

การลดสีย้อม Acid Red 2 โดยใช้แบคทีเรีย

Decolorization of Acid Red 2 Using Bacteria

เกตุณารินทร์ ปั่นเพ็ง, ศรีสุดา ปันณานุสรณ์,
ธีระชัย ธานันต์ และนิรมล ศากยวงศ์*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Ketnarin Panpeang, Srisuda Pannanusorn,

Theerachai Thanananta and Niramol Sakayawong *

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Received: May 4, 2018; Accepted: May 14, 2018

บทคัดย่อ

การศึกษาการลดสี Acid Red 2 โดยใช้แบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus* (C23), *Paenibacillus* sp. B1 (C29), *Paenibacillus* sp. Dg.904 (C24) และ *Stenotrophomonas maltophilia* (C39) พบว่าแบคทีเรีย C23 สามารถลดสีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากับร้อยละ 100 และมีอัตราการลดสีเฉลี่ย 12.50 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะนิ่ง ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 ระยะเวลาเพียง 8 ชั่วโมง เมื่อความเข้มข้นสีสูงถึง 500 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรีย C23 สามารถลดสีร้อยละ 100 และมีอัตราการลดสีเฉลี่ย 25.00 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 ภายในระยะเวลา 20 ชั่วโมง สำหรับการวิเคราะห์ผลผลิตภัณฑ์หลังการลดสีโดยเทคนิค UV-visible spectrophotometry พบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเปลี่ยนแปลงจาก 429 เป็น 238 นาโนเมตร แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์หลังการลดสีมีการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันเฉพาะของสารไปจากเดิม นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันโดยเทคนิค Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy ภายหลังการลดสี พบว่าหมู่ฟังก์ชันของโครงสร้างสีในผลิตภัณฑ์หลังการลดสีมีแนวโน้มเล็กลง ค่าร้อยละการกำจัดไฮโดรเจนของผลิตภัณฑ์หลังบำบัดมีเท่ากับ 66.18 อย่างไรก็ตาม เมื่อนำผลิตภัณฑ์หลังบำบัดมาศึกษาความเป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของต้นถั่วเขียว พบว่าร้อยละการงอก ความยาวของยอด และความยาวของรากเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับผลจากสี Acid Red 2

คำสำคัญ : สีย้อม Acid Red 2; การลดสี; แบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus*

Abstract

Decolorization of Acid Red 2 dye by *Lysinibacillus sphaericus* (C23), *Paenibacillus* sp. B1 (C29), *Paenibacillus* sp. Dg.904 (C24) and *Stenotrophomonas maltophilia* (C39) was studied. From the

beginning dye concentration of 100 mg L^{-1} , the bacterial C23 could 100 % decolorize with an average rate of decolorization at $12.50 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, under static conditions at 37°C , pH 7.0 within 8 hours. By increasing dye concentration up to 500 mg L^{-1} , the C23 could remain 100 % decolorization, while the average decolorization rate was $25.00 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ during 20 hours. In the section of degradation product analysis by using UV-visible spectrophotometry, the maximum adsorption wavelengths were changed from 429 nm to 238 nm. The result indicated that the specific functional groups of Acid Red 2 dye were changed after biodegradation. In addition, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy had analyzed the changing of functional groups of Acid Red 2 dye structure after decolorization. The functional groups of the products after decolorization were smaller than those of the original Acid Red 2 structure. The percentage of COD removal after decolorization by C23 was 66.18. However, the toxicity of decolorized products to green bean growth was found that the percentage of germination, plumule length, and radical length increased significantly when compared with those of Acid Red 2.

Keywords: Acid Red 2 dye, decolorization, *Lysinibacillus sphaericus*

1. คำนำ

อุตสาหกรรมสิ่งทอเป็นอุตสาหกรรมที่มีการใช้น้ำและสารเคมีในกระบวนการผลิตทำให้เกิดเป็นของเสียในปริมาณมากโดยเฉพาะน้ำเสียที่เป็นสีและสารเคมีต่าง ๆ ที่ละลายอยู่ในน้ำ ทำให้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมสิ่งทอประกอบด้วยค่าบีโอดี ค่าซีโอดี และความเข้มข้นของสีย่อมจะแปรเปลี่ยนไปตามกระบวนการผลิตที่มีลักษณะเฉพาะของโรงงานแต่ละแห่ง เนื่องจากน้ำเสียที่ปล่อยลงสู่ธรรมชาติมีการปนเปื้อนของสารเคมีและสีที่ย้อมที่หลงเหลือจากกระบวนการผลิต ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อคุณภาพน้ำในด้านของทัศนียภาพและก่อให้เกิดมลพิษทางน้ำที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำอีกด้วย (Eichlerova *et al.*, 2006)

สีย้อมเอซิด (acid dye) คือ สีย้อมเคมีหรือสีย้อมสังเคราะห์ชนิดหนึ่ง มีโครงสร้างขนาดใหญ่และซับซ้อน ซึ่งเมื่อละลายน้ำแล้วโมเลกุลสีจะมีประจุเป็นลบที่เรียกว่า “สีเอซิด” โครงสร้างของสีย้อมประกอบด้วยหมู่อะตอมที่เรียกว่า “โครโมฟอร์” เป็นหมู่อะตอมที่ทำให้เกิดสี ได้แก่ หมู่เอโซ (-N=N-) หมู่ซัลเฟอร์ (-S-) หมู่ไนโตร (-NO₂) เป็นต้น ทำให้ค่า

ซีโอดีในน้ำเสียมีปริมาณสูง ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และสารก่อการกลาย (mutagen) ในสิ่งมีชีวิต (Santos *et al.*, 2004) เนื่องจากสีชนิดนี้จะเกิดกลไกการติดสีหรือสามารถย้อมและดูดซับอย่างรวดเร็วในสารละลายสีย้อมที่มีสภาพเป็นกรด โครงสร้างโมเลกุลของสีส่วนใหญ่เป็นเกลือโซเดียมของกรดอินทรีย์ เหมาะสำหรับย้อมเส้นใยโปรตีน เช่น ขนสัตว์ ไหม เส้นใยสังเคราะห์บางชนิด กลไกในการดูดติดสีเกิดเป็นพันธะไอออนิก โดยเกิดขึ้นระหว่างหมู่ NH₂ ในเส้นใยกับหมู่ซัลเฟตของสีย้อม NaO₃S ด้วยอาศัย H⁺ จากสภาพความเป็นกรด สารละลายสีย้อมให้แก่หมู่ NH₂ เป็น NH₃⁺

การกำจัดสีในอุตสาหกรรมแบ่งเป็นวิธีการกายภาพ เคมี และชีวภาพ ซึ่งแต่ละวิธีก็จะมีข้อจำกัดที่แตกต่างกัน งานวิจัยนี้เลือกใช้การบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพ (biological treatment) ซึ่งเป็นวิธีการบำบัดน้ำเสียด้วยการกำจัดสิ่งเจือปนในน้ำเสียโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพหรือจุลินทรีย์ โดยเฉพาะสารคาร์บอนอินทรีย์ ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส โดยจุลินทรีย์จะใช้สารอินทรีย์เป็นอาหาร สารตั้งต้นในกระบวนการดำรงชีวิต การเจริญเติบโต

การสังเคราะห์เซลล์ใหม่ (new cell) ซึ่งจะได้ผลผลิตเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) น้ำ (H_2O) โดยจุลินทรีย์เหล่านี้อาจเป็นจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจน (aerobic organism) หรือจุลินทรีย์ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic organism)

Telke และคณะ (2008) ศึกษาจุลศาสตร์และกลไกของสีย้อม Reactive Red 141 (RR141) ที่ย่อยสลายด้วย *Rhizobium radiobacter* MTCC 8161 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเสียในระบบบำบัดของโรงงานฟอกย้อม พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถย่อยสลายสีย้อมเอโซหลายประเภท โดยศึกษาการย่อยสลาย RR141 ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 ภายใต้สภาวะไร้อากาศ มีค่าซีโอดีลดลงร้อยละ 83.33 โดยยูเรียและสารสกัดจากยีสต์จะช่วยส่งเสริมการย่อยสลายของแบคทีเรียชนิดนี้ เมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิค FTIR spectroscopy และเทคนิค gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) แสดงแนวโน้มให้เห็นว่าโครงสร้างสีย้อมเกิดการย่อยสลายกลายเป็น naphthalene diazonium, p-dinitrobenzene และ 2-nitrosonaphthol ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย การศึกษาแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* ที่แยกได้จากกากตะกอนเร่งปนเปื้อนสีสังเคราะห์ เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสี Methyl Red ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งสีชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่ม mono azo ที่เป็นสารก่อการกลาย โดยสามารถย่อยสลายสี Methyl Red เป็นสาร 2 ชนิด คือ 2-aminobenzoic acid และ N,N'-dimethyl-p-phenylene diamine จากนั้นสาร 2 ชนิด นี้จะถูกย่อยสลายต่อเนื่องโดยกิจกรรมของแบคทีเรีย ทำให้มีความเข้มข้นของสีลดลง (Wong and Yuen, 1998)

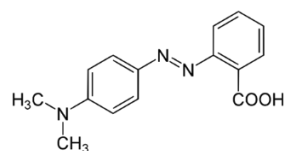
ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาการย่อยสลายของสีย้อม Acid Red 2 โดยศึกษาสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

ที่เหมาะสมด้วยการทดสอบประสิทธิภาพการลดสีย้อมเอโซ โดยมีการแปรผันปัจจัยต่าง ๆ จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์หลังการลดสีด้วยเทคนิค UV-visible spectrophotometry, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy รวมทั้งวิเคราะห์ค่าซีโอดี (chemical oxygen demand) ของผลิตภัณฑ์หลังการลดสี นอกจากนี้ยังทดสอบความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ต่อพืช ซึ่งผลงานวิจัยและข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้แบคทีเรียในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานฟอกย้อมต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมสารละลายสีย้อม

สีย้อมที่ใช้ในการศึกษาการลดสีครั้งนี้คือ Acid Red 2 ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$) มีชื่อทางการค้าว่า Methyl Red (Dystar Thai Co., Ltd., ไทย) น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 269.3 เมื่อวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer (Shimadzu, UV-1601, ออสเตรเลีย) พบว่าความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) เท่ากับ 429 นาโนเมตร เตรียมสารละลายสีย้อมด้วยการนำผงสีย้อมมาชั่งและละลายในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 25,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสีย้อม Acid Red 2 มีโครงสร้างสร้าง (Clarke และ Kirner, 1941) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างสร้างสีย้อม Acid Red 2

2.2 แบคทีเรียใช้ในการลดสีย้อม

แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ *Lysinibacillus sphaericus* (C23), *Paenibacillus* sp. Dg.904 (C24), *Paenibacillus* sp. B1 (C29)

และ *Stenotrophomonas maltophilia* (C39) จากการคัดแยกจากดินบริเวณที่ทิ้งขยะ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยชิซึโอกะ (Shizuoka University) ประเทศญี่ปุ่น

2.3 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียโดยเชื้อลงบนอาหารแข็ง nutrient agar (NA) บ่มในตูบ่มเชื้อ (incubator) (Binder, ED240 oven, สหรัฐอเมริกา) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แบคทีเรียจะเจริญเต็มพื้นที่อาหารบนจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนี ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว nutrient broth (NB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) (SciLution, SI-S150, ไทย) ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงสารปริมาตรน้อย (microcentrifuge) (IWAKI, TCF-12, ญี่ปุ่น) เพื่อแยกเซลล์ออกจากส่วนใสด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกเก็บส่วนตะกอนเซลล์มาล้างด้วย 0.85 % NaCl จำนวน 2 รอบ เก็บเซลล์ที่ได้ไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป และเก็บรักษาแบคทีเรียในอาหารเหลว NB ที่มี 30 % glycerol ผสมอยู่ในตู้เย็นแช่เยือกแข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อครั้งต่อไป

2.4 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ในการลดสีย้อม

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียโดยเชื้อลงบนอาหารแข็ง NA บ่มในตูบ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แบคทีเรียจะเจริญเต็มพื้นที่อาหารบนจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนี ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ด้วย

ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำกล้าเชื้อที่ได้ไปคำนวณปริมาณความขุ่นเซลล์เริ่มต้น โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ปรับความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นให้เท่ากับ McFarland standard no. 3 หรือประมาณ OD = 0.582 โดยเจือจางด้วยอาหารเหลว NB ซึ่งจะได้กล้าเชื้อสำหรับนำไปศึกษาประสิทธิภาพในการลดสีย้อมต่อไป

2.5 การศึกษาการลดสีย้อม

นำแบคทีเรียจากข้อ 2.4 มาศึกษาประสิทธิภาพในการลดสีย้อม เดิมกล้าเชื้อคิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) ลงในอาหารเหลว Bushnell Haas medium (BHM) 90 มิลลิลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบ คือ $MgSO_4$ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร K_2HPO_4 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร KH_2PO_4 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร yeast extract 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร $CaCl_2$ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร $FeCl_3$ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร NH_4NO_3 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Waghmode *et al.*, 2012) แหล่งคาร์บอน คือ glucose 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจน คือ NH_4Cl 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วย 1.0 M HCl และ 1.0 M NaOH วัดด้วยเครื่อง pH meter (Scientific Instrument, IQ 240, สหรัฐอเมริกา) แล้วปรับให้ได้ค่าความเป็นกรดต่าง 7.0 ± 0.2 ที่มีสีย้อม Acid Red 2 ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มในตูบ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะนิ่ง จนกระทั่งสีมีการเปลี่ยนแปลงจากสีแดงเป็นสีเหลืองอ่อน นำส่วนใสที่ได้หลังการบำบัดมาปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 7.0 จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงสารปริมาตรน้อย ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 429 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer โดยมีอาหารเหลว BHM ที่ผสม

สีย้อม Acid Red 2 เป็นทริตเมนต์ควบคุม ซึ่งแบคทีเรียที่มีความสามารถในการลดสีจะถูกคัดเลือกเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.6 การหาความเข้มข้นของสีย้อมที่เหมาะสมสำหรับการลดสี

เติมกล้ำเชื้อแบคทีเรีย 20 ไมโครลิตร คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) ลงในหลุมแต่ละหลุมของ 96 well plate ที่มีอาหารเหลว BHM 180 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดต่าง 7.0 ± 0.2 เติมสีย้อม Acid Red 2 ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 0-4,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (two-fold serial dilution) จากนั้นปมในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะนิ่ง เก็บส่วนใสที่ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมუნเหวี่ยงด้วยเครื่องหมუნเหวี่ยงสารปริมาตรน้อย ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 429 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate spectrophotometer โดยมีอาหารเหลว BHM ที่ผสมสีย้อม Acid Red 2 เป็นทริตเมนต์ควบคุม ค่าที่ได้นำไปคำนวณร้อยละการลดสี (% decolorization) ดังสมการที่ 1 และอัตราการลดสีเฉลี่ย (average

decolorization rate) ดังสมการที่ 2

2.7 การหาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมสำหรับการลดสี

เติมกล้ำเชื้อแบคทีเรีย 20 ไมโครลิตร คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรโดยปริมาตร ลงในหลุมแต่ละหลุมของ 96 well plate ที่มีอาหารเหลว BHM 180 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วย 1.0 M HCl และ 1.0 M NaOH ให้ได้ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 และ 11.0 เติมสีย้อม Acid Red 2 (การทดลองข้อ 2.6) จากนั้นปมในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะนิ่ง และเก็บส่วนใสทุก 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีมีการเปลี่ยนแปลงจากสีแดงเป็นสีเหลืองอ่อน จากนั้นนำไปหมუნเหวี่ยงด้วยเครื่องหมუნเหวี่ยงสารปริมาตรน้อย ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 429 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate spectrophotometer โดยมีอาหารเหลว BHM ที่ผสมสีย้อม Acid Red 2 เป็นทริตเมนต์ควบคุม ค่าที่ได้นำไปคำนวณร้อยละการลดสี (สมการที่ 1) และอัตราการลดสีเฉลี่ย (สมการที่ 2)

$$\text{ร้อยละการลดสี} = [(\text{ความเข้มข้นก่อนลดสี} - \text{ความเข้มข้นหลังลดสี}) \div \text{ความเข้มข้นก่อนลดสี}] \times 100 \quad (1)$$

$$\text{อัตราการลดสีเฉลี่ย} = [(\text{ความเข้มข้นก่อนลดสี} \times \text{ร้อยละการลดสี}) \div (100 \times \text{ระยะเวลาการลดสี})] \quad (2)$$

2.8 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์หลังการลดสี

2.8.1 การวิเคราะห์การลดสี

นำผลิตภัณฑ์หลังจากการลดสีมาหาร้อยละการลดสี โดยเก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมუნเหวี่ยงสารปริมาตรน้อย ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนใสหลังการหมუნเหวี่ยงมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer วัดค่าการดูดกลืนแสงที่สูงสุด ($\lambda_{\max}$) ของสีย้อม Acid Red 2 คือ 429 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟ

มาตรฐานของสีย้อม ซึ่งใช้อาหารเหลว BHM ที่ไม่มีการเติมสีเป็นทริตเมนต์ควบคุม และคำนวณร้อยละการลดสี (สมการที่ 1) (Qu *et al.*, 2012) และอัตราการลดสีเฉลี่ย (สมการที่ 2)

2.8.2 วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-visible spectrophotometry

นำผลิตภัณฑ์ที่ก่อนและหลังการลดสี หมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมუნเหวี่ยงสารปริมาตรน้อย ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสที่ได้ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 7.0

จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่น 190-700 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ซึ่งใช้อาหารเหลว BHM ที่ไม่มีการเติมสีเป็นทริตเมนต์ควบคุมเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์หลังการลดสี จากนั้นสร้างกราฟค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์

2.8.3 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FTIR spectroscopy

นำสารตัวอย่างที่เป็นผลิตภัณฑ์ก่อนและหลังการลดสีหมუნเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงสารปริมาตรน้อย ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปทำให้เป็นของแข็งโดยการระเหยนํ้าออกในตู้อบความร้อน (hot air oven) อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และนำเข้าตู้ดูดความชื้น (desiccator) เตรียมตัวอย่างโดยการบดตัวอย่าง 0.05 กรัมผสมกับโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) 0.05 กรัม ให้เข้ากันในโกร่ง และนำของผสมใส่ในแผ่นตรึงตัวอย่าง โดยเกลี่ยของผสมให้สม่ำเสมอ นำไปวางบนแท่นเครื่องอัดไฮดรอลิก (hydraulic press) จากนั้นยัดสารตัวอย่างด้วยแผ่นเซลล์ นำตัวอย่างเข้าเครื่อง FTIR spectrometer (Perkin Elmer, FTIR SPECTRUM GX, เยอรมัน) ณ ห้องปฏิบัติการเคมี C-407 สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรม

ศาสตร์ ศูนย์รังสิต นำผลไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม WIN-IR easy และ IR Mentor pro 6.5 (BIO-RAD Laboratories) ช่วงเลขคลื่นที่ตรวจสอบ คือ 4000-400 cm^{-1} แล้วศึกษาหมู่ฟังก์ชันที่เปลี่ยนแปลงไปของผลิตภัณฑ์ก่อนการลดสีเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์โดยแบคทีเรีย

2.8.4 การวิเคราะห์ค่าซีโอดี (COD)

นำผลิตภัณฑ์ก่อนการลดสีและหลังการลดสี ส่งวิเคราะห์ค่าซีโอดีด้วยวิธี closed reflux ณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์เบทาโกร (BSC) จังหวัดปทุมธานี นำค่าซีโอดีที่ได้ไปคำนวณร้อยละการกำจัดซีโอดี ดังสมการที่ 3 (Sureyya *et al.*, 2004)

2.8.5 การตรวจสอบความเป็นพิษก่อนและหลังการลดสีต่อพืช (phytotoxicity)

ศึกษาความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ก่อนและหลังการลดสีย้อม Acid Red 2 ต่อถั่วเขียว (*Vigna radiata*) โดยนำผลิตภัณฑ์ก่อนและหลังการลดสีย้อม Acid Red 2 ที่มีน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมรดลงในภาชนะปลูกถั่วเขียวทุกวัน อย่างละ 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาการปลูกเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นวัดค่าร้อยละการงอก ความยาวของยอด (plumule) และราก (radical) (Phugare *et al.*, 2011) ดังสมการที่ 4

$$\text{ร้อยละการกำจัดซีโอดี} = \frac{[\text{ค่าซีโอดีก่อนลดสี} - \text{ค่าซีโอดีหลังลดสี}]}{\text{ค่าซีโอดีก่อนลดสี}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{ร้อยละการงอก} = \frac{[\text{จำนวนของเมล็ดที่งอก}]}{[\text{จำนวนของเมล็ดที่ปลูก}]} \times 100 \quad (4)$$

2.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) และหาค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ด้วยวิธี Duncan's multiple range test โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 22.0

3. ผลและวิจารณ์

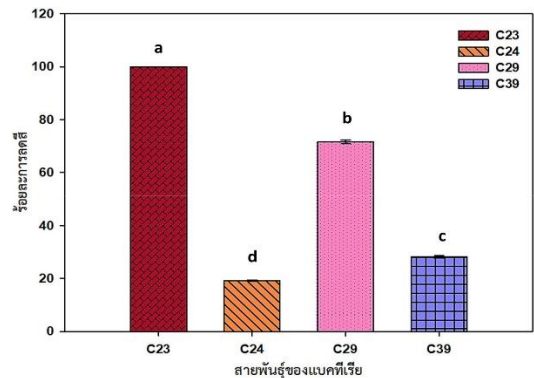
3.1 สายพันธุ์แบคทีเรียต่อประสิทธิภาพการลดสี

พบว่า *Lysinibacillus sphaericus* (C23) สามารถลดสีในอัตราร้อยละ 100 รองลงมา คือ *Paenibacillus* sp. B1 (C29) ร้อยละ 71.62±0.78 *Stenotrophomonas maltophilia* (C39) ร้อยละ

28.16±0.50 และ *Paenibacillus* sp. Dg.904 (C24) ร้อยละ 19.12±0.30 ตามลำดับ ภายในระยะเวลา 8 ชั่วโมง วัดค่าความเป็นกรดต่างของผลิตภัณฑ์หลังการลดสีได้เท่ากับ 6.8 เมื่อพิจารณาสายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อการลดสีของ Acid Red 2 พบว่าสายพันธุ์ของแบคทีเรียมีผลต่อการลดสีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sompark และคณะ (2014) ที่คัดแยกแบคทีเรีย *Paenibacillus terrigena* จากอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ โดยมีประสิทธิภาพในการลดสี Reactive Red 141 (RR141) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

การศึกษากลไกการย่อยสลายสีกลุ่มเอโซด้วยแบคทีเรียรายงานว่าการตัดพันธะของหมู่เอโซด้วยเอนไซม์เอโซรีดักเทส (azo reductase) ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนในปริมาณที่จำกัด โดย NADH จะทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนทำให้เกิดการสลายสาร aromatic amine ด้วยเอนไซม์ชนิด non-specific เมื่อเข้าสู่กระบวนการ hydroxylation จะทำให้เกิดการเปิดวงอะโรมาติก (Dafale *et al.*, 2008) โดยมีประสิทธิภาพการลดสีแสดงดังรูปที่ 2 นอกจากนี้เมื่อพิจารณาสายพันธุ์ของแบคทีเรียต่ออัตราการลดสีเฉลี่ย พบว่าสายพันธุ์ของแบคทีเรียมีผลต่ออัตราการลดสีเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยอัตราการลดสีเฉลี่ยดังตารางที่ 1 โดยผลการทดลองข้างต้นพบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถลดสีของย้อมที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะนี้ จึงนำแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ มาศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.2 ความเข้มข้นของสีต่อประสิทธิภาพการลดสี



รูปที่ 2 ผลของชนิดแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพการลดสี (^{abc}ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี Duncan's multiple range test)

ตารางที่ 1 ชนิดของสายพันธุ์แบคทีเรียต่ออัตราการลดสีเฉลี่ย

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ร้อยละการลดสี	อัตราการลดสีเฉลี่ย (mg L ⁻¹ h ⁻¹)
C23	100.00±0.00 ^a	12.50±0.00 ^a
C24	19.12±0.30 ^d	2.39±0.04 ^d
C29	71.62±0.78 ^b	8.95±0.10 ^b
C39	28.16±0.50 ^c	3.52±0.06 ^c

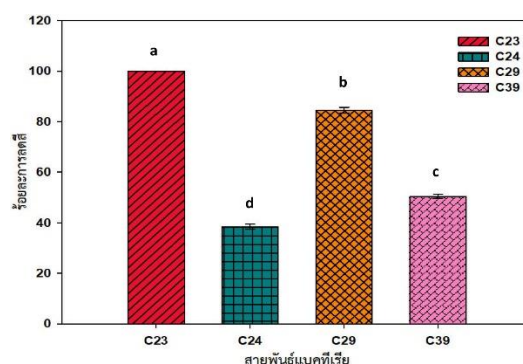
^{abc}ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี Duncan's multiple range test

การทดลองลดความเข้มข้นสีในอาหารเหลว BHM ที่มีสีย้อม Acid Red 2 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0-4,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยเทคนิค two-fold serial dilution ค่าความเป็นกรดต่าง 7.0±0.2 พบว่าแบคทีเรีย C23 สามารถลดสี ร้อยละ 100 ที่ความเข้มข้นสูงสุด 500 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ แบคทีเรีย C29 สามารถลดสีร้อยละ 100 ที่

ความเข้มข้นสูงสุดได้ที่ 375 มิลลิกรัมต่อลิตร และสุดท้าย คือ แบคทีเรีย C39 และ C24 สามารถลดสีร้อยละ 100 ที่ความเข้มข้นสูงสุดได้ที่ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง แต่เมื่อนำมาคำนวณการลดสีที่ความเข้มข้นสี 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแบคทีเรีย C23 สามารถลดสีร้อยละ 99.99 ± 0.05 รองลงมา คือ แบคทีเรีย C29 สามารถลดสีร้อยละ 84.57 ± 1.12 แบคทีเรีย C39 สามารถลดสีร้อยละ 50.44 ± 0.83 และแบคทีเรีย C24 สามารถลดสีร้อยละ 38.45 ± 0.92 ตามลำดับ ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยประสิทธิภาพการลดความเข้มข้นสีแสดงดังรูปที่ 3 จากนั้นนำ 96 well plate ไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเพิ่มระยะเวลาอีก 24 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรีย C23 สามารถลดสีได้เท่าเดิมที่ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากความเข้มข้นของสีย้อม Acid Red 2 ที่เพิ่มมากขึ้นอาจส่งผลกระทบต่อความสามารถในการย่อยสลายสาร ความสามารถในการปรับตัวเพื่อการอยู่รอดและการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

เมื่อพิจารณาสายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพการลดความเข้มข้นสี พบว่าสายพันธุ์ของแบคทีเรียมีผลต่อประสิทธิภาพการลดความเข้มข้นสีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ซึ่งการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกมา มีประสิทธิภาพในการลดสี แต่ความเข้มข้นที่ใช้ต้องเหมาะสมต่อแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งคล้ายคลึงกับผลงานวิจัยของ เฉลิมวูธ และคณะ (2560) ที่ศึกษาความสามารถของ *Paenibacillus* sp. (C29) ในการลดสีย้อม Reactive red 141 ในอาหารเหลว NB พบว่ามีประสิทธิภาพในการลดสีย้อมที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้อย่างสมบูรณ์ที่ร้อยละ 99.98 ภายในระยะเวลา 11 ชั่วโมง สำหรับความเข้มข้นสีย้อมที่ใช้ คือ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ระยะเวลา

ในการลดสีนานกว่า 11 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสีมีผลต่อระยะเวลาในการลดสี และงานวิจัยของ Kalyani และคณะ (2009) พบว่าความเข้มข้นของสีจะก่อให้เกิดความเป็นพิษและสะสมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยโมเลกุลของสีสามารถขัดขวางการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เอโซรีดักเทส (azo reductase) โดยไปยับยั้งบริเวณตำแหน่ง active site ของเอนไซม์จึงทำให้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาการสลายโครงสร้างสี ดังนั้นความสามารถในการลดสีของแบคทีเรียจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสีย้อมเพิ่มขึ้น



รูปที่ 3 ผลของความเข้มข้นสีต่อประสิทธิภาพการลดสี (abc ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี Duncan's multiple range test)

3.3 ความเป็นกรด-ด่างต่อประสิทธิภาพการลดสี

ทดลองค่าความเป็นกรดต่างต่อประสิทธิภาพการลดสี พบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพการลดสีที่ค่าความเป็นกรดต่างในช่วงกว้างที่ 3.0-11.0 แต่ค่าความเป็นกรดต่างที่ดีที่สุด คือ 7.0 ดังตารางที่ 2 โดยสามารถเรียงลำดับประสิทธิภาพการลดสีจากมากไปน้อยได้ดังนี้ แบคทีเรีย C23 สามารถการลดสีร้อยละ 100

แบบที่เรีย C29 สามารถลดสีร้อยละ 86.47 ± 0.90
แบบที่เรีย C39 สามารถลดสีร้อยละ 36.34 ± 0.85
และแบบที่เรีย C24 สามารถลดสีร้อยละ 31.19 ± 1.55
ภายในระยะเวลา 20 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อนำ
ผลิตภัณฑ์ก่อนและหลังการลดสีมาวัดค่าความเป็น
กรดต่าง พบว่ามีค่าที่เปลี่ยนแปลงไปจากค่าเดิม
โดยค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 3.0-5.0 จะมีค่า
เพิ่มขึ้น และในช่วงค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0-
9.0 มีค่าลดลงเล็กน้อย แต่ค่าความเป็นกรดต่างที่
11.0 ค่าความเป็นกรดต่างไม่มีการเปลี่ยนแปลง

การลดลงของสีที่เกิดขึ้นเกี่ยวข้องกับโดย
ตรงต่ออัตราการเจริญเติบโตและระบบเมตาบอลิซึม
ของจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความ
เป็นกรดต่างในช่วงที่เหมาะสมในการย่อยสลาย
โมเลกุลของสีย้อม ไม่ได้เป็นผลมาจากการเติม
สารเคมีที่ใช้ปรับค่าความเป็นกรดต่างในอาหาร
เลี้ยงเชื้อ ดังนั้นการที่ทำให้จุลินทรีย์มีอัตราการ

เจริญเติบโตสูงและทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ
จำเป็นอย่างยิ่งต้องมีการควบคุมค่าความเป็นกรด-
ต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม
โดยค่าความเป็นกรดต่างที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง
เล็กน้อยเป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการลดสี
อัตราการลดสีมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อค่า
ความเป็นกรดต่างมาก หรือค่าความเป็นด่างสูง ซึ่งการ
เปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 7.0 ถึง
9.5 มีผลกระทบเพียงเล็กน้อยต่อกระบวนการลดสี
ย้อม อัตราการลดสีย้อมเพิ่มขึ้นเกือบ 2.5 เท่าเมื่อ
ค่าความเป็นกรดต่างเพิ่มขึ้นจาก 5.0 เป็น 7.0
(Chang *et al.*, 2001) นอกจากนี้ค่าความเป็นกรด
ต่างที่เป็นมาตรฐานน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมจะ
กำหนดให้อยู่ในช่วงระหว่าง 5.5-9.0 (มันสิน, 2542)
ทำให้ผลิตภัณฑ์หลังการลดสีสามารถปล่อยออกสู่
สิ่งแวดล้อมได้

ตารางที่ 2 ผลค่าความเป็นกรดต่างต่อประสิทธิภาพการลดสี

สายพันธุ์ แบคทีเรีย	ร้อยละการลดสี				
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9	pH 11
C23	40.14 ± 0.09^a	83.98 ± 1.33^a	100 ± 0.00^a	82.38 ± 0.62^a	22.33 ± 2.06^a
C24	9.17 ± 0.06^d	16.52 ± 0.96^d	31.19 ± 1.55^d	16.73 ± 1.44^d	6.33 ± 0.23^d
C29	31.28 ± 1.63^b	72.47 ± 1.92^b	86.47 ± 0.90^b	63.48 ± 1.14^b	27.59 ± 0.51^b
C39	24.97 ± 0.77^c	31.52 ± 1.45^c	36.34 ± 0.85^c	30.80 ± 1.35^c	23.17 ± 0.99^c

abc ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี
Duncan's multiple range test

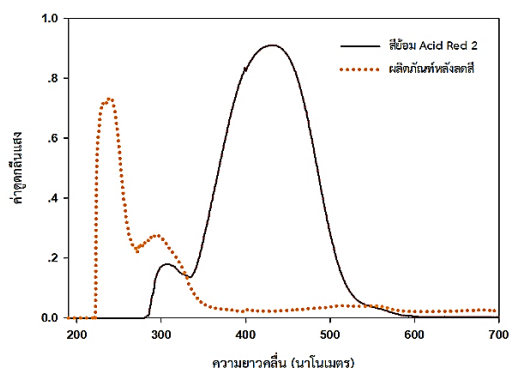
3.4 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์หลังการลดสี

3.4.1 ผลค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง
UV-visible spectrophotometer

นำผลิตภัณฑ์ก่อนและหลังการลดสี
โดยใช้แบบที่เรีย C23 ไปหมუნเหวี่ยงด้วยเครื่อง
หมุนเหวี่ยงสารปริมาตรน้อย ความเร็ว 12,000 รอบ

ต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสที่ได้ปรับค่าความ
เป็นกรดต่างให้เท่ากับ 7 จากนั้นวัดค่าการดูดกลืน
แสงช่วงความยาวคลื่นที่ 190-700 นาโนเมตร ด้วย
เครื่อง UV-visible spectrophotometer ซึ่งใช้อาหาร
เหลว BHM ที่มีสีย้อม Acid Red 2 เป็นทรีตเมนต์
ควบคุมเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์หลังการลดสี ผล

ค่าดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่นที่ 190-700 นาโนเมตร ดังรูปที่ 4 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเปลี่ยนจาก 429 นาโนเมตร เปลี่ยนไปเป็น 238 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงค่าการดูดกลืนแสงแสงอัลตราไวโอเล็ต แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์หลังการลดสีมีการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันเฉพาะ (functional group) ของสารตั้งต้นไป โดยช่วงความยาวคลื่นที่เปลี่ยนไปเกี่ยวข้องกับการย่อยของโครงสร้างของพันธะเอโซที่เชื่อมต่อกับโครงสร้างเปิดของวงแหวน naphthalene ring และ benzene ตามลำดับ (Mielgo *et al.*, 2001) และยังสามารถยืนยันประสิทธิภาพการลดสีของแบคทีเรีย C23 ได้อีกด้วย

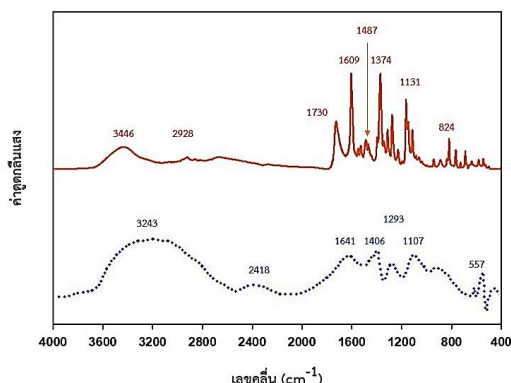


รูปที่ 4 UV-visible spectra ของสี Acid Red 2 ก่อนและหลังการลดสีด้วยแบคทีเรีย C23

3.4.2 ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันด้วยเครื่อง FTIR spectrometer

การวิเคราะห์โครงสร้างของสีย้อมและผลิตภัณฑ์หลังการลดสี พบว่าสีย้อมที่ยังไม่ผ่านการลดสีนั้นจะแสดงตำแหน่งพิกที่ทั่วไปในตำแหน่งที่มี หมู่ N-H ที่ตำแหน่งพิกที่ 3446 หมู่ C-H ที่ตำแหน่งพิกที่ 2928 หมู่ C=O ที่ตำแหน่งพิกที่ 1730 หมู่ NH₂ ที่ตำแหน่งพิกที่ 1609 หมู่ ring ที่ตำแหน่งพิกที่ 1487 หมู่ O-H ที่ตำแหน่งพิกที่ 1374 หมู่ C-O-C ที่ตำแหน่งพิกที่ 1131 และหมู่ C-H ที่ตำแหน่งพิกที่ 824 เมื่อนำผลิตภัณฑ์หลังการลดสี

โดยแบคทีเรีย C23 มาวิเคราะห์พบว่าตำแหน่งพิกที่เพิ่มขึ้น คือ หมู่ O-H ที่ตำแหน่งพิกที่ 3243 หมู่ R-COOCO-R ที่ตำแหน่งพิกที่ 921 และหมู่ COOH ที่ตำแหน่งพิกที่ 557 โดยผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันด้วยเครื่อง FTIR spectrometer ดังรูปที่ 5 จากงานวิจัยของ นิรมล และดุขยา (2556) ที่ศึกษาเกี่ยวกับการลดสี RR141 เมื่อนำผลิตภัณฑ์หลังการลดสีโดยใช้จุลินทรีย์ ไบโพรเซสส์ด้วยวิธี FTIR พบว่าผลิตภัณฑ์หลังการลดสีไม่มีการเปลี่ยนแปลงตรงตำแหน่งพิกที่ 1111 (วงแหวนสี) แต่มีการแตก ring ผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ *p*-dinitro benzene ผลิตภัณฑ์ยังคงมีความเป็นพิษอยู่ ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้เป็นการสลายพันธะของโครงสร้างขนาดใหญ่ของโครงสร้างสีให้มีขนาดเล็กลง



รูปที่ 5 FTIR spectra ของสี Acid Red 2 ก่อนและหลังการลดสีด้วยแบคทีเรีย C23

3.4.3 ผลการวิเคราะห์ค่าซีโอดี

การทดสอบผลิตภัณฑ์ก่อนและหลังการลดสีโดยแบคทีเรีย C23 ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ค่าซีโอดี ณ บริษัท เอเชีย แล็บ แอนด์ คอนซัลแตนท์ จำกัด ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3 พบว่าอาหารเหลว BHM ที่มีสมสีย้อมความเข้มข้นสี 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าซีโอดีก่อนการลดสีเท่ากับ 2,358 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อลดสีด้วยแบคทีเรีย C23

มีค่าซีไอดีเท่ากับ 691 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยค่าซีไอดีก่อนการลดสีจะมีค่าสูงกว่าค่า ซีไอดีหลังการลดสีเมื่อนำไปคิดร้อยละการกำจัด ซีไอดีที่ลดลงมีค่าเท่ากับ 66.18 ดังตารางที่ 3 แต่ค่าซีไอดีของการบำบัดโดยจุลินทรีย์ยังคงมีค่าเกินมาตรฐานน้ำทิ้งของกรมโรงงานอุตสาหกรรมที่กำหนดไว้ที่ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร (มันสิน, 2542)

ทั้งนี้เนื่องมาจากน้ำเสียที่นำไปวิเคราะห์นั้นจะประกอบไปด้วยสารประกอบอื่น ๆ นอกเหนือจากสีย้อมนั้นมีแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส แหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ ทำให้ค่าซีไอดีหรือปริมาณออกซิเจนทั้งหมดที่ต้องการใช้

เพื่อออกซิเดชันสารอินทรีย์ในน้ำเสียสูง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ พรชนก และภัชราภรณ์ (2554) ที่ศึกษาการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานปลาป่นที่มีค่า ซีไอดีและค่าบีไอดีก่อนบำบัดสูงถึง 4,000-16,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าน้ำเสียหลังบำบัดด้วยจุลินทรีย์ทางการค้าชนิด EMTEC FM ยังมีปริมาณค่าซีไอดีและค่าบีไอดีสูงกว่ามาตรฐาน ดังนั้นควรนำผลิตภัณฑ์หลังการลดสีมาผ่านการบำบัดด้วยวิธีการทางกายภาพหรือทางเคมีต่อไป เพื่อให้ผลผลิต ภัณฑ์หลังการลดสีมีค่าซีไอดีที่สามารถปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมได้

ตารางที่ 3 ผลร้อยละการกำจัดซีไอดีที่ลดลงก่อนบำบัดและหลังบำบัดสีโดยแบคทีเรีย

ตัวอย่าง	ค่าซีไอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ร้อยละการกำจัดซีไอดี
	ก่อนลดสี	หลังลดสี	
อาหารเหลว BHM ที่ผสมสีย้อม Acid Red 2 ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร	2,043	691	66.18

ตารางที่ 4 ผลความเป็นพิษก่อนและหลังการลดสีต่อพืช (phytotoxicity)

ปัจจัย	แบคทีเรีย C23		
	น้ำกลั่น	สีย้อม Acid Red 2	ผลิตภัณฑ์หลังการลดสี
ร้อยละการงอก	100	30	100
ความยาวของยอด (เซนติเมตร)	19.32±0.95 ^a	1.30±0.12 ^c	12.07±1.44 ^b
ความยาวของราก (เซนติเมตร)	6.87±0.79 ^a	10.44±0.21 ^c	3.16±0.39 ^b

^{abc}ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี Duncan's multiple range test

3.4.4 ผลความเป็นพิษก่อนและหลังการลดสีต่อพืช (phytotoxicity)

ศึกษาความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ก่อนและหลังการลดสีย้อมต่อถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ที่ความเข้มข้น 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าถั่วเขียวที่รดด้วยน้ำกลั่นและผลิตภัณฑ์หลัง

การบำบัดมีร้อยละการงอกเท่ากับ 100 ซึ่งแตกต่างจากถั่วเขียวที่รดด้วยสีย้อม Acid Red 2 ที่มีร้อยละการงอกเท่ากับ 30 แต่เมื่อพิจารณาความยาวของยอดและความยาวของราก พบว่าต้นถั่วเขียวที่รดด้วยน้ำกลั่นมีความยาวของยอดและรากมากที่สุด รองลงมา คือ ผลิตภัณฑ์หลังการลดสี และสุดท้าย

คือสีย้อม Acid Red 2 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสีย้อมมีผลต่อร้อยละการงอก การเจริญเติบโต ความยาวของยอดและความยาวของราก เมื่อพิจารณาผลความเป็นพิษต่อพืช พบว่าสารที่ลดลงไปบนถั่วเขียวมีผลต่อร้อยละการงอก ความยาวของยอด และความยาวของรากแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลการศึกษาความเป็นพิษต่อพืช (*Triticum aestivum*) พบว่าน้ำกลั่นและผลิตภัณฑ์หลังการลดสีมีร้อยละการงอกเท่ากับ 100 แต่สีย้อม Reactive Red (RR2) มีร้อยละการงอกเท่ากับ 30 ซึ่งน้ำกลั่นและผลิตภัณฑ์หลังการลดสีมีร้อยละการงอกเท่ากัน เนื่องมาจากแบคทีเรียย่อยสลายสารอาหารเหลว BHM และลดความเป็นพิษของสีย้อมให้มีโครงสร้างที่เล็กลง ทำให้พืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ (Leelahakriengkrai et al., 2011) นอกจากนี้สีย้อมเอซิดสามารถดูดกลืนแสงได้ ทำให้พืชน้ำที่ต้องการแสงในการสังเคราะห์แสงได้รับผลกระทบอย่างรุนแรงจากการขาดแสงสว่างไปด้วย และสีย้อมมักมีโลหะหนักอยู่ในโครงสร้าง ได้แก่ ทองแดง โครเมียม และโคบอลต์

4. สรุป

การลดสี Acid Red 2 โดยแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว Bushnell Haas medium (BHM) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง 7.0 ภายใต้สภาวะหนึ่ง พบว่าแบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus* (C23) มีร้อยละการลดสีเท่ากับ 100 ในระยะเวลา 20 ชั่วโมง และมีอัตราการลดสีเฉลี่ย 25.00 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ความเข้มข้นสี 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 เมื่อศึกษาเป็นการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์หลังการลดสีด้วยเทคนิค UV-visible spectrophotometry พบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเปลี่ยนจาก 429 นาโนเมตร เป็น 238 นาโนเมตร ผลิต

ภัณฑ์หลังการลดสีมีการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันเฉพาะ (functional group) ของสารตั้งต้นไปจากเดิม นอกจากนี้เมื่อใช้เทคนิค FTIR spectroscopy พบว่าหมู่ฟังก์ชันโครงสร้างของผลิตภัณฑ์หลังการลดสีมีแนวโน้มเล็กลงกว่าสี Acid Red 2 ก่อนลดสี นอกจากนี้ร้อยละการกำจัดซีโอดีเท่ากับ 66.18 แต่ค่าซีโอดีหลังการลดสียังมีค่าเกินมาตรฐานน้ำทิ้งที่กรมโรงงานอุตสาหกรรมกำหนด ซึ่งต้องใช้วิธีการบำบัดสีทางกายภาพหรือเคมีมาช่วยบำบัดต่อไป สีย้อมก่อนการบำบัดมีความเป็นพิษส่งผลให้ร้อยละการงอก ความยาวของยอด และความยาวของรากลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำกลั่นและผลิตภัณฑ์หลังการลดสี ดังนั้นงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรีย C23 มีประสิทธิภาพในการลดสีย้อม และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในพื้นที่ปนเปื้อนจริง

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ภายใต้ “ทุนวิจัยทั่วไป” ตามสัญญาเลขที่ ทน 58/2561 ขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สาขาวิชาเคมี และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่กรุณาอนุเคราะห์ให้ใช้เครื่องมือสำหรับการวิจัยครั้งนี้

6. รายการอ้างอิง

กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม, 2548, ตำราระบบบำบัดมลพิษน้ำ, สำนักพิมพ์เทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมโรงงาน, กรุงเทพฯ.
เฉลิมวุฒ สมปาก, สุกัลยา อุทัยดา, ชีระชัย ธนนานันต์ และนิรมล ศากยวงศ์, 2560, การบำบัดสีในน้ำเสียจากโรงงานฟอกย้อมด้วยวิธีการกำจัดอากาศและการเติมอากาศแบบต่อเนื่องโดยแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. C29 ว.วิทยา

- ศาสตร์และเทคโนโลยี 3: 221-235.
- มันสิน ตันทุลเวศม์, 2542, เทคโนโลยีบำบัดน้ำเสีย
อุตสาหกรรม เล่ม 1, บริษัท แชน. อี. 68 คอน
ซัลติง เอ็นจิเนียร, กรุงเทพฯ, 245 น.
- นิรมล ศากยวงศ์ และดุขยา จันท์เสาร์, 2556, การ
บำบัดสีรีแอคทีฟโดยแบคทีเรียที่แยกได้จาก
ดิน, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 21: 147-
158.
- พรชนก วงผดุงเกียรติ และภัชราภรณ์ สุวรรณวิทยา,
2554, จุลินทรีย์ทางการค้าในกระบวนการ
บำบัดน้ำเสียโรงงานปลาป่น, วิศวกรรมสาร
มก. 77: 24-33.
- Chang, J.S., Chou, C., Lin, Y.C., Lin, P.J., Ho,
J.Y., Hu, T.L., 2001, Kinetic characteristics
of bacterial azo- dye decolorization by
Pseudomonas luteola, Water Res. 35:
2841-2850.
- Clarke, H.T. and Kirner, W.R., 1941, Methyl Red,
Organic Syntheses 1: 374.
- Dafale, N., Rao, N.N., Meshram, S.U. and Wate,
S.R., 2008, Decolorization of azo dyes and
simulated dye bath wastewater using
acclimatized microbial consortium-biostimu
lation and halo tolerance, Bioresource
Technol. 99: 2552-2558.
- Eichlerova, I., Homolka, L. and Nerud, F., 2006,
Synthetic dye decolorization of white rot
fungus *Dichomitus squalens*, Bioresource
Technol. 97: 2153-2159.
- Leelahakriengkrai, P. and Peerapornpisal, Y.,
2011, Water quality and trophic status in
main rivers of Thailand, Chiang Mai J. Sci.
38, 280-294.
- Kalyani, D.C., Telke, A.A., Dhanve, R.S. and
Jadhav, J.P., 2009, Ecofriendly biodegrada
tion and detoxification of Reactive Red 2
textile dye by newly isolated *Pseudomonas*
sp. SUK1, J. Hazard Mater. 163: 735-742.
- Mielgo, I., Moreira, M.T., Feijoo, G., Lema, J.M.,
2001, A packed-bed fungal bioreactor for
continuous decolourisation of azo dyes
(orange II), J. Biotechnol. 89: 99-106.
- Phugare, S.S., Kalyani, D.C., Surwase, S.N. and
Jadhav, J.P., 2011, Ecofriendly degrada
tion, decolorization and detoxification of
textile effluent by a developed bacterial
consortium, Ecotoxicol. Environ. Saf. 74:
1288-1296.
- Qu, Y., Cao, X., Ma, Q., Shi, Sh., Tan, L., Li, X.,
Zhou, H., Zhang, X. and Zhou, J., 2012,
Aerobic decolorization and degradation of
acid red b by a newly isolated *Pichia* sp.
TCL, J. Hazard. Mater. 223: 31-38.
- Santos, A.B., Cervantes, F.J. and Lier, J.B.,
2007, Review paper on current
technologies for decolourization of textile
wastewaters: perspectives for anaerobic
biotechnology, Bioresource Technol. 98:
2369-2385.
- Sompark, C., Thananata, T. and Sakkayawong,
N., 2014, Screening of RR141 decolorizing
bacteria from Khao Yai National Park,
Thailand, pp 98, 5th Bioscience
International Conference, Thailand.
- Sureyya, M., Deniz, K. and Tugba, O., 2004,
Color and COD removal from wastewater
containing reactive black 5 using Fenton's
oxidation process, Chemosphere 54: 435-
441.
- Telke, A., Kalyani, D., Jadhav J, and Govindwar,

- S. , 2008, Kinetics and mechanism of reactive red 141 degradation by a bacterial isolate *Rhizobium radiobacter* MTCC 8161, Acta Chim. Slov. 55: 320-329.
- Waghmode, T.R., Kurade, M.B., Kagalkar, A.N., and Govindwar, S.P., 2012, Differential fate of metabolism of a disperse dye by microorganisms *Galactomyces geotrichum* and *Brevibacillus laterosporus* and their consortium GG-BL, J. Environ. Sci. 24: 1295-1304.
- Wong, P.K. and Yuen, P.Y., 1998, Decolourization and biodegradation of N,N'-dimethyl-p-phenylenediamine by *Klebsiella pneumoniae* RS-13 and *Acetobacter liquefaciens* S-1, J. Appl. Microbiol. 85: 79-87.