

จุลินทรีย์สำหรับบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งทะเล



วิทยานิพนธ์นี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2539

ISBN 974-633-175-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MICROORGANISMS FOR WASTEWATER TREATMENT OF MARINE SHRIMP CULTURE

Miss.Premsuda Saman

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Sciences

Program Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1996

ISBN 974-633-175-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์
โดย
สาขาวิชา
อาจารย์ที่ปรึกษา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

จุลินทรีย์สำหรับบำบัดน้ำเสียจากการเผาถ่านกุ้งทะเล
นางสาวเพรอมสุดา สมาน
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรวิธีวงศ์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เว่งพิพัฒน์
ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต

บันทิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาหลักสูตรบริโภคความหลากหลายบันทิต

คณบดีบันทิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ฤงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบบัณฑิตวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเสถียร)

อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรวิธีวงศ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เว่งพิพัฒน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

กรรมการ

(ดร. ประสาท กิตตากุปต์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาไทยกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

เพรอมสุ่ตา ล่ман : ชุมชนกรีย์สำหรับน้ำเสียกี๊เกิดจากการเลี้ยงปูঁกงะเล
(MICROORGANISMS FOR WASTEWATER TREATMENT OF MARINE SHRIMP CULTURE)
อ.ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. ลมเกียรติ ปิยะรัชวิตรากูล, 101 หน้า. ISBN 974-633-175-2

ภาควิชา
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ
ปีการศึกษา 2538

ลายมือชื่อนิสิต บี.บี.นง.กร ลี.มาน
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อ.ดร.พญ. ลี.รัตน์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาawan อ.ดร.พญ. ลี.รัตน์

C626814 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: MICROORGANISMS / WASTEWATER TREATMENT / SHRIMP CULTURE

PREMSUDA SAMAN : MICROORGANISMS FOR WASTEWATER TREATMENT OF MARINE

SHRIMP CULTURE THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. SOMKIAT

PIYATIRATITIVORAKUL, Ph.D. 101 pp. ISBN 974-633-175-2

Isolation of effective microorganisms that could degrade organic compounds from sediment and sea water of shrimp farms from Songkla, Nakornsritthammarat, Chachoengsao Province was investigated. Five strains were selected and designated as following : S25, the protein hydrolysing strain ; S22 and P3, protein and starch hydrolysing strains and finally P1 and P4, protein, starch and lipid hydrolysing strains. Their enzymatic activities were assayed when their growth reached late exponential phase. P4 was the highest protease producing strain (115 U/ml) following with P1 (85 U/ml), P3 (84 U/ml), S22 (80 U/ml) and S25 (78 U/ml). When activity of amylase was assayed, it was found that P1 produced the highest amylase activity at 5 U/ml, then P4 at 4.77 U/ml, S22 at 3.41 U/ml and P3 at 3.33 U/ml, consecutively. Whereas lipase activity (0.45 U/ml) of P4 was higher than that of P1 (0.166 U/ml). All isolated strains were gram positive, rod shape and spore formation bacteria. They could survive in low water activity and in salinity range of 10-100 ppt. Interestingly, S25 strain could tolerate to high salinity up to 100 ppt. Biochemical test was performed and it was found that P1, P3, P4, S22 and S25 were *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. firmus*, *B. latus*, *B. marinus*, respectively. Co-culture among these species showed no inhibition to individual growth. Efficiency test of organic substance degradation illustrated that when comparing only any individual strain to co-culture up to 5 strains, five strains with a ratio of 1:1:1:1:1 gave the best performance of organic substance reduction in sea water mixed with shrimp feed at concentrations 0.5%, 1%, 2%, and 3% (W/V) with the percentage of 97%, 88%, 88% and 84% in 7 days. These results indicated that bacteria isolated from this study could be monitored as a biological control for wastewater treatment of the shrimp farm.

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....

ลายมือชื่อนิสิต..... เมธสสา กัน

สาขาวิชา..... เทคโนโลยีทางชีวภาพ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... พล.พญ. น.ส. บริรุ๊งค์

ปีการศึกษา..... 2538

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... ดร. ดร. ดร.



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลงได้โดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา
ผศ.ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิดิวงุล ผศ.ดร. ศิริรัตน์ เว่งพิพัฒน์ ศ.ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต
ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบ
ขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี่

ขอกราบขอบพระคุณ อ.ดร. สุเมธ ตันตรະเรียรา และ ดร. ประสาท กิตตะคุปต์
ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณหัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้กรุณาเอื้อเพื่อสถานที่ และ
เครื่องมือในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา รวมทั้งเพื่อนๆ และ น้องๆ
ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลที่ได้กรุณาเอื้อเพื่อ
สถานที่ อุปกรณ์ สารเคมี และส่วนหนึ่งของทุนอุดหนุนการวิจัยนี้ รวมทั้งเพื่อนๆ พี่ๆ และ น้องๆ
ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติที่ให้ทุน
บัณฑิตศึกษาภายใต้ประเทศไทย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่น้อง ที่ได้ให้กำลังใจช่วยเหลือ
สนับสนุน ตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จสมบูรณ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	๑
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	๑
กิตติกรรมประกาศ.....	๒
สารบัญ.....	๓
สารบัญตาราง.....	๔
สารบัญรูป.....	๘
คำย่อ.....	๙
บทที่	
1. บทนำ.....	๑
2. วารสารปริทัศน์.....	๓
3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	๒๒
4. ผลการทดลอง.....	๓๕
5. อภิปรายผลการทดลอง.....	๖๘
6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	๗๖
เอกสารอ้างอิง.....	๗๘
ภาคผนวก ก	๘๗
ภาคผนวก ข.....	๙๓
ภาคผนวก ค.....	๙๖
ภาคผนวก ง.....	๙๘
ประวัติผู้เขียน.....	๑๐๑

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

1 แหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	13
2 จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อกุ้งที่อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา	
จากบ่อ กุ้ง อายุ 2.5 เดือน และ 4.5 เดือน.....	37
3 จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อ กุ้ง ที่อำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช	
จากบ่อ กุ้ง อายุ 3 เดือน และ 3.5 เดือน.....	37
4 จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อ กุ้ง ที่อำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา	
จากบ่อ กุ้ง อายุ 2 เดือน และ 3 เดือน.....	37
5 ชนิดของเอนไซม์ตราชpalainแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์.....	38
6 ลักษณะการเจริญ และการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรีย P1 P3 P4 S22 และ S25.....	51
7 ชนิดและปริมาณของแบคทีเรีย P1 P3 P4 S22 และ S25 ภายหลังการเลี้ยงร่วมกับบนอาหารแข็งนิวเตอร์ยนท์ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชม.....	57

ศูนย์วิทยทรัพยากร อุปกรณ์รวมมหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

ภูมิ

หน้า

1 ความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์แบบจุลเชื้ออาหารในป่าเฉียงสัตว์.....	21
2 การย่ออย่างเดียวของแบคทีเรียที่แยกได้ ก) P1 ข) P3 และ ค) P4 บนอาหาร Skim milk agar บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ 48 ชม.....	39
3 การย่ออย่างเดียวของแบคทีเรียที่แยกได้ ก) S22 และ ข) S25 บนอาหาร Skim milk agar บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ 48 ชม.....	40
4 การย่ออย่างเดียวของแบคทีเรียที่แยกได้ ก) P1 และ ข) P3 บนอาหาร Starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ 48 ชม.....	41
5 การย่ออย่างเดียวของแบคทีเรียที่แยกได้ ก) P4 และ ข) S22 บนอาหาร Starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ 48 ชม.....	42
6 การย่ออย่างเดียวของแบคทีเรียที่แยกได้ ก) P1 และ ข) P4 บนอาหาร Tween 80 agar บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ 48 ชม.....	43
7 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียที่ OD ₆₀₀ และแอคติวิตี้ของโปรดิโอส ก) P1 ข) P3 และ ค) P4 ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย 3 ชั้นของการทดลอง ชั่งเฉียงแบคทีเรีย [†] ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยผงถั่วเหลืองและแป้ง ปริมาณ 300 มล. บรรจุในขวดแก้ว ทรงกรวยขนาด 500 มล. เขย่าเฉียงที่ 37° ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 24 ชม.....	46
8 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียที่ OD ₆₀₀ และแอคติวิตี้ของโปรดิโอส ก) S22 และ ข) S25 ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย 3 ชั้นของการทดลอง ชั่งเฉียงแบคทีเรีย [†] ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยผงถั่วเหลืองและแป้ง ปริมาณ 300 มล. บรรจุในขวดแก้ว ทรงกรวยขนาด 500 มล. เขย่าเฉียงที่ 37° ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 24 ชม.....	47
9 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียที่ OD ₆₀₀ และแอคติวิตี้ของอะไมเลส ก) P1 และ ข) P3 ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย 3 ชั้นของการทดลอง ชั่งเฉียงแบคทีเรีย [†] ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยผงถั่วเหลืองและแป้ง ปริมาณ 300 มล. บรรจุในขวดแก้ว ทรงกรวยขนาด 500 มล. เขย่าเฉียงที่ 37° ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 24 ชม.....	48

สารบัญรูป (ต่อ)

10 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียที่ OD ₆₀₀ และแอคติวิตี้ของอะไมเลส ก) P4 และ ข) S22 ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย 3 ชั้นของการทดลอง ซึ่งเลี้ยงแบคทีเรีย ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยผงถั่วเหลืองและแป้ง ปริมาตร 300 มล. บรรจุในขวดแก้ว ทรงกรวยขนาด 500 มล. เขย่าเลี้ยงที่ 37° ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 24 ชม.....	49
11 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียที่ OD ₆₀₀ และแอคติวิตี้ของไลเปส ก) P1 และ ข) S22 ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย 3 ชั้นของการทดลอง ซึ่งเลี้ยงแบคทีเรีย ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยผงถั่วเหลือง แป้ง และ Tween 80 1% (W/V) ปริมาตร 300 มล. บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มล. เขย่าเลี้ยงที่ 37° ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 24 ชม.....	50
12 การย้อมสีแกรมของแบคทีเรีย ก) P1 ข) P3 และ ค) P4 อายุ 24 ชม. ถ่ายจากกล้อง จุลทรรศน์ Nikon รุ่น 32 S กำลังขยาย 1000 เท่า	54
13 การย้อมสีแกรมของแบคทีเรีย ก) S22 และ ข) S25 อายุ 24 ชม. ถ่ายจากกล้อง จุลทรรศน์ Nikon รุ่น 32 S กำลังขยาย 1000 เท่า.....	55
14 การลดลงของ COD จากน้ำเสียเที่ยมเตรียมจากน้ำธรรมดางานสมอาหารกุ้ง 1 % (W/V) หลังจากการเติมแบคทีเรียในช่วง log phase ของ P1 P3 P4 S22 และ S25 ปริมาณ 10 ⁷ เชลล์ต่อมล. เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37° เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบ กับค่า COD ของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย.....	59
15 การลดลงของ COD จากน้ำเสียเที่ยมเตรียมจากน้ำทะเล ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ผสมอาหารกุ้ง 1 % (W/V) หลังจากการเติมแบคทีเรียในช่วง log phase ของ P1 P3 P4 S22 และ S25 ปริมาณ 10 ⁷ เชลล์ต่อมล. เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37° เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับค่า COD ของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย.....	60
16 การลดลงของ COD จากน้ำเสียเที่ยมเตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ผสมอาหารกุ้ง 1% (W/V) หลังจากการเติมแบคทีเรียช่วงการเจริญ log phase 2 สายพันธุ์ ในอัตราส่วน 1:1 ของ P1P3 P1P4 P1S22 P1S25 P3P4 P3S22 P3S25 P4S22 P4S25 และ S22S25 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30° เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับค่า COD ของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย.....	61

สารบัญรูป (ต่อ)

- 17 การลดลงของ COD จากน้ำเสียเที่ยมเตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน
ผสมอาหารกุ้ง 1% (W/V) หลังจากการเติมแบคทีเรียช่วงการเจริญ log phase
3 สายพันธุ์ ในอัตราส่วน 1:1:1 ของ P1P3P4 P1P3S22 P1P3S25 P1P4S22
P1P4S25 P1S22S25 P3P4S22 P3P4S25 P3S22S25 และ P4S22S25 เลี้ยงที่อุณหภูมิ
 30°C เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับค่า COD ของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย.....62
- 18 การลดลงของ COD จากน้ำเสียเที่ยมเตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน
ผสมอาหารกุ้ง 1% (W/V) หลังจากการเติมแบคทีเรียช่วงการเจริญ log phase
4 สายพันธุ์ ในอัตราส่วน 1:1:1:1 ของ P1P3P4S22 P1P3P4S25 P1P3S22S25
P1P4S22S25 และ P3P4S22S25 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบ
กับค่า COD ของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย.....63
- 19 การลดลงของ COD จากน้ำเสียเที่ยมเตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน
ผสมอาหารกุ้ง 1% (W/V) หลังจากการเติมแบคทีเรีย P1 P3 P4 S22 และ S25
ช่วงการเจริญ log phase อัตราส่วน 1:1:1:1:1 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน
เปรียบเทียบกับค่า COD ของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย.....64
- *20 การลดลงของ COD จากน้ำเสียเที่ยมเตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน
ผสมอาหารกุ้ง 0.5 % (W/V) หลังจากการเติมแบคทีเรีย P1 P3 P4 S22 และ S25
ช่วงการเจริญ log phase อัตราส่วน 1:1:1:1:1 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน
เปรียบเทียบกับค่า COD ของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย.....65
- 21 การลดลงของ COD จากน้ำเสียเที่ยมเตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน
ผสมอาหารกุ้ง 2 % (W/V) หลังจากการเติมแบคทีเรีย P1 P3 P4 S22 และ S25
ช่วงการเจริญ log phase อัตราส่วน 1:1:1:1:1 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน
เปรียบเทียบกับค่า COD ของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย.....66
- 22 การลดลงของ COD จากน้ำเสียเที่ยมเตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน
ผสมอาหารกุ้ง 3 % (W/V) หลังจากการเติมแบคทีเรีย P1 P3 P4 S22 และ S25
ช่วงการเจริญ log phase อัตราส่วน 1:1:1:1:1 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน
เปรียบเทียบกับค่า COD ของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย.....67

ສัญลักษณ์และคำย่อ

ml.	=	มิลลิลิตร
° ซี	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
M	=	ไมลาร์
mm	=	นาโนเมตร
N	=	นอร์มอล
COD	=	Chemical Oxegen Demand
U/ml	=	ยูนิตต่อ มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย