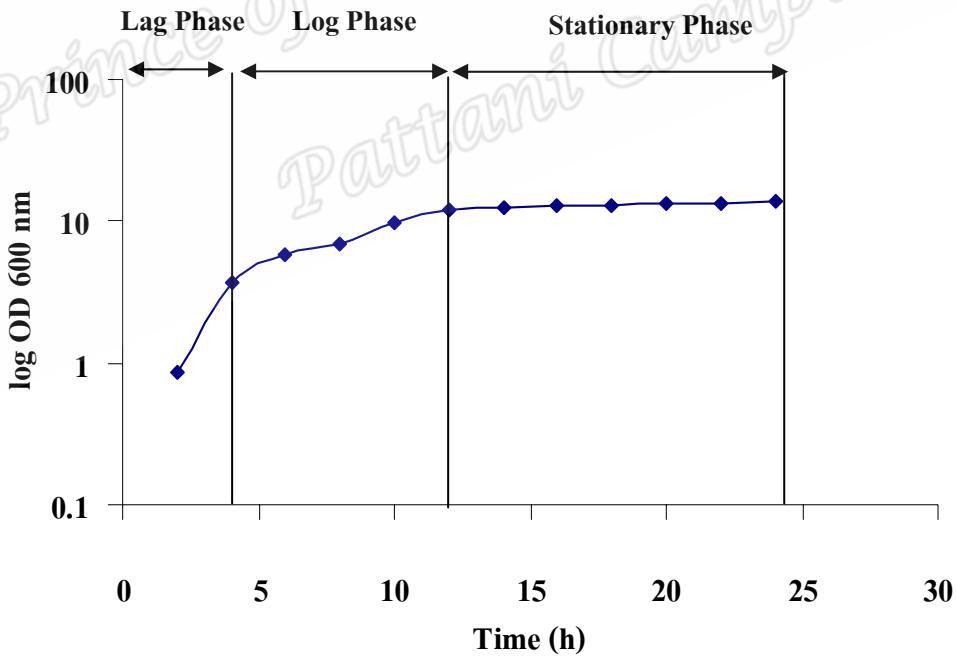
บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

4.1 ผลการศึกษาระยะการเจริญที่เหมาะสมของแบคทีเรีย

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ORB7106 ในอาหารเหลว DSM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พบว่า เชื้อแบคทีเรียมีการเจริญเป็นอย่างดีและเจริญเข้าสู่ช่วงปลาย Log phase หรือ ช่วงต้น Stationary phase เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง โดยในระยะนี้แบคทีเรียจะมีอัตราการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วและมีอัตราการเจริญสูงกว่าระยะอื่น ๆ และมีกระบวนการเมแทบอลิซึมตลอดจนสมบัติทางสรีรวิทยาในระดับที่ไม่แตกต่างกันมากนัก จากนั้นตั้งแต่ระยะเวลา 12-24 ชั่วโมง จะเข้าสู่ช่วง Stationary phase จากรูปที่ 4.1 จะเห็นได้ว่ายังไม่พบช่วง Death phase ของแบคทีเรีย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อยังคงมีปริมาณเพียงพอต่อการเจริญและมีการผลิตเอนไซม์ต่อไปได้

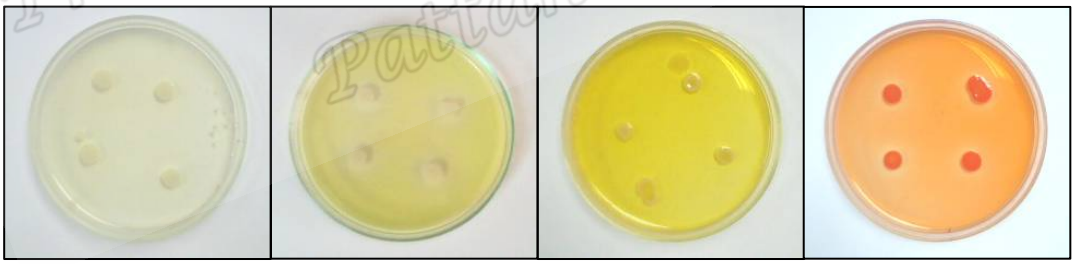


รูปที่ 4.1 ระยะการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* ORB7106 ในอาหารเหลว DSM เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.2 ผลการศึกษาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลายสีย้อมเอโซบนอาหารแข็ง DSM

การศึกษาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลายสีย้อมเอโซในอาหารแข็ง DSM โดยเทคนิค spot inoculation ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 5, 7 และ 9 บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่า โคโลนีของ *B. subtilis* ORB7106 เจริญได้ดี ทุกอุณหภูมิและทุกค่าพีเอช ในทุกความเข้มข้นและทุกชนิดสีย้อม (รูปที่ 4.2 ตารางที่ 4.1 และ 4.2) โดยสีของโคโลนีจะเปลี่ยนไปตามสีที่ผสมในอาหาร เนื่องจากมีการดูดซับสีเข้าสู่เซลล์ โดยเฉพาะโคโลนีที่เลี้ยงบนอาหารที่ผสมสี Congo red แต่ความสามารถในการย่อยสลาย พบว่า สามารถย่อยสลายสี Methyl red และCongo red ได้ในทุกความเข้มข้นสี สังเกตจากบริเวณใสรอบโคโลนี สี Orange G ไม่พบบริเวณใสรอบโคโลนี แต่มีการดูดซับสีเข้าสู่เซลล์เพียงเล็กน้อยในทุกความเข้มข้นสี สำหรับสี Azobenzene มีลักษณะสีคล้ายกับสีของอาหารจึงไม่สามารถสังเกตบริเวณใสรอบโคโลนีได้ (รูปที่ 4.2) เนื่องจากผลการย่อยสลายสีย้อมเอโซในอาหารแข็งยังไม่สามารถตรวจวัดประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีย้อมเอโซแต่ละชนิดได้ จึงต้องมีการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีย้อมเอโซในอาหารเหลวต่อไป และจากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายสีย้อมเอโซในอาหารแข็ง DSM พบว่า ในสภาวะของอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ผลของการเจริญและการย่อยสลายสีย้อมเอโซไม่แตกต่างกัน ดังนั้นในการย่อยสลายสีย้อมเอโซในอาหารเหลว จึงได้เลือกทดสอบที่อุณหภูมิ 25, 37 และ 45 องศาเซลเซียส



Azobenzene **Methyl red** **Orange G** **Congo red**

รูปที่ 4.2 ผลการย่อยสลายสีย้อมเอโซ โดย *B. subtilis* ORB7106 บนอาหารแข็ง DSM ที่ผสมสีย้อมเอโซแต่ละชนิดได้แก่ Azobenzene, Methyl red, Orange G และ Congo red ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (พีเอช 7) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 4.1 ผลของอุณหภูมิในการย่อยสลายสีย้อมเอโซบนอาหารแข็ง DSM ที่พีเอชเท่ากับ 7 โดย *B. subtilis* ORB7106 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Dyes	Dyes Concentration																			
	10 mg/L					50 mg/L					100 mg/L					200 mg/L				
	Temperature (°C)					Temperature (°C)					Temperature (°C)					Temperature (°C)				
	25	**30**	**37**	**40**	**45**	**25**	**30**	**37**	**40**	**45**	**25**	**30**	**37**	**40**	**45**	**25**	**30**	**37**	**40**	**45**
Azobenzene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl red	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Orange G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Congo red	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีวงใสรอบโคโลนี

\+ หมายถึง มีวงใสรอบโคโลนี

ตารางที่ 4.2 ผลของพีเอชในการย่อยสลายสีย้อมเอโซบนอาหารแข็ง DSM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดย *B. subtilis* ORB7106 ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

Dyes	Dyes Concentration											
	10 mg/L			50 mg/L			100 mg/L			200 mg/L		
	pH			pH			pH			pH		
	5	7	9	5	7	9	5	7	9	5	7	9
Azobenzene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl red	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Orange G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Congo red	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีวงใสรอบโคโลนี

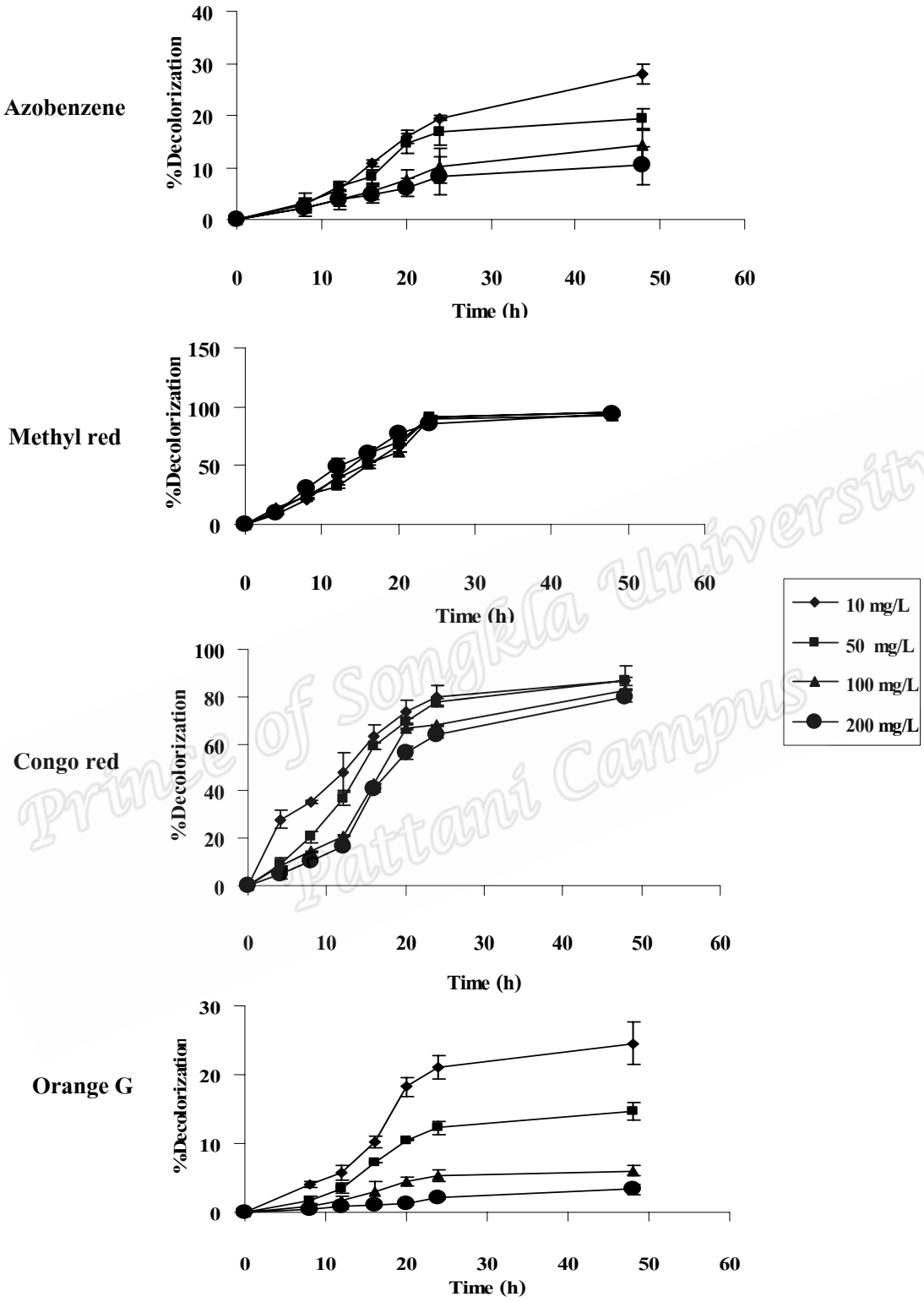
\+ หมายถึง มีวงใสรอบโคโลนี

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.3 ผลการทดสอบความเข้มข้นสีเริ่มต้นในการย่อยสลายสีย้อมเอโซในอาหารเหลว DSM

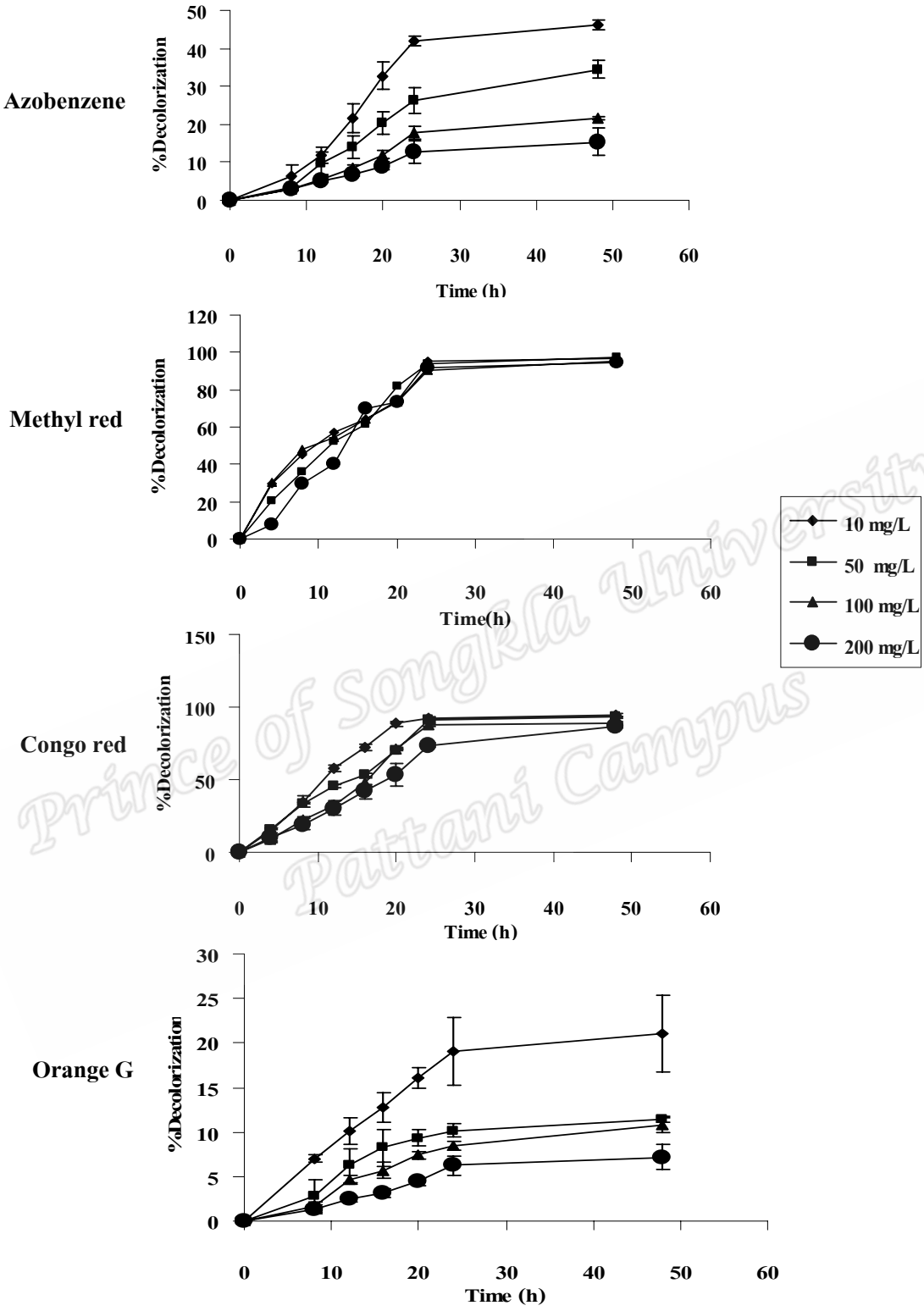
การทดสอบความเข้มข้นสีเริ่มต้นในการย่อยสลายสีย้อมเอโซในอาหารเหลว DSM พบว่า *B. subtilis* ORB7106 สามารถย่อยสลายสีย้อมเอโซทั้ง 4 ชนิด ได้ทุกความเข้มข้นสี โดยสามารถย่อยสลายสี Methyl red ได้มากกว่าร้อยละ 90 ในทุกความเข้มข้นสี และย่อยสลายสี Congo red ได้มากกว่าร้อยละ 80 ในทุกความเข้มข้นสี สำหรับสี Azobenzene และ Orange G ย่อยสลายได้ดีที่ความเข้มข้นสีต่ำสุด คือ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรและเมื่อความเข้มข้นสีเพิ่มขึ้น พบว่า ประสิทธิภาพในการย่อยสลายลดลงโดยย่อยสลายได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (รูปที่ 4.3, 4.4 และ4.5 ตามลำดับ และตารางที่ 4.3) จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นต่ำสุดสามารถย่อยสลายได้ดีที่สุด เนื่องจากความเข้มข้นสีที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย และโครงสร้างของสีย้อมเอโซเป็นวงอะโรมาติกที่มีความซับซ้อน ย่อยสลายได้ยาก และมีความเป็นพิษ ดังนั้นแบคทีเรียจึงใช้ระยะเวลาในการปรับตัวเพิ่มขึ้นเพื่อให้ทนต่อสภาวะที่มีพิษ และย่อยสลายสารดังการเป็นแหล่งพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญ (Dafale *et al.,* 2008) และจากผลการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Azobenzene และ Orange G ได้เพียงเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโครงสร้างและคุณสมบัติของสีที่ย่อยสลายได้ยาก ซึ่งสอดคล้องกับ Wackerow-Kouzova (2005) ได้ทำการคัดแยกและศึกษาแบคทีเรียกลุ่ม Heterotrophic จากดิน 4 ชนิด คือ *Bacillus cereus* SNK12, *Paenibacillus polymyxa* SNK2, *Azotobacter chroococcum* ANKII, และ *Ochrobactrum intermedium* ANKI ในการย่อยสลาย Azobenzene ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 1 เดือน จากผลการศึกษาพบว่า แบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด มีการย่อยสลาย Azobenzene หลังจากบ่มเป็นเวลา 14 วันโดยสามารถย่อยสลายได้เพียงร้อยละ 47, 33, 30 และ 25 ตามลำดับ และ Eichlerova *et al.* (2003) ศึกษาการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Orange G โดย *Pleurotus ostreatus* พบว่า ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Orange G ในอาหารเหลวเกิดขึ้นได้น้อยมาก และในอาหารแข็งไม่เกิดการย่อยสลาย หลังจากบ่มไปเป็นเวลา 25 วัน แต่ปริมาณเซลล์ยังคงมีการเจริญและมีจำนวนเพิ่มขึ้น

Prince of Songkla University Pattani Campus



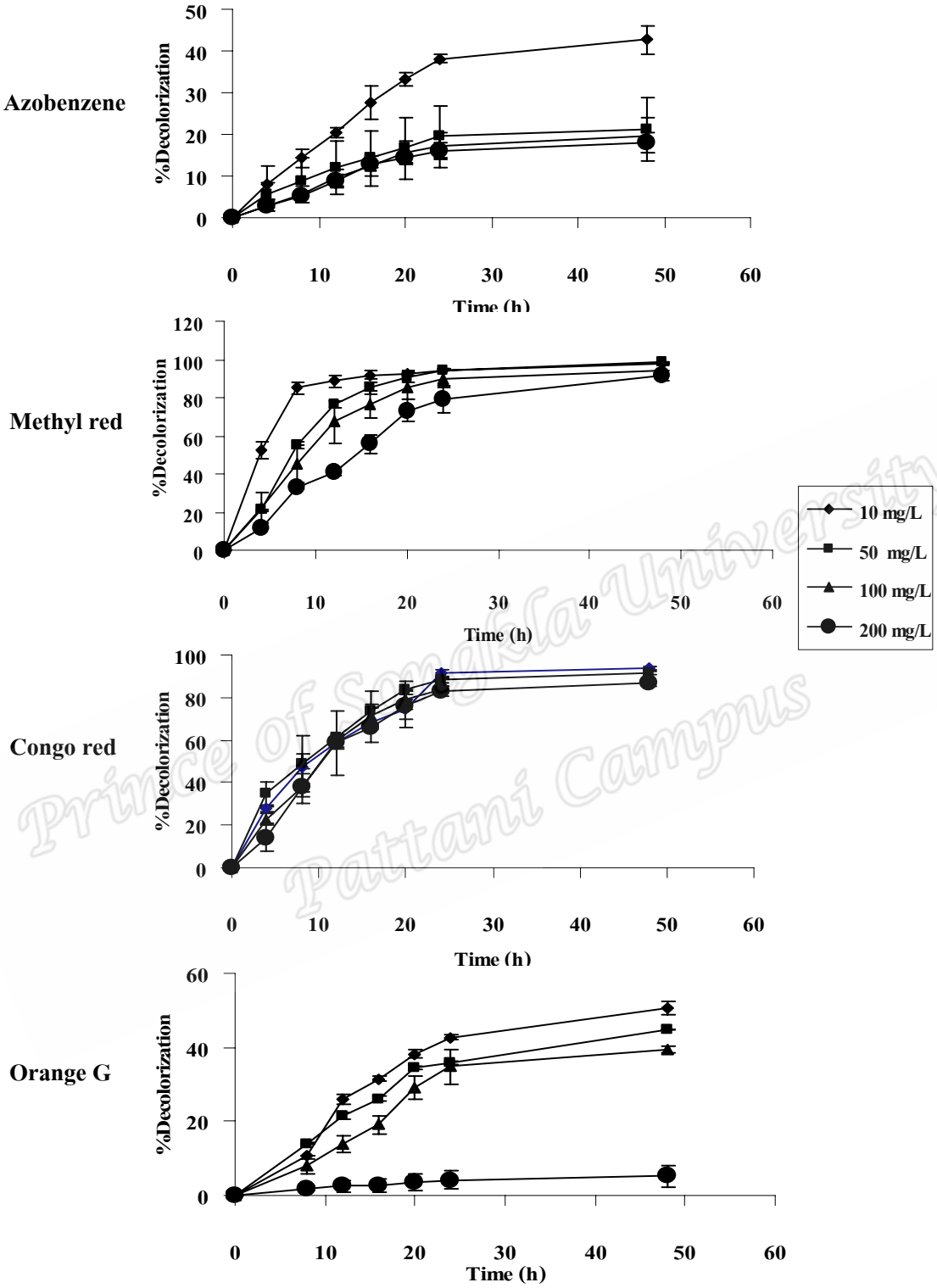
รูปที่ 4.3 ผลการย่อยสลายสีย้อมเอโซที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารเหลว DSM (pH7) โดย *B. subtilis* ORB7106 ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แสดงค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 4.4 ผลการย่อยสลายสีย้อมเอโซที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารเหลว DSM (pH7) โดย *B. subtilis* ORB7106 ที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แสดงค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 4.5 ผลการย่อยสลายสีย้อมเอโซที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารเหลว DSM (pH7) โดย *B. subtilis* ORB7106 ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แสดงค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 4.3 ผลของความเข้มข้นสีเริ่มต้น อุณหภูมิและพีเอช ต่อการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Azobenzene (AZ), Methyl red (MR), Orange G (OG) และCongo red (CR) โดย *B. subtilis* ORB7106 และ *B. subtilis* JH642 ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ (± SD)

Dyes	Strain	Conc.	(%) Decolorization				
		(mg/L)	25°C pH7	37°C pH7	45°C pH7	37°C pH5	37°C pH9
AZ	JH642	10	13.16±0.48	21.51±2.24	25.34±6.15	22.94±5.76	20.49±0.60
		50	11.19±1.48	17.96±2.25	14.63±5.56	21.66±6.06	15.41±0.64
		100	9.48±1.65	14.82±0.75	12.56±4.72	21.77±9.18	12.72±1.00
		200	7.61±1.95	11.82±1.73	10.73±3.81	12.70±2.34	11.86±0.98
	ORB7106	10	27.92±1.78	46.22±1.25	42.67±3.43	38.25±5.12	42.55±0.33
		50	19.29±2.07	34.52±2.38	21.34±7.60	33.77±7.45	33.52±0.50
		100	14.16±3.42	21.49±0.46	19.72±4.17	26.48±7.98	17.99±1.32
		200	10.32±3.66	15.45±3.50	18.01±2.55	14.21±2.19	15.39±1.58
MR	JH642	10	73.87±0.65	91.17±0.74	93.63±0.66	86.85±6.18	81.50±0.71
		50	55.18±0.20	89.41±1.94	89.74±0.34	82.53±0.49	74.96±0.76
		100	43.84±0.96	76.01±0.66	89.70±1.31	71.01±1.49	60.87±0.44
		200	11.93±3.23	65.55±0.68	9.34±0.81	70.16±5.21	81.50±0.71
	ORB7106	10	95.80±0.39	96.53±1.38	97.89±0.41	94.24±1.31	96.45±0.51
		50	95.19±0.32	97.15±0.44	98.28±0.37	92.69±1.70	93.88±0.25
		100	92.51±0.29	95.59±1.24	94.48±2.52	89.70±0.47	88.44±0.32
		200	93.74±0.12	94.49±0.49	91.52±2.75	88.17±1.85	81.86±0.43

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ผลของสภาวะต่าง ๆ (ความเข้มข้นสี, อุณหภูมิและพีเอช) ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Azobenzene (AZ), Methyl red (MR), Orange G (OG) และCongo red (CR) โดย *B. subtilis* ORB7106 และ *B. subtilis* JH642 ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ (± SD)

Dyes	Strain	Conc. (mg/L)	(%) Decolorization				
			25°C pH7	37°C pH7	45°C pH7	37°C pH5	37°C pH9
OG	JH642	10	9.70±0.38	10.82±1.43	17.32±2.56	7.33±0.96	11.25±4.60
		50	5.12±0.37	8.72±0.47	11.03±1.97	2.94±0.83	6.85±3.04
		100	3.37±0.53	8.044±1.90	6.98±1.41	2.64±0.45	3.19±0.92
		200	2.11±0.80	2.73±1.09	4.05±2.74	1.01±0.51	1.59±0.69
	ORB7106	10	24.56±5.55	21.06±4.82	50.59±1.43	11.16±1.01	13.67±2.70
		50	14.73±0.48	11.47±0.36	44.79±1.26	5.83±0.18	9.28±3.49
		100	6.04±0.87	10.78±1.62	39.32±0.45	2.90±0.50	4.28±0.95
		200	3.35±1.46	7.20±0.53	5.20±2.37	1.18±0.58	3.10±1.60
CR	JH642	10	52.76±15.40	46.93±1.38	47.51±4.06	45.00±1.05	46.72±1.53
		50	40.17±0.78	39.99±1.24	39.17±0.71	39.55±1.69	38.91±0.69
		100	34.25±2.15	36.61±0.77	40.13±10.06	28.15±0.95	33.83±0.21
		200	32.01±2.46	26.40±1.11	32.09±0.40	24.75±2.87	28.74±1.50
	ORB7106	10	87.08±6.19	94.25±1.54	93.99±0.58	93.59±2.41	93.85±0.38
		50	86.56±1.56	93.20±0.35	91.42±0.71	90.38±2.57	92.67±0.46
		100	82.70±0.36	89.10±0.42	89.26±0.97	87.30±4.43	92.00±0.25
		200	80.10±0.64	86.70±1.56	86.75±1.34	85.25±5.73	88.18±0.80

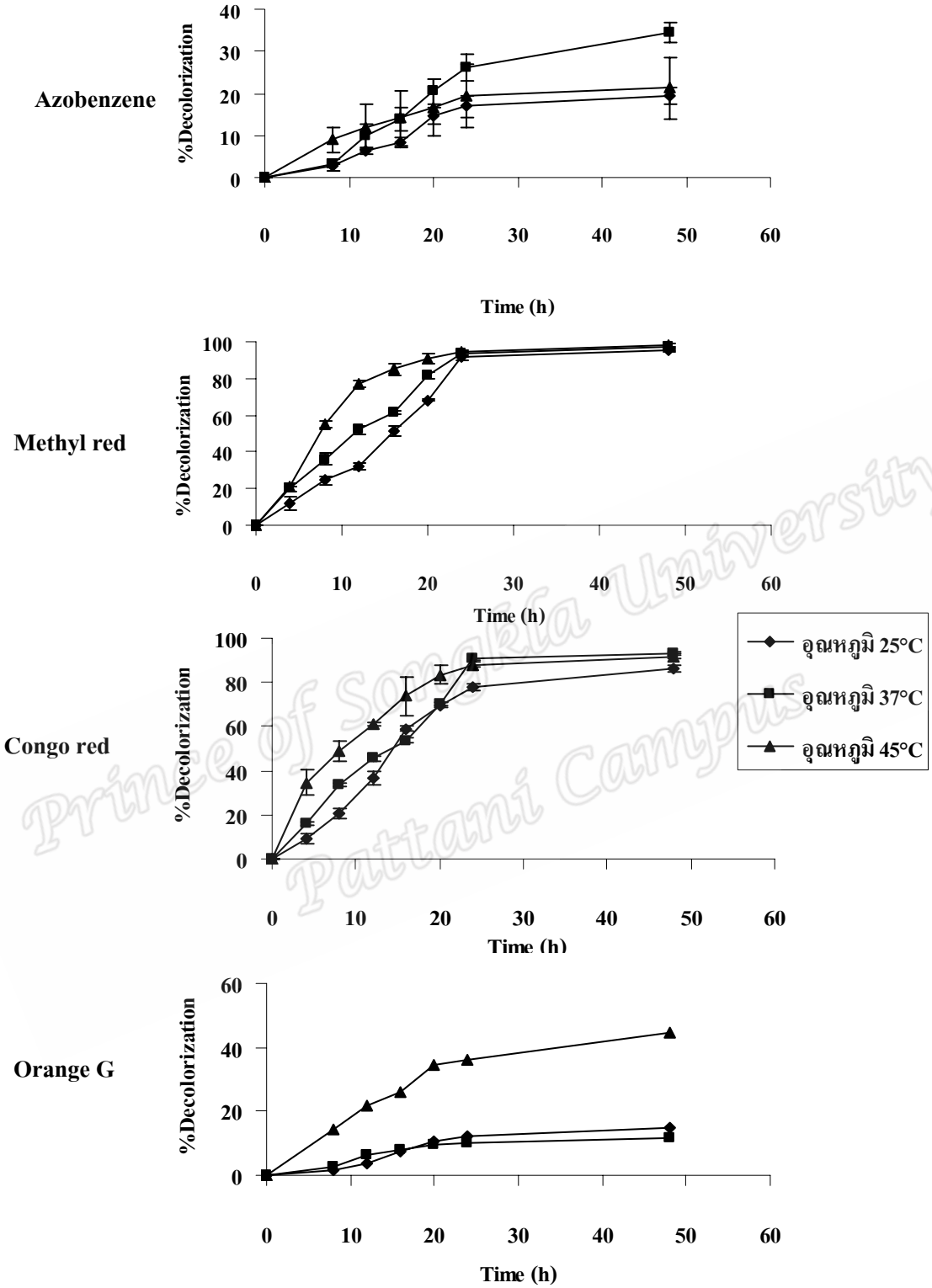
4.4 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายสีย้อมเอโซ ในอาหารเหลว DSM

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายสีย้อมเอโซในอาหารเหลว DSM โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว DSM ที่มีสีย้อมเอโซแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 25, 37 และ45 องศาเซลเซียส พบว่า *B. subtilis* ORB7106 สามารถย่อยสลายสีย้อมเอโซได้ ที่ทุกสภาวะของอุณหภูมิ โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการย่อย

Prince of Songkla University Pattani Campus

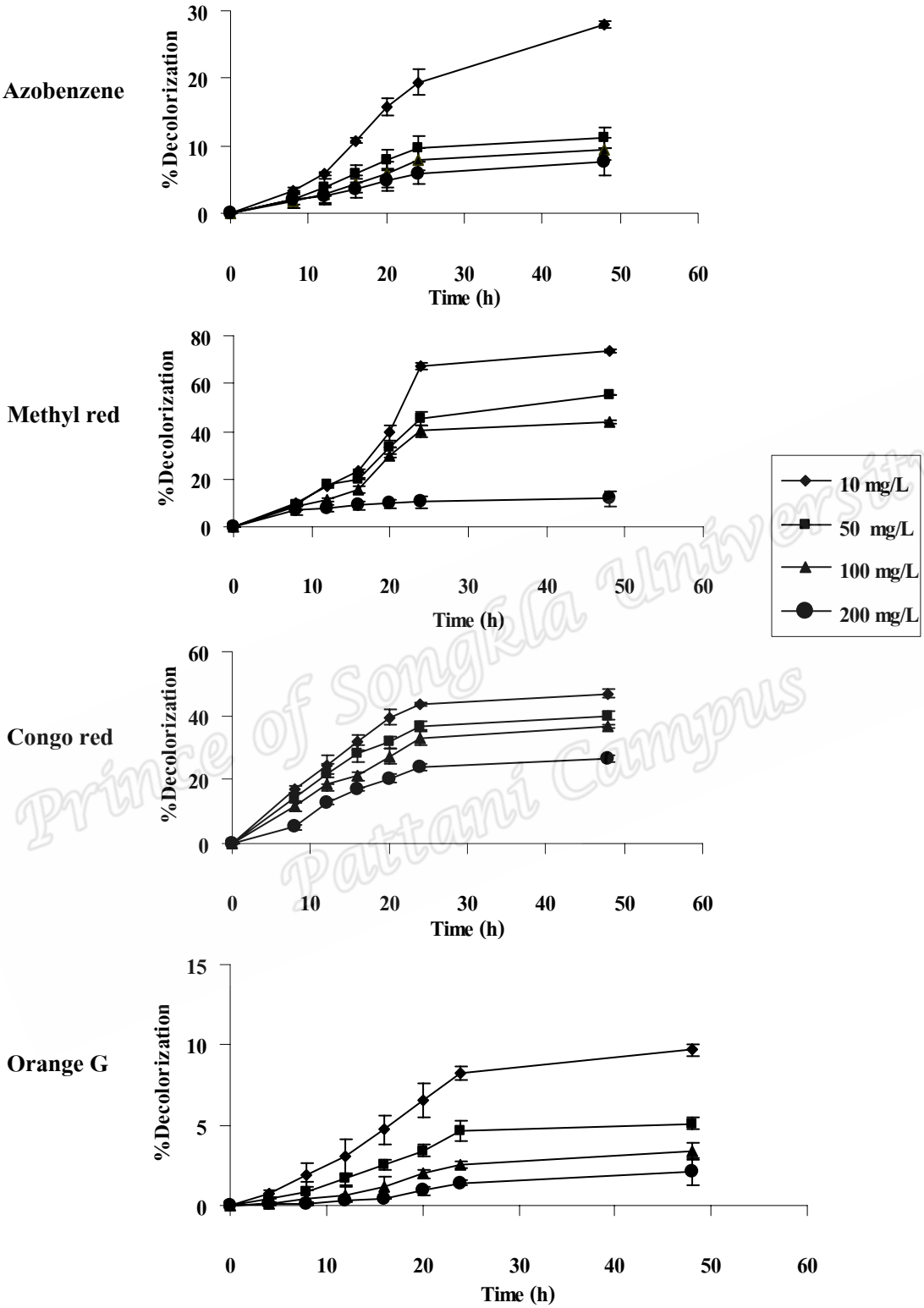
สลายสีย้อมเอโซดีที่สุด และสามารถย่อยสลายสี Methyl red ได้ดีที่สุด โดยย่อยสลายได้ถึงร้อยละ 91.52-98.28 ย่อยสลายสี Congo red ได้ ร้อยละ 80.10-94.25 Azobenzene ย่อยสลายได้เพียงร้อยละ 10.32-46.22 สำหรับสี Orange G ย่อยสลายได้เพียงเล็กน้อย ภายในเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.6 และตารางที่ 4.3) ในขณะที่ *B .subtilis* JH642 สามารถย่อยสลายสี Methyl red ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ร้อยละ 55.18-93.63 สามารถย่อยสลายสี Congo red ได้ร้อยละ 39.17-52.76 สำหรับสี Azobenzene และ Orange G ย่อยสลายได้เพียงเล็กน้อย ภายในเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.7, 4.8, 4.9 และ 4.10 และตารางที่ 4.3) จากผลการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Olukanni *et al*. (2009) ที่ทำการศึกษาอุณหภูมิที่แตกต่างกันตั้งแต่ 25-45 องศาเซลเซียสในการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Methyl red ที่ความเข้มข้น 56 มิลลิกรัมต่อลิตรโดย Micrococcus พบว่า ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสี Methyl red ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ย่อยสลายได้ดีที่สุด สำหรับ ที่อุณหภูมิ 25 และ 45 องศาเซลเซียส ย่อยสลายได้เพียงร้อยละ 40-50 เท่านั้น และการศึกษาของ Gopinath *et al.* (2009) ที่ศึกษาการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Congo red ที่ความเข้มข้น 100-300 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 31-40 องศาเซลเซียส โดย *Bacillus* sp. พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสี Congo อยู่ในช่วง 35-39 องศาเซลเซียส และ สามารถย่อยสลายสี Congo red ได้ถึงร้อยละ 100 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 24-27 ชั่วโมง ศศิพงศ์ (2550) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียผสมในการลดสี C.I.Acid Red 114, C.I.Direct Red 80 และ C.I.Reactive Red 141 ที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าประสิทธิภาพในการลดสีเพิ่มมากขึ้น เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการย่อยสลาย โดยเชื้อแบคทีเรียผสมใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายสีลดลง โดยใช้เวลาในการบำบัดช่วงไร้อากาศเพียง 1วันเท่านั้น ต่างจากการบำบัดที่อุณหภูมิห้องที่ใช้เวลาถึง 2 วัน ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลอง Supaka *et al*. (2003) ที่พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสีย้อมเอโซ คือ อุณหภูมิที่สูงปานกลางประมาณ 37– 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (Pearce *et al.,* 2003) และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นมากกว่านี้พบว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายจะลดลง โดยประสิทธิภาพในการย่อยสลายย้อมสีเอโซจะสอดคล้องกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทสจะอยู่ที่ประมาณ 35-45 องศาเซลเซียส และประสิทธิภาพในการย่อยสลายจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เนื่องจากอุณหภูมิไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการทำงานของเอนไซม์เอโซรีดักเทส ศศิพงศ์ (2550) พบว่า เอนไซม์เอโซรีดักเทสเป็นเอนไซม์ที่สามารถทนต่ออุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลาสั้น ๆ เท่านั้น จากผลการศึกษาและการรายงานทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า *B. subtilis* ORB7106 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีย้อมเอโซได้ในช่วงกว้างของอุณหภูมิ

Prince of Songkla University Pattani Campus



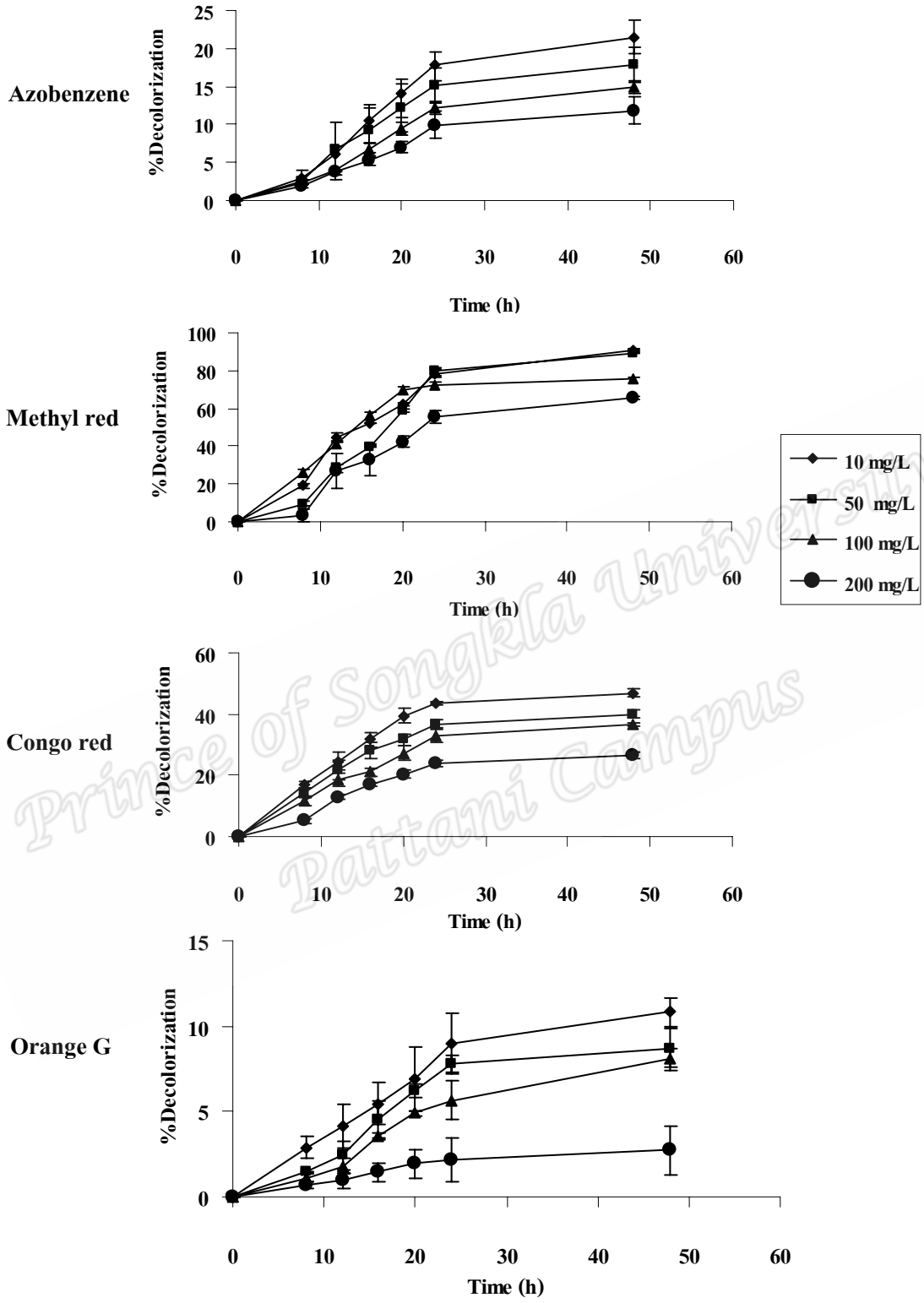
รูปที่ 4.6 ผลของอุณหภูมิในการย่อยสลายสีย้อมเอโซที่ความเข้มข้น 50 mg/L ในอาหารเหลว DSM (pH7) โดย *B. subtilis* ORB7106 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แสดงค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

Prince of Songkla University Pattani Campus



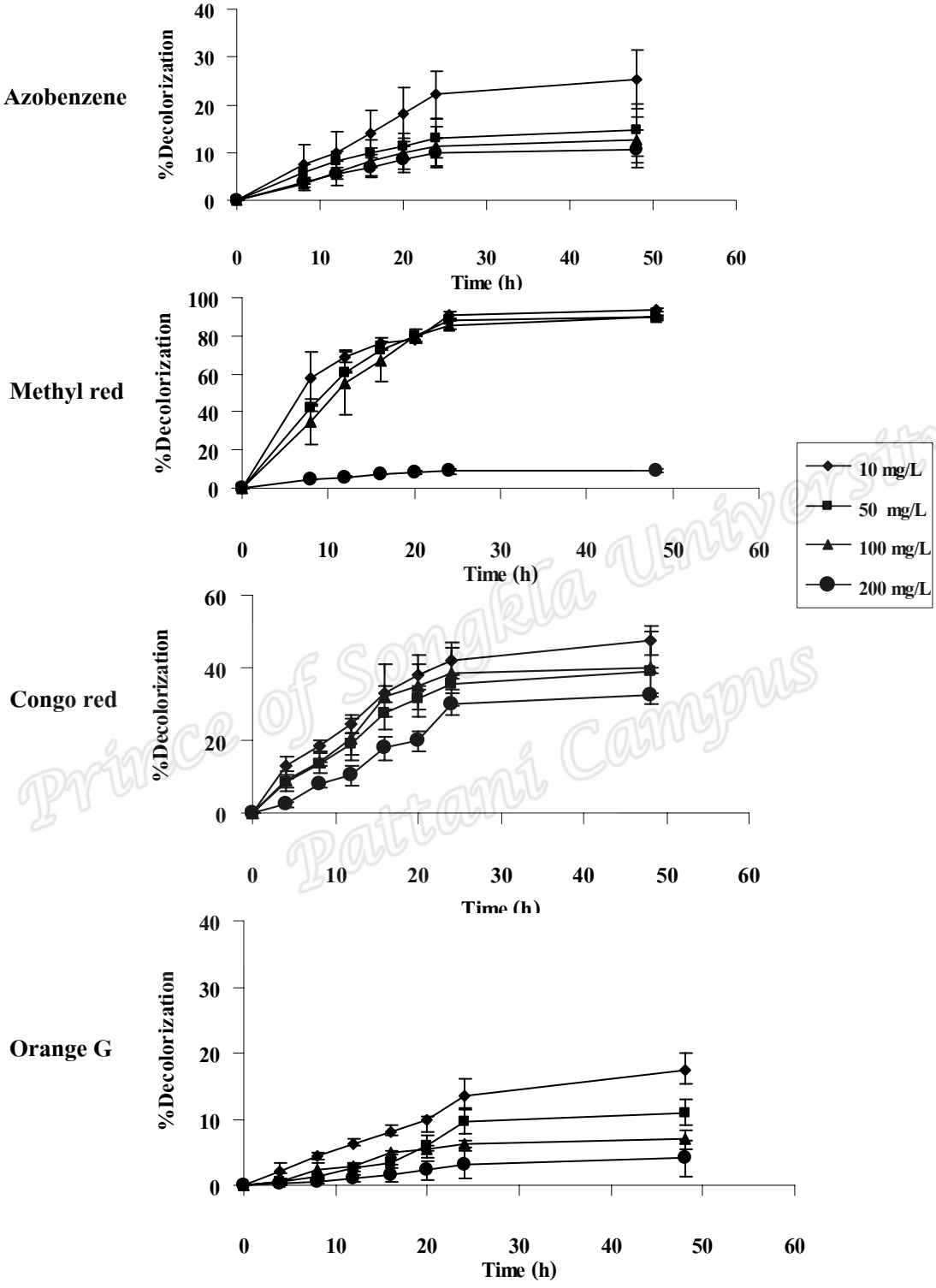
รูปที่ 4.7 ผลการย่อยสลายสีย้อมเอโซที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารเหลว DSM (pH7) โดย *B. subtilis* JH642 เป็นที่อุณหภูมิ 25°C ระยะเวลา 48 ชั่วโมง แสดงค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

Prince of Songkla University Pattani Campus



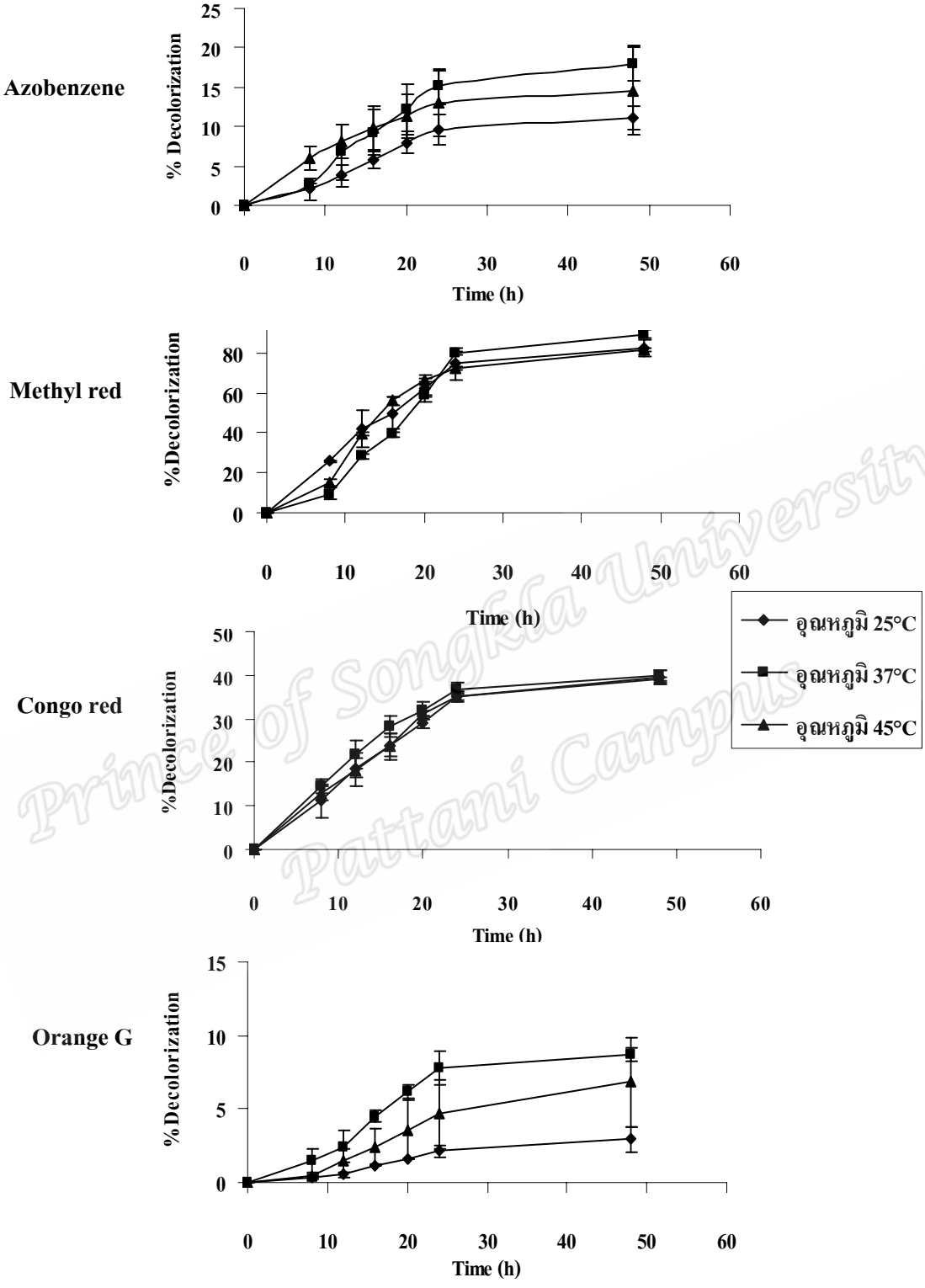
รูปที่ 4.8 ผลการย่อยสลายสีย้อมเอโซที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารเหลว DSM (pH7) โดย *B. subtilis* JH642 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แสดงค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 4.9 ผลการย่อยสลายสีย้อมเอโซที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารเหลว DSM (pH7) โดย *B. subtilis* JH642 ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แสดงค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

Prince of Songkla University Pattani Campus



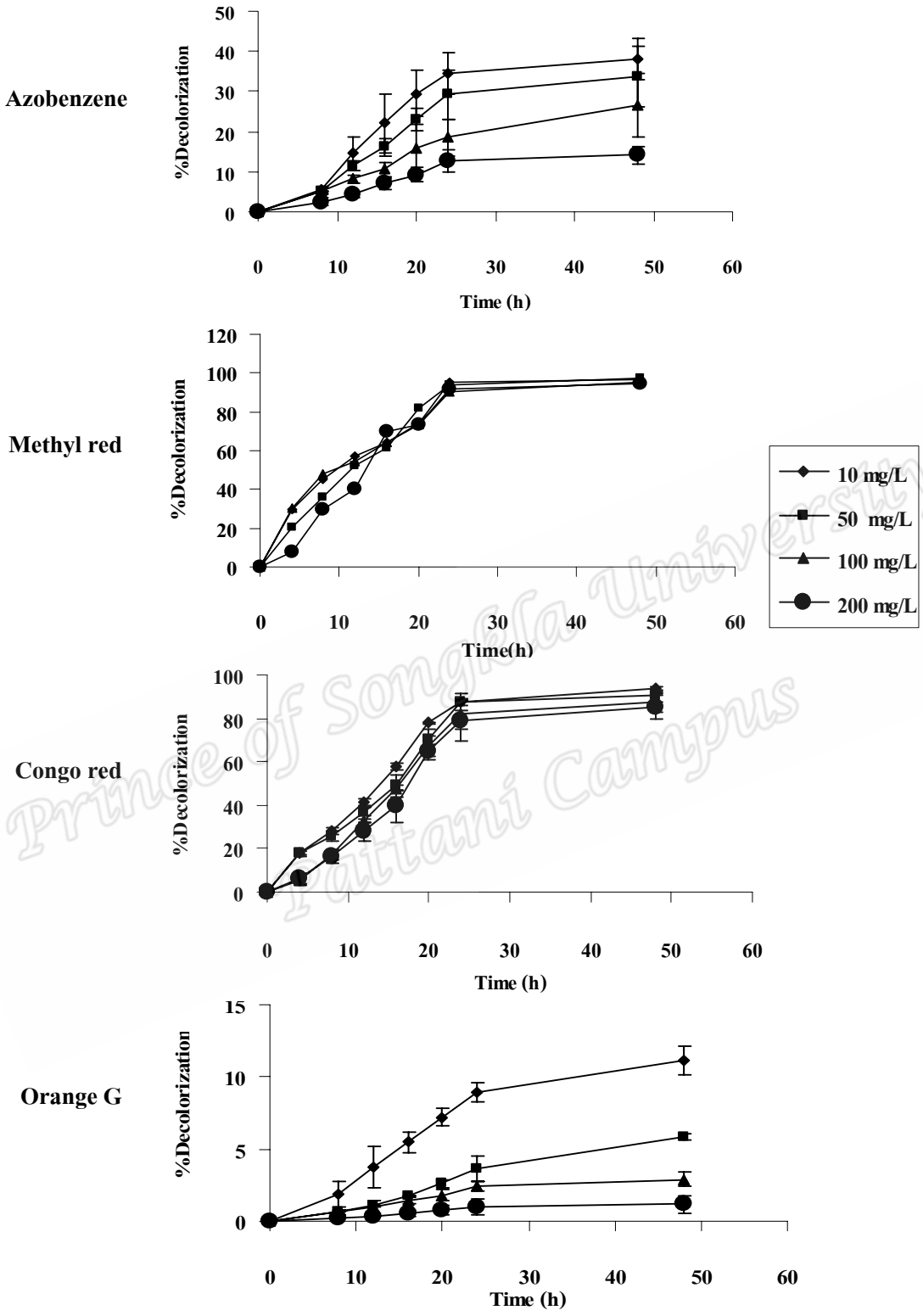
รูปที่ 4.10 ผลของอุณหภูมิในการย่อยสลายสีย้อมเอโซที่ความเข้มข้น 50 mg/L ในอาหารเหลว DSM (pH7) โดย *B. subtilis* JH642 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แสดงค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.5 ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลายสีย้อมเอโซ ในอาหารเหลว DSM

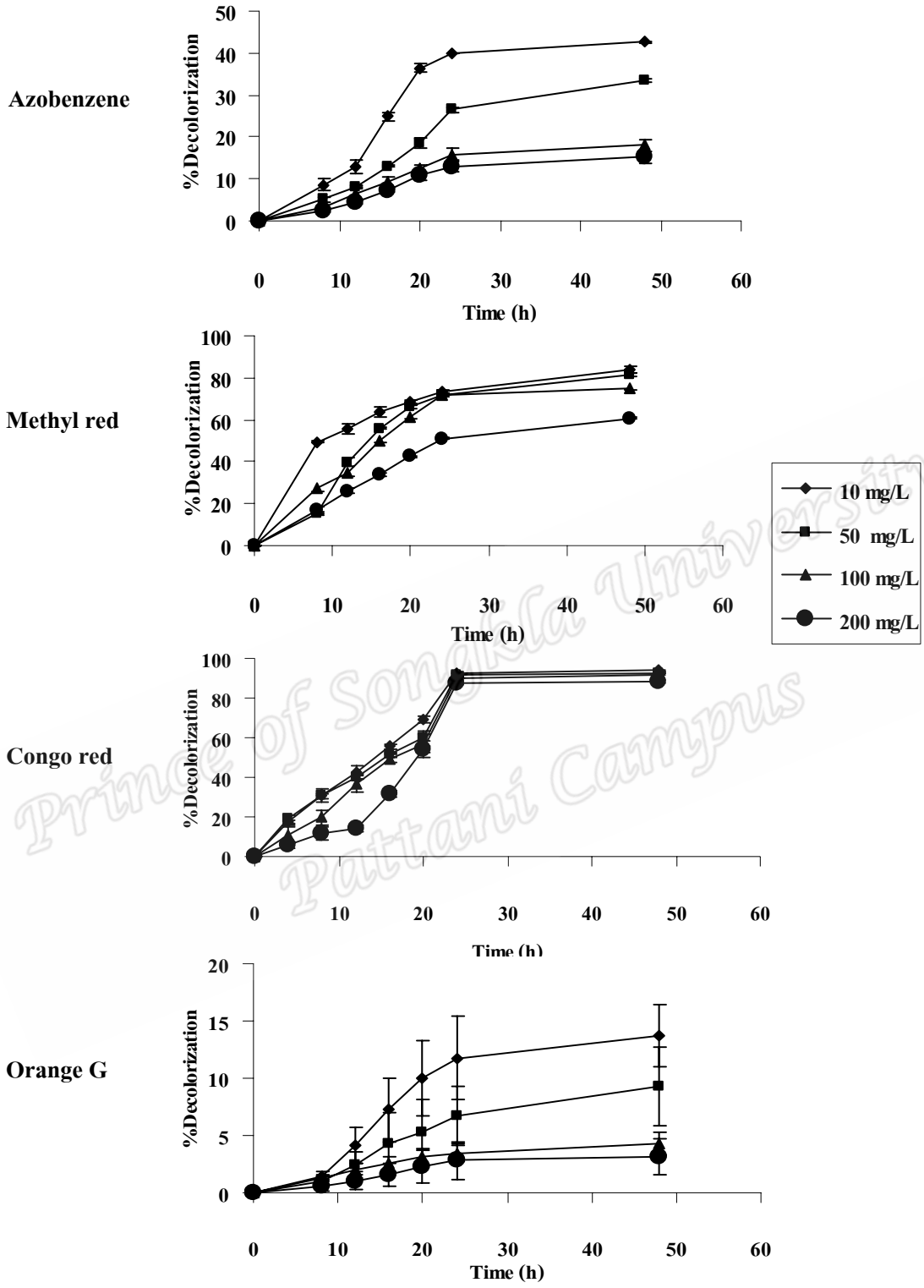
การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลายสีย้อมเอโซ ในอาหารเหลว DSM พบว่า ที่พีเอช 5, 7 และ 9 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีย้อมเอโซไม่แตกต่างกัน โดย *B. subtilis* ORB7106 สามารถย่อยสลายสี Methyl red ได้ดีที่สุด โดยย่อยสลายได้ถึงร้อยละ 80.86-97.15 สามารถย่อยสลายสี Congo red ได้ร้อยละ 85.25-94.25 สำหรับสี Azobenzene และ Orange G ย่อยสลายได้เพียงเล็กน้อย ภายในเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.11, 4.12 และ4.13 ตามลำดับ และตารางที่ 4.3) ในขณะที่ *B. subtilis* JH642 สามารถย่อยสลายสี Methyl red ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ร้อยละ 74.96-91.17 สามารถย่อยสลายสี Congo red ได้ร้อยละ 38.91-46.93 Azobenzene ย่อยสลายได้เพียงร้อยละ 14.21-46.22 สำหรับสี Orange G ย่อยสลายได้เพียงเล็กน้อยเช่นเดียวกัน ภายในเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.14, 4.15 และ4.16 ตามลำดับ และตารางที่ 4.3) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *B. subtilis* ORB7106 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ในช่วงกว้างของพีเอช โดยย่อยสลายได้ทั้งในช่วงสภาวะของกรดอ่อนจนถึงสภาวะที่เป็นด่าง จากการศึกษาของวีรนุชและคณะ (2551) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกระบวนการย่อยสลายสีเอโซจะอยู่ที่สภาวะเป็นกลางจนถึงความเป็นด่างเล็กน้อยและอัตราการย่อยสลายสีจะลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นด่างแก่ เช่นเดียวกับ Supaka *et al*. (2003) ใช้เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากระบบบำบัดของโรงงานฟอกย้อม ในการย่อยสลายสีรีแอกทีฟชนิดที่มีโครโมฟอร์เป็นเอโซ คือ C.I. Reactive Orange 16, C.I. Reactive purple 5, C.I. Reactive black 5 และC.I. Reactive blue 19 ในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยใช้ระบบบำบัดแบบแอนแอโรบิกและตามด้วยระบบบำบัดแบบแอโรบิก จากผลการทดลอง ปรากฏว่าสีส่วนใหญ่จะถูกกำจัดในระหว่างบำบัดแบบแอนแอโรบิก และพบว่าผลของความเป็นกรด – ด่าง ในช่วง pH 7-9 ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสีสูงขึ้น และ Dong *et al*. (2003) ทดสอบการย่อยสีย้อมกลุ่มแอนทราควิโนน โดยแบคทีเรีย *Rhodopsuedomonas* พบว่า สีถูกย่อยสลายได้ถึงร้อยละ 93 ที่พีเอชช่วง 6-9 ในสภาพที่ไม่เติมอากาศ อย่างไรก็ตาม ยังมีงานวิจัยที่สนใจการย่อยสลายสีย้อมในสภาวะที่เป็นกรดแก่จนถึงสภาวะที่เป็นด่างแก่ เพื่อตอบสนองต่อความต้องการของอุตสาหกรรมฟอกย้อมในการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีย้อม จากงานวิจัยของ Olukanni *et al.,* (2009) ศึกษาการย่อยสลาย สี Methyl red ที่พีเอช 4-10 โดยแบคทีเรีย *Micrococcus* ที่แยกได้จากดินบริเวณบ่อขยะ พบว่า ที่ พีเอช 6, 7 และ 8 แบคทีเรียย่อยสลายสี Methyl red ได้ร้อยละ 84.60, 94.19 และ 93.94 ตามลำดับ และพบว่าในสภาวะที่เป็นกรดแก่และด่างแก่ ประสิทธิภาพในการย่อยสลายลดลงเหลือเพียง ร้อยละ 30.34 เท่านั้น

Prince of Songkla University Pattani Campus



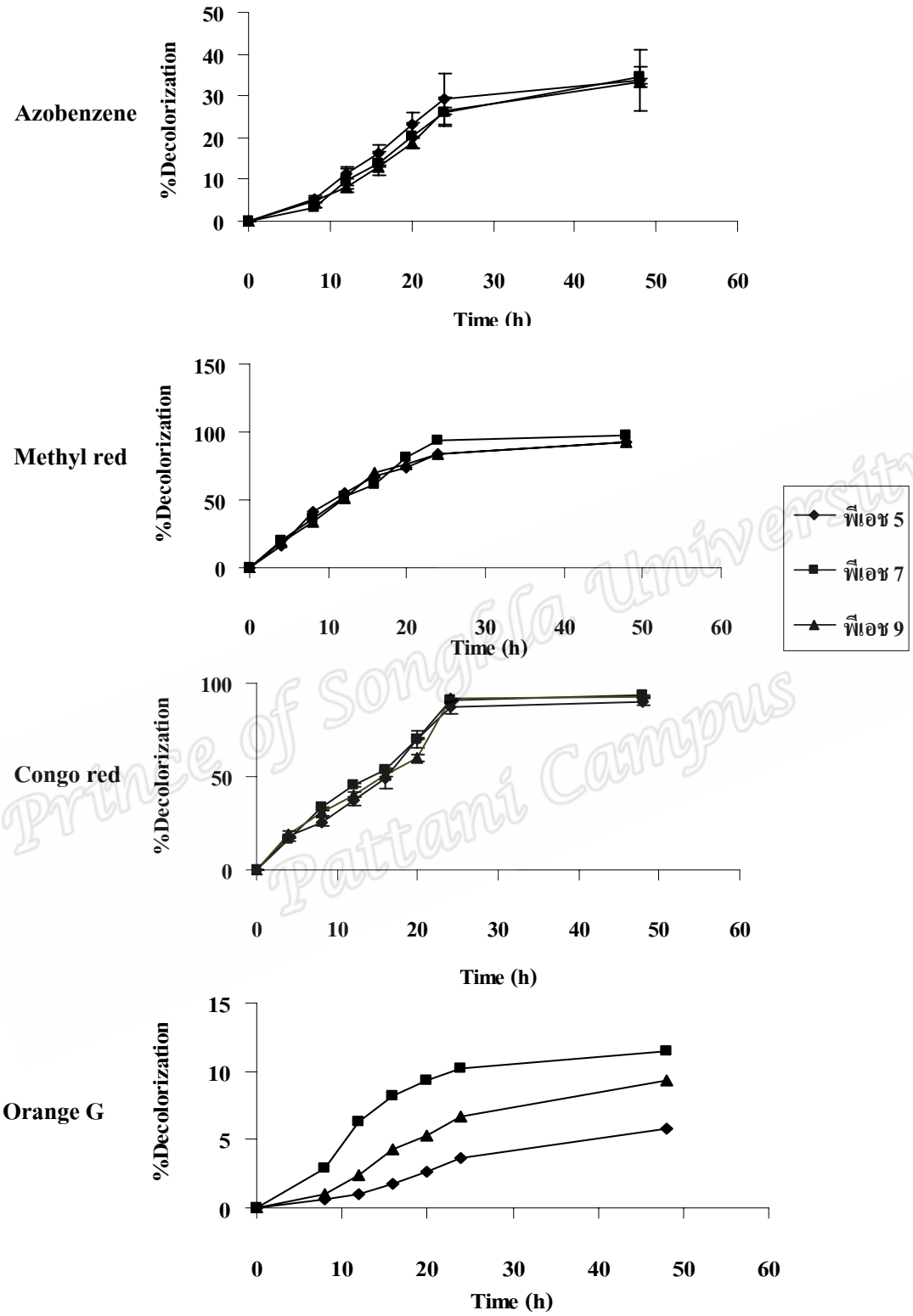
รูปที่ 4.11 ผลการย่อยสลายสีย้อมเอโซที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารเหลว DSM (pH5) โดย *B. subtilis* ORB7106 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แสดงค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

Prince of Songkla University Pattani Campus



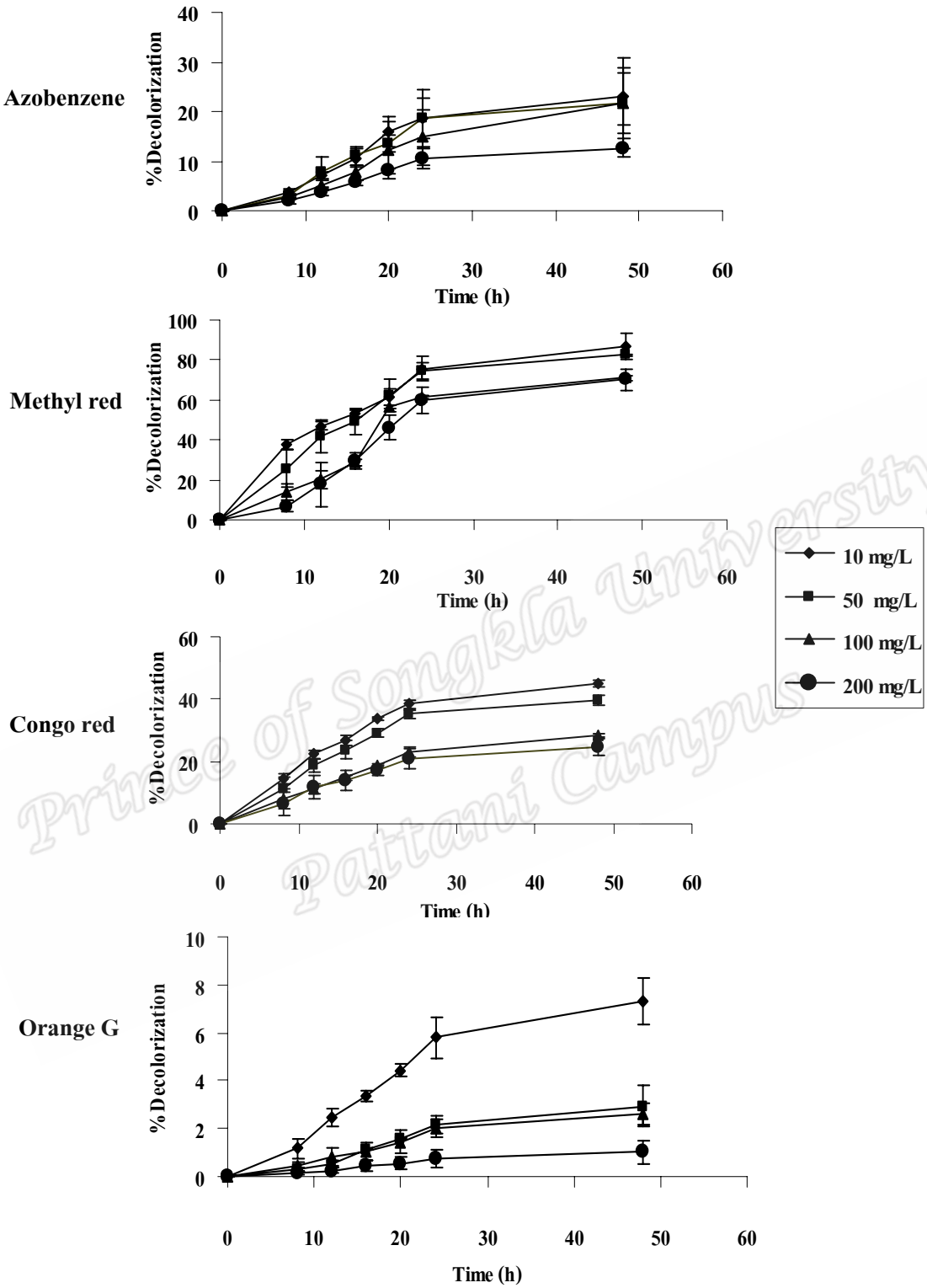
รูปที่ 4.12 ผลการย่อยสลายสีย้อมเอโซที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารเหลว DSM (pH9) โดย *B. subtilis* ORB7106 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แสดงค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

Prince of Songkla University Pattani Campus



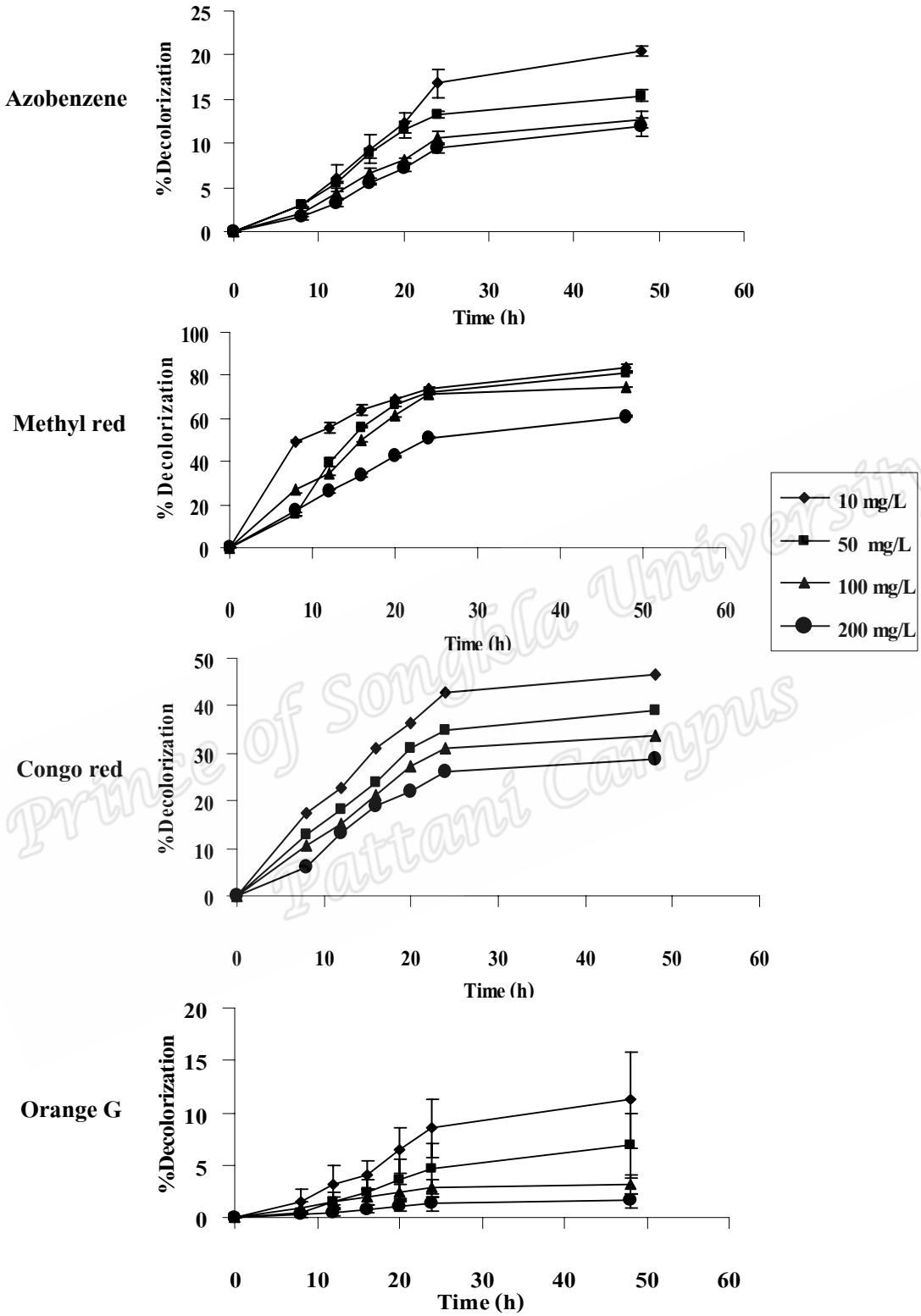
รูปที่ 4.13 ผลของพีเอชในการย่อยสลายสีย้อมเอโซที่ความเข้มข้น 50 mg/L ในอาหารเหลว DSM (37°C) โดย *B. subtilis* ORB7106 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แสดงค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

Prince of Songkla University Pattani Campus



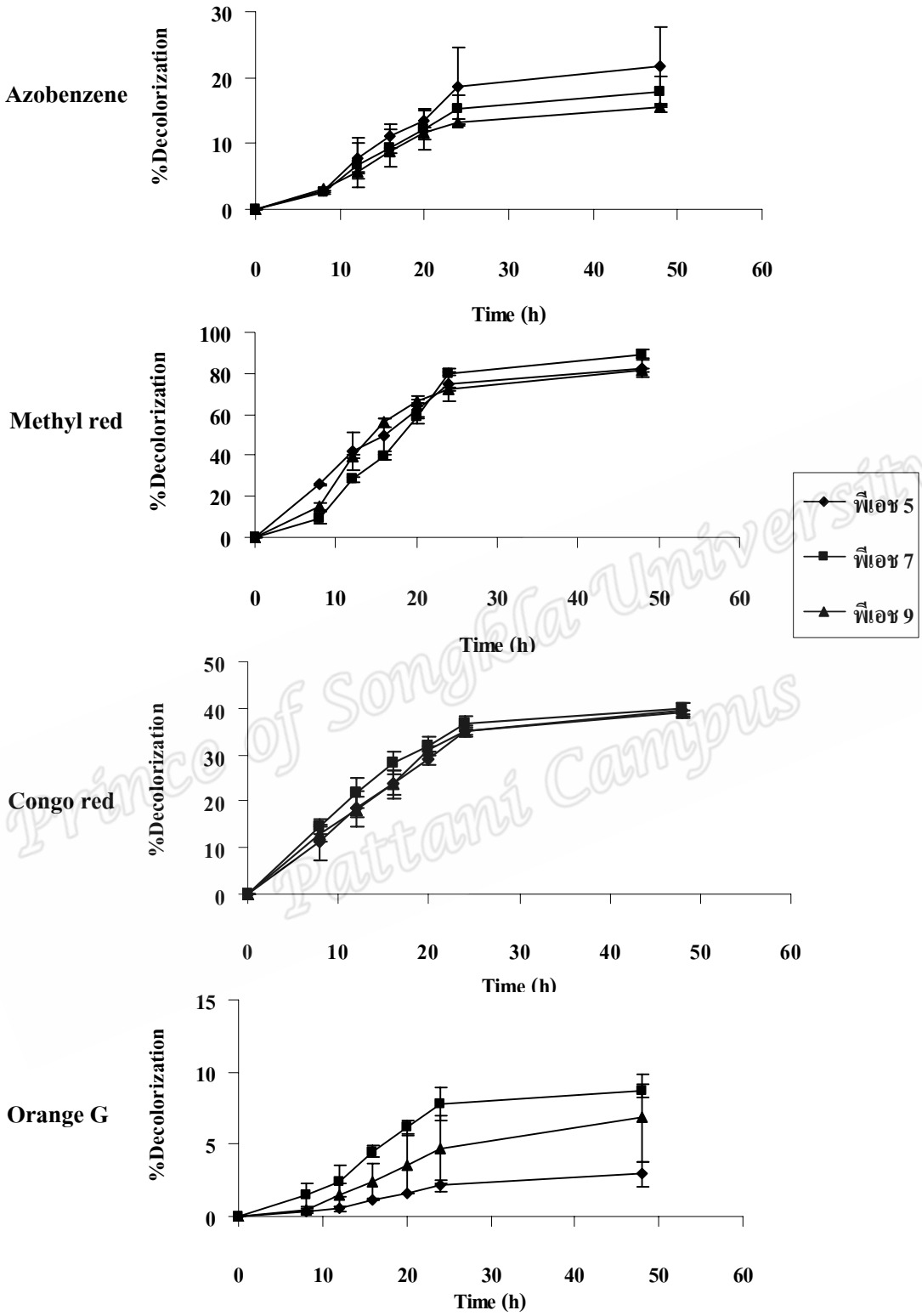
รูปที่ 4.14 ผลการย่อยสลายสีย้อมเอโซที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารเหลว DSM (pH5) โดย *B. subtilis* JH642 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แสดงค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 4.15 ผลการย่อยสลายสีย้อมเอโซที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารเหลว DSM (pH9) โดย *B. subtilis* JH642 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แสดงค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 4.16 ผลของพีเอชในการย่อยสลายสีย้อมเอโซที่ความเข้มข้น 50 mg/L ในอาหารเหลว DSM (37°C) โดย *B. subtilis* JH642 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แสดงค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.6 ผลทางสถิติวิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายสีย้อมเอโซโดย *B. subtilis* ORB7106 และ *B. subtilis* JH642 ในอาหารเหลว DSM

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายสีย้อมเอโซโดย *B. subtilis* ORB7106 และ *B. subtilis* JH642 ในอาหารเหลว DSM พบว่า *B. subtilis* ORB7106 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสีย้อมเอโซได้ดีกว่าในทุกชนิดสีและทุกสภาวะของอุณหภูมิและพีเอช (ตารางที่ 4.4) อีกทั้งยังย่อยสลายได้เร็วกว่า โดยเริ่มย่อยสลายสี Methyl red และ Congo red ที่ความเข้มข้นสีเริ่มต้นต่ำสุดภายในระยะเวลา 8 ชั่วโมง และย่อยสลายได้ร้อยละ 80.34-90.23 ภายในระยะเวลา 16 ชั่วโมง ในขณะที่ *B. subtilis* JH642 เริ่มย่อยสลายสี Methyl red และ Congo red ที่ความเข้มข้นสีเริ่มต้นต่ำสุด ที่ระยะเวลา 16 และ 20 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาคผนวก ค)

ตารางที่ 4.4 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายสีย้อมเอโซ โดย *B. subtilis* ORB7106 และ *B. subtilis* JH642 ในอาหารเหลว DSM

Strains	(%) Decolorization			
	Azobenzene	Methyl Red	Orange G	Congo Red
JH642	9.13 [a]	47.08 [a]	3.55 [a]	24.97 [a]
ORB7106	15.26 [b]	68.26 [b]	8.97 [b]	60.60 [b]

ค่าเฉลี่ย ของการทดลอง 3 ซ้ำ ที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$, n=360 ทดสอบโดย *t*' test

[a, b] แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

4.7 ผลการศึกษาชนิดของเอนไซม์เอโซรีดักเทส (AzoR1) ที่สร้างจาก *B. subtilis* ORB7106 ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซ

การศึกษาชนิดของเอนไซม์เอโซรีดักเทส (AzoR1) ที่สร้างจาก *B. subtilis* ORB7106 ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซ โดยเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บส่วนใส และตะกอนเซลล์มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสี Methyl red ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเอนไซม์เอโซรีดักเทส (AzoR1) จาก *B. subtilis* ORB7106 ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซ เป็นชนิด Intracellular enzyme

Prince of Songkla University Pattani Campus

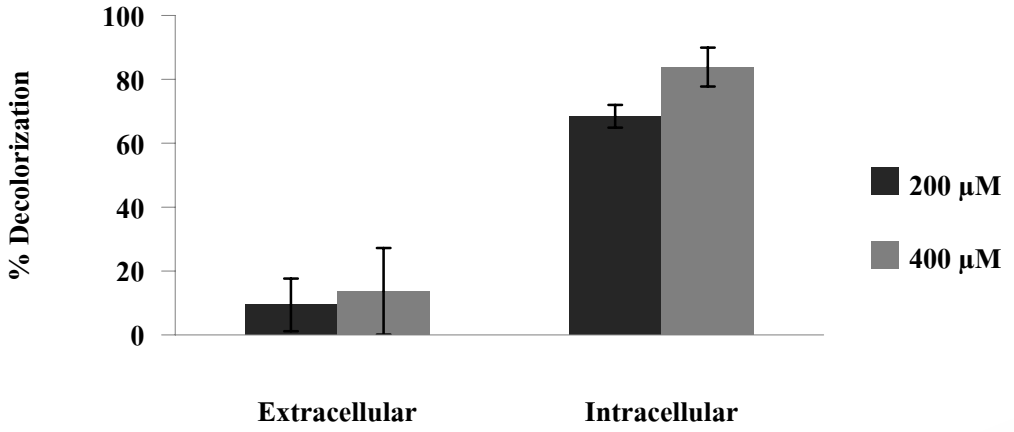
จากรูปที่ 4.17 (ก) ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด Methyl red ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเอนไซม์เอโซรีดักเทส (AzoR1) ชนิด Extracellular และ Intracellular enzyme ที่มี NADH เป็นโคแฟคเตอร์ พบว่า เอนไซม์จาก Intracellular enzyme ย่อยสลายได้ดีกว่า โดย Intracellular enzyme ที่มี NADH 200 และ 400 ไมโครโมลาร์ ย่อยสลายได้ร้อยละ 68.4 และ 83.89 และ Extracellular enzyme ย่อยสลายได้ร้อยละ 9.4 และ 13.6 ตามลำดับในระยะเวลา 2 นาที จากผลการทดลองแสดงว่า *B. subtilis* ORB7106 สร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทสย่อยสลายสีย้อมเอโซภายในเซลล์

จากรูปที่ 4.17 (ข) แสดงกิจกรรมเอนไซม์เอโซรีดักเทสชนิด Extracellular และIntracellular enzyme ที่มี NADH 200 และ 400 ไมโครโมลาร์ เป็นโคแฟคเตอร์ในสภาวะที่มีสี Methyl red 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่า เอนไซม์จาก Intracellular enzyme มีกิจกรรมของเอนไซม์เอโซรีดักเทสมากกว่าเอนไซม์จาก Extracellular enzyme โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เอโซรีดักเทส เท่ากับ 87.69 และ 105.61 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์จาก Extracellular enzyme มีกิจกรรมเอนไซม์เอโซรีดักเทสเพียง 17.50 และ 29.11 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เท่านั้น

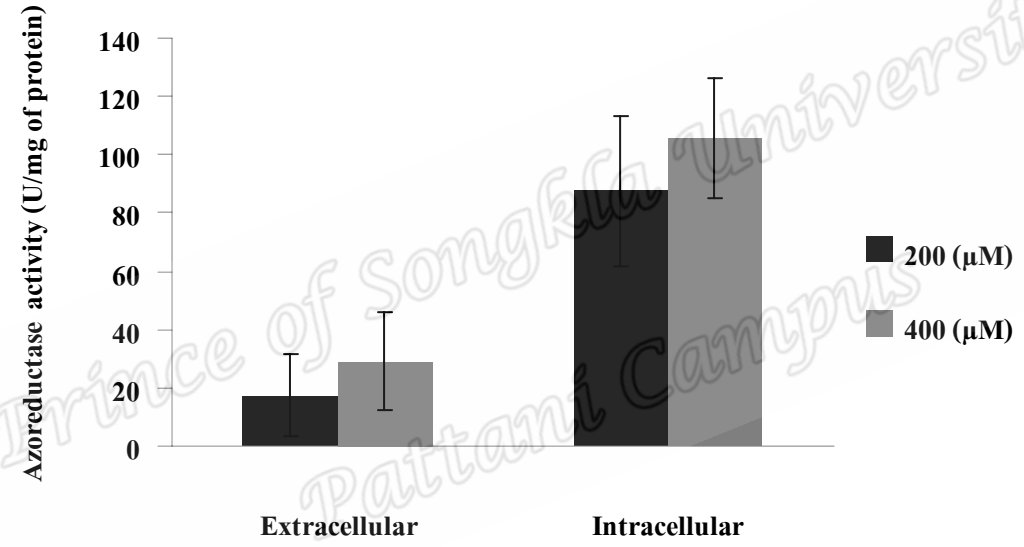
โดยทั่วไปเอนไซม์เอโซรีดักเทสที่สร้างจากแบคทีเรียมีทั้งชนิดที่เป็น Extracellular และ Intracellular enzyme ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย กระบวนการย่อยลสายและสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจน Chen (2002) พบว่า *Pseudomonas luteola* สร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทสย่อยสลายสีย้อมเอโซภายในเซลล์แต่เมื่อมีการเติมออกซิเจนลงไประหว่างการเพาะเลี้ยง แบคทีเรียจะลดสร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทส ซึ่งทำให้การย่อยสีหยุดลง ในทางตรงกันข้ามการบ่มในสภาวะคงที่ (static condition) ปริมาณออกซิเจนจะมีเพียงเล็กน้อยที่บริเวณผิวหน้าอาหารจะก่อให้เกิดการชักนำการสร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทสจากภายในเซลล์มากยิ่งขึ้น สำหรับเอนไซม์เอโซรีดักเทสที่ปล่อยสู่ภายนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) พบว่า แบคทีเรียจะสร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทส (Extracellular enzyme) ในการย่อยสลายสีย้อมภายนอกเซลล์ เมื่อกระบวนการย่อยสลายอยู่ในระบบที่มีการย่อยสลายแบบต่อเนื่อง (batch decolorization) (Dafale *et al.,* 2008)

Prince of Songkla University Pattani Campus

ก



ข



Prince of Songkla University Pattani Campus

รูปที่ 4.17 ผลการศึกษาชนิดของเอนไซม์เอโซรีดักเทส ในการย่อยสลายสี Methyl Red ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) ประสิทธิภาพการย่อยสลาย (ข) กิจกรรมเอนไซม์เอโซรีดักเทส ชนิด Extracellular enzyme และ Intracellular enzyme จาก *B. subtilis* ORB7106 ที่มี NADH 200 (■) และ 400 (■) ไมโครโมลาร์

4.8 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสีย้อมเอโซในการชักนำการสร้างเอนไซม์

การศึกษาประสิทธิภาพของสีย้อมเอโซในการชักนำการสร้างเอนไซม์ โดย *B. subtilis* JH642 ในอาหารเหลว DSM โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลวที่เติมและไม่เติมสี Methyl Red ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนเซลล์ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสี Methyl red พบว่า เมื่อเลี้ยง *B. subtilis* JH642 ในอาหารเหลว DSM ที่ไม่เติมสี

Methyl Red (ไม่มีการชักนำ) เป็นระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง เมื่อนำเอนไซม์จากสภาวะที่ไม่มีการชักนำมาทดสอบการย่อยสลายสี Methyl Red ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติม NADH พบว่า มีการย่อยสลายได้ร้อยละ 9.93, 23.48 และ 31.33 ตามลำดับ และเมื่อเติม NADH ย่อยสลายได้ร้อยละ 14.15, 30.96 และ 39.78 ตามลำดับ ภายในระยะเวลา 2 นาที เมื่อเลี้ยง *B. subtilis* JH642 ในอาหารเหลว DSM ที่เติมสี Methyl Red (มีการชักนำ) เป็นระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง นำมาทดสอบการย่อยสลายสี Methyl Red ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติม NADH พบว่า มีการย่อยสลายได้ร้อยละ 17.48, 38.44 และ 52.52 ตามลำดับ และเมื่อเติม NADH ย่อยสลายได้ร้อยละ 28.0, 51.41 และ 71.70 ตามลำดับ ภายในระยะเวลา 2 นาที รูปที่ 4.18 (ก)

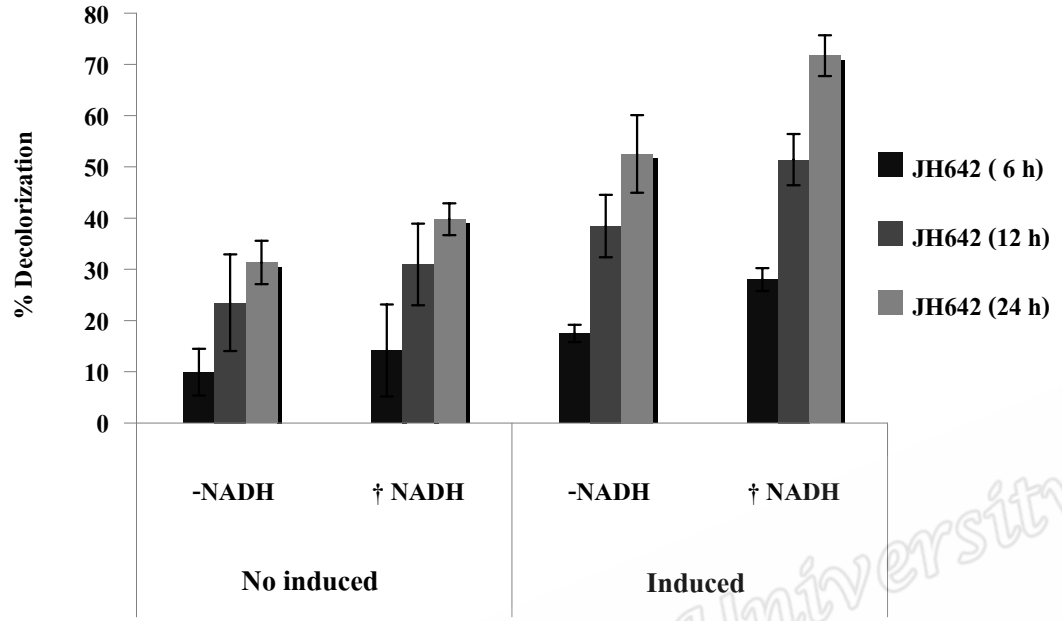
จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าในสภาวะที่ไม่มีการชักนำและไม่มีการเติม NADH จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเกิดขึ้นด้วย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก *B. subtilis* JH642 มีการสร้างเอนไซม์ชนิดอื่นร่วมด้วยในการเจริญและสร้างเอนไซม์เพื่อการย่อยสลายสารอาหาร (Dafale *et al.,* 2008)

การศึกษากิจกรรมเอนไซม์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาการย่อยสลายสี Methyl red 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จากเอนไซม์ที่มีการชักนำ (เลี้ยงในสภาวะที่มีสี Methyl red 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) และเอนไซม์ที่ไม่มีการชักนำ (เลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีสี Methyl red 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยเติมและไม่เติม NADH 400 ไมโครโมลาร์ เป็นโคแฟคเตอร์ จะเห็นได้ว่า เอนไซม์จากสภาวะที่ไม่มีการชักนำโดยเติมและไม่เติม NADH มีปริมาณเอโซรีดักเทส เท่ากับ 36.89 และ 46.83 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เอนไซม์จากสภาวะที่มีการชักนำโดยเติมและไม่เติม NADH มีปริมาณเอโซรีดักเทส เท่ากับ 59.03 และ 80.60 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ รูปที่ 4.18 (ข)

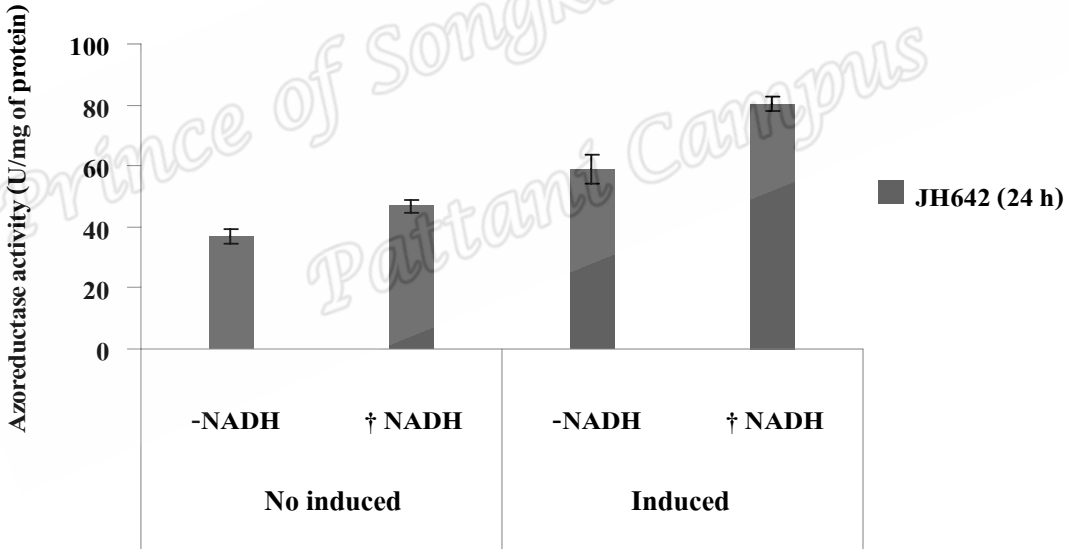
จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของสี Methyl red ในการชักนำการสร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทส พบว่า สอดคล้องกับการศึกษาการแสดงออกของยีน *azoR1* โดยเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มียีนรายงานเชื่อมต่อกับยีน *azoR1* (*B. subtilis* ORB7094) (Leelakriangsak *et al.,* 2007) โดยตรวจพบการแสดงออกของยีน *azoR1* เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมและไม่เติมสี Methyl red พบว่า ในสภาวะที่มีการเติม Methyl red มีการแสดงออกของยีน *azoR1* เพิ่มมากขึ้น (ไม่แสดงผลการศึกษา) และการรายงานของ Telke *et al.* (2008) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของสีย้อมเอโซในการชักนำการสร้างเอนไซม์ โดยเลี้ยง *Rhizobium radiobacter* ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยการเติม Methyl red ในอาหารเหลว เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเมื่อนำเอนไซม์จากสภาวะที่มีการชักนำมาทดสอบ พบว่า มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายและการสร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทสเพิ่มขึ้น คิดเป็นร้อยละ 177 เมื่อเทียบกับหลอดควบคุม (Control)

Prince of Songkla University Pattani Campus

ก



ข



รูปที่ 4.18 ประสิทธิภาพของสีย้อมเอโซในการชักนำการสร้างเอนไซม์ (ก) การย่อยสลายสีย้อมเอโซ ชนิด Methyl Red ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมและไม่เติม NADH 400 ไมโครโมลาร์ โดย *B. subtilis* JH642 ที่เลี้ยงในอาหาร DSM ในสภาวะที่มีการชักนำและไม่มีการชักนำเป็นระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง (ข) กิจกรรมเอนไซม์ ที่มี NADH 400 ไมโครโมลาร์ โดย *B. subtilis* JH642 ในสภาวะที่มีการชักนำและไม่มีการชักนำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Prince of Songkla University Pattani Campus