

การกำจัดสีอะโซด้วยเม็ดบีดกลุ่มแบคทีเรียตรึงรูป

Decolorization of Azo Dyes by Immobilized Bacterial Consortium Beads

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล* และ ดาริกา รุปรังาม

Pranee Pattanapitpaisal and Darika Roopngam

ห้องปฏิบัติการ ไบโอดีเมคเคชัน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

บทคัดย่อ

อุตสาหกรรมฟอกย้อมเป็นอุตสาหกรรมที่มีการใช้น้ำและสารเคมีจำนวนมาก จึงทำให้สิ้นเปลือง
แหล่งน้ำธรรมชาติและอาจก่อปัญหามลพิษทางน้ำที่ทวีความรุนแรงมากขึ้นหากไม่มีการกำจัดอย่าง
เหมาะสม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเม็ดบีดกลุ่มแบคทีเรียตรึงรูปในการกำจัด
สีอะโซ 3 ชนิด คือ Blue BCC, Congo red, และ Golden yellow RNL ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 50
มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าที่เวลา 144 ชั่วโมง immobilized bacterial consortium PD-I beads มี
ประสิทธิภาพในการกำจัดสีย้อม Blue BCC, Congo red และ Golden yellow RNL เท่ากับร้อยละ 100.0,
90.5 และ 69.0 ตามลำดับ ส่วน immobilized bacterial consortium PD-II beads มีประสิทธิภาพในการ
กำจัดสีย้อมเท่ากับร้อยละ 99.2, 92.0 และ 76.4 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า immobilized dead cells PD-
I beads มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีย้อมเท่ากับร้อยละ 92.3, 78.3 และ 54.8 ตามลำดับ ส่วน
immobilized dead cells PD-II beads มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีย้อมเท่ากับร้อยละ 96.3, 82.0 และ 60.1
ตามลำดับ สำหรับ alginate gel bead สามารถกำจัดสีย้อมเท่ากับร้อยละ 92.3, 70.0 และ 43.0 จาก
การศึกษา immobilized bacterial consortium beads ด้วยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากลไกการกำจัดสี
ด้วยเม็ดบีดกลุ่มแบคทีเรียตรึงรูปเกิดขึ้นจากการกำจัดสีด้วยการย่อยสลายทางชีวภาพร่วมกับการดูดซับสี
บางส่วนโดยเซลล์ที่ถูกตรึงและสารพอลิเมอร์ การศึกษาดัชนีการดูดซับสีด้วยเม็ดบีดที่ตรึงรูปพบว่ามีแบคทีเรียอย่างน้อย 2 สายพันธุ์ที่รูปร่างกลมและรูปร่างแท่งกระจายอยู่ทั่วเม็ดบีด ผลการทดลองนี้จึง
ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของกลุ่มแบคทีเรียตรึงรูปในการกำจัดน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อมต่อไป

คำสำคัญ : สีอะโซ, การกำจัดสี, กลุ่มแบคทีเรีย, เม็ดบีดกลุ่มแบคทีเรียตรึงรูป

*E-mail address : scpranpa@gmail.com

Abstract

Environmental problem, especially water pollution, causing from the growth of industries has become increasingly alarming. The objective of this study was to investigate the potential of immobilized bacterial consortium, immobilized dead cells and alginate gel beads to decolorize various azo dyes via blue BCC, Congo red, and golden yellow RNL at each concentration of 50 mg/L. Results revealed that immobilized bacterial consortium PD-I decolorized blue BCC, Congo red and golden yellow RNL up to 100.0%, 90.5% and 69.0% within 144 h, respectively, while the immobilized bacterial consortium PD-II decolorized up to 99.2%, 92.0% and 76.4% within 144 h., respectively. In addition, immobilized dead cells PD-I decolorized 92.3% of blue BCC, followed by 78.3% and 54.8% decolorization of Congo red and golden yellow RNL. Immobilized dead cells PD-II showed decolorization of 96.3%, 82.0% and 60.1% of blue BCC, Congo red and golden yellow RNL, respectively. While alginate gel beads showed 92.3%, 70.0% and 43.0% decolorization of blue BCC, Congo red and golden yellow RNL, respectively. The mechanism of the decolorization process by immobilized microbial consortium beads indicated that it proceeded primarily by biological decolorization associated with partial adsorption of the dye onto the entrapped cells and gel matrix. Electron microscopic observation revealed that the microbial consortium contained in the gel beads was at least two kinds of bacterial species in the form of rod and cocci. This suggests the potential of using immobilized microbial consortium beads to treat an industrial dye wastewater.

Keywords: azo dye, decolorization, bacterial consortium, immobilized bacterial consortium beads

1. บทนำ

สีย้อม (Dyes) เป็นสารอินทรีย์ประเภทหนึ่งที่ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมายเช่น อุตสาหกรรมการฟอกย้อมสิ่งทอ อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง กระดาษและรูปภาพต่างๆ หากแบ่งสีย้อมตามโครงสร้างทางเคมีและหมู่พันธะที่ใส่ จะสามารถแบ่งสีย้อมแบ่งออกเป็นหลายกลุ่ม ตัวอย่างเช่น สียอะโซ (azo dyes) สียไตรอะริลมีเทน (triarylmethane dyes) และสียแอนทราควิโนน (anthraquinone dyes) เป็นต้น [1] สียอะโซเป็นสีที่ถูกใช้มากที่สุดในอุตสาหกรรมฟอกย้อมถึงร้อยละ 70 รองลงมาคือสียแอนทราควิโนน [2] สียอะโซเป็นสารประกอบอะโรมาติกที่มีหมู่อะโซ (-N=N-) และหมู่ซัลโฟนิค (-SO₃-) ซึ่งเป็นหมู่ที่ดึงอิเล็กตรอน จึงทำให้เกิดส่วนประกอบที่ขาดแคลนอิเล็กตรอนและ

ด้านทานต่อปฏิกริยาออกซิเดชันของแบคทีเรีย สีอะโซจึงเป็นสีที่ย่อยสลายได้ยาก และมีความเป็นพิษต่อคนและสัตว์ [3] ปัจจุบันมีการคิดค้นเทคโนโลยีเพื่อใช้ในการย่อยสลายสีอะโซมอะโซ ซึ่งมีทั้งการกำจัดสีด้วยวิธีทางกายภาพและวิธีการกำจัดทางเคมี เช่น การตกตะกอนด้วยสารเคมี การแลกเปลี่ยนไอออน และการใช้โอโซน [4] แต่วิธีกำจัดดังกล่าวมีข้อจำกัดหลายประการ ได้แก่ ค่าใช้จ่ายสูง ตะกอนที่ได้จากการกำจัดมีปริมาณมาก และทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีความเป็นพิษ ซึ่งต้องทำการกำจัดต่อไปอีก การใช้จุลินทรีย์ในการกำจัดและย่อยสลายสีอะโซมอะโซ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความสำคัญมากขึ้นเนื่องจากมีต้นทุนต่ำ เกิดตะกอนน้อย และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม [5] งานวิจัยส่วนใหญ่จะเน้นเชื้อบริสุทธิ์ที่อยู่ในรูปของเซลล์อิสระ ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* [6], *Staphylococcus arlettae* [7], *Pseudomonas aeruginosa* [8], *Rhodopseudomonas palustris* [9], และ *Bacillus cereus* [10] ทั้งนี้เนื่องจากน้ำเสียในอุตสาหกรรมฟอกย้อมจะมีสีย้อมปนเปื้อนหลากหลายชนิดขึ้นกับกระบวนการผลิต [11] ดังนั้น งานวิจัยที่ใช้กลุ่มจุลินทรีย์ผสมในการกำจัดสีอะโซจึงได้รับความสนใจมากขึ้นในช่วงสิบปีที่ผ่านมา [12-15]

อย่างไรก็ตามการใช้เซลล์อิสระในการย่อยสลายทางชีวภาพจะมีข้อจำกัดเกี่ยวกับอัตราการเกิดปฏิกริยา ความคงทนและการสูญเสียเซลล์ออกจากระบบ [16] ดังนั้น เทคโนโลยีการตรึงเซลล์จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียในอุตสาหกรรมฟอกย้อม ทั้งนี้เพราะเซลล์ตรึงรูปมีข้อได้เปรียบหลายประการ คือ มีชีวมวลในปริมาณที่เข้มข้น สามารถทำปฏิกริยาได้อย่างต่อเนื่อง และนำกลับมาใช้ซ้ำได้ มีความต้านทานต่อสภาวะที่รุนแรงต่างๆ เช่น พีเอช อุณหภูมิ และสารมลพิษต่างๆ นอกจากนี้ยังสามารถแยกเซลล์ตรึงรูปออกจากระบบบำบัดน้ำเสียได้ง่าย [17-18] การตรึงรูปโดยการเก็บกักเซลล์จะช่วยสร้างสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากการต้านทานต่อการแพร่ของโดยสารพวง จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสีอะโซด้วยการย่อยสลายโดยแบคทีเรีย [19-20] สารพวงธรรมชาติที่ใช้ในการตรึงเซลล์ได้แก่ อัลจิเนตและคาร์ราจีแนน ส่วนสารพวงสังเคราะห์ได้แก่ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ และพอลิอะคริลลาไมด์ [21] โดยพบว่าอัลจิเนตเป็นสารพวงที่นิยมนำมาใช้ในการกำจัดสี [16, 18-19] มีรายงานการใช้สารพวงในการตรึงเซลล์เชื้อบริสุทธิ์เพื่อการกำจัดสี เช่น *Pseudomonas* sp. [22], *Trametes hirsute* [23], *Proteus vulgaris* [24] *Burkholderia vietnamiensis* [25], *Phanerochate chrysosporium* [26] ส่วนการตรึงกลุ่มเซลล์แบคทีเรียเชื้อผสมยังมีรายงานน้อยมาก ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Chen และคณะ [20] ซึ่งใช้สารพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ในการตรึงกลุ่มเซลล์จุลินทรีย์เพื่อการกำจัดสีอะโซ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาประสิทธิภาพกลุ่มแบคทีเรียตรึงรูปที่ตรึงด้วยอัลจิเนตในการกำจัดสีอะโซจำนวน 3 ชนิด คือ Congo red, Blue BCC และ Golden yellow RNL ผลงานวิจัยที่ได้จะเป็นแนวทางในการพัฒนาการกำจัดหรือลดปริมาณสีย้อมในน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อมต่อไป

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียโรงงานฟอกย้อม (ระบบปรับเสถียร) อ.วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี และจากบ่อบำบัดน้ำเสีย (ระบบตะกอนเร่ง) โรงพยาบาลอุทุมพรพิสัย อ.อุทุมพรพิสัย จ. ศรีสะเกษ บรรจุขวดปลอดเชื้อและปิดฝาให้มิดชิด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนทำการทดลองต่อไป

2.2 การพัฒนากลุ่มแบคทีเรียกำจัดสี

ปีเปตตัวอย่างน้ำเสียใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell and Hass basal medium supplemented with glucose and yeast extract (BHB-GY medium) [2] ซึ่งเติม Congo red 1%, Blue BCC 1% และ Golden yellow RNL 1% ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้ถ่ายเชื้อ (1%) ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHB-GY medium ซึ่งเติมสีทั้งสามชนิดที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำซ้ำจนกระทั่งครบ 7 รอบ กลุ่มแบคทีเรียที่ได้จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานฟอกย้อมและระบบบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาลอุทุมพรพิสัย คือ 1) bacterial consortium PD-I และ 2) bacterial consortium PD-II ตามลำดับ

2.3 การตรึงกลุ่มแบคทีเรีย

นำกลุ่มแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกตะกอนเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อสองครั้ง เตรียมเซลล์พื้นผิวของแบคทีเรียด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ BHB-GY medium จากนั้นนำสารแขวนลอยของกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมไว้ผสมกับ โซเดียมอัลจิเนต โดยมีอัตราส่วนสุทธิเท่ากับ โซเดียมอัลจิเนต 5% และกลุ่มแบคทีเรีย 7.5% (w/v น้ำหนักเซลล์เปียก) นำสารแขวนลอยที่มีส่วนผสมของโซเดียมอัลจิเนตและกลุ่มแบคทีเรียหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 2% แช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อการแข็งตัว เมื่อครบกำหนดนำเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูป (immobilized bacterial consortium beads) มาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง เม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปที่ได้มี 2 ชนิดคือ immobilized bacterial consortium PD-I beads และ immobilized bacterial consortium PD-II beads ทำการเตรียมเม็ดบีดควบคุมเช่นเดียวกับเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูป คือ เม็ดบีดอัลจิเนต (alginate gel beads) โดยใช้ น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนสาร

แขวนลอยของกลุ่มแบคทีเรียและเม็ดบีทเซลล์ที่ไม่มีชีวิตจริงรูป (immobilized dead cells beads) ซึ่งจะนำกลุ่มแบคทีเรียไปนั่งมาเชื้อภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ก่อนการตรึงรูป

2.4 การกำจัดสีของอะโซ

นำ immobilized bacterial consortium PD-I beads หรือ immobilized bacterial consortium PD-II beads (20%) เติมนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHB-GY medium ซึ่งเติมสีแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 499 นาโนเมตร 611 นาโนเมตร และ 410 นาโนเมตร สำหรับสี Congo red, Blue BCC และ Golden yellow RNL ตามลำดับ ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Nova spec II Model 80-2088-64 เพื่อดูประสิทธิภาพในการกำจัดสีของสี ย้อมทำการทดลองควบคุมโดยใช้ immobilized dead cells beads และ alginate gel beads ทำการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง

$$\text{ประสิทธิภาพในการกำจัดสีของ (ร้อยละ)} = \left(\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมเริ่มต้น} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมที่เหลือ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมเริ่มต้น}} \right) \times 100$$

2.5 การศึกษาลักษณะของเม็ดบีทด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

นำ immobilized bacterial consortium PD-I beads และ immobilized bacterial consortium PD-II beads มาตัดตามขวางแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แช่ใน glutaraldehyde 2.5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ทำการกำจัดน้ำออกจากเม็ดบีทโดยแช่ในเอทานอลความเข้มข้น 30% 50% 70% 80% และ 100% ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 15 นาที ทำให้อตัวอย่างแห้งด้วยวิธี Critical-point dry (CPD) แล้วติดตัวอย่างบน STUB นำไปเคลือบด้วยทองคำ แล้วนำไปศึกษาลักษณะของเม็ดบีทด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JEOL JSM-6010LV)

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การเตรียมและการตรึงกลุ่มแบคทีเรียกำจัดสี

กลุ่มแบคทีเรีย 2 กลุ่ม คือ bacterial consortium PD-I และ bacterial consortium PD-II ที่ได้จากบ่อแฟลคัลเททีฟจากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานฟอกย้อม (ระบบปรับเสถียร) อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี และบ่อเติมอากาศจากระบบบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาลอุทุมพรพิสัย (ระบบตะกอนเร่ง) อำเภออุทุมพรพิสัย จังหวัดศรีสะเกษ เมื่อนำมาตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนต ได้กลุ่มแบคทีเรียตรึงรูป 2 ชนิด คือ immobilized bacterial consortium PD-I beads และ immobilized bacterial consortium PD-II beads ผลการทดลองพบว่าเม็ดบีทที่ได้มีลักษณะกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ไม่มีการเกาะติดของ

เม็ดบีด และเมื่อทำการกำจัดด้วยสีย้อมอะโซพบว่าลักษณะของเม็ดบีดยังคงมีสภาพเดิม แต่สีของเม็ดบีดเปลี่ยนไปตามสีที่กำจัด อัลจินตเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ธรรมชาติเช่นเดียวกับคาร์ราจีแนน โครงสร้างประกอบด้วยกรดดี-แมนนูโรนิก (D-mannuronic acid) และกรดแอล-กลูโรนิก (L-guluronic acid) กรดกลูโรนิกจะทำปฏิกิริยาเกิดสภาพเจลกับแคลเซียมไอออน [21] Wang และคณะ [22] รายงานว่าเซลล์ดริ่งรูปสามารถทำกิจกรรมได้อย่างต่อเนื่อง ปฏิกิริยามีความคงที่และมีความคงทนต่อสารประกอบที่เป็นพิษ

3.2 การกำจัดสี Blue BCC

จากการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสี Blue BCC ความเข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า เม็ดบีดทรงรูปทั้ง 5 ชนิดสามารถกำจัดสีได้ดีตั้งแต่ระยะเวลาการกำจัดที่ 24 ชั่วโมง และกำจัดได้ดีขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นในทุกการทดลอง และสามารถกำจัดได้ดีที่สุดที่ระยะเวลา 144 ชั่วโมง โดย immobilized bacterial consortium PD-I beads มีประสิทธิภาพการกำจัดสี Blue BCC ได้ดีที่สุดเท่ากับร้อยละ 100.0 รองลงมาคือ immobilized bacterial consortium PD-II beads เท่ากับร้อยละ 99.2 Immobilized dead cell PD-II beads เท่ากับร้อยละ 96.3 ส่วน immobilized dead cell PD-I beads มีประสิทธิภาพการกำจัดสีเท่ากับร้อยละ 92.3 และ alginate gel beads เท่ากับร้อยละ 92.3 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งสรุปได้ว่า immobilized bacterial consortium beads สามารถกำจัดสีได้สูงกว่า immobilized dead cells beads และ alginate gel beads ตามลำดับ Tony และคณะ [2] ศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสีอะโซโดยใช้กลุ่มแบคทีเรียอิสระพบว่าที่ระดับความเข้มข้นสี Blue BCC เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร กลุ่มแบคทีเรียอิสระ SKB-I และ SKB-II สามารถกำจัดสีได้ร้อยละ 32.0 และ 45.0 ที่เวลา 120 ชั่วโมง ตามลำดับ Cheng และคณะ [25] เม็ดบีดทรงเซลล์ *B. vietnamiensis* ด้วย PVA-sodium alginate-kaolin มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีคริสตัลไวโอเลตกำจัดสีได้ร้อยละ 97.2 เซลล์อิสระกำจัดสีได้ร้อยละ 93.1 ที่เวลา 30 ชั่วโมง ส่วนเม็ดบีดควบคุม (ไม่มีเซลล์) สามารถกำจัดสีได้ร้อยละ 76.9

จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการกำจัดสีของ immobilized dead cells beads และ alginate gel beads เกิดจากการที่เม็ดบีดเกาะกับผนังเซลล์และอัลจินตซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์โดยอาศัยกลไกการดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) ส่วนประสิทธิภาพในการกำจัดสีของ immobilized bacterial consortium beads เกิดจากการย่อยสลายทางชีวภาพ (biological degradation) ร่วมกับกลไกการดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) ที่ผนังเซลล์และสารพอลิเมอร์อัลจินต Silveira และคณะ [27] รายงานว่ากลไกการย่อยสลายสีย้อมอะโซรวมกับการดูดซับเพื่อการจัดสีของแบคทีเรียเกิดขึ้นจากการที่แบคทีเรียเริ่มต้นดูดซับสีเข้าสู่เซลล์ภายในระยะเวลาสั้น ๆ จนกระทั่งถึงจุดอิ่มตัวของการดูดซับสี เซลล์จึงจะเริ่มกระบวนการย่อยสลายสีทางชีวภาพ Chen และคณะ [28] รายงานว่าประสิทธิภาพในการกำจัดสีของแบคทีเรียเกิดจากการที่เซลล์แบคทีเรียสร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทส (azoreductase) ใน

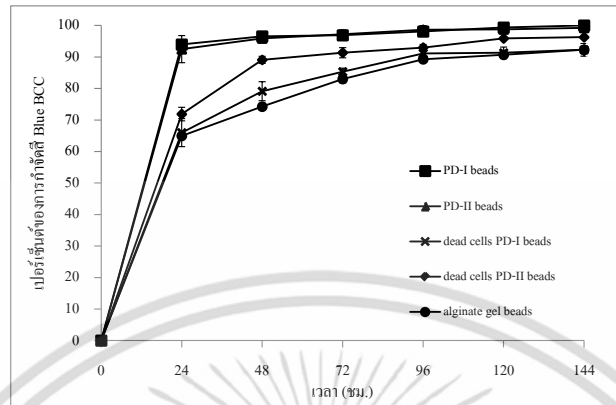
การเร่งปฏิกิริยาเพื่อย่อยสลายพันธะเอโซ ทำให้โมเลกุลของสีอะโซแตกออกและมีขนาดโมเลกุลเล็กลง มีผลทำให้ความเข้มข้นของสีในสารละลายลดลง

3.3 การกำจัดสี Congo red

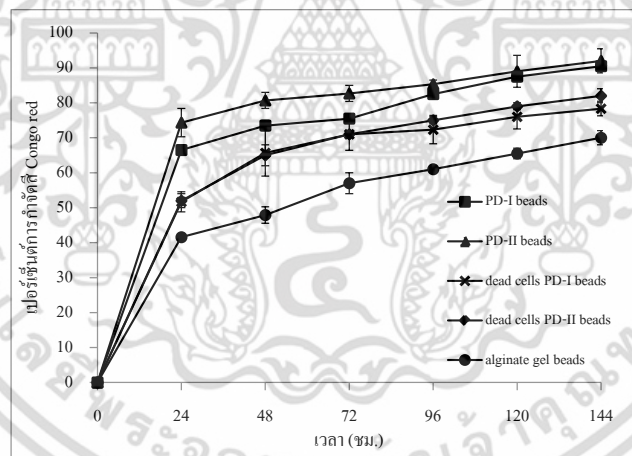
จากการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสี Congo red ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าที่เวลา 144 ชั่วโมง immobilized bacterial consortium PD-II beads สามารถกำจัดสี Congo red ได้ดีที่สุดเท่ากับร้อยละ 92.0 รองลงมาคือ immobilized bacterial consortium PD-I beads, immobilized dead cells PD-II beads, immobilized dead cells PD-I beads และ alginate gel beads โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีเท่ากับร้อยละ 90.5, 82.5, 78.3, 70.0 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2 จะเห็นว่า immobilized bacterial consortium beads สามารถกำจัดสีได้สูงกว่า immobilized dead cells beads และ alginate gel beads ตามลำดับ ประสิทธิภาพในการกำจัดสีของ immobilized dead cells beads และ alginate gel beads เกิดจากการที่เม็ดสียึดเกาะกับผนังเซลล์และอัลจินต โดยอาศัยกลไกการดูดซับทางกายภาพ [20] ซึ่งสังเกตได้จากสีของเม็ดสีที่เปลี่ยนไปตามสีย้อมที่ทำการกำจัด Tony และคณะ [2] ศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสีอะโซโดยใช้กลุ่มแบคทีเรียอิสระพบว่าที่ระดับความเข้มข้นสี Congo red เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร กลุ่มแบคทีเรียอิสระ SKB-I และ SKB-II สามารถกำจัดสีได้ร้อยละ 65.2 และ 71.0 ที่เวลา 120 ชั่วโมง ตามลำดับ

3.4 การกำจัดสี Golden yellow RNL

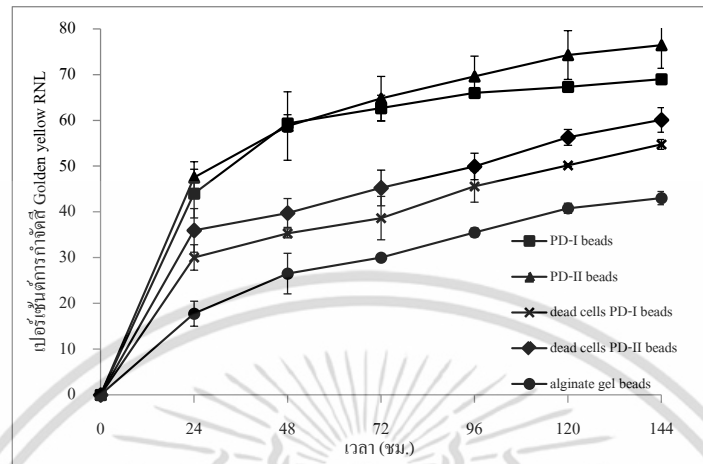
จากการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสี Golden yellow RNL ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าที่เวลา 144 ชั่วโมง immobilized bacterial consortium PD-II beads สามารถกำจัดสี Golden yellow RNL ได้ดีที่สุดเท่ากับร้อยละ 76.4 รองลงมาคือ immobilized bacterial consortium PD-I beads, immobilized dead cells PD-II beads, immobilized dead cells PD-I beads และ alginate gel beads โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีเท่ากับร้อยละ 69.0, 60.1, 54.8 และ 43.0 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3 จะเห็นว่า immobilized bacterial consortium beads, immobilized dead cells beads และ alginate gel beads มีประสิทธิภาพในการกำจัดสี Golden yellow RNL ได้ต่ำกว่าการกำจัดสี Blue BCC และ Congo red เนื่องจากโมเลกุลของสีย้อม Golden yellow RNL มีขนาดใหญ่ จึงเป็นปัญหาในเรื่องของการถ่ายเทมวลสาร (mass transfer) เข้าสู่ภายในเม็ดสี [21] ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดลดลง ด้วย Tony และคณะ [2] ได้ศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสีอะโซโดยใช้กลุ่มแบคทีเรีย พบว่าสามารถกำจัดสี Golden yellow RNL ได้เพียงเล็กน้อย แต่แบคทีเรียยังคงสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ แสดงให้เห็นว่าสี Golden yellow RNL ไม่เป็นพิษต่อแบคทีเรีย



รูปที่ 1. การกำจัดสี Blue BCC ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดย immobilized bacterial consortium PD-I beads, immobilized bacterial consortium PD-II beads, immobilized dead cells PD-I beads, immobilized dead cells PD-II beads และ alginate gel beads ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 144 ชั่วโมง ข้อมูลได้จากการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง และ error bars แสดงถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 2. การกำจัดสี Congo red ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดย immobilized bacterial consortium PD-I beads, immobilized bacterial consortium PD-II beads, immobilized dead cells PD-I beads, immobilized dead cells PD-II beads และ alginate gel beads ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 144 ชั่วโมง ข้อมูลได้จากการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง และ error bars แสดงถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 3. การกำจัดสี Golden yellow RNL ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดย immobilized bacterial consortium PD-I beads, immobilized bacterial consortium PD-II beads, immobilized dead cells PD-I beads, immobilized dead cells PD-II beads และ alginate gel beads ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 144 ชั่วโมง ข้อมูลได้จากการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง และ error bars แสดงถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 1. ประสิทธิภาพของการกำจัดสีอะโซ 3 ชนิด ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดย immobilized bacterial consortium PD-I beads, immobilized bacterial consortium PD-II beads, immobilized dead cells PD-I beads, immobilized dead cells PD-II beads และ alginate gel beads ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 144 ชั่วโมง

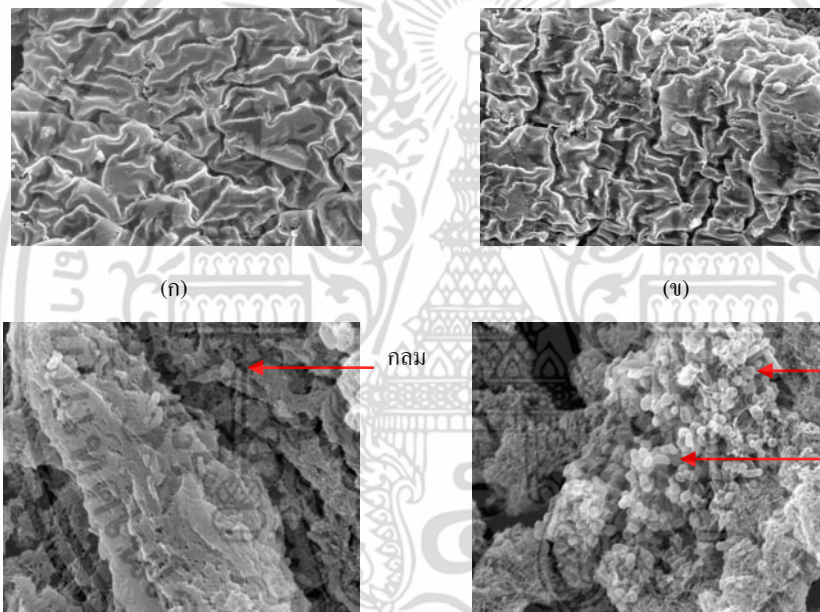
ชนิดของสี	ร้อยละการกำจัดสีอะโซ				
	Immobilized bacterial consortium PD-I beads	Immobilized bacterial consortium PD-II beads	Immobilized dead cells PD-I beads	Immobilized dead cells PD-II beads	Alginate gel beads
	Blue BCC	100.0±0.00	99.2±1.32	92.3±2.00	96.3±0.29
Congo red	90.5±0.05	92.0±3.46	78.3±2.08	82.0±2.00	70.0±2.00
Golden yellow RNL	69.0±0.47	76.4±5.04	54.8±1.06	60.1±2.61	43.0±1.45

3.5 การศึกษาลักษณะของเมดบีทด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

จากการศึกษาลักษณะของ alginate gel bead พบว่าพื้นผิวภายนอกของเมดบีททั้งก่อนและหลังการกำจัดสีอะโซมีลักษณะผิวเป็นคลื่นหยาบ พื้นผิวภายในของเมดบีทเป็นช่องโปร่งที่สามารถให้สีอะโซผ่านเข้าออกได้ ส่วนลักษณะของเมดบีท immobilized bacterial consortium beads ทั้งสองชนิดทั้งก่อนและหลัง

การกำจัดสีข้อม มีลักษณะพื้นผิวภายนอกเป็นคลื่นหยาบ ส่วนพื้นผิวภายในมีลักษณะเป็นช่อง โปร่งที่สามารถให้สีข้อมผ่านเข้าออกได้เพื่อการทำปฏิกิริยา และพบแบคทีเรียรูปร่างกลมและรูปร่างแท่งถูกตรึงอยู่ภายในเม็ดบีท ดังแสดงในรูปที่ 4

แบคทีเรียรูปร่างแบบกลมและแบบแท่ง ย้อมสีแกรมติดทั้งแกรมบวกและแกรมลบแสดงถึงจำนวนแบคทีเรียอย่างน้อย 2 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการกำจัดสีข้อมอะโซทั้ง 3 ชนิด โดยแต่ละสายพันธุ์จะย่อยสลายโมเลกุลสีที่แตกต่างกัน อาจใช้สารที่ผลิตร่วมกันที่มีอยู่ในสายพันธุ์สำหรับการย่อยสลาย [24, 29-31] ทำให้การย่อยสลายมีประสิทธิภาพสูงขึ้น เนื่องจากมีการทำงานร่วมกันระหว่างกิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายของสีอะโซ [5, 32]



รูปที่ 4. พื้นผิวของ immobilized bacterial consortium PD-II beads เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 7,500 เท่า แสดงลักษณะพื้นผิวภายนอก (ก) ก่อนการกำจัดสีข้อม (ข) หลังการกำจัดสีข้อม และแสดงลักษณะพื้นผิวภายใน (ค) ก่อนการกำจัดสีข้อม (ง) หลังการกำจัดสีข้อม

4. สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้นำอัลจินตมาใช้ในการตรึงกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานฟอกสีข้อมและโรงพยาบาลในการกำจัดสีข้อมอะโซ 3 ชนิด ผลการทดลองพบว่า immobilized bacterial consortium beads, immobilized dead cells beads และ alginate gel beads มีประสิทธิภาพในการกำจัด

สีอะโซทั้งสามชนิด แต่ immobilized bacterial consortium beads มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีอะโซมากกว่า immobilized dead cells beads และ alginate gel beads ทั้งนี้กลไกการกำจัดสีเกิดจากการย่อยสลายทางชีวภาพร่วมกับการดูดซับสีบางส่วนโดยเซลล์ที่ถูกตรึงและสารพอลิเมอร์ที่เคลือบผิวใน การกำจัดสีของ immobilized dead cells beads และ alginate gel beads เกิดจากกระบวนการดูดซับสีเซลล์ที่ถูกตรึงและสารพอลิเมอร์ ซึ่งงานศาสตร์ของการดูดซับสีและกิจกรรมการย่อยสลายของแบคทีเรียโดย เอนไซม์กำลังศึกษาในขั้นต่อไป เพื่อใช้อธิบายกิจกรรมของเซลล์ในการกำจัดสีอะโซร่วมกับการดูดซับทางกายภาพของเม็ดบีทอัลจินต

เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] Pearce, C.I., Lloyd, J.R. and Guthrie, J.T., 2003. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells. *Dyes Pigments*, 58, 179-196.
- [2] Tony, B.D., Goyal, D. and Khanna, S., 2009. Decolorization of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. *Inter. Biodeterio. Biodegrad.*, 63, 462-469.
- [3] Yoo, E.S., Libra, J. and Wiesmann, U., 2000. Reduction of azo dyes by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Wat. Sci. Technol.*, 1, 15-22.
- [4] Selvam, K., Swaminathan, K. and Keo, S.C., 2003. Microbial decolourization of azo dyes and dye industry effluent by *Fomes lividus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 591-593.
- [5] Yang, Q., Yang, M., Pritsch, K., Yediler, A. and Kettrup, A., 2003. Decolorization of synthetic dyes and production of manganese-dependent peroxidase by new fungal isolates. *Biotechnol. Lett.*, 25, 709-713.
- [6] Dave, S.R. and Dave, R.H., 2009. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* for acid red 119 dye decolorization. *Bioresource Technol.*, 100, 249-253.
- [7] Elisangila, E., Andrea, Z., Fabio, D.G., Cristiano, R.M., Regina, D.L. and Artur, C-P., 2009. Biodegradation of textile azo dyes by a facultative *Staphylococcus arlettae* strain VN-11 using a sequential microaerophilic/aerobic process. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 63, 280-288.
- [8] Sheth, N.T. and Dave, S.R., 2009. Optimization for enhanced decolorization and degradation of reactive red BS C.I. 111 by *Pseudomonas aeruginosa* NGKCTS. *Biodegr.*, 20, 827-836.
- [9] Celik, L., Öztürk, A. and Abdullah, M.I., 2012. Biodegradation of reactive red 195 azo dye by the bacterium *Rhodopseudomonas palustris* 51ATA. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 6, 120-126.

- [10] Liao, C-S., Hung, C-H. and Chao, S-L., 2013. Decolorization of azo dye reactive black B by *Bacillus cereus* strain HJ-1. *Chemosphere*, 90, 2109-2114.
- [11] Wuhrmann, K., Mechsner, K. and Kappeler, T., 1980. Investigation on rate-determining factor in the microbial reduction of azo dyes. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 9, 325-338.
- [12] Khehra, M.S., Saini, H.S., Sharma D.K., Chadha B.S. and Chimni, S.S., 2005. Decolorization of various azo dyes by bacterial consortia. *Dyes Pigments*, 67, 55-61.
- [13] Joshi, T., Iyengar, L., Singh, K. and Garg, S., 2008. Isolation, identification and application of novel bacterial consortium TJ-1 for the decolorisation of structurally different azo dyes. *Bioresource Technol.*, 99, 7115-7121.
- [14] Jain, K., Shah, V., Chapla, D. and Madamwar, D., 2012. Decolorization and degradation of azo dye-reactive violet 5R by an acclimatized indigenous bacterial mixed cultures-SB4 isolated from anthropogenic dye contaminated soil. *J. Hazard. Mater.*, 214, 378-386.
- [15] Cui, D., Li, G., Zhao, D., Gu, X., Wanh, C. and Zhao, M., 2012. Microbial community structures in mixed bacterial consortia for azo dye treatment under aerobic and anaerobic conditions. *J. Hazard. Mater.*, 222, 185-192.
- [16] Ha, J., Engler, C.R. and Wild, J.R., 2009. Biodegradation of coumaphos, chlorferon, and diethylthiophosphate using bacteria immobilized in Ca-alginate gel beads. *Bioresour. Technol.*, 100, 1138-1142.
- [17] Wang, J.L., 2002. *Microbial immobilization techniques and water pollution control*. Science Press. Beijing.
- [18] Ransay, J.A., Mok, W.H.W., Luu, Y.S. and Savage, M., 2005. Decoloration of textile dyes by alginate-immobilized *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, 61, 956-964.
- [19] Steffan, S.L., Bardi, L. and Marzona, M., 2005. Azo dye biodegradation by microbial cultures immobilized in alginate beads. *Environ. Int.*, 31, 201-205.
- [20] Chen, K-C., Wu, J-Y., Huang, C-C., Liang, Y-M. and Hwang, S-C. J., 2003. Decolorization of azo dye using PVA-immobilized microorganisms. *J. Biotechnol.*, 101, 241-252.
- [21] ประณี พัฒนพิพิธไพศาล. 2556. เอนไซม์เทคโนโลยี. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร. [Pranee Pattanapitpaisal. 2556. Enzyme Technology. Chulalongkorn University Press. Bangkok (in Thai)]

- [22] Wang, J.L., Ye, Y.C. and Wu, W.Z., 2000. The radial distribution and bioactivity of *Pseudomonas* sp. immobilized in calcium alginate beads. *Process Biochem.*, 3(5), 465-469.
- [23] Dominguez, A., Couto, S. and Sanroman, M.A., 2005. Dye decolorization by *Trametes hirsute* immobilized into alginate beads. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 405-409.
- [24] Saratale R.G., Saratale G.D., Chang J.S. and Govindwar S.P., 2009. Decolorization and degradation of reactive azo dyes by fixed bed bioreactors containing immobilization cells of *Proteus vulgaris* NCIM-2027. *Biotechnol. Bioproc. Engin.*, 16, 830-842.
- [25] Cheng, Y., Lin, H-Y., Chen, Z., Megharaj, M. and Naidu, R., 2012. Biodegradation of crystal violet using *Burkholderia vietnamiensis* CO9V immobilized on PVA-sodium alginate-kaolin gel beads. *Ecotox. Environ. Safe.*, 83, 108-114.
- [26] Pakshirajan, K. and Kheria, S., 2012. Continuous treatment of colored industry wastewater using immobilized *Phanerochaete chrysosporum* in a rotating biological contractor reactor. *J. Environ. Manage.*, 101, 118-123.
- [27] Silveira, E., Marques, P.P., Silva, S.S., Lima-Filho, J.L., Porto, A.L.F. and Tambourgi, E. B., 2009. Selection of *Pseudomonas* for industrial textile dyes decolourization. *Inter. Biodeterio. Biodegrad.*, 6(3), 230-235.
- [28] Chen, H., Hopper, S.L. and Cerniglia, C.E., 2005. Biochemical and molecular characterization of an azoreductase from *Staphylococcus aureus* a tetrameric NADPH- dependent flavoprotein. *Microbiol.*, 151, 1433-1441.
- [29] Chang, J.S., Chen, B.Y. and Lin, Y.S., 2004. Stimulation of bacterial decolorization of an azo dye by extracellular metabolites from *Escherichia coli* strain NO₃. *Bioresource. Technol.*, 91, 243-248.
- [30] Forgacs, E., Cserhati, T. and Oros, G., 2004. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environ. Int.*, 30, 953-971.
- [31] Jadhav, S.U., Jadhav, U.U., Dawkar, V.V. and Govindwar, V., 2008. Biodegradation of disperse dye brown 3REL by microbial consortium of *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360 and *Bacillus* sp. VUS. *Biotechnol. Bioproc. Engin.*, 13, 232-239.
- [32] Chen, B.Y. and Chang, J.S., 2007. Assessment upon species evolution of mixed consortia for azo dye decolorization. *J. Chinese Inst. Chem. Engin.*, 38, 259-266.