

หัวข้อคุณูปการ

การแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียผลิตยูรีเอสเพื่อการ
ปรับปรุงคุณภาพคอนกรีต

ผู้เขียน

นางสาวสฎา อยู่สถาพร

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์)

คณะกรรมการที่ปรึกษา

อ. ดร. วสุ ปฐมอริย์

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ผศ. ดร. สกุนดิ บวรสมบัติ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ผศ. ดร. ปุณ เทียงบุญธรรม

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ยูรีเอสบางสายพันธุ์มีความสามารถในการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงคุณสมบัติบางประการของวัสดุก่อสร้างได้ แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จแพร่หลายในเชิงพาณิชย์เนื่องจากต้นทุนในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียยังสูงอยู่ งานวิจัยชิ้นนี้จึงเกิดขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ยูรีเอสจากดินที่มีการสะสมของยูเรีย เพื่อให้ได้แบคทีเรียในท้องถิ่นที่มีความสามารถในการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต และนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงคุณสมบัติบางประการของวัสดุก่อสร้างได้แก่ บล็อกประสานและซีเมนต์ และเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้น้ำทิ้งจากบ่อหมักก๊าซชีวภาพมูลไก่มาใช้ทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียตามท้องตลาดซึ่งมีราคาแพง เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย จากการทดลองแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ยูรีเอสพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส แบคทีเรียไอโซเลท C13 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสสูงสุด 25.71 หน่วย ต่อน้ำหนักโปรตีน 1 มิลลิกรัม ซึ่งสูงกว่าค่าที่วัดได้จากเชื้อมาตรฐาน *Bacillus pasteurii* KCTC 3558 ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสเท่ากับ 11.24 หน่วย ต่อโปรตีน 1 มิลลิกรัม เมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตบล็อกประสานพบว่าที่ระยะเวลาในการบ่ม 28 วัน บล็อกที่ผสมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท C13 มีการพัฒนากำลังอัดเพิ่มขึ้นแต่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท C13 พบว่ามีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *B. mesonae* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 98.73% นอกจากนี้จากการศึกษาการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ผลิตยูรีเอสในการผลิตบล็อกประสาน พบว่าการผสม

เชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสทำให้บดล็อกประสานสามารถรับกำลังอัดได้มากขึ้น โดยที่ระยะเวลาบ่ม 28 วัน บดล็อกประสานที่ผสมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus pasteurii* KCTC 3558 และผสมจุลินทรีย์อีเอ็ม 5% สามารถรับแรงกดได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยรับแรงกดได้สูงขึ้น 7.38% และ 9.79% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำทิ้งจากบ่อหมักก๊าซชีวภาพมูลไก่ทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน พบว่าน้ำทิ้งจากบ่อหมักก๊าซชีวภาพมูลไก่มีศักยภาพที่จะสามารถนำมาพัฒนาเป็นอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทดแทนได้ โดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus pasteurii* KCTC 3558 ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งจากบ่อหมักก๊าซชีวภาพมูลไก่ความเข้มข้น 25% โดยปริมาตร มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสวัดได้ 16.75 ยูนิตต่อโปรตีน 1 มิลลิกรัม ซึ่งสูงที่สุดเมื่อเทียบกับที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB-urea, NB-urea และ MP ซึ่งวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้ 0.91, 6.81 และ 7.72 ยูนิตต่อโปรตีน 1 มิลลิกรัม ตามลำดับ การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำทิ้งจากบ่อหมักก๊าซชีวภาพมูลไก่ความเข้มข้น 25% โดยปริมาตรยังสามารถลดค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียได้ถึง 88.91%, 79.12% และ 33.0% เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB-urea, NB-urea และ MP ตามลำดับ และเมื่อทำการขึ้นรูปลูกบาศก์ซีเมนต์ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus pasteurii* KCTC 3558 ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งจากบ่อหมักก๊าซชีวภาพมูลไก่พบว่า ก้อนซีเมนต์ที่ได้มีค่าความหนาแน่นเพิ่มขึ้น 5.38% และสามารถรับแรงกดได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยรับแรงกดได้สูงขึ้นถึง 30.27 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า การดกตะกอนแคลเซียมที่ชักนำโดยจุลินทรีย์มีผลทำให้วัสดุก่อสร้าง ในที่นี้ คือบดล็อกประสานและซีเมนต์สามารถรับแรงกดได้มากขึ้น และน้ำทิ้งจากบ่อหมักก๊าซชีวภาพมูลไก่มีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดแทนเพื่อลดค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ยูรีเอสเพื่อการประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงคุณภาพวัสดุก่อสร้างบางชนิดได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Dissertation Title	Isolation and Screening of Urease Producing Bacteria for Concrete Quality Improvement	
Author	Ms. Sada Yoosathaporn	
Degree	Doctor of Philosophy (Applied Microbiology)	
Advisory Committee	Dr. Wasu Pathom-aree	Advisor
	Asst. Prof. Dr. Sakunnee Bovonsombat	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Poon Thiengburanathum	Co-advisor

Abstract

Some urease producing bacteria with calcium carbonate precipitation ability could be applied in construction materials qualities improvement. However, it is not yet successful in commercial scale because of the high cost of bacterial cultivation. This study aims to isolate and screen for effective urease producing bacteria from urea accumulated soil for bacterial calcification. These bacteria were applied to improve quality properties of construction materials namely, soil-cement interlocking block and cement paste. Feasibility study on the use of effluent from chicken manure bio-gas plant as alternative cost effective bacterial culture medium was also investigated. The results showed that bacterial isolate C13 which isolated from rabbit farm soil has the highest urease activity of 25.74 unit/ mg protein in urease production broth, which is higher than a reference strain, *Bacillus pasteurii* KCTC 3558 (11.24 unit/mg protein). Therefore, isolate C13 was selected for soil-cement interlocking block production. The increasing of compressive strength of soil-cement interlocking block treated with bacterial isolate C13 was observed after 28 days of incubation but the compressive strength is lower than control 7.54%. The 16S rRNA gene sequence analysis indicated that isolate C13 is closely related with *B. mesonae* with 98.73% similarity. The application of urease producing bacteria in soil-cement interlocking block production demonstrated that the compressive strength of interlocking block treated with *B. pasteurii* KCTC 3558 or 5 % EM was significantly increased by 7.38% and 9.79%, respectively, compared with the control at 28 days of incubation. The effluent from

chicken manure bio-gas plant showed potential for use as an alternative bacterial culture medium. *B. pasteurii* KCTC 3558 cultured in 25% (v/v) chicken manure effluent medium showed highest urease activity of 16.75 unit/ mg protein compared with the cultivation in TSB-urea, NB-urea and MP which showed urease activity of 0.91, 6.81 and 7.72 unit/ mg protein, respectively. The result also indicated that the cultivation of *B. pasteurii* KCTC 3558 in 25% (v/v) chicken manure effluent medium can save the cost of bacterial cultivation for 88.91%, 79.12% and 33.0% compared with the cultivation in TSB-urea, NB-urea and MP, respectively. The density and compressive strength of cement cubes treated with *B. pasteurii* KCTC 3558 cultivated in 25% (v/v) chicken manure effluent medium were increased by 5.38% and 30.27%, respectively in comparison with control. It could be concluded that microbial calcification has positive effect on construction materials both soil-cement interlocking block and cement paste by increasing their compressive strength. The effluent from chicken manure bio-gas plant has a potential to develop as an alternative cost effective culture medium for urease producing bacteria.