# การบำบัดสีรีแอคทีฟโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน

# Reactive Dye Treatment by Soil Bacteria

**นิรมล ศากยวงศ์* และดุษยา จันทร์เสาร์**

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

**Niramol Sakkayawong* and Dutsaya Jansao**

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

## บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เป็นการทดสอบการบำบัดสีรีแอคทีฟโดยแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus hornekiae*, *Bacillus* sp. VT_GPA4/2008, *Paenibacillus* sp Dg-904, *Paenibacillus* sp. B1 และ *Stenotrophomonas* sp. F26(2011) ซึ่งคัดแยกได้จากดินที่ประเทศญี่ปุ่น พบว่า *Paenibacillus* sp. B1 มีประสิทธิภาพการบำบัดสีรีแอคทีฟได้ดีที่สุด จากนั้นนำ *Paenibacillus* sp. B1 มาศึกษาความสามารถในการบำบัดสี RR141 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมกรัมต่อลิตร ในอาหารสูตร nutrient broth (NB) ดัดแปลง ตั้งทิ้งไว้ในสภาวะนิ่งที่ขาดออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเวลาการบำบัดผ่านไป 8 ชั่วโมง *Paenibacillus* sp. B1 มีประสิทธิภาพในบำบัดสีได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของสีรีแอคทีฟ RR141 ที่แบคทีเรียชนิดนี้สามารถบำบัดได้ต้องมีความเข้มข้นไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และระยะเวลา 24 ชั่วโมงเป็นระยะเวลาในการเลี้ยงแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. B1 ที่เหมาะสมก่อนที่นำมาบำบัดสีรีแอคทีฟ RR141 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบำบัดนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ATR-FTIR

**คำสำคัญ :** *Paenibacillus* sp., การย่อยสี, สีรีแอคทีฟ RR141, เทคนิค ATR-FTIR

**Abstract**

This research described the test of reactive dye treatment by 5 bacterial strains such as *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus hornekiae*, *Bacillus* sp. VT_GPA4/2008, *Paenibacillus* sp. Dg-904, *Paenibacillus* sp. B1 and *Stenotrophomonas* sp. F26(2011). These strains were screened from soil, which studied from Department of Environmental Microbiology, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Japan. *Paenibacillus* sp. B1 has a maximum decolorization capacity. After that, this strain was studied decolorization

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** bunyason@hotmail.com

of 50 mg/L of reactive red (RR141) dye in modified nutrient broth. The decolorization capacity was static anoxic condition at temperature of 30 ºC, for 24 hours. The capacity of decolorization (%) was 100 % at 8 hours of treatment time. The optimum concentration of reactive dye was not higher than 50 mg/L while optimum cultivation time was 24 hours. The product of dye degradation was analyzed by ATR-FTIR technique.

**Key words:** *Paenibacillus* sp., dye degradation, reactive dye RR141, ATR-FTIR technique

## 1. บทนำ

ในปัจจุบันปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะมลพิษทางน้ำที่เกิดจากการเจริญเติบโตทางอุตสาหกรรมนั้นทวีความรุนแรงมากขึ้นโดยเฉพาะอุตสาหกรรมสิ่งทอซึ่งเป็นอุตสาหกรรมที่มีการขยายตัวสูง ทำให้มีการพัฒนาทั้งทางด้านกระบวนการผลิตและการแข่งขันสูงขึ้นเพื่อเพิ่มปริมาณสินค้าหรือผลิตภัณฑ์ให้มากขึ้น กระบวนการฟอกย้อมเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญขั้นตอนหนึ่งของอุตสาหกรรมนี้ เนื่องจากกระบวนการดังกล่าวมีการใช้น้ำปริมาณมาก ซึ่งไม่เพียงแต่ส่งผลให้เกิดน้ำเสียในปริมาณมาก แต่น้ำเสียดังกล่าวยังมีการปนเปื้อนสารเคมีและสีย้อม ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมหากไม่มีการบำบัดน้ำเสียในเบื้องต้นก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ สีย้อมที่ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกย้อมมีหลายประเภท ได้แก่ สีรีแอคทีฟ (reactive dye) สีไดเร็กซ์ (direct dye) และสีซัลเฟอร์ (sulfur dye) เป็นต้น สีรีแอคทีฟ (reactive dye) เป็นสีสังเคราะห์ที่ให้สีที่สดใสและติดทนดี จึงนิยมใช้ในกระบวนการฟอกย้อม

จากรายงานของ Easton (1995) [1] พบว่าสีรีแอคทีฟที่เหลือจากการใช้งานในกระบวนการฟอกย้อมจะถูกปล่อยออกมากับน้ำทิ้งสูงถึงร้อยละ 50 เนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิลของเส้นใย มีลักษณะคล้ายกับหมู่ที่มีอยู่ในน้ำ ดังนั้นสีจึงเข้าไปทำปฏิกิริยากับน้ำได้ซึ่งสีที่เข้าไปทำปฏิกิริยากับน้ำแล้วจะไม่สามารถทำปฏิกิริยากับเส้นใย และถูกปล่อยลงในน้ำย้อม น้ำทิ้งที่ปนเปื้อนด้วยสีเหล่านี้ นอกจากจะทำให้ทัศนียภาพของแหล่งน้ำดูไม่สวยงามแล้ว ยังบดบังแสงอาทิตย์ที่ส่องผ่านผิวน้ำ ทำให้อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชน้ำลดลงเป็นเหตุให้ออกซิเจนในน้ำลดลงซึ่งส่งผลให้น้ำเน่าเสียและสิ่งมีชีวิตในน้ำตายในที่สุด [2] จึงจำเป็นต้องบำบัดน้ำเสียฟอกย้อมก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ แต่เนื่องจากสีรีแอคทีฟเป็นสีที่สามารถละลายน้ำได้ดีจึงยากต่อการบำบัดด้วยวิธีตกตะกอนโดยใช้สารเคมี

ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานสิ่งทอด้วยวิธีทางชีววิทยา สามารถทำได้เนื่องจากมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถย่อยสลายสีได้ [3] แต่ในการย่อยสลายต้องเลือกสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมด้วย เนื่องจากสีมีโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อน [4] จุลินทรีย์แบบใช้อากาศ (aerobic microorganism) สามารถย่อยสลายสีได้แต่ค่อนข้างยากและผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความเป็นพิษมากขึ้น [5-7] ส่วนการย่อยสลายโดยใช้จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobic microorganism) พบว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดสีได้ดี [8-10] แต่หลังจากกระบวนการบำบัดจะก่อให้เกิดสารพิษที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้ จากการย่อยของหมู่เอโซที่เป็นองค์ประกอบของสี [11-12]

จากการวิจัยนี้เป็นการศึกษาการนำแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ที่แยกจากดินที่ประเทศญี่ปุ่น มาคัดเลือก

แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำสีรีแอคทีฟ RR141 ในสภาวะนิ่งให้ได้ประสิทธิภาพมากที่สุด จากนั้นนำแบคทีเรียมาศึกษาเปรียบเทียบระยะเวลาการบำบัดน้ำสีรีแอคทีฟ RR141 ระยะเวลาการเลี้ยงแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพการบำบัดสี RR141 ความเข้มสีรีแอคทีฟ RR141 ที่เหมาะสม รวมทั้งศึกษาผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากการบำบัดสีของแบคทีเรียว่าหมู่ฟังก์ชั่นของสีมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร

## 2. อุปกรณ์และวิธีการ

### 2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ใช้ในการบำบัดสีรีแอคทีฟ RR141

นำแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากดินในประเทศญี่ปุ่น 3 แหล่ง ได้แก่ (1) ดินบริเวณไร่ชาเขียวในเมืองมากิโนฮาระ (Makinohara) (2) ดินบริเวณอพาร์ทเม้นท์ในเมืองโอชิกะซึคัสยะ (Oshika Shukusya) และ (3) ดินบริเวณใกล้ที่ทิ้งขยะของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยชิซูโอกะ ในการคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์นี้ใช้วิธีการจำแนกตามลำดับเบส *16S rRNA* ซึ่งเป็นการศึกษาโดยความร่วมมือกับภาควิชาจุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยชิซูโอกะ ประเทศญี่ปุ่น สามารถแยกแบคทีเรียได้ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus hornekiae*, *Bacillus* sp. VT_GPA4/2008, *Paenibacillus* sp. Dg-904, *Paenibacillus* sp. B1 และ *Stenotrophomonas* sp. F26(2011) จากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ มาเลี้ยง โดยเขี่ยเชื้อ 1 loop จากหลอดเก็บเชื้อลงในหลอดฝาเกลียวขนาด 16x150 มิลลิเมตร ที่มีอาหารสูตร nutrient broth (NB) ดัดแปลง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ประกอบด้วย NaCl 1 กรัม peptone (Himedia, India) 0.1 กรัม yeast extract (Difco, USA) 0.4 กรัม Beef extract (Himedia, India) 0.2 กรัม และสีรีแอคทีฟ RR141 (Procion Red HE7B) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยความสูงของอาหารสูตร NB ดัดแปลงเท่ากับ 7 เซนติเมตร เลี้ยงโดยตั้งทิ้งไว้ที่สภาวะนิ่งในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของสีรีแอคทีฟ RR141 เมื่อแบคทีเรียสายพันธุ์ใดสามารถเปลี่ยนแปลงอาหาร NB ดัดแปลงที่มีสีรีแอคทีฟ RR141 จากสีแดงเป็นสีเหลืองหรือสีแดงหายไปจะคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์นั้นมาศึกษาต่อไป

### 2.2 การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพระยะเวลาการบำบัดน้ำสีรีแอคทีฟ RR141 ในการบำบัดด้วยแบคทีเรีย

นำแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ที่เลือกได้จากการศึกษาที่ 2.1 หลังจากการเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมง มาศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพระยะเวลาในการบำบัดสีรีแอคทีฟ RR141 โดยการปิเปตต์แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์จากหลอดเก็บเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงโดยตั้งทิ้งไว้ที่สภาวะนิ่งในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของปริมาณแบคทีเรียในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6 จากนั้นทำการเจือจางปริมาณแบคทีเรียด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ให้ได้ค่า McFarland no. เท่ากับ 1 และมีค่าความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ $3x10^8$ CFU/mL จากนั้นปิเปตต์อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียที่มีค่าความหนาแน่นเซลล์ดังกล่าว 1 มิลลิลิตรใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสูตร NB ดัดแปลงทีมีสารละลายสี RR141 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร

50 มิลลิลิตร (ความสูงของอาหารเท่ากับ 2.2 เซนติเมตร) เก็บตัวอย่างปริมาณ 1 มิลลิลิตรทุก 1 ชั่วโมง จนกระทั่งมีการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีแดงเป็นสีเหลือง ใส่ตัวอย่างลงในหลอดขนาดเล็ก แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอน ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใส (supernatant) มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer (Model U1900, Hitachi, Tokyo) ที่ความยาวคลื่น 544 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มสีที่เหลืออยู่หลังการบำบัดโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การบำบัดสีของแต่ละตัวอย่างตามสมการที่ 1

$$\text{ค่าเปอร์เซ็นต์การบำบัดสี} = \frac{(C_i - C_f)\times 100}{C_i}$$

เมื่อ $C_i$ = ความเข้มข้นสีรีแอคทีฟก่อนการบำบัด

$C_f$ = ความเข้มข้นสีรีแอคทีฟหลังการบำบัด

แบคทีเรียสายพันธุ์ใดที่มีระยะเวลาการบำบัดสีรีแอคทีฟ RR141 สั้นที่สุดจะเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์นั้นมาศึกษาต่อไป

**2.3 การศึกษาระยะเวลาการเลี้ยงแบคทีเรียที่เหมาะสมก่อนนำมาบำบัดสีรีแอคทีฟ RR141**

นำสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดสีที่ได้จากการศึกษาที่ 2.2 มา 1 loop จากหลอดเก็บเชื้อใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 เป็นการเลี้ยงแบคทีเรียที่ระยะเวลา 8 ชั่วโมง (ระยะเวลา log phase ของแบคทีเรีย) และชุดที่ 2 เป็นการเลี้ยงแบคทีเรียที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ระยะเวลา stationary phase ของแบคทีเรีย) เมื่อครบเวลาการเลี้ยงที่กำหนดนำแบคทีเรียที่ได้มาเจือจางปริมาณแบคทีเรียด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ให้ได้ค่า McFarland no. เท่ากับ 1 และมีค่าความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ $3\times10^8$ CFU/mL และนำแบคทีเรียที่ได้จากการทดลองแต่ละชุดมาปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารสูตร NB ดัดแปลง 50 มิลลิลิตร ที่มีสี RR141 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงโดยตั้งทิ้งไว้ที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างปริมาณ 1 มิลลิลิตรทุก 1 ชั่วโมง ใส่ลงในหลอดขนาดเล็ก หมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอน ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 544 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer (Model U1900, Hitachi, Tokyo) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มสีที่เหลืออยู่หลังการบำบัด โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การบำบัดสีของแต่ละตัวอย่างตามสมการที่ 1

**2.4 การศึกษาความเข้มที่เหมาะสมของสีรีแอคทีฟ RR141 ในการบำบัดด้วยแบคทีเรีย**

เตรียมอาหาร NB ดัดแปลง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายสีรีแอคทีฟ RR141 ความเข้มข้น 25, 50, 75, 100, 125 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร นำสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดสีที่ได้จากการศึกษาที่ 2.2 ที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารสูตร NB ดัดแปลงในสภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (ระยะเวลา log phase ของแบคทีเรีย) มาเจือจางปริมาณแบคทีเรียด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ให้ได้ค่า McFarland no. เท่ากับ 1 และมีค่าความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ $3\times10^8$ CFU/mL มาปริมาณ 1 มิลลิลิตรใส่ในอาหารที่มีสี RR141 ที่เตรียมไว้แต่ละความเข้มข้น เลี้ยงโดยตั้งทิ้งไว้ที่ตู้บ่ม

เชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่าง ปริมาณ 1 มิลลิลิตรทุก 1 ชั่วโมง ใส่ลงในหลอดขนาดเล็กหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอน ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 544 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer (Model U1900, Hitachi, Tokyo) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มสีที่เหลืออยู่หลังการบำบัดโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานและหาเปอร์เซ็นต์การบำบัดสีของแต่ละตัวอย่างตามสมการที่ 1

**2.5 การศึกษาผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากการบำบัดสีของแบคทีเรีย**

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบำบัดสี RR141 และน้ำเสียสีจากโรงงานฟอกย้อมที่ได้จากการย่อยด้วยแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดขนาดเล็ก หมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอน ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสใส่ในขวดเก็บตัวอย่าง (vial) นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectrometer (Bruker Optics, Germany) รุ่น TENSOR 27 ใช้หัววัด (detector) แบบ single reflection (Germanium crystal) รุ่น Pike MIRacle (Bruker Optics, Germany) ณ สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) จังหวัดนครราชสีมา นำข้อมูลสเปกตรัมที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม IR Mentor (Bio-Rad Laboratories, USA) และ Win-IR Easy (Bio-Rad Laboratories, USA) เพื่อวิเคราะห์เบื้องต้นว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นหมู่ฟังก์ชั่นประเภทใด

## 3. ผลการทดลองและอภิปราย

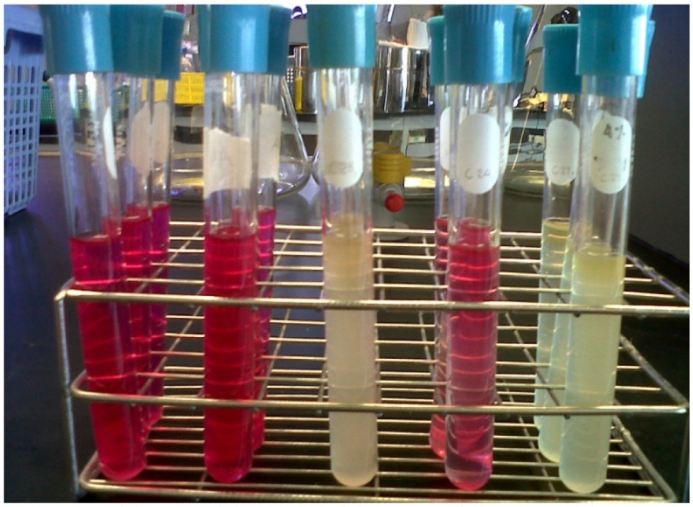
**3.1 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่ใช้ในการบำบัดสีรีแอคทีฟ RR141**

จากการนำแบคทีเรีย 5 ชนิด คือ *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus hornekiae*, *Bacillus* sp. VT_GPA4/2008, *Paenibacillus* sp. Dg-904 และ *Paenibacillus* sp. B1 นำมาเลี้ยงลงในอาหารสูตร NB ดัดแปลงที่มีสีรีแอคทีฟ RR141 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยตั้งทิ้งไว้ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า *Paenibacillus*sp. B1 มีการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารสูตร NB ดัดแปลงที่มีสีแดงของสีรีแอคทีฟ RR141 มากที่สุด รองลงมา คือ *Bacillus* sp. VT_GPA4/2008 แสดงดังรูปที่ 1 โดยลักษณะการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์จะมีการเจริญทั้งส่วนผิวหน้า (surface growth) ของอาหารมีลักษณะเป็นแบบ ring และมีการเกิดตะกอนที่ก้นหลอด (sedimentation) เป็นแบบ flaky ดังนั้นคาดการณ์ว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถย่อยสีได้ภายใต้สภาวะ facultative anaerobic condition นอกจากนี้เมื่อทำการวัดค่าการเปลี่ยนแปลง pH ของผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังการย่อยสีด้วยแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) โดยอาหาร NB ดัดแปลงก่อนใช้แบคทีเรียบำบัดมีค่า pH เท่ากับ 7.965±0.005 และพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบำบัดด้วย *Paenibacillus* sp. B1 และ *Bacillus* sp. VT_GPA4/2008 มีค่า pH สูงขึ้นเป็น 7.761±0.001 และ 7.882±0.002 ตามลำดับ เนื่องจากแบคทีเรียที่ย่อยสลายสีในสภาวะแบบไม่ใช้ออกซิเจนจะมีการสะสมกรดทำให้ค่า pH ของผลิตภัณฑ์มีค่า pH สูงขึ้น [13]

**3.2 ผลการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำสีรีแอคทีฟ RR141 ระหว่าง *Bacillus* sp. VT_GPA4/2008 กับ *Paenibacillus* sp. B1**

ผลการคัดเลือกแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ จากการศึกษาที่ 2.1 ที่สามารถบำบัดน้ำสีรีแอคทีฟ RR141

ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ คือ *Bacillus* sp. VT_GPA4/2008 กับ *Paenibacillus* sp. B1 มาเลี้ยงต่อในอาหารสูตร NB ดัดแปลงที่มีสีรีแอคทีฟ RR141 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยศึกษาเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการบำบัด ทำการเก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมง พบว่าเมื่อระยะเวลาการบำบัดผ่านไป 8 ชั่วโมง *Paenibacillus* sp. B1 สามารถเปลี่ยนแปลงสีของอาหารสูตร NB ดัดแปลงที่มีสีแดงของสีรีแอคทีฟ RR141 เป็นสีเหลืองขุ่น และเมื่อคำนวณประสิทธิภาพในการบำบัดสีเทียบกับความเข้มสีเริ่มต้น พบว่าสามารถบำบัดสีได้ 100±0.00 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *Bacillus* sp. VT_GPA4/2008 สามารถบำบัดสีได้ 79.568±0.006 เปอร์เซ็นต์ดังแสดงในตารางที่ 2



(ก) (ข) (ค) (ง) (จ)

**รูปที่ 1** การเปลี่ยนแปลงของสีอาหาร NB ดัดแปลงที่มีสีรีแอคทีฟ RR141 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อบำบัดด้วยแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ *Stenotrophomonas maltophilia* (ก) *Bacillus hornekiae* (ข) *Bacillus* sp. VT_GPA4/2008 (ค) *Paenibacillus* sp. Dg-904 (ง) และ *Paenibacillus* sp. B1 (จ)

**ตารางที่ 1** การเปรียบเทียบค่า pH ของอาหาร NB ดัดแปลงก่อนและผลิตภัณฑ์หลังการบำบัดด้วย *Bacillus* sp. VT_GPA4/2008 กับ *Paenibacillus* sp. B1

| ค่า pH ของอาหารดัดแปลงก่อนการบำบัด | ค่า pH ของผลิตภัณฑ์หลังการบำบัด | |
|---|---|---|
| | *Bacillus* sp. VT_GPA4/2008 | *Paenibacillus* sp. B1 |
| 7.965±0.005 | 7.882±0.002 | 7.761±0.001 |

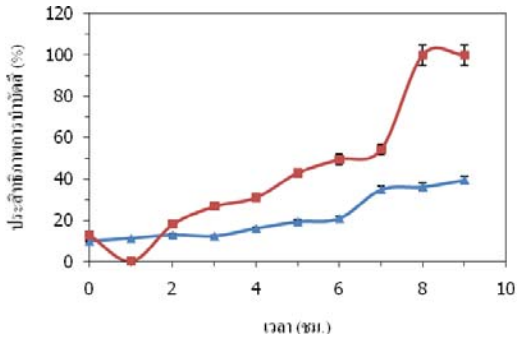
หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, N=3

**ตารางที่ 2** การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดสี RR141 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ของ *Bacillus* sp. VT_GPA4/2008 กับ *Paenibacillus* sp. B1

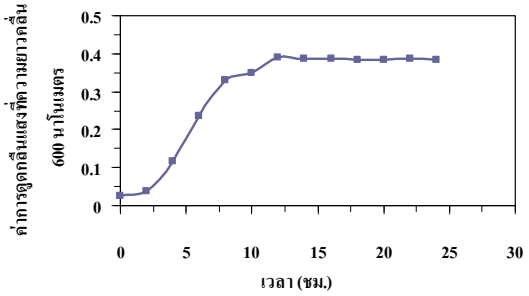
| เวลาในการบำบัด (ชั่วโมง) | ประสิทธิภาพการบำบัดสี RR141 (เปอร์เซ็นต์) | |
|---|---|---|
| | *Bacillus* sp. VT_GPA4/2008 | *Paenibacillus* sp. B1 |
| 0 | 16.486±0.004 | 12.703±0.003 |
| 1 | 21.351±0.016 | 0.270±0.003 |
| 2 | 8.929±0.006 | 18.108±0.004 |
| 3 | 6.757±0.003 | 26.757±0.002 |
| 4 | 25.135±0.100 | 31.081±0.001 |
| 5 | 32.162±0.160 | 42.973±0.009 |
| 6 | 42.973±0.065 | 49.459±0.0004 |
| 7 | 33.784±0.109 | 54.324±0.001 |
| 8 | 79.730±0.021 | 100±0.00 |
| 9 | 79.568±0.006 | 100±0.00 |

**3.3 ผลการศึกษาเปรียบเทียบระยะเวลาการเลี้ยง *Paenibacillus* sp. B1 ต่อประสิทธิภาพการบำบัดสีรีแอคทีฟ RR141**

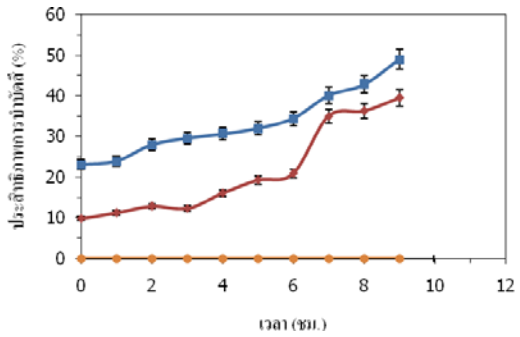
นำแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. B1 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหาร NB เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (ระยะเวลา log phase ของแบคทีเรีย) และ 24 ชั่วโมง (ระยะเวลา stationary phase ของแบคทีเรีย) จากนั้นเก็บตัวอย่างมาตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสูตร NB ดัดแปลงที่มีสี RR141 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 9 ชั่วโมง พบว่า *Paenibacillus* sp. B1 ที่เลี้ยงไว้ 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการบำบัดสี RR141 ในระยะเวลาการบำบัด 9 ชั่วโมง เท่ากับ 100.00±0.50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *Paenibacillus* sp. B1 ที่เลี้ยงไว้ 8 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการบำบัดสี RR141 ในระยะเวลาการบำบัด 9 ชั่วโมง เท่ากับ 39.59±0.20 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 2) เนื่องจากที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่ 24 ชั่วโมงเป็นช่วงระยะ stationary phase ของแบคทีเรีย (รูปที่ 3) ซึ่งเป็นระยะที่แบคทีเรียมีปริมาณมากที่สุดทำให้มีประสิทธิภาพในการบำบัดสีได้มากกว่าที่ระยะเวลา 8 ชั่วโมง ที่อยู่ในระยะ log phase




รูปที่ 2 ประสิทธิภาพการบำบัดสีรีแอคทีฟ RR141 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรของ *Paenibacillus* sp. B1 ที่เลี้ยงไว้ที่ 24 ชั่วโมง (■) และ 8 ชั่วโมง (▲)




รูปที่ 3 การเจริญของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. B1




รูปที่ 4 ประสิทธิภาพการบำบัดสี RR 141 ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร (■) ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (♦) และที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 75-150 มิลลิกรัมต่อลิตร (●) ของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. B1 ที่เลี้ยงไว้ที่ 8 ชั่วโมง

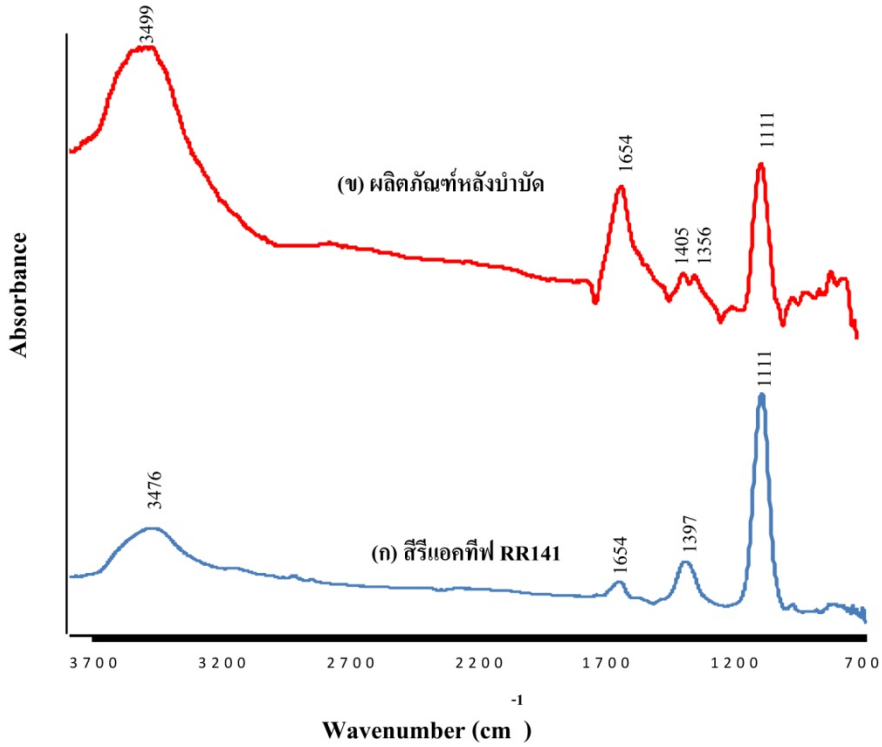
**3.4 ผลการศึกษาความเข้มสี RR141 ที่เหมาะสมในการบำบัดด้วย *Paenibacillus* sp. B1**

ผลการศึกษาหลังจากที่เลี้ยง *Paenibacillus* sp. B1 เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ตามช่วงการเจริญเติบโตในช่วง log phase จากนั้นนำแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. B1 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ไปเลี้ยงในอาหารสูตร NB ดัดแปลงที่มีสีรีแอคทีฟ RR141 ความเข้มข้น 25, 50, 75, 100, 125 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4) พบว่า *Paenibacillus* sp. B1 มีประสิทธิภาพการบำบัดสี RR 141 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีประสิทธิภาพการบำบัดเท่ากับ 49.05±0.45 และ 39.59 ±0.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นตั้งแต่ 75-100 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้น แบคทีเรียไม่สามารถบำบัดสีได้ เนื่องจากความเข้มสีมากจะเกิดความเป็นพิษต่อแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียตายและหมดประสิทธิภาพในการบำบัดสี [3] ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. B1 สามารถบำบัดสี RR141 ได้ต้องมีความเข้มข้นไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

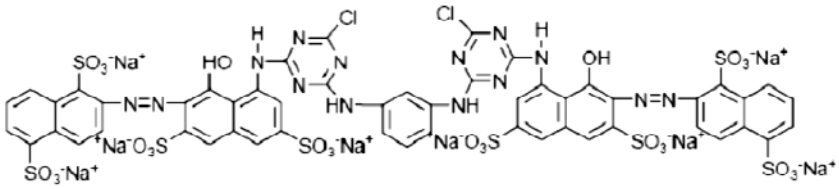
**3.5 ผลการศึกษาผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากการบำบัดสี ของ *Paenibacillus* sp. B1**

การวิเคราะห์ ATR-FTIR สเปคตราของการย่อยสลายผลิตภัณฑ์น้ำสีรีแอคทีฟ RR141 ที่ได้จากการบำบัดของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. B1 (รูปที่ 5) เมื่อทำการวิเคราะห์สเปคตราของน้ำสีรีแอคทีฟ RR141 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เป็นความเข้มข้นเริ่มต้น (รูปที่ 5ก) พบว่ามีพีคที่ระบุว่าเป็นสีรีแอคทีฟ RR141 ดังต่อไปนี้ตำแหน่ง 3476 $cm^{-1}$ (หมู่ amine : -NH) ตำแหน่ง 1654 $cm^{-1}$ (หมู่ alkane : C=C) ตำแหน่ง 1397 $cm^{-1}$ (หมู่ azo : -N=N-) และตำแหน่ง 1111 $cm^{-1}$ (หมู่ aromatic : CH bonding) ซึ่งหมู่เหล่านี้แสดงถึงหมู่ฟังก์ชั่นของโครงสร้างทางเคมีของสีรีแอคทีฟ RR141 (รูปที่ 6) และเมื่อทำการวิเคราะห์สเปคตราของผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อบำบัดด้วยแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. B1 (รูปที่ 5ข) พบว่ามีพีคที่ตำแหน่ง 3499 $cm^{-1}$ (หมู่ amine : -NH) ตำแหน่ง 1654 $cm^{-1}$ (หมู่ alkane : C=C) ตำแหน่ง 1405 $cm^{-1}$ (หมู่ hydroxyl : OH) ตำแหน่ง 1356 $cm^{-1}$ (หมู่ $NO_2$) และตำแหน่ง 1111 $cm^{-1}$ (หมู่ aromatic : CH bonding) การเปลี่ยนแปลงของตำแหน่งพีคจาก 3476 ไปเป็น

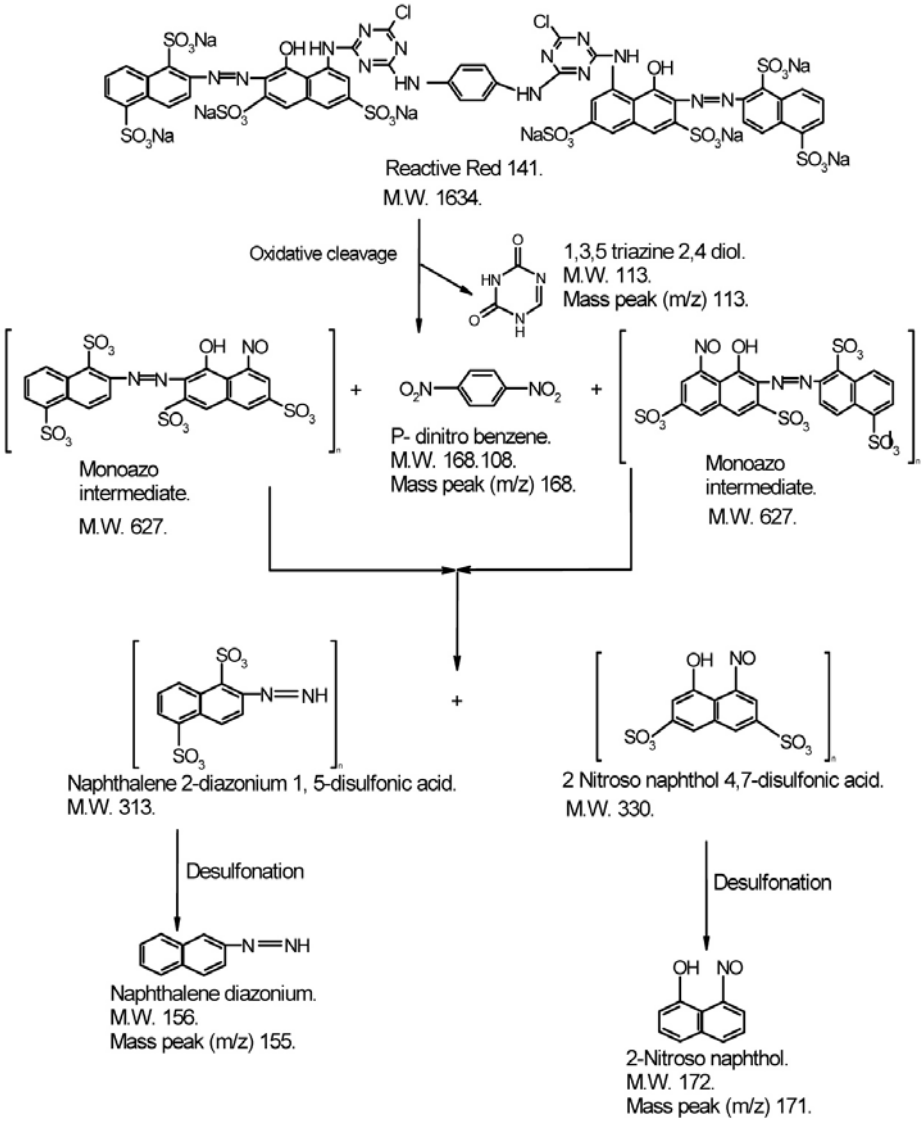
3499 $cm^{-1}$ อาจสามารถระบุได้ว่ามีการย่อยตรงบริเวณหมู่ amine ทำให้ตำแหน่งดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสารพวก naphthalene diazonium (รูปที่ 7) นอกจากนี้พีคของหมู่ azo (N=N) ที่ตำแหน่ง 1397 $cm^{-1}$ มีการแยกออกเป็น 2 พีคย่อย คือ ที่ตำแหน่ง 1405 $cm^{-1}$ (หมู่ hydroxyl : OH) และตำแหน่ง 1356 $cm^{-1}$ (หมู่ $NO_2$) จากผลการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจเกิดสาร naphthol และ dinitro benzene ตามลำดับ




**รูปที่ 5** ATR-FTIR สเปคตราของสารละลายสี RR141 เริ่มต้นความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) ผลิตภัณฑ์หลังจากการบำบัดสีรีแอคทีฟ RR141 (ข) ได้รับการบำบัดโดย *Paenibacillus* sp. B1



**รูปที่ 6** โครงสร้างทางเคมีของสีรีแอคทีฟ RR141 [14]




**รูปที่ 7** ข้อเสนอกลไกการย่อยสลายโมเลกุลของสี reactive red 141 โดย *Rhizobium radiobacter* MTCC 8161 [9]

## 4. สรุป

จากการศึกษาการบำบัดน้ำสี RR141 และน้ำเสียสีจากโรงงานฟอกย้อม โดยใช้แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ได้คัดแยกจากดินของประเทศญี่ปุ่น จากภาควิชาจุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยชิซูโอกะ ซึ่ง ได้แก่ *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus hornekiae*, *Bacillus* sp. VT_GPA4/2008, *Paenibacillus* sp. Dg-904, *Paenibacillus* sp. B1 และ *Stenotrophomonas* sp. F26 พบว่าแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. B1 มีการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารสูตร NB ดัดแปลงที่มีสีแดงของสีรีแอคทีฟ RR141 มากที่สุด แบคทีเรียที่มีการเปลี่ยนแปลงสีรองลงมา คือ *Bacillus* sp. VT_GPA4/2008 และเมื่อเวลาการบำบัดผ่านไป 9 ชั่วโมง *Paenibacillus* sp. B1 ที่มีระยะเวลาการเลี้ยง 24

ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในบำบัดสีได้ 100.00±0.00 เปอร์เซ็นต์ ในขณะ *Paenibacillus* sp. B1 ที่เลี้ยงไว้ 8 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการบำบัดสี RR141 เท่ากับ 39.59±0.20 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นระยะเวลาการเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมงเป็นระยะเวลาในการเลี้ยงแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. B1 ที่เหมาะสมก่อนที่นำมาบำบัด และความเข้มข้นที่เหมาะสมที่แบคทีเรียชนิดนี้สามารถบำบัดได้ต้องมีความเข้มข้นไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

## 5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปี 2550 ตามสัญญาฉบับที่ ปอ 1/2550 ขอขอบคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยชิซูโอกะ ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้ความอนุเคราะห์สายพันธุ์แบคทีเรีย และขอบคุณสถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์กรมหาชน) จังหวัดนครราชสีมา ที่ให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่อง Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectrometer

## 6. เอกสารอ้างอิง

[1] Easton, J.R., 1995, The dye marker's view, pp. 9-21, In Cooper, P., Colour in Dyehouse Effluent, Society of Dyers and Colorists, The Dyers Company Publications Trust, United Kingdom.

[2] Sanghi, R. and Bhattacharya, B., 2002, Review on decolorisation of aqueous dye solutions by low cost adsorbents, Color. Technol. 118: 256-269.

[3] Dawkar, V.V., Jadhav, U.U., Jadhav, M.U., Kagalkar, A.N. and Govindwar, S.P., 2010, Decolorization and detoxification of sulphonated azo dye red HE7B by *Bacillus* sp. VUS, World. J. Microbiol. Biotechnol. 26: 909-916.

[4] Mahony, T.O., Guibal, E. and Tobin, J.M., 2002, Reactive dye biosorption by *Rhizopus arrhizus* biomass, Enzyme. Microb. Tech. 31: 456-463.

[5] Nigam, P., Banat, I.M., Singh, D. and Merchant, R., 1996, Microbial process for the decolourization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes, Process. Biochem. 31: 435-442.

[6] Pagga, U. and Brown, D., 1986, The degradation of dye-stuffs: Part II behavior of dyestuffs in aerobic biodegradation tests, Chemosphere 15: 479-491.

[7] Radha, K.V., Regupathi, I., Arunagiri, A. and Murugesan, T., 2005, Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics, Process Biochem. 40: 3337-3345.

[8] Brown, D. and Laboureur, P., 1983, The degradation of dyestuffs, Part I: Primary biodegradation under anaerobic conditions, Chemoshere 12: 397-404.

[9] Harmer, C. and Bishop, P., 1992, Transformation of azo dye A0-7 by wastewater biofilms, Water. Sci. Technol. 26: 627-636.

[10] 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.

[11] Panswad, T. and Luangdilok, W., 2000, Decolorization of reactive dyes with different molecular structures under different environmental conditions, Water Res. 34: 4177-4184.

[12] Wong, Y. and Yu, J., 1999, Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes, Water Res. 33: 3512-3520.

[13] สุนันทา เลาวัณย์ศิริ, 2553, การกำจัดสีและความเป็นพิษของสีย้อมรีแอคทีฟในน้ำเสียโดยใช้ระบบบำบัดต่อเนื่องแบบไม่ใช้อากาศและใช้อากาศ, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 29: 274-281.

[14] Dolphen, R., Sakkayawong, N., Thiravetyan, P. and Nakbanpote, W., 2007, Adsorption of reactive red 141 from wastewater onto modified chitin, J. Hazard. Mater. 145: 250-255.