

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สูตรอาหารสำหรับการวิเคราะห์

Difco sporulation medium (DSM) pH 7 สำหรับ 1 ลิตร

Difco Nutrient Broth	8	กรัม
1.2% MgSO ₄	10	มิลลิลิตร
10% KCl	10	มิลลิลิตร
1N NaOH	0.4	มิลลิลิตร
H ₂ O	800	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมด และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร กรณีที่เป็นอาหารแข็ง เติม Bacto agar 12 กรัม นำมานั่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เมื่ออาหารที่เติมผงวุ้นมีอุณหภูมิอยู่ที่ 55 องศาเซลเซียส แล้ว จึงเติม

1M Ca (NO ₃) ₂	1	มิลลิลิตร
0.01 M MnCl ₂	1	มิลลิลิตร
1% Tryptophan	1	มิลลิลิตร

กรณีที่ใช้ยาปฏิชีวนะ ผสมด้วย ให้เติม 1 มิลลิลิตร จากความเข้มข้น 1000 เท่า

เตรียม stock ยาปฏิชีวนะ แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1000 เท่า

Tetracycline	12.5	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
Chloramphenicol	5	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การเตรียมสารเคมี

2.2 การเตรียมสารละลาย 0.05 M acetate buffer

เตรียม stock solution

สารละลาย A : 0.2 M acetic acid (CH₃COOH 11.6 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M sodium acetate (CH₃COONa 16.4 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสมสารละลาย A และสารละลาย B เพื่อให้ได้ระดับ pH ที่ต้องการตามอัตราต่อไปนี้ แล้วเติมน้ำให้เป็น 200 มิลลิลิตร (ควรตรวจสอบด้วย pH meter ก่อนนำไปใช้)

สารละลาย A (มิลลิลิตร)	สารละลาย B (มิลลิลิตร)	pH
41.0	9.0	4.0
20.0	30.0	4.8
10.5	39.5	5.2

2.2 การเตรียมสารละลาย 0.05 M phosphate buffer

เตรียม stock solution

สารละลาย A: 0.2 M monobasic sodium phosphate (NaH_2PO_4 27.8 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M dibasic sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสมสารละลาย A และสารละลาย B เพื่อให้ได้ระดับ pH ที่ต้องการตามอัตราต่อไปนี้ แล้วเติมน้ำให้เป็น 400 มิลลิลิตร (ควรตรวจสอบด้วย pH meter ก่อนนำไปใช้)

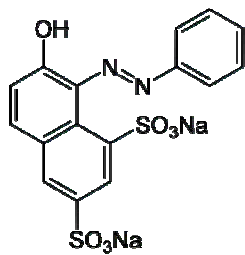
สารละลาย A (มิลลิลิตร)	สารละลาย B (มิลลิลิตร)	pH
87.7	12.3	6.0
39.0	61.0	7.0
5.3	94.7	8.0

3. การเตรียมสารละลายสี่ข้อมเอโซ

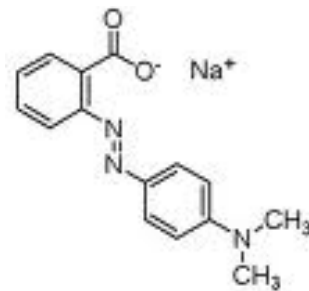
เตรียม stock สารละลายสี่ข้อมเอโซแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.1 การเตรียมสารละลายสี่ข้อมเอโซสำหรับวิเคราะห์

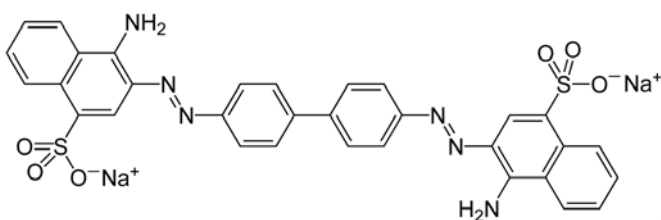
เตรียมสารละลายสี่ข้อมเอโซที่จะใช้ในการทดลองในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ประกอบด้วยอาหาร DSM (ภาคผนวก ก) และสารละลายสี่ข้อมเอโซแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีปริมาตรรวมในพลาสติกเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ



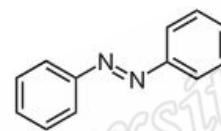
Orange G



Methyl red



Congo red



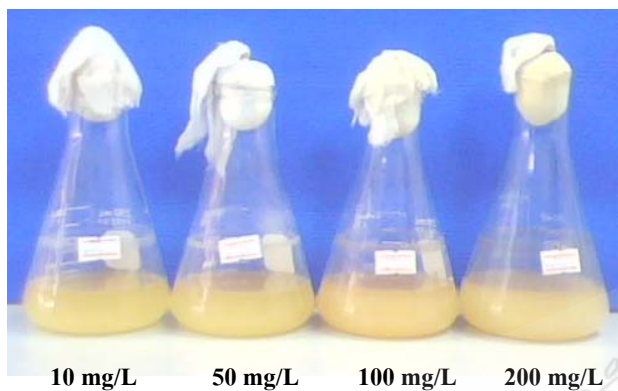
Azobenzene

รูปที่ ก-1 โครงสร้างทางเคมีของสียโซที่ใช้ในการศึกษา
ที่มา : (Sugiura *et al.*, 2006)

ภาคผนวก ข

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสีย้อมเอโซ

ก



ข

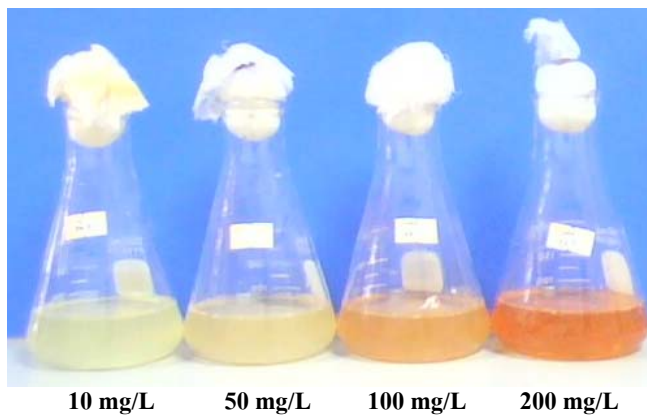


ค



รูปที่ ข-1 การย่อยสลายสี Methyl red โดย *B. subtilis* ORB7106 (ก) *B. subtilis* JH642 (ข)
เปรียบเทียบกับ Control (ค) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (pH7) ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ก



ข



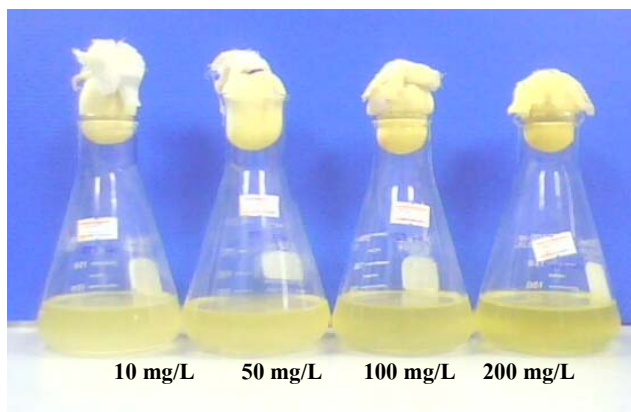
ค



Control

รูปที่ ข-2 การย่อยสลายสี Congo red โดย *B. subtilis* ORB7106 (ก) *B. subtilis* JH642 (ข)
เปรียบเทียบกับ Control (ค) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (pH7) ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ก



ข



ค



รูปที่ ข-3 การย่อยสลายสี Azobenzene โดย *B. subtilis* ORB7106 (ก) *B. subtilis* JH642 (ข) เปรียบเทียบกับ Control (ค) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (pH7) ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ก



ข



ค



รูปที่ ข- 4 การย่อยสลาย Orange G โดย *B. subtilis* ORB7106 (ก) *B. subtilis* JH642 (ข) เปรียบเทียบ
กับ Control (ค) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (pH7) ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ภาคผนวก ก

ผลของสภาวะต่าง ๆ (ความเข้มข้นสี อุณหภูมิและพีเอช) ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซ

ตาราง ก-1 ผลของสภาวะต่าง ๆ (ความเข้มข้นสี อุณหภูมิและพีเอช) ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซ ชนิด Azobenzene (AZ), Methyl red (MR), Orange G (OG) และ Congo red (CR) โดย *B. subtilis* ORB7106 ที่ระยะเวลา 8 ชั่วโมง จากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ (\pm SD)

Dyes	Conc. (mg/L)	(%) Decolorization				
		25°C pH7	37°C pH7	45°C pH7	37°C pH5	37°C pH9
AZ	10	3.23 \pm 1.89	6.22 \pm 2.93	14.21 \pm 2.09	5.61 \pm 0.48	8.58 \pm 1.45
	50	2.94 \pm 1.34	3.31 \pm 0.05	8.96 \pm 5.32	5.26 \pm 0.90	5.05 \pm 0.56
	100	2.20 \pm 0.44	3.11 \pm 0.48	5.55 \pm 1.98	5.01 \pm 0.25	3.14 \pm 0.20
	200	2.33 \pm 1.58	3.07 \pm 0.67	5.07 \pm 1.33	2.57 \pm 0.86	2.35 \pm 0.22
MR	10	21.69 \pm 0.72	45.15 \pm 1.85	85.03 \pm 3.08	47.13 \pm 1.76	55.08 \pm 0.60
	50	24.55 \pm 2.10	36.18 \pm 3.24	55.36 \pm 1.74	41.61 \pm 1.24	33.95 \pm 3.56
	100	23.83 \pm 1.77	48.31 \pm 2.39	45.51 \pm 9.80	32.17 \pm 4.68	26.50 \pm 1.52
	200	31.18 \pm 1.61	29.59 \pm 3.10	32.55 \pm 0.87	27.69 \pm 7.53	20.35 \pm 1.70
OG	10	3.96 \pm 1.08	7.03 \pm 1.44	10.68 \pm 1.21	1.86 \pm 0.89	1.39 \pm 0.22
	50	1.67 \pm 0.72	2.89 \pm 1.89	14.09 \pm 0.85	0.68 \pm 0.08	0.98 \pm 0.46
	100	0.83 \pm 0.79	1.63 \pm 0.55	8.03 \pm 2.31	0.61 \pm 0.20	1.26 \pm 0.54
	200	0.51 \pm 0.34	1.28 \pm 0.31	1.89 \pm 1.42	0.22 \pm 0.01	0.55 \pm 0.42
CR	10	21.69 \pm 0.72	45.15 \pm 1.85	85.03 \pm 3.08	47.13 \pm 1.76	55.08 \pm 0.60
	50	24.55 \pm 2.10	36.18 \pm 3.24	55.36 \pm 1.74	41.61 \pm 1.24	33.95 \pm 3.56
	100	23.83 \pm 1.77	48.31 \pm 2.39	45.51 \pm 9.80	32.17 \pm 4.68	26.50 \pm 1.52
	200	31.18 \pm 1.61	29.59 \pm 3.10	32.55 \pm 0.87	27.69 \pm 7.53	20.35 \pm 1.70

ตาราง ก-2 ผลของสภาวะต่าง ๆ (ความเข้มข้นสี อุณหภูมิและพีเอช) ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Azobenzene (AZ), Methyl red (MR), Orange G (OG) และ Congo red (CR) โดย *B. subtilis* JH 642 ที่ระยะเวลา 8 ชั่วโมง จากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ (\pm SD)

Dyes	Conc. (mg/L)	(% Decolorization)				
		25°C pH7	37°C pH7	45°C pH7	37°C pH5	37°C pH9
AZ	10	1.45 \pm 0.50	2.93 \pm 1.10	7.54 \pm 4.14	3.64 \pm 0.77	3.01 \pm 0.39
	50	2.06 \pm 1.35	2.52 \pm 0.28	5.97 \pm 1.41	2.97 \pm 0.51	3.06 \pm 0.27
	100	1.78 \pm 0.60	2.22 \pm 0.04	3.29 \pm 1.25	2.67 \pm 0.43	2.14 \pm 0.42
	200	1.94 \pm 1.06	1.86 \pm 0.28	3.87 \pm 0.99	1.87 \pm 0.43	1.77 \pm 0.38
MR	10	9.82 \pm 0.73	18.95 \pm 1.27	57.34 \pm 13.92	37.68 \pm 2.52	49.49 \pm 0.25
	50	9.34 \pm 0.56	9.52 \pm 0.35	42.01 \pm 1.71	25.69 \pm 9.34	15.29 \pm 0.91
	100	8.30 \pm 1.09	25.69 \pm 1.68	35.06 \pm 11.75	14.03 \pm 4.13	27.07 \pm 1.50
	200	7.03 \pm 2.06	3.40 \pm 3.26	4.62 \pm 0.40	6.70 \pm 2.67	16.89 \pm 1.79
OG	10	1.90 \pm 0.77	2.91 \pm 1.28	4.30 \pm 0.73	1.16 \pm 0.40	1.57 \pm 1.06
	50	0.86 \pm 0.63	1.45 \pm 0.83	1.30 \pm 0.30	0.30 \pm 0.11	0.48 \pm 0.19
	100	0.46 \pm 0.44	1.12 \pm 0.41	2.25 \pm 1.02	0.43 \pm 0.18	0.96 \pm 0.53
	200	0.14 \pm 0.06	0.70 \pm 0.45	0.52 \pm 0.30	0.15 \pm 0.05	0.25 \pm 0.20
CR	10	1.57 \pm 1.06	16.91 \pm 1.16	18.25 \pm 1.86	14.52 \pm 1.72	17.37 \pm 2.39
	50	0.48 \pm 0.19	14.44 \pm 1.66	13.52 \pm 0.48	11.23 \pm 3.82	12.88 \pm 1.52
	100	0.96 \pm 0.53	11.92 \pm 1.60	14.04 \pm 2.94	8.01 \pm 3.25	10.52 \pm 0.51
	200	0.25 \pm 0.20	5.07 \pm 0.59	8.68 \pm 0.86	6.45 \pm 3.65	6.22 \pm 1.08

ตาราง ค-3 ผลของสภาวะต่าง ๆ (ความเข้มข้นสี อุณหภูมิและพีเอช) ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Azobenzene (AZ), Methyl red (MR), Orange G (OG) และCongo red (CR) *B. subtilis* ORB7106 ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง จากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ (\pm SD)

Dyes	Conc. (mg/L)	(% Decolorization)				
		25°C pH7	37°C pH7	45°C pH7	37°C pH5	37°C pH9
AZ	10	5.79 \pm 0.93	11.83 \pm 2.06	20.56 \pm 1.17	14.54 \pm 4.16	12.88 \pm 1.55
	50	6.33 \pm 0.83	9.75 \pm 2.83	12.05 \pm 6.52	11.57 \pm 1.31	8.11 \pm 0.43
	100	3.70 \pm 1.17	5.64 \pm 0.78	9.63 \pm 2.10	8.29 \pm 1.03	6.54 \pm 1.48
	200	3.75 \pm 1.89	5.03 \pm 0.15	8.88 \pm 1.57	4.43 \pm 0.81	4.47 \pm 0.24
MR	10	40.78 \pm 0.49	57.30 \pm 1.62	88.58 \pm 2.83	59.75 \pm 2.38	65.00 \pm 0.30
	50	31.92 \pm 1.59	52.01 \pm 2.02	76.79 \pm 1.85	55.37 \pm 1.65	50.97 \pm 1.69
	100	39.02 \pm 2.50	54.45 \pm 1.87	67.13 \pm 10.89	54.96 \pm 2.45	40.30 \pm 1.10
	200	48.96 \pm 6.49	40.53 \pm 2.67	41.02 \pm 2.21	42.40 \pm 1.86	33.78 \pm 0.72
OG	10	5.68 \pm 0.80	10.12 \pm 1.63	25.89 \pm 0.68	3.73 \pm 1.43	1.39 \pm 1.57
	50	3.47 \pm 0.03	6.25 \pm 2.14	21.60 \pm 0.71	1.07 \pm 0.07	2.42 \pm 1.15
	100	1.61 \pm 1.53	4.66 \pm 0.90	13.91 \pm 2.38	0.95 \pm 0.44	2.04 \pm 0.53
	200	0.82 \pm 0.16	2.50 \pm 0.50	2.47 \pm 1.87	0.37 \pm 0.09	1.04 \pm 0.76
CR	10	48.10 \pm 8.07	57.91 \pm 2.00	58.61 \pm 15.37	41.66 \pm 9.62	42.52 \pm 3.22
	50	36.77 \pm 2.80	45.60 \pm 1.19	61.26 \pm 0.93	36.90 \pm 2.11	40.20 \pm 1.43
	100	21.17 \pm 0.29	31.94 \pm 1.36	59.42 \pm 3.58	32.86 \pm 0.56	36.97 \pm 4.08
	200	16.38 \pm 5.18	30.52 \pm 4.87	59.19 \pm 2.35	27.74 \pm 4.50	14.44 \pm 1.64

ตาราง ก-4 ผลของสภาวะต่าง ๆ (ความเข้มข้นสี อุณหภูมิและพีเอช) ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Azobenzene (AZ), Methyl red (MR), Orange G (OG) และ Congo red (CR) โดย *B. subtilis* JH 642 ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง จากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ (\pm SD)

Dyes	Conc. (mg/L)	(% Decolorization)				
		25°C pH7	37°C pH7	45°C pH7	37°C pH5	37°C pH9
AZ	10	3.69 \pm 0.28	6.18 \pm 0.99	9.77 \pm 4.65	7.01 \pm 0.94	6.02 \pm 1.51
	50	3.81 \pm 1.37	6.75 \pm 3.46	8.11 \pm 2.04	7.81 \pm 3.06	5.58 \pm 0.08
	100	2.74 \pm 1.21	4.00 \pm 0.07	5.67 \pm 2.44	5.21 \pm 1.28	4.41 \pm 0.60
	200	2.59 \pm 1.22	3.83 \pm 0.10	5.60 \pm 1.31	3.73 \pm 0.47	3.18 \pm 0.40
MR	10	16.79 \pm 0.77	44.86 \pm 2.13	44.86 \pm 2.13	47.13 \pm 2.10	55.52 \pm 2.64
	50	17.62 \pm 0.32	28.15 \pm 1.60	28.15 \pm 1.60	41.73 \pm 8.52	39.65 \pm 1.96
	100	11.06 \pm 0.66	40.82 \pm 0.96	40.82 \pm 0.96	20.34 \pm 4.41	34.74 \pm 1.45
	200	7.83 \pm 1.53	26.91 \pm 9.63	26.91 \pm 9.63	17.63 \pm 10.70	26.20 \pm 0.85
OG	10	3.02 \pm 1.09	4.18 \pm 1.22	6.28 \pm 0.68	2.44 \pm 0.37	3.08 \pm 1.87
	50	1.65 \pm 0.40	2.45 \pm 1.09	2.47 \pm 0.27	0.52 \pm 0.18	1.54 \pm 0.81
	100	0.69 \pm 0.49	1.81 \pm 0.18	2.97 \pm 0.33	0.82 \pm 0.40	1.44 \pm 0.51
	200	0.30 \pm 0.02	0.98 \pm 0.54	0.98 \pm 0.55	0.26 \pm 0.09	0.50 \pm 0.33
CR	10	22.06 \pm 3.01	24.60 \pm 2.87	24.49 \pm 2.67	22.23 \pm 1.60	22.63 \pm 2.09
	50	17.79 \pm 0.76	21.78 \pm 3.22	19.21 \pm 3.02	18.66 \pm 2.29	18.32 \pm 3.76
	100	8.84 \pm 0.17	18.52 \pm 2.26	20.40 \pm 5.80	11.13 \pm 1.68	15.11 \pm 1.95
	200	8.41 \pm 0.15	12.91 \pm 0.84	13.20 \pm 2.76	11.56 \pm 3.74	13.17 \pm 2.10

ตาราง ค-5 ผลของสภาวะต่าง ๆ (ความเข้มข้นสี อุณหภูมิและพีเอช) ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Azobenzene (AZ), Methyl red (MR), Orange G (OG) และ Congo red (CR) โดย *B. subtilis* ORB7106 ที่ระยะเวลา 16 ชั่วโมง จากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ (\pm SD)

Dyes	Conc. (mg/L)	(% Decolorization)				
		25°C pH7	37°C pH7	45°C pH7	37°C pH5	37°C pH9
AZ	10	10.75 \pm 0.52	21.61 \pm 3.78	27.58 \pm 4.11	22.05 \pm 7.22	24.93 \pm 0.98
	50	8.39 \pm 1.26	13.85 \pm 2.93	14.22 \pm 6.65	16.14 \pm 2.08	13.03 \pm 0.19
	100	5.35 \pm 1.40	8.45 \pm 0.79	12.35 \pm 2.38	10.58 \pm 1.80	9.43 \pm 1.25
	200	4.77 \pm 1.67	6.85 \pm 0.41	12.71 \pm 0.73	6.99 \pm 1.38	7.29 \pm 0.54
MR	10	60.61 \pm 5.40	63.90 \pm 1.56	91.83 \pm 2.09	66.38 \pm 1.77	70.65 \pm 0.35
	50	51.07 \pm 2.79	61.63 \pm 1.11	85.05 \pm 3.12	67.41 \pm 0.26	69.62 \pm 0.78
	100	52.09 \pm 1.14	64.02 \pm 4.15	76.71 \pm 7.28	64.26 \pm 0.52	50.02 \pm 2.40
	200	60.25 \pm 0.92	69.97 \pm 1.53	55.60 \pm 5.28	62.55 \pm 8.96	42.58 \pm 0.49
OG	10	10.24 \pm 1.38	12.74 \pm 1.15	31.52 \pm 1.12	5.47 \pm 0.73	7.27 \pm 2.79
	50	7.24 \pm 0.15	8.20 \pm 0.90	26.17 \pm 0.57	1.73 \pm 0.05	4.25 \pm 2.68
	100	2.99 \pm 0.61	5.67 \pm 0.48	19.15 \pm 3.14	1.44 \pm 0.27	2.50 \pm 0.63
	200	1.03 \pm 0.12	3.11 \pm 0.43	2.82 \pm 2.16	0.57 \pm 0.18	1.59 \pm 1.02
CR	10	62.89 \pm 5.08	72.12 \pm 2.28	67.88 \pm 9.16	57.68 \pm 5.04	55.44 \pm 1.50
	50	59.13 \pm 1.28	53.65 \pm 1.27	73.84 \pm 8.76	48.93 \pm 4.94	51.34 \pm 1.39
	100	43.14 \pm 0.07	48.05 \pm 2.54	71.48 \pm 4.05	47.86 \pm 1.12	49.48 \pm 1.85
	200	41.13 \pm 1.63	42.15 \pm 4.95	66.19 \pm 0.55	39.68 \pm 7.29	31.92 \pm 1.56

ตาราง ก-6 ผลของสภาวะต่าง ๆ (ความเข้มข้นสี อุณหภูมิและพีเอช) ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Azobenzene (AZ), Methyl red (MR), Orange G (OG) และ Congo red (CR) โดย *B. subtilis* JH 642 ที่ระยะเวลา 16 ชั่วโมง จากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ (\pm SD)

Dyes	Conc. (mg/L)	(% Decolorization)				
		25°C pH7	37°C pH7	45°C pH7	37°C pH5	37°C pH9
AZ	10	5.94 \pm 0.31	10.48 \pm 2.15	14.11 \pm 4.61	10.65 \pm 1.93	9.31 \pm 1.64
	50	5.87 \pm 1.22	9.28 \pm 2.89	9.79 \pm 2.86	11.17 \pm 1.86	8.89 \pm 0.48
	100	4.39 \pm 1.25	6.67 \pm 0.96	8.08 \pm 2.94	7.77 \pm 1.52	6.67 \pm 0.55
	200	3.62 \pm 1.42	5.26 \pm 0.66	6.89 \pm 2.01	5.70 \pm 0.22	5.40 \pm 0.15
MR	10	23.59 \pm 0.72	52.24 \pm 0.27	76.40 \pm 2.76	53.05 \pm 1.71	63.69 \pm 2.60
	50	19.97 \pm 0.34	39.84 \pm 1.37	72.74 \pm 0.61	49.20 \pm 6.85	56.00 \pm 0.54
	100	15.58 \pm 1.34	56.17 \pm 1.78	66.77 \pm 10.58	28.97 \pm 1.63	49.92 \pm 0.87
	200	8.87 \pm 1.53	32.77 \pm 8.67	7.39 \pm 0.36	29.41 \pm 4.06	33.85 \pm 0.69
OG	10	4.73 \pm 0.89	5.45 \pm 1.87	7.98 \pm 1.19	3.37 \pm 0.24	4.10 \pm 1.37
	50	2.55 \pm 0.32	4.50 \pm 0.38	3.51 \pm 0.33	1.15 \pm 0.05	2.44 \pm 1.23
	100	1.14 \pm 0.66	3.53 \pm 0.14	4.99 \pm 0.25	1.06 \pm 0.40	2.01 \pm 0.76
	200	0.43 \pm 0.02	1.46 \pm 0.89	1.55 \pm 0.92	0.42 \pm 0.22	0.79 \pm 0.35
CR	10	26.43 \pm 0.81	31.70 \pm 2.53	32.90 \pm 2.25	26.89 \pm 1.58	30.98 \pm 1.58
	50	21.55 \pm 1.43	28.09 \pm 2.47	27.54 \pm 0.96	23.66 \pm 2.97	23.94 \pm 2.70
	100	13.15 \pm 1.06	21.08 \pm 1.21	31.95 \pm 8.89	14.84 \pm 0.82	21.15 \pm 1.54
	200	11.70 \pm 1.77	17.10 \pm 0.48	19.07 \pm 3.15	14.03 \pm 3.16	18.99 \pm 2.14

ตาราง ก-7 ผลของสภาวะต่าง ๆ (ความเข้มข้นสี อุณหภูมิและพีเอช) ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Azobenzene (AZ), Methyl red (MR), Orange G (OG) และ Congo red (CR) โดย *B. subtilis* ORB7106 ที่ระยะเวลา 20 ชั่วโมง จากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ครั้ง (\pm SD)

Dyes	Conc. (mg/L)	(%) Decolorization				
		25°C pH7	37°C pH7	45°C pH7	37°C pH5	37°C pH9
AZ	10	15.88 \pm 1.14	32.69 \pm 3.64	33.15 \pm 1.62	29.38 \pm 5.77	36.39 \pm 0.98
	50	14.71 \pm 1.88	20.48 \pm 2.93	16.68 \pm 7.48	23.0 \pm 2.82	18.60 \pm 1.22
	100	7.68 \pm 1.82	12.0 \pm 1.15	15.68 \pm 2.85	15.98 \pm 5.67	12.32 \pm 1.02
	200	6.19 \pm 1.85	8.94 \pm 1.02	14.29 \pm 0.97	9.32 \pm 1.85	10.81 \pm 0.99
MR	10	69.91 \pm 1.23	74.05 \pm 0.94	92.84 \pm 1.48	77.17 \pm 3.24	81.74 \pm 0.82
	50	67.9 \pm 0.49	81.78 \pm 1.90	90.87 \pm 2.81	73.99 \pm 0.07	75.92 \pm 1.15
	100	61.38 \pm 0.31	73.20 \pm 2.57	85.15 \pm 6.11	71.24 \pm 0.87	66.81 \pm 1.76
	200	77.00 \pm 1.04	73.56 \pm 2.61	73.05 \pm 5.65	68.38 \pm 5.18	54.91 \pm 0.55
OG	10	18.23 \pm 1.63	16.07 \pm 3.89	38.07 \pm 0.75	7.21 \pm 0.61	10.0 \pm 3.32
	50	10.52 \pm 0.92	9.33 \pm 0.69	34.44 \pm 0.45	2.61 \pm 0.29	5.30 \pm 2.91
	100	4.40 \pm 0.82	7.39 \pm 0.54	28.99 \pm 4.65	1.81 \pm 0.35	3.12 \pm 0.70
	200	1.24 \pm 0.19	4.41 \pm 1.07	3.66 \pm 2.52	0.76 \pm 0.33	2.26 \pm 1.45
CR	10	73.34 \pm 4.97	88.47 \pm 1.61	74.34 \pm 8.58	77.98 \pm 5.06	69.07 \pm 1.46
	50	69.64 \pm 1.22	70.29 \pm 0.60	83.41 \pm 4.28	70.28 \pm 4.40	59.85 \pm 1.6
	100	66.48 \pm 0.20	71.63 \pm 0.40	78.99 \pm 4.36	67.30 \pm 4.63	56.37 \pm 6.58
	200	56.22 \pm 0.50	53.13 \pm 8.10	75.74 \pm 5.72	64.58 \pm 3.63	54.01 \pm 1.57

ตาราง ค-8 ผลของสภาวะต่าง ๆ (ความเข้มข้นสี อุณหภูมิและพีเอช) ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Azobenzene (AZ), Methyl red (MR), Orange G (OG) และ Congo red (CR) โดย *B. subtilis* JH 642 ที่ระยะเวลา 20 ชั่วโมง จากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ (\pm SD)

Dyes	Conc. (mg/L)	(% Decolorization)				
		25°C pH7	37°C pH7	45°C pH7	37°C pH5	37°C pH9
AZ	10	8.33 \pm 1.28	14.12 \pm 1.87	18.02 \pm 5.57	15.82 \pm 3.06	12.33 \pm 1.20
	50	7.94 \pm 1.39	12.12 \pm 3.17	11.32 \pm 2.74	13.46 \pm 1.63	11.55 \pm 0.92
	100	5.75 \pm 1.96	9.49 \pm 0.81	9.89 \pm 3.23	12.30 \pm 5.78	8.05 \pm 0.35
	200	4.91 \pm 1.54	6.97 \pm 0.77	8.60 \pm 2.71	8.03 \pm 1.11	7.29 \pm 0.40
MR	10	39.40 \pm 3.34	61.98 \pm 0.79	78.20 \pm 2.26	61.62 \pm 4.34	68.75 \pm 0.89
	50	33.40 \pm 0.13	58.67 \pm 1.89	79.83 \pm 0.30	62.17 \pm 8.11	66.32 \pm 0.77
	100	29.67 \pm 0.66	69.90 \pm 1.46	80.17 \pm 3.16	56.52 \pm 1.15	61.33 \pm 0.76
	200	9.80 \pm 1.86	42.34 \pm 3.08	8.16 \pm 0.92	46.03 \pm 6.04	42.55 \pm 0.47
OG	10	6.54 \pm 1.05	6.92 \pm 1.80	9.77 \pm 0.70	4.42 \pm 0.26	6.44 \pm 2.19
	50	3.43 \pm 0.37	6.21 \pm 0.49	5.88 \pm 1.64	1.59 \pm 0.04	3.58 \pm 1.99
	100	2.00 \pm 0.25	4.91 \pm 1.12	5.58 \pm 0.41	1.43 \pm 0.47	2.47 \pm 0.73
	200	0.95 \pm 0.27	1.92 \pm 1.25	2.24 \pm 1.48	0.55 \pm 0.23	1.09 \pm 0.48
CR	10	34.62 \pm 7.67	39.43 \pm 2.45	37.85 \pm 3.01	33.93 \pm 0.52	36.38 \pm 2.71
	50	26.94 \pm 1.90	31.73 \pm 1.95	31.41 \pm 2.80	29.07 \pm 1.44	31.17 \pm 0.53
	100	19.87 \pm 0.45	27.34 \pm 2.57	35.10 \pm 8.59	18.67 \pm 0.33	27.36 \pm 0.45
	200	19.12 \pm 3.04	20.44 \pm 1.29	21.83 \pm 2.88	17.29 \pm 1.97	21.84 \pm 1.37

ตาราง ก-9 ผลของสภาวะต่าง ๆ (ความเข้มข้นสี อุณหภูมิและพีเอช) ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Azobenzene (AZ), Methyl red (MR), Orange G (OG) และ Congo red (CR) โดย *B. subtilis* ORB7106 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ (\pm SD)

Dyes	Conc. (mg/L)	(% Decolorization)				
		25°C pH7	37°C pH7	45°C pH7	37°C pH5	37°C pH9
AZ	10	19.42 \pm 0.51	41.93 \pm 1.39	38.14 \pm 0.91	34.60 \pm 5.24	39.97 \pm 0.13
	50	16.92 \pm 2.50	26.16 \pm 3.32	19.48 \pm 7.30	29.19 \pm 6.17	26.47 \pm 0.75
	100	10.28 \pm 3.43	17.65 \pm 1.67	17.18 \pm 3.31	18.45 \pm 4.47	15.84 \pm 1.47
	200	8.39 \pm 3.63	12.57 \pm 3.02	16.16 \pm 1.74	12.59 \pm 2.69	12.93 \pm 1.32
MR	10	90.98 \pm 0.99	95.12 \pm 0.49	94.52 \pm 0.38	85.55 \pm 1.50	90.30 \pm 1.42
	50	91.31 \pm 0.95	93.61 \pm 1.96	94.47 \pm 0.37	83.56 \pm 0.24	83.65 \pm 0.60
	100	89.91 \pm 1.11	90.14 \pm 0.23	90.20 \pm 5.08	82.12 \pm 0.15	77.82 \pm 0.65
	200	86.17 \pm 0.73	92.02 \pm 0.56	79.21 \pm 6.95	78.08 \pm 0.16	72.56 \pm 0.68
OG	10	21.09 \pm 3.10	19.07 \pm 4.37	42.76 \pm 1.96	8.96 \pm 0.66	11.77 \pm 3.66
	50	12.27 \pm 1.22	10.17 \pm 0.35	36.02 \pm 0.15	3.64 \pm 0.85	6.72 \pm 0.51
	100	5.25 \pm 0.75	8.44 \pm 0.78	34.70 \pm 0.85	2.44 \pm 0.34	3.48 \pm 0.77
	200	2.08 \pm 0.76	6.23 \pm 1.38	4.17 \pm 2.92	1.01 \pm 0.58	2.80 \pm 1.63
CR	10	80.18 \pm 4.23	92.45 \pm 0.98	91.71 \pm 1.46	87.36 \pm 3.59	92.51 \pm 0.77
	50	77.98 \pm 1.48	90.63 \pm 0.26	88.10 \pm 1.35	87.29 \pm 4.07	91.51 \pm 0.76
	100	67.75 \pm 0.25	87.80 \pm 0.70	83.81 \pm 1.38	82.20 \pm 7.12	90.16 \pm 1.08
	200	63.93 \pm 1.08	73.82 \pm 2.15	83.10 \pm 2.17	79.14 \pm 9.31	87.19 \pm 0.42

ตาราง ค-10 ผลของสภาวะต่าง ๆ (ความเข้มข้นสี อุณหภูมิและพีเอช) ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Azobenzene (AZ), Methyl red (MR), Orange G (OG) และ Congo red (CR) โดย *B. subtilis* JH 642 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ (\pm SD)

Dyes	Conc. (mg/L)	(%) Decolorization				
		25°C pH7	37°C pH7	45°C pH7	37°C pH5	37°C pH9
AZ	10	10.89 \pm 1.82	17.9 \pm 01.66	22.09 \pm 5.01	18.62 \pm 4.20	16.78 \pm 1.69
	50	9.56 \pm 1.91	15.13 \pm 2.22	12.98 \pm 4.20	18.56 \pm 5.93	13.28 \pm 0.35
	100	7.96 \pm 1.59	12.16 \pm 0.84	11.37 \pm 4.08	14.86 \pm 5.54	10.57 \pm 0.77
	200	5.94 \pm 1.65	9.97 \pm 1.77	9.89 \pm 3.04	10.62 \pm 2.65	9.52 \pm 0.59
MR	10	67.37 \pm 1.30	78.48 \pm 1.98	90.91 \pm 1.79	75.76 \pm 5.96	73.67 \pm 0.69
	50	45.20 \pm 2.82	79.50 \pm 0.78	88.39 \pm 0.32	74.51 \pm 4.04	71.93 \pm 0.45
	100	40.10 \pm 2.61	72.42 \pm 1.47	85.67 \pm 2.21	61.23 \pm 0.87	71.70 \pm 0.58
	200	10.50 \pm 2.56	55.69 \pm 3.46	8.84 \pm 1.17	59.81 \pm 6.24	51.08 \pm 0.63
OG	10	8.24 \pm 0.44	9.00 \pm 0.83	13.56 \pm 2.42	5.81 \pm 0.85	8.54 \pm 2.79
	50	4.67 \pm 0.61	7.81 \pm 1.13	9.67 \pm 1.81	2.15 \pm 0.39	4.67 \pm 2.34
	100	2.52 \pm 0.24	5.67 \pm 0.65	6.29 \pm 0.51	2.02 \pm 0.40	2.80 \pm 0.86
	200	1.41 \pm 0.16	2.18 \pm 1.43	3.12 \pm 2.08	0.77 \pm 0.38	1.32 \pm 0.65
CR	10	39.53 \pm 7.93	43.53 \pm 0.46	41.76 \pm 3.71	38.36 \pm 1.22	42.63 \pm 2.97
	50	32.68 \pm 0.92	36.78 \pm 1.43	35.61 \pm 1.41	35.14 \pm 1.20	34.99 \pm 0.86
	100	27.96 \pm 3.21	32.86 \pm 2.17	38.26 \pm 8.76	23.16 \pm 1.56	31.12 \pm 0.74
	200	26.97 \pm 1.46	23.93 \pm 1.13	27.74 \pm 3.02	20.91 \pm 3.44	26.23 \pm 0.88

ภาคผนวก ง

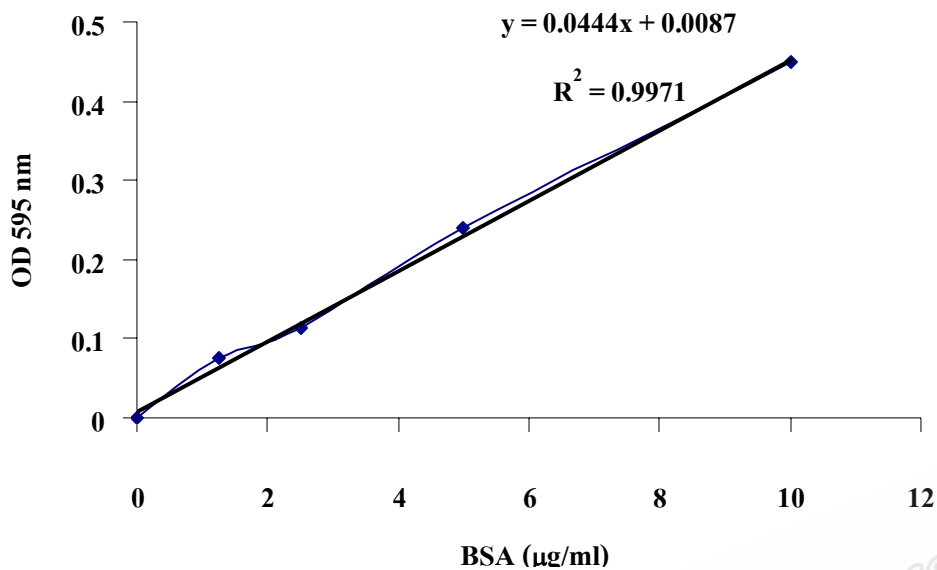
กราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานสารละลายโปรตีน Bovine serum albumin (BSA)

เตรียมสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้น 10, 5, 2.5 และ 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 0.05 M phosphate buffer (pH7) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำมาผสมกับ dye reagent concentrate (Bio Rad protein assay) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ทำการทดลอง 2 ซ้ำ จากนั้นเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น เพื่อหาสมการเส้นตรงสำหรับใช้คำนวณหาปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ทดสอบ

ตาราง ง-1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ของสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร
0	0
1.25	0.075
2.50	0.113
5.00	0.241
10.00	0.449



รูปที่ ง- 1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA

ตาราง ง-2 ผลการหาปริมาณ โปรตีนของ *B. subtilis* ORB7106 และ *B. subtilis* JH 642

	<i>B. subtilis</i> ORB7106		<i>B. subtilis</i> JH642	
	Extracellular	Intracellular	No induced	Induced
OD 595 nm	0.298	0.815	0.419	0.527
Protein (µg/mL)	55.17	148.32	92.53	92.15