



การลดความเข้มข้นสีย้อมจากน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอโดยจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 และ FN2



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การลดความเข้มข้นสีย้อมจากน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอโดยจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1  
และ FN2



โดย  
นางสาวพริษา บัวโพธิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต  
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
มหาวิทยาลัยศิลปากร  
ปีการศึกษา 2565  
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

DECOLORIZATION OF TEXTILE EFFLUENT USING CO-MICROORGANISM

*BACILLUS* SP. FN1 AND FN2



By

MISS Peraya BUAPHO

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science BIOTECHNOLOGY

Department of BIOTECHNOLOGY

Silpakorn University

Academic Year 2022

Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	การลดความเข้มข้นสีย้อมจากน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอโดยจุลินทรีย์ผสม <i>Bacillus</i> sp. FN1 และ FN2
โดย	นางสาวพีรยา บัวโพธิ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิ้นธุ์วัฒน์ ฤทธิธรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริพร พงศ์ทองผาสุข

คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์และ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณศรี ลีจิระจำเนียร) เทคโนโลยีอุตสาหกรรม

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา วัฒนการุณ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิ้นธุ์วัฒน์ ฤทธิธรรม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(รองศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิริย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริพร พงศ์ทองผาสุข)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อติศักดิ์ จตุรพิริย์)

630920051 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทบัณฑิต

คำสำคัญ : การกำจัดสี, น้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอ, *Bacillus* sp.

นางสาว พิรยา บัวโพธิ์: การลดความเข้มข้นสีย้อมจากน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอโดยจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 และ FN2 อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิ้นธุ์ฉน์ ฤทธิธรรม

เมื่อผสม *Bacillus* sp. FN1 กับ *Bacillus* sp. FN2 ในอัตราส่วน 1:1 พบว่าจุลินทรีย์ผสมสามารถกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งในอุตสาหกรรมสิ่งทอได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถกำจัดสีได้สูงสุดที่ 64.28, 75.73, 83.05 และ 86.26% ที่ความยาวคลื่น 425, 509, 595 และ 625 nm ตามลำดับ ภายใน 168 ชั่วโมง ในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส (1.0% w/v), สารสกัดจากยีสต์ (0.3% w/v), แอมโมเนียมคลอไรด์ (0.6% w/v) และน้ำทิ้งจากสิ่งทอ 10% (v/v) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1,000 เท่า pH 7.0 ภายใต้สภาวะการเขย่า 150 rpm 48 ชั่วโมง ตามด้วยสภาวะที่ไม่มี การเขย่า อุณหภูมิ 37 °C จุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 และ FN2 แสดงค่ากัมมันตภาพแลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส เอโซรีดักเทส และลิกนินเปอร์ออกซิเดสสูงสุดที่ 55.53, 19.34, 11.98 และ 4.80 U/L ตามลำดับ และสามารถลด COD, TS, TSS และ TDS ได้สูงสุด 93.94, 46.77, 58.18 และ 60.90% ตามลำดับ ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อพืช สีย้อมที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพไม่ส่งผลเสียต่อการงอกและการเจริญของ *Ipomoea aquatica* Forsk (100%) และ *Oryza sativa* L. (80%)



630920051 : Major BIOTECHNOLOGY

Keyword : Decolorization, Industrial textile effluent, *Bacillus* sp.

MISS Peraya BUAPHO : DECOLORIZATION OF TEXTILE EFFLUENT USING CO-MICROORGANISM *BACILLUS* SP. FN1 AND FN2 Thesis advisor : Assistant Professor Sinthuwat Ritthitham, Ph.D.

The co-culture of *Bacillus* sp. FN1 and FN2 in the ratio of 1:1 could efficiently decolorize the industrial textile effluent. In this study, the co-culture showed the highest decolorization percentage of 64.28, 75.73, 83.05, and 86.26% at the wavelengths of 425, 509, 595, and 625 nm, respectively, within 168 hours in the medium containing glucose (1.0% w/v), yeast extract (0.3% w/v), ammonium chloride (0.6% w/v), and 10% (v/v) of 1,000 fold of the initial textile effluent concentration at 37 °C, pH 7.0 under shaking condition at 150 rpm 48 h and subsequently in static condition. The co-culture of *Bacillus* sp. FN1 and FN2 showed the maximum laccase, manganese peroxidase, azoreductase, and lignin peroxidase activities of 55.53, 19.34, 11.98, and 4.80 U/L respectively, while the removal percentage of COD, TS, TSS, and TDS was 93.94, 46.77, 58.18 and 60.90% respectively. For the phytotoxicity test, the biodegraded dyes did not adversely effect on the germination and growth of *Ipomoea aquatica* Forsk (100%) and *Oryza sativa* L. (80%).



## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เพราะความกรุณาอย่างยิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิ้นธุ์วัฒน์ ฤทธิธรรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริพร พงศ์ทองผาสุข อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ อีกทั้งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วณิดา วัฒนการุณ ประธานกรรมการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อติศักดิ์ จตุรพิริย์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำในการดำเนินงาน รวมทั้งแนะแนวทางการแก้ไขปัญหาข้อบกพร่องเพิ่มเติมในการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณาจารย์และบุคลากรภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่าน ซึ่งให้ความช่วยเหลือเอื้ออำนวยความสะดวกตลอดการศึกษา ตลอดจนถ่ายทอดความรู้อันเป็นประโยชน์ในการศึกษางานวิจัย และในการประยุกต์ใช้งานต่อไป

นางสาว พีรยา บัวโพธิ์



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1. ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3. ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1. สีย้อม.....	4
2.2. ประเภทของสีย้อม.....	4
2.3. กลไกการกำจัดสีโดยจุลินทรีย์.....	7
2.5. แลคเคส (Laccase; Lac).....	8
2.6. ลิควินเปอร์ออกซิเดส (Lignin peroxidase; LiP).....	9
2.7. แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Manganese peroxidase; MnP).....	10
2.8. ปัจจัยที่มีผลต่อการกำจัดสี.....	11
2.9. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	12
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	21



3.1. เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี.....	21
3.1.1. เครื่องมือ.....	21
3.1.2. อุปกรณ์.....	22
3.1.3. สารเคมี.....	22
3.2. วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	23
3.2.1. จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษา.....	23
3.2.2. ตัวอย่างน้ำเสีย.....	24
3.2.3. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ผลิตแลคเคสที่คัดแยกได้.....	25
3.2.4. การวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์.....	26
3.2.5. การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ.....	29
3.2.6. การทดสอบปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ.....	30
1. การศึกษาสถานะที่มีการเขย่าและไม่มีการเขย่าต่อการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ.....	30
2. การศึกษาอัตราส่วนของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ.....	30
3. การศึกษาชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ....	31
4. การศึกษาชนิดแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ..	31
5. การศึกษาอัตราส่วนของปริมาณแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ.....	32
6. การศึกษา pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ .....	32
7. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ .....	33
8. การศึกษาความเข้มข้นสีย้อมเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ.....	34
9. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (Total sugar).....	34
10. การศึกษาพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ .....	34

11. การศึกษาการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอในสภาวะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ .....	36
12. การทดสอบความเป็นพิษของสีย้อมน้ำทิ้งก่อนและหลังการบำบัดที่มีผลต่อพืช....	37
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	38
4.1. ผลการศึกษาสภาวะการให้อากาศของจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีการเขย่าและไม่มีการเขย่า .....	38
4.2. ผลการศึกษาอัตราส่วนของจุลินทรีย์ผสมที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีน้ำเสียจากโรงงานสิ่งทอ	44
4.3. ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอ .....	48
4.4. ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอ .....	52
4.5. ผลการศึกษาอัตราส่วนของปริมาณแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อ การกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ .....	56
4.6. ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอ .....	62
4.7. ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอ.....	68
4.8. ผลการศึกษาความเข้มข้นสีย้อมเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ ....	73
4.9. ผลการศึกษาการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอในสภาวะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ .....	82
4.10. ผลทดสอบความเป็นพิษของสีย้อมน้ำทิ้งก่อนและหลังการบำบัดที่มีผลต่อการเจริญของพืช .....	87
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	91
รายการอ้างอิง.....	92
ภาคผนวก.....	99
ภาคผนวก ก วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์.....	100
ภาคผนวก ข เตรียมสารเคมี .....	102
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน .....	103
ประวัติผู้เขียน.....	105

## สารบัญตาราง

## หน้า

ตารางที่ 1 ประเภทของสีย้อมแบ่งตามโครงสร้างและลักษณะของการนำไปใช้งาน .....	5
ตารางที่ 2 สรุปผลการศึกษาการใช้จุลินทรีย์กำจัดสีย้อม .....	19
ตารางที่ 3 องค์ประกอบของ reaction mixture สำหรับการวิเคราะห์แลคเคสที่ความยาวคลื่น 468 nm โดยใช้ DMP (2,6-Dimethoxyphenol) เป็น substrate (2 mM 2,6-dimethoxyphenol in 10% absolute alcohol in 25 mM Tris-Hydrochloric buffer pH 9.0) ( $\epsilon_{468} = 14,800 \text{ M}^{-1}\text{CM}^{-1}$ ) โดยดัดแปลงจาก Wariishi et al. (1992).....	26
ตารางที่ 4 องค์ประกอบของ reaction mixture สำหรับการวิเคราะห์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ความยาวคลื่น 310 nm โดยใช้ Veratryl alcohol (3,4-Dimethoxybenzyl alcohol) เป็น substrate (10 mM 3,4-Dimethoxybenzyl alcohol in 25mM Glycine-Sodium hydroxide buffer pH 10.0) ( $\epsilon_{310} = 9,300 \text{ M}^{-1}\text{CM}^{-1}$ ) โดยดัดแปลงจาก Tien and Kirk (1988) และ Albarrán-Velo et al. (2017).....	27
ตารางที่ 5 องค์ประกอบของ reaction mixture สำหรับการวิเคราะห์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ความยาวคลื่น 270 nm โดยใช้ Manganese sulfate ( $\text{MnSO}_4$ ) เป็น substrate (10 mM $\text{MnSO}_4$ in 100 mM Sodium malate buffer pH 6.0) ( $\epsilon_{270} = 11,590 \text{ M}^{-1}\text{CM}^{-1}$ ) โดยดัดแปลงจาก Wariishi et al. (1992) และ Chi and Yan (2009) .....	28
ตารางที่ 6 องค์ประกอบของ reaction mixture สำหรับการวิเคราะห์เอโซรีดักเทสที่ความยาวคลื่น 492 nm โดยใช้ Congo red เป็น substrate (40 mM Congo red in 25 mM Tris-Hydrochloric buffer pH 7.0) ( $\epsilon_{492} = 33,000 \text{ M}^{-1}\text{CM}^{-1}$ ) โดยดัดแปลงจาก Zimmermann et al. (1982) และ Leelakriangsak and Borisut (2012).....	29
ตารางที่ 7 การทดสอบความเป็นพิษต่อพืชของน้ำทิ้งสิ่งทอที่ย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ผสม <u>Bacillus</u> sp. FN1 ต่อ <u>Bacillus</u> sp. FN2 .....	88

## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ขั้นตอนการกำจัดสีเฮโซโดยแบคทีเรีย .....	8
ภาพที่ 2 กลไกการออกซิเดชันของแลคเคส ได้แก่ กลไกการเกิดออกซิเดชันของแลคเคส (A) และ กลไกการเกิดออกซิเดชันของแลคเคสที่มีตัวกลาง (OX = oxidized state) (B).....	9
ภาพที่ 3 วัฏจักรการเร่งปฏิกิริยาของลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Lignin peroxidase; LiP).....	10
ภาพที่ 4 วัฏจักรการเร่งปฏิกิริยาของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Manganese peroxidase; MnP) 11	
ภาพที่ 5 ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ <i>Bacillus</i> sp. FN1 (A) และ <i>Bacillus</i> sp. FN2 (B) บนอาหาร แข็งที่มี Guaiacol (0.02 v/v) บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง .....	24
ภาพที่ 6 แสดงลักษณะเซลล์ของจุลินทรีย์ <i>Bacillus</i> sp. FN1 (A) และ <i>Bacillus</i> sp. FN2 (B) จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 55,000 เท่า.....	24
ภาพที่ 7 สีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอที่ไม่เจือจาง (A) และสีน้ำเสียจากโรงงานสิ่งทอที่ระดับการเจือจาง 1000 เท่า (B).....	25
ภาพที่ 8 UV-Vis spectrum ของสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอที่ระดับเจือจาง 1000 เท่า โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank.....	25
ภาพที่ 9 ขั้นตอนในการวิเคราะห์ COD อย่างเร็วเมื่อ COD > 800 mg/L.....	36
ภาพที่ 10 สภาวะที่ไม่มีกรเขย่า (Static) สภาวะที่ไม่มีกรเขย่าตามด้วยสภาวะที่มีการเขย่า (Static to shaking) ที่แสดงค่าความขุ่น และ pH (A) ประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่ง ทอ (B) และค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ (C) ของ <i>Bacillus</i> sp. FN 1 .....	40
ภาพที่ 11 สภาวะที่มีการเขย่า (Shaking) และสภาวะที่มีการเขย่าตามด้วยสภาวะที่ไม่มีกรเขย่า (Shaking to static) ที่แสดงค่าความขุ่น และ pH (A) ประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่ง ทอ (B) และค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ (C) ของ <i>Bacillus</i> sp. FN 1 .....	41
ภาพที่ 12 สภาวะที่ไม่มีกรเขย่า (Static) และสภาวะที่ไม่มีกรเขย่าตามด้วยสภาวะที่มีการเขย่า (Static to shaking) ที่แสดงค่าความขุ่น และ pH (A) ประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่ง ทอ (B) และค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ (C) ของ <i>Bacillus</i> sp. FN 2 .....	42

ภาพที่ 13 สภาวะที่มีเอนไซม์ การเขย่า (Shaking) และสภาวะที่มีการเขย่าตามด้วยสภาวะที่ไม่มี  
การเขย่า (Shaking to static) ที่แสดงค่าความขุ่น และ pH (A) ประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งจาก  
โรงงานสิ่งทอ (B) และค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ (C) ของ *Bacillus* sp. FN 2..... 43

ภาพที่ 14 ค่า pH และค่าความขุ่นของเซลล์ (OD) (A) และประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่ง  
ทอของอัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 ในอัตราส่วน 2:1 (B), 1:1  
(C) และ 1:2 (D) ตามลำดับ และเลี้ยงที่สภาวะที่มีการเขย่า 150 rpm 48 ชั่วโมงตามด้วยสภาวะที่  
ไม่มีการเขย่า ที่ 37 °C..... 46

ภาพที่ 15 ค่ากัมมันตภาพแลคเตส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) และกัมมันตภาพ  
แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) ตามลำดับ ที่อัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ  
*Bacillus* sp. FN2 ในอัตราส่วน 2:1, 1:1 และ 1:2..... 47

ภาพที่ 16 ค่า pH และค่าความขุ่นของเซลล์ (OD) (A) และประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่ง  
ทอของอัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 ในอัตราส่วน 1:1 ที่แหล่ง  
คาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ กลูโคส (B) ซูโครส (C) และแป้ง (D) ตามลำดับ ..... 50

ภาพที่ 17 ค่ากัมมันตภาพแลคเตส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) และกัมมันตภาพ  
แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) ตามลำดับ ที่อัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ  
*Bacillus* sp. FN2 ในอัตราส่วน 1:1 ที่แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ กลูโคส ซูโครสและแป้ง... 51

ภาพที่ 18 ค่า pH และค่าความขุ่นของเซลล์ (OD) (A) และประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่ง  
ทอของ ที่แหล่งไนโตรเจนต่างกันเป็นเปปโทน (B) สารสกัดจากยีสต์ (C) แอมโมเนียมไนเตรท  
(NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) (D) และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH<sub>4</sub>Cl) (E) ตามลำดับ..... 54

ภาพที่ 19 ค่ากัมมันตภาพแลคเตส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) และกัมมันตภาพ  
แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) ตามลำดับ ที่แหล่งไนโตรเจนต่างกันเป็น เปปโทน สารสกัดจากยีสต์  
แอมโมเนียมไนเตรท (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH<sub>4</sub>Cl) ..... 55

ภาพที่ 20 ค่า pH และค่าความขุ่นของเซลล์ (OD) (A) และประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่ง  
ทอของ อัตราส่วนของ กลูโคส (1.0% w/v) ต่อสารสกัดจากยีสต์ (0.3% w/v) ต่อแอมโมเนียมคลอ  
ไรด์ (0.3% w/v) ที่อัตราส่วนต่างกัน ได้แก่ 0:1:1 (B), 1:1:1 (C), 2:1:1 (D), 1:2:1 (E) และ 1:1:2 (F)  
ตามลำดับ..... 59

ภาพที่ 21 ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์ (Extracellular) ได้แก่ ค่ากัมมันตภาพแลคเตส (A)  
กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) กัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) และกัมมันตภาพ

เอโซรีดักเทส (D) ตามลำดับ ที่อัตราส่วนของกลูโคส (1.0% w/v) ต่อสารสกัดจากยีสต์ (0.3% w/v) ต่อแอมโมเนียมคลอไรด์ (0.3% w/v) ที่อัตราส่วนต่างกัน ได้แก่ 0:1:1, 1:1:1, 2:1:1, 1:2:1 และ 1:1:2..... 60

ภาพที่ 22 ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายในเซลล์ (Intracellular) ได้แก่ ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) กัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) และกัมมันตภาพเอโซรีดักเทส (D) ตามลำดับ ที่อัตราส่วนของกลูโคส (1.0% w/v) ต่อสารสกัดจากยีสต์ (0.3% w/v) ต่อแอมโมเนียมคลอไรด์ (0.3% w/v) ที่อัตราส่วนต่างกัน ได้แก่ 0:1:1, 1:1:1, 2:1:1, 1:2:1 และ 1:1:2..... 61

ภาพที่ 23 ค่า pH และค่าความขุ่นของเซลล์ (OD) (A) และประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอของจุลินทรีย์ผสมที่ pH ต่างกัน ได้แก่ pH 5.0 (B), 7.0 (C) และ 9.0 (D) ตามลำดับ ..... 64

ภาพที่ 24 UV-Vis spectrum ของสีย้อมน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอก่อนและหลังบำบัดด้วยจุลินทรีย์ผสมที่ pH เริ่มต้นต่างกัน ได้แก่ pH 5.0 (A), 7.0 (B) และ 9.0 (C)..... 65

ภาพที่ 25 ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์ (Extracellular) ได้แก่ ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) กัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) และกัมมันตภาพเอโซรีดักเทส (D) ตามลำดับ ที่ pH ต่างกัน ได้แก่ pH 5.0, 7.0 และ 9.0..... 66

ภาพที่ 26 ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายในเซลล์ (Intracellular) ได้แก่ ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) กัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) และกัมมันตภาพเอโซรีดักเทส (D) ตามลำดับ ที่ pH ต่างกัน ได้แก่ pH 5.0, 7.0 และ 9.0..... 67

ภาพที่ 27 ค่า pH และค่าความขุ่นของเซลล์ (OD) (A) และประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอของจุลินทรีย์ผสมที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ได้แก่ 37 (B), 40 (C), และ 45 °C (D) ตามลำดับ .... 70

ภาพที่ 28 ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์ (Extracellular) ได้แก่ ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) กัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) และกัมมันตภาพเอโซรีดักเทส (D) ตามลำดับ ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ได้แก่ 37 (B), 40 (C), และ 45 °C (D) ตามลำดับ 71

ภาพที่ 29 แสดงค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายในเซลล์ (Intracellular) ได้แก่ ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) กัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) และกัมมันตภาพเอโซรีดักเทส (D) ตามลำดับ ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ได้แก่ 37 (B), 40 (C), และ 45 °C (D) ตามลำดับ..... 72



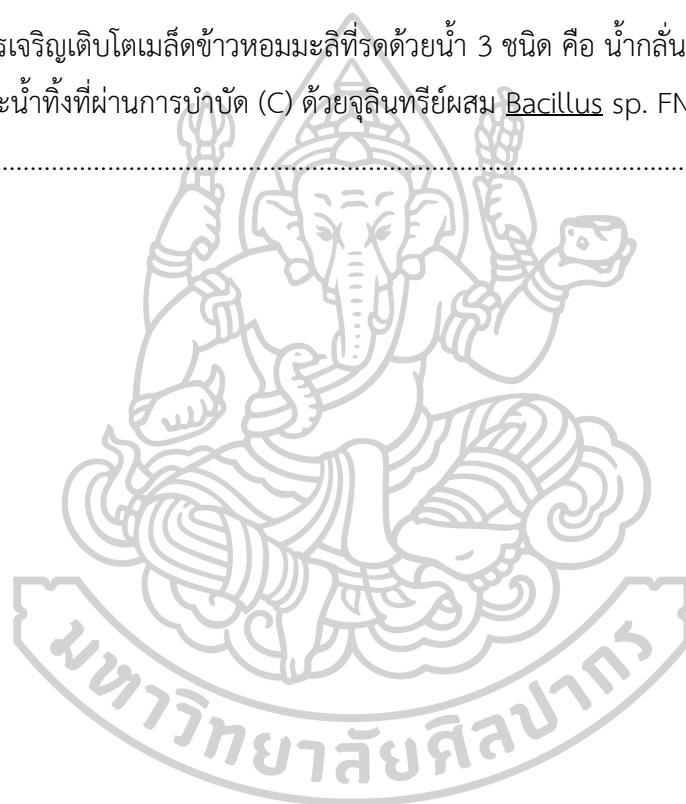
- ภาพที่ 30 ความสัมพันธ์ค่า pH, ค่าความขุ่นของเซลล์ (OD) และความเข้มข้นน้ำตาล (A) และประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอของจุลินทรีย์ผสม (B) และการกำจัดค่า COD และปริมาณของแข็ง (C) ที่ความเข้มข้นสีย้อมน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอเริ่มต้น 100 เท่า ..... 77
- ภาพที่ 31 ความสัมพันธ์ค่า pH, ค่าความขุ่นของเซลล์ (OD) และความเข้มข้นน้ำตาล (A) และประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอของจุลินทรีย์ผสม (B) และการกำจัดค่า COD และปริมาณของแข็ง (C) ที่ความเข้มข้นสีย้อมน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอเริ่มต้น 500 เท่า ..... 78
- ภาพที่ 32 ความสัมพันธ์ค่า pH, ค่าความขุ่นของเซลล์ (OD) และความเข้มข้นน้ำตาล (A) และประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอของจุลินทรีย์ผสม (B) และการกำจัดค่า COD และปริมาณของแข็ง (C) ที่ความเข้มข้นสีย้อมน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอเริ่มต้น 1000 เท่า ..... 79
- ภาพที่ 33 UV-Vis spectrum ของสีย้อมน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอก่อนและหลังบำบัดด้วยจุลินทรีย์ผสม ที่ความเข้มข้นสีย้อมเริ่มต้นต่างกัน ได้แก่ 100 เท่า (A), 500 เท่า (B) และ 1000 เท่า (C) ..... 80
- ภาพที่ 34 ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์ (Extracellular) ได้แก่ ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) กัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) และกัมมันตภาพเอไซรีดักเทส (D) ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นสีย้อมน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอเริ่มต้น 100 เท่า, 500 เท่า และ 1000 เท่า ..... 80
- ภาพที่ 35 ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายในเซลล์ (Intracellular) ได้แก่ ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) กัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) และกัมมันตภาพเอไซรีดักเทส (D) ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นสีย้อมน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอเริ่มต้น 100 เท่า, 500 เท่า และ 1000 เท่า ..... 81
- ภาพที่ 36 ค่า pH และค่าความขุ่นของเซลล์ (OD) (A) และประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอของจุลินทรีย์ผสมที่สภาวะที่มีการฆ่าเชื้อ (B) และสภาวะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ (C) ตามลำดับ ..... 83
- ภาพที่ 37 ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์ (Extracellular) ได้แก่ ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) กัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) และกัมมันตภาพเอไซรีดักเทส (D) ตามลำดับ ที่สภาวะที่มีการฆ่าเชื้อ (Sterile) และสภาวะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ (Non-Sterile) ..... 84
- ภาพที่ 38 ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายในเซลล์ (Intracellular) ได้แก่ ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) กัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) และกัมมันตภาพ

เอโซรีดักเทส (D) ตามลำดับ ที่สภาวะที่มีการฆ่าเชื้อ (Sterile) และสภาวะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ (Non-Sterile)..... 85

ภาพที่ 39 UV-Vis spectrum ของสีย้อมน้ำทึงจากโรงงานสิ่งทอหลังบำบัดด้วยจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีการฆ่าเชื้อ (A) และไม่มีการฆ่าเชื้อ (B) ตามลำดับ โดยจุลินทรีย์ผสมที่ความเข้มข้นสีน้ำทึงเริ่มต้น 1000 เท่า ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่าตามสภาวะที่ไม่มีการเขย่า ภายใน 168 ชั่วโมง..... 86

ภาพที่ 40 การเจริญเติบโตเมล็ดผักบุงที่รดด้วยน้ำ 3 ชนิด คือ น้ำกลั่น (A) น้ำทึงที่ไม่ผ่านการบำบัด (B) และน้ำทึงที่ผ่านการบำบัด (C) ด้วยจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 .... 89

ภาพที่ 41 การเจริญเติบโตเมล็ดข้าวหอมมะลิที่รดด้วยน้ำ 3 ชนิด คือ น้ำกลั่น (A) น้ำทึงที่ไม่ผ่านการบำบัด (B) และน้ำทึงที่ผ่านการบำบัด (C) ด้วยจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2..... 90





## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1. ที่มาและความสำคัญ

ในปัจจุบันมีการเติบโตของอุตสาหกรรมมากขึ้น ส่งผลให้เกิดมลภาวะทางน้ำทำให้คุณภาพน้ำแย่ง ซึ่งสาเหตุสำคัญคือการระบายน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมลงสู่แหล่งน้ำ และหนึ่งในนั้นคืออุตสาหกรรมที่ใช้สีย้อม ซึ่งมีการระบายน้ำทิ้งลงสู่แหล่งน้ำ ทำให้เกิดมลพิษต่อแหล่งน้ำส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของมนุษย์ (Akansha *et al.*, 2019) สีย้อมแทบทุกชนิดมีส่วนประกอบที่เป็นพิษย่อยสลายตามธรรมชาติได้ยาก บางชนิดมีโครงสร้างทางเคมีเป็นพวกอะโรมาติกเอมีน (Aromatic amine) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง นอกจากนี้ สีที่ปนเปื้อนลงไปในแหล่งน้ำยังมีผลบดบังการสังเคราะห์แสงของแพลงก์ตอนและพืชน้ำ ซึ่งมีผลกระทบต่อห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศโดยตรง สีย้อมส่วนใหญ่ละลายน้ำได้ดีแต่ย่อยสลายยาก เนื่องจากทนทานต่อแสง และความเป็นกรดต่างทำให้ยากต่อการบำบัด (รวินิภา ศรีมูล, 2559)

ปัจจุบันได้มีการคิดค้นเทคโนโลยีและการบำบัดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมสิ่งทอ ซึ่งมีทั้งการบำบัดสีย้อมด้วยวิธีทางกายภาพ และวิธีการบำบัดทางเคมี เช่น การตกตะกอนด้วยสารเคมี การแลกเปลี่ยนไอออน และการใช้โอโซน แต่วิธีบำบัดดังกล่าวยังมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ค่าใช้จ่ายในการบำบัดค่อนข้างสูง ตะกอนที่ได้จากการบำบัดมีเป็นจำนวนมาก และมีสารพิษตกค้างยากต่อการกำจัดต่อไป ในขณะที่วิธีการบำบัดทางชีวภาพเป็นวิธีการบำบัดที่อาศัยจุลินทรีย์ประเภทต่างๆ เช่น แบคทีเรีย สาหร่าย และเห็ดรา ซึ่งแบคทีเรียมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง และพบว่าสามารถบำบัดสีย้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ อันเนื่องมาจากกลไกการทำงานของเอนไซม์เอโซรีดักเทสในการย่อยสลายพันธะเอโซจากโมเลกุลใหญ่ให้เป็นโมเลกุลที่เล็กลง ซึ่งการบำบัดสีย้อมด้วยวิธีทางชีวภาพยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และมีค่าใช้จ่ายน้อย ดังนั้น วิธีการบำบัดทางชีวภาพจึงเป็นทางเลือกที่ดีทางหนึ่งในการบำบัดน้ำทิ้งสีย้อมจากอุตสาหกรรมสิ่งทอ (สุกัลยา บริสุทธิ์, 2553)

งานวิจัยนี้ศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอของบริษัท โนเบลเท็กซ์การย้อม จำกัด อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม โดยอาศัยการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 และ *Bacillus* sp. FN2 ที่คัดแยกได้จากน้ำทิ้งสีย้อม โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ ได้แก่ สภาพอากาศ, อัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม, ชนิดของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม, อัตราส่วนปริมาณของแหล่งคาร์บอนต่อ

แหล่งไนโตรเจน, pH เริ่มต้น, อุณหภูมิ, และความเข้มข้นของสีย้อมเริ่มต้น และศึกษาความเป็นพิษของสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอที่มีผลต่อการเติบโตของพืช ตลอดจนศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกัมมันตภาพเอนไซม์ (แลคเคส (Lac) ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) และเอโซรีดักเทส (Azoreductase) ประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอและความสามารถในการลด COD (Chemical Oxygen Demand) และปริมาณของแข็งในน้ำ (TS, TSS และ TDS) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสีย้อมจากน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งสีย้อมในอุตสาหกรรมได้

## 1.2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1. ศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอโดยการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. FN1 และ *Bacillus* sp. FN2

1.2.2. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกัมมันตภาพเอนไซม์ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการกำจัดสีย้อม เช่น แลคเคส (Lac) ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) และเอโซรีดักเทส (Azoreductase) และประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ

1.2.3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ ได้แก่ สภาพการให้อากาศ, อัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม, ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม, อัตราส่วนปริมาณของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน, pH เริ่มต้น, อุณหภูมิ และความเข้มข้นของสีย้อมเริ่มต้น

1.2.4. ศึกษาความเป็นพิษต่อพืชของสีย้อมน้ำทิ้งก่อนและหลังบำบัดด้วยจุลินทรีย์ผสม

## 1.3. ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1. ศึกษาการกำจัดสีน้ำทิ้งจากบริษัท โนเบิลเท็กซ์การย้อม จำกัด โดยการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. FN1 และ *Bacillus* sp. FN2

1.3.2. ศึกษาความสัมพันธ์ของกัมมันตภาพเอนไซม์ (Lac, LiP, MnP และ Azoreductase) กับประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ

1.3.3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอของจุลินทรีย์

1.3.3.1. สภาพการให้อากาศของจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีการเขย่าและไม่มีการเขย่า

1.3.3.2. อัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ FN2 ที่อัตราส่วน 2:1, 1:1

และ 1:2

- 1.3.3.3. ชนิดของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส, ซูโครส, และ แป้ง
- 1.3.3.4. ชนิดของแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ เปปโตน, สารสกัดจากยีสต์, แอมโมเนียมไนเตรท ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) และแอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )
- 1.3.3.5. อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม
- 1.3.3.6. pH เริ่มต้นของอาหารที่ 5.0, 7.0, และ 9.0
- 1.3.3.7. อุณหภูมิที่ 37, 40 และ 45 °C
- 1.3.3.8. ความเข้มข้นสีย้อมเริ่มต้นที่ระดับการเจือจาง 100, 500 และ 1000 เท่า
  - 1.3.3.8.1. การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด ของแข็งแขวนลอย และของแข็งที่ละลายน้ำได้
  - 1.3.3.8.2. วิเคราะห์ COD (Chemical Oxygen Demand)
- 1.3.3.9. การกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอในสถานะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ
- 1.3.3.10. ทดสอบความเป็นพิษของสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอหลังการบำบัดที่มีผลต่อพืช

#### 1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบสถานะที่เหมาะสมและการเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสีย้อมจากน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอโดยใช้จุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 และ *Bacillus* sp. FN2 และสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดสีย้อมในอุตสาหกรรมได้

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1. สีย้อม

สีย้อม (Dye stuffs) คือ สีชนิดหนึ่งที่ใช้ในการย้อมเส้นใยของผ้าอาจจะเป็นสารอินทรีย์ หรือ สารอนินทรีย์ก็ได้ มีลักษณะเป็นผลึกหรือผงละเอียด สีย้อมบางชนิดละลายน้ำได้ บางชนิดจะไม่สามารถละลายน้ำ แต่จะละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เมื่อนำสีย้อมไปใช้ในกระบวนการย้อมจะทำให้โมเลกุลของสีย้อมซึมผ่านเข้าไปในตัวทำละลาย โดยตัวทำละลายจะทำลายโครงสร้างผลึกของวัตถุนั้นชั่วคราว ซึ่งอาจเกิดพันธะไอออนิก (Ionic bond) หรือพันธะโควาเลนต์ (Covalent bond) กับวัตถุที่ต้องการย้อมโดยตรง สีที่เห็นจากสีย้อมนั้นเกิดจากอิเล็กตรอนในพันธะคู่ที่อยู่ในโมเลกุลของสีย้อม สามารถดูดกลืนพลังงานแสงในช่วงสเปกตรัมต่างกัน พลังงานแสงที่สายตามองเห็นจะมีความยาวคลื่นช่วง 400-700 nm สีย้อมที่มีโครงสร้างโมเลกุลต่างกัน จะมีความสามารถในการดูดกลืนพลังงานสีที่ความยาวคลื่นต่างๆ กันไป ซึ่งสายตาสถาสามารถปรับภาพได้ จึงทำให้โมเลกุลสีย้อมต่างโทนสีกัน แสดงสีให้เราเห็นด้วยสายตาคือสีที่ต่างกัน (ขนิษฐา, 2550a) สามารถแบ่งสีย้อมออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

สีย้อมธรรมชาติ (Natural dye stuffs) เป็นสีย้อมที่มาจากแหล่งธรรมชาติ โดยเฉพาะพืชและสัตว์ สีย้อมที่มาจากส่วนประกอบพืช เช่น ส่วนลำต้น ส่วนดอก ส่วนที่เป็นเปลือก ส่วนที่เป็นใบ เป็นต้น ตัวอย่างเช่น สีดำจากลูกมะเกลือ สีนํ้าเงินจากต้นคราม สีเหลืองจากเนื้อไม้ไผ่ สีแดงจากดอกกรรณิการ์ สีแดงจากรากต้นเข็ม ส่วนสีย้อมที่มาจากสัตว์ เช่น สีม่วงแดงของครั่ง และสีม่วงจากหอยสังข์หนาม เป็นต้น

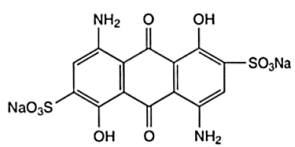
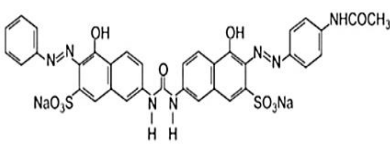
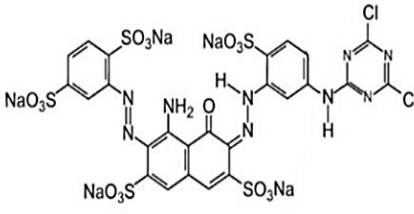
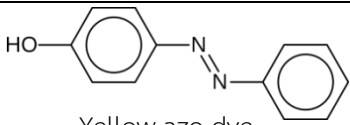
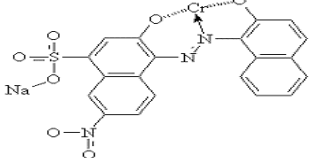
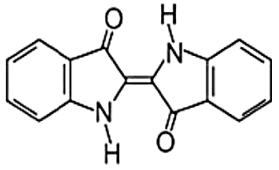
สีย้อมสังเคราะห์ (Synthetic dye stuffs) เป็นสีย้อมที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (ขนิษฐา, 2550b)

#### 2.2. ประเภทของสีย้อม

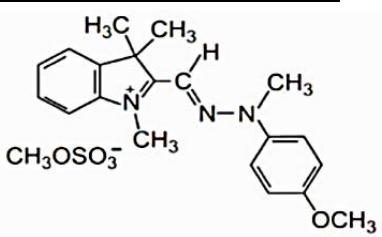
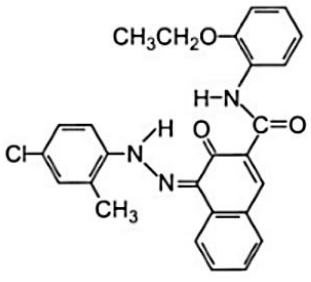
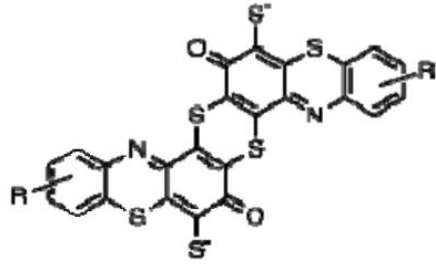
ในการจำแนกสีย้อมที่นิยมกันมากที่สุด คือ การจำแนกสีย้อมตามการนำไปใช้ เพราะจะต้องมีความคงทนการซัก มีความคงทนต่อแสง และยังต้องมีความคงทนต่อความร้อน โดยที่สีย้อมแต่ละประเภทจะมีสูตรโครงสร้างเคมี สมบัติของสีย้อม ตลอดจนวิธีใช้ที่แตกต่างกันไป ดังนั้น การเลือกใช้

สีย้อมจึงมีความสำคัญอย่างมากในการย้อมสี เพราะวัตถุที่ต้องการย้อมอาจสามารถย้อมด้วยสีย้อมเพียงชนิดเดียว หรือย้อมด้วยสีย้อมหลายชนิดที่ต่างชนิดกันได้ เช่น เส้นใยเซลลูโลส ส่วนใหญ่จะย้อมด้วยสีไดเร็กต์ เป็นต้น (อรุณี คงดี อัลเตรด, 2558) สีย้อมที่ใช้ทั่วไปในอุตสาหกรรมสิ่งทอแบ่งตามโครงสร้างและลักษณะของการนำไปใช้งาน แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ประเภทของสีย้อมแบ่งตามโครงสร้างและลักษณะของการนำไปใช้งาน

ชนิดของสีย้อม	ลักษณะของโครงสร้าง	การนำไปใช้	ตัวอย่างโครงสร้างสีย้อม
<b>สีแอซิด</b> (Acid dye)	เป็นเกลือโซเดียมของกรด กำมะถัน อาจมีหมู่แอนทราควิโนน แชนทีน เอโซ หรือ ไนโตรละลายน้ำได้มีประจุลบ	ใช้ย้อมเส้นใยโปรตีนและเซลลูโลส	 Acid blue 45
<b>สีไดเร็กต์</b> (Direct dye)	ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบเอโซ พทาโลไซยานิน หรือ ออกซาซิน มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ละลายน้ำให้ประจุลบ เกาะติดเส้นใยได้ดี	นิยมใช้ย้อมเส้นใยเซลลูโลส	 Direct orange 25
<b>สีรีแอคทีฟ</b> (Reactive dye)	ละลายน้ำให้ประจุลบ โมเลกุลของสีจะจับกับหมู่ไฮดรอกซิลในสถานะที่เป็นต่าง โครงสร้างมีหมู่รีแอคทีฟ (Reactive group) เช่น หมู่คลอรีนเตตโรซีน และหมู่ไวนิลซิลโฟน	เหมาะกับการย้อมเส้นใยเซลลูโลส	 Reactive blue 109
<b>สีเอโซ</b> (Azo dye)	มีหมู่เอโซ โครงสร้างทั่วไปคือ R-N=N-R ไม่ละลายน้ำ	ใช้ย้อมเส้นใยได้ทั้งเซลลูโลส ไนลอน และแอซีเตต	 Yellow azo dye
<b>สีมอร์ดันท์</b> (Mordant dye)	เป็นสีย้อมที่ต้องใช้สารประกอบออกไซด์ของโลหะช่วยยึดบนเส้นใย เช่น โครเมียม ดีบุก เหล็กที่ทำให้มีโมเลกุลใหญ่	ใช้ย้อมเส้นใยโปรตีนและโพลีเอไมด์	 Mordant Black
<b>สีแว็ต</b> (Vat dye)	ไม่ละลายน้ำ มีส่วนประกอบที่สำคัญ 2 ชนิด คือ สีอินดิโก และสีแอนทราควิโนนอยด์ ละลายน้ำโดยทำปฏิกิริยากับสารรีดิวซ์และโซเดียมไฮดรอกไซด์ ถูกรีดิวซ์กลายเป็นเกลือ ซึมเข้าไปในเส้นใย	ย้อมเส้นใยได้ทุกชนิดทั้งเส้นใยธรรมชาติและเส้นใยสังเคราะห์	 Indigo pigment blue 66

ตารางที่ 1 ประเภทของสีย้อมแบ่งตามโครงสร้างและลักษณะของการนำไปใช้งาน (ต่อ)

ชนิดของสีย้อม	ลักษณะของโครงสร้าง	การนำไปใช้	ตัวอย่างโครงสร้างสีย้อม
<b>สีเบสิค</b> (Basic dye)	เป็นเกลือของเบสอินทรีย์ ( $-NR^{3+}$ หรือ $=NR^{2+}$ ) อาจมีหมู่ เฮมิไซยานิน แอนทราควิโนน หรือไตรอาร์ลิมีเทน ละลายน้ำ ได้มีประจุบวก	นิยมใช้ย้อมเส้นใยโปรตีน ไนลอน และ เส้นใย อะคริลิก	 <p>Basic yellow</p>
<b>สีดิสเพิร์ส</b> (Disperse dye)	ไม่ละลายน้ำ อนุภาคของสีอยู่ที่ ประมาณ 1-3 ไมโครเมตร แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ สีย้อม อะมิแอนทราควิโนน และ สีย้อมอะโซ ซึ่งทั้งสองกลุ่ม ประกอบด้วยอนุพันธ์ของเอทา โนลามีน	ใช้ย้อมเส้นใยแอซีเตต โพลีเอสเตอร์ ไนลอน และอะคริลิก	 <p>Disperse red 220</p>
<b>สีซัลเฟอร์</b> (Sulfur dye)	ไม่ละลาย ได้จากการนำ สารอินทรีย์ที่มีหมู่ไนโตรและ หมู่อะมิโนมาทำปฏิกิริยา กับซัลเฟอร์หรือโซเดียมซัลไฟด์ ที่อุณหภูมิสูง ต้องรีดิวซ์สีให้ โมเลกุลอยู่ในสภาพที่ละลายน้ำ ได้	นิยมนำมาย้อมผ้าฝ้าย	 <p>Sulfur black 1</p>

ที่มา: รวนิภา ศรีมูล (2559)



## 2.3. กลไกการกำจัดสีโดยจุลินทรีย์

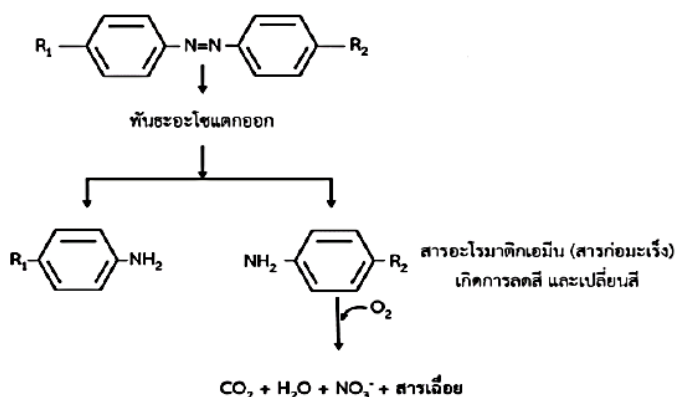
กลไกในการย่อยสลายสีย้อมมี 2 กลไกหลัก คือ

2.3.1. กลไกการดูดซับ (Biosorption) กลไกการดูดซับในกิจกรรมการย่อยสลายสีย้อมเกิดจากแบคทีเรียดูดซับสีเข้าสู่เซลล์ และมีสีบางส่วนถูกดูดซับภายในไซโทพลาสซึม ทำให้ความเข้มข้นของสีย้อมลดลงขั้นหนึ่งแต่เป็นเพียงระยะเวลาสั้น ๆ ไม่สามารถลดสีได้ในระยะยาว จนเมื่อถึงจุดที่แบคทีเรียดูดซับสีจนถึงจุดอิ่มตัวแล้วเซลล์จะมีกระบวนการทางชีวภาพเพื่อย่อยสลายสีเกิดขึ้น

2.3.2. การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Enzymatic degradation) การผลิตเอนไซม์จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์และเอนไซม์ที่ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์เพื่อเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสีย้อม โดยในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสีย้อมอาจประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดเรียกรวมว่า Ligninolytic enzymes ได้แก่ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Lignin peroxidases; LiP) แลคเคส (Laccases; Lac) และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Manganese peroxidases; MnP) เป็นเอนไซม์ที่เกิดจากกลไกการย่อยสลายแบบ Oxidative สำหรับเอโซเรดักเทส (Azoreductase) เป็นเอนไซม์ที่เกิดจากกลไกการย่อยสลายแบบรีดักทีฟ โดยจุลินทรีย์ผลิตขึ้นและปล่อยออกมาย่อยสลายสารจำพวกอะโรมาติกซึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่ เอโซเรดักเทสต้องการ NADH และ NADPH เป็นโคแฟกเตอร์ในการย่อยสลายสีย้อม เอโซเรดักเทสมีทั้งชนิดที่เป็น Intracellular enzyme และ Extracellular enzyme (สุกัลยา บริสุทธิ์, 2553)

## 2.4. การกำจัดสีเอโซ

การกำจัดสีเอโซส่วนใหญ่ใช้จุลินทรีย์ที่เจริญภายใต้สภาวะไร้อากาศ โดยที่จุลินทรีย์จะผลิตเอนไซม์เอโซเรดักเทส (Azoreductase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่สุดในกระบวนการย่อยสลายสีย้อมเนื่องจากการผลิตภายในเซลล์แล้วจะปล่อยไปยังบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดได้ดีกว่าจุลินทรีย์ที่เจริญภายใต้สภาวะที่มีอากาศ เนื่องจากออกซิเจนในอากาศเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอโซเรดักเทสในการย่อยสลายพันธะเอโซ (-N=N-) ซึ่งกลไกการกำจัดสีจะเกิดขึ้นบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์โดยมี NADH ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์จะช่วยให้เอโซเรดักเทสสามารถย่อยสลายพันธะเอโซในโมเลกุลของสารสีที่แขวนลอยอยู่ในน้ำให้กลายเป็นสารเอโรมาติกเอมีน (ภาพที่ 1) แต่สารประกอบนี้ยังคงความเป็นพิษสูงโดยก่อให้เกิดโรคมะเร็ง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้จุลินทรีย์ที่เจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน มาย่อยสลายต่อให้กลายเป็นสารประกอบอื่นที่ไม่เป็นพิษ โครงสร้างสีที่ประกอบด้วยพันธะเอโซเดี่ยว (Monoazo) แบคทีเรียจะสามารถกำจัดพันธะเอโซได้ดี และรวดเร็วกว่าสีที่มีองค์ประกอบของพันธะเอโซสองตำแหน่ง (Diazo) และสามตำแหน่ง (Triazo) ในโมเลกุลของสี (ธิดิณัฐ คำใจ, 2552)



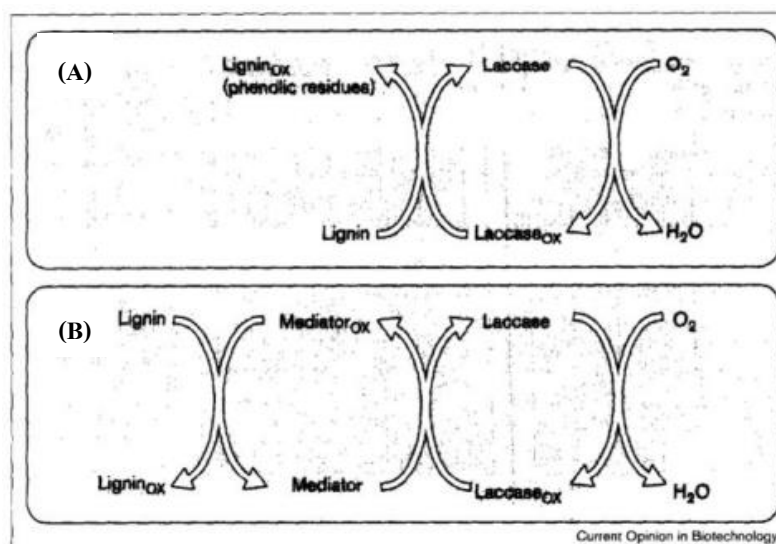
ภาพที่ 1 ขั้นตอนการกำจัดสีเอโซโดยแบคทีเรีย  
ที่มา: ธิติณัฐ คำใจ (2552); Pearce *et al.* (2003)

## 2.5. แลคเคส (Laccase; Lac)

แลคเคส (EC 1.10.3.2) เป็นเอนไซม์ที่มี copper หลายอะตอม ค้นพบครั้งแรกในจากยางของต้น *Rhus verniciflua* โดย Yoshida ในปี 1883 และต่อมาได้ถูกค้นพบในแมลง แบคทีเรีย และถูกค้นพบมากในรเชื้อรา โดยแลคเคสทำหน้าที่ออกซิไดซ์ทั้ง สารประกอบฟีนอล (Phenolic) และสารประกอบที่ไม่ใช่ฟีนอล (non phenolic) เช่น Guaiacol, DMP (2,6-dimethoxyphenol), Veratyl alcohol และ Syringaldazine เป็นต้น (Kyomuhimbo & Brink, 2023) แลคเคสอาจทำปฏิกิริยาโดยตรงกับส่วนที่เป็นสารประกอบฟีนอลของลิกนินหรืออาจต้องการสารตัวกลางซึ่งทำหน้าที่เป็น co-substrate โดยสารตัวกลางที่นิยมใช้ คือ ABTS (2,2-Azinobis-(3-ethylbenzoylthiazoline-6-sulphonate) แลคเคสมีมวลโมเลกุลของ monomer ในช่วง 40-130 kDa โดยเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชัน (Oxidation) หนึ่งอิเล็กตรอนของสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ 4 โมเลกุล ควบคู่กับการรีดักชัน (Reduction) 4 อิเล็กตรอน ของออกซิเจนไปเป็นน้ำ (Wu *et al.*, 2010) กลไกการเกิดออกซิเดชันของแลคเคส แสดงดังภาพที่ 2 นอกจากนี้ แลคเคสยังมีความสำคัญ เนื่องจากออกซิไดซ์ทั้งสารตั้งต้นที่เป็นพิษและไม่เป็นพิษ ซึ่งมีการใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร อุตสาหกรรมแปรรูปไม้ อุตสาหกรรมยา และอุตสาหกรรมเคมี เป็นต้น เอนไซม์นี้มีความเฉพาะเจาะจงมาก มีความยั่งยืนทางนิเวศวิทยาและเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ดี จึงมีการประยุกต์ใช้แลคเคสในการลดความเข้มข้นของมลพิษในอุตสาหกรรมสิ่งทอที่ใช้น้ำและสารเคมีปริมาณมาก ซึ่งสารเคมีเหล่านี้มีตั้งแต่สารประกอบอินทรีย์ไปจนถึงสารประกอบอนินทรีย์ ซึ่งเป็นสารเคมีที่ย่อยสลายได้ยากในธรรมชาติ และเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ ด้วยเหตุนี้ในปัจจุบันจึงมีการพัฒนากระบวนการกำจัดย้อมด้วยที่แลคเคส (Shekher *et al.*, 2011) มีรายงานว่าแลคเคสที่



ถูกผลิตโดย *Aeromonas hydrophila* ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE มีน้ำหนักโมเลกุล 60 kDa สามารถกำจัดสีย้อม Crystal violet (100 mg/L;  $\lambda_{\max} = 590 \text{ nm}$ ) ได้ 95.30% ภายใน 8 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่า (110 rpm) ที่ pH 7.0 ในอาหารที่มีกลูโคส (0.1% w/v) และ สารสกัดจากยีสต์ (0.5% w/v)



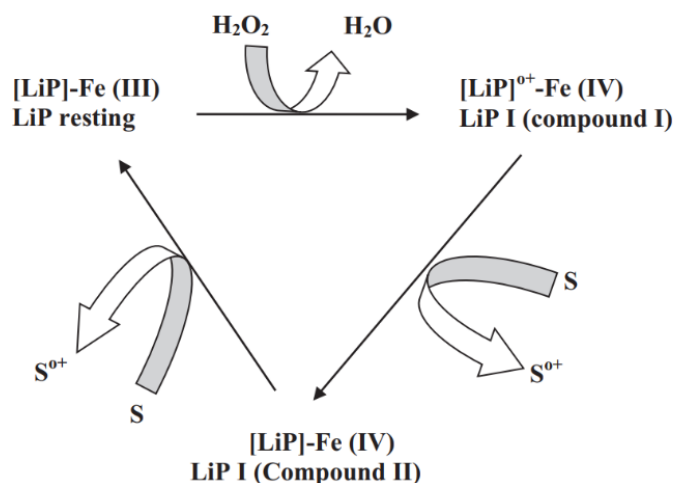
ภาพที่ 2 กลไกการออกซิเดชันของแลคเคส ได้แก่ กลไกการเกิดออกซิเดชันของแลคเคส (A) และ กลไกการเกิดออกซิเดชันของแลคเคสที่มีตัวกลาง (OX = oxidized state) (B)

ที่มา: Breen and Singleton (1999)

## 2.6. ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Lignin peroxidase; LiP)

ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (EC 1.11.10.14) เป็น Ligninolytic enzyme ตัวแรกที่มีการค้นพบ และพบ บ่อยใน *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* และ *Bjerkandera sp.* จัดเป็นเอนไซม์ที่มี Ferric heme เป็นตัวให้อิเล็กตรอน สามารถ reduce โมเลกุลของออกซิเจนได้ สาร hydrogen peroxidase และ superoxide (อนุกุล เกียรติวิชัยบุตร (2556); Baciocchi *et al.* (2002)) การเร่งปฏิกิริยาของลิกนินเปอร์ออกซิเดสประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (ภาพที่ 3) ขั้นตอนปฏิกิริยาแรก คือปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Fe (III) โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ทำให้เกิดสารประกอบตัวที่หนึ่งคือ Oxo-ferryl ในขั้นตอนที่สองสารตั้งต้น Oxo-ferryl จะถูกรีดิวซ์โดยโมเลกุลของสารตั้งต้น เช่น สารตั้งต้นที่เป็น non-phenolic aromatic compound (S) ซึ่งให้อิเล็กตรอนหนึ่งตัวแก่สารประกอบ I เพื่อสร้างสารตั้งต้นตัวที่สอง ในขั้นตอนสุดท้ายเกี่ยวข้องกับการให้อิเล็กตรอนตัวที่สองให้กับสารประกอบ II โดยสารตั้งต้นที่ลดลงจะส่งผลให้

ลิกนินเปอร์ออกซิเดสกลับสู่สถานะออกซิเดชัน Fe (III) ซึ่งบ่งชี้ว่าปฏิกิริยาออกซิเดชันเสร็จสิ้น แสดงดังภาพที่ 3 (Falade *et al.* (2017); Abdel-Hamid *et al.* (2013))

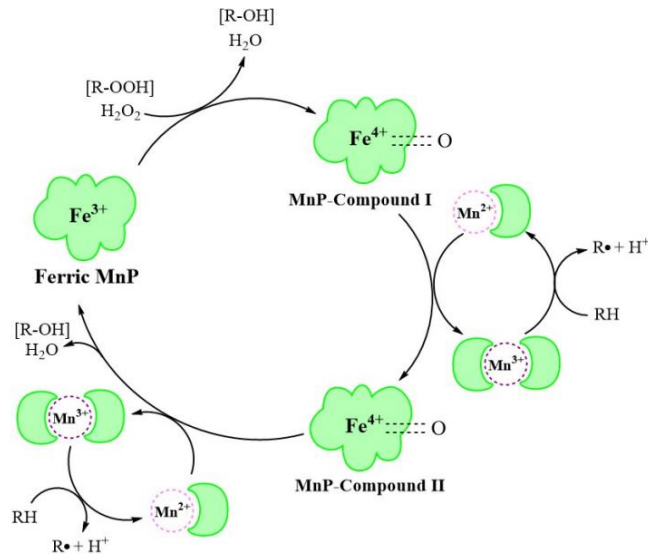


ภาพที่ 3 วัฏจักรการเร่งปฏิกิริยาของลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Lignin peroxidase; LiP)

ที่มา: Abdel-Hamid *et al.* (2013)

## 2.7. แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Manganese peroxidase; MnP)

แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (EC 1.11.1.7) ส่วนใหญ่พบได้มากในราขาว ซึ่งคล้ายกับ LiPs เป็นเอนไซม์ที่มีโกลโคเลตซึ่งประกอบด้วย heme ทำหน้าที่หมู่ฟังก์ชันที่จำเป็นต่อการทำงานของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) มีรายงานว่า พบแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ใน *P. chrysosporium* เป็นครั้งแรก (Breen & Singleton, 1999) วัฏจักรการเร่งปฏิกิริยาของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในช่วงเริ่มต้นของการเร่งปฏิกิริยาโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) หรือสารอินทรีย์เปอร์ออกซิเดสที่จับกับเอนไซม์ในรูปแบบ Fe (III) กระบวนการนี้จะเกิด  $\text{H}_2\text{O}$  หนึ่งโมเลกุล และสร้างสารประกอบ MnP I ( $\text{Fe}^{4+}$ -oxo-porphyrin radical complex) โดยมีสารออกซิเดชันสองตัว ซึ่งถูกออกซิไดซ์  $\text{Mn}^{2+}$  เป็น  $\text{Mn}^{3+}$  ทำให้เกิดสารประกอบ MnP II ทันที หลังจากนั้นสารประกอบ MnP II รวมตัวกับ  $\text{Mn}^{2+}$  ทำให้เกิด  $\text{Mn}^{3+}$  ในลักษณะเดียวกันแล้วปล่อย  $\text{H}_2\text{O}$  หนึ่งโมเลกุล และถูกรีดิวซ์ให้อยู่ในรูปของ Fe (III) เหมือนเดิม แสดงว่าสิ้นสุดวัฏจักรการเร่งปฏิกิริยาของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส แสดงดังภาพที่ 4 (Chang *et al.*, 2021)



ภาพที่ 4 วัฏจักรการเร่งปฏิกิริยาของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Manganese peroxidase; MnP)

ที่มา: Chang *et al.* (2021)

## 2.8. ปัจจัยที่มีผลต่อการกำจัดสี

ประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพนั้นตัวแปรที่เกี่ยวข้องมีความสำคัญมาก เช่น ระดับการให้อากาศ อุณหภูมิ pH และพลังงานศักย์ในปฏิกิริยารีดอกซ์ของระบบจะต้องเหมาะสมเพื่อจะทำให้อัตราการกำจัดสีเกิดขึ้นสูงสุด นอกจากนี้ ปริมาณของตัวให้อิเล็กตรอน และตัวกลางในปฏิกิริยารีดอกซ์ต้องสมดุลกับปริมาณชีวมวลเซลล์ในระบบและปริมาณของสี ความสามารถของแบคทีเรียในการกำจัดสีจากประเภทสีที่ต่างกัน จะต้องมีการทดสอบชนิดของน้ำทิ้งที่สามารถบำบัดได้ โดยระบบ องค์ประกอบของน้ำทิ้งสิ่งทอมีความหลากหลายประกอบด้วย สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ สารอาหาร เกลือ องค์ประกอบของซิลเฟออร์และความเป็นพิษของสี โดยองค์ประกอบเหล่านี้อาจมีผลไปยังยังกระบวนการกำจัดสี

2.8.1. ออกซิเจน เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากที่สุด เพราะออกซิเจนมีผลต่อการเจริญของเซลล์ และการกำจัดสี โดยในระหว่างที่เซลล์มีการเจริญเติบโต ออกซิเจนจะมีความสำคัญคือมีผลต่อลักษณะทางกายภาพของเซลล์ ส่วนในระหว่างการทำกำจัดสี ออกซิเจนจะมีผลยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอโซรีดักเทส (Azoreductase) ไม่ให้ทำงานได้ดี เนื่องจากที่ออกซิเจนจะไปรับอิเล็กตรอนอิสระที่ปลดปล่อยจากในเซลล์ แทนที่จะมีการส่งผ่านอิเล็กตรอนด้วย Redox mediator กับบริเวณพันธะเอโซ จึงเป็นสาเหตุทำให้การกำจัดสีลดลง

2.8.2. อุณหภูมิ ในระบบส่วนใหญ่อัตราการกำจัดสีจะเพิ่มขึ้น ถ้าอุณหภูมิเพิ่มขึ้น ในช่วงที่กำจัดสีขึ้นอยู่กับระบบ โดยความต้องการอุณหภูมิเพื่อให้มีการกำจัดสีสูงสุด สัมพันธ์กับ

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเซลล์คือ 35-45 °C ถ้าอุณหภูมิของระบบสูงมากกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ กิจกรรมการกำจัดสีจะค่อยๆ ลดลง (ปิยะบุตร โพธิคาม บำรุง, 2554)

2.8.3. pH จากการศึกษาในระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีจะมีค่าเป็นกลางหรือเป็นด่างเล็กน้อยคือ 7.0 - 9.5 และอัตราการกำจัดสีจะลดลงอย่างรวดเร็วที่ pH เป็นกรดเข้มข้นหรือเป็นด่างเข้มข้น (ปิยะบุตร โพธิคาม บำรุง, 2554)

2.8.4. ความเข้มข้นสี จากการศึกษาแบคทีเรียที่สามารถกำจัดสีได้ดีจะพิจารณาจากกิจกรรมของเอโซรีดักเทส (Azoreductase) และจากการใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทที่ระดับต่างๆ ปรากฏว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสีที่แบคทีเรียสามารถกำจัดได้ง่ายอยู่ในช่วง 1-10  $\mu\text{mol}$  และการกำจัดสีจะมีค่าเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 30  $\mu\text{mol}$  (ปิยะบุตร โพธิคาม บำรุง (2554); Sani and Banerjee (1999))

2.8.5. โครงสร้างสี จากการศึกษาพบว่าโครงสร้างสีที่ประกอบไปด้วยพันธะเอโซเดี่ยว (Monoazo) แบคทีเรียสามารถกำจัดสีได้ดีและรวดเร็วกว่าสีที่มีองค์ประกอบของพันธะเอโซสองแห่ง (Diazo) และสามแห่ง (Triazo) ในโมเลกุลสี

2.8.6. ตัวให้อิเล็กตรอน จากการศึกษาพบว่าตัวให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยากำจัดสีเอโซด้วย เอนไซม์เอโซรีดักเทส (Azoreductase) ได้คือ โคแฟกเตอร์ชนิด NADH และได้การยืนยันจากการทดลองที่มีการนำ p-chloromercuribenzoate ไปยับยั้งการสร้าง NADH ภายในเซลล์แบคทีเรีย พบว่าการกำจัดสีลดลง (ปิยะบุตร โพธิคาม บำรุง (2554); Gingell and Walker (1971))

2.8.7. พลังงานศักย์ในปฏิกิริยารีดอกซ์ การกำจัดสีของแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับพลังงานในการส่งผ่านอิเล็กตรอน โดยเมื่อมีการกำจัดสีมากขึ้น ค่าพลังงานศักย์ในปฏิกิริยารีดอกซ์จะมีค่าสูงขึ้นด้วย (ปิยะบุตร โพธิคาม บำรุง (2554); Bragger *et al.* (1997))

2.8.8. ตัวกลางในปฏิกิริยารีดอกซ์ จากการศึกษาพบว่านอกจากพลังงานศักย์เพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีการกำจัดมากขึ้น ยังมีตัวกลางในปฏิกิริยารีดอกซ์ที่มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันด้วย (ปิยะบุตร โพธิคาม บำรุง (2554); Van Der Zee *et al.* (2001))

## 2.9. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดสีย้อมสิ่งทอ 24 สายพันธุ์ และได้แบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ซึ่งมีความสามารถในการกำจัดสีได้ดีที่สุด พร้อมทั้งศึกษาสภาวะที่เหมาะสม พบว่า *A. hydrophila* เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ แต่กำจัดสีได้ดีในสภาวะไม่มีอากาศหรือมีอากาศเพียงเล็กน้อย แบคทีเรียสามารถกำจัดสี RED RBN ( $\lambda_{\text{max}} = 518 \text{ nm}$ ) ได้ 90%

ภายในเวลา 8 วัน โดยมีความเข้มข้นสีเริ่มต้น 3000 mg/l ในสภาวะที่มี pH 5.5-10.0 อุณหภูมิ 20-35 °C และยังพบว่าแหล่งไนโตรเจน เช่น สารสกัดจากยีสต์ และ เปปโทน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสีได้ แต่แหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคสจะยับยั้งการกำจัดสี เพราะกลูโคสจะถูกสลายและเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์ ซึ่งมีผลทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่า pH ลดลงจะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และการกำจัดสีได้ (Chen *et al.*, 2003)

การศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดสี Acid Red 88 ( $\lambda_{max} = 505 \text{ nm}$ ) ระหว่างกลุ่มแบคทีเรีย (Bacterial consortium) เรียกรวมกันว่า HM-4 ซึ่งประกอบไปด้วย Bacillus 11 cereus (BN-7), Pseudomonas putida (BN-4), Pseudomonas fluorescence (BN-5) และ Stenotrophomonas acidaminiphila (BN-3) กับ แบคทีเรียเชื้อเดี่ยว (Individual culture) ผลปรากฏว่า HM-4 สามารถกำจัดสี Acid Red 88 ได้อย่างสมบูรณ์ ภายใน 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อเดี่ยวนั้นใช้เวลา 60 ชั่วโมง จึงสามารถกำจัดสีได้อย่างสมบูรณ์ และได้ศึกษาการกำจัดสีอื่นๆ อีก 5 ชนิด คือ Acid Red 88, Acid Red 119, Acid Red 97, Acid Blue 113 และ Reactive Red 120 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสามารถกำจัดสี ทั้ง 5 ชนิดได้ 78%, 99%, 94%, 99%, และ 82% ตามลำดับที่ความเข้มข้นของสีย้อมเริ่มต้น 60 mg/l ในอาหาร Mineral salts medium (MSM) ที่เติม 0.1% (w/v) ของกลูโคส และสารสกัดจากยีสต์ สามารถกำจัดสีได้ภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถกำจัดสีอย่างมีประสิทธิภาพของน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมสิ่งทอที่มีส่วนผสมของสีย้อมเอโซ (Khehra *et al.*, 2005)

การศึกษาการกำจัดสี Methyl orange ( $\lambda_{max} = 465 \text{ nm}$ ) แสดงให้เห็นว่า Kocuria rosea (MTCC 1532) สามารถกำจัดสี Methyl orange ได้ 100% (50 mg/l) ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่า มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดสีคือ 6.8 และ 30 °C ตามลำดับ Kocuria rosea (MTCC 1532) แสดงการกำจัดสี Methyl orange ได้สูงสุดที่มีสารสกัดจากยีสต์ เมื่อเทียบกับสารชนิดอื่นๆ ภายในเวลา 12 ชั่วโมง นอกจากนี้ การเหนี่ยวนำ reductases อย่างมีนัยสำคัญ (NADH-DCIP reductase และ Azoreductase) แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการกำจัดสี Methyl orange สารที่เกิดขึ้นหลังจากการกำจัดสี Methyl orange เช่น 4-amino sulfonic acid และ N, N'-dimethyl *p*-phenyldiamine มีลักษณะเฉพาะ ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้ FTIR และ MS การศึกษาความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์พบว่า สี Methyl orange เป็นพิษ และหลังจากการกำจัดสีสารที่ได้ไม่มีความเป็นพิษเมื่อทดสอบกับพืช (Triticum aestivum และ Phaseolus mungo) และแบคทีเรีย (K. rosea, Pseudomonas aurugenos และ Azatobacter vinelandii) (Parshetti *et al.*, 2010)

การศึกษาการกำจัดสีย้อม Orange II ( $\lambda_{max} = 486 \text{ nm}$ ) โดยใช้ Pseudomonas putida SKG-1 การลดสีสูงสุดของสีน้ำเสียที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 mg/l ที่ pH 8.0 อุณหภูมิ 30 °C และ



4% (v/v) ของหัวเชื้อภายใต้สภาวะคงที่ ภายใน 96 ชั่วโมง การเติมกลูโคส 0.4% (w/v) และ ammonium sulfate 0.1% (w/v) เพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำเสียได้สูงถึง 92.8% ภายใน 96 ชั่วโมง แบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีความทนทานต่อความเข้มข้นของสีย้อมได้ถึง 1000 mg/l การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นสีย้อมส่งผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและการกำจัดสี ภายใต้สภาวะเหมาะสม ประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำเสียที่ไม่ผ่านการกรองและไม่เติม *P. putida* สามารถกำจัดสีน้ำเสียได้เพียง 35.2% และพบว่าเมื่อเติม *P. putida* ประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำเสียเพิ่มขึ้นเป็น 41.3% และเพิ่มขึ้นมากถึง 50.2% เมื่อเติมกลูโคส และไม่มีการเติม ammonium sulfate และเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำเสียสูงถึง 69.5% ดังนั้น แสดงให้เห็นว่า *P. putida* มีศักยภาพในการกำจัดสีน้ำเสียจากอุตสาหกรรมสิ่งทอ (Garg *et al.*, 2012)

การศึกษาการแยกจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่จากตะกอนแม่น้ำที่ปนเปื้อนด้วยสีย้อมเอโซ ซึ่งสามารถย่อยสลาย Reactive black B (RBB;  $\lambda_{\max} = 559 \text{ nm}$ ) ได้ ซึ่งระบุว่าเป็นสายพันธุ์ *Bacillus cereus* HJ-1 โดยการวิเคราะห์ลำดับยีน 16S rRNA สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดสี RBB โดย *B. cereus* HJ-1 คือ 25 °C, pH 8.0, 1 CMC ของ triton X-100, 0.15 g/l ของสารสกัดจากยีสต์, 0.125 g/L ของกลูโคส ที่ความเข้มข้นที่ ( $EC_{50}$ ) ของ RBB 48 mg/L (98.1%) และพบว่าความเป็นพิษจะลดลงหลังจากการกำจัดสี (Liao *et al.*, 2013)

จากการแยกแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการกำจัดสีย้อมเอโซ Reactive Black ( $\lambda_{\max} = 595 \text{ nm}$ ) ในอาหารเหลว โดยแยกเชื้อแบคทีเรียจำนวน 74 สายพันธุ์ โดยใช้สีย้อมเอโซ Reactive Black เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนใน Mineral salt media พบว่า สายพันธุ์แบคทีเรียที่มีอัตราการกำจัดสีจะถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมเอโซ Reactive Black ในการเพาะเลี้ยงโดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกแล้วจำนวน 4 สายพันธุ์ สำหรับการกำจัดสีของ Reactive Black (250 mg/l) คือ pH 7.0 และอุณหภูมิ 32 °C เมื่อสารละลายสีย้อมเสริมด้วยสารสกัดจากยีสต์ 0.5% เป็นสารตั้งต้นร่วมจากสายพันธุ์ทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งมี 2 สายพันธุ์ คือ *Klebsiella oxytoca* ETL-1 และ *Bacillus subtilis* ETL-2 แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการกำจัดสี Reactive Black ความเข้มข้น 500 mg/l ภายใน 6 ชั่วโมง ในอาหารเหลว (Shah *et al.*, 2013)

การศึกษาแยกกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายสีย้อมเอโซ จากตัวอย่างดินในสภาพแวดล้อมที่มีเกลือ และทดสอบการกำจัดสีของสีย้อมเอโซ Direct Blue 151 (DB 151;  $\lambda_{\max} = 600 \text{ nm}$ ) และ Direct Red 31 (DR 31;  $\lambda_{\max} = 484 \text{ nm}$ ) โดยที่ความเข้มข้นของสีย้อม 200 mg/l กลุ่มแบคทีเรียสามารถกำจัดสีย้อม DB 151 และ DR 31 ได้ถึง 97.57% และ 95.25% ภายในเวลา 5 วัน ตามลำดับ การทดสอบมีการปรับสภาวะการเจริญให้เหมาะสมสำหรับกลุ่มแบคทีเรีย คือ ค่า pH 9.5,

อุณหภูมิ 36 °C โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน จากการแยกกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายสีย้อม *Bacillus cereus* เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีมากที่สุดถึง 93.37% (Lalnunhlimi & Krishnaswamy, 2016)

การศึกษาการกำจัดสีและกำจัดสารพิษของสี Congo red ( $\lambda_{\max} = 490 \text{ nm}$ ) โดยใช้ *Shewanella oneidensis* MR-1 จากการศึกษาผลของปัจจัยที่มีต่อการกำจัดสีแบบไม่มีอากาศพบว่า ช่วง pH อุณหภูมิ และความเข้มข้นของ sodium chloride ที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดสีคือ 6.0–8.5, 28–40 °C และ 0–20 g/L ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ซึ่งมีประสิทธิภาพการกำจัดสีสูงสุด 99.25% ที่ความเข้มข้นสี Congo red 2 g/L ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และพบว่า Nitrite, Nitrate และ Oxygen สามารถยับยั้งการกำจัดสีได้ นอกจากนี้การเติม Riboflavin และ Methylene blue สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสีโดย *S. oneidensis* MR-1 เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อพืช (*Triticum aestivum*, *Pogostemon cablin* และ *Isatis indigotica*) พบว่าสี Congo red หลังกระบวนการกำจัดสีไม่เป็นพิษต่อพืช (Liu *et al.*, 2016)

การศึกษาแบคทีเรียที่กำจัดสีย้อมเอโซจากสิ่งทอที่คัดแยกจากทะเลสาบที่เป็นต่าง ได้แก่ ทะเลสาบ Abaya และทะเลสาบ Chamo โดยใช้สีย้อม Reactive Red 239 (RR 239;  $\lambda_{\max} = 541 \text{ nm}$ ) โดยจากการใช้กระบวนการคัดเลือก แบคทีเรียสายพันธุ์ CH12 ในการศึกษาปัจจัยของสารอาหารที่เติม, ค่า DO, pH, อุณหภูมิ, ความเข้มข้นของสีย้อม และชนิดของสีย้อมในการกำจัดสี โดยเมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับยีน 16S rRNA พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ CH12 คือ *Bacillus sp.* ประสิทธิภาพในการกำจัดสีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอน ( $\geq 98\%$ ) และไนโตรเจนอินทรีย์ ( $\sim 100\%$ ) และพบว่า สามารถกำจัดสีได้อย่างสมบูรณ์ภายใต้สภาวะ Anoxic และสภาวะ Anaerobic ที่อุณหภูมิ 30 °C และ pH 10.0 อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพในการกำจัดสีของแบคทีเรียสายพันธุ์ CH12 นั้นจะถูกยับยั้งเมื่อเติม sodium nitrate (1-8%) และในสภาวะที่มีอากาศ ( $\leq 6\%$ ) ดังนั้น แบคทีเรียสายพันธุ์ CH12 สามารถใช้ในการกำจัดสีย้อม RR239 ได้ที่ความเข้มข้น 50 - 250 g/L และสีอื่นๆ อีก 6 ชนิด (Guadie *et al.*, 2017)

การศึกษาการกำจัดสีย้อม Sudan I ( $\lambda_{\max} = 490 \text{ nm}$ ) โดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Shewanella putrefaciens* CN32 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน และปัจจัยที่มีผลต่อการกำจัดสีที่เหมาะสม พบว่า ค่า pH อุณหภูมิ และความเข้มข้นของ sodium chloride ที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดสีคือ 7.0-8.0, 26°C และ 0-20 g/L ตามลำดับ พบว่า biosurfactant rhamnolipid สามารถปรับปรุงการลดสีของ Sudan I ได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ การเลี้ยงร่วมกันของ *Shewanella putrefaciens* CN32 กับ *Bacillus circulans* BWL1061 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีได้ 90.23% ภายใน 108 ชั่วโมง ซึ่งบ่งชี้ว่าการเพาะเลี้ยงร่วมกันเป็นเทคนิคมีศักยภาพที่ดีในการบำบัด

น้ำเสียสีย้อม ยิ่งไปกว่านั้นการทดสอบความเป็นพิษของจุลินทรีย์ระบุว่าเป็นพิษของ Sudan I ต่อ *Escherichia coli* BL21 และ *Bacillus subtilis* 168 ลดลงอย่างเห็นได้ชัด หลังจากกระบวนการกำจัดสี (Liu *et al.*, 2018)

การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของสีย้อม Crystal violet ( $\lambda_{\max} = 590 \text{ nm}$ ) โดยลิกนินโกลติกซึ่งผลิตได้จากแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเสียสิ่งทอระบุว่าเป็น *Aeromonas hydrophila* ตามการวิเคราะห์ลำดับยีน 16 S rRNA และจากผลการวิจัยพบว่า แบคทีเรียที่แยกได้มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีย้อม Crystal violet ได้ถึง 99% ที่ pH 7.0 และอุณหภูมิ 35 °C เมื่อมีซูโครสและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ แบคทีเรียนี้ยังผลิตลิกนินเปอร็อกซิเดสและแลคเคส นอกจากนี้ การวิเคราะห์ GC-MS พบว่าสีย้อม Crystal violet ถูกเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ phenol, 2, 6-bis (1,1 dimethylethyl), 2',6'-dihydroxy acetophenone และ Benzene ซึ่งพบว่าความเป็นพิษของสีย้อม Crystal violet ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบความเป็นพิษที่มีต่อพืชพบว่าการยับยั้งการงอกของเมล็ดถึง 60%, 56.67% และ 46.67% แต่หลังจากการย่อยสลาย/การกำจัดสีโดยแบคทีเรีย พบว่าการยับยั้งการงอกของเมล็ดเพียง 43.33%, 36.67% และ 16.67% ตามลำดับ หลังจาก 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้น จากการศึกษาจึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียที่แยกได้มีศักยภาพสูงในการย่อยสลาย/การกำจัดสีย้อม Crystal violet รวมถึงการลดความเป็นพิษของสีย้อมได้อย่างมีนัยสำคัญ (Bharagava *et al.*, 2018)

การศึกษาการกำจัดสีและการย่อยสลายของสีย้อม Methyl orange โดย *Bacillus stratosphericus* SCA1007 พบว่า *Bacillus stratosphericus* SCA1007 สามารถกำจัดสี Methyl orange ( $\lambda_{\max} = 460 \text{ nm}$ ) ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 150 mg/l ที่อุณหภูมิ 35 °C และ pH 7.0 ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่าในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์ และเป็นการศึกษาครั้งแรกที่แสดงให้เห็นว่า *Bacillus stratosphericus* SCA1007 สามารถกำจัดสีย้อม Methyl orange ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ภายใน 12 ชั่วโมง และในการทดสอบความเป็นพิษของสีย้อมใน *Escherichia coli* และ *Vigna radiata* พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายสีย้อมไม่เป็นพิษต่อแบคทีเรียและพืช (Akansha *et al.*, 2019)

การศึกษาการกำจัดสีและการย่อยสลายสีย้อม Reactive yellow 145 (RY145;  $\lambda_{\max} = 415 \text{ nm}$ ) โดยเพาะเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* (RS1) และ *Thiosphaera pantotropha* ATCC 35512 ใน nutrient broth ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่า พบว่าสามารถกำจัดสี RY145 ได้



อย่างสมบูรณ์ภายใน 96 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีการเขย่าพบว่าสามารถกำจัดสีได้เพียง 50% ใน 96 ชั่วโมง การกำจัดสีภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่าและตามด้วยสภาวะที่มีการเขย่าสามารถกำจัดสีได้อย่างสมบูรณ์ และเกิดกระบวนการ mineralization ได้ 65% ในเวลา 96 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม กระบวนการ mineralization ของสีย้อมใน *Pseudomonas aeruginosa* และ *Thiosphaera pantotropha* ถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นของสีย้อมที่ 100 mg/l และ 50 mg/L ตามลำดับ และถึงแม้จะมีการเติมสีย้อมอีกครั้ง จุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์ก็ยังคงความสามารถกำจัดสีย้อมได้ และพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ใน Mineral Media (MM) สามารถกำจัดสีย้อม RY145 ได้ถึง 54% และใน Mineral Media (MM) ที่เติมเปปไทน์ (400 mg/L) ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่าที่ pH 7.0 สามารถกำจัดสีได้อย่างสมบูรณ์ (Garg *et al.*, 2020)

การแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่จากสถานที่กำจัดขยะจากสีย้อมของอุตสาหกรรมสิ่งทอใน Tirupur พบว่า *Bacillus subtilis* โดยระบุจากการจัดลำดับ 16S rRNA สามารถกำจัดสีและย่อยสลายสีย้อม Reactive Blue 160 ( $\lambda_{max} = 630 \text{ nm}$ ) ภายใต้สภาวะการทดลองทางเคมีและทางกายภาพที่แตกต่างกัน (pH, อุณหภูมิ, การเขย่า, การไม่เขย่า) และพบว่า สามารถกำจัดสีได้สมบูรณ์ที่ pH 7.0 และ 35 °C ภายใต้สภาวะการเขย่า ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งในกระบวนการกำจัดสีแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์หลายชนิด เช่น ลิกนินเปอร์ออกซิเดส, เอโซติคอกเทส และ NADH-DCI ซึ่งจะกำจัดสีและย่อยสลายสีย้อม Reactive Blue 160 อย่างมีนัยสำคัญ ในการศึกษาความเป็นพิษที่มีผลต่อพืชและจุลินทรีย์พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการกำจัดสีและย่อยสลายสีย้อม Reactive Blue 160 ไม่เป็นพิษต่อพืชและจุลินทรีย์ ดังนั้น สรุปได้ว่า *Bacillus subtilis* สามารถนำไปใช้ในการบำบัดสีย้อม Reactive Blue 160 ทางชีวภาพได้ในอนาคต (Barathi *et al.*, 2020)

การศึกษากำจัดสีย้อม Methyl orange ( $\lambda_{max} = 464 \text{ nm}$ ) พบว่า *Pseudomonas aeruginosa* MZ520730 โดยระบุจากการจัดลำดับ 16S rRNA มีประสิทธิภาพการกำจัดสีสูงสุด 99% ที่ความเข้มข้นสีเริ่มต้น 100 mg/l และสามารถลด TOC (Total organic carbon) ได้ถึง 96% ภายใน 12 ชั่วโมง ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สภาวะคงที่ และยังพบว่า *Pseudomonas aeruginosa* MZ520730 ผลิตแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล ~53 kDa ด้วยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE นอกจากนี้การวิเคราะห์ LC-MS แสดงให้เห็นว่าสีย้อม Methyl orange ถูกย่อยสลายเป็น 4-[(4-aminophenyl) diazenyl] benzene sulfonate, 4, 2-((dihy-

droxymethyl) hyrazono-4) 5-benzene sulfonate, 4-(triazan-2-yl) benzene sulfonic, น้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) เมื่อความเป็นพิษต่อพืชแสดงให้เห็นว่าสารละลายที่บำบัดโดย แบคทีเรียทำให้เมล็ดงอกได้ถึง 90% ซึ่งบ่งชี้ว่า *Pseudomonas aeruginosa* MZ520730 มี ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีย้อม Methyl orange ที่เป็นพิษให้กลายเป็นสารที่ไม่เป็นพิษและ สามารถใช้อย่างมีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม (Kishor, Purchase, Saratale, Ferreira, Hussain, *et al.*, 2021)

การศึกษาการกำจัดสีและการย่อยสลายสีย้อม Methyl orange ( $\lambda_{\max} = 466 \text{ nm}$ ) โดย *Aeromonas hydrophila* ซึ่งแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเสียสิ่งทอซึ่งพบว่า *Aeromonas hydrophila* สามารถกำจัดสีได้สูงสุดประมาณ 85% ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับ กระบวนการกำจัดสี คือ ที่ความเข้มข้นของสีย้อม Methyl orange 20 mg/l, pH 7.0 และอุณหภูมิ 35 °C และพบว่ามีจุลินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ เปปโตนซึ่งสามารถกำจัดสีได้ดีกว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็น meat extract (Velusamy *et al.*, 2022) สรุปผลการศึกษการใช้จุลินทรีย์กำจัดสีย้อม แสดงดังตารางที่ 2



ตารางที่ 2 สรุปผลการศึกษารหัสจุลินทรีย์กำจัดสีย้อม

จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษา	สีย้อมที่ใช้	สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดสีย้อม			ประสิทธิภาพการกำจัด (%)	เอกสารอ้างอิง
		แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	pH อุณหภูมิ (°C)		
<i>Aeromonas hydrophila</i>	RED RBN (3000 mg/l; $\lambda_{max} = 559$ nm)	glucose	yeast extract และ peptone	5.5-6.0 20-35	90 (8 d)	(Chen <i>et al.</i> , 2003)
กลุ่มแบคทีเรีย HM-4	Acid Red 88 (20 mg/l; $\lambda_{max} = 505$ nm)	glucose	yeast extract	7.0 35	100 (24 h)	(Khehra <i>et al.</i> , 2005)
<i>Kocuria rosea</i> (MTCC 1532)	Methyl orange (50 mg/l; $\lambda_{max} = 460$ nm)	glucose	yeast extract	6.8 30	100 (12 h)	(Parshetti <i>et al.</i> , 2010)
<i>Pseudomonas putida</i> SKG-1	Orange II (100 mg/l; $\lambda_{max} = 486$ nm)	glucose	NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	8.0 30	92.8 (96 h)	(Garg <i>et al.</i> , 2012)
กลุ่มแบคทีเรีย ( <i>Bacillus cereus</i> )	Direct Blue151 (200 mg/l; $\lambda_{max} = 560$ nm)	sucrose	yeast extract	9.5 36	97.57% (5 d)	(Lalnunhlimi & Krishswany, 2016)

ตารางที่ 2 สรุปผลการศึกษารหัสจุลินทรีย์กำจัดสีย้อม (ต่อ)

จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษา	สีย้อมที่ใช้	สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดสีย้อม			ประสิทธิภาพการกำจัด (%)	เอกสารอ้างอิง
		แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	pH อุณหภูมิ (°C)		
	Direct Red 31 (200 mg/l; $\lambda_{\max} = 484 \text{ nm}$ )				95.25% (5 d)	
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Congo red (2000 mg/l; $\lambda_{\max} = 490 \text{ nm}$ )	-	yeast extract	6.0-8.5 28-40	99.25 (24 h)	(Liu et al., 2016)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Reactive yellow 145	sucrose	peptone	7.0 37	100 (96 h)	(Garg et al., 2020)
<i>Thiophane pantotropha</i>	(50 mg/l; $\lambda_{\max} = 415 \text{ nm}$ )				50 (96 h)	
<i>Klebsiella oxytoca</i> ETL-1 และ <i>Bacillus subtilis</i> ETL-2	Reactive Black (500 mg/l; $\lambda_{\max} = 595 \text{ nm}$ )	-	yeast extract	7.0 32	100 (6h)	(Shah et al., 2013)
<i>Bacillus cereus</i> HJ-1	Reactive Black B (500 mg/l; $\lambda_{\max} = 595 \text{ nm}$ )	glucose	yeast extract	8.0 25	98.1 (96 h)	(Liao et al., 2013)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Crystal violet (100 mg/l; $\lambda_{\max} = 590 \text{ nm}$ )	sucrose	yeast extract	7.0 35	99 (96 h)	(Bharagava et al., 2018)

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1. เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

##### 3.1.1. เครื่องมือ

ชื่อเครื่องมือ	ชื่อบริษัท
1. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น ME2002E	METTLER TOLEDO, Thailand
2. เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น ME204E	METTLER TOLEDO, Thailand
3. ตู้ Laminar flow	NUAIRE, Minnesota, USA
4. เครื่องผลิตน้ำกลั่น รุ่น Maxima LS. Model	ELGA, UK
5. Autoclave รุ่น Ss-325	Tomy, Japan
6. Autoclave รุ่น Ss-700	Tomy, Japan
7. Auto pipette	SCIOGEX, USA
8. Centrifuge (Z36HK)	HERMLE, Germany
9. Centrifuge	SCIOGEX, USA
10. Hot air oven Model ULM 500	Memmert, Germany
11. Hot plate & Magnetic stirrer รุ่น MSH-20A	Vision Scientific, England
12. Incubator	Pol-Eko Aparatura, Thailand
13. Microcentrifuge รุ่น Microfuge16	Beckman-Coulter, Germany
14. Microplate reader รุ่น Infinite F50	Tecan, Austria
15. pH meter	METTLER TOLEDO, Thailand
16. Shaking incubator รุ่น JSSI-300C	JS RESEARCH INC, South Korea
17. Spectrophotometer รุ่น GENESYS10S UV-Vis	Thermo Fisher Scientific, USA
18. Thermomixer	Eppendorf, Germany
19. Thermoreactor รุ่น RD 125	Lovibond, Germany
20. Ultrasonicator	Fisher, USA
21. Vortex	Scientific Industries, USA
22. Water testing photometer รุ่น MD 600	Lovibond, Germany

### 3.1.2. อุปกรณ์

1. กระจกฉีดยาแอลกอฮอล์
2. กระจกตวง
3. ขวดน้ำกลั่น
4. ขวดรูปชมพู่
5. จานเพาะเชื้อ
6. ไชริงค์ฉีดยาพลาสติก
7. ตะเกียงแอลกอฮอล์
8. ถังพลาสติกใส/ยาง
9. แห้งแก้ว
10. ปีกเกอร์
11. ผ้าเช็ดโต๊ะ/กระดาษทิชชู
12. ไฟแช็ก
13. สำลี
14. หลอดทดลอง
15. อลูมิเนียมฟอยล์
16. Centrifuge tube
17. Duran
18. Eppendorf tube
19. Minisart filters
20. Loop
21. Rack
22. Pipette tip

### 3.1.3. สารเคมี

1. Agar (Bio Agars)
2. Ammonium Nitrate ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )
3. Congo red ( $\text{C}_{32}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{Na}_2\text{O}_6\text{S}_2$ )
4. Glucose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )
5. Guaiacol (Sigma-Aldrich, USA)
6. Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Chem-Supply Pty Ltd, Australia)

7. Iron (II) sulfate heptahydrate ( $\text{FeSO}_4$ ) (Sigma-Aldrich, USA)
8. Manganese (II) sulfate monohydrate ( $\text{MnSO}_4$ ) (Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
9. Magnesium sulfate ( $\text{MgSO}_4$ ) (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Germany)
10. Monopotassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (RCI Labscan Limited)
11. Peptone (Sisco Research Laboratories, India)
12. Potassium phosphate, dibasic ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
13. Sucrose ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ )
14. Starch
15. Sodium acetate ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India)
16. Tris (Amresco)
17. yeast extract
18. Zinc sulphate ( $\text{ZnSO}_4$ ) (RCI Labscan, Thailand)
19. 2,6-Dimethoxyphenol (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Germany)
20. 3,4-Dimethoxybenzyl alcohol (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Germany)

### 3.2. วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.2.1. จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษา

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาคือจุลินทรีย์ Bacillus sp. FN1 และ Bacillus sp. FN2 ที่คัดแยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ (ภาพที่ 5) (จิระนนท์ สินทร, 2561)





ภาพที่ 5 ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. FN1 (A) และ *Bacillus* sp. FN2 (B) บนอาหารแข็งที่มี Guaiacol (0.02 v/v) บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

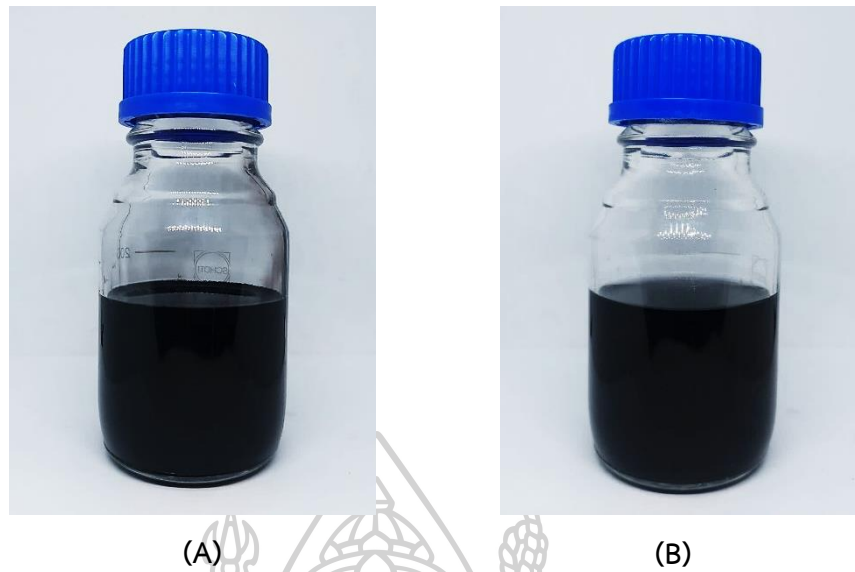


ภาพที่ 6 แสดงลักษณะเซลล์ของจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. FN1 (A) และ *Bacillus* sp. FN2 (B) จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 55,000 เท่า

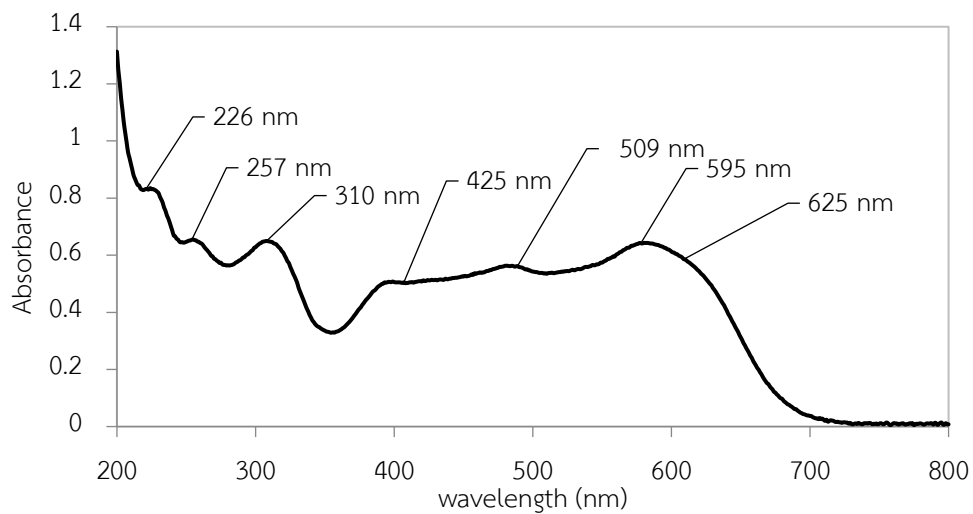
### 3.2.2. ตัวอย่างน้ำเสีย

น้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอของบริษัท โนเบิลเท็กซ์การย้อม จำกัด (ภาพที่ 7) ตั้งอยู่ที่ 234 หมู่ 14 ถนนเพชรเกษม ตำบลไร่ชิง อำเภอสสามพราน จังหวัดนครปฐม 73210





ภาพที่ 7 สีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอที่ไม่เจือจาง (A) และสีน้ำเสียจากโรงงานสิ่งทอที่ระดับการเจือจาง 1000 เท่า (B)



ภาพที่ 8 UV-Vis spectrum ของสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอที่ระดับเจือจาง 1000 เท่า โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

### 3.2.3. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ผลิตแลคเคสที่คัดแยกได้

การเตรียมกล้าเชื้อ โดยเชื้อโคโลนีที่มีสีชมพู-น้ำตาลแดงจากอาหารแข็ง Production agar ที่มี 0.02% (v/v) Guaiacol 1 โคโลนี ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว LB broth 5 ml เพาะเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อทั้งหมดจาก

หลอดทดลอง (5 ml) ลงในอาหาร Production medium มีองค์ประกอบดังนี้ (g/l) 3.0 peptone, 10 glucose, 0.6 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.001 ZnSO<sub>4</sub>, 0.4 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.0005 FeSO<sub>4</sub>, 0.05 MnSO<sub>4</sub>, 0.5 MgSO<sub>4</sub> และ 0.02% Guaiacol ปริมาตร 45 ml เพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

### 3.2.4. การวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์

การวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ แลคเคส (Lac) ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส (LiP) แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (MnP) และเอโซรีดักเทส (Azoreductase) โดยใช้ สับสเตรท 4 ชนิด ได้แก่ DMP (2,6-Dimethoxyphenol, Sigma), Veratryl alcohol (3,4-Dimethoxybenzyl alcohol, Sigma), Manganese sulfate (MnSO<sub>4</sub>) และ Congo red ตามลำดับ สามารถเตรียม Assay mixture (control, inactive และ active) โดยเติมสารต่างๆ ในการทดสอบดังที่แสดงในตารางที่ 3 - 6

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของ reaction mixture สำหรับการวิเคราะห์แลคเคสที่ความยาวคลื่น 468 nm โดยใช้ DMP (2,6-Dimethoxyphenol) เป็น substrate (2 mM 2,6-dimethoxyphenol in 10% absolute alcohol in 25 mM Tris-Hydrochloric buffer pH 9.0) ( $\epsilon_{468} = 14,800 \text{ M}^{-1}\text{CM}^{-1}$ ) โดยดัดแปลงจาก Wariishi *et al.* (1992)

Assay mixture	ปริมาณ (µl)		
	Enzyme	Substrate	Buffer
Control	-	200	50
Inactive (วัดทันที)	50	200	-
Active	50	200	-

Buffer หมายถึง 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 บ่ม Assay mixture ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 468 nm

คำนวณกัมมันตภาพแลคเคสจากสมการ (1)

$$\text{ค่ากัมมันตภาพแลคเคสจากสมการ (U/L)} = \frac{(\text{Active} - \text{Inactive}) \times 10^6}{(14,800 \times 30 \times 0.05)} \times \text{Dilution factor} \quad (1)$$

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (Unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DMP 1  $\mu\text{mol}$  ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 468 nm เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของ reaction mixture สำหรับการวิเคราะห์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส ที่ความยาวคลื่น 310 nm โดยใช้ Veratryl alcohol (3,4-Dimethoxybenzyl alcohol) เป็น substrate (10 mM 3,4-Dimethoxybenzyl alcohol in 25mM Glycine-Sodium hydroxide buffer pH 10.0) ( $\epsilon_{310} = 9,300 \text{ M}^{-1}\text{CM}^{-1}$ ) โดยดัดแปลงจาก Tien and Kirk (1988) และ Albarrán-Velo *et al.* (2017)

Assay mixture	ปริมาตร ( $\mu\text{l}$ )			
	Enzyme	Substrate	Buffer	2 mM $\text{H}_2\text{O}_2$ in buffer
Control	-	200	600	200
Inactive (วัดทันที)	200	200	400	200
Active	200	200	400	200

Buffer หมายถึง 25 mM Glycine-Sodium hydroxide buffer pH 10 ป่ม Assay mixture ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 nm คำนวณกัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากสมการ (2)

$$\text{ค่ากัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (U/L)} = \frac{(\text{Active} - \text{Inactive}) \times 10^6}{(9,300 \times 30 \times 0.2)} \times \text{Dilution factor} \quad (2)$$

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (Unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Veratryl alcohol 1  $\mu\text{mol}$  ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 nm เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของ reaction mixture สำหรับการวิเคราะห์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ความยาวคลื่น 270 nm โดยใช้ Manganese sulfate ( $\text{MnSO}_4$ ) เป็น substrate (10 mM  $\text{MnSO}_4$  in 100 mM Sodium malate buffer pH 6.0) ( $\epsilon_{270} = 11,590 \text{ M}^{-1}\text{CM}^{-1}$ ) โดยดัดแปลงจาก Wariishi *et al.* (1992) และ Chi and Yan (2009)

Assay mixture	ปริมาณ (μl)			
	Enzyme	Substrate	Buffer	2 mM $\text{H}_2\text{O}_2$ in buffer
Control	-	100	600	200
Inactive (วัดทันที)	100	100	500	200
Active	100	100	500	200

Buffer หมายถึง 100 mM Sodium malate buffer pH 6.0 บ่ม Assay mixture ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 270 nm  
คำนวณกัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากสมการ (3)

$$\text{ค่ากัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (U/L)} = \frac{(\text{Active} - \text{Inactive}) \times 10^6}{(11,592 \times 30 \times 0.1)} \times \text{Dilution factor} \quad (3)$$

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (Unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ  $\text{MnSO}_4$  1 μmol ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 270 nm เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม ภายในเวลา 1 min ภายใต้สภาวะที่กำหนด

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของ reaction mixture สำหรับการวิเคราะห์เอโซรีดักเทสที่ความยาวคลื่น 492 nm โดยใช้ Congo red เป็น substrate (40 mM Congo red in 25 mM Tris-Hydrochloric buffer pH 7.0) ( $\epsilon_{492} = 33,000 \text{ M}^{-1}\text{CM}^{-1}$ ) โดยดัดแปลงจาก Zimmermann *et al.* (1982) และ Leelakriangsak and Borisut (2012)

Assay mixture	ปริมาณ (µl)			
	Enzyme	Substrate	Buffer	40 mM NADH in buffer
Control	-	100	50	50
Inactive (วัดทันที)	50	100	-	50
Active	50	100	-	50

Buffer หมายถึง 25 mM Tris-Hydrochloric buffer pH 7.0 บ่ม Assay mixture ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm  
คำนวณกัมมันตภาพเอโซรีดักเทสจากสมการ (4)

$$\text{ค่ากัมมันตภาพเอโซรีดักเทส (U/L)} = \frac{(\text{Inactive} - \text{Active}) \times 10^6}{(33,000 \times 30 \times 0.05)} \times \text{Dilution factor} \quad (4)$$

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (Unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของ Congo red 1 µmol ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

### 3.2.5. การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ

ทดสอบการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอจะวิเคราะห์ประสิทธิภาพการกำจัดสีโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นและสุดท้ายของปฏิกิริยาสารผสมโดยวิธี UV-Vis spectrometry  
คำนวณประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอโดยใช้จูลินทรีย์จากสมการ (5)

$$\% \text{Decolorization} = \frac{A_0 - A_f}{A_0} \times \text{Dilution factor} \quad (5)$$

โดยที่  $A_0$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น

$A_f$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงสุดท้าย

### 3.2.6. การทดสอบปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ

#### 1. การศึกษาสภาวะที่มีการเขย่าและไม่มีการเขย่าต่อการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ

นำกล้าเชื้อ 10 ml ของ *Bacillus* sp. FN1 และ FN2 ที่ค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับ  $0.7 \pm 0.05$  ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ (production medium) ที่ pH 7.0 ปริมาตร 80 ml และสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ความเข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 10 ml โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุด ได้แก่ 1.) เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า (Static) 2.) เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า ตามด้วยสภาวะที่มีการเขย่าที่ 150 rpm (Static to shaking) 3.) เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่า (Shaking) และ 4.) เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่า ตามด้วยสภาวะที่ไม่มีการเขย่า (Shaking to static) โดยเปลี่ยนสภาวะเมื่อครบ 48 h บ่มที่อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  และเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm เก็บผลทุกๆ 12 ชั่วโมง ปริมาตร 5 ml จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำของเหลวเหนือตะกอน 1 ml ใส่ลงในควิเวทท์ที่สะอาดและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200 - 800 nm ทั้งเริ่มต้น และสุดท้าย นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ ตัวอย่างที่เหลือนำมาวัดค่า pH และวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ ส่วนตะกอนเซลล์ล้างด้วย 20% (v/v) acetone จนตะกอนเซลล์ไม่มีสี แล้วนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 nm แล้วนำสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอไปใช้ในการทดลองต่อไป

#### 2. การศึกษาอัตราส่วนของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ

นำกล้าเชื้อ 10 ml ที่อัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ FN2 ในอัตราส่วน 2:1, 1:1 และ 1:2 ตามลำดับ ที่ค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับ  $0.7 \pm 0.05$  ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ (production medium) ที่ pH 7.0 ปริมาตร 80 ml และสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ความเข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 10 ml แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะการใช้อากาศที่เหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  เก็บผลทุกๆ 12 ชั่วโมง ปริมาตร 5 ml จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำของเหลวเหนือตะกอน 1 ml ใส่ลงในควิเวทท์ที่สะอาดและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200 - 800 nm



ทั้งเริ่มต้นและสุดท้าย นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ ตัวอย่างที่เหลือนำมาวัดค่า pH และวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ ส่วนตะกอนเซลล์ล้างด้วย 20% (v/v) acetone จนตะกอนเซลล์ไม่มีสี แล้วนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 nm แล้วนำอัตราส่วนจุลินทรีย์ผสมที่เหมาะสมในการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอไปใช้ในการทดลองต่อไป

### 3. การศึกษาชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น (1% w/v) กลูโคส ซูโครส และแป้ง และมีแหล่งไนโตรเจนเป็น (0.3% w/v) peptone ปริมาตร 80 ml ผสมกับกล้ำเชื้อ 10 ml ที่อัตราส่วนจุลินทรีย์ผสมที่เหมาะสม ที่ค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับ  $0.7 \pm 0.05$  ที่ pH 7.0 และความเข้มข้นของสีย้อมเริ่มต้นที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 เท่า ปริมาตร 10 ml แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะการใช้อากาศที่เหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เก็บผลทุกๆ 12 ชั่วโมง ปริมาตร 5 ml จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำของเหลวเหนือตะกอน 1 ml ใส่ลงในคิวเวทท์ที่สะอาด และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200 - 800 nm ทั้งเริ่มต้นและสุดท้าย นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ ตัวอย่างที่เหลือนำมาวัดค่า pH และวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ ส่วนตะกอนเซลล์ล้างด้วย 20% (v/v) acetone จนตะกอนเซลล์ไม่มีสี แล้วนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 nm แล้วนำชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ในการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอไปใช้ในการทดลองต่อไป

### 4. การศึกษาชนิดแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็น (0.3% w/v) เปปโทน สารสกัดจากยีสต์ แอมโมเนียมไนเตรท ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) และ แอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) โดยมีชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ปริมาตร 80 ml ผสมกับกล้ำเชื้อ 10 ml ที่อัตราส่วนจุลินทรีย์ผสมที่เหมาะสม ที่ค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับ  $0.7 \pm 0.05$  ที่ pH 7.0 และความเข้มข้นของสีย้อมเริ่มต้นที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 เท่า ปริมาตร 10 ml แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะการใช้อากาศที่เหมาะสม อุณหภูมิที่เหมาะสม เก็บผลทุกๆ 12 ชั่วโมง ปริมาตร 5 ml จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำของเหลวเหนือตะกอน 1 ml ใส่ลงในคิวเวทท์ที่สะอาด และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200 - 800 nm ทั้งเริ่มต้นและสุดท้าย นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ ตัวอย่างที่เหลือนำมาวัดค่า pH และวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ ส่วนตะกอนเซลล์ล้างด้วย 20% (v/v) acetone จนตะกอนเซลล์ไม่มีสี แล้วนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 nm แล้วนำปริมาณของแหล่งไนโตรที่เหมาะสมในการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอไปใช้ในการทดลองต่อไป



## 5. การศึกษาอัตราส่วนของปริมาณแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ

การศึกษาอัตราส่วนปริมาณแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจะศึกษาโดยเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม (1% w/v) ต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่เป็นสารอินทรีย์ (0.3% w/v) ต่อ แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่เป็นสารอนินทรีย์ (0.3% w/v) ที่อัตราส่วนต่างๆ (C:N:N) ได้แก่ 0:1:1, 1:1:1, 2:1:1, 1:2:1 และ 1:1:2 จะคิดปริมาณเป็นสองเท่าจากปริมาณที่ใช้ในสูตรอาหารปกติ จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่อัตราส่วนแตกต่างกัน ปริมาตร 80 ml ผสมกับกล้าเชื้อ 10 ml ที่อัตราส่วนจุลินทรีย์ผสมที่เหมาะสม ค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับ  $0.7 \pm 0.05$  ที่ pH 7.0 และความเข้มข้นของสีย้อมเริ่มต้นที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 เท่า ปริมาตร 10 ml แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะการใช้อากาศที่เหมาะสม อุณหภูมิ 37 °C เก็บผลทุกๆ 12 ชั่วโมง ปริมาตร 5 ml จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำของเหลวเหนือตะกอน 1 ml ใส่ลงในคิวเวทท์ที่สะอาด และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200 - 800 nm ทั้งเริ่มต้นและสุดท้าย นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ ตัวอย่างที่เหลือนำมาวัดค่า pH และวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์ (Extracellular) ส่วนตะกอนเซลล์แบ่ง 1 ml ล้างด้วย 20% (v/v) acetone จนตะกอนเซลล์ไม่มีสี แล้วนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 nm ตะกอนเซลล์ที่เหลือ (4 ml) นำมาละลายด้วย 25 mM Tris-Hydrochloric buffer pH 7.0 นำตะกอนเซลล์ไปแตกเซลล์ด้วยเครื่องสลายเซลล์ด้วยความถี่สูง (Ultrasonic) ที่อุณหภูมิ 5 °C แอมพลิจูด 25% และ pulser on 5 วินาที, pulser off 10 วินาที เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำตัวอย่างละ 2 รอบ ดัดแปลงจากวิธีของ Zhang *et al.* (2011) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อแยกส่วนใสออกจากเศษเซลล์ จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ภายในเซลล์ (Intracellular) จากนั้นอัตราส่วนปริมาณแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอไปใช้ในการทดลองต่อไป

## 6. การศึกษา pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ

นำกล้าเชื้อ 10 ml ที่อัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ FN2 ในอัตราส่วนที่เหมาะสม โดยค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับ  $0.7 \pm 0.05$  ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดและอัตราส่วนปริมาณแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมปริมาตร 80 ml ที่ pH เริ่มต้นของอาหารที่แตกต่างกัน ได้แก่ 5.0, 7.0 และ 9.0 และสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ความเข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 10 ml แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะการใช้อากาศ

ที่เหมาะสม อุณหภูมิ 37 °C เก็บผลทุกๆ 12 ชั่วโมง ปริมาตร 5 ml จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำของเหลวเหนือตะกอน 1 ml ใส่ลงในคิวเวทท์ที่สะอาดและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200 - 800 nm ทั้งเริ่มต้น และสุดท้าย นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ ตัวอย่างที่เหลือนำมาวัดค่า pH และวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์ (Extracellular) ส่วนตะกอนเซลล์แบ่ง 1 ml ล้างด้วย 20% (v/v) acetone จนตะกอนเซลล์ไม่มีสี แล้วนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 nm ตะกอนเซลล์ที่เหลือ (4 ml) นำมาละลายด้วย 25 mM Tris- Hydrochloric buffer pH 7.0 จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกตามวิธีข้างต้นที่ได้กล่าวไปในข้อ 5. แล้วเก็บส่วนใสสำหรับการวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ภายในเซลล์ (Intracellular) ค่า pH ที่เหมาะสมในการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอไปใช้ในการทดลองต่อไป

#### 7. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ

นำกล้าเชื้อ 10 ml ที่อัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ FN2 ในอัตราส่วนที่เหมาะสม โดยค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับ  $0.7 \pm 0.05$  ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดและอัตราส่วนปริมาณแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ปริมาตร 80 ml ที่ pH ที่เหมาะสม และสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ความเข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 10 ml แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะการใช้อากาศที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ได้แก่ 37, 40 และ 45 °C เก็บผลทุกๆ 12 ชั่วโมง ปริมาตร 5 ml จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำของเหลวเหนือตะกอน 1 ml ใส่ลงในคิวเวทท์ที่สะอาดและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 200 - 800 nm ทั้งเริ่มต้น และสุดท้าย นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณประสิทธิภาพ การกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ ตัวอย่างที่เหลือนำมาวัดค่า pH และวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์ (Extracellular) ส่วนตะกอนเซลล์แบ่ง 1 ml ล้างด้วย 20% (v/v) acetone จนตะกอนเซลล์ไม่มีสี แล้วนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 nm ตะกอนเซลล์ที่เหลือ (4 ml) นำมาละลายด้วย 25 mM Tris- Hydrochloric buffer pH 7.0 จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกตามวิธีข้างต้นที่ได้กล่าวไปในข้อ 5. แล้วเก็บส่วนใสสำหรับการวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ภายในเซลล์ (Intracellular) แล้วนำอุณหภูมิที่เหมาะสมในการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอไปใช้ในการทดลองต่อไป

## 8. การศึกษาความเข้มข้นสีย้อมเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ

นำกล้าเชื้อ 10 ml ที่อัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ FN2 ในอัตราส่วนที่เหมาะสม โดยค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับ  $0.7 \pm 0.05$  ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดและอัตราส่วนปริมาณแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมปริมาตร 80 ml ที่ pH ที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้นของสีย้อมเริ่มต้นที่แตกต่างกัน ได้แก่ 100, 500 และ 1,000 เท่า ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 10 ml จาก stock สีย้อมน้ำทิ้งที่ 10, 50 และ 100 เท่า แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะการใช้อากาศที่เหมาะสม อุณหภูมิที่เหมาะสม เก็บผลทุกๆ 12 ชั่วโมง ปริมาตร 5 ml จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำของเหลวเหนือตะกอน 1 ml ใส่ลงในคิวเวทท์ที่สะอาดและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200 - 800 nm ทั้งเริ่มต้น และสุดท้าย นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ ตัวอย่างที่เหลือนำมาวัดค่า pH วิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์ (Extracellular) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) วิเคราะห์ปริมาณของแข็งในน้ำ และวิเคราะห์ค่า COD (Chemical Oxygen Demand) ส่วนตะกอนเซลล์แบ่ง 1 ml ล้างด้วย 20% (v/v) acetone จนตะกอนเซลล์ไม่มีสี แล้วนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 nm ตะกอนเซลล์ที่เหลือ (4 ml) นำมาละลายด้วย 25 mM Tris- Hydrochloric buffer pH 7.0 จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกตามวิธีข้างต้นที่ได้กล่าวไปในข้อ 5. แล้วเก็บส่วนใสสำหรับการวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ภายในเซลล์ (Intracellular) จากนั้นนำน้ำทิ้งที่บำบัดได้ที่ความเข้มข้นสีย้อมเริ่มต้นที่เหมาะสมไปทดลองความเป็นพิษต่อพืช (Phytotoxicity test)

## 9. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (Total sugar)

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ด้วยวิธี Phenol-Sulfuric ดัดแปลงตามวิธีของ DuBois *et al.* (1956) โดยปิเปตตัวอย่างมา 1 ml เติม 5% phenol 1 ml เขย่าให้เข้ากันแล้วเติม 98% sulfuric acid 5 ml เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นทิ้งให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 490 nm

## 10. การศึกษาพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ

### 10.1. การวิเคราะห์ปริมาณของแข็ง

การวิเคราะห์ของแข็งในน้ำจะวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่

- 1.) ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total Solids; TS) คือปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายและไม่ละลายน้ำ หาได้โดยจะนำตัวอย่างมา 10 ml ใส่ภาชนะที่มีน้ำหนักคงที่นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 °C

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่ 2.) ปริมาณของแข็งที่แขวนลอยทั้งหมด (Total Suspended Solids; TSS) คือของแข็งส่วนที่ไม่ละลายในน้ำแต่มีขนาดเล็กพอที่จะแขวนลอย (suspend) อยู่ในน้ำได้ หาได้โดยจะนำตัวอย่างทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงแยกของแข็งที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นแยกส่วนใสออกจากตะกอนนำส่วนใส 10 ml ใส่ภาชนะที่มีน้ำหนักคงที่นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่และ

3.) ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ (Total Dissolved Solids; TDS) หมายถึง ส่วนที่ละลายได้ในน้ำ เช่น น้ำตาล หาได้โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์แล้ว นำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 µm หลังจากนั้นนำตัวอย่างส่วนที่ผ่านกระดาษกรองมา 10 ml ใส่ภาชนะที่มีน้ำหนักคงที่นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่

สามารถคำนวณหาปริมาณของแข็งในน้ำได้ดังสมการ (6)

$$\text{ปริมาณของแข็ง (mg/l)} = \frac{A - B}{\text{ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้}} \times 10^6 \quad (6)$$

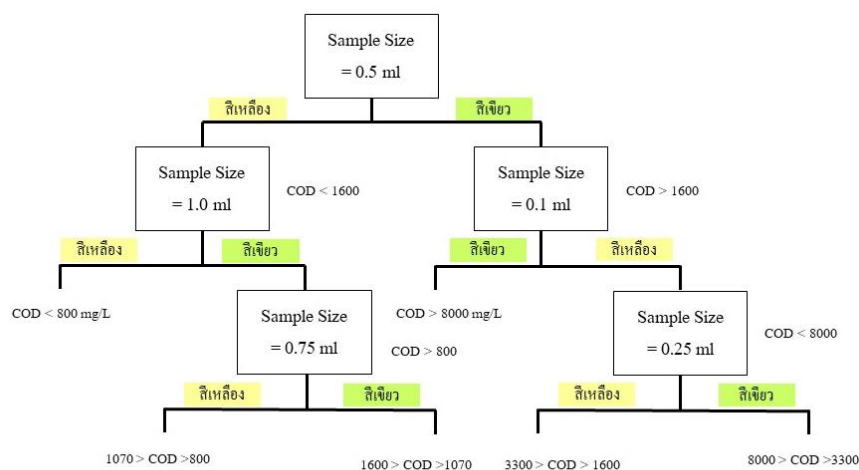
โดยที่ A คือ น้ำหนักภาชนะหลังอบที่ 105 °C

B คือ น้ำหนักภาชนะก่อนอบที่ 105 °C

## 10.2. วิเคราะห์ COD (Chemical Oxygen Demand)

ในการวิเคราะห์หาค่า COD หาได้โดยใช้ชุดทดสอบ COD (COD Vario Tube Test ยี่ห้อ Lovibond, Germany) ช่วง 0 – 1500 mg/l ขั้นแรกต้องหาช่วงของค่า COD โดยการนำตัวอย่าง 0.5 ml เติมลงให้หลอดทดลองที่มี 0.1 N Potassium dichromate จำนวน 1 ml เขย่าหลอดทดลองทันที จากนั้นเติม 98% Sulfuric acid จำนวน 3 ml เขย่าให้เข้ากันสังเกตสีที่เกิดขึ้นแล้วเปรียบเทียบกับภาพที่ 9 เจือจางตัวอย่างจนค่า COD อยู่ในช่วงที่ต้องการ จากนั้นเมื่อได้ช่วงของค่า COD ที่ต้องการแล้วนำมาทดสอบด้วยชุดทดสอบ COD โดยเติมตัวอย่างจำนวน 2 ml ลงในหลอดชุดทดสอบ ปิดฝาให้สนิทแล้วเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่เตาย่อย COD (Thermoreactor RD 125; Lovibond, Germany) ที่อุณหภูมิ 148 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่า COD ด้วยเครื่อง

วัดคุณภาพน้ำแบบใช้แสง ( Water testing photometer MD 600; Lovibond, Germany)  
ค่า COD ที่อ่านได้จากเครื่องจะมีหน่วยเป็น mg/l



ภาพที่ 9 ขั้นตอนในการวิเคราะห์ COD อย่างเร็วเมื่อ COD > 800 mg/l

## 11. การศึกษาการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอในสถานะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ

นำกล้าเชื้อ 10 ml ที่อัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ FN2 ในอัตราส่วนที่เหมาะสม โดยค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับ  $0.7 \pm 0.05$  ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดและอัตราส่วนปริมาณแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมปริมาตร 80 ml ที่ pH ที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้นของสีย้อมเริ่มต้นที่เหมาะสมปริมาตร 10 ml โดยการทดลองแบ่งเป็น 2 ชุด ได้แก่ 1.) จุลินทรีย์ผสมในสถานะที่มีการฆ่าเชื้อและ 2.) จุลินทรีย์ผสมในสถานะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ ซึ่งจะใช้น้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการกรอง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะการใช้อากาศที่เหมาะสม อุณหภูมิที่เหมาะสม เก็บผลทุกๆ 12 ชั่วโมง ปริมาตร 5 ml จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำของเหลวเหนือตะกอน 1 ml ใส่ลงในคิวเวทท์ที่สะอาดและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200 - 800 nm ทั้งเริ่มต้น และสุดท้าย นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ ตัวอย่างที่เหลือนำมาวัดค่า pH วิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์ (Extracellular) ส่วนตะกอนเซลล์แบ่ง 1 ml ล้างด้วย 20% (v/v) acetone จนตะกอนเซลล์ไม่มีสี แล้วนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 nm ตะกอนเซลล์ที่เหลือ (4 ml) นำมาละลายด้วย 25 mM Tris- Hydrochloric buffer pH 7.0 จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกตามวิธีข้างต้นที่ได้กล่าวไปในข้อ 5. แล้วเก็บส่วนใสสำหรับการวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ภายในเซลล์ (Intracellular)



## 12. การทดสอบความเป็นพิษของสีย้อมน้ำที่ทั้งก่อนและหลังการบำบัดที่มีผลต่อพืช

ทดสอบความเป็นพิษของสีย้อมน้ำที่ทั้งก่อนและหลังการกำจัดสีโดยจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 และ FN2 โดยศึกษาการเจริญเติบโตของพืช 2 ชนิด ได้แก่ ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica* Forsk) และข้าวหอมมะลิ (*Oryza sativa* L.) โดยแบ่งการทดสอบออกเป็น 3 ชุด ๆ ละ 10 ต้น คือ น้ำกลั่น (ชุดควบคุม) สีย้อมน้ำที่ทั้งก่อนบำบัด และสีย้อมน้ำที่ทั้งก่อนและหลังบำบัด โดยจะนำเมล็ดพืชทั้ง 3 ชนิด แซ่ในสารละลาย 3 ชุดการทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเมล็ดพืชดังกล่าวมาเรียงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ที่มีกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นจะรดด้วยสารละลายทั้ง 3 ชุด ปริมาตร 15 ml จำนวน 1 ครั้ง โดยตัดแปลงจาก นูรดา สะบาหานาเลาะห์ (2561) และ Sudha *et al.* (2018) หลังจาก 5 วัน จะวิเคราะห์การเจริญเติบโตของพืช โดยจะวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของพืชที่ใช้ในการทดสอบ ดังนี้ ความยาวของราก (cm), ความยาวของยอด (cm), ลักษณะสีของพืช และดัชนีการงอกของเมล็ดพืช (Relative Seed Germination Index percentage; %RSGI) โดยนับเมล็ดพืชที่งอกเทียบกับเมล็ดพืชทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง ตามวิธีของ Chen *et al.* (2018) ซึ่งคำนวณได้ตามสมการ (7)

$$\text{ดัชนีการงอกของเมล็ดพืช (\%)} = (\text{จำนวนเมล็ดที่งอก} / \text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}) \times 100 \quad (7)$$



## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1. ผลการศึกษาสภาวะการให้อากาศของจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีการเขย่าและไม่มีการเขย่า

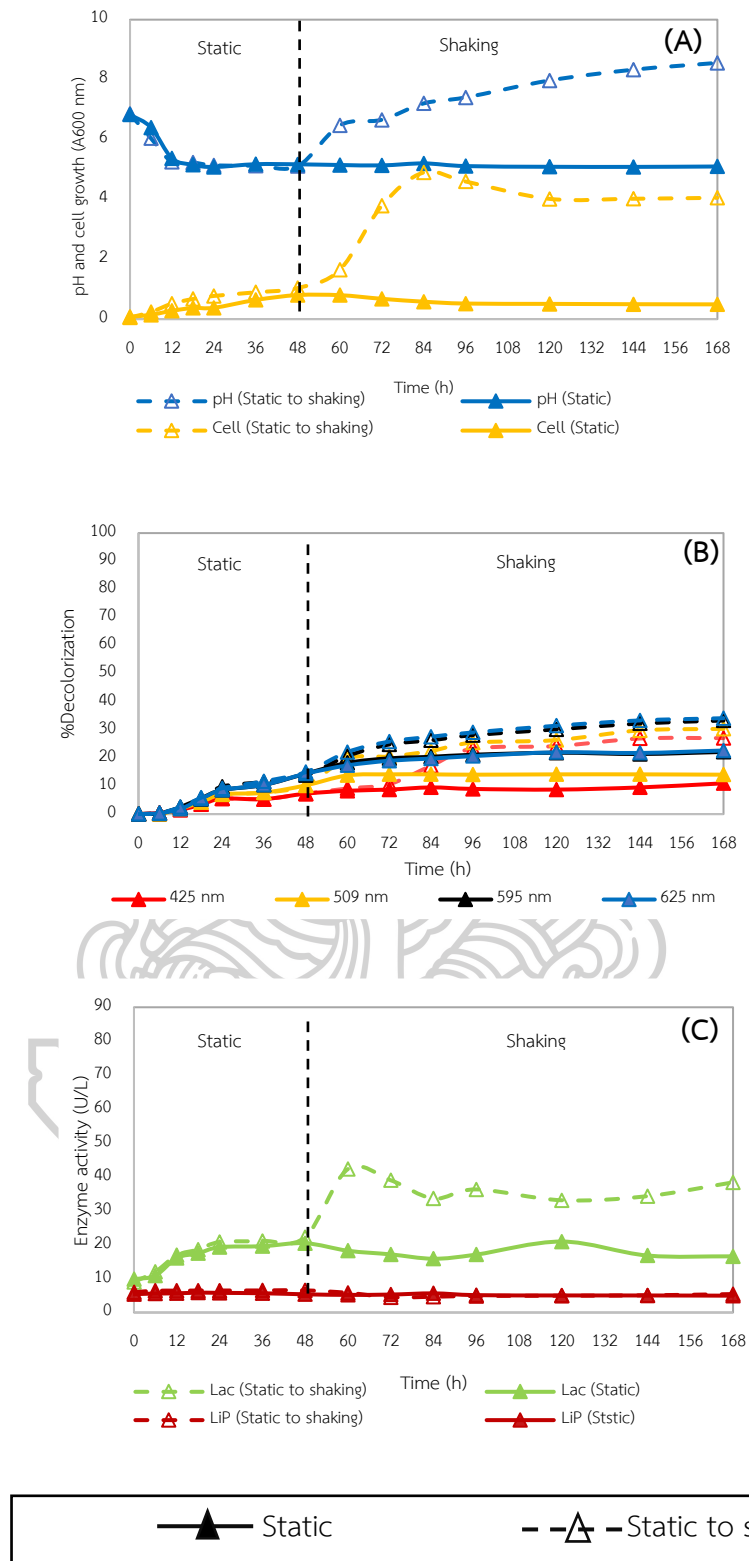
ผลการศึกษาสภาวะการให้อากาศของ *Bacillus* sp. FN1 และ *Bacillus* sp. FN2 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเป็นกลูโคสและเปปโทน ซึ่งควบคุม pH ที่ 7.0 กำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอที่เจือจางความเข้มข้น 1000 เท่า โดยการทดลองแบ่งเป็น 4 ชุดทดลอง ได้แก่ สภาวะที่ไม่มีการเขย่า (Static) สภาวะที่มีการเขย่า 150 rpm (Shaking) สภาวะที่ไม่มีการเขย่า (48 ชั่วโมง) ตามด้วยสภาวะที่มีการเขย่า (Static to shaking) และสภาวะที่มีการเขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามด้วยสภาวะที่ไม่มีการเขย่า (Shaking to static) บ่มที่ 37 °C พบว่า *Bacillus* sp. FN1 และ *Bacillus* sp. FN2 ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่าที่ 150 rpm 48 ชั่วโมง ตามด้วยสภาวะที่ไม่มีการเขย่า (Shaking to static) สามารถกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอสูงสุดโดยดังที่แสดงในภาพที่ 10,11,12 และ 13 โดย *Bacillus* sp. FN1 สามารถกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอสูงสุดที่ความยาวคลื่น 425, 509, 595 และ 625 nm เท่ากับ 41.33, 48.93, 56.45 และ 58.67 % ตามลำดับ (ภาพที่ 11 B) และ *Bacillus* sp. FN2 สามารถกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอสูงสุดเท่ากับ 46.27, 52.43, 53.23 และ 55.54% ตามลำดับ ภายใน 168 ชั่วโมง (ภาพที่ 13 B) เมื่อวิเคราะห์กัมมันตภาพแลคเคสและลิกนินเปอร์ออกซิเดสพบว่า *Bacillus* sp. FN1 จะให้ค่ากัมมันตภาพสูงสุดเท่ากับ 48.95 U/L ที่เวลา 84 ชั่วโมง 7.92 U/L ที่เวลา 60 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 11 C) และพบว่า *Bacillus* sp. FN2 ให้ค่ากัมมันตภาพสูงสุดเท่ากับ 49.93 U/L ที่เวลา 72 ชั่วโมง 8.34 U/L ที่เวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 13 C) Chen *et al.* (2003) รายงานว่า *Aeromonas hydrophila* เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศและกำจัดสีได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศหรือมีอากาศเพียงเล็กน้อย ซึ่งสามารถกำจัดสี RED RBN (3000 mg/l;  $\lambda_{max}$  = 518 nm) ได้ 90% ใน 8 วัน ในสภาวะที่ไม่มีการเขย่าเอโซรีดักเทส (Azoreductase) สามารถทำงานได้ดีและประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมกลุ่มเอโซได้ดีกว่าสภาวะที่มีการเขย่า (Yoo *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังรายงานไว้ในสภาวะที่มีการเขย่าตามด้วยสภาวะที่ไม่มีการเขย่าสามารถกำจัดสีย้อม Reactive yellow 145 (50 mg/l;  $\lambda_{max}$  = 415 nm) ได้มากกว่า 80% ภายใน 7 วัน โดยใช้ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Thiosphaera pantotropha* เนื่องจากเอโซรีดักเทส (Azoreductase) จะผลิตขึ้นในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและเอโซรีดักเทส (Azoreductase) ย่อยสลายสีย้อมเอโซซารสีที่แขวนลอยอยู่ในน้ำให้กลายเป็นอะโรมาติก



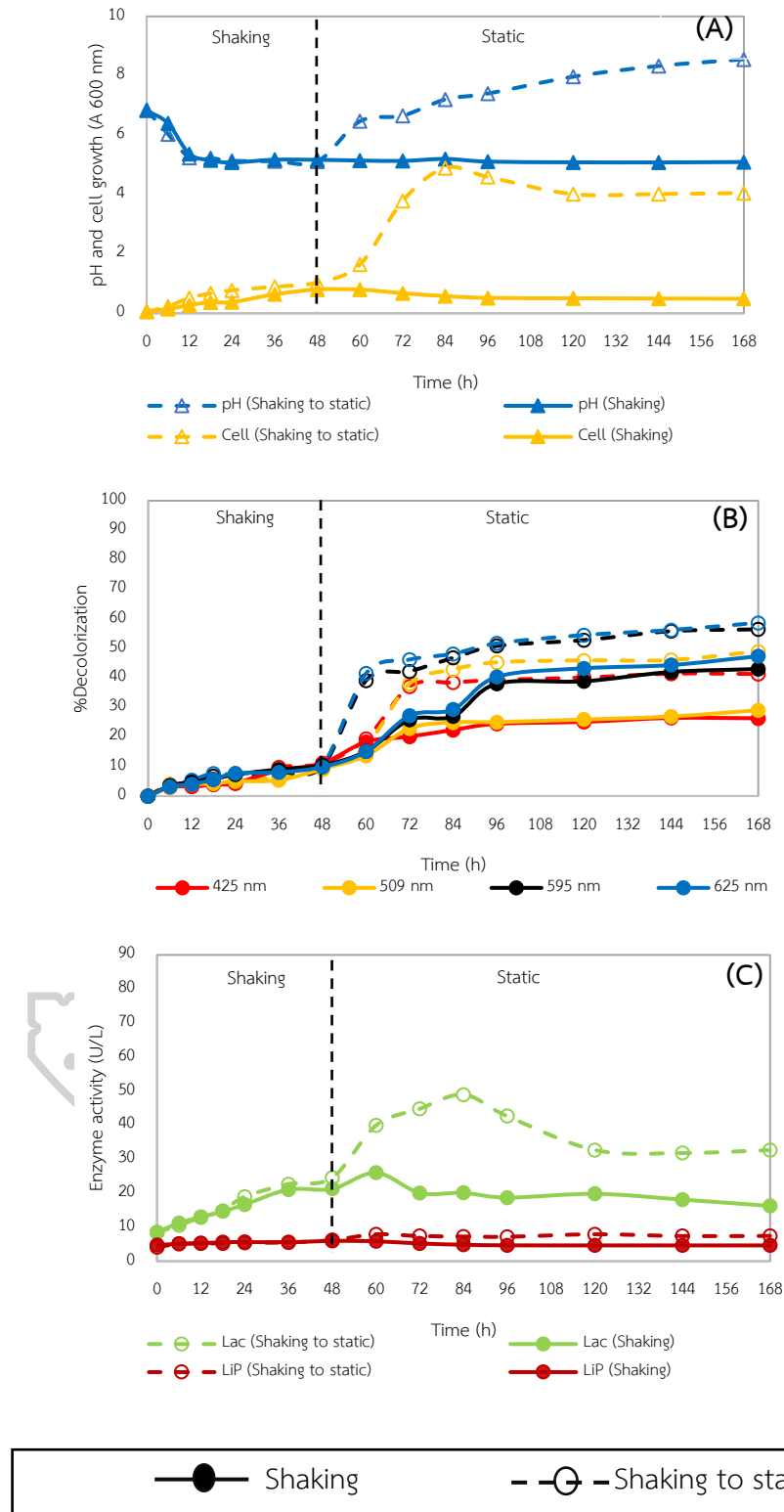
เอมีนที่ไม่มีสี (Garg *et al.*, 2020) Bharagava *et al.* (2018) รายงานว่าการกำจัดสีย้อม Crystal violet (100 mg/l;  $\lambda_{\max}$  = 590 nm) ได้ 95.30% โดย *Aeromonas hydrophila* ภายใน 8 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่า (110 rpm) และพบว่าแบคทีเรียนี้ยังผลิตลิกนินเปอร์ออกซิเดสและแลคเคส ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ ~ 40 และ ~ 60 kDa ตามลำดับ

จากการศึกษาสภาวะการให้อากาศของจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. FN1 และ *Bacillus* sp. FN2 ภายใต้สภาวะที่ไม่มีกรเขย่า (Static) สภาวะที่มีการเขย่า (Shaking) สภาวะที่ไม่มีกรเขย่าตามด้วยสภาวะที่มีการเขย่า (Static to shaking) และสภาวะที่มีการเขย่าตามด้วยสภาวะที่ไม่มีกรเขย่า (Shaking to static) ในการกำจัดน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอพบว่าจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. FN1 และ *Bacillus* sp. FN2 สามารถกำจัดสีน้ำทิ้งได้สูงสุดภายใต้สภาวะที่มีการเขย่าตามด้วยสภาวะที่ไม่มีกรเขย่า (Shaking to static) และ เมื่อพิจารณาค่ากัมมันตภาพแลคเคสพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปลี่ยนสภาวะ และลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพการกำจัดสี ในทางตรงกันข้ามพบว่าค่ากัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดสเมื่อเปลี่ยนสภาวะกับไม่มีการเปลี่ยนแปลง และมีค่ากัมมันตภาพน้อยเมื่อเทียบกับค่ากัมมันตภาพแลคเคส ซึ่งไม่สัมพันธ์กับประสิทธิภาพการกำจัดสีของจุลินทรีย์ทั้งสอง ดังนั้น จึงเลือกใช้สภาวะการให้อากาศแบบสภาวะที่มีการเขย่าตามด้วยสภาวะที่ไม่มีกรเขย่า (Shaking to static) มาใช้ทดลองกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอ

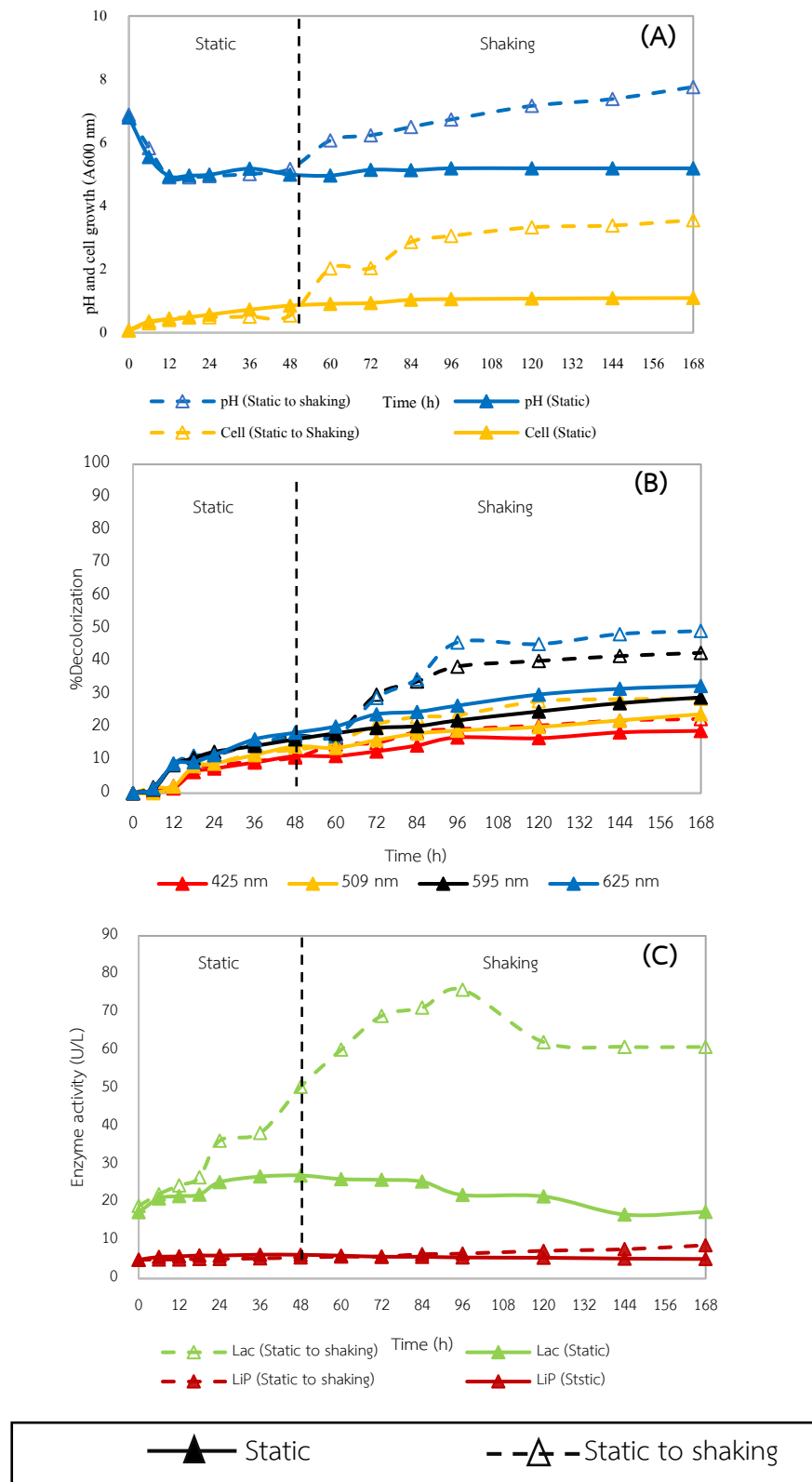




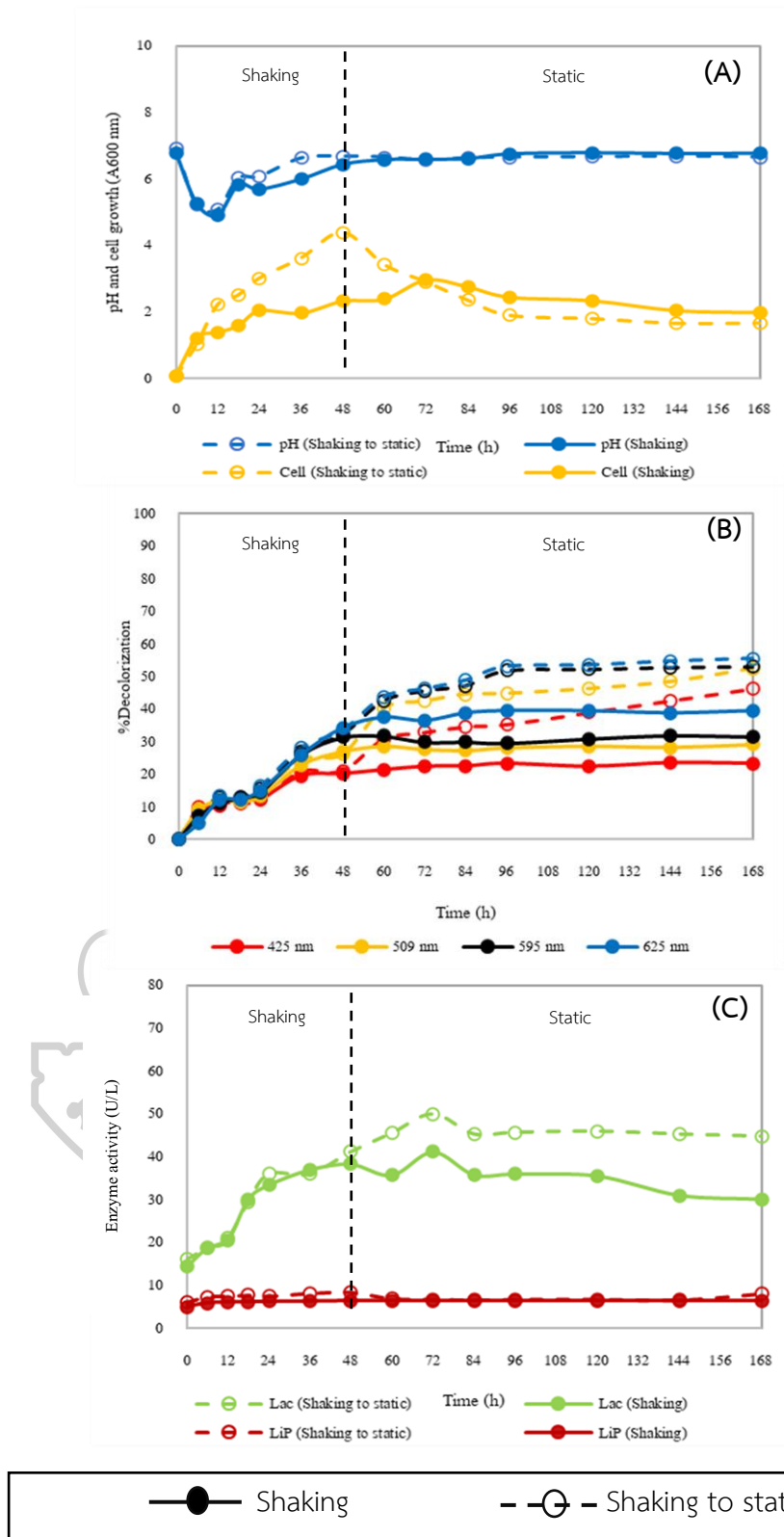
ภาพที่ 10 สภาวะที่ไม่มีการเขย่า (Static) สภาวะที่ไม่มีการเขย่าตามด้วยสภาวะที่มีการเขย่า (Static to shaking) ที่แสดงค่าความขุ่น และ pH (A) ประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอ (B) และค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ (C) ของ *Bacillus* sp. FN 1



ภาพที่ 11 สภาวะที่มีการเขย่า (Shaking) และสภาวะที่มีการเขย่าตามด้วยสภาวะที่ไม่มีการเขย่า (Shaking to static) ที่แสดงค่าความขุ่น และ pH (A) ประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอ (B) และค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ (C) ของ *Bacillus* sp. FN 1



ภาพที่ 12 สภาวะที่ไม่มี การเขย่า (Static) และสภาวะที่ไม่มี การเขย่าตามด้วยสภาวะที่มี การเขย่า (Static to shaking) ที่แสดงค่าความขุ่น และ pH (A) ประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอ (B) และค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ (C) ของ *Bacillus* sp. FN 2



ภาพที่ 13 สภาวะที่มีเอนไซม์ การเขย่า (Shaking) และสภาวะที่มีการเขย่าตามด้วยสภาวะที่ไม่มี การเขย่า (Shaking to static) ที่แสดงค่าความขุ่น และ pH (A) ประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งจาก โรงงานสิ่งทอ (B) และค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ (C) ของ *Bacillus* sp. FN 2

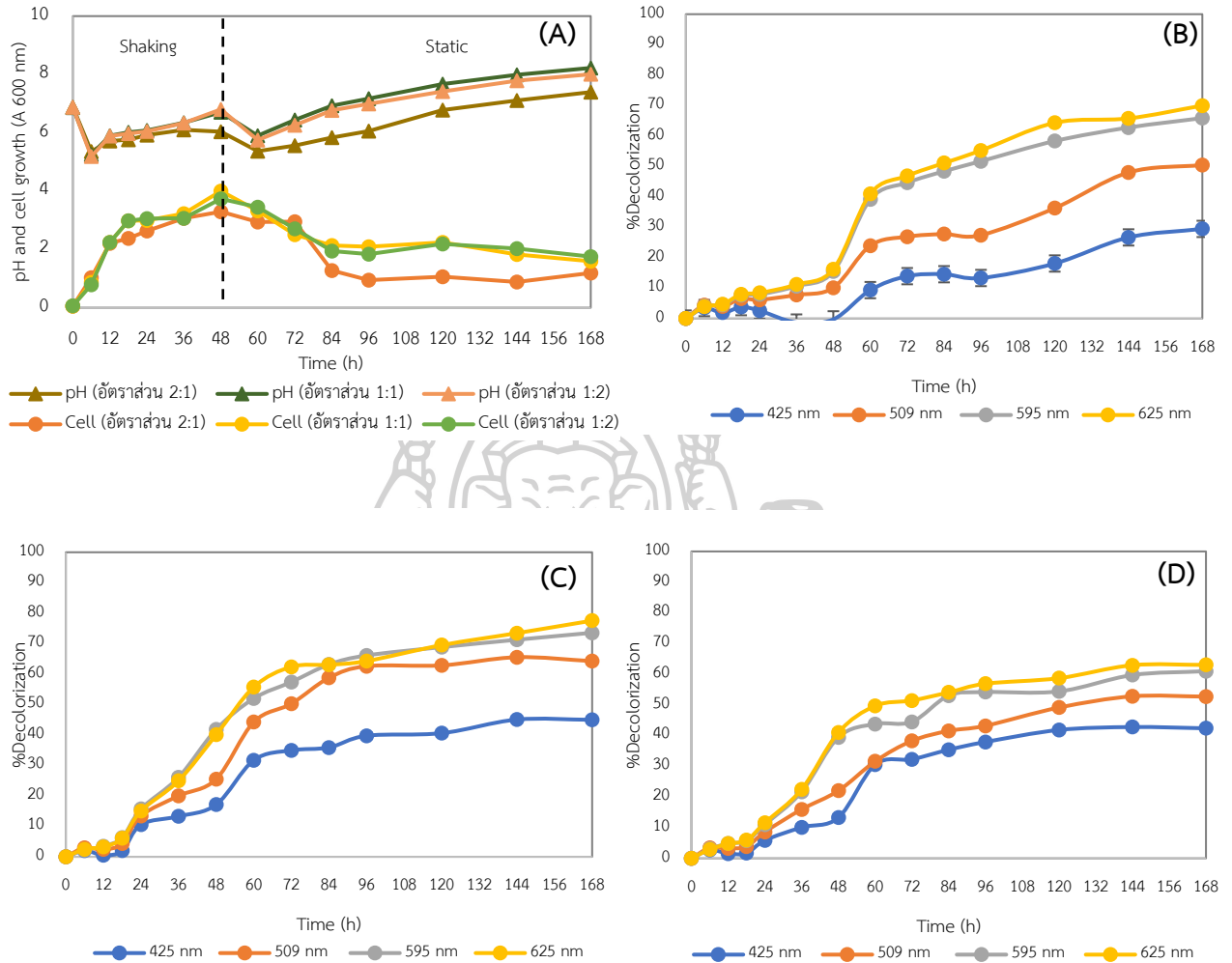
#### 4.2. ผลการศึกษาอัตราส่วนของจุลินทรีย์ผสมที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีน้ำเสียจากโรงงานสิ่งทอ

จากการศึกษาการใช้จุลินทรีย์ผสมในอัตราส่วนจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 ในอัตราส่วน 2:1, 1:1 และ 1:2 กำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอที่เจือจางความเข้มข้น 1000 เท่า ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเป็นกลูโคสและเปปโทน ตามลำดับ ซึ่งควบคุมสภาวะของจุลินทรีย์ที่ pH 7.0 บ่มที่ 37 °C ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่า 150 rpm 48 ชั่วโมง ตามด้วยสภาวะที่ไม่มีการเขย่า (Shaking to static) พบว่าอัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 ในอัตราส่วน 1:1 สามารถกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอ สูงสุดเท่ากับ 44.97, 64.25, 73.56 และ 77.54% ที่ความยาวคลื่น 425, 509, 595 และ 625 nm ภายในเวลา 168 ชั่วโมง (ภาพที่ 14 C) เมื่อเทียบกับอัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 ในอัตราส่วน 2:1 และ 1:2 ดังที่แสดงในภาพที่ 14 B และ D เมื่อวิเคราะห์กัมมันตภาพแลคเคส พบว่าอัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 ในอัตราส่วน 2:1, 1:1 และ 1:2 จะให้ค่ากัมมันตภาพแลคเคสสูงสุดเท่ากับ 78.04 U/L ที่เวลา 144 ชั่วโมง, 76.73 U/L ที่เวลา 72 ชั่วโมง และ 70.28 U/L ที่เวลา 60 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 15 A) เมื่อใช้ 3,4-Dimethoxybenzyl alcohol เป็น substrate พบว่า อัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 ในอัตราส่วน 2:1, 1:1 และ 1:2 จะให้ค่ากัมมันตภาพ ลิกนินเปอร์ออกซิเดสสูงสุด 7.92 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง, 5.86 U/L ที่เวลา 144 ชั่วโมง และ 6.88 U/L ที่เวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 15 B) และเมื่อวิเคราะห์กัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสโดยใช้ Manganese Sulfate ( $MnSO_4$ ) เป็น substrate พบว่า อัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 ในอัตราส่วน 2:1, 1:1 และ 1:2 จะให้ค่ากัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงสุดเท่ากับ 15.49, 14.76 และ 13.05 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 15 C) มีรายงานว่า *Bacillus megaterium* W10 กับ *Bacillus amyloliquefaciens* SP-L1 ในอัตราส่วน 1:1 สามารถลดความเข้มข้นสีน้ำเสียจากอุตสาหกรรมผลิต ผ้าหม้อห้อม ( $\lambda_{max} = 563$  nm) ได้ 95.48% ภายใน 5 วัน ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่าที่ 120 rpm ในอาหารที่มี 2.5% w/v กลูโคส และ 0.5% w/v สารสกัดจากยีสต์ (ปิยะบุตร โพธิคามบำรุง, 2554) และพบว่า การเพาะเลี้ยง *Shewanella putrefaciens* CN32 กับ *Bacillus circulans* BWL1061 ในอัตราส่วน 1:1 พบว่าสามารถกำจัดสีย้อม Sudan I (20 mg/l;  $\lambda_{max} = 487$  nm) สูงสุด 90.23% ใน 108 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้อากาศ ในอาหาร Luria-Bertani (LB) ซึ่งสูงกว่าการกำจัดสีโดยใช้ *Shewanella putrefaciens* CN32 (66.8%) เพียงอย่างเดียว ซึ่งบ่งชี้ว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ ร่วมกันมีศักยภาพที่ดีในการบำบัดน้ำทิ้งจากการย้อมสี (Liu *et al.*, 2018)

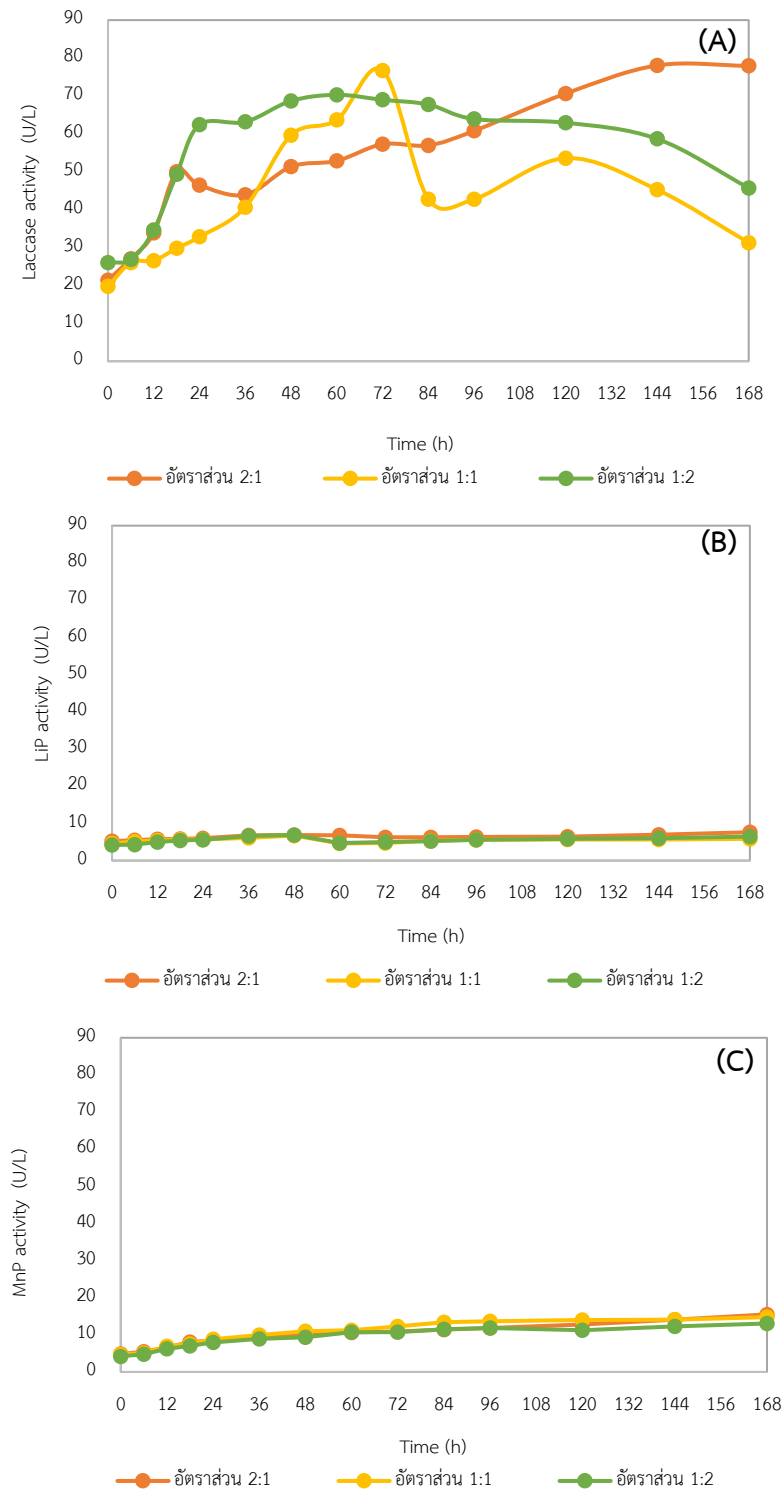


จากการศึกษาอัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม Bacillus sp. FN1 ต่อ Bacillus sp. FN2 ในอัตราส่วน 2:1, 1:1 และ 1:2 ในการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอพบว่า การใช้อัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม Bacillus sp. FN1 ต่อ Bacillus sp. FN2 ในอัตราส่วน 1:1 ประสิทธิภาพกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอสูงสุด เมื่อเทียบกับอัตราส่วนจุลินทรีย์ผสมทั้งสองอัตราส่วน และเมื่อพิจารณาค่ากัมมันตภาพเอนไซม์พบว่า ค่ากัมมันตภาพแลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อประสิทธิภาพการกำจัดสีเพิ่มขึ้น แต่พบว่าค่ากัมมันตภาพฟอสฟอรัสเปอร์ออกซิเดสไม่มีการเปลี่ยนแปลงซึ่งไม่สอดคล้องกับประสิทธิภาพการกำจัดสีของจุลินทรีย์ และเมื่อเปรียบเทียบค่ากัมมันตภาพเอนไซม์กับอัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม 2:1 และ 1:2 ซึ่งมีค่ากัมมันตภาพเอนไซม์มากกว่าจุลินทรีย์ผสมในอัตราส่วน 1:1 ซึ่งไม่สอดคล้องกับประสิทธิภาพการกำจัดสี ดังนั้น จึงเลือกใช้อัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม Bacillus sp. FN1 ต่อ Bacillus sp. FN2 ในอัตราส่วน 1:1 มาใช้ในการทดลองกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอต่อไป เนื่องจากสามารถกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอได้สูงสุด





ภาพที่ 14 ค่า pH และค่าความขุ่นของเซลล์ (OD) (A) และประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอของอัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 ในอัตราส่วน 2:1 (B), 1:1 (C) และ 1:2 (D) ตามลำดับ และเลี้ยงที่สภาวะที่มีการเขย่า 150 rpm 48 ชั่วโมงตามด้วยสภาวะที่ไม่มีการเขย่า ที่ 37 °C



ภาพที่ 15 ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) และกัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) ตามลำดับ ที่อัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 ในอัตราส่วน 2:1, 1:1 และ 1:2

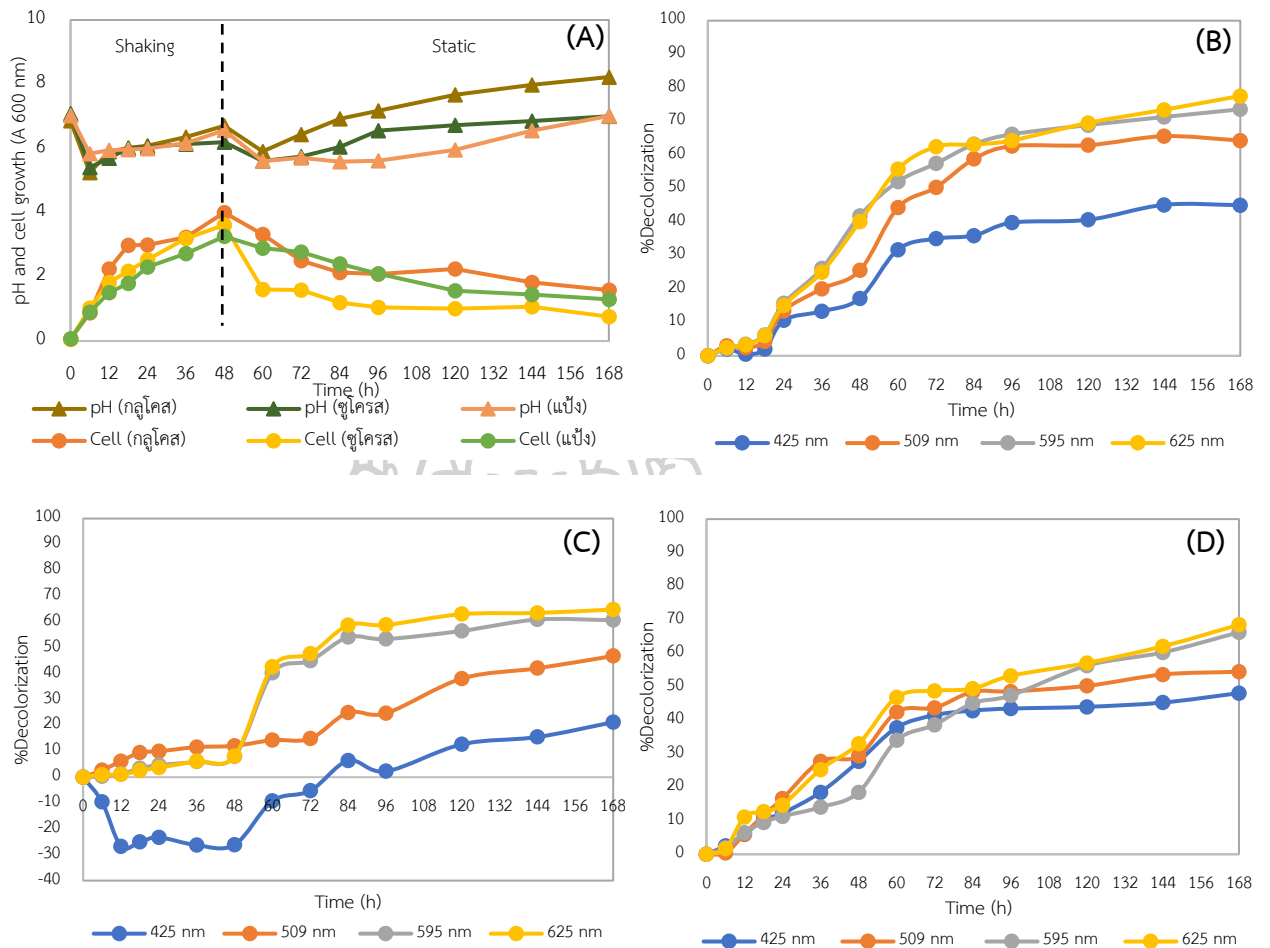
### 4.3. ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอ

จากการศึกษาใช้จุลินทรีย์ผสมอัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 ที่อัตราส่วน 1:1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH 7.0 ที่ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ได้แก่ กลูโคส ซูโครส และแป้ง (0.1% w/v) และมีแหล่งไนโตรเจนเป็นเปปโทน (0.03% w/v) กำจัดสีน้ำเสียจากโรงงานสิ่งทอที่เจือจางความเข้มข้นเริ่มต้น 1000 เท่า บ่มที่ 37 °C ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่าที่ 150 rpm (48 ชั่วโมง) ตามด้วยสภาวะที่ไม่มีการเขย่า พบว่าจุลินทรีย์ผสมที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นกลูโคสสามารถกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอสูงสุดที่ความยาวคลื่น 425, 509, 595 และ 625 nm เท่ากับ 44.97, 64.25, 73.56 และ 77.54% ตามลำดับ ภายในเวลา 168 ชั่วโมง (ภาพที่ 16 B) ส่วนจุลินทรีย์ผสมที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส และแป้ง ที่ความยาวคลื่นเดียวกัน สามารถกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอเท่ากับ 21.25, 46.86, 60.69 และ 64.85% ตามลำดับ สำหรับแหล่งคาร์บอนที่เป็นซูโครส (ภาพที่ 16 C) และ 48.07, 54.47, 66.23 และ 68.48% ตามลำดับ สำหรับแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้ง (ภาพที่ 16 D) ภายในเวลา 168 ชั่วโมง มีรายงานว่า *Aspergillus* ssp. สามารถกำจัดสีสังเคราะห์กลุ่มเอโซ (Acid blue 29;  $\lambda_{\max}$  = 600 nm, Disperse red 1;  $\lambda_{\max}$  = 463 nm และ Congo red;  $\lambda_{\max}$  = 490 nm) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 mg/l ได้มากกว่า 86% ในเวลา 60 ชั่วโมง โดยมีกลูโคส (0.1% w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน (Ameen *et al.*, 2021) *Staphylococcus hominis* RMLRT03 สามารถกำจัดสีย้อม Acid orange (600 mg/l;  $\lambda_{\max}$  = 483 nm) ได้อย่างสมบูรณ์ในอาหารที่มีกลูโคส (0.1% w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ภายในเวลา 60 ชั่วโมง (Singh *et al.*, 2014) และมีรายงานว่าเมื่อเติมกลูโคส (0.1% w/v) ลงในอาหาร Mineral Salts Medium (MSM) พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม HM-4 สามารถกำจัดสีย้อม Acid Red 88 (60 mg/l;  $\lambda_{\max}$  = 505 nm) ได้อย่างสมบูรณ์ ภายใน 24 ชั่วโมง (Khehra *et al.*, 2005) ยังมีรายงานว่า *Alternaria alternata* CMERI F6 สามารถกำจัดสีย้อม Congo red (600 mg/L;  $\lambda_{\max}$  = 498 nm) ได้สูงสุดเท่ากับ 99.99% ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ในอาหารที่มีกลูโคส (0.05% w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน (Chakraborty *et al.*, 2013) นอกจากนี้ มีรายงานว่า *Phanerochaete chrysosporium* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส (1% w/v) สามารถกำจัดสีย้อม Congo red (50 mg/l;  $\lambda_{\max}$  = 500 nm) ได้มากกว่า 97% ภายใน 10 วัน (Andrade *et al.*, 2013) และ *Pseudomonas aeruginosa* MZ520730 สามารถกำจัดสี Methyl orange (100 mg/L;  $\lambda_{\max}$  = 464 nm) ได้สูงสุด 99% ภายใน 12 ชั่วโมง ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส (1% w/v) และ

พบว่าแบคทีเรียนี้ยังผลิตแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ซึ่งวิเคราะห์ด้วยด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ ~ 53 kDa

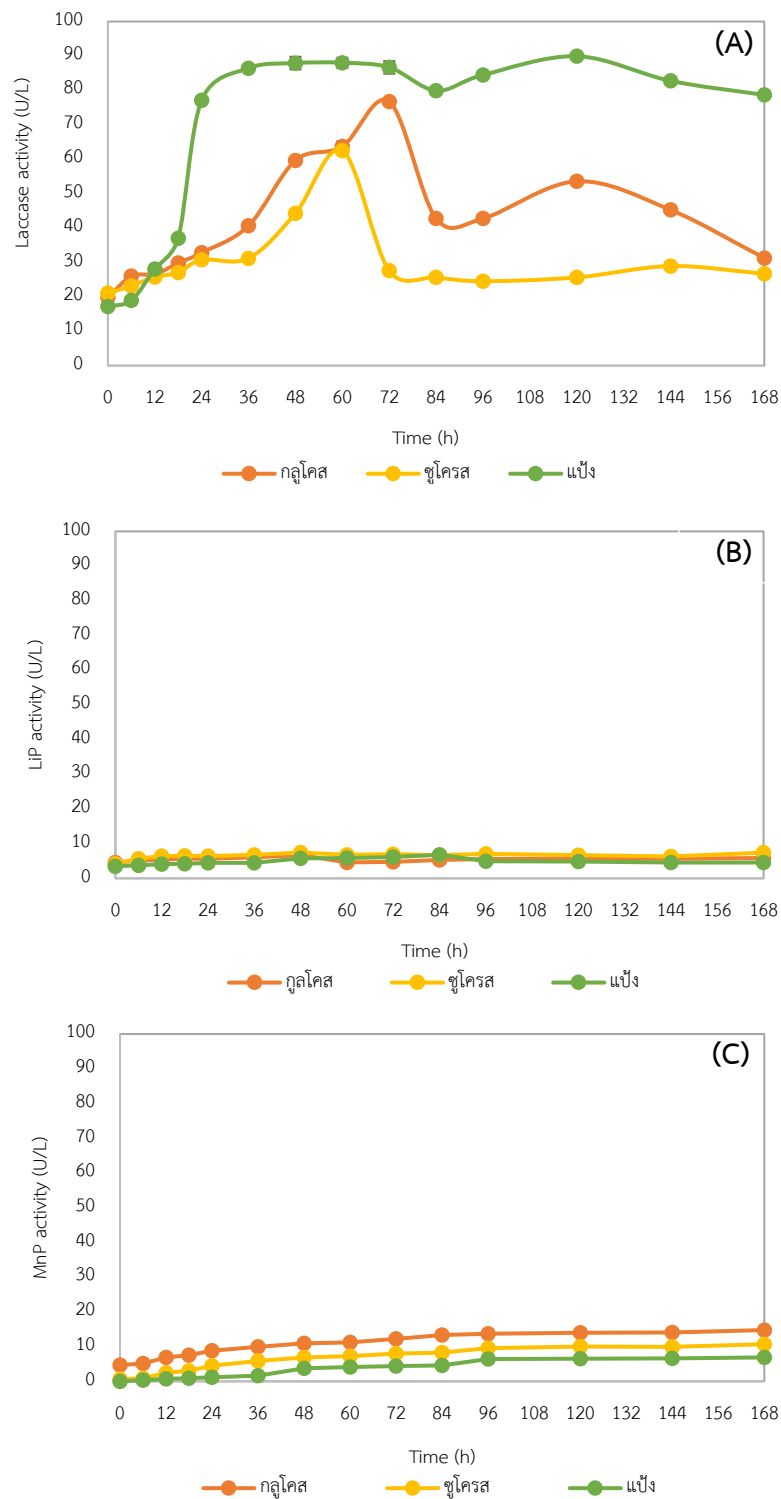
ภาพที่ 17 A แสดงค่ากัมมันตภาพแลคเคสที่ชนิดแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันได้แก่ กลูโคส ซูโครส และแป้ง ให้ค่ากัมมันตภาพแลคเคสสูงสุดเท่ากับ 76.73 U/L ที่เวลา 72 ชั่วโมง, 62.47 U/L ที่เวลา 60 ชั่วโมง และ 89.91 U/L ที่เวลา 120 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่แหล่งคาร์บอนที่เป็นกลูโคส ซูโครส และแป้งให้ค่าเท่ากับ 6.73 U/L ที่เวลา 48 ชั่วโมง, 7.41 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง และ 6.79 U/L ที่เวลา 84 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 17 B) และพบว่าค่ากัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเท่า 14.76, 10.69 และ 6.89 U/L ที่ 168 ชั่วโมง สำหรับแหล่งคาร์บอนที่เป็นกลูโคส ซูโครส และแป้ง ตามลำดับ (ภาพที่ 17 C)

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เป็น กลูโคส ซูโครส และแป้ง ตามลำดับ ที่ใช้จุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 ในอัตราส่วน 1:1 พบว่าที่แหล่งคาร์บอนที่เป็นกลูโคส (1% w/v) มีประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งสูงสุดเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนที่เป็นซูโครสและแป้ง เมื่อพิจารณาค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ของจุลินทรีย์ผสมในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าค่ากัมมันตภาพแลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น เมื่อประสิทธิภาพการกำจัดสีเพิ่มขึ้น และเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ในอาหารที่ซูโครสและแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ามีค่ากัมมันตภาพแลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น แต่ไม่สอดคล้องกับประสิทธิภาพการกำจัดสี และในกรณีของค่ากัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดสไม่มีการเปลี่ยนแปลงซึ่งไม่สอดคล้องกับประสิทธิภาพการกำจัดสี ดังนั้น จึงเลือกใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในทดลองต่อไป เนื่องจากให้ประสิทธิภาพการกำจัดสีสูงสุด



ภาพที่ 16 ค่า pH และค่าความขุ่นของเซลล์ (OD) (A) และประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอของอัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 ในอัตราส่วน 1:1 ที่แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ กลูโคส (B) ซูโครส (C) และแป้ง (D) ตามลำดับ





ภาพที่ 17 ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) และกัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) ตามลำดับ ที่อัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 ในอัตราส่วน 1:1 ที่แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ กลูโคส ซูโครสและแป้ง

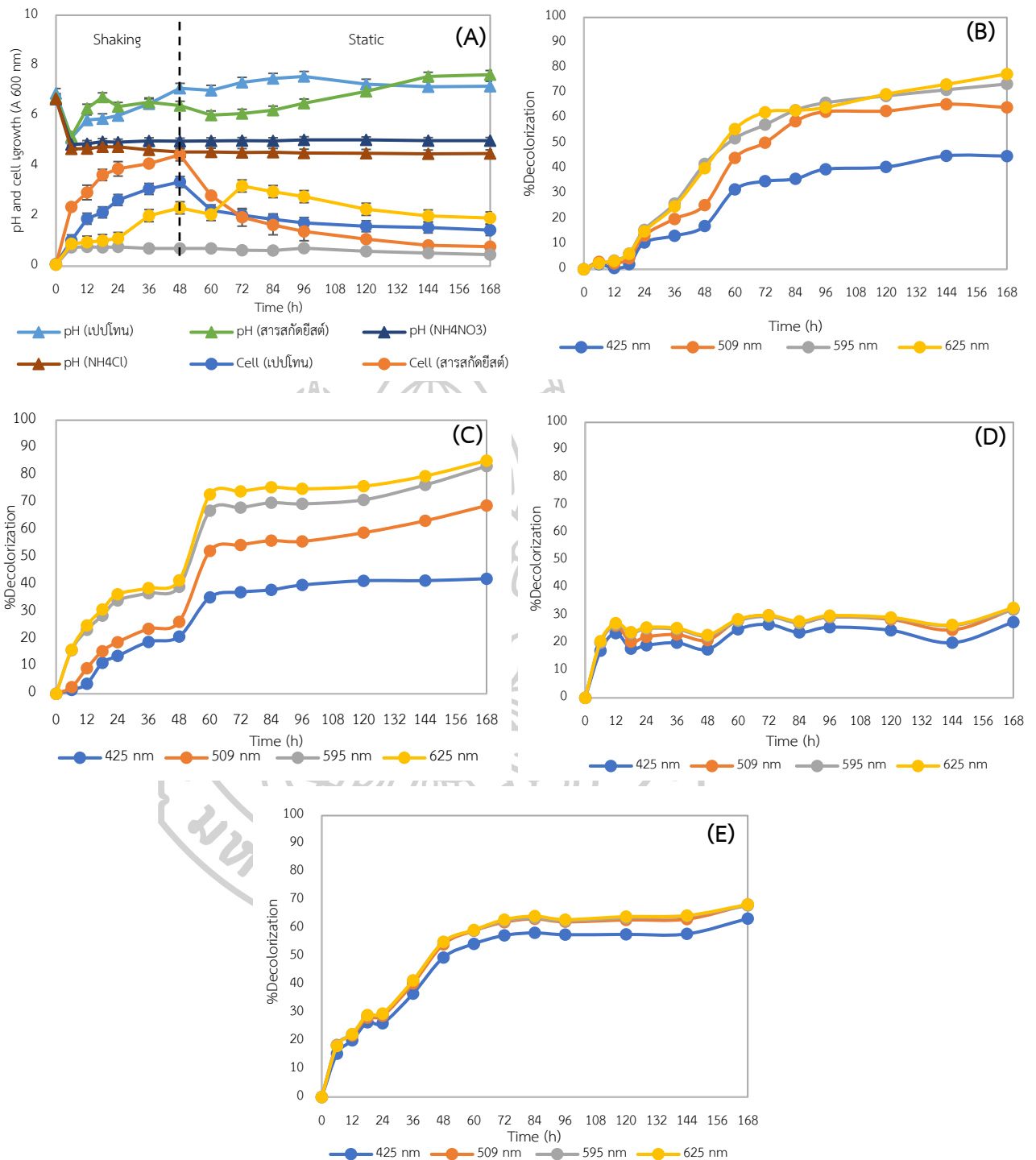
#### 4.4. ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอ

จากภาพที่ 15 เป็นการศึกษาการใช้จุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 ในอัตราส่วน 1:1 มาศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เป็นเปปโตน สารสกัดจากยีสต์ แอมโมเนียมไนเตรท ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) และแอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (0.3% w/v) ตามลำดับ ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส (1% w/v) กำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอที่เจือจางความเข้มข้น 1000 เท่า ที่อาหาร pH 7.0 บ่มที่ 37 °C ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่าที่ 150 rpm (48 h) ตามด้วยสภาวะที่ไม่มีการเขย่า พบว่าจุลินทรีย์ผสมที่ใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นสารสกัดจากยีสต์สามารถกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอสูงสุดที่ความยาวคลื่น 425, 509, 595 และ 625 nm เท่ากับ 42.06, 68.78, 83.21 และ 85.23% ตามลำดับ ภายในเวลา 168 ชั่วโมง (ภาพที่ 18 C) และจุลินทรีย์ผสมที่ใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นเปปโตน สามารถกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอสูงสุดที่ความยาวคลื่นเดียวกันเท่ากับ 44.97, 64.25, 73.56 และ 77.54% ตามลำดับ ภายในเวลา 168 ชั่วโมง (ภาพที่ 18 B) และเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรท ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) และแอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) ที่ความยาวคลื่นเดียวกัน สามารถกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอได้เพียง 27.45, 32.15, 32.01 และ 32.66% ตามลำดับ สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นแอมโมเนียมไนเตรท ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) (ภาพที่ 18 D) และ 63.37, 68.38, 68.03 และ 68.48% ตามลำดับ สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นแอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (ภาพที่ 18 E) ภายในเวลา 168 ชั่วโมง มีรายงานว่า *Ganoderma cupreum* AG-1 สามารถกำจัดสีย้อม Reactive violet 1 (100 mg/l;  $\lambda_{\text{max}} = 575 \text{ nm}$ ) ได้เท่ากับ 98% ภายในเวลา 4 วัน โดยมีสารสกัดจากยีสต์ (0.05% w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีกัมมันตภาพแลคเคส และลิกนินเปอร์ออกซิเดสเท่ากับ 462 และ 144 U/ml ตามลำดับ (Gahlout *et al.*, 2013) Singh *et al.* (2014) รายงานว่า *Staphylococcus hominis* RMLRT03 สามารถกำจัดสีย้อม Acid orang (600 mg/l;  $\lambda_{\text{max}} = 483 \text{ nm}$ ) ได้อย่างสมบูรณ์ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์ (0.05% w/v) ในเวลา 60 ชั่วโมง ยังมีรายงานอีกว่าในอาหารที่เติมสารสกัดจากยีสต์ (0.5% w/v) สามารถกำจัดสีย้อม Crystal violet (100 mg/l;  $\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$ ) ได้สูงสุดเท่ากับ 95.30% ภายใน 8 ชั่วโมง โดย *Aeromonas hydrophila* (Bharagava *et al.*, 2018) และยังมีรายงานว่า *Bacillus albus* DD 1 สามารถกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 (50 mg/l;  $\lambda_{\text{max}} = 553 \text{ nm}$ ) ได้สูงสุดเท่ากับ 98% ภายในเวลา 72 ชั่วโมง ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์ (1% w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน (Srivastava *et al.*, 2022) จากรายงานของ Andrade *et al.* (2013) พบว่า *Phanerochaete chrysosporium* สามารถกำจัดสีย้อม Congo red (50 mg/l;  $\lambda_{\text{max}} = 500 \text{ nm}$ ) ได้

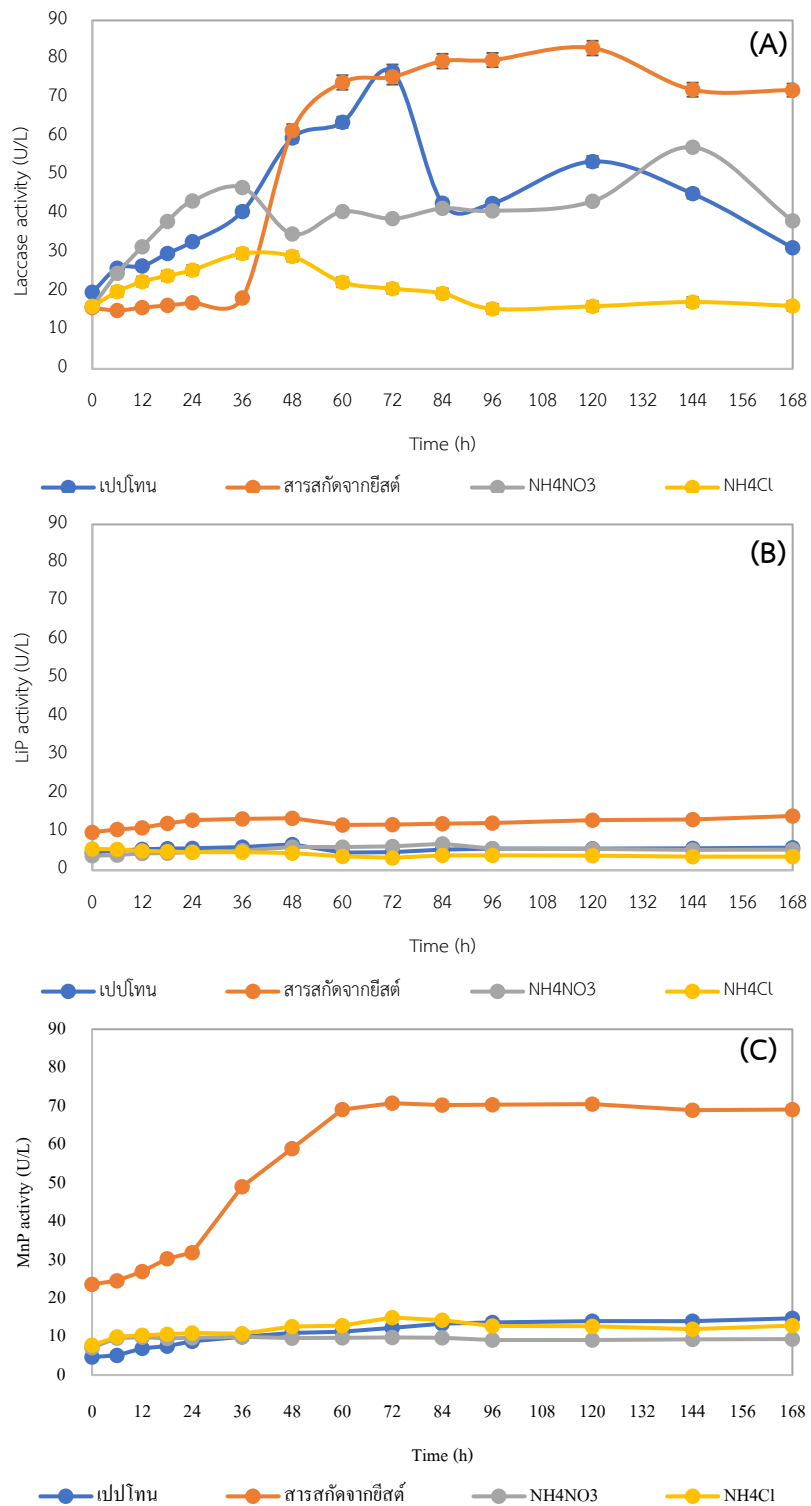
สูงสุด 90% และ 93% ในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรท ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) 0.042 g/l และแอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 0.042 g/l ตามลำดับ เป็นแหล่งไนโตรเจนภายใน 10 วัน นอกจากนี้ ยังมีรายงาน *Aeromonas* sp. DH-6 สามารถกำจัดสีย้อม Methyl orange (100 mg/l;  $\lambda_{\text{max}} = 466$  nm) ได้อย่างสมบูรณ์ (100%) ภายใน 12 ชั่วโมง ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์ (2% w/v) และ 95% ในเวลา 48 ชั่วโมง ในอาหารที่เติม 2% w/v แอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่เมื่อเติม 2% w/v แอมโมเนียมไนเตรท ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) เกิดการยับยั้งการกำจัดสี (Du *et al.*, 2015)

เมื่อวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพแลคเคสที่แหล่งไนโตรเจนต่างกันเป็นเปปโทน สารสกัดจากยีสต์ แอมโมเนียมไนเตรท ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) และแอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) ตามลำดับ ให้ค่ากัมมันตภาพแลคเคสสูงสุดเท่ากับ 76.73 U/L ที่เวลา 72 ชั่วโมง, 82.86 U/L ที่เวลา 120 ชั่วโมง, 57.26 U/L ที่เวลา 144 ชั่วโมง และ 29.78 U/L ที่เวลา 36 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 19 A) ค่ากัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่แหล่งไนโตรเจนต่างกันเป็นเปปโทน สารสกัดจากยีสต์ แอมโมเนียมไนเตรท ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) และแอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) ให้ค่าเท่ากับ 6.73 U/L ที่เวลา 48 ชั่วโมง, 14.12 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง, 6.89 U/L ที่เวลา 96 ชั่วโมง และ 5.53 U/L ที่เวลา 0 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 19 B) และพบว่าค่ากัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเท่า 14.76 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง, 70.55 U/L ที่เวลา 120 ชั่วโมง, 9.95 U/L ที่เวลา 36 ชั่วโมง และ 14.98 U/L ที่เวลา 84 ชั่วโมง สำหรับแหล่งไนโตรเจนต่างกันเป็นเปปโทน สารสกัดจากยีสต์ แอมโมเนียมไนเตรท ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) และแอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) ตามลำดับ (ภาพที่ 19 C)

จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนต่างกันเป็นเปปโทน สารสกัดจากยีสต์ แอมโมเนียมไนเตรท ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) และแอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) ตามลำดับ ที่ใช้จุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 ในอัตราส่วน 1:1 พบว่าที่แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ที่เป็นสารสกัดจากยีสต์ มีประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งสูงสุดและให้ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์สูงสุด และในกรณีที่เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ที่เป็นแอมโมเนียมไนเตรท ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) และแอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) พบว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) สามารถกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอได้สูงสุดในทางตรงกันข้ามพบว่า ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ต่ำสุด ซึ่งไม่สอดคล้องกับประสิทธิภาพการกำจัดสี ดังนั้น จึงเลือกใช้สารสกัดจากยีสต์และแอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) เป็นแหล่งไนโตรเจนในทดลองต่อไป เนื่องจากเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพการกำจัดสีสูงสุด



ภาพที่ 18 ค่า pH และค่าความขุ่นของเซลล์ (OD) (A) และประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอของ ที่แหล่งไนโตรเจนต่างกันเป็นเปปโทน (B) สารสกัดจากยีสต์ (C) แอมโมเนียมไนเตรท (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) (D) และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH<sub>4</sub>Cl) (E) ตามลำดับ



ภาพที่ 19 ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) และกัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) ตามลำดับ ที่แหล่งไนโตรเจนต่างกันเป็น เปปโทน สารสกัดจากยีสต์ แอมโมเนียมไนเตรท (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH<sub>4</sub>Cl)

#### 4.5. ผลการศึกษาอัตราส่วนของปริมาณแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ

อัตราส่วนของกลูโคส (0.1% w/v) ต่อสารสกัดจากยีสต์ (0.3% w/v) ต่อแอมโมเนียมคลอไรด์ (0.6% w/v) ที่อัตราส่วน 1:1:2 พบว่าจุลินทรีย์ผสมสามารถกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอที่เจือจางความเข้มข้น 1000 เท่า ได้สูงสุด 64.28, 75.73, 83.05 และ 86.26% ที่ความยาวคลื่น 425, 509, 595 และ 625 nm ตามลำดับ (ภาพที่ 20 F) ภายใน 168 ชั่วโมง ที่อาหาร pH 7.0 บ่มที่ 37 °C ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่า (48 ชั่วโมง) ตามด้วยสภาวะที่ไม่มีการเขย่า เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ผสมที่ใช้อาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เป็นกลูโคสและสารสกัดจากยีสต์ตามลำดับ พบว่าจุลินทรีย์ผสมที่ใช้อาหารที่ผสมกลูโคส (0.1% w/v) ต่อสารสกัดจากยีสต์ (0.3% w/v) ต่อแอมโมเนียมคลอไรด์ (0.6% w/v) ที่อัตราส่วน 1:1:2 สามารถกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอเพิ่มขึ้น 20% ที่ความยาวคลื่น 425 และ 509 nm และพบว่าที่อัตราส่วน 0:1:1, 1:1:1, 2:1:1, และ 1:2:1 สามารถกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งเท่ากับ 38.71, 48.68, 54.11 และ 52.27% ตามลำดับ ที่ความยาวคลื่น 425 nm 43.57, 60.56, 68.16 และ 75.73% ตามลำดับ ที่ 509 nm ที่ความยาวคลื่น 595 สามารถกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งเท่ากับ 75.70, 71.23, 79.07 และ 77.52% และที่ความยาวคลื่น 625 nm เท่ากับ 79.02, 77.08, 83.15 และ 81.25% สำหรับอัตราส่วน 0:1:1, 1:1:1, 2:1:1, และ 1:2:1 ตามลำดับ ภายในเวลา 168 ชั่วโมง (ภาพที่ 20 B, C, D และ E) Srivastava *et al.* (2022) รายงานว่าประสิทธิภาพการกำจัดสีเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ (1% w/v) ซึ่งสามารถกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 (50 mg/L;  $\lambda_{\max}$  = 553 nm) ได้สูงสุดเท่ากับ 98% ภายในเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งแหล่งไนโตรเจนเป็นสารอาหารที่สำคัญที่เป็นตัวช่วยหลักในการย่อยสลายสี ซึ่งไนเมแทบอลิซึมของสารสกัดจากยีสต์เป็นขั้นตอนสำคัญในการสร้าง NADH ซึ่งทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนเมื่อการรีดิวซ์ของพันธะเอโซ (Behzat, 2015)

จากการวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์ที่อัตราส่วนของกลูโคส (0.1% w/v) ต่อสารสกัดจากยีสต์ (0.3% w/v) ต่อแอมโมเนียมคลอไรด์ (0.3% w/v) ที่อัตราส่วน 0:1:1, 1:1:1, 2:1:1, 1:2:1 และ 1:1:2 ให้ค่ากัมมันตภาพแลคเคสสูงสุดเท่ากับ 37.71 U/L ที่เวลา 0 ชั่วโมง, 55.44 U/L ที่เวลา 0 ชั่วโมง, 42.43 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง, 35.32 U/L ที่เวลา 0 ชั่วโมง และ 55.53 U/L ที่เวลา 144 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 21 A) ค่ากัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่อัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนเดียวกับมีค่าเท่ากับ 8.73 U/L ที่เวลา 36 ชั่วโมง, 10.02 U/L ที่เวลา 72 ชั่วโมง, 12.65 U/L ที่เวลา 96 ชั่วโมง, 13.82 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง และ 4.54 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 21 B) และพบว่าค่ากัมมันตภาพแมงกานีส

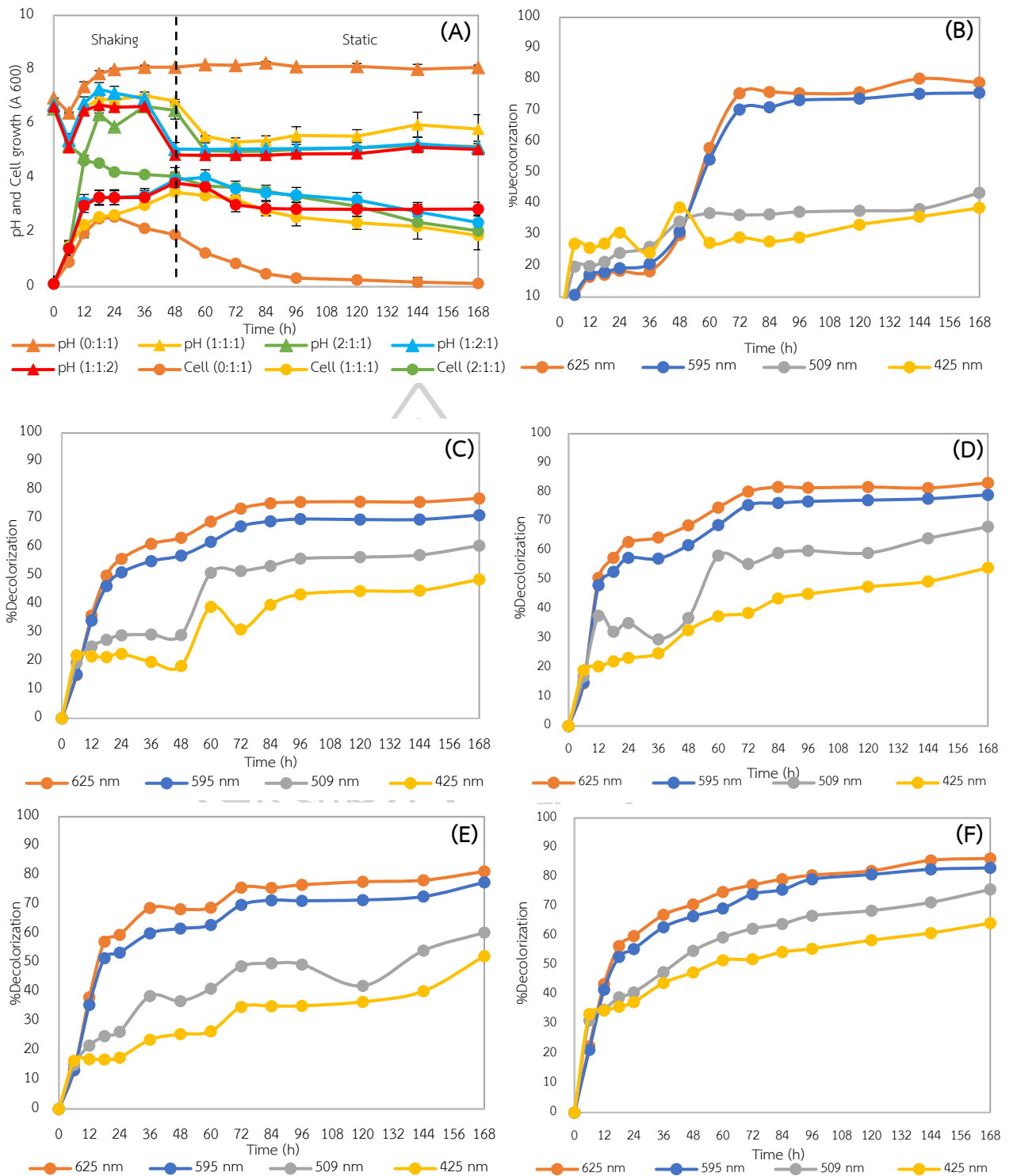
เปอร์ออกซิเดสเท่า 9.62 U/L ที่เวลา 48 ชั่วโมง, 19.35 U/L ที่เวลา 144 ชั่วโมง, 20.42 U/L ที่เวลา 48 ชั่วโมง, 22.03 U/L ที่เวลา 60 ชั่วโมง และ 28.74 U/L ที่เวลา 84 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 21 C) และเมื่อวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพเอโซรีดักทดสอบว่ามีค่าเท่ากับ 7.84 U/L ที่เวลา 72 ชั่วโมง, 9.38 U/L ที่เวลา 60 ชั่วโมง, 10.79 U/L ที่เวลา 96 ชั่วโมง, 10.77 U/L ที่เวลา 144 ชั่วโมง และ 11.98 U/L ที่เวลา 84 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 21 D) สำหรับอัตราส่วนของกลูโคส (0.1% w/v) ต่อสารสกัดจากยีสต์ (0.3% w/v) ต่อแอมโมเนียมคลอไรด์ (0.3% w/v) ที่อัตราส่วน 0:1:1, 1:1:1, 2:1:1, 1:2:1 และ 1:1:2 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายในเซลล์ที่อัตราส่วนของกลูโคส (0.1% w/v) ต่อสารสกัดจากยีสต์ (0.3% w/v) ต่อแอมโมเนียมคลอไรด์ (0.3% w/v) ที่อัตราส่วน 0:1:1, 1:1:1, 2:1:1, 1:2:1 และ 1:1:2 ให้ค่ากัมมันตภาพแลคเคสสูงสุดเท่ากับ 19.48 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง, 23.61 U/L ที่เวลา 60 ชั่วโมง, 24.89 U/L ที่เวลา 24 ชั่วโมง, 24.89 U/L ที่เวลา 48 ชั่วโมง และ 13.02 U/L ที่เวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 22 A) ค่ากัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่อัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนเดียวกันกับมีค่าเท่ากับ 12.72 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง, 12.51 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง, 13.68 U/L ที่เวลา 36 ชั่วโมง, 13.51 U/L ที่เวลา 6 ชั่วโมง และ 12.24 U/L ที่เวลา 84 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 22 B) และพบว่าค่ากัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเท่า 5.54 U/L ที่เวลา 144 ชั่วโมง, 8.82 U/L ที่เวลา 96 ชั่วโมง, 17.83 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง, 16.43 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง และ 12.24 U/L ที่เวลา 120 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 22 C) และเมื่อวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพเอโซรีดักทดสอบว่า มีค่าเท่ากับ 12.16 U/L ที่เวลา 12 ชั่วโมง, 11.56 U/L ที่เวลา 24 ชั่วโมง, 10.53 U/L ที่เวลา 24 ชั่วโมง, 11.33 U/L ที่เวลา 12 ชั่วโมง และ 12.17 U/L ที่เวลา 12 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 19 D) สำหรับอัตราส่วนของกลูโคส (0.1% w/v) ต่อสารสกัดจากยีสต์ (0.3% w/v) ต่อแอมโมเนียมคลอไรด์ (0.3% w/v) ที่อัตราส่วน 0:1:1, 1:1:1, 2:1:1, 1:2:1 และ 1:1:2 ตามลำดับ

จากการศึกษาอัตราส่วนของกลูโคส (0.1% w/v) ต่อสารสกัดจากยีสต์ (0.3% w/v) ต่อแอมโมเนียมคลอไรด์ (0.3% w/v) ที่ใช้จุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 อัตราส่วน 1:1 พบว่าในอัตราส่วน 1:1:2 มีประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอสูงสุด และมีค่ากัมมันตภาพแลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอโซรีดักทดสอบภายนอกเซลล์สูงสุด แต่พบว่าค่ากัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีค่าน้อยสุด ซึ่งไม่สอดคล้องกับประสิทธิภาพการกำจัดสี และเมื่อเทียบกับค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายในเซลล์ พบว่าค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์สูงกว่า

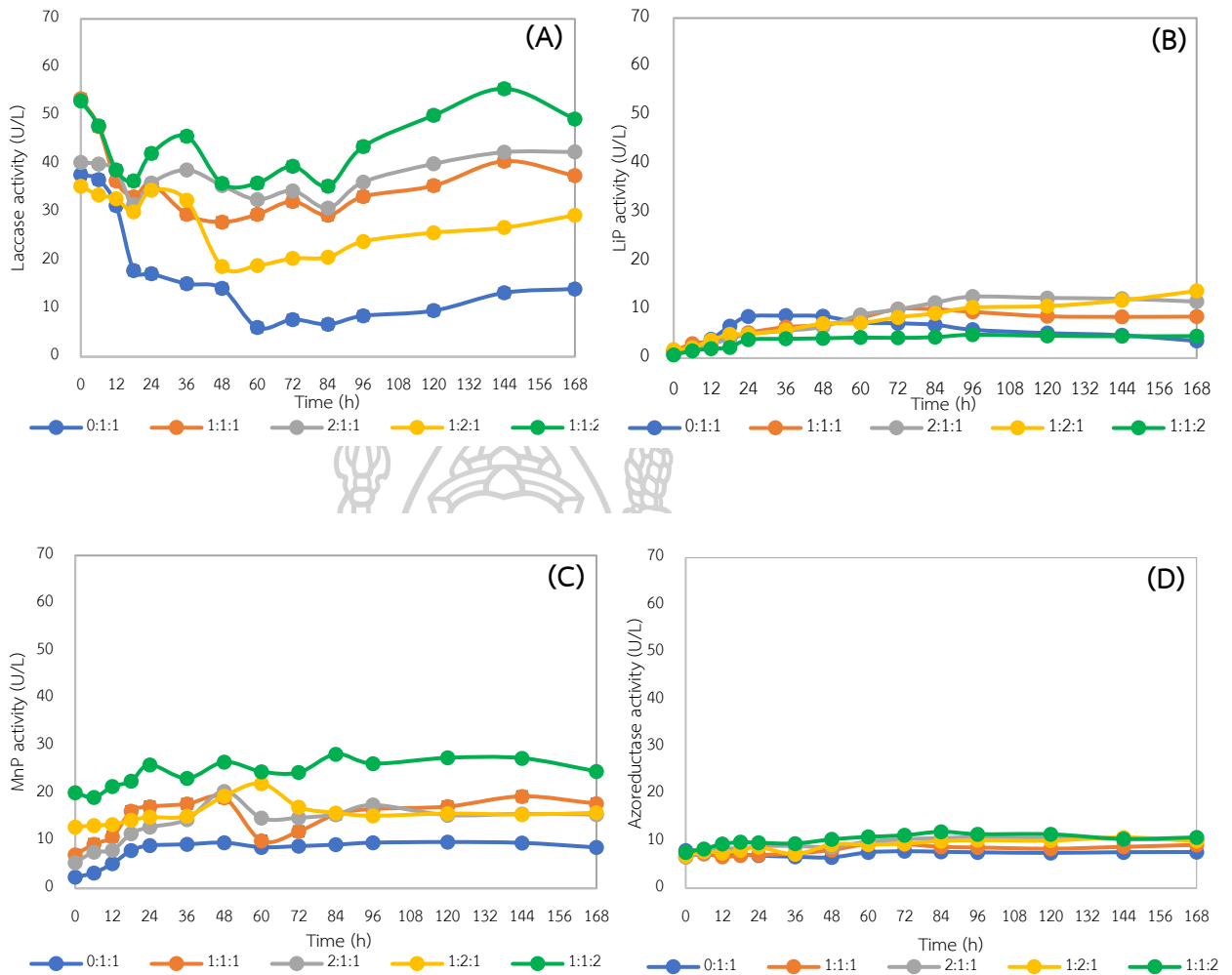


ค่ากัมมันตภาพภายในเซลล์ นอกจากนี้ ยังพบว่าจุลินทรีย์ผสมในอาหารที่อัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่ 1:1:2 มีประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอสูงกว่าจุลินทรีย์ผสมในอาหารที่มีสารสกัดยีสต์หรือแอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) เพียงอย่างเดียว ดังนั้น จึงเลือกใช้อาหารในอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน ที่ 1:1:2 (0.1% w/v กลูโคส ต่อ 0.3% w/v สารสกัดจากยีสต์ ต่อ 0.6% w/v แอมโมเนียมคลอไรด์) ในการทดลองถัดไป

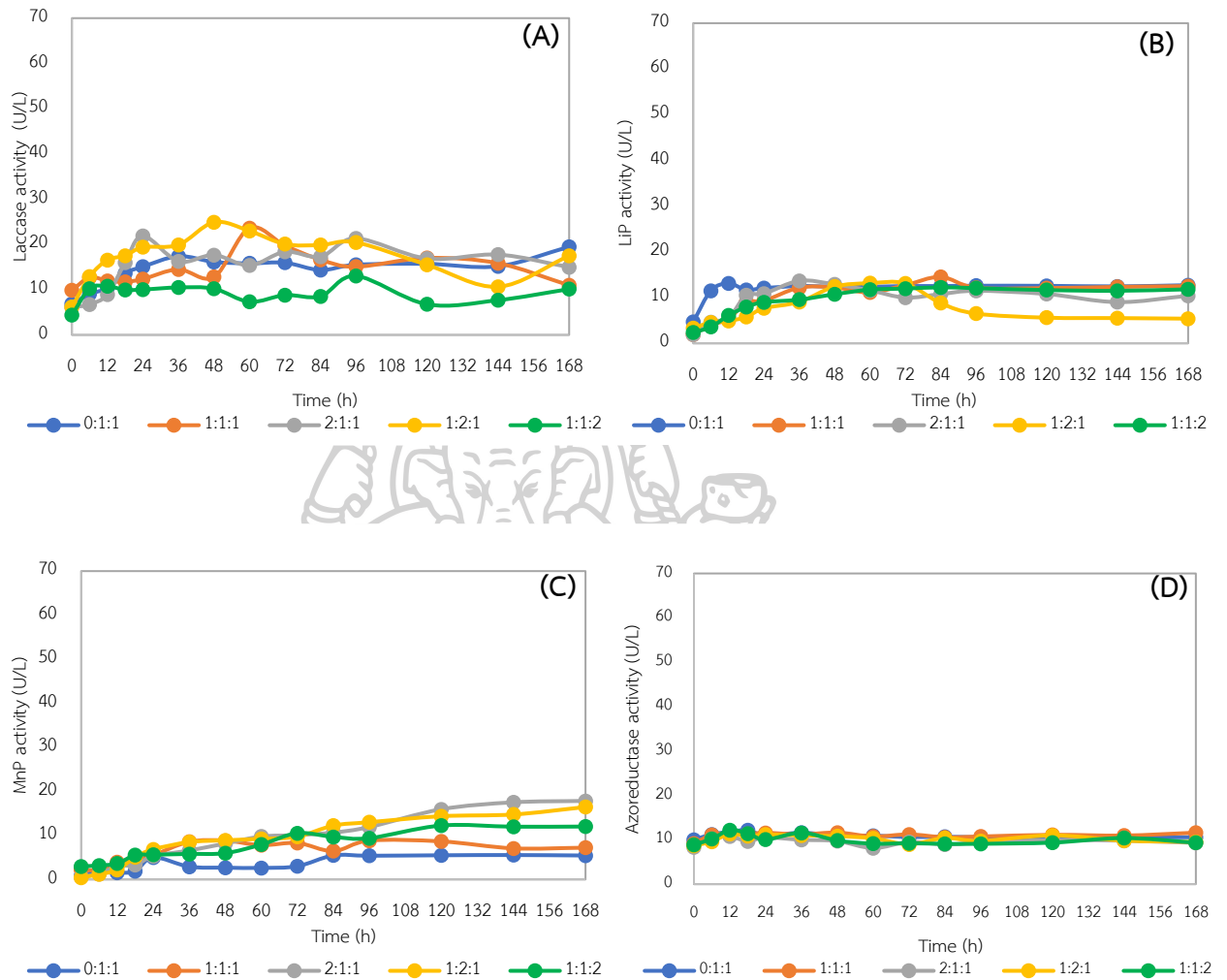




ภาพที่ 20 ค่า pH และค่าความขุ่นของเซลล์ (OD) (A) และประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอของ อัตราส่วนของ กลูโคส (1.0% w/v) ต่อสารสกัดจากยีสต์ (0.3% w/v) ต่อแอมโมเนียมคลอไรด์ (0.3% w/v) ที่อัตราส่วนต่างกัน ได้แก่ 0:1:1 (B), 1:1:1 (C), 2:1:1 (D), 1:2:1 (E) และ 1:1:2 (F) ตามลำดับ



ภาพที่ 21 ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์ (Extracellular) ได้แก่ ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) กัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) และกัมมันตภาพเอโซรีดักเทส (D) ตามลำดับ ที่อัตราส่วนของกลูโคส (1.0% w/v) ต่อสารสกัดจากยีสต์ (0.3% w/v) ต่อแอมโมเนียมคลอไรด์ (0.3% w/v) ที่อัตราส่วนต่างกัน ได้แก่ 0:1:1, 1:1:1, 2:1:1, 1:2:1 และ 1:1:2



ภาพที่ 22 ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายในเซลล์ (Intracellular) ได้แก่ ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) กัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) และกัมมันตภาพเอโซรีดักเทส (D) ตามลำดับ ที่อัตราส่วนของกลูโคส (1.0% w/v) ต่อสารสกัดจากยีสต์ (0.3% w/v) ต่อแอมโมเนียมคลอไรด์ (0.3% w/v) ที่อัตราส่วนต่างกัน ได้แก่ 0:1:1, 1:1:1, 2:1:1, 1:2:1 และ 1:1:2

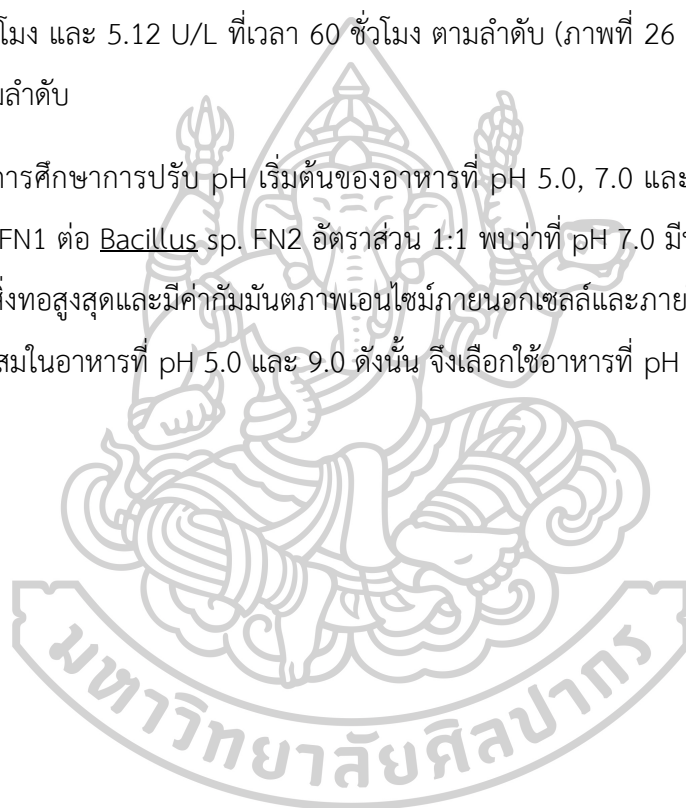
#### 4.6. ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอ

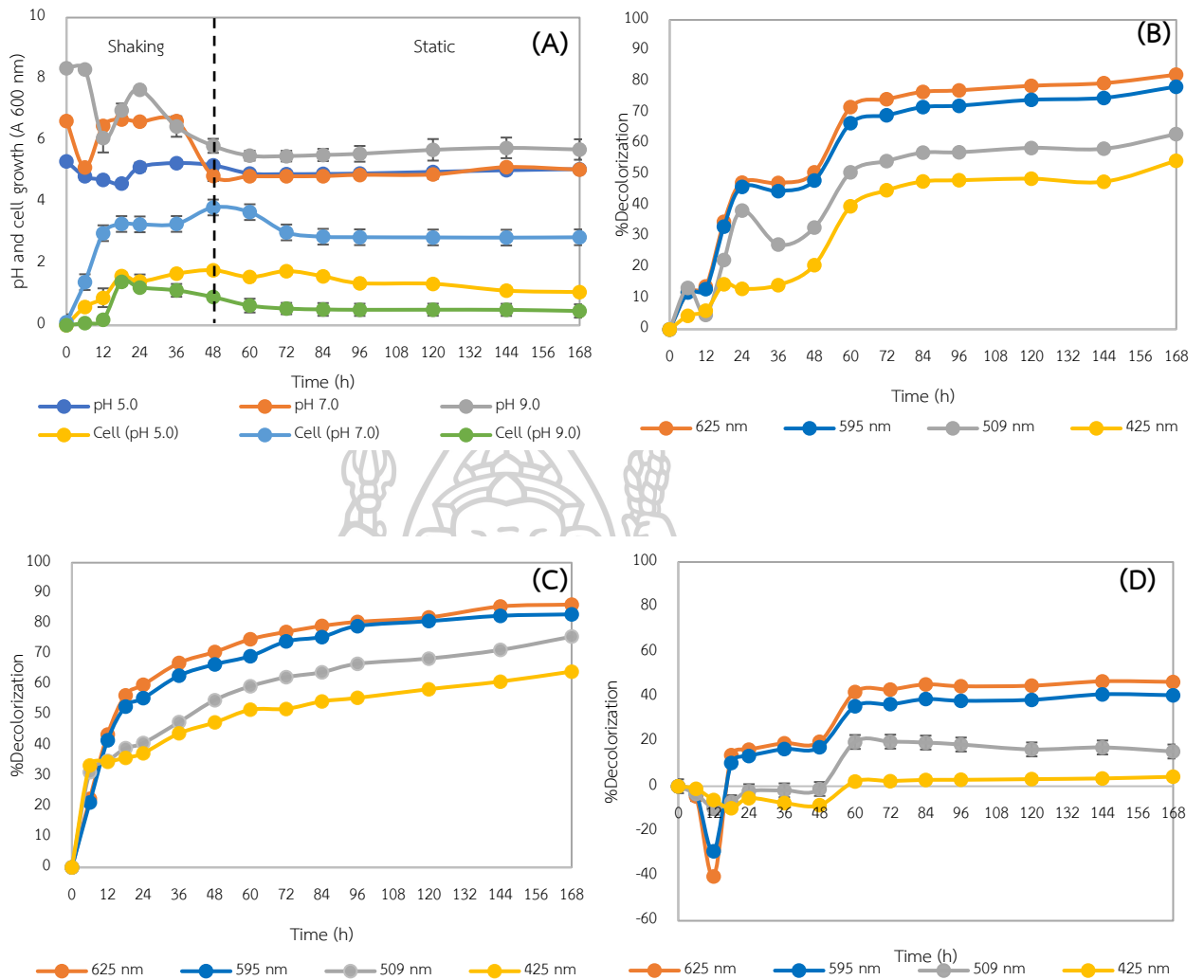
จากการทดลองใช้จุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 กำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอที่เจือจางความเข้มข้น 1000 เท่า ศึกษาที่ค่า pH ตั้งแต่ pH 5.0, 7.0 และ 9.0 ปรับ pH ของอาหารด้วย 0.1 M HCl และ 0.1 M NaOH ควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่าที่ 150 rpm (48 ชั่วโมง) ตามด้วยสภาวะที่ไม่มีการเขย่า พบว่าที่ pH 7.0 จุลินทรีย์ผสมมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอได้มากที่สุด 64.28, 75.73, 83.05 และ 86.26% ที่ความยาวคลื่น 425, 509, 595 และ 625 nm ตามลำดับ (ภาพที่ 23 C) ภายใน 168 ชั่วโมง และที่อาหาร pH 5.0 และ 9.0 พบว่าสามารถกำจัดสีน้ำทิ้งที่ความยาวคลื่นเดียวกันได้เท่ากับ 54.44, 63.12, 78.44 และ 82.29% ตามลำดับ (ภาพที่ 21 B) และ 4.23, 15.50, 40.60 และ 46.55% สำหรับ pH 9.0 ที่ความยาวคลื่น 425, 509, 595 และ 625 nm ตามลำดับ (ภาพที่ 23 D) และพบว่าที่ความยาวคลื่น 400-700 nm ลดลง เมื่อเวลาผ่านไปและลักษณะสีของน้ำทิ้งหลังการบำบัดแต่ละ pH แตกต่างกันดังแสดงในภาพที่ 24 จากการรายงานของ Velusamy *et al.* (2022) พบว่า *Aeromonas hydrophila* สามารถกำจัดสีย้อม Methyl orange (20 mg/L;  $\lambda_{max} = 466$  nm) ได้ 85% ที่ pH 7.0 ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยของ Akansha *et al.* (2019) รายงานว่าสีย้อม Methyl orange (150 mg/L;  $\lambda_{max} = 468$  nm) ย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ที่ pH 7.0 โดยใช้ *Bacillus stratophericus* SCA1007 และ *Aeromonas hydrophila* สามารถกำจัดสีย้อม Crystal violet (100 mg/L;  $\lambda_{max} = 590$  nm) ได้สูงสุด 99.99% ที่ pH 7.0 (Bharagava *et al.*, 2018) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า *Bacillus subtilis* สามารถกำจัดสีย้อม Reactive blue 160 (500mg/L;  $\lambda_{max} = 630$  nm) ได้อย่างสมบูรณ์ที่ pH 7.0 (Barathi *et al.*, 2020)

จากการวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์ที่ pH 5.0, 7.0 และ 9.0 ให้ค่ากัมมันตภาพแลคเคสสูงสุดเท่ากับ 42.95 U/L ที่เวลา 24 ชั่วโมง, 55.53 U/L ที่เวลา 144 ชั่วโมง และ 37.20 U/L ที่เวลา 36 ตามลำดับ (ภาพที่ 25 A) ค่ากัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ pH เดียวกันมีค่าเท่ากับ 8.07 U/L ที่เวลา 36 ชั่วโมง, 4.54 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง และ 7.03 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 25 B) และพบว่าค่ากัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส เท่า 14.14 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง, 28.74 U/L ที่เวลา 84 ชั่วโมง, และ 6.76 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 25 C) และเมื่อวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพเอโซรีดักเทสพบว่ามีค่าเท่ากับ 8.34 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง, 11.98 U/L ที่เวลา 84 ชั่วโมง และ 6.76 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 25 D) สำหรับ pH 5.0, 7.0 และ 9.0 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ

ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายในเซลล์ที่ pH 5.0, 7.0 และ 9.0 ให้ค่ากัมมันตภาพแลคเคสสูงสุดเท่ากับ 10.98 U/L ที่เวลา 48 ชั่วโมง, 13.02 U/L ที่เวลา 96 ชั่วโมง และ 13.59 U/L ที่เวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 26 A) ค่ากัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ pH เดียวกันมีค่าเท่ากับ 0.80 U/L ที่เวลา 72 ชั่วโมง, 13.15 U/L ที่เวลา 60 ชั่วโมง และ 0.82 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 26 B) และพบว่าค่ากัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเท่า 3.19 U/L ที่เวลา 12 ชั่วโมง, 16.43 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง และ 3.16 U/L ที่เวลา 12 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 26 C) และเมื่อวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพเอไซรีดักเทสพบว่ามีค่าเท่ากับ 1.29 U/L ที่เวลา 24 ชั่วโมง, 12.17 U/L ที่เวลา 12 ชั่วโมง และ 5.12 U/L ที่เวลา 60 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 26 D) สำหรับ pH 5.0, 7.0 และ 9.0 ตามลำดับ

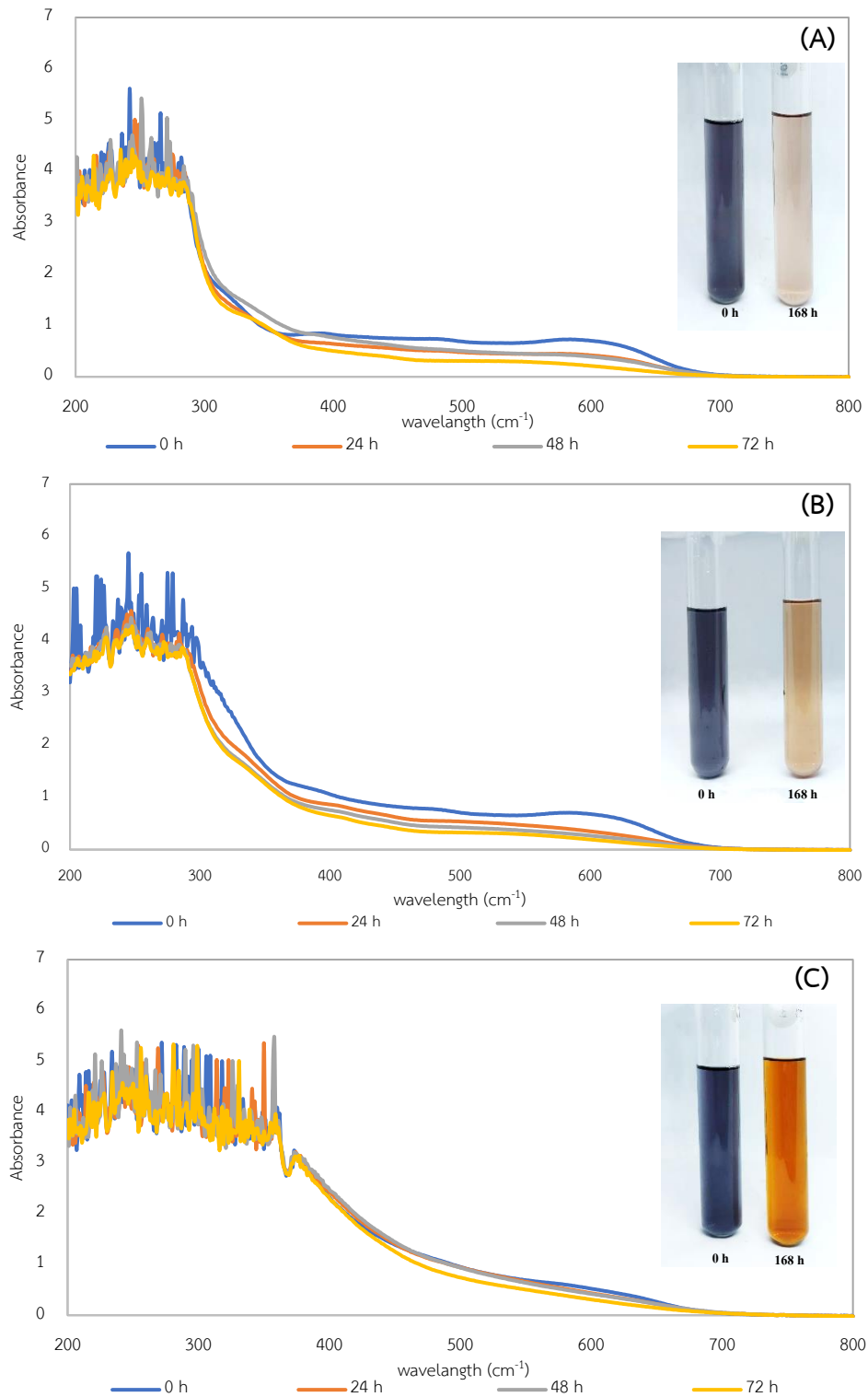
จากการศึกษาการปรับ pH เริ่มต้นของอาหารที่ pH 5.0, 7.0 และ 9.0 ที่ใช้จุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 อัตราส่วน 1:1 พบว่าที่ pH 7.0 มีประสิทธิภาพการกำจัดกลิ่นที่โรงงานสิ่งทอสูงสุดและมีค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์และภายในเซลล์สูงสุด เมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ผสมในอาหารที่ pH 5.0 และ 9.0 ดังนั้น จึงเลือกใช้อาหารที่ pH 7.0 ในการทดลองถัดไป



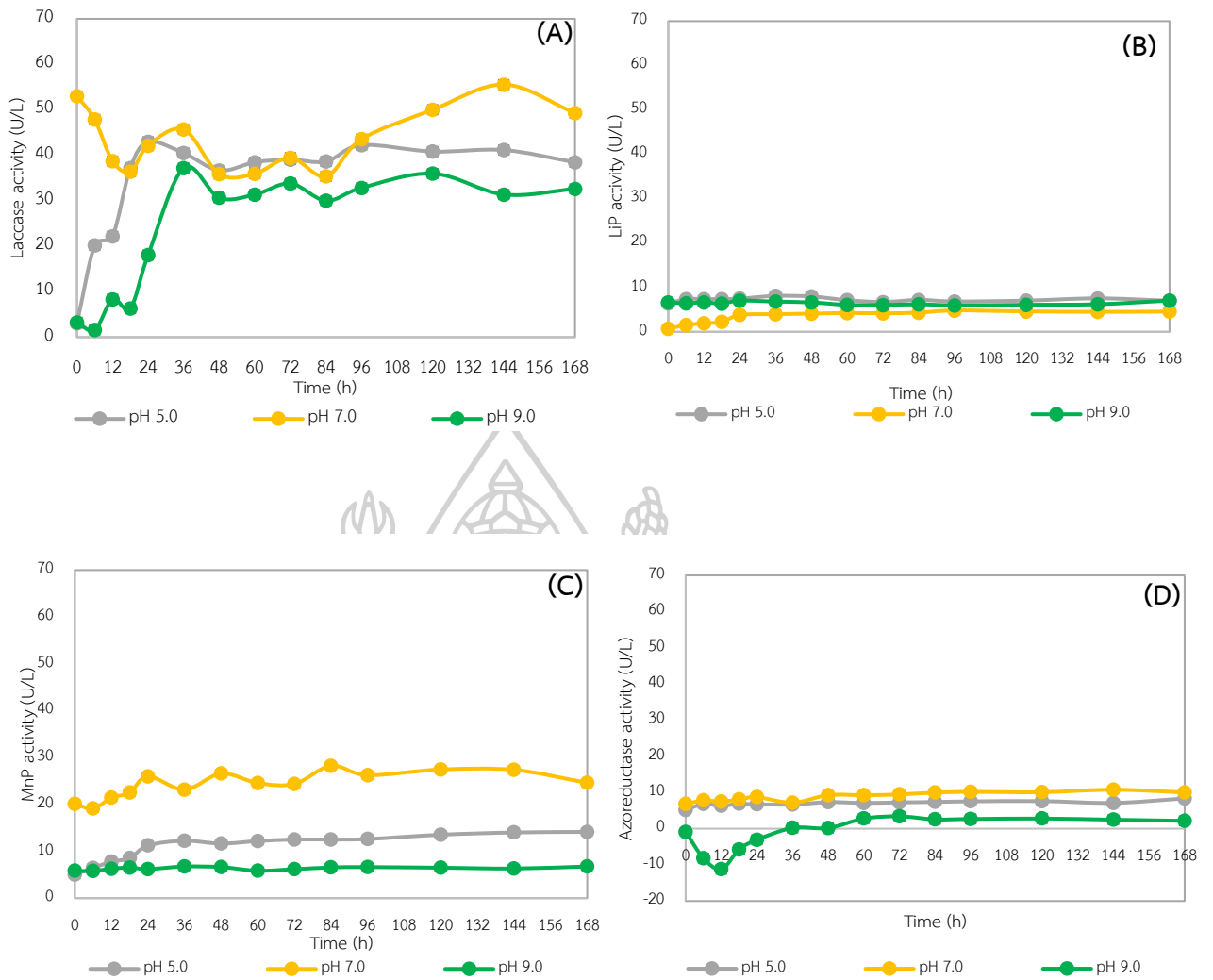


ภาพที่ 23 ค่า pH และค่าความขุ่นของเซลล์ (OD) (A) และประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอของจุลินทรีย์ผสมที่ pH ต่างกัน ได้แก่ pH 5.0 (B), 7.0 (C) และ 9.0 (D) ตามลำดับ

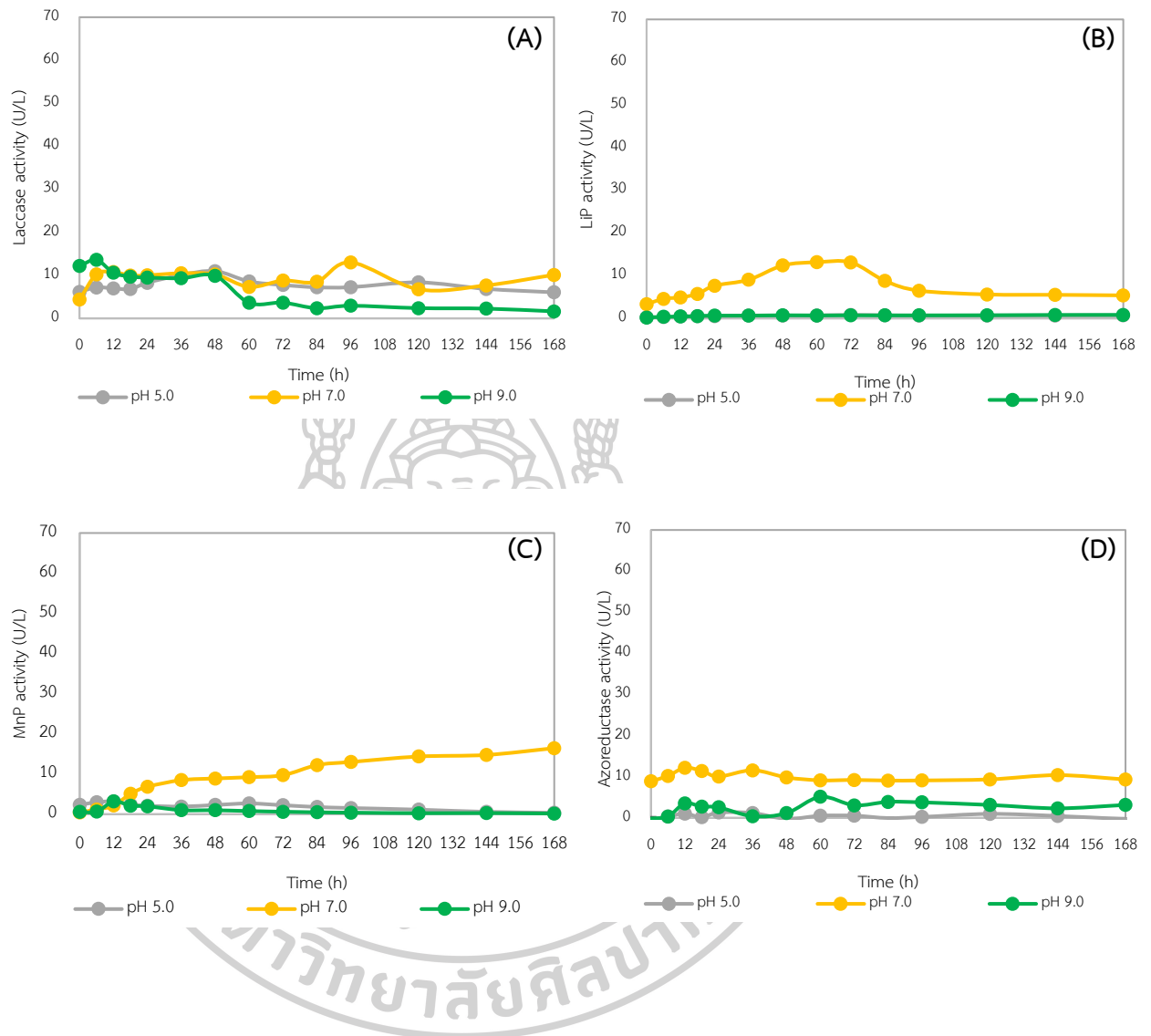




ภาพที่ 24 UV-Vis spectrum ของสีย้อมน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอ ก่อนและหลังบำบัดด้วยจุลินทรีย์ผสม ที่ pH เริ่มต้นต่างกัน ได้แก่ pH 5.0 (A), 7.0 (B) และ 9.0 (C)



ภาพที่ 25 ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์ (Extracellular) ได้แก่ ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) กัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) และกัมมันตภาพเอโซเรดักเตส (D) ตามลำดับ ที่ pH ต่างกัน ได้แก่ pH 5.0, 7.0 และ 9.0



ภาพที่ 26 ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายในเซลล์ (Intracellular) ได้แก่ ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) กัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) และกัมมันตภาพเอโซรีดักเทส (D) ตามลำดับ ที่ pH ต่างกัน ได้แก่ pH 5.0, 7.0 และ 9.0

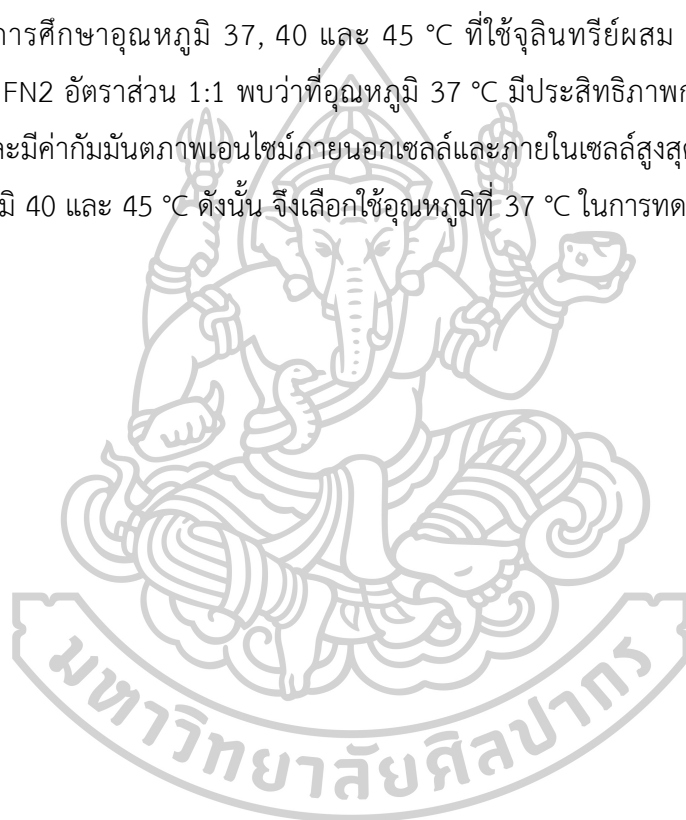
#### 4.7. ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอ

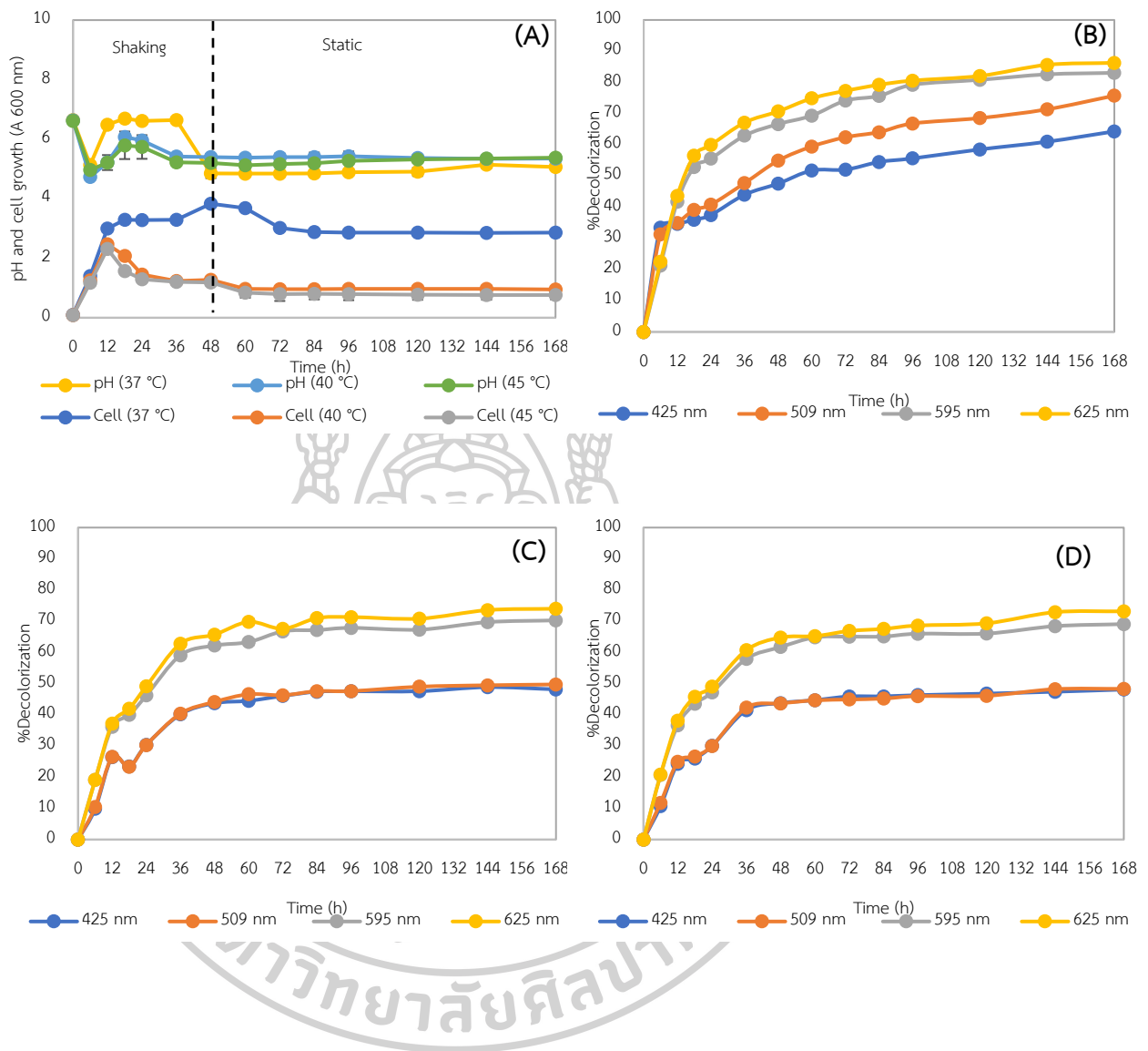
จากการศึกษาที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอที่อุณหภูมิ 37, 40 และ 45 °C โดยจุลินทรีย์ผสมที่ความเข้มข้นสีน้ำทิ้งเริ่มต้นเจือจาง 1000 เท่า ควบคุมสภาวะที่ pH 7.0 ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่าที่ 150 rpm (48 ชั่วโมง) ตามด้วยสภาวะที่ไม่มีการเขย่า พบว่าอุณหภูมิ 37 °C เหมาะสมต่อการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอ มีประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอได้มากที่สุด 64.28, 75.73, 83.05 และ 86.26% ที่ความยาวคลื่น 425, 509, 595 และ 625 nm ตามลำดับ (ภาพที่ 27 B) ภายใน 168 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 40 และ 45 °C พบว่าสามารถกำจัดสีน้ำทิ้งที่ความยาวคลื่นเดียวกันได้เท่ากับ 48.13, 49.72, 70.26 และ 73.98% ตามลำดับ (ภาพที่ 27 C) และ 48.09, 48.30, 69.06 และ 73.14 % สำหรับ pH 9.0 ที่ความยาวคลื่น 425, 509, 595 และ 625 nm ตามลำดับ (ภาพที่ 27 D) ภายใน 168 ชั่วโมง จากรายงานของ Balapure *et al.* (2014) พบว่าที่อุณหภูมิ 37 °C กลุ่มแบคทีเรีย BND สามารถกำจัดสีย้อม Reactive blue 160 (100 mg/L;  $\lambda_{\max} = 630$  nm) ได้อย่างสมบูรณ์ ภายใน 4 ชั่วโมง และ *Bacillus subtilis* สามารถกำจัด Reactive blue 160 (500 mg/L;  $\lambda_{\max} = 630$  nm) ได้อย่างสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 37 °C ยังมีรายงานว่า *Bacillus albus* DD1 สามารถกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 (50mg/L; ;  $\lambda_{\max} = 597$  nm) ได้สุด 60% ที่อุณหภูมิ 30 °C และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 40 °C สามารถเพิ่มการกำจัดสีเป็น 75% (Srivastava *et al.*, 2022) การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิส่งผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เป็นอย่างมาก ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิสูงกิจกรรมของจุลินทรีย์จะลดลงอย่างมาก เนื่องจากอัตราการเติบโตที่ช้าและการหยุดทำงานของเอนไซม์ซึ่งมีหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการกำจัดสีย้อมและการกำจัดสีก็จะลดลง (Karim *et al.*, 2018)

จากการวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์ที่อุณหภูมิ 37, 40 และ 45 °C ให้ค่ากัมมันตภาพแลคเคสสูงสุดเท่ากับ 55.53 U/L ที่เวลา 144 ชั่วโมง, 40.74 U/L ที่เวลา 60 ชั่วโมง และ 35.72 U/L ที่เวลา 12 ตามลำดับ (ภาพที่ 28 A) ค่ากัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่อุณหภูมิเดียวกันมีค่าเท่ากับ 4.80 U/L ที่เวลา 96 ชั่วโมง, 12.47 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง และ 12.69 U/L ที่เวลา 120 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 28 B) และพบว่าค่ากัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเท่ากับ 19.35 U/L ที่เวลา 144 ชั่วโมง, 11.97 U/L ที่เวลา 60 ชั่วโมง, และ 14.67 U/L ที่เวลา 72 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 28 C) และเมื่อวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพเอโซรีดักเทส พบว่ามีค่าเท่ากับ 11.98 U/L ที่เวลา 84 ชั่วโมง, 4.63 U/L ที่เวลา 36 ชั่วโมง และ 3.39 U/L ที่เวลา 60 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 28 D) สำหรับอุณหภูมิ 37, 40 และ 45 °C ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายในเซลล์ที่อุณหภูมิ 37, 40 และ 45 °C ให้ค่ากัมมันตภาพแลคเคสสูงสุดเท่ากับ 13.02 U/L ที่เวลา 96 ชั่วโมง, 15.12 U/L ที่เวลา 12 ชั่วโมง และ 12.51 U/L ที่เวลา

24 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 29 A) ค่ากัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่อุณหภูมิเดียวกันมีค่าเท่ากับ 13.15 U/L ที่เวลา 60 ชั่วโมง, 0.83 U/L ที่เวลา 60 ชั่วโมง และ 0.78 U/L ที่เวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 29 B) และพบว่าค่ากัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเท่า 16.43 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง, 2.03 U/L ที่เวลา 60 ชั่วโมง และ 1.81 U/L ที่เวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 29 C) และเมื่อวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพเอโซรีดักเทสพบว่ามีค่าเท่ากับ 12.17 U/L ที่เวลา 12 ชั่วโมง, 2.75 U/L ที่เวลา 12 ชั่วโมง และ 3.48 U/L ที่เวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 29 D) สำหรับ อุณหภูมิ 37, 40 และ 45 °C ตามลำดับ

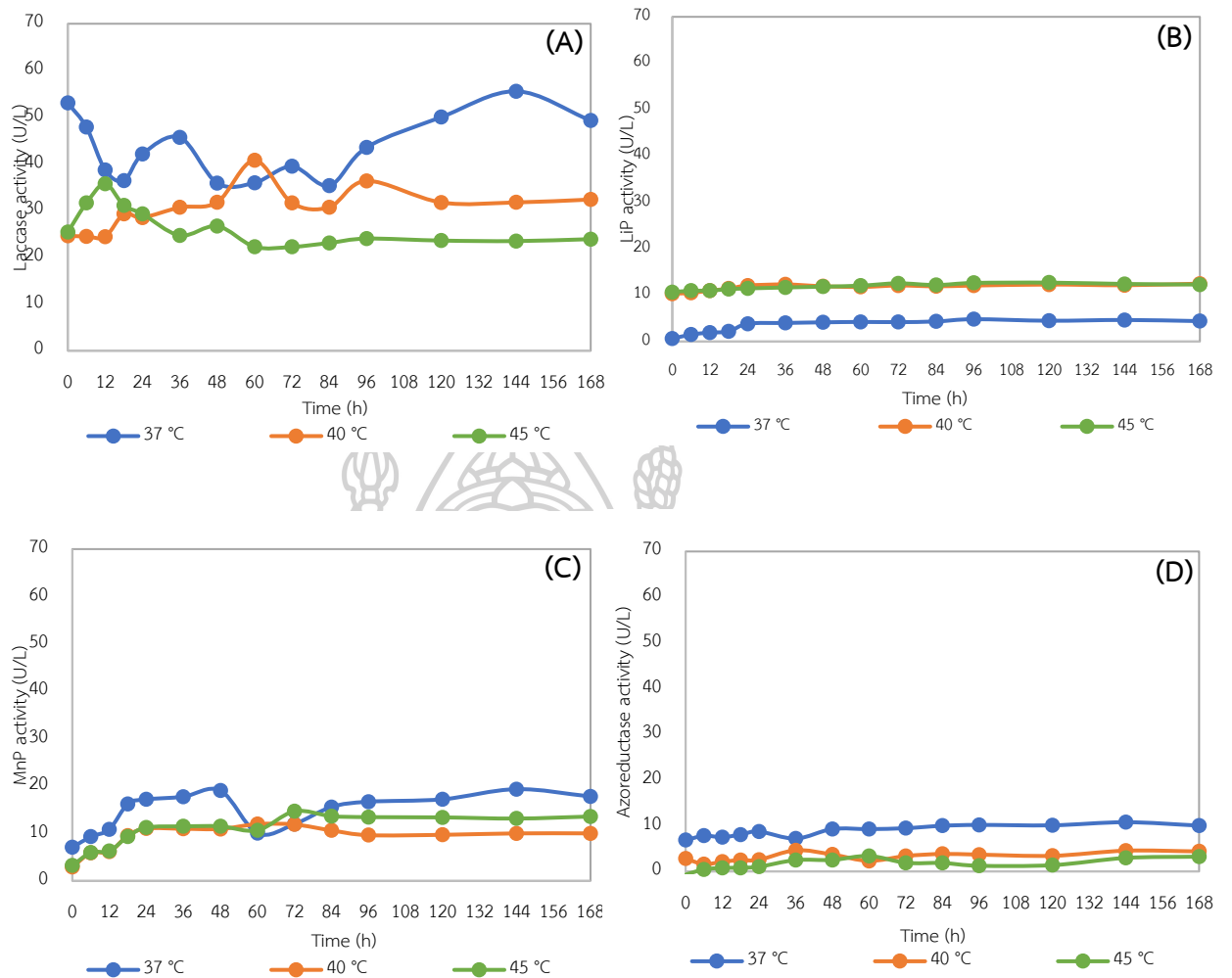
จากการศึกษาอุณหภูมิ 37, 40 และ 45 °C ที่ใช้จุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 อัตราส่วน 1:1 พบว่าที่อุณหภูมิ 37 °C มีประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงาน สิ่งทอสูงสุดและมีค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์และภายในเซลล์สูงสุด เมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ผสมในอุณหภูมิ 40 และ 45 °C ดังนั้น จึงเลือกใช้อุณหภูมิที่ 37 °C ในการทดลองถัดไป



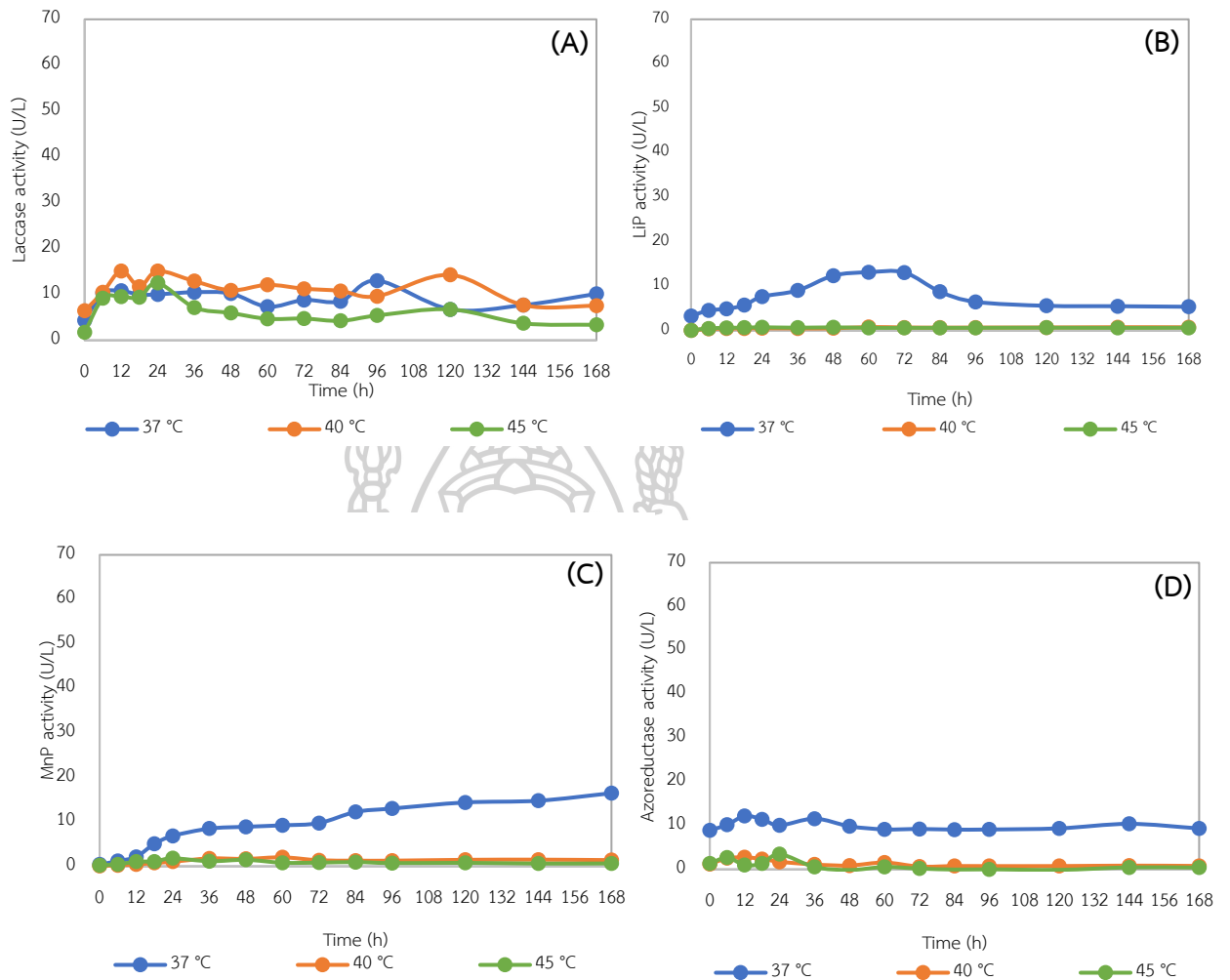


ภาพที่ 27 ค่า pH และค่าความขุ่นของเซลล์ (OD) (A) และประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอของจุลินทรีย์ผสมที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ได้แก่ 37 (B), 40 (C), และ 45 °C (D) ตามลำดับ





ภาพที่ 28 ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์ (Extracellular) ได้แก่ ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิพินินเปอร์ออกซิเดส (B) กัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) และกัมมันตภาพเอไซรีดักเทส (D) ตามลำดับ ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ได้แก่ 37 (B), 40 (C), และ 45 °C (D) ตามลำดับ



ภาพที่ 29 แสดงค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายในเซลล์ (Intracellular) ได้แก่ ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) กัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) และกัมมันตภาพเอไซรีดักเทส (D) ตามลำดับ ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ได้แก่ 37 (B), 40 (C), และ 45 °C (D) ตามลำดับ

#### 4.8. ผลการศึกษาความเข้มข้นสีย้อมเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอ

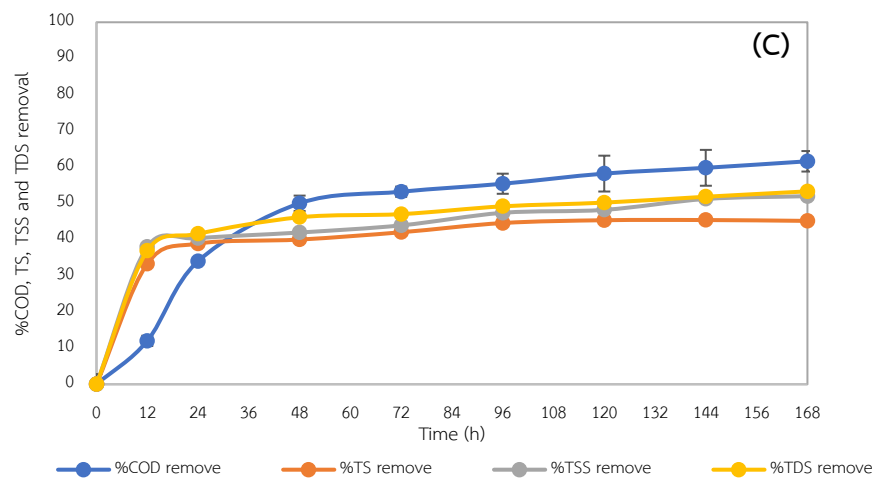
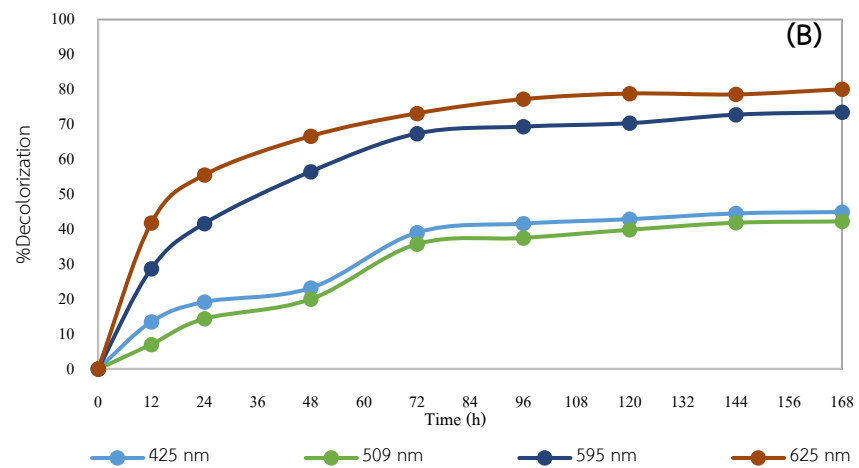
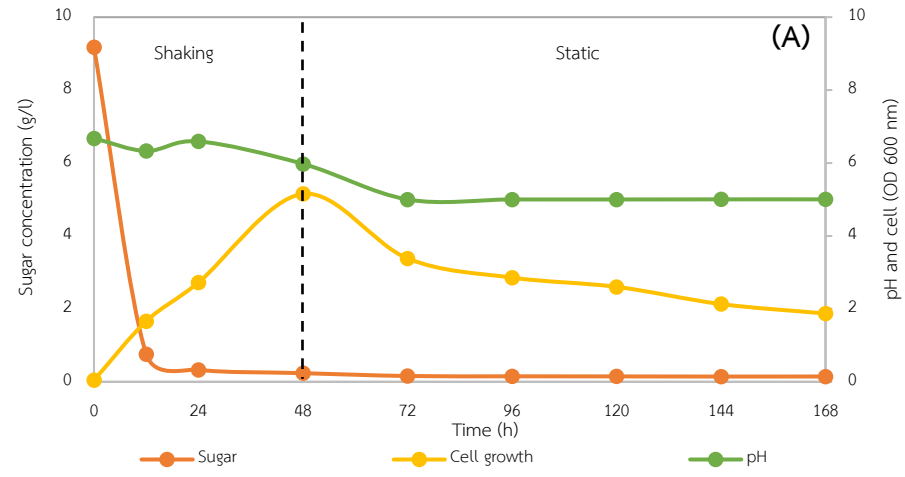
จากการทดลองใช้จุลินทรีย์ผสม Bacillus sp. FN1 ต่อ Bacillus sp FN2 กำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอที่เจือจางความเข้มข้นเริ่มต้น 100 เท่า, 500 เท่า และ 1000 เท่า ควบคุมสภาวะที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่าที่ 150 rpm (48 ชั่วโมง) ตามด้วยสภาวะที่ไม่มีการเขย่า พบว่าความเข้มข้นสีย้อมเริ่มต้นที่ 1000 เท่า มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอได้มากที่สุด 64.28, 75.73, 83.05 และ 86.26% ที่ความยาวคลื่น 425, 509, 595 และ 625 nm ตามลำดับ (ภาพที่ 32 B) ภายใน 168 ชั่วโมง และที่ ความเข้มข้นสีย้อม 100 เท่า พบว่าสามารถกำจัดสีน้ำทิ้งที่ความยาวคลื่นเดียวกันได้เท่ากับ 44.92, 42.21, 73.47 และ 80.05% ตามลำดับ (ภาพที่ 30 B) และ 55.73, 58.75, 68.54 และ 76.60% สำหรับความเข้มข้นสีย้อม 500 เท่า (ภาพที่ 31 B) ที่ความยาวคลื่น 425, 509, 595 และ 625 nm ตามลำดับ ในการวิเคราะห์ค่า COD พบว่าจุลินทรีย์ผสมสามารถลดค่า COD ได้มากที่สุด 93.94% ในเวลา 168 ชั่วโมง (ภาพที่ 32 C) ที่ความเข้มข้นสีย้อมเริ่มต้น 1,000 เท่า ในทางตรงกันข้ามที่ความเข้มข้นสีย้อมที่ 100 และ 500 เท่า สามารถลดค่า COD ได้เพียง 61.60 และ 55.58% ใน 168 ชั่วโมง (ภาพที่ 30 B และ 31 B) และเมื่อวิเคราะห์การกำจัดปริมาณของแข็งในน้ำพบว่าจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นสีย้อมทั้งสามความเข้มข้นสามารถกำจัดปริมาณของแข็ง (%TS, TSS และ TDS remove) เท่า 50% ภายใน 168 ชั่วโมง ดังที่แสดงในภาพที่ 30, 31 และ 32 C จากภาพที่ 33 สเปกตรัมเมื่อเวลาผ่านไปที่ความยาวคลื่น 400-700 nm ลดลง และลักษณะของน้ำทิ้งหลังการบำบัดด้วยจุลินทรีย์ผสมที่ความเข้มข้นสีย้อมเริ่มต้นแตกต่างกัน จากการรายงานของ Kalyani *et al.* (2009) พบว่า Pseudomonas sp. SUK1 สามารถกำจัดสีย้อม Reactive Red 2 (300 mg/l;  $\lambda_{max}$  = 542 nm) ได้สูงสุด 96% และสามารถลดค่า COD ได้ 52% ภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งคล้ายกับการรายงานที่ Lysinibacillus sp. RGS สามารถกำจัดสีย้อม Remazol Red (50 mg/l;  $\lambda_{max}$  = 578 nm) ได้อย่างสมบูรณ์ และสามารถลดค่า COD สูงสุด 92% ใน 6 ชั่วโมง นอกจากนี้ Lysinibacillus sp. RGS ยังสามารถกำจัดสีย้อมผสม (Remazol Red, Rubin, Scarlet RR, Brilliant Blue, Brown 3 REL, Golden Yellow HER และ Methyl Red; 50 mg/l) และน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอ 70 ml ในน้ำ 100 ml ได้มากที่สุดที่ 82 และ 72% และสามารถลดค่า COD ได้ 69 และ 62% ภายใน 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ (Saratale *et al.*, 2013) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าแบคทีเรียกลุ่มไบโอฟิล์ม ได้แก่ C1 (Vitreoscilla

sp. ENSG301, *Acinetobacter lwoffii* ENSG302, *Klebsiella pneumoniae* ENSG303 และ *Pseudomonas fluorescens* ENSG304), C2 (*Escherichia coli* ENSD101, *Enterobacter asburiae* ENSD102 และ *E. ludwigii* ENSH201), C3 (*E. asburiae* ENSD102, *Vitreoscilla* sp. ENSG301 และ *Bacillus thuringiensis* ENSW401) และ C4 (*E. coli* ENSD101, *E. ludwigii* ENSH201 และ *B. thuringiensis* ENSW401) สามารถกำจัดสีย้อม Methyl orange (200 mg/l;  $\lambda_{\max}$  = 465 nm) ได้ 97.30, 98.75, 99.51 และ 99.29% ตามลำดับ และสามารถลดค่า COD ได้ 85.37 ถึง 91.44% ภายใน 60 ชั่วโมง (Haque *et al.*, 2021) และ *Bacillus cohnii* (RKS9) สามารถกำจัดสีน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมสิ่งทอได้ถึง 93.87% และสามารถลดค่า COD, BOD, TDS, TOC และ TSS เท่ากับ 77.35, 86.02, 66.75, 67.25 และ 60.34% ตามลำดับภายใน 48 ชั่วโมง และยังสามารถกำจัดสีย้อม Congo red (100 mg/l;  $\lambda_{\max}$  = 497 nm) ได้สูงสุด 99% ภายใน 12 ชั่วโมง และยังพบกิจกรรมของเอไซรีดักเทส แลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ที่พบว่าถูกผลิตขึ้นระหว่างการบำบัดสีย้อม (Kishor, Purchase, Saratale, Ferreira, Bilal, *et al.*, 2021) จากการวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์ที่ความเข้มข้นสีย้อมเริ่มต้น 100, 500 และ 1000 เท่า ให้ค่ากัมมันตภาพแลคเคสสูงสุดเท่ากับ 61.01 U/L ที่เวลา 24 ชั่วโมง, 62.10 U/L ที่เวลา 48 ชั่วโมง และ 55.53 U/L ที่เวลา 144 ตามลำดับ (ภาพที่ 34 A) ค่ากัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้นสีย้อมเดียวกันมีค่าเท่ากับ 23.25 U/L ที่เวลา 48 ชั่วโมง, 16.31 U/L ที่เวลา 48 ชั่วโมง และ 4.54 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 34 B) และพบว่า ค่ากัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเท่า 23.08 U/L ที่เวลา 48 ชั่วโมง, 28.74 U/L ที่เวลา 84 ชั่วโมง, และ 19.34 U/L ที่เวลา 144 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 34 C) และเมื่อวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพเอไซรีดักเทสพบว่า มีค่าเท่ากับ 15.47 U/L ที่เวลา 144 ชั่วโมง, 13.13 U/L ที่เวลา 84 ชั่วโมง และ 11.98 U/L ที่เวลา 84 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 34 D) สำหรับความเข้มข้นสีย้อมเริ่มต้น 100, 500 และ 1000 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายในเซลล์ที่ความเข้มข้นสีย้อมเริ่มต้น 100, 500 และ 1000 เท่า ให้ค่ากัมมันตภาพแลคเคสสูงสุดเท่ากับ 52 U/L ที่เวลา 18 ชั่วโมง, 51.98 U/L ที่เวลา 18 ชั่วโมง และ 13.02 U/L ที่เวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 35 A) ค่ากัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้นสีย้อมเดียวกันมีค่าเท่ากับ 3.87 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง, 2.63 U/L ที่เวลา 48 ชั่วโมง และ 13.15 U/L ที่เวลา 60 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 35 B) และพบว่าค่ากัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเท่ากับ 3 U/L ที่เวลา 120 ชั่วโมง, 1.48 U/L ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 16.43 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง

ตามลำดับ (ภาพที่ 35 C) และเมื่อวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพไอโซตอปพบว่ามีค่าเท่ากับ 3.85 U/L ที่เวลา 12 ชั่วโมง, 1.54 U/L ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 12.17 U/L ที่เวลา 12 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 35 D) สำหรับความเข้มข้นสีย้อมเริ่มต้น 100, 500 และ 1000 เท่า ตามลำดับ

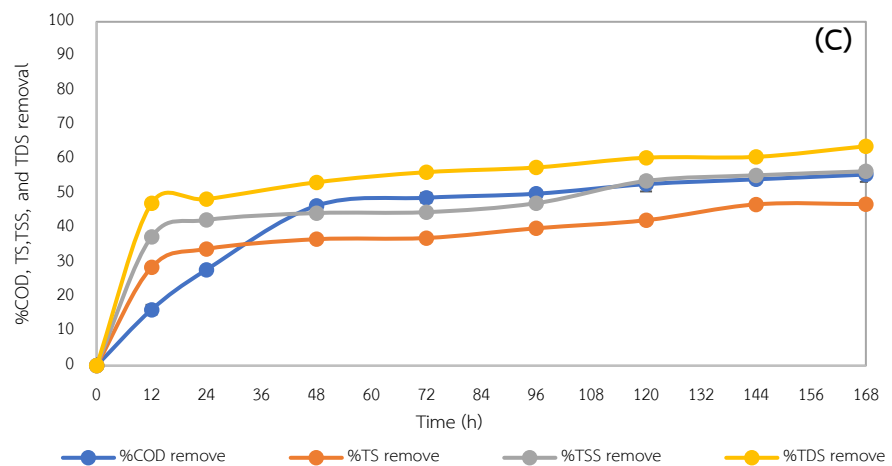
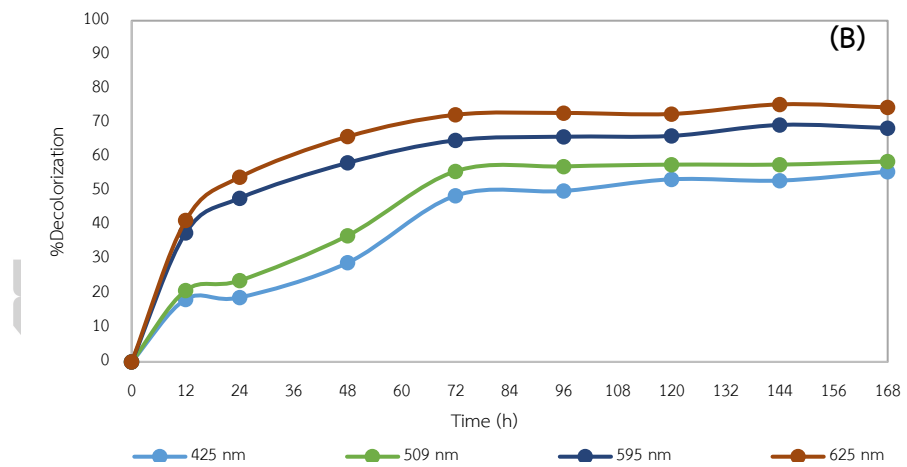
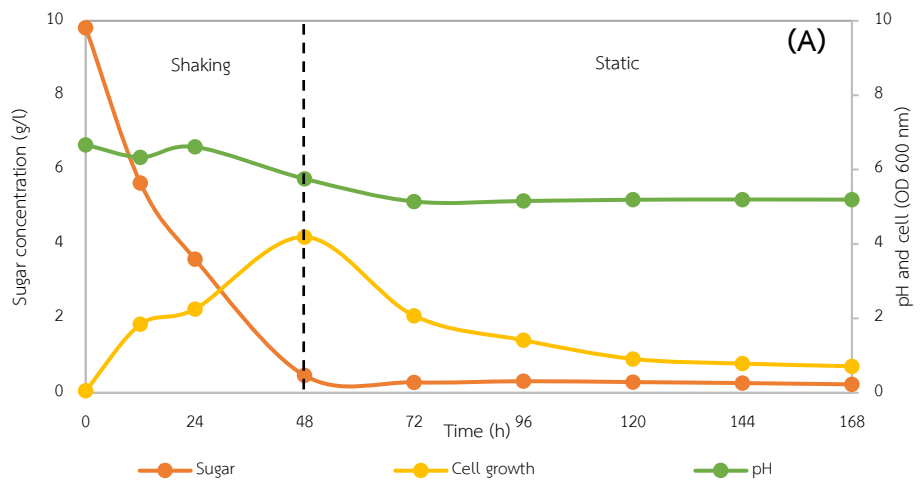
จากการศึกษาความเข้มข้นสีย้อมเริ่มต้น 100, 500 และ 1000 เท่า ตามลำดับ โดยใช้ จุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2 อัตราส่วน 1:1 พบว่าความเข้มข้นสีย้อมเริ่มต้น 1000 เท่า มีประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอและสามารถลดค่า COD สูงสุด เมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ผสมในความเข้มข้นสีย้อมเริ่มต้น 100 และ 500 ดังนั้น จึงเลือกใช้ความเข้มข้นสีย้อมเริ่มต้น 1000 เท่า ไปในการทดลองความเป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของพืช



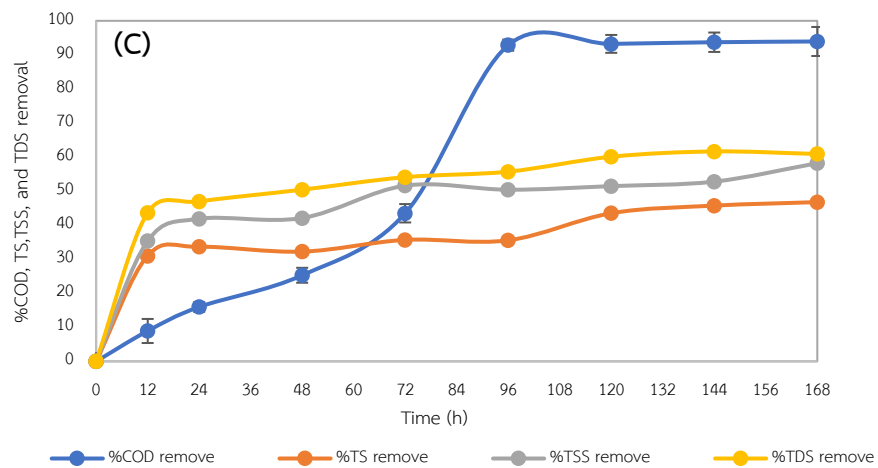
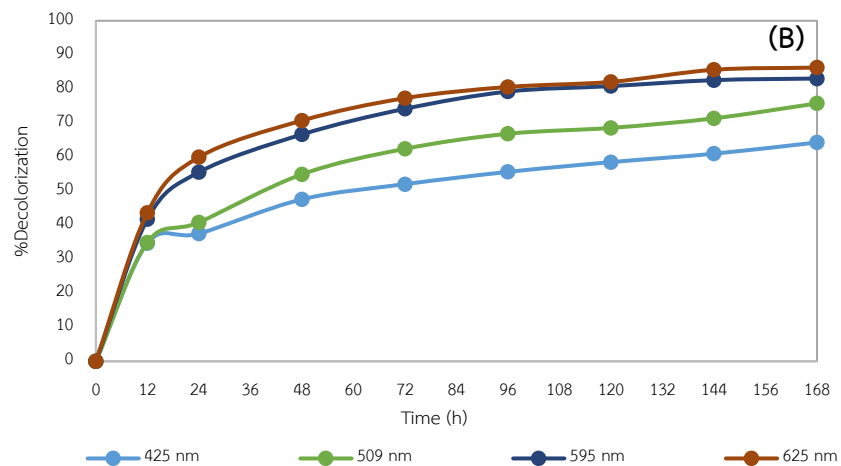
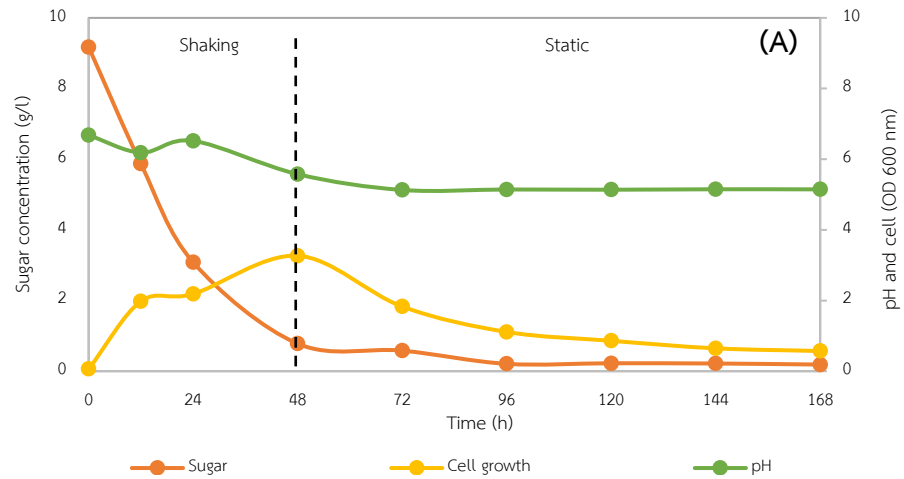




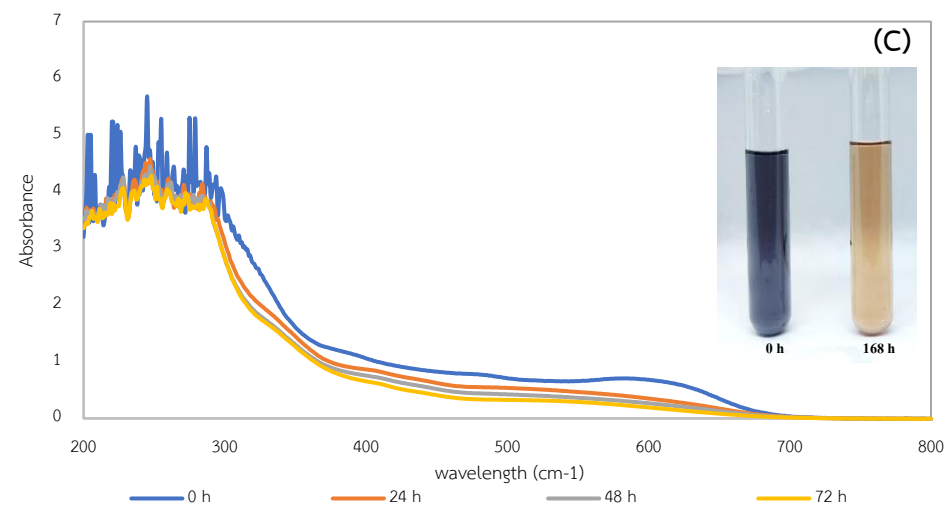
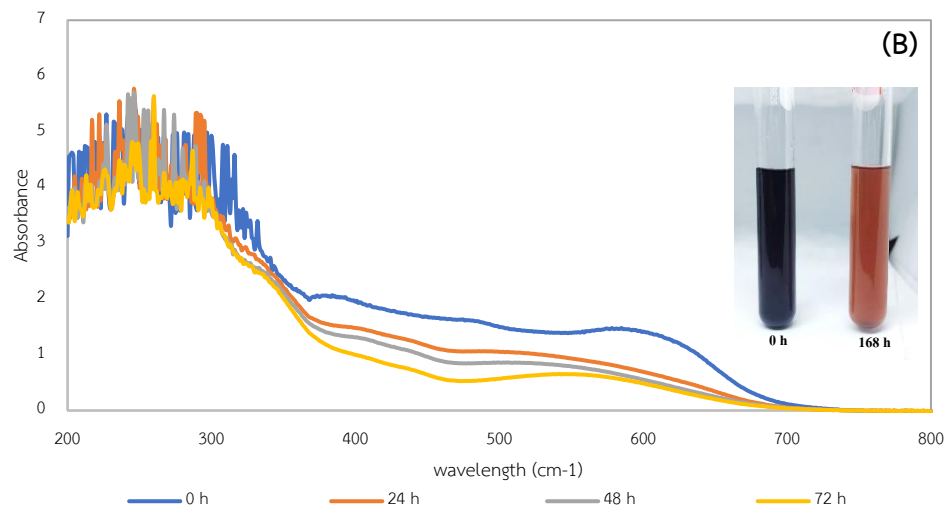
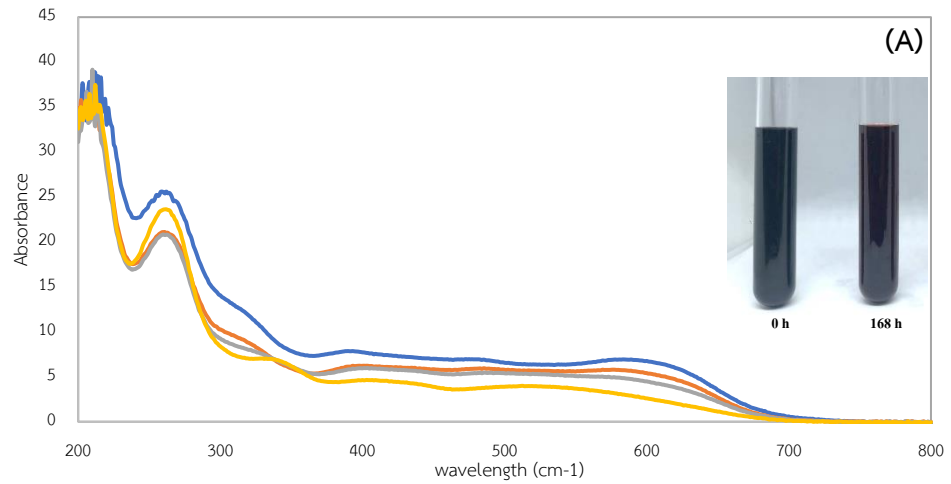
ภาพที่ 30 ความสัมพันธ์ค่า pH, ค่าความขุ่นของเซลล์ (OD) และความเข้มข้นน้ำตาล (A) และประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอของจุลินทรีย์ผสม (B) และการกำจัดค่า COD และปริมาณของแข็ง (C) ที่ความเข้มข้นสีย้อมน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอเริ่มต้น 100 เท่า



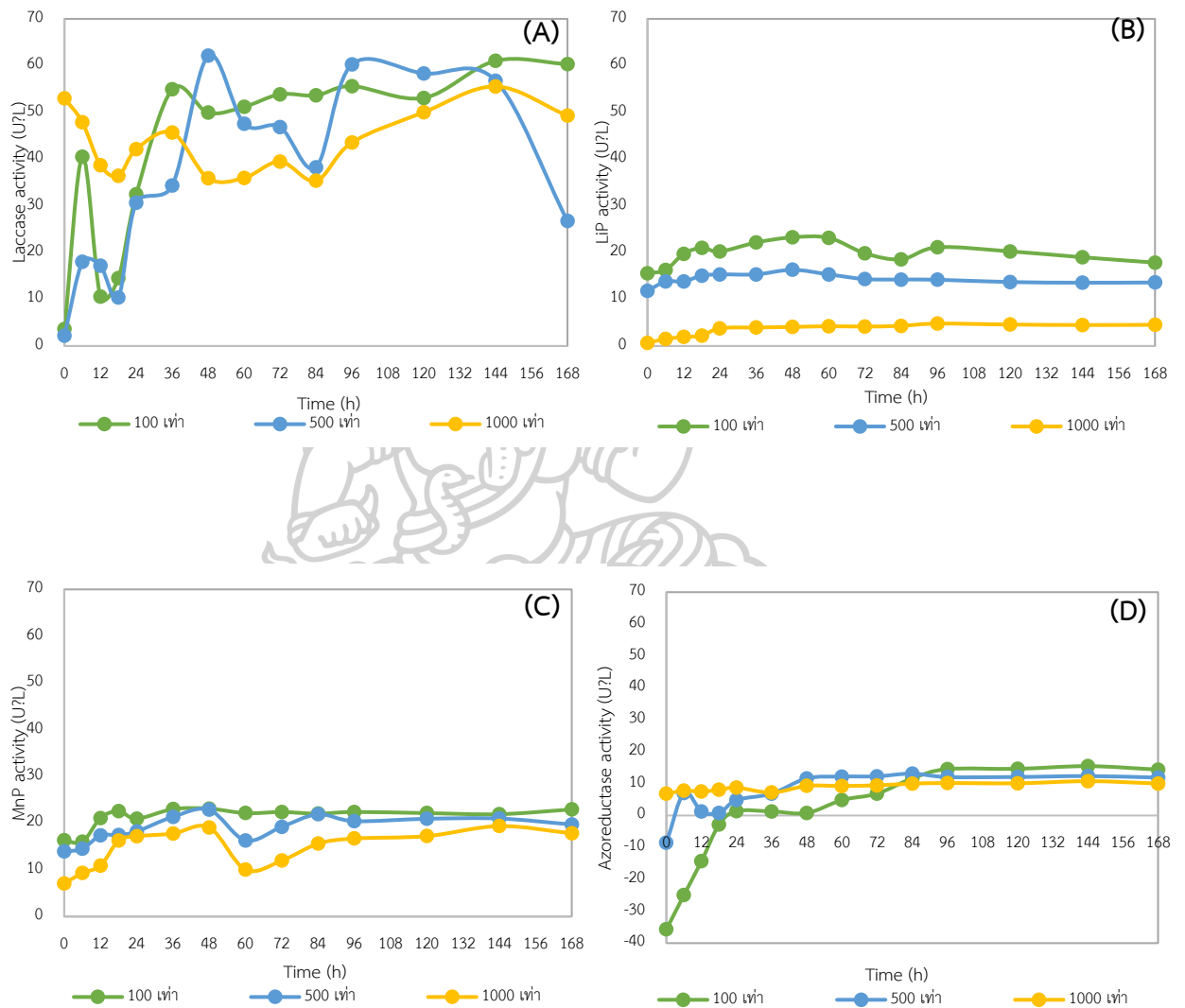
ภาพที่ 31 ความสัมพันธ์ค่า pH, ค่าความขุ่นของเซลล์ (OD) และความเข้มข้นน้ำตาล (A) และประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอของจุลินทรีย์ผสม (B) และการกำจัดค่า COD และปริมาณของแข็ง (C) ที่ความเข้มข้นสีย้อมน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอเริ่มต้น 500 เท่า



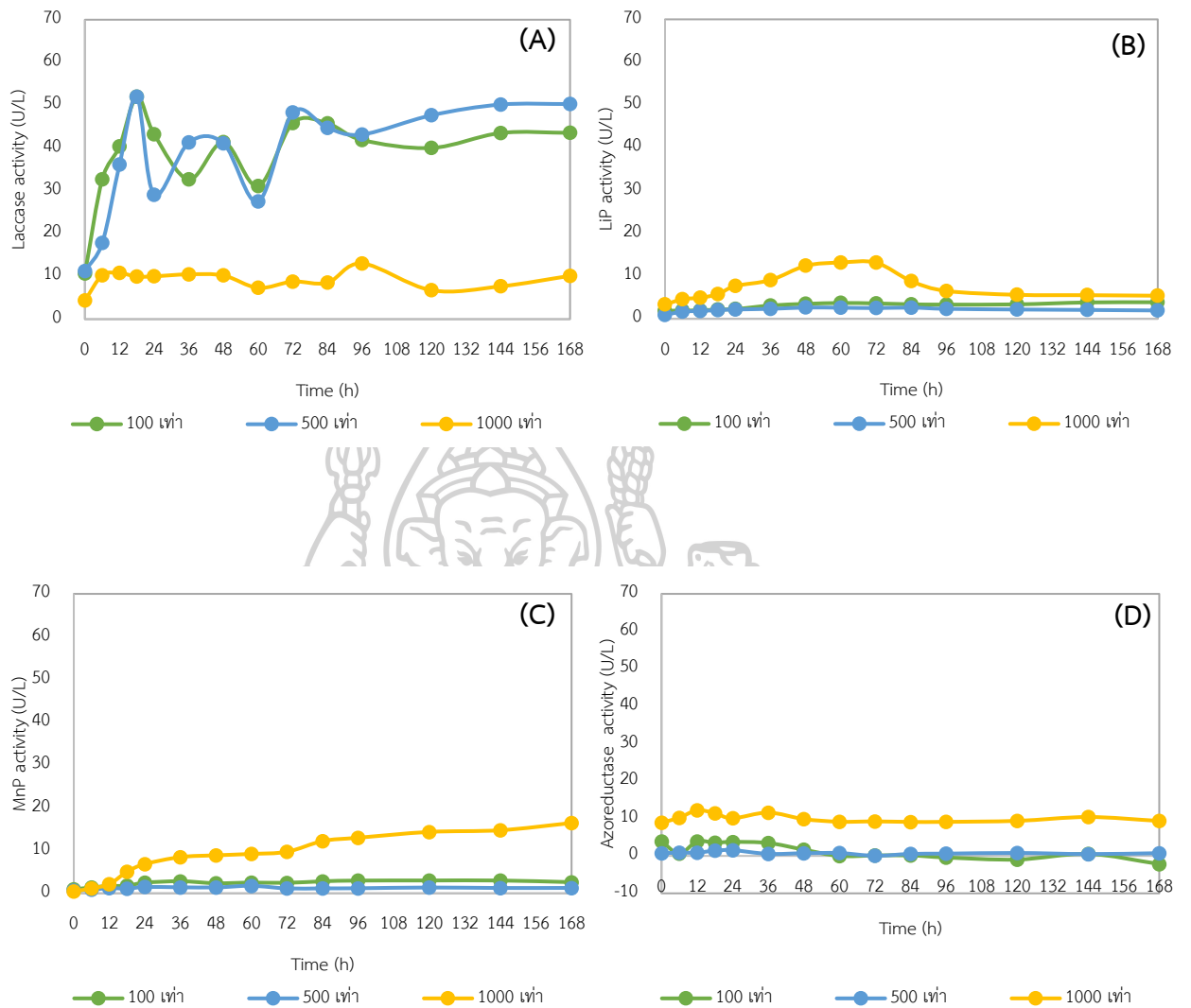
ภาพที่ 32 ความสัมพันธ์ค่า pH, ค่าความขุ่นของเซลล์ (OD) และความเข้มข้นน้ำตาล (A) และประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอของจุลินทรีย์ผสม (B) และการกำจัดค่า COD และปริมาณของแข็ง (C) ที่ความเข้มข้นสีย้อมน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอเริ่มต้น 1000 เท่า



ภาพที่ 33 UV-Vis spectrum ของสีย้อมน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอก่อนและหลังบำบัดด้วยจุลินทรีย์ผสม ที่ความเข้มข้นสีย้อมเริ่มต้นต่างกัน ได้แก่ 100 เท่า (A), 500 เท่า (B) และ 1000 เท่า (C)



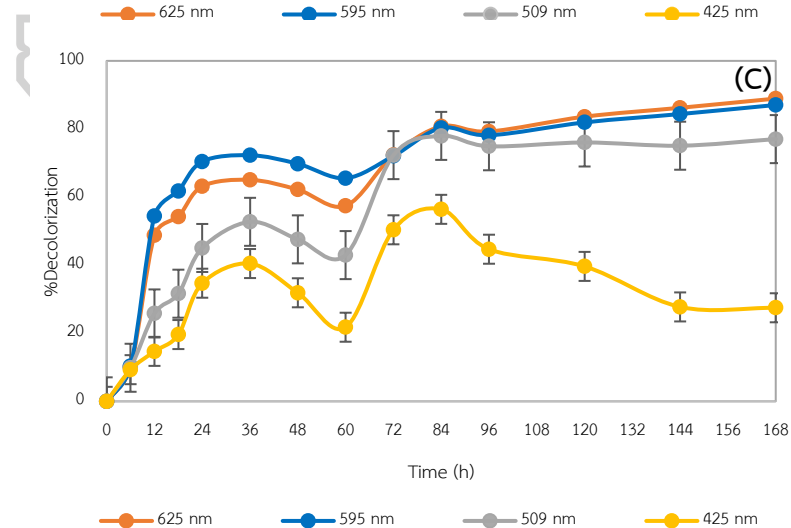
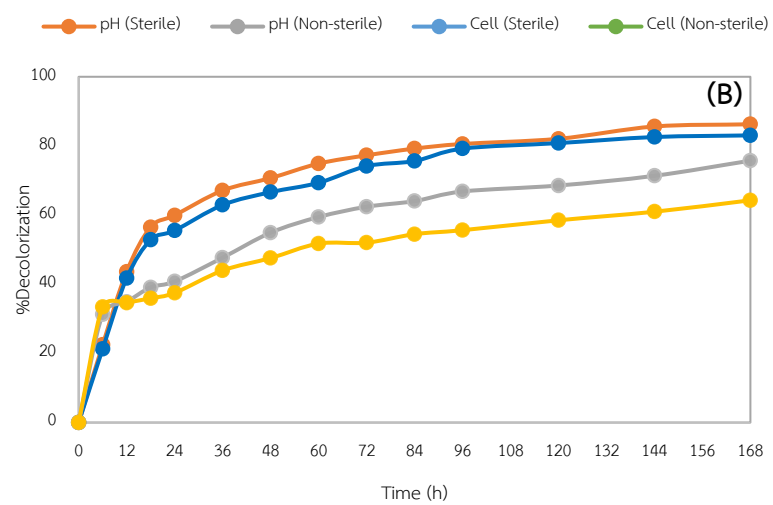
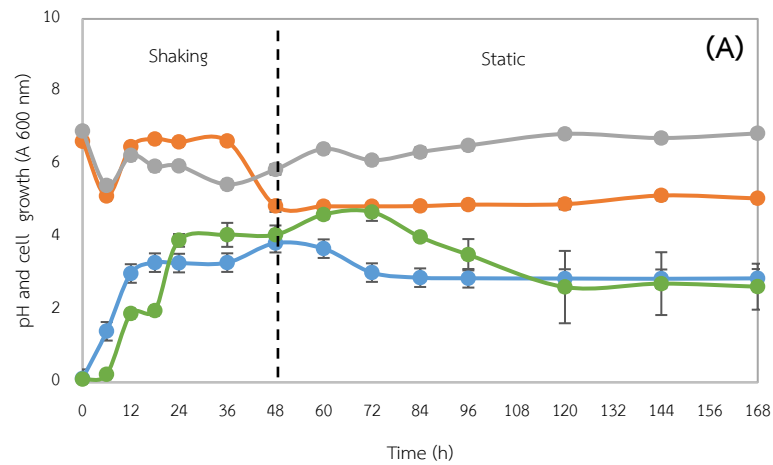
ภาพที่ 34 ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์ (Extracellular) ได้แก่ ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) กัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) และกัมมันตภาพเอโซรีดักเทส (D) ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นสีย้อมน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอเริ่มต้น 100 เท่า, 500 เท่า และ 1000 เท่า



ภาพที่ 35 ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายในเซลล์ (Intracellular) ได้แก่ ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) กัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) และกัมมันตภาพเอโซรีดักเทส (D) ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นสี่ย้อมน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอเริ่มต้น 100 เท่า, 500 เท่า และ 1000 เท่า

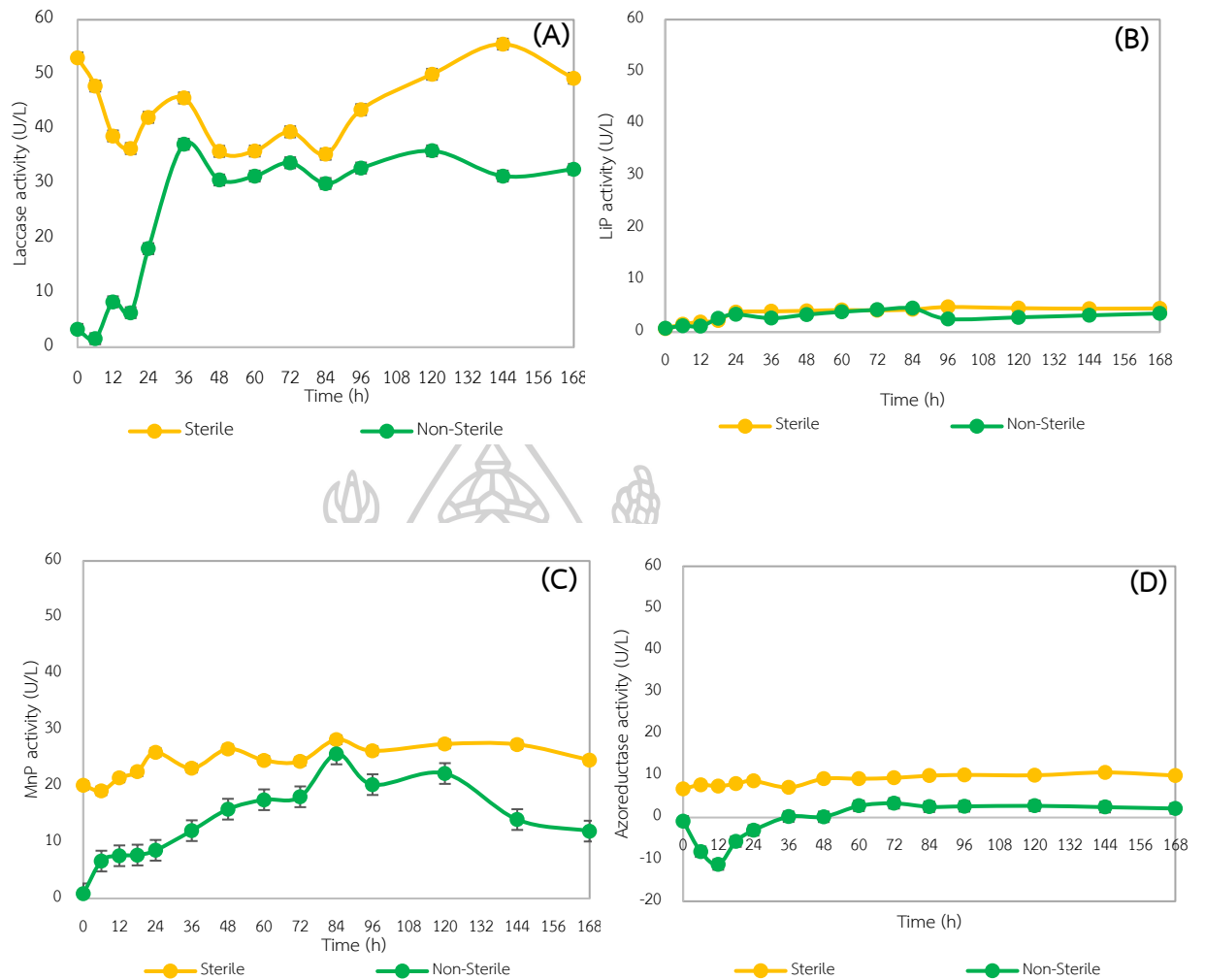
#### 4.9. ผลการศึกษาการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอในสถานะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ

จากการทดลองใช้จุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp FN2 กำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอที่เจือจางความเข้มข้น 1000 เท่า ควบคุมสภาวะที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่าที่ 150 rpm (48 ชั่วโมง) ตามด้วยสภาวะที่ไม่มีการเขย่าในสภาวะที่มีการฆ่าเชื้อ (Sterile) และไม่มีการฆ่าเชื้อ (non-sterile) พบว่าจุลินทรีย์ผสมในสภาวะที่มีการฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอเท่ากับ 64.28, 75.73, 83.05 และ 86.26% ที่ความยาวคลื่น 425, 509, 595 และ 625 nm ตามลำดับ (ภาพที่ 36 B) และที่ความยาวคลื่นเดียวกัน พบว่าจุลินทรีย์ผสมในสภาวะไม่มีการฆ่าเชื้อสามารถกำจัดสีได้ 27.48, 77.02, 87.04 และ 88.93% ตามลำดับ (ภาพที่ 36 C) ภายใน 168 ชั่วโมง แต่พบว่าที่ความยาวคลื่น 425 nm จุลินทรีย์ผสมในสภาวะไม่ฆ่าเชื้อสามารถกำจัดสีได้มากที่สุด 56.39% ใน 84 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ผสมในสภาวะทั้งสองพบว่าประสิทธิภาพการกำจัดสีต่างกันเพียงเล็กน้อย เมื่อวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์ที่สภาวะที่มีฆ่าเชื้อและไม่มีการฆ่าเชื้อ พบว่าค่ากัมมันตภาพแลคเคสสูงสุด 55.53 U/L ที่เวลา 144 ชั่วโมง และ 37.36 U/L ที่เวลา 36 ตามลำดับ (ภาพที่ 37 A) ค่ากัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดสเท่ากับ 4.54 U/L ที่เวลา 168 ชั่วโมง และ 4.57 U/L ที่เวลา 84 ชั่วโมง (ภาพที่ 37 B) และค่ากัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเท่ากับ 28.74 U/L และ 25.69 U/L ที่เวลา 84 ชั่วโมง (ภาพที่ 37 C) สำหรับสภาวะที่มีการฆ่าเชื้อและไม่มีการฆ่าเชื้อตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพเอไซรีติกเทส พบว่าที่สภาวะที่มีการฆ่าเชื้อมีค่าเท่ากับ 11.98 U/L ที่เวลา 84 ชั่วโมง และสภาวะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อเท่ากับ 3.39 U/L ที่เวลา 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 37 D) ซึ่งค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ทั้งสองสภาวะมีค่าใกล้เคียงกัน และเมื่อเทียบค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์มีค่าสูงกว่าค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายในเซลล์ (ภาพที่ 38) มีรายงานว่า การเพาะเลี้ยง *Bacillus megaterium* W10 และ *Bacillus amyloliquefaciens* SP-L1 ในอัตราส่วน 1:1 ในสภาวะที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพในการลดความเข้มข้นสีน้ำเสียจากอุตสาหกรรมผลิตผ้าหม้อห้อม ( $\lambda_{max} = 563$  nm) เท่ากับ 43.33% ภายใน 7 วัน (ปิยะบุตร โพธิคามบำรุง, 2554)

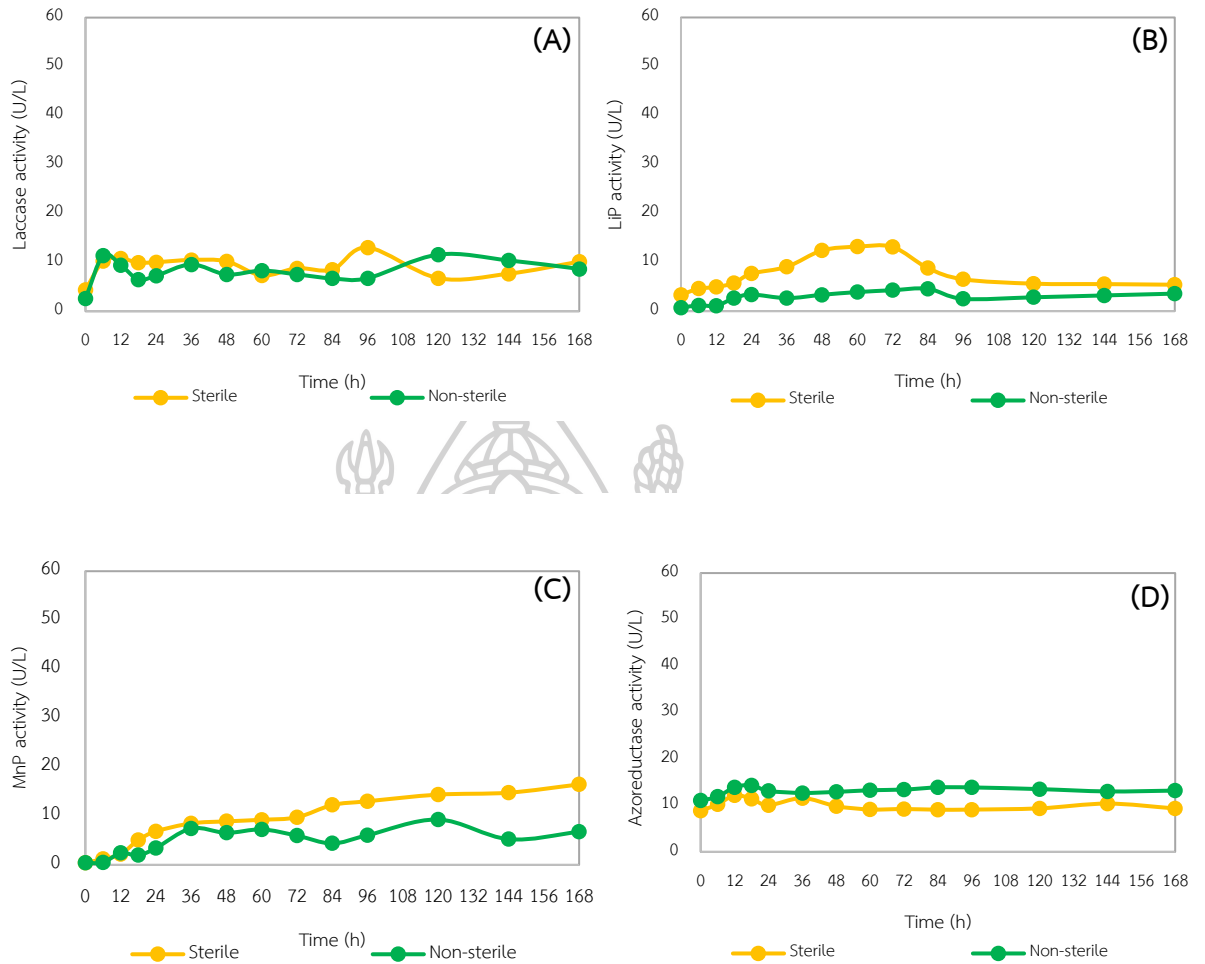


ภาพที่ 36 ค่า pH และค่าความขุ่นของเซลล์ (OD) (A) และประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งโรงงานสิ่งทอของจุลินทรีย์ผสมที่มีภาวะที่มีการฆ่าเชื้อ (B) และสถานะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ (C) ตามลำดับ

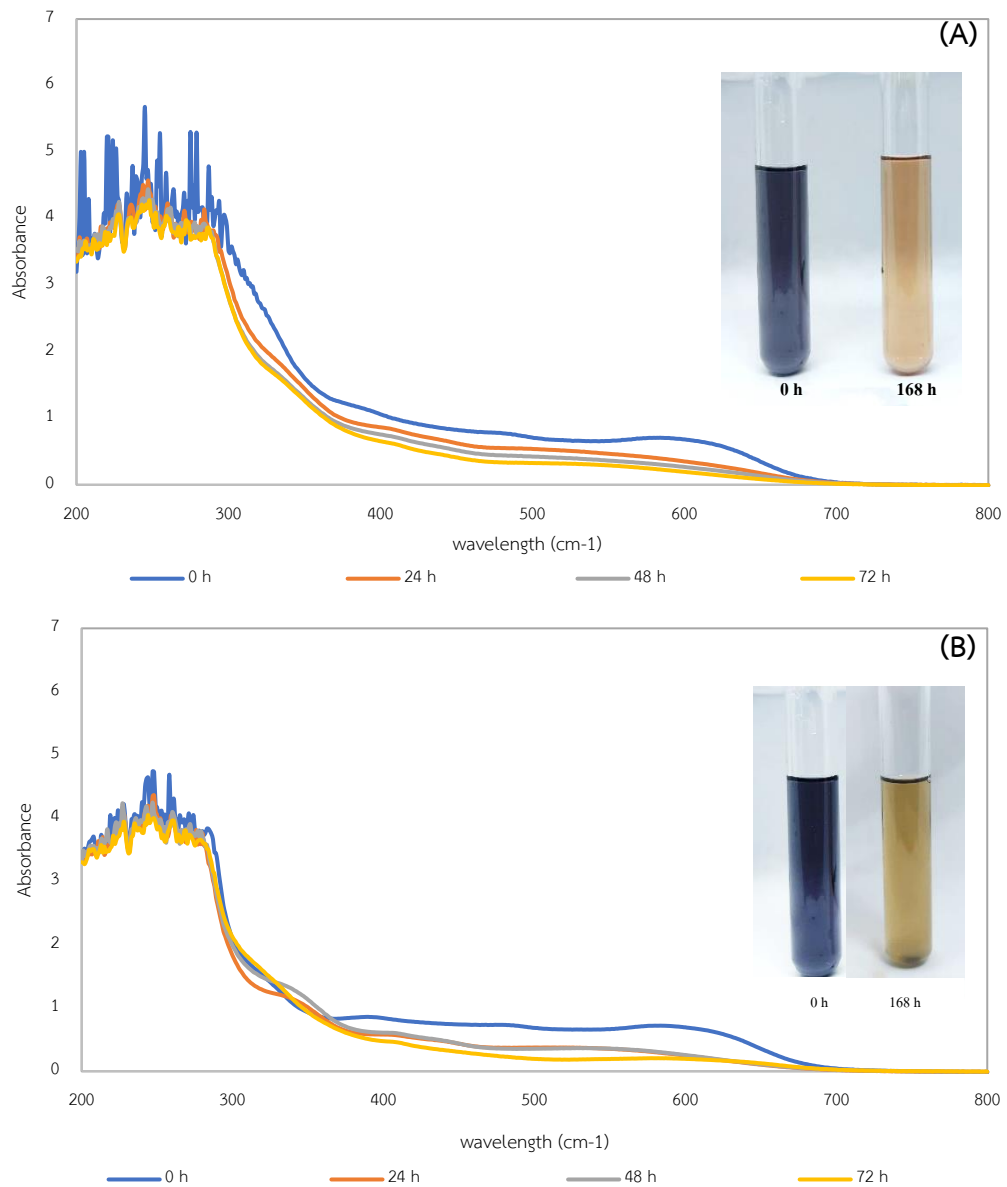




ภาพที่ 37 ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายนอกเซลล์ (Extracellular) ได้แก่ ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) กัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) และกัมมันตภาพเอโซรีดักเทส (D) ตามลำดับ ที่สภาวะที่มีการฆ่าเชื้อ (Sterile) และสภาวะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ (Non-Sterile)



ภาพที่ 38 ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ภายในเซลล์ (Intracellular) ได้แก่ ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (A) กัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส (B) กัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (C) และกัมมันตภาพเอโซรีดักเทส (D) ตามลำดับ ที่สภาวะที่มีการฆ่าเชื้อ (Sterile) และสภาวะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ (Non-Sterile)



ภาพที่ 39 UV-Vis spectrum ของสีย้อมน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอหลังบำบัดด้วยจุลินทรีย์ในสถานะที่มีการฆ่าเชื้อ (A) และไม่มีการฆ่าเชื้อ (B) ตามลำดับ โดยจุลินทรีย์ผสมที่ความเข้มข้นสีน้ำทิ้งเริ่มต้น 1000 เท่า ภายใต้สถานะที่มีการเขย่าตามสถานะที่ไม่มีการเขย่า ภายใน 168 ชั่วโมง

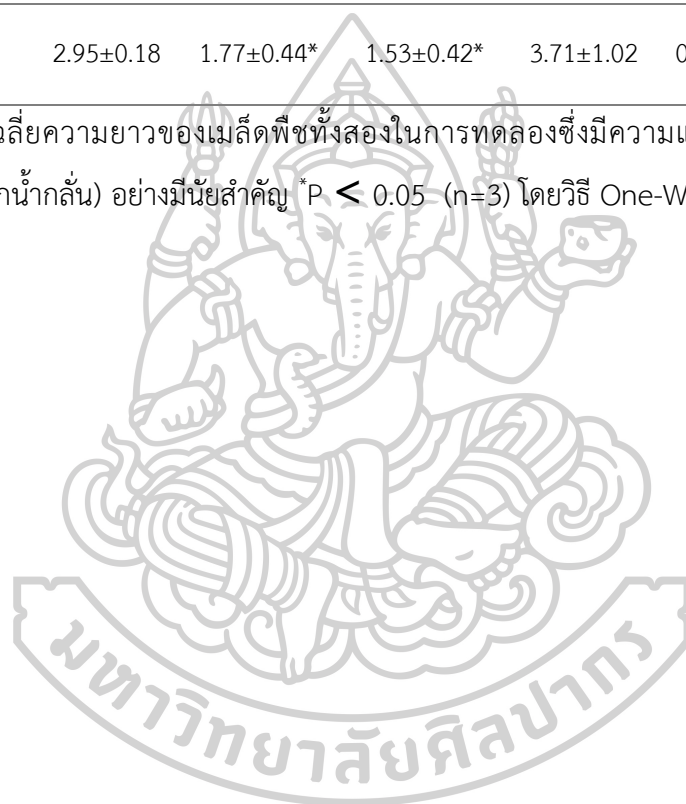
#### 4.10. ผลทดสอบความเป็นพิษของสีย้อมน้ำทั้งก่อนและหลังการบำบัดที่มีผลต่อการเจริญของพืช

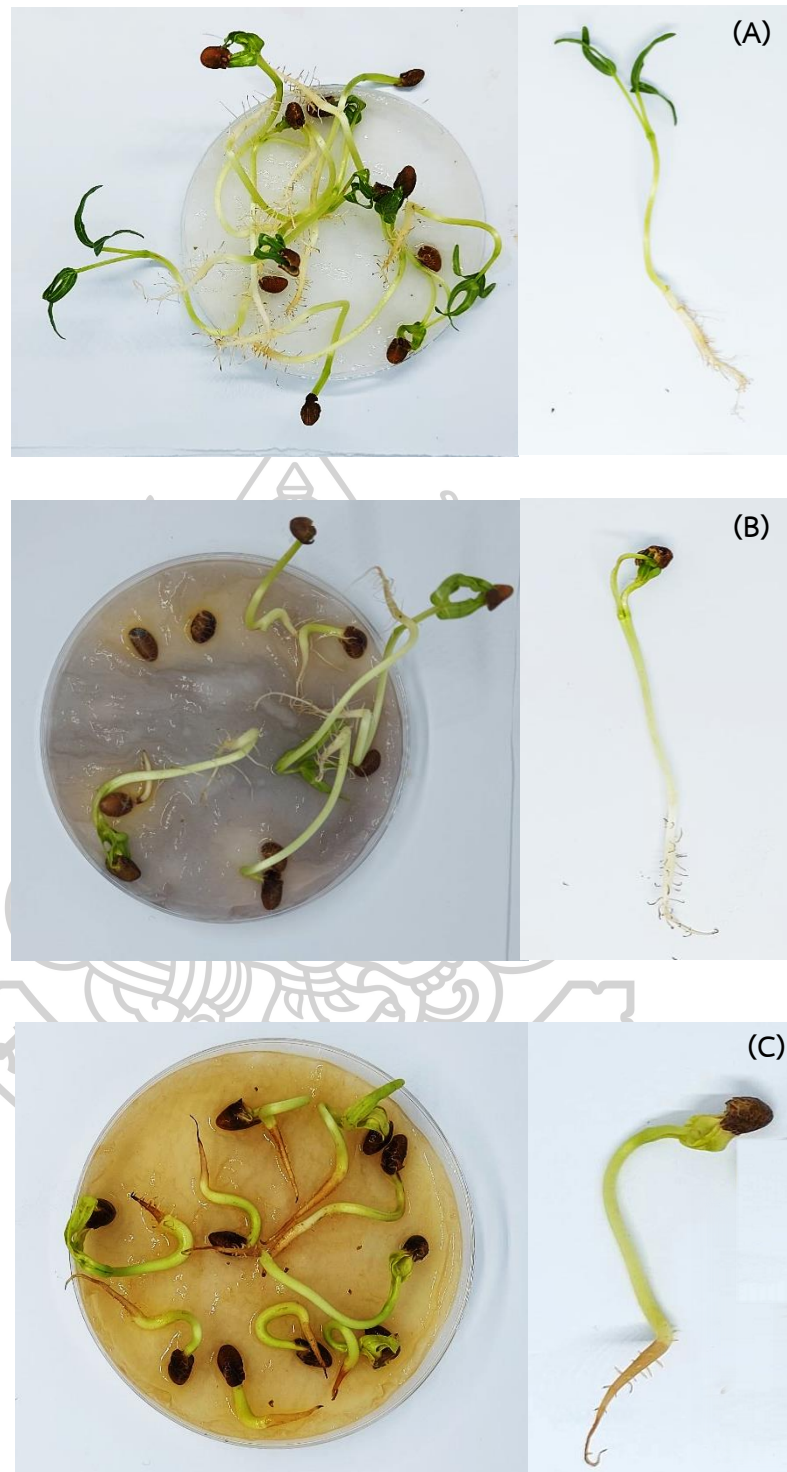
ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อพืชในเมล็ดผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica* Forsk) และข้าวหอมมะลิ (*Oryza sativa* L.) ที่รดด้วยน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1,000 เท่า หลังการบำบัดด้วยจุลินทรีย์ผสมที่มีประสิทธิภาพการกำจัดสีเท่ากับ 85.56% พบว่าลักษณะของเมล็ดผักบุ้ง มีดัชนีการงอกของเมล็ดพืช ความยาวของยอด และความยาวของราก เท่ากับ 100%,  $3.33 \pm 0.52$  และ  $1.77 \pm 0.44$  cm ตามลำดับ หลังจาก 5 วัน (ตารางที่ 7) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะสีของใบและลำต้นกับเมล็ดผักบุ้งที่รดด้วยน้ำกลั่นพบว่าเมล็ดผักบุ้งที่รดด้วยน้ำทิ้งหลังการบำบัด มีลักษณะสีของใบค่อนข้างเหลืองและลำต้นเล็กและสั้นกว่าเมล็ดผักบุ้งที่รดด้วยน้ำกลั่น (ภาพที่ 40) ในกรณีของเมล็ดข้าวหอมมะลิ พบว่าดัชนีการงอกของเมล็ดพืช ความยาวของยอด และความยาวของราก เท่ากับ 80%,  $4.27 \pm 0.40$  และ  $0.84 \pm 0.09$  cm ตามลำดับ หลังจาก 5 วัน (ตารางที่ 7) และลักษณะสีของใบเหลืองและมีความยาวรากที่สั้นเมื่อเทียบกับเมล็ดข้าวหอมมะลิที่รดด้วยน้ำกลั่น (ภาพที่ 41) ตามที่รายงานก่อนหน้านี้โดย Barathi *et al.* (2020) *Bacillus subtilis* มีความสามารถในการกำจัดสีย้อม Direct black G 160 (800 mg/l) หลังการบำบัด สารเมทาบอลไลต์ที่เกิดขึ้นเป็นสารที่ไม่เป็นพิษตามที่ได้ทดสอบความเป็นพิษต่อพืชด้วยเมล็ดข้าวโพด (*Zea mays*) และถั่วเขียว (*Vigna radiata*) Akansha *et al.* (2019) พบว่าสีย้อม Methyl orange (150 mg/l) หลังบำบัดด้วย *Bacillus stratosphericus* SCA1007 ไม่เป็นพิษซึ่งทดสอบความเป็นพิษต่อพืชด้วยเมล็ดถั่วเขียว (*Vigna radiata*) และมีรายงานว่าสีย้อม Reactive blue 160 (100 mg/l) หลังบำบัดโดยกลุ่มแบคทีเรีย BND ไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Phaseolus mungo* และ *Triticum aestivum* เมื่อเทียบกับสีย้อม Reactive blue ที่ไม่ได้ผ่านการบำบัด (Balapure *et al.*, 2014) ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยของ Telke *et al.* (2008) ที่รายงานว่าเมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อพืชของสีย้อม Reactive Red 141 (50 mg/l) บำบัดด้วย *Rhizobium radiobacter* MTCC 8161 ต่อพืช *Triticum aestivum* และ *Oryza sativa* พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสาร มีความเป็นพิษน้อยกว่าสีย้อม Reactive Red 141 ที่ไม่ผ่านการบำบัด

ตารางที่ 7 การทดสอบความเป็นพิษต่อพืชของน้ำทิ้งสิ่งทอที่ย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2

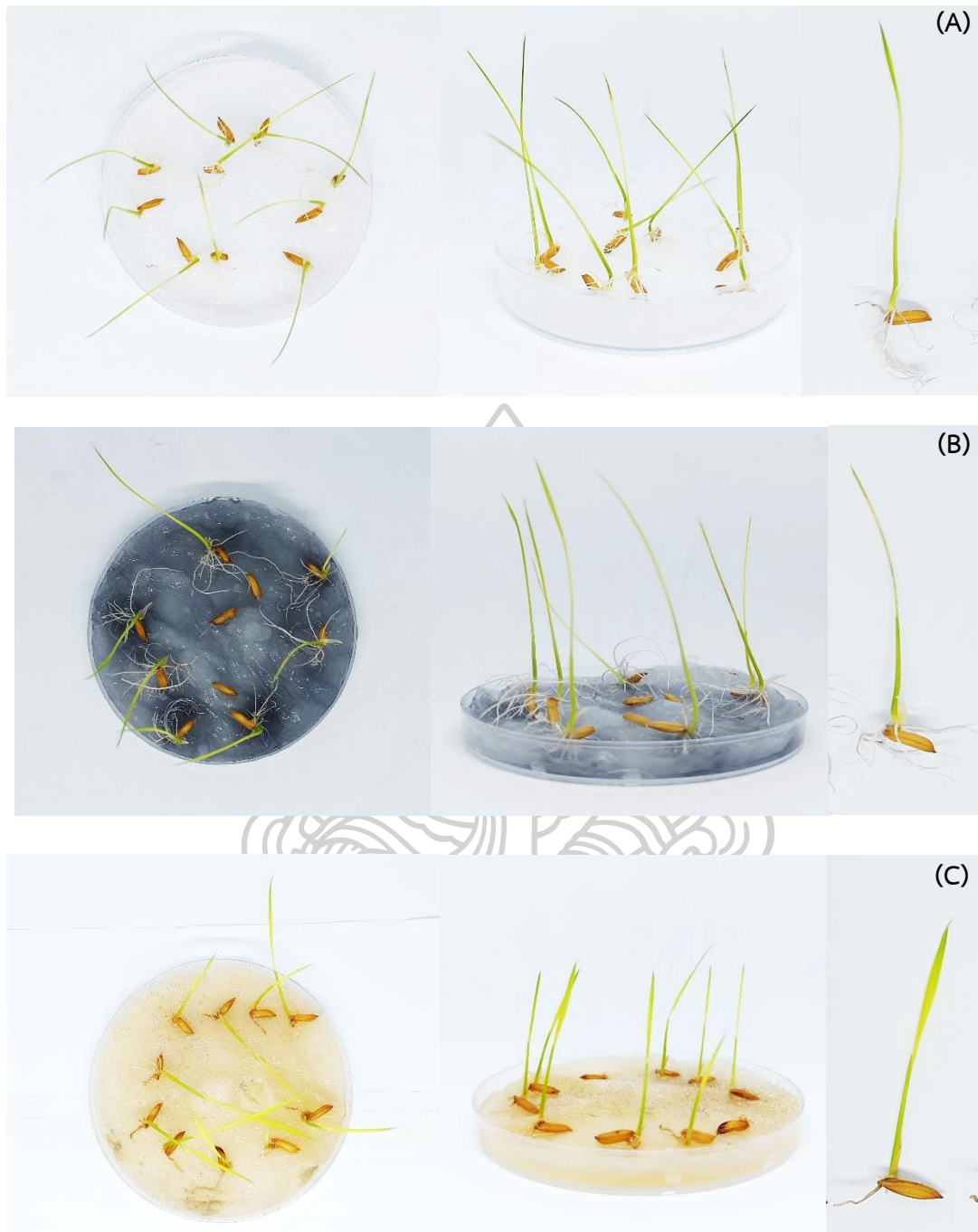
พารามิเตอร์ที่ศึกษา	<i>Ipomoea aquatica</i> Forsk			<i>Oryza sativa</i> L.		
	น้ำกลั่น	น้ำทิ้ง (หลังบำบัด)	น้ำทิ้ง (ก่อนบำบัด)	น้ำกลั่น	น้ำทิ้ง (หลังบำบัด)	น้ำทิ้ง (ก่อนบำบัด)
% Germination	100%	100%	75%	100%	80%	75%
ความยาวยอด (cm)	5.46±0.29	3.33±0.52*	3.82±0.86*	5.48±0.45	4.27 ± 0.40*	5.23±1.0
ความยาวราก (cm)	2.95±0.18	1.77±0.44*	1.53±0.42*	3.71±1.02	0.84 ± 0.09*	3.48±0.97

ค่านี้เป็นค่าเฉลี่ยความยาวของเมล็ดพืชทั้งสองในการทดลองซึ่งมีความแตกต่างจากชุดควบคุม (เมล็ดพืชที่งอกน้ำกลั่น) อย่างมีนัยสำคัญ \* $P < 0.05$  (n=3) โดยวิธี One-Way ANOVA





ภาพที่ 40 การเจริญเติบโตเมล็ดผักบุ้งที่รดด้วยน้ำ 3 ชนิด คือ น้ำกลั่น (A) น้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการบำบัด (B) และน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัด (C) ด้วยจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2



ภาพที่ 41 การเจริญเติบโตเมล็ดข้าวหอมมะลิที่รดด้วยน้ำ 3 ชนิด คือ น้ำกลั่น (A) น้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการบำบัด (B) และน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัด (C) ด้วยจุลินทรีย์ผสม *Bacillus* sp. FN1 ต่อ *Bacillus* sp. FN2



## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาอัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม Bacillus sp. FN1 ต่อ FN2 ในการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอ พบว่าจุลินทรีย์ผสมในอัตราส่วน 1:1 มีประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอสูงสุดที่ความเข้มข้นสีย้อมเริ่มต้น 1000 เท่า เมื่อเทียบกับอัตราส่วนจุลินทรีย์ผสม Bacillus sp. FN1 ต่อ FN2 ในอัตราส่วน 2:1 และ 1:2 ซึ่งมีประสิทธิภาพการกำจัดสีเท่ากับ 64.28, 75.73, 83.05 และ 86.25% ที่ความยาวคลื่น 425, 509, 595 และ 625 nm ตามลำดับ ภายใน 168 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่า 150 rpm 48 ชั่วโมงตามด้วยสภาวะที่ไม่มีการเขย่า อุณหภูมิ 37 °C ในอาหาร ที่มี 1% w/v กลูโคส ต่อ 0.3% w/v สารสกัดจากยีสต์ ต่อ 0.6% w/v แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH<sub>4</sub>Cl) ที่ pH 7.0 นอกจากนี้ ยังพบว่าสามารถลดค่า COD ได้สูงสุด 93.94% และลดปริมาณของแข็งในน้ำ (TS, TSS และ TDS) ได้ถึง 50% ภายในเวลา 168 ชั่วโมง

เมื่อกัมมันตภาพเอนไซม์ทั้งภาพนอกและภายในเซลล์พบว่า กัมมันตภาพแลคเคสมีค่าสูงตามด้วยค่ากัมมันตภาพแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส กัมมันตภาพเอไซรีดักเทส และกัมมันตภาพลิกนินเปอร์ออกซิเดส ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอ และเมื่อนำน้ำทิ้งหลังบำบัดมาทดสอบกับเมล็ดผักบุ้งและเมล็ดข้าวหอมมะลิเปรียบ พบว่าเมล็ดผักบุ้งและเมล็ดข้าวหอมมะลิสามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำทิ้งหลังการบำบัดซึ่งเปรียบเทียบกับวิธีการรอกกับเมล็ดผักบุ้งและเมล็ดข้าวหอมมะลิที่งอกในน้ำกลั่นที่มีค่าใกล้เคียงกัน แสดงได้ว่าสารเมตาบอไลต์ที่ได้หลังจากกระบวนการกำจัดสีย้อมน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอไม่เป็นพิษต่อพืช ซึ่งพิสูจน์ได้ว่าน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอหลังการบำบัดด้วยจุลินทรีย์ผสมเป็นต่อสิ่งแวดล้อม เมื่อเทียบกับน้ำทิ้งที่บำบัดด้วย Bacillus sp. FN1 หรือ Bacillus sp. FN2 เพียงอย่างเดียว ดังนั้น จุลินทรีย์ผสม Bacillus sp. FN1 กับ Bacillus sp. FN2 มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีในน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอได้

## รายการอ้างอิง

- Abdel-Hamid, A. M., Solbiati, J. O., & Cann, I. K. (2013). Insights into lignin degradation and its potential industrial applications. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 82, pp. 1-28). Elsevier.
- Akansha, K., Chakraborty, D., & Sachan, S. G. (2019). Decolorization and degradation of methyl orange by Bacillus stratosphericus SCA1007. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101044.
- Albarrán-Velo, J., López-Iglesias, M., Gotor, V., Gotor-Fernández, V., & Lavandera, I. (2017). Synthesis of nitrogenated lignin-derived compounds and reactivity with laccases. Study of their application in mild chemoenzymatic oxidative processes. *RSC advances*, 7(80), 50459-50471.
- Ameen, F., Dawoud, T. M., Alshehrei, F., Alsamhary, K., & Almansob, A. (2021). Decolorization of acid blue 29, disperse red 1 and congo red by different indigenous fungal strains. *Chemosphere*, 271, 129532.
- Andrade, M. V. F., Silva, K. M. L. d., Siqueira, J. P. d. S., Wanderley, C. R. P., Araújo, R. d. S., Marinho, G., & Rodrigues, K. (2013). Azo dye degradation by *Phanerochaete chrysosporium* in the medium enriched with nitrogen in the presence of primary co-substrate. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56, 867-874.
- Baciocchi, E., Bietti, M., Gerini, M. F., & Lanzalunga, O. (2002). The mediation of veratryl alcohol in oxidations promoted by lignin peroxidase: the lifetime of veratryl alcohol radical cation. *Biochemical and biophysical research communications*, 293(2), 832-835.
- Balasure, K. H., Jain, K., Chattaraj, S., Bhatt, N. S., & Madamwar, D. (2014). Co-metabolic degradation of diazo dye—Reactive blue 160 by enriched mixed cultures BDN. *Journal of Hazardous Materials*, 279, 85-95.
- Barathi, S., Aruljothi, K., Karthik, C., & Padikasan, I. A. (2020). Optimization for enhanced ecofriendly decolorization and detoxification of Reactive Blue160 textile dye by Bacillus subtilis. *Biotechnology reports*, 28, e00522.
- Behzat, B. (2015). Decolorization of reactive black 39 and acid red 360 by pseudomonas

- aeruginosa. *Water Science and Technology*, 72(8), 1266-1273.
- Bharagava, R. N., Mani, S., Mulla, S. I., & Saratale, G. D. (2018). Degradation and decolourization potential of an ligninolytic enzyme producing *Aeromonas hydrophila* for crystal violet dye and its phytotoxicity evaluation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 166-175.
- Bragger, J., Lloyd, A., Soozandehfar, S., Bloomfield, S., Marriott, C., & Martin, G. (1997). Investigations into the azo reducing activity of a common colonic microorganism. *International journal of pharmaceutics*, 157(1), 61-71.
- Breen, A., & Singleton, F. L. (1999). Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. *Current opinion in biotechnology*, 10(3), 252-258.
- Chakraborty, S., Basak, B., Dutta, S., Bhunia, B., & Dey, A. (2013). Decolorization and biodegradation of congo red dye by a novel white rot fungus *Alternaria alternata* CMERI F6. *Bioresource technology*, 147, 662-666.
- Chang, Y., Yang, D., Li, R., Wang, T., & Zhu, Y. (2021). Textile dye biodecolorization by manganese peroxidase: A review. *Molecules*, 26(15), 4403.
- Chen, K.-C., Wu, J.-Y., Liou, D.-J., & Hwang, S.-C. J. (2003). Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. *Journal of Biotechnology*, 101(1), 57-68.
- Chen, Y., Feng, L., Li, H., Wang, Y., Chen, G., & Zhang, Q. (2018). Biodegradation and detoxification of Direct Black G textile dye by a newly isolated thermophilic microflora. *Bioresource technology*, 250, 650-657.
- Chi, Y., & Yan, H. (2009). Detection on laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase in ligninolytic enzymes of *Pleurotus dyamor*. *Sci Silvae Sin*, 45(154), 8.
- Du, L.-N., Li, G., Zhao, Y.-H., Xu, H.-K., Wang, Y., Zhou, Y., & Wang, L. (2015). Efficient metabolism of the azo dye methyl orange by *Aeromonas* sp. strain DH-6: characteristics and partial mechanism. *International biodeterioration & biodegradation*, 105, 66-72.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. t., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Falade, A. O., Nwodo, U. U., Iweriebor, B. C., Green, E., Mabinya, L. V., & Okoh, A. I. (2017). Lignin peroxidase functionalities and prospective applications.

*MicrobiologyOpen*, 6(1), e00394.

- Gahlout, M., Gupte, S., & Gupte, A. (2013). Optimization of culture condition for enhanced decolorization and degradation of azo dye reactive violet 1 with concomitant production of ligninolytic enzymes by Ganoderma cupreum AG-1. *Biotech*, 3(2), 143-152.
- Garg, N., Garg, A., & Mukherji, S. (2020). Eco-friendly decolorization and degradation of reactive yellow 145 textile dye by Pseudomonas aeruginosa and Thiosphaera pantotropha. *Journal of environmental management*, 263, 110383.
- Garg, S. K., Tripathi, M., Singh, S. K., & Tiwari, J. K. (2012). Biodecolorization of textile dye effluent by Pseudomonas putida SKG-1 (MTCC 10510) under the conditions optimized for monoazo dye orange II color removal in simulated minimal salt medium. *International biodeterioration & biodegradation*, 74, 24-35.
- Gingell, R., & Walker, R. (1971). Mechanisms of azo reduction by Streptococcus faecalis II. The role of soluble flavins. *Xenobiotica*, 1(3), 231-239.
- Guadie, A., Tizazu, S., Melese, M., Guo, W., Ngo, H. H., & Xia, S. (2017). Biodecolorization of textile azo dye using Bacillus sp. strain CH12 isolated from alkaline lake. *Biotechnology reports*, 15, 92-100.
- Haque, M. M., Haque, M. A., Mosharaf, M. K., & Marcus, P. K. (2021). Decolorization, degradation and detoxification of carcinogenic sulfonated azo dye methyl orange by newly developed biofilm consortia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 793-804.
- Kalyani, D., Telke, A., Dhanve, R., & Jadhav, J. (2009). Ecofriendly biodegradation and detoxification of Reactive Red 2 textile dye by newly isolated Pseudomonas sp. SUK1. *Journal of Hazardous Materials*, 163(2-3), 735-742.
- Karim, M. E., Dhar, K., & Hossain, M. T. (2018). Decolorization of textile reactive dyes by bacterial monoculture and consortium screened from textile dyeing effluent. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 375-380.
- Khehra, M. S., Saini, H. S., Sharma, D. K., Chadha, B. S., & Chimni, S. S. (2005). Decolorization of various azo dyes by bacterial consortium. *Dyes and pigments*, 67(1), 55-61.
- Kishor, R., Purchase, D., Saratale, G. D., Ferreira, L. F. R., Bilal, M., Iqbal, H. M., &

- Bharagava, R. N. (2021). Environment friendly degradation and detoxification of Congo red dye and textile industry wastewater by a newly isolated Bacillus cohni (RKS9). *Environmental Technology & Innovation*, 22, 101425.
- Kishor, R., Purchase, D., Saratale, G. D., Ferreira, L. F. R., Hussain, C. M., Mulla, S. I., & Bharagava, R. N. (2021). Degradation mechanism and toxicity reduction of methyl orange dye by a newly isolated bacterium Pseudomonas aeruginosa MZ520730. *Journal of Water Process Engineering*, 43, 102300.
- Kyomuhimbo, H. D., & Brink, H. G. (2023). Applications and immobilization strategies of the copper-centred laccase enzyme; a review. *Heliyon*.
- Lalnunhlimi, S., & Krishnaswamy, V. (2016). Decolorization of azo dyes (Direct Blue 151 and Direct Red 31) by moderately alkaliphilic bacterial consortium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 39-46.
- Leelakriangsak, M., & Borisut, S. (2012). Characterization of the decolorizing activity of azo dyes by Bacillus subtilis azoreductase AzoR1. *Songklanakarinn Journal of Science & Technology*, 34(5).
- Liao, C.-S., Hung, C.-H., & Chao, S.-L. (2013). Decolorization of azo dye reactive black B by Bacillus cereus strain HJ-1. *Chemosphere*, 90(7), 2109-2114.
- Liu, W., Liu, L., Liu, C., Hao, Y., Yang, H., Yuan, B., & Jiang, J. (2016). Methylene blue enhances the anaerobic decolorization and detoxication of azo dye by Shewanella onediensis MR-1. *Biochemical Engineering Journal*, 110, 115-124.
- Liu, W., You, Y., Sun, D., Wang, S., Zhu, J., & Liu, C. (2018). Decolorization and detoxification of water-insoluble Sudan dye by Shewanella putrefaciens CN32 co-cultured with Bacillus circulans BWL1061. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 166, 11-17.
- Parshetti, G., Telke, A., Kalyani, D., & Govindwar, S. (2010). Decolorization and detoxification of sulfonated azo dye methyl orange by Kocuria rosea MTCC 1532. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1-3), 503-509.
- Pearce, C., Lloyd, J., & Guthrie, J. (2003). The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes and pigments*, 58(3), 179-196.
- Sani, R. K., & Banerjee, U. C. (1999). Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by Kurthia sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(7),



433-437.

- Saratale, R. G., Gandhi, S. S., Purankar, M. V., Kurade, M. B., Govindwar, S. P., Oh, S. E., & Saratale, G. D. (2013). Decolorization and detoxification of sulfonated azo dye CI Remazol Red and textile effluent by isolated Lysinibacillus sp. RGS. *Journal of bioscience and bioengineering*, 115(6), 658-667.
- Shah, M. P., Patel, K. A., Nair, S. S., & Darji, A. (2013). Optimization of environmental parameters on microbial degradation of Reactive Black dye. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 4(3).
- Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., & Kumar, A. (2011). Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme research*, 2011.
- Singh, R. P., Singh, P. K., & Singh, R. L. (2014). Bacterial decolorization of textile azo dye acid orange by Staphylococcus hominis RMLRT03. *Toxicology international*, 21(2), 160.
- Srivastava, A., Dangi, L. K., Kumar, S., & Rani, R. (2022). Microbial decolorization of Reactive Black 5 dye by Bacillus albus DD1 isolated from textile water effluent: kinetic, thermodynamics & decolorization mechanism. *Heliyon*, 8(2), e08834.
- Sudha, M., Bakiyaraj, G., Saranya, A., Sivakumar, N., & Selvakumar, G. (2018). Prospective assessment of the Enterobacter aerogenes PP002 in decolorization and degradation of azo dyes DB 71 and DG 28. *Journal of environmental chemical engineering*, 6(1), 95-109.
- Telke, A., Kalyani, D., Jadhav, J., & Govindwar, S. (2008). Kinetics and Mechanism of Reactive Red 141 Degradation by a Bacterial Isolate Rhizobium radiobacter MTCC 8161. *Acta Chimica Slovenica*, 55(2).
- Tien, M., & Kirk, T. K. (1988). Lignin peroxidase of Phanerochaete chrysosporium. In *Methods in enzymology* (Vol. 161, pp. 238-249). Elsevier.
- Van Der Zee, F. P., Bouwman, R. H., Strik, D. P., Lettinga, G., & Field, J. A. (2001). Application of redox mediators to accelerate the transformation of reactive azo dyes in anaerobic bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 75(6), 691-701.
- Velusamy, K., Periyasamy, S., Kumar, P. S., Jayaraj, T., Gokulakrishnan, M., & Keerthana, P. (2022). Transformation of aqueous methyl orange to green metabolites using

- bacterial strains isolated from textile industry effluent. *Environmental Technology & Innovation*, 25, 102126.
- Wariishi, H., Valli, K., & Gold, M. H. (1992). Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *Journal of Biological Chemistry*, 267(33), 23688-23695.
- Wu, Y.-R., Luo, Z.-H., Chow, R. K.-K., & Vrijmoed, L. (2010). Purification and characterization of an extracellular laccase from the anthracene-degrading fungus *Fusarium solani* MAS2. *Bioresource technology*, 101(24), 9772-9777.
- Yoo, E., Libra, J., & Adrian, L. (2001). Mechanism of decolorization of azo dyes in anaerobic mixed culture. *Journal of environmental engineering*, 127(9), 844-849.
- Zhang, Y., Ma, Y., Yang, M., Min, S., Yao, J., & Zhu, L. (2011). Expression, purification, and refolding of a recombinant human bone morphogenetic protein 2 in vitro. *Protein expression and purification*, 75(2), 155-160.
- Zimmermann, T., Kulla, H. G., & Leisinger, T. (1982). Properties of purified Orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. *European Journal of Biochemistry*, 129(1), 197-203.
- ชนิษฐา. (2550a). ตอนที่ 3 : สีย้อม. สืบค้นจาก [https://www.tpa.or.th/writer/read\\_this\\_book\\_topic.php?bookID=370&pageid=3&ead=true&count=true](https://www.tpa.or.th/writer/read_this_book_topic.php?bookID=370&pageid=3&ead=true&count=true)
- ชนิษฐา. (2550b). ตอนที่ 6 : ประเภทของสีย้อม. สืบค้นจาก [https://www.tpa.or.th/writer/read\\_this\\_book\\_topic.php?bookID=370&pageid=6&ead=true&count=true](https://www.tpa.or.th/writer/read_this_book_topic.php?bookID=370&pageid=6&ead=true&count=true)
- จิระนันท์ สินทร. (2561). การกำจัดสีน้ำเสียโรงงานสิ่งทอโดยใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์สายพันธุ์ FN1 และ FN2 ที่แยกได้จากน้ำเสียโรงงานสิ่งทอ มหาวิทยาลัยศิลปากร]. นครปฐม.
- ฉัตรินธุ์ คำใจ. (2552). การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. เชียงใหม่.
- นурดา สะบาหานาเลาะ. (2561). การคัดแยกยีสต์และประสิทธิภาพในการกำจัดสีย้อมอะโซ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์]. สงขลา.
- ปิยะบุตร โพธิคามบำรุง. (2554). การลดความเข้มข้นสีในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตผ้าหม้อห้อมด้วยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสม มหาวิทยาลัยแม่โจ้. เชียงใหม่.
- รวินภา ศรีมูล. (2559). การบำบัดสีย้อมในน้ำเสียด้วยกระบวนการดูดซับ. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น,



44(3), 419-434.

สุกัลยา บริสุทธิ์. (2553). การย่อยสลายสีย้อมเอโซด้วยเอโซรีดักเทส (AzoR1) จากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ORB7106 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์]. สงขลา.

อนุกุล เกียรติขวัญบุตร. (2556). การกำจัดสีและการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงาน สกัดน้ำมันปาล์มโดยราไวท์รอกที่ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์]. สงขลา.

อรุณี คงดี อัลเดรด. (2558). การจำแนกและชนิดของสีย้อม. สืบค้นจาก

[http://www.science.mju.ac.th/chemistry/download/a\\_kongdee/คม362-บทที่%203%20การย้อมสี-4p.pdf](http://www.science.mju.ac.th/chemistry/download/a_kongdee/คม362-บทที่%203%20การย้อมสี-4p.pdf).





ภาคผนวก

**ภาคผนวก ก**  
**วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์**

1. Production medium

เตรียมอาหาร Production medium ซึ่งอาหารโดยคำนวณปริมาณตามต้องการ ซึ่งความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อจะแสดงในตารางที่ 6 ในกรณีเตรียมอาหารแข็งจะต้องเติม 2% (w/v) Agar powder แล้วละลายด้วยน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เตรียมไว้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติม จึงเติม 0.02% (v/v) Guaiacol ลงอาหารเลี้ยงในขั้นตอนสุดท้าย

ตารางที่ 8 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Production medium

องค์ประกอบของอาหาร	ปริมาณที่ใช้
Glucose	10 g/l
Peptone	3 g/l
dipotassium hydrogen phosphate ( $K_2HPO_4$ )	0.4 g/l
Potassium dihydrogen phosphate ( $KH_2PO_4$ )	0.6 g/l
Magnesium sulfate heptahydrate ( $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.5 g/l
Manganese (II) sulfate heptahydrate ( $Mn_2SO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.005 g/l
Iron (II) sulfate heptahydrate ( $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.0005 g/l
Zinc Sulphate heptahydrate ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.001 g/l
Guaiacol	0.02% (v/v)
Agar powder	2 % (w/v)

2. LB broth

เตรียมอาหาร LB broth ซึ่งอาหารโดยคำนวณปริมาณตามต้องการ ซึ่งความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อจะแสดงในตารางที่ 9 แล้วละลายด้วยน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกันนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที

## ตารางที่ 9 องค์ประกอบของ LB broth

องค์ประกอบของอาหาร	ปริมาณที่ใช้
Yeast extract	5 g/l
Peptone	10 g/l
NaCl	10 g/l



## ภาคผนวก ข

## เตรียมสารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก pH 7.0-9.0 เข้มข้น 25 mM (25 mM Tris-Hydrochloric buffer pH 7.0-9.0) ชั่ง Tris 0.303 g ละลายในน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ปรับ pH ด้วย 25 mM HCl จนได้ pH ที่ต้องการ
2. สารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีนโซเดียมไฮดรอกไซด์ pH 10.0 เข้มข้น 25 mM (25 mM Glycine Sodium hydroxide buffer pH 10.0) ละลาย Glycine 0.1875 g และ Sodium hydroxide 0.1 g ในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml จากนั้นปรับ pH 10.0
3. สารละลายกัวเอคอลเข้มข้น 10 mM (10 mM Guaiacol) ปิเปต guaiacol 110  $\mu$ l แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 ml
4. สารละลาย 2,6-dimethoxyphenol (DMP) เข้มข้น 2 mM ในเอทานอล 10 % และในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก pH 9.0 เข้มข้น 25 mM (2mM DMP in 10% EtOH in 25 mM Tris-Hydrochloric buffer pH 9.0) ชั่ง 2,6-dimethoxyphenol (DMP) 0.031 g ละลายด้วยเอทานอล 10 ml แล้วปรับปริมาตร เป็น 100 ml ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก pH 9.0 เข้มข้น 25 mM (เตรียมสารละลายใหม่ทุกครั้ง)
5. สารละลาย 3,4-Dimethoxybenzyl alcohol เข้มข้น 10 mM (10 mM Veratryl alcohol) ปิเปต 3,4-Dimethoxybenzyl alcohol 145.3  $\mu$ l แล้วปรับปริมาตรด้วย Glycine Sodium hydroxide buffer เป็น 100 ml (เตรียมสารละลายใหม่ทุกครั้ง)
6. สารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2 mM (2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ปิเปต H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 226.7  $\mu$ l แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ตาม pH ที่ต้องการ (เตรียมสารละลายใหม่ทุกครั้ง)
7. สารละลาย Congo red เข้มข้น 40 ppm ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก pH 7.0 เข้มข้น 25 mM ชั่ง Congo red 0.004 g ละลายสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก pH 7.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml (เตรียมสารละลายใหม่ทุกครั้ง)

## ภาคผนวก ค

## กราฟมาตรฐาน

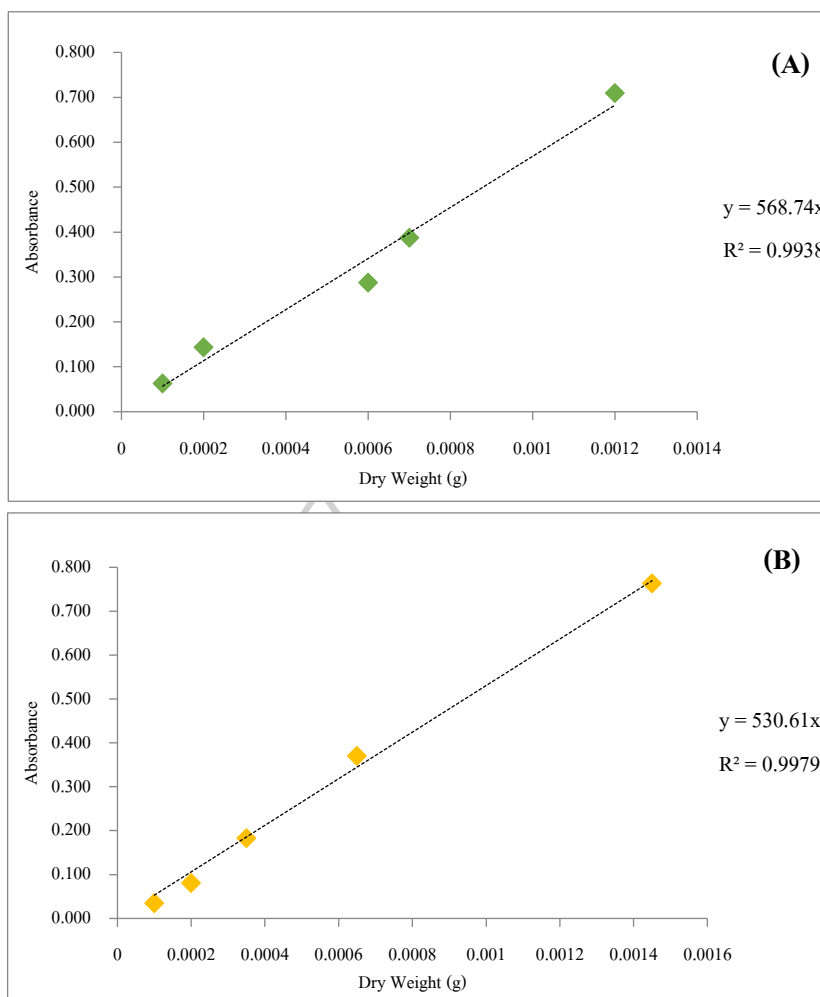
## 1. กราฟมาตรฐานของเซลล์จุลินทรีย์

การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight)

เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. FN1 และ *Bacillus* sp. FN2 โดยการเตรียมกล้าเชื้อ เชื้อโคโลนีที่มีสีชมพู-น้ำตาลแดงจากอาหารแข็ง Production agar ที่มี 0.02% (v/v) Guaiacol 1 โคโลนี ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว LB broth 5 ml เพาะเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 h จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อทั้งหมดจากหลอดทดลอง (5 ml) ลงในอาหาร Production medium มีองค์ประกอบดังนี้ (g/L) 3.0 peptone, 10 glucose, 0.6 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.001 ZnSO<sub>4</sub>, 0.4 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.0005 FeSO<sub>4</sub>, 0.05 MnSO<sub>4</sub>, 0.5 MgSO<sub>4</sub> และ 0.02% Guaiacol ปริมาตร 45 ml เพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่าง 5 ml นำไปตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นเจือจางตัวอย่างเป็นลำดับ (serial dilution) ด้วยน้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 แล้วจึงนำตัวอย่างปริมาตร 1 ml ไปวัดความหนาแน่นเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 nm และนำตัวอย่างปริมาตร 2 ml ใส่ลงในกระชงที่มีน้ำหนักคงที่แล้วจึงนำไปอบแห้งด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักของเซลล์คงที่เพื่อวัดน้ำหนักของเซลล์ คำนวณตามสมการดังต่อไปนี้

น้ำหนักแห้งเซลล์แห้ง (g/ml) = (น้ำหนักกระชงหลังอบเซลล์ (g) - น้ำหนักกระชงอบก่อนใส่เซลล์ (g)) / ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้อบ (ml)

จากนั้นพลอตกราฟเพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานในการคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของเซลล์ (OD 600) กับน้ำหนักเซลล์แห้ง (g/ml)



ภาพที่ 42 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm และ Dry weight (g) ของจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. FN1 (A) และ *Bacillus* sp. FN2 (B)



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	พริยา บัวโพธิ์
วัน เดือน ปี เกิด	27 พฤษภาคม 2540
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี
วุฒิการศึกษา	ระดับปริญญาตรี สาขาวิศวกรรมกระบวนการชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์
ที่อยู่ปัจจุบัน	102 หมู่ 2 ตำบลดงมะยาง อำเภอเสลภูมิอำนาจ จังหวัดอำนาจเจริญ 37000
ผลงานตีพิมพ์	Buapho, P and Ritthitham, S. (2022). Biodegradation and decolorization of industrial textile azo dye effluent by Bacillus sp. FN1. The Pure and Applied Chemistry International Conference 2022 (PACCON2022) “Frontiers in Chemical Sciences for Health, Energy, and Sustainability”. Department of Chemistry, School of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Thailand. June 30- July 1, 2022. 338-343 Buapho, P and Ritthitham, S. (2022). Decolorization and Detoxification of industrial textile effluent by Bacillus sp. FN2. The Pure and Applied Chemistry International Conference 2023 (PACCON2023) “Chemical Diversity Towards Sustainable Development Goals”. General Sampao Chusri Building: E4, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand. January 20 - 21, 2023. 412-416
รางวัลที่ได้รับ	Best Poster Presentation Awards ในงาน The Pure and Applied Chemistry International Conference 2023 (PACCON2023) “Chemical Diversity Towards Sustainable Development Goals”. General Sampao Chusri Building: E4, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand. January 20 - 21, 2023