิไดซิงแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชม.



ภาพที่ 4.9 อัตราการบำบัดน้ำในไทรด์ของไคโดซาน 3 ขนาด ภายหลังจากนำไปตรึงเชื้อในไทรด์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่เป็นเวลา 24 ชม. โดยตัวอักษร a และ b แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)