

การดูดซับสีย้อมแอซิด เบเนวอล เรด โดยใช้สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก  
*Scenedesmus dimorphus* ที่มีชีวิตแบบตรึงเซลล์

Biosorption of Benewol Red Acid Dye by Immobilized Living Cell of Green Microalga

*Scenedesmus dimorphus*

สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์<sup>1</sup>

บทคัดย่อ

การดูดซับสีย้อมแอซิด ชนิดเบเนวอลเรด โดยใช้สาหร่าย *Scenedesmus dimorphus* ที่มีชีวิตแบบตรึงเซลล์ โดยหาค่าสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมและจลนพลศาสตร์การดูดซับสีย้อมในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าสาหร่ายสามารถดูดซับสีย้อมเบเนวอล เรด ได้สูงที่สุด เมื่อสารละลายสีย้อมมีพีเอช 3 โดยดูดซับได้  $11.11 \pm 1.12$  มิลลิกรัมต่อกกรัมซึ่งสูงกว่าและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารละลายพีเอช 4-8 ระยะเวลาเข้าสู่จุดสมดุลในการดูดซับคือ 180 นาที โดยดูดซับสีย้อมเบเนวอล เรด ได้  $4.25 \pm 0.09$  มิลลิกรัมต่อกกรัม ปริมาณการดูดซับสีย้อมต่อกกรัมของสาหร่าย ( $q_{eq}$ ) จะมากขึ้นเมื่อจำนวนสาหร่ายลดลง โดยการดูดซับสีย้อมเบเนวอล เรดของ *S. dimorphus* แบบตรึงเซลล์ เป็นไปตามสมการการดูดซับของ Langmuir adsorption isotherm โดยมีค่าการดูดซับสีย้อมสูงสุด ( $Q_{max}$ )  $31.92 \pm 0.34$  มิลลิกรัมต่อกกรัมอันดับของปฏิกิริยาในการดูดซับสีย้อมคืออันดับสองเสมือนซึ่งแสดงว่าสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิดนี้มีศักยภาพสูงในการบำบัดน้ำเสียที่มีสีย้อมแอซิดเข้มข้นสูง และมีขึ้นกำหนดอัตราเร็วในการดูดซับของการดูดซับสีย้อมเบเนวอลเรดบน *S. dimorphus* ที่ตรึงเซลล์คือการแพร่ผ่านชั้นฟิล์ม และการแพร่เข้าภายในเซลล์ชั้นเริ่มต้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *S. dimorphus* ที่ตรึงเซลล์ เป็นตัวดูดซับที่เหมาะสมในการบำบัดน้ำเสียที่มีสีย้อมเบเนวอล เรด บนเบื่อนอยู่ในระบบบำบัดน้ำเสีย

คำสำคัญ : การตรึงเซลล์ ชีวเคสมีส สาหร่ายขนาดเล็ก สีย้อม การบำบัดน้ำเสีย

Abstract

The benewol red acid dye sorption by immobilized living cell of *Scenedesmus dimorphus* was studied in laboratory. The optimum pH for benewol red sorption by immobilized *S. dimorphus* was 3, with significantly higher sorption ability ( $11.11 \pm 1.12$  mg/g) than pH 4-8. The equilibrium time for benewol red sorption by immobilized *S. dimorphus* was 180 min with sorption ability of  $4.25 \pm 0.09$  mg/g. The benewol red adsorption capacity ( $q_{eq}$ ) was increased when the biomass of *S. dimorphus* decreased. The adsorption of benewol red by immobilized *S. dimorphus* was fitted to Langmuir adsorption isotherm with the maximum uptake capacity ( $Q_{max}$ ) of  $31.92 \pm 0.34$  mg/g. The order of reaction of immobilized *S. dimorphus* was pseudo-second order, indicating that this green microalga has a high potential for treating wastewater at elevated acid dye concentration. The rate limiting step of benewol red adsorption reaction in immobilized *S. dimorphus* was film diffusion rate and initial rate of intraparticle diffusion. The results indicated that *S. dimorphus* is a potential biosorbent for water contaminated with benewol red in bioremoval systems

Keywords : Immobilized cell, *Scenedesmus*, Microalgae, Dye, Wastewater treatment

<sup>1</sup>หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

## คำนำ

สีย้อม (dyes) เป็นสีสังเคราะห์ที่มีการใช้ในอุตสาหกรรมปลายประเภทเช่นอุตสาหกรรมยางสิ่งทอพลาสติก กระดาษเครื่องสำอางฯลฯ น้ำทิ้งที่ปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรมเหล่านี้บ่อยครั้งพบว่ามีสารปนเปื้อนของสีย้อม เมื่อลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติจะส่งผลให้สิ่งมีชีวิตมีความต้องการใช้ออกซิเจนสูงขึ้นสีแขวนลอยในน้ำบั้งแสงที่ส่องลงน้ำ และสีย้อมยังมีส่วนประกอบที่มีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำสูง (Ozer *et al.*, 2006a) จึงจำเป็นต้องบำบัดน้ำเสียที่มีสีย้อมปนเปื้อน ก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำวิธีการกำจัดสีย้อมจากน้ำเสียมีหลายวิธีเช่น กายภาพเคมีและชีวภาพโดยกระบวนการทางกายภาพเคมี เช่น การใช้โอโซนการตกตะกอนการกรองด้วยเยื่อกรองซึ่งบ่อยครั้งที่พบว่ากระบวนการเหล่านี้ไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควรมีราคาสูงและขอบเขตการปรับใช้กับน้ำทิ้งมีช่วงแคบ (Vijayaraghavan and Yun, 2008)

สีแอดิซชนิดเบนเวลอล เรดมีความนิยมใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท สีชนิดนี้เป็นสารประกอบอินทรีย์ มีประจุลบละลายน้ำได้ดีส่วนใหญ่เป็นเกลือของกรดกำมะถันกลไกในการติดสีเกิดเป็นพันธะไอออนิกใช้ย้อมเส้นใยโปรตีนในน้ำย้อมที่มีสภาพเป็นกรดเจือจางสีแอดิซบางชนิดสามารถนำไปใช้ย้อมเส้นใยเซลลูโลสบริสุทธิ์ เช่น ปอปานในลอนขนแกะไหมและอะคลริกได้ดีวิธีการใช้จะนำสีย้อมที่เกิดจากสารประกอบอินทรีย์ไปละลายน้ำย้อมที่เป็นกรดหรือเป็นกลาง (Ozer *et al.*, 2006a, b)

การดูดซับทางชีวภาพจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญเนื่องจากตัวดูดซับส่วนใหญ่มีราคาถูก สะดวกในการใช้งานตัวดูดซับทางชีวภาพที่นิยมมีหลายชนิดทั้งแบคทีเรีย พืชบก พืชน้ำ สาหร่าย ถ่านแถ้าไม้แกลบฝ้าย ไคโตซานซึ่งได้มีการศึกษาพบว่าตัวดูดซับหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพดีในการดูดซับสีย้อม (Srinivasan and Viraraghavan, 2010) สำหรับสาหร่ายนั้นพบว่ามีความสมบัติในการดูดซับสีย้อมได้รวดเร็ว ดูดซับได้ทั้งที่ผิวเซลล์และนำเข้าไปภายในเซลล์ (Bajguz, 2000) นอกจากนี้ยังใช้ได้ทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ไม่มีชีวิต (Marungrueng and Pavasant, 2007) โดยสาหร่ายสามารถทำงานได้แม้ในสภาวะแวดล้อมที่ผันแปรในช่วงกว้าง เช่นมีการผันแปรของอุณหภูมิ พีเอช หรือการมีไอออนอื่นๆ ปนอยู่ (Ahuja *et al.*, 1997)

สาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) มีการกระจายอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไปมีความสามารถในการลดสีย้อมได้ดี (El-Sheekh *et al.*, 2009; Ergene *et al.*, 2009; Khataee *et al.*, 2011) มีศักยภาพในการใช้เป็นตัวดูดซับทางชีวภาพที่มีราคาถูกความสามารถในการดูดซับสีย้อมของสาหร่ายส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับหมู่ฟังก์ชันที่ผิวเซลล์ของสาหร่ายโดยผิวเซลล์ของสาหร่ายที่มีกลุ่มประจุบวกจะจับกับสีย้อมแอดิซที่มีโครงสร้างเป็นประจุลบ เช่น หมู้อัลเฟต หรือ ซัลโฟเนต ได้อย่างเสถียร (Marungrueng and Pavasant, 2007) ได้มีการใช้สาหร่ายหลายชนิดในการดูดซับสีย้อมเช่น *Chlorella vulgaris*, *Lyngbyalagerleri*, *Nostoclincki*, *Oscillatoriarubescens*, *Elakatothrixviridis* และ *Volvox aureus* ซึ่งพบว่ามีความสามารถในการดูดซับสีย้อมได้ดี (El-sheekh *et al.*, 2009) สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Scenedesmus dimorphus* เป็นสาหร่ายที่มีความสามารถในการเป็นตัวดูดซับที่ดี (สุนิรัตน์, 2547, Ruangsomboon *et al.*, 2012) แต่พบว่าหลังการดูดซับแล้ว จะกำจัดสาหร่ายออกจากน้ำเสียได้ยากเนื่องจากมีขนาดเล็ก วิธีการแก้ไขคือต้องทำการตรึงเซลล์สาหร่ายไว้บนตัวยึดเกาะที่มีขนาดใหญ่พอสมควร จึงจะสามารถนำไปกำจัดทิ้งได้ง่ายหลังจากการดูดซับสีย้อมโดยมีรายงานว่าสาหร่าย *Scenedesmus quadricauda* ที่ตรึงกับอัลจิเนตสามารถดูดซับสีย้อม reactive ได้ดี (Ergene *et al.*, 2009)

โดยการที่สาหร่ายจะแสดงประสิทธิภาพสูงสุดในการดูดซับสีย้อมนั้น จำเป็นต้องอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของสาหร่ายมากที่สุดโดยปัจจัยที่ส่งผลต่อการทำงานของตัวดูดซับที่สำคัญที่สุดคือ ระยะเวลาในการดูดซับ รองลงมาคือ ความเข้มข้นของตัวถูกดูดซับหรือสีย้อม พีเอชของสารละลาย ปริมาณสาหร่ายหรือตัวดูดซับ และอุณหภูมิ ตามลำดับ (Khataee *et al.*, 2011) ดังนั้นการศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม และศึกษาจลนพลศาสตร์ของสาหร่ายต่อการดูดซับสีย้อม จะสามารถให้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการกำจัดสีย้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การเตรียมสาหร่าย

เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus dimorphus* ด้วยสูตรอาหาร chlorella medium (Vonshak and Maske, 1982) ในห้องปฏิบัติการ ได้รับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 12 ชั่วโมง มีการให้อากาศเพื่อให้สาหร่ายหมุนเวียน เมื่อสาหร่ายเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ late exponential phase (14 วัน) ทำการเก็บเซลล์สาหร่ายด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็วสูง ล้างด้วยน้ำกลั่น และนำเซลล์สาหร่ายตรึงในเม็ดอัลจิเนต (alginate beads) รูปร่างเป็นทรงกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.0 มิลลิเมตร โดยละลายโซเดียมอัลจิเนตในน้ำ milli-q water จากนั้นผสมสาหร่ายลงไป คนให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นใช้หลอดดูดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.0 มิลลิเมตร ดูดส่วนผสมดังกล่าวไปหยดในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ที่ไว้ 30 นาที นำมาล้างด้วยน้ำ milli-q water จนสะอาด และนำไปใช้ทดสอบการดูดซับสีย้อม สีย้อมที่ใช้ในการทดลองคือสีแอซิด (acid dye) ชนิดเบเนวอล เรด benewolred

### 2. การหาระดับพีเอช ระยะเวลา และปริมาณสาหร่ายที่เหมาะสมต่อการดูดซับสีย้อมเบเนวอล เรด

ละลายสีย้อมเบเนวอล เรด ในน้ำ milli-q water ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นศึกษาการดูดซับสีย้อมเบเนวอล เรด ตรวจวัดพีเอชของสารละลายสีย้อมที่แตกต่างกันระหว่าง 2-8 นำผลพีเอชที่เหมาะสมไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ตรวจวัดระยะเวลาการเข้าสู่จุดสมดุลของการดูดซับและวิเคราะห์ปริมาณสีย้อมที่เหลือในสารละลาย ในช่วงระยะเวลา 0-120 ชั่วโมง นำผลระยะเวลาที่เหมาะสมไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ปริมาณสาหร่ายที่ใช้ในการทดลองระหว่าง 0.5-6 กรัม น้ำหนักสดต่อลิตร

ปรับระดับพีเอชของสารละลายสีย้อมเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้  $\text{HNO}_3$  0.1 โมลต่อลิตร และ  $\text{NaOH}$  0.1 โมลต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายสีย้อมปริมาตร 10 มิลลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิตร ใส่สาหร่ายที่ตรึงในอัลจิเนต ปิด ที่เตรียมไว้ข้างต้นลงในสารละลายสีย้อมแล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า (shaker) ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 180 นาที (ยกเว้นการศึกษาเรื่องระยะเวลา) หลังจากนั้นแยกเม็ดอัลจิเนตของสาหร่ายออกจากสารละลายสีย้อม วิเคราะห์ปริมาณสีย้อมที่เหลือในสารละลาย วิเคราะห์ปริมาณสีย้อมด้วยเครื่อง spectrophotometer (Genesys 20 Thermo Spectronic)

คำนวณปริมาณสีย้อมที่ถูกดูดซับต่อปริมาณสาหร่าย ( $q_{eq}$  มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อกรัม) ดังสมการ (Volesky and Holan, 1995)

$$q_{eq} = V(C_0 - C_{eq})/M$$

เมื่อ  $V$  คือ ปริมาตรของสารละลายสีย้อม (มิลลิลิตร)

$C_0$  คือ ความเข้มข้นตั้งต้นของสีย้อม (มิลลิกรัมต่อลิตร)

$C_{eq}$  คือ ความเข้มข้นสุดท้ายของสีย้อม (มิลลิกรัมต่อลิตร)

$M$  คือ ปริมาณน้ำหนักสดของสาหร่าย (กรัม)

โดยสร้างสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของสีย้อมที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน เพื่อใช้คำนวณความเข้มข้นของสีย้อมในการทดลอง

### 3. การศึกษาไอโซเทอร์มการดูดซับและจลพลศาสตร์การดูดซับ (adsorption isotherm and kinetics)

ใส่สาหร่ายที่ตรึงเซลล์ในรูปเม็ดอัลจิเนต ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร สารละลายสีย้อม 100 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 10-1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ปริมาณสีย้อมที่เหลือในสารละลายที่จุดสมดุล และทำนายลักษณะการดูดซับสีย้อมของสาหร่ายโดยนำค่าที่ได้ไปคำนวณโดยใช้สมการการดูดซับของ Langmuir และ Freundlich (Volesky and Holan, 1995) สมการ Langmuir  $1/q_{eq} = (1/(K_a Q_{max})) (1/C_{eq}) + (1/Q_{max})$

เมื่อ  $q_{eq}$  คือ ปริมาณสีย้อมที่ถูกดูดซับที่จุดสมดุล (มิลลิกรัมต่อกรัมสำหรับ)

$Q_{max}$  คือ ปริมาณสีย้อมที่ถูกดูดซับได้สูงที่สุดโดยสำหรับ (มิลลิกรัมต่อกรัมสำหรับ)

$K_d$  คือ ค่าคงที่ในการดูดซับสีย้อมของสำหรับซึ่งสัมพันธ์ระหว่างความชอบ (สัมพรรคของแร่ธาตุ) ระหว่างตัวดูดซับและตัวถูกดูดซับ (ลิตรต่อมิลลิกรัม)

$C_{eq}$  คือ ปริมาณสีย้อมที่เหลือในสารละลายที่จุดสมดุล (มิลลิกรัมต่อลิตร)

ส่วนสมการของ Freundlich มีรูปแบบการคือ  $q_{eq} = K_f C_{eq}^{1/n}$  เมื่อ  $K_f$  และ  $1/n$  เป็นค่าคงที่ของการดูดซับ ซึ่งค่า  $K_f$  และ  $1/n$  เป็นดัชนีของประสิทธิภาพในการดูดซับ (adsorption capacity index) และความหนาแน่นในการดูดซับ (adsorption intensity) ตามลำดับ

การศึกษากจลนพลศาสตร์การดูดซับศึกษาโดยใช้สำหรับที่ตรึงเซลล์ในรูปเม็ดอัลจิเนต 5 กรัมต่อลิตร ในสารละลายสีย้อมที่ระดับความเข้มข้น 10-400 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ปริมาณสีย้อมที่เหลือในสารละลายที่เวลา 0-120 ชั่วโมง จากนั้นศึกษาอันดับของปฏิกิริยา (order of reaction) และขั้นกำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยา (rate limiting step)

#### 4. การวิเคราะห์ปริมาณสีย้อมและการวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อชุดการทดลอง วิเคราะห์ความแปรปรวนของชุดทดลองโดยวิธี One-way ANOVA และวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างข้อมูลโดยวิธี Duncan new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับคอมพิวเตอร์

### ผลการทดลองและวิจารณ์

#### 1. ระดับพีเอชของสารละลายที่เหมาะสมต่อการดูดซับสีย้อม

สำหรับ *S. dimorphus* ที่ตรึงในเม็ดอัลจิเนตสามารถดูดซับสีย้อมเบนซออล เรด ได้สูงที่สุดที่ระดับพีเอชของสารละลายเท่ากับ 3 โดยมีค่าการดูดซับ  $31.16 \pm 2.35$  เปอร์เซ็นต์ หรือ  $11.11 \pm 1.12$  มิลลิกรัมต่อกรัมสำหรับ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับระดับพีเอช 4-8 (Table 1)

พีเอชของสารละลายไม่เพียงส่งผลต่อความสามารถในการดูดซับสีย้อมโดยสำหรับแต่ยังส่งผลต่อความสามารถในการละลายของสีย้อม โดยที่สีแอสิดเมื่อละลายน้ำจะแตกตัวให้อิออนลบของสีแก่น้ำ หมู่ฟังก์ชันของสีย้อมแอสิดที่แสดงประจุลบ (anionic group) เช่น หมู่ซัลโฟเนต ( $SO_3^-$ ) หมูคาร์บอกซิเลต ( $CO_2^-$ ) หรือซัลเฟต ( $SO_4^{2-}$ ) ฯลฯ โดยที่หมู่ซัลโฟเนตนั้นจะให้ความเป็นกรดที่แก่กว่าหมูคาร์บอกซิเลต ดังนั้น ค่าพีเอชในสารละลายจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมกระบวนการดูดซับโดยค่าพีเอชเริ่มต้นของสารละลายมีอิทธิพลมากกว่าพีเอชสุดท้าย (Ozer *et al.*, 2005) และค่าพีเอชมีผลต่อการแตกตัวของสารละลายสีย้อมประจุลบและพบว่าเมื่อพีเอชต่ำลงจะทำให้เพิ่มปริมาณกลุ่มประจุบวกของโปรตอน ( $H^+$ ) และ hydronium ions ( $H_3O^+$ ) ที่บริเวณผิวเซลล์ของสำหรับและเกิดปฏิสัมพันธ์ (interaction) กับหมู่ฟังก์ชันประจุลบของสีย้อมแอสิดได้มาก ทำให้เกิดแรงดึงดูดที่มากขึ้น คุณสมบัตินี้ทำให้สำหรับเพิ่มความสามารถในการดูดซับที่สูงขึ้นเมื่ออยู่ในระดับพีเอชที่ต่ำ (Ozer *et al.*, 2006a) ซึ่งจากผลการทดลองจะพบว่าสีเบนซออล เรด ถูกดูดซับได้ดีที่พีเอชต่ำ (2 และ 3) ซึ่งเป็นเพราะสีย้อมนี้แตกตัวให้ประจุลบได้ดีที่พีเอชต่ำ และที่พีเอชต่ำยังช่วยเพิ่มประจุบวกที่ผิวเซลล์สำหรับจึงช่วยเพิ่มการดูดซับได้ดีมากยิ่งขึ้น

Table 1 Benewol redsorption ability of immobilized *S. dimorphus* under different pH.

pH	Sorption (%)	$q_{eq}$ (mg/g)
2	27.52±0.88 <sup>A</sup>	10.92±0.53 <sup>A</sup>
3	31.16±2.35 <sup>A</sup>	11.11±1.12 <sup>A</sup>
4	4.88±2.86 <sup>C</sup>	2.09±1.20 <sup>C</sup>
5	14.39±0.76 <sup>B</sup>	6.71±0.38 <sup>B</sup>
6	3.01±1.10 <sup>C</sup>	1.26±0.46 <sup>C</sup>
7	0.81±0.12 <sup>C</sup>	0.37±0.05 <sup>C</sup>
8	1.05±0.37 <sup>C</sup>	0.49±0.18 <sup>C</sup>

The different superscript letters in each column are significantly different ( $p < 0.05$ ).

## 2. ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการดูดซับสีย้อม

การดูดซับสีย้อมที่สภาวะที่เหมาะสมทำให้ตัวดูดซับสามารถดูดซับสีย้อมได้เต็มที่ดังนั้นการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้ตัวดูดซับสัมผัสสารละลายสีย้อมเพื่อทำให้การดูดซับเข้าสู่จุดสมดุล ถือว่ามีบทบาทสำคัญเพราะการดูดซับสีย้อมโดยตัวดูดซับโดยทั่วไปแล้วตัวดูดซับสามารถดูดซับสีย้อมเพิ่มขึ้นจนถึงจุดสมดุลในระยะเวลาหนึ่งเมื่อพ้นจุดสมดุลแล้วความสามารถในการดูดซับจะไม่เพิ่มขึ้นอีก

จากการทดลองนี้พบว่าการดูดซับสีย้อมเบนวอล เรด เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกหลังจากที่ได้ตัวดูดซับในสารละลาย โดยพบว่าภายในระยะเวลาหลังการสัมผัส 1 ชั่วโมงสาหร่ายสามารถดูดซับสีย้อมได้ถึง 3.72±0.03 มิลลิกรัมต่อกรัม และที่ 3 ชั่วโมงสาหร่ายดูดซับได้สูงสุด 4.25±0.09 มิลลิกรัมต่อกรัม หลังจากนั้นการดูดซับจะค่อนข้างคงที่จนถึงระยะเวลา 120 ชั่วโมง ดังนั้นจุดสมดุลของการดูดซับจึงอยู่ที่ 3 ชั่วโมง (Figure 1) การที่สาหร่ายสามารถดูดซับสีย้อมได้อย่างรวดเร็วในช่วงแรกเนื่องจากตำแหน่งที่ทำหน้าที่จับบนผิวเซลล์สาหร่ายนั้นยังว่างอยู่ จากนั้นการดูดซับเริ่มช้าลงเพราะตำแหน่งที่จับเริ่มเหลือน้อยลงและเมื่อตำแหน่งที่จับทุกตำแหน่งจับสีย้อมได้เต็มจึงถึงจุดสมดุลของการดูดซับ ซึ่งให้ผลการศึกษาเช่นเดียวกับการทดลองใช้หญ้าทะเลและคาร์บอนกัมมันต์ในการดูดซับสีย้อม (Guezguez *et al.*, 2009)

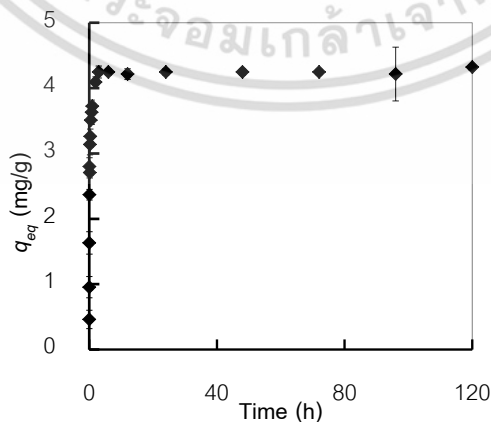


Figure 1 Benewol redadsorption capacity of immobilized *S. dimorphus* at various exposure times.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3. ปริมาณสาหร่ายที่เหมาะสมต่อการดูดซับสีย้อม

การดูดซับสีย้อมเบนเวล เรด โดย *S. dimorphus* ที่ตรึงเซลล์ในเม็ดอัลจิเนต พบว่าจากการทดลองปริมาณสาหร่ายที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ดูดซับคือ 0.5 กรัมต่อลิตร เพราะให้ปริมาณการดูดซับต่อกรัมสูงที่สุด โดยจากการทดลองพบว่าเมื่อปริมาณสาหร่ายเพิ่มขึ้นจาก 0.5 เป็น 1-1.5 กรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์การดูดซับสีย้อมเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะเป็นการเพิ่มตำแหน่งยึดจับที่ทำหน้าที่จับสีย้อมให้มากขึ้น แต่เมื่อปริมาณสาหร่ายสูงกว่า 1.5 กรัมต่อลิตร ค่าการดูดซับกลับลดลงและพบว่าปริมาณสีย้อมที่ถูกดูดซับได้น้ำหนักสาหร่าย 1 กรัม ( $q_{eq}$ ) นั้นมีค่าลดลงเมื่อปริมาณสาหร่ายเพิ่มขึ้นโดยมีค่าการดูดซับลดลงจาก  $9.32 \pm 0.18$  เหลือ  $0.42 \pm 0.05$  มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด เมื่อปริมาณเพิ่มจาก 0.5 เป็น 6 กรัมน้ำหนักสดต่อลิตร (Table 2) ทั้งนี้เป็นเพราะปริมาณสาหร่ายที่เพิ่มมากขึ้นเป็นผลทำให้สาหร่ายอยู่ใกล้ชิดกันมากเกินไป และเกิดการเกาะกลุ่มกันทำให้ผิวเซลล์สาหร่ายบางส่วนไม่สัมผัสสีย้อมที่ซึมเข้ามา เม็ดบีคจึงไม่สามารถทำหน้าที่จับสีย้อมได้ ทำให้เซลล์สาหร่ายจับสีย้อมได้ไม่เต็มผิวเซลล์ ดังนั้นปริมาณสีย้อมต่อสาหร่าย 1 กรัม จึงมีปริมาณลดลงเมื่อปริมาณสาหร่ายมากขึ้นซึ่งให้ผลการศึกษาเช่นเดียวกับการใช้สาหร่าย *Enteromorpha prolifera* ในการดูดซับสีย้อมแอซิด (Ozer *et al.*, 2005)

Table 2 Benewel redsorption ability and adsorption capacity of immobilized *S. dimorphus* at various biomasses.

Algal biomass (g/l)	Sorption (%)	$q_{eq}$ (mg/g)
0.5	$85.33 \pm 1.67^A$	$9.32 \pm 0.18^A$
1.0	$87.53 \pm 0.70^A$	$4.77 \pm 0.04^B$
1.5	$87.39 \pm 1.03^A$	$3.18 \pm 0.04^C$
2.0	$82.46 \pm 1.16^{AB}$	$2.25 \pm 0.03^D$
2.5	$75.36 \pm 0.45^{BC}$	$1.64 \pm 0.01^E$
3.0	$66.48 \pm 1.47^C$	$1.21 \pm 0.03^F$
6.0	$45.74 \pm 5.30^D$	$0.42 \pm 0.05^G$

The different superscript letters in each column are significantly different ( $p < 0.05$ ).

### 4. ความเข้มข้นของสีย้อมเริ่มต้นที่มีผลต่อการดูดซับสีย้อม

ความเข้มข้นของสีย้อมเริ่มต้นส่งผลต่อความสามารถในการดูดซับของสาหร่าย โดยสีย้อมที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจะทำให้สาหร่ายดูดซับสีย้อมปริมาณต่อ 1 กรัมของสาหร่ายได้เพิ่มมากขึ้น โดยจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสาหร่ายดูดซับสีย้อมได้สูงสุด  $97.21 \pm 2.60$  มิลลิกรัมต่อกรัม ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของสีย้อมสูงสุดคือ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Figure 2) ทั้งนี้เป็นเพราะเมื่อความเข้มข้นของสีย้อมมีมาก จะทำให้เกิดพลังงานในการผลักของสีย้อมสู่เซลล์สาหร่ายมากขึ้น และอาจมีการเกาะตัวของสีย้อมที่ผิวเซลล์สาหร่ายและผิวของก้อนอัลจิเนตทำให้สีย้อมถูกดูดซับไปจากสารละลายมากขึ้น (Ozer *et al.*, 1999; Mehta and Gaur, 2001)

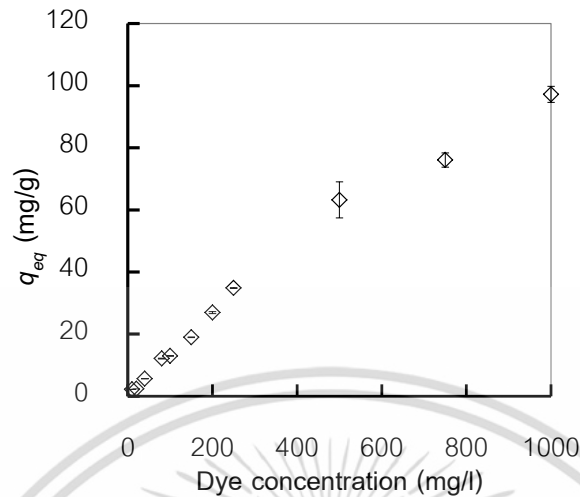


Figure 2 Benewol redsorption ability of immobilized *S. dimorphus* at various dye concentrations.

### 5. ประสิทธิภาพสูงสุดของสาหร่ายในการดูดซับสีย้อม

จากการศึกษาไอโซเทอร์มการดูดซับพบว่าค่าความสัมพันธ์ ( $r^2$ ) ของสมการ Langmuir มีค่าสูงกว่าสมการของ Freundlich ดังนั้นจึงสันนิษฐานได้ว่าการดูดซับสีย้อมโดยสาหร่ายสกุลนี้มีความสัมพันธ์ตามทฤษฎีการดูดซับของ Langmuir ซึ่งกล่าวไว้ว่าการดูดซับสีย้อมจะเกิดที่ผิวเซลล์เป็นการดูดซับเพียงชั้นเดียว (monolayer) และเกิดการดูดซับบนตำแหน่งดูดซับที่มีความเหมือนกัน (homogenous binding site) (Weber, 1972) โดยการดูดซับสีย้อมเบเนวอล เรดสูงสุด ( $Q_{max}$ ) ของสาหร่าย *S. dimorphus* ในการดูดซับครั้งนี้ คือ  $31.92 \pm 0.34$  มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด (Table 3)

โดยได้มีรายงานการใช้ *S. quadricauda* ที่มีชีวิตตรึงเซลล์ในการดูดซับสีย้อม reactive พบว่ามีการดูดซับแบบ Langmuir เช่นกัน โดยมีค่าการดูดซับสูงสุด 68.8 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (Ergeneet *et al.*, 2009) การดูดซับสีย้อม acid red 337 และ acid blue 324 โดยสาหร่ายสีเขียว *Enteromorpha prolifera* ซึ่งดูดซับได้ 55.1 และ 59.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ (Ozer *et al.*, 2005) การดูดซับสีย้อม acid blue 329 และ acid blue 290 โดยสาหร่าย *Spirogyra rhizopus* ซึ่งดูดซับได้ 367.00 และ 1360.60 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ (Ozer *et al.*, 2006b) และมีรายงานการใช้พืชน้ำจืดขนาดใหญ่ *Azolla rostrata* ดูดซับสีย้อม acid dye ได้แก่ acid red 88, acid green 3, acid orange 7, และ acid blue 15 พบว่าการดูดซับสูงสุดมีค่าเท่ากับ 81.30, 83.33, 76.92 และ 76.34 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Padmesh *et al.*, 2006) โดยความสามารถในการดูดซับสีย้อมของสาหร่ายแต่ละชนิดจะขึ้นกับชนิดและจำนวนของหมู่ฟังก์ชันที่ผิวเซลล์ของสาหร่าย ซึ่งจะแตกต่างกันไปในสาหร่าย (Marungrueng and Pavasant, 2007)

**Table 3** Langmuir and Freundlich isotherm parameters for the adsorption of benewol red by immobilized *S. dimorphus*.

Langmuir		Freundlich		
$Q_{max}$	$K_a$	$R^2$	$n$	$r^2$
31.92±0.34	0.02±0.00	0.93±0.01	1.21±0.01	0.73±0.01

## 6. จลนพลศาสตร์การดูดซับสีย้อม

จลนพลศาสตร์ของการดูดซับ (kinetics of adsorption) เป็นการศึกษากลไกการดูดซับจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่อหนึ่งหน่วยเวลาหรือเรียกว่าอัตราเร็วของการดูดซับ (rate of reaction) ณ เวลาต่าง ๆ ก่อนการดูดซับเข้าสู่ภาวะสมดุลด้วยการหาอันดับของปฏิกิริยา (order of reaction) การหาขั้นกำหนดอัตราเร็วของการดูดซับ (rate determining/rate limiting step) และค่าคงที่ของอัตราเร็วของการดูดซับ (rate constant) เพื่อศึกษาปัจจัยของความเข้มข้นเริ่มต้นของสารตั้งต้นที่มีผลต่ออัตราเร็วของการดูดซับสำหรับนำไปเป็นข้อมูลในการออกแบบและประยุกต์ใช้ตัวดูดซับให้มีประสิทธิภาพเหมาะกับการใช้งานระบบต่าง ๆ เช่น batch reactors และ fixed beds เป็นต้น (Masel, 1996; สุวีรัตน์, 2549) การที่จะพิจารณาว่าสารย้อมมีอันดับของปฏิกิริยาการดูดซับสีย้อมเป็นอันดับใดจะพิจารณาจากค่าความสัมพันธ์ ( $r$ ) ของอัตราเร็วของปฏิกิริยากับความเข้มข้นของตัวทำปฏิกิริยา โดยการทดลองขั้นต้นพบว่าคุณสมบัติของของไหลนี้เป็น pseudo และผลการทดลองพบว่าสำหรับ *S. dimorphus* มีรูปแบบการดูดซับแบบปฏิกิริยาอันดับที่สองเสมือน (Pseudo-second order reaction) โดยพิจารณาจากค่าความสัมพันธ์ที่มีค่ามากกว่าโดยเข้าใกล้หนึ่ง ซึ่งมีค่าความสัมพันธ์ที่สูงกว่าปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่งเสมือน (Pseudo first-order reaction) (Table 4) นั่นคืออัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็นปฏิกิริยากับกำลังสองของความเข้มข้นของสารตั้งต้น ดังนั้นเมื่อเพิ่มตัวดูดซับเข้าสู่ระบบหนึ่งเท่าจะดูดซับสีย้อมเพิ่มขึ้นเป็นกำลังสองซึ่งมีรายงานว่าการใช้ *S. quadricauda* ที่ตรึงเซลล์ และใช้ *Chlorella vulgaris* ในการดูดซับสีย้อม reactive พบว่ามีอัตราการดูดซับเป็นอันดับสองเสมือน เช่นเดียวกัน (Aksu and Tezer, 2005; Ergene et al., 2009)

**Table 4** Determination the order of benewol red adsorption by immobilized *S. dimorphus*.

Dye concentration (mg/l)	Pseudo-First Order		Pseudo-Second Order	
	-k (10 <sup>-4</sup> /min)	(-r)	k (x10 <sup>-2</sup> mg/l/min)	(r)
10	0.1	0.187	37.7	0.999
20	0.3	0.362	3.5	0.999
40	0.5	0.493	1.7	0.999
80	0.5	0.436	0.6	0.999
160	0.6	0.309	0.3	0.998
240	0.7	0.537	0.3	0.895
320	0.2	0.412	0.2	0.999
400	0.5	0.362	0.2	0.999

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นกำหนดอัตราเร็วของการดูดซับคือขั้นควบคุมอัตราเร็วของขบวนการทั้งหมดจากกลไกการดูดซับซึ่งเป็นการแพร่หรือเคลื่อนที่ของตัวดูดซับเข้าไปในตัวดูดซับมีการเกิดขึ้นตอน 4 ขั้นตอนย่อยติดต่อกัน คือ 1) bulk transport เป็นการเคลื่อนที่ของตัวดูดซับจากสารละลายไปยังผิวฟิล์มน้ำหรือโมเลกุลน้ำที่ล้อมรอบตัวดูดซับ 2) film transport เป็นการเคลื่อนที่ของตัวดูดซับข้ามฟิล์มน้ำไปยังผิวของตัวดูดซับ 3) intraparticle transport เป็นการเคลื่อนที่ของตัวดูดซับเข้าไปภายในรูพรุนของตัวดูดซับและ 4) adsorption เป็นการดูดซับระหว่างตัวดูดซับกับ active sites บนผิวตัวดูดซับซึ่งเกิดขึ้นเร็วมาก (Agrawal, 1990) แต่ละขั้นตอนจะมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาเร็วหรือช้าแตกต่างกัน โดยขั้นตอนที่เกิดช้ามากที่สุดจะเป็นขั้นกำหนดอัตราเร็วของการดูดซับ (rate determining step)

ในการศึกษานี้พบว่าขั้นกำหนดอัตราเร็วของการดูดซับพบว่าทั้งขั้นการแพร่ของของเหลวผ่านชั้นฟิล์มซึ่งเป็นชั้นน้ำ (film diffusion) และการดูดซับช่วงที่หนึ่ง (Initial rate) ของขั้นการแพร่เข้าสู่ภายในรูพรุน (Intra-particle diffusion) เป็นขั้นกำหนดอัตราเร็วของการดูดซับ (Table 5)

**Table 5** Effects of initial benewol red concentration on dye sorption rate in film diffusion and intraparticle diffusion.

Dye concentration (mg/l)	Film diffusion	Intraparticle diffusion	
	Initial rate ( $\times 10^{-4}/\text{min}$ )	Initial rate (mg/g biomass/min <sup>0.5</sup> )	Secondary rate (mg/g biomass/min <sup>0.5</sup> )
10	90	2.1	3.0
20	100	13.5	19.1
40	36	16.2	13.3
80	22	33.3	40.9
160	0.6	10.1	97.8
240	1	44.4	48.9
320	27	51.8	39.9
400	13	352.9	91.5

### สรุปผลการทดลอง

สาหร่าย *S. dimorphus* ที่ตรึงในอัลจิเนต มีความสามารถในการดูดซับสีย้อมแอซิด ชนิดเบนเนวอล เรดได้ดีที่ระดับพีเอช 3 มีระยะเวลาสมดุลในการดูดซับที่ 3 ชั่วโมงซึ่งไม่นานเกินไป และพบว่าเปอร์เซ็นต์การดูดซับสีย้อมเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ของ *S. dimorphus* ลดลง นอกจากนี้เมื่อดูดซับสีย้อมแล้ว เม็ดอัลจิเนตที่ตรึงสาหร่ายซึ่งมีขนาดใหญ่จึงกำจัดจากน้ำเสียได้ง่ายจึงไม่มีการตกค้างในแหล่งน้ำไม่กระทบต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงเป็นตัวดูดซับชีวภาพทางเลือกอีกตัวหนึ่ง ที่น่าจะนำมาใช้บำบัดน้ำเสียต่อไปในอนาคต

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังปีงบประมาณ 2556

## เอกสารอ้างอิง

- สุนิรัตน์ เรืองสมบุญ. 2547. การดูดซับตะกั่วและแคดเมียมจากน้ำเสียโดยใช้ *Scenedesmus dimorphus* เป็นตัวดูดซับ. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง. 12:42-47.
- สุนิรัตน์ เรืองสมบุญ. 2549. การดูดซับโลหะหนักโดยสาหร่าย. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 451 น.
- Agrawal, G.L. 1990. Basic Chemical Kinetics. McGraw-Hill Publishing Company Limited, New Delhi. 214 p.
- Ahuja, P., R. Gupta and R.K. Saxena. 1997. *Oscillatoriaanguistissima*: a promising  $\text{Cu}^{2+}$  biosorbent. Current Microbiol. 35:151-154.
- Aksu, Z. and S. Tezer. 2005. Biosorption of reactive dyes on the green alga *Chlorella vulgaris*. Process Biochemistry. 40:1347-1361.
- Bajguz, A. 2000. Blockade of heavy metals accumulation in *Chlorella vulgaris* cells by 24-epibrassinolide. Plant Physiology Biochemistry. 38:797-801.
- El-Sheekh, M., M.M. Gharieb and G.W. Abou-El-Souod. 2009. Biodegradation of dyes by some green algae and cyanobacteria. International Biodeterioration & Biodegradation. 63:699-704.
- Ergene, A., K. Ada, S. Tan and H. Katirciooglu. 2009. Removal of remazol brilliant blue R dye from aqueous solutions by adsorption onto immobilized *Scenedesmus quadricauda*: equilibrium and kinetic modeling studies. Desalination. 249:1308-1314.
- Guezguez, I., S. Dridi-Dhauadi and F. Mhenni. 2009. Sorption of yellow 59 on *Posidonia oceanica*, a non-conventional biosorbent: comparison with activated carbons. Industrial crops and products. 29:197-204.
- Khataee, A.R., G. Dehghan, E. Ebadi, M. Zarei and M. Pourhassa. 2010. Biological treatment of a dye solution by Macroalgae *Chara* sp.: Effect of operational parameters, intermediates identification and artificial neural network modeling. Bioresource Technology. 101:2252-2258.
- Khataee, A.R., M. Zarei, G. Dehghan, E. Ebadi and M. Pourhassa. 2011. Biotreatment of a triphenylmethane dye solution using a Xanthophyta alga: modeling of key factors by neural network. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 42:380-386.
- Marungrueng, K. and P. Pavasant. 2007. High performance biosorbent (*Caulerpalentillifera*) for basic dye removal. Bioresource Technology. 98:1567-1572.
- Masel, R.I. 1996. Principles of Adsorption and Reaction on Solid Surfaces. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Mehta, S.K. and J.P. Gaur. 2001. Concurrent sorption of  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  by *Chlorella vulgaris* from a binary metal solution. Applied Microbiology and Biotechnology. 55:379-382.
- Ozer, A., D. Ozer and H.I. Ekiz. 1999. Application of Freundlich and Langmuir models to multistage purification process to remove heavy metal ions by using *Schizomeris leibleinii*. Process Biochemistry. 34:919-927.
- Ozer, A., G. Akkaya and M. Turabik. 2005. The biosorption of Acid Red 337 and Acid Blue 324 on *Enteromorpha prolifera*: The application of nonlinear regression analysis to dye biosorption. Chemical Engineering Journal. 112:181-190.
- Ozer, A., G. Akkaya and M. Turabik. 2006a. The removal of Acid Red 274 from wastewater: Combined biosorption and biocoagulation with *Spirogyra rhizopus*. Dyes and Pigments. 71:83-89.
- Ozer, A., G. Akkaya and M. Turabik. 2006b. Biosorption of Acid Blue 290 (AB 290) and Acid Blue 324 (AB 324) dyes on *Spirogyra rhizopus*. Journal of Hazardous Materials B. 135:355-364.
- Padmesh, T.V.N., K. Vijayaraghavan, G. Sekaran and M. Velan. 2006. Application of *Azollarongpongon* biosorption of acid red 88, acid green 3, acid orange 7 and acid blue 15 from synthetic solutions. Chemical Engineering Journal. 122:55-63.
- Ruangsomboon, S., S. Choochote, P. Thaweekijakarn and D. Aue-umneoy. 2012. Nitrogen and phosphorus removal from wastewater by green microalga, *Scenedesmus dimorphus*. Proc. 2<sup>nd</sup> Asia-Oceania algae innovation summit: algae for sustainable development, Bangkok, Thailand.
- Srinivasan, A. and T. Viraraghavan. 2010. Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: A review. Journal of Environmental Management. 91:1915-1929.

- Vijayaraghavan, K. and Y.S. Yun. 2008. Biosorption of C.I. Reactive Black 5 from aqueous solution using acid-treated biomass of brown seaweed *Laminaria* sp. *Dyes and Pigments*. 76:726-732.
- Volesky, B. and Z.R. Holan. 1995. Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress*. 11:235-250.
- Vonshak, A and H. Maske. 1982. Algae: growth techniques and biomass production. In: Coombs, J., Hall, D.O. (Eds.), *Techniques in Bioproducity and Photosynthesis*. Pergamon Press, Oxford.
- Weber, W.J. 1972. *Physicochemical Process for Water Quality control*. Wiley Interscience, New York.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้