สำนักหอสมุด

อภินันทนาการ สัญญาเลขที่ R2560B060

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การกำจัดสีย้อมจุลินทรีย์ด้วยเส้นใยเห็ดที่คัดเลือก

Dye Decolorization by Selected Mushroom Mycelium

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 21 มีค. 2565
เลขทะเบียน 0497779
เลขเรียกหนังสือ จ TD 758 .5.C65 จ491ร 2560

ผู้วิจัย ผศ.ดร.วาสนา ฉัตรดำรง
ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดย
งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีงบประมาณ พ.ศ.2560

Executive Summary

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลการนำเห็ดที่เจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่สามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้มาใช้ในการกำจัดสีย้อมในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ที่มีการใช้สีย้อมในการศึกษาจุลินทรีย์เป็นปริมาณมากในแต่ละปี และจะเป็นแนวทางในการพัฒนาการนำเชื้อเห็ดที่ได้ไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตเยื่อกระดาษ ที่ยังมีปัญหาในการบำบัดน้ำทิ้งที่ยังมีสีไม่พึงประสงค์ ก่อนปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมได้ ซึ่งการใช้เส้นใยเห็ดที่คัดเลือกได้มาใช้ประโยชน์นี้ นอกจากไม่สิ้นเปลืองแล้วยังไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม และเป็นการใช้ประโยชน์จากเห็ดในธรรมชาติอีกด้านหนึ่ง อีกทั้งสามารถนำข้อมูลที่ได้แผยแพร่แก่ชุมชนในการช่วยกันดูแลรักษาพื้นที่พบเห็ด เผยแพร่ผลการวิจัยในที่ประชุมวิชาการวารสารระดับชาติหรือวารสารนานาชาติ อีกทั้งเป็นการเพิ่มประสบการณ์แก่นิสิตในด้านการวิจัย และการมีส่วนช่วยในการดูแลรักษาสิ่งแวดล้อม

วิธีการศึกษาวิจัย

1. ตัวอย่างเส้นใยเห็ดที่ใช้ในการทดสอบ

เส้นใยเห็ดที่ใช้ในการทดสอบ ได้จากการเก็บตัวอย่างเห็ดจากแหล่งต่างๆ เช่น เห็ดพื้นบ้านที่ขายในท้องตลาด เห็ดที่เจริญตามธรรมชาติในป่าชุมชน และเห็ดที่เจริญในพื้นที่ธรรมชาติทั่วไป จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงให้ได้เส้นใยบริสุทธิ์ เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การหาค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุด (λmax)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ sterile production broth (Nidadavolu, 2013) ซึ่งประกอบด้วย Peptone 1 กรัม Yeast extract 2 กรัม Dipotassium hydrogen phosphate 1 กรัม Magnesium sulfate hepta hydrate 0.2 กรัม Ammonium sulfate 5 กรัม Glucose 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมสีย้อมจุลินทรีย์คริสตัลไวโอเลต หรือสีย้อมซาฟรานิน โอ 0.01% ผสมให้เข้ากันดี นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไออุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็นแล้วนำไปตรวจหาค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุด (λmax) ด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer ของสีย้อมแต่ละสี

3. การเตรียมและคัดเลือกเส้นใยเห็ดเพื่อใช้ในการกำจัดสีย้อม

เพาะเลี้ยงเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดพื้นบ้านที่คัดแยกได้บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C ให้เจริญเต็มจานอาหารเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตัดเส้นใยเห็ดบริเวณ 3/4 จากจุดศูนย์กลางที่ทำการเพาะเลี้ยงเส้นใย ด้วย pasture pipette ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 10 ชิ้น ลงในอาหาร SPB ที่ผสมสีย้อมแต่ละชนิดและผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 มล. ในฟลาสค์ขนาด 250 มล. นำไปเพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C และเก็บ

ตัวอย่างเพื่อศึกษาการลดลงของสีย้อมในวันที่ 0, 3 และ 5 วัน หรือจนกว่าสีจะถูกกำจัดหมด โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer และคำนวนหาเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมจากสูตร

$$\% \text{ decolorization} = \frac{A_{ini} - A_{fin}}{A_{ini}} \times 100$$

โดยกำหนดให้ A_{ini} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 0 วัน

A_{fin} = ค่าการดูดกลืนแสงในวันที่ทดสอบ

4. การศึกษาความสามารถของเส้นใยเห็ดที่คัดเลือกเพื่อใช้ในการกำจัดสีย้อม

นำเห็ดที่สามารถเจริญได้เร็ว และกำจัดสีย้อมได้ดีมาศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมในสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่

4.1 ศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดที่คัดเลือกได้ที่พีเอชต่างๆ

ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ SPB ที่ผสมสีย้อมจุลินทรีย์คริสตัลไวโอเลตหรือสีย้อมซาฟรานิน โอ 0.01% จากนั้นปรับพีเอชเป็น 4, 6 และ 9 ด้วยสารละลายด่าง Sodium hydroxide 0.1 Molar และสารละลายกรด Hydrochloric เข้มข้น 20% นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไออุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็น ตัดเส้นใยเห็ดที่เจริญบนอาหาร PDA ที่เจริญเต็มจานอาหารเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30°C ด้วย pasture pipette ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 10 ชิ้น เพาะเลี้ยงในอาหารที่เตรียมไว้ บ่มในเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C เก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาการลดลงของสีย้อมในวันที่ 0, 3 และ 5 วัน หรือจนกว่าสีจะถูกกำจัดหมด โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer แล้วคำนวนหาเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดที่พีเอชต่างๆ

4.2 ศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดที่คัดเลือกได้ที่อุณหภูมิ 35 และ 40°C

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ SPB ที่ผสมสีย้อมจุลินทรีย์คริสตัลไวโอเลตหรือสีย้อมซาฟรานิน โอ 0.01% และปรับพีเอชให้เหมาะสมดังการทดลองที่ 4.1 ทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที และปรับอุณหภูมิเป็น 35 และ 40°C เพื่อดูความสามารถในการเจริญและการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดที่อุณหภูมิสูงขึ้น ทำการเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกัน และคำนวนหาเปอร์เซนต์การลดลงของสีย้อม

5. การศึกษาการสร้างเอนไซม์บางชนิดที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสีย้อม (ดัดแปลงจากวิธีของ Nidadavolu, et.al., 2013)

ศึกษาหากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสบนอาหารแข็ง ทำโดยเตรียมอาหาร PDA เติม guiaiacol 0.02% (ปริมาตร 200 µl/l) นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไออุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา

15 นาที จากนั้นนำมาเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยเชื้อเห็ดที่ต้องการทดสอบ แล้วบ่มให้เชื้อเจริญ สังเกตการสร้างวงสีน้ำตาลแดงในอาหารรอบโคโลนีเชื้อ แสดงว่าเชื้อที่ทดสอบสามารถสร้างเอนไซม์แลคเคสได้

6. นำผลการทดลองที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในกำจัดสีของน้ำทิ้งที่ได้จากการบำบัดแล้วของโรงงานเยื่อกระดาษ จ.นครสวรรค์

ผลการศึกษาวิจัย

1. ผลการหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λmax) ของสีย้อม

สีย้อมคริสตัลไวโอเลตเป็นสารที่มีสีม่วงมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 591 nm และสีย้อมซาฟรานิน โอ เป็นสารที่มีสีแดงมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 523 nm

2. ผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ด

ศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดทั้ง 16 ไอโซเลต ในระยะเวลา 5 วัน พบว่าเส้นใยเห็ดทั้ง 16 ไอโซเลต สามารถเจริญได้ในอาหาร SPB ที่ผสมสีย้อมซาฟรานิน โอ และสีย้อมคริสตัลไวโอเลต เส้นใยเห็ดที่มีความสามารถในการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ และคริสตัลไวโอเลตได้ดีที่สุดคือเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 รองลงมาคือไอโซเลต TSL-10 โดยมีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมเท่ากับ 128.745, 69.922 และ 101.195, 90.438 ตามลำดับ

ปริมาณเส้นใยการเจริญของเห็ดไอโซเลต TSL-10 เท่ากับ 32.57 และ 17.47 g/L ในอาหาร SPB ที่ผสมสีย้อมซาฟรานิน โอ และคริสตัลไวโอเลต ส่วนเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 เจริญและให้ปริมาณเส้นใยเท่ากับ 35.9 และ 10.33 g/L ในอาหาร SPB ที่ผสมสีย้อมซาฟรานิน โอ และคริสตัลไวโอเลต ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดทั้ง 2 ไอโซเลตพบว่าเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 มีลักษณะการกำจัดสีย้อมทั้ง 2 ชนิดเป็นแบบดูดซับ (absorption) เนื่องจากเส้นใยเห็ดมีสีเปลี่ยนไปตามชนิดของสีย้อมที่ทดสอบ ส่วนเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 มีลักษณะการกำจัดสีย้อมแบบปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสลายสีย้อม ลักษณะของเส้นใยจะไม่มีสีของสีย้อมที่นำมาทดสอบ แต่มีสีขาวเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม เมื่อนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสดงดังภาพที่ 19 เห็ดไอโซเลต TSL-10 และ 15 จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อราไวท์ร็อทซึ่งมีคุณสมบัติในการฟอกสีให้จางลง และสามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโนไลติกออกมากำจัดสีย้อมได้

3.ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ด

จากผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดทั้ง 2 ไอโซเลต พบว่าเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 สามารถกำจัดสีย้อมทั้ง 2 ชนิดได้ดีที่สุดที่ pH4 และเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 สามารถกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ สีย้อมคริสตัลไวโอเลตได้ที่สุดที่ pH6

3.1 ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10

ผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ และสีย้อมคริสตัลไวโอเลตของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 พบว่าเส้นใยเห็ดไฮโซเลต TSL-10 สามารถกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ ได้ดีที่สุดที่ pH4 รองลงมาคือ pH6, pH7.21 และ pH9 โดยมีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมเท่ากับ 98.436±0.727, 69.547±7.498, 49.997±1.574 และ 28.601±1.897 ตามลำดับ และเชื้อเจริญให้น้ำหนักเส้นใยเปียกเท่ากับ 88.47, 81.43, 75.7และ 55.97 g/L ที่ pH 4, 6, 7.21 และ 9 ตามลำดับ

ส่วนผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลตของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 ที่ pH4, 6, 7.29 และ 9 พบว่าเส้นใยเห็ดไฮโซเลต TSL-10 สามารถกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลตได้ดีที่สุดที่ pH4 รองลงมาคือ pH7.29, pH6 และ pH9 โดยมีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมเฉลี่ยเท่ากับ 106.242±4.680, 97.524±0.960, 87.159±6.921 และ 43.142±0.528 ตามลำดับ และเมื่อศึกษาการเจริญของเส้นใยเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าที่ pH4, pH6, pH7.29 และ pH9 ได้ปริมาณเส้นใยเท่ากับ 82.53, 56.73, 54.17 และ 58.07 g/L ตามลำดับ

3.2 ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15

เมื่อศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ และสีย้อมคริสตัลไวโอเลตของเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 ที่ pH4, pH6, pH7.28 และ pH9 พบว่าเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 สามารถกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ ได้ดีที่สุดที่ pH6 รองลงมาคือที่ pH7.28, pH9 และ pH4 โดยมีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมเท่ากับ 142.679±1.685, 125.274±5.614, 77.529±3.509 และ 56.659±5.729 ตามลำดับ และเมื่อศึกษาการเจริญของเส้นใยเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าที่ pH4, pH6, pH7.28 และ pH9 ได้ปริมาณเส้นใยเท่ากับ 40.27, 127.9, 22.4 และ 202.37 g/L ตามลำดับ

ส่วนผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลตของเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 นั้น พบว่าเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 สามารถกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลตได้ดีที่สุดที่ pH6 รองลงมาคือที่ pH4, pH7.38 และ pH9 โดยมีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมเท่ากับ 111.456±0.472, 106.195± 2.481, 97.907±1.361 และ 64.104±4.999 ตามลำดับ และเมื่อศึกษาการเจริญของเส้นใยเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าที่ pH4, pH6, pH7.38 และ pH9 ได้ปริมาณเส้นใยเท่ากับ 27.03, 22.87, 23.07 และ 147.2 g/L

4. ผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดที่อุณหภูมิสูง 35 และ 40 องศาเซลเซียส

จากผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 และ ไอโซเลต 15 ทำให้ทราบว่าเชื้อทั้งสองชนิด มี pH เหมาะสมในการกำจัดสีย้อมอยู่ในช่วง pH กรดถึงกลาง จึงนำเส้นใยเห็ดทั้ง 2 ไอโซเลต มาทำการศึกษาอุณหภูมิที่สูงมากกว่า 30 องศาเซลเซียส ที่เชื้อกำจัดสีย้อมได้ดีอยู่แล้ว แล้วเพิ่มอุณหภูมิทดสอบให้สูงขึ้นถึง 35 และ 40 องศาเซลเซียส เพื่อดูความทนอุณหภูมิสูงได้ของเชื้อว่ายังมีความสามารถในการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ และสีย้อมคริสตัลไวโอเลตได้หรือไม่ จากผลการทดลองพบว่า

4.1 ผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ และคริสตัลไวโอเลต ของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 และไอโซเลต 15 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

จากผลการศึกษาการกำจัดสีย้อมในช่วงวันที่ 1 ถึงวันที่ 3 เส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 มีแนวโน้มจะกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ ได้ดีกว่าเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 แต่เปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมสูงกว่าเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อทดสอบถึงวันที่ 4 และวันที่ 5 พบว่าเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 มีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมเพิ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยมีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ เท่ากับ 59.684±2.336 และ 102.625±1.751 ส่วนเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 มีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมได้เพียง 45.249±6.562 และ 65.008±3.313 ตามลำดับ อย่างไรก็ดี พบว่าไอโซเลต 15 มีการเจริญของเส้นใยดีกว่าโดยชั่งน้ำหนักเปียกได้ 34.77 g/L ส่วนไอโซเลต TSL-10 ชั่งได้น้ำหนักเปียก เท่ากับ 26.9 g/L แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการกำจัดสีย้อมก็ยังน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ส่วนผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลต ของเส้นใยเห็ดทั้ง 2 ไอโซเลต พบว่าเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 มีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลตได้ 70.472± 4.791 ส่วนเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 กำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลตได้ถึง 111.078±1.841 แต่เมื่อนำเส้นใยเห็ดทั้ง 2 ไอโซเลตมาชั่งน้ำหนัก พบว่าได้น้ำหนักเปียกเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 เท่ากับ 28.43 และไอโซเลต 15 เท่ากับ 11 g/L ตามลำดับ

4.2 ผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ และคริสตัลไวโอเลต ของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 และ 15 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ ของเส้นใยเห็ดทั้ง 2 ไอโซเลต ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าในระยะ 5 วัน เส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 และ ไอโซเลต 15 มีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอได้น้อยมาก โดยกำจัดสีย้อมได้ใกล้เคียงกันเพียง 23.234± 2.433 และ 24.625±2.574 ตามลำดับ ส่วนในการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลตของเส้นใยเห็ดทั้ง 2 ไอโซเลตในระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าเส้นใยเห็ดทั้งสองก็กำจัดสีย้อมได้น้อยเช่นเดียวกัน โดยเห็ดไอโซเลต TSL-10 มีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมได้เพียง 18.941±3.849 ส่วนเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 มีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมได้ใกล้เคียงกับการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ คือ 28.702±3.915 จากการทดลองจึงไม่สามารถหาการเจริญของเส้นใยเห็ดทั้งสองชนิดได้ (เมื่อนำน้ำหนักมาเปรียบเทียบกับวันที่ 0)

4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลคเคสของเส้นใยเห็ดไอโซเลตต่างๆ

ในการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลคเคสของเส้นใยเห็ดไอโซเลตต่างๆบนอาหารแข็งโดยเติม guaiacol เป็นสับเสตรทในทดสอบเอนไซม์ บ่มเป็นเวลา 7 วัน และสังเกตการเปลี่ยนแปลง ผลการทดสอบแสดงภาพที่ 36 พบว่าเส้นใยเห็ดไอโซเลต ม.1, ม.2, ม.3, 16, 16.1, 16.2, 16.3, 2.3, 15, TNP-9.1, และ N1 เส้นใยมีการเจริญและสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้โดยอาหารจะเปลี่ยนจากสีใสเป็นสีส้ม ส่วนเส้นใยเห็ดไอโซเลต TNP-9.1, TSL-10, TSL-2, 9.1 และ 2.1 พบว่าเส้นใยมีการเจริญ แต่ไม่พบการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการทดสอบเบื้องต้นในการศึกษาการผลิตเอนไซม์แลคเคส ทำให้สามารถสรุปได้ว่าเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 กำจัดสีย้อมได้โดยการสร้างเอนไซม์แล้วปล่อยออกมาย่อยสีย้อม ส่วนไอโซเลต TSL-10 กำจัดสีย้อมได้โดยวิธีดูดซับเข้าสู่เส้นใย จึงทำให้เส้นใยมีสีของสีย้อมด้วย

บทคัดย่อ

ศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมจุลินทรีย์ 2 ชนิดคือ สีซาฟรานิน-โอ และสีคริสตัลไวโอเลต ด้วยเส้นใยเห็ดจำนวน 16 ไอโซเลต ที่พบได้ในพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก ในอาหาร sterile production broth โดยผสมสีย้อมเข้มข้น 0.01% บ่มที่อุณหภูมิ 30°C ในเครื่องเขย่า 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน พบว่าเส้นใยเห็ด ไอโซเลต 15 (*Mycoamaranthu scambodgensis*) กำจัดสีย้อมได้ดีที่สุด โดยกำจัดสีย้อมซาฟรานิน-โอ ได้ 128.018±6.278% และกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลตได้ 106.941±4.356% รองลงมาคือเส้นใยเห็ด ไอโซเลต TSL-10 (*Entoloma* sp.) กำจัดสีย้อมซาฟรานิน-โอและคริสตัลไวโอเลตได้ 69.159±13.115 และ 93.916±2.119% ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30°C pH6 เส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 สามารถกำจัดสีย้อมได้ดีที่สุด มีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมซาฟรานิน-โอและสีย้อมคริสตัลไวโอเลตเท่ากับ 142.679±1.685 และ 111.456±0.472 % ตามลำดับ ส่วนเส้นใยเห็ดไอโซลเต TSL-10 สามารถกำจัดสีย้อมทั้ง 2 ชนิดได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30°C pH4 มีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมซาฟรานิน-โอ และสีย้อมคริสตัลไวโอเลตเท่ากับ 98.436±0.727 และ 106.242±4.68% ตามลำดับ เมื่อศึกษาเบื้องต้นถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลคเคสบนอาหาร PDA ที่เติม 0.2% Guaiacol พบว่าเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ มีผลทำให้อาหารมีสีส้มเข้ม

คำสำคัญ: เส้นใยเห็ด การกำจัดสีย้อม ซาฟรานิน-โอ คริสตัลไวโอเลต

Abstract

The study on decolorization of 2 dyes, safranin-o and crystal violet by 16 isolates of mushroom mycelium were collected from Phitsanulok areas. All cultures were cultivated in sterile production broth contain with 0.01% dye, incubated in incubator shaker at 30°C for 5 days. The results showed that, isolate 15 (*Mycoamaranthu scambodgensis*) has the highest decolorized of safranin-o to 128.018±6.278% and crystal violet to 106.941±4.356% and the isolate TSL-10 (*Entoloma* sp.) was able to decreased safranin- o and crystal violet to 69.159±13.115 and 93.916±2.119%, respectively. At The temperature 30°C pH6, isolate 15 has the highest decolorized of safranin-o and crystal violet to 142.679±1.685 and 111.456±0.472%, respectively. While isolate TSL-10 decreased of safranin- o and crystal violet to 98.436±0.727 and 106.242±4.68%, respectively at temperature 30°C and pH4. The Preliminary of laccase enzyme production on PDA mixed with 0.2% guaiacol, the result indicated that isolate 15 secreted enzyme able to dark orange color in medium.

Key words: mushroom mycelium, dye decolorization, safranin-o, crystal violet

สารบัญ

	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	3
บทคัดย่อ	10
สารบัญ	12
สารบัญภาพ	13
สารบัญตาราง	14
สารบัญตารางภาพ	15
บทที่ 1 บทนำ	16
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการทำวิจัย	16
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18
บทที่ 2 อุปกรณ์และวิธีการศึกษาวิจัย	35
2.1 อุปกรณ์การวิจัยและสารเคมี	35
2.2 วิธีการศึกษาวิจัย	36
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย	39
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย	72
เอกสารอ้างอิง	74
ภาคผนวก	81

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้าง azo dyes	19
2	โครงสร้าง anthroquinone	20
3	โครงสร้าง triphenylmethane	20
4	การผลิตเอนไซม์ ligninolytic ของเส้นใยเห็ดเพื่อย่อยสลายสารในธรรมชาติ	26
5	Ligninolytic enzymes applications	32
6	ผลการหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสีคริสตัลไวโอเลต (A) และ สีซาฟรานิน โอ (B) ด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer	39
7	การกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ และคริสตัลไวโอเลตของเส้นใยเห็ดไอโซเลตต่างๆ	42
8	ลักษณะการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL10 และ ไอโซเลต 15	46
9	ผลการลดลงของสีย้อมซาฟรานิน โอ ด้วยเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 ที่ pH 4, 6, 7.21 และ 9	48
10	ผลการลดลงของสีย้อมคริสตัลไวโอเลตด้วยเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 ที่ pH 4, 6, 7.29 และ 9	50
11	ผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ ของเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 ที่ pH 4, 6, 7.28 และ 9	52
12	ผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลตด้วยเส้นใยเห็ด 15 ที่ pH 4, 6, 7.38 และ 9	54
13	ผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ ด้วยเส้นใยเห็ด TSL-10 และไอโซเลต 15 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	56
14	ผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลตด้วยเส้นใยเห็ด TSL-10 และไอโซเลต 15 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	59
15	ผลการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ ด้วยเส้นใยเห็ด TSL-10 และไอโซเลต 15 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	61
16	ผลการกำจัดสีย้อมคริสตัลไอโอเลตด้วยเส้นใยเห็ด TSL-10 และไอโซเลต 15 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	63

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	Ligninolytic enzymes produced by white rot fungi	28
2	Biological functions of ligninolytic enzymes	30
3	การประยุกต์ใช้เอนไซม์กลุ่ม Ligninolytic enzymes ในงานด้านต่างๆ	32
4	การกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ และคริสตัลไวโอเลตของเส้นใยเห็ดไอโซเลตต่างๆ	42
5	ผลการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 และ 15	46
6	ผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ ของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10	48
7	ผลการกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลต ด้วยเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 ที่ pH ต่างๆ	50
8	ผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ ของเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 ที่ pH ต่างๆ	52
9	ผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลต ของเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 ที่ pH ต่างๆ	54
10	การกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ ของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 และไอโซเลต 15 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	56
11	การกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลต ของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 และไอโซเลต 15 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	59
12	ผลการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ ของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 และไอโซเลต 15 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	61
13	ผลการกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลตของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 และไอโซเลต 15 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	63
14	องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ SPB สูตรดั้งเดิมและสูตรปรับปรุง	71

สารบัญตารางภาพ

ตารางภาพที่		หน้า
1	ตัวอย่างดอกเห็ดและลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA	41
2	การลดลงของสีย้อมซาฟรานิน โอ และคริสตัลไวโอเลตของเส้นใยเห็ดไอโซเลตต่างๆ	43
3	การกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ ด้วยเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 ที่ pH ต่างๆ	49
4	ผลการลดลงของสีย้อมคริสตัลไวโอเลตด้วยเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 ที่ pH ต่างๆ	51
5	ผลการลดลงของสีย้อมซาฟรานิน โอด้วยเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 ที่ pH ต่างๆ	52
6	ผลการลดลงของสีย้อมคริสตัลไวโอเลตด้วยเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 ที่ pH ต่างๆ	54
7	ผลการลดลงของสีย้อมซาฟรานิน โอ ด้วยเส้นเห็ดไอโซเลต TSL-10 และไอโซเลต 15 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	57
8	ผลการลดลงของสีย้อมคริสตัลไวโอเลตด้วยเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 และไอโซเลต 15 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	60
9	ผลการลดลงของสีย้อมซาฟรานิน โอ ด้วยเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 และไอโซเลต 15 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	62
10	ผลการลดลงของสีย้อมคริสตัลไวโอเลตด้วยเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 และไอโซเลต 15 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	64
11	ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลคเคสของตัวอย่างเส้นใยเห็ดบนอาหารแข็ง	56

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการทำวิจัย

สีย้อม (Dye) เป็นสารเคมีที่สกัดจากน้ำมันปิโตรเลียมหรือถ่านหิน เมื่อผ่านการสกัดจะได้สารไฮโดรคาร์บอนที่อิ่มตัว เช่น เบนซิน ไซลีน แอนทราซีน โทลูอีน แนพทาลีน และพาราฟิน ซึ่งสารไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนเป็นสีย้อมด้วยเทคนิคต่าง ๆ สีย้อมในปัจจุบันที่ใช้กันมากมี 2 ประเภท ได้แก่ สีย้อมจากธรรมชาติ และสีย้อมที่ได้จากการสังเคราะห์ (สุกฤตา และคณะ, 2555) และอาจแบ่งสีย้อมเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่กลุ่ม azo, anthroquinone และ triphenylmethane (Rajput, et.al., 2011) โดยทั่วไป สีย้อมเป็นสารที่จัดได้ว่ามีความเป็นพิษต่ำ แต่ในแง่ของผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมนั้น พบว่าสีย้อมเป็นสารที่ยากต่อการสลายตัวทางชีวภาพ และเนื่องจากสีย้อมเป็นสารที่มีสีเข้ม ดังนั้น แม้มีสีอยู่ในน้ำเพียงปริมาณเล็กน้อย ก็สามารถทำให้น้ำมีสีเป็นที่รังเกียจของผู้พบเห็นได้ จึงต้องมีการกำจัดสีของน้ำทิ้งก่อนปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อม (รัชนีย์,http://www.navy.mi.th/science/BrithDay46/Brithday_data/ biology.htm) สีย้อมและสารที่ทำหน้าที่คล้ายสี ปัจจุบันมีการใช้กันมากในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เครื่องสำอาง ยา และ อุตสาหกรรมเครื่องนุ่งห่มจากขนสัตว์ ทั่วโลกพบมีการใช้สีย้อมและสีซึ่งมีความแตกต่างกันมากมายหลายชนิด มีการผลิตมากกว่า 8,000,000 ตันต่อปี และคาดว่าอย่างน้อยที่สุด 10-20% ของสีที่ใช้มีการปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมในรูปของของเสีย (Palmieri et al., 2005; Levin et al., 2004) โดยอุตสาหกรรมสิ่งทอจัดเป็นอุตสาหกรรมที่มีการปล่อยของเสียโดยเฉพาะสีย้อมออกมาเป็นอันดับต้นๆ ซึ่งมีความกังวลว่าจะมีผลต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพสิ่งมีชีวิต (McKay, 1979) สีย้อมมีความเป็นพิษต่ำ แต่สีย้อมอาจเข้าสู่ร่างกายของผู้ใช้ได้ 3 ทาง คือทางจมูกโดยการสูดดม ทางผิวหนังโดยการสัมผัส และทางระบบทางเดินอาหาร โดยปนเข้าไปกับอาหารการกิน แต่สารที่ใช้ในการสังเคราะห์สีย้อมมีจำนวนไม่น้อยที่มีความเป็นพิษสูงมาก โดยวัตถุดิบที่ใช้ในการสังเคราะห์สีย้อมมีหลายชนิดที่มีความเป็นพิษสูงและเป็นสารก่อมะเร็ง เช่น 2-naphthyl amine และ benzidine เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีส่วนผสมของสารที่ย่อยสลายได้ยาก อาจมีผลตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานาน (สุกฤตา และคณะ, 2555) สีย้อมส่วนใหญ่มีความคงตัวสูงต่อแสง อุณหภูมิ น้ำ และสารเคมี (McKay, 1979) กำจัดได้ยากด้วยวิธีกายภาพแบบดั้งเดิม เช่น การใช้ activated sludge (Wong and Yuen, 1996) การดูดซับ (Rajput, et.al., 2011) หรือการใช้สารเคมี (McMullan, et.al., 2001) การเผาด้วยความร้อนสูง หรือการใช้แสง เช่น โอโซน ซึ่งมักมีราคาสูง (DeMoraes et al., 2000) ส่วนการใช้จุลินทรีย์ที่แม้ย่อยสลายสีได้ยาก แต่การใช้จุลินทรีย์เปลี่ยนสารสีเหล่านี้ให้เป็นสารรูปแบบอื่นที่ไม่มีอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมก็ใช้ได้ผลดี นอกจากนี้ยังมีราคาถูกและไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อเทียบกับวิธีกายภาพหรือเคมี นอกจากจะมีการใช้สีย้อมในงานหลายด้านดังที่กล่าวมาแล้ว สีย้อมยังมีการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการต่างๆ เช่นห้องปฏิบัติการด้าน

จุลชีววิทยาของสถานศึกษาและห้องปฏิบัติการตรวจสอบเชื้อ จุลินทรีย์ในโรงพยาบาล และสถานประกอบการที่เกี่ยวข้อง โดยใช้สีย้อมหลายชนิดในการย้อมจุลินทรีย์เพื่อศึกษาลักษณะเชื้อ

การกำจัดสีย้อมไม่ว่าจะโดยการใช้สารเคมี หรือการกำจัดโดยวิธีกายภาพมีข้อดีและเสียแตกต่างกัน แต่ทางเลือกหนึ่งที่มีการใช้และศึกษาเพื่อกำจัดสีย้อมคือ การใช้จุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อรา ซึ่งมีหลายชนิดที่มีความสามารถกำจัดสีย้อมได้ดี เชื้อราจัดเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม จัดเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน โดยอาศัยความสามารถในการเป็นผู้ย่อยสลายที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้น จึงมีการนำเชื้อรามาใช้ในการย่อยสลายสารเพื่อรักษาหรือฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติ โดยเฉพาะการนำมาใช้ในการย่อยสลายสารที่ย่อยสลายได้ยากในธรรมชาติหรือกำจัดได้ยากและสิ้นเปลืองเมื่อกำจัดโดยวิธีทางเคมีหรือกายภาพ White rot fungi เป็นเชื้อราที่รู้จักกันดีว่ามีประสิทธิภาพสูงในการทำหน้าที่ย่อยสลายสีย้อม เช่น สีย้อมกลุ่ม azo, heterocyclic, reactive และ polymeric (Novotny, et.al., 2004) สามารถสร้างเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ที่มีโครงสร้างและการทำงานที่ไม่จำเพาะเจาะจงที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์ laccase เอนไซม์ Lignin peroxidases (LiPs) และเอนไซม์ Manganese peroxidases (MnP) (Heinzkill, et.al., 1998) เอนไซม์ Laccase จะ oxidation ทั้งสารกลุ่ม phenolic และ non-phenolic และย่อยสลายสีสังเคราะห์ได้หลายชนิด (Swamy and Ramsay, 1999) เนื่องจากมีกิจกรรมเอนไซม์แบบไม่จำเพาะเจาะจง จึงมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในงานหลายชนิด เช่น อุตสาหกรรมเยื่อไม้ การฟอกขาว และการกำจัดน้ำเสียที่มีสีเคมี เนื่องจากอุตสาหกรรมสิ่งทอมักมีของเสียที่เป็นส่วนผสมของสีย้อมหลายชนิด ในการกำจัดของเสียเหล่านี้จึงทำให้ไม่สิ้นเปลืองมาก เนื่องจากเชื้อรามีศักยภาพในการย่อยสลายได้สูง กำจัดของเสียได้หลายชนิด (Thurston, 1994) เช่นจากการวิจัยของ Revankar and Lele (2006) รายงานการใช้ white rot fungus, *Ganoderma* sp. WR-1 ที่คัดเลือกได้ว่าสามารถผลิตเอนไซม์ laccase ได้สูง ย่อยสลายสารประกอบกลุ่มที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมได้ รวมทั้งสารในกลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) และสีย้อมสังเคราะห์ นอกจากนี้ยังมีรายงานการคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดป่า 7 ชนิด ที่สามารถลดปริมาณและดูดซับสี ได้แก่เห็ด *Pleurotus florida*, *Pleurotus sajorkaju*, *Grifola frondosa*, *Polyporous* sp. 1, Jelly sp., *Schizophylum commune*, *Polyporous* sp. โดยพบว่าเห็ด Jelly sp., *Schizophylum commune* และ Polyporous sp. ลดปริมาณสี malachite green เข้มข้น 0.01% ได้สูงถึง 98.25%, 64.25% และ 26.25% ตามลำดับ (Rajput, et. al. 2011)

สีย้อม มีการใช้ในหลายรูปแบบ การกำจัดสีย้อมทำได้ยากไม่ว่าโดยวิธีกายภาพหรือเคมี และค่อนข้างสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และอาจมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ส่วนโรงงานเยื่อกระดาษ แม้จะมีวิธีกำจัดของเสียได้ดี แต่ยังพบปัญเกี่ยวกับสีของน้ำที่ผ่านการบำบัดยังมีสีที่ไม่พึงประสงค์และกำจัดได้ยาก เป็นปัญหาที่ต้องมีการแก้ไขต่อไป การใช้จุลินทรีย์โดยเฉพาะเห็ด ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาท

สำคัญในการเป็นผู้ย่อยสลายที่ดีในธรรมชาติ อีกทั้งสามารถย่อยสลารที่ย่อยสลายได้ยากได้ มาพัฒนาใช้ในการฟื้นฟูสภาพแวดล้อม โดยเฉพาเห็ดพื้นบ้านที่ไม่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงให้เป็นดอกเห็ดได้ บางชนิดรับประทานได้และบางชนิดไม่มีรายงานการนำมารับประทาน ดังนั้นการศึกษาการนำเส้นใยเห็ดพื้นบ้านมาใช้ในการบำบัดเพื่อฟื้นฟูสภาพแวดล้อมก็เป็นวิธีการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งราคาไม่สูงและยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

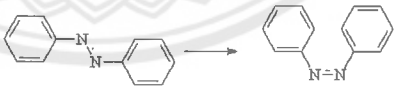
สีย้อม (Dye) เป็นสารเคมีที่สกัดจากน้ำมันปิโตรเลียมหรือถ่านหิน เมื่อผ่านการสกัดจะได้สารไฮโดรคาร์บอนที่ไม่อิ่มตัว เช่น เบนซิน ไซลีน แอนทราซีน โทลูอีน แนพทาลีน และพาราฟิน ซึ่งสารไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนเป็นสีย้อมด้วยเทคนิคต่าง ๆ มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับ ความเหมาะสมกับเส้นใยที่จะย้อม และกระบวนการย้อมที่แตกต่างกันไป การเกิดสีของสีย้อมทำให้ตามนุษย์ปกติมองเห็นได้เกิดจาก การเรียงตัวของกลุ่มอะตอมประเภทหนึ่งภายในโมเลกุลของสีย้อม เรียกว่า โครโมฟอร์ ซึ่งมีอยู่ 7 กลุ่ม คือ กลุ่มไนโตรโซ (Nitroso Group) กลุ่มไนโตร (Nitro Group) กลุ่มอะโซ (Azo Group) กลุ่มเอ็ททิลลีน (Ethylene Group) กลุ่มคาร์บอนิล (Carbonyl Group) กลุ่มคาร์บอนิล-ไนโตรเจน (Carbonyl-Nitrogen Group) กลุ่มซัลเฟอร์ (Sulphur Group) สีย้อมในปัจจุบันที่ใช้กันมากมี 2 ประเภท ได้แก่ สีย้อมจากธรรมชาติ และสีย้อมที่ได้จากการสังเคราะห์ (สุกฤตา และคณะ, 2555) และอาจแบ่งสีย้อมเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่กลุ่ม azo, anthroquinone และ triphenylmethane (Rajput, et.al., 2011) โดยทั่วไป สีย้อมเป็นสารที่จัดได้ว่ามีความเป็นพิษต่ำ แต่ในแง่ของผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมนั้น พบว่าสีย้อมเป็นสารที่ยากต่อการสลายตัวทางชีวภาพ อย่างไรก็ตาม ปัญหาสำคัญของสีย้อมในน้ำทิ้ง ปัจจุบันมิได้อยู่ที่ความเป็นพิษของสีย้อม แต่อยู่ที่สีของน้ำทิ้ง เนื่องจากสีย้อมเป็นสารที่มีสีเข้ม ดังนั้น แม้มีสีอยู่ในน้ำเพียงปริมาณเล็กน้อย ก็สามารถทำให้น้ำมีสีเป็นที่รังเกียจของผู้พบเห็นได้ จึงต้องมีการกำจัดสีของน้ำทิ้งก่อนปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อม ปัญหาที่เกิดจากสีย้อมในน้ำทิ้งโรงงานได้แก่ 1) ก่อให้เกิดความไม่สวยงามทางด้านทัศนียภาพ 2) สีย้อมที่เป็นสารอินทรีย์ย่อยสลายได้ ทำให้ค่าออกซิเจนละลายน้ำลดลง 3) ขัดขวางการเดินทางของแสง ซึ่งจำเป็นต่อการสังเคราะห์แสงของพืช 4) การผลิตออกซิเจนลดลง เนื่องจากผลกระทบจากข้อ 3 ซึ่งส่งผลต่อสัตว์น้ำ 5) ความเป็นพิษของตัวสีย้อม บางชนิดเป็นสารก่อมะเร็ง 6) ทั้งหมดข้างต้นส่งผลให้สภาวะของแหล่งน้ำไม่เหมาะต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ (รัชนีย์, http://www.navy.mi.th/science/ BrithDay46/ Brithday_data/biology.htm)

สีย้อมและสารที่ทำหน้าที่คล้ายสี ปัจจุบันมีการใช้กันมากในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เครื่องสำอาง ยา และอุตสาหกรรมเครื่องนุ่งห่ม ทั่วโลกพบมีการใช้สีย้อมและสีซึ่งมีความแตกต่างกันมากมายหลายชนิด มีการผลิตมากกว่า 8,000,000 ตันต่อปี และคาดว่าอย่างน้อยที่สุด 10-20% ของสีที่ใช้มีการ

ปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมในรูปของของเสีย (Palmieri et al., 2005; Levin et al., 2004) โดยอุตสาหกรรมสิ่งทอจัดเป็นอุตสาหกรรมที่มีการปล่อยของเสียโดยเฉพาะสีย้อม ออกมาเป็นอันดับต้นๆ ซึ่งมีความกังวลว่าจะมีผลต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพสิ่งมีชีวิต (McKay, 1979) สีย้อมมีความเป็นพิษต่ำ แต่สีย้อมอาจเข้าสู่ร่างกายของผู้ใช้ได้ 3 ทาง คือทางจมูกโดยการสูดดม ทางผิวหนังโดยการสัมผัส และทางระบบทางเดินอาหาร โดยปนเข้าไปกับอาหารการกิน แต่สารที่ใช้ในการสังเคราะห์สีย้อมมีจำนวนไม่น้อยที่มีความเป็นพิษสูงมาก โดยวัตถุดิบที่ใช้ในการสังเคราะห์สีย้อมมีหลายชนิดที่มีความเป็นพิษสูงและเป็นสารก่อมะเร็ง เช่น 2-naphthylamine และ benzidine เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีส่วนผสมของสารที่ย่อยสลายได้ยาก อาจมีผลตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานาน (สุกฤตา และคณะ, 2555) สีย้อมส่วนใหญ่มีความคงตัวสูงต่อแสง อุณหภูมิ น้ำ และสารเคมี (McKay, 1979) กำจัดได้ยากด้วยวิธีกายภาพแบบดั้งเดิม เช่น การใช้ activated sludge (Wong and Yuen, 1996) การดูดซับ (Rajput, et.al., 2011) หรือการใช้สารเคมี (McMullan, et.al., 2001) การเผาด้วยความร้อนสูง หรือการใช้แสง เช่น โอโซน ซึ่งมักมีราคาสูง (DeMoraes et al., 2000) ส่วนการใช้จุลินทรีย์ที่แม้ย่อยสลายสีได้ยาก แต่การใช้จุลินทรีย์เปลี่ยนสารสีเหล่านี้ให้เป็นสารรูปแบบอื่นที่ไม่มีอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมก็ใช้ได้ผลดี นอกจากนี้ยังมีราคาถูกเมื่อเทียบกับวิธีกายภาพหรือเคมี

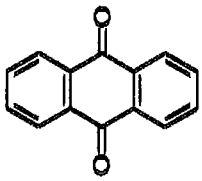
องค์ประกอบของสีย้อมมีหลายชนิด และมีโครงสร้างทางเคมีต่างกันเพื่อให้ทนต่อการใช้งาน เช่น ทนต่อการซักฟอก แสง และความร้อน เป็นต้น ตัวอย่างโครโมฟอร์ของสีย้อมที่นิยมใช้ในปัจจุบันได้แก่

1. azo dyes เป็นสีที่มีหมู่เอโซ (azo linkage, -N=N-) หนึ่งหมู่ เชื่อมระหว่างวงอะโรมาติก 2 วง เป็นสีกลุ่มที่มีความสำคัญที่สุด มีปริมาณการใช้สูงถึง 60–70 % ของสีทั้งหมด ให้สีสดใสและเข้ม เช่น สีเหลือง ส้ม แดง



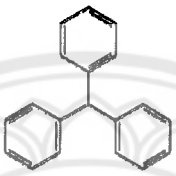
ภาพที่ 1 โครงสร้าง azo dyes
ที่มา: http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/price/azo.htm

2. anthroquinone dye เป็นสีที่มีหมู่แอนทราควิโนนอยู่ในโมเลกุล มีความสำคัญรองจากสีย้อมเอโซ ส่วนใหญ่เป็นสีน้ำเงิน มีความทนทานต่อแสงอยู่ในเกณฑ์ดี มีราคาแพงกว่าสีย้อมเอโซ



ภาพที่ 2 โครงสร้าง anthroquinone
ที่มา: https://en.wikipedia.org/wiki/Anthraquinone

3. triphenylmethane dye เป็นสีย้อมที่นิยมใช้ในการศึกษาลักษณะจุลินทรีย์ที่ใช้มากในห้องปฏิบัติการทดสอบจุลินทรีย์ เช่น สี crystal violet, fuchsin



ภาพที่ 3 โครงสร้าง triphenylmethane
ที่มา: https://en.wikipedia.org/wiki/Triphenylmethane

นอกจากจะมีการใช้สีย้อมในงานหลายด้านดังที่กล่าวมาแล้ว สีย้อมยังมีการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการต่างๆ เช่น ห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยาของสถานศึกษาต่างๆ และห้องปฏิบัติการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ในโรงพยาบาล และสถานประกอบการที่เกี่ยวข้อง โดยใช้สีย้อมหลายชนิดในการย้อมจุลินทรีย์เพื่อศึกษาลักษณะต่างๆ ดังสรุปได้ตามนงลักษณ์และปรีชา (2541) ได้แก่

1.การย้อมสีแบบธรรมดา (simple staining) เป็นการย้อมสีแบคทีเรียโดยใช้สีเพียงสีเดียว เซลล์จะถูกย้อมติดสีสม่ำ เสมอกัน เพื่อศึกษารูปร่างและขนาดของเซลล์ ตัวอย่างสีที่ใช้ เช่น เมทิลีนบลู คริสตัลไวโอเลต คาร์บอลฟุคซิน

2.การย้อมสีแบบแกรม (gram's staining) เป็นการย้อมสีที่สำคัญและนิยมใช้มากที่สุด สามารถใช้จำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ สีสำคัญที่ใช้ในการย้อมแกรม คือ สีคริสตัลไวโอเลต และสีซาฟรานิน

3.การย้อมสีแบบทนกรด (Acid Fast staining) เป็นการย้อมสีแบคทีเรียบางกลุ่มที่สามารถทนต่อการล้างด้วยแอลกอฮอล์เจือกรด ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Mycobacterium* การย้อมสีแบบทนกรดใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* ที่เป็นสาเหตุของโรควัณโรคและโรคเรื้อน

4.การย้อมสีสปอร์ (Endospore staining) เช่น แบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* และ *Clostridium* จะมีการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ เนื่องจากสปอร์ติดสีย้อมยาก การย้อมสปอร์จึงต้องใช้ความร้อน วิธีการย้อมสีสปอร์ที่นิยม คือ วิธีของ Schaeffer and Fulton

5.การย้อมสีโครงสร้างต่างๆ ของแบคทีเรีย (Special staining) เช่น แฟลกเจลลา แคปซูล ผนังเซลล์ เป็นต้น เป็นการย้อมสีที่ต้องใช้เทคนิคพิเศษ

6.การย้อมสีแบบเนกาทีฟ (negative staining) เป็นการย้อมสีที่ตัวเซลล์แบคทีเรียจะไม่ถูกสีย้อม แต่สีจะไปติดแน่นกับแผ่นสไลด์ จึงมองเห็นเป็นฉากมืด ส่วนตัวเซลล์แบคทีเรียจะโปร่งแสงจึงมองเห็นได้ชัด สีที่นิยมใช้คือ สีนิโกรซิน หรือ India ink

การบำบัดสีในน้ำทิ้ง (รัชนีย์, http://www.navy.mi.th/ science/BrithDay46/Brithday _data/biology.htm)

สิ่งเจือปนในน้ำทิ้งจากโรงงานฟอกย้อมนั้น ส่วนใหญ่จะเป็นสีย้อมและสารเคมีซึ่งเป็นส่วนที่เหลือตกค้างอยู่ในน้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิตและจะถูกปล่อยลงแหล่งน้ำทิ้ง แม้ไม่ถูกจัดให้เป็นสารก่อมลภาวะในน้ำ แต่เนื่องจากทำให้เกิดความรู้สึกน่ารังเกียจต่อคนทั่วไป ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรมของมาตรฐานน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม กำหนดให้สีในน้ำทิ้งไม่เป็นที่น่ารังเกียจ ดังนั้น น้ำทิ้งจากโรงงานฟอกย้อมก่อนปล่อยออกจากโรงงาน ต้องผ่านระบบบำบัดน้ำเสียเพื่อทำการกำจัดสารต่าง ๆ รวมทั้งสีที่ตกค้างก่อน วิธีการบำบัดสีมีหลายวิธีคือ

1. การตกตะกอนด้วยสารเคมี (Chemical Coagulation) เป็นการกำจัดสีที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง ใช้ในการบำบัดขั้นต้นก่อนการบำบัดทางชีววิทยา สารตกตะกอนที่นิยมใช้คือ ปูนขาว สารส้ม เฟอร์รัสคลอไรด์ หรือเฟอร์รัสซัลเฟต เป็นต้น การกำจัดสีโดยกระบวนการตกตะกอนด้วยสารส้ม จะทำให้โมเลกุลของสีถูกดูดซับบนอนุภาคของสารส้ม ทำให้ตะกอนสีจมลงในน้ำ เป็นวิธีกำจัดสีได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่เนื่องจากน้ำทิ้งจะมีลักษณะแตกต่างไปตามชนิดของโมเลกุลสีย้อม ถ้าสีย้อมมีโมเลกุลเล็ก เช่น ประเภทสีแอสิด สีรีแอคทีฟ การเกิดตะกอนของสีโดยใช้สารส้มจะไม่สามารถทำได้ ดังนั้นต้องปรับปรุงประสิทธิภาพของปฏิกิริยาการตกตะกอนให้เป็นไปอย่างสมบูรณ์ โดยใช้สารช่วยให้เกิดการรวมตัวของตะกอนเช่น โพลีอิเลคโตรไลท์ ซึ่งต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสม เนื่องจากความเข้มข้นของโพลีอิเลคโตรไลท์ที่เหลืออยู่ในน้ำทิ้งจะส่งผลเสียต่อกระบวนการไนตริฟิเคชั่น

2. กระบวนการบำบัดทางชีววิทยา (Biological Treatment) กระบวนการนี้อาศัยจุลินทรีย์ในการลดสีโดยจุลินทรีย์ที่เติบโตขึ้นมาใหม่ จะมีการดูดซับสีไปด้วยทำให้สามารถบำบัดสีได้ แบ่งออกเป็น 2 ระบบคือ

- ระบบตะกอนเร่ง (Activated Sludge) เป็นกระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีววิทยา ซึ่งอาศัยจุลินทรีย์ในการย่อยสลาย หรือเปลี่ยนรูปของมวลสารต่างๆ ที่มีอยู่ในน้ำเสีย ให้มีค่าความสกปรกลดลง
- ระบบบ่อเติมอากาศ (Aerated Lagoon) ดัดแปลงจากการบำบัดน้ำเสียแบบที่มีอากาศและไม่มีอากาศรวมกัน โดยเพิ่มเครื่องเติมอากาศที่ผิวน้ำ ระบบนี้คล้ายกับระบบตะกอนเร่ง ต่างกันเพียงบ่อนี้

จะมีขนาดค่อนข้างใหญ่ ขุดจากพื้นดินโดยตรง คุณภาพของน้ำเมื่อผ่านกระบวนการนี้จะมีค่าบีโอดีลดลง

3. การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ (Activated Carbon) เป็นกระบวนการดูดซับที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย สามารถใช้กำจัดสีได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่มีข้อจำกัดที่น้ำหนักโมเลกุลของของเสียที่จะถูกดูดซับ ต้องมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 400 ซึ่งโดยทั่วไปน้ำหนักโมเลกุลของของเสียในอุตสาหกรรมสีจะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 400 และสูงกว่า 1200 ดังนั้น ก่อนการกำจัดสีด้วยกระบวนการดูดซับบนถ่านกัมมันต์ จะต้องมีการปรับขนาดโมเลกุลของของเสียให้เหมาะสมก่อน โดยการไฮโดรไลซิสด้วยปูนขาว ซึ่งต้องใช้ปูนขาวปริมาณมากในการปรับพีเอชของสารละลายให้อยู่ในช่วง 10-11 ซึ่งส่งผลให้พีเอชของน้ำทิ้งสูง ดังนั้น ต้องมีการปรับพีเอชให้เป็นกลางก่อนปล่อยทิ้ง การกำจัดสีด้วยการดูดซับบนถ่านกัมมันต์เป็นกระบวนการที่ทำให้โมเลกุลของสีดูดติดบนผิวของถ่านกัมมันต์ ดังนั้น ประสิทธิภาพการดูดซับสีจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณรูพรุนของถ่านกัมมันต์ เพราะพื้นที่ผิวจำเพาะมากขึ้นนั่นเอง แต่การทำให้โมเลกุลของสีหลุดออกจากผิวของถ่านนั้นทำได้ยาก ต้นทุนการนำถ่านกัมมันต์กลับมาใช้ใหม่จึงสูง เพราะต้องผ่านการเผาและการกำจัดกากซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูง รวมถึงค่าใช้จ่ายในส่วนที่มีการปรับพีเอชก่อนปล่อยออกจากโรงงานด้วย ทำให้เทคนิคนี้ไม่เป็นที่นิยมแม้จะมีประสิทธิภาพการกำจัดสีสูงก็ตาม

4. การออกซิไดซ์ด้วยโอโซน (OzoneTreatment) โดยทั่วไปโมเลกุลสีย้อมจะมีหมู่โครโมฟอร์ที่เป็นสารประกอบ อินทรีย์เป็นพวกวงแหวนกับพันธะคู่หรือพันธะเดี่ยว ดังนั้นการที่จะทำลายโมเลกุลของสีนั้น ต้องทำลายหมู่โครโมฟอร์ที่เป็นพันธะคู่หรือพันธะเดี่ยวก่อน ซึ่งการบำบัดทางชีววิทยาไม่สามารถทำได้ กระบวนการกำจัดสีโดยใช้โอโซนเป็นเทคนิคที่นำมาใช้ไม่นานนัก ซึ่งอาจได้รับความนิยมเมื่อมาตรฐานการปล่อยน้ำทิ้งเข้มงวดขึ้น โอโซเนชั่น (Ozonation) เป็นการออกซิไดซ์พันธะคู่ที่เป็นพันธะเคมีของหมู่โครโมฟอร์ของโมเลกุลด้วยโอโซน แต่เนื่องจากโอโซนเป็นตัวออกซิไดซ์ที่แรงมากจะทำปฏิกิริยากับสารประกอบในน้ำทิ้งอย่างรวดเร็วเมื่อเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นโมเลกุลของสีย้อมซึ่งส่วนใหญ่มักประกอบด้วยไนโตรเจน คลอรีน หรือซัลเฟอร์จะเกิดเป็นสารประกอบชนิดใหม่ที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าสารเริ่มต้นเดิม

5. เทคโนโลยีเยื่อแผ่น (Membrane Technology) กระบวนการกำจัดสีด้วยเยื่อแผ่น (Membrane) สามารถใช้ในการกำจัดสี นำเอาสารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีและสีย้อมบางชนิดกลับมาใช้ใหม่ได้แบ่งออกเป็น 4 ประเภทคือ

5.1 ไมโครฟิลเตรชั่น (Microfiltration) ใช้ในการกำจัดสีย้อมที่มีลักษณะเป็นคอลลอยด์ (Colloid) ที่ถูกปล่อยออกจากหม้อย้อมหลังจากผ่านการล้าง ใช้กำจัดสีประเภทสีดิสเพอร์ส

ที่ใช้ย้อมเส้นใยประเภทโพลีเอสเทอร์ และสีย้อมประเภทสีซัลเฟอร์ สีแวต และสีอะโซอิกที่ใช้ย้อมเส้นใยฝ้ายและวิสคอส (Viscose) สีย้อมดิสเพอร์สเมื่อผ่านกระบวนการไมโครฟิลเตรชั่นแล้วสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้

5.2 ออสโมซิสย้อนกลับ (Reverse Osmosis) เหมาะสำหรับใช้กำจัดอิออนสีย้อมและโมเลกุลของสีย้อมที่มีขนาดใหญ่ ต้องผ่านเยื่อแผ่น 2 ขั้นตอน คือเยื่อแผ่นออสโมซิสย้อนกลับที่บรรจุน้ำกร่อย (Brackish Water) และเยื่อแผ่นออสโมซิสย้อนกลับที่บรรจุน้ำทะเล (Sea Water) ซึ่งเยื่อแผ่นแรกจะสามารถกำจัดสีได้ถึงร้อยละ 90 ความเข้มข้นของสีที่เหลือจะถูกส่งผ่านไปยังเยื่อแผ่นที่สอง และสามารถกำจัดสีได้ถึงร้อยละ 94 อย่างไรก็ตามสีย้อมที่ใช้ย้อมเส้นใยประเภทฝ้ายไม่สามารถใช้กระบวนการนี้ได้

5.3 ไดนามิค เมมเบรน (Dynamic Membrane) ใช้กำจัดสีย้อมที่มีลักษณะเป็นคอลลอยด์ที่แขวนลอยอยู่โดยใช้ตัวรองรับที่มีรูพรุน เช่น เหล็ก แสตนเลส วัสดุคาร์บอน หรือเซรามิก ซึ่งต่อมาได้พัฒนามาใช้ Hydrous zirconium (IV) oxide และกรดโพลีอะคลีลิกส์ (Zr/PAA) เพื่อปรับปรุงขนาดของรูพรุน กระบวนการนี้สามารถกำจัดสีได้มากกว่า 95%

5.4 นาโนฟิลเตรชั่น (Nanofiltration) ใช้กำจัดสีย้อมประเภทสีรีแอคทีฟที่ใช้ย้อมเส้นใยฝ้ายเนื่องจากการย้อมสีรีแอคทีฟต้องใช้สารอิเลคโตรไลท์ช่วยในการย้อม เช่น โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) ซึ่งกระบวนการนี้สามารถแยกสารพวกอิเลคโตรไลท์เหล่านี้ออกมาและนำกลับมาใช้ได้

6. เทคโนโลยีใหม่ๆ (New Technology) เทคโนโลยีใหม่ๆ มากมายที่เกิดขึ้น มีพื้นฐานตั้งอยู่บนเทคนิคต่างๆกันแต่มีวัตถุประสงค์เดียวกันคือเพื่อลดผลกระทบต่างๆให้เหลือน้อยที่สุดเช่น

6.1 ตัวดูดซับชนิดอนินทรีย์ซึ่งถูกปรับปรุงให้ดีขึ้น และมีการนำมาใช้กันอยู่ในโรงงาน ประสิทธิภาพในการกำจัดสีค่อนข้างดี อัตราการกำจัดเป็นไปอย่างรวดเร็ว ให้ผลการกำจัดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้แม้จะมีความแปรผันของความเข้มข้นสีที่สูงหรือมีสารเจือปนก็ตาม ซึ่งต้นทุนวิธีนี้ต่ำกว่าเทคนิคอื่นๆ ที่คล้ายกัน ดังนั้นเทคนิคนี้จึงคุ้มค่าต่อการพิจารณา

6.2 ระบบที่มีพื้นฐานของอิเลคโตรไลซิสที่อยู่ในระหว่างกำลังพัฒนา พลังงานที่ใช้จะสูง และบางครั้งคลอรีน และไฮดรอกซีเรดิคัลสามารถเกิดขึ้นได้ ซึ่งจะทำให้เกิดการแตกพันธะอย่างควบคุมไม่ได้ ตัวดูดซับชนิดอินทรีย์หรือพืชแห้ง เช่น ผักตบชวาจะมีองค์ประกอบที่สำคัญ คือเซลลูโลส ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันนัลไว้แลกเปลี่ยนอิออน หรือโมเลกุลของสารอินทรีย์ได้

จากกระบวนการต่างๆที่ใช้ในการกำจัดสีย้อมที่กล่าวมา ไม่ว่าจะโดยการใช้สารเคมี การกำจัดโดยวิธีกายภาพ และทางชีววิทยาโดยอาศัยจุลินทรีย์ในการตกตะกอนก็ตาม แต่ละวิธีมีข้อดีและเสียแตกต่างกัน แต่ทางเลือกหนึ่งที่มีการใช้และศึกษาเพื่อกำจัดสีย้อมคือการใช้จุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อรา ซึ่งมีหลายชนิดที่มีความสามารถกำจัดสีย้อมได้ดี เนื่องจากเชื้อราเป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถสร้างอาหารได้เอง ต้องอาศัยอาหารจากแหล่งอื่นโดยทำการย่อยสลายแล้วดูดซึมเข้าสู่เซลล์เพื่อการเจริญ เชื้อราจึงเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีบทบาทสำคัญ โดยเฉพาะการเป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ ทำให้เกิดการหมุนเวียนของแร่ธาตุต่างๆในระบบนิเวศ เชื้อราจัดเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม มีการอยู่อาศัยหลายแบบทั้งการอาศัยแบบพึ่งพากับสิ่งมีชีวิตอื่น การเป็นปรสิต การอาศัยอยู่แบบอิสระและดำรงชีพโดยการย่อยสารอินทรีย์ต่างๆ เชื้อราจัดเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน โดยอาศัยความสามารถในการเป็นผู้ย่อยสลายที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้น จึงมีการนำเชื้อรามาใช้ในการย่อยสลายสารเพื่อรักษาหรือฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติ โดยเฉพาะการนำมาใช้ในการย่อยสลายสารที่ย่อยสลายได้ยากในธรรมชาติ หรือกำจัดได้ยากและสิ้นเปลืองเมื่อกำจัดโดยวิธีทางเคมีหรือกายภาพ

เห็ด เป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในอาณาจักรราที่มีขนาดใหญ่ เกิดจากการรวมตัวกันของเส้นใยจนเป็นโครงสร้างที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และเป็นทรัพยากรธรรมชาติกลุ่มหนึ่งที่มีบทบาทหน้าที่ที่สำคัญในระบบนิเวศ อยู่ในกลุ่มที่เรียกว่าฟังไจ (Fungi) ซึ่งเดิมถูกจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในกลุ่มของพืชชั้นต่ำ แต่เมื่อวิวัฒนาการการศึกษาด้านวิทยาศาสตร์มีความก้าวหน้ามากขึ้น ทำให้สามารถตรวจสอบได้จนถึงระดับโมเลกุล ทำให้ทราบว่าเห็ดและราไม่ใช่พืชเพราะไม่มีโครงสร้างภายในเซลล์ที่เรียกว่าคลอโรพลาสต์ที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงและมีลำดับของพันธุกรรมคล้ายคลึงกับสัตว์มากกว่าพืช นักวิทยาศาสตร์จึงได้แยกกลุ่มของเห็ดราออกจากกลุ่มของพืช และเห็ดแตกต่างจากราตรงที่เส้นใย มีการถักทอรวมกันเป็นดอกเห็ด ซึ่งลักษณะเช่นนี้ไม่พบในกลุ่มของรา โดยเห็ดจัดอยู่ในรากลุ่ม Basidiomycotina และ Ascomycotina แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ เห็ดกินได้ (edible mushroom) และเห็ดพิษ (poisonous mushroom or toadstool) (ราชบัณฑิตยสถาน, 2539) นักวิทยาศาสตร์ได้ทำการประเมินว่าเห็ดในโลกนี้น่าจะมีประมาณ 140,000 ชนิด แต่ในขณะนี้มีการศึกษาเพื่อจัดจำแนกได้เพียงร้อยละ 10 เท่านั้น ยังมีเห็ดอีกเป็นจำนวนมากที่มีอยู่ในธรรมชาติเพื่อรอการศึกษาขั้นต่อไป Nyerges (2002) รายงานชนิดเห็ดที่รู้จักว่ามีอยู่ประมาณ 38,000 สายพันธุ์ พบมีเพียง 50 สายพันธุ์ที่มีพิษ มี 50 สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติทางยา และอีก 700 สายพันธุ์ที่ใช้เป็นอาหาร

จุลินทรีย์ในกลุ่มรา โดยเฉพาะเห็ดเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญมาก เพราะนอกจากจะพบได้ทั่วไปแล้ว ยังเป็นผู้ย่อยสลายที่ดีในธรรมชาติ โดยเชื้อราจะดูดซึมสารอาหารต่างๆที่มีขนาดเล็กที่สามารถดูดซึมได้จากสิ่งแวดล้อมเข้าสู่เซลล์ แต่ถ้าเป็นสารที่มีขนาดใหญ่เชื้อราจะสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยสลายให้มีขนาดเล็กก่อน เช่นการย่อยสลายสารในกลุ่มลิกโนเซลลูโลส ซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมากในธรรมชาติ สามารถแบ่งราเป็นกลุ่มต่างๆในการย่อยเซลลูโลสได้เป็น 1) **กลุ่ม white rot fungi** คือ เชื้อ

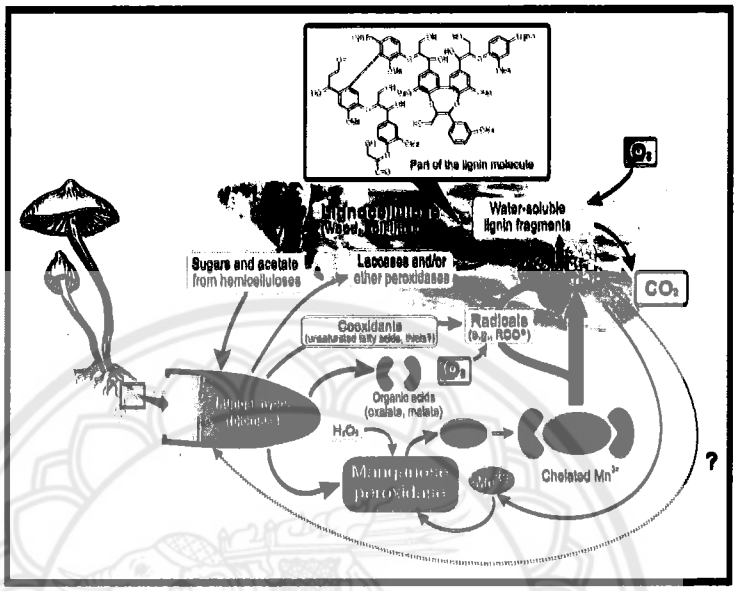
2 TD
758
.S.C65
วน๑๕
1049779

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
21 มี.ค. 2565

ราที่สามารถย่อยสลายสารประกอบประเภทลิกโนเซลลูโลส (linocellulose) ได้แก่ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses) และลิกนิน (lignin) โดยย่อยสลายองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสได้ทั้งหมด เช่น *Trichoderma* sp. *Aspergillus braze* ในขณะที่เชื้อรากลุ่ม white soft rot fungi จะย่อยสลายโพลิแซกคาไรด์ทั้งของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และย่อยลิกนินได้บางส่วน ดังภาพที่ 4 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการทำงานของเชื้อรากลุ่ม white rot fungi คือย่อยสลายสารประกอบประเภทลิกโนเซลลูโลสได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Aerobe and Anaerobe) เช่น เชื้อรา *A. braze* ในขณะที่ยีสต์สามารถย่อยสลายได้ดีเฉพาะภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น (Tangnu, 1982) **2) กลุ่ม brown rot fungi** คือ เชื้อราที่สามารถย่อยสลายได้เฉพาะเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสเท่านั้น (สุกาญจน์, 2553) และกลุ่ม leaf litter fungi (Cho et.al., 2009) ลิกนินเป็นสารที่พบทั่วไปในธรรมชาติ เป็นส่วนประกอบของพืชที่ย่อยสลายได้ยากเพราะมีโครงสร้างเป็น aromatic polymer ช่วยให้ความแข็งแรงแก่พืช (Martinez, et.al., 2005) แต่สามารถย่อยสลายได้ด้วยจุลินทรีย์ไม่กี่ชนิดโดยเฉพาะจุลินทรีย์ในกลุ่ม White rot fungi ที่จะสร้างเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ แล้วย่อยสลายลิกนิน ด้วยกลุ่มเอนไซม์ oxidoreductases ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ laccases และ peroxidases ซึ่งจัดเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ทำงานได้ดีเมื่อมีออกซิเจน นอกจากนี้ยังย่อยสลายสารที่ย่อยสลายยากต่างๆ ได้แก่ สารกลุ่ม single aromatic molecules และอื่นๆ เช่น xenobiotics (สารแปลกปลอมเข้าไปในเซลล์ของสิ่งที่มีชีวิต เช่น ยา ยาฆ่าแมลง และสารก่อมะเร็ง) กลุ่มเอนไซม์ดังกล่าวจะมีลักษณะแตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดและต่างกันตามสภาวะการเจริญ (Kirk and Farrell, 1987)

White rot fungi เป็นเชื้อราที่รู้จักกันดีว่ามีประสิทธิภาพสูงในการทำหน้าที่ย่อยสลายสีย้อม เช่น สีย้อมกลุ่ม azo, heterocyclic, reactive และ polymeric (Novotny, et.al., 2004) สามารถสร้างเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ที่มีโครงสร้างและการทำงานที่ไม่จำเพาะเจาะจง กลุ่มเอนไซม์นี้ ได้แก่ เอนไซม์ laccase (EC 1.10.3.2) เอนไซม์ Lignin peroxidases (LiPs) (EC 1.11.1.14) และเอนไซม์ Manganese peroxidases (MnP) (EC 1.11.1.13) (Heinzkill, et.al., 1998) ดังภาพที่ 4 Laccase จะ oxidation ทั้งสารกลุ่ม phenolic และ non-phenolic และย่อยสลายสีสังเคราะห์ได้หลายชนิด (Swamy and Ramsay, 1999) เพราะมีกิจกรรมเอนไซม์แบบไม่จำเพาะเจาะจง จึงมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในงานหลายชนิด เช่น อุตสาหกรรมเยื่อไม้ การฟอกขาว และการกำจัดน้ำเสียที่มีสีเคมี เนื่องจากอุตสาหกรรมสิ่งทอมักมีขอเสียที่เป็นส่วนผสมของสีย้อมหลายชนิด ในการกำจัดของเสียเหล่านี้จึงมักไม่สิ้นเปลืองมาก เนื่องจากศักยภาพในการย่อยสลายได้สูง กำจัดของเสียได้หลายชนิด (Thurston, 1994) เช่น Revankar and Lele (2006) รายงานการใช้ white rot fungus, *Ganoderma* sp. WR-1 ที่คัดเลือกได้ว่าสามารถผลิตเอนไซม์ laccase ได้สูง เมื่อเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ที่มีการรายงานมาก่อนหน้า เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่มีเอนไซม์ในกลุ่ม ligninolytic ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบกลุ่มที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมได้ รวมทั้งสารในกลุ่ม polycyclic aromatic

hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), สีย้อมสังเคราะห์ เป็นต้น (Pointing, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่าแอคติโนมัยสีทบางชนิดและแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศยังมีความสามารถในการย่อยสลายได้เช่นกัน



ภาพที่ 4 การผลิตเอนไซม์ ligninolytic ของเส้นใยเห็ดเพื่อย่อยสลายสารในธรรมชาติ
ที่มา : http://www.kolumbus.fi/ilona.barlund/ilona.barlund/MartinsProjects.html

เอนไซม์ laccase (benzenediol: oxygen oxidoreductase EC 1.10.3.2) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม multicopper oxidase ซึ่งคอปเปอร์จะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในวัตถุดิบหลายชนิด ทำงานได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน (Yaropolov et al. 1994) Yoshida เป็นผู้ค้นพบครั้งแรกในน้ำยางของต้น Japanese lacquer ในปี 1883 โดยทำให้น้ำยางแข็งเมื่อถูกอากาศ (Call and Mücke, 1997; Gianfreda et al. 1999) เอนไซม์แลคเคส พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในพืช แมลงบางชนิด และแบคทีเรียบางกลุ่ม (Kramer et al. 2001; Claus, 2003; Claus, 2004; Dittmer et al. 2004) แต่มีรายงานว่าเอนไซม์ที่พบในเชื้อรามีการนำมาใช้ในงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพมากที่สุด (Kalmiş et al. 2008) พบว่ามีรามากกว่า 60 สายพันธุ์ ใน Phylum Ascomycota, Zygomycota และโดยเฉพาะ Phylum Basidiomycota เป็นกลุ่มที่สร้างเอนไซม์แลคเคสได้ดี แต่กิจกรรมเอนไซม์จะแตกต่างกันไปตามแต่ชนิดของเชื้อรา โดยเอนไซม์จะถูกปล่อยออกมารอบเชื้อบนอาหาร เนื่องจากจะออกซิไดซ์ลิกนินได้เป็นสารในกลุ่มฟีโนลิก ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นสารตัวกลางที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ โดยตัวอย่างของสารสังเคราะห์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวกลางที่นิยมศึกษาคือ ABTS [2.2-azino-bis-(3-ethylbenzothia zoline-6-sulphonic acid)] (Call and Mücke, 1997) รวมทั้ง p-hydroxycinnamic acids (Gianfreda et al. 1999)

เอนไซม์ Lignin peroxidases (LiPs) (EC 1.11.1.14) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม oxidoreductases (Higuchi, 2004) เป็นเอนไซม์ที่พบครั้งแรกในเชื้อรากลุ่ม Basidiomycete ในเชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall (order Corticiales) ปี 1983 (Tien and Kirk, 1988) และมีรายงานว่าพบในรากลุ่ม white-rot basidiomycetes และใน actinomycetes (Kirk and Farrell, 1987) LiP เป็นเอนไซม์กลุ่ม hemeprotein ที่สร้างออกมานอกเซลล์และต้องมี H_2O_2 อยู่ในสภาวะที่มี redox potential สูง พีเอชต่ำ (Gold and Alic, 1993) เอนไซม์ LiP สามารถ oxidizied วัตถุดิบได้หลายชนิด เช่น สารกลุ่ม polymeric substrates เป็นเอนไซม์ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมสูง (Erden et al. 2009)

เอนไซม์ Manganese peroxidases (MnP) (EC 1.11.1.13) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม oxidoreductases ย่อยสลายลิกนินเช่นกัน (Higuchi, 2004) พบต่อจากเอนไซม์ LiP ในเชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* พบมากใน white rot fungi หลายชนิด และพบมากกว่าเอนไซม์ lignin peroxidase เอนไซม์ MnP จะเปลี่ยน Mn^{2+} เป็น Mn^{3+} รวมทั้งเปลี่ยน phenolic เป็น phenoxyl radicals (Hofrichter, 2002)

เอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนินซึ่งได้แก่เอนไซม์ lignin peroxidase (LiP), เอนไซม์ manganese peroxidase (MnP) และเอนไซม์ laccase หรือ copper containing phenoloxidase โดยเอนไซม์ในกลุ่ม Ligninolytic มีศักยภาพในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมและงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้มากมายดังตารางที่ 1 และใช้ได้กับวัตถุดิบหลากหลายชนิดทั้งสารอินทรีย์ และอนินทรีย์ (Esposito and de Azevedo, 2004; Rodríguez and Toca, 2006)

การย่อยสลายสีด้วยเห็ดเป็นวิธีทางชีวภาพที่มีข้อดีมากกว่าวิธีทางกายภาพหรือเคมี เนื่องจากสามารถย่อยสลายได้สมบูรณ์ ได้เป็นแร่ธาตุต่างๆ เช่น CO_2 และ H_2O ในธรรมชาติแม้จะมีจุลินทรีย์มากมายแต่อาจมีคุณสมบัติไม่เพียงพอในการย่อยสลายสีได้สมบูรณ์

จากรายงานวิจัยของ Madhavi, et. al. (2006) ที่ศึกษาการกำจัดสีสังเคราะห์ที่ย่อยสลายยากโดยคัดแยก white-rot fungi จากเปลือกและต้นไม้ที่ตายแล้ว จัดจำแนกได้เป็นเห็ดสายพันธุ์ *Ganoderma* sp. WR-1 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสม พบว่าเชื้อกำจัดสีได้สูงสุด 96% ในอาหารที่ประกอบด้วย starch 2%, yeast extract 0.125%, สีจากเมล็ด amaranth 100 ppm โดยเห็ด *Ganoderma* sp. WR-1 มีอัตราการกำจัดสีแร็วมากเมื่อเทียบกับเชื้ออื่นที่ทดสอบ นอกจากนี้ยังมีความสามารถกำจัดสีเคมีอื่นๆได้ดี เมื่อนำเชื้อนี้ไปทดลองใช้ในการกำจัดสีย้อมของน้ำเสียอุตสาหกรรม เชื้อก็สามารถกำจัดสีย้อมได้เร็วภายใน 12 ชั่วโมง

ตารางที่ 1 Ligninolytic enzymes produced by white rot fungi

Enzyme	EC. No	Catalyzed reactions	Fungi	References
Laccase	1.10.3.2	Phenol oxidation	*Trametes versicolor*	Yaropolov et al. 1994
Lignin peroxidase	1.11.1.14	Phenol polymerization	*Phanerochaete chrysosporium*	Gold and Alic, 1993 Haglund, 1999 Piontek et al. 2001 Erden et al. 2009
Manganese peroxidase	1.11.1.13	Phenol oxidation; Oxidize Mn^{2+} to Mn^{3+}	*Phanerochaete chrysosporium*	Hofrichter, 2002
Cellobiose-quinone oxireductase	1.1.5.1	Quinone reduction; Celobiose degradation	*Phanerochaete chrysosporium*	Soares, 1998
Aryl alcohol oxidase	1.1.3.7	H_2O_2 production	*Pleurotus saborcaju*	Martínez et al. 2009
Glyoxal oxidase	1.2.3.5	H_2O_2 production	*Phanerochaete chrysosporium*	Martínez et al. 2009
Manganese independent peroxidase	1.11.1.7	Activity on aromatic substrates	*Phanerochaete chrysosporium*	Wyatt and Broda, 1995 Ruiz-Dueñas and Martínez, 2009
Versatile peroxidase	1.11.1.16	Oxidizes Mn^{2+}; High redox-potential aromatic compouds	*Pleurotus* sp.	Ruiz-Dueñas et al. 2009
Cellobiose dehydrogenase	1.1.99.18	Lignin degradation; Unite the hydrolytic and oxidative systems; Dispose manganese (MnII) for MnP through precipitate reduction from manganese oxide (MnO_2)	*Phanerochaete chrysosporium*	Henriksson et al. 2000a Henriksson et al. 2000b Kersten and Cullen, 2007 Carvalho et al. 2009

ที่มา: Maciel et.al., (2010)

Rajput, et.al. (2011) ทำการคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดป่า 7 ชนิด ที่สามารถลดปริมาณและดูดซับสี ได้แก่เห็ด *Pleurotus florida*, *Pleurotus sajorkaju*, *Grifola, frondosa*, *Polyporous* sp.

1, *Jelly* sp., *Schizophylum commune*, *Polyporous* sp. โดยทำการเพาะเลี้ยงเห็ดบนอาหาร Potato dextrose agar ที่ผสมสีย้อม malachite green (MG) 0.01% สังเกตสีที่ลดลงโดยดูจากบริเวณใสรอบโคโลนีเชื้อ และศึกษาปริมาณสีที่ลดลงโดยการวัดด้วย UV-VIS spectrophotometer ความยาวคลื่น 540 nm หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน พบว่าเห็ด *Jelly* sp. *Schizophylum commune* และ *Polyporous* sp. ลดปริมาณสีได้ 98.25%, 64.25% และ 26.25% ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 10 วัน เห็ดทั้งสามสายพันธุ์ลดปริมาณสีได้ 99.75%, 97.5% และ 68.5% ตามลำดับ

สุกฤตา และคณะ (2555) ศึกษาการดูดซับสีในกลุ่มสีอะโซ โดยใช้เส้นใยเห็ดขอนขาวกลุ่ม white rot คือ *Lentinus squarrosulus* Mont. พบว่าเห็ดขอนขาวมีความสามารถในการดูดซับสีน้ำเงินและสีเหลืองได้ดีกว่าเส้นใยของเห็ดบดในเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารที่มีความเข้มข้นของสารละลายสีเท่ากับ 100 ppm เมื่อศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมระหว่างเส้นใยเห็ดขอนขาวที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต พบว่าเส้นใยเห็ดขอนขาวที่มีชีวิตมีความสามารถในการลดความเข้มสีที่สูงกว่าเส้นใยเห็ดที่ไม่มีชีวิต กล่าวได้ว่า เส้นใยเห็ดที่มีชีวิตมีการลดความเข้มสีด้วยกระบวนการดูดซับและการย่อยสลายสีด้วยเอนไซม์ โดยเส้นใยเห็ดขอนขาวสามารถสร้างเอนไซม์แลกเคคได้ มีกิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ 0.5 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เส้นใยที่ไม่มีชีวิตจะสูญเสียความสามารถในการดูดซับสีบางส่วนไป

Hima Bindu Nidadavolu, et. al. (2013) ศึกษาการกำจัดสีย้อมในกลุ่ม triphenyl methane 6 ชนิด ได้แก่ bromophenol blue, basic fuchsin, methyl violet, methyl green, ethyl violet และ malachite green ด้วยเชื้อเห็ด *Fomitopsis feei* พบว่าเชื้อกำจัดสี basic fuchsin ได้สูงสุด 98% รองลงมาคือ bromophenol blue กำจัดได้ 96.8% แต่มีอัตราการกำจัดได้เร็วกว่า โดยการกำจัดสีย้อมไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างกิจกรรมเอนไซม์ ligninolytic แต่พบกิจกรรมเอนไซม์ laccase และ lignin peroxidase สูงสุดในการกำจัดสี basic fuchsin 46 U/ml และ methyl green (44 U/ml) ตามลำดับ หลังบ่มเชื้อเป็นเวลา 21 วัน และพบเอนไซม์ triphenylmethane reductase ที่กำจัดสีย้อมกลุ่ม triphenylmethane ได้ดี และสรุปได้ว่าการใช้เชื้อรากำจัดสีย้อมมีความน่าสนใจ เนื่องจากค่าใช้จ่ายไม่สูงและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Jebapriya and Gnanadoss (2014) ที่ทำการคัดเลือก white rot fungi และศึกษาลักษณะทางโมเลกุล ศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ laccase และศึกษาการกำจัดสีย้อมจาก fruiting body ของ white rot fungi 22 ไอโซเลต พร้อมศึกษาการผลิตเอนไซม์ laccase พบว่ามี 10 ไอโซเลตที่ผลิตเอนไซม์ได้ โดยมี 3 ไอโซเลตซึ่งจัดจำแนกได้เป็น *Pleurotus floridanus* LCJ155, *Leucocoprinus cretaceus* LCJ164 และ *Agaricus* sp. LCJ169 ที่มี

ประสิทธิภาพในการกำจัดสีย้อมได้ดี โดยเชื้อทั้งสามสามารถพัฒนามาใช้ในการกำจัดสีย้อมในอุตสาหกรรมได้ โดยค่าใช้จ่ายไม่สูงและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

Ligninolytic enzymes ยังมีความสำคัญเนื่องจากเป็นตัวกระตุ้นกิจกรรมที่สำคัญในธรรมชาติ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Biological functions of ligninolytic enzymes

Enzyme	Applications
Laccase	Spore resistance, Rhizomorph formation, Pathogenesis, Fruit bodies formation, Pigments synthesis, Lignin degradation
Lignin Peroxidase	Biodegradation of lignin, Defense of fungi against pathogens
Manganese Peroxidase	Degradation of lignin, Interespecific fungal interactions

ที่มา: Maciel et.al., 2010

นอกจากนี้เอนไซม์ในกลุ่ม ligninolytic enzymes โดยเฉพาะเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อรา ยังมีการนำมาปรับใช้ในงานด้านต่างๆ ได้แก่

ด้านอุตสาหกรรมอาหาร (Food Industry) โดยเอนไซม์ Laccases ช่วยในการกำจัดสีและสารที่ไม่พึงประสงค์ เช่น สารกลุ่มฟีโนลิก ทำให้อาหารและเครื่องดื่มมีสีและลักษณะที่ดีขึ้น ลดการเกิดสีน้ำตาลและความขุ่นในน้ำผลไม้ ทำงานเหมือนกรด ascorbic, sugar beet gelatin pectin และช่วยกำจัดสารแขวนลอยในน้ำเสียจากอุตสาหกรรม ส่วนเอนไซม์ Lignin peroxidases (LiP) และ Manganese peroxidases (MnP) สามารถสังเคราะห์สาร aromatic จากธรรมชาติได้ (Rodríguez and Toca, 2006)

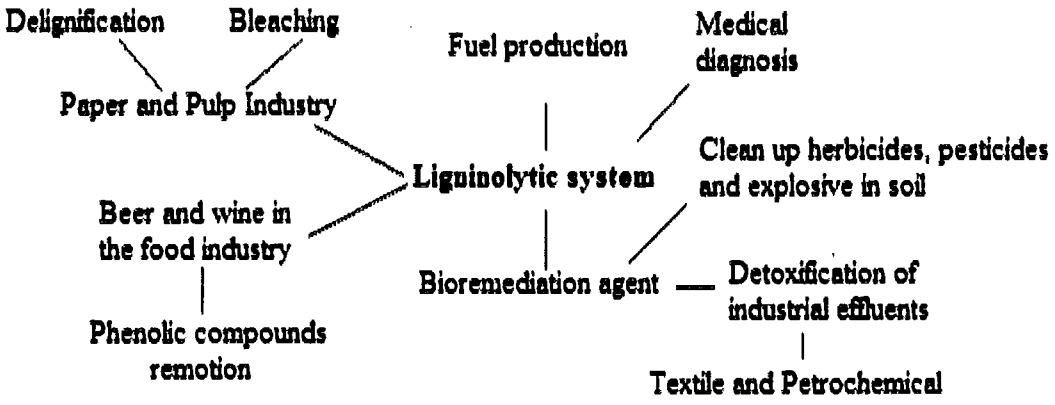
ด้านอุตสากรรมเยื่อและกระดาษ (Pulp and paper industry) เอนไซม์ Laccases ช่วยในการย่อยและกำจัดลิกนินจากอุตสาหกรรมเยื่อไม้ ใช้ในการแยกเส้นใยเซลลูโลส ซึ่งเป็นอุตสาหกรรมที่ใช้ Laccases กันมาก (Rodríguez and Toca, 2006) เช่นเดียวกับ Lignin peroxidases (LiP) ก็นิยมนำมาใช้เช่นกัน และทั้ง LiP และ MnP ก็มีรายงานการนำมาใช้ในการกำจัดสีในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ

ด้านอุตสาหกรรมสิ่งทอ (Textile industry) กลุ่มเอนไซม์ Laccases รวมทั้ง Lignin peroxidases (LiP) และ MnP มีการพัฒนามาใช้ในการฟอกขาวและกำจัดสีในอุตสาหกรรมสิ่งทอ

(Abadulla et al. 2000) นิยมใช้กำจัดสีทั้งสีสังเคราะห์ที่ใช้มากในปัจจุบันในน้ำเสียเพราะมีค่าใช้จ่ายไม่สูง (Rodríguez and Toca, 2006)

การลดความเป็นพิษของสารในธรรมชาติ (Bioremediation) เอนไซม์ Laccases เป็นสารช่วยลดความเป็นพิษทางชีวภาพ เช่น สารกลุ่ม xenobiotic ที่พบปนเปื้อนในดินจำนวนมาก (Rodríguez and Toca, 2006) รวมทั้งสารกลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) และ fossil fuels ที่พบในธรรมชาติ (Pointing, 2001; Anastasi et al. 2009) เนื่องจาก PAHs มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ และทำให้เกิดมะเร็ง ซึ่งมีความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์ (Bamforth and Singleton, 2005) เอนไซม์ Lignin peroxidases (LiP) จะเป็นตัวกระตุ้นแบบไม่จำเพาะเจาะจง ส่วน MnP จะช่วยย่อยสลายทำให้เกิดเป็นแร่ธาตุต่างๆในธรรมชาติ เนื่องจากสามารถย่อยสลายสารในกลุ่ม azo, heterocyclic, และ polymeric dyes เช่นการย่อยสลาย 1.1.1-trichloro-2.2-bis-(4-chlorophenyl) ethane (DDT), 2.4.6-trinitrotoluene (TNT) และ polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) (Bumpus and Aust, 1987)

ปัจจุบันมีความสนใจในการนำเอนไซม์กลุ่มนี้มาใช้มากขึ้น ดังภาพที่ 5 และตารางที่ 3 โดยใช้ในการสังเคราะห์สารออร์กานิคหลายชนิด เช่นกลุ่ม phenols และ steroids, medical agents ได้แก่ anesthetics, anti-inflammatory, antibiotics และ sedatives และมีวิธีการใหม่ๆในการนำเอนไซม์ laccase มาใช้ควบคู่กับสารบางชนิดเช่น morphine และ codeine เพื่อใช้เป็นยาฉีด พัฒนาเป็น biosensors หรือ bioreporters (Bauer et al. 1999) ส่วน Lignin peroxidase (LiP) นอกจากนำมาใช้เป็น biosensors สำหรับการ polymeric phenol หรือ lignin สูงแล้ว ยังมีความสนใจในการนำมาสังเคราะห์สารเคมีเพื่อใช้ในเครื่องสำอาง และเวชภัณฑ์เกี่ยวกับผิว (Belinky et al. 2005) สำหรับเอนไซม์ Manganese peroxidase (MnP) ที่ผลิตได้จากรากลุ่ม basidiomycete คือ *Phanerochaete chrysosporium* สามารถย่อยสลาย styrene ซึ่งเป็นสาร polymer ที่ใช้มากในอุตสาหกรรมการทำ plastic wrapping เพื่อใช้ในการขนส่งอาหาร ช่วยในการกำจัดของเสียทางน้ำและดิน (Soto et al. 1991)



ภาพที่ 5 Ligninolytic enzymes applications

ที่มา : http://www.ejbiotechnology.cl/content/vol13/issue6/full/2/f1.html

ตารางที่ 3 การประยุกต์ใช้เอนไซม์กลุ่ม Ligninolytic enzymes ในงานด้านต่างๆ

Food Industry	
Laccase	Phenolic remotion from the food and beverage, Ascorbic acid determination, Sugar beet pectin gelation
Lignin peroxidase	Source of natural aromatics, Production of vanillin
Manganese peroxidase	Production of natural aromatic flavours
Pulp and paper industry	
Laccase	Depolymerization of lignin, Delignify wood pulps, Bleaching of kraft pulps
Bioremediation	
Lignin peroxidase	Decolouriment of kraft pulp, Mill effluents
Manganese peroxidase	Kraft pulp bleaching
Textile industry	
Laccase	Textile dye degradation and bleaching
Lignin peroxidase	
Manganese peroxidase	
Laccase	Biodegradation of xenobiotics, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation

Lignin peroxidase	Degradation of azo, heterocyclic, reactive and polymeric dyes Mineralizationof environmental contaminants, Xenobiotic and pesticides degradation
Manganese peroxidase	PAH's degradation, Synthetic dyes, Bleach from paper producing plants DDT, PCB, TNT
Organic synthesis, Medical, Pharmaceutical, Cosmetics and Nanotechnology Applications	
Laccase	Polymers production, Coupling of phenols and steroids, Medical agents, Carbon-nitrogen bonds construction, Complex natural products synthesis, Personal higienic products, Biosensors and bioreporters
Lignin peroxidase	Functional compounds synthesis, Cosmetics and dermatological for skin Bioelectro-catalytic activity at atomic resolution
Manganese peroxidase	Acrylamide polymerization, Polymer styrene degradation, Direct electron transfer (DET)

ที่มา: Maciel et.al., 2010

แหล่งของ Laccases ยังพบได้ทั่วไปทั้งในพืชชั้นสูงและรา (Desa, S.S. 2011) ปัจจุบันพบในแบคทีเรียบางชนิด เช่น *S. lavendulae*, *S. cyaneus* และ *Marinomonas mediterranea* และจากรายงานของ Madhavi and Lele (2009) กล่าวว่า เอนไซม์Laccases พบในต้นไม้ กะหล่ำ เทอร์นิป แอ๊ปเปิล หน่อไม้ฝรั่ง มันฝรั่งและลูกแพ แต่ในเชื้อราจะพบมากกว่าพืชชั้นสูง เช่นในกลุ่ม Basidiomycetes ได้แก่ *Phanerochaete chrysosporium*, *Theiophora terrestris*, and *Lenzites, betulina* (Viswanath *et al.* 2008) และ white rot fungi (Kiiskinen *et al.* 2004) เช่น *Ganoderma* sp, *Phlebia radiate*, *Pleurotus ostreatus* และ*Trametes versicolour*

จากรายงานของ ชยพร สงวนทัพยากร (2544) ที่ศึกษาการลดสีของน้ำเสียจากโรงงานเยื่อกระดาษด้วยเชื้อราตรึงเซลล์ กล่าวถึงแหล่งของน้ำเสียที่มีลิกนินเจือปนอยู่ว่า น้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษมักมีสีและความเป็นพิษที่ทำให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม เพราะไม่สามารถกำจัดสีออกจากน้ำเสียได้หมดในขั้นตอนการบำบัด ในขบวนการผลิตเยื่อและกระดาษ ลิกนิน ซึ่งเป็นโครงสร้างสำคัญในเนื้อไม้จะถูกทำลายและเปลี่ยนรูปเป็นอนุพันธ์ต่างๆ ในน้ำทิ้งจึงมีสารเหล่านี้ปนอยู่ ทำให้มีสีน้ำตาลเข้มและมีพิษ ผลเสียของสีในแหล่งน้ำธรรมชาติ คือจะกั้นขวางแสงแดดไม่ให้ส่องลงในน้ำ ลดการสังเคราะห์แสงของพืชน้ำ เป็นสีที่มองเห็นได้ทำให้น้ำไม่น่ามอง สีที่ปนเปื้อนเกิดจากสารอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ และเป็นสารผสมของแข็งละเอียดที่แขวนลอย (colloid) อยู่ สีของน้ำเสียมี 2 ประเภท คือ สีที่แท้จริง (True colour) เกิดจากการละลายของสารประกอบที่มีในน้ำ และสีที่ปรากฏ (Apparent

color) เกิดจากการสะท้อนของสิ่งที่แขวนลอยอยู่ในน้ำ หรือการสะท้อนของท้องฟ้า ทราบสีที่แท้จริงได้โดยการนำน้ำมากรองหรือเหวี่ยงเอาสิ่งแขวนลอยออกไป แล้วนำน้ำไปเปรียบเทียบกับสีมาตรฐาน

ส่วนของน้ำเสียโรงงานเยื่อกระดาษที่มีลิกนินปนอยู่ ได้แก่

1. น้ำทิ้งจากการย่อยเยื่อและการล้างเยื่อ เรียกน้ำทิ้งนี้ว่า black liquor เพราะน้ำมีลักษณะสีดำคล้ำ หรือสีน้ำตาลเข้ม
2. น้ำ white water จากการแยกเยื่อ การทำความสะอาดเยื่อ และการทำเยื่อให้ข้น (screening, cleaning and thickening) เป็นน้ำที่มีปริมาณมาก เป็นน้ำทิ้งที่ไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เนื่องจากมีสารแขวนลอยพวกเส้นใยอยู่
3. น้ำทิ้งจากเครื่องล้างเยื่อในระบบฟอกเยื่อ (Bleach plant washer) น้ำทิ้งจากการฟอกเยื่อจะมีสารอินทรีย์ชนิดสารประกอบ chlorinated aromatic อยู่มาก เป็นน้ำที่มีค่า COD, BOD และความเข้มของสีสูงมาก

1.3 วัตถุประสงค์และประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการกำจัดสีย้อมจุลินทรีย์ด้วยเส้นใยเห็ดพื้นบ้านที่คัดเลือกได้
2. ศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เชื้อผลิตออกมา ซึ่งจะเป็นข้อมูลในการผลิตเอนไซม์เพื่อการใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆอีกได้
3. เพื่อศึกษาความสามารถในการกำจัดสีของน้ำทิ้งจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา และการกำจัดสีจากน้ำทิ้งของโรงงานผลิตเยื่อกระดาษ เพื่อเป็นการพัฒนาไปใช้ในโรงงานผลิตเยื่อกระดาษต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลการนำเห็ดที่เจริญได้ในสิ่งแวดล้อม ที่สามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้มาใช้ในการกำจัดสีย้อมในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ที่มีการใช้สีย้อมในการศึกษาจุลินทรีย์เป็นปริมาณมากในแต่ละปี และจะเป็นการพัฒนาการนำเชื้อเห็ดที่ได้ไปใช้ในโรงงานผลิตเยื่อกระดาษ ที่ยังมีปัญหาในการบำบัดน้ำทิ้งที่ยังมีสีไม่พึงประสงค์ก่อนปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมได้ ซึ่งการใช้เส้นใยเห็ดที่คัดเลือกได้มาใช้ประโยชน์นี้ นอกจากไม่สิ้นเปลืองแล้วยังไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม และเป็นการใช้ประโยชน์จากเห็ดในธรรมชาติอีกด้านหนึ่ง อีกทั้งสามารถนำข้อมูลที่ได้แผยแพร่แก่ชุมชนในการช่วยกันดูแลรักษาพื้นที่พบเห็ด และเผยแพร่ผลการวิจัยในที่ประชุมวิชาการหรือวารสารนานาชาติ อีกทั้งเป็นการเพิ่มประสบการณ์แก่นิสิตในด้านการวิจัย และมีจิตอาสาในการช่วยดูแลรักษาสิ่งแวดล้อมอีกทางหนึ่ง

บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีการศึกษาวิจัย

2.1 อุปกรณ์การวิจัยและสารเคมี

วัสดุอุปกรณ์/เครื่องมือ

- จานเพาะเชื้อ (plates)
- เข็มเขี่ยเชื้อและตะเกียงแก๊ส (needles and bunsen burner)
- แท่งแก้วดูดสาร (pipettes)
- หลอดทดสอบ (test tube)
- ชั้นวางหลอดทดสอบ (rack)
- สไลด์และกระจกปิดสไลด์ (Slides, cover glasses)
- ขวดเตรียมสาร (dulan bottles)
- บีกเกอร์ (beakers)
- กระบอกตวง (cylenders)

เครื่องมือ

- UV/VIS Spectrophotometer รุ่น DU 730, Beckman Coulter
- UV/VIS Spectrophotometer รุ่น SP-830 plus Metertech
- Centrifuge, DRE Standard Centrifuge
- Incubator shaker, Innova 4340
- Incubator, Shel Lab รุ่น 1565
- Laminar air flowรุ่น HVR 2460
- Hot air oven รุ่น ES-315
- Hot plate stirrer, HALOGEN รุ่น HT2
- พีเอชมิเตอร์ (pH meter), Oakton
- หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
- ตู้บ่ม (incubator)
- เครื่องชั่ง

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- Potato dextrose agar (PDA)
- Potato dextrose broth (PDB)

- Chloramphenicol
- แอลกอฮอล์ 95%, 70%
- สีย้อมคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet dye)
- สีย้อมซาฟรานินโอ (Safranin O dye)
- Sodium acetate buffer
- Guaiacol SIGMA-ALDRICH W253200-1KG-K

ตัวอย่างเส้นใยเห็ด

- เส้นใยเห็ดขอนขาว *Lentinus squarrosulus*	ไอโซเลต ม.1, ม.2 และ ม.3
- เส้นใยเห็ดหิ้งครีบ *Lentinus sp.*	ไอโซเลต 2.1 และ 2.3
- เส้นใยเห็ดตระกูลหลินจือ *Ganoderma sp.*	ไอโซเลต 9.1
- เส้นใยเห็ดขลำหมา *Mycoamaranthu scambodgensis*	ไอโซเลต 15
- เส้นใยเห็ดกรวยคำ *Gerronema icterinum*	ไอโซเลต 16, 16.1, 16.2 และ16.3
- เส้นใยเห็ดจั่น *Tricholoma crassa*	ไอโซเลต N1
- เส้นใยเห็ดหิ้งครีบเนยแข็ง *Oligoporus caesius*	ไอโซเลต TSL-2
- เส้นใยเห็ดหิ้งหลากสี *Trametes versicolor*	ไอโซเลต TSL-5
- เส้นใยเห็ด Entoloma *Entoloma sp.*	ไอโซเลต TSL-10
- เส้นใยเห็ดถอบหอม *Astraeu sodoratus*	ไอโซเลต TNP 9.1

2.2 วิธีการศึกษาวิจัย

1. ตัวอย่างเส้นใยเห็ดที่ใช้ในการทดสอบ

เส้นใยเห็ดที่ใช้ในการทดสอบ ได้จากการเก็บตัวอย่างเห็ดจากแหล่งต่างๆ เช่น เห็ดพื้นบ้านที่ขายในท้องตลาด เห็ดที่เจริญตามธรรมชาติในป่าชุมชนและเห็ดที่เจริญในพื้นที่ธรรมชาติทั่วไป จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงให้ได้เส้นใยบริสุทธิ์ เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การหาค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุด (λmax)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ sterile production broth (Nidadavolu, 2013) ซึ่งประกอบด้วย Peptone 1 กรัม, Yeast extract 2 กรัม, Dipotassium hydrogen phosphate 1 กรัม, Magnesium sulfate hepta hydrate 0.2 กรัม, Ammonium sulfate 5 กรัม, Glucose 20 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมสีย้อมจุลินทรีย์คริสตัลไวโอเลต หรือสีย้อมซาฟรานิน โอ 0.01% ผสมให้เข้ากันดี นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไออุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็นแล้วนำไปตรวจหาค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุด (λmax) ด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer ของสีย้อมแต่ละสี

3. การเตรียมและคัดเลือกเส้นใยเห็ดเพื่อใช้ในการกำจัดสีย้อม

เพาะเลี้ยงเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดพื้นบ้านที่คัดแยกได้บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C ให้เจริญเต็มจานอาหารเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตัดเส้นใยเห็ดบริเวณ 3/4 จากจุดศูนย์กลางที่ทำการเพาะเลี้ยงเส้นใย ด้วย pasture pipette ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 10 ชิ้น ลงในอาหาร SPB ที่ผสมสีย้อมแต่ละชนิดและผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 มล. ในฟลาสค์ขนาด 250 มล. นำไปเพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C และเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาการลดลงของสีย้อมในวันที่ 0, 3 และ 5 หรือจนกว่าสีจะถูกกำจัดหมด โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer และคำนวนหาเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมจากสูตร

$$\% \text{ decolorization} = \frac{A_{ini} - A_{fin}}{A_{ini}} \times 100$$

โดยกำหนดให้ A_{ini} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 0 วัน

A_{fin} = ค่าการดูดกลืนแสงในวันที่ทดสอบ

4. การศึกษาความสามารถของเส้นใยเห็ดที่คัดเลือกเพื่อใช้ในการกำจัดสีย้อมในสภาวะที่เหมาะสม

นำเห็ดที่สามารถเจริญได้เร็ว และกำจัดสีย้อมได้ดีมาศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมในสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่

4.1 ศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดที่คัดเลือกได้ที่พีเอชต่างๆ

ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ SPB ที่ผสมสีย้อมจุลินทรีย์คริสตัลไวโอเลตหรือสีย้อมซาฟรานิน โอ 0.01% จากนั้นปรับพีเอชเป็น 4, 6 และ 9 ด้วยสารละลายด่าง Sodium hydroxide 0.1 M และสารละลายกรด Hydrochloric เข้มข้น 20% นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไออุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็น ตัดเส้นใยเห็ดที่เจริญเต็มจานอาหาร PDA อายุประมาณเวลา 7 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 30°C ด้วย pasture pipette ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 10 ชิ้น เพาะเลี้ยงในอาหารที่เตรียมไว้ บ่มในเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C เก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาการลดลงของสีย้อมในวันที่ 0, 3 และ 5 หรือจนกว่าสีจะถูกกำจัดหมด โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer แล้วคำนวนหาเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดที่พีเอชต่างๆ

4.2 ศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดที่คัดเลือกได้ที่อุณหภูมิ 35 และ 40°C

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ SPB ที่ผสมสีย้อมจุลินทรีย์คริสตัลไวโอเลตหรือสีย้อมซาฟรานิน โอ 0.01% และปรับพีเอชให้เหมาะสมดังการทดลองที่ 4.1 ทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที และปรับอุณหภูมิเป็น 35 และ 40°C เพื่อดูความสามารถในการเจริญและการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดที่อุณหภูมิสูงขึ้น ทำการเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกัน และคำนวนหาเปอร์เซนต์การลดลงของสีย้อม

5. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสีย้อม (ดัดแปลงจากวิธีของ Coli, et. al., 1993 และ Nidadavolu, et. al., 2013)

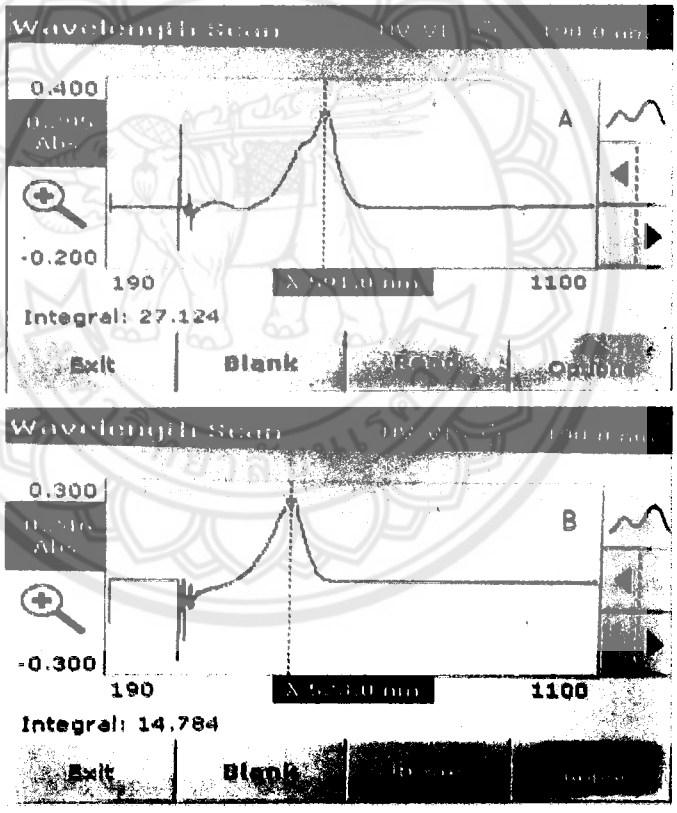
ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสบนอาหารแข็ง ทำโดยเตรียมอาหาร PDA แล้วเติมด้วย guiaiacol 0.02% หรือปริมาตร 200 µl/l นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไออุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดที่ต้องการทดสอบ บ่มให้เชื้อเจริญ สังเกตการสร้างวงสีน้ำตาลแดงในอาหารรอบโคโลนีเชื้อ แสดงว่าเชื้อที่ทดสอบสามารถสร้างเอนไซม์แลคเคสได้

6. ศึกษาการนำผลการทดลองที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดสีน้ำทิ้งที่ได้จากการบำบัดแล้วของโรงงานเยื่อกระดาษ จ.นครสวรรค์

บทที่ 3
ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

1.การหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λmax) ของสีย้อม

หาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสีย้อมคริสตัลไวโอเลต และสีย้อมซาฟรานิน โอ ที่ผสมในอาหาร Sterile production broth (SPB) ด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer รุ่น DU 730, Beckman Coulter พบว่าสีย้อมคริสตัลไวโอเลตเป็นสารที่มีสีม่วงมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 591 nm (A) และสีย้อมซาฟรานิน โอ เป็นสารที่มีสีแดงมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 523 nm (B) ผลการดูดกลืนแสงสูงสุดของสีย้อมแสดงดังภาพที่ 6 ตามลำดับ



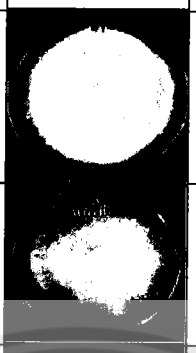
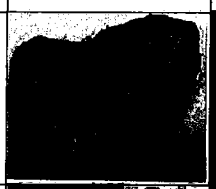
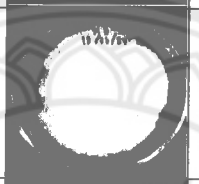
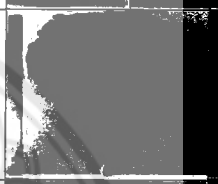
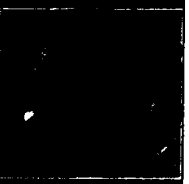
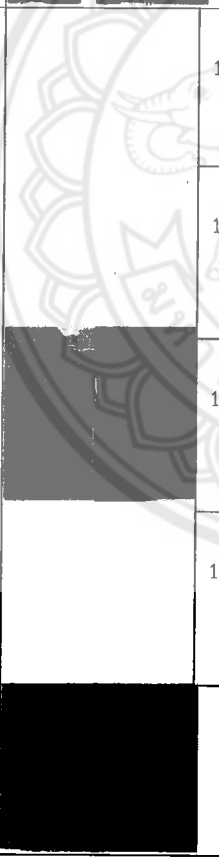
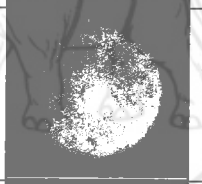
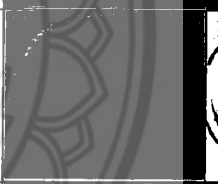
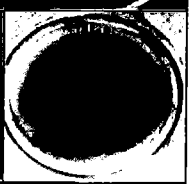
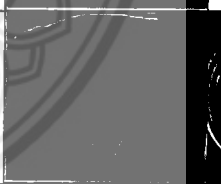
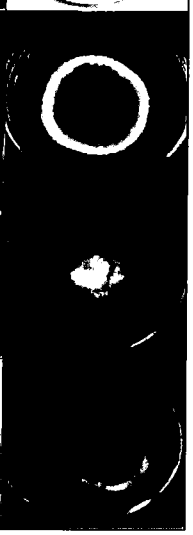
ภาพที่ 6 ผลการหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสีคริสตัลไวโอเลต (A) และ สีซาฟรานิน โอ (B) ด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer

2.ผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ด

นำเส้นใยเห็ดทั้ง 16 ไอโซเลต ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบเห็ด 12 ไอโซเลต ที่เส้นใยสามารถเจริญได้เต็มจานอาหาร และมีลักษณะของเส้นใยแตกต่างกันออกไป โดยลักษณะของเส้นใยส่วนใหญ่จะมีสีขาวฟู เจริญอยู่หนาแน่นและสม่ำเสมอบนผิวหน้าอาหาร PDA ได้แก่เส้นใยเห็ดไอโซเลต ม.1, ม.2, ม.3, 16, 16.1, 16.2, 16.3, TNP-9.1, 2.3, 15, TSL-10 แลtไอโซเลต TSL-5 ในขณะที่เส้นใยเห็ดอีก 4 ไอโซเลต คือ TSL-2, 9.1, N1 และ ไอโซเลต 2.1 ที่เส้นใยเจริญได้ช้า โดยใช้เวลาประมาณ 14 วันจึงจะเจริญได้เต็มจานอาหาร ลักษณะของดอกเห็ด และเส้นใยเห็ดทั้ง 16 ไอโซเลต แสดงดังตารางภาพที่ 1

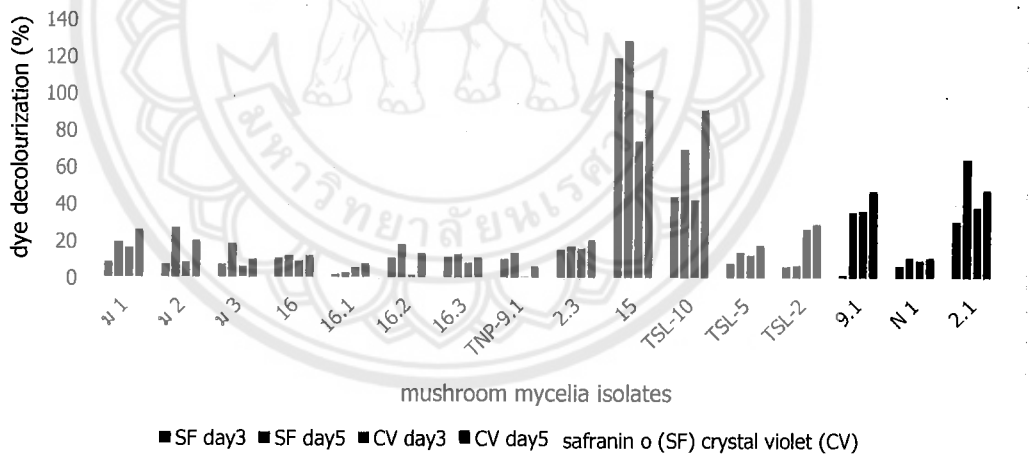
เมื่อศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดทั้ง 16 ไอโซเลต ในระยะเวลา 5 วัน โดยทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 3 และวันที่ 5 พบว่าเส้นใยเห็ดทั้ง 16 ไอโซเลต สามารถเจริญได้ในอาหาร SPB ที่ผสมสีย้อมซาฟรานิน โอ และสีย้อมคริสตัลไวโอเลต ดังแสดงในตารางที่ 4 และภาพที่ 7 โดยมีเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อมที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลการศึกษาพบว่าเส้นใยเห็ดที่มีความสามารถในการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ ได้ดีที่สุดคือเส้นใยเห็ดไอไซเลต 15 รองลงมาคือไอโซเลต TSL-10, 2.1, 9.1, ม.2, ม.1, ม.3, 16.2, 2.3, TSL-5, TNP-9.1, 16.3, 16, N1, TSL-2 และ 16.1 โดยมีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมเท่ากับ 128.745, 69.922, 64.542, 36.017, 27.126, 19.277, 18.667, 18.293, 17.153, 14.286, 13.704, 12.915, 11.913, 11.278, 7.234 และ 2.655 ตามลำดับ และผลการศึกษาการกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลต พบว่าเส้นใยเห็ดที่มีความสามารถในการกำจัดสีย้อมได้ดีที่สุดคือเส้นใยเห็ดไอไซเลต 15 รองลงมาคือไอโซเลต TSL-10, 2.1, 9.1, TSL-2, ม.1, 2.3, ม.2, TSL-5, 16.2, 16, N1, 16.3, ม.3, 16.1, และ TNP-9.1 โดยมีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมเท่ากับ 101.195, 90.438, 47.191, 46.479, 28.571, 25.279, 19.685, 19.277, 16.906, 12.635, 11.111, 10.569, 10.359, 9.211, 6.855 และ 5.455 ตามลำดับ

ตารางภาพที่ 1 ตัวอย่างดอกเห็ดและลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA

เห็ดไอโซเลต	ลักษณะดอกเห็ด	ลักษณะเส้นใยเห็ดบนอาหาร PDA	เห็ดไอโซเลต	ลักษณะดอกเห็ด	ลักษณะเส้นใยเห็ดบนอาหาร PDA
ม. 1			2.3		
ม. 2			15		
ม. 3			TSL-10		
16		16	TSL-5		
		16.1 	TSL-2		
		16.2	9.1		
		16.3	N 1		
TNP-9.1			2.1		

ตารางที่ 4 การกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ และคริสตัลไวโอเลตของเส้นใยเห็ดไอโซเลตต่างๆ

เห็ดไอโลต	ความสามารถในการกำจัดสีย้อม (%)				เห็ดไอโซเลต	ความสามารถในการกำจัดสีย้อม (%)			
	ซาฟรานิน โอ		คริสตัลไวโอเลต			ซาฟรานิน โอ		คริสตัลไวโอเลต	
	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 3	วันที่ 5		วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 3	วันที่ 5
ม 1	8.434	19.277	16.357	25.279	2.3	15.693	17.153	16.142	19.685
ม 2	7.287	27.126	8.434	19.277	15	119.433	128.745	74.104	101.195
ม 3	7.393	18.667	6.14	9.211	TSL-10	44.141	69.922	42.629	90.438
16	10.83	11.913	9.195	11.111	TSL-5	8.163	14.286	12.59	16.906
16.1	1.88	2.655	5.645	6.855	TSL-2	6.383	7.234	26.786	28.571
16.2	10.976	18.293	1.805	12.635	9.1	1.695	36.017	36.62	46.479
16.3	11.439	12.915	8.367	10.359	N 1	6.767	11.278	9.756	10.569
TNP-9.1	10.37	13.704	0.909	5.455	2.1	31.076	64.542	38.577	47.191



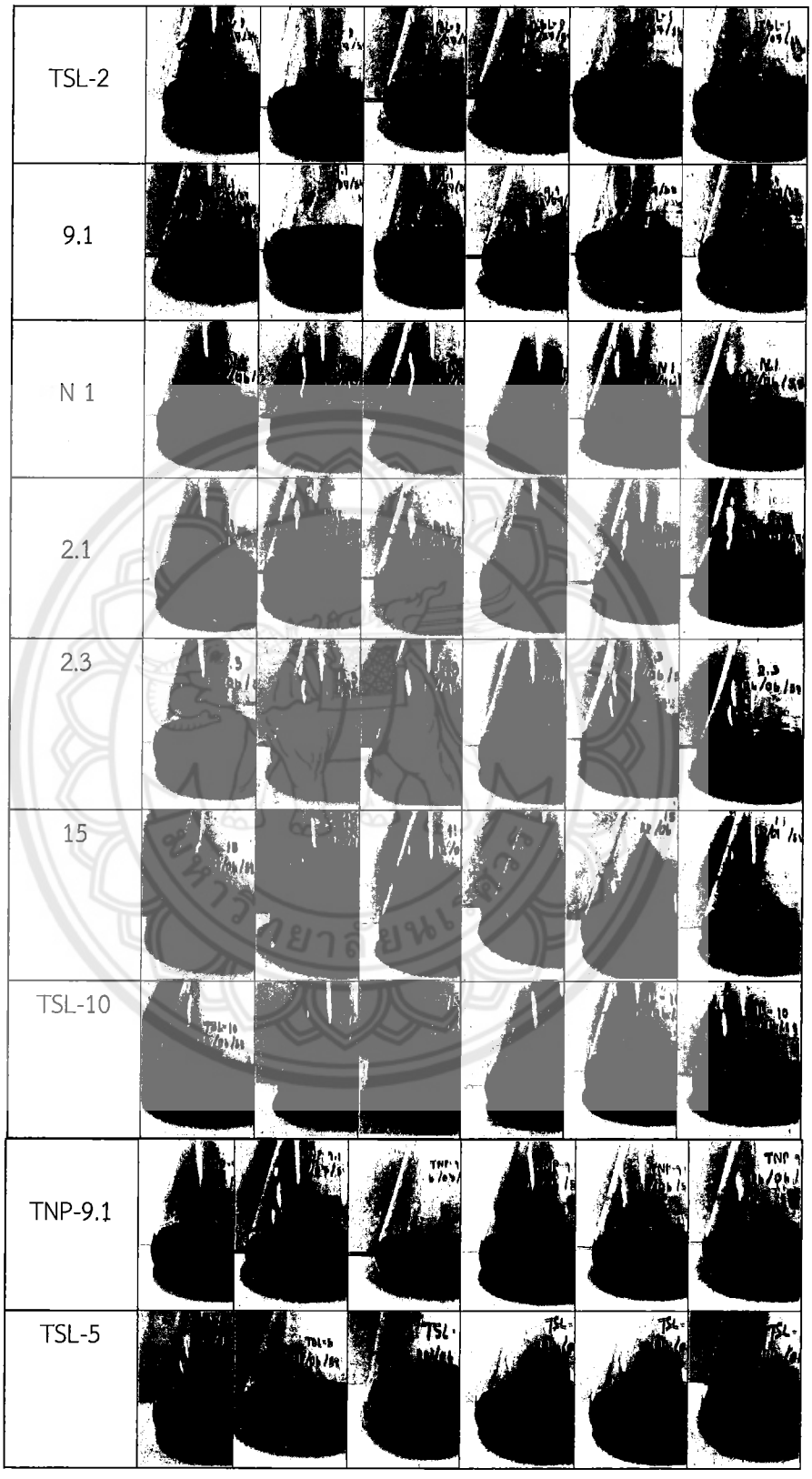
ภาพที่ 7 การกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ และคริสตัลไวโอเลตของเส้นใยเห็ดไอโซเลตต่างๆ

จากผลความสามารถในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดทั้ง 16 ไอโซเลต พบว่าเส้นใยเห็ด 2 ไอโซเลตที่สามารถกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ และสีย้อมคริสตัลไวโอเลตได้ดีกว่าเห็ดไอโซเลตอื่นๆที่นำมาทดสอบ ได้แก่เส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 และไอโซเลต 15 ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีการลดลงของสีย้อมซา

ฟรานิน โอ จากสีแดงเป็นสีชมพูอ่อน และมีการลดลงของสีย้อมคริสตัลไวโอเลตจากสีม่วงเป็นสีม่วงอ่อนในวันที่ 3 จนกระทั่งในวันที่ 5 สีย้อมทั้ง 2 ชนิดลดลงจนหมดเหลือเพียงสีของอาหาร SPB เท่านั้น ดังตารางภาพที่ 2

ตารางภาพที่ 2 การลดลงของสีย้อมซาฟรานิน โอ และคริสตัลไวโอเลตของเส้นใยเห็ดไอโซเลตต่างๆ

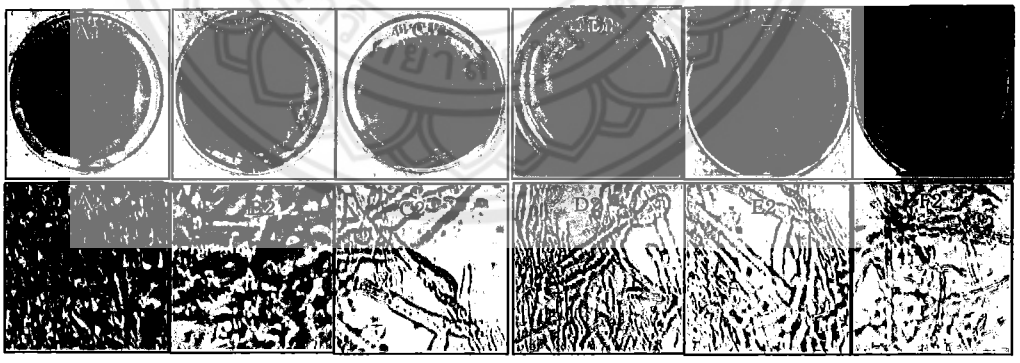
เห็ดไอโซเลต	อาหาร SPB + safranin o			อาหาร SPB + crystal violet		
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 5
ม 1						
ม 2						
ม 3						
16						
16.1						
16.2						
16.3						


TSL-2
9.1
N 1
2.1
2.3
15
TSL-10
TNP-9.1
TSL-5

ตารางที่ 5 ผลการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 และ 15

วันที่	การกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ (%)		การกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลต (%)	
	ไอโซเลต TSL-10	ไอโซเลต 15	ไอโซเลต TSL-10	ไอโซเลต 15
3	51.138 ±5.842	121.985 ±5.919	45.774 ±11.597	76.666 ±8.270
5	69.159 ±13.115	128.018 ±6.278	93.916 ±2.119	106.941 ±4.356
wet weight (g/L)	32.57	35.9	17.47	10.33

เมื่อเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหาร SPB ที่ผสมสีย้อมซาฟรานิน โอ และสีย้อมคริสตัลไวโอเลต เป็นเวลา 5 วัน เห็ดไอโซเลต TSL-10 เจริญและให้ปริมาณเส้นใย 32.57 และ 17.47 g/L ส่วนเห็ดไอโซเลต 15 เจริญและให้ปริมาณเส้นใยเท่ากับ 35.9 และ 10.33 g/L ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดทั้ง 2 ไอโซเลตพบว่าเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 มีลักษณะการกำจัดสีย้อมทั้ง 2 ชนิดเป็นแบบดูดซับ (absorption) โดยพบว่าเส้นใยเห็ดมีสีเปลี่ยนไปตามชนิดของสีย้อมที่ทดสอบ ส่วนเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 มีลักษณะการกำจัดสีย้อมแบบปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสลายสีย้อม ซึ่งจะเห็นว่าลักษณะของเส้นใยจะไม่มีสีของสีย้อมที่นำมาทดสอบ แต่มีสีขาวเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม และเมื่อนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะแสดงดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ลักษณะการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL10 และ ไอโซเลต 15

เส้นใยไอโซเลต TSL10 ในอาหารมีสีย้อมซาฟรานิน โอ (A1, A2), ในอาหารมีสีย้อมคริสตัลไวโอเลต (B1, B2) และในอาหาร SPB ไม่มีสีย้อม (C1, C2)

เส้นใยไอโซเลต 15 ในอาหารมีสีย้อมซาฟรานิน โอ (D1, D2), ในอาหารมีสีย้อมคริสตัลไวโอเลต (E1, E2) และในอาหาร SPB ไม่มีสีย้อม (F1, F2)

เห็ดไอโซเลต TSL-10 และ 15 จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อราไวท์ร็อทซึ่งมีคุณสมบัติในการทำให้สีจางลง และสามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติกออกมากำจัดสีย้อมได้ (Wensenberg *et al*.,2003) เช่นเดียวกับการรายงานของสุกฤตา และคณะ (2555) ที่ศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการดูดซับสีย้อม Acid blue 83 (สีน้ำเงิน) และ 6,6'-Urcylenebis-1-naphthol-3-sulfonic acid (สีเหลือง) โดยเส้นใยเห็ดในกลุ่มไวท์ร็อท ได้แก่เส้นใยเห็ดขอนขาว *Lentinus squarrosulus* Mont.LS-YA และ *Lentinus polychrous* Lev. LP-PT-1 พบว่าเส้นใยเห็ดขอนขาว LS-YA ที่มีชีวิตสามารถดูดซับสีน้ำเงินได้สูงสุดถึง 75.53% และ 100% ในขณะที่สามารถดูดซับสีเหลืองได้ 53.64% และ 60.11% ในช่วง 2 ชั่วโมงแรกและ 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าเส้นใยเห็ดขอนขาว LS-YA สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.5 U/ml ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของสีที่ลดลงอาจเกิดจากการดูดซับของเส้นใยร่วมกับกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส

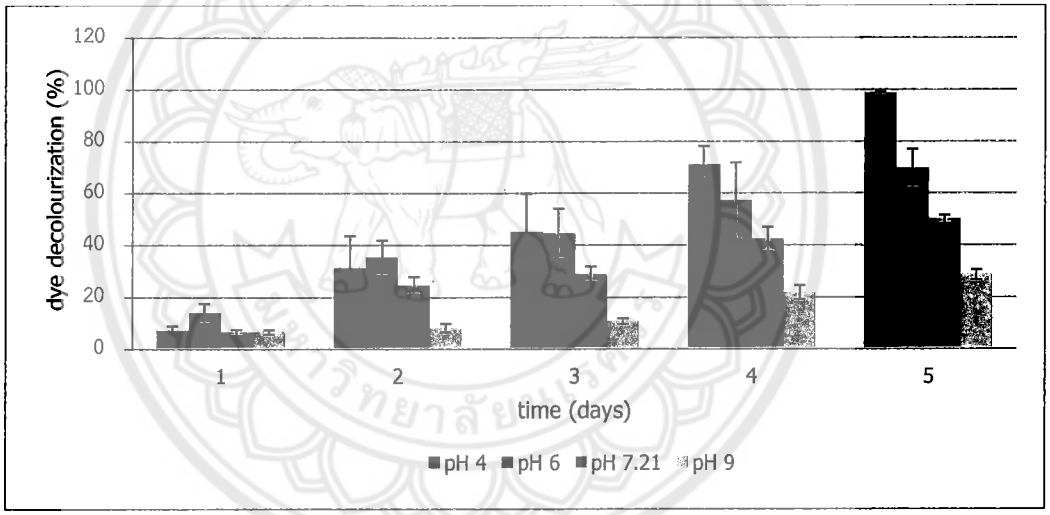
3. ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ด

3.1 ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10

จากผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ และสีย้อมคริสตัลไวโอเลตของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 ที่ pH4, pH6, pH7.21 และ pH9 โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 5 และนำมาคิดเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยในการกำจัดสีย้อม ผลการศึกษาการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ แสดงดังตารางที่ 6 ภาพที่ 9 และ ตารางภาพที่ 3 พบว่าเส้นใยเห็ดไฮโซเลต TSL-10 สามารถกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ ได้ดีที่สุดที่ pH 4 รองลงมาคือ pH 6, 7.21 และ 9 โดยมีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมเท่ากับ 98.436±0.727, 69.547±7.498, 49.997±1.574 และ 28.601±1.897 ตามลำดับ และเมื่อศึกษาการเจริญของเส้นใยเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าที่ pH4, pH6, pH7.21 และ pH9 เชื้อเจริญให้ปริมาณเส้นใยเท่ากับ 88.47, 81.43, 75.7และ 55.97 g/L ตามลำดับ

ตารางที่ 6 ผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ ของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10

วันที่	การกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ (%)			
	pH4	pH6	pH7.21	pH9
1	7.084 ± 1.88	13.789 ±3.738	6.436 ±1.12	6.649 ±0.757
2	31.072 ±12.6	35.227 ±6.742	24.553 ±3.42	8.201 ±1.592
3	45.2 ±14.83	44.403 ±9.803	28.892 ±2.92	10.765 ±1.07
4	70.803 ±7.51	57.080±14.742	42.359 ±4.63	21.819 ±2.67
5	98.436 ±0.73	69.547 ±7.498	49.997 ±1.57	28.601 ±1.89
wet weight (g/l)	88.47	81.43	75.7	55.97

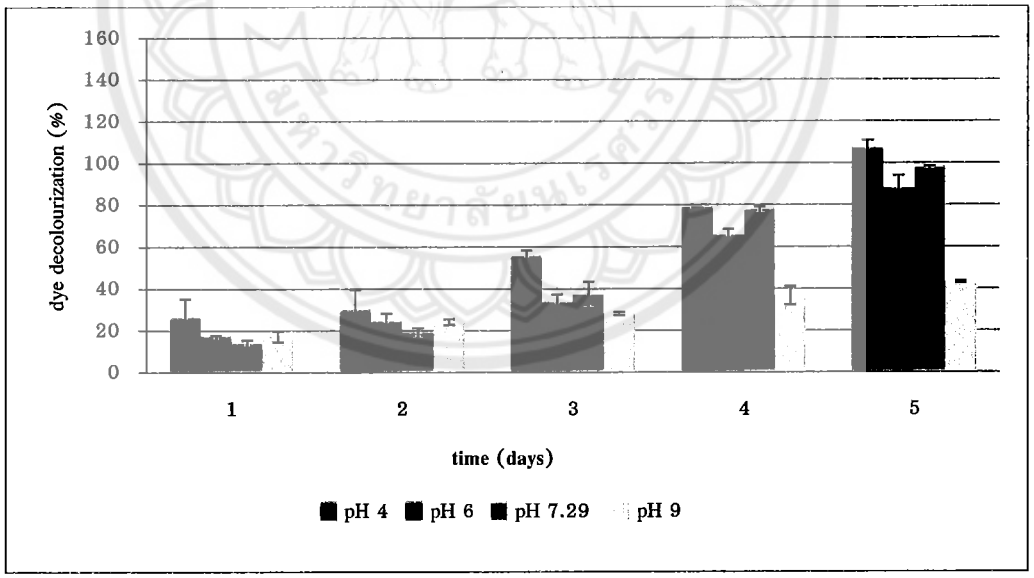


ภาพที่ 9 ผลการลดลงของสีย้อมซาฟรานิน โอ ด้วยเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 ที่ pH4, pH6, pH7.21 และ pH9

sterile production broth (SPB) พบว่าผลการศึกษาเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลตคือ สามารถกำจัดได้ที่สุดที่ pH4 แต่ในส่วนของการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ นั้นพบว่าแตกต่างกัน คือเส้นใยเห็ดไอโซเลต ม.3 สามารถกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ ได้ดีที่สุดที่ pH8 แต่เส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 สามารถกำจัดได้ดีที่สุดที่ pH4

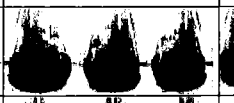
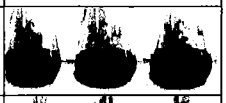
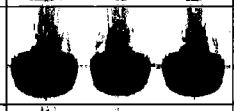
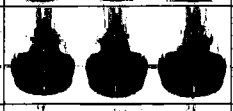
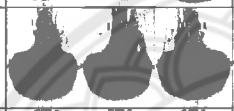
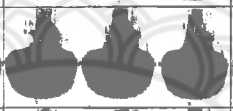
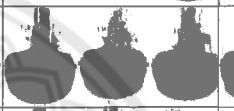
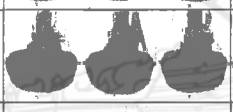
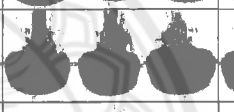
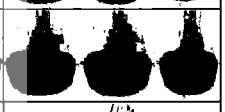
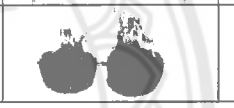
ตารางที่ 7 ผลการกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลต ด้วยเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 ที่ pH ต่างๆ

วันที่	การกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลต (%)			
	pH4	pH6	pH7.29	pH9
1	25.32±9.795	16.28±1.588	13.62±1.768	17.188 ±2.518
2	29.06±10.55	23.516±4.68	18.668±2.57	24.121 ±1.320
3	54.747±3.62	32.54±4.799	37.023±6.28	28.049 ±0.785
4	77.93±0.58	64.56±3.836	93.48±1.31	36.654 ±4.386
5	106.24±4.68	87.159±6.92	97.524±0.96	43.142 ±0.528
wet weight (g/L)	82.53	56.73	54.17	58.07



ภาพที่ 10 ผลการลดลงของสีย้อมคริสตัลไวโอเลตด้วยเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 ที่ pH4, pH6, pH7.29 และ pH9

ตารางภาพที่ 4 ผลการลดลงของสีย้อมคริสตัลไวโอเลตด้วยเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 ที่ pH ต่างๆ

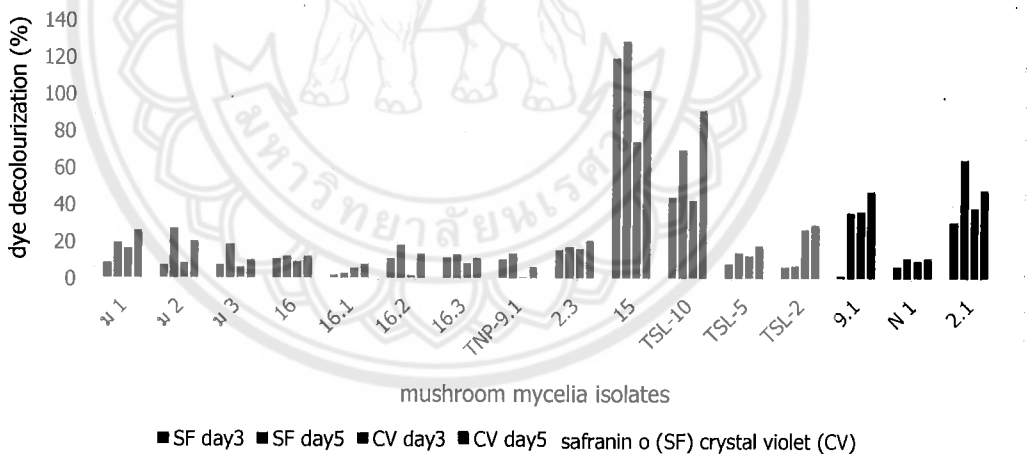
วันที่	pH4	pH6	pH7.29	pH9
0				
1				
2				
3				
4				
5				
Control				

3.2 ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15

เมื่อศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ และสีย้อมคริสตัลไวโอเลตของเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 ที่ pH4, pH6, pH7.28 และ pH9 แสดงดังตารางที่ 8 ภาพที่ 11 และตารางภาพที่ 5 พบว่าเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 สามารถกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ ได้ดีที่สุดที่ pH6 รองลงมาคือที่ pH 7.28, pH9 และ pH4 โดยมีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมเท่ากับ 142.679± 1.685, 125.274 ± 5.614, 77.529 ±3.509 และ 56.659 ± 5.729 ตามลำดับ และเมื่อศึกษาการเจริญของเส้นใยเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าที่ pH 4, 6, 7.28 และ 9 ได้ปริมาณเส้นใยเท่ากับ 40.27, 127.9, 22.4 และ 202.37 g/L ตามลำดับ

ตารางที่ 4 การกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ และคริสตัลไวโอเลตของเส้นใยเห็ดไอโซเลตต่างๆ

เห็ดไอโลเต	ความสามารถในการกำจัดสีย้อม (%)				เห็ดไอโซเลต	ความสามารถในการกำจัดสีย้อม (%)			
	ซาฟรานิน โอ		คริสตัลไวโอเลต			ซาฟรานิน โอ		คริสตัลไวโอเลต	
	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 3	วันที่ 5		วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 3	วันที่ 5
ม 1	8.434	19.277	16.357	25.279	2.3	15.693	17.153	16.142	19.685
ม 2	7.287	27.126	8.434	19.277	15	119.433	128.745	74.104	101.195
ม 3	7.393	18.667	6.14	9.211	TSL-10	44.141	69.922	42.629	90.438
16	10.83	11.913	9.195	11.111	TSL-5	8.163	14.286	12.59	16.906
16.1	1.88	2.655	5.645	6.855	TSL-2	6.383	7.234	26.786	28.571
16.2	10.976	18.293	1.805	12.635	9.1	1.695	36.017	36.62	46.479
16.3	11.439	12.915	8.367	10.359	N 1	6.767	11.278	9.756	10.569
TNP-9.1	10.37	13.704	0.909	5.455	2.1	31.076	64.542	38.577	47.191

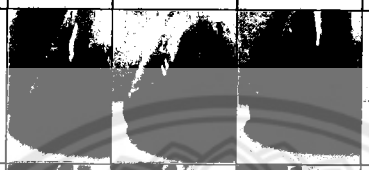
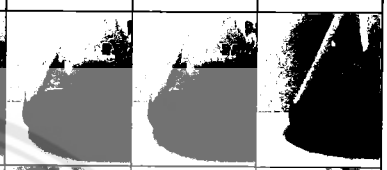
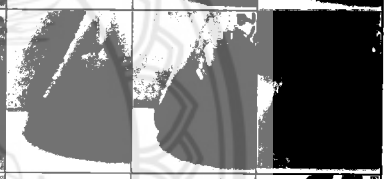
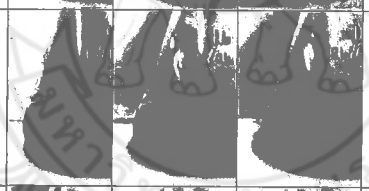
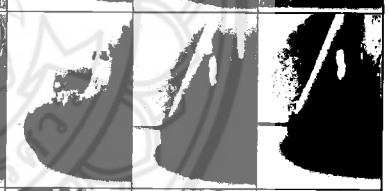
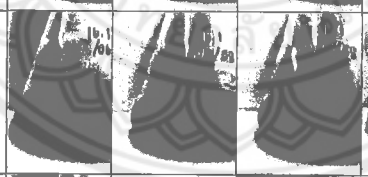
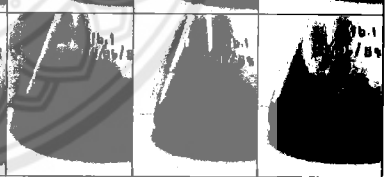
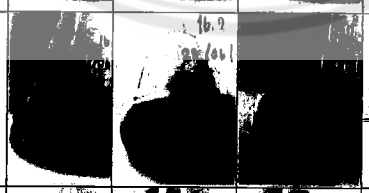
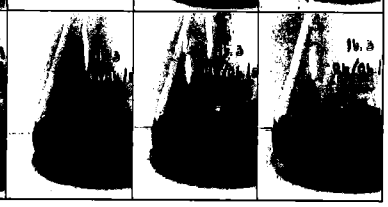


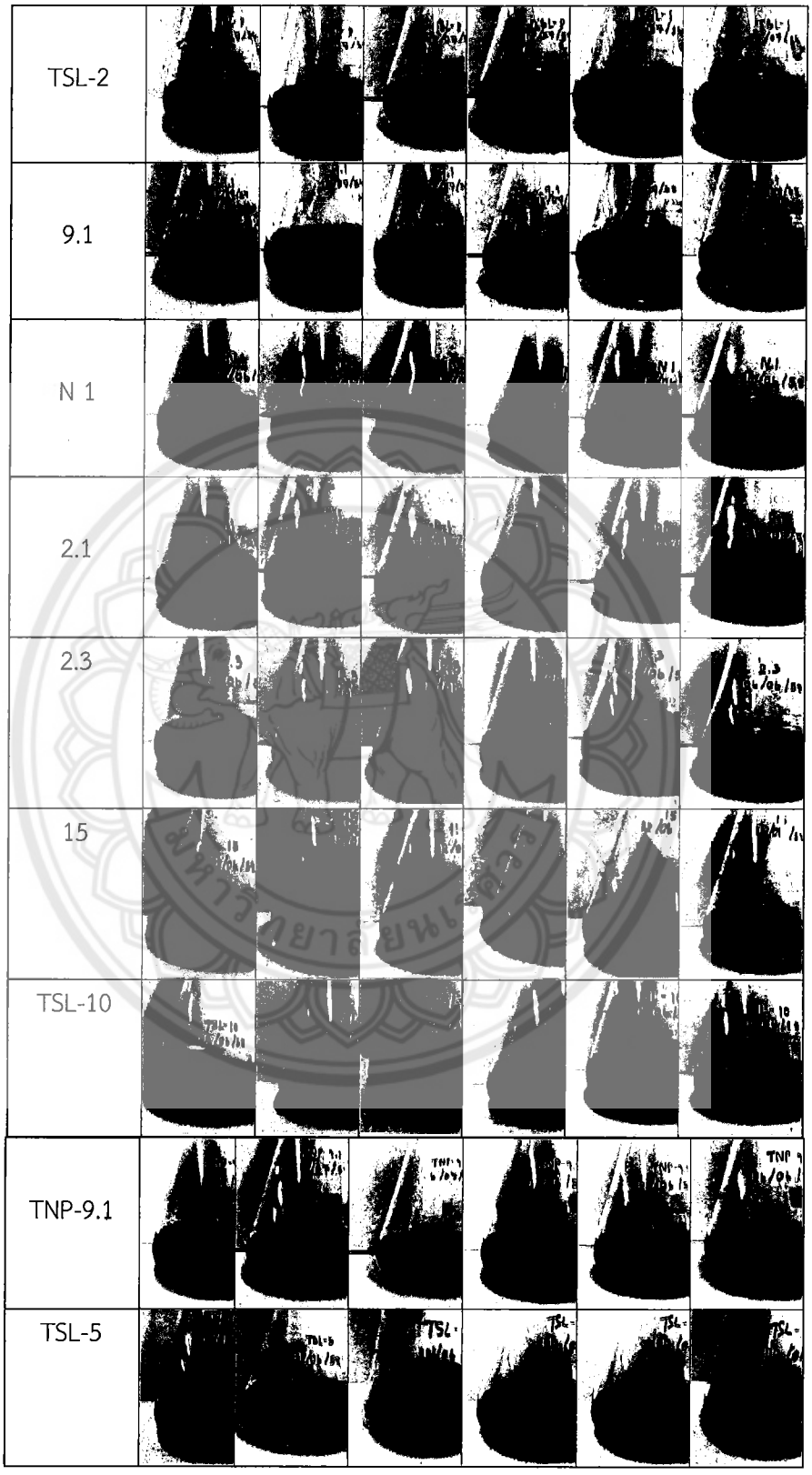
ภาพที่ 7 การกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ และคริสตัลไวโอเลตของเส้นใยเห็ดไอโซเลตต่างๆ

จากผลความสามารถในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดทั้ง 16 ไอโซเลต พบว่าเส้นใยเห็ด 2 ไอโซเลตที่สามารถกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ และสีย้อมคริสตัลไวโอเลตได้ดีกว่าเห็ดไอโซเลตอื่นๆที่นำมาทดสอบ ได้แก่เส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 และไอโซเลต 15 ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีการลดลงของสีย้อมซา

ฟรานิน โอ จากสีแดงเป็นสีชมพูอ่อน และมีการลดลงของสีย้อมคริสตัลไวโอเลตจากสีม่วงเป็นสีม่วงอ่อนในวันที่ 3 จนกระทั่งในวันที่ 5 สีย้อมทั้ง 2 ชนิดลดลงจนหมดเหลือเพียงสีของอาหาร SPB เท่านั้น ดังตารางภาพที่ 2

ตารางภาพที่ 2 การลดลงของสีย้อมซาฟรานิน โอ และคริสตัลไวโอเลตของเส้นใยเห็ดไอโซเลตต่างๆ

เห็ดไอโซเลต	อาหาร SPB + safranin o			อาหาร SPB + crystal violet		
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 5
ม 1						
ม 2						
ม 3						
16						
16.1						
16.2						
16.3						


TSL-2
9.1
N 1
2.1
2.3
15
TSL-10
TNP-9.1
TSL-5

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 และไอโซเลต 15 จากเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมในวันที่ 5 พบว่าเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 สามารถกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ และสีย้อมคริสตัลไวโอเลตได้สูงถึง 128.745% และ 101.195% ตามลำดับ ในขณะที่เส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 สามารถกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ และสีย้อมคริสตัลไวโอเลตได้ 69.922% และ 90.43% ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 สามารถกำจัดสีย้อมทั้ง 2 ชนิดได้ดีที่สุด โดยเมื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อมพบว่าสูงมากกว่า 100% ในขณะที่เส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 ก็สามารถกำจัดสีย้อมทั้ง 2 ชนิดได้ดีเช่นกัน แต่น้อยกว่าเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15

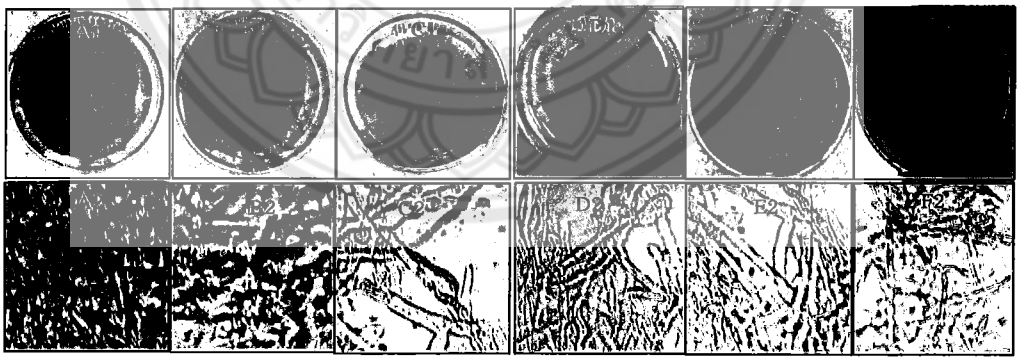
ทั้งนี้อาจเป็นเพราะคุณสมบัติในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดแตกต่างกัน เนื่องจาก เมื่อนำเส้นใยเห็ดทั้งสองไอโซเลตที่เจริญในอาหารที่มีสีย้อมมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 มีลักษณะเป็นสีชมพูของซาฟรานิน โอ และมีสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต ซึ่งต่างจากเส้นใยที่เจริญอยู่ในอาหาร SPB ซึ่งเป็นชุดควบคุมที่เส้นใยไม่มีสี จึงคาดว่าเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 ใช้คุณสมบัติในการกำจัดสีย้อมแบบดูดซับสีเข้าเส้นใย ดังนั้นเมื่อเส้นใยมีการเจริญและดูดซับสีย้อมได้ถึงระดับหนึ่งแล้ว อาจทำให้ไม่สามารถดูดซับสีย้อมอีกได้ ซึ่งต่างจากเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 ที่เส้นใยมีสีขาว ซึ่งน่าจะมีการผลิตเอนไซม์ออกมาใช้ในการกำจัดสีย้อม ทำให้สามารถกำจัดสีย้อมได้ดีและกำจัดไจนหมด เพราะคุณสมบัติในการกำจัดสีย้อมของเห็ดนั้น นอกจากใช้วิธีดูดซับสีย้อมแล้ว เห็ดยังสามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติกออกมาย่อยสลายสีย้อมได้ (Wensenberg *et al.*, 2003)

เนื่องจากเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 และ ไอโซเลต 15 มีความสามารถในการกำจัดสีย้อมทั้ง 2 ชนิดได้ดีที่สุด จึงนำเส้นใยเห็ดทั้ง 2 ไอโซเลตมาทำการทดสอบเพื่อยืนยันความสามารถในการกำจัดสีย้อมอีกครั้งที่ โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 3 และ 5 ดังตารางที่ 5 ซึ่งจากผลการทดสอบพบว่า เส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 และ ไอโซเลต 15 มีความ สามารถในการกำจัดสีย้อมได้สูงใกล้เคียงกับที่ได้ทำการศึกษาไว้ โดยเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 มีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ เท่ากับ 51.138 ±5.842 และ 69.159 ±13.115 ในวันที่ 3 และ 5 ตามลำดับ และมีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลตเท่ากับ 45.774 ±11.597 และ 93.916 ±2.119 ในวันที่ 3 และ 5 ตามลำดับ เช่นเดียวกับเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 มีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอเท่ากับ 121.985 ±5.919, 128.018 ±6.278 ในวันที่ 3, 5 และมีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลตเท่ากับ 76.666 ±8.27 และ 106.941 ±4.356% ในวันที่ 3 และ 5 ตามลำดับ พร้อมนำเส้นใยเห็ดมาชั่งน้ำหนักเพื่อดูการเจริญของเส้นใย พบว่า

ตารางที่ 5 ผลการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 และ 15

วันที่	การกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ (%)		การกำจัดสีย้อมคริสตัลไวโอเลต (%)	
	ไอโซเลต TSL-10	ไอโซเลต 15	ไอโซเลต TSL-10	ไอโซเลต 15
3	51.138 ±5.842	121.985 ±5.919	45.774 ±11.597	76.666 ±8.270
5	69.159 ±13.115	128.018 ±6.278	93.916 ±2.119	106.941 ±4.356
wet weight (g/L)	32.57	35.9	17.47	10.33

เมื่อเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหาร SPB ที่ผสมสีย้อมซาฟรานิน โอ และสีย้อมคริสตัลไวโอเลต เป็นเวลา 5 วัน เห็ดไอโซเลต TSL-10 เจริญและให้ปริมาณเส้นใย 32.57 และ 17.47 g/L ส่วนเห็ดไอโซเลต 15 เจริญและให้ปริมาณเส้นใยเท่ากับ 35.9 และ 10.33 g/L ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดทั้ง 2 ไอโซเลตพบว่าเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 มีลักษณะการกำจัดสีย้อมทั้ง 2 ชนิดเป็นแบบดูดซับ (absorption) โดยพบว่าเส้นใยเห็ดมีสีเปลี่ยนไปตามชนิดของสีย้อมที่ทดสอบ ส่วนเส้นใยเห็ดไอโซเลต 15 มีลักษณะการกำจัดสีย้อมแบบปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสลายสีย้อม ซึ่งจะเห็นว่าลักษณะของเส้นใยจะไม่มีสีของสีย้อมที่นำมาทดสอบ แต่มีสีขาวเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม และเมื่อนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะแสดงดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ลักษณะการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL10 และ ไอโซเลต 15

เส้นใยไอโซเลต TSL10 ในอาหารมีสีย้อมซาฟรานิน โอ (A1, A2), ในอาหารมีสีย้อมคริสตัลไวโอเลต (B1, B2) และในอาหาร SPB ไม่มีสีย้อม (C1, C2)

เส้นใยไอโซเลต 15 ในอาหารมีสีย้อมซาฟรานิน โอ (D1, D2), ในอาหารมีสีย้อมคริสตัลไวโอเลต (E1, E2) และในอาหาร SPB ไม่มีสีย้อม (F1, F2)

เห็ดไอโซเลต TSL-10 และ 15 จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อราไวท์ร็อทซึ่งมีคุณสมบัติในการทำให้สีจางลง และสามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติกออกมากำจัดสีย้อมได้ (Wensenberg *et al*.,2003) เช่นเดียวกับการรายงานของสุกฤตา และคณะ (2555) ที่ศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการดูดซับสีย้อม Acid blue 83 (สีน้ำเงิน) และ 6,6'-Urcylenebis-1-naphthol-3-sulfonic acid (สีเหลือง) โดยเส้นใยเห็ดในกลุ่มไวท์ร็อท ได้แก่เส้นใยเห็ดขอนขาว *Lentinus squarrosulus* Mont.LS-YA และ *Lentinus polychrous* Lev. LP-PT-1 พบว่าเส้นใยเห็ดขอนขาว LS-YA ที่มีชีวิตสามารถดูดซับสีน้ำเงินได้สูงสุดถึง 75.53% และ 100% ในขณะที่สามารถดูดซับสีเหลืองได้ 53.64% และ 60.11% ในช่วง 2 ชั่วโมงแรกและ 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าเส้นใยเห็ดขอนขาว LS-YA สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.5 U/ml ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของสีที่ลดลงอาจเกิดจากการดูดซับของเส้นใยร่วมกับกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส

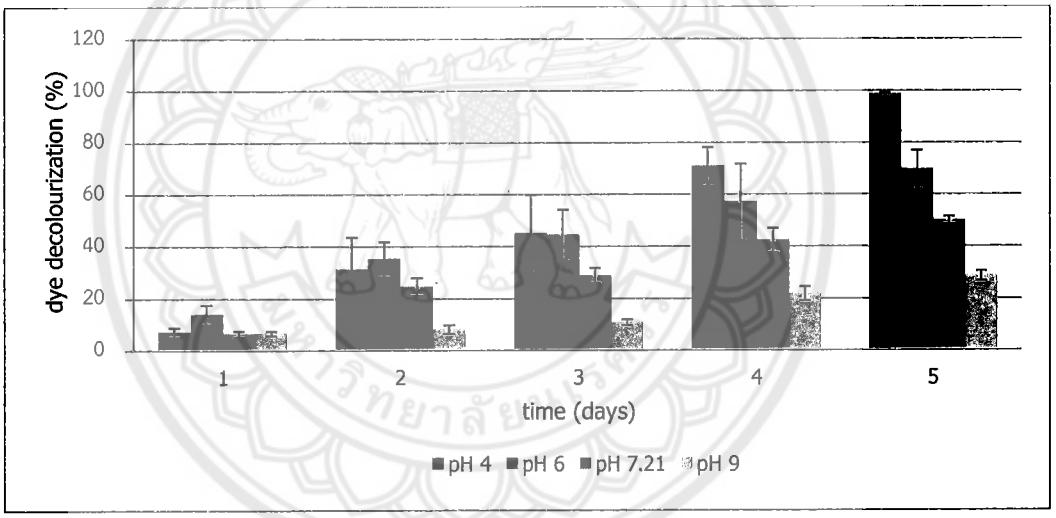
3. ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ด

3.1 ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการกำจัดสีย้อมของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10

จากผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ และสีย้อมคริสตัลไวโอเลตของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 ที่ pH4, pH6, pH7.21 และ pH9 โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 5 และนำมาคิดเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยในการกำจัดสีย้อม ผลการศึกษาการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ แสดงดังตารางที่ 6 ภาพที่ 9 และ ตารางภาพที่ 3 พบว่าเส้นใยเห็ดไฮโซเลต TSL-10 สามารถกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ ได้ดีที่สุดที่ pH 4 รองลงมาคือ pH 6, 7.21 และ 9 โดยมีเปอร์เซนต์การกำจัดสีย้อมเท่ากับ 98.436±0.727, 69.547±7.498, 49.997±1.574 และ 28.601±1.897 ตามลำดับ และเมื่อศึกษาการเจริญของเส้นใยเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าที่ pH4, pH6, pH7.21 และ pH9 เชื้อเจริญให้ปริมาณเส้นใยเท่ากับ 88.47, 81.43, 75.7และ 55.97 g/L ตามลำดับ

ตารางที่ 6 ผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ ของเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10

วันที่	การกำจัดสีย้อมซาฟรานิน โอ (%)			
	pH4	pH6	pH7.21	pH9
1	7.084 ± 1.88	13.789 ±3.738	6.436 ±1.12	6.649 ±0.757
2	31.072 ±12.6	35.227 ±6.742	24.553 ±3.42	8.201 ±1.592
3	45.2 ±14.83	44.403 ±9.803	28.892 ±2.92	10.765 ±1.07
4	70.803 ±7.51	57.080±14.742	42.359 ±4.63	21.819 ±2.67
5	98.436 ±0.73	69.547 ±7.498	49.997 ±1.57	28.601 ±1.89
wet weight (g/l)	88.47	81.43	75.7	55.97



ภาพที่ 9 ผลการลดลงของสีย้อมซาฟรานิน โอ ด้วยเส้นใยเห็ดไอโซเลต TSL-10 ที่ pH4, pH6, pH7.21 และ pH9