

การลดความเข้มสีและการย่อยสลายสีอะโซด้วยแบคทีเรีย

Decolourization and Biodegradation of Azo Dyes by Bacteria

ไทรมาศ บุญไทย¹, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย² สุบันทิต นิมรัตน์^{3*}Traimat Boonthai¹, Verapong Vuthiphandchai² Subuntith Nimrat^{3*}

Received: 24 February 2012 ;Accepted: 30 May 2012

บทคัดย่อ

สีอะโซเป็นสารประกอบอะโรมาติกที่มีพันธะคู่ของไนโตรเจน ($N=N$) หนึ่งพันธะหรือมากกว่าและเป็นสีสังเคราะห์กลุ่มใหญ่ที่สุด มีการประมาณการณ์ว่าในแต่ละปีทั่วโลกมีการผลิตสีสังเคราะห์เกือบ 1 ล้านตัน ซึ่งสีอะโซเป็นกลุ่มสีที่ผลิตมากที่สุดคิดเป็นมากกว่าร้อยละ 70 สีกลุ่มนี้นิยมนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมสิ่งทอ เครื่องหนัง อาหาร เครื่องสำอาง ยา กระดาษและอุตสาหกรรมอื่นๆ สีอะโซประมาณร้อยละ 2-50 ที่มีการใช้ในอุตสาหกรรมย้อมสิ่งทอจะปนเปื้อนออกมากับน้ำทิ้งจากการย้อมผ้า ตามปกติแล้วสีเหล่านี้มักทนทานต่อการย่อยสลายภายใต้ระบบบำบัดน้ำเสียโดยทั่วไป สีอะโซและสารเมแทบอไลต์บางชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารก่อการกลายพันธุ์และสารก่อมะเร็งในสัตว์และก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการบำบัดสีอะโซก่อนปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อรักษาสิ่งแวดล้อมและลดผลกระทบต่อสุขภาพ การบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งการประยุกต์ใช้แบคทีเรียเป็นเทคนิคที่น่าสนใจ เนื่องจากเสียค่าใช้จ่ายน้อย เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ผลผลิตกากตะกอนปริมาณน้อย สามารถกำจัดได้อย่างสมบูรณ์ทำให้ไม่เกิดผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่มีความเป็นพิษ บทความนี้จะมุ่งเน้นถึงการลดความเข้มสีและการย่อยสลายสีอะโซทางชีวภาพด้วยแบคทีเรียเป็นสำคัญ การประยุกต์ใช้แบคทีเรียในการย่อยสลายสีอะโซมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย โครงสร้างของสีอะโซและสถานะในการย่อยสลาย

คำสำคัญ: สีอะโซ แบคทีเรีย การย่อยสลายทางชีวภาพ การลดความเข้มสี

Abstract

Azo dyes, aromatic compounds with one or more azo bond ($-N=N-$), are the largest class of synthetic dyes. It is estimated that the annual world production of dyes is nearly 1 million tons, of which more than 70% are azo dyes. These dyes have been used extensively in various commercial activities such as textile, tannery, food, cosmetic, pharmaceuticals, paper printing and other industries. Approximately 2-50% of azo dyes used in textile dyeing process is discharged into textile effluents. Unfortunately, azo dyes are resistant to be degraded under common wastewater treatment. Some azo dyes and their metabolites possess mutagenic and carcinogenic potential in animals and cause serious environmental problems.

Therefore, treatment of azo dyes is required in order to maintain environment and minimize health hazard. Biological treatment, in particular application of bacteria, is becoming interest due to cost effective, environmental-friendly method, production of less sludge and complete decomposition with non-toxic by products. This review is focused on the decolourization and biodegradation of azo dyes by bacteria. Application of bacteria for azo dye treatment provides

¹ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

² ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

³ ภาควิชาจุลชีววิทยาและโครงการวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

¹ Biological Science Program, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri 20131

² Dept. of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri 20131

³ Dept. of Microbiology and Environmental Science Program, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri 20131

* Corresponding author: Subuntith Nimrat, Dept. of Microbiology and Environmental Science Program, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri 20131. Tel. +6638-103120 E-mail: subunti@buu.ac.th

substantial benefits and offers different efficacy, depending on type of azo-degrading bacteria, structure of azo dyes and biodegradable conditions.

Keywords: Azo Dyes, Bacteria, Biodegradation, Decolourization

บทนำ

สีอะโซสีสังเคราะห์เป็นสารเคมีที่เข้ามามีบทบาทสำคัญต่อชีวิตประจำวันของมนุษย์ ซึ่งสิ่งของเครื่องใช้เกือบทุกชนิดมักเกี่ยวข้องกับสีสังเคราะห์ ดังนั้นในปัจจุบันทั่วโลกจึงมีการผลิตสีสังเคราะห์ในปริมาณที่สูงมาก ตัวอย่างเช่นในประเทศอินเดียมีการผลิตสีอะโซในปริมาณสูงถึง 60,000 ตันต่อปี คิดเป็นร้อยละ 6.6 ของปริมาณสีที่ผลิตขึ้นทั่วโลก¹ โดยอุตสาหกรรมสิ่งทอเป็นอุตสาหกรรมที่ใช้สีอะโซมากที่สุดประมาณ 2 ใน 3 ของมูลค่าการตลาดทั้งหมด² การประมาณการปริมาณที่แน่นอนของสีที่ผลิตเพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเป็นเรื่องที่ทำได้ยาก แต่อย่างไรก็ตามมีการประมาณการว่าในแต่ละปีมีการผลิตสีสังเคราะห์มากกว่า 100,000 ชนิด ในปริมาณเกือบ 1 ล้านตัน เพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ทั่วโลก ซึ่งสีอะโซเป็นกลุ่มสีที่ถูกผลิตมากที่สุด คิดเป็นเกือบ 70% โดยน้ำหนักของสีที่ผลิตทั้งหมดทั่วโลก³ ส่งผลให้สีอะโซเป็นสีกลุ่มใหญ่ที่สุดที่ถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม⁴ สีอะโซเป็นที่นิยมในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างแพร่หลายทั่วโลกเนื่องจากสีกลุ่มนี้เป็นสีที่มีราคาถูก ผลิตได้ง่ายในปริมาณมาก มีความเสถียรและมีหลายเฉดสีให้เลือกใช้งานได้อย่างเหมาะสม⁵

สีอะโซเป็นสีที่มีโครงสร้างเป็นสารประกอบอะโรมาติกที่มีหมู่อะโซ (-N=N-) 1 หมู่หรือมากกว่า 1 หมู่ในโครงสร้าง ดังภาพที่ 1 สีอะโซนิยมใช้อย่างแพร่หลายในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมสิ่งทอ อาหาร เครื่องสำอางและกระดาษ เป็นต้น⁶ ซึ่งอุตสาหกรรมสิ่งทอเป็นอุตสาหกรรมที่ใช้สีชนิดนี้มากที่สุด สีอะโซสามารถปนเปื้อนลงสู่น้ำทิ้งของโรงงานได้ตั้งแต่ร้อยละ 2-50 ทำให้น้ำผิวดินและน้ำใต้ดินบริเวณโดยรอบโรงงานย่อมผามีการปนเปื้อนสีอะโซ⁷ ในปี ค.ศ. 1978 คาดว่าสีอะโซประมาณร้อยละ 2 (9,000 ตัน) ของปริมาณที่ผลิตขึ้นในกระบวนการผลิตสี (450,000 ตัน) ถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม⁸ และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการประมาณการว่าในแต่ละปีทั่วโลกมีการปนเปื้อนของสีอะโซในน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมประมาณ 280,000 ตัน⁹ โดยอุตสาหกรรมสิ่งทอเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมที่มีการปล่อยน้ำเสียลงสู่สิ่งแวดล้อมมากที่สุด เนื่องจากต้องใช้น้ำปริมาณมหาศาลตลอดกระบวนการผลิต น้ำเสียจากโรงงานสิ่งทอเป็นน้ำเสียที่ประกอบด้วยสารเคมีต่างๆ หลากหลายชนิดที่ใช้ใน

กระบวนการผลิตสิ่งทอ เช่น สีอะโซชนิดต่างๆ สารช่วยในการกระจายสี (Dispersant agent) กรด ต่าง เกลือ สารซักฟอก สารออกซิไดส์และสารอื่นๆ¹⁰ สีอะโซอะโซที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งเป็นสารประกอบทางเคมีที่ย่อยสลายได้ยาก เนื่องจากโครงสร้างที่ซับซ้อนและมีความคงทนในธรรมชาติ รวมทั้งสีเหล่านี้ผลิตมาจากสารเคมีที่เป็นอันตรายและมีศักยภาพในการก่อมะเร็ง เช่น เบนซินดีน แนฟทาลีนและสารอะโรมาติกอื่นๆ^{11, 12} ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องกำจัดสีเหล่านี้ในน้ำทิ้งอุตสาหกรรมก่อนปล่อยออกสู่แหล่งน้ำ

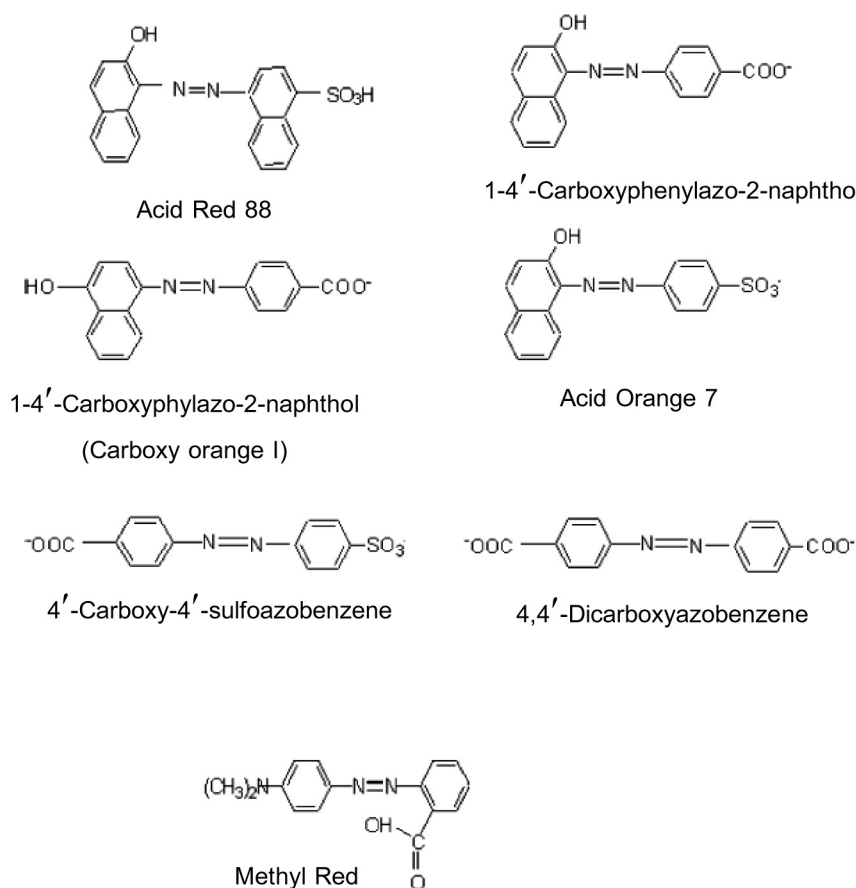


Figure 1 Chemical structures of some azo dyes¹³

จากอดีตจนถึงปัจจุบันมีการศึกษาการใช้วิธีทางกายภาพ (Physical method) และวิธีทางเคมี (Chemical method) ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนสีอย่างแพร่หลาย^{3, 14, 15} ไม่ว่าจะเป็นการใช้เทคนิคการตกตะกอน (Coagulation) ร่วมกับการจับตัวเป็นก้อน (Flocculation) การใช้เทคนิคการดูดซับ (Adsorption) การใช้แผ่นเมมเบรน (Membrane technology) และการที่ใช้สารออกซิไดส์ที่รุนแรง (Strong oxidizing agents) เช่น H_2O_2 , Fenton's reagent, TiO_2 , ZnO_2 เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามการใช้เทคโนโลยีเหล่านี้มักมีข้อจำกัดหรือข้อเสียเมื่อนำมาดำเนินการในระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรม ดังแสดงในตารางที่ 1

ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการผลักดันให้มีการใช้เทคโนโลยีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อลดผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นต่อสิ่งแวดล้อม รวมทั้งลดการใช้น้ำในกระบวนการผลิต ลดการปล่อยน้ำเสีย¹⁶ และลดการกระทำความผิดตามข้อบังคับของกฎหมายในเรื่องการปล่อยน้ำเสียของโรงงานออกสู่สิ่งแวดล้อม เนื่องจากตลอดระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา รัฐบาล

ในหลายประเทศได้ออกข้อบังคับที่เข้มงวดเกี่ยวกับการปล่อยน้ำเสียออกสู่สิ่งแวดล้อมของโรงงานอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่พัฒนาแล้ว ซึ่งแรงกดดันทางกฎหมายนี้จะทำให้โรงงานอุตสาหกรรมใช้กระบวนการบำบัดน้ำเสียที่มีสีปนเปื้อน เพื่อทำให้น้ำเสียผ่านมาตรฐานก่อนปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม โดยเทคโนโลยีดังกล่าวคือการบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีทางชีวภาพนั่นเอง เทคนิคนี้เป็นวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและสามารถนำไปสู่การย่อยสลายสีได้อย่างสมบูรณ์และมีค่าใช้จ่ายต่ำ จุลินทรีย์หลายชนิดเช่น รา แบคทีเรีย ยีสต์และสาหร่ายมีความสามารถในการย่อยสลายสีอะโซได้อย่างสมบูรณ์¹⁰ แต่อย่างไรก็ตามการลดความเข้มข้นและการย่อยสลายด้วยแบคทีเรียเป็นวิธีที่ได้รับความสนใจในการศึกษาอย่างกว้างขวาง เนื่องจากแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ในปริมาณมากในน้ำทิ้งของโรงงาน อีกทั้งแบคทีเรียยังสามารถย่อยสลายสีอะโซได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาอันสั้นและสมบูรณ์เมื่อเปรียบ เทียบการใช้จุลินทรีย์ชนิดอื่น^{10, 17}

Table 1 Advantage and disadvantage of current treatment technologies for colour removal involving physical and chemical processes¹⁵

Physical and chemical methods	Advantage	Disadvantage
Oxidation	Rapid process	High energy costs and formation of by-products
Adsorption	Absorbent requires regeneration or disposal	Absorbent requires regeneration or disposal
Membrane technologies	Removes almost all dye type	Concentrated sludge production
Coagulation/flocculation	Economically feasible	High sludge production

กลไกการย่อยสลายสีอะโซด้วยแบคทีเรีย

สีของน้ำที่จัดเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของน้ำทิ้งหรือแสดงถึงมลภาวะทางน้ำได้ประการหนึ่ง ในปัจจุบันการย่อยสลายสีอะโซด้วยแบคทีเรียได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากเป็นกระบวนการทางชีวภาพที่เกิดกระบวนการย่อยสลายได้อย่างมีประสิทธิภาพและเกิดการย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ (Mineralization) รวมทั้งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายสีอะโซได้หลากหลายชนิด มีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการไม่สูง เป็นวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและทำให้เกิดกากตะกอนจากการย่อยสลายในปริมาณไม่มากนัก¹⁰

การทำลายพันธะอะโซเป็นขั้นตอนแรกในการย่อยสลายสีอะโซด้วยแบคทีเรีย ซึ่ง Gingell and Walker¹⁸ ได้เสนอขั้นตอนการย่อยสลายสีอะโซว่าประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ 1) การทำลายพันธะอะโซภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือสภาวะที่มีออกซิเจนและเกิดสารอะโรมาติกเอมีนเป็นสารตัวกลาง และ 2) การย่อยสลายอะโรมาติกเอมีนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งสีอะโซจะมีสีที่จางลงหรือกลายเป็นสารไม่มีสีเมื่อมีการตัดพันธะอะโซ ($-N = N-$) รวมทั้งตัดส่วนของเฮเทอโรไซคลิกและวงแหวนอะโรมาติกของโมเลกุลสี ซึ่งจะทำให้การดูดกลืนแสงของสารเปลี่ยนไปจากช่วงที่มนุษย์มองเห็นได้ไปเป็นช่วงอัลตราไวโอเล็ตหรืออินฟราเรด¹⁹

ในขั้นตอนของการย่อยสลายสีอะโซในขั้นตอนแรกส่วนใหญ่แล้วมักจะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และการย่อยสลายสีอะโซภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเป็นกระบวนการที่ต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ โดยมีทั้งเอนไซม์ที่จำเพาะเจาะจงและไม่จำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้น เอนไซม์ที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง ได้แก่ เอนไซม์อะโซรีดักเทส (Azoreductase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความไวต่อออกซิเจน (Oxygen-sensitive) และเป็นเอนไซม์ภายในเซลล์ (Intracellular

enzyme) โดยจะได้สารตัวกลาง คือ สารอะโรมาติกเอมีน ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีสี และบางชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง²⁰

นอกจากนั้นการย่อยสลายสีอะโซของแบคทีเรียบางชนิดเกิดจากเอนไซม์ Oxygen catalyzed azoreductase หรือ Aerobic azoreductase ซึ่งจะเกิดสารอะโรมาติกเอมีนเป็นสารตัวกลางเช่นเดียวกัน²¹ โดยเอนไซม์ชนิดนี้จัดเป็นเอนไซม์ภายในเซลล์ และมีความจำเพาะเจาะจงต่อโครงสร้างของสารตั้งต้น (โครงสร้างสีอะโซ) สูง เอนไซม์อะโซรีดักเทสพบครั้งแรกใน *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ K22 และ KF46 โดย Zimmermann และคณะ^{22, 23} นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดยังสามารถผลิตเอนไซม์ Lignin peroxidase ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายสีอะโซได้เช่นเดียวกัน เช่น *Acinetobacter calcoaceticus* NCIM 2890 และ *Bacillus* sp.²⁴

ในขั้นตอนต่อมาสารอะโรมาติกเอมีนที่เกิดขึ้นจากการทำลายพันธะอะโซจะถูกย่อยสลายต่อเนื่องภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน เนื่องจากสารชนิดนี้เป็นสารที่คงทนต่อการย่อยสลายภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน²⁵ การย่อยสลายสารอะโรมาติกเอมีนของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนจะอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ Monooxygenase และ Dioxygenase ในการเติมออกซิเจนในวงแหวนอะโรมาติกก่อนที่จะเกิดการแตกของวงแหวนอะโรมาติกต่อไป หากเกิดการย่อยสลายต่อเนื่องอย่างสมบูรณ์จะทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำและแอมโมเนียเป็นผลิตภัณฑ์

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียเดี่ยวและแบคทีเรียผสมหลายชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายสีอะโซเพียงขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งหรือทั้ง 2 ขั้นตอน คือ การทำลายพันธะอะโซและย่อยสลายสารกลุ่มเอมีนอย่างต่อเนื่องเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนในการเจริญเติบโตได้กล่าวรายละเอียดในหัวข้อต่อไป

การศึกษาการย่อยสลายสีอะโซด้วยแบคทีเรีย

การใช้แบคทีเรียในการทำจัดสีสังเคราะห์ในน้ำทิ้งอุตสาหกรรมมีข้อดีหลายประการ ไม่ว่าจะเป็นค่าใช้จ่ายในการเดินระบบไม่สูง สามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์นำไปสู่การไม่เกิดสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม เป็นกระบวนการที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและผลิตกากตะกอนในปริมาณน้อย^{10, 26} ดังนั้นการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถปรับตัวเพื่อย่อยสลายสีสังเคราะห์เหล่านี้จะเพิ่มประสิทธิภาพในการฟื้นฟูสภาพทางชีวภาพในอนาคตรวมทั้งเพื่อการประสบความสำเร็จในการย่อยสลายสีอะโซ แบคทีเรียที่ใช้ในการย่อยสลายจึงควรมีความสามารถในการเจริญและย่อยสลายสีอะโซและสารเมแทบอลิต์ได้ทั้งสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและสภาวะที่มีออกซิเจน จากพื้นฐานของงานวิจัยต่างๆ ทั่วโลกที่เกี่ยวกับการศึกษาการย่อยสลายสีอะโซด้วยแบคทีเรียที่ผ่านมาส่วนใหญ่นั้นมักมุ่งเน้นศึกษาในด้านของบทบาทของแบคทีเรียทั้งในรูปแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมในการย่อยสลายสีอะโซ¹³ ซึ่งการใช้แบคทีเรียเดี่ยวและแบคทีเรียผสมในการย่อยสลายสีอะโซนั้นมีรายละเอียดต่อไปนี้

การย่อยสลายสีอะโซด้วยแบคทีเรียเดี่ยว

การคัดแยกแบคทีเรียเดี่ยวที่มีความสามารถในการย่อยสลายสีอะโซเริ่มต้นครั้งแรกในทศวรรษที่ 1970

โดยสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีชื่อว่า *Bacillus subtilis*²⁷ จนกระทั่งในปัจจุบันยังคงมีการศึกษาการใช้เชื้อเดี่ยวในการย่อยสลายสีอะโซ โดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสีกลุ่มนี้ ได้แก่ *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus*, *Micrococcus* และ Purple nonsulfur photosynthesis bacteria¹⁰ แบคทีเรียที่แยกได้นั้นมีความสามารถในการย่อยสลายสีอะโซที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับโครงสร้างและความเข้มข้นของสีอะโซ คุณสมบัติของแบคทีเรียและสภาวะในการย่อยสลายนี้นแสดงสรุปในตารางที่ 2

จากการศึกษาที่ผ่านมาจนถึงปัจจุบันมีการศึกษาการย่อยสลายสีอะโซด้วยแบคทีเรียเดี่ยวอย่างกว้างขวาง เช่น Wong and Yuen²⁸ รายงานว่าแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* ที่แยกได้จากกากตะกอนเร่งที่ปนเปื้อนสีสังเคราะห์เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสี Methyl red ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งสีชนิดนี้จัดเป็นสีอะโซกลุ่ม Monoazo dye ที่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์โดยเปลี่ยนสี Methyl red เป็นสาร 2 ชนิด คือ 2-Aminobenzoic acid และ N-N'-Dimethyl-p-phenylene diamine ดังภาพที่ 2a จากนั้นสารทั้ง 2 ชนิดนี้จะถูกย่อยสลายต่อเนื่องโดยกิจกรรมของแบคทีเรียชนิดนี้ทำให้มีความเข้มข้นลดลงดังภาพที่ 2b

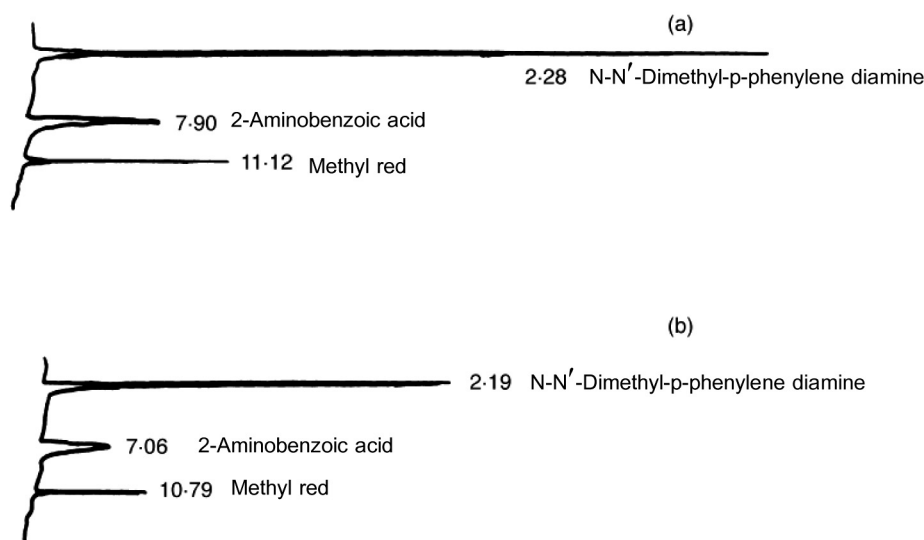


Figure 2 HPLC analysis of degradation of 2-Aminobenzoic acid and N-N'-Dimethyl-p-phenylene diamine derived from the reductive cleavage of methyl red by *Klebsiella pneumoniae*²⁸

(a) after 24-h incubation

(b) after 36-h incubation

การใช้เชื้อเดี่ยวในการย่อยสลายสียอะโซทำให้การศึกษากลไกการย่อยสลายอย่างละเอียดสามารถดำเนินการได้ง่าย รวมทั้งสามารถควบคุมการทำงานและดัดแปลงสายพันธุ์ของแบคทีเรียเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายให้มากยิ่งขึ้น¹⁰ และการวิเคราะห์จลศาสตร์ (Kinetic) ของการย่อยสลายสียอะโซสามารถทำได้โดยไม่ยุ่งยาก อีกทั้งการศึกษาปัจจัยที่

มีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายก็ทำได้ง่ายเช่นเดียวกัน²⁹ แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการคัดแยกแบคทีเรียเดี่ยวเพียง 1 ชนิดที่มีความสามารถในการย่อยสลายสียอะโซได้อย่างสมบูรณ์นั้น ต้องทำการคัดแยกและศึกษาเป็นระยะเวลานาน เพราะส่วนใหญ่แบคทีเรียเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งมักมีความสามารถในการย่อยสลายสียอะโซได้เพียงบางส่วนเท่านั้น¹⁰

Table 2 Decolourization of various azo dyes by single bacterial cultures¹⁰

Bacterial mixture	Name of azo dyes	Concentration (mg/L)	Time	Decolourization (%)	References
<i>Proteus mirabilis</i>	RED RBN	1,000	20	95	Chen et al. (1999)
<i>Paenibacillus azoreducens</i> sp. nov.	Remazol Black B	100	24	98	Meehan et al. (2001)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NBAR12	Reactive Blue 172	500	42	83	Bhatt et al. (2005)
<i>Rhizobium radiobacter</i> MTCC 8161	Reactive Red 141	50	48	90	Telke et al. (2008)
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> AS1.2352	Reactive Brilliant Red	50	24	90	Liu et al. (2006)
<i>Bacillus fusiformis</i> KMK5	Disperse Blue 79 และ Acid Orange 10	อย่างละ 1,500	48	100	Kolekar et al. (2008)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Reactive Red 141	3,800	24	70-80	Chen et al. (2009)
<i>Micrococcus glutamicus</i> NCIM 2168	Reactive Green 19A	50	42	100	Saratale et al. (2009)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Reactive Red 141	3,800	48	100	Chen et al. (2009b)
<i>Bacillus</i> sp. VUS	Navy Blue 2GL	500	18	94	Dawkar et al. (2009)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> NCIM 2890	Direct Brown MR	50	48	91.3	Ghodake et al. (2009)
<i>Brevibacillus laterosporus</i> MTCC 2298	Golden Yellow HER	50	48	87	Gomare et al. (2009)
<i>Enterococcus gallinarum</i>	Direct Black 38	100	20 วัน	100	Bafana et al. (2009)
<i>Pseudomonas</i> sp. SU-EBT	Congo Red	1,000	12	97	Telke et al. (2009)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Remazol Orange	200	24	94	Sarayu and Sandhya (2010)

การย่อยสลายสียอะโซด้วยแบคทีเรียผสม

การประยุกต์ใช้เชื้อผสมในการย่อยสลายสียอะโซเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสียอะโซ^{6,30} เนื่องจากแบคทีเรียผสมมีการทำงานร่วมกันหรือเสริมฤทธิ์กันของกลุ่มแบคทีเรียผสม^{10, 31, 32} จากการศึกษาพบว่าการใช้เชื้อผสมในการย่อยสลายสียอะโซ แบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถเข้าทำลายโครงสร้างโมเลกุลของสียอะโซในตำแหน่งที่แตกต่างกัน และการนำสารเมแทบอลิต์ที่เกิดขึ้นมาใช้ในกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ขึ้นอยู่กับความสามารถของแต่ละสายพันธุ์^{3, 5} การศึกษาในอดีตที่ผ่านมาได้มีการประยุกต์ใช้เชื้อผสมในการย่อยสลายสียอะโซจำนวนมาก ประสิทธิภาพในการกำจัดสียอะโซของแบคทีเรียผสมมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับโครงสร้างและความเข้มข้นของสียอะโซ สภาวะในการย่อยสลายและปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียผสมแสดงดังตารางที่ 3

จากการศึกษาของ Nigam และคณะ³³ พบว่ากลุ่มแบคทีเรียที่ประกอบด้วย *Alcaligenes faecalis* และ *Commamonas acidovorans* สามารถย่อยสลายสียอะโซ 8 ชนิดได้ ในขณะที่แบคทีเรียทั้งสองชนิดที่อยู่ในรูปของเชื้อเดี่ยวไม่สามารถย่อยสลายสียอะโซได้เลย แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้มีปฏิสัมพันธ์แบบทำงานร่วมกัน นอกจากนั้น Vijaya and Sandhya³⁴ พบว่าแบคทีเรียผสมที่แยกได้จากโรงบำบัดน้ำทิ้งชุมชนสามารถลดความเข้มข้นสี Methyl red ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนได้แม้ความเข้มข้นจะสูงถึง 700 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 18 ชั่วโมง ดังภาพที่ 3

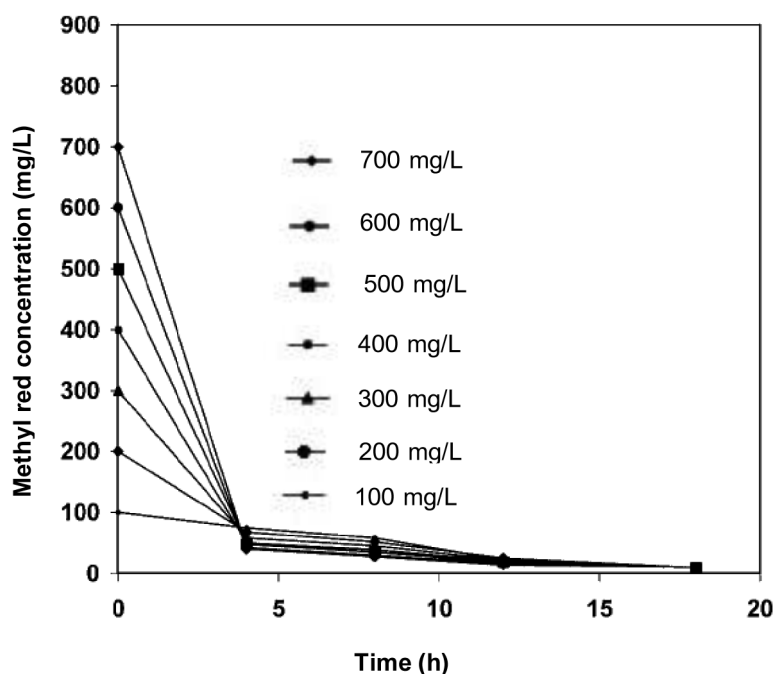


Figure 3 Biodegradation of methyl red by a mixed bacterial culture³⁴

Rozgaj and Glancer³⁵ รายงานว่าการย่อยสลายสี 6-Aminonaphthyl-2-sulfonate จำเป็นต้องใช้กิจกรรมของแบคทีเรีย 11 ชนิด ซึ่งแบคทีเรียชนิดใดชนิดหนึ่งไม่สามารถย่อยสลายสีชนิดนี้ได้ แสดงให้เห็นว่ากระบวนการย่อยสลายสีชนิดนี้เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียทุกชนิดที่อยู่ในระบบหากมี

แบคทีเรียเพียงชนิดเดียวการย่อยสลายก็จะเกิดขึ้นอย่างไม่สมบูรณ์ ซึ่งแบคทีเรียผสมเหล่านี้สามารถใช้สี 6-Aminonaphthyl-2-sulfonate เป็นแหล่งคาร์บอน พลังงาน ไนโตรเจน และซัลเฟอร์ในการเจริญ

Table 3 Decolourization of various azo dyes by mixture of bacterial cultures¹⁰

Bacterial mixture	Name of azo dyes	Concentration (mg/L)	Time (h)	Decolourization (%)	References
Bacterial mixture SV5	Ranocid Fast Blue	100	24	100	Mathew and Madamwar (2004)
Bacterial mixture RVM11.1	Reactive Violet 5	200	37	94	Moosvi et al. (2005)
Mixed culture	Reactive Black 5	100-3,000	48	90	Mohanty et al. (2006)
Mixed culture	Direct Black-38	100	240	100	Kumar et al. (2007)
<i>Enterobacter</i> sp., <i>Serratia</i> sp., <i>Yersinia</i> sp. and <i>Erwinia</i> sp.	Reactive Red 195	30	48	90	Jirasripongpun et al. (2007)
Mixed bacterial consortium JW-2	Reactive Violet 5R	100	36	100	Moosvi et al. (2007)
Mixed culture	Reactive and Disperse dye	500	120-240	100	Asgher et al. (2007)
Isolated halophilic and halotolerant bacteria	Remazol Black B, Maxilon Blue, Sulphonyl Scarlet BN LE, Sulphonyl Blue TLE, Sulphonyl Green BLE, Remazol Black N and Entrazol Blue	5,000	96	100	Asad et al. (2007)
<i>Proteus vulgaris</i> and <i>M. glutamicus</i>	Scarlet R and mixture of 8 dyes	50 each	3	100	Saratale et al. (2009)
<i>Proteus vulgaris</i> and <i>Micrococcus glutamicus</i>	Mixture of 6 reactive dyes	50 each	24	100	Saratale et al. (2010)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การย่อยสลายสารที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น สีอะโซ มักประสบความสำเร็จด้วยการย่อยสลายด้วยแบคทีเรียผสมมากกว่าการใช้แบคทีเรียเดี่ยว³² เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละชนิดอาจเข้าไปย่อยสลายโมเลกุลของสีอะโซในตำแหน่งที่แตกต่างกัน รวมทั้งยังอาจใช้สารตัวกลางที่ผลิตจากแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่ง ทำให้การย่อยสลายเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์³⁶ รวมทั้งพบว่าแบคทีเรียผสมใช้ระยะเวลาในการทำจัสตินถึงขั้นตอนสุดท้ายสั้นกว่าแบคทีเรียเดี่ยว ดังรายงานของ Khehra และคณะ³¹ พบว่าแบคทีเรียผสมระหว่าง *Pseudomonas putida* BN4, *Stenotrophomonas acidaminiphila* BN3, *P. fluorescence* BN5 และ *Bacillus cereus*

BN7 สามารถลดความเข้มข้น C.I. Acid Red 88 ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 24 ชั่วโมง ในขณะที่แบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ที่อยู่ในรูปเชื้อเดี่ยวต้องใช้ระยะเวลามากกว่า 60 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4

นอกจากนี้รายงานการวิจัยการลดความเข้มข้น C.I. Acid Brown 100 ด้วยแบคทีเรียผสมระหว่าง *S. acidaminiphila* BN3, *P. putida* BN4, *P. fluorescence* BN5 และ *B. cereus* BN7 สามารถเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับประสิทธิภาพการลดความเข้มข้นของเชื้อเดี่ยว³² ดังแสดงในภาพที่ 4

Table 4 Decolourization percentage of C.I. Acid Red 88 by single and mixed bacteria³¹

Treatments	Decolourization (%) at different intervals (h)					
	12	24	36	48	60	72
<i>S. acidaminiphila</i> BN3	50	85	99	99	99	99
<i>P. putida</i> BN4	25	80	94	99	100	100
<i>P. fluorescence</i> BN5	31	78	88	94	100	100
<i>B. cereus</i> BN7	40	89	95	99	100	100
Mixture of four selected bacteria	90	100	100	100	100	100

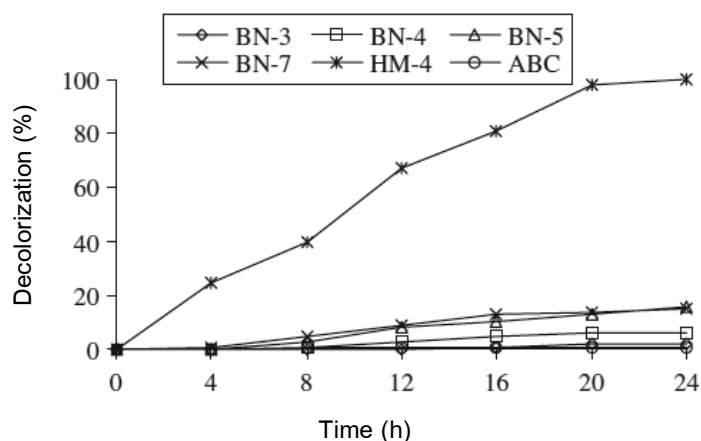


Figure 4 Decolourization of C.I. Acid Brown 100 by individual and mixed bacterial isolates³²

BN3, *S. acidaminiphila* BN3; BN4, *P. putida* BN4; BN5, *P. fluorescence*; BN7, *B. cereus* BN7; HM4, mixture of bacteria; ABC, adsorption by bacterial cell

นอกจากนี้การใช้เชื้อผสมสามารถนำไปใช้ในทางปฏิบัติได้ง่ายกว่าการใช้เชื้อเดี่ยว เนื่องจากระบบบำบัดน้ำเสียประกอบด้วยแบคทีเรียหลากหลายชนิดและองค์ประกอบต่างๆ ในน้ำเสียก็มีมากมายและไม่เป็นเนื้อเดียวกัน จึงส่งผลให้การมีแบคทีเรียหลายชนิดน่าจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารที่อยู่ในน้ำเสียในสภาพแวดล้อมจริงได้ดีกว่าการใช้เชื้อเดี่ยว

ถึงแม้การใช้แบคทีเรียผสมในการลดความเข้มข้นและ/หรือการย่อยสลายสิ่งสังเคราะห์มีข้อดีหลายประการ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียแต่ละชนิดสำหรับการลดความเข้มข้นและการย่อยสลายสีอะโซ การเตรียมแบคทีเรียผสมและการตรวจติดตามแบคทีเรียผสมในระหว่างกระบวนการย่อยสลายเป็นขั้นตอนการศึกษาที่มีความยุ่งยากมากกว่าการศึกษาในแบคทีเรียเดี่ยว

สรุป

การลดความเข้มข้นและการย่อยสลายสีอะโซด้วยแบคทีเรียเดี่ยวและแบคทีเรียผสมมีความเป็นไปได้สูงในการประยุกต์ใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการใช้สีอะโซ ซึ่งการลดความเข้มข้นและการย่อยสลายของแบคทีเรียทั้ง 2 รูปแบบมักมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถของแบคทีเรีย คุณสมบัติและโครงสร้างของสีอะโซและสภาวะที่ใช้ในการย่อยสลาย แต่อย่างไรก็ตามการใช้แบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนด้วยสีอะโซเป็นวิธีที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเสียค่าใช้จ่ายในการดำเนินการไม่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางกายภาพและเคมี และจัดการกับกากตะกอนที่เกิดจากกระบวนการบำบัดได้อย่างไม่ยุ่งยาก

เอกสารอ้างอิง

- Shenai VA. Azo dyes on textiles vs German ban, an objective assessment. *Chemical Weekly* 1995;12:33-34.
- Anjaneyulu Y. Sreedhara Chary N. Samuel Suman Raj D. Decolourization of industrial effluents - available methods and emerging technologies. *Rev Environ Sci Biotechnol* 2005;4:245-273.
- Forgacs E. Cserhati T. Oros G. Removal of synthetic dyes from wastewaters. *Environ Int* 2004;30:953-971.
- Chang JS. Chou C. Lin Y. Ho J. Hu TL. Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. *Water Res* 2001;35:2841-2850.
- Chang JS. Chen BY. Lin YS. Stimulation of bacterial decolorization of an azo dye by extracellular metabolites from *Escherichia coli* strain NO₃. *Bioresource Technol* 2004;91:243-248.
- สุภัททิศ นิมรรัตน์, รัตติชล ศิริโรจน์มหารวงษ์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. การพัฒนาวิธีการบำบัดสีอะโซแบล็คด้วยการดูดซับ/ตะกอนเร่ง. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา* 2553; 15(1): 88-97.
- O'Neill C. Hawkes FR. Esteves SRR. Hawkes DL. Wilcox SJ. Anaerobic and aerobic treatment of a simulated textile effluent. *J Chem Technol Biot* 1999;74:993-999.
- Brown D. Effects of colorants in the aquatic environment. *Ecotox Environ Safe* 1987;13: 139-147.
- Jin X. Liu G. Xu Z. Tao W. Decolourisation of a dye industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;74: 239-243.
- Saratale RG. Saratale GD. Chang JS. Govindwar SP. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *J Taiwan Inst Chem Eng* 2011;42:138-157.
- Clarke EA. Anliker R. Organic Dyes and Pigments. In O Hutzinger (ed), *The Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 3, Part A. Anthropogenic Compounds, pp. 181-215. Springer: Heidelberg 1980.
- Levine WG. Metabolism of azo dyes: Implication for detoxification and activation. *Drug Metab Rev* 1991;23:253-309.
- Pandey A. Singh P. Iyengar L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *Int Biodeter Biodegr* 2007;59:73-84.
- Vandevivere PC. Binachi R. Verstrate W. Treatment of wastewater from textile wet processing industry: Review of emerging technologies. *J Chem Technol Biot* 1998;72: 289-302.
- Pearce CI. Lloyd JR. Guthrie JT. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells. *Dyes Pigments* 2003;58:179-196.
- Petek J. Glavic P. An integral approach to waste minimization in process industries. *Resour Conserv Recy* 1996;17:169-188.

17. Paszczynski A. Pasti-Grigsby MB. Goszczyanski S. Crawford RL. Crawford DL. Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. Appl Environ Microb 1992; 58:3598-3604.
18. Gingell R. Walker R. Mechanisms of azo reduction by *Streptococcus faecalis* II, the role of soluble flavins. Xenobiotics 1971;1:231-239.
19. Strickland A. Perkins WS. Decolouration of continuous dyeing wastewater by ozonation. Text Chem Color 1995;27:11-16.
20. Van der Zee FP. Villaverde S. Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes: A short review of bioreactor studies. Water Res 2005; 39:1425-1440.
21. Lin J. Zhang X. Li Z. Lei L. Biodegradation of Reactive Blue 13 in a two-stage anaerobic/ aerobic fluidized beds system with a *Pseudomonas* sp. isolate. Bioresource Technol 2010;101:34-40.
22. Zimmermann T. Kulla H. Leisinger T. Properties of purified orange II-azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. Eur J Biochem 1982; 129:197-203.
23. Zimmermann T. Gasser F. Kulla H. Leisinger T. Comparison of two bacterial azoreductases acquired during adaptation to growth on azo dyes. Arch Microbiol 1984;138:37-43.
24. Dawkar VV. Jadhav UU. Ghodake GS. Govindwar SP. Effect of inducers on the decolorization and biodegradation of textile azo dye Navy Blue 2GL by *Bacillus* sp. VUS. Biodegradation 2009;20:777-787.
25. Joshi T. Iyengar L. Singh K. Garg S. Isolation, identification and application of novel bacterial consortium TJ-1 for the decolourization of structurally different azo dyes. Bioresource Technol 2008;99:7115-7121.
26. Stolz A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. Appl Microbiol Biotechnol 2001;56:69-80.
27. Horitsu H. Takada M. Idaka E. Tomoyeda M. Ogawa T. Degradation of p-aminoazobenzene by *Bacillus subtilis*. Eur J Appl Microbiol 1977;4:217-224.
28. Wong PK. Yuen PY. Decolorization and biodegradation of N-N'-Dimethyl-p-phenylenediamine by *Klebsiella pneumoniae* RS-13 and *Acetobacter liquefaciens* S-1. J Appl Microbiol 1998;85:79-87.
29. Chang JS. Lin YC. Fed-batch bioreactor strategies for microbial decolorization of azo dye using a *Pseudomonas luteola* strain. Biotechnol Progr 2000;16:979-985.
30. สุภัณฑิต นิมรัตน์. จุลชีววิทยาของน้ำเสีย. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2548.
31. Khehra MS. Saini HS. Sharma DK. Chadha BS. Chimni SS. Decolorization of various azo dyes by bacterial consortia. Dyes Pigments 2005;67:55-61.
32. Khehra MS. Saini HS. Sharma DK. Chadha BS. Chimni SS. Comparative studies on potential of consortium and constituent pure bacterial isolates to decolorize azo dyes. Water Res 2005;39:5135-5141.
33. Nigam P. Banat IM. Singh D. Marchant R. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. Process Biochem 1996;31: 435-442.
34. Vijaya PP. Sandhya S. Decolorization and complete degradation of methyl red by a mixed culture. The Environmentalist 2003;23: 145-149.
35. Rozgaj R. Glancer SM. Total degradation of 6-amnionaphthalene 2-sulfonic acid by a mixed culture consisting of different bacterial genera. FEMS Microbiol Ecol 1992;86:229-236.
36. Rieger PG. Meier HM. Gerle M. Vogt U. Groth T. Knackmuss HJ. Xenobiotics in the environment: Present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. J Biotechnol 2002;94:101-123.