



ประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก **BACILLUS LICHENIFORMIS**  
ในการออกฤทธิ์ต้านการเจริญของ **PROTEUS MIRABILIS**

มะโน ชาญสมร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี  
พ.ศ. 2556  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี



**EFFICACY OF ANTIMICROBIAL SUBSTANCE PRODUCED FROM  
*BACILLUS LICHENIFORMIS* AGAINST *PROTEUS MIRABILIS***

**MANO CHANSAMON**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS  
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
MAJOR IN BIOTECHNOLOGY  
FACULTY OF SCIENCE  
UBON RATCHATHANI UNIVERSITY  
YEAR 2013  
COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY**



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

เรื่อง ประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* ในการออกฤทธิ์ต้านการเจริญของ *Proteus mirabilis*

ผู้วิจัย นางสาวนงนิชา ษณุสມร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นารีรัตน์ ไชยคง)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชริดา ปุกหุต)

กรรมการ

(ดร.สมม. โนนกลาง)

กรรมการ

(ดร.แก้วดา สูตรสุวรรณ)

คณะกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ อินทรประเสริฐ)

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.อุทิศ อินทร์ประเสริฐ)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ปฏิบัติราชการแทนอธิการบดี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปีการศึกษา 2556

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือและสนับสนุนจากผู้ที่เกี่ยวข้อง  
หลายฝ่าย ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นารีรัตน์ ไชยคง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ให้การช่วยเหลือและคำแนะนำ ข้อคิดในการศึกษาเป็นอย่างดี ตลอดจน  
แก่ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จึงสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณท่านคณะกรรมการผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธิค่า ปุกหุต ดร.สนน โนนกาง  
และ ดร.แก้วดา สุตรสุวรรณ ให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ และขอขอบพระคุณ  
อาจารย์ทุกท่านที่ให้การอบรมสั่งสอนและให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์และเข้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ  
คณะวิทยาศาสตร์ ที่กรุณาให้ความสะดวกเรื่องอุปกรณ์ สารเคมี และแนะนำการใช้เครื่องมือ

ขอขอบคุณ NST Biotechnology Co. Ltd ที่ให้การสนับสนุนเชื้อ *Bacillus licheniformis*  
สำหรับการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณนางสาวปันดดา เพชรสัวนักศึกษาปริญญาเอกสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่  
ให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือ ขอขอบคุณนายอนุพล ฤกษ์สว่างที่อยู่เป็นเพื่อนทำงานมาโดยตลอด  
และขอขอบคุณเพื่อนๆ นักศึกษาปริญญาโทสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกคนสุดท้ายนี้ขอรบ  
ขอขอบพระคุณ บิดามารดา และทุกคนในครอบครัว ที่เดี๋ยงดูให้เติบโต เป็นกำลังใจ ดูแลและให้การ  
สนับสนุนด้านทรัพย์ในการเรียนและการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ

ม.ร.ด. ชนก สุวณ  
(นางสาวมะโน ชาญสมร)

ผู้วิจัย

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่	ช
<b>1 บทนำ</b>	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	2
1.4 ขอบเขตการศึกษาค้นคว้า	2
1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ	3
<b>2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับกําชแอนโนมเนียและกําชไโซโตรเจนซัลไฟด์	4
2.2 การผลิตกําชแอนโนมเนียและกําชไโซโตรเจนซัลไฟด์จากชุลินทรี	11
2.3 การควบคุมกลิ่นกําชแอนโนมเนียและกําชไโซโตรเจนซัลไฟด์	17
2.4 ลักษณะของ <i>Bacillus licheniformis</i>	19
<b>3 วิธีดำเนินงานวิจัย</b>	
3.1 ศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i>	
และ <i>Proteus mirabilis</i>	27
3.2 ทราบมาตรฐานการเจริญของ <i>B. licheniformis</i> และ <i>P. mirabilis</i>	28
3.3 การเจริญและการผลิตสารต้านจุลชีพของเชื้อ <i>B. licheniformis</i>	
ที่อุณหภูมิ 37°C	29
3.4 อุณหภูมิที่ส่งผลต่อ กิจกรรมการต้านจุลชีพและการเจริญของ	
<i>B. licheniformis</i> และ <i>P. mirabilis</i>	29

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5 pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของ <i>B. licheniformis</i> และ <i>P. mirabilis</i>	30
3.6 แหล่งการบอนและแหล่งในโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญของ <i>B. licheniformis</i> และ <i>P. mirabilis</i>	31
3.7 ปัจจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญ <i>P. mirabilis</i>	31
3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล	33
<b>4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล</b>	
4.1 ศักยภาพสมบัติเบื้องต้นของเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> และ <i>Proteus mirabilis</i>	34
4.2 กราฟนำทางการเจริญของเชื้อ <i>B. licheniformis</i> และ <i>P. mirabilis</i>	36
4.3 การเจริญและการผลิตสารต้านจุลชีพของเชื้อ <i>B. licheniformis</i> ที่อุณหภูมิ 37°C	39
4.4 อุณหภูมิที่ส่งผลต่อกิจกรรมการต้านจุลชีพของสาร CFS และการเจริญของ <i>B. licheniformis</i> และ <i>P. mirabilis</i>	40
4.5 pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของ <i>B. licheniformis</i> และ <i>P. mirabilis</i>	43
4.6 แหล่งการบอนและแหล่งในโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญของ เชื้อ <i>B. licheniformis</i> และ <i>P. mirabilis</i>	46
4.7 ปัจจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญ <i>P. mirabilis</i>	51
<b>5 สรุปผล อภิปรายและข้อเสนอแนะ</b>	
<b>เอกสารอ้างอิง</b>	<b>65</b>
<b>ภาคผนวก</b>	
ก อาหารเลี้ยงเชื้อและอุปกรณ์	72
ข สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์	76
ค ข้อมูลการทดลองและข้อมูลการวิเคราะห์สถิติ	82
ง ผลงานทางวิชาการ	91
<b>ประวัติผู้วิจัย</b>	<b>99</b>

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สมบัติทางกายภาพเคมีของก๊าซแอมโมเนีย	4
2.2 ลักษณะความเป็นพิษของก๊าซแอมโมเนีย	5
2.3 สมบัติทางกายภาพเคมีของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	6
2.4 ลักษณะความเป็นพิษของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	7
2.5 Effect of glucose on $H_2S$ production of <i>Proteus vulgaris</i> in PIA and PIB	19
2.6 กิจกรรมการด้านจุลชีพของ cell-free broth culture ของ <i>B. licheniformis</i> ZJU12 ที่ pH 7.0	20
3.1 อัตราการเจือจาง cell culture ( <i>B. licheniformis</i> และ <i>P. mirabilis</i> )	28
3.2 แหล่งการรับอนและแหล่งในโตรเจนที่ศึกษา	31
3.3 อัตราการผสมสารละลายในการทดสอบปริมาณ CFS จาก <i>B. licheniformis</i> ที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ด้านการเจริญของ <i>P. mirabilis</i>	32
4.1 อุณหภูมิที่ส่งผลต่อกิจกรรมการด้านจุลชีพของสาร CFS และ FC จาก <i>B. licheniformis</i>	40
4.2 อุณหภูมิที่ส่งผลต่อการเจริญของ <i>B. licheniformis</i> และ <i>P. mirabilis</i>	41
4.3 pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของ <i>B. licheniformis</i> ที่อุณหภูมิ 35°C	43
4.4 pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของ <i>P. mirabilis</i> ที่อุณหภูมิ 35°C	44
4.5 pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของ <i>P. mirabilis</i> ที่อุณหภูมิ 45 °C	45
4.6 ปริมาณสาร CFS จาก <i>B. licheniformis</i> ที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ด้านการเจริญของ <i>P. mirabilis</i> ที่อุณหภูมิ 35 และ 45°C	55
4.7 ปัจจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญของ <i>P. mirabilis</i>	56
5.1 องค์ประกอบของปัจจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญของ <i>P. mirabilis</i>	63

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 กระบวนการผลิตที่ทำให้เกิดกลินในโรงบำบัดน้ำเสีย	8
2.2 กระบวนการผลิตที่ทำให้เกิดกลินจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์	9
2.3 กระบวนการผลิตที่ทำให้เกิดกลินในโรงงานปลาปั่นโรงงานกระดูกป่น	10
2.4 กระบวนการผลิตที่ทำให้เกิดกลินในโรงกลั่นน้ำมัน	11
2.5 เปอร์เซ็นต์การตรวจพบแบคทีเรียในน้ำสัตว์	12
2.6 วงจรของไข้โตรเจน	13
2.7 การเจริญและการผลิต bacteriocin-like peptides ของ <i>B. licheniformis</i> ZJU12 ในอาหาร LB medium ที่ 30°C : (♦) OD <sub>600</sub> และ (■) เส้นผ่าศูนย์กลาง Inhibition zone	21
2.8 การเจริญและการผลิต bacteriocin-like peptides ของ <i>B. licheniformis</i> B116 ในอาหาร Dextrose and Yeast extract broth ที่ 30°C: (▲) OD <sub>600</sub> และ (■) เส้นผ่าศูนย์กลาง Inhibition zone	22
2.9 Schematic diagram of biosynthesis of peptidoglycan in a bacterial cell with sites of action of various antibiotics.	23
2.10 Antibiotics which inhibit bacterial protein synthesis.	24
4.1 ลักษณะโภค营养ของแบคทีเรีย <i>B. licheniformis</i> ที่เจริญบนอาหาร NA	34
4.2 ลักษณะรูปร่างเซลล์ <i>B. licheniformis</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า	35
4.3 ลักษณะรูปร่างเซลล์ <i>P. mirabilis</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า	35
4.4 ทดสอบการสร้างกีซ่าไฮโดรเจ็ลไฟฟ์ (A) และทดสอบการสร้างกีซ่าแอมโมเนียม (B)	36
4.5 ความสัมพันธ์การเจริญของ <i>B. licheniformis</i> ระหว่างค่าความชื้น (OD <sub>600nm</sub> ) กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml)	37
4.6 ความสัมพันธ์การเจริญของ <i>B. licheniformis</i> ระหว่างค่าความชื้น (OD <sub>600nm</sub> ) กับน้ำหนักแห้ง (mgCDW/L)	37
4.7 ความสัมพันธ์การเจริญของ <i>P. mirabilis</i> ระหว่างค่าความชื้น (OD <sub>600nm</sub> ) กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml)	38

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.8 ความสัมพันธ์การเจริญของ <i>P. mirabilis</i> ระหว่างค่าความชุ่น ( $OD_{600nm}$ ) กับน้ำหนักแห้ง (mgCDW/L)	38
4.9 การเจริญของ <i>B. licheniformis</i> ในอาหาร NB ที่อุณหภูมิ $37^{\circ}\text{C}$	39
4.10 การเปลี่ยนแปลง pH ในระหว่างการเจริญของ <i>B. licheniformis</i>	39
4.11 อุณหภูมิที่ส่งผลต่อกรรมการต้านจุลชีพของสาร CFS และ FC จาก <i>B. licheniformis</i>	40
4.12 อุณหภูมิที่ส่งผลต่อการเจริญของ <i>B. licheniformis</i> และ <i>P. mirabilis</i>	41
4.13 กิจกรรมของสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก <i>B. licheniformis</i> ในการขับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>P. mirabilis</i> ในอาหาร NA อุณหภูมิ $45^{\circ}\text{C}$	42
4.14 กิจกรรมของสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก <i>B. licheniformis</i> ในการขับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>P. mirabilis</i> ในอาหาร NA ที่อุณหภูมิ $45^{\circ}\text{C}$	42
4.15 pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของ <i>B. licheniformis</i> ในอาหาร NB ที่อุณหภูมิ $35^{\circ}\text{C}$	43
4.16 pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของ <i>P. mirabilis</i> ในอาหาร NB ที่อุณหภูมิ $35^{\circ}\text{C}$	44
4.17 pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของ <i>P. mirabilis</i> ในอาหาร NB ที่อุณหภูมิ $45^{\circ}\text{C}$	45
4.18 แหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญของ <i>P. mirabilis</i> ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ $35^{\circ}\text{C}$	46
4.19 แหล่งในโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญของ <i>P. mirabilis</i> ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ $35^{\circ}\text{C}$	47
4.20 การเปลี่ยนแปลง pH ของอาหาร NB ที่เติมแหล่งการบ่อนและแหล่งในโตรเจน แยกต่างกันในระหว่างการเจริญของ <i>P. mirabilis</i> ที่อุณหภูมิ $35^{\circ}\text{C}$	48
4.21 แหล่งการบ่อนที่ส่งผลต่อการเจริญของ <i>B. licheniformis</i> ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ $35^{\circ}\text{C}$	49
4.22 แหล่งในโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญของ <i>B. licheniformis</i> ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ $35^{\circ}\text{C}$	50
4.23 การเปลี่ยนแปลง pH ของอาหาร NB ที่เติมแหล่งการบ่อน และ แหล่งในโตรเจน แยกต่างกันในระหว่างการเจริญของ <i>B. licheniformis</i> ที่อุณหภูมิ $35^{\circ}\text{C}$	51
4.24 การสร้างสปอร์ของเซลล์ <i>B. licheniformis</i> ในอาหารเหลวที่เวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล่องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า	52

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.25 ปริมาณสาร CFS จาก <i>B. licheniformis</i> ที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ด้านการเจริญของ <i>P. mirabilis</i> ที่อุณหภูมิ 35°C	53
4.26 ประสิทธิภาพของสาร CFS จาก <i>B. licheniformis</i> ขับยั้งการเจริญของ <i>P. mirabilis</i> ที่อุณหภูมิ 35°C	53
4.27 ปริมาณสาร CFS จาก <i>B. licheniformis</i> ที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ด้านการเจริญของ <i>P. mirabilis</i> ที่อุณหภูมิ 45°C	54
4.28 ประสิทธิภาพของสาร CFS จาก <i>B. licheniformis</i> ขับยั้งการเจริญของ <i>P. mirabilis</i> ที่อุณหภูมิ 45°C	54
4.29 ผลของอุณหภูมิและสารต้านจุลชีพที่ส่งผลต่อการเจริญของ <i>P. mirabilis</i>	56
4.30 การเปลี่ยนแปลง pH ในระหว่างการควบคุมการเจริญของ <i>P. mirabilis</i>	57
4.31 การเจริญของ <i>P. mirabilis</i> ที่ผ่านการเพาะเดี่ยงโดยเติมสารต้านจุลชีพแล้วนำมาเพาะเดี่ยงต่อในอาหาร NA	58

## บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง : ประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis*  
ในการออกฤทธ์ต้านการเจริญของ *Proteus mirabilis*

โดย : นายนาย ชาญสมร

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ

ประธานกรรมการที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นารีรัตน์ ไชยคง

คำศัพท์สำคัญ : Antimicrobial substance *Bacillus licheniformis* *Proteus mirabilis* Ammonia producing bacteria Hydrogen sulfide producing bacteria

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการออกฤทธ์ของสารต้านจุลชีพที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 บ่น เขย่าตัวขวดความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นแยกเอาส่วนใส่ที่ไม่มี เชคล์ไปทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Proteus mirabilis* ซึ่งเป็นแบคทีเรีย ที่สามารถสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ ตรวจวัดปริมาณสารหรือกิจกรรมต้าน จุลชีพโดยวิธี Disc diffusion จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *B. licheniformis* เริ่มสร้างสารต้านจุลชีพ ในช่วงการเจริญระยะ Exponential growth phase (ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง) และ ตรวจพบปริมาณสารต้านจุลชีพมากที่สุดในช่วงการเจริญระยะ Early stationary growth phase (ช่วงเวลา 24 - 36 ชั่วโมง) จากการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* พบร่วมที่ pH 7.0 เชื้อ *P. mirabilis* สามารถเจริญได้ในอาหาร NB ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 25 องศาเซลเซียส ถึง 40 องศาเซลเซียส และการเจริญของเชื้อจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่ออุณหภูมิของการ เพาะเลี้ยงเพิ่มเป็น 45 องศาเซลเซียส จากนั้นได้ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่ส่งผลต่อการออกฤทธ์ ของสารต้านจุลชีพในการยับยั้งการเจริญของ *P. mirabilis* ทดสอบโดยวิธี Disc diffusion พบร่วม กิจกรรมของสารต้านจุลชีพเกิดได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส การเติมสารต้านจุลชีพที่อยู่ใน รูปของส่วนใส่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ในสัดส่วนร้อยละ 5 และร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ส่งผลให้เชื้อ *P. mirabilis* เจริญ ลดลงร้อยละ 59.3 และร้อยละ 90.9 ตามลำดับ ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 45 องศาเซลเซียส จะช่วยเสริมการออกฤทธ์ของสารต้านจุลชีพในการยับยั้งการเจริญของ *P. mirabilis*

## ABSTRACT

TITLE : EFFICACY OF ANTIMICROBIAL SUBSTANCE PRODUCED FROM  
*BACILLUS LICHENIFORMIS* AGAINST *PROTEUS MIRABILIS*  
BY : MANO CHANSAMON  
DEGREE : MASTER OF SCIENCE  
MAJOR : BIOTECHNOLOGY  
CHAIR : ASST. PROF. NAREERAT CHAIKONG, PH D.

KEYWORDS : ANTIMICROBIAL SUBSTANCE / *BACILLUS LICHENIFORMIS* /  
*PROTEUS MIRABILIS* / AMMONIA PRODUCING BACTERIA /  
HYDROGEN SULFIDE PRODUCING BACTERIA

In this study, antimicrobial substance from cell-free broth culture of *Bacillus licheniformis* was prepared and tested for inhibitory efficacy on *Proteus mirabilis*, an ammonia and hydrogen sulfide producing bacteria. The antimicrobial activity was assayed by disc diffusion method. *B. licheniformis* was grown at 37°C in Nutrient broth (NB) pH 7.0 with shaking at 150 rpm. It was found that the antimicrobial metabolite was produced in the middle of the exponential growth phase (12 h) and the maximum activity was obtained at the early stationary growth phase (24 - 36 h). The effect of temperature on the growth of *P. mirabilis* was investigated. At pH 7.0, *P. mirabilis* was able to grow in NB at temperature range between 25°C and 40°C and growth was significantly reduced when the temperature increased to 45°C. The influence of temperature on the antimicrobial activity was also studied. By using disc diffusion method, the maximum antimicrobial activity of cell-free supernatant of *B. licheniformis* against *P. mirabilis* was found at 45°C. Adding 5% and 10% volume by volume of cell free supernatant of *B. licheniformis* to the culture medium resulted in a 59.3% and 90.9% growth inhibition of *P. mirabilis* at 45°C, respectively. The findings from this study indicate that rising temperature to 45°C would be an enhancement of antimicrobial susceptibility against *P. mirabilis*.

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัจจัย

ในปัจจุบันก๊าซแอมโมเนีย ( $\text{NH}_3$ ) และก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ( $\text{H}_2\text{S}$ ) ถูกสร้างขึ้นและปลดปล่อยออกมานเป็นจำนวนมากจากการทางอุตสาหกรรม เช่น โรงกลั่นปิโตรเคมี การเตรียมอาหาร ระบบบำบัดน้ำเสีย การบำบัดเชื้อเพลิง และรวมถึงการทำฟาร์มปศุสัตว์ (Chung et al., 2001) ซึ่งก๊าชทั้งสองมีความเป็นพิษ สามารถก่อปัญหาระบบททางเดินหายใจในมนุษย์และสัตว์ เช่น เนื้อเยื่อบุตา จมูก และทางเดินหายใจทำให้เกิดการระคายเคือง ซึ่งจะนำไปสู่การเกิดโรคทางระบบทางเดินหายใจ อาจมีการปนเปื้อนในน้ำดื่มน้ำใช้ หรือเกิด Eutrophication บนผิวน้ำส่งผลให้สาหร่ายบุบ และคุณภาพน้ำลดลง ก๊าชแอมโมเนีย และ ก๊าชไฮโดรเจนซัลไฟด์เกิดจากแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถย่อยสลายสารประกอบโปรตีน และ กรดอมิโนต่างๆ เช่น tryptone, casamino acids, casein, methionine, cysteine และ cystine (Bitton and Wiley, 2005) มีแบคทีเรียหลายชนิดที่คัดแยกได้จากน้ำดื่ม ซึ่งไอโซเลทเหล่านี้มีความสามารถในการผลิตก๊าชแอมโมเนียจากชนิดของกรดอะมิโนที่ต่างกัน พบว่าส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีการผลิตก๊าชแอมโมเนียมากที่สุด เช่น *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Budvicia aquatic*, *Klebsiella pneumonia* และ *Pseudomonas migulae* (Terence et al., 2004) แบคทีเรียที่ผลิตก๊าชไฮโดรเจนซัลไฟด์ส่วนใหญ่เป็น Gram-negative ได้แก่ *Aeromonas*, *Shewanella*, *Proteus*, *Bacillus* และ *Citrobacter* (Stilinovic and Hrenovic., 2009) อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) ส่งผลต่อการการเจริญและผลิตสารกลืนเหม็นจากแบคทีเรียที่สร้างก๊าชแอมโมเนียและก๊าชไฮโดรเจนซัลไฟด์ และรวมถึงปัจจัยของอุณหภูมิ และความเป็นกรดค่างในสภาพแวดล้อมด้วย จากการประเมินความสามารถในการลดปริมาณก๊าชแอมโมเนียและตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถลดปริมาณก๊าชแอมโมเนียที่อุณหภูมิ  $55^\circ\text{C}$  พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* sp., *Bacillus thermosphaericus*, *Bacillus smithii* และ *Thermoactinomyces candidus* มีความสามารถลดปริมาณก๊าชแอมโมเนียได้สูง (Sasaki et al., 2007) การควบคุมปริมาณก๊าชแอมโมเนีย และก๊าชไฮโดรเจนซัลไฟด์ทางชีวภาพเป็นอิทธิพลเด่นหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหามลพิษทางกินและขังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม *Bacillus licheniformis* เป็นแบคทีเรียที่พบได้แพร่หลายในธรรมชาติมีการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักสำหรับผลิต amylases, proteases, antibiotics และ special chemicals มีความสามารถในการดัดแปลงในระดับต่ำต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม

เชื้อ *B. licheniformis* สามารถผลิตสารต้านจุลชีพ (Antimicrobial substances) ที่ต้านการเจริญของแบคทีเรีย Gram-positive และ Gram-negative ได้ทางชั้นต้น (Yaoqi et al., 2012) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis* ในอาหารเหลว ศึกษาปัจจัยที่ส่งเสริมการออกฤทธิ์ของสารในการต้านการเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซแอมโมเนียและก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟฟ์ (*P. mirabilis*) และศึกษาปัจจัยที่เพิ่มประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพจาก *B. licheniformis* ในการออกฤทธิ์ต้านการเจริญของ *P. mirabilis*

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis*
- 1.2.2 ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพจาก *B. licheniformis*
- 1.2.3 ปัจจัยที่เพิ่มประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพจาก *B. licheniformis* ในการออกฤทธิ์ต้านการเจริญของ *P. mirabilis*

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ทราบปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis* และ ปัจจัยที่ส่งผลต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพจาก *B. licheniformis* ในการต้านการเจริญของ *P. mirabilis* เพื่อที่จะนำไปศึกษาปัจจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านการเจริญของ *P. mirabilis* (แบคทีเรียที่สร้างก๊าซแอมโมเนียและก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟฟ์) เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมการเจริญของ *P. mirabilis* ซึ่งเป็นต้นเหตุในการก่อปัญหาน้ำพิษทางกลิ่นก๊าซแอมโมเนียและก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟฟ์

## 1.4 ขอบเขตการศึกษาค้นคว้า

ทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของเชื้อ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis* ศึกษาการเจริญ และ การผลิตสารต้านจุลชีพของเชื้อ *B. licheniformis* ที่อุณหภูมิ 37°C ศึกษาอุณหภูมิที่ส่งผลต่อการออกฤทธิ์ของสาร (cell free supernatant of *B. licheniformis*) ต้านการเจริญของ *P. mirabilis* ศึกษา ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis* (pH อุณหภูมิ แหล่งการรับอน แหล่งในโตรเจน) และศึกษาปัจจัยที่เพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญของ *P. mirabilis*

### 1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

- CFS : Cell-free supernatant of *B. licheniformis* (mm/20 $\mu$ L)
- FC : Fresh culture of *B. licheniformis* (mm/20 $\mu$ L)
- T : Time (h)
- °C : องศาเซลเซียส
- I : Standard Deviation (SD) หรือ ค่า errors bar
- SAS : โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test
- P>0.05 : ข้อมูลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- $OD_{600nm}$  : การวัดค่าความชุนด้วยเครื่อง Spectrophotometers ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
- $\mu$  : ค่าอัตราเจริญ หรือ Specific growth rate ( $h^{-1}$ )
- $t_d$  : ระยะเวลาที่มวลชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า หรือ Biomass doubling time (h)
- $NH_3$  : ก๊าซแอนโนเนีย
- $H_2S$  : ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ หรือ ก๊าซไฮไนเตอร์
- % (v/v) : ร้อยละโดยปริมาตร
- NA : Nutrient Agar
- NB : Nutrient Broth

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับก๊าซแอนโนมเนียและก๊าซไฮโดรเจนชัลไฟฟ์

##### 2.1.1 คุณสมบัติของก๊าซแอนโนมเนีย

###### 2.1.1.1 ลักษณะทั่วไป

แอนโนมเนียเป็นสารประกอบที่อยู่ในรูป  $\text{NH}_3$  โดยปกติพบในสถานะก๊าซ ในเมือง ไม่ไวไฟ มีกลิ่นฉุนรุนแรง คนปกติจะเริ่มได้กลิ่นที่ความเข้มข้นในอากาศมากกว่า 5 ppm เป็นอันตรายเมื่อสัมผัสสูกโดยตรง แต่ไม่เป็นสารพิษสะสม

###### 2.1.1.2 ลักษณะทางกายภาพเคมี

สมบัติทางกายภาพเคมีของก๊าซแอนโนมเนียสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สมบัติทางกายภาพเคมีของก๊าซแอนโนมเนีย (กรมควบคุมมลพิษ, 2552)

Characteristics	Information
Chemical formula	$\text{NH}_3$
CAS registry no.	7664-41-7
Molecular weight	17.031 g/mol
Physical state	GAS
Specific gravity	0.6819 g/L
Melting point	-77.73 °C (195.42K)
Boiling point	-33.44 °C (239.81K)
Solubility in water at 0°C	89.9g/100ml
Ignition point	651°C
pH	11.6

### 2.1.1.3 ลักษณะความเป็นพิษ

ก๊าซแอมโมเนียมมีความเป็นพิษและอันตรายต่อมนุษย์ในลักษณะความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute toxic) โดยมีอันตรายต่อร่างกาย หากได้รับเข้าสู่ร่างกายทางการหายใจในปริมาณมากกว่า 25 ppm ทำให้ร่างกายเคืองจมูกและคอ ถ้าได้รับปริมาณมากจะหายใจติดขัด เจ็บหน้าอก หลอดลมบีบ เกร็ง มีเสmenะและปอดบวม มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง อาเจียน ความดันโลหิตเพิ่ม หากสัมผัสทางผิวนังและได้รับปริมาณมากในระยะเวลาสั้นๆ ทำให้เกิดอาการคันที่ผิวนัง เป็นผื่นแดง บวม เป็นแพลล์ ถ้าได้รับปริมาณมากๆ และถ้ามีความเข้มข้นสูงจะทำให้ผิวนังไหม้แสง บวม เป็นน้ำเหลือง การสัมผัสสูกติดทำให้เจ็บตา ตามวัน น้ำตาไหล กันที่กระจกตา ถ้าได้รับช้าๆ อย่างต่อเนื่องในระยะยาวทำให้เกิดอาการระคายเคืองเรื้อรังต่อตัวอย่างถาวร (Chronic Irritation) และเป็นสารก่อมะเร็ง และทำลายไต ตับ ปอด และระบบประสาทส่วนกลาง

ตารางที่ 2.2 ลักษณะความเป็นพิษของก๊าซแอมโมเนียม (กรมสุขาภิบาลสิ่งแวดล้อม, 2554)

ความเข้มข้น NH <sub>3</sub> (ppm)	ผลต่อผู้สัมผัส	ระยะเวลาที่สัมผัส
5-9	จมูกเริ่มรับกลิ่น ได้	เมื่อสัมผัส
100	ผู้สัมผัสบางรายอาจมีอาการระคายเคืองอีกด้อด	½ ชม
400	ระคายเคืองลำคอ หายใจติดขัด	ไม่ควรได้รับนานเกิน 1 ชม
500	ความดันโลหิตเพิ่ม หายใจติดขัด	½ ชม
700	ระคายเคืองต่อตามาก การมองเห็นไม่ชัดเจน	½ ชม
1,720	อาการไอรุนแรง ชา	หลังได้รับ ½ ชม ทำให้เสียชีวิต
5,000-10,000 (0.5-1%)	อาการเกร็งของระบบทางเดินหายใจ สภาวะขาดออกซิเจนของเนื้อเยื่อ	เสียชีวิตทันที

### 2.1.2 คุณสมบัติของก๊าซไฮโดรเจนชัลไฟฟ์

#### 2.1.2.1 ลักษณะทั่วไป

ก๊าซไฮโดรเจนชัลไฟฟ์เป็นก๊าซที่ไม่มีสี มีกลิ่นของกลิ่นของไข่เน่าที่มีความเข้มข้นต่ำ ส่วนที่มีความเข้มข้นสูงๆ จะมีกลิ่นหวาน (Sweetish odor)(OHSA, 1995)

#### 2.1.2.2 ลักษณะทางกายภาพเคมี

สมบัติทางกายภาพเคมีของก๊าซไฮโดรเจนชัลไฟฟ์สรุปได้ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สมบัติทางกายภาพเคมีของก๊าซไฮโดรเจนชัลไฟฟ์ (Daniel, 2002)

Characteristics	Information
Chemical formula	H <sub>2</sub> S
CAS registry no.	7783-06-4
Molecular weight	34.08
Physical state	GAS
Vapor pressure at 25°C	20 mm Hg
Melting point	-85.49°C
Boiling point	-60.33°C
Solubility in water at 20°C	4.1 g/L
Log K <sub>ow</sub>	Not applicable
Henry's law constant at 20°C	1150 x 10 <sup>-4</sup> mol/L-atm
Conversion factor in air	1 ppm = 1.39 mg/m <sup>3</sup>
Odor threshold in air (absolute)	0.2 ppm
Threshold limit value	TWA : 10 ppm STEL : 15 ppm (15 minutes)

#### 2.1.2.3 ลักษณะความเป็นพิษ

ก๊าซไฮโดรเจนชัลไฟฟ์เป็นสารพิษที่มีฤทธิ์รุนแรง และเป็นก๊าซที่ทำให้เกิดการระคายเคืองตาและระบบทางเดินหายใจ ซึ่งทำให้เกิดอาการ เช่น ไอ ปวดบริเวณนูกเมื่อหายใจ และปวดบริเวณลำคอ ในกรณีที่ได้รับก๊าซไฮโดรเจนชัลไฟฟ์ความเข้มสูงๆ อาจทำให้ตายโดยเฉียบพลัน เนื่องจากก๊าซจะไปขับขึ้นกระบวนการสร้างออกซิเจนของเซลล์เนื้อเยื่อ และลดปริมาณ

การถ่ายออกซิเจนของเลือด ทึ้งขังไปกดทับเส้นประสาท เป็นผลให้เกิดอาการอันพาด และระบบทางเดินหายใจล้มเหลว จนในที่สุดก็จะเสียชีวิต

ตารางที่ 2.4 ลักษณะความเป็นพิษของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (OSHA, 1995)

ความเข้มข้นก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (ส่วนในล้านส่วน)	อาการที่ปะగูก
10	เริ่มน้ำมูกระคายเคืองตา
50-100	ระบบทางเดินหายใจเกิดอาการระคายเคืองเล็กน้อย หลัง สัมผัส 1 ชั่วโมง
100	เกิดอาการระคายเคืองที่ตา ไอ สูญเสียประสาทสัมผัสการรับ กลิ่นหลังสัมผัสเป็นเวลา 2-15 นาที จากนั้นจะเป็นปวด บริเวณตา ลำคอ เมื่อสัมผัสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรณี ถ้า สัมผัสก๊าซมากกว่านี้ จะเป็นผลให้อาการต่างๆ รุนแรงขึ้น และอาจทำให้เสียชีวิตได้ใน 48 ชั่วโมง
200-300	เกิดอาการระคายเคืองที่ระบบทางเดินหายใจมากขึ้น โดยเฉพาะบริเวณลำคอ เมื่อสัมผัสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
500-700	หมดสติ และอาจเสียชีวิตได้หลังสัมผัสก๊าซเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
700-1000	ระบบทางเดินหายใจหยุดทำงาน หมดสติ และเสียชีวิตโดย เหตุการณ์

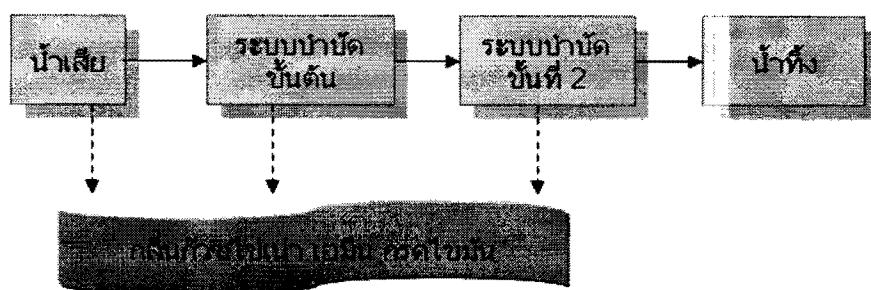
### 2.1.3 แหล่งกำเนิดก๊าซแอมโมนิยั่นและก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

ก๊าซแอมโมนิยั่นและก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ถูกปล่อยออกมาราฟาร์มปศุสัตว์เป็น หลัก และบังเป็นสารมลพิษในน้ำที่สำคัญสามารถพบได้ทั้งในน้ำเสีย น้ำผิวดิน และน้ำใต้ดิน แอมโมนิยั่นและไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ปนเปื้อนในน้ำเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น จากการละลาย แอมโมนิยั่นหรือก๊าซแอมโมนิยั่นในภาคอุตสาหกรรม จากชาตุอาหารและสารอาหารในแหล่งน้ำที่ สามารถเปลี่ยนเป็นแอมโมนิยั่นได้ จากการทำฟาร์มปศุสัตว์ และจากการใช้ปุ๋ยในภาคเกษตรกรรม เป็นต้น น้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น น้ำเสียจากโรงงานน้ำยาหางขัน น้ำเสียจาก

โรงงานฟอกน้ำ และน้ำเสียที่เกิดจากการล้างฟาร์มปศุสัตว์จะมีก๊าซแอมโมเนียมและก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ปนเปื้อนในปริมาณสูง ถ้าถูกปล่อยลงสู่แหล่งน้ำผิวดินหรือแหล่งน้ำใต้ดินก็เกิดผลกระทบต่อระบบนิเวศวิทยา เช่น เป็นอันตรายต่อสิ่งชีวิตในน้ำโดยตรง และก่อให้เกิดปัญหาการเจริญของสาหร่าย จึงมีการกำหนดค่ามาตรฐานของแอมโมเนียมในน้ำทึ่งจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำทึ่งจากชุมชน และ ในน้ำประปาให้มีแอมโมเนียมปนเปื้อนได้ไม่เกิน  $100-200 \text{ mg/L}$ ,  $10-25 \text{ mg/L}$  และ  $0.05-0.1 \text{ mg/L}$  ตามลำดับ กลิ่นที่เกิดจากอุตสาหกรรมมีมากนัยหลายประเภท สารที่ทำให้เกิดกลิ่นมีหลากหลายชนิดส่วนใหญ่นั้นมักเป็นประเภทสารประกอบอินทรีย์ที่ระเหยง่าย (Volatile Organic compounds) ที่ใช้ในอุตสาหกรรม ตัวอย่างของอุตสาหกรรมที่มักจะทำให้เกิดมีกลิ่นได้แก่ โรงงานบำบัดน้ำเสีย ฟาร์มเลี้ยงสัตว์ โรงงานปลาสติก โรงงานฟอกน้ำ โรงงานผลิตเคมีภัณฑ์ต่างๆ

#### 2.1.3.1 โรงงานบำบัดน้ำเสีย

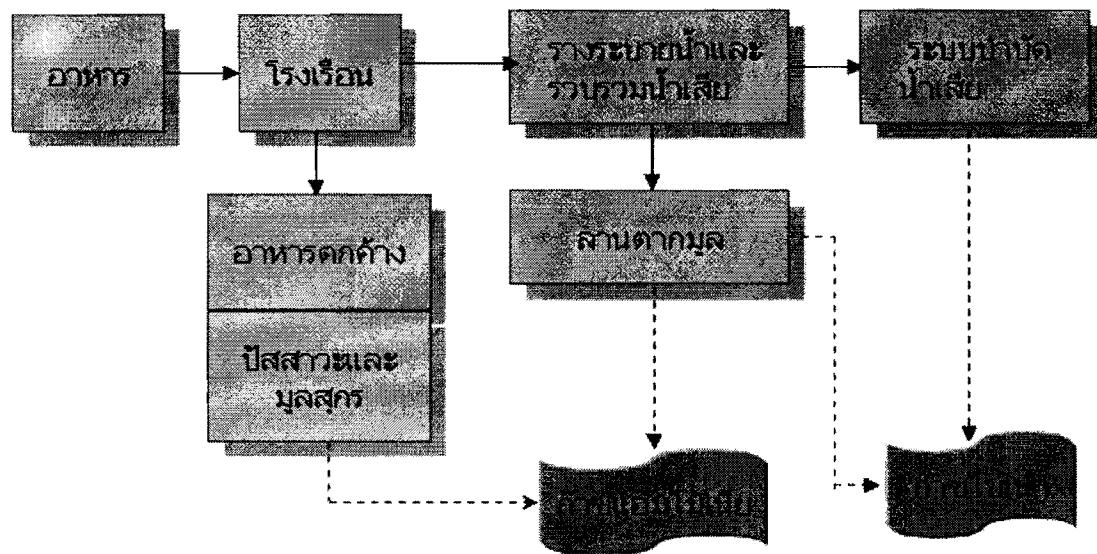
น้ำเสียที่มีสารอินทรีย์ปนเปื้อนหากทิ้งไว้ไม่บำบัดโดยเร็วทำให้เกิดกระบวนการย่อยสลายโดยแบคทีเรีย เช่น การย่อยโปรตีนทำให้ในโครงสร้างและกำมะถันในโปรตีนเปลี่ยนเป็นก๊าซแอมโมเนียม และก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นและน้ำเสียนี้สภาพเป็นกรด บางส่วนของในโครงสร้างเป็นกลิ่นความชั้ด เช่น เอมีน บางส่วนของกำมะถันในน้ำเสียกลายเป็นเมอร์แคปเทนทำให้เกิดกลิ่นเหม็น โรงงานที่มีน้ำเสียปนเปื้อนสารอินทรีย์ในปริมาณสูงได้แก่ โรงงานสุรา โรงงานแปรรูปผลิตภัณฑ์ทางเกษตร เช่น โรงงานผลไม้กระป่อง โรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม รวมทั้งระบบบำบัดน้ำเสียรวมในนิคมอุตสาหกรรม เมือง และเทศบาลต่างๆ กลิ่นที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เป็นก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และอาจมีกรดไขมันอญี่ปุ่น โรงงานที่มีน้ำเสียทางเคมีต้องตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำเสียและที่มาของน้ำเสียซึ่งจะสามารถระบุชนิดของสารเคมีที่ทำให้เกิดกลิ่นได้



ภาพที่ 2.1 กระบวนการผลิตที่ทำให้เกิดกลิ่นในโรงงานบำบัดน้ำเสีย (กรมควบคุมมลพิษ, 2554)

### 2.1.3.2 ฟาร์มเลี้ยงสัตว์

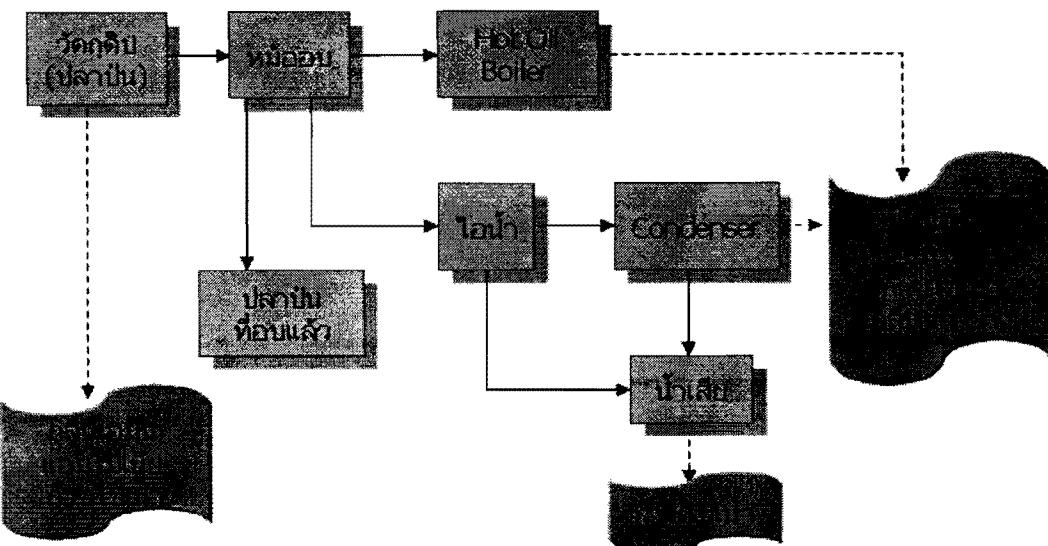
บริเวณที่เก็บอุจจาระและปัสสาวะสัตว์ และลานตามนูด จะเกิดกลิ่นการเน่าเสียกลิ่นที่เกิดขึ้นจะเป็นพวก เอเมิน ก้าชแอม โนเนีย และก้าชไฮโครเจนซัลไฟฟ์ ระบบบำบัดน้ำเสียของฟาร์มเลี้ยงสัตว์ส่วนใหญ่เป็นระบบบ่อหมักซึ่งเป็นบ่อเปิด ถ้าการคูดระบบไม่มีประสิทธิภาพ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายในบ่อจะเป็นไปอย่างไม่สมบูรณ์ทำให้เกิดก้าชที่มีกลิ่น เช่น ก้าชไฮโครเจนซัลไฟฟ์ หรือ ก้าชไน์เม่า



ภาพที่ 2.2 กระบวนการผลิตที่ทำให้เกิดกลิ่นจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์ (กรมควบคุมมลพิษ, 2554)

### 2.1.3.3 โรงงานปลาป่น โรงงานกรดดูกป่น

กระบวนการเก็บวัสดุคุณภาพ ปลา ขนเป็ด กระดูก จะมีการเน่าเสีย มีความชื้น กลิ่นที่เกิดขึ้นจะเป็นพวก เอเมิน ก้าชแอม โนเนีย และก้าชไฮโครเจนซัลไฟฟ์ กระบวนการต้ม หรือ อบด้วยความร้อน จะมีไอน้ำที่มีกลิ่นของ เอเมิน ก้าชแอม โนเนีย กลิ่นปลาเย่าง และก้าชไฮโครเจนซัลไฟฟ์ ระยะออกทางปล่อง กระบวนการบำบัดน้ำเสีย ซึ่งจะมีกลิ่นของก้าชไฮโครเจนซัลไฟฟ์เป็นหลัก และ กระบวนการเก็บผลิตภัณฑ์ที่สำเร็จแล้ว บางครั้งจะมีกลิ่นเอเมิน รบกวน

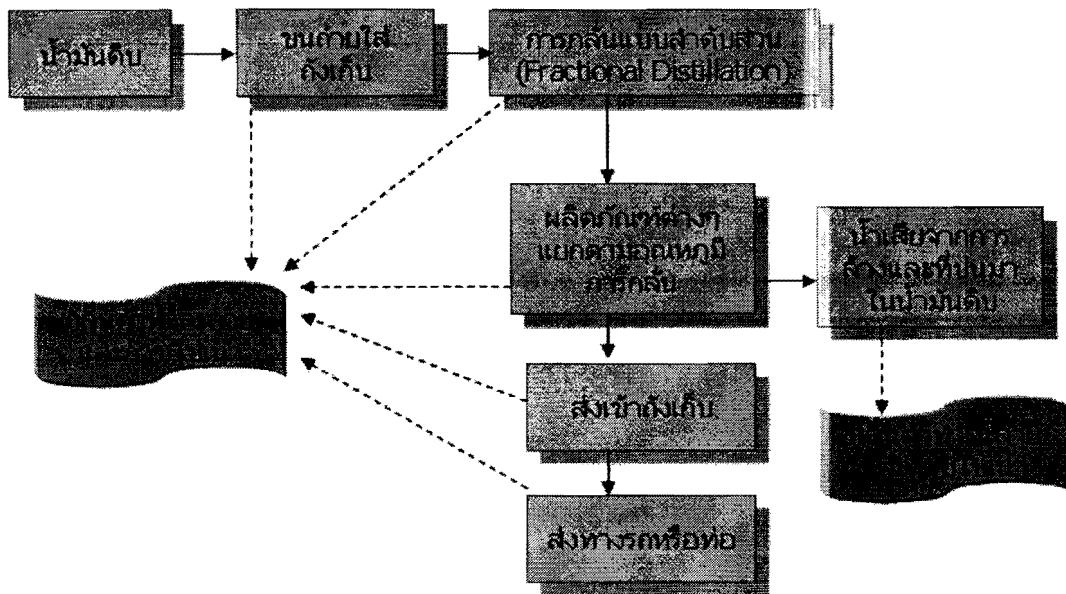


ภาพที่ 2.3 กระบวนการผลิตที่ทำให้เกิดกลิ่นในโรงงานปลาเป็น โรงงานกระดูกป่น

(กรมควบคุมมลพิษ, 2554)

#### 2.1.3.4 โรงงานน้ำมัน

กระบวนการเก็บน้ำมันดินจะมีกลิ่นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และไฮโดรคาร์บอนจากถังเก็บ การกลั่นจะมีกลิ่นของน้ำมันพากไฮโดรคาร์บอน Methyl Tertiary-Butyl Ether และก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์แต่มีปริมาณน้อยเพียงสามารถควบคุมได้ ปัญหาเกิดขึ้นจากการเก็บและขนส่งมากที่สุด แม้ว่าการกลั่นน้ำมันทำในกระบวนการที่ปิดมิคชิดใน Reactors ที่ทันสมัยในโรงงานแต่การเก็บบรรจุผลผลิตหรือวัตถุดิน (น้ำมันดิน) ในถัง ซึ่งมีการใช้ฝาชนิดต่างๆ ทั้งแบบฝาที่ขัดติดสนิท หรือฝาลอยได้ จะมีการระบายไฮอกซ์ของสารไฮโดรคาร์บอนที่เก็บไว้ได้จำนวนหนึ่งเนื่องจากไฮอกซ์มีความดันที่เปลี่ยนไปตามความร้อนและการบรรจุเข้าออกจาดัง ทำให้ไฮอกซ์บางส่วนระเหยออกมานำอกได้ นอกจากนั้น ในระหว่างการขนถ่ายใส่ถังหรือรถบรรทุกที่จะมีการระเหยได้อีกส่วนหนึ่ง ในการเผาไหม้ซึ่งใช้เชื้อเพลิงที่มีกำมะถันเจือปนจะมีก๊าซซัลเฟอร์ไฮด์ออกไประดับสูง แต่ก๊าซส่วนนี้จะถูกนำไปเผาหรือทำการกำมะถันเหลวหรือคงไว้ในถังโดยใช้ Propane ทำให้กำมะถันน้ำมันดินที่มีน้ำเสียเกิดขึ้นจากการเผาไหม้ สารปนเปื้อนในน้ำเสียเป็นสารไฮโดรคาร์บอนที่มีกำมะถันเจือปน ซึ่งหากทิ้งน้ำเสียไว้ไม่บ้านดักโดยเร็วทำให้เกิดกระบวนการบ่อขยะโดยแบกที่เรียกว่าไม่ใช้ออกซิเจนทำให้กำมะถันเปลี่ยนเป็นก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ บางส่วนของกำมะถันในน้ำเสียจะเปลี่ยนเป็นเมอร์แคปแทนทำให้เกิดกลิ่นเหม็น



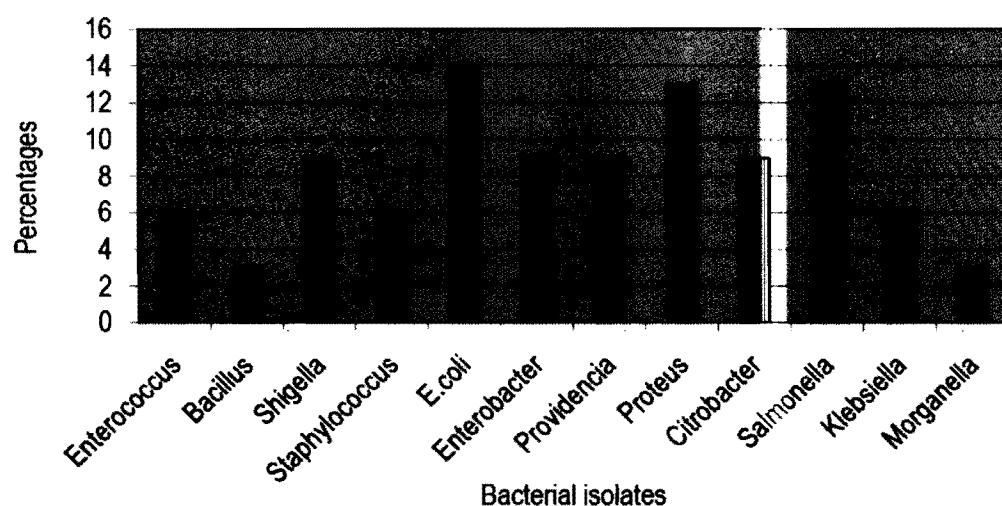
ภาพที่ 2.4 กระบวนการผลิตที่ทำให้เกิดกลิ่นในโรงกลั่นน้ำมัน (กรมควบคุมมลพิษ, 2554)

## 2.2 การผลิตก๊าซแอนโนนเนียและก๊าซไฮโดรเจนชัลไฟฟ์จากจุลินทรีย์

ก๊าซแอนโนนเนียและก๊าซไฮโดรเจนชัลไฟฟ์เป็นก๊าซที่เกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างชั้นช้อน ได้แก่ โปรตีน ไขมันเพื่อใช้เป็นสารอาหารในการดำเนินชีวิตของจุลินทรีย์ ซึ่งมีทั้งกระบวนการหมักในสภาพไร้อกซิเจน (Anaerobic bacteria) และในสภาพมีออกซิเจน (Aerobic bacteria) โดยพลังงานที่ได้จะถูกใช้ในการเจริญเติบโต สารอินทรีย์ไม่เลกุลใหญ่จะถูกสลายเป็นกรดไขมัน กรดอินทรีย์ แอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซไฮโดรเจนชัลไฟฟ์ และ ก๊าซแอนโนนเนีย นอกจากนี้ยังมีจากแคล่องอุดสาหกรรมอื่นๆ เช่น กระบวนการทางอุดสาหกรรม เช่น โรงกลั่นปิโตรเคมี, การเตรียมอาหาร, ระบบบำบัดน้ำเสีย, การบำบัดเชื้อเพลิง และรวมถึงการทำฟาร์มปศุสัตว์ (Chung et al., 2001) การเกิดกลิ่นโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์อาจแบ่งออกได้กว้างๆ เป็น 2 ชนิด ชนิดที่ 1 กลิ่นที่เกิดจากสาร อนินทรีย์ อยู่ในรูปของ ก๊าซ ได้แก่ ก๊าซแอนโนนเนียและก๊าซไฮโดรเจนชัลไฟฟ์ (Dague, 1972) ชนิดที่ 2 กลิ่นที่เกิดจากสารอินทรีย์ อยู่ในรูปของไօระเหย ได้แก่ เมอร์แคปแทน (mercaptans) อินโคล (indole) สகาโทල (skatole) และสารประกอบที่มีในโตรเจนและกำมะถันเป็นองค์ประกอบอื่นๆ กรดอินทรีย์ อัลเดียร์ คีโทน ที่อาจก่อให้เกิดกลิ่นได้เอง หรือร่วมกับการใช้สารประกอบอื่นที่ก่อให้เกิดกลิ่นได้ นอกจากนี้ ยังเป็นแอลกอฮอล์และกรดไขมันที่ระเหยได้

### 2.2.1 จุลินทรีย์ที่ตรวจพบในแหล่งของเสียจากอุตสาหกรรม

จากการจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำได้ น้ำเสีย อาหารสัตว์ และอากาศ จากฟาร์มสัตว์ปีกพบว่าเป็น aerobic bacteria ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus spp.*, *Pasteurella spp.* และ *Diplococcus spp.* ซึ่งเป็น Gram-negative coccobacilli และ Gram-negative small rods (Nasrin et al., 2007) และมีการตรวจพบกลุ่มแบคทีเรียที่ก่อปัญหากลิ่นเหม็นในมูลสัตว์ ดังแสดงในภาพที่ 2.5

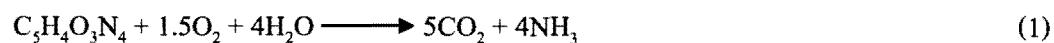


ภาพที่ 2.5 เปรียบเทียบการตรวจพบแบคทีเรียในมูลสัตว์ (William and Wambura, 2011)

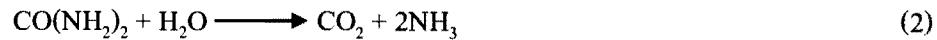
### 2.2.2 การผลิตกลิ่น ammonium ใหม่จากจุลินทรีย์

ammonium ใหม่เนี่ยส่วนใหญ่เกิดจากกระบวนการ metabolism ของจุลินทรีย์กระบวนการ decomposition (Decomposition) สารอินทรีย์ของจุลินทรีย์ การเกิด ammonium ใหม่เนี่ยในน้ำมี 2 รูปแบบคือ un-ionized ammonia ( $\text{NH}_3$ ) และ ammonia ion ( $\text{NH}_4^+$ ) การเกิด ammonium ใหม่เนี่ยทั้งสองรูปแบบขึ้นอยู่กับความสมดุลของอุณหภูมิกับ pH โดย pH จะเป็นปัจจัยที่สำคัญกว่าอุณหภูมิ

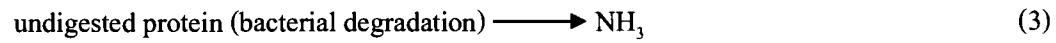
Aerobic decomposition of uric acid:



Urea hydrolysis:



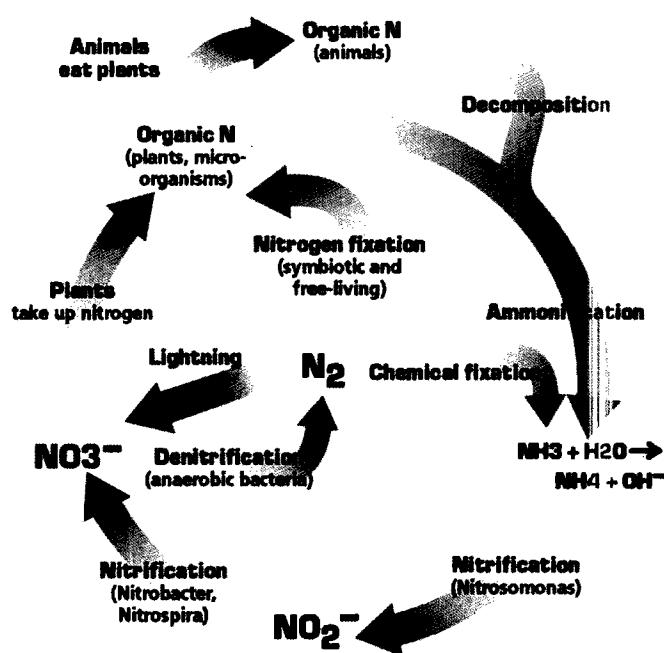
### Mineralization:



สมการการย่อยสลายสารอินทรีที่เพื่อผลิตกําชแอนมิเนีย (Hobbs et al., 1999; Aneja et al., 2001)

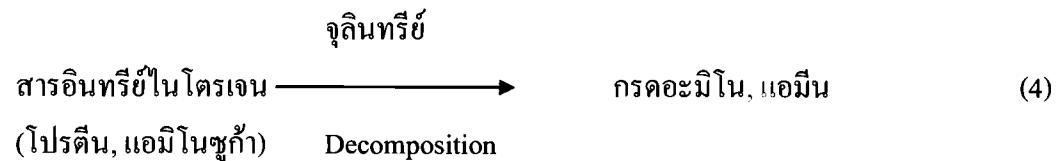
#### 2.2.3 วงจรไนโตรเจนในธรรมชาติ

สารประกอบอินทรีและสารประกอบอนินทรีที่ในไตรเจนในธรรมชาติ มีหลายชนิด เช่น โปรตีน อนุพันธ์ของโปรตีน กรดอะมิโน กรดnicotinic บูรี่ เกลือแอนมิเนีย เกลือไนโตรที่ในธรรมชาติ และกําชไนโตรเจน เป็นต้น



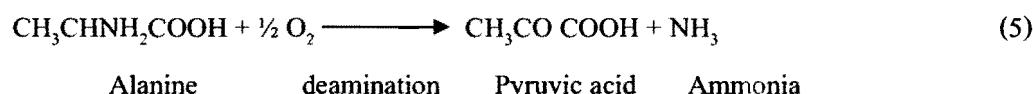
ภาพที่ 2.6 วงจรของไนโตรเจน (Annenberg, 2005)

Aminization เป็นกระบวนการที่สารประกอบโปรตีนถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีที่ phyk Heterotrophic ไปเป็นสารประกอบในไตรเจนพวก Amino compound ซึ่งได้ดังสมการ



โปรตีนจะถูกเอนไซม์ Proteolytic ของจุลินทรีย์ย่อยสลายเป็นกรดอะมิโนในกรดอะมิโนนี้ส่วนหนึ่งถูกนำไปใช้ประโยชน์ในการเป็นแหล่งไนโตรเจนและแหล่งพลังงานของเซลล์ บางส่วนจะถูกเปลี่ยนสภาพคือไปจุลินทรีย์ในธรรมชาติต้องสารประกอบอินทรีย์ในไตรเจน เพื่อสังเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ในไตรเจนอื่นๆ ดังนั้น จุลินทรีย์จึงมีบทบาทในการแปรรูปสารประกอบในไตรเจน และเกิดกระบวนการแปรรูปสารเหล่านี้แตกต่างกันไป ได้แก่ กระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ในไตรเจนเป็นสารประกอบอนินทรีย์ในไตรเจน ซึ่งเรียกว่า nitrogen mineralization

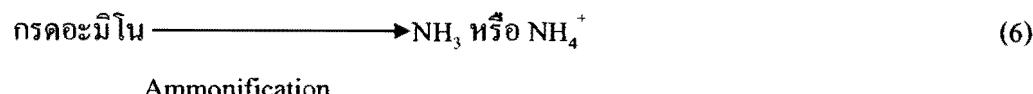
Alanine



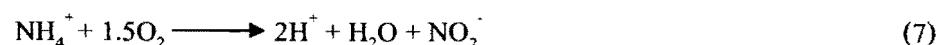
กระบวนการนำสารประกอบอนินทรีย์ในไตรเจนเข้าสู่เซลล์ เพื่อสังเคราะห์เป็นสารประกอบอินทรีย์ในไตรเจน เรียกว่า Nitrogen immobilization อย่างไรก็ตามภายในได้กระบวนการทั้งสองดังกล่าว จุลินทรีย์ซึ่งก่อให้เกิดกระบวนการต่างๆ อีกมากมาย เช่น กระบวนการเกิดแอมโมเนีย ในเด Rath การตรึงก๊าซในไตรเจน ซึ่งเรียกว่ารวมกันเป็นวงจร ในไตรเจน กระบวนการต่างๆเหล่านี้ ได้แก่

2.2.3.1 Ammonification คือกระบวนการย่อยสลายกรดอะมิโนได้แอมโมเนีย เกิดขึ้นโดยบทบาทของ heterotrophic bacteria เชื้อรา และแบคทีโรมัยซีท (actinomycete) กระบวนการนี้เกิดได้ทั้งในสภาพที่มีโมเลกุลออกซิเจนหรือไม่มีก็ได้ในสภาพที่ไม่มีโมเลกุลออกซิเจนจะเป็นบทบาทของ facultative anaerobes

Ammonifying bacteria

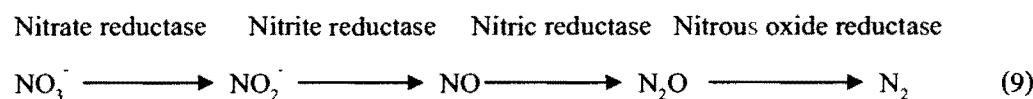


2.2.3.2 Nitrification เป็นกระบวนการที่มีการออกซิได้ก๊าซแอมโมเนียในไตรเจนเป็นไนเตรทโดยแบคทีเรียกลุ่มนitrifying bacteria ซึ่งเป็นแบคทีเรียประเภท Chemoautotrophs



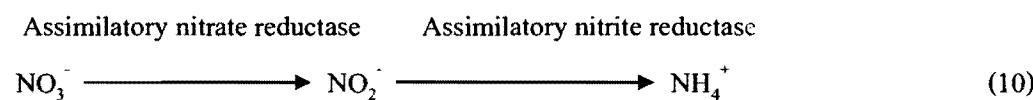
2.2.3.3 Denitrification และ Nitrate Reduction เป็นกระบวนการเกิดขึ้นในระบบธรรมชาติในสภาวะที่มีการขาดออกซิเจน โดยแบคทีเรีย facultative anaerobe และ anaerobic chemoautotroph แบ่งเป็น 2 แบบ

1) Denitrification คือ กระบวนการสลายสารประกอบอนินทรีย์ในเดรท เป็นแก๊สใน โครงสร้างโดยแบคทีเรีย facultative anaerobe และ anaerobe



ตัวอย่างของคือในตรีพิเศษันแบคทีเรียได้แก่ *Pseudomonas, Achromobacteria, Thiobacillus, Bacillus* และ *Micrococcus*

2) Nitrate reduction เป็นกระบวนการสลายสารประกอบอนินทรีย์ ในเดรทให้เกิดเป็นในไครท์ หรือ แอมโมเนียม โดยแบคทีเรีย Facultative anaerobe (สมศักดิ์ วงศ์ใน, 2528)



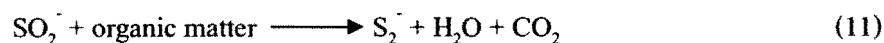
จากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้อง มีแบคทีเรียหลายชนิดที่คัดแยกได้จากมูลสุกร ซึ่งไอโซเลทเหล่านี้มีความสามารถในการผลิตแอมโมเนียมจากนิคของอะมิโนที่ต่างกัน พบว่าส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกermenophytes ที่มีการผลิตก้าชแอมโมเนียมมากที่สุด เช่น *Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Budvicia aquatic, Klebsiella pneumonia* และ *Pseudomonas migulae* (Terence and Michael, 2004) จัดเป็นกลุ่มแบคทีเรีย facultative anaerobe

#### 2.2.4 การผลิตก้าชไอโอดรเจนซัลไฟฟ์จากจุลินทรีย์

สำหรับการผลิตก้าชไอโอดรเจนซัลไฟฟ์จากจุลินทรีย์ซึ่งอยู่กับชนิดของสารอินทรีย์ที่ใช้ในการย่อยสลาย โดยทั่วไปจะมีปริมาณก้าชไอโอดรเจนซัลไฟฟ์สูงจากมูลสัตว์หรือน้ำเสียที่มีปริมาณซัลเฟตสูง เมื่อก้าชไอโอดรเจนซัลไฟฟ์รวมตัวกับความชื้นในบรรยากาศจะเป็นกรดซัลฟิวริก ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ซึ่งมีสมบัติเป็นกรดแก่ที่มีฤทธิ์การกัดกร่อนสูง กลืนของก้าชไอโอดรเจนซัลไฟฟ์นักเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ ซึ่งเกิดได้ 2 วิธี คือ

2.2.4.1 การย่อยสลายสารอินทรีย์ พวกโปรตีนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบภายใน สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยจุลินทรีย์พวก Proteolytic bacteria เช่น *Proteus Escherichia* และ *Pseudomonas* เรียกปฏิกิริยานี้ว่า ดีชัลเฟอเรชั่น แบนค์ที่เรียกอุ่มนี้เป็นแบนค์ที่เรียชนิด facultative anaerobe แต่การสร้างไสโตรเจนชัลไฟฟ์จะเกิดในสภาวะที่ไม่มีอากาศแท่นนั้น

#### Anaerobic



#### Bacteria



การย่อยสลายสารอินทรีย์ เพื่อผลิตก๊าซไสโตรเจนชัลไฟฟ์ (Arogo et al., 2000; Sawyer et al., 1978)

2.2.4.2 การรีดิวเซชัลเฟตภายในสภาวะไม่มีออกซิเจน การรีดิวเซชัลเฟตในน้ำเสีย เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนละลายน้ำ ซึ่งสามารถใช้ออกซิเจนในชัลเฟต ในการออกซิไดซ์สารอินทรีย์ ก่อตัวคือ ใช้ชัลเฟตเป็นตัวรับอิเลคตรอน ผลลัพธ์คือ ชัลเฟตจะถูก รีดิวเซให้เป็นชัลไฟฟ์ ปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นเมื่อไม่มีตัวรับอิเลคตรอนอื่นๆ เช่น ไม่มีออกซิเจน หรือ ในเตรหอยู่ด้วย จุลินทรีย์ที่สามารถในการรีดิวเซชัลเฟต คือ พวก sulfate-reducing bacteria เช่น *Desulfovibrio*, *Desulfomonas* และ *Desulfotomaculum* โดยมี *Desulfovibrio desulfuricans* เป็น ตัวการหลัก และการเกิดชัลไฟฟ์โดยบวชีนี้เป็นกลไกสำคัญที่สุดของการเกิดไสโตรเจนชัลไฟฟ์ในน้ำเสีย จากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า เชื้อ *Proteus vulgaris* เป็นแบนค์ที่เรียกที่พบทั่วไปใน ธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำเสีย กองขยะ มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซไสโตรเจนชัลไฟฟ์ได้ โดยสามารถ ย่อยสลายโมเลกุลของโปรตีนหรือกรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบในสภาพที่ไม่มี ออกซิเจน เรียกปฏิกิริยานี้ว่า desulfurization (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2554) เมื่อเพาะเลี้ยง *P. vulgaris* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ peptone iron agar (PIA) ภายใน 1 - 7 วันจะเห็นสีดำ เกิดขึ้น เพราะ *P. vulgaris* สามารถดูดซึมน้ำเปลี่ยนเป็นไสโตรเจนชัลไฟฟ์ เมื่อทำปฏิกิริยากับอิออน ของเหล็กจะเกิดเป็นสีดำของเหล็กชัลไฟฟ์ (William, 1990; Wistreich and Lechtmean, 1980) นอกจากนั้น *P. vulgaris* สามารถสร้าง Urease enzyme ที่จะ Hydrolyze สาร urea ในอาหาร เปลี่ยนเป็นก๊าซแอมโมเนียได้

### 2.3 การควบคุมกลิ่นก๊าซแอมโมเนียและก๊าซไฮโดรเจนชัลไฟฟ์

วิธีการควบคุมกลิ่นนักทำโดยใช้สารเคมี ซึ่งอาจเป็นการทำลายสิ่งมีชีวิตทั้งหลาย เช่น จุลินทรีย์ในระบบนิเวศจึงเป็นการแก้ปัญหาแบบไม่ยั่งยืน เพราะทำลายสภาพแวดล้อมโดยเฉพาะทำลายความหลากหลายของจุลินทรีย์ในธรรมชาติอย่างถาวรสิ่งสารเคมีบางชนิดเป็นสารพิษหรือเป็นสารบ่อบดีอย่างมาก ถ้าตักถังอยู่ในสภาพแวดล้อมอาจก่อให้เกิดปัญหานลภาวะอื่นๆ ต่อไป การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อควบคุมกลิ่นก๊าซไฮโดรเจนชัลไฟฟ์ และ ก๊าซแอมโมเนียจึงเป็นวิธีที่ช่วยแก้ปัญหาที่กล่าวมาแล้วได้ โดยจะอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ แบ่งได้เป็น 2 กรณี คือ กรณีแรกเป็นการใช้ก๊าซไฮโดรเจนชัลไฟฟ์ และ ก๊าซแอมโมเนียที่เกิดขึ้นแล้วเป็นแหล่งของพลังงานในการเจริญซึ่งเป็นการกำจัดกลิ่น กรณีที่สองเป็นการเติมจุลินทรีย์บางชนิดซึ่งเป็นปฏิปฏิกิริยาต่อจุลินทรีย์สร้างก๊าซไฮโดรเจนชัลไฟฟ์ และ ก๊าซแอมโมเนีย เช่น ทำให้เกิดการแก่และเสื่อมของอาหาร การสร้างสารพิษขับย้งการเจริญ เป็นต้น ซึ่งจัดเป็นการป้องกันการเกิดกลิ่น

**2.3.1 จุลินทรีย์ใช้ก๊าซไฮโดรเจนชัลไฟฟ์และก๊าซแอมโมเนียเป็นแหล่งของพลังงานในการเจริญ เช่น เยเกอร์โโทรฟิกแบคทีเรียที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนชัลไฟฟ์ คือ *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากปูยีหมักน้ำสุกร (Yun et al., 1997) โดยพบว่าเชื้อสามารถดูดซึ่งชัลไฟฟ์ได้จากการทำงานของเอนไซม์ ไฮโดรเจนชัลไฟฟ์จะออกซิเดสภายในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยมีผลิตภัณฑ์หลักที่ได้เป็น elemental sulfur ดังสมการที่ 13 (Nakada and Ohta, 1999)**



ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์สำหรับกำจัดก๊าซไฮโดรเจนชัลไฟฟ์ ซึ่งมีข้อดีในเรื่องการประหยัด ค่าใช้จ่ายและมีความปลอดภัยสูงกว่าการใช้สารเคมี เนื่องจากเป็นวิธีประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติแต่มีข้อจำกัดคืออาจพนปัญหาความไม่สม่ำเสมอเรื่องสภาพแวดล้อมในธรรมชาติ (สุภาพร หวังศิริเจริญ และ วสุ ปฐมอารี, 2009)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงกำจัดไฮโดรเจนชัลไฟฟ์ได้โดยการออกซิไคลซ์ชัลไฟฟ์ ตามปฏิกริยา



ส่วนกุ่ม colorless sulfur bacteria ออกซิไคลซ์ชัลไฟฟ์ตามปฏิกริยา



จุลินทรีย์ใช้ก้าชแอมโมเนียมเป็นแหล่งของพลังงานในการเจริญ เช่น เอทอโรโโทรฟิก แบคทีเรียที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการกำจัดก้าชแอมโมเนียมคือ *Bacillus* sp. โดยพบว่าเชื้อสามารถใช้แหล่งในต่อเจนในการเจริญโดยปฏิกริยา Denitrification และ Nitrification จากการคัดเลือก *Bacillus* sp. ที่มีความสามารถในการลดแอมโมเนียมในไตรท์และในtered มีอทดสอบประสิทธิภาพการลด  $\text{NH}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$  และ  $\text{NO}_3\text{-N}$  ในอาหารสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* sp. จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis* จำนวน 6 สายพันธุ์ *B. licheniformis* จำนวน 2 สายพันธุ์ *B. polymyxa* และ *B. pumilus* พบว่า *B. polymyxa* และ *B. subtilis* เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการลด  $\text{NH}_3\text{-N}$  และ  $\text{NO}_3\text{-N}$  ได้สูงสุด คิดเป็นประสิทธิภาพการกำจัด 56 และ 63% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม พบว่า *Bacillus* sp. ทุกสายพันธุ์สามารถลดปริมาณ  $\text{NH}_3\text{-N}$  ได้ (พิพากษา โสภณพัฒนกิจ และ บุรพิน ค่านคุณิตาพันธุ์, 2553)

**2.3.2 จุลินทรีย์เป็นปฎิปักษ์ต่อจุลินทรีย์ที่สร้างก้าชแอมโมเนียมและไฮโดรเจนซัลไฟด์** ในสภาพแวดล้อมธรรมชาตินั้นมีจุลินทรีย์หลายประเภทที่สามารถขับยักษ์การเจริญของกันและกันได้ ตามกฎของธรรมชาติ เช่น มีการสร้างสารพิษ สารปฏิชีวนะ หรือสารบางอย่างที่ทำให้จุลินทรีย์อีกประเภทหนึ่งไม่สามารถเจริญได้ หรือถูกทำลายไป ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สร้างกรดสำคัญได้แก่ กลุ่ม Lactic acid bacteria, Acetic acid bacteria และ *Bacillus* sp. ตัวอย่างของแบคทีเรียที่เรียกว่าสร้างสารปฏิชีวนะ หรือสารต้านจุลชีพบางอย่าง ได้แก่ *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* และกลุ่ม Lactic acid bacteria จากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่าผลกระบวนการก่อตัวของกลุ่มโคสและแบคทีเรียแลคติกต่อการขับยักษ์การเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ มีรายงานว่าสารละลายน้ำตาลที่หมัก โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ป่นเปี้ยนในกากน้ำตาลใช้ขับยักษ์การสร้างก้าชไฮโดรเจนซัลไฟด์ของเชื้อ *Proteus vulgaris* ได้ โดยพบว่าสารละลายน้ำตาลที่มีฤทธิ์ขับยักษ์ดังกล่าวมีพีเอชต่ำ ซึ่งเกิดจากการหมักกากน้ำตาลนั้น ทำให้เกิดกรด (Wungkobkiat et al., 1996 ; อรุณวรรณ หวังกอบเกียรติ และคณะ, 2538) จากการศึกษา งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกรด และ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ของ *P. vulgaris* ในอาหารมีน้ำตาลที่ pH 7.0 พบว่ากลุ่มโคสและแบคทีเรียต่อการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ของ *P. vulgaris* โดยการเติมกลุ่มโคสจะเกิด การสร้างกรด และ ขับยักษ์การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ เนื่องจากกรดไปขับยักษ์การเจริญของเชื้อ แบคทีเรีย *P. vulgaris*. ดังนั้น การเพิ่มกลุ่มโคสช่วยเพิ่มความสามารถในการขับยักษ์การสร้าง ไฮโดรเจนซัลไฟด์ และการเติมกลุ่มโคสก่อนการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์จะดีกว่าการเติมหลังการ สร้างเสร็จแล้ว ดังแสดงในตารางที่ 2.5 นอกจากนั้นในอาหารที่มีน้ำตาลการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

แอลกอติกร่วมกับ *P. vulgaris* แบปคทีเรียแอลกอติกจึงช่วยส่งเสริมให้เกิดการสร้างกรดและลดพิโอซองได้จนถึงระดับที่ *P. vulgaris* ไม่สามารถเจริญได้เร็วขึ้น (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2554)

**ตารางที่ 2.5 Effect of glucose on H<sub>2</sub>S production of *Proteus vulgaris* in PIA and PIB**  
(อรุณวรรษ หัวงกอบเทียรดิ และคณะ, 2538)

Medium and conditions	Incubation period (days)	
	1	2
1) PIA control (without <i>P. vulgaris</i> )	NC	NC
PIA	B	B
PIA + 1% glucose	+G	+G
2) PIB control (without <i>P. vulgaris</i> )	NC	NC
PIB	B	B
PIB + 1% glucose	+G	+G
3) PIB + 1% glucose*	B	+G
Note : NC = No change	B = Strong H <sub>2</sub> S production, Black color, Bad smell	
+ = Turbid, absence of H <sub>2</sub> S	G = Gas production	

## 2.4 ลักษณะของ *Bacillus licheniformis*

### 2.4.1 คุณสมบัติเบื้องต้นของ *B. licheniformis*

การจัดจำแนกหมวดหมู่ทางวิทยาศาสตร์ (Scientific classification) ตาม Bergey's manual of Systematic Bacteriology 2<sup>nd</sup>, 1984 - 1989 (Weigmann, 1898; Chester, 1901)

Kingdom: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Class: Bacilli

Order: Bacillales

Family: Bacillaceae

Genus: *Bacillus*

Species: *B. licheniformis*

เป็นแบคทีเรีย Facultative anaerobic แกรมบวก เชลล์มีลักษณะเป็นรูปแท่ง สร้างสปอร์เป็นรูปวงรี หรือ ทรงกระบอกอยู่ที่ตำแหน่งตรงกลาง (central) ใกล้ตรงกลาง (paracentral) และ อยู่ตอนปลาย เชลล์ (subterminal) สปอร์ไม่บวมเป็นพอนอยู่เป็นเชลล์เดียวหรือเรียงตัวเป็นสาย เชลล์ที่เจริญในน้ำตาลกลูโคสจะขึ้นสีแกรนดิตดิน้ำเงิน มีขนาด  $0.6 - 0.8 \times 1.5 - 3.0$  ไมโครเมตร พอนอยู่เป็นเชลล์เดียวหรือเรียงตัวเป็นสาย ขอบโคลนีไม่สม่ำเสมอ มีเส้นผ่าศูนย์กลางโคลนี  $2 - 4$  มิลลิเมตร เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำสุด  $15^{\circ}\text{C}$  และเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด  $50 - 55^{\circ}\text{C}$  นอกจากนั้นยังทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง  $68^{\circ}\text{C}$  และการเจริญได้ดีที่ pH  $5.7 - 6.8$  และ ยังสามารถรีดิวชันใน酎เปลี่ยนไปเป็นไนโตรทีได้

#### 2.4.2 สารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *B. licheniformis*

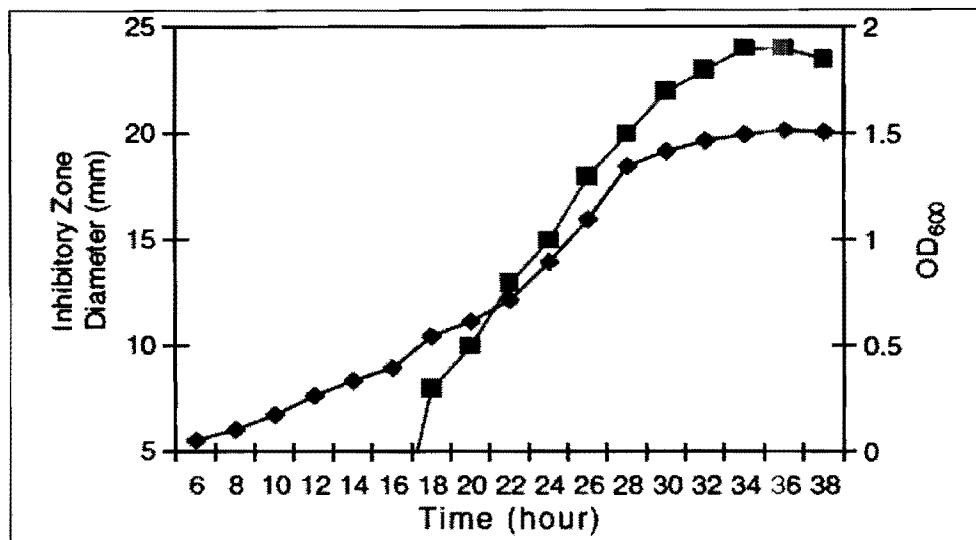
*B. licheniformis* เป็นแบคทีเรียที่พบได้แพร่หลายในธรรมชาตินิการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักสำหรับผลิต amylases, proteases, antibiotics, และ special chemicals มีความเสี่ยงในระดับต่ำต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม *B. licheniformis* สามารถผลิตสารต้านจุลชีพ (Antimicrobial substances) ได้ทางชินิด สาร bacteriocin-like peptides เป็นสารต้านจุลชีพชนิดหนึ่งที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ZJU12 สามารถต้านการเจริญของแบคทีเรีย Gram-positive และ Gram-negative หลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 2.6 (He et al., 2006)

ตารางที่ 2.6 กิจกรรมการต้านจุลชีพของ cell-free supernatant ของ *B. licheniformis* ZJU12  
ที่ pH 7.0 (He et al., 2006)

Indicators		Inhibitory zone diameter (mm)	Antagonistic activity
<i>Bacteria</i>			
Gram-positive	<i>Bacillus subtilis</i> (bean curd isolate)	18	+++
	<i>Enterococcus faecium</i> (clinical isolate)	10	++
	<i>Micrococcus flavus</i> (bean curd isolate)	24	++++
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	22	++++
	<i>Staphylococcus aureus</i> (clinical isolate, MRSA)	22	++++
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (clinical isolate)	20	+++
Gram-negative	<i>Acinetobacter baumanii</i> (clinical isolate)	-	-
	<i>Branhamella catarrhalis</i> (clinical isolate)	-	-
	<i>Enterobacter cloacae</i> (clinical isolate)	-	-
	<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	-	-
	<i>Proteus</i> sp. (clinical isolate)	-	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (clinical isolate)	-	-
	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> Zhe 173	26	+++++
<i>Fungi</i>	<i>Alternaria brassicae</i> (cabbage isolate)	20	+++
	<i>Fusarium oxysporum</i> (cotton isolate)	23	++++
	<i>Guignardia</i> sp. ( <i>shihu</i> isolate)	26	+++++
	<i>Pyricularia grisea</i> (rice isolate)	25	+++
	<i>Rhizoctonia solani</i> (rice isolate)	25	+++

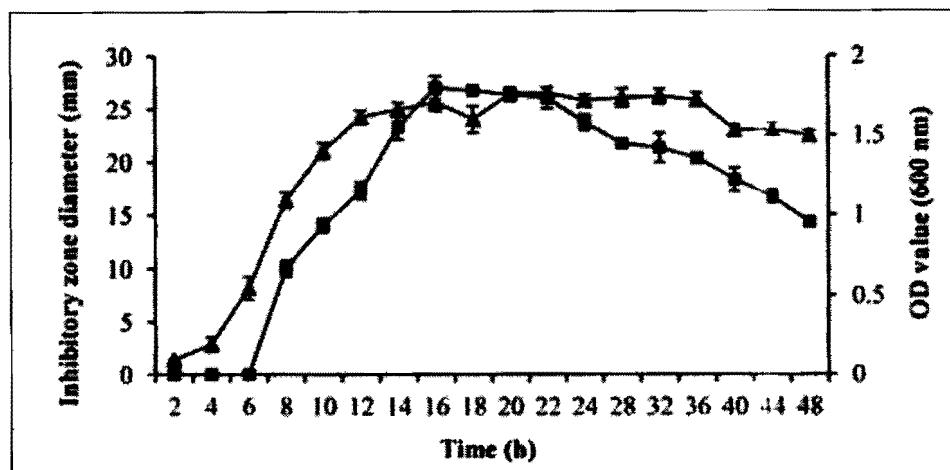
(-) No antagonistic activity; (+) inhibitory zone diameter within 6-10 mm; (++) 11-15 mm; (+++) 16-20 mm; (\*\*\*\*) 21-25 mm; (\*\*\*\*\*) 26-30 mm.

สารด้านจุลชีพที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ถูกตรวจสอบในช่วง middle exponential growth phase มีการผลิตสารได้สูงสุดในช่วง early stationary growth phase และ ค่อยๆลดลงดังแสดงในภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 การเจริญและการผลิต bacteriocin-like peptides ของ *B. licheniformis* ZJU12 ในอาหาร LB medium ที่ 30°C: (◆) OD<sub>600</sub> และ (■) เส้นผ่าศูนย์กลาง inhibition zone (He et al., 2006)

มีรายงานการคัดแยก *B. licheniformis* MKU3 จากตะกอนดิน โรงงานผ่าสัตว์ที่สามารถผลิตสารด้านจุลชีพ (antimicrobial peptide) ได้ และ ด้านการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., and *Listeria monocytogenes* เมื่อสาร antimicrobial peptide ถูกทำให้บริฤทธิ์และวิเคราะห์โดยเลกุลาร์ พนว่าเป็นสารปฏิชีวนะ bacteriocin (Nagarajan et al., 2010) bacteriocin like inhibitory substance (BLIS) ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* IIIRHR2 สามารถขับขึ้นการเจริญแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด เช่น *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis* (Sharma et al., 2010) สารด้านจุลชีพที่ผลิตจาก *B. licheniformis* B116 ถูกตรวจสอบในช่วง early exponential growth phase มีการผลิตสารได้สูงสุดในช่วง early stationary growth phase และ ค่อยๆลดลงในช่วง late stationary growth phase ดังแสดงในภาพที่ 2.8 (Guo et al., 2012)



ภาพที่ 2.8 การเจริญและการผลิต bacteriocin-like peptides ของ *B. licheniformis* B116 ในอาหาร Dextrose and Yeast extract broth ที่ 30°C: (▲) OD<sub>600</sub> และ (■) เส้นผ่าศูนย์กลาง inhibition zone (Guo et al., 2012)

#### 2.4.3 กิจกรรมการต้านจุลชีพ

สารปฏิชีวนะ (Antibiotics) หมายถึง สารที่สร้างจากจุลชีพ (Microorganism) และมีฤทธิ์ในการฆ่า หรือ ขับย้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค สารต้านจุลชีพ (Antimicrobial) รวมถึงสารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าหรือขับย้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค ทั้งที่เป็นยาปฏิชีวนะ สารเคมีสังเคราะห์ และ สารต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial) สารต้านจุลชีพมีการแบ่งได้หลายแบบ (Anderson et al., 2012)

##### 2.4.3.1 การแบ่งกลุ่มตามฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มหลัก

1) Bacteriostatic agent สามารถขับย้งการเจริญของเซลล์แบคทีเรียได้แต่ไม่ทำลายเซลล์ ตัวอย่าง เช่น Chloramphenicol, Tetracyclines, Erythromycin, Lincomycin, Sulfonamides และ Ethionamide

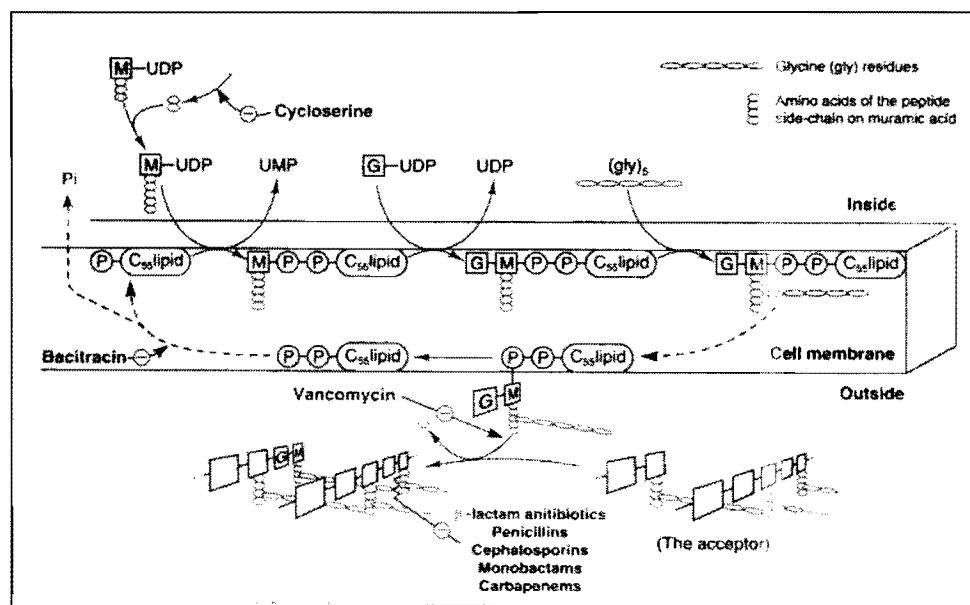
2) Bactericidal agent สามารถออกฤทธิ์ทำลายเซลล์แบคทีเรียทำให้เซลล์ตาย ตัวอย่าง เช่น Penicillins, D-cycloserine, Cephalosporins, Bacitracin, Rifampicin, Polymyxin B, Colistin และ Vancomycin

##### 2.4.3.2 การแบ่งกลุ่มตามกลไกการออกฤทธิ์ของสารสามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม (Allison et al., 2002)

1) สารกลุ่มขับย้งการสร้างผนังเซลล์ (cell wall synthesis inhibitors) ทำให้เซลล์แบคทีเรียเกิดการแตก (lysis) และสารจะมีผลต่อเมื่อแบคทีเรียกำลังจะแบ่งตัว ตัวอย่าง เช่น Penicillins, D-cycloserine, Cephalosporins, Bacitracin, และ Vancomycin แบคทีเรียมี cell wall ซึ่ง

เป็นลักษณะที่แตกต่างจากเซลล์ของนิวบ์ (เซลล์นิวบ์ไม่มี cell wall) องค์ประกอบที่สำคัญของ cell wall ของแบคทีเรียได้แก่ polymer ที่เรียกว่า “Peptidoglycan” Peptidoglycan ประกอบด้วย polypeptide และ polysaccharide ซึ่ง polysaccharide นั้นได้แก่ amino sugar 2 ชนิดคือ N-acetylmuramic acid และ N-acetylglucosamine ส่วน polypeptide นั้นประกอบด้วยกรดอะมิโน (amino acid) 5 ตัวเชื่อมต่อกัน N-acetylmuramic acid และ Glycine อีก 5 โมเลกุล ยา Antibacterial สามารถที่จะออกฤทธิ์รบกวนในขั้นตอนต่างๆของการสังเคราะห์ Cell wall และทำให้ bacteria ตาย ในที่สุด

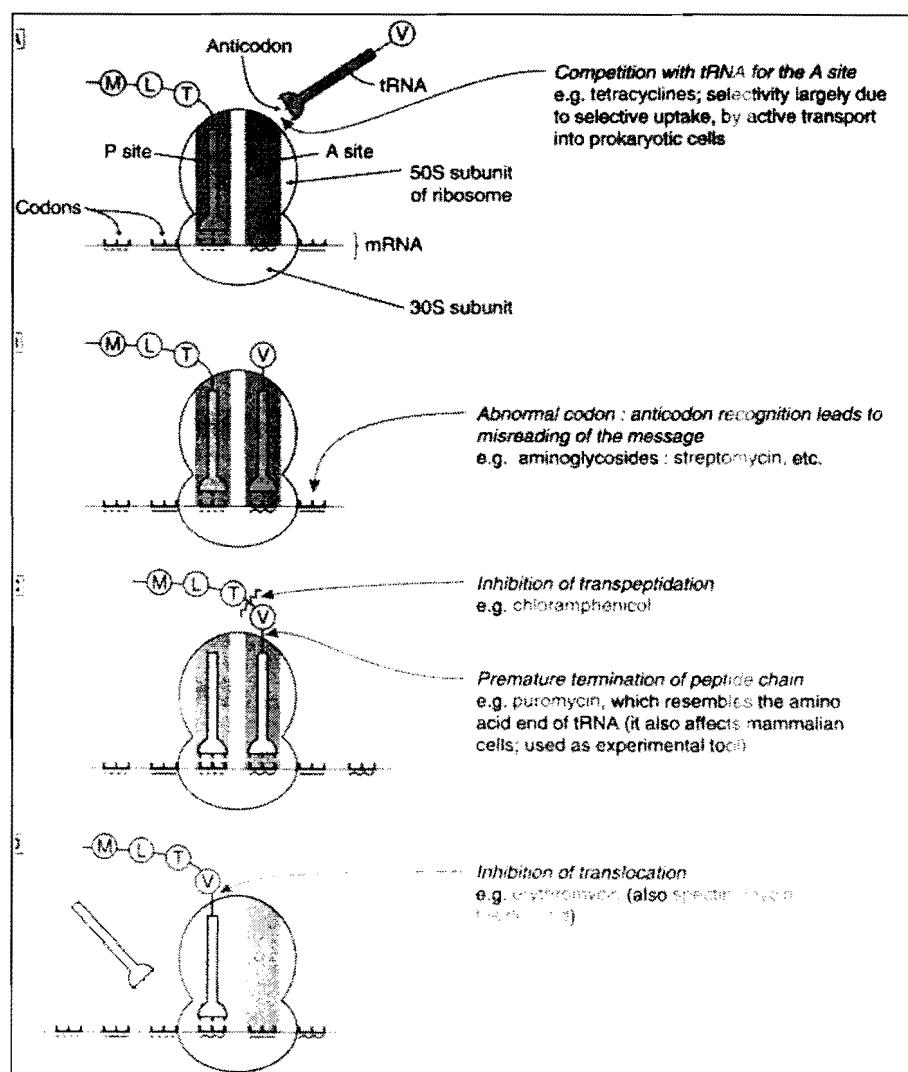
Bacitracin ออกฤทธิ์ขั้นยังการสร้าง cell wall โดยการขับยั่งการกลับมาทำงานของ lipid carrier หลังจากที่ได้ส่งสารที่เป็น building block ของ peptidoglycan ออกไปนอกเซลล์แล้ว Bacitracin มีพิษที่สำคัญคือก่อ nephrotoxicity มีฤทธิ์ต่อเชื้อ gram-positive



ภาพที่ 2.9 Schematic diagram of biosynthesis of peptidoglycan in a bacterial cell with sites of action of various antibiotics (Allison et al., 2002)

2) สารขับยังการสร้างโปรตีน (protein synthesis inhibitors) ขั้นตอนการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย แสดงดังภาพที่ 7 ซึ่งขั้นตอนโดยสรุปคือ อันดับแรก Ribosome มาจับ mRNA และในบริเวณของ P-sites และ A-sites ของ ribosome จะเป็นบริเวณที่ให้ tRNA มาจับบริเวณ P-sites ของ ribosome มี tRNA มีสายของกรดอะมิโนที่ได้จากการอ่านรหัส codon บน mRNA เรียงตัวต่อกัน ต่อมากับ Ribosome เคลื่อนที่ไปตาม mRNA ที่ A-sites ของ ribosome จะมี

tRNA มาจับช่อง tRNA ที่ม่าจับนั้นจะมีความเฉพาะเจาะจงกับ codon บน mRNA (เรียกว่าส่วนที่มีความเฉพาะเจาะจงกับ codon ว่า anticodon) ช่อง tRNA จะนำเอกสารดosome โนที่เฉพาะเจาะจงกับ codon บน mRNA มาด้วย จากนั้นเกิดปฏิกิริยาการเข้ามาร่วมต่อกันระหว่างกรดosome โนบน tRNA บริเวณ P-sites และ A-sites (ปฏิกิริยา transpeptidation) ทำให้กรดosome โนทั้งหมดสามารถยื่น tRNA ที่อยู่บน A-sites แล้ว tRNA บน P-sites ที่ว่าง (ไม่มีกรดosome โนจับ) จะหลุดออกໄไป เกิดการเคลื่อนของ tRNA จาก A-sites ไปยัง P-sites ซึ่ง tRNA นี้มีสายของกรดosome โนต่ออยู่ แล้ว Ribosome เคลื่อนที่ไปบน mRNA อ่าน codon ต่อไปและเกิดเหตุการณ์เช่นนี้ซ้ำอีกจนได้เป็นสายของ peptide และ protein ซึ่งยา Antibacterial ที่ออกฤทธิ์โดยการรบกวนการสังเคราะห์โปรตีนออกฤทธิ์โดยการขัดขวางขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งข้างต้น



ภาพที่ 2.10 Antibiotics which inhibit bacterial protein synthesis (Allison et al., 2002)

3) ขับขึ้นหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane function inhibitors) หน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ทั่วไป คือ เป็น Osmotic barrier คือช่วยป้องกันไม่ให้สารต่างๆเข้าหรือออกจากเซลล์ง่ายเกินไป นอกจากนี้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบขนส่งเพื่อเลือกการนำส่งสารเข้าหรือออกจากเซลล์ ยาที่รบกวนการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์คือ ยากลุ่ม Tryrocidins (เช่น Tryrocidin A) กลุ่ม Gramicidins (เช่น Gramicidins) กลุ่ม Polymyxin (เช่น Polymyxin) Polymyxins เป็นสารพวก Decapeptides ยาไปจับตรงส่วนนอกของเมมเบรน และปลายอิกข้างจะแทรกเข้าไปในชั้นเมมเบรน ทำให้สารต่างๆรั่วออกจากเซลล์จึงผ่านเข้าได้

4) ขับขึ้นการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก (nucleic acid synthesis inhibitors) สารต้านจุลชีพกลุ่ม Quinolones หรือ Fluroquinolones ออกฤทธิ์ขับขึ้นการทำงานของ DNA gyrase และ Topoisomerase II ทำให้ไม่เกิด DNA replication แบคทีเรียจึงตาย เช่น Ciprofloxacin และ สารต้านจุลชีพกลุ่ม Rifampicin สามารถจับ subunit ของ RNA polymerase เพื่อขัดขวางการเพิ่มปริมาณในระหว่างการแบ่งเซลล์

5) รบกวนกระบวนการเมตานอดิสต์ (antimetabolites) สารต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์แบบนี้ส่วนใหญ่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตานอดิสต์ จึงแข่งขันเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้ และการขับขึ้นของยาลักษณะนี้พบว่าสามารถฟื้นกลับสู่สภาพเดิมเมื่อปริมาณยาลดลง ยาหมวดนี้ หรือมี Substrate ที่เอนไซม์ไปยั่งกันจับมากกว่าปกติ Sulfonamides โดยยาจะแย่งจับ Dihydrofolic acid synthetase ทำให้แบคทีเรียไม่มี Folic acid ที่ต้องนำไปใช้สร้าง DNA Trimethoprim (TMP) ที่เป็นตัวขับขึ้น Dihydrofolic acid synthetase เช่นเดียวกับ sulfonamide และขับขึ้นการเปลี่ยน Dihydrofolic acid ไปเป็น Tetrahydrofolic acid เมื่อใช้ร่วมกันจะสามารถฆ่าแบคทีเรียได้

#### 2.4.4 เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. licheniformis*

แบคทีเรีย *B. licheniformis* หลายชนิดที่เซลล์สามารถหลัง lytic enzyme ที่สามารถย่อยลายเซลล์ผู้ต่อต้านได้ เช่น *B. licheniformis* ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ที่ส่งผลบนเซลล์ *P. vulgaris* และ *P. mirabilis* โดยการเตรียมอาหารเหลวของเชื้อ *B. licheniformis* (S, 103 และ 60.4) ทั้ง 3 สายพันธุ์ ผสมกับเซลล์ *P. vulgaris* และ *P. mirabilis* ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ววัดกิจกรรม bacteriolytic activity โดยการวัดค่าความชุ่ม พลของเอนไซม์ทำให้มีการลดลงของค่าดูดกลืนแสง ของสารละลายน้ำ soluble ที่เรียบ 0.01 U/min เป็น 1 Unit ของกิจกรรม bacteriolytic activity ซึ่ง *B. licheniformis* จะมีประสิทธิภาพในการ lysis เซลล์ของเชื้อ *P. vulgaris* และ *P. mirabilis* โดยปฏิกิริยาของกลุ่ม lipopolysaccharide ที่มีประจุลบ บนเยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรียแกรนูลบกับ

bacteriolytic enzymes ที่มีประจุบวก ปฏิกิริยานี้จะบล็อกการการทำงานของเอนไซม์และย่อสลาย ลักษณะของ peptidoglycan และ ความร้อนของเซลล์ที่มีชีวิตربกวน โครงสร้างของเยื่อหุ้มชั้นนอก ของแบคทีเรียแกรนูลบทำให้ hydrolytic enzymes สามารถเข้าถึงและย่อสลายผนังเซลล์ได้ (Ryazanova et al., 2005)

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 ศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเชื้อ *Bacillus licheniformis* และ *Proteus mirabilis*

##### 3.1.1 สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

*B. licheniformis* เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารต้านจุลชีพที่ด้านการเจริญของจุลทรรศ์ได้หลากหลายนิด เช่น รา แบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท เอ็นเอสทีในโอลูเก็ตโน โลดี จำกัด

*P. mirabilis* เป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซแอมโมเนีย และก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งก๊าซทั้งสองเป็นก๊าซที่ก่อปัญหามลพิษทางกลิ่นเหม็น ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลสรรพสิทธิประเสริฐ จังหวัดอุบลราชธานี

##### 3.1.2 การย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain) (มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี)

ทำการทดสอบสไลด์ และเช็คให้แห้ง เตรียมรอบสเมียร์เชือให้ทั่วสไลด์และตรึงเซลล์ด้วยความร้อน หขดสี Crystal violet ให้ทั่วรอบสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ลงในอ่างน้ำ แล้วจะด้วยสารละลายไอโซดีน หลังจากนั้นหยดสารสารละลายไอโซดีนให้ทั่วรอบสเมียร์ และทิ้งไว้นาน 1 นาที จากนั้นเทสารละลายไอโซดีนทิ้ง แล้วจะด้วยสารละลายแอลกออล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมาก แต่อ่อนๆให้เกิน 20 วินาที แล้วถางน้ำทันทีโดยให้น้ำผ่านเบาๆ ขับด้วยกระดาษซับ และย้อมทับด้วยการหขดสี Safranin ให้ทั่วรอบสเมียร์ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสีทิ้ง ถางด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษซับ วางทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

##### 3.1.3 การทดสอบ Biochemical test (มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี)

3.1.3.1 Triple sugar iron test (TSI) ทดสอบความสามารถในการผลิต H<sub>2</sub>S ด้วย TSI ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิด คือ glucose ร้อยละ 0.1, lactose ร้อยละ 1 และ sucrose ร้อยละ 1 โดยเพียงเชือลงบนผิว slant ลักษณะ tail fish แล้วแห้ง loop นั้นจะคลุบไปดึงกันหลอด แล้ว incubate ที่ 37°C เป็นระยะเวลา 18 - 24 ชั่วโมง ถ้าเชือสร้าง H<sub>2</sub>S จะทำปฏิกิริยากับ Ferrous ion ที่มีอยู่ใน media ได้ ferrous sulfide ทำให้เกิดเป็นตะกอนสีดำขึ้น

3.1.3.2 Urease test เป็นการทดสอบหา Urease enzyme ซึ่งจะสามารถ Hydrolyze urea ให้ได้แอมโมเนียซึ่งจะทำให้มี pH สูงขึ้นโดยเพิ่มเชื้อลงบนผิว slant แล้ว incubate ที่ 37°C เป็นระยะเวลา 18 - 24 ชั่วโมงอ่านผล โดยจะเกิดการเปลี่ยนสี indicator (Phenol red) เป็นสีแดงหรือสีชมพู

#### 3.1.4 การเตรียม Fresh culture

Fresh culture ของเชื้อ *B. licheniformis* หรือ *P. mirabilis* ถูกเตรียมโดยถ่ายแต่ละเชื้อจากอาหาร NA slant ลงในอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรนำไปบ่มเพ่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่ อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจึงนำวัดการเจริญด้วยค่าความชุ่ม ( $OD_{600nm}$ ) แล้วปรับค่าความชุ่มเริ่มต้นเป็น 0.5 ก่อนที่จะนำไปใช้ในการทดลองอื่นๆต่อไป

### 3.2 กราฟมาตราฐานการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis*

กราฟมาตราฐานการเจริญทำเพื่อหาความสัมพันธ์ของการเจริญทั้ง 3 แบบ ได้แก่ ค่าความชุ่ม ( $OD_{600nm}$ ) น้ำหนักแห้ง (mgCDW/L) และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml) ซึ่งจะมีความสอดคล้องระหว่างกัน ง่าย และ ประยุกต์เวลาสำหรับการทดลองวัดการเจริญ โดยนำ Fresh culture ของเชื้อแบบที่เรียบ *B. licheniformis* หรือ *P. mirabilis* เพาะเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (3 ช้อน) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นข้อมูลที่ได้จะนำมาทำการเจือจางดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 อัตราการเจือจาง Cell culture (*B. licheniformis* หรือ *P. mirabilis*)

อัตราการเจือจาง	Cell culture ( <i>B. licheniformis</i> หรือ <i>P. mirabilis</i> )	NB
ไม่เจือจาง	100 มิลลิลิตร	0 มิลลิลิตร
2 เท่า	50 มิลลิลิตร	50 มิลลิลิตร
5 เท่า	20 มิลลิลิตร	80 มิลลิลิตร
10 เท่า	10 มิลลิลิตร	90 มิลลิลิตร
25 เท่า	4 มิลลิลิตร	96 มิลลิลิตร
50 เท่า	2 มิลลิลิตร	98 มิลลิลิตร
100 เท่า	1 มิลลิลิตร	99 มิลลิลิตร

นำมาวัดการเจริญ 3 แบบ ได้แก่ วัดค่าความชุน ( $OD_{590nm}$ ) ชั่งน้ำหนักแห้ง (mgCDW/L) ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml) และวัดความสัมพันธ์ของการเจริญทั้ง 3 แบบ

### 3.3 การเจริญและการผลิตสารต้านจุลชีพของเชื้อ *B. licheniformis* ที่อุณหภูมิ $37^{\circ}\text{C}$

ถ่าย Fresh culture ของ *B. licheniformis* ร้อยละ 1.0 โดยปริมาตรต่อปริมาตรอาหาร NB 50 มิลลิลิตรจำนวน 12 ฟลาสก์ (ทำ 3 ชั้้า) นำไปบ่มเพาะที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เก็บตัวอย่างทุกๆ 4 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมงนำมามาวัดการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* ด้วยการวัดค่าความชุน ( $OD_{590nm}$ ) ชั่งน้ำหนักแห้ง (mgCDW/L) ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml) และติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่า pH จากนั้นนำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาปั่นให้เขียวที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีนาน 15 นาที แยกเอาส่วน cell free supernatant (CFS) ของ *B. licheniformis* มากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตรจะได้สาร CFS ตั้งแต่ T0 - T48 แล้วเก็บไว้ตัวเชิงปริมาณของสาร CFS โดยทดสอบกิจกรรมการต้านจุลชีพ (Qualitative antimicrobial activity) เก็บที่อุณหภูมิ  $-4^{\circ}\text{C}$

### 3.4 อุณหภูมิที่ส่งผลต่อ กิจกรรมต้านจุลชีพและการเจริญของ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis*

#### 3.4.1 อุณหภูมิที่ส่งผลต่อ กิจกรรมต้านจุลชีพของสาร CFS จาก *B. licheniformis*

นำ Fresh culture เชื้อ *P. mirabilis* ร้อยละ 1.0 โดยปริมาตรต่อปริมาตรอาหาร หลอม NA 15 มิลลิลิตรผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่องอาหารแข็ง แล้ววางแผ่น paper dish เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 มิลลิเมตรบนผิวอาหารในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจากนั้นคุณ Fresh culture ของเชื้อ *B. licheniformis* ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสาร CFS ของเชื้อ *B. licheniformis* (จากข้อ 3.3 เก็บที่เวลา 24 ชั่วโมง) ปริมาตร 20 ไมโครลิตรหยดลงบนแผ่น paper dish รอให้ผิวน้ำอาหารแห้งจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 6 ระดับ ได้แก่ 25, 30, 35, 40, 45, 50 และ  $55^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24 - 36 ชั่วโมง แล้ววัด Inhibition zone และ Growth zone โดยการใช้ scale millimeter (ดัดแปลงมาจาก He et al., 2006 และ Guo et al., 2012)

#### 3.4.2 อุณหภูมิที่ส่งผลต่อการเจริญของ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis*

นำ Fresh culture ของเชื้อ *B. licheniformis* หรือ *P. mirabilis* ร้อยละ 1.0 โดยปริมาตรต่อปริมาตรอาหาร NB 50 มิลลิลิตรจำนวน 7 ฟลาสก์ (ทำ 3 ชั้้า) บ่มเพาะที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 7 ระดับ ได้แก่ 25, 30, 35, 40, 45, 50 และ  $55^{\circ}\text{C}$  เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง นำมามาวัดการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis* ด้วยค่าความชุน

( $OD_{600nm}$ ) และวัดค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไปโดยทำการทดสอบ 3 ชั้นให้นำแต่ละชั้นาวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดสอบ 2 ครั้ง และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์สถิติโดยใช้โปรแกรม SAS ด้วยวิธี Duncan's multiple-range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

### 3.4.3 การวัดเชิงปริมาณของสาร CFS ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* โดยทดสอบกิจกรรมการต้านจุลชีพ

นำ Fresh culture เชื้อ *P. mirabilis* ร้อยละ 1.0 โดยปริมาตรต่อปริมาตรอาหารหลอก NA 15 มิลลิลิตรผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่องอาหารแข็ง แล้ววางแผ่น paper dish เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 มิลลิเมตรบนผิวอาหารในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นดูด CFS ของ *B. licheniformis* (จากข้อ 3.3 เก็บที่ T0 - T48) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หลอดบนแผ่น paper dish รอให้ผิวน้ำอาหารแห้งจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 24 - 36 ชั่วโมง แล้ววัด Inhibition zone และ Growth zone โดยใช้ scale millimeter (ดัดแปลงมาจาก He et al., 2006 และ Guo et al., 2012)

## 3.5 pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis*

### 3.5.1 pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis*

เตรียมอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่ถูกปรับ pH เป็น 4 ระดับ ได้แก่ 3.0, 5.0, 7.0 และ 9.0 จากนั้นถ่าย Fresh culture เชื้อ *B. licheniformis* ร้อยละ 1.0 โดยปริมาตรต่อปริมาตรอาหาร NB 50 มิลลิลิตร โดยแต่ละระดับ pH ทำจำนวน 12 ฟลาสก์ (3 ชั้น) นำไปบ่มเพย์ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 35°C เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมงจนครบ 36 ชั่วโมงนำมาวัดค่าการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* ด้วยความถี่ ( $OD_{600nm}$ ) และวัดค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไป โดยทำการทดสอบ 3 ชั้นให้นำแต่ละชั้นาวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดสอบ 2 ครั้งนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณผลศาสตร์และวิเคราะห์สถิติโดยใช้โปรแกรม SAS ด้วยวิธี Duncan's multiple-range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

### 3.5.2 pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis*

เตรียมอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่ถูกปรับ pH เป็น 6 ระดับ ได้แก่ 3.0, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0 และ 9.0 จากนั้นถ่าย Fresh culture เชื้อ *P. mirabilis* ร้อยละ 1.0 โดยปริมาตรต่อปริมาตรอาหาร NB 50 มิลลิลิตร โดยแต่ละระดับ pH ทำจำนวน 12 ฟลาสก์ (3 ชั้น) นำไปบ่มเพย์ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 35 และ 45°C เก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมงจนครบ 24 ชั่วโมงนำมาวัดค่าการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* ด้วยความถี่ ( $OD_{600nm}$ ) และวัดค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไป โดยทำการทดสอบ 3 ชั้นให้นำแต่ละชั้นาวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดสอบ 2 ครั้งนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณ

จนพอกศาสตร์ และวิเคราะห์สถิติโดยใช้โปรแกรม SAS ด้วยวิธี Duncan's multiple-range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

### 3.6 แหล่งการบ่อนและแหล่งในโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis*

ตารางที่ 3.2 แหล่งการบ่อนและแหล่งในโตรเจนที่ศึกษา

แหล่งการบ่อน	แหล่งในโตรเจน
NB	NB
NB เติม glucose ร้อยละ 1.0	NB เติม urea ร้อยละ 1.0
NB เติม sucrose ร้อยละ 1.0	NB เติม peptone ร้อยละ 1.0
NB เติม starch (potato starch) ร้อยละ 1.0	NB เติม Ammonium nitrate ร้อยละ 1.0
-	NB เติม Ammonium sulfate ร้อยละ 1.0

เตรียมอาหารเหลว NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่ปรับเริ่มต้นเป็น pH 7.0 ดังตารางที่ 3.2 แล้วถ่าย Fresh culture เชื้อ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis* ร้อยละ 1.0 โดยปริมาตรต่อปริมาตรอาหาร NB 50 มิลลิลิตร (ทำ 3 ขั้น) บ่มเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 35°C เก็บตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง นำมารวัดการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis* ด้วยค่าความทึบ (OD<sub>600nm</sub>) และวัดค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไป โดยการทดลอง 3 ขั้นให้นำแต่ละขั้นมาวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลอง 2 ครั้ง และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์สถิติโดยใช้โปรแกรม SAS ด้วยวิธี Duncan's multiple-range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

### 3.7 ปัจจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญของ *P. mirabilis*

#### 3.7.1 การเพาะเลี้ยง *B. licheniformis* เพื่อผลิต Cell-free supernatant (CFS)

นำ Fresh culture ของ *B. licheniformis* มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมงนำมารวัดการเจริญด้วยค่าความทึบ (OD<sub>600nm</sub>) ข้อมูลที่ได้จะนำมาตรวจสอบการปนเปื้อน และวัดค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไป จากนั้นแยกเอาส่วน CFS โดยนำไปปั่นหักที่ 10,000 รอบต่อนาที แล้วแยกเอาส่วนใสมากรองผ่านกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตรใส่ขวด sterile เก็บแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -4°C

### 3.7.2 ปริมาณสารที่เหมาะสมในการออดกุธิ์ด้านการเจริญของ *P. mirabilis*

นำ CFS ของ *B. licheniformis* จากการทดลองที่ 3.7.1 มาทำการทดสอบสารละลายนั้นในคราบต่างกัน 2 ระดับ ได้แก่ 35 และ 45°C ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมารวัดค่าการเจริญด้วยความสูญ (OD<sub>600nm</sub>)

**ตารางที่ 3.3 อัตราการทดสอบสารละลายนในการทดสอบปริมาณ CFS จาก *B. licheniformis* ที่เหมาะสมในการออดกุธิ์ด้านการเจริญของ *P. mirabilis***

CFS (%)	CFS (มิลลิลิตร)	ร้อยละ 7.5 NB pH 7.0 (มิลลิลิตร)	Sterile distilled water (มิลลิลิตร)	Fresh culture of <i>P. mirabilis</i> (มิลลิลิตร)
0	0	2	7.9	100
5	0.5	2	7.4	100
10	1	2	6.9	100
25	2.5	2	6.4	100
50	5	2	2.9	100
75	7.5	2	0.4	100

หมายเหตุ \* CFS คือ Cell-free supernatant of *B. licheniformis*

### 3.7.3 การศึกษาประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญของ *P. mirabilis*

ศึกษา CFS ของ *B. licheniformis* ความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 35°C และความเข้มข้นร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 45°C ในอาหาร NB โดยทดสอบสารละลายนั้นดังตารางที่ 3.2 แล้วเติมเชื้อ *P. mirabilis* ร้อยละ 1.0 โดยปริมาตรต่อปริมาตรอาหาร NB บ่มที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีแล้วติดตามการเจริญทุกๆ 1 ชั่วโมง โดยนำมารวัดค่าการเจริญด้วยความสูญ (OD<sub>600nm</sub>) และติดตามค่า pH จนครบ 12 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ชั้้าให้น้ำแต่ละชั้้ามีเคราะห์ซึ่งมูลผลการทดลอง 2 ครั้งนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณจลนผลศาสตร์ และวิเคราะห์สถิติโดยใช้โปรแกรม SAS ด้วยวิธี Duncan's multiple-range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

### 3.7.4 การศึกษาฤทธิ์ของสาร CFS ที่ผลิตจากเชื้อ *B. licheniformis* ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *P. mirabilis*

นำ Culture ของ *P. mirabilis* จากข้อ 3.7.3 ที่เวลา 12 ชั่วโมงนาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร NA นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 35°C นาน 18 - 24 ชั่วโมงและสังเกตว่ามีการเจริญของ *P. mirabilis* บนอาหาร NA หรือไม่

### 3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

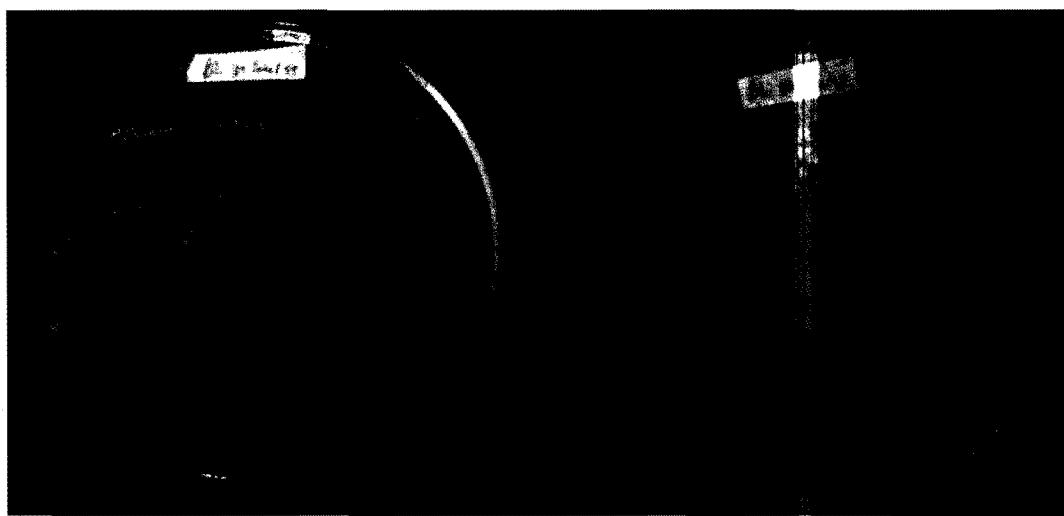
คำนวณจำนวนพลศาสตร์ และวิเคราะห์สถิติโดยใช้โปรแกรม SAS ด้วยวิธี Duncan's multiple-range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

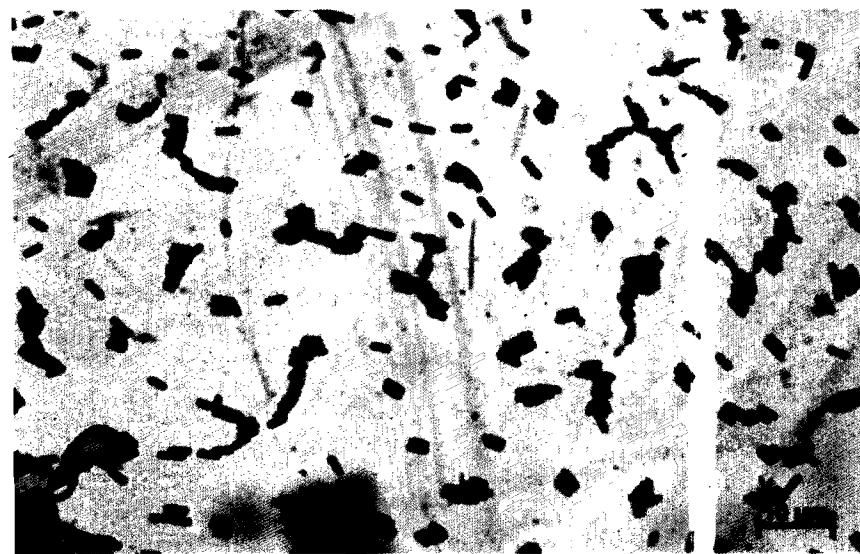
#### 4.1 การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของ *Bacillus licheniformis* และ *Proteus mirabilis*

จากการเพาะเลี้ยง *B. licheniformis* ในอาหาร Nutrient Agar (NA) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบร่วงโคลoni มีลักษณะกลม สีขาวซุ่ม ขอบโคลoni ไม่สม่ำเสมอ ผิวน้ำนมขึ้นจากอาหารเดียงเชื้อ แผ่นผิวน้ำแห้ง ข้างในเป็นเมือกเหนียวสีขาวใส



ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคลoni ของแบคทีเรีย *B. licheniformis* ที่เจริญบนอาหาร NA

เมื่อนำมาขึ้นสีแกรมและตรวจส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย *B. licheniformis* พบร่วงแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์มีลักษณะเป็นรูปแท่ง สร้างสปอร์อยู่ที่ตำแหน่งตรงกลาง (central) ใกล้ตรงกลาง (paracentral) และอยู่ค่อนไปทางเซลล์ (subterminal) สปอร์ไม่บวมเป็ง พบรอยเป็นเซลล์เดียวหรือเรียงตัวเป็นสาย



ภาพที่ 4.2 ลักษณะรูปร่างเซลล์ของ *B. licheniformis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า  
(Bar = 10 $\mu$ m)

จากการเพาะเลี้ยง *P. mirabilis* ในอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบร้าโคโลนีมีลักษณะเป็นจุดกลมเด็กๆ เท่าปลายเข็มหมุด โคลoniสีขาวใส ขอนเรียบ ผิวน้ำนม ขึ้นจากผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำมาข้อมสีเกรมและตรวจสอนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า) เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย *P. mirabilis* พบร้าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์เป็นรูปเท่งสัน พนอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือกรุจกรุจาย



ภาพที่ 4.3 ลักษณะรูปร่างเซลล์ของ *P. mirabilis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า  
(Bar = 10 $\mu$ m)

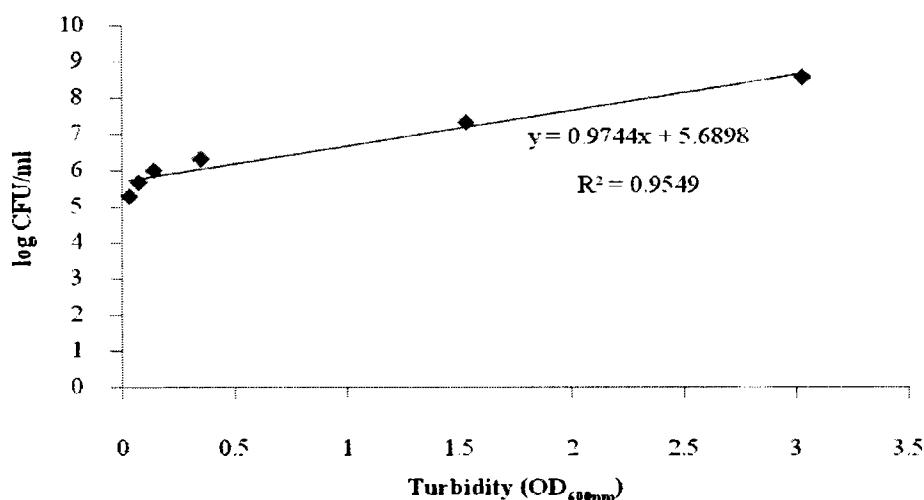
เมื่อนำมาทดสอบการสร้างกําชไสโครเจนซัลไฟฟ์โดยเพาะเลี้ยง *P. mirabilis* ในอาหาร Triple sugar iron ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิด คือ glucose ร้อยละ 0.1, lactose ร้อยละ 1 และ sucrose ร้อยละ 1 โดยทดสอบการสร้างกําชแอนโนเนียเพาะเลี้ยงใน Urea agar base บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง พบว่า *P. mirabilis* สามารถย่อยน้ำตาลที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบภายในสภาวะไม่มีออกซิเจนสร้างเป็นกําชไสโครเจนซัลไฟฟ์ดังแสดงในภาพที่ 4A อาหารสีส้มแดงจะถูกเปลี่ยนเป็นสีดำ และสามารถสร้าง Urease enzyme ที่จะย่อยญี่เริขในอาหารเปลี่ยนเป็นกําชแอนโนเนียดังแสดงในภาพที่ 4B อาหารสีเหลืองส้มจะถูกเปลี่ยนเป็นสีชมพู (สีบานเย็น)



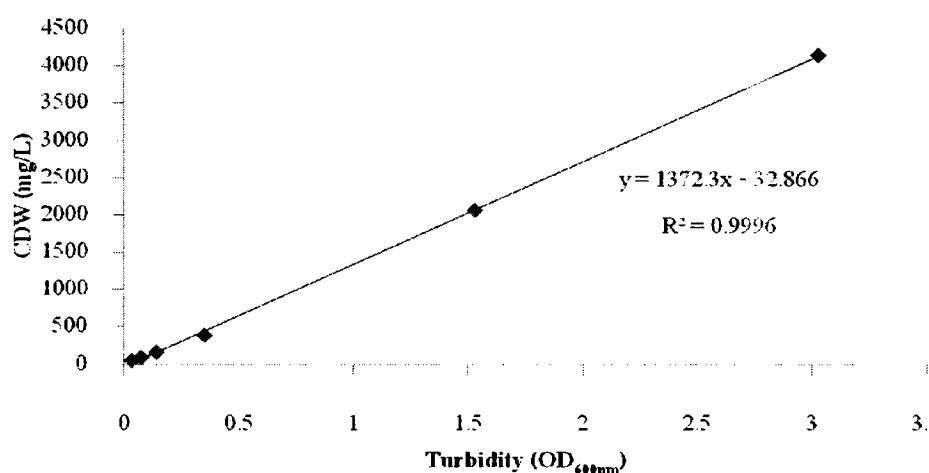
ภาพที่ 4.4 การทดสอบการสร้างกําชไสโครเจนซัลไฟฟ์ (A) และทดสอบการสร้างกําชแอนโนเนีย (B)

#### 4.2 กราฟนาฬิกาการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis*

นำเชื้อ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis* มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่อุณหภูมิ 35°C ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางด้วยอาหาร NB เป็น 6 ระดับ ได้แก่ ไม่เจือจาง, 5 เท่า, 10 เท่า, 25 เท่า, 50 เท่า และ 100 เท่า แล้ววัดการเจริญ 3 แบบ ได้แก่ วัดค่าความขุ่น ( $OD_{600nm}$ ) ชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์ (mg CDW/L) ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml) แล้วหาความสัมพันธ์ของการวัดการเจริญทั้ง 3 แบบ พบร่วมกับความสัมพันธ์ของการเจริญดังแสดงในภาพที่ 4.5, 4.6, 4.7 และ 4.8

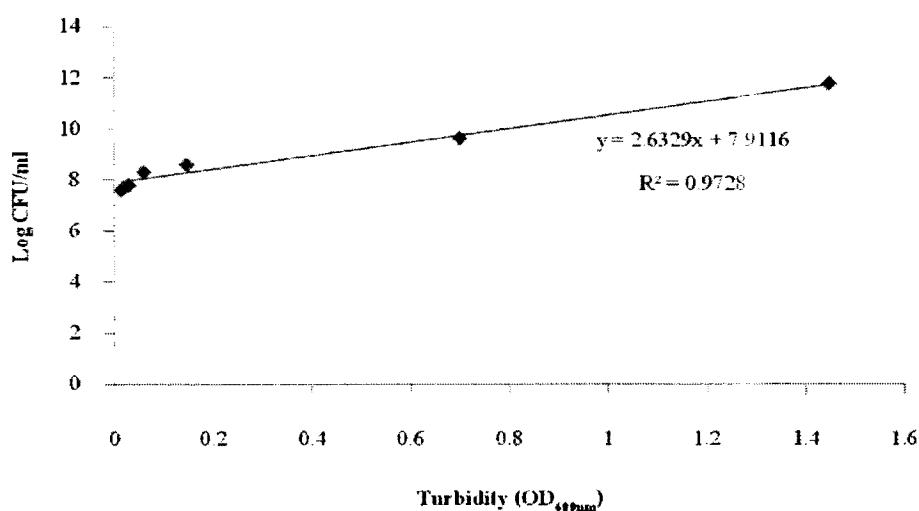


ภาพที่ 4.5 ความสัมพันธ์การเจริญของ *B. licheniformis* ระหว่างค่าความชุ่น ( $OD_{600nm}$ ) กับ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml)

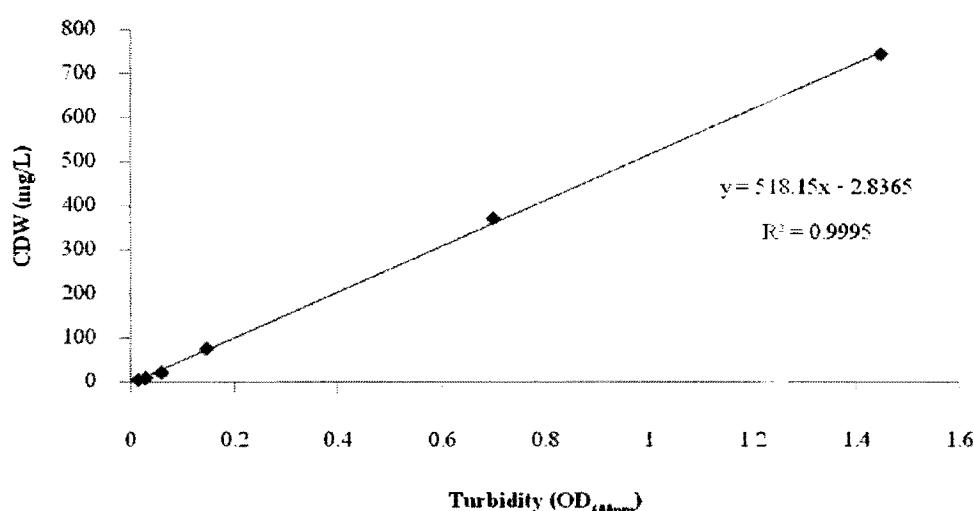


ภาพที่ 4.6 ความสัมพันธ์การเจริญของ *B. licheniformis* ระหว่างค่าความชุ่น ( $OD_{600nm}$ ) กับน้ำหนักแห้งของเซลล์ (mgCDW/L)

จากผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.5 และ 4.6 พบร่วมกัน ความสัมพันธ์การเจริญของ *B. licheniformis* แบบแบ่งเป็นสองส่วน เมื่อทราบความสัมพันธ์ของการเจริญแล้วการทดลองในครั้งต่อไปจึงสามารถเลือกวัดการเจริญเพียงแบบเดียวเพื่อคำนวณหาความสัมพันธ์กับการเจริญแบบอื่นๆ โดยใช้สมการเส้นตรง  $y = 0.9744x + 5.6898$  ( $R^2 = 0.9549$ ) สำหรับหาความสัมพันธ์การเจริญของ *B. licheniformis* ระหว่าง  $x$  = ค่าความชุ่น ( $OD_{600nm}$ ) กับ  $y$  = จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml) และใช้สมการเส้นตรง  $y = 1372.3x - 32.866$  ( $R^2 = 0.9996$ ) สำหรับหาความสัมพันธ์การเจริญของ *B. licheniformis* ระหว่าง  $x$  = ค่าความชุ่น ( $OD_{600nm}$ ) กับ  $y$  = น้ำหนักแห้งของเซลล์ (mgCDW/L)



ภาพที่ 4.7 ความสัมพันธ์การเจริญของ *P. mirabilis* ระหว่างค่าความชุ่น (OD<sub>600nm</sub>) กับ จำนวนเชลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml)

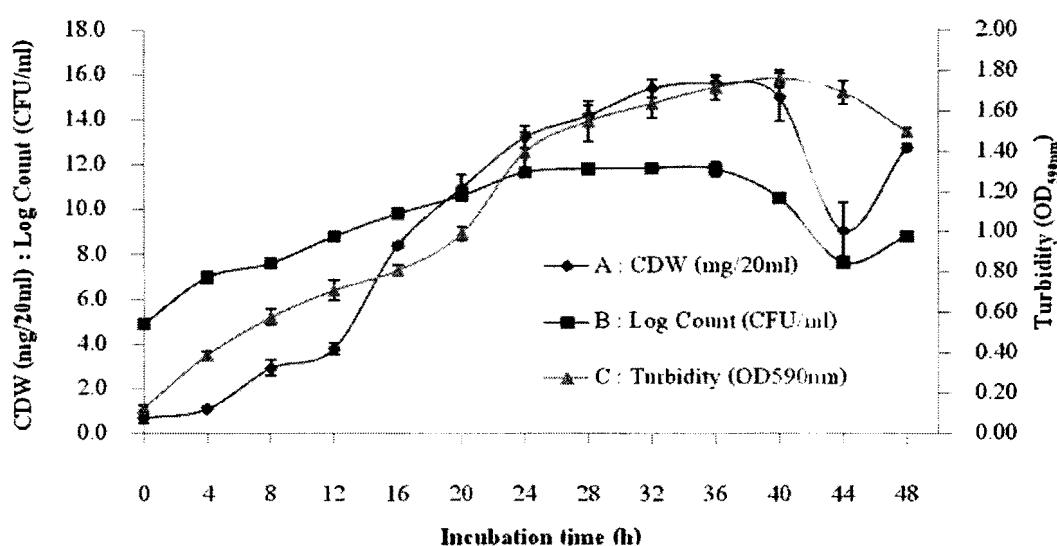


ภาพที่ 4.8 ความสัมพันธ์การเจริญของ *P. mirabilis* ระหว่างค่าความชุ่น (OD<sub>600nm</sub>) กับน้ำหนักแห้งของเชลล์ (mgCDW/L)

จากผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.7 และ 4.8 สามารถใช้สมการเส้นตรง  $y = 2.6329x + 7.9116$  ( $R^2 = 0.9728$ ) สำหรับหาความสัมพันธ์การเจริญของ *P. mirabilis* ระหว่าง  $x =$  ค่าความชุ่น (OD<sub>600nm</sub>) กับ  $y =$  จำนวนเชลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml) และใช้สมการเส้นตรง  $y = 518.15x - 2.8365$  ( $R^2 = 0.9995$ ) สำหรับหาความสัมพันธ์การเจริญของ *P. mirabilis* ระหว่าง  $x =$  ค่าความชุ่น (OD<sub>600nm</sub>) กับ  $y =$  น้ำหนักแห้งของเชลล์ (mgCDW/L)

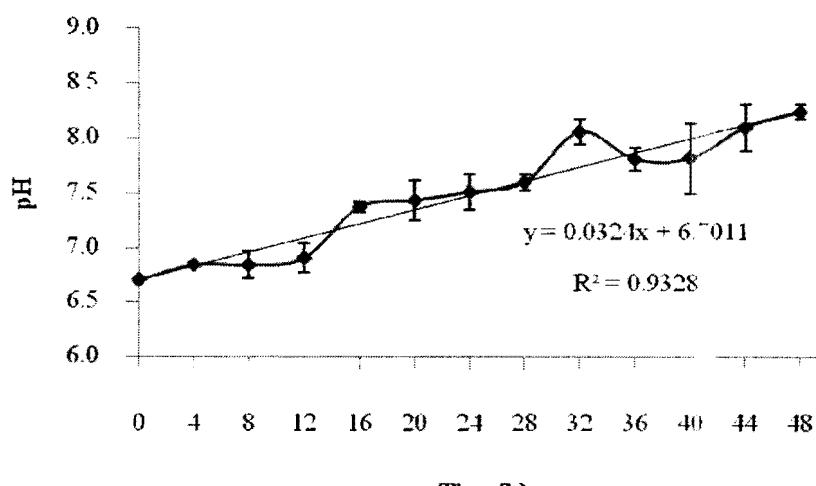
#### 4.3 การเจริญและการผลิตสารต้านจุลชีพของเชื้อ *Bacillus licheniformis*

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ในอาหาร NB ค่า pH 6.8 - 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็ว 150 รอบต่อนาที พบร่วมเชื้อเจริญในช่วง Lag phase ที่เวลา 0 - 4 ชั่วโมง เจริญในช่วง Log phase ที่เวลา 4 - 24 ชั่วโมง เข้าสู่ Stationary growth phase หลังจาก 24 ชั่วโมง แล้วค่อยลดลงดังแสดงในภาพที่ 4.9



ภาพที่ 4.9 การเจริญของ *B. licheniformis* ในอาหาร NB ที่อุณหภูมิ 37°C

การเปลี่ยนแปลง pH ของอาหาร NB ในระหว่างการเจริญของ *B. licheniformis* จาก pH เริ่มต้นในช่วง 6.8 - 7.0 พบร่วม pH มีการเปลี่ยนแปลงในแนวโน้มเป็นค่าเพิ่มขึ้นดังแสดงในภาพที่ 4.10

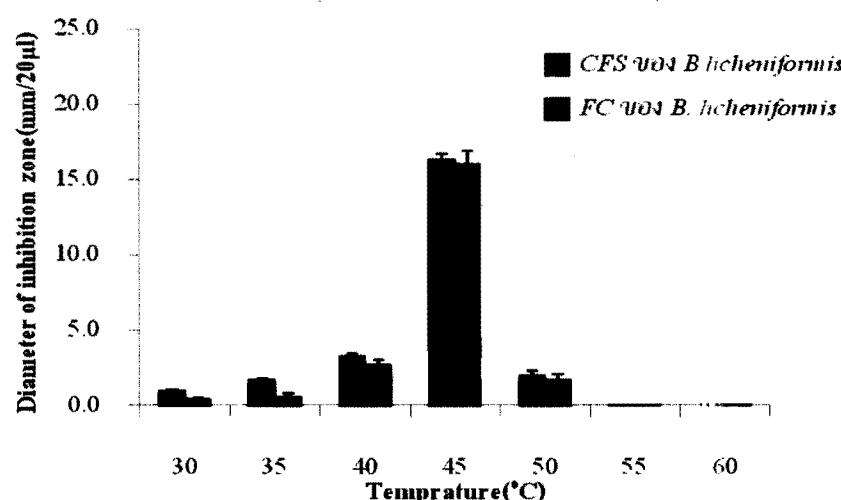


ภาพที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลง pH ของอาหาร NB ในระหว่างการเจริญของ *B. licheniformis*

#### 4.4 อุณหภูมิที่ส่งผลต่อการทดลองการต้านจุลชีพของสาร cell-free supernatant (CFS) และ การเจริญของ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis*

##### 4.4.1 อุณหภูมิที่ส่งผลต่อการทดลองการต้านจุลชีพของสาร CFS จาก *B. licheniformis*

จากการทดสอบกิจกรรมการต้านจุลชีพของสาร CFS ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* และ FC ของ *B. licheniformis* ที่อุณหภูมิต่างกันในอาหาร NA ค่า pH 7.0 พบว่าที่อุณหภูมิ 45°C CFS และ FC ขับยั้งการเจริญของ *P. mirabilis* ได้สูงสุด โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone เท่ากับ  $16.3 \pm 0.41$  มิลลิเมตร และ  $16 \pm 0.90$  มิลลิเมตร ตามลำดับ ขณะที่อุณหภูมิ 30, 35, 40 และ 50°C ขับยั้งการเจริญของ *P. mirabilis* ได้ในระดับต่ำ ส่วนที่อุณหภูมิ 55°C ไม่พบกิจกรรมขับยั้ง การเจริญ *P. mirabilis* เนื่องจาก *P. mirabilis* ไม่แสดงการเจริญคงภาพที่ 4.11 และตารางที่ 4.1



ภาพที่ 4.11 อุณหภูมิที่ส่งผลต่อการทดลองการต้านจุลชีพของสาร CFS และ FC จาก *B. licheniformis*

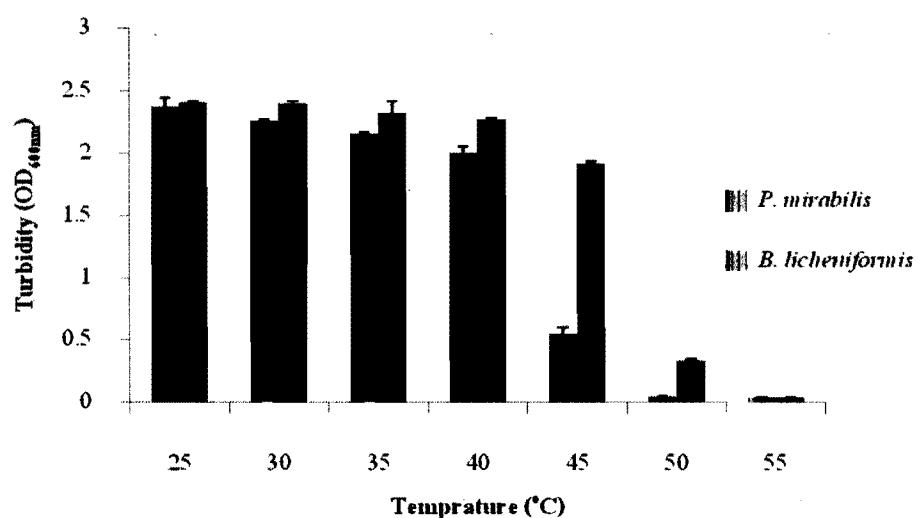
ตารางที่ 4.1 อุณหภูมิส่งผลต่อการทดลองการต้านจุลชีพของสาร CFS และ FC จาก *B. licheniformis*

อุณหภูมิ (°C)	เส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone (มิลลิเมตร/20 ไมโครลิตร)	
	CFS	FC
30	$1.0 \pm 0.09^{EF}$	$0.4 \pm 0.09^{FG}$
35	$1.7 \pm 0.09^{CD}$	$0.6 \pm 0.19^{FG}$
40	$3.3 \pm 0.10^B$	$2.7 \pm 0.31^B$
45	$16.3 \pm 0.41^A$	$16 \pm 0.90^A$
50	$2.0 \pm 0.30^C$	$1.3 \pm 0.39^{DE}$
55	$0.1 \pm 0.01^G$	$0.1 \pm 0.00^G$

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $P>0.05$ )

#### 4.4.2 อุณหภูมิที่ส่งผลต่อการเจริญของ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis*

จากการศึกษาอุณหภูมิที่ส่งผลต่อการเจริญของ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis* ในอาหาร NB ค่า pH 7.0 ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 6 ระดับได้แก่ 30, 35, 40, 45, 50 และ 55°C พนวจว่า *P. mirabilis* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 - 40°C โดยมีการเจริญได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 25 - 30°C และมีการเจริญได้ในระดับสูงที่อุณหภูมิ 35°C และ 40°C ส่วนอุณหภูมิ 45°C พนวจว่ามีการเจริญในระดับต่ำ และไม่พบการเจริญของ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ 50 - 60°C สำหรับ *B. licheniformis* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 - 45°C โดยพนวจว่ามีการเจริญได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 25 - 35°C และมีการเจริญได้ในระดับสูงที่อุณหภูมิ 40°C และ 45°C ส่วนที่อุณหภูมิ 50°C พนวจว่ามีการเจริญในระดับต่ำ และไม่พบการเจริญของ *B. licheniformis* ที่อุณหภูมิ 55°C ดังแสดงในภาพที่ 4.12 และตารางที่ 4.2



ภาพที่ 4.12 อุณหภูมิที่ส่งผลต่อการเจริญของ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis*

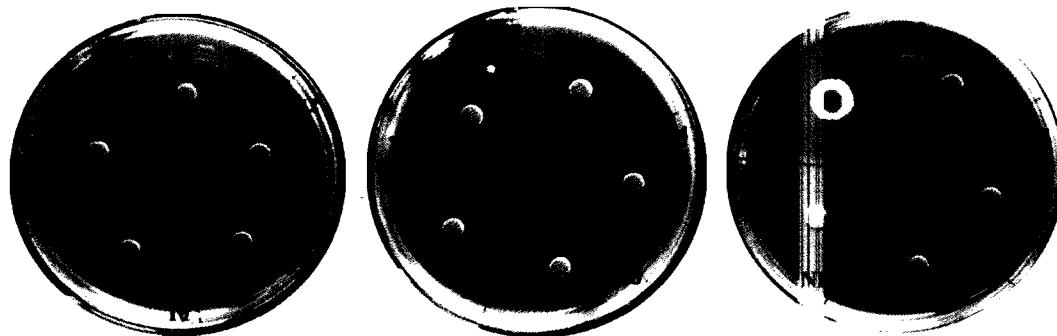
ตารางที่ 4.2 อุณหภูมิที่ส่งผลต่อการเจริญของ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis*

อุณหภูมิ (°C)	การเจริญของเชื้อ (OD <sub>600nm</sub> )	
	<i>P. mirabilis</i>	<i>B. licheniformis</i>
30	2.26 ± 0.067 <sup>A</sup>	2.34 ± 0.02 <sup>A</sup>
35	2.15 ± 0.002 <sup>A</sup>	2.32 ± 0.09 <sup>A</sup>
40	2.00 ± 0.048 <sup>B</sup>	2.27 ± 0.007 <sup>A</sup>
45	0.55 ± 0.047 <sup>C</sup>	1.91 ± 0.015 <sup>B</sup>
50	0.046 ± 0.004 <sup>D</sup>	0.33 ± 0.004 <sup>C</sup>
55	0.03 ± 0.003 <sup>D</sup>	0.03 ± 0.005 <sup>D</sup>

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในแนวสค暮ร์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ( $P>0.05$ )

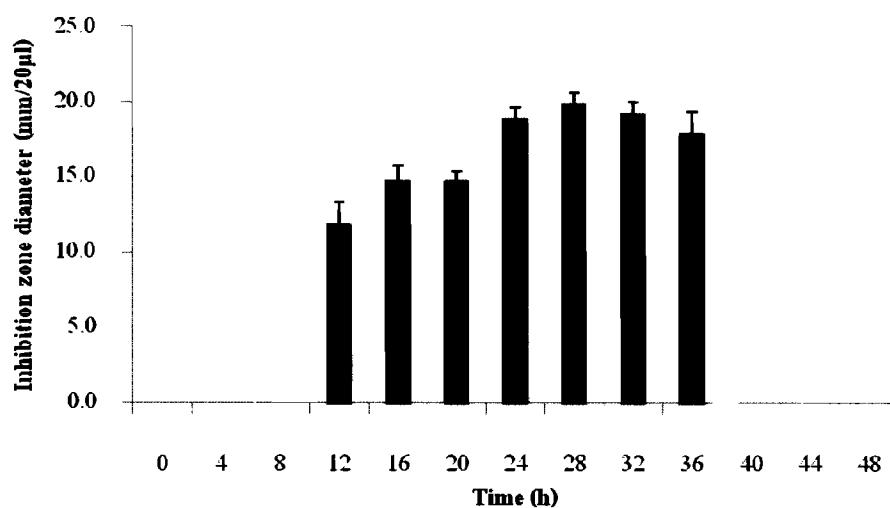
#### 4.4.3 การวัดเชิงปริมาณสาร CFS ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* โดยทดสอบกิจกรรมการต้านจุลชีพ

เมื่อนำสารต้านจุลชีพ CFS ที่ถูกเก็บทุกๆ 4 ชั่วโมงตั้งแต่ T0 - T48 มาทดสอบกิจกรรมการต้านจุลชีพ (Qualitative antimicrobial activity) กับเชื้อ *P. mirabilis* ที่มีค่าความชุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 บ่มที่อุณหภูมิ 45°C พบร่วมกับ *B. licheniformis* แสดงกิจกรรมการขับยั้งการเจริญของ *P. mirabilis* ซึ่งจะสังเกตจากการเกิด Inhibition zone ดังแสดงในภาพที่ 4.13



ภาพที่ 4.13 กิจกรรมของสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ในการขับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* ในอาหาร NA อุณหภูมิ 45°C (T: Time (h))

เมื่อวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone พบร่วมกับการเจริญของเชื้อในช่วง Exponential growth phase ที่เวลา 12 ชั่วโมง และมีการผลิตสารได้มากที่สุด ในระหว่างการเจริญในช่วง Early stationary growth phase ที่เวลา 24 - 36 ชั่วโมง แสดงในภาพที่ 4.14

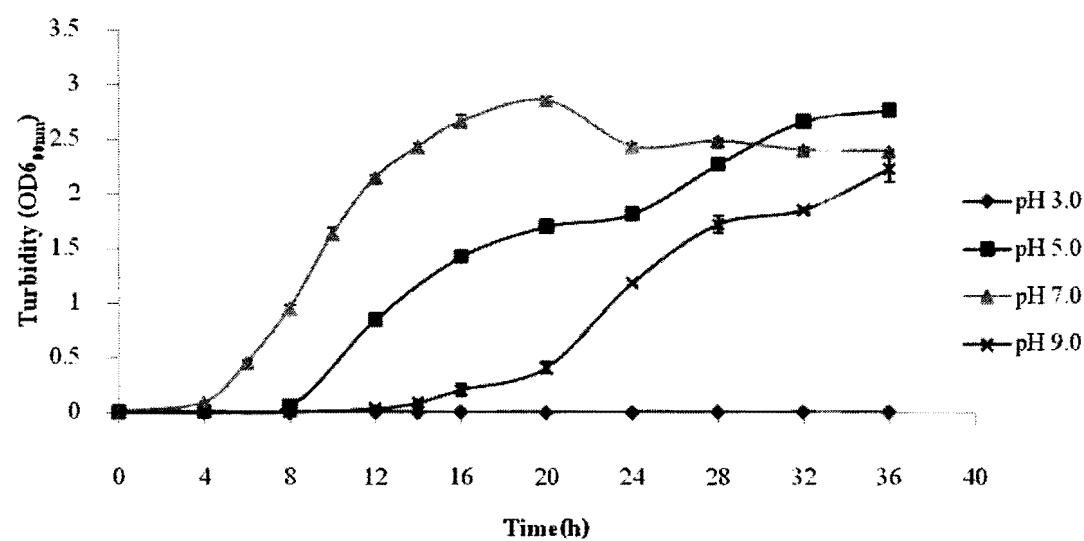


ภาพที่ 4.14 กิจกรรมของสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ในการขับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* ในอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 45°C

#### 4.5 ปัจจัยของ pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis*

##### 4.5.1 pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis*

จากการศึกษา pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* ในอาหาร NB ที่ อุณหภูมิ 35°C ค่า pH แตกต่างกัน 4 ระดับได้แก่ 3.0, 5.0, 7.0 และ 9.0 พนว่าเชื้อ *B. licheniformis* เจริญได้เร็วที่สุดที่ pH 7.0 โดยใช้ระยะเวลา 6.58 ชั่วโมงที่จะทำให้มวลชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า (Biomass doubling time) ในส่วนของ pH 5.0 และ pH 9.0 ส่งผลให้ *B. licheniformis* มีการเจริญช้ากว่าโดยใช้ระยะเวลาเท่ากับ 11.30 และ 13.83 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่ไม่พบรากษ์ของเชื้อ *B. licheniformis* ที่ pH 3.0 ดังแสดงในภาพที่ 4.15 และตารางที่ 4.3



ภาพที่ 4.15 pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของ *B. licheniformis* ในอาหาร NB ที่อุณหภูมิ 35°C

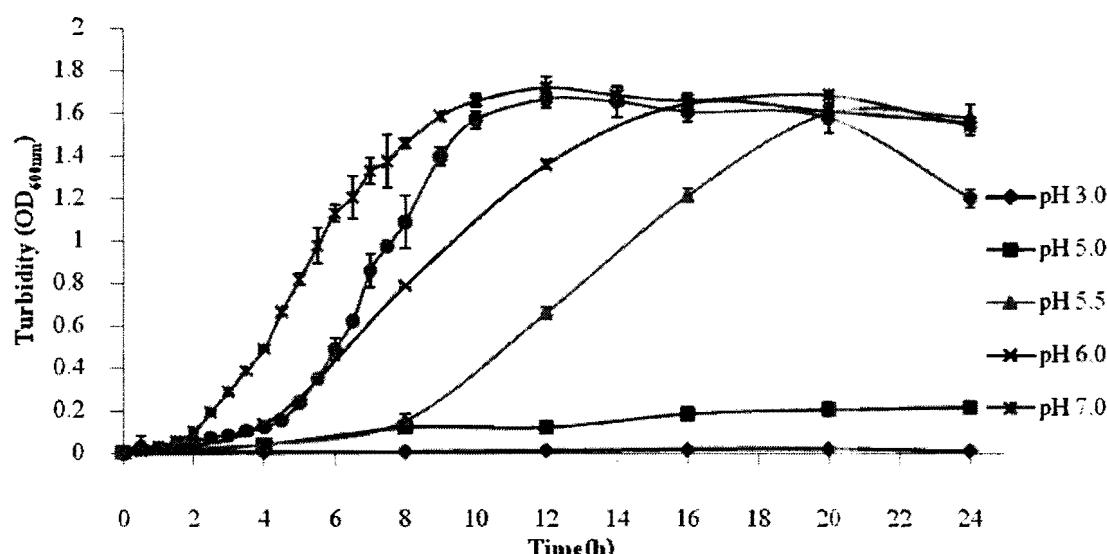
ตารางที่ 4.3 pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของ *B. licheniformis* ที่อุณหภูมิ 35 °C

pH	การเจริญของเชื้อ <i>B. licheniformis</i> ที่อุณหภูมิ 35°C	
	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$t_d$ (h)
3.0	0	0
5.0	0.0613 <sup>B</sup>	11.3074 <sup>B</sup>
7.0	0.1053 <sup>A</sup>	6.5825 <sup>C</sup>
9.0	0.0501 <sup>C</sup>	13.8352 <sup>A</sup>

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในแนวสมมติ ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ( $P>0.05$ )

#### 4.5.2 pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis*

จากการทดสอบปัจจัยของ pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* ในอาหาร NB อุณหภูมิ 35°C ที่ pH แตกต่างกัน 6 ระดับ ได้แก่ pH 3.0, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0 และ 9.0 พบว่าที่ค่า pH 7.0 เชื้อ *P. mirabilis* มีการเจริญได้รวดเร็วโดยใช้ระยะเวลาเพียง 0.74 ชั่วโมงที่จะทำให้น้ำดินเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า (Biomass doubling time) ในขณะที่ *P. mirabilis* ที่ pH 9.0, pH 6.0 และ pH 5.5 ใช้ระยะเวลา 1.21, 1.54 และ 2.28 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนที่ pH 5.0 และ pH 3.0 ใช้ระยะเวลาทำให้น้ำดินเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่ามากที่สุด เท่ากับ 4.63 และ 4.65 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.16 และตารางที่ 4.4



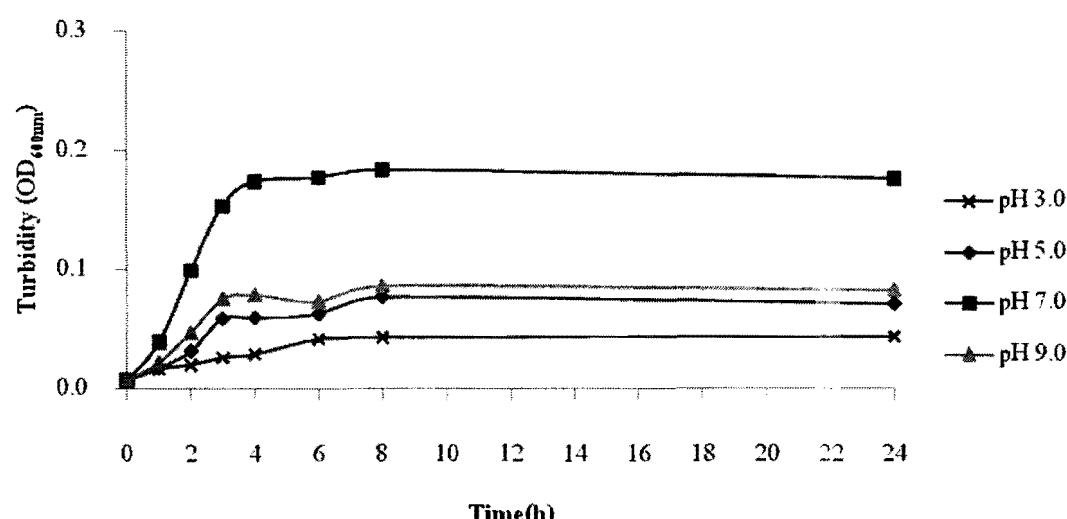
ภาพที่ 4.16 pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของ *P. mirabilis* ในอาหาร NB ที่อุณหภูมิ 35°C

ตารางที่ 4.4 pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ 35°C

pH	การเจริญของเชื้อ <i>P. mirabilis</i> ที่อุณหภูมิ 45°C	
	$\mu (\text{h}^{-1})$	$t_d (\text{h})$
3.0	0.1497 <sup>E</sup>	4.6302 <sup>A</sup>
5.0	0.1489 <sup>E</sup>	4.6551 <sup>A</sup>
5.5	0.3033 <sup>D</sup>	2.2853 <sup>B</sup>
6.0	0.4493 <sup>C</sup>	1.5427 <sup>C</sup>
7.0	0.9260 <sup>A</sup>	0.7485 <sup>E</sup>
9.0	0.5695 <sup>B</sup>	1.2171 <sup>D</sup>

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในแนวส่วนตัว “ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ( $P>0.05$ )

เมื่อทดสอบปัจจัยของ pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* ในอาหาร NB ที่อุณหภูมิ 45°C ค่า pH แตกต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ pH 3.0, 5.0, 7.0 และ 9.0 พบว่าที่ pH 7.0 เชื้อ *P. mirabilis* มีการเจริญโดยใช้ระยะเวลา 2.35 ชั่วโมงที่จะทำให้มวลชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า (Biomass doubling time) ในขณะที่ pH 9.0, pH 5.0 และ pH 3.0 ใช้ระยะเวลาทำให้มวลชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่านานกว่าที่สุด เท่ากับ 3.97, 5.43 และ 5.86 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่งผลให้มีการเจริญในระดับต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับการเจริญในสภาพปกติที่อุณหภูมิ 35°C ค่า pH 7.0 ดังแสดงในภาพที่ 4.17 และตารางที่ 4.5



ภาพที่ 4.17 pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของ *P. mirabilis* ในอาหาร NB ที่อุณหภูมิ 45°C

ตารางที่ 4.5 pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ 45°C

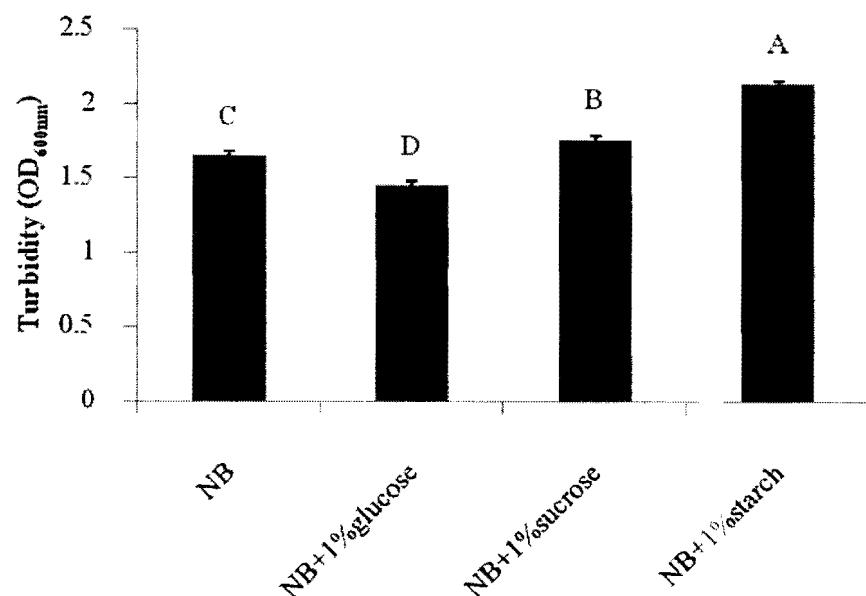
pH	การเจริญของเชื้อ <i>P. mirabilis</i> ที่อุณหภูมิ 45°C	
	$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$t_d$ (h)
3.0	0.1181 <sup>D</sup>	5.8691 <sup>A</sup>
5.0	0.1275 <sup>C</sup>	5.4364 <sup>B</sup>
7.0	0.2943 <sup>A</sup>	2.3552 <sup>D</sup>
9.0	0.1744 <sup>B</sup>	3.9744 <sup>C</sup>

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในแนวเดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P > 0.05$ )

#### 4.6 แหล่งคาร์บอน และแหล่งในต่อเจนที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* และ *P. mirabilis*

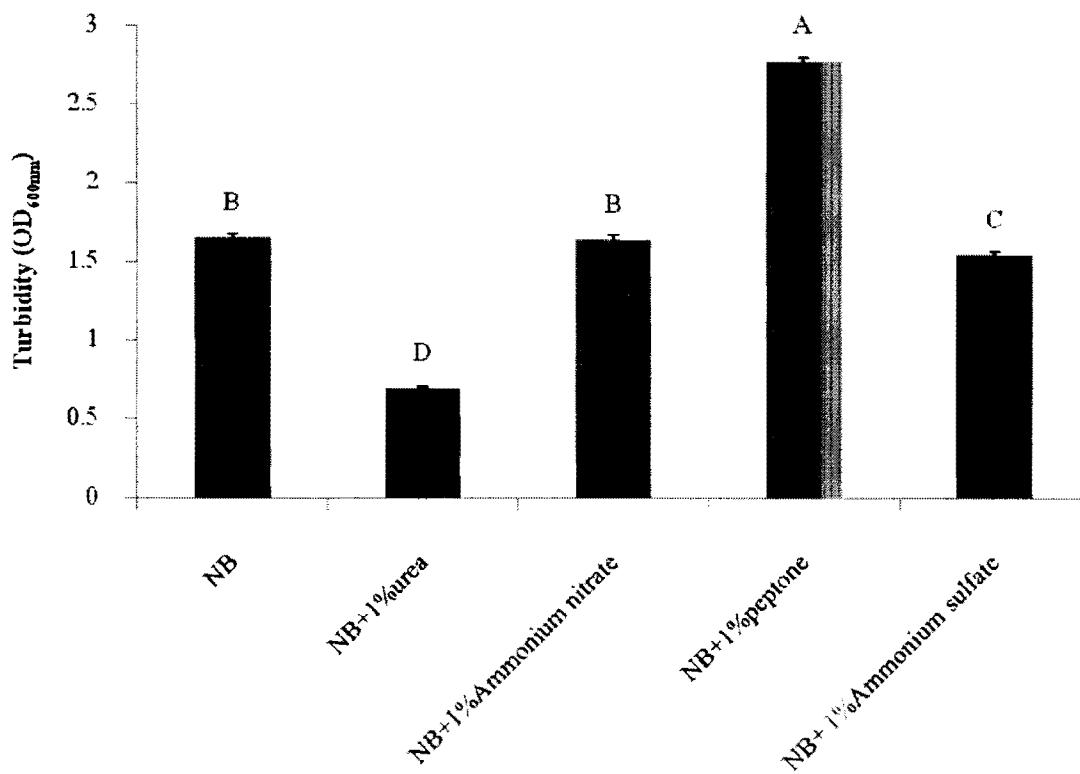
##### 4.6.1 แหล่งคาร์บอน และ แหล่งในต่อเจนที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis*

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. mirabilis* ในอาหาร NB เดินแหล่งของคาร์บอน แต่ก็ต่างกัน (glucose ร้อยละ 1.0, sucrose ร้อยละ 1.0 และ starch ร้อยละ 1.0) ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 35°C บ่มเพาะ 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมารวัดผลการเจริญโดยการวัดค่าความขุ่น ( $OD_{600nm}$ ) จากภาพที่ 4.18 และ 4.19 ลักษณะ A - D เป็นผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SAS ด้วยวิธี Duncan's multiple-range test ถ้าค่าเฉลี่ยของค่าความขุ่น ( $OD_{600nm}$ ) ที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยเทียบกันในแต่ละภาพ ผลการศึกษาพบว่าเชื้อ *P. mirabilis* แสดงการเจริญที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยแสดงเจริญได้น้อยที่สุดในอาหาร NB เดิน glucose ร้อยละ 1.0 วัดค่าความขุ่นได้  $1.45 \pm 0.02$  เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร NB วัดค่าความขุ่นได้  $1.65 \pm 0.02$  และในอาหาร NB เดิน sucrose ร้อยละ 1.0 วัดค่าความขุ่นได้  $1.76 \pm 0.02$  ในขณะที่เพาะเลี้ยงในอาหาร NB เดิน starch ร้อยละ 1.0 พบว่าเชื้อ *P. mirabilis* เจริญได้ดีที่สุดวัดค่าความขุ่นได้  $2.13 \pm 0.01$  แสดงในภาพที่ 4.18



ภาพที่ 4.18 แหล่งของคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 35°C

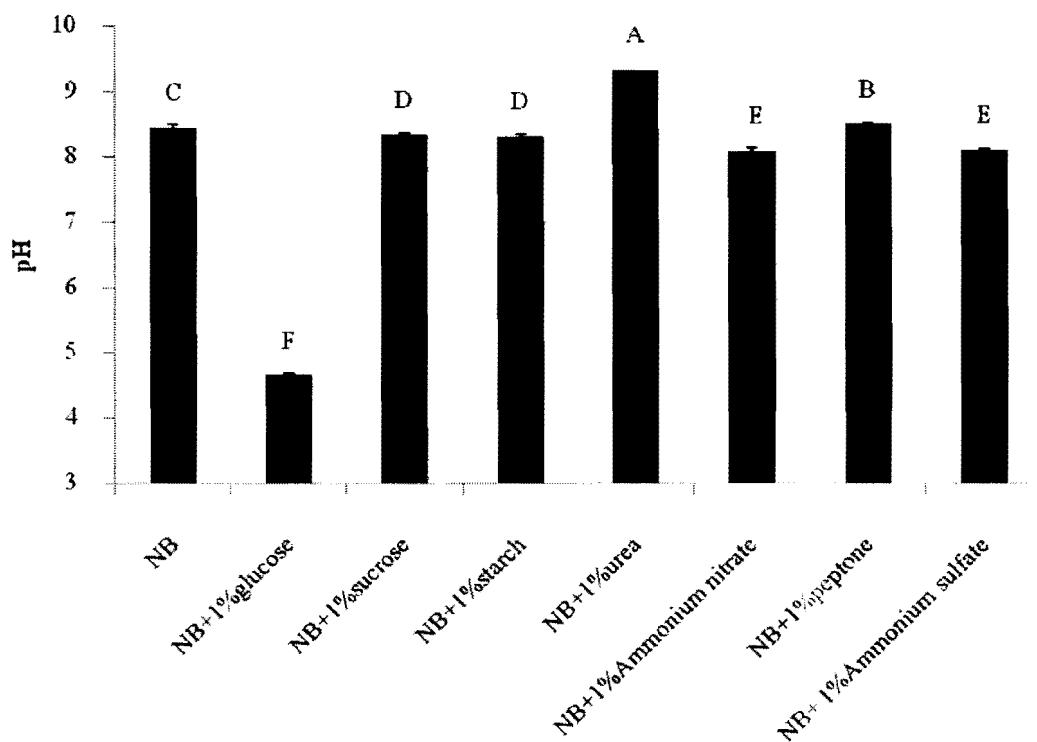
*P. mirabilis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร NB เดินแมลง ในโตรเจนที่แตกต่างกัน (urea ร้อยละ 1.0, Ammonium nitrate ร้อยละ 1.0, Peptone ร้อยละ 1.0 และ Ammonium sulfate ร้อยละ 1.0) ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 35°C บ่มแข็งฯ 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดผลการเจริญโดยการวัดค่าความขุ่น ( $OD_{600nm}$ ) พบว่า *P. mirabilis* แสดงการเจริญได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยพบการเจริญต่ำที่สุดของ *P. mirabilis* ในอาหาร NB เดิน urea ร้อยละ 1.0 วัดค่าความขุ่นได้  $0.69 \pm 0.01$  ขณะที่เพาะเลี้ยงในอาหาร NB และ NB เดิน Ammonium nitrate ร้อยละ 1.0 แสดงการเจริญไม่แตกต่างกัน วัดค่าความขุ่นได้  $1.65 \pm 0.02$  และ  $1.63 \pm 0.03$  ตามลำดับ และในอาหาร NB เดิน Ammonium sulfate ร้อยละ 1.0 วัดค่าความขุ่นได้  $1.53 \pm 0.03$  ในขณะที่เชื้อ *P. mirabilis* เจริญได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร NB เดิน Peptone ร้อยละ 1.0 วัดค่าความขุ่นได้  $2.76 \pm 0.02$  แสดงในภาพที่ 4.19



ภาพที่ 4.19 แหล่งในโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 35°C

สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. mirabilis* ในอาหาร NB ที่เดินแหล่งคาร์บอน และในโตรเจนแตกต่างกันปรับค่า pH เริ่มต้นเป็น 7.0 เมื่อวัดค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไปขณะที่มีการเจริญเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากภาพที่ 4.20 สัญลักษณ์ A-F เป็นผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดย

ใช้โปรแกรม SAS ด้วยวิธี Duncan's multiple-range test พบว่า *P. mirabilis* ที่เจริญในอาหาร NB เติม glucose ร้อยละ 1.0 แสดงค่า pH เป็นกรดมากที่สุดวัดค่าได้ 4.65 ส่วนในอาหาร NB, NB เติม Peptone ร้อยละ 1.0, NB เติม sucrose ร้อยละ 1.0, NB เติม starch ร้อยละ 1.0, NB เติม Ammonium nitrate ร้อยละ 1.0 และ NB เติม Ammonium sulfate 1.0 วัดค่า pH ได้อยู่ในช่วง 8.09 - 8.49 ในขณะที่ *P. mirabilis* เจริญในอาหาร NB เติม urea ร้อยละ 1.0 มีค่า pH เป็นด่างสูงที่สุดวัดค่าได้ 9.33 แสดงในภาพที่ 4.20

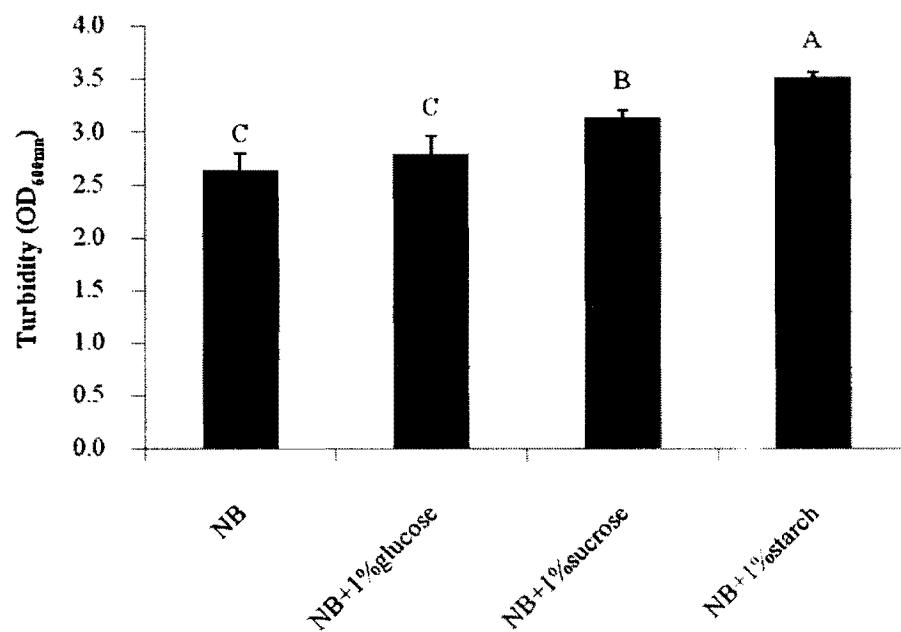


ภาพที่ 4.20 การเปลี่ยนแปลง pH ของอาหาร NB ที่เติมแหล่งคาร์บอน และ แหล่งไนโตรเจน แตกต่างกันในระหว่างการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ 35°C

#### 4.6.2 แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis*

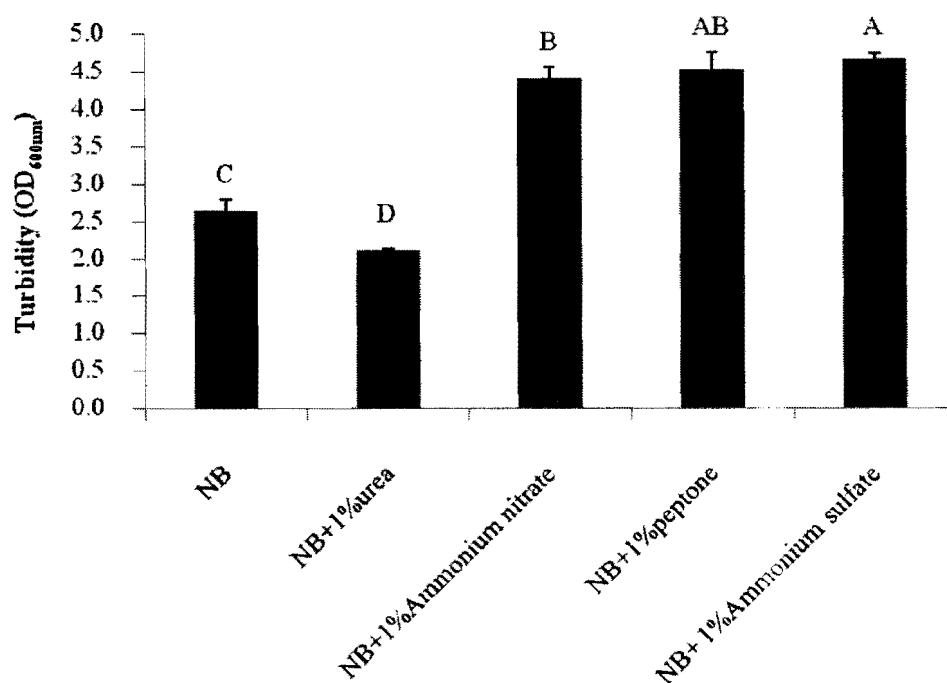
จากการทดสอบแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* ในอาหาร NB ซึ่งเติมแหล่งของคาร์บอนแตกต่างกัน (glucose ร้อยละ 1.0, sucrose ร้อยละ 1.0 และ starch ร้อยละ 1.0) ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 35°C บ่มเพียง 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดผลการเจริญโดยการวัดค่าความชุ่ม (OD<sub>600nm</sub>) จากภาพที่ 4.21 และ 4.22 สัญลักษณ์ A - D เป็นผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยโปรแกรม SAS ด้วยวิธี Duncan's multiple-range test ถ้าค่าเฉลี่ยของค่าความชุ่ม (OD<sub>600nm</sub>) ที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่ต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยเทียบกันในแต่ละภาพ จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *B. licheniformis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร NB เติม starch ร้อยละ 1.0 มีการเจริญดีที่สุด วัดค่าความชุ่นได้  $3.52 \pm 0.04$  เชื้อเจริญได้ดีในอาหาร NB เติม sucrose ร้อยละ 1.0 วัดค่าความชุ่นได้  $3.14 \pm 0.05$  แต่เมื่อพิจารณา *B. licheniformis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร NB และ อาหาร NB เติม glucose ร้อยละ 1.0 พบร่วมกับการเจริญไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงในภาพที่ 4.21



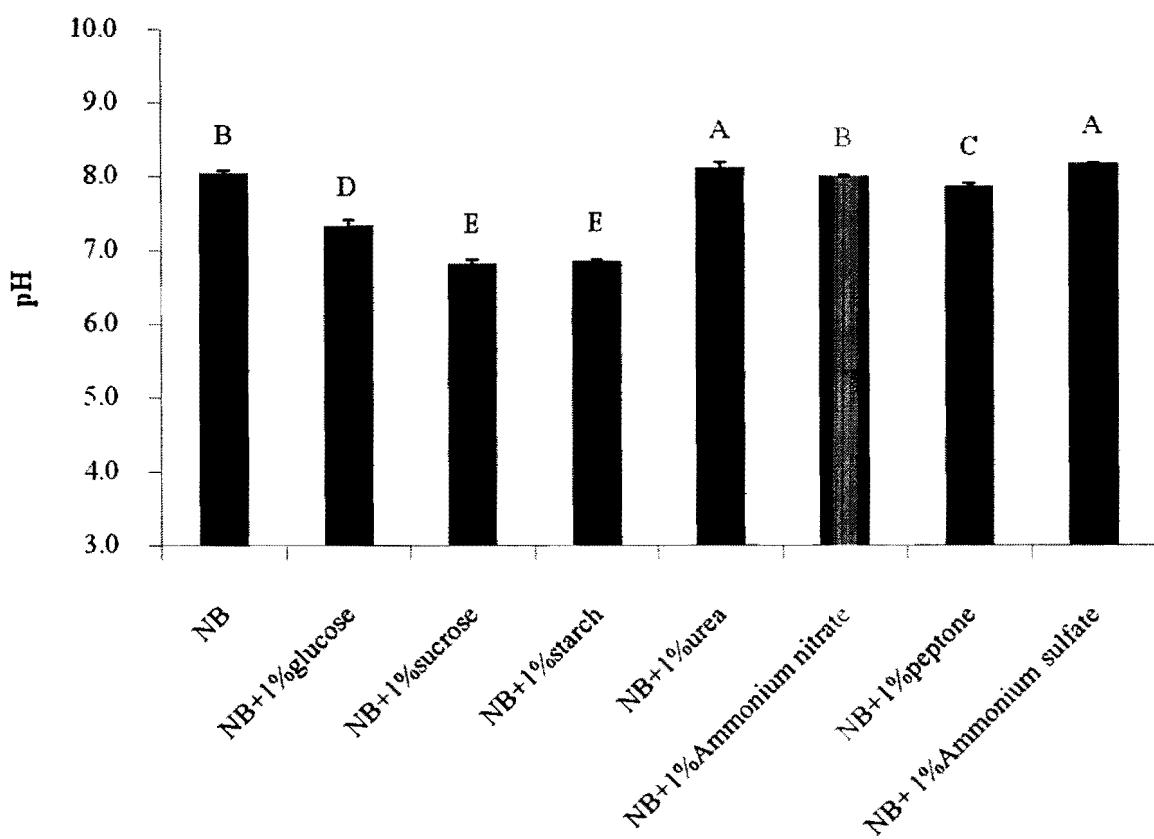
ภาพที่ 4.21 แหล่งการบอนที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 35°C

สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ในอาหารเหลว NB ที่เติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (urea ร้อยละ 1.0, Ammonium nitrate ร้อยละ 1.0, Peptone ร้อยละ 1.0 และ Ammonium sulfate ร้อยละ 1.0) พบร่วมกับเชื้อ *B. licheniformis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร NB เติม Ammonium sulfate ร้อยละ 1.0 มีการเจริญสูงสุด วัดค่าความชุ่นได้  $4.67 \pm 0.06$  เชื้อเจริญได้ดีลงมาในอาหาร NB ที่เติม Peptone ร้อยละ 1.0 วัดค่าความชุ่นได้  $4.53 \pm 0.22$  และในอาหาร NB ที่เติม Ammonium nitrate ร้อยละ 1.0 วัดค่าความชุ่นได้  $4.41 \pm 0.15$  ในขณะที่เชื้อเจริญได้น้อยในอาหาร NB วัดค่าความชุ่นได้  $2.64 \pm 0.15$  และน้อยที่สุดในอาหาร NB เติม urea ร้อยละ 1.0 วัดค่าความชุ่นได้  $2.10 \pm 0.02$  แสดงในภาพที่ 4.22



ภาพที่ 4.22 แหล่งในโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 35°C

จากเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ในอาหาร NB เดินแหล่งคาร์บอนและในโตรเจนที่แตกต่างกันปรับค่า pH เริ่มต้นเป็น 7.0 เมื่อวัดค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไปในขณะที่มีการเจริญเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากภาพที่ 4.23 สัญลักษณ์ A-E เป็นผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SAS ด้วยวิธี Duncan's multiple-range test พบว่า *B. licheniformis* ที่เจริญในอาหาร NB ที่เติม urea ร้อยละ 1.0 และ Ammonium sulfate ร้อยละ 1.0 มีค่า pH เป็นต่างที่ไม่ต่างกัน วัดค่าได้ 8.11 และ 8.15 ตามลำดับ เชื้อ *B. licheniformis* ที่เจริญในอาหาร NB และ NB เติม Ammonium nitrate ร้อยละ 1.0 มีค่า pH สูงไม่ต่างกัน วัดค่าได้ 8.03 และ 7.98 ตามลำดับ สำหรับการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* ในอาหาร NB เติม Peptone ร้อยละ 1.0 วัดค่า pH ได้ 7.86 และในอาหาร NB เติม glucose ร้อยละ 1.0 วัดค่า pH ได้ 7.33 ในขณะที่ *B. licheniformis* ที่เจริญในอาหาร NB เติม sucrose ร้อยละ 1.0 และ starch ร้อยละ 1.0 มีค่า pH ต่ำไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 วัดค่า pH ได้ 6.82 และ 6.84 ตามลำดับ แสดงในภาพที่ 4.23

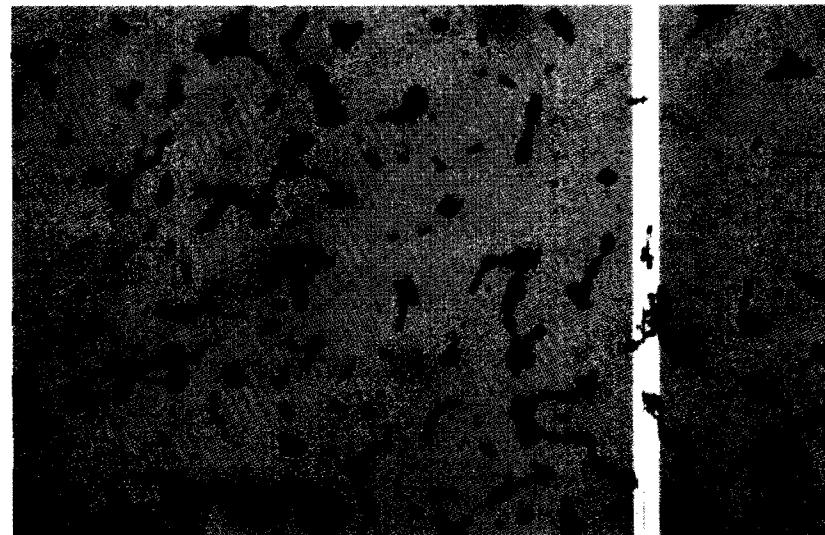


ภาพที่ 4.23 การเปลี่ยนแปลง pH ของอาหาร NB ที่เติมแหล่งคาร์บอน และ แหล่งไนโตรเจน แตกต่างกันในระหว่างการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 35°C

#### 4.7 ปัจจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญของ *P. mirabilis*

##### 4.7.1 การเพาะเลี้ยง *B. licheniformis* เพื่อผลิต Cell-free supernatant (CFS)

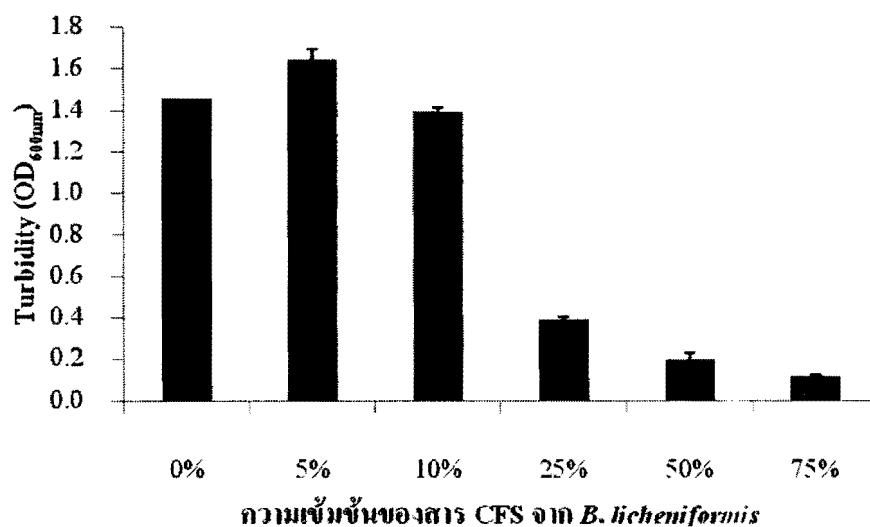
จากการนำ Fresh culture ของ *B. licheniformis* มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่มี pH เริ่มต้นเท่ากัน 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า มีการเจริญ วัดค่าความชุ่น ได้  $2.56 \pm 0.20$  หรือ เทียบการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิต ได้เท่ากับ  $1.528 \times 10^8$  CFU/ml จากการข้อมูลสีแกรม ไม่พบรูปเป็นเปื้อนแต่พบว่าเซลล์ของ *B. licheniformis* มี การสร้างสปอร์ เป็นจำนวนมากดังแสดงในภาพที่ 4.24 จากนั้นนำไปปั่นหัวงึงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที แยกเอาส่วนใส่โดยกรองผ่านกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร แล้วเก็บใส่ขวด ปลดล็อกเชื้อ แยกบางส่วนมาวัดค่า pH ของสาร CFS ได้เท่ากับ  $8.56 \pm 0.12$  เก็บแช่แข็งไว้ที่ -4°C



ภาพที่ 4.24 การสร้างสปอร์ของเชลล์ *B. licheniformis* ในอาหารเหลวที่เวลา 24 ชั่วโมงภายใต้  
กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (Bar = 10 $\mu$ m)

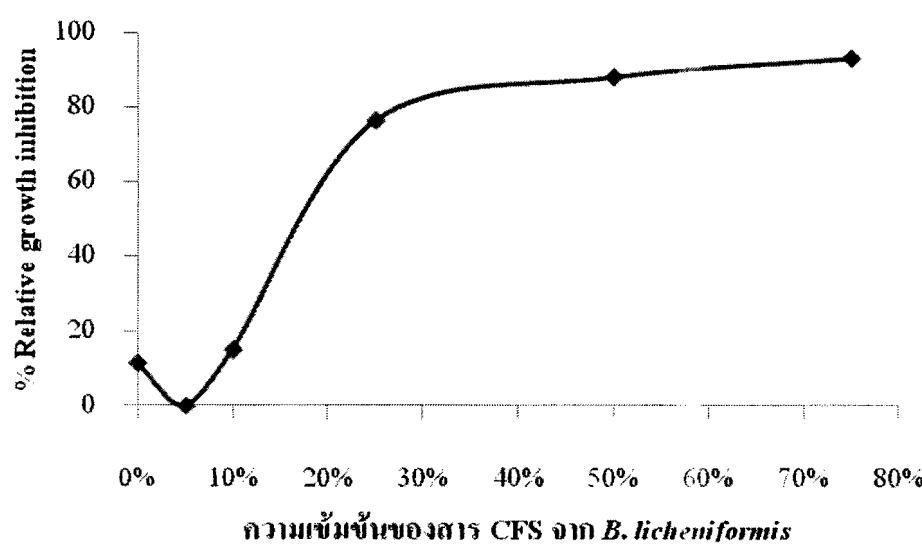
#### 4.7.2 ปริมาณสารที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ต้านการเจริญของ *P. mirabilis*

จากการศึกษาปริมาณสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ที่เหมาะสมเพื่อการออกฤทธิ์ต้านการเจริญของ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ 35°C และ 45°C โดยเติมสาร CFS ผลิตจาก *B. licheniformis* ที่แตกต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5, 10, 25, 50 และ 75 ลงในอาหาร NB แล้วเติม Fresh culture ของ *P. mirabilis* ค่าความชุน 0.5 ร้อยละ 1.0 โดยปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเหลว แล้วนำไปบ่มเพย়ากที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พนว่าที่อุณหภูมิ 35°C การเติมสารที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ที่ระดับความเข้มข้นเพียงร้อยละ 25 ส่งผลให้ *P. mirabilis* มีการเจริญในระดับต่ำ วัดค่าความชุนได้  $0.38 \pm 0.029^{\circ}$  และมีการเจริญในระดับต่ำที่สุดเมื่อเติมสารที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ในระดับความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 75 ดังแสดงในภาพที่ 4.25 และตารางที่ 4.6



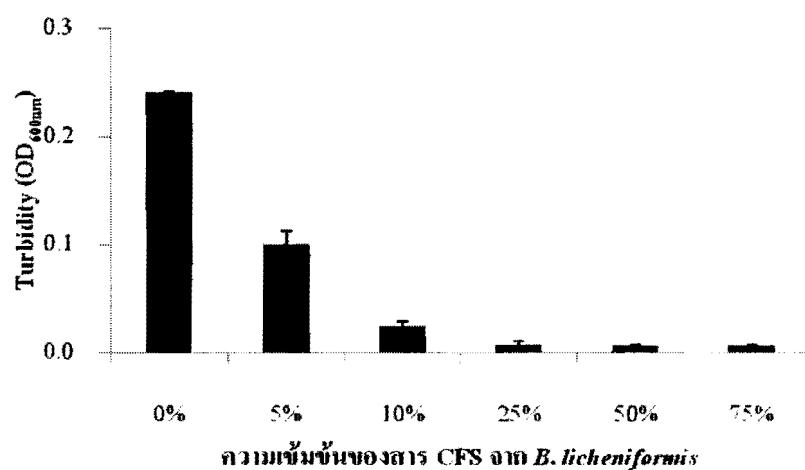
ภาพที่ 4.25 ปริมาณสาร CFS จาก *B. licheniformis* ที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ต้านการเจริญของ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ 35°C

เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นสาร CFS ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* กับประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* เมื่อเติมสาร CFS ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ความเข้มข้นร้อยละ 25 พน.ว่ามีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *P. mirabilis* ได้ร้อยละ 76.52 ดังแสดงในภาพที่ 4.26



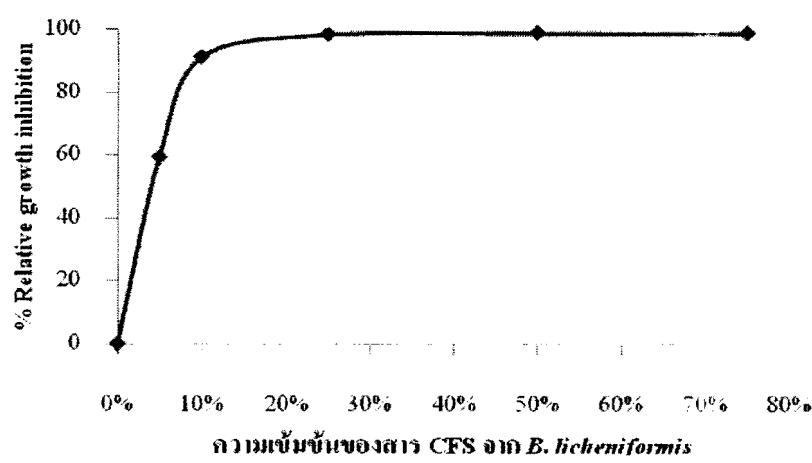
ภาพที่ 4.26 ประสิทธิภาพของสาร CFS จาก *B. licheniformis* ยับยั้งการเจริญของ *P. mirabilis* ที่ อุณหภูมิ 35°C

ขณะที่อุณหภูมิ  $45^{\circ}\text{C}$  การเติมสารที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ที่ระดับความเข้มข้นเพียงร้อยละ 5 ก็ส่งผลให้ *P. mirabilis* มีการเจริญในระดับต่ำ วัดค่าความชุ่นได้  $0.10 \pm 0.038^{\text{B}}$  และแสดงการเจริญในระดับต่ำที่สุดเมื่อเติมสารที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ในระดับความเข้มข้นร้อยละ 10, 25, 50 และ 75 ดังแสดงในภาพที่ 4.27 และตารางที่ 4.6



ภาพที่ 4.27 ปริมาณสาร CFS จาก *B. licheniformis* ที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ต้านการเจริญของ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ  $45^{\circ}\text{C}$

เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นสาร CFS ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* กับประสิทธิภาพการขับยั้งการเจริญของ *P. mirabilis* เมื่อเติมสาร CFS ผลิตจาก *B. licheniformis* ความเข้มข้นร้อย 5 พบร่วมนิประสิทธิภาพการขับยั้งการเจริญของ *P. mirabilis* ได้ร้อยละ 59.33 ดังแสดงในภาพที่ 4.28



ภาพที่ 4.28 ประสิทธิภาพของสาร CFS จาก *B. licheniformis* ขับยั้งการเจริญของ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ  $45^{\circ}\text{C}$

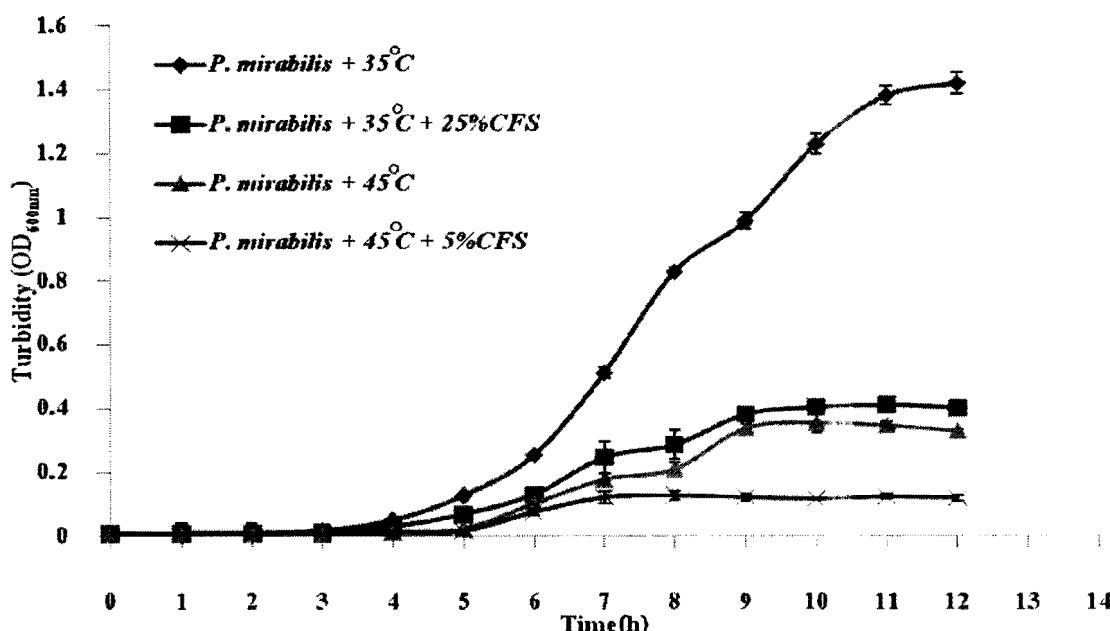
ตารางที่ 4.6 ปริมาณสาร CFS จาก *B. licheniformis* ที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ด้านการเจริญของ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ 35 และ 45°C

ความเข้มข้นสาร CFS (%)	อุณหภูมิ (°C)	
	35	45
0	1.45 ± 0.048 <sup>B</sup>	0.24 ± 0.012 <sup>A</sup>
5	1.64 ± 0.014 <sup>A</sup>	0.10 ± 0.038 <sup>B</sup>
10	1.39 ± 0.012 <sup>B</sup>	0.02 ± 0.003 <sup>C</sup>
25	0.38 ± 0.029 <sup>C</sup>	0.007 ± 0.001 <sup>D</sup>
50	0.19 ± 0.010 <sup>D</sup>	0.006 ± 0.001 <sup>D</sup>
75	0.11 ± 0.016 <sup>E</sup>	0.006 ± 0.000 <sup>D</sup>

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในแนวส่วนก์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ( $P>0.05$ )

#### 4.7.3 การศึกษาประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญของ *P. mirabilis*

จากการศึกษาปัจจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญ *P. mirabilis* ที่ อุณหภูมิ 35°C โดยเดินสาร CFS ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 25 และ ที่ อุณหภูมิ 45°C เดินสาร CFS ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 แล้วติดตาม การเจริญของ *P. mirabilis* เทียบกับการเจริญของ *P. mirabilis* อุณหภูมิ 35 และ 45°C ที่ไม่เดินสาร พบว่า *P. mirabilis* เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 35°C ที่เดินสาร CFS จาก *B. licheniformis* ในระดับความเข้มข้นร้อยละ 25 มีการเจริญช้ากว่า *P. mirabilis* ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 35°C ที่ไม่เดินสาร โดยใช้ ระยะเวลาถึง 1.92 ชั่วโมงที่จะทำให้มวลชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า (Biomass doubling time) เมื่อ เทียบกับ *P. mirabilis* เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 35°C ที่ไม่เดินสาร ใช้ระยะเวลาเพียง 0.72 ชั่วโมง ดัง แสดงในภาพที่ 4.29 และ ตารางที่ 4.7



ภาพที่ 4.29 ผลของอุณหภูมิและสารต้านจุลชีพ (CFS) ที่มีต่อการเจริญของ *P. mirabilis*

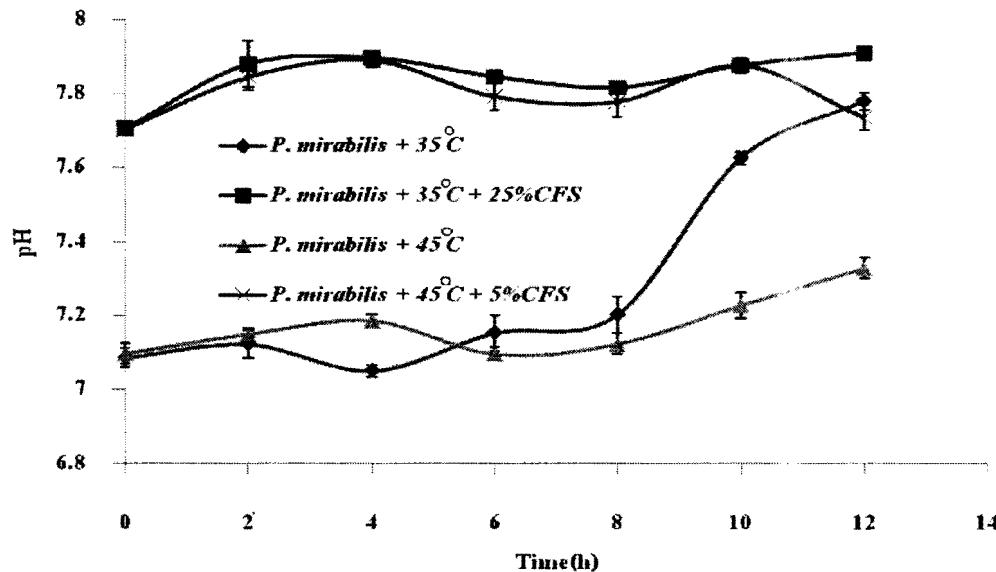
ในส่วนของ *P. mirabilis* ที่เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 45°C เดินสาร CFS จาก *B. licheniformis* ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 เทียบกับการเจริญของ *P. mirabilis* อุณหภูมิ 45°C ที่ไม่เดินสาร ผลศึกษาพบว่า *P. mirabilis* เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 45°C ที่เดินสาร CFS ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* เจริญได้มากกว่า *P. mirabilis* ที่ไม่เดินสาร โดยใช้ระยะเวลาถึง 4.49 ชั่วโมงที่จะทำให้มวลชีวภาพเพิ่มเป็นสองเท่า (Biomass doubling time) เมื่อเทียบกับ *P. mirabilis* เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 45°C ที่ไม่เดินสารใช้ระยะเวลาเพียง 2.16 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4.29 และตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ปัจจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญของ *P. mirabilis*

อุณหภูมิและสาร CFS จาก <i>B. licheniformis</i>	ผลต่อการเจริญของ <i>P. mirabilis</i>		
	OD <sub>600nm</sub>	$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$t_d$ (h)
35°C	1.41 ± 0.033 <sup>A</sup>	0.9590 <sup>A</sup>	0.7227 <sup>D</sup>
35°C + 25% CFS	0.41 ± 0.004 <sup>B</sup>	0.3609 <sup>B</sup>	1.9206 <sup>C</sup>
45°C	0.35 ± 0.029 <sup>C</sup>	0.3200 <sup>C</sup>	2.1660 <sup>B</sup>
45°C + 5% CFS	0.12 ± 0.006 <sup>D</sup>	0.1543 <sup>D</sup>	4.4922 <sup>A</sup>

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในแนวส่วนก์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $P>0.05$ )

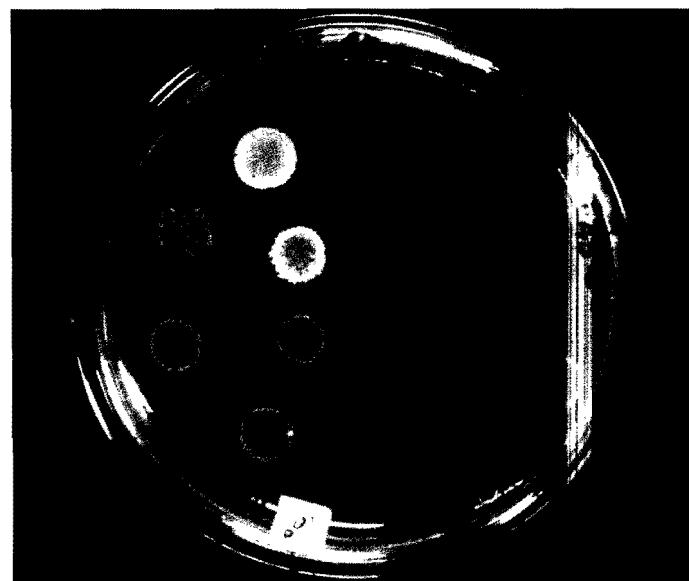
ชีพ CFS จาก *B. licheniformis* ด้านการเจริญของ *P. mirabilis* พบร่วมกันอาหารที่มีการเติมสารด้านจุลชีพด้วย pH เริ่มต้นได้เท่ากับ 7.70 และ การเปลี่ยนแปลงภายใน 12 ชั่วโมง มีค่า pH อยู่ในช่วง 7.70 - 7.90 ส่วนในอาหารเหลวที่ไม่เติมสารด้านจุลชีพพบว่ามีค่า pH เริ่มต้น 7.01 และพบร่วมกับ pH มีการเปลี่ยนแปลงในระดับสูงอยู่ในช่วง 7.01 - 7.80 เนื่องจากที่อุณหภูมิ 35°C เชื้อ *P. mirabilis* มีการเจริญได้ดี ส่วนที่อุณหภูมิ 45°C มีการเปลี่ยนแปลงของ pH ในระดับต่ำอยู่ในช่วง 7.01 - 7.32 เนื่องจากมีการเจริญของ *P. mirabilis* ในระดับต่ำดังแสดงในภาพที่ 4.28



ภาพที่ 4.30 การเปลี่ยนแปลง pH ในระหว่างการควบคุมการเจริญของ *P. mirabilis*

#### 4.7.4 การศึกษาฤทธิ์ของ Cell-free supernatant ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ในการด้านเชื้อแบคทีเรีย *P. mirabilis*

เมื่อนำ Culture ของ *P. mirabilis* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงโดยเติมสารด้านจุลชีพ (จากข้อ 4.7.3) ที่เวลา 12 ชั่วโมง มาทำการเพาะเลี้ยงต่อในอาหาร NA บ่มที่ 35°C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง พบร่วม *P. mirabilis* สามารถเจริญได้ดังนั้นสารด้านจุลชีพที่ผลิตจาก *B. licheniformis* มีฤทธิ์ในการด้านเชื้อแบคทีเรีย *P. mirabilis* แบบ Bacteriostatic agent ซึ่งจะสามารถขับย้งการเจริญของเชลล์แบคทีเรีย *P. mirabilis* ได้แต่ไม่ทำลายเซลล์ดังแสดงในภาพที่ 4.29



ภาพที่ 4.31 การเจริญของ *P. mirabilis* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงโดยเติมสารต้านจุลชีพ และนำมา  
เพาะเลี้ยงต่อในอาหาร NA

## บทที่ 5

### สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ

ของเสียจากกระบวนการทางอุตสาหกรรม หรือของเสียจากกระบวนการครัวเรือนที่ถูกปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมในธรรมชาติ หากของเสียเหล่านั้นมีการเป็นเปื้อนโปรตีน หรือ อะมิโนในปริมาณความเข้มข้นสูง จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติบางชนิดจะสามารถเจริญและปลดปล่อยก๊าซมลพิษที่ก่อปัญหากลิ่นเหม็นโดยพบว่าหลักๆ เช่น *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Budvicia aquatic*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Pseudomonas migulae* (Terence et al., 2004) จะเจริญและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้รวดเร็ว อีกทั้งยังเป็นเชื้อสาเหตุที่ก่อปัญหากลิ่นก๊าซแอมโมเนียและก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ งานวิจัยนี้ได้ศึกษา และ นุյงเน้นไปที่การควบคุมการเจริญของเชื้อสาเหตุก่อปัญหาลพิษทางกลิ่นด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ โดยเลือกเชื้อ *P. mirabilis* เป็นตัวแทนเชื้อต้นเหตุก่อปัญหาลพิษทางกลิ่นเหม็นในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจาก *P. mirabilis* มีคุณสมบัติผลิตได้ทึ้งก๊าซแอมโมเนียและก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ จากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของ *P. mirabilis* พบร่วมเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เชลล์มีลักษณะเป็นรูปแท่งสั้น สามารถย่อยน้ำตาลที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบภายในสภาพไม่มีออกซิเจน สร้างเป็นก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ สอดคล้องกับย่อยสลายโมเลกุลของโปรตีนหรือกรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน เรียกปฏิกริยานี้ว่า desulfuration (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2554) เพราะ *P. vulgaris* จะสามารถลดอะมิโนเปล็ทินเป็นไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งเมื่อทำปฏิกริยากับอ่อนของเหล็กจะเกิดเป็นสีดำของเหล็กซัลไฟด์ (William, 1990; Wistreich and Lechtmann, 1980) นอกจากนั้น *P. mirabilis* ยังสามารถสร้าง Urease enzyme ที่จะย่อยรีบในอาหารเปลี่ยนเป็นก๊าซแอมโมเนีย

*B. licheniformis* เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารต้านจุลชีพที่ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น รา แบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ เป็นเชื้อที่ใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรม ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท เอ็นเอฟทีในโอลิเย จำกัด จากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของ *B. licheniformis* พบร่วมเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เชลล์มีลักษณะเป็นรูปแท่ง สร้างสปอร์อยู่ที่ตำแหน่งตรงกลาง (central) ใกล้ตรงกลาง (paracentral) และอยู่ก่อนปลาย เชลล์ (subterminal) *B. licheniformis* สามารถผลิตสารต้านจุลชีพ (Antimicrobial substances) ที่ต้านการเจริญของแบคทีเรีย Gram-positive และ Gram-negative หลากหลายชนิด (Guo et al., 2012)

ซึ่งสารต้านจุลชีพ bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* HTRHR2 สามารถขับยับการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis* (Sharma et al., 2010) เชื้อ *B. licheniformis* จึงมีความน่าสนใจในการนำไปศึกษาการควบคุมการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis*

จากการศึกษาการเจริญและการผลิตสารต้านจุลชีพของเชื้อ *B. licheniformis* ในอาหาร NB ค่า pH 6.8 - 7.0 ที่อุณหภูมิ 37°C บ่มเพาะที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีพบว่าเซลล์เจริญในช่วง Lag phase ที่เวลา 0-4 ชั่วโมง เจริญในช่วง Log phase หรือ Exponential growth phase ที่เวลา 4 - 24 ชั่วโมง เข้าสู่ช่วง Stationary growth phase หลังจาก 24 ชั่วโมง แล้วค่อยลดลง ในระหว่างการเจริญของ *B. licheniformis* จาก pH เริ่มต้นในช่วง 6.8 - 7.0 พบว่า pH มีการเปลี่ยนแปลงในแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นวัดค่าได้ 8.25 เมื่อนำสาร CFS ที่ถูกเก็บทุกๆ 4 ชั่วโมงมาทดสอบแบบ Qualitative antimicrobial activity กับเชื้อ *P. mirabilis* พบว่าสารถูกตรวจพบกึ่งกลางระหว่างการเจริญในช่วง Exponential growth phase ที่เวลา 12 ชั่วโมง และมีการผลิตสารได้มากที่สุดในระหว่างการเจริญในช่วง Early stationary growth phase ที่เวลา 24 - 36 ชั่วโมง สอดคล้องกับสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ZJU12 ถูกตรวจพบในช่วง Middle exponential growth phase มีการผลิตสารได้สูงสุดในช่วง Early stationary growth phase (He et al., 2004) เช่นเดียวกับ *B. licheniformis* B116 ถูกตรวจสารต้านจุลชีพในช่วง Early exponential growth phase มีการผลิตสารได้สูงสุดในช่วง Early stationary growth phase และ ก่อให้ลดลงในช่วง Late stationary growth phase (Guo et al., 2012)

สำหรับการเจริญของ *B. licheniformis* ที่อุณหภูมิแตกต่างกันพบว่า แสดงการเจริญได้ดีที่ อุณหภูมิ 30 - 45°C โดยพบว่ามีการเจริญได้ในสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 - 35°C และมีการเจริญได้ในระดับสูงที่อุณหภูมิ 40°C และ 45°C ส่วนอุณหภูมิ 50°C พบว่ามีการเจริญในระดับต่ำ และ ไม่ตรวจพบการเจริญของ *B. licheniformis* ที่อุณหภูมิ 55°C ในขณะที่ *B. licheniformis* ไม่สามารถเจริญได้ในอาหาร NB ค่า pH ≤ 3.0 แต่สามารถเจริญได้ในช่วง pH 5.0 - 9.0 และแสดงการเจริญได้ดีที่สุดที่ pH 7.0 และจากการศึกษาการเจริญบนที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* พบว่า มีการเจริญดีที่สุดในอาหาร NB เดิม starch (potato starch) ร้อยละ 1.0 วัดค่าความชุ่มได้  $3.52 \pm 0.04$  มีค่า pH 6.84 เนื่องจากในอาหาร potato starch มีหน่วยย่อยของน้ำตาล glucose เป็นองค์ประกอบจึงส่งเสริมการเจริญได้ดี การเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ในอาหารเหลว NB เดิมแหล่งโปรตีนที่แตกต่างกันพบว่ามีการเจริญสูงสุดไม่ต่างกันในอาหารเหลวที่เดิม Peptone ร้อยละ 1.0 และ Ammonium sulfate ร้อยละ 1.0 วัดค่าความชุ่มได้  $4.53 \pm 0.22$  และ  $4.67 \pm 0.06$  ตามลำดับ มีค่า pH 7.86 - 8.15

งานวิจัยนี้ได้ศึกษา และ มุ่งเน้นไปที่การควบคุมการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* เนื่องจาก เป็นตัวแทนเชื้อสาเหตุที่ก่อปัญหากลิ่นก๊าซแอมโมเนียและก๊าซไฮโดรเจนชัลไฟฟ์ ดังนั้น การศึกษา ปัจจัย อุณหภูมิ pH แหล่งอาหาร และแหล่งในโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพที่ผลิตจากเชื้อ *B. licheniformis* ให้ควบคุมการเจริญของ เชื้อ *P. mirabilis* ได้ดี หากการศึกษาอุณหภูมิที่ส่งผลต่อการเจริญของ *P. mirabilis* พบว่าที่อุณหภูมิ 45°C ส่งผลให้ *P. mirabilis* แสดงการเจริญได้ในระดับต่ำ วัดค่าการเจริญ ( $OD_{600nm}$ ) ได้  $0.55 \pm 0.047$  ในขณะที่สาร CFS ผลิตจาก *B. licheniformis* ออกฤทธิ์ขับยับยั้งการเจริญของ *P. mirabilis* ได้สูงสุดที่ อุณหภูมิ 45°C โดยพบว่ามีเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone เท่ากับ  $16.3 \pm 0.41$  มิลลิเมตร/20 ไมโครลิตร ดังนั้นที่อุณหภูมิ 45°C ช่วยในการเสริมฤทธิ์ให้สารสามารถออกฤทธิ์ขับยั้งการเจริญของ *P. mirabilis* ได้สูงสุด การศึกษาวิธีการควบคุมกลิ่นในปัจจุบันมีหลากหลายวิธี เช่นการใช้สารเคมี วิธีทางกายภาพ การใช้จุลินทรีย์ รวมไปถึงการใช้สารจากพืชสมุนไพร เช่น การศึกษา กิจกรรมการ ต้านจุลชีพของ *Lactobacillus murinus* (LbO2) ต้านการเจริญของ *P. mirabilis* แต่ละสายพันธุ์ที่ อุณหภูมิ 37°C พบว่า LbO2 สามารถขับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* สายพันธุ์ Pr6515 และ XT2 มีเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone 14 มิลลิเมตร/2.5 ไมโครลิตร ส่วนสายพันธุ์ Pr2921 และ Pr4149 มีเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone 12 มิลลิเมตร/2.5 ไมโครลิตร (Fraga et al., 2005) แต่ กลุ่มแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. ไม่สามารถเจริญ และคงทนสภาวะในสภาวะแวดล้อมที่หลากหลายได้ เนื่องจากสภาวะในโคลปัจจุบันมีแนวโน้มอุณหภูมิสูงขึ้น

ในส่วนการศึกษาปัจจัยของ pH ที่ส่งผลต่อการขับยั้งการเจริญของ *P. mirabilis* พบว่า pH ที่ *P. mirabilis* ไม่สามารถเจริญได้ในอาหาร NB คือ  $pH \leq 5.0$  ส่วนแหล่งของการรับอนที่มีผลต่อ การเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* พบว่าหากเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม glucose ร้อยละ 1.0 แสดงการ เจริญได้ในระดับต่ำกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหาร NB วัดค่าความชุ่มได้  $1.45 \pm 0.02$  เมื่อวัดค่า pH พบว่า มีความเป็นกรดสูงวัดค่าได้ 4.65 เช่นเดียวกันกับการเพาะเลี้ยง *P. mirabilis* ในอาหาร Glucose broth ซึ่งทำให้เชื้อ *P. mirabilis* ใช้ระยะเวลาถึง 4 - 5 ชั่วโมงที่จะทำให้มีลักษณะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า (โสรวี จันทรารี, 2555) เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงใน NB ที่สภาวะเดียวกันใช้ระยะเวลาเพียง 0.74 ชั่วโมง และขั้งสอดคล้องกับการศึกษาผลกระทนของกลุ่มแบคทีเรียแลคติกมีผลต่อการขับยั้ง การเกิดไฮโดรเจนชัลไฟฟ์ มีรายงานว่าสารละลายน้ำตาน้ำตาลที่หมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ปั่นปือใน กากน้ำตาลใช้ขับยั้งการสร้างก๊าซไฮโดรเจนชัลไฟฟ์ของ *P. vulgaris* ได้ โดยพบว่าสารละลายน้ำ ที่มี ฤทธิ์ขับยั้งดังกล่าวมี pH ต่ำ ซึ่งเกิดจากการหมักกากน้ำตาลทำให้เกิดกรด (Wungkobkiat et al., 1996 ; อรุณวรรณ หวังกอบเก็ตติ และคณะ, 2538) ดังนั้นการเติม glucose ในอาหารเหลวช่วยลดการผลิต ก๊าซแอมโมเนีย และ ก๊าซไฮโดรเจนชัลไฟฟ์เนื่องจากการจะไปขับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis*

สำหรับการศึกษาเหล่านี้ในโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* พนวณการเจริญต่ำที่สุดของ *P. mirabilis* ในอาหาร NB เดิน urea ร้อยละ 1.0 วัดค่าความชุ่นได้  $0.69 \pm 0.01$  เมื่องจากเชื้อ *P. mirabilis* สามารถเปลี่ยน urea ไปเป็นค่า pH เป็นค่าสูงที่สุดค่าได้ 9.33 จึงไปขึ้นชั้นการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* เอง

การศึกษาเบนคที่เรียกที่สร้างสารปฏิชีวนะ หรือ สารต้านจุลชีพบางอย่างร่วมกับปัจจัยอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ เป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการควบคุมการเจริญของ *P. mirabilis* จากการศึกษาปัจจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญของ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ 45°C พนวณการเดินสาร CFS ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ความเข้มข้นเพียงร้อยละ 5.0 ทำให้ *P. mirabilis* มีค่าการเจริญวัดค่าความชุ่นได้  $0.12 \pm 0.006^B$  และใช้ระยะเวลานานถึง 4.5 ชั่วโมงที่จะทำให้มีจุลชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า ส่งผลให้ *P. mirabilis* เจริญลดลงร้อยละ 59.3 จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญของ *P. mirabilis* ได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบไม่เติมสารที่มีค่าการเจริญด้วยความชุ่นได้  $0.35 \pm 0.029^C$  และใช้เวลาเพียง 2.16 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังศึกษาประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญของ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ 35°C พนวณการเติมสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ความเข้มข้นร้อยละ 25 ทำให้ *P. mirabilis* มีค่าการเจริญวัดค่าความชุ่นเท่ากับ  $0.41 \pm 0.004^B$  และใช้ระยะเวลานานถึง 1.9 ชั่วโมงที่จะทำให้มีจุลชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า ส่งผลให้ *P. mirabilis* เจริญลดลงร้อยละ 76.52 จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญของ *P. mirabilis* ได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบไม่เติมสารที่มีค่าการเจริญวัดค่าความชุ่นเท่ากับ  $1.41 \pm 0.033^A$  และใช้เวลาเพียง 0.74 ชั่วโมงทำให้มีจุลชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า ดังนั้นการเติมสาร CFS จาก *B. licheniformis* ศึกษาร่วมกับปัจจัยของอุณหภูมิจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญของ *P. mirabilis* เมื่องจากสารดังกล่าวมีฤทธิ์ขับยับการเจริญของแบนคที่เรียกที่เป็นต้นเหตุก่อปัญหาน้ำพิษทางกลืนก้าช แอนโนเนีย และก้าชไอก็อโรเจนซัลไฟด์ได้จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงไปของ pH ในระหว่างการศึกษาปัจจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญของ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ 35 และ 45°C พนวณ pH มีการเปลี่ยนแปลงในแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเมื่อ *P. mirabilis* แสดงการเจริญที่เปลี่ยนแปลงไป สำหรับองค์ประกอบของปัจจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* แสดงดังตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 องค์ประกอบของปัจจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญของ *P. mirabilis*

Factor		Specific growth rate ( $\text{h}^{-1}$ )	Biomass doubling time (h)
35°C Nutrient broth	pH 3	0.1497 <sup>F</sup>	4.630 <sup>a</sup>
	pH 5	0.1489 <sup>F</sup>	4.655 <sup>a</sup>
	pH 5.5	0.3033 <sup>E</sup>	2.285 <sup>b</sup>
	pH 6	0.4493 <sup>C</sup>	1.542 <sup>d</sup>
	pH 7	0.926 <sup>A</sup>	0.748 <sup>f</sup>
	pH 9	0.5695 <sup>B</sup>	1.217 <sup>e</sup>
45°C Nutrient broth	25% CFS	0.3609 <sup>D</sup>	1.920 <sup>c</sup>
	pH 3	0.1181 <sup>E1</sup>	5.869 <sup>a1</sup>
	pH 5	0.1275 <sup>D1</sup>	5.436 <sup>b1</sup>
	pH 7	0.2943 <sup>A1</sup>	2.355 <sup>e1</sup>
	pH 9	0.1744 <sup>B1</sup>	3.974 <sup>d1</sup>
	5% CFS	0.1543 <sup>C1</sup>	4.492 <sup>c1</sup>
(โสร์วีซ์ จันทรารี, 2555)	Glucose broth pH 6.8-7	30°C	0.147 <sup>C2</sup>
		35°C	0.154 <sup>B2</sup>
		40°C	0.160 <sup>A2</sup>
		45°C	0.059 <sup>D2</sup>
			11.768 <sup>a2</sup>

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในแนวสอดคล้องกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $P>0.05$ )

#### ข้อเสนอแนะ

- (1) การศึกษาในการวิจัยนี้ได้พิจารณา *B. licheniformis* สำหรับการผลิตสารต้านจุลชีพที่อุณหภูมิ 35°C บ่มเพียง 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากมีการศึกษาปัจจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะเพิ่มการผลิตสารให้มีปริมาณความเข้มข้นสูงขึ้นเพื่อจะเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *P. mirabilis*
- (2) การเติม glucose ร่วมกับสาร CFS ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญของ *P. mirabilis* เนื่องจากการหมักกาบนำต่อผลลัพธ์การทำให้เกิดกรดคั่งน้ำนมจากการเติม glucose ในอาหารเหลวช่วยลดการผลิตก๊าซแอนโรมเนียและก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เนื่องจากกรดจะไปยับยั้งการเจริญของ *P. mirabilis*
- (3) ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการทดลองควบคุมปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น แต่ศึกษาปัจจัยการควบคุมการเจริญของ *P. mirabilis* เนื่องจากการควบคุมเชื้อสาเหตุที่ก่อปัญหาหลักก๊าซแอนโรมเนียและก๊าซ

ไฮโดรเจนซัลไฟฟ์ให้มีการเจริญคลคลงกีเป็นอิทธิหนึ่งสำหรับความคุณที่ดันเหตุในการก่อมลพิษก้าวกลืนเหมือนจากแบคทีเรีย

(4) ในการนำไปประยุกต์ใช้ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่นการผลิตเป็นผงสาปรีแล้วนำไปรือในบริเวณที่ก่อปัญหาภัยลุนแอน โนนเนยและไฮโดรเจนซัลไฟฟ์ หรือ ผลิตเป็นหัวเชื้อเหลวแล้วนำไปฉีดพ่นบริเวณที่ก่อปัญหาภัยลุน เนื่องจากการเจริญของ *B. licheniformis* ในสภาวะปกติสามารถผลิตสารต้านจุลชีพได้ อีกทั้ง *B. licheniformis* เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคและยังเป็นพรไนโอดิก

(5) หากมีการนำไปประยุกต์ใช้ในระบบบำบัดของเสีย เช่น ระบบบำบัดน้ำเสียแบบ bioscrubber biofilter และ biotrickling filter (Syed et al., 2006) ที่ก่อปัญหาภัยลุนแอน โนนเนยและไฮโดรเจนซัลไฟฟ์ โดยใช้หัวเชื้อ *B. licheniformis* เดินลงในระบบดังกล่าวจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมมลพิษทางภัยลุนแอน โนนเนยและไฮโดรเจนซัลไฟฟ์ได้

เอกสารอ้างอิง

## เอกสารอ้างอิง

- กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการการศึกษาความเหมาะสมของการกำหนดค่ามาตรฐานและวิธีการตรวจวัดคลื่นจากฟาร์มสุกร. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552.
- . เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ โครงการวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการและควบคุมมลพิษในอากาศ (ระบบกำจัดกลิ่นแบบชีวภาพ). กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2554.
- กระทรวงอุตสาหกรรม กรมโรงงานอุตสาหกรรม. คู่มือการจัดการสิ่งแวดล้อมอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : สำนักเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม, 2542.
- กองสุขาภิบาลสิ่งแวดล้อม. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการการจัดการความปลดปล่อยแก๊สและมาตรฐานความปลดปล่อย. กรุงเทพฯ : สำนักอนามัย น.1-5, 2554.
- ทิพกานทร โสภณพัฒนกิจ และบุญพิน ค่านุสิตาพันธ์. การคัดเลือก *Bacillus* sp. ที่มีความสามารถในการลดแอมโมเนียในไตรท์ และในเตอร์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2553.
- นพกานทร พานิช, แสงสันติ พานิช และวันชัย ริวิไพบูลย์. ตัวราระบบบำบัดมลพิษอากาศ. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2550.
- มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. บุคลากรวิทยาปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, 2554.
- มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาเบื้องต้น. อุบลราชธานี : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์, ม.ป. ป.
- สุภาพร หวังศรีเจริญ และวสุ ปฐมอารีย์. “การกำจัดก้าช ไฮโครเจนซัลไฟด์ที่ปนเปื้อนในก้าชชีวภาพโดยจุลินทรี”, KKU Science Journal. 37(2) : 130-136, 2009.
- สมศักดิ์ วงศ์. จุลินทรีและกิจกรรมในดิน. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช, 2528.
- โลสวีร์ย์ จันทร์ราเร. การศึกษาจุลพลศาสตร์การเจริญของ *Bacillus licheniformis* แบบกะในอาหารเหลว. สารนิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต : มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2555.
- อรุณวรรณ หวังกอบเกียรติ, อรุณ กันธิยะ และอมรา จันทน์โอ. “ผลของอีอิเม็ต่อการยับยั้งการเกิดไฮโครเจนซัลไฟด์”, โครงการวิจัย EM และผลของการใช้ต่อการเกษตร และสิ่งแวดล้อม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตร และสหกรณ์, กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2538.

### เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Anderson, J. Groundwater, W. and Worsley, J. Antibacterial agents. India: Wiley publishers science 1807, 2012.
- Allison, D.G., Gilbert, P. and Lambert, P.A. "Antimicrobial action basic principles", Molecular medical microbiology. 10(2): 585-590, 2002.
- APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington: APHA, Inc. Street, NW, 2005.
- Annenberg, L. Rediscovering Biology. Unit 4 Microbial Diversity. [http://www.learner.org/channel/courses/biology/textbook/microb/microb\\_8.html](http://www.learner.org/channel/courses/biology/textbook/microb/microb_8.html), May 19, 2005.
- Aneja, V.P. and et al. "Measurement and analysis of atmospheric ammonia from anaerobic lagoons", Atmospheric Environment. 35(11): 1949-1958, 2001.
- Arogo, J. and et al. "Hydrogen sulfide production from stored liquid swine manure: a laboratory study", Transactions of the ASAE. 43(5): 1241-1245, 2000.
- Arogo, J., Westerman, P.W and Heber, A.J. "A review ammonia emissions from confined swine feeding operations", ASAE paper. 46(3): 805-817, 2002.
- Bitton, G. and Wiley, Wastewater Microbiology. 3<sup>rd</sup> Edition. New Jersey: Inc.Haboken, 2005.
- Cheremisinoff, P.N. and Young, R.A. Industrial Odor Technology Assessment. Michigan: Ann Arbor Science Publ, 1975.
- Chung, Y.C., Huang, C. and Tseng, C.Y. "Biological elimination of H<sub>2</sub>S and NH<sub>3</sub> from wastegases by biofilter packed with immobilized heterotrophic bacteria", Chemosphere. 43(8): 1043-1050, 2001.
- Chester, F.D. A Manual of Determinative Bacteriology. New York: The Macmillan Co., 1901
- Dague, R.R. "Fundamental of Odor Control", Journal of the Water Pollution Control Federation. 44(4): 583-589, 1972.
- Daniel, C. EPA Air Pollution Control Cost Manual. 6<sup>th</sup> Edition. North Carolina: Springfield, 2002.
- Detch, C. and Stulke, J. "Ammonia utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory function of NrgA and NggB", Microbiology. 149(11): 3289-3297, 2003.

### เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Devinny, S.J., Deshusses, M.A. and Webster, T.S. Biofilter for Air Pollution Control. England: Lewis Publishers, 1999.
- Fraga, M., Scavone, P. and Zunino, P. "Preventive and therapeutic administration of an indigenous *Lactobacillus* sp. strain against *Proteus mirabilis* ascending urinary tract infection in a mouse model", Antonie van Leeuwenhoek. 88(1): 25–34, 2005.
- Galera, M.M. and et al. "Effects of pollutant concentration ratio on the simultaneous removal of NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S and toluene geses using rock wool-compost biofilter", Hazardous Material. 152(2): 624-631, 2008.
- Guo, Y. and et al. "Identification of a New *Bacillus licheniformis* Strain Producing a Bacteriocin-Like Substance", Journal of Microbiology. 50(3): 452–458, 2012.
- He, L., Chen, W. and Liu, Y. "Production and partial characterization of bacteriocin-like pepitides by *Bacillus licheniformis* ZJU12", International Journal of Microbiology. 161(4): 321-326, 2006.
- Hobbs, P.J., Misselbrook, T.H. and Cumby, T.R. "Productions and emissions of odours and gases from aging pig wasre", Journal of Agricultural Engineering Research. 72(3): 291-298, 1999.
- Nakada, Y. and Ohta, Y. "Purification and properties of hydrogen sulfide oxides from *Bacillus* sp. BN53-1", Journal of Bioscience and Bioengineering. 87(4): 452-455, 1999.
- Nagarajan, K. and Paramasamy, G. "Purification and Characterization of a Novel Broad-spectrum Bacteriocin from *Bacillus licheniformis* MKU3", Biotechnology and Bioprocess Engineering. 15(2): 365-370, 2010.
- Nasrin M.S. and et al. "Identification of bacteria and determination of their load in adult layer and its environment", Journal Bangladesh Society Agricultural Science Technology. 4(1 & 2): 69-72, 2007.
- Occupational Safety and Health Administration (OSHA) Ammonia and Hydrogen Sulfide. New York: United States Department of Labor. 96813, 1995.

### ເອກສາຣອ້າງອີງ (ຕ່ອ)

- Olivera, F.C., Caron, G.R. and Brandelli, A. "Bacteriocin like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40", Letters in Applied Microbiology. 38(4): 251-256, 2004.
- Pandima, K. and et al. "Eugenol alters the integrity of cell membrane and acts against the nosocomial pathogen *Proteus mirabilis*", Archives of Pharmacal Research. 36(3): 282–292, 2013.
- Prywer, J. and Torzewska, A. "Effect of Curcumin Against *Proteus mirabilis* During Crystallization of Struvite from Artificial Urine", Alternative Medicine. 10(1):1-7, 2012.
- Rafson, H.J. Odor and VOC Control Handbook. New York: McGraw-Hill, 1988.
- Ryazanova, L.P. and et al. "Effect of the Proteolytic Enzymes of *Bacillus licheniformis* and the lysoamidase of *Lysobacter* sp. XL1 on *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis* cells", Applied Biochemistry and Microbiology. 41(5): 490–494, 2005.
- Sasaki, H. and et al. "Ammonia removal from livestock wastewater by ammonia-assimilating microorganisms immobilized in polyvinyl alcohol", Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 34(2): 105-110., 2007.
- Sawyer, C.N. and McCarty, P.L. Chemistry for Environmental Engineering. 3<sup>rd</sup> Edition New York: McGraw Hill Book Company, 1978.
- Ser Intan, M. and et al. "production of Extra-Cellular Proteases from Marine *Bacillus* sp. Cultured in media containing Ammonium Sulfate as the sole Nitrogen source", Malaysian Journal of Microbiology. 1(2): 30-34, 2005.
- Sharma, S. Ram, S. and Poonam, K. "*Bacillus licheniformis* IITRHR2: A novel source of antimicrobial proteinaceous food substance", International Journal of Microbiology. 2(9): 127-133, 2010.
- Stilinovic, B. and Hrenovic J "Plate method for counting proteolytic sulfide-producing bacteria", Acta Botanica Croatica. 68(1), 57-66, 2009.
- Stilinovic, B. and Hrenovic J "Rapid detection of sulfide-producing bacteria from sulfate and tiosulfate", Folia Microbiologica. 49(2): 53-58, 2004.

### เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Syed, M. and et al. "Removal of hydrogen sulfide from gas streams using biological processes -A review", Canadian Biosystems Engineering. 48(1): 2.1-2.14, 2006.
- Terence, R. and Michael, A. "Isolation and Identification of Hyper-Ammonia Producing Bacteria from Swine Manure Storage pits", Current Microbiology. 48(1): 20-26, 2004.
- Weigmann, H "Ueber zwei an der Kasefereifung beteiliget Bakterien" Zentbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. II. 4(2): 820-834, 1898.
- William, M.O. Practical Handbook of Microbiology. Boston: CRC Press, 1990.
- William, O. and Wambura, M. "Isolation and Characterization of Pathogenic Bacteria and Fungi from *Leptoptilos crumeniferus* (Marabou Stork) Droppings", Journal of Applied Technology in Environmental Sanitation. 1(1): 93-106, 2011.
- Wistreich, G.A. and M.D. Lechtmean. Laboratory Exercises in Microbiology. 4<sup>th</sup> ed. New York: Macmillan Publishing Co. Inc., 1980.
- Wungkobkiat, A., Kuntiya, A. and Chatanao, A. "Effect of EM on Inhibition of Hydrogen Sulfide Production", Kasetsart Journal (Natural Science). 30(5): 227-235, 1996.
- Yun, S.I. and Ohta, Y. "Some physiological properties of microorganism capable of deodorizing farm animal feces", Bioresource Technology. 60(1): 21-26, 1997.

**ภาคผนวก**

ภาคผนวก ก  
อาหารเลี้ยงเชื้อและอุปกรณ์

## อาหารเลี้ยงเชื้อและอุปกรณ์

### 1. Nutrient Agar (NA)

สูตรอาหาร NA 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

Meat extract	3.0 กรัม
Peptone	5.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม
pH	6.8-7.0

ละลายส่วนผสมต่างๆ ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.8-7.0 ด้วย 0.1 M HCl หรือ 1N NaOH และนำไปปั่นเชือกที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 50-60°C และเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

### 2. Nutrient Broth (NB)

สูตรอาหาร NB 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

Meat extract	3.0 กรัม
Peptone	5.0 กรัม
pH	6.8-7.0

ละลายส่วนผสมต่างๆ ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.8-7.0 ด้วย 0.1 M HCl หรือ 1N NaOH และนำไปปั่นเชือกที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที

### 3. Glucose broth (Dextrose broth)

สูตรอาหาร GB 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

Meat extract	10.0 กรัม
Peptone	10.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Glucose (Dextrose)	20 กรัม
pH	6.8-7.0

ละลายส่วนผสม Meat extracts, Casein Peptone และ Sodium chloride ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ส่วน Glucose (Dextrose) ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตรนำไป

บรรจุขวดแยกกันแล้วปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.8-7.0 ด้วย 0.1 M HCl หรือ 1N NaOH และนำไป放  
เขื่อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาทีรอให้เย็นแล้วนำมาระบายน้ำ

#### 4. Urea Agar Base (UAB)

สูตรอาหาร UAB 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

NaCl	5.0 กรัม
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.2 กรัม
Peptone	1.0 กรัม
Glucose	1.0 กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.8 กรัม
Phenol Red	0.012 กรัม
Agar	15.0 กรัม

ละลายส่วนผสมต่างๆ ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.8-7.0  
ด้วย 0.1 M HCl หรือ 1N NaOH และนำไป放เขื่อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที ตั้งทิ้ง  
ไว้ให้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 50-60 °C เดิน 40% Urea solution ปริมาตร 50.0 มิลลิลิตรแล้วเทลงบนจาน  
อาหารเลี้ยงเชื้อ

40% Urea solution 100 มิลลิลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

Urea	40.0 กรัม
------	-----------

เตรียม 40% Urea solution โดยชั่ง Urea 40.0 g เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100  
มิลลิลิตรทำให้ปอดดเชื้อนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมครอน

#### 5. Triple Sugar Iron Agar (TSI)

สูตรอาหาร TSI 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

Beef extract	3.0 กรัม
Yeast extract	3.0 กรัม
Peptone	15.0 กรัม
Protease peptone	5.0 กรัม

Lactose	10.0 กรัม
Dextrose	1.0 กรัม
Sucrose	10.0 กรัม
FeSO <sub>4</sub>	0.2 กรัม
NaCl	5.0 กรัม
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.3 กรัม
Agar	12.0 กรัม
Phenol Red	0.024 กรัม

ละลายน้ำในน้ำกําลังปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ถูกต้องในช่วง 6.8-7.0

ด้วย 0.1 M HCl หรือ 1N NaOH แบ่งใส่หลอดแล้วนำไปผ่านเครื่องที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที นำออกมาน้ำอุ่นหล่อลงในร้อนแล้วเทลงในภาชนะที่ต้องการ

## 6. อุปกรณ์

Spectrophotometer (WPA, Colourwave, UK)

Spectrophotometer (Perkin Elmer, USA)

Centrifuge (Hettich, Germany)

Incubator shaker (Innova, USA)

Autoclave (ALP, Japan)

Hot air oven (Memmert, Germany)

pH Meter (Metrohm, Switzerland)

Water bath (Contherm, Newzealand)

Auto pipette (Gilson, France)

Test tube (Pyrex, USA)

Erlenmeyer flask (Pyrex, USA)

Cylinder (Pyrex, USA)

Beaker (Pyrex, USA)

**ภาคผนวก ข**  
**สารคณีและวิธีการวิเคราะห์**

## สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

### 1. สารเคมี

Glucose/C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (Fluka, Switzerland)  
 Sucrose/C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> (Merck, Germany)  
 Starch/ (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub> (Fluka, Switzerland)  
 Urea/ CO (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (Ajax, Newzealand)  
 Dextrose/C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (Fluka, Switzerland)  
 Ammonium nitrate/NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (Carlo Erba, Italy)  
 Ammonium sulfate/ NH<sub>4</sub> SO<sub>4</sub> (Fluka, Switzerland)  
 Casein peptone (HIMEDIA, India)  
 Yeast extracts (HIMEDIA, India)  
 Meat extracts (HIMEDIA, India)  
 Magnesium sulfate/MgSO<sub>4</sub> (Ajax, Newzealand)  
 Potassium dihydrogen phosphate/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Carlo Erba, Italy)  
 Absolute ethyl alcohol/C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (Merck, Germany)  
 Ferric sulfate/FeSO<sub>4</sub> (Riedel, Germany)  
 Sodium chloride /NaCl (Carlo Erba, Italy)  
 Sodium hypochlorite/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Carlo Erba, Italy)  
 di- Potassium hydrogen orthophosphate/3H<sub>2</sub>O(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Riedel, Germany)  
 Phenol red/C<sub>19</sub>H<sub>1405</sub>S (Fluka, Switzerland)

### 2. การย้อมสีเกรม (Gram's stain)

#### 2.1 การเตรียมสารเคมี

##### 2.1.1 Crystal violet

สารละลายน้ำ A: Crystal violet (85 % dye)	2.0 กรัม
Ethyl alcohol 95 %	20.0 มิลลิลิตร
ละลายน้ำในขวดกอนหดตัวจะดีที่สุด	

สารละลายน้ำกับสารละลายน้ำ	0.8 กรัม
น้ำกับน้ำ	80.0 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายน้ำ กับสารละลายน้ำ ถ้ามีตะกอนกรองก่อนการใช้ และถ้ามีสีเข้มเกินไปอาจเจือจางสารละลายน้ำ เป็น 1:10 ก่อนผสมกับสารละลายน้ำ

#### 2.1.2 Safranin (Stock safranin)

Safranin	2.5 กรัม
Ethyl alcohol 95 %	100.0 มิลลิลิตร

ถ้าจะใช้สีในการข้อมให้เจือจาง 1:10 (Stock safranin 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำก้อน 90 มิลลิลิตร) ถ้ามีตะกอนกรองก่อนการใช้ทุกครั้ง

#### 2.1.3 Gram's iodine solution (mordant)

Iodine (crystal)	1.0 กรัม
Potassium iodine (KI)	2.0 กรัม
น้ำกับน้ำ	300.0 มิลลิลิตร

คลาด Iodine และ Potassium iodine ในน้ำก้อนปริมาณน้อยๆ ก่อน แล้วเติมน้ำให้ครบ แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

#### 2.1.4 Alcohol

Ethyl alcohol 95 %	100.0 มิลลิลิตร
--------------------	-----------------

### 2.2 วิธีการปฏิบัติ

2.2.1 ทำความสะอาดสไลด์ และเช็ดให้แห้ง

2.2.2 เครื่ยมรอยสเมียร์และตรึงเซลล์ด้วยความร้อน

2.2.3 หยดสี Crystal violet ให้ทั่วรอยสเมียร์ ทึ่งไว้นาน 1 นาที

2.2.4 เทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ลงในอ่างน้ำ แล้วซัดด้วยสารละลายน้ำ iodine หลังจากนั้นหยดสารสารละลายน้ำ iodine ให้ทั่วรอยสเมียร์ และทึ่งไว้นาน 1 นาที

2.2.5 เทสารละลายน้ำ iodine ทึ่ง แล้วซัดด้วยสารละลายน้ำ ethyl alcohol 95 % หรือแอลกอฮอล์อาเซติดอน จนกระทั้งไม่มีสีม่วงละลายออกมาน แต่ถ้าให้เกิน 20 วินาที แล้วค้างน้ำทันทีโดยให้น้ำผ่านเบาๆ

2.2.6 ขับด้วยกระดาษชัน และข้อมทับด้วยการหยดสี Safranin ทั่วรอยสเมียร์ทึ่งไว้นาน 1 นาที

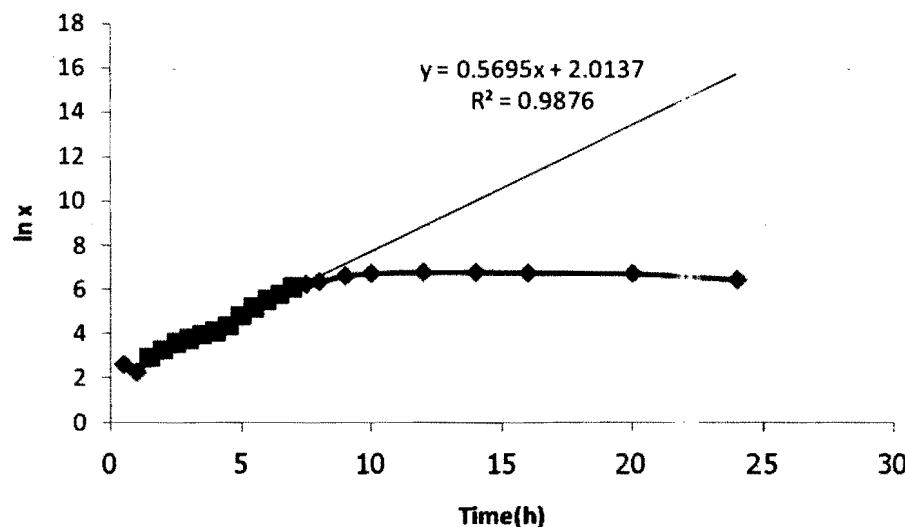
### 2.2.7 เทสทิ้ง ล้างด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษซับ วางทิ้งไว้ให้แห้ง

### 2.2.8 นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

## 3. วิธีคำนวณหาค่าจลนพลาสตร์ (Kinetics)

### 3.1 ค่าอัตราจำเพาะการเจริญ (Specific growth rate; $\mu$ )

จากสมการ  $y = \mu X + b$  ดังนี้จะสามารถหาค่า  $\mu$  โดยเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแกน  $x$  คือ เวลา ( $t$ ) มีหน่วยเป็นชั่วโมงกับแกน  $y$  คือ  $\ln x$  ( $\ln$  ของมวลชีวภาพ)



ภาพตัวอย่าง กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา(ห) กับ  $\ln X$  ( $\ln$  ของCDW (mg/L)) ของ *Proteus mirabilis* ที่อุณหภูมิ  $35^\circ\text{C}$  pH 9.0

จากการตัวอย่างจะสามารถบอกรอตัวจำเพาะของการเจริญ ได้จากสมการ  $y = 0.5695x + 2.0137$  ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.5695 ดังนั้น *Proteus mirabilis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth อุณหภูมิ  $35^\circ\text{C}$  pH 9.0 มีค่าอัตราจำเพาะของการเจริญเท่ากับ  $0.5695 \text{ h}^{-1}$

### 3.2 ระยะเวลาที่มวลชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า (Biomass doubling time; $t_d$ )

จากสมการ  $t_d = \ln 2 / \mu$  ดังนี้จะสามารถหาค่า  $t_d$  ได้จากการแทนค่า  $\mu$  จากข้อ 3.1 ลงในสมการจะได้  $t_d = \ln 2 / 0.5695 \text{ h}^{-1}$  มีค่าเท่ากับ 1.217115 h ดังนั้น *Proteus mirabilis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth อุณหภูมิ  $35^\circ\text{C}$  pH 9.0 ใช้ระยะเวลา 1.217115 ชั่วโมงที่มวลชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า(Biomass doubling time)

#### 4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม The SAS System for Windows 9.0 (English)

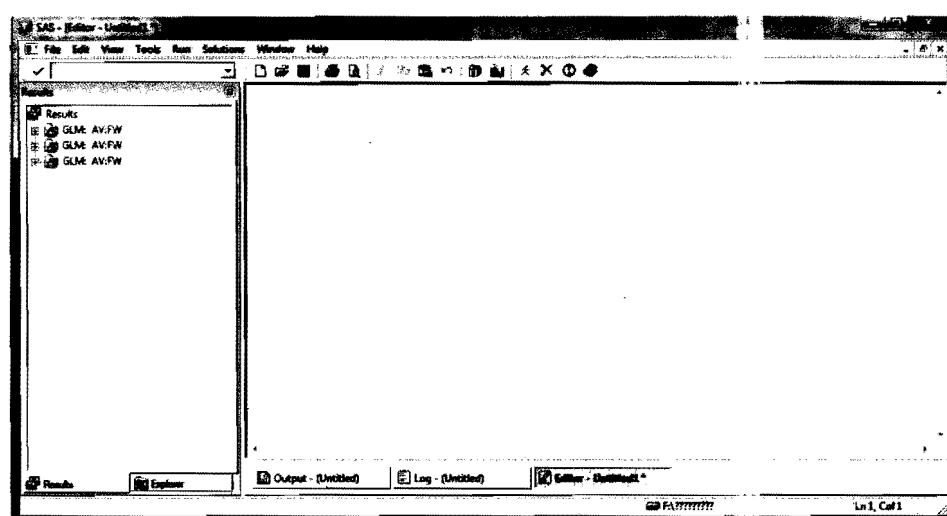
##### 4.1. The SAS System for Windows 9.0 (English)

SAS เป็นคำย่อมาจาก Statistical Analysis System ซึ่งองค์ประกอบของหน้าต่างของ SAS system ในระบบ SAS จะแสดง 3 หน้าต่าง

4.1.1 PGM (Program Editor) : ใช้เขียนคำสั่ง SAS และแก้ไขข้อมูลทั่วๆไป

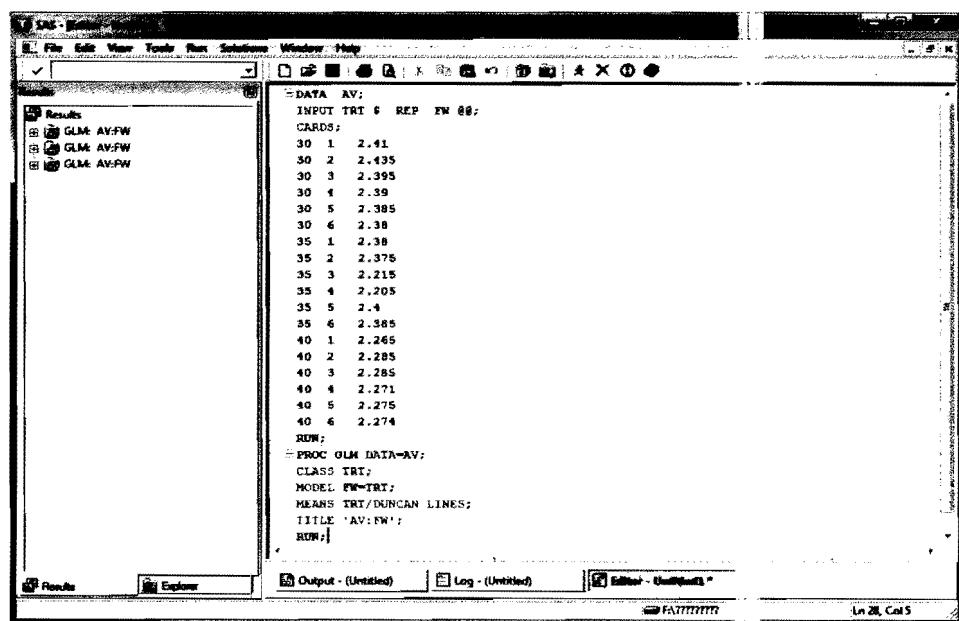
4.1.2 Log : ส่วนที่แสดงลำดับการทำงานของชุดคำสั่งและความผิดพลาด

4.1.3 Output : แสดงสิ่งที่ได้จากการประมวลผลของชุดคำสั่ง SAS



##### 4.2. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test

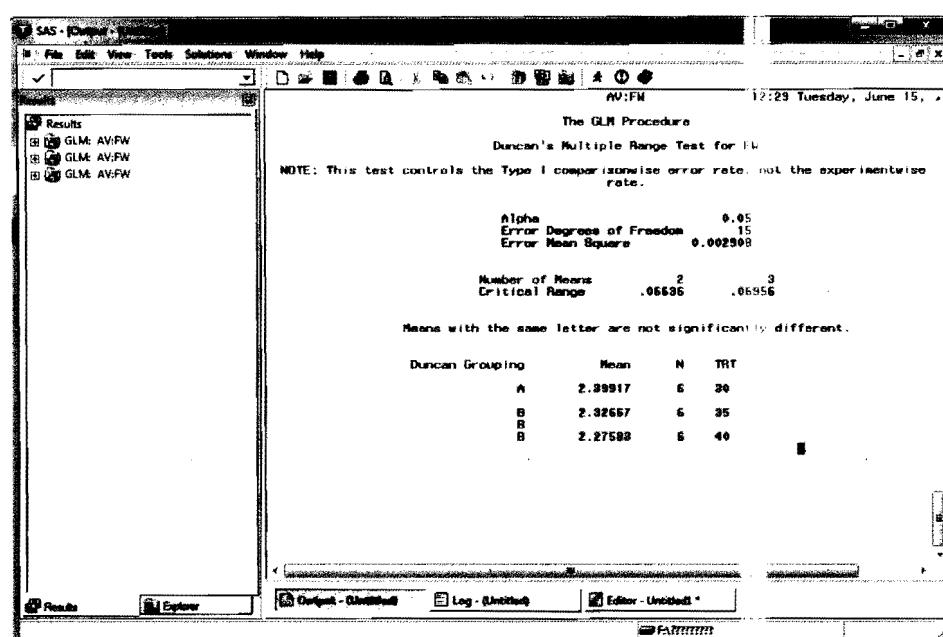
###### 4.2.1 วางแผนข้อมูลที่จัดเรียงไว้แล้วในช่องเขียนคำสั่ง SAS



#### 4.2.2 กดสัญลักษณ์ Submit ในแดปเบอร์เครื่องมือ เพื่อให้ประมวลผลตามคำสั่ง



#### 4.2.3 เลือกหน้าต่าง Output จะแสดงข้อมูลที่ประมวลผลดังนี้



#### 4.2.4 นำข้อมูลที่ได้มาแบ่งรุ่ง

Temperatures (°C)	Growth of bacteria (OD <sub>600nm</sub> )
30	2.40 <sup>A</sup> ± SD
35	2.32 <sup>B</sup> ± SD
40	2.27 <sup>B</sup> ± SD

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในแนวส่วนก์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น  
ร้อยละ 95 (P>0.05)

### ภาคผนวก ค

**ข้อมูลการทดสอบและข้อมูลการวิเคราะห์สถิติ**

### ข้อมูลการทดสอบและข้อมูลการวิเคราะห์สถิติ

#### 1. การเจริญและการผลิตสารต้านจุลชีพของเชื้อ *B. licheniformis*

Time(h)	CDW(mg/20ml)		log CFU/ml		OD <sub>590nm</sub>		pH	
	Mean *	SD	Mean *	SD	Mean *	SD	Mean *	SD
0	0.7000	0.2646	4.9182	0.0639	0.1250	0.0138	6.7033	0.0103
4	1.1000	0.1000	6.9815	0.1784	0.3900	0.0179	6.8433	0.0216
8	2.9333	0.3512	7.6128	0.2080	0.5783	0.0392	6.8417	0.1280
12	3.8000	0.2646	8.8140	0.1148	0.7117	0.0523	6.9067	0.1335
16	8.4000	0.1000	9.8261	0.1686	0.8100	0.0283	7.3750	0.0468
20	10.9667	0.5859	10.6180	0.1404	0.9917	0.0354	7.4333	0.1858
24	13.2333	0.5033	11.6659	0.2042	1.3967	0.0969	7.5100	0.1614
28	14.2000	0.4583	11.8162	0.2061	1.5490	0.1012	7.5983	0.0733
32	15.4000	0.4000	11.8583	0.1200	1.6367	0.0698	8.0567	0.1194
36	15.6333	0.2887	11.8039	0.3177	1.7167	0.0599	7.8050	0.1037
40	15.0000	1.0583	10.5272	0.1815	1.7600	0.0438	7.8150	0.3182
44	9.0667	1.2503	7.6484	0.0449	1.6933	0.0589	8.0950	0.2141
48	12.7667	0.1528	8.8050	0.0239	1.5000	0.0179	8.2383	0.0677

#### 2. อุณหภูมิที่ส่งผลต่อกรรมการต้านจุลชีพของสาร CFS จาก *B. licheniformis*

Duncan Grouping	Mean *	N	TRT (°C)
A	16.3333	6	45 (CFS)
A	16.0000	6	45 (FC)
B	3.3333	6	40 (CFS)
B	2.6667	6	40 (FC)
C	2.0000	6	50 (CFS)
DC	1.6667	6	35 (CFS)
DE	1.3333	6	50 (FC)
FE	1.0000	6	30 (CFS)
FG	0.6000	6	35 (FC)
FG	0.4000	6	30 (FC)
G	0.1667	6	55 (CFS)
G	0.1000	6	55 (FC)

3. อุณหภูมิที่ส่งผลต่อการเจริญของ *P. mirabilis*

Duncan Grouping	Mean *	N	TRT (°C)
A	2.26483	6	30
A	2.15983	6	35
B	2.00367	6	40
C	0.55383	6	45
D	0.04617	6	50
D	0.03762	6	55

4. อุณหภูมิที่ส่งผลต่อการเจริญของ *B. licheniformis*

Duncan Grouping	Mean *	N	TRT (°C)
A	2.39917	6	30
A	2.32667	6	35
A	2.27583	6	40
B	1.91750	6	45
C	0.33833	6	50
D	0.03845	6	55

5. pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* ที่อุณหภูมิ 35°C

Time (h)	pH 3.0		pH 9.0		pH 5.0		pH 7.0	
	Mean *	SD						
0	0.008383	0.000778	0.003533	0.000344	0.003467	0.000761	0.006267	0.000314
4	0.008117	0.000728	0.00705	0.001084	0.008317	0.00153	0.095333	0.005715
8	0.005733	0.001469	0.006967	0.000589	0.060917	0.014008	0.95355	0.027219
12	0.00595	0.001332	0.0405	0.016046	0.849817	0.017227	2.15295	0.018575
16	0.01015	0.001595	0.208383	0.060539	1.424567	0.040197	2.6646	0.058181
20	0.007233	0.001317	0.4099	0.049457	1.7038	0.0559	2.8576	0.036058
24	0.0051	0.001538	1.1826	0.022418	1.81725	0.051643	2.439667	0.028473
28	0.008267	0.001216	1.719767	0.07886	2.2696	0.023357	2.484	0.024697
32	0.008433	0.001255	1.8497	0.022636	2.664	0.051131	2.4026	0.01549
36	0.009133	0.000121	2.228	0.121576	2.7663	0.056367	2.39415	0.011422

5.1 ค่าอัตราจำเพาะการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* ที่อุณหภูมิ 35°C

Duncan Grouping	Mean *	N	TRT (°C)
A	0.1053	1	pH 7.0
B	0.0613	1	pH 5.0
C	0.0501	1	pH 9.0
-	0	1	pH 3.0

5.2 ระยะเวลาที่มีผลชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าของเชื้อ *B. licheniformis* ที่อุณหภูมิ 35°C

Duncan Grouping	Mean *	N	TRT (°C)
A	13.8352	1	pH 9.0
B	11.3074	1	pH 5.0
C	6.5825	1	pH 7.0
-	0	1	pH 3.0

6. pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ 35°C

Time (h)	pH 3.0		pH 5.5		pH 6.0		pH 5.0	
	Mean *	SD						
0	0.00245	0.000513	0.002267	0.000459	0.002267	0.000339	0.003083	0.000376
4	0.005833	0.000579	0.0402	0.003503	0.135317	0.004676	0.040937	0.000258
8	0.007817	0.000611	0.152633	0.03188	0.78865	0.009272	0.121583	0.001114
12	0.01305	0.001809	0.65985	0.028812	1.3581	0.021409	0.122167	0.000931
16	0.017583	0.001367	1.21	0.033014	1.6442	0.016581	0.185167	0.000931
20	0.020217	0.002739	1.5979	0.045204	1.60585	0.015835	0.205	0.000707
24	0.011067	0.000779	1.5769	0.060278	1.55135	0.013814	0.215	0.00114

6.1 ค่าอัตราจำเพาะการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ 35°C

Duncan Grouping	Mean *	N	TRT (°C)
A	0.9260	1	pH 7.0
B	0.5695	1	pH 9.0
C	0.4493	1	pH 6.0
D	0.3033	1	pH 5.5
E	0.1489	1	pH 5.0
E	0.1497	1	pH 3.0

Time (h)	pH 7.0		pH 9.0	
	Mean*	SD	Mean*	SD
0	0.001708	0.000188	0.001667	0.000204
0.5	0.012458	0.001728	0.031875	0.049303
1	0.027167	0.002897	0.024167	0.002143
1.5	0.055667	0.001708	0.041125	0.001928
2	0.097	0.003947	0.055375	0.001928
2.5	0.191333	0.007431	0.073	0.002646
3	0.289778	0.006337	0.085708	0.004454
3.5	0.387167	0.012809	0.105292	0.003662
4	0.4905	0.010095	0.121583	0.00629
4.5	0.665167	0.016437	0.155042	0.011882
5	0.816167	0.027169	0.238167	0.017466
5.5	0.975	0.082678	0.35025	0.009648
6	1.12775	0.043052	0.490417	0.051188
6.5	1.20475	0.098692	0.621833	0.009579
7	1.32775	0.062616	0.858542	0.078714
7.5	1.373667	0.125942	0.974842	0.023399
8	1.458667	0.024582	1.086979	0.123514
9	1.585167	0.014442	1.39625	0.044357
10	1.657333	0.029494	1.568258	0.04057
12	1.720417	0.050755	1.665267	0.044829
14	1.683333	0.036765	1.652625	0.073403
16	1.660083	0.033979	1.604625	0.046139
20	1.682542	0.011721	1.574375	0.069717
24	1.537	0.044137	1.197167	0.043747

6.2 ระยะเวลาที่มวลชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าของเชื้อ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ 35°C

Duncan Grouping	Mean*	N	TRT (°C)
A	4.6302	1	pH 3.0
A	4.6551	1	pH 5.0
B	2.2853	1	pH 5.5
C	1.5427	1	pH 6.0
E	0.7485	1	pH 7.0
D	1.2171	1	pH 9.0

7. pH ที่ส่งผลต่อการเจริญของ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ 45°C

Time (h)	pH 3.0		pH 5.0		pH 7.0		pH 9.0	
	Mean <sup>*</sup>	SD						
0	0.0062	0.0008	0.0067	0.0008	0.0068	0.0008	0.0067	0.0008
1	0.0160	0.0006	0.0173	0.0023	0.0387	0.0028	0.0217	0.0010
2	0.0197	0.0019	0.0312	0.0029	0.0987	0.0027	0.0467	0.0025
3	0.0258	0.0023	0.0583	0.0028	0.1530	0.0035	0.0750	0.0015
4	0.0287	0.0112	0.0590	0.0029	0.1733	0.0026	0.0782	0.0073
6	0.0413	0.0008	0.0623	0.0012	0.1768	0.0029	0.0727	0.0076
8	0.0427	0.0008	0.0762	0.0020	0.1830	0.0021	0.0858	0.0012
24	0.0431	0.0015	0.0705	0.0019	0.1753	0.0027	0.0822	0.0015

7.1 ค่าอัตราจำเพาะการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ 45°C

Duncan Grouping	Mean <sup>*</sup>	N	TRT (°C)
A	0.2943	1	pH 7.0
B	0.1744	1	pH 9.0
C	0.1275	1	pH 5.0
D	0.1181	1	pH 3.0

7.2 ระยะเวลาที่มวลซีวภาพเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าของเชื้อ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ 45°C

Duncan Grouping	Mean <sup>*</sup>	N	TRT (°C)
A	5.8691	1	pH 3.0
B	5.4364	1	pH 5.0
C	2.3552	1	pH 7.0
D	3.9744	1	pH 9.0

8. แหล่งการบอนที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ 35°C

Duncan Grouping	Mean <sup>*</sup>	N	TRT (°C)
A	2.13215	6	NB+1%starch
B	1.76145	6	NB+1%sucrose
C	1.64995	6	NB
D	1.45225	6	NB+1%glucose

9. แหล่งในโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ 35°C

Duncan Grouping	Mean *	N	TRT (°C)
A	2.76960	6	NB+1%peptone
B	1.64995	6	NB
B	1.63325	6	NB+1%ammonium nitrate
C	1.53695	6	NB+1% ammonium sulfate
D	0.69255	6	NB+1%urea

10. pH ที่เปลี่ยนแปลงไประหว่างการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ 35°C

Duncan Grouping	Mean *	N	TRT (°C)
A	9.33417	6	NB+1%urea
B	8.49533	6	NB+1%peptone
C	8.45367	6	NB
D	8.33767	6	NB+1%sucrose
D	8.31083	6	NB+1%starch
E	8.10817	6	NB+1% ammonium sulfate
E	8.09100	6	NB+1% ammonium nitrate
F	4.65883	6	NB+1%glucose

11. แหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* ที่อุณหภูมิ 35°C

Duncan Grouping	Mean *	N	TRT (°C)
A	3.52220	6	NB+1%starch
B	3.14450	6	NB+1%sucrose
C	2.79270	6	NB+1%glucose
C	2.64867	6	NB

12. แหล่งในโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* ที่อุณหภูมิ 35°C

Duncan Grouping	Mean *	N	TRT (°C)
A	4.67833	6	NB+1% ammonium sulfate
BA	4.53247	6	NB+1%peptone
B	4.41000	6	NB+1%ammonium nitrate
C	2.64867	6	NB
D	2.10595	6	NB+1%urea

13. pH ที่เปลี่ยนแปลงไประหว่างการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* ที่อุณหภูมิ 35°C

Duncan Grouping	Mean *	N	TRT (°C)
A	8.15833	6	NB+1% ammonium sulfate
A	8.11083	6	NB+1%urea
B	8.03833	6	NB
B	7.98917	6	NB+1% ammonium nitrate
C	7.86117	6	NB+1%peptone
D	7.33367	6	NB+1%glucose
E	6.84867	6	NB+1%starch
E	6.82317	6	NB+1%sucrose

14. ปริมาณสาร CFS จาก *B. licheniformis* ที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ด้านการเจริญของ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ 35°C

Duncan Grouping	Mean *	N	TRT
A	1.644633	6	5%
B	1.457433	6	0%
B	1.396667	6	10%
C	0.38905	6	25%
D	0.1977	6	50%
E	0.115117	6	75%

15. ปริมาณสาร CFS จาก *B. licheniformis* ที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ด้านการเจริญของ *P. mirabilis* ที่อุณหภูมิ 45°C

Duncan Grouping	Mean *	N	TRT
A	0.241567	6	0%
B	0.1002	6	5%
C	0.0244	6	10%
D	0.007067	6	25%
D	0.005967	6	50%
D	0.006183	6	75%

### 16. การศึกษาประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญของ *P. mirabilis*

Time (h)	35°C		35°C + 25% CFS		45°C		45°C + 5% CFS	
	Mean <sup>*</sup>	SD						
0	0.009433	0.000797	0.009567	0.001669	0.007817	0.00096	0.007533	0.001331
1	0.007133	0.000575	0.010033	0.032202	0.007	0.0008	0.007433	0.000779
2	0.011267	0.002201	0.011033	0.031687	0.008233	0.00072	0.006917	0.000655
3	0.01985	0.00181	0.012533	0.001017	0.008383	0.000705	0.0081	0.000681
4	0.051783	0.002194	0.031267	0.00068	0.015017	0.000922	0.012817	0.000412
5	0.128933	0.006616	0.068867	0.002509	0.024	0.004301	0.016933	0.00035
6	0.255933	0.007403	0.131683	0.014768	0.103583	0.000371	0.076083	0.009169
7	0.512767	0.016533	0.246833	0.049291	0.178717	0.017329	0.12205	0.018089
8	0.8295	0.010401	0.286967	0.044716	0.2106	0.022537	0.12725	0.01347
9	0.9881	0.025993	0.3825	0.009732	0.339617	0.013716	0.121867	0.010838
10	1.228967	0.029577	0.404083	0.004343	0.35545	0.029992	0.1174	0.004352
11	1.380033	0.028738	0.41125	0.004752	0.347467	0.012224	0.124083	0.006129
12	1.417633	0.033279	0.401983	0.007896	0.330233	0.006725	0.120183	0.008876

#### 16.1 ค่าอัตราจำเพาะการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis*

Duncan Grouping	Mean <sup>*</sup>	N	TRT (°C)
A	0.9590	1	35°C
B	0.3609	1	35°C + 25% CFS
C	0.3200	1	45°C
D	0.1543	1	45°C + 5% CFS

#### 16.2 ระยะเวลาที่มีผลชี้วิภาคเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าของเชื้อ *P. mirabilis*

Duncan Grouping	Mean <sup>*</sup>	N	TRT (°C)
A	4.4922	1	45°C + 5% CFS
B	2.1660	1	45°C
C	1.9206	1	35°C + 25% CFS
D	0.7227	1	35°C

หมายเหตุ : Mean<sup>\*</sup> คือ ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ชุด แต่ละชุดวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลอง 2 ครั้ง

**ภาคผนวก ๔**  
**ผลงานทางวิชาการ**

## ผลงานทางวิชาการ

Chansamon, M. and Chaikong, N. "Efficacy of antimicrobial substance from *Bacillus licheniformis* against ammonia and hydrogen sulfide producing bacteria", The 24<sup>th</sup> Annual meeting of the Thai Society for Biotechnology (TSB 2012). 530, 2012

## Efficacy of antimicrobial substance from *Bacillus licheniformis* against ammonia and hydrogen sulfide producing bacteria

**Mano Chansamon<sup>a</sup> and Nareerat Chaikong<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup>Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

\*e-mail: manonaluk@hotmail.com

### **Abstract**

Large amounts of ammonia and hydrogen sulfide producing from bacteria are generated and released from industrial processes, such as petro-chemical refining, food preparation, wastewater treatment, treatment of fuels, and including livestock farming, could cause bad smell to environment. In this study, antimicrobial substance from cell-free broth culture of *Bacillus licheniformis* was prepared and tested for inhibitory efficacy on *Proteus mirabilis*, an ammonia and hydrogen sulfide producing bacteria. The antimicrobial activity was assayed by disc diffusion method. It was found that the antimicrobial metabolite was detected in the middle of the exponential growth phase and the maximum activity was obtained at the early stationary growth phase. The antimicrobial activity of cell-free supernatant of *B. licheniformis* was high against *P. mirabilis* at 45°C. Although too many *P. mirabilis* displayed good growth at 30-40°C, *P. mirabilis* was lower level of growth at 45°C and no *P. mirabilis* growth at 50-55°C.

**Keywords:** Antimicrobial Substance, *Bacillus licheniformis*, Ammonia and hydrogen sulfide producing bacteria.

### **Introduction and Objective**

Recently, the large amounts of ammonia ( $\text{NH}_3$ ) and hydrogen sulfide ( $\text{H}_2\text{S}$ ) are generated and released from industrial processes, such as petro-chemical refining, food preparation, wastewater treatment, treatment of fuels, and including livestock farming. These two odor problems were caused by ammonia and hydrogen sulfide producing bacteria. Many bacteria decompose protein compounds to end products such as ammonia and hydrogen sulfide. A large number of bacterial isolates from stored swine manure were recovered that could grow on a variety of amino acid sources, such as tryptone, casamino acids and casein. These isolates varied in their ability to produce ammonia from the different amino acid sources. Most of the Gram-negative strains were found to be most ammonia production, such as *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Budvicia aquatic*, *Klebsiella pneumonia* and

*Pseudomonas migulae* (Terence et al., 2004). In particular, volatile fatty acids, volatile amines, ammonia and indoles are well-known as offensive odorous materials that are volatilized from livestock waste and its treatment systems (Mackie et al., 1998). Carbon to nitrogen (C/N) ratios in the environment may affect the microbial assimilation of ammonia and the microbial degradation of organic nitrogen (Zehr and Ward et al., 2002). The compound hydrogen sulphide is toxic to animals and plants and its formation in the environment occupies a great attention. The hydrogen sulfide in environmental samples could be the product of bacterial anaerobic decomposition of organic matter containing amino acid with sulphur such as methionine, cysteine, and cystine (assimilatory sulphate reduction) or the product of reduction of sulphate, sulphite or thiosulphate (dissimilatory sulphate reduction) (Bitton.. 2005). The 64 isolated pure cultures of hydrogen sulfide producing bacteria were isolated.

Microscopic examination of the isolated colonies of aerobically grown proteolytic sulfide-producing bacteria (PSPB) confirmed gram-negative non-spore forming rod shaped cells and gram-positive sporogenic rod shaped cells in all cases. The common feature of isolates was gelatinolytic activity and facultative anaerobic type of metabolism. Isolates mainly belonged to the genera *Aeromonas*, *Shewanella*, *Proteus*, *Bacillus* and in few cases *Erwinia* and *Citrobacter* (Bozidar *et al.*, 2009). The aqueous foam, containing microorganisms and the two chemical additives, attained about 88.3 and 70% ammonia and hydrogen sulfide emissions suppression, respectively. The data show that the aqueous foam was effective in the control ammonia and hydrogen sulfide emissions, and the suppression capacity can be markedly enhanced by the addition of appropriate microorganisms and chemical additives (Ryong Lee *et al.*, 2007). Biological control of ammonia and hydrogen sulfide volatilization is required for odor problem reduction and preservation of environmental quality. *Bacillus licheniformis* is a saprophytic bacterium that is widespread in nature. It has been applied widely in the fermentation industry for the production of amylases, proteases, antibiotics, and special chemicals with low risk of adverse effects to human health or the environment (US Environmental Protection Agency (US EPA), 1997). It exhibited antibacterial activity against various species of Gram-positive and a few species of Gram-negative bacteria (Korenblum, 2005). Antimicrobial substance are secondary metabolites, and insensitive to various proteolytic enzymes (Froyshov *et al.*, 1975). Antimicrobial substances are ribosomally synthesized antagonistic peptides produced by bacteria, which kill or inhibits the growth of the related bacteria (Tagg *et al.*, 1976; Joerger, 2003).

In this study, an antimicrobial substance was produced by *B. licheniformis* in liquid culture. Antimicrobial activity of the cell-free supernatant of *B. licheniformis* against

*P. mirabilis* and growth of *P. mirabilis* were tested at different temperatures.

## Materials and Methods

### 2.1 Strains and culture condition

A bacterial strain of *B. licheniformis* was used for antimicrobial substance production. This strain has been implemented in industrial production by NST Biotechnology Co. Ltd, Thailand. Bacterial strain of *P. mirabilis* was decomposing protein compounds to end products such as ammonia and hydrogen sulfide. Ammonia and hydrogen sulfide producing bacteria were used as indicator bacteria for the antimicrobial spectrum of the inhibitory substance. Both strains were grown in nutrient broth (containing peptone 5 g/L and meat extract 3 g/L) under aerobic condition with constant agitation.

### 2.2 Growth and preparation of antimicrobial substance

*B. licheniformis* was grown in 50 ml of Nutrient Broth at 37°C in a rotary shaker at 150 cycles per minute. Sterile nutrient medium was used as control. Cell densities were measured as turbidity at 590 nm after growth for varying, the number of colony-forming unit (CFU) per milliliter was determined by plating the samples on nutrient agar and measurement of dry cell weight. Those were determined at 4 h intervals. Cells were harvested by centrifugation at 10,000g for 15 min, and culture supernatants were sterilized with 0.45 µm filter membranes and stored at 4°C until utilization.

### 2.3 Antimicrobial activity assay

The antimicrobial activity against *P. mirabilis* was detected by agar disc diffusion method (Motta and Brandelli, 2002). 150 µl of fresh exponential phase culture of *P. mirabilis* was mixed with 15 ml of melted nutrient agar. The mixture was poured into an empty plate and allowed to solidify. An aliquot of 20 µl cell-free supernatant was added to each sterilized discs (6 mm diameter) placed on

the bacterial inoculated agar plates. The plates were incubated at optimal temperature for the test organism. The plates were observed for clear inhibitory zone and measured using zone scale millimeter.

#### 2.4 Effects of temperature on antimicrobial activity and growth of *P. mirabilis*

The antimicrobial activity of cell-free supernatant of *B. licheniformis* as compared with fresh culture *B. licheniformis* (BL) against *P. mirabilis* and growth of *P. mirabilis* and *B. licheniformis* were tested at different temperature. Those were incubated at 30, 35, 40, 45, 50, 55 and 60°C in a rotary shaker at 150 cycles per min. Antimicrobial effect was measured by the appearance of zones of inhibition. Bacterial growth was measured by turbidity as the optical density at 600 nm.

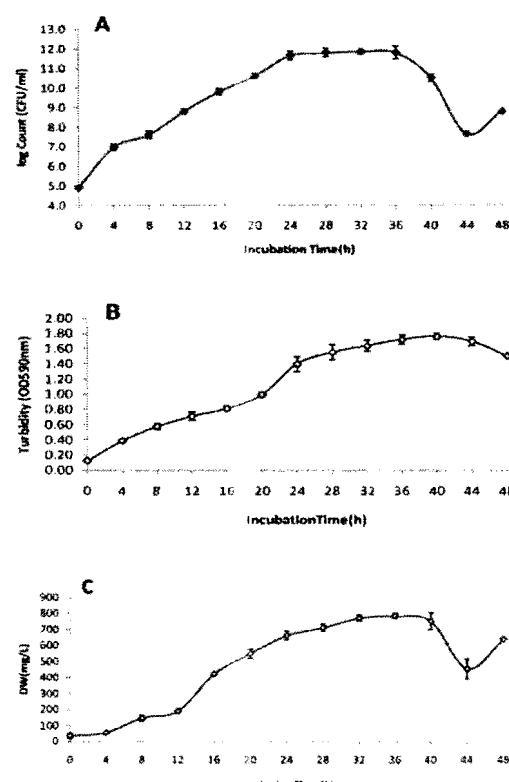
#### 2.5 Determination of antimicrobial substance production

Cell-free supernatant of *B. licheniformis* were collected at 4 h intervals. Those were tested for antimicrobial activity. An aliquot of 20 µl cell-free supernatant collected at different times, fresh culture *B. licheniformis* (BL) and nutrient broth (NB) was added to each sterilized discs placed on the bacterial inoculated agar plates. The plates were incubated at 45°C for 36 h. The antimicrobial activities of substance produced by *B. licheniformis* at different times were measured by the appearance of zones of inhibition.

#### Results

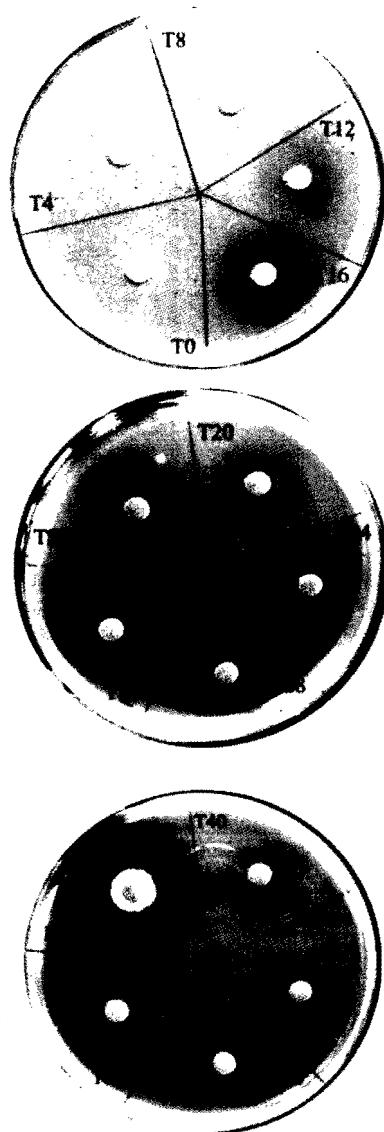
##### 3.1 Growth and antimicrobial substance production

*B. licheniformis* was grown in nutrient medium at 37°C. Cell growth reached the stationary phase after 24 h of cultivation (Fig. 1).



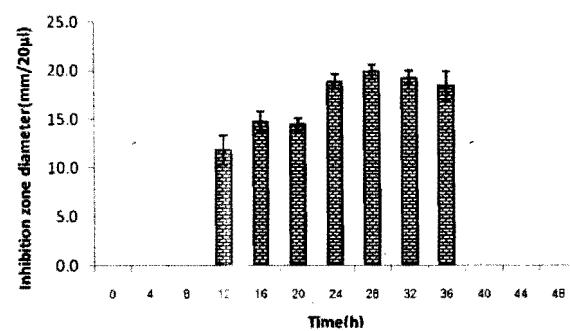
**Figure 1.** Growth of *B. licheniformis* in Nutrient medium at 37°C for 48 hour A: colony-forming unit (CFU) per milliliter; B: turbidity (OD590nm); C: dry cell weight.

The antimicrobial substance was detected in the middle of the exponential growth phase at 12 h and the maximum activity was obtained at the early stationary growth phase at 24 h-36 h (Fig. 2, 3).



**Figure2.** Zone of growth inhibition against *P. mirabilis* T0-T48: cell-free supernatant of *B. licheniformis* were collected at 4 h intervals; BL: fresh culture *B. licheniformis*; NB: nutrient broth.

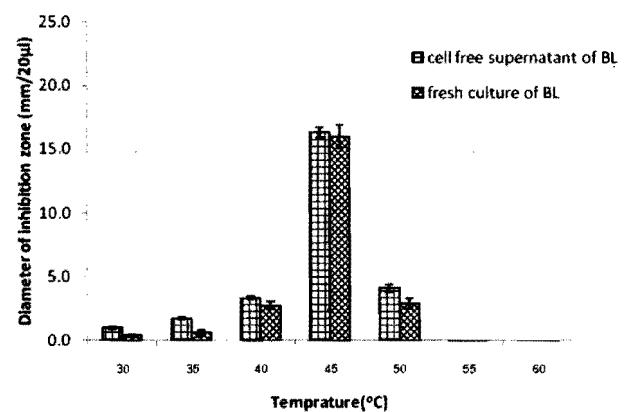
Cell-free supernatant of *B. licheniformis* was showed largest inhibition zone (18-20 mm/20 $\mu$ l) in stationary growth phase at 24 h-36 h (Fig. 3).



**Figure3.** Inhibition zone diameter (mm) of antimicrobial substance production by *B. licheniformis* against *P. mirabilis* (T0-T48).

### 3.2 Effects of temperature on antimicrobial activity and growth of *P. mirabilis*

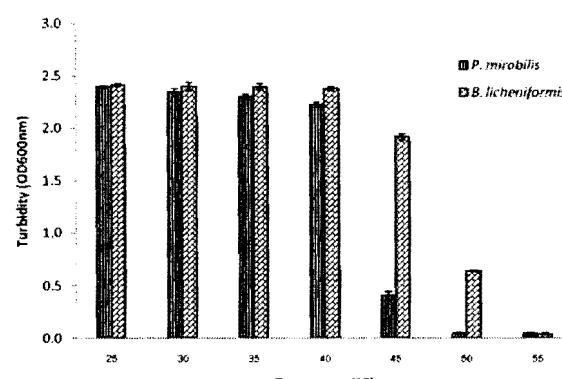
The antimicrobial activities of cell-free supernatant of *B. licheniformis* and fresh culture *B. licheniformis* were high against *P. mirabilis* at 45°C. Low level inhibitory effect against *P. mirabilis* was observed at 30, 35, 40 and 50 °C, whereas no effect was observed for the 55 and 60 °C (Fig. 4).



**Figure4.** Effects of temperature on antimicrobial activity of cell-free supernatant produced by *B. licheniformis* as compared with fresh culture *B. licheniformis* (BL) those against *P. mirabilis*.

Although *P. mirabilis* displayed good growth at 30-40°C, *P. mirabilis* was lower level of growth at 45°C and no *P. mirabilis* growth at 55-60°C. *B. licheniformis* displayed good growth at 30-45°C, *B.*

*licheniformis* was lower level of growth at 50°C and no *B. licheniformis* growth at 55°C (Fig. 5).



**Figure 5.** Effects of temperature on growth of *P. mirabilis* and *B. licheniformis*.

## Discussion

The genus *Bacillus* has many commercially important species including the ones producing proteinaceous antibiotics. It exhibited antibacterial activity against various species of Gram-positive and a few species of Gram-negative bacteria (Korenblum, 2005). Antimicrobial metabolite was detected in the middle of the exponential growth phase and the maximum activity was obtained at the early stationary growth phase. (Lili He *et al.*, 2006). As the bacteriocin-like substance was produced during the exponential growth phase it can be considered primary metabolites, like antimicrobial substance produced by *B. licheniformis* (Cleveland *et al.*, 2005; Fernanda *et al.*, 2011). It is established that temperature optimization are essential to regulate antimicrobial substances production in liquid culture (Sharma *et al.*, 2010) and efficacy of exhibits antimicrobial activity against ammonia and hydrogen sulfide producing bacteria, *Proteus mirabilis*. The antimicrobial activity of cell-free supernatant of *B. licheniformis* was high against *P. mirabilis* at 45°C. *P. mirabilis* are mesophiles that grow optimally at temperatures of between 25°C and 40°C. (Murray *et al.*, 2003) The effects of temperature on growth of *P. mirabilis* were studied. It found that *P.*

*mirabilis* was lower level of growth at 45°C. These are enhancement of antimicrobial susceptibility high against *P. mirabilis*. Biological control of ammonia and hydrogen sulfide volatilization is required for odor problem reduction and preservation of environmental quality. These initial findings - indicate possible application of antimicrobial substances isolated from novel source that is, *B. licheniformis* against ammonia and hydrogen sulfide producing bacteria.

## References

- Bozidar S, Jasna H. Plate method for counting proteolytic sulphide-producing bacteria. *Acta Bot. Croat.* 2009; 68(1): 57-66.
- Jianhua X, Rijun Z, changjiang S, Yaoqi G. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* LFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens. *J. Biotech.* 2009; 8(20): 5611-5619.
- Korenblum, E., von der Weid, I., Santos, A.L.S., Rosado, A.S., Sebastián, G.V., Coutinho, C.M.L.M., Magalhaes, F.C.M., De Paiva, M.M., Seldin, L. Production of antagonistic substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* H2O-1 and *B. licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 2005; 98: 667-675.
- Mackie, R.I., Stroot, P.G. and Varel, V.H. Biochemical identification and biological origin of key odor components in livestock waste. *J Anim Sci.* 1998; 76: 1331-1342.
- Sapna S, Ram L, poonam K. *Bacillus licheniformis* II TRHR2: A novel source of antimicrobial proteinaceous food substance. *J. Appl. Microbiol.* 2010; 2(9): 127-133.
- Seung-Ryoung L, Joon Kyoung H, young ju C. Reduction of Ammonia and Hydrogen sulfide Emission from Swine Manure Using Aqueous Foams Amended with Microorganisms and Chemical Additives. *Clean* 2007; 35(3): 230-234.

7. Terence R, Michael A. Isolation and Identification of Hyper-Ammonia producing Bacteria from Swine Manure Storage Pits. *Current Microbial.* 2004; 48: 20-26.
8. Ying C, chihpin H, Ching P. Biological elimination of  $H_2S$  and  $NH_3$  from wastegases by biofilter packed with immobilized heterotrophic bacteria. *Chemosphere.* 2001; 43: 1043-1050.

## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	นางสาวนง ชาญสมร
ประวัติการศึกษา	มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, พ.ศ.2550 - 2553 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา <sup>*</sup> นักเรียนศึกษาตอนปลาย โรงเรียนแม่ราชนครพิทยาคม อำเภอเมืองราชบูรณะ จังหวัดอุบลราชธานี, พ.ศ.2547 - 2549
ประวัติการวิจัย	Chansamon, M. and Chaikong, N. "Efficacy of <i>Bacillus licheniformis</i> for growth inhibition of urease producing bacteria isolated from chicken feces", <u>The 38<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand</u> . 348, 2012 Chansamon, M. and Chaikong, N. "Efficacy of antimicrobial substance from <i>Bacillus licheniformis</i> against ammonia and hydrogen sulfide producing bacteria", <u>The 24<sup>th</sup> Annual meeting of the Thai Society for Biotechnology (TSB 2012)</u> . 530, 2012