เอกสารวิชาการฉบับที่ ๑/๒๕๖๑ Technical Paper No. 1/2018

การย่อยสลายทางชีวภาพของมาลาไคท์กรีนโดยแบคทีเรียจากแหล่งน้ำ
Biodegradation of Malachite Green by Bacteria from Water Resources

รุ่งนภา ว่องไวไพโรจน์ Roongnapa Wongwaipairote
ปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ Pawared Inthuserdha

กองวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ Fisheries Industrial Technology Research and Development Division
กรมประมง Department of Fisheries
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ Ministry of Agriculture and Cooperatives

เอกสารวิชาการฉบับที่ ๑/๒๕๖๑ Technical Paper No. 1/2018

การย่อยสลายทางชีวภาพของมาลาไคท์กรีนโดยแบคทีเรียจากแหล่งน้ำ
Biodegradation of Malachite Green by Bacteria from Water Resources

รุ่งนภา ว่องไวไพโรจน์ Roongnapa Wongwaipairote
ปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ Pawared Inthuserdha

กองวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ Fisheries Industrial Technology Research and Development Division
กรมประมง Department of Fisheries
๒๕๖๑ 2018
รหัสทะเบียนวิจัย 58-0805-58100

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์	4
วิธีดำเนินการ	4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	7
สรุปผลการทดลอง	20
ข้อเสนอแนะ	20
เอกสารอ้างอิง	21
ภาคผนวก	23

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ร้อยละการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเหลว 4 มิลลิลิตร	8
2	ร้อยละการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร	9
3	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดเลือก	11
4	ผลการทดสอบการย่อยคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียที่คัดเลือก	12
5	ร้อยละของการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกโดยใช้ชุดทดสอบ API 20 E	12
6	การย่อยสลายมาลาไคท์กรีนโดยเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (S7-3) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	15
7	การย่อยสลายมาลาไคท์กรีนโดยเชื้อ *Enterobacter cloacae* (S7-5) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	16
8	การย่อยสลายมาลาไคท์กรีนโดยเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (S7-3) ที่ pH ต่าง ๆ	17
9	การย่อยสลายมาลาไคท์กรีนโดยเชื้อ *Enterobacter cloacae* (S7-5) ที่ pH ต่าง ๆ	18
10	ร้อยละการย่อยสลายมาลาไคท์กรีน 10 ppm โดยเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (S7-3) ในน้ำบ่อปลา	18
11	การย่อยสลายมาลาไคท์กรีน 100 ppm โดยเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (S7-3) ในน้ำบ่อปลาผสม Nutrient Broth ในอัตราส่วน 1:1	19

สารบาญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การย่อยสลายทางชีวภาพของมาลาไคท์กรีนโดยเชื้อจุลินทรีย์ (Cha *et. al*., 2001)	4
2	การดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ผสมมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm ก่อนเลี้ยงเชื้อทดสอบ	13
3	การดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ผสมมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm หลังจากเลี้ยงเชื้อ *Enterobacter cloacae* (S7-5) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	14
4	การดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ผสมมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm หลังจากเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (S7-3) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	14

ภาพผนวกที่		
1	การย่อยสลายมาลาไคท์กรีนโดยแบคทีเรีย	23
2	การย่อยสลายมาลาไคท์กรีนในขวดรูปชมพูโดยเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (S7-3)	23
3	การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียตัวอย่างโดยชุดทดสอบ API 20 E	24

การย่อยสลายทางชีวภาพของมาลาไคท์กรีนโดยแบคทีเรียจากแหล่งน้ำ

รุ่งนภา ว่องไวไพโรจน์* และ ปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ
กองวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนจากตะกอนดินในแหล่งน้ำ รวมทั้งจำแนกชนิดและหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายของแบคทีเรียดังกล่าว ผลการคัดแยกพบแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร จำนวน 33 ไอโซเลต แต่พบเพียง 9 ไอโซเลตสามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้มากกว่าร้อยละ 80 ในเวลา 24 ชั่วโมง ผลการจำแนกชนิดพบ 7 ไอโซเลตเป็นสายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* และอีก 2 ไอโซเลตเป็นสายพันธุ์ *Enterobacter cloacae* โดยทั้งสายพันธุ์ *P. Aeruginosa* และ *E. Cloacae* มีสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายมาลาไคท์กรีน คือที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 7 และ 30-35 องศาเซลเซียส pH 6-7 ตามลำดับ และพบว่า *P. aeruginosa* สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนสูงสุดได้มากกว่าร้อยละ 89 ในเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในขณะที่ *E. cloacae* สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนสูงสุดได้มากกว่าร้อยละ 94 ในเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ได้ทดลองย่อยสลายมาลาไคท์กรีนโดยแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ใน Nutrient Broth แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 618 นาโนเมตร พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงลดลงและสีของมาลาไคท์กรีนในอาหารจางลงจนเกือบหายไป ชี้ให้เห็นว่าเป็นการย่อยสลายทางชีวภาพ

คำสำคัญ: มาลาไคท์กรีน การย่อยสลายทางชีวภาพ แบคทีเรีย แหล่งน้ำ

* ผู้รับผิดชอบ: เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ ๑๐๙๐๐ โทร. ๐-๒๙๔๐-๖๑๓๐-๔๕
e-mail: roongnapaw@dof.mail.go.th

Biodegradation of Malachite Green by Bacteria from Water Resources

Roongnapa Wongwaipairote* **and Pawared Inthuserdha**
Fisheries Industrial Technology Research and Development Division, Department of Fisheries.

Abstract

The purposes of this reseasrch were to isolate and identify the bacteria which had malachite green (MG) degradation capabilities from sediment in water resources and to find out the optimal condition of MG degradation of these isolated bacteria. The results showed that 33 isolates contained MG degradation capabilities at a concentration of 100 mg/l. However, only 9 isolates had higher degradation capabilities than 80% within 24 hours. By identification, there were 7 isolates as *Pseudomonas aeruginosa* and the rest of 2 isolates as *Enterobacter cloacae.* The optimal MG degradation conditions of both isolated bacteria were 40°C pH 7 and 30-35°C pH 6–7, respectively. Moreover, *P. aeruginosa* had the highest MG degradation capability which was more than 89% within 48 hours at 40°C whereas *E. cloacae* had the highest MG degradation capability which was more than 96% within 48 hours at 30-35°C. In addition, MG degradation capabilities by both isolated bacteria in nutrient broth were carried out. The absorption at wave length 618 nanometer was measured. The lower absorption reading and decolorization of MG was found. It could indicate that MG degradation was biodegradation.

Key words: malachite green, biodegradation, bacteria, water resource

* Corresponding author: Kaset-Klang, Chatuchak, Bangkok 10900, Tel. 0-2940-6130-45
e-mail: roongnapaw@dof.mail.go.th

คำนำ

มาลาไคท์กรีน ($C_{23}H_{25}N_2$) เป็นสารประกอบอินทรีย์ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ tri-phenylmethane ละลายได้ดีในน้ำ มักใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมการย้อมสี เช่น การย้อมผ้าไหม ผ้าฝ้าย เครื่องหนัง และ เซรามิก (Culp and Beland, 1996) และยังใช้เป็นสารต่อต้านเชื้อรา ปรสิต และแบคทีเรียในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เนื่องจากมีราคาถูก หาได้ง่าย และมีประสิทธิภาพสูงในการต่อต้านเชื้อก่อโรคในปลา (Alderman, 1984)

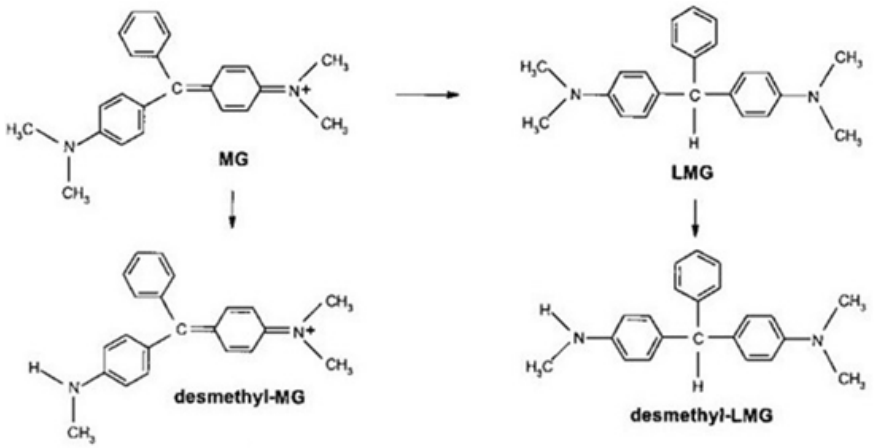
สหรัฐอเมริกาได้ประกาศห้ามใช้มาลาไคท์กรีนในกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับอาหารตั้งแต่ปี 1983 รวมทั้งสหราชอาณาจักรก็ห้ามใช้ด้วย มาลาไคท์กรีนถูกห้ามใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในหลายประเทศ เนื่องจากมีความเป็นพิษสูง เป็นสารก่อมะเร็ง สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ มีการตกค้างสูงในเนื้อเยื่อ และมีความเป็นพิษสูงต่อเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Clemmensen *et al.*, 1984) โดยที่ระดับความเข้มข้นต่ำเพียง 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้เกิดเนื้องอกที่ตับในหนู (Rao, 1995) และเป็นสาเหตุให้เกิดความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ในกระต่ายและปลา ยิ่งไปกว่านั้น มาลาไคท์กรีนสามารถถูกดูดซับโดยเซลล์ของร่างกายและเปลี่ยนรูปไปเป็นลิวโคมาลาไคท์กรีน และคาร์บินอล ซึ่งยังคงเป็นพิษต่อมนุษย์ มีนักวิจัยหลายท่าน รายงานว่า ลิวโคมาลาไคท์กรีน มีความเป็นพิษมากกว่ามาลาไคท์กรีน และตกค้างในเซลล์มนุษย์ได้นานกว่าอีกด้วย (Rao, 1995)

ประเทศไทยมีปัญหาการตรวจพบสารมาลาไคท์กรีนในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ซึ่งอาจเกิดจากการปนเปื้อนของแหล่งน้ำที่ตั้งอยู่ใกล้กับโรงงานอุตสาหกรรมที่กล่าวข้างต้น รวมทั้งยังมีการลักลอบใช้สารมาลาไคท์กรีนในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งการกระทำดังกล่าวนอกจากจะส่งผลกระทบโดยตรงต่อผู้บริโภคแล้ว สารเคมีที่ตกค้างในแหล่งน้ำยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ดังนั้นการกำจัดมาลาไคท์กรีนจากสิ่งแวดล้อมและระบบนิเวศทางน้ำ จึงเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องทำอย่างยิ่ง เนื่องจากมาลาไคท์กรีนสามารถคงอยู่ในระบบนิเวศน์ได้เป็นระยะเวลานาน และอาจปนเปื้อนสู่สัตว์น้ำที่อยู่ในแหล่งน้ำ โดยมีหลายเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ในการย่อยสลายและกำจัดมาลาไคท์กรีนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม เช่น การดูดซับ การตกตะกอนทางเคมี การย่อยสลายโดยแสง การทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่น และรีดักชั่น และการใช้วิธีทางเคมีไฟฟ้า อย่างไรก็ตาม วิธีการเหล่านี้ต้องใช้พลังงานและสารเคมีจำนวนมาก และเกิดตะกอนของเสียปริมาณสูง (Ramezani *et al.*, 2013)

มีการศึกษาการนำจุลินทรีย์หลายชนิดมาใช้ในการกำจัดมาลาไคท์กรีน เช่น white rot fungus, *Sphingomonas paucimobilis*, *Brevibacillus laterosporus*, *Bacillus cereus* DC11, *Aeromonas hydrophila* DN322, *Pseudomonas otitidis* W/L3, *Mycobacteria*, *Citrobacter* strain KCTC 18061P, *Mycobacteria*, *Kurthia* sp., *Kocuria rosea* สายพันธุ์ MTCC1532, *Bacillus* สายพันธุ์ MTCC 3330, *Achromobacter xylosoxidans* สายพันธุ์ MG1, *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ X5, *Klebsiella terrigena* สายพันธุ์ PTCC1650 ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวมีความสามารถในการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้ (Li *et al*., 2012; Parshetti *et al.,* 2006; Lal and Srivastava, 2011; Wang *et al.*, 2011; Xuying *et al.*, 2012; Ramezani *et al.,* 2013)

กลไกของการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนโดยจุลินทรีย์ซึ่งจะทำให้สีของมาลาไคท์กรีนจางลง มี 2 วิธี ดังนี้ 1) การดูดซับ (Absorption) คือการดูดซับสารมาลาไคท์กรีนเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งจะทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์มีสีเข้มขึ้น และ 2) การย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation) คือ การย่อยสลายมาลาไคท์กรีนโดยจุลินทรีย์ ซึ่งจะทำให้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมมาลาไคท์กรีนมีสีจางลง (Zhou and Zimmermann, 1993) โดย Yatome *et al*. (1991) ได้รายงานว่าแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มี

มาลาไคท์กรีนเข้มข้น เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้สามารถใช้มาลาไคท์กรีนเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ โดยอาศัยปฏิกิริยาการดึงหมู่เมทิล (demethylation) ออกจากโครงสร้างของมาลาไคท์กรีนกลายเป็น desmethyl-MG ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การย่อยสลายทางชีวภาพของมาลาไคท์กรีนโดยเชื้อจุลินทรีย์ (Cha *et. al*., 2001)

อย่างไรก็ตาม การศึกษาวิจัยเรื่องนี้ในประเทศไทยยังมีน้อยมาก คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการพัฒนาวิธีการกำจัดมาลาไคท์กรีนโดยใช้จุลินทรีย์ ซึ่งเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเกิดตะกอนของเสียน้อย ราคาไม่แพง และสามารถย่อยสลายสีย้อมจนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ไม่เป็นพิษ โดยการคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งน้ำเพื่อนำมาใช้ในการกำจัดมาลาไคท์กรีนที่ตกค้าง ซึ่งอาจเกิดจากการลักลอบใช้สารดังกล่าวในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ หรือมาจากการปนเปื้อนของน้ำทิ้ง จากโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนสู่สัตว์น้ำในธรรมชาติหรือสัตว์น้ำที่เพาะเลี้ยงในแหล่งน้ำบริเวณใกล้เคียง ซึ่งอาจช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของมาลาไคท์กรีนสู่ปลายทางในวัตถุดิบสัตว์น้ำได้ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งน้ำและศึกษาความสามารถในการย่อยสลายมาลาไคท์กรีน รวมทั้งจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนของแบคทีเรียที่แยกได้

วิธีดำเนินการ

1. วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1.1 เครื่องมือ

- เครื่องชั่งไฟฟ้า (electric balance) รุ่น CP3202s ยี่ห้อ Sartorius
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-1800 ยี่ห้อ SHIMADZU
- เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refreigerated centrifuge) รุ่น MRX-150 ยี่ห้อ TOMY
- กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น BH2 ยี่ห้อ OLYMPUS

- ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator) รุ่น BM400 ยี่ห้อ Memmert
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 3310 ยี่ห้อ JENWAY
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 ยี่ห้อ TOMY

1.2 สารเคมี

- มาลาไคท์กรีน ($C_{23}H_{25}N_2 \cdot C_2HO_4 \cdot 0.5C_2H_2O_4$) ยี่ห้อ SIGMA
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ยี่ห้อ Merck

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- nutrient broth ยี่ห้อ Difco
- peptone ยี่ห้อ Difco

2. วิธีการทดลอง

2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย ดัดแปลงจากวิธีของ Lal *et al.* (2011)

เก็บตัวอย่างตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงปลาใน 3 จังหวัด คือ สมุทรปราการ ศรีสะเกษ และพังงา โดยสุ่มตัวอย่างตะกอนดินบ่อละ 2 จุดๆ ละ 500 กรัม เพื่อกระจายความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียที่จะนำมาใช้ในการทดสอบการย่อยสลายมาลาไคท์กรีน นำมาคัดแยกเชื้อแบคทีเรียโดยชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารวุ้น nutrient agar ผสมมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (part per million : ppm) ทำการ spread plate และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่สร้างโซนใสที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันมาแยกเชื้อโดยการ streak plate บนอาหาร nutrient agar ที่ผสมมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวเขี่ยลงบนอาหาร nutrient agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบต่อไป

2.2 การทดสอบการย่อยสลายมาลาไคท์กรีน ดัดแปลงจากวิธีของ Lal *et al.* (2011)

นำเชื้อที่แยกได้จากข้อ 2.1 มาเขี่ยเชื้อใส่ในอาหารเหลว nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้ OD_{600} เท่ากับ 0.6 จากนั้นปิเปตเชื้อทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลว nutrient broth ที่เติมสารละลายมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm และฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 4 มิลลิลิตร ทำ 3 ซ้ำ สำหรับชุดควบคุมเป็นอาหารเหลว nutrient broth ที่เติมมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm ที่ไม่ใส่เชื้อทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนที่เปลี่ยนไป โดยสุ่มตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส และนำส่วนใสที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 618 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และคำนวณหาค่าร้อยละของการย่อยสลายดังนี้

$$\text{ร้อยละของการย่อยสลาย} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้})}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น}} \times 100$$

คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้สูง มาทดสอบการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนอีกครั้งเพื่อขยายระดับการทดลองในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่ใส่อาหารเหลว nutrient broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อยืนยันผลการทดลอง โดยใช้วิธีการทดสอบและคำนวณร้อยละของการย่อยสลายเช่นเดียวกัน

2.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย ตามวิธีของ นงลักษณ์ และปรีชา (2544)

ศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียทางสัณฐานวิทยา เช่น ย้อมแกรมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และทดสอบทางชีวเคมี รวมทั้งการย่อยคาร์โบไฮเดรต โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E ของ BIOMERIEURX

2.4 การทดสอบการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนทางชีวภาพ (Biodegradation)

นำเชื้อที่แยกได้จากข้อ 2.2 อย่างน้อย 2 สายพันธุ์ มาทดสอบการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนทางชีวภาพ โดยเลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหารเหลว nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้ OD_{600} เท่ากับ 0.6 จากนั้นปิเปตเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลว nutrient broth ที่เติมสารละลายมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm และฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 4 มิลลิลิตร ทำ 3 ซ้ำ สำหรับชุดควบคุมเป็นอาหารเหลว nutrient broth ที่เติมมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm ที่ไม่ใส่เชื้อทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนที่เปลี่ยนไป โดยสุ่มตัวอย่างก่อนและหลังการเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส และนำส่วนใสที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 618 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และตรวจหาการเกิดสารลิวโคมาลาไคท์กรีนจากการย่อยสลายมาลาไคท์กรีน โดยตรวจหา peak ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของลิวโคมาลาไคท์กรีน

2.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายมาลาไคท์กรีน

2.5.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิ ดัดแปลงจากวิธีของ Nan *et al.* (2012)

เลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหารเหลว nutrient broth pH 6.8 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้ OD_{600} เท่ากับ 0.6 จากนั้นปิเปตเชื้อทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว nutrient broth ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีการเติมมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm ทำ 3 ซ้ำ สำหรับชุดควบคุมเป็นอาหารเหลว nutrient broth ที่เติมมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm ที่ไม่ใส่เชื้อทดสอบ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นสุ่มตัวอย่างปริมาตร 4 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 618 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และคำนวณค่าร้อยละของการย่อยสลาย

2.5.2 ศึกษาผลของ pH ดัดแปลงจากวิธีของ Nan *et al.* (2012)

เลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหารเหลว nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้ OD_{600} เท่ากับ 0.6 จากนั้นปิเปตเชื้อทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว nutrient broth ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm พร้อมทั้งปรับ pH เป็น 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ทำ 3 ซ้ำ

บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นสุ่มตัวอย่างปริมาตร 4 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 618 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และคำนวณค่าร้อยละของการย่อยสลาย

2.6 การศึกษาความเป็นไปได้ในการนำไปประยุกต์ใช้

ศึกษาการนำไปประยุกต์ใช้กับบ่อปลา โดยการนำน้ำจากบ่อปลามาใช้ในการทดสอบการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (S7-3) เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้ OD_{600} เท่ากับ 0.6 จากนั้นปิเปตเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำบ่อปลาปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่มาลาไคท์กรีนเข้มข้น 10 ppm ทำ 3 ซ้ำ และชุดควบคุมเป็นน้ำบ่อที่ไม่ใส่เชื้อ โดยทดสอบความสามารถในการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนเปรียบเทียบกับน้ำบ่อปลาผสม Nutrient Broth ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่เชื้อทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร และใส่มาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm นำชุดทดสอบทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นสุ่มตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 618 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และคำนวณค่าร้อยละของการย่อยสลาย

3. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design) วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดย Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปในการคำนวณทางสถิติ

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายมาลาไคท์กรีนจากแหล่งน้ำ

จากการทดลองสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่เจริญได้ในอาหาร nutrient agar ที่ผสมมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm โดยโคโลนีที่สร้างโซนใสได้ทั้งหมด 33 ไอโซเลต จากตัวอย่างตะกอนดินในแหล่งน้ำ 3 จังหวัด คือ สมุทรปราการ ศรีสะเกษ และพังงา

2. ผลการทดสอบการย่อยสลายมาลาไคท์กรีน

ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนเบื้องต้นของเชื้อ 33 ไอโซเลต ในหลอดทดลอง ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 1 พบว่า ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีเชื้อทดสอบเพียง 1 ไอโซเลต ที่สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้ต่ำกว่าร้อยละ 91 คือเชื้อ S4-4 ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้เพียงร้อยละ 33.20 ± 0.68 ในขณะที่เวลา 24 ชั่วโมง มีเชื้อทดสอบ 15 ไอโซเลต ที่สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้สูง คือ เชื้อทดสอบรหัส S2-9, S4-1, S4-2, S4-5, S5-1, S6-1, S6-2, S6-4, S6-5, S6-7, S7-1, S7-3, S7-5, S8-3 และ S8-4 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) กับเชื้อทดสอบอีก 18 ไอโซเลต ซึ่งทั้ง 15 ไอโซเลต สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้สูงกว่าร้อยละ 88 ดังนั้น จึงคัดเลือกเชื้อดังกล่าวไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 1 ร้อยละการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเหลว 4 มิลลิลิตร

รหัสเชื้อทดสอบ	ร้อยละของการย่อยสลายที่ 24 ชั่วโมง	ร้อยละของการย่อยสลายที่ 48 ชั่วโมง
S1-1	34.88±1.95 ^{dA}	95.07±0.51 ^{ijklB}
S2-2	78.92±6.55 ^{efgA}	95.46±0.13 ^{jklmB}
S2-4	4.14±1.90 ^{aA}	96.24±0.65 ^{klmnoB}
S2-8	84.71±0.81 ^{ghiA}	96.55±0.67 ^{mnoB}
S2-9	89.70±0.79 ^{hijA}	94.95±0.19 ^{ijkB}
S3-1	8.08±4.44 ^{aA}	92.37±1.34 ^{bcdefB}
S3-2	76.28±6.49 ^{efA}	94.56±0.42 ^{hijA}
S3-5	73.72±7.90 ^{eA}	96.55±0.23 ^{mnoB}
S3-8	76.35±0.92 ^{efA}	96.33±0.56 ^{klmnoB}
S4-1	90.80±0.88 ^{hijA}	97.31±0.37 ^{oB}
S4-2	91.82±0.76 ^{hijA}	97.59±0.54 ^{oB}
S4-4	8.57±1.68 ^{aA}	33.20±0.68 ^{aB}
S4-5	88.63±2.77 ^{hijA}	97.21±0.38 ^{noB}
S5-1	94.44±1.80 ^{jA}	96.51±1.97 ^{lmnoA}
S5-2	79.65±1.29 ^{efgA}	91.49±1.61 ^{bcB}
S5-3	77.97±1.32 ^{efgA}	93.93±0.23 ^{ghiB}
S5-4	16.38±6.46 ^{bA}	94.88±0.50 ^{ijkB}
S5-5	26.56±7.19 ^{cA}	95.34±0.24 ^{ijklmB}
S6-1	90.12±1.02 ^{hijA}	92.76±0.54 ^{cdefgA}
S6-2	90.64±0.97 ^{hijA}	91.27±1.24 ^{bA}
S6-4	91.17±0.24 ^{hijA}	92.64±0.54 ^{bcdefgA}
S6-5	91.56±1.18 ^{hijA}	91.86±0.74 ^{bcdeA}
S6-6	79.19±0.88 ^{efgA}	92.95±0.44 ^{defgB}
S6-7	91.12±2.25 ^{hijA}	95.12±0.69 ^{ijklmA}
S6-8	18.94±2.31 ^{bA}	95.83±0.58 ^{jklmnB}
S7-1	91.58±0.95 ^{hijA}	93.35±0.72 ^{fghA}
S7-2	78.65±0.72 ^{efgA}	93.37±0.41 ^{fghB}
S7-3	91.23±1.15 ^{hijA}	91.61±0.78 ^{bcdA}
S7-4	83.54±1.90 ^{fghA}	91.89±1.02 ^{bcdeB}
S7-5	90.40±0.60 ^{hijA}	96.27±0.63 ^{klmnoB}
S8-2	80.31±3.20 ^{efgA}	93.12±0.60 ^{efgB}
S8-3	93.54±0.52 ^{jA}	95.15±0.12 ^{ijklmB}
S8-4	92.64±0.24 ^{ijA}	94.65±0.91 ^{hijB}

$^{a, b, c}$ อักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

$^{A, B}$ อักษรที่แตกต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

นำเชื้อทดสอบ 15 ไอโซเลต ที่สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้สูงกว่าร้อยละ 88 ภายในเวลา 24 ชั่วโมง มาทดสอบการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนอีกครั้งในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว nutrient broth ผสมมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งผลแสดงดังตารางที่ 2 พบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อทั้ง 15 ไอโซเลตสามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้สูงกว่าร้อยละ 88 ในขณะที่เวลา 24 ชั่วโมง มีเชื้อทดสอบเพียง 9 ไอโซเลต คือ เชื้อรหัส S2-9, S6-1, S6-2, S6-4, S6-5, S7-3, S7-5, S8-3 และ S8-4 ที่สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm ได้สูงกว่าร้อยละ 80 จึงนำเชื้อทั้ง 9 ไอโซเลต ไปทำการจำแนกชนิดต่อไป

ตารางที่ 2 ร้อยละการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร

รหัสเชื้อทดสอบ	ร้อยละของการย่อยสลายที่ 24 ชั่วโมง	ร้อยละของการย่อยสลายที่ 48 ชั่วโมง
S2-9	82.22±1.88 ^{fgA}	90.89±1.00 ^{bcB}
S4-1	74.65±5.30 ^{cdeA}	90.65±0.52 ^{bcB}
S4-2	72.85±3.53 ^{cdA}	91.26±1.31 ^{cdB}
S4-5	69.95±1.53 ^{cA}	92.99±0.10 ^{eB}
S5-1	35.33± 6.93 ^{aA}	91.44±0.44 ^{cdeB}
S6-1	80.02±2.21 ^{efgA}	89.16±1.48 ^{abB}
S6-2	80.73±1.20 ^{efgA}	89.76±0.87 ^{abcB}
S6-4	82.29±2.87 ^{fgA}	88.88±1.24 ^{aB}
S6-5	81.34±1.42 ^{efgA}	89.99±0.42 ^{abcB}
S6-7	58.80±1.42 ^{bA}	92.58±0.60 ^{deB}
S7-1	79.21±1.36 ^{defA}	90.43±0.58 ^{abcB}
S7-3	87.27±0.30 ^{gA}	91.07±0.34 ^{cdB}
S7-5	84.40±1.92 ^{fgA}	95.10±0.64 ^{fB}
S8-3	85.15±1.10 ^{fgA}	89.95±1.32 ^{abcB}
S8-4	86.62±1.13 ^{fgA}	90.48±1.32 ^{abcB}

$^{a, b, c}$ อักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

$^{A, B}$ อักษรที่แตกต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

3. ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

นำเชื้อทดสอบ 9 ไอโซเลต จากข้อ 2 ที่สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขวดรูปชมพู่ ได้สูงกว่าร้อยละ 80 คือ เชื้อทดสอบรหัส S2-9, S6-1, S6-2, S6-4, S6-5, S7-3, S7-5, S8-3 และ S8-4 มาจำแนกชนิดโดยการย้อมแกรม ทดสอบทางชีวเคมีและการย่อยคาร์โบไฮเดรต โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E ผลการย้อมแกรมพบว่าเชื้อทั้ง 9 ไอโซเลต มีรูปร่างเป็นท่อน และติดสีแกรมลบ สำหรับผลการทดสอบทางชีวเคมีแสดงดังตารางที่ 3 พบว่า เชื้อทดสอบรหัส S6-1, S6-2, S6-4, S6-5, S7-3, S8-3 และ S8-4 ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีใกล้เคียงกัน คือ ให้ผลเป็นบวกในการทดสอบ arginine dihydrolase, citrate, gelatinase, motility, MacConkey และ oxidation และให้ผลเป็นลบในการทดสอบ β-galactosidase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, hydrogen sulfide, tryptophan deaminase, indole, Voges-Proskauer, nitrites, N_2 gas และ fermentation ยกเว้น urease ที่เชื้อทดสอบ S6-5 ให้ผลเป็นบวก แต่เชื้ออื่นให้ผลเป็นลบ ในขณะที่เชื้อทดสอบรหัส S2-9 และ S7-5

มีผลการทดสอบทางชีวเคมีใกล้เคียงกัน คือให้ผลเป็นบวกในการทดสอบ β-galactosidase, arginine dihydrolase, citrate, Voges-Proskauer, nitrites, motility, MacConkey, oxidation และ fermentation และให้ผลเป็นลบ ในการทดสอบ lysine decarboxylase, hydrogen sulfide, urease, indole, gelatinase, oxidase และ N_2 gas ยกเว้น ornithine decarboxylase และ tryptophan deaminase ที่ให้ผลต่างกัน สำหรับผล การทดสอบการย่อยคาร์โบไฮเดรตแสดงดังตารางที่ 4 พบว่าเชื้อทดสอบรหัส S2-9 และ S7-5 มีผลการทดสอบใกล้เคียงกัน คือ glucose, mannose, sorbitol, rhamnose, sucrose, melibiose, amygdalin และ arabinose ให้ผลเป็นบวก ในขณะที่เชื้อทดสอบรหัส S6-1, S6-2, S6-4, S6-5, S7-3, S8-3 และ S8-4 มีผลการทดสอบที่เหมือนกัน คือให้ผลเป็นบวกใน glucose และ arabinose ให้ผลเป็นลบใน mannose, inositol, sorbitol, rhamnose, sucrose, melibiose และ amygdalin

ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลต โดยชุดทดสอบ API 20E (ตารางที่ 5) พบว่าเชื้อทดสอบรหัส S2-9 และ S7-5 เป็นสายพันธุ์ *Enterobacter cloacae* ซึ่งมีผลการทดสอบ Voges-Proskauer, motility, MacConkey, oxidation, fermentation และการย่อยน้ำตาล glucose, mannose, sorbitol, rhamnose, sucrose, melibiose และ arabinose เป็นบวก และให้ผลการทดสอบ indole และ gelatinase เป็นลบ สำหรับเชื้อทดสอบรหัส S6-1, S6-2, S6-4, S6-5, S7-3, S8-3 และ S8-4 เป็นสายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งมีผลการทดสอบ gelatinase, motility, MacConkey และการย่อยน้ำตาล glucose เป็นบวก และให้ผลการย่อยน้ำตาล mannose, inositol, sorbitol, rhamnose และ sucrose เป็นลบ ผลที่ได้สอดคล้องกับคู่มือการคัดแยกแบคทีเรียในหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, Part B (Brenner *et al*., 2004) เชื้อ *Enterobacter cloacae* มักพบได้ในดิน น้ำ น้ำเสีย เนื้อสัตว์ ผิวหนังและลำไส้ของคนและสัตว์ และมักเป็นสาเหตุของการติดเชื้อภายในโรงพยาบาล และเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* มักพบกระจายในดิน น้ำ ขยะ และพืช รวมทั้งในลำไส้ของคน เชื้อชนิดนี้ทำให้เกิดการเน่าเสีย และมักเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในผู้ที่ภูมิคุ้มกันต่ำ หรือผู้ป่วยภายในโรงพยาบาล (กนกรัตน์, 2541)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดเลือก

รายการทดสอบ	รหัสเชื้อทดสอบ								
	S2-9	S6-1	S6-2	S6-4	S6-5	S7-3	S7-5	S8-3	S8-4
β-galactosidase	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Arginine-dihydrolase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lysine-decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine-decarboxylase	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrogen sulfide	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Tryptophan-deaminase	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Gelatinase	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Oxidase	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Nitrites	+	-	-	-	-	-	+	-	-
N_2 gas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MacConkey	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentation	+	-	-	-	-	-	+	-	-

ตารางที่ 4 ผลทดสอบการย่อยคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียที่คัดเลือก

ลำดับที่	รหัสเชื้อทดสอบ	glucose	mannose	inositol	sorbitol	rhamnose	sucrose	melibiose	amygdalin	arabinose
1	S2-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	S6-1	+	-	-	-	-	-	-	-	+
3	S6-2	+	-	-	-	-	-	-	-	+
4	S6-4	+	-	-	-	-	-	-	-	+
5	S6-5	+	-	-	-	-	-	-	-	+
6	S7-3	+	-	-	-	-	-	-	-	+
7	S7-5	+	+	-	+	+	+	+	+	+
8	S8-3	+	-	-	-	-	-	-	-	+
9	S8-4	+	-	-	-	-	-	-	-	+

ตารางที่ 5 ร้อยละของการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกโดยใช้ชุดทดสอบ API 20 E

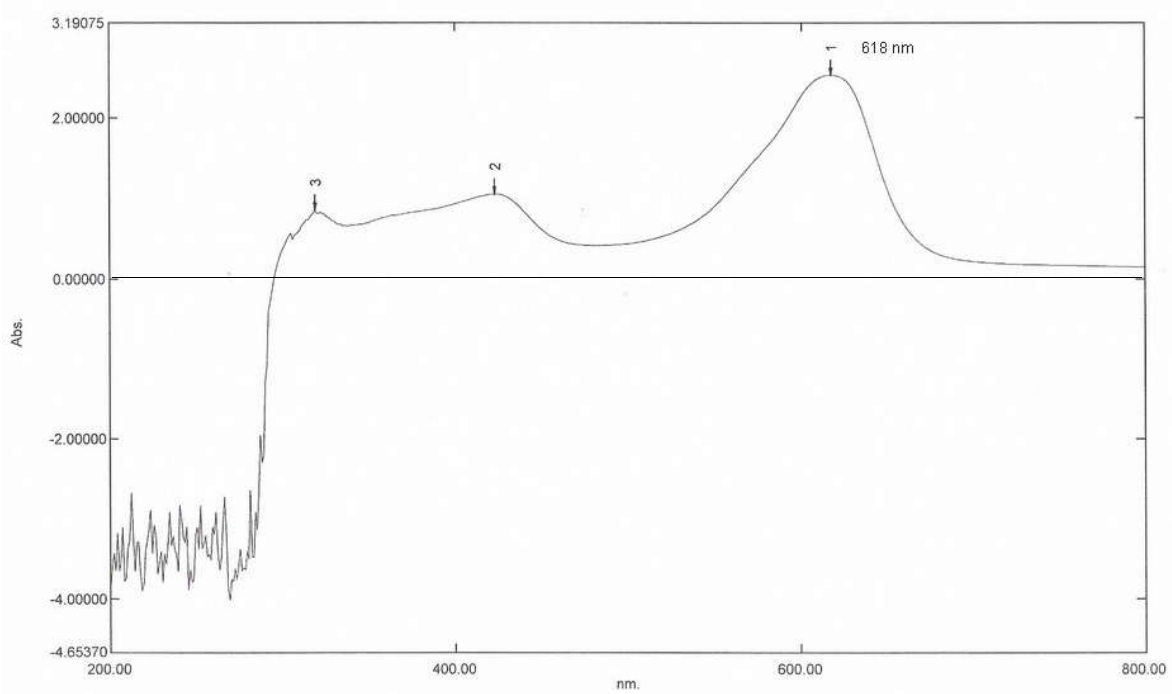
รหัสเชื้อทดสอบ	สายพันธุ์	ร้อยละของการจำแนกชนิด
S2-9	*Enterobacter cloacae*	91.3
S6-1	*Pseudomonas aeruginosa*	84.5
S6-2	*Pseudomonas aeruginosa*	84.5
S6-4	*Pseudomonas aeruginosa*	84.5
S6-5	*Pseudomonas aeruginosa*	99.9
S7-3	*Pseudomonas aeruginosa*	84.5
S7-5	*Enterobacter cloacae*	95.3
S8-3	*Pseudomonas aeruginosa*	84.5
S8-4	*Pseudomonas aeruginosa*	84.5

จากผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลต (ตารางที่ 5) พบว่าเป็นสายพันธุ์ *Enterobacter cloacae* จำนวน 2 ไอโซเลต และเป็นสายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* จำนวน 7 ไอโซเลต ดังนั้นจึงคัดเลือกตัวแทนของเชื้อทดสอบสายพันธุ์ละ 1 ไอโซเลต โดยพิจารณาจากความสามารถในการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนในตารางที่ 2 ได้เชื้อทดสอบรหัส S7-5 เป็นตัวแทนของ *Enterobacter cloacae* และเชื้อทดสอบรหัส S7-3 เป็นตัวแทนของ *Pseudomonas aeruginosa* เพื่อนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนต่อไป

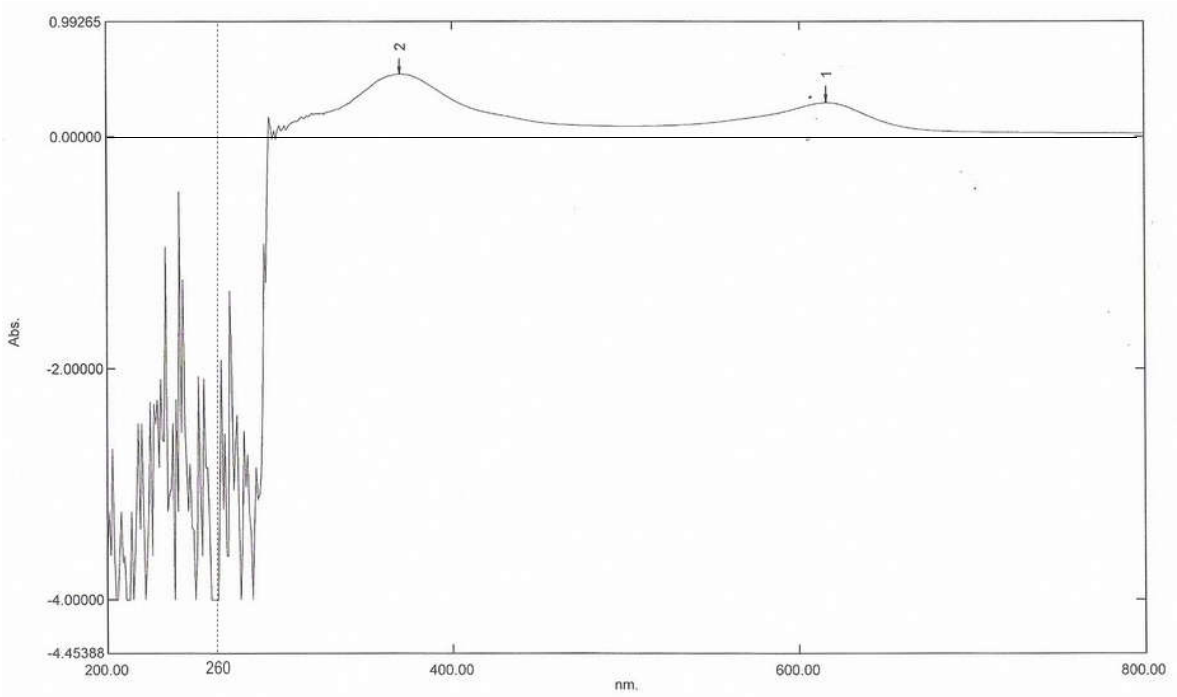
4. ผลการทดสอบการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนทางชีวภาพ (Biodegradation)

ผลการทดสอบการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนทางชีวภาพ โดยการวัดการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ผสมมาลาไคท์กรีนก่อนเลี้ยงเชื้อทดสอบ ดังภาพที่ 2 ปรากฏ peak ที่ความยาวคลื่น 618 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดของมาลาไคท์กรีน และวัดการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากเลี้ยงเชื้อทดสอบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 6.8 เป็นเวลา 24

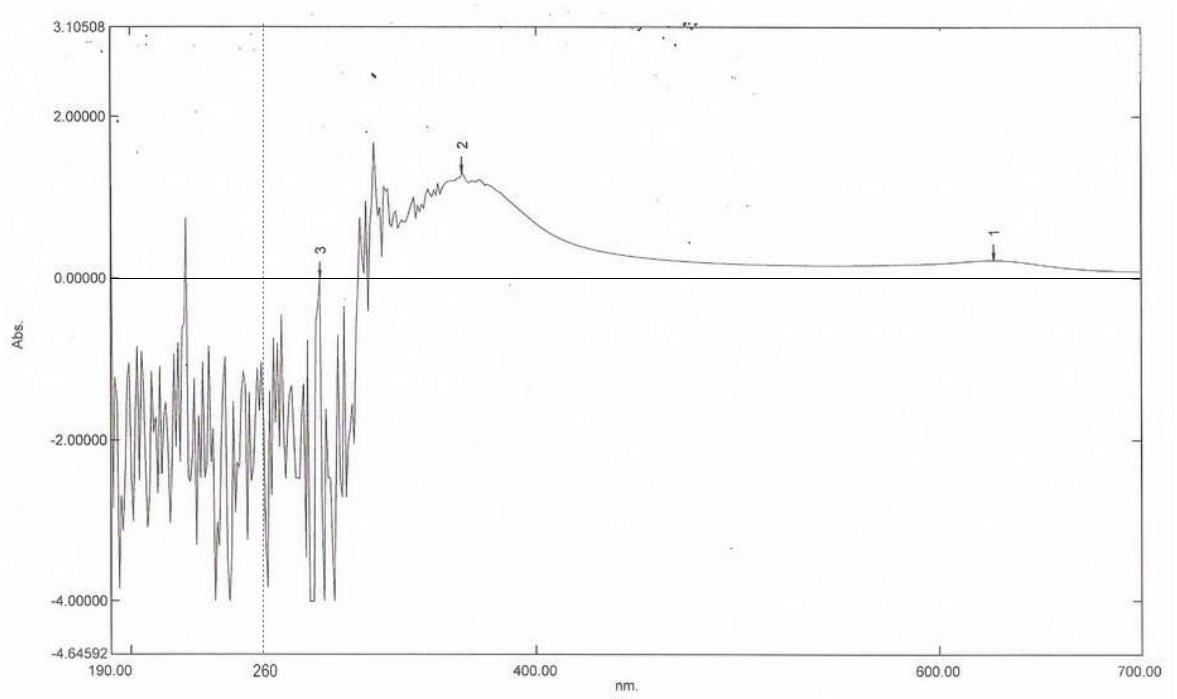
และ 48 ชั่วโมง ดังภาพที่ 3 และ 4 ตามลำดับ พบว่าความสูงของ peak ที่ความยาวคลื่น 618 นาโนเมตร ลดลงจนเกือบหายไป ซึ่งเป็นการยืนยันถึงการลดลงของมาลาไคท์กรีนเกิดจากการย่อยสลายทางชีวภาพโดยเชื้อทดสอบ และตรวจไม่พบ peak ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดของลิวโคมาลาไคท์กรีน (Lal and Srivastava, 2011) แสดงให้เห็นว่าการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนโดยเชื้อทดสอบรหัส S7-3 และ S7-5 ไม่เกิดเป็นสารลิวโคมาลาไคท์กรีน



ภาพที่ 2 การดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ผสมมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm ก่อนเลี้ยงเชื้อทดสอบ



ภาพที่ 3 การดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ผสมมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm หลังจากเลี้ยงเชื้อ *Enterobacter cloacae* (S7-5) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 4 การดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ผสมมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm หลังจากเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (S7-3) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

5. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายมาลาไคท์กรีน

5.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายมาลาไคท์กรีน

ผลการศึกษาการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนที่ 3 อุณหภูมิ คือ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ของเชื้อทดสอบรหัส S7-3 และ S7-5 แสดงดังตารางที่ 6 และ 7 ตามลำดับ จากตารางที่ 6 พบว่า เชื้อ S7-3 สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm ได้ร้อยละ 78.79, 82.68 และ 82.62 ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อทั้ง 3 อุณหภูมิ ให้ผลการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (P>0.05) แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อต่อไปเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เชื้อ S7-3 ที่บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm ได้สูงถึงร้อยละ 89 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P≤0.05) กับเชื้อ S7-3 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากเชื้อ S7-3 เป็นสายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 42 องศาเซลเซียส (Brenner *et al*., 2004) ดังนั้น ในการทดลองนี้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส คืออุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนของเชื้อ S7-3

ตารางที่ 6 การย่อยสลายมาลาไคท์กรีนโดยเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (S7-3) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เวลา	ร้อยละของการย่อยสลาย		
	30 องศาเซลเซียส	35 องศาเซลเซียส	40 องศาเซลเซียส
24 ชั่วโมง	78.79±2.87[a]	82.68±1.68[a]	82.62±3.00[a]
48 ชั่วโมง	84.51±1.17[b]	84.57±1.82[b]	89.45±1.14[a]

[a, b] อักษรที่แตกต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P≤0.05)

เมื่อพิจารณาผลการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยเชื้อ S7-5 ตามตารางที่ 7 พบว่าที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อ S7-5 ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm ได้มากกว่าร้อยละ 92 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P≤0.05) กับที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส คือมีการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนเพียงร้อยละ 16 ถึงแม้ว่าเชื้อ S7-5 เป็นสายพันธุ์ *Enterobacter cloacae* ซึ่งสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 30-37 องศาเซลเซียส (Brenner *et al*., 2004) ดังนั้นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จึงอาจเป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมในการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนของเชื้อ S7-5 โดย Lv *et al*. (2013) ได้รายงานว่าอุณหภูมิมีผลกระทบต่อการย่อยสลายมาลาไคท์กรีน โดยที่อุณหภูมิสูงจะสามารถยับยั้งการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ และเมื่อเลี้ยงเชื้อต่อไปเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส เชื้อ S7-5 สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm ได้มากกว่าร้อยละ 94 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P≤0.05) กับที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส คือเชื้อ S7-5 สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้เพียงร้อยละ 60 ซึ่งอาจเนื่องมาจากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนของเชื้อ S7-5 คืออุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส เนื่องจากมีการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้สูงเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 7 การย่อยสลายมาลาไคท์กรีนโดยเชื้อ *Enterobacter cloacae* (S7-5) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เวลา	ร้อยละของการย่อยสลาย		
	30 องศาเซลเซียส	35 องศาเซลเซียส	40 องศาเซลเซียส
24 ชั่วโมง	93.39±0.18[a]	92.60±0.94[a]	16.24±1.68[b]
48 ชั่วโมง	94.05±0.10[a]	95.35±0.48[a]	60.55±2.07[b]

[a, b] อักษรที่แตกต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P≤0.05)

เมื่อเปรียบเทียบผลการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนของเชื้อทดสอบทั้ง 2 ไอโซเลต คือ S7-3 และ S7-5 พบว่า เชื้อทดสอบรหัส S7-5 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ *Enterobacter cloacae* สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้มากกว่าเชื้อทดสอบรหัส S7-3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* (ตารางที่ 6 และ 7) กล่าวคือ เชื้อ S7-5 มีค่าร้อยละของการย่อยสลายสูงสุดคือ ร้อยละ 93 และ 95 ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่ เชื้อ S7-3 มีค่าร้อยละของการย่อยสลายสูงสุดคือ ร้อยละ 82 และ 89 ที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

5.2 การศึกษาผลของ pH ต่อการย่อยสลายมาลาไคท์กรีน

ผลการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนโดยเชื้อทดสอบรหัส S7-3 และ S7-5 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ pH ต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 8 และ 9 ตามลำดับ จากตารางที่ 8 พบว่า เชื้อ S7-3 ที่เลี้ยงในอาหาร pH 7 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm ได้สูงสุดคือร้อยละ 72 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P≤0.05) กับที่ pH อื่น ๆ โดย pH ที่เชื้อ S7-3 สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้รองลงมาคือ pH 6 โดยมีค่าร้อยละของการย่อยสลายเท่ากับ 61 แต่ที่ pH 4 และ 5 เชื้อ S7-3 ย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้เพียงร้อยละ 8-9 เท่านั้น Wang *et al*. (2011) แยกเชื้อ *Achromobacter xylosoxidans* MG1 จากน้ำทิ้งของโรงงานย้อมผ้า และศึกษาการย่อยสลายมาลาไคท์กรีน ของเชื้อดังกล่าวที่ pH 3-12 พบว่า ร้อยละของการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนที่ pH ต่าง ๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ pH 6 และ 7 มีค่าร้อยละของการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนสูงกว่าที่ pH อื่น ๆ ดังนั้น pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อการย่อยสลายมาลาไคท์กรีน (Ramezani *et al*., 2013)

เมื่อเลี้ยงเชื้อ S7-3 ต่อไปจนครบ 48 ชั่วโมง พบว่าที่ pH 6 และ 7 เชื้อ S7-3 สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้มากกว่าร้อยละ 83 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P≤0.05) กับที่ pH อื่น ๆ โดยที่ pH 5 เชื้อ S7-3 สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้รองลงมาคือ ร้อยละ 67 แต่ที่ pH 4 การย่อยสลายของมาลาไคท์กรีนโดยเชื้อ S7-3 แทบจะไม่เพิ่มขึ้นเลย ทั้งนี้เนื่องมาจากเชื้อ S7-3 เป็นสกุล *Pseudomonas* ซึ่งแบคทีเรียสกุลนี้ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็นกรด คือ pH ต่ำกว่า 4.5 (Brenner *et al*., 2004) ดังนั้น pH ที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลายของมาลาไคท์กรีนของเชื้อ S7-3 คือ pH 7

ตารางที่ 8 การย่อยสลายมาลาไคท์กรีนโดยเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (S7-3) ที่ pH ต่าง ๆ

pH	ร้อยละของการย่อยสลายที่ 24 ชั่วโมง	ร้อยละของการย่อยสลายที่ 48 ชั่วโมง
4	9.29±0.33[d]	9.39±0.37[d]
5	8.53±2.74[d]	67.49±3.66[b]
6	61.19±3.99[b]	83.27±1.26[a]
7	72.95±1.52[a]	84.72±0.48[a]
8	26.06±1.30[c]	33.41±1.90[c]
9	28.42±2.79[c]	34.05±1.78[c]
10	28.38±0.58[c]	34.49±1.42[c]

[a, b, c] อักษรที่แตกต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

ผลการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนโดยเชื้อทดสอบรหัส S7-5 ที่เลี้ยงในอาหารทีมีค่า pH ต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 9 พบว่า เชื้อ S7-5 ที่เลี้ยงในอาหาร pH 6 และ 7 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm ได้มากกว่าร้อยละ 87 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) กับ pH อื่น ๆ โดย pH ที่เชื้อ S7-5 สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้รองลงมาคือ pH 5 และ 8 โดยมีค่าร้อยละของการย่อยสลายคือ 61 และ 59 ตามลำดับ แต่ที่ pH 4 เชื้อ S7-5 ย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้น้อยมากคือประมาณร้อยละ 7 เท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อ S7-5 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ *Enterobacter cloacae* ไม่สามารถเจริญได้ที่ pH 4 สอดคล้องกับงานทดลองของ Bevilacqua *et al*. (2010) ที่แยกแบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterobacter cloacae* จากผลโอลีฟอิตาลี และศึกษาการเจริญของเชื้อดังกล่าวที่ pH ต่าง ๆ พบว่าการเจริญของ *Enterobacter cloacae* เริ่มถูกยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญที่ pH 4.5 และการเจริญของเชื้อดังกล่าวถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ที่ pH 4 และ Subudhi *et al*. (2013) ได้ศึกษาผลกระทบของ pH ต่อการสร้างไฮโดรเจนจากน้ำตาลไซโลสโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterobacter cloacae* DT-1 พบว่า ที่ pH 4 มีผลกระทบต่อการเจริญและการสร้างไฮโดรเจนของเชื้อดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญ คือที่ pH นี้เชื้อ *Enterobacter cloacae* DT-1 สามารถเจริญได้น้อยมาก และสร้างไฮโดรเจนได้น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับที่ pH อื่น ๆ ที่สูงขึ้น

เมื่อเลี้ยงเชื้อ S7-5 ต่อไปจนครบ 48 ชั่วโมง พบว่าที่ pH 5-7 เชื้อ S7-5 สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้มากกว่าร้อยละ 93 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) กับ pH อื่น ๆ โดยที่ pH 8 และ 9 เชื้อ S7-5 สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้รองลงมาคือร้อยละ 75 และ 72 ตามลำดับ แต่ที่ pH 4 เชื้อ S7-5 ย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้น้อยที่สุดคือร้อยละ 10 เท่านั้น Saratale *et al*. (2011) ศึกษาการย่อยสลายสีย้อม Azo dyes โดยแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งของโรงงานทอผ้า ได้รายงานไว้ว่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดสีย้อมโดยแบคทีเรียมักจะอยู่ในช่วงระหว่าง pH 6-10 สำหรับการทดลองนี้ pH ที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลายของมาลาไคท์กรีนโดยเชื้อ S7-5 คือ pH 6 และ pH 7 เนื่องจากเป็น pH ที่เชื้อดังกล่าวสามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้มากกว่าที่ pH อื่น ๆ

ตารางที่ 9 การย่อยสลายมาลาไคท์กรีนโดยเชื้อ *Enterobacter cloacae* (S7-5) ที่ pH ต่าง ๆ

pH	ร้อยละของการย่อยสลายที่ 24 ชั่วโมง	ร้อยละของการย่อยสลายที่ 48 ชั่วโมง
4	7.37±1.23[d]	10.72±1.10[d]
5	61.53±4.73[b]	93.77±0.88[a]
6	89.85±1.64[a]	96.89±0.36[a]
7	87.95±1.83[a]	96.04±0.55[a]
8	59.64±4.10[b]	75.36±1.38[b]
9	46.91±4.83[c]	72.73±2.81[bc]
10	40.00±7.65[c]	70.71±3.31[c]

[a, b, c] อักษรที่แตกต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบผลการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนของเชื้อทดสอบทั้ง 2 ไอโซเลต คือ S7-3 และ S7-5 พบว่า เชื้อทดสอบรหัส S7-5 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ *Enterobacter cloacae* สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้มากกว่าเชื้อทดสอบรหัส S7-3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* (ตารางที่ 8 และ 9) กล่าวคือ เชื้อ S7-5 มีค่าร้อยละของการย่อยสลายสูงสุดคือ ร้อยละ 89 และ 96 ภายในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (ที่ pH 6) ในขณะที่ เชื้อ S7-3 มีค่าร้อยละของการย่อยสลายสูงสุดคือ ร้อยละ 72 และ 84 ภายในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (ที่ pH 7)

6. ผลการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำไปประยุกต์ใช้กับบ่อปลา

6.1 ผลการทดสอบพบว่าร้อยละการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 10 ppm ในน้ำบ่อ แสดงดังตารางที่ 10 พบว่าชุดควบคุมและเชื้อทดสอบในน้ำบ่อไม่ฆ่าเชื้อ มีค่าร้อยละการย่อยสลาย 90.08 และ 91.19 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและเชื้อทดสอบในน้ำบ่อที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งมีค่าร้อยละการย่อยสลาย 91.66 และ 90.11 ตามลำดับ โดยค่าร้อยละการย่อยสลายที่ใกล้เคียงกันอาจเนื่องมาจากการที่ในน้ำบ่อมีสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าวและมาลาไคท์กรีนบางส่วนอาจทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำเกิดเป็นตะกอน จึงทำให้มีค่าการย่อยสลายไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 10 ร้อยละการย่อยสลายมาลาไคท์กรีน 10 ppm โดยเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (S7-3) ในน้ำบ่อปลา

การฆ่าเชื้อ	การใส่เชื้อ S7-3	ร้อยละของการย่อยสลายที่ 24 ชั่วโมง
น้ำบ่อ	ชุดควบคุม	90.08
	ใส่เชื้อทดสอบ S7-3	91.19
น้ำบ่อปลอดเชื้อ	ชุดควบคุม	91.66
	ใส่เชื้อทดสอบ S7-3	90.11

6.2 ผลการทดสอบพบว่าร้อยละการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm ในน้ำบ่อผสม Nutrient Broth ในอัตราส่วน 1:1 แสดงดังตารางที่ 11 พบว่าชุดควบคุมและเชื้อทดสอบในน้ำบ่อไม่ฆ่าเชื้อผสม Nutrient Broth ในอัตราส่วน 1:1 มีค่าร้อยละการย่อยสลาย 22.34 และ 59.53 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการย่อยสลายกับชุดควบคุมและเชื้อทดสอบในน้ำบ่อที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งมีค่าร้อยละการย่อยสลาย 46.73 และ 82.75 ตามลำดับ โดยพบว่าเชื้อทดสอบในน้ำบ่อไม่ฆ่าเชื้อผสม Nutrient Broth

ที่ไม่ฆ่าเชื้อ มีค่าร้อยละการย่อยสลายต่ำกว่าอาจเนื่องมาจากการที่มีเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ตามธรรมชาติในน้ำบ่อ ซึ่งอาจเจริญและแย่งอาหารที่เชื้อทดสอบต้องใช้ในการเจริญเติบโต ทำให้มีค่าร้อยละการย่อยสลายได้ในปริมาณที่ต่ำกว่าเชื้อทดสอบในน้ำบ่อที่ผ่านการฆ่าเชื้อซึ่งจะมีค่าร้อยละการย่อยสลายได้มากกว่า เนื่องจากเป็นน้ำที่ปลอดเชื้อ

ตารางที่ 11 การย่อยสลายมาลาไคท์กรีน 100 ppm โดยเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (S7-3) ในน้ำบ่อปลาผสม Nutrient Broth ในอัตราส่วน 1:1

การฆ่าเชื้อ	การใส่เชื้อ S7-3	ร้อยละของการย่อยสลายที่ 24 ชั่วโมง
น้ำบ่อ	ชุดควบคุม	22.34
	ใส่เชื้อทดสอบ S7-3	59.53
น้ำบ่อปลอดเชื้อ	ชุดควบคุม	46.73
	ใส่เชื้อทดสอบ S7-3	82.75

ผลการทดลองอาจสรุปได้ว่าน้ำในบ่อปลามีเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายตามธรรมชาติ ซึ่งมีผลกระทบต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายอาจทำให้ความสามารถในการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนลดลง ดังนั้น การนำเชื้อไปใช้ในการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนในน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ ควรนำไปใช้ในน้ำที่ได้ผ่านการบำบัดในเบื้องต้นแล้ว ซึ่งอาจเป็นขั้นตอนสุดท้ายของการบำบัดน้ำทิ้ง และควรเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ให้เหมาะสมกับปริมาณการปนเปื้อนมาลาไคท์กรีนและความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายที่ต้องมีการแข่งขันการเจริญกับเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ในแหล่งน้ำ

สรุปผลการทดลอง

1. คัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างตะกอนดินในแหล่งน้ำ 3 จังหวัด คือ สมุทรปราการ ศรีสะเกษ และพังงา ได้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm จำนวน 33 ไอโซเลต เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนพบว่า มีเชื้อทดสอบ 9 ไอโซเลต ที่สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm ได้มากกว่าร้อยละ 80 ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียของเชื้อทดสอบทั้ง 9 ไอโซเลต พบว่าเป็นสายพันธุ์ *Enterobacter cloacae* จำนวน 2 ไอโซเลต และเป็นสายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* จำนวน 7 ไอโซเลต

2. ทดสอบการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนของเชื้อที่แยกได้พบว่าเป็นการย่อยสลายทางชีวภาพ

3. สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนของเชื้อ *Enterobacter cloacae* (S7-5) สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 100 ppm โดยมีค่าการย่อยสลายสูงสุดถึงร้อยละ 96 ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 6-7 ส่วนเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (S7-3) มีค่าการย่อยสลายสูงสุดที่ร้อยละ 89 ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 7

4. ผลการทดสอบการนำเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ไปใช้ในการย่อยสลายมาลาไคท์กรีนในธรรมชาติให้ได้อย่างมีประสิทธิภาพพบว่าจะต้องบำบัดน้ำทิ้งในเบื้องต้นเสียก่อน และควรปรับปริมาณเชื้อให้เหมาะสมกับปริมาณการปนเปื้อนมาลาไคท์กรีนและความสามารถในการแข่งขันการเจริญเติบโตของเชื้อเป้าหมายกับเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ในแหล่งน้ำ อย่างไรก็ตาม วิธีการย่อยสลายทางชีวภาพของมาลาไคท์กรีนโดยแบคทีเรียนี้เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถนำไปใช้ในการกำจัดมาลาไคท์กรีนที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำได้

ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาสายพันธุ์ที่แยกได้ในการวิจัยนี้อย่างละเอียดจนถึง Strain เพื่อให้ทราบว่าเป็นเชื้อก่อโรคหรือไม่

เอกสารอ้างอิง

กนกรัตน์ ศิริพานิชกร. 2541. โรคติดเชื้อ. พิมพ์ครั้งที่ 2. โฮลิสติกพับลิซชิ่ง. กรุงเทพมหานคร : 444 หน้า.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร. 735 หน้า.

Alderman, D. J. 1984. Malachite Green: A Review. *J. Fish Dis*. 8: 289-298.

Bevilacqua, A., M. Cannarsi, M. Gallo, M. Singaglia, A. R. Corbo. 2010. Characterization and implications of *Enterobacter cloacae* strains, isolated from Italian table olives “Bella Di Cerignola”. *J. Food Sci.* 75 (1): M53-M60.

Brenner, D. J., N. R. Krieg and J. T. Staley. (eds.) 2004. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. East Lansing, MI, USA. 1203 pp.

Cha, C. J., D. R. Doerge and C. E. Cerniglia. 2001. Biotransformation of malachite green by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol*. 67: 4358–4360.

Clemmensen, S., J. C. Jensen, N. J. Jensen, O. Meyer and P. Olsen. 1984. Toxicological studies on malachite green: a triphenylmethane dye. *Arch. Toxicol*. 56: 43-45.

Culp, S. J. and F. A. Beland. 1996. Malachite green: a toxicological review. *Int. J. Toxicol*. 15: 219–238.

Lal, N. and A. K. Srivastava. 2011. Decolorization of malachite green by newly isolated *Bacillus* strain MTCC-3330. *Arch. Environ. Sci*. 5: 71-76.

Li, M. J., A. N. Li, X. R. Xu, S. Wu, S. Li, X. X. Ai and H. B. Li. 2012. Degradation and removal of malachite green in environment. *Int. J. Environ. Bioeng*. 2(1): 1-18.

Lv G. Y., J. H. Cheng, X. Y. Chen, Z. F. Zhang and L. F. Fan. 2013. Biological decolorization of malachite green by *Deinococcus radiodurans* R1. *Bioresource Technol*. 144: 275-280.

Nan, X., J. Zheng and Y. Yao. 2012. Decolorization of malachite green and biosorption of leucomalachite green by strain *Pseudomonas putida* X5. *Asia Pac. Con. Env. Sci. Tech*. 6: 140-146.

Parshetti, G., S. Kalme, G. Saratale and S. Govindwar. 2006. Biodegradation of malachite green by *Kocuria rosea* MTCC 1532. *Acta. Chim. Slov*. 53: 492–498.

Ramezani, S., A. A. Pourbabaee and D. H. Javaheri. 2013. Biodegradation of malachite green by *Klebsiella terrigenaptcc* 1650: The critical parameters were optimized using Taguchi optimization method. *J Bioremed Biodeg*. 4(1): 1-6.

Rao, K. V. 1995. Inhibition of DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures by malachite green: a new liver tumor promoter. *Toxicol Lett*. 81: 107-113.

Saratale, R. G., G. D. Saratale, J. S. Chang and S. P. Govindwar. 2011. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng*. 42: 138-157.

Subudhi, S., T. Nayak, N. R. Kumar, P. Vijayananth and B. Lal. 2013. Impact of regulated pH on proto scale hydrogen production from xylose by an alkaline tolerant novel bacterial strain, *Enterobacter cloacae* DT-1. *Int. J. Hydrogen Energy*. 38: 2728-2737.

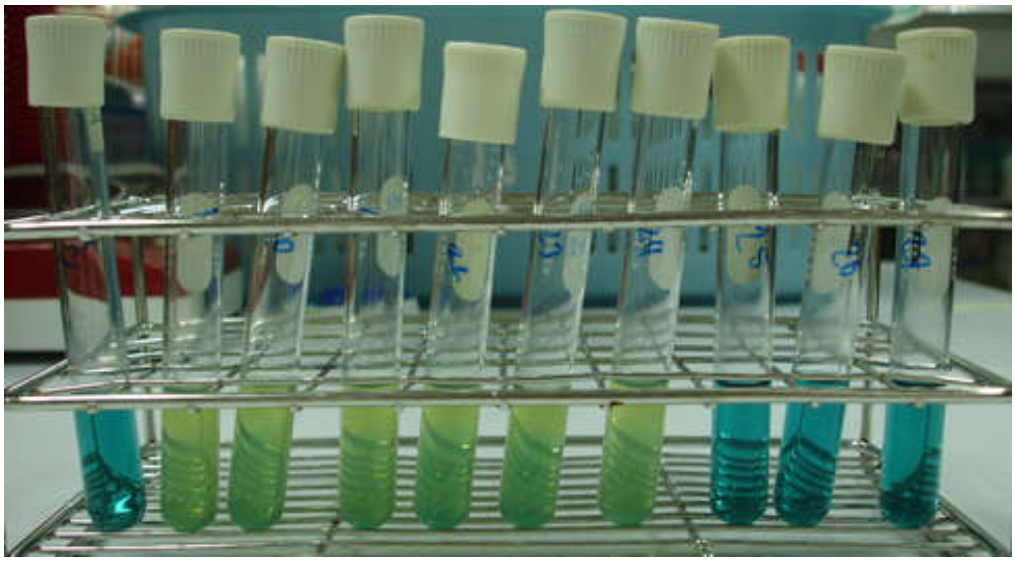
Wang, J., M. Qiao, K. Wei, J. Ding, Z. Liu, K. Zhang and X. Huang, 2011. Decolorizing activity of malachite green and its mechanisms involved in dye biodegradation by *Achromobacter xylosoxidans* MG1. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*. 20: 220–227.

Xuying, N., Z. Jianbo and Y. Yuhua. 2012. Decolorization of malachite green and biosorption of leucomalachite green by strain *Pseudomonas putida* X5. Asia Pacific conference on environmental science and technology. 6: 140-146.

Yatome, C., T. Ogawa and M. Matsui. 1991. Degradation of crystal violet by *Bacillus subtilis*. *J. Environ. Sci. Heal*. 26: 75-87.

Zhou, W. and W. Zimmermann. 1993. Decolorization of industrial effluents containing reactive dyes by actinomycetes. *FEMS Microbiol Lett*. 107: 157–162.

ภาคผนวก



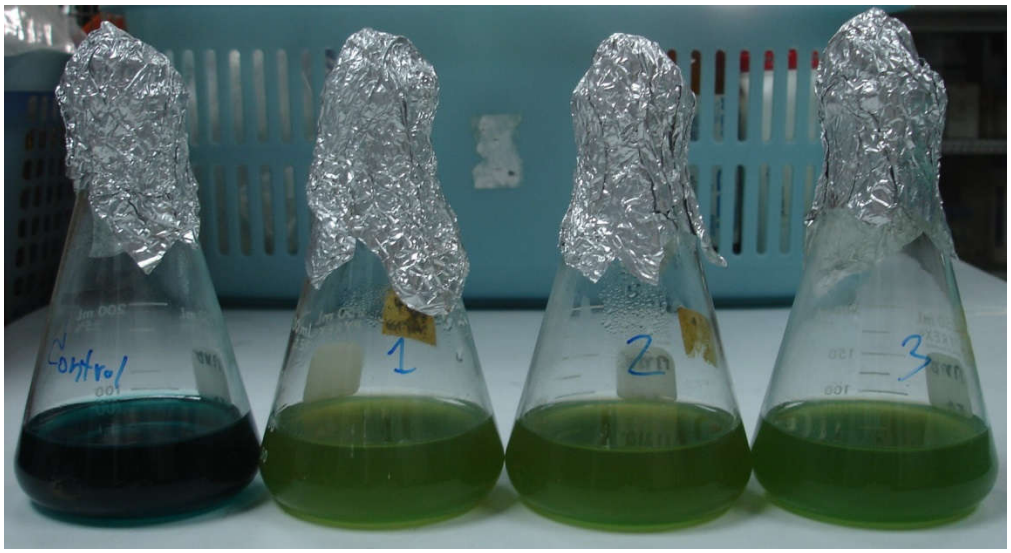
C 1 2 3 4 5 6 7 8 9

ภาพผนวกที่ 1 การย่อยสลายมาลาไคท์กรีนโดยแบคทีเรีย

C: control

1-6: เชื้อทดสอบที่สามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้ ทำให้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจางลง

7-9: เชื้อทดสอบที่ย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้เล็กน้อย



C 1 2 3

ภาพผนวกที่ 2 การย่อยสลายมาลาไคท์กรีนในขวดรูปชมพู่โดยเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (S7-3)

C: control

1-3: เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (S7-3) ซ้ำที่ 1, 2 และ 3

เชื้อสามารถย่อยสลายมาลาไคท์กรีนได้ทำให้สีจางลงเมื่อเทียบกับ control

ภาพผนวกที่ 3 การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียตัวอย่างโดยชุดทดสอบ API 20 E