

การติดตามและศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในเมือกชีวภาพของระบบ
การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบน้ำหมุนเวียนที่มีปัญหาในตรรทสะสม

อภาววรรณ พ่อคำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยทักษิณ

2556

บทคัดย่อ

ชื่อวิทยานิพนธ์ : การติดตามและศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในเมือกชีวภาพของระบบ

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบน้ำหมุนเวียนที่มีปัญหาในเตรทสะสม

ชื่อ-ชื่อสกุลผู้ทำวิทยานิพนธ์ : นางสาว อภาวรรณ พอค้า

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร. นุศลอินทร์สง่า

อาจารย์ ดร. สมพงษ์ โอทอง

อาจารย์ ดร. สุภภาศิริรัฐนิม

ปริญญาและสาขาวิชา : ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ปีการศึกษาที่สำเร็จ : 2555

การติดตามและศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในเมือกชีวภาพของระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบน้ำหมุนเวียนที่มีปัญหาในเตรทสะสม โดยติดตามศึกษาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียในเมือกชีวภาพ โดยใช้วิธีการที่เหมาะสมกับประสิทธิภาพการบำบัดในเตรทภายในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในแต่ละช่วงเวลา งานวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นการคัดเลือกชนิดตัวกลางที่เหมาะสมต่อการบำบัดในเตรทจากเมือกชีวภาพ โดยใช้ตัวกลาง 4 ชนิด ส่วนที่ 2 ศึกษาและติดตามประสิทธิภาพการควบคุมคุณภาพน้ำของระบบการทดลองเลี้ยงปลาโดยใช้ระบบน้ำหมุนเวียนที่ตัวกลางให้เมือกชีวภาพยึดเกาะ โดยทำการตรวจสอบคุณภาพทางเคมี และศึกษาความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ภายในเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดในเตรทด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) และเทคนิค Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) ผลการศึกษาในช่วงแรก พบว่าตัวกลางที่เหมาะสมต่อการบำบัดในเตรทได้ดีที่สุด คือ แผ่นอวนไนลอนชนิดทอไม่มีปมตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1×1 นิ้ว มีประสิทธิภาพการบำบัดในเตรทได้ดีที่สุด เนื่องจากมีลักษณะเหมาะสมต่อการยึดเกาะของจุลินทรีย์ ระบบสามารถเข้าสู่สภาวะคงที่ได้เร็วที่สุด สอดคล้องกับผลการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียดีในτριไฟอิง และการติดตามการพัฒนาให้เป็นเมือกชีวภาพที่มีขนาดหนาเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาทดลอง ส่วนผลการติดตามโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH พบปริมาณแบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* คลาส *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มเด่น ส่วนผลการศึกษาในส่วนที่ 2 พบว่า ทั้ง 2 ชุดการทดลองคือ ชุดทดลองที่มีการเลี้ยงปลา และชุดการทดลองควบคุม (ไม่มีปลา) มี

ประสิทธิภาพการบำบัดในเตรทที่คล้ายกัน เมื่อการตรวจสอบโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียภายในเมือกชีวภาพด้วยเทคนิค FISH มีการตรวจพบปริมาณแบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* คลาส *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มเด่น จากทั้ง 2 ชุดการทดลอง ส่วนเมื่อใช้เทคนิค DGGE พบว่า ในชุดการทดลองที่ 1 พบแบคทีเรีย *Methylophaga sulfidovorans* ซึ่งเป็นสมาชิกในคลาส *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มเด่น และชุดทดลองที่ 2 พบแบคทีเรียคาดว่าเป็นจีส *Luteolibacter* ซึ่งเป็นสมาชิกในคลาส *Verrucomicrobiae* เป็นกลุ่มเด่น เชื่อได้น่าเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีบทบาทในการรีดิวซ์ในเตรท การเลือกใช้แผ่นอวนในลอนชนิดทอไม่มีปมเป็นตัวกลางในระบบบำบัดน้ำเสียเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำไปแก้ปัญหาในเตรทสะสมภายในระบบจากการเพาะเลี้ยงสัณฐานแบบน้ำหมุนเวียนต่อไป

Abstract

Thesis Title : Monitoring of Roles and Efficiencies in Biofilm from the Recirculating Aquaculture System with High Nitrate Accumulation Problem.

Student's Name : Ms. Arpawon Phoakha

Advisory Committee : Assistant. Professor. Dr. Nugul Intrasungkha

Dr. Sompong O-Tong

Dr. Suphada Kiriratnikom

Degree and Program : Master of Science in Biology

Academic Year : 2012

This study was to monitor of roles and efficiencies in biofilm from the Recirculating Aquaculture System (RAS) with high nitrate accumulation problem, by using suitable methods to investigate the relationship of the bacterial communities in biofilm and their nitrate removal efficiencies at different operation times. The main objective of this study was to find the solution for nitrate accumulation problem commonly found in RAS system. The study consisted of two main experiments, namely, first experiment was the selection of suitable media for biofilm attachment and the second experiment was the monitoring of roles and efficiencies from RAS with biofilm system by using chemical analysis for determining the treatment efficiency and microbial communities analysis by Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) techniques. The results of the first experiment was found the nylon net shown the highest nitrate removal performance, due to its proper structure and physical characteristics for bacterial adhesion. Moreover, the presence of denitrifying bacteria when using most probable number (MPN) with microtechnique analysis and the dominant bacteria belonging to *Gammaproteobacteria* when investigated with FISH technique were confirmed this finding. However, when using the DGGE technique analysis it has shown more diversity of bacterial communities in the experiment part 1 with the dominant of *Methylophaga sulfidovorans* and bacteria belonging to

Gammaproteobacteria. While in Experiment part 2 it was found more dominant bacteria consisted of *Luteolibacter* sp. and bacteria belonging to class *Verrucomicrobiae* which may play a major role in reducing nitrate. In conclusion the nylon net can be a good supporting media which can lead to a solution of nitrate accumulation problem in the Recirculating aquaculture systems.

แหล่งทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเพณีวิจัย จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ กลุ่มเรื่องที่ 2 สาขาด้านการบริหารจัดการทรัพยากรน้ำ งบประมาณที่ได้รับการสนับสนุนจำนวน 117,000 (หนึ่งแสนหนึ่งหมื่นเจ็ดพันบาทถ้วน) ปีงบประมาณ 2554

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นุกล อินทรสังขา ประธานกรรมการที่ปรึกษาสำหรับคำแนะนำ การดูแลให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน และคำปรึกษาตลอดจนตรวจแก้วิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. สมพงษ์ โอทอง และ อาจารย์ ดร. สุภกา ศิริรัฐนิคม กรรมการที่ปรึกษา สำหรับการอำนวยความสะดวกในการเก็บและวิเคราะห์ตัวอย่าง อนุเคราะห์ระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบน้ำหมุนเวียนที่ใช้ในการวิจัย คำแนะนำและตรวจแก้วิทยานิพนธ์ จนทำให้วิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) สาขาด้านการบริหารจัดการทรัพยากรน้ำ ปีงบประมาณ 2554 ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัย

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมภพ อินทสุวรรณ ที่ให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขเพิ่มเติมเพื่อความสมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. สมพงษ์ โอทอง และคณะ ที่ให้ความร่วมมือช่วยเหลือทางด้านเทคนิคทางชีวโมเลกุล

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และพี่น้องที่คอยช่วยเหลือสนับสนุนทั้งด้านกำลังใจและกำลังทรัพย์ด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่ให้การสนับสนุนทางด้าน อุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา สถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำสงขลา งานวิจัยของสุภกา ศิริรัฐนิคม และงานวิจัยของ นุกล อินทรสังขาและคณะ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง

ขอบคุณ คุณมานิ แก้วชนิด คุณกฤษณะ เรืองคล้าย คุณพันธสิทธิ์ โชคสวัสดิกร ที่ให้ความสะดวกในการใช้วัสดุ อุปกรณ์ในการทำวิจัย และเพื่อน EMBG ที่คอยให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือ แลกเปลี่ยนความคิดเห็น และกำลังใจมาโดยตลอดจนเสร็จสิ้นวิทยานิพนธ์

คุณค่าทั้งหลายที่ได้รับจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูทดแทนแด่บิดา มารดา และบูรพาจารย์ที่เคยอบรมสั่งสอน ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่าน

อภาวรรณ พ่อคำ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
สถานที่ทำการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
น้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ.....	4
การบำบัดน้ำเสีย.....	5
เมือกชีวภาพ	8
วัฏจักรไนโตรเจน	11
จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดทางไนโตรเจนทางชีวภาพ.....	16
เทคนิคที่ใช้ศึกษานิวเคลียสในระบบบำบัดน้ำเสีย.....	19
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	25
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	31
ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง.....	31
วัสดุและอุปกรณ์.....	31
สารเคมี.....	32
วิธีดำเนินการเก็บรวบรวมข้อมูล.....	32
วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล.....	38
4 ผลการวิจัย.....	48
การเพาะกล้าเชื้อแบคทีเรียสำหรับแก้ปัญหาไนเตรทสะสมจากระบบการ เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบน้ำหมุนเวียนที่ในระดับห้องปฏิบัติการ.....	48
การศึกษาเพื่อแก้ไนเตรทสะสมจากการเลี้ยงสัตว์น้ำด้วยระบบน้ำหมุนเวียน	53

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 บทย่อ สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	76
บทย่อ	76
สรุปผลการศึกษา	77
อภิปรายผลการทดลอง	79
ข้อเสนอแนะ	93
บรรณานุกรม.....	94
ภาคผนวก.....	108
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	128

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ปริมาณของเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งชายฝั่ง.....	5
2 ความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์และปฏิกิริยาในการรีดิวซ์สารประกอบ ไนโตรเจน	18
3 น้ำเสียสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงกล้าเชื้อแบคทีเรียไนโตรไฟอิง.....	34
4 น้ำเสียสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงกล้าเชื้อแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิง.....	35
5 องค์ประกอบของสารละลาย Trace elements	35
6 ดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะต่อกลุ่มแบคทีเรียระดับโคเมน ไฟล์ม และคลาสที่ใช้ใน การศึกษา	44
7 ดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะต่อกลุ่มแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิง	44
8 เปรียบเทียบคุณลักษณะตัวกลางจากถึงปฏิกิริยาที่บรรจุตัวกลาง และถึงปฏิกิริยา ควบคุม.....	55
9 การวัดขนาดของตัวกลางและความหนาของเมือกชีวภาพจากพื้นผิวตัวกลางโดย ทำการย้อมแบบ เปียกเพื่อคุณลักษณะของการเกาะของเมือกชีวภาพบนตัวกลาง..	56
10 ค่าเอ็มพีเอ็น	111
11 ส่วนประกอบของ PBS	113
12 ส่วนประกอบของ Formamide และน้ำสำหรับเตรียม Hybridization buffer	115
13 ส่วนประกอบของ NaCl สำหรับเตรียม Wash buffer	115
14 การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิงยีน 16S rDNA ด้วย เทคนิค DGGE จาก ตัวอย่างเมือกชีวภาพในระบบการทดลองแบบกะ(ระดับ ความเค็ม 15 ppt) และ กล้าเชื้อ แบคทีเรียดีไนโตรไฟอิงแบคทีเรีย (ระดับความ เค็ม 15 ppt)	124
15 การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียดีไนโตรไฟอิงยีน 16S rDNA ด้วย เทคนิคDGGE จากจากตัวอย่างเมือกชีวภาพ (ระดับความเค็ม 15 ppt)	125

สารบัญภาพประกอบ

ภาพที่	หน้า
1 ระยะเวลาการเกิด Biofilm	10
2 วัฏจักรของไนโตรเจน	12
3 ขั้นตอนต่างๆ ที่สำคัญของเทคนิค rRNA approach	22
4 ขั้นตอน Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Technique analysis	23
5 ขั้นตอน DGGE analysis	24
6 ระบบการทดลองแบบกะ (Batch reactor)	37
7 แผนผังการทดลองระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง	38
8 การติดตามประสิทธิภาพการบำบัดแอมโมเนียในถัง Single tank NB (ระดับความเค็ม 15 ppt)	49
9 การติดตามประสิทธิภาพการบำบัดไนเตรทในถัง Single tank DNB (ระดับความเค็ม 15 ppt)	50
10 โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่พบในถัง Single tank NB จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH	52
11 โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่พบในถัง Single tank DNB จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH โดยมีสัดส่วนเป็นร้อยละของแบคทีเรียระดับไฟลัมไปจนถึงระดับสปีชีส์ เมื่อเทียบกับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด	52
12 ติดตามการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตรทจากถังปฏิบัติการที่บรรจุตัวกลาง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับ ชุดควบคุมที่ไม่มีตัวกลาง ที่มีความเข้มข้นของ NO_3^- -N 100 มก/ล. ที่ระดับความเค็ม 15 ppt	54
13 ลักษณะของผิวดักกลางแต่ละชนิดก่อนและหลังการเกิดเมือกชีวภาพ	57
14 การศึกษาลักษณะของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะตัวกลางจากถังปฏิบัติการที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดไนเตรทได้ดีที่สุด มาตรวจสอบด้วยเทคนิคการย้อมแบบเปียก ที่กำลังขยาย 1500 เท่า	58
15 การเกาะของแบคทีเรียบนตัวกลางชนิดแผ่นอวนในลอนๆ โดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบบ SEM	60

สารบัญภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
16 การศึกษาลักษณะทั่วไปของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะตัวกลางจากทั้ง 5 ถึงปฏิบัติการจากเมือกชีวภาพที่มีอายุ 24 วันมาตรวจสอบด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบแกรม ที่กำลังขยาย 1,500 เท่า	62
17 ตรวจสอบโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงจากเมือกชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียที่เข้าไปยึดเกาะบนพื้นผิวของตัวกลางด้วยเทคนิค FISH	63
18 การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง 16S rDNA ด้วยเทคนิค DGGE จาก ตัวอย่างเมือกชีวภาพในระบบการทดลองแบบกะ (ระดับความเค็ม 15 ppt) และ กล้าเชื้อแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง (ระดับความเค็ม 15 ppt)	64
19 การติดตามประสิทธิภาพการสารประกอบไนโตรเจนของชุดการทดลองที่ 1 (ไม่เติมปลาแทบทิม) (ระดับความเค็ม 15%)	68
20 การติดตามประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบไนโตรเจนของชุดการทดลอง ที่ 2 (เติมปลาแทบทิม) (ระดับความเค็ม 15%)	68
21 ลักษณะทั่วไปของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะตัวกลางจากระบบภายในระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง โดยทำการขูดและเขย่าเมือกชีวภาพจากตัวกลางมาตรวจสอบด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบแกรม ที่กำลังขยาย1500 เท่า	69
22 ลักษณะทั่วไปของเมือกชีวภาพที่ยึดเกาะตัวกลางจากระบบภายในระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง ที่กำลังขยาย 600 เท่า	70
23 ตรวจสอบลักษณะของเมือกชีวภาพที่เกิดจากแบคทีเรียที่เข้าไปยึดเกาะบนพื้นผิวของตัวกลางเมือกชีวภาพโดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบบ CLSM	71
24 การตรวจสอบโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค FISH	73
25 การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียดีไนตริไฟอิง 16S rDNA ด้วยเทคนิค DGGEจากจาก ตัวอย่างเมือกชีวภาพจากระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง (ระดับความเค็ม 15 ppt)	75