

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ระดับการประเมินคุณภาพ

☐ ดีเยี่ยม

☐ ดีมาก

☒ ดี

☐ ปานกลาง





การศึกษาประสิทธิภาพของแบบที่เรียนในการบำบัดน้ำเสีย
ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ

ธิดิณัฐ คำใจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักงานบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

สำนักงานบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ชื่อเรื่อง

การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสีย

ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ

โดย

ธิดิณัฐ คำใจ

พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐปน ชื่นบาล)

วันที่ 29 เดือน 10 พ.ศ. 2552

กรรมการที่ปรึกษา

สงวน จันทะ

(อาจารย์ ดร.ศิริภรณ์ ชื่นบาล)

วันที่ 24 เดือน 10 พ.ศ. 2552

กรรมการที่ปรึกษา

ปิยะ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์)

วันที่ 29 เดือน 10 พ.ศ. 2552

ประธานกรรมการประจำหลักสูตร

ปิยะ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์)

วันที่ 24 เดือน 10 พ.ศ. 2552

สำนักงานบัณฑิตศึกษารับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.เทพ พงษ์พานิช)

ประธานกรรมการบัณฑิตศึกษา

วันที่ 29 เดือน 10 พ.ศ. 2552

ชื่อเรื่อง	การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ
ชื่อผู้เขียน	นางสาวธิดิณัฐ คำใจ
ชื่อปริญญา	ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ประธานกรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จูปน ชื่นบาล

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีในน้ำเสียที่มีสี อะโซเป็นองค์ประกอบ จากการทดสอบในเบื้องต้น พบว่า แบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลท คือ Mju-20(1), Mju-20(2), Mju-20(3), Mju-17, LP-1 และ Mk-8 ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสี congo red โดยทำการทดสอบการเกิดบริเวณใสบนอาหารสูตร nutrient agar ที่มีสี congo red 0.2 กรัมต่อลิตร พบว่า แบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี จากนั้นทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียที่มีสี congo red เป็นองค์ประกอบในรูปเซลล์แขวนลอย พบว่า แบคทีเรีย Mk-8 มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีสูงสุดถึงร้อยละ 85.8 และกำจัดเอฟซีไอดีได้ร้อยละ 54.7 จากนั้นทำการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการกำจัดสี congo red พบว่า ที่พีเอช 7.0-7.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 และเมื่อเติม yeast extract ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและสี congo red 0.2 กรัมต่อลิตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการกำจัดสีของแบคทีเรีย ไอโซเลท Mk-8

การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย Mk-8 ที่ตรึงบนตัวกลางฝาชวดน้ำพลาสติก แผ่นพลาสติก หินภูเขาไฟ ซีโอไลท์ ฟองน้ำ โซเดียมแอลจิเนต โดยทำการตรึงเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า แบคทีเรีย Mk-8 ที่ตรึงบนหินภูเขาไฟให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสีสูงสุดคิดเป็นร้อยละ 67.6 รองลงมา คือ แบคทีเรีย Mk-8 ที่ตรึงบนฟองน้ำเท่ากับร้อยละ 66.5 ทำให้สามารถคัดเลือกตัวกลางหินภูเขาไฟและฟองน้ำมาใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป

ประสิทธิภาพของแบคทีเรียในรูปเซลล์แขวนลอยเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่ตรึงลงบนตัวกลางที่คัดเลือก พบว่า แบคทีเรียในรูปเซลล์แขวนลอยมีประสิทธิภาพการบำบัดดีกว่าเซลล์แบคทีเรียที่ตรึงบนตัวกลาง จากนั้นได้ทำการทดสอบการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมผ้าบาติก อ.ป่าซาง จ.ลำพูน ที่ทำการเจือจางน้ำเสียกับน้ำประปาในอัตราส่วน 50:50, 30:70, 20:80, 10:90 และ 5:95 โดยทำการทดลองในสภาวะไร้อากาศ เติม yeast extract ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก

ต่อปริมาตร พีเอช 7.0 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า ที่อัตราเจือจางน้ำเสียต่อน้ำประปาเท่ากับ 20:80 แบคทีเรียในรูปเซลล์แขวนลอย มีค่าการกำจัดที่ดีกว่าอัตราเจือจางอื่นๆ

เมื่อทำการจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต Mk-8 พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต Mk-8 เมื่อตรวจคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา การทดสอบทางชีวเคมีและ การใช้ชุดทดสอบ API 50 CH แบคทีเรียไอโซเลต Mk-8 มีคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายกับ *Bacillus subtilis* ร้อยละ 85.8 และมีลำดับเบสยีน 16S rRNA ที่คล้ายกับ *Bacillus subtilis* ร้อยละ 99.5

จากนั้นทำการทดสอบความเป็นพิษของน้ำที่ผ่านการบำบัดในสภาวะไร้อากาศด้วย *Bacillus subtilis*. Mk-8 พบว่า น้ำที่ผ่านการบำบัดในสภาวะไร้อากาศส่งผลให้ไรแดง (*Daphnia* sp.) ที่ทำการทดสอบมีอัตราการตายสูงแต่เมื่อมีการเติมออกซิเจนให้กับน้ำที่ผ่านการบำบัดในสภาวะไร้อากาศด้วยแบคทีเรีย พบว่า ไรแดงมีอัตราการตายลดลง

Title	A Study on Efficiency of Bacteria Used for Azo Dye Containing Wastewater Treatment
Author	Miss Thitinut Khumjai
Degree of	Master of Science in Biotechnology
Advisory Committee Chairperson	Assistant Professor Dr. Tapan Cheunbarn

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the efficiency of bacteria used for azo dye (congo red) containing wastewater treatment. From the primary tests, it was found that 6 bacterial isolates (Mju-20(1), Mju-20(2), Mju-20(3), Mju-17, LP-1 and Mk-8) could decolorize congo red. Then, bacteria by colonies on nutrient agar mixed with 0.2 g/L congo red was investigated. The finding showed that 6 bacteria isolates presented clear zone around colonies. Efficiency of Mk-8 suspended cell on decolorizing and FCOD (Filter Chemical Oxygen Demand) reducing were 82.8 and 54.7 percent, respectively. The optimum conditions for color removal were 2 percent yeast extract and 0.2 g/L azo dye, pH 7.0-7.5 and 37 °C.

Immobilized bacteria for 7 days biofilm formation using 6 materials (plastic cap, plastic, volcano rock, zeolite, sponge and sodium alginate bead) for lab scale anaerobic synthetic azo dye wastewater treatment was further studied. The finding showed that immobilized bacteria on volcano rock and sponge had a highest color removal efficiency (67.6 and 66.5 percent, respectively). The volcano rock and sponge were selected for continual experiment.

The comparison of suspended and immobilized bacteria for azo dye decolorization was studied. The finding showed that suspended bacteria had a higher color removal efficiency than immobilized bacteria (volcano rock and sponge). The suspended and immobilized bacteria were tried to decolorize real wastewater collected from batik factory at Pasang district, Lumphun province. Suspended and immobilized bacteria Mk-8 for real textile wastewater treatment was diluted for five dilution (50:50, 30:70, 20:80, 10:90 and 5:95) and done under anaerobic condition, mixed with 2 percent yeast extract, pH 7 at 37 °C for 7 days. It was found that dilution of wastewater at 20:80 (textile wastewater : tap water) had efficiency on

decolorizing better than other dilutions. Suspended bacteria showed higher color removal efficiency in real textile wastewater than immobilized bacteria.

The identification of Mk-8 isolate using API 50 CH and 16S rRNA sequencing technique was studied. It was found that Mk-8 isolate was *Bacillus subtilis* (85.5 and 99.5 percent, respectively).

Then, study on toxicity of wastewater after treatment by *Bacillus subtilis*. Mk-8 under anaerobic condition at 37 °C for 7 days. Result showed that *Daphnia* sp. after added in wastewater was high mortality. After adding oxygen into wastewater ; *Daphnia* sp. mortality was reduced.

Keywords : azo dye; decolorize; suspended bacteria; immobilized cell; FCOD (filter chemical oxygen demand)

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐปน ชื่นบาล ประธานกรรมการที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.ศิราภรณ์ ชื่นบาล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์ กรรมการที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา และสนับสนุนในเรื่องของอุปกรณ์ สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนให้คำแนะนำ ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำงานวิจัยนี้ ตลอดจนเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบคุณ โรงงานฟอกย้อมผ้า ต.แม่แรง อ.ป่าซาง จ.ลำพูน ที่เอื้อเพื่อนำเสื้อมีเป็นส่วนหนึ่งในงานวิจัย

เหนือสิ่งอื่นใด ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อธนู คำใจ คุณแม่ธัญกนก คำใจ คุณย่าญาติพี่น้องครอบครัวคำใจทุกคน ครอบครัวเลิศพล ดร.วิชาญ เลิศพล คุณแม่ไลลา อำนุจักชิ และคุณราเจส นาดีชัน ไลลา ที่คอยให้การสนับสนุน ให้ทุนการศึกษา ตลอดจนการอบรมสั่งสอนและให้กำลังใจในการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้เสมอมา

ข้าพเจ้าขอขอบคุณความคิดและสิ่งดีๆ ที่เกิดขึ้นจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ให้แก่ บิดา มารดา ครูบาอาจารย์และผู้มีอุปการคุณทุกท่าน สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าหวังว่าวิทยานิพนธ์เล่มนี้คงมีประโยชน์ต่อผู้ที่มีความสนใจไม่มากนัก

ธิดิณัฐ คำใจ

มิถุนายน 2552

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
สารบัญตาราง	(11)
สารบัญภาพ	(13)
สารบัญตารางผนวก	(16)
สารบัญภาพผนวก	(17)
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
กรอบแนวความคิด	3
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	4
น้ำเสียจากโรงงานย้อมผ้าและฟอกย้อม	4
ประเภทของสิ่งสกปรกเจือปนในน้ำเสีย	6
สีย้อม	6
การจำแนกสีย้อม	7
สารเคมีที่ใช้ช่วยในกระบวนการฟอกย้อม	9
สิ่งสกปรกเจือปนในเส้นใย	10
เส้นใย	11
สิ่งสกปรกเจือปนอื่น ๆ	11
ผลกระทบทางสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมสิ่งทอ	12
การบำบัดน้ำเสียจากโรงงานย้อมผ้า	13
วิธีการบำบัดทางกายภาพและทางเคมี	15
การบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ	17
ลักษณะของสีอะโซ	17

	หน้า
การกำจัดสื้อะโซโดยใช้แบคทีเรีย	19
กลไกในการกำจัดสื้อะโซโดยใช้แบคทีเรีย	19
ปัจจัยที่มีต่อการกำจัดสื้อะโซ	21
การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ในรูปเซลล์ตรึง	22
การใช้วัสดุตัวกลางในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย	23
การใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมในรูป เซลล์ตรึง	25
การใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมในรูป เซลล์แขวนลอยและการใช้เอนไซม์จากเซลล์จุลินทรีย์	27
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	30
อุปกรณ์ในการวิจัย	30
วิธีดำเนินการวิจัย	34
บทที่ 4 ผลและการอภิปรายผลการวิจัย	44
ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำ เสียสังเคราะห์ที่มีสื้อะโซเป็นองค์ประกอบ	44
ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต Mk-8	50
ผลการศึกษาการตรึงเซลล์แบคทีเรียลงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ	57
ผลการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ตรึงบนตัวกลาง ชนิดต่าง ๆ ในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสื้อะโซ เป็นองค์ประกอบเพื่อคัดเลือก ตัวกลางที่เหมาะสมใน การทดลองขั้นต่อไป	60
ผลการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ตรึงลงบนตัวกลางชนิด ต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเซลล์ แบคทีเรียในรูปเซลล์แขวนลอยใน การบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสื้อะโซเป็นองค์ประกอบในระดับ ห้องปฏิบัติการ	69

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ตรึงลงบนตัวกลางและ เปรียบเทียบกับแบคทีเรียในรูปเซลล์แขวนลอยในการบำบัดน้ำ เสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมบาติก อ.ป่าซาง จ.ลำพูน	72
ผลการจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต Mk-8	77
ผลการศึกษาผลของความเป็นพิษจากน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดด้วย แบคทีเรียแบบเซลล์แขวนลอย	85
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	88
สรุปผลการวิจัย	88
ข้อเสนอแนะ	90
บรรณานุกรม	91
ภาคผนวก	98
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม	99
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีและวิธีวิเคราะห์ COD	102
ภาคผนวก ค ตัวกลางชนิดที่ใช้ในการตรึงแบคทีเรียและลำดับเบส ของดีเอ็นเอในส่วน 16S rRNA	108
ภาคผนวก ง กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของน้ำเสีย	116
ภาคผนวก จ ประสิทธิภาพการกำจัดสีและการกำจัดเอฟซีไอดีของ แบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลตและลักษณะของน้ำเสียจากอุตสาหกรรม ฟอกย้อมที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรีย	118
ภาคผนวก ฉ ประวัติผู้วิจัย	122

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 ปริมาณของโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อมชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย ปี 2543-2547	5
2 สารอะโรมาติกเอมีนที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษและเป็นสารก่อมะเร็ง	13
3 ผลกระทบที่ได้จากการตรึงเซลล์สิ่งมีชีวิตลงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ	24
4 ปริมาณการใช้ตัวกลางที่ได้จากธรรมชาติในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ	25
5 คุณสมบัติของน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ	36
6 ขนาดและปริมาณของตัวกลางที่ใช้ในการทดลอง	38
7 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 ที่ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง	50
8 ผลความเข้มข้นที่เหมาะสมของ yeast extract ต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8	53
9 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำเสียสังเคราะห์ที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 แบบเซลล์แขวนลอยที่มีระดับความเข้มข้นของสีอะโซต่าง ๆ	56
10 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบของตัวกลางชนิด ต่าง ๆ	68
11 ลักษณะน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมผ้าบาติก อ.ป่าซาง จ.ลำพูน	72
12 ค่าเอฟซีไอดีของน้ำเสียก่อนและหลังบำบัดด้วยแบคทีเรียตรึงบนหินภูเขาไฟ	76
13 ค่าซีไอดีของน้ำเสียก่อนและหลังบำบัดด้วยแบคทีเรียแขวนลอย	76
14 ค่าซีไอดีของน้ำเสียก่อนและหลังบำบัดด้วยแบคทีเรียตรึงบนฟองน้ำ	77
15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 เทียบกับ <i>Bacillus</i> sp.	79
16 การจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 โดยการหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA	82
17 การทดสอบความเป็นพิษของน้ำที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8	86

ตาราง

หน้า

- 18 การทดสอบความเป็นพิษของน้ำที่ผ่านการเติมออกซิเจนเป็นระยะเวลา
12 ชั่วโมง

86



สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	ตัวอย่าง โครงสร้างของสีย้อมอะโซ	18
2	ขั้นตอนการสลายตัวของพันธะอะโซทำให้เกิดการลดสี	20
3	กลไกในการกำจัดสีอะโซโดยแบคทีเรีย	21
4	วิธีดำเนินการวิจัย	34
5	น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ	36
6	สี congo red ของบริษัท Fluka (India)	36
7	ลักษณะการเจริญบนอาหารสูตร nutrient agar ของแบคทีเรียไอโซเลท Mju-20(1), Mju-20(2), Mju-20(3), Mk-8, Lp-1 และ Mju-17	45
8	รูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียไอโซเลท Mju-20(1), Mju-20(2), Mju-20(3), Mju-17, Mk-8, และ Lp-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า	46
9	บริเวณสีที่เกิดจากการย่อยสลายสีอะโซของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลทบนอาหารสูตร nutrient agar ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ	47
10	การบำบัดน้ำเสียสีอะโซสังเคราะห์โดยนำเซลล์แบคทีเรีย Mk-8 ในรูปเซลล์แขวนลอยเทียบกับชุดควบคุม	48
11	ร้อยละการกำจัดสีอะโซในน้ำเสียสังเคราะห์โดยแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท	49
12	ร้อยละการกำจัดเอฟซีโอดีในน้ำเสียที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบโดยแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท	49
13	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 ในการกำจัดสีอะโซในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่าพีเอชต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน	51
14	สีของน้ำเสียที่ค่าพีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ หลังการบำบัดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 เป็นระยะเวลา 7 วัน	51
15	สีของน้ำเสียที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และ 7.5 หลังการบำบัดด้วยแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 เป็นระยะเวลา 7 วัน	52
16	ร้อยละการกำจัดสีอะโซในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มี yeast extract ความเข้มข้นต่าง ๆ ของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8	54

ภาพ		หน้า
17	ลักษณะของน้ำเสียสังเคราะห์ที่เติม yeast extract ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังการบำบัดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8	55
18	ลักษณะของตัวกลางที่ตรึงแบคทีเรียโดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร nutrient broth โดยทำการตรึงเป็นระยะเวลา 7,10 และ 14 วัน	58
19	ลักษณะแผ่นฟิล์มที่เกิดขึ้นในระหว่างการตรึงแบคทีเรียบนตัวกลาง	59
20	ร้อยละการกำจัดสีอะโซของแบคทีเรีย Mk-8 ที่ตรึงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ โดยทำการตรึงเป็นระยะเวลา 7,10 และ 14 วัน	60
21	น้ำเสียสังเคราะห์ที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรียตรึงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน	61
22	น้ำเสียสังเคราะห์ที่ผ่านการบำบัดด้วยตัวกลางชนิดต่าง ๆ ที่ไม่มีการตรึงเซลล์แบคทีเรีย	61
23	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ ในระยะเวลาต่าง ๆ ที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร ภายหลังจากการบำบัดด้วยแบคทีเรียที่ตรึงบนตัวกลาง	64
24	ร้อยละการกำจัดสีอะโซของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 ที่ตรึงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ	65
25	ประสิทธิภาพการกำจัดเอฟซีโอดีในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบของแบคทีเรีย Mk-8 ตรึงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ	67
26	ร้อยละการกำจัดเอฟซีโอดีของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 ที่ตรึงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ	67
27	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ ภายหลังจากเติมแบคทีเรียที่ตรึงลงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 ในรูปแขวนลอย	71
28	การกำจัดเอฟซีโอดีของแบคทีเรียที่ตรึงลงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 ในรูปแขวนลอยในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ	71
29	น้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมบาติก อ.ป่าซาง จ.ลำพูน	72
30	ลักษณะน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมบาติก อ.ป่าซาง จ. ลำพูน ที่ระดับการเจือจางต่าง ๆ	74

ภาพ	หน้า	
31	ลักษณะน้ำเสียอุตสาหกรรมฟอกย้อมบาติก อ.ป่าซาง จ. ลำพูน ที่อัตรา เจือจาง 20:80 ก่อนและหลังการบำบัดด้วยแบคทีเรีย Mk-8 แบบเซลล์ แขวนลอย	74
32	ร้อยละการกำจัดสีในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมบาติก อ.ป่าซาง จ. ลำพูน ของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 ที่ตรึงบนตัวกลางหินภูเขาไฟ ฟองน้ำ และในรูปเซลล์แขวนลอย	75
33	ลักษณะ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Mk- 8	78
34	ลักษณะของ <i>Bacillus</i> sp. Mk-8	80
35	ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ในส่วนของยีน 16S rRNA	82
36	ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8	83
37	ลำดับชื่อของแบคทีเรียที่มีลำดับเบสคล้ายแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8	84
38	ไรแดงที่ใช้ในการทดลอง	87
39	การเติมออกซิเจนในน้ำที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8	87

สารบัญตารางผนวก

ตารางผนวก

หน้า

- 1 ปริมาณน้ำตัวอย่างและรีเอเจนท์ที่เหมาะสมสำหรับหลอดย่อย
สลายขนาดต่าง ๆ 105
- 2 ประสิทธิภาพการกำจัดสีและการกำจัดเอฟซีไอของแบคทีเรีย
ทั้ง 6 ไอโซเลท 119

สารบัญภาพผนวก

ภาพผนวก	หน้า
1 กราฟมาตรฐานสำหรับใช้เตรียมน้ำเสียสังเคราะห์	107
2 ตัวกลางชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย	109
3 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไฮโซเลต Mk-8 ที่ได้จาก primer 27F	110
4 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไฮโซเลต Mk-8 ที่ได้จาก primer 520R	111
5 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไฮโซเลต Mk-8 ที่ได้จาก primer 357F	112
6 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไฮโซเลต Mk-8 ที่ได้จาก primer 1080R	113
7 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไฮโซเลต Mk-8 ที่ได้จาก primer 920F	114
8 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไฮโซเลต Mk-8 ที่ได้จาก primer 1522R	115
9 การดูดกลืนแสงสูงสุดของน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ	115
10 การดูดกลืนแสงสูงสุดของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมผ้าบาติก อ.ป่าซาง จ. ลำพูน	117
11 ลักษณะน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรีย Mk-8 ที่ตรึง บนหินภูเขาไฟในวันสุดท้ายของการทดลอง	119
12 ลักษณะน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรีย Mk-8 ที่ตรึงบนฟองน้ำในวันสุดท้ายของการทดลอง	120
13 ลักษณะน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรีย Mk-8 ในรูป เซลล์แขวนลอยในวันสุดท้ายของการทดลอง	120

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันปริมาณของน้ำเสียที่ได้จากอุตสาหกรรมฟอกย้อมมีจำนวนที่มากขึ้นทำให้ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม จากการปล่อยน้ำทิ้งของโรงงานฟอกย้อมลงสู่แหล่งน้ำโดยไม่ผ่านการบำบัดอย่างถูกต้อง เมื่อน้ำถูกปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติจะมีผลกระทบต่อแหล่งน้ำนั้น โดยจะก่อให้เกิดมลพิษทางน้ำ สาเหตุสำคัญ คือ สีย้อมที่ปะปนอยู่ในน้ำซึ่งสีจะเป็นตัวกั้นทางเดินของแสงลงสู่แหล่งน้ำจะทำให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำลดลงจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนก็ไม่สามารถที่จะทำการสลายพันธะหรือลดสีได้ เมื่อมีการสะสมในปริมาณมากจึงทำให้แหล่งน้ำนั้นเกิดการเน่าเสียและยังมีการตกค้างของสารพิษชนิดต่างๆ สีที่นิยมใช้ส่วนใหญ่เป็นสีสังเคราะห์เพราะมีความสามารถในการย้อมติดกับเส้นใยได้หลายชนิดและมีคุณภาพที่ดีกว่าสีจากธรรมชาติ ซึ่งสีประเภทนี้มักนิยมใช้กันทั้งในอุตสาหกรรมฟอกย้อมสิ่งทอ กระดาษ เครื่องหนัง อาหารและเครื่องสำอาง เป็นต้น (Kou et al., 2003) สีย้อมที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มอะโซ (Carliell et al., 1994) สีอะโซมีอยู่มากกว่า 100,000 ชนิดซึ่งเป็นที่รู้จักและใช้กันทั่วโลก สีอะโซประกอบด้วยพันธะที่เรียกว่า อะโซ ($R_2-N=N-R_2$) อาจมีเพียงหนึ่งพันธะ สองพันธะ หรือมากกว่าสองพันธะขึ้นอยู่กับสารประกอบชนิดต่างๆ ที่ประกอบอยู่ในโครงสร้างของสีนั้น ๆ ซึ่งส่วนใหญ่จะมีสารในกลุ่มอะโรมาติกและซัลโฟเนตประกอบอยู่ในโครงสร้าง สารในกลุ่มนี้มีผลต่อการยึดเกาะกับเส้นใยและทำให้เกิดความเข้มของสีขึ้น สีอะโซ นอกจากจะมีคุณสมบัติที่ดีแล้วยังมีราคาที่ถูกและง่ายต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมฟอกย้อมชนิดต่างๆ

การบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมสิ่งทอนี้มีหลายวิธี ได้แก่ โคแอกกูเลชันด้วยสารเคมี การดูดซับด้วย โอโซนเนชั่น เทคโนโลยีการใช้แผ่นเมมเบรน ไฟฟ้าเคมีและการบำบัดทางชีวภาพ เป็นต้น จากการบำบัดน้ำทิ้งสีด้วยวิธีการทางกายภาพและทางเคมีนั้นมักจะประสบปัญหาหลายด้าน เช่น งบประมาณราคาต้นทุนในการก่อสร้างมีราคาแพงและสลัดจ์ที่ได้จากการบำบัดมีปริมาณมากและยังคงความเป็นพิษสูง (Pearce et al., 2003) ยิ่งไปกว่านั้นสีอะโซเมื่อเกิดการสลายพันธะภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนจะทำให้เกิดสารไซโตทอกซิกหรือสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และมะเร็งต่อสิ่งมีชีวิต ในปัจจุบันงานทางด้านสิ่งแวดล้อมจะให้ความสำคัญในการบำบัดน้ำทิ้งโดยใช้วิธีทางชีวภาพเนื่องจากเป็นเทคโนโลยีสะอาด โดยเฉพาะน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมจะมีการบำบัดด้วยจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการกำจัดสีย้อม เช่น แบคทีเรียสายพันธุ์

Pseudomonas KF46, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas* sp. (Sani and Benegjee, 1999) เป็นต้น เชื้อรา ชนิด White Rot Fungi, Ligninolytic Fungi , *Pleurotus ostreatus* และ *Phanerochaete chrysosporium* (Guimaraes et al., 2002) ยีสต์และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Direk et al., 1999) แต่ ส่วนใหญ่งานวิจัยทั้งหลายจะศึกษาการกำจัดหรือย่อยสลายสิ่งข่มสิ่งทอชนิดอะโซจากแบคทีเรีย และเชื้อรามากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ (Kuo et al., 2003)

ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้จึงได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย สิ่งข่มสิ่งทอที่ทำการคัดแยกและทดสอบประสิทธิภาพในเบื้องต้นแล้วมาทำการตรึงลงบนตัวกลาง ชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นวิธีการการบำบัดทางชีวภาพวิธีการหนึ่งมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียจาก อุตสาหกรรมฟอกย้อมทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรม ย้อมสิ่งทอ
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงแบคทีเรียลงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ
3. เพื่อศึกษาความสามารถของแบคทีเรียที่ผ่านการตรึงลงบนตัวกลางในการบำบัด น้ำเสียจากอุตสาหกรรมย้อมสิ่งทอ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำแบคทีเรียที่ทำการตรึงลงบนตัวกลางและทดสอบประสิทธิภาพ แล้วไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมย้อมสิ่งทอทั้งในระดับอุตสาหกรรมขนาด ใหญ่และขนาดเล็ก รวมไปถึงอุตสาหกรรมฟอกย้อมของหมู่บ้านต่างๆ ได้
2. สามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับระบบบำบัดน้ำเสียประเภทอื่น ๆ ได้
3. สามารถลดการสูญเสียพลังงานลดต้นทุนทางเศรษฐศาสตร์ที่ใช้ในการเดิน ระบบบำบัดน้ำเสียได้
4. น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมย้อมสิ่งทอที่ผ่านการบำบัดแล้วจะมีประสิทธิภาพที่ สามารถปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ

กรอบแนวความคิด

ปัจจุบันอุตสาหกรรมที่มีการใช้สีสังเคราะห์เป็นส่วนหนึ่งในกระบวนการผลิต ยกตัวอย่างได้ เช่น อุตสาหกรรมฟอกย้อมสิ่งทอ กระดาษ เครื่องหนัง อาหารและเครื่องสำอาง เป็นต้น มีการขยายตัวเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก ทั้งในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ ขนาดย่อม รวมไปถึงอุตสาหกรรมที่ทำกันในระดับชุมชน ของเสียส่วนใหญ่ที่ได้จากอุตสาหกรรมเหล่านี้มักจะอยู่ในรูปของน้ำเสียที่มีองค์ประกอบของสีสังเคราะห์ในกลุ่มอะโซ เมื่อทำการปล่อยน้ำเสียที่มีองค์ประกอบของสีสังเคราะห์และสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการผลิตลงสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติ โดยตรงหรือผ่านการบำบัดที่ไม่ถูกต้องแล้วนั้นก็ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติโดยสีจะทำให้สภาพของลำน้ำมีการเปลี่ยนแปลง เมื่อมีการสะสมในปริมาณมากก็จะทำให้เกิดน้ำเน่าเสีย รวมไปถึงเมื่อมีการย่อยสลายตัวเองตามธรรมชาติของสีสังเคราะห์ก็จะมีสารพิษในแหล่งน้ำ นั้น ๆ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการป้องกันหรือควบคุมการปล่อยน้ำเสียจากอุตสาหกรรมที่มีการใช้สีสังเคราะห์ในกระบวนการผลิต โดยทำการบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีการที่เหมาะสมทั้งนี้จะเป็นการช่วยลดปัญหามลพิษที่อาจเกิดขึ้นได้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

น้ำเสียจากโรงงานย้อมผ้าและฟอกย้อม

อุตสาหกรรมฟอกย้อมสิ่งทอถือเป็นอุตสาหกรรมหนึ่งที่มีมานานหลายศตวรรษ เพราะมนุษย์มีความจำเป็นที่จะต้องสวมใส่เครื่องนุ่งห่ม ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งในปัจจัย 5 ในการดำรงชีวิตของมนุษย์ โดยสามารถที่จะยกตัวอย่างชนิดของโรงงานที่แตกต่างกันออกไป (ตาราง 1) ซึ่งปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมส่วนใหญ่เกิดจากการทิ้งน้ำเสีย น้ำเสียที่ได้จากการฟอกย้อมเกิดขึ้นเกือบทุกขั้นตอนของการฟอกย้อม ตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมผ้า การเตรียมสี และตกแต่งสำเร็จ โดยเฉพาะในการทำความสะอาดของแต่ละขั้นตอนจะมีการใช้น้ำในอัตราที่สูงมาก ซึ่งสิ่งที่สามารถพบได้ในน้ำเสียเสมอได้แก่ เศษเส้นใย เศษผ้า สารเคมี กรดด่าง ไขมัน สบู่ สีย้อมและตัวทำละลาย ดังนั้น จึงทำให้ปริมาณสารมลพิษในน้ำเสียมีปริมาณสูง และเป็นปัญหาคอสิ่งแวดล้อม (กาวิ, 2545)

สภาพการเกิดและการระบายน้ำเสียจะเริ่มจากอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในกระบวนการผลิตซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดที่ถ่ายน้ำเสียลงในรางระบายน้ำภายในโรงงานหลังจากนั้นน้ำเสียจะไหลเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานก่อนระบายทิ้งออกสู่แหล่งน้ำสาธารณะต่อไป ซึ่งน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมมีที่มาจากแหล่งต่าง ๆ ที่สำคัญ 6 แหล่งด้วยกัน คือ

1. น้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิตได้แก่ น้ำใช้ในการดำเนินการฟอกย้อม น้ำใช้ในส่วนนี้อาจจะมีการระเหยไปบ้างในระหว่างขั้นตอนการผลิตแต่ส่วนใหญ่จะถูกปล่อยออกมาเป็นน้ำเสียภายหลังการผลิต
2. น้ำที่ใช้ในขั้นตอนการฟอกย้อม น้ำในส่วนนี้จะปริมาณไม่มากนักแต่มีความเข้มข้นของสิ่งสกปรกเจือปนที่ค่อนข้างสูงน้ำที่ใช้ในการซักล้างภายหลังการฟอกย้อมน้ำในส่วนนี้จะมีปริมาณมาก แต่มีความเข้มข้นของสิ่งสกปรกเจือปนโดยส่วนรวมแล้วต่ำกว่าน้ำเสียในประเภทแรก
3. น้ำที่ใช้ในหม้อไอน้ำ ในกระบวนการฟอกย้อมมักจะมีการอาศัยไอน้ำเป็นตัวให้ความร้อนแก่น้ำที่ใช้ในกระบวนการและเป็นตัวให้ความร้อนในคู่อบไอน้ำ ถ้าไอน้ำที่ใช้ถูกปล่อยให้เย็นลงและกลั่นตัวใน ท่อไอน้ำก็จะได้น้ำที่สะอาดนำกลับมาใช้ใหม่ได้แต่ถ้าไอน้ำถูกส่งเข้าไปให้ความร้อนแก่สารละลายสีย้อมโดยตรง ก็จะเป็นการเพิ่มปริมาณของสารละลายสีย้อมและจะถูกรวบรวมเป็นน้ำเสียที่สกปรกที่สุด

4. น้ำที่ใช้ในการหล่อเย็น กระบวนการฟอกย้อม มีบ่อยครั้งที่ทางโรงงานจำเป็นต้องลดอุณหภูมิของสารละลายสีย้อมลงในเวลาอันสั้นโดยอาศัยการใช้น้ำหล่อเย็น น้ำหล่อเย็นนี้ส่วนใหญ่จะเป็นน้ำสะอาดสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้

5. น้ำที่ใช้ในการล้างเครื่องจักรและทำความสะอาดโรงงานน้ำส่วนนี้นับเป็นส่วนประกอบที่สำคัญส่วนหนึ่งของน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อมและบางกรณีเป็นน้ำเสียที่มีความสกปรกสูงมากด้วย เช่น น้ำล้างถังเตรียมสีย้อม เป็นต้น

6. น้ำจากแหล่งอื่น ๆ นอกจากน้ำเสียจากแหล่งต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นแล้วโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อมยังอาจมีน้ำเสียจากแหล่งอื่น ๆ อีก น้ำใช้ของคนงานหรือน้ำฝน เป็นต้น

ตาราง 1 ปริมาณของโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อมชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย ปี 2543-2547

ชนิดของ โรงงาน	ปี 2543		ปี 2544		ปี 2545		ปี 2546		ปี 2547	
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
Man-made										
fiber mills	17	0.4	17	0.4	18	0.4	18	0.4	17	0.4
Spring mills	148	3.2	149	3.3	150	3.3	154	3.4	152	3.4
Weaving	677	14.9	675	14.9	681	14.9	673	14.7	661	14.8
mills										
Knitting mills	631	13.8	657	14.5	664	14.5	675	14.7	658	14.7
Dyeing and										
painting mills	412	9	405	8.9	409	8.9	414	9	404	9
Clothing mills	2,672	58.6	2,641	58.1	2,648	57.9	2,658	57.9	2,588	57.8
Total textile	4,557	100	4,544	100	4,570	100	4,592	100	4,480	100
mills										

ที่มา: Textile industry division, (2005)

ประเภทของสิ่งสกปรกเจือปนในน้ำเสีย

สารเคมีที่ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกย้อมนั้นมีทั้งสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ ตัวอย่างของสารอนินทรีย์ เช่น ค่างและกรดอนินทรีย์ ได้แก่ โซเดียมซิลิเกต ($2\text{Na}_2\text{OSiO}_2$) โซเดียมซัลไฟด์ (Na_2S) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_3) และสารฟอกขาวธรรมชาติ ส่วนสารอินทรีย์นั้นมีการใช้อย่างกว้างขวาง ซึ่งประกอบด้วย กรดอินทรีย์ เช่น กรดฟอร์มิก (HCOOH) กรดอะซิติก (CH_3COOH) กรดไขมัน พวกสบู่ แป้ง สารอินทรีย์ที่ใช้แทนแป้ง ผงซักฟอก สารที่ทำให้นุ่ม สีย้อม สารนำพาและสารเคมีอื่นๆ อีก เช่น สารที่ป้องกันการซึมของน้ำ สารกันเชื้อรา สารกันไฟ ซึ่งล้วนแต่นำมาใช้ให้เป็นประโยชน์ต่อผ้า ระหว่างกระบวนการตกแต่งสำเร็จทั้งสิ้น

สารเคมีบางตัวอาจมีค่าบีโอดีสูง ซึ่งในขณะเดียวกันสารเคมีอื่น ๆ ที่มีค่าบีโอดีต่ำ และมีคุณสมบัติคล้ายกันก็สามารถนำมาใช้ทดแทนกันได้ จึงนิยมใช้สารเคมีที่มีค่าบีโอดีต่ำ เช่น การใช้ carboxylmethyl cellulose แทนแป้ง ซึ่งมีประโยชน์และไม่เป็นอันตรายหรือหาทางกำจัดออกไปได้ง่ายโดยวิธีทางเคมีหรือทางฟิสิกส์ แต่ทั้งนี้อาจจะมีสารเคมีบางตัวที่ใช้ทดแทนแล้วทำให้เกิดผลต่อเนื่อง ซึ่งเป็นผลเสียหายนต่อสัตว์น้ำหรือการใช้น้ำในอนาคตและทำให้ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากขึ้น

เมื่อนำน้ำไปใช้ไปผ่านกระบวนการผลิตในขั้นตอนต่าง ๆ ซึ่งในแต่ละขั้นตอนนั้น จะมีการใช้สารเคมีหลายชนิดและปริมาณต่าง ๆ กัน หลังจากนั้นน้ำใช้ผ่านเข้าไปในกระบวนการผลิตแล้วจะกลายเป็นน้ำเสียซึ่งจะต้องนำไปปรับปรุงให้มีคุณภาพที่เหมาะสมก่อนที่จะปล่อยสู่แหล่งน้ำสาธารณะ โดยน้ำเสียที่ได้จากกระบวนการฟอกย้อมนั้นมีสิ่งสกปรกเจือปนอยู่มากมายหลายประเภท ซึ่งอาจจะจำแนกออกเป็นประเภทที่สำคัญ ๆ ได้ดังนี้ คือ

สีย้อม

สีย้อมมีมากมายหลายชนิดการนำสีย้อมมาใช้ประโยชน์ให้ได้ผลดีนั้นขึ้นอยู่กับอำนาจการรวมตัวของสีกับเส้นใยซึ่งต้องมียามากกว่าอำนาจการรวมตัวของสีกับน้ำ การเกิดสภาวะนี้เมื่อโมเลกุลสีย้อมมีหมู่อะตอมที่ถูกเรียงตัวกันในลักษณะที่ทำให้เกิดการดูดซับกับเส้นใยแล้วเกิดพันธะยึดกันแน่น พันธะที่มีอิทธิพลทำให้เกิดการดูดติดกับเส้นใยได้ (กาวิ, 2545) คือ

1. พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond)
2. แรงแวนเดอร์วาลส์ (van der waal's forces)

3. แรงไอออน (ionic forces)

4. พันธะโควาเลนต์ (covalent bond)

การดูดติดกันของโมเลกุลของสีย้อมกับโมเลกุลของเส้นใยอย่างน้อยจะต้องประกอบไปด้วยพันธะหรือแรงข้างต้น ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป บางครั้งอาจจะเกิดทั้ง 4 ชนิดผสมผสานกันไป แรงดึงดูดทางเคมีที่ทำให้เกิดการยึดติดได้ดีที่สุดได้แก่ พันธะโควาเลนต์ นอกจากพันธะและแรงทั้ง 4 ชนิดแล้วอิทธิพลของรูปร่างและขนาดโมเลกุลของสีย้อมก็มีผลต่อการยึดติดหรือมีผลกระทบต่อการใช้ย้อมอย่างมากด้วย

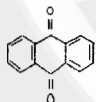
การจำแนกสีย้อม

สีย้อมสิ่งทอแบ่งตามลักษณะกายภาพเป็น 2 ชนิด ชนิดหนึ่งละลายน้ำได้ เรียกว่า สีย้อม (dye) อีกชนิดหนึ่งไม่ละลายน้ำเรียกว่าพิกเมนต์ (pigment) แต่การจำแนกสีย้อมอาจจำแนกได้หลักๆ 2 วิธี ดังนี้

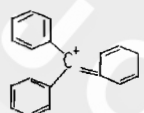
การจำแนกประเภทตามโครงสร้างทางเคมี

1. สียอะโซ (azo dye) มีกลุ่ม $-N=N-$ เป็นโครงสร้างสำคัญในโมเลกุล

2. สียแอนทราควิโนน (anthraquinone dye)

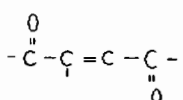
มีกลุ่ม  เป็นโครงสร้างสำคัญในโมเลกุล

3. สียไตรฟีนิลมีเทน (triphenylmethane dye)

มีกลุ่ม  เป็นโครงสร้างสำคัญในโมเลกุล

4. สียซัลเฟอร์ (sulphur dye) มีกลุ่ม D-S-S-D เป็นโครงสร้างสำคัญในโมเลกุล

5. สียอินดิโกอยด์ (indigoids)

มีกลุ่ม  เป็นโครงสร้างสำคัญในโมเลกุล

การจำแนกประเภทสีย้อมตามกรรมวิธีการย้อม

1. สีย้อมกรด (acid dye) คือ สีย้อมซึ่งเมื่อละลายในน้ำแล้วโมเลกุลของสีจะมีประจุลบและมักใช้ย้อมในน้ำย้อมที่มีความเป็นกรดใช้ย้อมเส้นใยโปรตีนและไนลอนได้ดี การเกาะติดของสีย้อมประเภทนี้ในเส้นใยอาศัยแรงดึงดูดระหว่างประจุลบบนโมเลกุลของสีกับประจุบวกบนโมเลกุลบนเส้นใยเป็นสำคัญ สิกลุ่มนี้มักจะมีกลุ่มซัลโฟนิค (sulphonic group) ซึ่งให้ประจุลบในน้ำ

2. สีย้อมเบส (basic dye) คือ สีย้อมซึ่งเมื่อละลายน้ำโมเลกุลสีจะมีประจุบวก ใช้ย้อมเส้นใยอะคริลิก โปรตีน และไนลอนได้ดี การเกาะติดของสีย้อมประเภทนี้ในเส้นใยอาศัยแรงดึงดูดระหว่างประจุบวกบนสีย้อมกับประจุบนเส้นใยเป็นสำคัญ

3. สีย้อมตรง (direct dye) คือ สีย้อมซึ่งเมื่อละลายในน้ำแล้วโมเลกุลสีจะมีประจุลบ ใช้ย้อมพวกเส้นใยเซลลูโลสได้ดีและโดยปกติในการย้อมมักจะต้องใช้สารพวกอิลเลกโทรไลต์ เช่น โซเดียมคลอไรด์ลงไปช่วยในการย้อมด้วย การเกาะติดบนโมเลกุลของเส้นใยอาศัยแรงดึงดูด แวนเดอร์วาลส์

4. สีย้อมแอคทีฟ (reactive dye) คือ สีย้อมที่สามารถทำปฏิกิริยาทางเคมีกับเส้นใยทำให้เกาะติดอยู่กับโมเลกุลของเส้นใยได้โดยพันธะโควาเลนต์ ส่วนใหญ่ใช้ย้อมเส้นใยเซลลูโลส

5. สีย้อมกระจาย (disperse dye) คือ สีย้อมที่มีการละลายน้ำได้ต่ำใช้ย้อมเส้นใยที่มีการดูดซึมน้ำน้อย (hydrophobic fibers) โดยเฉพาะพวกเส้นใยสังเคราะห์ต่าง ๆ ได้ดี ในน้ำย้อมสีส่วนใหญ่จะไม่ละลายในน้ำแต่จะอยู่ในน้ำย้อมในลักษณะของสารกระจาย

6. สีย้อมแวท (vat dye) คือ สีย้อมที่ไม่ละลายน้ำที่มีกลุ่มคีโตน (ketone group ; $C=O$) อยู่ ปกติใช้ย้อมเส้นใยเส้นฝ้ายเป็นส่วนใหญ่ ในการย้อมจะต้องนำสีย้อมมาทำปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ให้อยู่ในรูปที่ละลายได้ในน้ำที่มีความเป็นด่างเพื่อให้ดูดซึมเข้าไปในเส้นใยได้เมื่อเข้าไปอยู่ในเส้นใยจึงทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ให้กลับไปอยู่ในรูปสารละลายน้ำไม่ได้ ด้วยวิธีนี้สีย้อมจะมีความติดทนอยู่ในเส้นใย ไม่ให้หลุดกลับออกมาในการซัก

7. สีย้อมซัลเฟอร์ (sulphur dye) คือ สีย้อมที่ไม่ละลายในน้ำและมีซัลเฟอร์เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างที่ทำให้เกิดสี ใช้ในการย้อมเส้นใยฝ้ายเป็นส่วนใหญ่ วิธีย้อมคล้ายกับสีย้อมแวท (vat dye) กล่าวคือ ก่อนย้อมจะต้องนำไปทำปฏิกิริยาให้กลับไปอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ก่อน เมื่อย้อมเสร็จแล้วจึงทำปฏิกิริยาให้กลับไปอยู่ในรูปเดิมที่ไม่ละลายน้ำเพื่อเป็นการลดขั้นตอนในการย้อมได้มีการเตรียมสีย้อมซัลเฟอร์ที่ละลายน้ำได้ในทำนองเดียวกับสีย้อมแวท (vat dye) สีพวกนี้สามารถละลายน้ำได้เลย และเมื่อย้อมเสร็จจึงนำไปทำปฏิกิริยาให้กลับไปอยู่ในรูปเดิม

8. สีมอร์แดง (mordant dye) คือ สีย้อมที่เกาะติดอยู่ภายในเส้นใยในลักษณะของสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะส่วนใหญ่ใช้ในการย้อมเส้นใยโปรตีนและไนลอน การย้อมในขั้นตอนแรกเป็นไปอย่างธรรมดาคล้ายการย้อมด้วยสีแอซิดแต่เมื่อเสร็จแล้วจะต้องนำไปทำปฏิกิริยากับสารละลายของเกลือโลหะ เช่น เกลือของโครเมียม เพื่อให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขึ้นบนเส้นใย

9. สีอะโซอิก (azoic dye) คือ สีย้อมที่ไม่ละลายน้ำที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นภายในเส้นใยด้วยการทำปฏิกิริยา coupling reaction ระหว่างเกลือไดอะโซเนียมกับสารประกอบที่เหมาะสมเกิดเป็นสีย้อมที่มีสูตรโครงสร้างของสีอะโซในการย้อมตัวทำปฏิกิริยาทั้งสองจะถูกย้อมเข้าไปในเส้นใยก่อนทำปฏิกิริยากัน เกิดเป็นสีย้อมภายในเส้นใยสีย้อมประเภทนี้นิยมใช้กับการย้อมใยฝ้ายมากที่สุด

10. สีออกซิเดชัน (oxidation dyes) คือ สีย้อมที่สามารถถูกออกซิไดซ์ให้อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ภายหลังที่ได้ย้อมให้เข้าไปเกาะติดเส้นใยแล้ว ส่วนใหญ่ใช้ในการย้อมเส้นฝ้าย

11. สีอินเกรน (ingrain dye) คือ สีย้อมที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นในเส้นใยด้วยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารกลาง (intermediate) ในเส้นใย นอกจากพวกที่เป็นสีอะโซอิก ได้แก่ สีรอลโซยานินซึ่งใช้ย้อมเส้นใยฝ้ายเป็นส่วนใหญ่

สารเคมีที่ช่วยในกระบวนการฟอกย้อม

สารช่วยย้อมถือเป็นสิ่งจำเป็นในกระบวนการย้อมเนื่องจากเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาให้สีซึมเข้าไปภายในเส้นใยได้เร็วขึ้นและทำให้สีติดทนทานสม่ำเสมอ สารช่วยย้อมที่สำคัญและใช้มากมีอยู่ 7 ชนิด ดังนี้

1. กรด ใช้สำหรับย้อมใยโปรตีนและไนลอนด้วยสีแอซิดทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายสีทำให้ประจุไฟฟ้าลบในเส้นใยน้อยลงและเพิ่มประจุไฟฟ้าบวก แอนไอออนจึงสามารถเข้าไปติดภายในเส้นใยได้ ตัวสีที่ดูดซึมน้อยต้องเพิ่มกรดให้มากขึ้นทำให้ตัวสีซึมกระจายตัวจากส่วนที่ติดสีมากไปยังส่วนที่ติดสีน้อยทำให้ย้อมได้สีสม่ำเสมอ สีประเภทนี้ต้องการกรดแก่เพื่อสามารถซึมเข้าไปภายในเส้นใยได้มากขึ้น

2. ค่าง ใช้สำหรับช่วยย้อมใยเซลลูโลสด้วยสีอะโซอิก (azoic dye) แวท (vat dye) กำมะถันและรีแอคทีฟ สีแวท และสีกำมะถันต้องย้อมที่เป็นค่างแก่และมีสารรีดิวซ์รวมอยู่ด้วย สีอะโซอิกละลายในค่างแก่ (โซดาไฟ) ส่วนสีรีแอคทีฟใช้ค่างอ่อน (โซเดียมคาร์บอเนต) ทำหน้าที่ให้โมเลกุลของสีทำปฏิกิริยาติดติดกับโมเลกุลของใยเซลลูโลสได้ดียิ่งขึ้น

3. เกลือ ใช้สำหรับช่วยข้อมโยชนสัตว์ด้วยสีแอซิดหรือสีเวท

4. สารที่ทำให้สีสม่ำเสมอเป็นสารที่ช่วยลดคุณสมบัติการดูดติดเส้นโยของสีให้ช้าลง ทำให้สีติดเส้นโยสม่ำเสมอ สารประกอบที่มีคุณสมบัติเช่นนี้ เรียกว่า surface active leveling agent ปฏิกริยาของสารนี้แบ่งออกเป็น 2 ชั้น สารประเภทนี้เป็นสารที่ดูดติดเส้นโยได้ง่าย ในขั้นต้นจึงแข่งขันกันซึมเข้าไปภายในเส้นโย ดังจะเห็นได้จากการข้อมชนสัตว์หรือในลอนที่สีดูดติดเส้นโยได้เร็วมาก ขณะเดียวกันสารเคมีนี้จะไปเพิ่มพลังงานให้แก่สีข้อมเพื่อรักษาสภาพเดิมของตัวสีไว้ไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำรวมตัวกันเป็นสารประกอบสมบูรณ์ชนิดใหม่จึงทำให้สีรวมกับเส้นโยได้ช้าลง

5. สารพา (carriers) เป็นสารที่มีคุณสมบัติทำให้สารข้อมสีซึมได้แม้ใช้กระบวนการข้อมปกติโดยมากใช้เป็นสารช่วยในการข้อมโยโพลีเอสเตอร์ทำหน้าที่ได้โดยดูดติดอยู่ที่ผิวเส้นโยก่อนเมื่อสีเข้าไปติดตัวสีจะละลายเส้นโยจะดูดสีไว้ได้มากขึ้นระดับการติดสีจะเพิ่มขึ้น

6. สารละลายอินทรีย์ใช้เป็นสารช่วยข้อมชนสัตว์และในลอนในกรณีทีสีข้อมละลายน้ำได้น้อย จะทำให้การข้อมได้ผลดีขึ้น รวดเร็วขึ้นและเส้นโยจะมีลักษณะดีกว่าการข้อมตามปกติ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารละลายอินทรีย์สามารถก่อเป็นเยื่อบาง ๆ ภายในเส้นโยได้อย่างรวดเร็วทำให้สีซึมผ่านเข้าไปติดเส้นโยได้เร็วขึ้น

7. สารรีดิวซ์ใช้กับสีที่ไม่ละลายน้ำ โดยจะทำให้โมเลกุลของสีมีขนาดเล็กลงจนสามารถซึมผ่านเข้าไปในช่องว่างของเส้นโยได้ สารรีดิวซ์โดยส่วนใหญ่จะเป็นสารประกอบโซเดียมและสารตัวอื่นช่วยให้ละลายน้ำได้ดีขึ้น เมื่อข้อมเรียบร้อยแล้วต้องทำให้ตัวสีนั้นกลับเป็นตัวสีที่ไม่ละลายน้ำตามเดิม

สิ่งสกปรกเจือปนในเส้นโย

วัสดุสิ่งทอที่ถูกลำเลียดผ่านกระบวนการฟอกข้อมล้วนแต่มีสิ่งสกปรกเจือปนมาบ้างไม่มากก็น้อย โดยทั่วไปเส้นโยธรรมชาติจะมีสิ่งสกปรกเจือปนสูงกว่าเส้นโยสังเคราะห์ เพราะนอกจากจะมีสิ่งสกปรกเจือปนที่ติดมาในระหว่างการผลิตแล้วยังมีสิ่งสกปรกเจือปนที่ติดมากับธรรมชาติซึ่งมีปริมาณค่อนข้างมาก เช่น เส้นโยขนแกะมีสิ่งสกปรกเจือปนที่ติดมากับธรรมชาติที่ต้องขจัดออกไปในขั้นตอนการเตรียมผ้าถึง 10 เปอร์เซ็นต์ สิ่งสกปรกเจือปนเหล่านี้มีทั้งที่เป็นสารจีฟี่ง ไขมัน โปรตีน ตลอดจนสารประกอบโลหะต่าง ๆ นอกจากนี้ในกระบวนการผลิตก็ยังมีสารเคมีต่าง ๆ ลงไปในเส้นโยด้วย เช่น สารพวกหล่อลื่นและแป้งที่ใช้ในการลงแป้งเส้นด้ายขึ้นเป็นต้น สิ่งสกปรกเจือปนเหล่านี้จะถูกขจัดออกจากเส้นโยในขั้นตอนการเตรียมผ้าก่อนการฟอกข้อมและจะหลุดติดมาในน้ำเสียจากขั้นตอนการเตรียมผ้า (จันทิคาและวิราภรณ์, 2544)

เส้นใย

ในน้ำเสียจากระบวนการฟอกย้อมมีองค์ประกอบอันหนึ่งที่จะหลีกเลี่ยงไม่ได้ คือ เส้นใยที่หลุดออกมาเศษเส้นใยนี้หากมีปริมาณมากก็อาจจะทำให้เกิดปัญหาการอุดตันของน้ำเสียในเครื่องย้อมได้ นอกจากนี้ในกรณีของเส้นใยโพลีเอสเตอร์ยังมีสาร โอลิโกเมอร์ (oligomer) ที่อาจหลุดออกมาจากเส้นใยและปะปนในน้ำเสียด้วย (จันทิดาและวิราภรณ์, 2544)

สิ่งสกปรกเจือปนอื่น ๆ

นอกจากสิ่งสกปรกเจือปนต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นแล้ว น้ำเสียจากระบวนการฟอกย้อมยังอาจมีสิ่งสกปรกเจือปนชนิดอื่น ๆ อีก เช่น สารเคมีพิเศษที่ใช้ในการขจัดรอยเปื้อนบนผ้า ซึ่งมักจะมีสารประกอบพวก chlorinated benzene พวกสารเคมีที่ใช้ในการล้างเครื่องเหล่านี้ เป็นต้น ซึ่งสารเคมีบางตัวก็จะมีผลอย่างมากต่อลักษณะของน้ำเสียในภายหลังจากที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าสิ่งสกปรกเจือปนในน้ำเสียจากระบวนการฟอกย้อมมีความหลากหลายอย่างยิ่งในแง่ขององค์ประกอบทางเคมี แต่น้ำเสียจากอุตสาหกรรมประเภทนี้ก็ยังมีข้อดีอยู่บ้างตรงที่สารส่วนใหญ่เป็นสารที่ง่ายต่อการบำบัด และมีค่าความเป็นพิษต่ำ (จันทิดาและวิราภรณ์, 2544)

ปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะสมบัติของน้ำเสีย

น้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อม กล่าวได้ว่าเป็นน้ำเสียที่มีความหลากหลายเป็นอย่างยิ่งในส่วนประกอบของสิ่งสกปรกเจือปนในน้ำเสีย ซึ่งแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญคือ

1. กระบวนการฟอกย้อมผลิตภัณฑ์
2. ชนิดของสารลงแป้งบนผ้าทอ
3. ชนิดความสกปรกของเส้นใย
4. ชนิดสีย้อมและกรรมวิธีการย้อมเส้นใย

ผลกระทบทางสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมสิ่งทอ

น้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมจะมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์และสารเคมีชนิดต่างๆเป็นจำนวนมาก ปัจจุบันมีจำนวนของสีย้อมที่ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกย้อมสิ่งทอทั่วโลกมากกว่า 10,000 สี ซึ่งสีเหล่านี้จะมีการตกค้างและปนเปื้อนอยู่เป็นจำนวนในน้ำเสียที่ได้จากกระบวนการผลิต (กาวิ, 2545) จึงเป็นที่มาของปัญหาสิ่งแวดล้อม ดังนี้

1. มีความหนืดของสภาพลำนํ้าสูงถึงแม้ว่าจะมีการปนเปื้อนของปริมาณสีเพียง 10-15 พีพีเอ็ม ทั้งนี้ยังทำให้เกิดสภาพที่ไม่น่ามองตามแหล่งน้ำ
2. เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงตามธรรมชาติของสีจะทำให้เกิดสารพิษและสารที่ก่อให้เกิดมะเร็งแสดงในตาราง 2 สีส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมเป็นสีที่ได้รับการสังเคราะห์ขึ้น โดยจะมีองค์ประกอบของสารในกลุ่มของเบนซีนและสารอะโรมาติกเอมีนชนิดอื่น ๆ ซึ่งสารเหล่านี้จะเกิดขึ้นหลังจากที่มีการทำปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายภายใต้สภาวะแอโรบิก จึงทำให้เกิดการสะสมของสารพิษในแหล่งน้ำ
3. ความโปร่งแสงของแหล่งน้ำลดลงจึงส่งผลกระทบโดยตรงต่อสิ่งมีชีวิตที่ดำรงชีวิตอยู่ในแหล่งน้ำ เช่น สิ่งมีชีวิตที่ต้องใช้แสงในการสังเคราะห์อาหาร รวมไปถึงทำลายระบบนิเวศของสัตว์น้ำ เป็นต้น
4. ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในน้ำมีปริมาณลดน้อยลงซึ่งส่งผลกระทบโดยตรงต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ

ตาราง 2 สารอะโรมาติกเอมีนที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษและเป็นสารก่อมะเร็ง

สารอะโรมาติกเอมีน
<i>o</i> -Aminoazotoluene
4-Amiobiphenyl
Benzidine
<i>p</i> -Chloroaniline
4-Chloro- <i>o</i> -toluidine
3,3'-Dichlorobenzidine
3,3'-Dimethoxybenzidine
3,3'-Dimethylbenzidine
4-Methoxy- <i>m</i> -phenylenediamine
6-Methoxy- <i>m</i> -toluidine
4,4'-Methylenebis (2-Chloroaniline)
4,4'-Methylenedianiline
4,4'-Methylenedi- <i>o</i> -toluidine
4-Methyl- <i>m</i> -phenylenediamine
2-Naphthylamine
5-nitro- <i>o</i> -toluidine
4,4'-Oxydianiline
4,4'-Thiodaniline
<i>o</i> -Toluidine
2,4,5-Trimethylaniline

ที่มา: Reife et al. (1999)

การบำบัดน้ำเสียจากโรงงานย้อมผ้า

น้ำเสียจากอุตสาหกรรมการย้อมผ้าจะพบว่าจะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น เนื่องมาจากการขยายตัวของตลาดอุตสาหกรรมสิ่งทอ โดยสังเกตจากปริมาณการสั่งซื้อสีที่มีการเพิ่มขึ้นทำให้มีความตระหนักและความพยายามในการหาวิธีการบำบัดและกำจัดน้ำเสียที่เหลือจากอุตสาหกรรม

การข้อมผ้าเพราะสีที่เหลือจากการข้อมเป็นสิ่งที่สร้างปัญหา โดยพบว่าในกระบวนการข้อมผ้าสีที่มีปริมาณมากกว่าร้อยละ 50 มีการหลุดออกมากับน้ำเสียถึงแม้การที่สีข้อมมีจำนวนน้อยที่ออกมากับน้ำเสียก็ยังสร้างปัญหา เนื่องจากส่วนใหญ่สีที่ใช้ข้อมจะเป็นสีที่สามารถละลายน้ำมีส่วนประกอบของพวกกลุ่ม hydroxyl ดังนั้นจึงมีความสามารถในการละลายน้ำสูงซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวมีผลต่อการโปร่งแสง การส่องผ่านของแสงสว่างลงสู่ได้ผิวน้ำทำให้เกิดมลภาวะทางน้ำรวมทั้งก่อให้เกิดทัศนียภาพ รวมทั้งสีบางชนิดถ้ามีการแตกตัวของอนุภาคจะทำให้ได้สารที่มีความเป็นพิษส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

Banat et al. (1996) มีการศึกษาพบว่า สีที่มีการปล่อยออกมากับน้ำเสียจะมีปริมาณโดยทั่วไปประมาณเท่ากับ 1.56 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่จากการทดสอบพบว่าแม้ว่าปริมาณสีเพียง 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็สามารถมองเห็นภายในแหล่งน้ำได้ ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพื่อหาเทคโนโลยีที่นำมาใช้ในการแก้ปัญหานี้ โดยในการนำเทคโนโลยีมาใช้ต้องมีข้อคำนึงถึงความเป็นไปได้ในการปฏิบัติและการหาแหล่งที่รองรับในการบำบัดน้ำเสียโดยจะพบว่า เทคโนโลยีที่นำมาใช้มีทั้งทางกายภาพเคมีและชีวภาพ สีบางส่วนในน้ำเสียสามารถกำจัดออกได้แต่ยังมีสีที่ไม่สามารถกำจัดออกได้และมีการนำน้ำกลับเข้ามาใช้ในระบบการผลิตใหม่โดยการนำน้ำกลับมาใช้ใหม่หรือใช้ซ้ำอีกเท่าที่จะทำได้และต้องมีการเลือกสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการเตรียมควรเลือกใช้ให้เหมาะสมคือ เลือกชนิดที่สามารถใช้ซ้ำได้อีกโดยไม่ทำให้เกิดปัญหาขึ้นเช่นเกิดเป็นจุดบนผ้า (spotting) เป็นต้น

ขั้นตอนสำคัญที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นขั้นตอนที่สามารถจะนำสารเคมีและสีข้อมกลับมาใช้ใหม่หรือใช้ซ้ำได้อีกอย่างได้ผล ได้แก่ การใช้น้ำสีข้อมจากอ่างข้อมซ้ำอีกจากขั้นตอนดังกล่าวข้างต้นแม้ว่าเทคโนโลยีที่รู้จักแพร่หลายมานานหลายปีและเป็นวิธีการที่สามารถลดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมได้อย่างมากเพราะนอกจากจะเป็นการลดสารเคมี เกลือ ค่างและสีแล้วยังเป็นการลดค่า ซีไอดี และ บีไอดี ในน้ำที่จะบำบัดอีกด้วยหากแต่วิธีการเหล่านี้ก็ไม่เป็นที่นิยมใช้กันเพราะที่ผ่านการข้อมมาแล้วทำให้เกิดปัญหา คือ คุณภาพผลิตภัณฑ์ การใช้น้ำข้อมสีซ้ำจะต้องมีการปรับความเข้มข้นของสีข้อมและปริมาณสารเคมีจึงทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มสีไปจากเดิม เนื่องจากสิ่งสกปรกบนผ้าที่ข้อมในครั้งแรกจะลงไปอยู่ในอ่างข้อมทำให้การควบคุมคุณภาพสีทำได้ยากขึ้น โดยเฉพาะการข้อมให้ได้ความเข้มสีที่เหมือนเดิม ดังนั้นหากต้องการผลิตภัณฑ์คุณภาพสูงวิธีการนี้ก็จะมีความยุ่งยากมากและมีสีข้อมบางประเภทเท่านั้นที่สามารถนำน้ำข้อมจากอ่างข้อมมาข้อมซ้ำ ได้แก่ สีซัลเฟอร์ สีแวงและสีดิสเพิร์ส ดังนั้นการนำกลับมาใช้ใหม่จะต้องมีการพิจารณาให้มีความเหมาะสมในการบำบัดน้ำเสียอาจมีการใช้หลาย ๆ วิธีเข้าร่วมกัน เช่นการกำจัดสีบางส่วนออกก่อนไม่ว่าจะใช้ทางกายภาพเคมีหรือทางชีวภาพ เนื่องจากการปรับปรุงคุณภาพก่อน

เข้าสู่ระบบบำบัดทำให้ประสิทธิภาพดีขึ้นและน้ำเสียที่หลังจากกระบวนการบำบัดแล้วมีคุณภาพตามมาตรฐานกำหนดสามารถปล่อยออกสู่สภาพแวดล้อมโดยไม่ก่อให้เกิดปัญหาต่อสภาพแวดล้อม

วิธีการบำบัดทางกายภาพและทางเคมี

1. โคแอกกูเลชันด้วยสารเคมี (chemical coagulation) โคแอกกูเลชันหรือการสร้างตะกอนเคมี ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ ขั้นตอนการเติมสารเคมีพวกสารสร้างตะกอน (coagulant) ผสมกับน้ำเสียที่มีตะกอนแขวนลอย เล็ก ๆ ขั้นตอนที่สองคือการกวนอย่างช้า ๆ เพื่อให้เกิดสภาพรวมตะกอน (flocculation) ซึ่งได้มีการเกาะกันระหว่างตะกอนแขวนลอยเล็ก ๆ กับการสร้างตะกอนจนได้ตะกอนที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจนสามารถตกตะกอนได้ สาเหตุที่ต้องทำการกวนช้า ๆ เพราะไม่ให้เกิดสภาพการเกาะตัวกันเกิดการแตกหลุดจากกันของตะกอนเล็ก ๆ เหล่านั้น การหาปริมาณสารเคมีที่ต้องการใช้จำเป็นต้องมีการทดลอง ซึ่งนิยมเรียกว่า จาร์เทสต์ (jar test)

2. การดูดติดผิว (adsorption) การดูดติดผิวเป็นความสามารถของสารบางชนิดในการดึงโมเลกุลหรือคอลลอยด์ สารดูดติดผิวมีหลายชนิดอาจแบ่งได้เป็น 3 ประเภทดังนี้

2.1 ประเภทสารอินทรีย์ เช่น ดินเหนียวชนิดต่าง ๆ แมกนีเซียมออกไซด์ ถ่าน-กระดูก แอคติเวทเต็ดซิลิกา เป็นต้น สารเหล่านี้มีพื้นที่ผิว 50 - 200 ตารางเมตรต่อกรัม

2.2 แอคติเวทเต็ดคาร์บอน มีพื้นที่ผิวมากกว่าสารอินทรีย์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญคือ 600 - 1000 ตารางเมตรต่อกรัม จึงจัดแยกไว้จากสารอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ

2.3 สารอินทรีย์สังเคราะห์เช่น เรซินแลกเปลี่ยนประจุ มีพื้นที่ผิว 300 - 500 ตารางเมตรต่อกรัม โดยทั่วไปกระบวนการดูดติดผิวในกระบวนการกำจัดสีและกลิ่นในน้ำประปาและกระบวนการกำจัดสีในน้ำเสียจะนิยมใช้แอคติเวทเต็ดคาร์บอนซึ่งมีพื้นที่ผิวจำเพาะสูงทำให้มีความสามารถในการดูดติดผิวสูงตามไปด้วย

3. โอโซนเนชั่นเป็นการกำจัดสีในน้ำเสียโดยใช้โอโซน (O_3) เป็นตัวออกซิไดซิงเอเจนต์โดยทำปฏิกิริยากับสีที่อยู่ในน้ำเสีย เช่นเดียวกับการใช้คลอรีนแต่โอโซนมีความสามารถในการออกซิไดซิงสูงกว่าคลอรีนเกือบ 1 เท่า โอโซนสามารถใช้ในรูปของเหลวได้แต่นิยมใช้ในรูปแบบก๊าซมากกว่า โอโซนเป็นก๊าซพิษที่ก่อให้เกิดความระคายเคือง จึงไม่เป็นที่นิยมใช้กันในอุตสาหกรรม

4. เทคโนโลยีการใช้แผ่นเมมเบรน ประกอบด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชันและรีเวอร์สออสโมซิส วิธีอัลตราฟิลเตรชันมีหลักการทำงานของระบบ คือใช้แผ่นเยื่อกระดาษ (membrane) แบบ porous พวกเซลลูโลสอะซิเตดหรือโพลีเมอร์สังเคราะห์ต่าง ๆ และอัดน้ำเข้าไปด้วยแรงดันไม่

เกิน 1,034 กิโลนิวตันต่อตารางเมตร เยื่อกรองจะทำหน้าที่แยกสารปนเปื้อนทั้งแบบละลายน้ำและตะกอนเล็กที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 500 ถึง 500,000 และขนาดตั้งแต่ 2×10^{-6} ถึง 1×10^{-2} มิลลิเมตรได้ สำหรับวิธีรีเวอร์สออสโมซิสสามารถแยกสารปนเปื้อนที่มีขนาดตั้งแต่ 4×10^{-7} ถึง 6×10^{-5} มิลลิเมตร ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าวิธีอุลตราฟิลเตรชันนิยมใช้ในการแยกเกลือที่ละลายน้ำได้ด้วยการกรองแผ่นเยื่อกรองแบบเยื่อกึ่งซึมผ่านได้ (semi permeable membrane) ณ ความดันตั้งแต่ความดันบรรยากาศจนถึง 6,900 กิโลนิวตันต่อตารางเมตร ระบบนี้ประกอบด้วยแผ่นกรอง ตัวถัง และเครื่องสูบน้ำที่ให้ความดันสูงพวกเยื่อกรองที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่ เซลลูโลสอะซิเตตและไนลอน

วิธีการที่กล่าวมามีประสิทธิภาพในการกำจัดสีข้อมจากน้ำเสียของอุตสาหกรรมฟอกข้อมในปัจจุบันนี้วิธีที่ได้รับการนำมาใช้อย่างจริงจัง ได้แก่ วิธีอุลตราฟิลเตรชันซึ่งเป็นเทคโนโลยีในการนำวัสดุกลับมาใช้ใหม่ซึ่งพบว่าสามารถนำ PVA โซดาไฟ สีข้อมอินดิโกนและน้ำกลับมาใช้ได้อย่างประสบความสำเร็จ แม้ว่ากระบวนการนี้จะปรากฏให้เห็นว่าสามารถกำจัดสีข้อมและสารที่เติมได้ทุกประเภท แต่ก็ยังไม่มีการนำมาใช้ในทางปฏิบัติเนื่องจากความยุ่งยากในการแยกสีผสม (สีผสมโดยส่วนใหญ่เป็นกรณีของน้ำจากขั้นตอนการข้อมและการตกแต่งสำเร็จ)

5. ไฟฟ้าเคมีหรืออิเล็กโตรเคมีคัล เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่งแต่ใช้กันน้อยมากในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกข้อม ลักษณะการทำงานมีองค์ประกอบหลัก คือ แหล่งจ่าย ไฟฟ้ากระแสตรง (DC power source) ขั้วไฟฟ้าอย่างน้อย 2 ขั้ว (electrode) และสารละลายนำไฟฟ้า (electrolyte solution) เมื่อทำการผ่านกระแสไฟฟ้าสู่เซลล์ไฟฟ้าเคมีที่ผ่านแผ่นแม่เหล็ก (Fe) เป็นขั้วไฟฟ้าพบว่าขั้วบวก (anode) จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเหล็ก ซึ่งทำให้แผ่นเหล็กเกิดการสึกกร่อนและละลายออกมาในรูปของ เฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) ที่ละลายอยู่ในน้ำ เมื่อเวลาผ่านไปปริมาณของ Fe^{2+} จะเพิ่มปริมาณมากขึ้นในขณะเดียวกันที่ขั้วลบ (cathode) จะเกิดปฏิกิริยารีดักชันของน้ำซึ่งน้ำจะเกิดการแตกตัวให้ก๊าซไฮโดรเจน (H_2) และไฮดรอกไซด์ไอออน (OH) เมื่อเวลาผ่านไปน้ำจะมีสภาพเป็นด่างและทำให้เกิดตกตะกอนของเฟอร์รัสไอออนและเฟอร์ริกไอออนซึ่งจะดูดซับและช่วยตกตะกอนของโลหะหนักสีข้อมหรือสิ่งปนเปื้อนต่าง ๆ ในน้ำเสีย

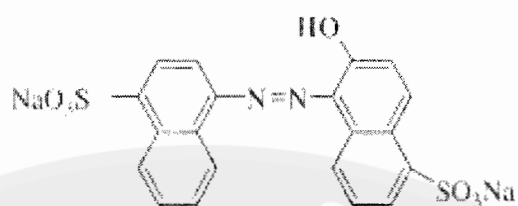
การกำจัดโดยทางกายภาพและทางเคมีนั้นเป็นกระบวนการที่ใช้การลงทุนที่สูงมากในการจัดการถึงแม้ว่าจะสามารถกำจัดสีออกจากน้ำเสียได้แต่ก็ยังเกิดปัญหาของการสะสมของของเสียที่เกิดจากการใช้กระบวนการเหล่านี้ เช่น กระบวนการโคแอกกูเลชันโดยใช้สารเคมีทำให้ตะกอนออกมาในปริมาณมาก ซึ่งต้องหาแนวทางในการกำจัดตะกอนไม่เช่นนั้นจะก่อให้เกิดปัญหาขึ้นอีก และในการทำการบำบัด Robinson et al. (2002) ได้ทำการศึกษาพบว่าการบำบัดน้ำเสียที่ต้องการกำจัดสีออกนั้นถ้ามีการจัดการระบบบำบัดที่มีขนาดใหญ่จะทำให้สามารถกำจัดสีได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถลดต้นทุนของการดำเนินการและการดูแลควบคุมได้

การบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ

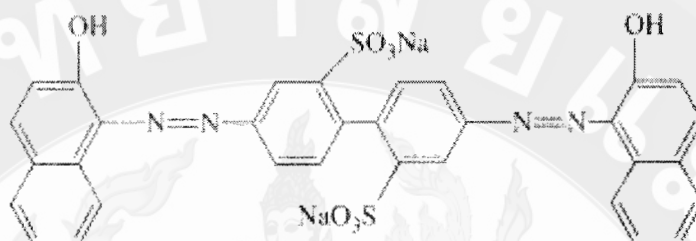
การบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพในการกำจัดสีออกโดยใช้แบคทีเรียซึ่งเป็นทางเลือกที่สามารถกำจัดสีได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีข้อได้เปรียบกว่าวิธีการกำจัดสีทางกายภาพและทางเคมีโดยเฉพาะการใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้สีเข้าไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมในเซลล์ในสภาพการบำบัดที่มีอากาศและไม่ใช้อากาศแต่พบว่าการบำบัดโดยใช้แบคทีเรียในสภาพที่ไม่มีอากาศนั้นแบคทีเรียสามารถลด electrophilic azo bond ภายในโมเลกุลของสีได้เป็นอย่างดี โดยที่แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีลักษณะเฉพาะคือ cytoplasmic azo reductases โดยการย่อยสลายพันธะอะโซในโมเลกุลของสีที่แขวนลอยอยู่ในน้ำเสียกลายเป็นสารอะโรมาติกเอมีนแต่สารที่ย่อยออกมาจะเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตเป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแต่สารกลุ่มนี้ถ้ามีการใช้แบคทีเรียที่เจริญภายใต้สภาพที่มีอากาศจะมีการใช้สารประกอบพวกอะมิโนในสารอะโรมาติกเอมีนเปลี่ยนจากสารที่มีพิษกลายเป็นสารประกอบที่ไม่เป็นพิษ

ลักษณะของสีอะโซ

สีอะโซประกอบด้วยสารในกลุ่มของอะโรมาติกเอมีนและฟีนอล อาจมีตำแหน่งของพันธะอะโซ 1 ตำแหน่งหรืออาจมากกว่า 1 พันธะ สีอะโซมีชนิดของกลุ่มสีมากถึงร้อยละ 60-70 และมีหน้าที่ที่แตกต่างกันออกไป (ภาพ 1) ประมาณร้อยละ 10-15 เป็นสีที่มีความสามารถในการย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ความเข้มข้นของสีต่อน้ำ 10-50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนึ่งลิตร ก็สามารถทำให้ได้สีที่มีความเข้มข้นมากและสามารถข้อมกับผลิตภัณฑ์ได้ในจำนวนมาก ผลที่เกิดจากการสลายพันธะหรือการย่อยสลายสีทำให้เกิดสารพิษและสารประกอบในกลุ่ม carcinogenic และ mutagenic ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งและการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ (Mustafa and Delia, 2004)



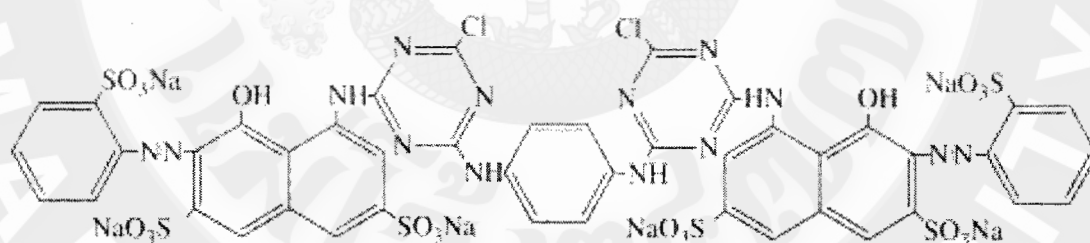
C.I. Acid Red 88 (AR-88), C.I. 15620, $\lambda_{\text{max}} = 505\text{nm}$



C.I. Acid Red 97 (AR-97), C.I. 22890, $\lambda_{\text{max}} = 494\text{nm}$



C.I. Acid Blue 113 (AB-113), C.I. 26360, $\lambda_{\text{max}} = 554\text{nm}$



C.I. Reactive Red 120 (RR-120), C.I. 25810, $\lambda_{\text{max}} = 530\text{nm}$

ภาพ 1 ตัวอย่างโครงสร้างของสีย้อมอะโซ

ที่มา : Khehra et al. (2005)

การกำจัดสีอะโซโดยแบคทีเรีย

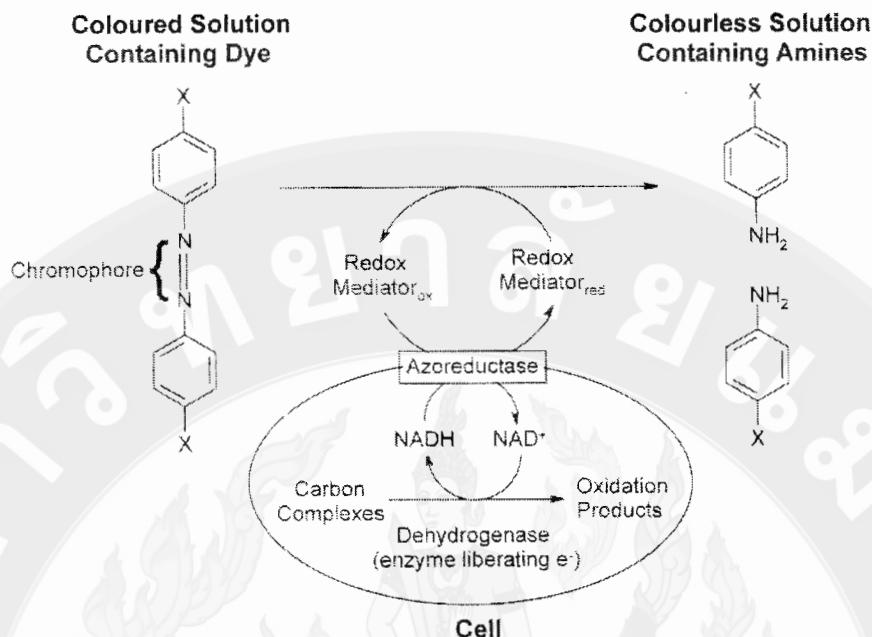
แบคทีเรียที่มีความสามารถในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมสิ่งทอ เช่น *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescence*, *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *E. coli*, *Klebsiella Pneumonia* เป็นต้น

การกำจัดสีโดยแบคทีเรียเพื่อลดสีในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมนั้นเป็นแนวทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีการทางกายภาพและทางเคมีและการใช้แบคทีเรียจำเป็นต้องใช้เซลล์แบคทีเรียที่เจริญภายใต้สภาวะแอนแอโรบิก โดยที่แบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ azoreductase มาช่วยสลายพันธะอะโซในโมเลกุลของสารสีที่แขวนลอยอยู่ในน้ำให้กลายเป็นสารอะโรมาติกเอมีน (ภาพ 2) แต่สารประกอบนี้ยังคงความเป็นพิษสูงโดยก่อให้เกิดมะเร็งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ด้วยเหตุนี้จำเป็นต้องใช้แบคทีเรียที่เจริญภายใต้สภาวะแอนแอโรบิกมาช่วยสลายต่อให้กลายเป็นสารประกอบอื่นที่ไม่เป็นพิษ (Pearce et al., 2003) โครงสร้างสีที่ประกอบด้วยพันธะอะโซเดี่ยว (monoazo) แบคทีเรียสามารถกำจัดพันธะอะโซได้ดีและรวดเร็วกว่าสีที่มีองค์ประกอบของพันธะอะโซสองแห่ง (dialazo) และสามแห่ง (triazazo) ในโมเลกุลของสี (Hu, 1999)

กลไกในการกำจัดสีอะโซโดยแบคทีเรีย

กลไกในการกำจัดสีอะโซโดยแบคทีเรียอย่างง่าย คือ การที่แบคทีเรียนั้นดูดซับสีเข้าสู่ผิวเซลล์ของตัวแบคทีเรีนั่นเอง แต่การกำจัดสีด้วยกระบวนการนี้มีความคล้ายคลึงกับกระบวนการทางกายภาพ คือ จะไม่มีความคงตัวในการกำจัดสีในระยะยาวเพราะว่าเมื่อเวลาผ่านไปภายในตัวเซลล์แบคทีเรียจะอิ่มตัวไปด้วยสี (Pearce et al., 2003) ด้วยเหตุนี้จึงมีการพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างสีอะโซและแบคทีเรียในทางการบำบัดแบบชีววิทยาด้วยกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพภายใต้สภาวะแอนแอโรบิกและแอนแอโรบิก

การกำจัดสีอะโซส่วนใหญ่แบคทีเรียที่เจริญภายใต้สภาวะแอนแอโรบิกจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดได้ดีกว่าเนื่องจากแบคทีเรียที่เจริญภายใต้สภาวะใช้ออกซิเจนที่มีเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ azoreductase ในการย่อยสลายพันธะอะโซทำให้ประสิทธิภาพในการลดในสภาวะที่มีออกซิเจนมีประสิทธิภาพน้อยเมื่อเทียบกับสภาวะไร้ออกซิเจน จากภาพ 3 แสดงให้เห็นถึงกลไกในการกำจัดสีอะโซซึ่งจะเกิดขึ้นที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียโดยที่ NADH ที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมสังเคราะห์พลังงานภายในเซลล์แบคทีเรียจะไปช่วยให้เอนไซม์ azoreductase ทำปฏิกิริยามีการส่งผ่านอิเล็กตรอนจากภายในเซลล์ไปสู่บริเวณ chromophore (N=N)



ภาพ 3 กลไกในการกำจัดสีอะโซโดยแบคทีเรีย

ที่มา: Keck et al. (1997)

ปัจจัยที่มีต่อการกำจัดสีอะโซ

1. ออกซิเจนจะมีผลยับยั้งเอนไซม์ azoreductase ไม่ให้สามารถทำงานได้ดี เนื่องจากสาเหตุที่ออกซิเจนจะไปยับยั้งเอนไซม์ที่ปลดปล่อยจากในเซลล์แทนที่จะมีการส่งผ่านอิเล็กตรอนด้วย redox mediator กับบริเวณพันธะอะโซจึงเป็นเหตุทำให้การกำจัดสีลดลงได้ไม่ดี (Yoo et al., 2001)
2. อุณหภูมิ จากการศึกษาอุณหภูมิเหมาะสมที่เซลล์แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตและกำจัดสีได้ดีจะอยู่ในช่วง 35-45 องศาเซลเซียส (Pearce et al., 2003)
3. พีเอช จากการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมที่แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตและการกำจัดสีได้ดีจะอยู่ในช่วงความเป็นด่างคือ 7.0-9.5 (Chang et al., 2001)
4. ความเข้มข้นสี จากการศึกษาแบคทีเรียสามารถกำจัดสีได้ดีจะพิจารณาจากโคเนตริกของเอนไซม์ azoreductase และจากการใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทที่ระดับต่างๆ ปรากฏว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสีที่แบคทีเรียสามารถกำจัดได้ง่ายจะอยู่ที่ช่วง 1-10 ไมโครโมล และการกำจัดสีจะมีค่าเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 30 ไมโครโมล (Sani and Banejee, 1999)

5. โครงสร้างสี จากการศึกษพบว่าโครงสร้างสีที่ประกอบด้วยพันธะอะโซเดี่ยว (monoazo) แบคทีเรียสามารถกำจัดพันธะอะโซได้ดีและรวดเร็วกว่าสีที่มีองค์ประกอบของพันธะอะโซสองแห่ง (diazo) และสามแห่ง (triazole) ในโมเลกุลของสี

6. ตัวให้อิเล็กตรอน จากการศึกษพบว่าตัวให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยาการกำจัดสีอะโซด้วยเอนไซม์ azoreductase ได้คือ โคแฟกเตอร์ชนิด NADH และได้มีการยืนยันจากการทดลองที่มีการนำ p-chloromercuribenzoate ไปยับยั้งการสร้าง NADH ภายในเซลล์แบคทีเรียพบว่าการกำจัดสีนั้นลดลง (Gingell and Walker, 1971)

7. พลังงานศักย์ในปฏิกิริยารีดอกซ์ การกำจัดสีของแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับพลังงานในการส่งผ่านอิเล็กตรอนโดยเมื่อมีการกำจัดสีมากขึ้นค่าพลังงานศักย์ในปฏิกิริยารีดอกซ์ก็จะมีค่าสูงขึ้นด้วย (Bragger et al., 1997)

8. ตัวกลางในปฏิกิริยารีดอกซ์ จากการศึกษพบว่านอกจากพลังงานศักย์เพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีการกำจัดสีมากขึ้นยังมีตัวกลางในปฏิกิริยารีดอกซ์ที่มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันด้วย (Van et al., 2001)

การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ในรูปเซลล์ตรึง

เทคนิคในการตรึงเซลล์แบคทีเรีย

การตรึงเซลล์แบคทีเรียเป็นวิธีการหนึ่งที่ถูกนิยมนำไปใช้งานวิจัยในหลายๆ ประเทศ โดยจุดประสงค์ของการตรึงเซลล์ คือ เพื่อให้ได้ปริมาณของเซลล์แบคทีเรียในความเข้มข้นสูง (Yann and Christophe, 2005) ยึดตรึงเซลล์ให้อยู่กับที่และยังเป็นการช่วยป้องกันเซลล์แบคทีเรียจากสภาพแวดล้อมที่เป็นพิษ เช่น พิเอช อุณหภูมิ สารอินทรีย์และสารพิษ เป็นต้น (Park and Chang, 2000) สามารถแบ่งเทคนิคการตรึงเซลล์แบคทีเรียได้ดังนี้

1. การตรึงลงบนตัวกลางที่เป็นเส้นใยหรือร่างแห
2. การยึดติดหรือดูดซับเซลล์ไว้กับโครงสร้าง หรือตัวกลางต่าง ๆ
3. การตรึงเซลล์หรือขังเซลล์ไว้ในเมมเบรนชนิดต่าง ๆ
4. การตรึงแบบ microencapsulation

ในปัจจุบันงานวิจัยหลาย ๆ งานวิจัยที่ทำการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการกำจัดน้ำเสียที่มีสีเป็นองค์ประกอบมุ่งเน้นที่จะทำการพัฒนารูปแบบในการตรึงเซลล์เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการบำบัดมากขึ้น โดยคำนึงถึงลักษณะการนำไปใช้งานที่สะดวก ประหยัดและลดความเสี่ยงจากสารพิษที่อาจส่งผลต่อตัวแบคทีเรียที่ผ่านการตรึง วิธีการตรึงแบบ entrapment ถือว่าเป็น

วิธีการตรึงที่ให้ประสิทธิภาพการบำบัดและใช้งานง่ายกว่าการตรึงในวิธีการแบบอื่นๆ (Sriamornsak, 1998) จากงานวิจัยของ Steffana et al. (2005) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงลงในแอลจิเนทปิด พบว่า แบคทีเรียชนิดเซลล์ผสมที่ถูกตรึงลงในแอลจิเนทสามารถกำจัดสีเอทธิลออกเร็นจ์ภายใต้สภาวะมือออกซิเจนได้

ส่วนในการตรึงเซลล์ลงในตัวกลางที่มีรูพรุนถือว่าเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมเช่นกัน โดยจะเป็นเทคนิคที่ตรึงเซลล์จุลินทรีย์ให้อยู่กับที่ ตัวกลางจะมีรูพรุนซึ่งเป็นเพียงตัวยึดของเซลล์แบคทีเรียหรือเส้นใยของเซลล์ที่ใช้ในการตรึง ตัวกลางจะไม่ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ การเจริญของเซลล์จุลินทรีย์หรือปริมาณของเซลล์จุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นได้เนื่องจากระยะเวลาและสารอาหารที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรึงในครั้งนั้น ๆ ชนิดของตัวกลางที่มีรูพรุนที่เลือกใช้ในการตรึงเซลล์ในอุตสาหกรรม (ตาราง 3)

การใช้วัสดุตัวกลางในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย

วัสดุตัวกลาง มีหน้าที่เป็นพื้นผิวให้จุลินทรีย์เกาะและเจริญเติบโตเป็นฟิล์มชีวภาพเพื่อกำจัด มวลสารที่มีอยู่ในน้ำเสีย วัสดุที่ใช้เป็นตัวกลางควรมีคุณสมบัติคงทนต่อสภาพแวดล้อมและไม่ละลายน้ำ เช่น หิน ถ่าน อิฐ ไม้ หรือชิ้นพลาสติก นอกจากนี้ยังต้องมีขนาดสม่ำเสมอ เพื่อให้มีช่องว่างเพียงพอสำหรับการถ่ายเทอากาศและไม่เกิดการอุดตันได้ง่าย (คงศักดิ์, 2538) จากการสำรวจการใช้วัสดุตัวกลางธรรมชาติชนิดต่าง ๆ แยกเป็นร้อยละ ดังตาราง 4

ลักษณะของวัสดุตัวกลางพลาสติกโดยทั่วไปพบว่า ตัวกลางที่เป็นพลาสติกสามารถรับระดับภาระบรรทุกสารอินทรีย์และอัตราบรรทุกน้ำที่สูงได้ดี ลักษณะโครงสร้างเป็นแบบเปิดลดการอุดตันที่เกิดจากการสะสมฟิล์มชีวภาพที่มากเกินไป มีการระบายอากาศที่ดี เป็นวัสดุเฉื่อยต่อปฏิกิริยา มีความคงทน รูปร่างมีลักษณะที่เอื้ออำนวยต่อการกระจายน้ำเสียอย่างทั่วถึง นอกจากนี้ยังมีน้ำหนักเบา ซึ่งเป็นผลให้สามารถลดค่าใช้จ่ายทางโครงสร้างของระบบได้อีกด้วย ตัวกลางที่เป็นพลาสติกสามารถแบ่งออกเป็น 2 พวกใหญ่ ๆ คือ ตัวกลางพลาสติกแบบเรณูคอมและพลาสติกแบบโมดูลา ซึ่งแต่ละจำพวกประกอบด้วยตัวกลางที่มีรูปร่าง ลักษณะรวมถึงชื่อทางการค้าที่แตกต่างกันออกไป (คงศักดิ์, 2538)

ตาราง 3 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตรึงเซลล์สิ่งมีชีวิตลงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ

	ตัวกลาง	ผลิตภัณฑ์ที่ได้
เซลล์จุลินทรีย์		
<i>Botryococcus braunii</i>	PUF	ไฮโดรคาร์บอน
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	NS	อะซีโตน, บิวทานอล, เอทานอล
<i>Escherichia coli</i>	SF	อะไมเลส
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	PUF	เฟอร์รัส ไอออน ออกซิเดชัน
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SS	เอทานอล
<i>Saccharomyces uvarum</i>	PEF	เอทานอล
<i>Mucor ambiguus</i>	PUF	ไลโนเลนิก แอซิด
<i>Penicillium chrysogenum</i>	PUF	เพนนิซิลิน
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	PUF	ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส
<i>Rhizopus arrhizus</i>	PUF	ฟูลิก แอซิด
<i>Rhizopus chinensis</i>	PUF	ไลเปส
<i>Trichoderma viride</i>	SF	เซลลูเลส
Mixed culture	PUF	ใช้ในการบำบัดของเสีย
เซลล์พืช		
<i>Capsicum frutescens</i>	PUF	แคปไซซิน
<i>Humulus lupulus</i>	PUF	ฮอป เฟเวอร์
เซลล์สัตว์		
Mouse myeloma	PVF	อิมมูโนโกลบูลิน จี
Hepatocyte	PVF	ใช้เพื่อเพาะเลี้ยง
CHO-KI and Vero	PUF	ใช้เพื่อเพาะเลี้ยง

หมายเหตุ: PUF หมายถึง โพลีเอสเตอร์โฟม NS หมายถึง เนเจอร์ล สปอนต์

PEF หมายถึง โพลียูเรเทนโฟม SS หมายถึง สแตนเลส สตีล

PVF หมายถึง โพรไวนิล ฟอรั่มัล เรซิน SF หมายถึง ซิลิโคนโฟม

ที่มา : Fukada (1995)

ตาราง 4 ปริมาณการใช้ตัวกลางที่ได้จากธรรมชาติในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ

ชนิดวัสดุตัวกลาง	ร้อยละที่พบ
granit	26
clinker	24
blast-furnace slag	23
rounded gravel	6
limestone and clinker	6
limestone	4
coke	4
clinker and gravel	3
slag and coke	1
sager chippings	1

ที่มา : Learner (1975)

การใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมใน รูปเซลล์ตรึง

ในการศึกษาการกำจัดสีในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมโดยใช้จุลินทรีย์ในรูปเซลล์ตรึงนั้นมีรายงานการวิจัยต่าง ๆ เช่น การศึกษาการกำจัดสี Acid Orange 7 โดยแบคทีเรียที่ตรึงบนตัวกลาง 3 ชนิด คือ kaolin, bentonite และ powdered activated carbon (PAC) แบคทีเรียที่ใช้ 3 สายพันธุ์ ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายสีคือ *Enterobacter*, *Pseudomonas* และ *Morganella* sp. ในการศึกษาพบว่าตัวกลางชนิด PACn ที่มีขนาด 0.490 มิลลิเมตรมีแบคทีเรียเกาะมากที่สุด การกำจัดสีของแบคทีเรียทำได้ในสภาวะไร้อากาศโดยใช้ตัวกลางเป็น PAC เช่นเดียวกับ Kuo et al. (2003) ซึ่งทำการศึกษาการกำจัดสีด้วยการตรึงจุลินทรีย์ไว้กับตัวกลางชนิด phosphorylated polyvinyl alcohol (PVA) พบว่า สามารถกำจัดสี RED RBN ได้ร้อยละ 75 ที่ความเข้มข้นสีเริ่มต้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ Chipperfield (1967) ได้อธิบายถึงลักษณะของวัสดุตัวกลางที่เป็นพลาสติกโดยทั่วไปแล้วสามารถรับภาระบรรทุกสารอินทรีย์และอัตราการบรรทุกของวัสดุศาสตร์ได้ในค่าที่สูง ลักษณะโครง สร้างจะเป็นแบบเปิดลดการอุดตันที่เกิดจากการสะสมของ

เมื่อชีวภาพที่มากเกินไปทำให้ชั้นกรองอุดตัน ซึ่งวัสดุนี้เป็นวัสดุเยื่อหุ้มต่อปฏิกิริยาความคงทนรูปร่างมีลักษณะที่เอื้ออำนวยต่อการกระจายน้ำเสียอย่างทั่วถึง อีกทั้งยังมีน้ำหนักที่เบาอีกด้วย

Coughlin et al. (2002) ศึกษาประสิทธิภาพของถังปฏิกรณ์ rotating drum bioreactor (RDBR) ในการย่อยสลายสี Acid Orange 7 และกรดซัลฟาลีนิก พบว่า ถังปฏิกรณ์ RDBR ที่มีหัวเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ ICX และ SAD4i เกิดเป็นฟิล์มชีวภาพ สามารถย่อยสลายสี AO7 และกรดซัลฟาลีนิกได้ จากการศึกษาของ Ilgi and Alparslan (2005) โดยใช้ระบบบำบัดแบบต่อเนื่องแอโรบิก- แอโรบิกในการลดซีไอดีและกำจัดสีจากน้ำเสียที่ได้จากอุตสาหกรรมสิ่งทอจากโรงงานในประเทศตุรกี ซึ่งระบบบำบัดที่ใช้ในการศึกษานี้คือ anaerobic packed-column reactor ที่มีการบรรจุตัวกลางที่มีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ลงไปในคอลัมน์และอีกระบบหนึ่งคือ activated sludge พบว่า น้ำที่ผ่านการบำบัดด้วยระบบแบบต่อเนื่องแล้วสามารถกำจัดสีได้ถึงร้อยละ 85 และลดซีไอดีได้ถึงร้อยละ 90

จากการศึกษาของ Khehra et al. (2006) ที่ทำการศึกษาและวิจัยต่อในเรื่องการย่อยสลายสี C.I. Acid Red 88 โดยใช้ระบบบำบัดแบบต่อเนื่องคือ Up flow fixed-film column reactor(UFCR) และ Continuously stirred aerobic reactor (CSAR) ซึ่งในถังปฏิกรณ์แบบ Up flow fixed-film column มีการตรึงเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescence* และ *Stenotrophomonas acidaminiphila* บนตัวกลาง polyurethane foam (PUF) พบว่า สามารถกำจัดสีได้ถึง ร้อยละ 98 และลดค่าซีไอดีได้ร้อยละ 95 แต่มีสารประกอบในกลุ่มอะโรมาติกเอมีนที่มีความเป็นพิษเกิดขึ้นหลังจากที่มีการสลายพันธะเอโซภายใต้สภาวะ anoxic แต่ความเป็นพิษลดลงได้ภายใต้สภาวะ aerobic นั่นคือเมื่อน้ำผ่านการบำบัดด้วย CSAR สารประกอบในกลุ่มอะโรมาติกเอมีนสามารถเปลี่ยนรูปไปเป็นสารอินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่มีความเป็นพิษหรือมีความเป็นพิษลดน้อยลงได้ เช่นเดียวกันกับ Majinder et al. (2006) ที่ได้ทำการศึกษการย่อยสลายสี C.I. acid red 88 โดยใช้ระบบบำบัดแบบต่อเนื่องคือ up flow fixed-film column reactor (UFCR) และ continuously stirred aerobic reactor (CSAR) ซึ่งในถังปฏิกรณ์แบบ up flow fixed-film column มีการตรึงเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescence* และ *Stenotrophomonas acidaminiphila* บนตัวกลาง Polyurethane foam (PUF) พบว่า สามารถกำจัดสีได้ถึงร้อยละ 98 และลดค่าซีไอดีได้ร้อยละ 95 แต่มีสารประกอบในกลุ่มอะโรมาติกเอมีนที่มีความเป็นพิษเกิดขึ้นหลังจากที่มีการสลายพันธะเอโซภายใต้สภาวะแอนแอโรบิกแต่ความเป็นพิษลดลงได้ภายใต้สภาวะแอโรบิก นั่นคือเมื่อน้ำผ่านการบำบัดด้วย CSAR สารประกอบในกลุ่มอะโรมาติกเอมีนสามารถเปลี่ยนรูปไปเป็นสารอินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่มีความเป็นพิษหรือมีความเป็นพิษลดน้อยลงได้

Chang et al. (2001) ได้ทำการตรึง *Pseudomonas luteola* โดยวิธี entrapment ใน calcium alginate, K-carrageenan และ polyacrylamide แล้วทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกำจัดสีอะโซซึ่งในการทดลองนี้ใช้ C.I. reactive red 22 กับ *Pseudomonas luteola* ที่อยู่ในรูปเซลล์แขวนลอย พบว่า ประสิทธิภาพในการกำจัดสีมีค่าที่ใกล้เคียงกันเมื่อมีการควบคุมสภาวะต่างๆอย่างเหมาะสม ในทางเดียวกันกับ Steffana et al. (2005) ได้ทำการศึกษาการย่อยสลายสีย้อม ethyl orange โดยจุลินทรีย์ที่ตรึงใน alginate beads กับ polyacrylamine resin พบว่า การทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงจะทำงานภายใน 30 วันในห้องควบคุมอุณหภูมิ จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสีได้ดี คือ เชื้อรา

การใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมฟอกย้อม ในรูปเซลล์แขวนลอยและการใช้เอนไซม์จากเซลล์จุลินทรีย์

จากงานวิจัยที่ผ่านมาในเรื่องการกำจัดสีที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมนั้น สามารถยกตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้เซลล์จุลินทรีย์ในรูปเซลล์แขวนลอยและการใช้เอนไซม์จากเซลล์จุลินทรีย์ ได้ เช่น Adnane et al. (2003) ได้ศึกษาคุณสมบัติและการทำเอนไซม์ azoreductase ให้บริสุทธิ์ที่ได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterobacter agglomerans* โดยพบว่าเอนไซม์ที่สกัดได้นั้นมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีอะโซได้ถึงร้อยละ 79 โดย Coughlin (1997) ได้ทำการศึกษาการสลายตัวตามธรรมชาติของสีย้อมอะโซ ด้วยจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ โดยที่จุลินทรีย์เหล่านั้นสามารถใช้สีย้อมเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน พบว่า แบคทีเรียจำเพาะต่อสีย้อมอะโซเท่านั้นที่จะสามารถสร้างเอนไซม์เพื่อสลายพันธะ อะโซได้

จากการศึกษาของ Balan et al. (2001) ที่ได้ทำการศึกษาการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานสิ่งทอ โดยใช้เชื้อราชนิด *Ligninolytic basidiomycete fungi* 4 สายพันธุ์ คือ *Phellinus gilvus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pycnoporus sanguineus* และ *Phanerochaete chrysosporium* ซึ่งหลังจากผ่านการบำบัดไป 4 ชั่วโมง สามารถลดสีได้ถึงร้อยละ 100, 94, 91 และ 75 ตามลำดับ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Cristina et al. (2003) ได้ศึกษาการย่อยสลายสีย้อมอะโซชนิด reactive black 5, reactive red 158 และ reactive yellow 37 ด้วยเชื้อราสายพันธุ์ *Geotrichum* sp. ปรากฏว่ามีการกำจัดสีได้สูงสุดภายหลังจากการเลี้ยงได้ 20 วัน ที่ความเข้มข้นสีเริ่มต้น 200 พีพีเอ็ม รวมไปถึงงานวิจัยของ Giovana et al. (2003) ได้ศึกษาการย่อยสลายสีย้อมชนิด methylene blue poly R-478 ด้วยเชื้อราสายพันธุ์ *Pleurotus pulmonarius* ในสภาพการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (solid state

fermentation) ปรากฏว่าภายหลังจากการเพาะเลี้ยงได้ 6 วัน *Pleurotus pulmonarius* สามารถกำจัดสีได้มากที่สุดและปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ laccase มีค่าสูงสุดที่ 480 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Jadhav et al. (2007) ได้ทำการศึกษาการกำจัดสี methyl red โดยการใช้ *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463 พบว่า ยีสต์สายพันธุ์นี้มีประสิทธิภาพในการกำจัดสี methyl red ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น เท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้อย่างสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 16 นาที ในสภาวะแอนอกซิกที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งในการทดลองนี้ได้มีการควบคุม พีเอชของอาหาร สารประกอบในอาหาร ความเข้มข้นของสี และเซลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463 อุณหภูมิและปริมาณการกวน เพื่อเป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสี

Dafale et al. (2007) ได้ทำการศึกษาการกำจัดสีอะโซจากบ่อพักน้ำใน กระบวนการฟอกย้อมโดยใช้แบคทีเรียแบบเซลล์ผสม 4 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus circulans* และแบคทีเรียไฮโดรไลติก NAD1 และ NAD6 ในสภาวะที่ทำการทดลองมีสภาวะ ที่มีความเค็มสูง มีความเข้มข้นของเกลือ ร้อยละ 10 พบว่า ประสิทธิภาพการบำบัดในสภาวะไร้อากาศด้วยแบคทีเรียแบบเซลล์ผสมนี้มีค่าสูงถึง ร้อยละ 70-90 ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง แต่เมื่อทำการตรวจสอบพบว่า ในขั้นตอนการกำจัดสีภายใต้สภาวะไร้อากาศนั้นปริมาณสาร flavin adenine dinucleotide (FAD) มากกว่า ร้อยละ 90 เกิดขึ้นระหว่างที่มีการย่อยสลายสี ในการศึกษาของ Mustafa and Delia (2002) ซึ่งได้ทำการศึกษาผลของออกซิเจนต่อการกำจัดสีอะโซชนิด congo red, direct black 38 ด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas sp.* ปรากฏว่ามีการกำจัดสีได้ดีในช่วง 5-9 วัน

Kuo et al. (2003) ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสีย้อม สีนํ้า 24 ชนิด จนได้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Aeromonas hydrophila* ซึ่งมีความสามารถในการกำจัดสี ได้ดีที่สุดในสภาวะที่เหมาะสม พบว่า *A. hydrophila* เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ และกำจัดสีได้ดีในสภาวะไร้อากาศหรือมีอากาศเพียงเล็กน้อย แบคทีเรียสามารถกำจัดสี RED RBN ได้ร้อยละ 90 ภายในเวลา 8 วัน โดยมีความเข้มข้นสีเริ่มต้น 3000 มิลลิกรัมต่อลิตรในสภาวะที่มี พีเอช 5.5-10.0 อุณหภูมิ 20-35 องศาเซลเซียสและยังพบอีกว่าแหล่งไนโตรเจน เช่น yeast extract และ peptone สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสีได้ แต่แหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคส จะยับยั้ง การกำจัดสีเพราะกลูโคสจะถูกสลายและเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์ ซึ่งมีผลทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าพี เอชลดลงจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและการย่อยสลายสีได้ ในทางเดียวกันกับ Martin et al. (1999) ได้ทำการศึกษาการกำจัดสีย้อมอะโซในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมสิ่งทอ โดยเชื้อราสายพันธุ์ *Phanerochaete chrysosporium* พบว่า สามารถกำจัดสีได้ภายใต้สภาวะที่มีไนโตรเจน ปริมาณจำกัด

Khehra et al. (2005) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายสี C.I. Acid Red 88 ระหว่างกลุ่มแบคทีเรีย (bacterial consortium) เรียกรวมกันว่า HM-4 ซึ่งประกอบไปด้วย *Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescense* และ *Stenotrophomonas acidaminiphila* กับแบคทีเรียเชื้อเดี่ยว (individual culture) ผลปรากฏว่า HM-4 สามารถย่อยสลายสี C.I. Acid Red 88 ได้อย่างสมบูรณ์ ภายในเวลาเพียง 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อเดี่ยวนั้นต้องใช้เวลาราว 60 ชั่วโมง จึงจะสามารถย่อยสลายสี C.I. Acid Red 88 ได้สมบูรณ์ และเขายังได้ศึกษาถึงการย่อยสลายสีอื่น ๆ อีก 4 ชนิด คือ C.I. Acid Red 97 (AR-97), C.I. Acid Red 119 (AR-119), C.I. Acid Blue 113 (AB-113) และ C.I. Reactive Red 120 (RR-120) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า สามารถย่อยสลายสี ทั้ง 4 ชนิด ได้ร้อยละ 78.0, 94.0, 99.0 และ 82.0 ตามลำดับ

Mustafa and Delia (2004) ศึกษาการบำบัดน้ำเสียที่มีองค์ประกอบของสี C.I. direct black 38 โดยการบำบัดแบบต่อเนื่อง UASB และ CSTR พบว่า เมื่อน้ำเสียผ่านการบำบัดแบบต่อเนื่องแล้วสามารถกำจัดสีได้ร้อยละ 94, 99 และ 92 เป็นการลดค่าบีโอดีและซีโอดีตามลำดับ ซึ่งในการศึกษานี้ยังพบอีกว่าสามารถลดปริมาณของสารอะโรมาติกเอมีนทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังจากการเปลี่ยนรูปของสารสีได้ถึงร้อยละ 81 เมื่อทำตรวจวัดจากน้ำที่ผ่านการบำบัดด้วย CSTR เพียงระบบเดียว แต่เมื่อผ่านการบำบัดแบบต่อเนื่อง UASB และ CSTR ของสารอะโรมาติกเอมีนทั้งหมดสามารถลดได้ถึงร้อยละ 86 เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษกับสิ่งมีชีวิตพบว่าความเป็นพิษมีค่าน้อยลงไม่ส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตที่นำมาทดสอบ

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์ในการวิจัย

สารเคมี

1. Beef extract (Himedia, India)
2. Peptone (Himedia, India)
3. Yeast extract (Himedia, India)
4. ฐึ้น (Agar)
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Ajax Finechem, Australia)
6. ไฮโดรเจนคลอไรด์ (HCl) (Ajax Finechem, Australia)
7. เฟอริกคลอไรด์ (FeCl₃) (Ajax Finechem, Australia)
8. แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂) (Ajax Finechem, Australia)
9. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO₄·7H₂O) (Ajax Finechem, Australia)
10. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจน ออโทฟอสเฟต (KH₂PO₄) (Ajax Finechem, Australia)
11. ยูเรีย (Urea)
12. โพแทสเซียมไดโครเมต (K₂Cr₂O₇) (APS, Australia)
13. ซัลฟูริกแอซิด (H₂SO₄) (Ajax Finechem, Australia)
14. ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag₂SO₄) (POCH SA, Poland)
15. น้ำตาล (Sugar) (Mitphol, Thailand)
16. คี Congo red (Direct Red 28) (Fluka, India)
17. Alginate Acid Sodium Salt (Fluka, US)

สารเคมีที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรีย โดยวิธีการหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA

1. ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป (Isoplant DNA extraction kit (NO. 314-02731)) (Nippon Gene, Japan)
2. Master Mix (Qiagen, Germany)
3. 27F (forward primer) 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
(Operan, Germany)
4. 520R (reverse primer) 5'-ACCGCGGCKGCTGGC-3'
(Operan, Germany)
5. 357F (forward primer) 5'-CTACGGGAGGCAAG-3'
(Operan, Germany)
6. 1080R (reverse primer) 5'-CCCAACATCTCACAC-3'
(Operan, Germany)
7. 920F (forward primer) 5'-AAACTCAAAGGAATGACGG-3'
(Operan, Germany)
8. 1522R (reverse primer) 5'-AAGGAGGTGATCCRCCGCA-3'
(Operan, Germany)
9. ชุดทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ (TaKaRa SUPREC™-PCR) (Takara, Japan)
10. loading dye (Fermentas LIFE SCIENCES, USA)
11. O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA)
12. เอนไซม์ RNase (Nippon Gene, Japan)
13. พงู้นอะกาโรส
- 14 . Absolute ethanol (Merck, Germany)

เครื่องมือ

1. Incubator บริษัท Binder
2. Laminar air flow บริษัท Eis Flufrance
3. Spectrophotometer บริษัท Genesys
4. Spectrophotometer บริษัท HACH รุ่น DR/2500

5. Autoclave บริษัท Hirayama
6. Autoclave บริษัท Sturdy รุ่น SA-300VL
7. Hot air oven บริษัท Binder
8. Incubator Shaker บริษัท Forma Scientific
9. pH meter บริษัท Sartorius
10. Fume hood บริษัท Pro Lab รุ่น 2000
11. PCR Sprint Thermal Cycler บริษัท Thermal hybrid รุ่น Sprint
12. Transluminator บริษัท Bio-Rad
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง บริษัท Sanyo รุ่น Harrier 18/80
14. เครื่องปั่นเหวี่ยง บริษัท Hettich รุ่น EBA 12R
15. Microwave บริษัท National
16. Deep freezer(-80 °C) บริษัท Sanyo
17. กล้องจุลทรรศน์ บริษัท Olympus
18. เครื่องชั่งสาร บริษัท Mettler-Toledo รุ่น AG285

อุปกรณ์ในการเตรียมเซลล์

1. พงู้น Sodium Alginate (Ajax Finechem, Australia)
2. ฝาขวดน้ำพลาสติก
3. แผ่นพลาสติก
4. หินภูเขาไฟ
5. ซีโอไลท์
6. ฟองน้ำ

อุปกรณ์อื่น ๆ

1. หลอดทดลอง (Test Tube)
2. ขวดรูปชมพู่ (Flask)
3. บีกเกอร์ (Beaker)
4. จานเพาะเชื้อ (Plate)
5. แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Spreader)
6. กระบอกตวง (Cylinder)

7. ขวดปรับปริมาตร
8. ปิเปต(Pipette)
9. ไมโครปิเปต (Micropipette)
10. ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)
11. บิวเรต
12. หลอดวิเคราะห์ซีไอดี
13. ตัวยกกลางชนิดต่างๆ



วิธีดำเนินการวิจัย

ในการทดลองเป็นการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียที่มี
สีอะโซเป็นองค์ประกอบโดยมีขั้นตอนการศึกษาวิจัยแสดงดังภาพ 4



ภาพ 4 วิธีดำเนินการวิจัย

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซ (azo dye) เป็นองค์ประกอบ

1. การตรวจสอบลักษณะพื้นฐานวิทยาและทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสีอะโซ

นำเชื้อที่ทำการคัดแยกจากตัวอย่างน้ำเสียบริเวณต่างๆ ในจังหวัดเชียงใหม่และลำพูนจากงานวิจัยเรื่องการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายสีย้อมสิ่งทอสังเคราะห์และหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อม (พรพรรณ, 2546) เมื่อทำการศึกษาความสามารถในการทนเค็มของแบคทีเรียไอโซเลท Mju-20(1), Mju-20(2), Mju-20(3), Mk-8, Lp-1 และ Mju-17 พบว่า เป็นแบคทีเรียที่สามารถทนเค็มได้ ซึ่งในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมสิ่งทอจะมีองค์ประกอบของเกลือสูง เนื่องจากเกลือเป็นสารที่ช่วยในการยิดติดของโมเลกุลของสีกับเส้นใยของผ้าที่ทำการย้อม

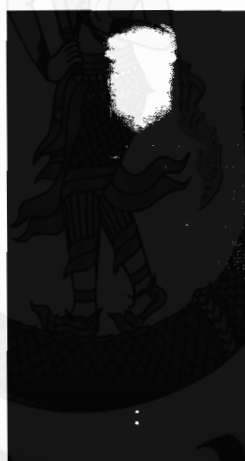
นำแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท มาทำการทดสอบการย่อยสลายสีอะโซโดยทำการฉีดลงบนอาหารสูตร nutrient agar ที่มีการเติมสี congo red 0.2 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บผลโดยดูจากความสามารถของเชื้อที่เจริญบนอาหารสูตร nutrient agar ที่มีการผสมสี congo red 0.2 กรัมต่อลิตรและสังเกตการเกิดบริเวณใส

2. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ

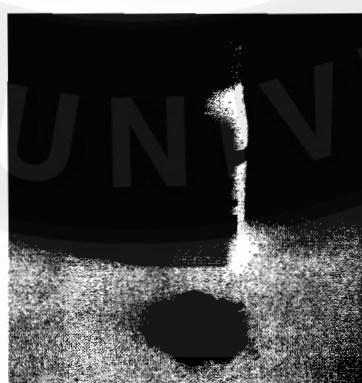
นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร nutrient broth ที่มีการเติมสี congo red 0.2 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการแยกเซลล์แบคทีเรียออกโดยวิธีการปั่นเหวี่ยง วิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดสี โดยนำส่วนใสมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร ทำการวิเคราะห์ผลทุก ๆ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการทดสอบความสามารถในการลดค่าเอฟซีโอดี (FCOD) ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบของสี congo red 0.2 กรัมต่อลิตร โดยทำการทดสอบ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์ผลเป็นเวลา 7 วัน คุณลักษณะของน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบแสดงดังตาราง 5 และภาพ 5,6 ตามลำดับ

ตาราง 5 คุณลักษณะของน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ

พารามิเตอร์	ผลที่ได้
ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร	2.314
พีเอช	7 - 7.5
เอฟซีไอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)	1350
สี	แดงเข้มอมส้ม



ภาพ 5 น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ



ภาพ 6 สี congo red ของบริษัท Fluka (India)

การทดสอบสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อ

1. การศึกษาผลของพีเอชต่อการเจริญของเชื้อ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร nutrient broth ที่พีเอช 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรแล้วนำตัวอย่างเชื้อไปเกลี่ยบนอาหารสูตร nutrient agar ให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อและวิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลายสียอะโซตามข้อ 1.2

2. การศึกษาผลความเข้มข้นของ yeast extract ต่อการเจริญของเชื้อ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร nutrient broth ที่มีการเติม yeast extract ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วนำตัวอย่างเชื้อไปเกลี่ยบนอาหารสูตร nutrient agar ให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงแล้วทำการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อและวิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลายสียอะโซตามข้อ 1.2

3. ความเข้มข้นของสีย congo red ที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีในน้ำเสียสังเคราะห์

ทำการศึกษาความเข้มข้นสีเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการกำจัดสีอะโซที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเสียสังเคราะห์ของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีมากขึ้น โดยใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีการเติม yeast extract ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 7.0 และผสมสีย congo red ที่ความเข้มข้น เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลายสียอะโซตามข้อ 1.2

การศึกษาคาร์ริงเชลล์แบคทีเรียลงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ

ทำการคัดเลือกตัวกลางเพื่อใช้ในการตรึงเชลล์แบคทีเรีย เช่น ฝาชวดน้ำ พลาสติก แผ่นพลาสติก หินภูเขาไฟ ซีโอไลท์ ฟองน้ำ โซเดียมแอลจิเนทเป็นต้น โดยทำการตรึงเชลล์แบคทีเรียในอาหารสูตร nutrient broth ที่มีตัวกลางชนิดต่าง ๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ แล้วทำการศึกษาความสามารถในการตรึงเชลล์ของแบคทีเรียกับตัวกลางชนิดต่าง ๆ

การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ตรึงลงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ ในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ

ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบโดยนำตัวกลางชนิดต่างๆ (ขนาดและปริมาณแสดงในตาราง 6) ที่ผ่านการตรึงด้วยเซลล์แบคทีเรียแล้วทดสอบความสามารถในการกำจัดเอพชีโอดีและความสามารถในการกำจัดสีอะโซในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบของสี congo red 0.2 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์เป็นเวลา 7 วัน ทำการบันทึกผลและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวกลางชนิดต่างๆ

ตาราง 6 ขนาดและปริมาณของตัวกลางที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดของตัวกลาง	ขนาด	น้ำหนัก (กรัม)
หินภูเขาไฟ	2-2.5 เซนติเมตร	5.0
ฟองน้ำ	1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร	5.0
แผ่นพลาสติก	2 เซนติเมตร	5.0
ผ้าขดพลาสติก	เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร	5.0
ซีโอไลท์	0.25-0.35 เซนติเมตร	5.0
แอลจินเนทปิด	เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ± 0.1 มิลลิเมตร	5.0

การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ตรึงลงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเซลล์แบคทีเรียในรูปเซลล์แขวนลอยในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบในระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบโดยนำเซลล์แบคทีเรียตรึงบนตัวกลางที่คัดเลือกแล้วและเซลล์แบคทีเรียในรูปเซลล์แขวนลอยมาทดสอบความสามารถในการลดค่าเอพชีโอดีและความสามารถในการกำจัดสีอะโซในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีการเติมสี congo red 0.2 กรัมต่อลิตร โดยทำการทดสอบในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์เป็นเวลา 7 วัน ทำการ

บันทึกผลและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่อยู่ในรูปเซลล์แขวนลอยและแบคทีเรียที่อยู่ในรูปเซลล์ตรึง

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ตรึงลงบนตัวกลางกับแบคทีเรียในรูปเซลล์แขวนลอยในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมสิ่งทอ อ.ป่าซาง จ.ลำพูน ในระดับห้องปฏิบัติการ

การศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมสิ่งทอ อ.ป่าซาง จ.ลำพูน โดยนำตัวกลางที่คัดเลือกแล้วที่ผ่านการตรึงด้วยเซลล์แบคทีเรียและเซลล์แบคทีเรียในรูปเซลล์แขวนลอยมาทดสอบความสามารถในการลดค่าเอพซีโอดีและความสามารถในการกำจัดสีในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมสิ่งทอ ค. แม่แรง อ.ป่าซาง จ.ลำพูน ที่ทำการเจือจางน้ำเสียน้ำประปาในอัตราส่วน 50:50, 30:70, 20:80, 10:90 และ 5:95 มีความเข้มข้นของ yeast extract ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยทำการทดสอบในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 7.0 ทำการวิเคราะห์เป็นเวลา 7 วัน ทำการบันทึกผลและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่อยู่ในรูปเซลล์แขวนลอยและแบคทีเรียที่อยู่ในรูปเซลล์ตรึง

การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8

1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics)

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 ในอาหารสูตร nutrient broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียที่เจริญในอาหารไปจึกลงบนอาหารสูตร nutrient agar นำไปบ่มที่สภาวะเดิมอีกครั้ง ซึ่งจะได้แบคทีเรียที่บริสุทธิ์ จากนั้นทำการย้อมสีแบคทีเรียแบบแกรม (Gram's staining)

2. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยชุดทดสอบสำเร็จรูป

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยชุดทดสอบ API 50 CH (Biomerieux) นำแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 มาจึกลงบนอาหารสูตร nutrient agar ให้ทั่วทั้งผิวน้ำอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศนาน 20 ชั่วโมง จากนั้นใช้ไม้พันสำลีป้าย (swab) โคโลนีแบคทีเรียบนอาหารมาละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วหยดสารละลายเซลล์แบคทีเรียที่ได้ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นับจำนวนหยดที่เติมลงไป จนได้ความขุ่นของสารละลายเซลล์มาตรฐานเท่ากับ 2 McFarland แล้วใช้สารละลายเซลล์ปริมาตรเป็น 2 เท่าของจำนวนหยดที่เติมลงไป มาผสมกับอาหาร API 50

CHL medium จากนั้นนำไปหยอดลงในหลอดเล็กๆ บนแผ่น strip จำนวน 50 หลอด นำแผ่น strip นี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บันทึกผลในชั่วโมงที่ 24 และ 48 หลังจากการบ่ม แล้ววิเคราะห์ผลในเว็บไซต์ apiweb (<http://apiweb.biomerieux.com>)

3. การหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA

3.1 การสกัด DNA จากแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 ในอาหารสูตร NB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศนาน 20 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วนำตะกอนเซลล์แบคทีเรียมาทำการสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป (Isoplant DNA extraction kit) ซึ่งมีขั้นตอนการสกัด ดังนี้ เติมน้ำ solution I ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปเขย่าแรง ๆ (vortex) เป็นเวลา 1-2 นาที เติมน้ำ solution II ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วเขย่าแรง ๆ เป็นเวลา 5-6 นาที แล้วนำไปบ่มในอ่างเก็บน้ำ ความคมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมน้ำ solution III ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เขย่าแรง ๆ เป็นเวลา 1-2 นาที แล้วนำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบตามระยะเวลานำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะได้ออกมาเป็นของเหลวแยกชั้น หลังจากนั้นดูดของเหลวใสส่วนบนประมาณ 300 ไมโครลิตร มาใส่ในหลอด microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติมน้ำ absolute ethanol ปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร แล้ว นำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งนาน 15 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เท absolute ethanol ทิ้ง แล้วเติมน้ำเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปเขย่าแรง ๆ แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทเอทานอลทิ้ง เปิดฝาหลอดทิ้งไว้เพื่อให้เอทานอลระเหยออกไปจนหมด แล้วเติมน้ำ TE buffer (pH 7.5) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำ RNase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที เพื่อทำลาย RNA ที่อาจปนเปื้อนมา ซึ่งจะได้ genomic DNA จากนั้นวัดความเข้มข้นของ genomic DNA โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นของ DNA ตามสูตรดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของ DNA (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

3.2 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) และทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

นำ DNA ที่สกัดได้จากแบคทีเรียทดสอบมาทำการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยใช้ universal primer เพื่อเพิ่มยีน 16S rRNA ซึ่งมีลำดับเบสประมาณ 500 คู่เบส โดย universal primer ที่ใช้มีดังนี้ 27F(forward primer) มีลำดับเบสดังนี้ 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 520R(reverse primer) ลำดับเบสดังนี้ 5'-ACCGCGGCGCTGGC-3', 357F (forward primer) มีลำดับเบสดังนี้ 5'-CTACGGGAGGCAAG-3', 1080R (reverse primer) มีลำดับเบสดังนี้ 5'-CCAACATCTCACAC-3', 920F (forward primer) มีลำดับเบสดังนี้ 5'-AAACTCAAAGGAATGACGG-3' และ 1522R (reverse primer) มีลำดับเบสดังนี้ 5'-AAGGAGGTGATCCRCCGCA-3' (Operan, Germany) ทำการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับการทำ PCR โดยให้มีปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย

Master mix	ปริมาตร 25 ไมโครลิตร
27F primer (ความเข้มข้น 10 พิโกโมลาร์)	ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
520R primer (ความเข้มข้น 10 พิโกโมลาร์)	ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
Genomic DNA	ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
ส่วน primer อีกสองคู่ที่เหลือทำเช่นเดียวกันกับคู่ที่ 1	

Primer ที่เหลือ คือ

357F primer (ความเข้มข้น 10 พิโกโมลาร์)	ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
1080R primer (ความเข้มข้น 10 พิโกโมลาร์)	ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
920F primer (ความเข้มข้น 10 พิโกโมลาร์)	ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
1522R primer (ความเข้มข้น 10 พิโกโมลาร์)	ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ในแต่ละปฏิกิริยาให้เข้ากัน จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ โดยใช้ เครื่อง PCR Sprint Thermal Cycler โดยกำหนดโปรแกรมการทำงานดังนี้

25 รอบ	Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที
	Denaturation	94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
	Annealing	55 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
	Extension	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
	Terminating	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที
	Hold	4 องศาเซลเซียส	จนกว่าจะใช้

จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบขนาดของ DNA ภายใต้อาณัติไฟฟ้า โดยผ่านตัวกลางชนิดวุ้น (agarose gel electrophoresis) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ เตรียม agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 กรัมโดยปริมาตร นำไปหลอมให้ละลาย จากนั้นนำ gel มาเทใน apparatus รอให้เจลแข็งตัวดีแล้วนำเจลไปวางในเครื่อง run gel เติ 1X TAE buffer ลงไปให้ท่วมเจล เตรียม ตัวอย่าง DNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วนำไปหยอดลงหลุมบนเจล โดยมี DNA marker อยู่ในหลุมที่หนึ่ง ซึ่งใช้ DNA marker ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร และ loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นปิดฝาเครื่องแล้วตั้งค่ากระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาการทำ electrophoresis แล้ว นำเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (EtBr) นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น นาน 10 นาที นำเจลไปส่องดูแถบของ DNA โดยเครื่อง Transluminator

หลังจากนั้นทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ใช้ชุด TaKaRa SUPRECT™-PCR ดังนี้ ปิเปต PCR product ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ TE buffer (พีเอช 7.5) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่ลงในคอลัมน์ นำคอลัมน์ไปใส่ในหลอด microcentrifuge tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำของเหลวที่อยู่ในหลอด microcentrifuge tube ที่ทิ้งแล้วเติม TE buffer (พีเอช 7.5) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงไปในคอลัมน์ ใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลงและดูด DNA ที่ค้างอยู่บนเยื่อกรองในคอลัมน์ให้หลุดออกมา แล้วคอลัมน์ลงในหลอด microcentrifuge tube อันใหม่แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ซึ่งจะทำให้ได้ PCR product บริสุทธิ์ที่มีปริมาณเท่ากับ 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำ PCR product ที่บริสุทธิ์นี้ไปทำการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยบริษัท First Base Laboratories ประเทศมาเลเซีย นำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบความคล้ายกับ

ฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ซึ่งจะช่วยให้ทราบ genus และ species ของแบคทีเรียได้

การศึกษาผลของความเป็นพิษจากน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรียแบบเซลล์แขวนลอย

ศึกษาผลของความเป็นพิษของน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดด้วยเซลล์แบคทีเรียในสภาวะไร้อากาศ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Mustafa and Delia (2005) นำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรียแบบเซลล์แขวนลอยมาทำการเจือจางที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 5, 10, 25, 50, 100 โดยปริมาตรต่อปริมาตร แล้วคัดเลือก ไรแดงจำนวน 5 ตัว มาทดสอบความเป็นพิษโดยใส่ไรแดงลงไปในช่วงทดลองที่มีปริมาตรน้ำเสียที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 5 มิลลิลิตร และมีค่าพีเอช 7-8 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงจำนวน 5 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลอัตราการตายของไรแดงทั้งหมด จากนั้นทำการศึกษาผลของออกซิเจนที่เติมลงไปในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรียแบบเซลล์แขวนลอยภายใต้สภาวะไร้อากาศต่ออัตราการรอดชีวิตของไรแดง โดยทำการเติมออกซิเจนลงในน้ำที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรียแบบเซลล์แขวนลอยแล้ว เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมงแล้วบันทึกผลเพื่อเป็นการติดตามผลของการบำบัดน้ำเสียที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ

บทที่ 4

ผลและการอภิปรายผลการวิจัย

ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการ บำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซ เป็นองค์ประกอบ

การตรวจสอบลักษณะพื้นฐานวิทยาและทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสีของแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย

นำแบคทีเรียไอโซเลท Mju-20(1), Mju-20(2), Mju-20(3), Mk-8, Lp-1 และ Mju-17 มาตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาบนอาหารสูตร nutrient agar โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท Mju-20(1) มีโคโลนีสีขาวครีม ลักษณะของโคโลนีกลม ผิวหน้าแบนราบ (flat) และขอบเรียบ (entire) ลักษณะโคโลนีมีขนาดใหญ่เรียงตัวต่อกันแน่น (ภาพ 7ก) เมื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า ไอโซเลท Mju-20(1) มีลักษณะเป็นท่อนต่อกันมีขนาดความกว้างของเซลล์ 0.5 - 0.8 ไมโครเมตร โดยมีความยาวของเซลล์ 2.5 - 5 ไมโครเมตร เป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ ข้อมติคีสแกรมบวกและสร้างเอนโดสปอร์อยู่ระหว่างส่วนหัวและส่วนกลางของเซลล์ (ภาพ 8ก)

แบคทีเรียไอโซเลท Mju-20(2) มีโคโลนีสีครีมขุ่น ผิวหน้าแบนราบและขอบเรียบแต่ลักษณะโคโลนีมีขนาดเล็กกว่าไอโซเลท Mju20-(1) และกระจายตัวเป็นจุดเล็ก (ภาพ 7ข) เมื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า มีลักษณะเป็นเซลล์ทรงกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.5 ไมโครเมตร คิตีสแกรมบวก (ภาพ 8ข)

แบคทีเรียไอโซเลท Mju20-(3) มีโคโลนีสีครีมขุ่น ผิวหน้าแบนราบและขอบเรียบ กระจายตัวเป็นจุดเล็ก (ภาพ 7ค) เมื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า มีลักษณะเป็นเซลล์ทรงกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.5 ไมโครเมตร คิตีสแกรมบวก (ภาพ 8ค) แบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 มีโคโลนีสีขาวครีม ลักษณะของโคโลนีกลม ผิวหน้าแบนราบและขอบเรียบ (ภาพ 7ง) เมื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า มีลักษณะเป็นท่อนต่อกัน คิตีสแกรมบวก (ภาพ 8ง)

แบคทีเรียไอโซเลท Lp-1 มีลักษณะใกล้เคียงกับไอโซเลท Mk-8 คือ มีลักษณะของโคโลนีกลมแต่มีขนาดใหญ่กว่า Mk-8 และสีโคโลนีของ Lp-1 มีสีขาวขุ่น ผิวหน้าแบนราบ

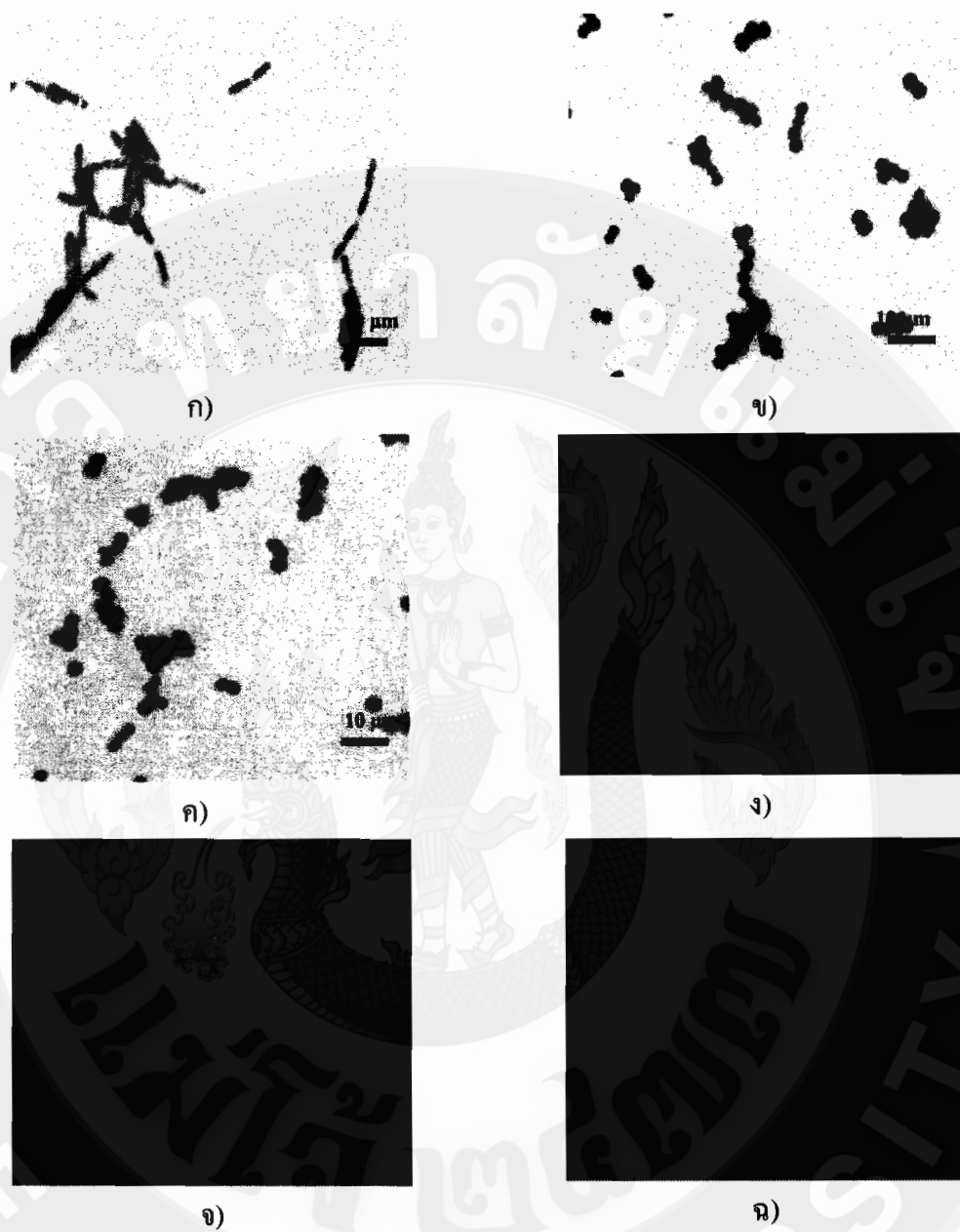
และขอบเรียบ (ภาพ 7จ) เมื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่ามีลักษณะเป็นท่อนต่อกัน ติดสีแกรมบวก (ภาพ 8จ)

แบคทีเรียไอโซเลท Mju-17 มีโคโลนีสีขาวขุ่น ผิวหน้าแบนราบและขอบเรียบ ลักษณะโคโลนีมีขนาดเล็กและกระจายตัวเป็นจุดเล็ก ๆ (ภาพ 7ฉ) เมื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า มีลักษณะเป็นเชลล์ทรงกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.5 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก (ภาพ 8ฉ)



ภาพ 7 ลักษณะการเจริญบนอาหารสูตร nutrient agar ของแบคทีเรียไอโซเลท Mju-20(1), Mju-20(2), Mju-20(3), Mk-8, Lp-1 และ Mju-17

ก) Mju-20(1)	ข) Mju-20(2)
ค) Mju-20(3)	ง) Mk-8
จ) Lp-1	ฉ) Mju-17



ภาพ 8 รูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียไอโซเลท Mju-20(1), Mju-20(2), Mju-20(3), Mju-17, Mk-8, และ Lp-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า

ก) Mju-20(1)

ง) Mk-8

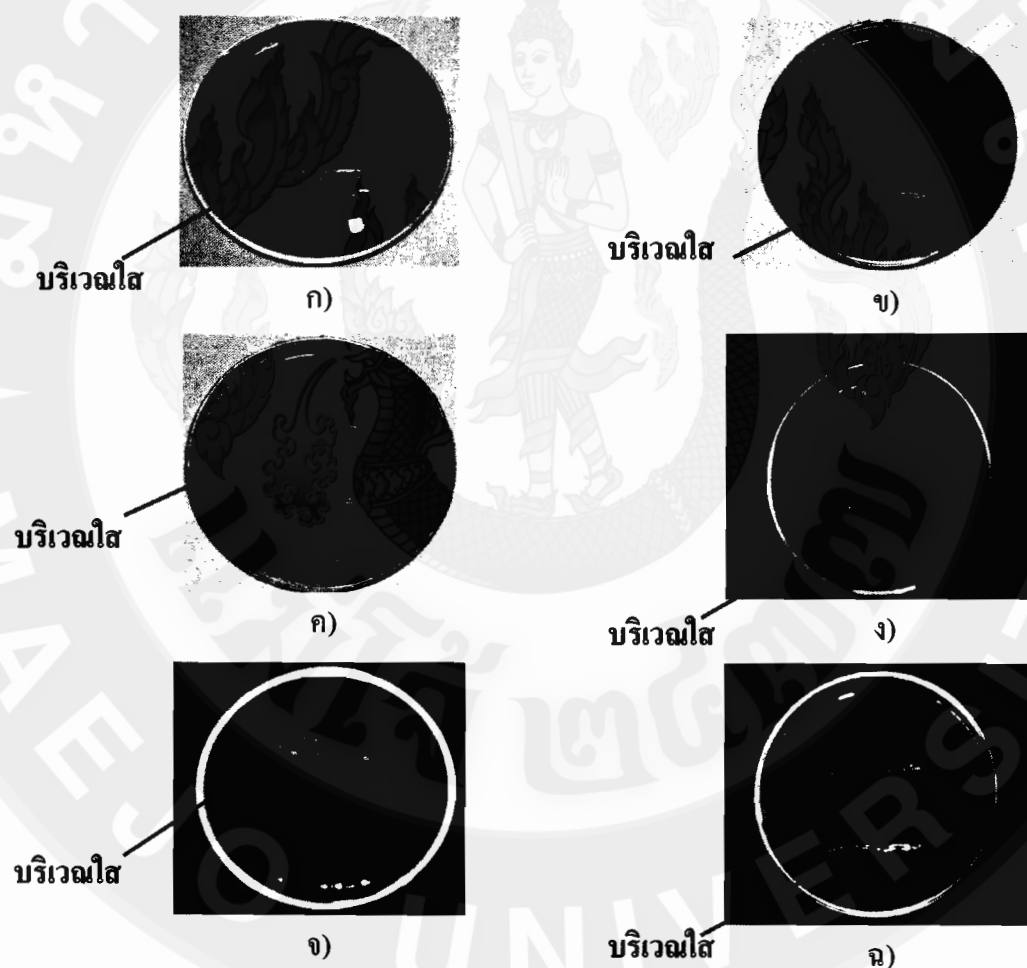
ข) Mju-20(2)

จ) Lp-1

ค) Mju-20(3)

ฉ) Mju-17

จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสีอะโซโดยสังเกตการเกิดบริเวณใสในอาหารสูตร nutrient agar ที่มีการเติมสี congo red 0.2 กรัมต่อลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เกิดบริเวณใสรอบ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท (ภาพ 9) แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท มีความสามารถในการย่อยสลายสีอะโซ ซึ่งจากรายงานการวิจัยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสีอะโซได้นั้น แบคทีเรียจะต้องสามารถผลิตเอนไซม์ azoreductase เพื่อย่อยสลายพันธะอะโซในโมเลกุลของสารสีที่แขวนลอยอยู่ในน้ำเสียให้กลายเป็นสารประกอบอะโรมาติกเอมีน (Pearce et al., 2003)



ภาพ 9 บริเวณใสที่เกิดจากการย่อยสลายสีอะโซของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลทบนอาหารสูตร nutrient agar ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ

ก) Mju-20(1)

ข) Mju-20(2)

ค) Mju-20(3)

ง) Mk-8

จ) Lp-1

ฉ) Mju-17

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบโดยนำเซลล์แบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลตในรูปเซลล์แขวนลอยมาทดสอบความสามารถในการกำจัดเอฟซีไอดี (FCOD) และความสามารถในการกำจัดสีอะโซในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีการเติมสี congo red 0.2 กรัมต่อลิตร โดยทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ ไร้อากาศ เป็นระยะเวลา 7 วัน (ภาพ 10, 11 และ 12) ทำการบันทึกผลและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่าง ๆ ที่อยู่ในรูปเซลล์แขวนลอย พบว่า แบคทีเรีย ไอโซเลต Mk-8 มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีอะโซ เท่ากับ ร้อยละ 85.8 และสามารถกำจัดเอฟซีไอดี ได้เท่ากับร้อยละ 54.7 (ตารางภาคผนวก 2) จากผลการทดลองในข้างต้นจึงได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลต Mk-8 มาใช้ในการทดลองต่อไป



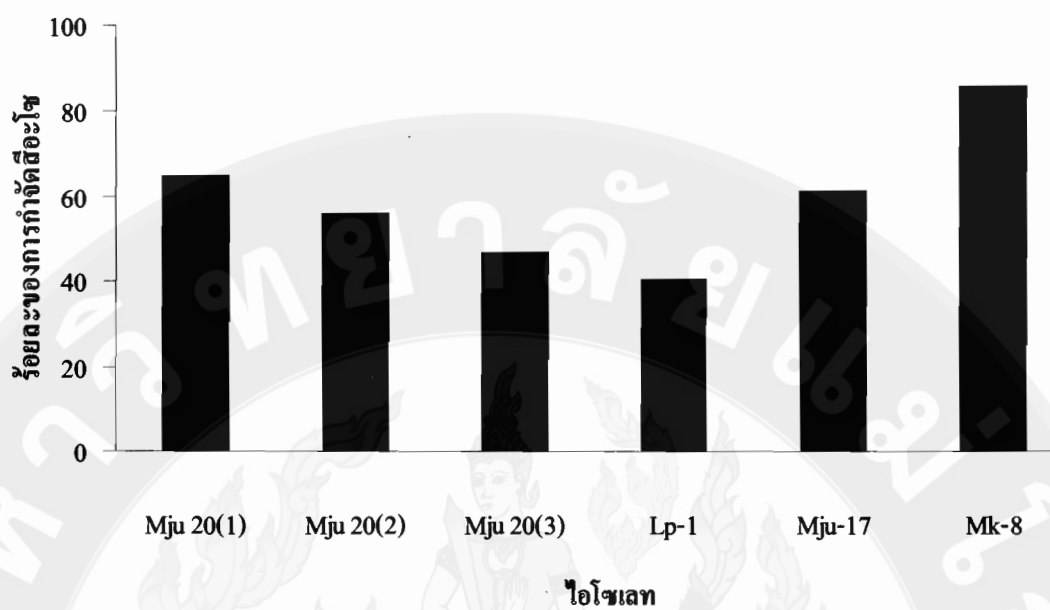
ก)

ข)

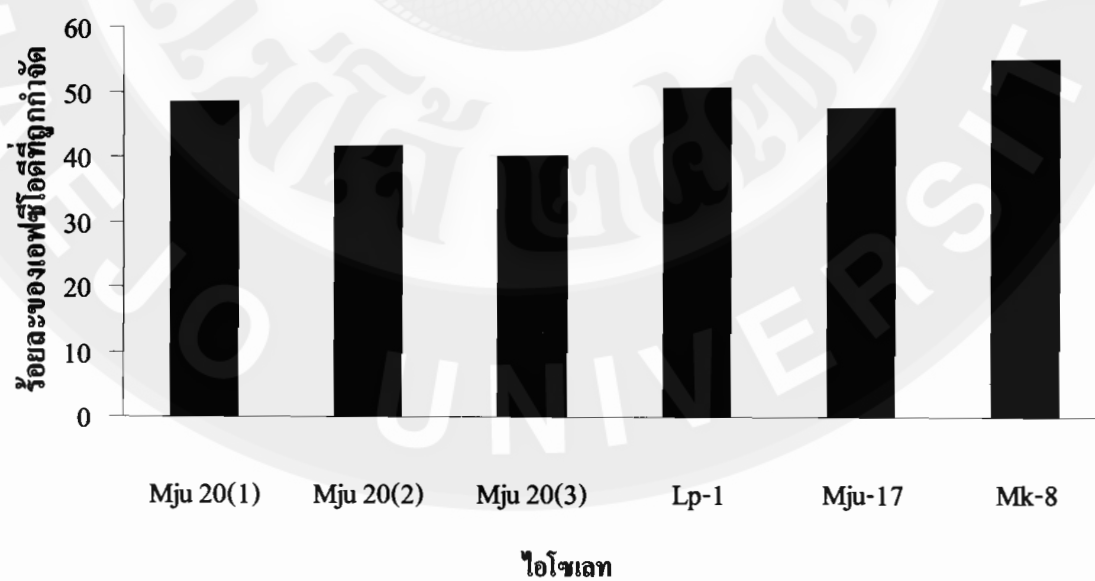
ภาพ 10 การบำบัดน้ำเสียสีอะโซสังเคราะห์โดยนำเซลล์แบคทีเรีย Mk-8 ในรูปเซลล์แขวนลอย เทียบกับชุดควบคุม

ก) ชุดควบคุม

ข) ชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียไอโซเลต Mk-8



ภาพ 11 ร้อยละการกำจัดสีอะโซในน้ำเสียสังเคราะห์โดยแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท



ภาพ 12 ร้อยละการกำจัดเอฟซีไอซีในน้ำเสียที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบโดยแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท

**ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ
เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8**

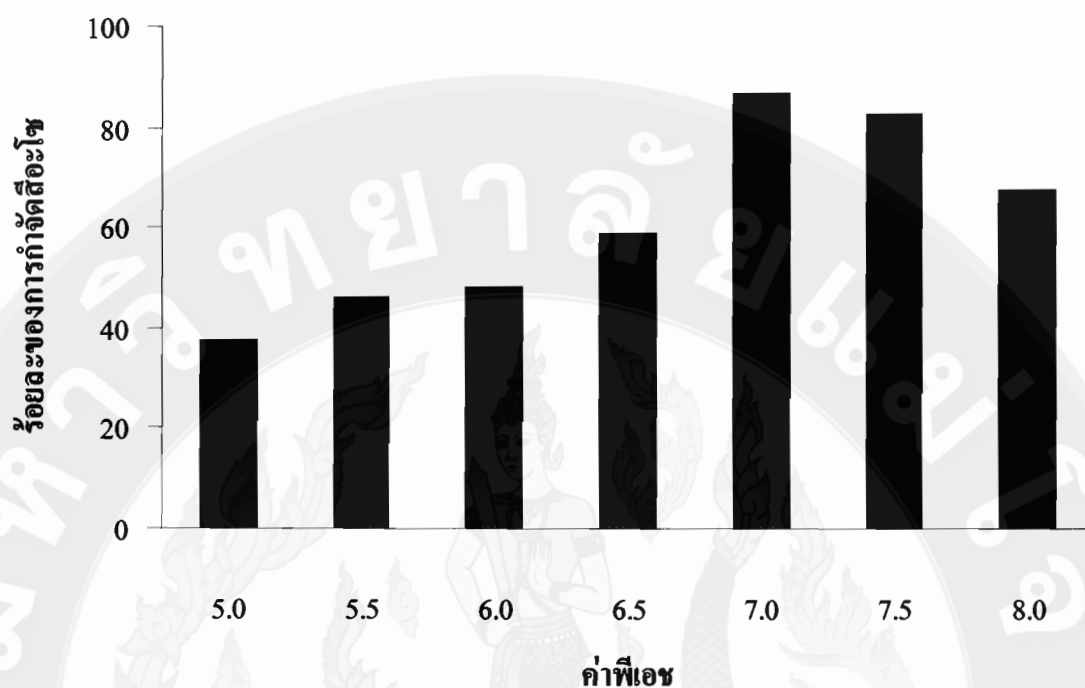
พีเอช (pH) ที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 และประสิทธิภาพในการกำจัดสี อะโซในน้ำเสียสังเคราะห์

จากผลการทดลองในข้อ 1 พบว่า แบคทีเรีย ไอโซเลท Mk-8 มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีและเอฟซีไอดีมากที่สุดเมื่อเทียบกับแบคทีเรียไอโซเลทอื่น ๆ ดังนั้น จึงได้เลือกแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 มาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร nutrient broth พีเอช 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าการเจริญ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำตัวอย่างเชื้อไปเกลี่ยบนอาหารสูตร nutrient agar ให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ที่ค่าพีเอช 7.0-7.5 เชื้อแบคทีเรีย Mk-8 เจริญเติบโตได้ดี (ตาราง 7)

เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมที่แบคทีเรียสามารถย่อยสลายสี อะโซในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพเป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ พบว่า ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 7 เชื้อแบคทีเรียสามารถย่อยสลายสีอะโซได้สูงที่สุด เท่ากับ ร้อยละ 86.9 รองลงมา ได้แก่ ที่ระดับพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสีย เท่ากับ 7.5 และ 8.0 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีอะโซได้เท่ากับ 82.5 และ 67.2 ตามลำดับ (ภาพ 13 , 14 และ 15) ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่พีเอชเท่ากับ 7.0-7.5

ตาราง 7 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 ที่ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

พีเอชเริ่มต้น	ค่าการดูดกลืนแสง (OD _{600 nm})	จำนวนแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 (cfu/ml)
5.0	0.519	5 x 10 ⁶
5.5	0.479	4 x 10 ⁶
6.0	0.596	5 x 10 ⁶
6.5	0.792	1.4 x 10 ⁷
7.0	0.896	2.4 x 10 ⁷
7.5	0.721	2.0 x 10 ⁷
8.0	0.703	1.2 x 10 ⁷



ภาพ 13 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 ในการกำจัดสีอะโซในน้ำเสียสังเคราะห์ ที่มีค่าพีเอชต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน



ก) ข) ค) ง) จ) ฉ) ช) ซ)

ภาพ 14 สีของน้ำเสียที่ค่าพีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ หลังการบำบัดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 เป็นระยะเวลา 7 วัน

ก) น้ำเสียเริ่มต้น

ข) พีเอช 5.0

ค) พีเอช 5.5

ง) พีเอช 6.0

จ) พีเอช 6.5

ฉ) พีเอช 7.0

ช) พีเอช 7.5

ซ) พีเอช 8.0



ก)

ข)

ค)

ภาพ 15 สีของน้ำเสียที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และ 7.5 หลังการบำบัดด้วยแบคทีเรีย

ไอโซเลท Mk-8 เป็นระยะเวลา 7 วัน

ก) น้ำเสียเริ่มต้น (พีเอช 5.7)

ข) พีเอช 7.0

ค) พีเอช 7.5

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเลี้ยงเชื้อ คือพีเอช 7.0 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Safia et al. (2006) ซึ่งได้ทำการศึกษาค่าพีเอชและอุณหภูมิที่มีผลต่อการย่อยสลายสีในน้ำเสียจากโรงงานฟอกย้อม พบว่า การเลี้ยงแบคทีเรียแบบร่วมกันสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่พีเอช 7 และสามารถย่อยสลายสีได้ถึงร้อยละ 90 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสี คือ 37 องศาเซลเซียสซึ่งสามารถย่อยสลายสีได้ถึงร้อยละ 93 ในทางเดียวกันกับงานวิจัยของ Chang et al. (2001) ซึ่งพบว่า ที่ระดับ พีเอชในช่วง 7-9 เป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญและการทำงานของเอนไซม์ azoreductase ที่แบคทีเรียผลิตออกมาย่อยสลายสีข้อมสิ่งทอสังเคราะห์แต่ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย

ความเข้มข้นของ yeast extract ที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 และประสิทธิภาพในการกำจัดสีอะโซในน้ำเสียสังเคราะห์

เมื่อทำการทดสอบระดับพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและต่อประสิทธิภาพการกำจัดสีอะโซพบว่า พีเอช 7.0 เป็นระดับพีเอชที่เหมาะสมในขั้นตอนนี้จึงนำแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 มาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร nutrient broth ที่มีการเติม yeast extract ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4 โดยนำหมักต่อปริมาตรและพีเอชเริ่มต้น

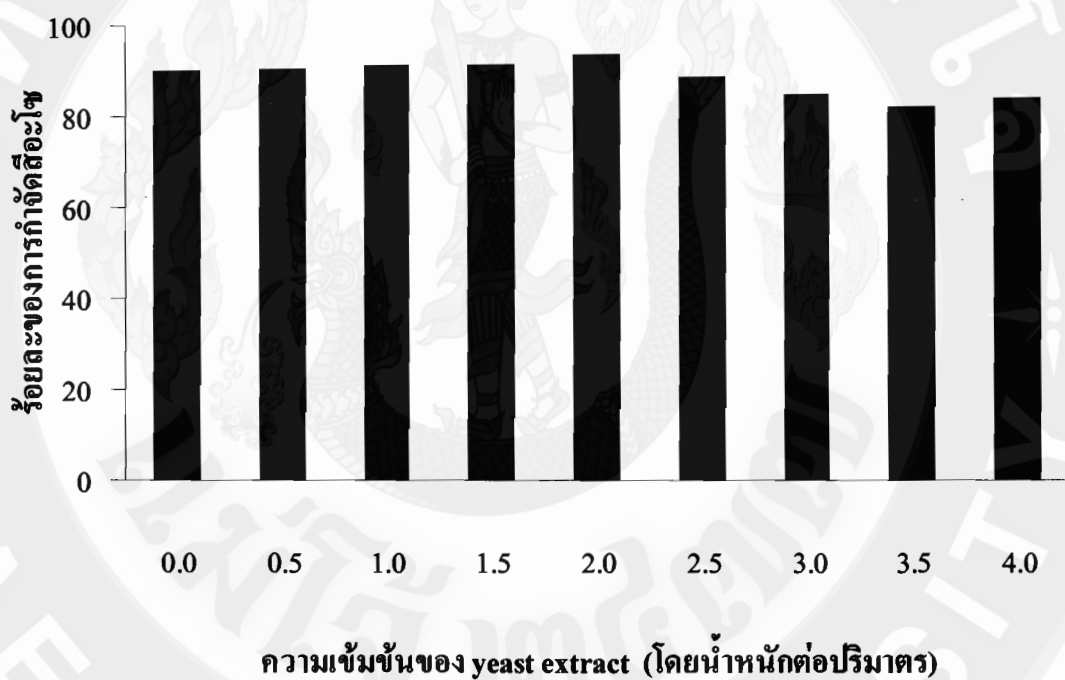
ของอาหารเหลวเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงโดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงจากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรพบว่า ที่ความเข้มข้นของ yeast extract ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรมากกว่าที่ความเข้มข้นอื่น (ตาราง 8)

ตาราง 8 ผลความเข้มข้นที่เหมาะสมของ yeast extract ต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย
ไอโซเลท Mk-8

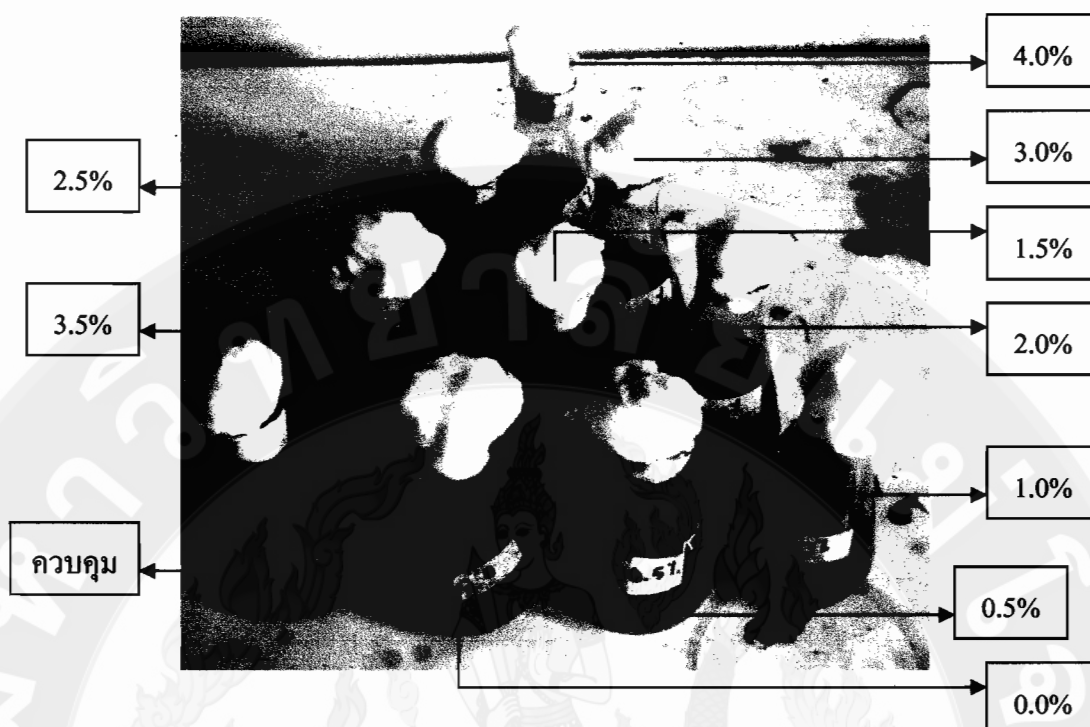
ร้อยละความเข้มข้นของ yeast extract (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD _{600nm})	จำนวนแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8(cfu/ml)
0.0	0.745	1.6x10 ⁷
0.5	1.289	2.4x10 ⁷
1.0	1.599	2.6x10 ⁷
1.5	1.621	3.0x10 ⁷
2.0	1.955	3.2x10 ⁷
2.5	1.816	2.5x10 ⁷
3.0	1.645	1.9x10 ⁷
3.5	1.795	2.1x10 ⁷
4.0	1.637	3.0x10 ⁷

จากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ yeast extract ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย Mk-8 เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีอะโซมากขึ้น โดยใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีการเติมสี congo red 0.2 กรัมต่อลิตร และ yeast extract ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พืชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วันในสภาวะไร้อากาศ พบว่า ที่ความเข้มข้นของ yeast extract ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีอะโซสูงสุด เท่ากับ ร้อยละ 93.3 (ภาพ 16 และภาพ 17) จะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของ yeast extract เท่ากับ 0 นั้น ก็สามารถที่จะกำจัดสี congo red ได้เช่นกัน คือ มีค่าการกำจัดสี congo red เท่ากับ ร้อยละ 89.8

แต่ในการวิจัยในครั้งนี้ต้องการเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสี congo red ดังนั้นเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดที่เพิ่มขึ้นจึงได้เลือกความเข้มข้นของ yeast extract ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก จากงานวิจัยของ Joshu et al. (2001) ได้ทำการศึกษากำหนดปริมาณของ yeast extract ต่อการย่อยสลายสีของ reactive red 22 ด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas luteola* พบว่าที่ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของ yeast extract มีผลทำให้เกิดการย่อยสลายสีของ reactive red 22 ได้สูงสุดและในทางเดียวกันกับงานวิจัยของ Hu (2001) ซึ่งได้ทำการศึกษากำหนดเพิ่มแหล่งไนโตรเจนโดยใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียพบว่า มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีอะโซไดรียล 59 - 99



ภาพ 16 ร้อยละการกำจัดสีอะโซในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มี yeast extract ความเข้มข้นต่าง ๆ ของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8



ภาพ 17 ลักษณะของน้ำเสียสังเคราะห์ที่เติม yeast extract ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังการบำบัดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8

ความเข้มข้นของสีที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีโฆในน้ำเสียสังเคราะห์

จากการศึกษาความเข้มข้นสีเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการกำจัดสีโฆที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเสียสังเคราะห์ของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีมากขึ้น โดยใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นของ yeast extract ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 7.0 และเติม congo red ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 กรัมต่อลิตร พบว่า ที่ความเข้มข้นสีเริ่มต้น 0.2 กรัมต่อลิตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 485 นาโนเมตร ลดลงดีที่สุดเมื่อเทียบกับระดับความเข้มข้นอื่น ๆ โดยในวันสุดท้ายของการทดลองที่ความเข้มข้นสีเริ่มต้น 0.2 กรัมต่อลิตร มีค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.421 ซึ่งลดลงจากวันแรกของการทดลองที่มีค่าการดูดกลืนแสง 1.145 โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงมีค่า เท่ากับ 0.724 (ตาราง 9) ทั้งนี้แสดงว่าแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีได้ดี ในระดับความเข้มข้นสีเริ่มต้น เท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่าโครงสร้างสีที่มีองค์ประกอบของหมู่ sulphonie ซึ่งเป็นสารประเภทดิเทอร์เจนต์ เมื่อเซลล์แบคทีเรียดูดซับหมู่ sulphonie เข้าไปในปริมาณมากจะมีผลไปยับยั้งเมทาบอลิซึมทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสีลดลง เมื่อมีปริมาณความเข้มข้นของสีเพิ่มขึ้นรวมไปถึงจำนวนพันธะโฆที่มีจำนวนมากก็จะส่งผลต่อการกำจัดสีโฆด้วย (Wuhrmann et al., 1980)

จากการศึกษางานวิจัยของ Hu (2001) พบว่า *Paenibacillus azoreducens* สามารถย่อยสลายสี remazol black B ที่มีความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ได้ถึงร้อยละ 98 เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Kalyani et al. (2009) ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของสีเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพการกำจัดสีของแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. SUK1 พบว่า ที่สภาวะไร้อากาศ พีเอช 6.2–7.5 มีประสิทธิภาพในการกำจัดสี reactive red 2 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.3 กรัมต่อลิตร ได้ถึงร้อยละ 96 โดยพบว่า ภายใต้สภาวะไร้อากาศเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียในการกำจัดสี จากผลการศึกษาความเข้มข้นของสีเริ่มต้น พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละวันที่ทำการทดลองยังมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงอยู่ ซึ่งอาจมีการขึ้นลงของค่าการดูดกลืนแสงเป็นผลมาจากการที่แบคทีเรียอาจมีการดูดซับสารสีเข้าไปภายในเซลล์บางส่วนจึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าลดลงและเมื่อเซลล์แบคทีเรียมีการปล่อยสารสีที่ดูดซับออกมาค่าการดูดกลืนแสงก็มีค่าเพิ่มขึ้น

ตาราง 9 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำเสียสังเคราะห์ที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรียโอโซเลท Mk-8 แบบ เซลล์แขวนลอยที่มีระดับความเข้มข้นของสีอะโซต่าง ๆ

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 485 นาโนเมตร									
ปริมาณ สี (กรัม)	วัน								ค่าการดูดกลืน แสงที่ลดลง
	0	1	2	3	4	5	6	7	
0.1	1.095	1.024	0.900	0.754	0.530	0.440	0.391	0.410	0.685
0.2	1.145	1.020	0.892	0.680	0.595	0.451	0.465	0.421	0.724
0.3	1.320	1.125	1.084	0.977	0.820	0.716	0.706	0.704	0.616
0.4	1.820	1.814	1.651	1.520	1.265	1.108	1.233	1.197	0.623
0.5	2.057	1.995	1.824	1.655	1.609	1.525	1.496	1.409	0.648
0.6	2.285	2.105	2.10	2.005	2.005	1.975	1.861	1.649	0.636
0.7	2.585	2.554	2.406	2.315	2.135	2.115	2.026	1.980	0.605
0.8	3.085	2.930	2.840	2.801	2.754	2.621	2.602	2.598	0.487
0.9	3.775	3.605	3.544	3.320	3.157	3.128	3.121	3.101	0.674
1.0	4.080	4.000	3.950	3.770	3.690	3.570	3.485	3.463	0.617

ผลการศึกษาการตรึงเซลล์แบคทีเรียลงบนตัวกลาง

ชนิดต่าง ๆ

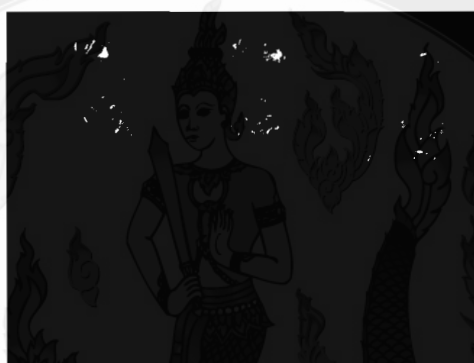
จากการนำแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 มาทำการตรึงลงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ แสดงในภาพภาคผนวก 1 โดยมีขนาดและปริมาณที่เลือกใช้แสดงดังตาราง 7 เพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรีย โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร nutrient broth ที่มีการเติม yeast extract ร้อยละ 2 กรัมโดยปริมาตร พี่เอชเท่ากับ 7 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะไร้อากาศ โดยทำการตรึงเป็นระยะเวลา 7 , 10 และ 14 วัน (ภาพ 18) และทำการทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดสีอะโซของตัวกลางชนิดต่าง ๆ พบว่า จากการสังเกตลักษณะของตัวกลางโดยตาเปล่าในแต่ละวันพบว่าจะมีเซลล์ของแบคทีเรียเกาะอยู่บนตัวกลางเพิ่มมากขึ้น โดยจะมองเห็นแผ่นฟิล์มเป็นเมือกสีขาวติดอยู่บนตัวกลาง (ภาพ 19) ซึ่งตัวกลางภูเขาไฟ ฟองน้ำ และซีโอไลต์จะมีแผ่นฟิล์มบาง ๆ เคลือบอยู่ ส่วนในแผ่นพลาสติกและฝาขวดน้ำพลาสติกจะมีปริมาณของแผ่นฟิล์มเคลือบอยู่ในปริมาณที่น้อยกว่า ทั้งนี้ อาจเนื่องจากลักษณะของผิวสัมผัสที่มีลักษณะไม่ขรุขระจึงเป็นการยากต่อการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรีย

จากการสังเกตสีของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่า สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนแปลงไปในแต่ละวันด้วยซึ่งเป็นผลสืบเนื่องจากการนำอาหารไปใช้ในการดำรงชีวิตของแบคทีเรียและเมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดสีอะโซ พบว่า การตรึงแบคทีเรียบนตัวกลางเป็นระยะเวลา 7 วัน สามารถที่จะกำจัดสีอะโซที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเสียได้จึงไม่จำเป็นที่จะต้องมีการตรึงเซลล์เป็นระยะเวลานาน (ภาพ 20)

วิธีในการตรึงเซลล์แบคทีเรียลงในโซเดียมแอลจิเนทบีดจะมีวิธีการที่แตกต่างไปจากการตรึงลงในตัวกลางชนิดอื่นๆ คือ โซเดียมแอลจิเนทจะมีลักษณะเป็นผงแป้ง จะต้องอาศัยแคลเซียมคลอไรด์ที่มีสภาวะเป็นด่างช่วยในการขึ้นรูปเป็นเม็ดบีด ซึ่งในการทดลองในครั้งนี้จะใช้เซลล์ทั้งหมดของแบคทีเรียในการตรึง (Whole cell immobilization (WCI)) ตามวิธีของ Kawaguti and Sato (2007) โดยทำการเตรียมผงโซเดียมแอลจิเนท 2 กรัมต่อลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว พร้อมทั้งใส่เซลล์แบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการผสมองค์ประกอบแต่ละชนิดจนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งจะมีลักษณะเป็นของเหลวข้นหนืด มีสีขาวขุ่นปนเหลือง เมื่อทำการเตรียมสารละลายโซเดียมแอลจิเนทที่มีองค์ประกอบของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 แล้วจึงนำสารละลายที่ได้นั้นมาทำการขึ้นรูปเป็นเม็ดบีดในสารละลายที่มีความเข้มข้นของ CaCl_2 ร้อยละ 2 กรัมโดยปริมาตร แล้วทำการพักไว้ในสารละลายที่มีความเข้มข้นของ CaCl_2 ร้อยละ 2 กรัมโดยปริมาตรเป็นระยะเวลา

12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป ลักษณะของ โซเดียมแอลจินेटที่แสดงในภาพภาคผนวก 1จ

จากผลการทดลองในข้างต้น จึงได้เลือกทำการตรึงเซลล์แบคทีเรียลงบนตัวกลาง ชนิดต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วันเพื่อเป็นการลดระยะเวลาในการตรึงเซลล์แบคทีเรียและค่าใช้จ่าย ในการเติมอาหารให้กับเซลล์แบคทีเรีย ดังนั้น การที่จะนำแบคทีเรียในรูปเซลล์ตรึงไปประยุกต์ใช้นั้นควรทำการตรึงเป็นระยะเวลา 7 วัน เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสีและเอพไซโอดีใน น้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อม



ก)

ข)

ค)



ง)

จ)

ภาพ 18 ลักษณะของตัวกลางที่ตรึงแบคทีเรียโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร nutrient broth โดยทำการตรึงเป็นระยะเวลา 7, 10 และ 14 วัน

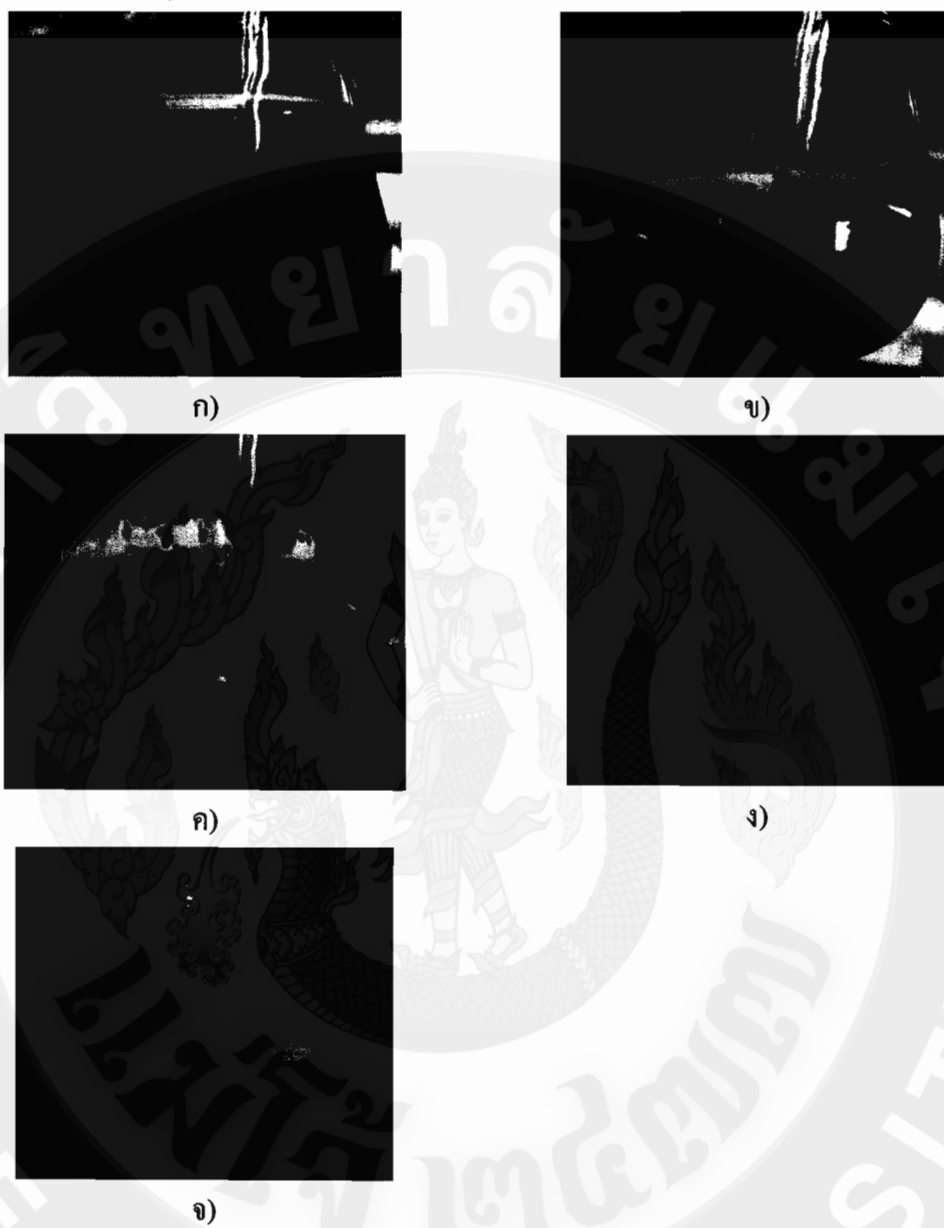
ก) หินภูเขาไฟ

ข) ฟองน้ำ

ค) แผ่นพลาสติก

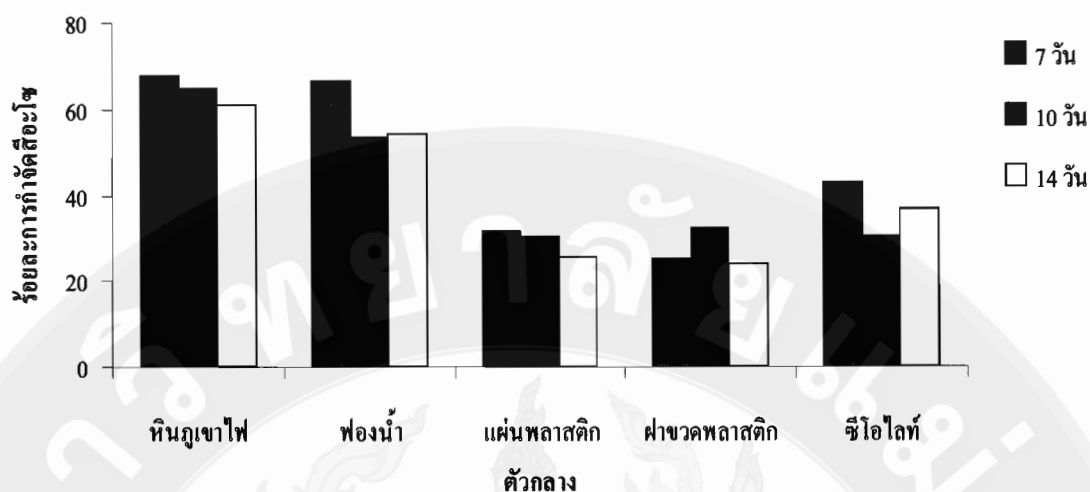
ง) ฝาชวดพลาสติก

จ) ซีโอไลท์



ภาพ 19 ลักษณะแผ่นฟิล์มที่เกิดขึ้นในระหว่างการตรึงแบบที่เรียบบนตัวกลาง

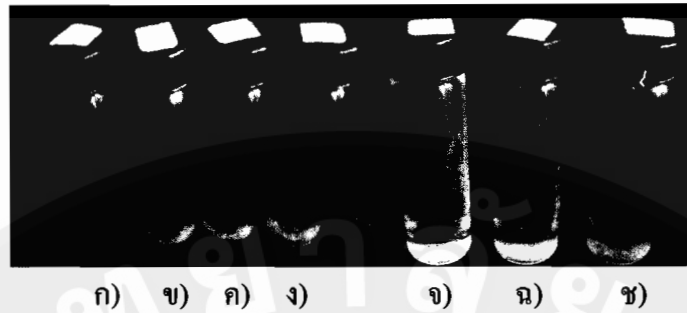
- ก) หินภูเขาไฟ
- ข) แผ่นพลาสติก
- ค) ซีโอไลท์
- ง) ฟองน้ำ
- จ) ฝาขวดพลาสติก



ภาพ 20 ร้อยละการกำจัดสีอะโซของแบคทีเรีย Mk-8 ที่ตรึงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ โดยทำการตรึงเป็นระยะเวลา 7,10 และ 14 วัน

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ตรึงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ ในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบเพื่อคัดเลือกตัวกลางที่เหมาะสมในการทดลองขั้นต่อไป

จากการทดสอบประสิทธิภาพของการตรึงแบคทีเรีย Mk-8 บนตัวกลางชนิดต่าง ๆ พบว่า การตรึงแบคทีเรีย Mk-8 บนตัวกลางเป็นระยะเวลา 7 วัน ประสิทธิภาพในการกำจัดสีมีประสิทธิภาพที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาในการตรึงช่วงต่างๆ ในการทดลองนี้จึงได้นำตัวกลางชนิดต่างๆ ที่ผ่านการตรึงด้วยเซลล์แบคทีเรียเป็นระยะเวลา 7 วัน มาทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ โดยในการทดลองมีการเติมสี congo red 0.2 กรัมต่อลิตร ทำการศึกษาในขวดรูปชมพู่ ในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดมาทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใส จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงของน้ำเสียที่ค่าความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร พบว่าการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ด้วยแบคทีเรียตรึงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน สีของน้ำเสียเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะเห็นความแตกต่างในชุดควบคุมซึ่งจะมีระดับความเข้มของสีมากกว่าสีของน้ำเสียสังเคราะห์ในชุดตัวกลางควบคุมและสีในน้ำเสียสังเคราะห์ในชุดทดลองที่ตรึงแบคทีเรียบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ (ภาพ 21 และภาพ 22)



ภาพ 21 น้ำเสียสีสังเคราะห์ที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรียตรึงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน

- | | |
|-----------------------|-----------------|
| ก) ขุคควบคุม | ข) ฝาขวดพลาสติก |
| ค) แผ่นพลาสติก | ง) ซีโอไลท์ |
| จ) หินภูเขาไฟ | ฉ) ฟองน้ำ |
| ช) โซเดียมแอลจิเนตบิท | |



ภาพ 22 น้ำเสียสีสังเคราะห์ที่ผ่านการบำบัดด้วยตัวกลางชนิดต่าง ๆ ที่ไม่มีการตรึงเซลล์แบคทีเรีย

- | | |
|-----------------------|-----------------|
| ก) ขุคควบคุม | ข) ฝาขวดพลาสติก |
| ค) แผ่นพลาสติก | ง) ซีโอไลท์ |
| จ) หินภูเขาไฟ | ฉ) ฟองน้ำ |
| ช) โซเดียมแอลจิเนตบิท | |

ประสิทธิภาพของตัวกลางชนิดต่าง ๆ ในการกำจัดสีอะโซ

จากการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบด้วยการตรึงแบคทีเรียบนหินภูเขาไฟ พบว่า ที่ความยาวคลื่น 498 นาโนเมตร ในวันเริ่มต้นมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 2.314 ซึ่งลดลงอย่างต่อเนื่องและเริ่มคงที่ในวันที่ 5 จนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง พบว่า มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.749 (ภาพ 23) ทั้งนี้แสดงว่า แบคทีเรียที่ยึดเกาะอยู่บนตัวกลางหินภูเขาไฟ สามารถกำจัดสีอะโซได้ โดยวันสุดท้ายของการทดลองค่าการดูดกลืนแสงที่ 485 นาโนเมตร ลดลงร้อยละ 67.9 (ภาพ 24) จากงานวิจัยของ Nigam and Marchant (1995) ซึ่งทำการศึกษาโดยการเลี้ยงแบคทีเรียร่วมกันและนำมาตรึงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ พบว่า เมื่อตรึงแบคทีเรียบนหินภูเขาไฟสามารถกำจัดสีอะโซได้สมบูรณ์ในเวลา 11 ชั่วโมง ซึ่งจะเห็นว่า ประสิทธิภาพการย่อยสลายสีอะโซดีมาก ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองของ Nigam and Marchant (1995) มีการเติมสารอาหารลงไปในน้ำเสียที่ทำการทดลองด้วย เมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพของตัวกลางหินภูเขาไฟที่ไม่มีการตรึงด้วยแบคทีเรีย พบว่า ตัวกลางหินภูเขาไฟที่ไม่มีการตรึงด้วยแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีอะโซร้อยละ 13.1 ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากหินภูเขาไฟมีการดูดซับสีอะโซที่มีอยู่ในองค์ประกอบของน้ำเสีย ดังนั้น ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนตัวกลางหินภูเขาไฟในการกำจัดสีอะโซมีค่าเท่ากับ ร้อยละ 54.8

การบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ด้วยการตรึงแบคทีเรียบนฟองน้ำ พบว่า มีค่าการดูดกลืนแสงในวันสุดท้ายของการทดลองเท่ากับ 0.775 โดยลดลงจากวันแรกของการทดลองที่มีค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 2.314 (ภาพ 23) คิดเป็นร้อยละการกำจัดสีอะโซเท่ากับ ร้อยละ 66.5 (ภาพ 24) จากงานวิจัยของ Nigam and Marchant (1995) ซึ่งทำการศึกษาโดยการเลี้ยงแบคทีเรียร่วมกันและนำมาตรึงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ พบว่า เมื่อตรึงแบคทีเรียบนโพลียูรีเทนโฟม พบว่า สามารถย่อยสลายสีอะโซได้สมบูรณ์ในเวลา 7 ชั่วโมง และจากงานวิจัยของ Ilgi and Alparslan (2004) ทำการศึกษาโดยใช้ stainless steel metal sponge เป็นตัวกลางในการตรึงแบคทีเรียบรรจุลงในคอลัมน์ในสถานะไร้อากาศ พบว่าสามารถย่อยสลายสีในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมได้ร้อยละ 20-70 เมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพของตัวกลางฟองน้ำที่ไม่มีการตรึงด้วยแบคทีเรีย พบว่า ตัวกลางฟองน้ำที่ไม่มีการตรึงด้วยแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีอะโซร้อยละ 14.5 ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากฟองน้ำมีการดูดซับสีอะโซที่มีอยู่ในองค์ประกอบของน้ำเสีย ดังนั้น ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนฟองน้ำในการกำจัดสีอะโซมีค่าเท่ากับ ร้อยละ 52.0

ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียสีสังเคราะห์ด้วยการตรึงแบคทีเรียบนแผ่นพลาสติก พบว่า ค่าการดูดกลืนมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องไปจนถึงวันที่ 7 ของการทดลองโดยใน

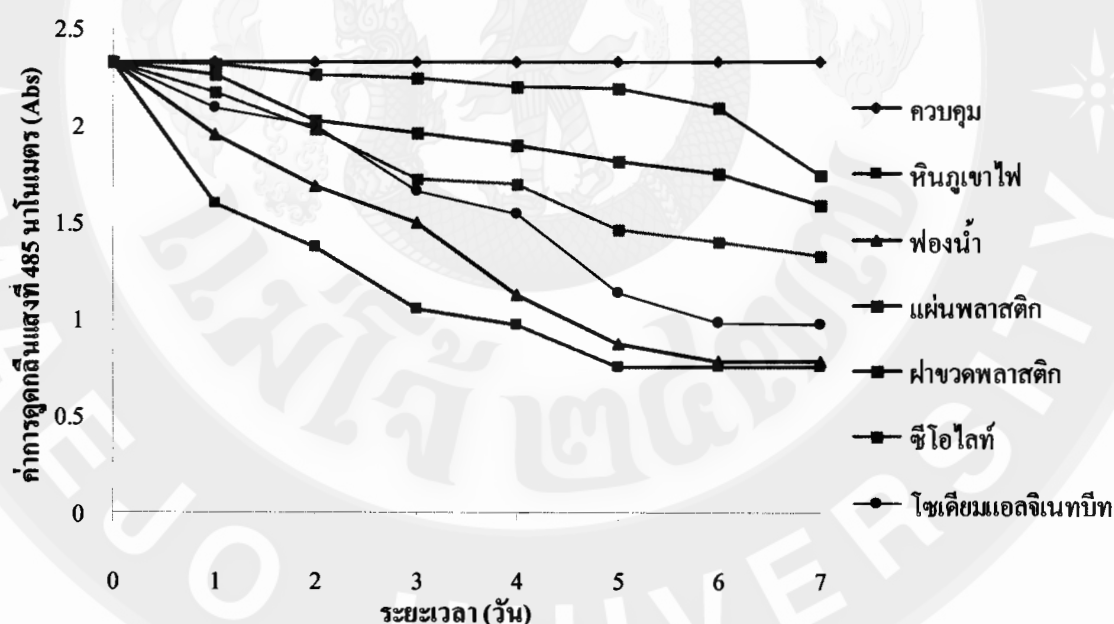
วันเริ่มต้นมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 2.314 และค่าการดูดกลืนแสงในวันสุดท้าย เท่ากับ 1.58 (ภาพ 23) แสดงว่าแบคทีเรียที่ยึดเกาะอยู่บนตัวกลางแผ่นพลาสติกมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีอะโซได คัดเป็นร้อยละการกำจัดสีอะโซเท่ากับ ร้อยละ 31.7 (ภาพ 24) เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Gray (1984) ที่กล่าวว่า วัสดุตัวกลางที่เป็นพลาสติกกำลังได้รับความนิยมอย่างมาก และลักษณะของวัสดุตัวกลางพลาสติกโดยทั่วไป พบว่า ตัวกลางที่เป็นพลาสติกสามารถรับระดับภาระบรรทุกสารอินทรีย์และอัตราบรรทุกน้ำที่สูงได้ดี ลักษณะ โครงสร้างเป็นแบบเปิดลดการอุดตันที่เกิดจากการสะสมฟิล์มชีวภาพที่มากเกินไป มีการระบายอากาศที่ดี เป็นวัสดุเฉื่อยต่อปฏิกิริยาที่มีความคงทน รูปร่างมีลักษณะที่เอื้ออำนวยต่อการกระจายน้ำเสียอย่างทั่วถึง นอกจากนี้ยังมีน้ำหนักเบา ซึ่งเป็นผลให้สามารถลดค่าใช้จ่ายทางโครงสร้างของระบบได้อีกด้วย (คงศักดิ์, 2538)

ส่วนในการบำบัดน้ำเสียสีสังเคราะห์ด้วยการตรึงแบคทีเรียบนฝาชวดพลาสติก พบว่า การตรึงแบคทีเรียลงบนฝาชวดพลาสติกมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีอะโซเพียงร้อยละ 25.1 ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงในวันสุดท้าย เท่ากับ 1.733 โดยลดลงจากค่าการดูดกลืนแสงค่าในวันเริ่มต้นที่มีค่าเท่ากับ 2.314 (ภาพ 23 และภาพ 24) แสดงว่าแบคทีเรียที่ยึดเกาะอยู่บนฝาชวดพลาสติกมีความสามารถในการกำจัดสีอะโซในน้ำเสียสีสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบได้ แต่ทั้งนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการตรึงตัวกลางบนฝาชวดน้ำพลาสติก

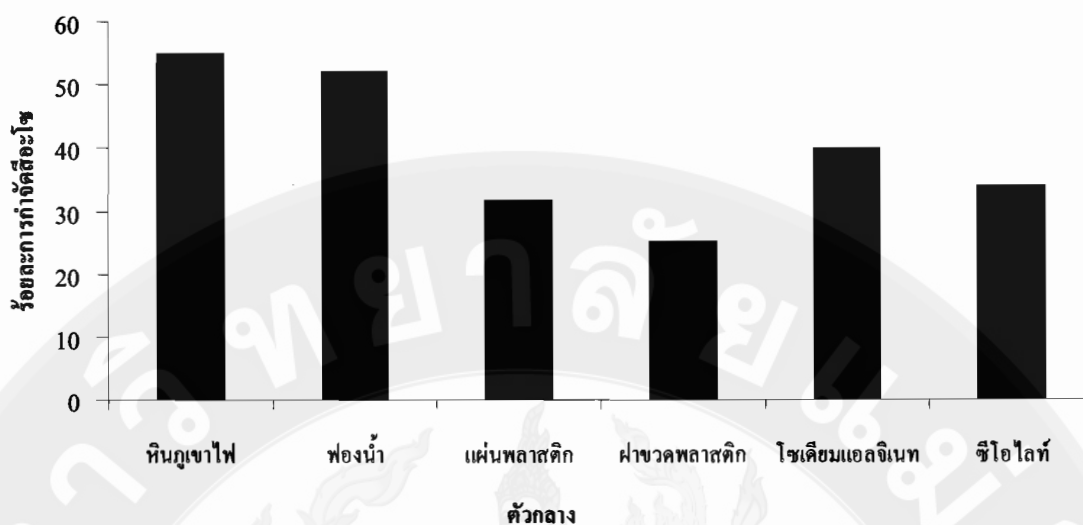
จากประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียสีสังเคราะห์ด้วยการตรึงแบคทีเรียบนซีโอไลต์ พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงในวันสุดท้ายมีค่าลดลงจากวันเริ่มต้น โดยค่าการดูดกลืนแสงน้ำเสียสีสังเคราะห์ในวันเริ่มต้นมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 2.314 และค่าการดูดกลืนแสงในวันสุดท้าย เท่ากับ 1.321 (ภาพ 23) โดยวันสุดท้ายของการทดลองค่าการดูดกลืนแสงลดลงร้อยละ 42.9 (ภาพ 24) เมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพของตัวกลางซีโอไลต์ที่ไม่มีการตรึงด้วยแบคทีเรีย พบว่า มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีอะโซร้อยละ 9.1 ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากซีโอไลต์มีการดูดซับสีอะโซจากงานวิจัยของ Wang et al. (2006) ได้ทำการศึกษการใช้ซีโอไลต์ในการดูดซับและกำจัดสี ซึ่งพบว่า ซีโอไลต์ที่ได้จากธรรมชาติสามารถดูดซับสารสีได้ถึงร้อยละ 40 ดังนั้น ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงบนซีโอไลต์ในการกำจัดสีอะโซมีค่าเท่ากับ ร้อยละ 33.8

ในการบำบัดน้ำเสียสีสังเคราะห์ด้วยการตรึงแบคทีเรียลงในโซเดียมแอลจิเนทพบ พบว่า ในวันเริ่มต้นมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 2.314 โดยสีของน้ำเสียสีสังเคราะห์จะเริ่มลดลงตั้งแต่วันที่ 1 โดยมีค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 2.085 และลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง มีค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.962 (ภาพ 23) แบคทีเรียที่ถูกตรึงลงในโซเดียม แอลจิเนทมีความสามารถในการกำจัดสีอะโซและคิดเป็นร้อยละการกำจัดสีอะโซเท่ากับ ร้อยละ 58.4 (ภาพ 24) เมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพของตัวกลางโซเดียมแอลจิเนทที่ไม่มี

การตรึงด้วยแบคทีเรีย พบว่า มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีอะโซรียลอะ 18.5 ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากโซเดียมแอลจิเนทที่มีการดูดซับสี congo red ที่มีอยู่ในองค์ประกอบของน้ำเสีย เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Chen และ Lin ซึ่งได้ทำการตรึงเซลล์แบคทีเรีย *Pseudomonas luteola* ลงในโซเดียมแอลจิเนท พบว่า ประสิทธิภาพในการกำจัดสีอะโซในสภาวะไร้อากาศ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง สามารถกำจัดสีอะโซคิดเป็นร้อยละ 80 ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการกำจัดสีโดยใช้โซเดียมแอลจิเนทนั้นยังขึ้นอยู่กับปัจจัยของความเข้มข้นของสีที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเสียนั้นๆ ด้วย ในปัจจุบันงานวิจัยส่วนใหญ่มักเลือกใช้การตรึงเซลล์แบบ entrapment โดยจะให้เซลล์แบคทีเรียอยู่ในโซเดียมแอลจิเนท ทั้งนี้เพื่อเป็นการปกป้องเซลล์จากสารพิษที่อาจเกิดขึ้นหลังจากที่เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายสารสีชนิดต่าง ๆ แล้ว และเซลล์แบคทีเรียที่ถูกขังหรือตรึงอยู่ในเม็ดบีดนั้นๆ ก็ยังสามารถที่จะเจริญเติบโตและมีชีวิตอยู่ต่อไปได้ (Tal et al., 2001) ดังนั้น ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงในโซเดียมแอลจิเนทในการกำจัดสีอะโซมีค่าเท่ากับร้อยละ 39.9



ภาพ 23 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ ในระยะเวลาต่าง ๆ ที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร ภายหลังจากบำบัดด้วยแบคทีเรียที่ตรึงบนตัวกลาง



ภาพ 24 ร้อยละการกำจัดสีอะโซของแบคทีเรียโอโซเลท Mk-8 ที่ตรึงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ

ประสิทธิภาพของตัวกลางชนิดต่าง ๆ ในการกำจัดเอฟซีโอดี

เมื่อทดสอบความมีประสิทธิภาพในการกำจัดเอฟซีโอดี โดยเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างชุดควบคุม ชุดตัวกลางควบคุมและชุดตัวกลางตรึงแบคทีเรียทำการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ทุก ๆ วัน เป็นเวลา 7 วัน หลังจากที่มีการตรึงแบคทีเรียบนหินภูเขาไฟแล้วนำไปบำบัดน้ำเสียสีสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ พบว่า เอฟซีโอดีมีค่าลดลงตั้งแต่วันที่ 1 โดยวันเริ่มต้นของการทดลองมีค่าเอฟซีโอดีเท่ากับ 1,350 มิลลิกรัมต่อลิตร และวันสุดท้ายของการทดลองเหลือค่าเอฟซีโอดีเท่ากับ 909 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพ 25) ทั้งนี้แสดงว่าแบคทีเรียที่ถูกตรึงอยู่บนตัวกลางหินภูเขาไฟมีความสามารถในการกำจัดเอฟซีโอดีในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบได้และเมื่อนำมาคิดเป็นค่าร้อยละการกำจัดเอฟซีโอดีของน้ำเสียสีอะโซสังเคราะห์ในวันที่ 7 ของการทดลอง พบว่า การกำจัดเอฟซีโอดีมีค่าเท่ากับร้อยละ 32.6 (ภาพ 26)

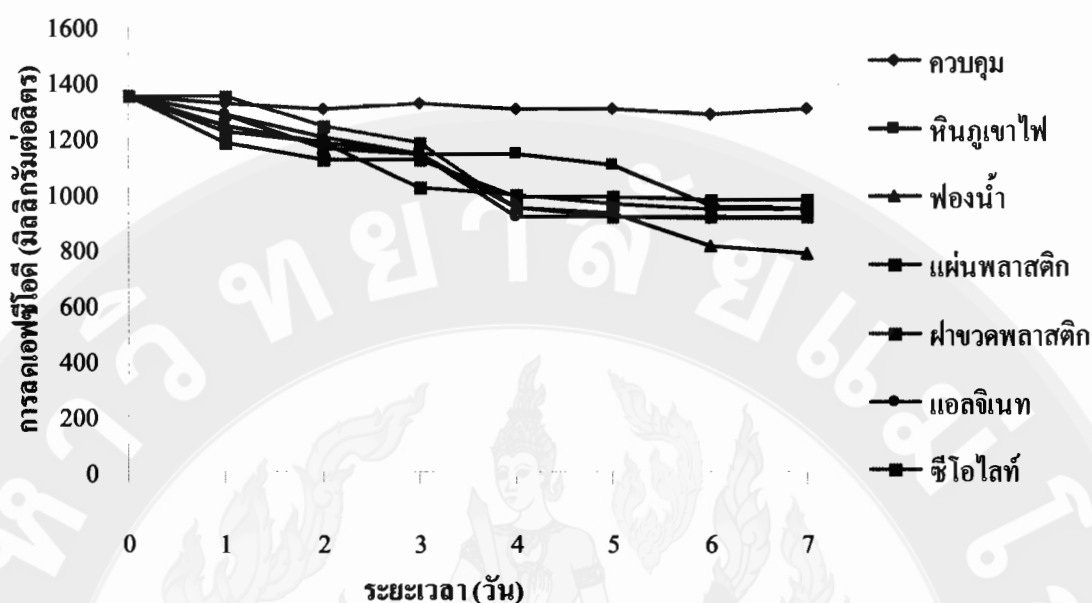
ประสิทธิภาพของการตรึงแบคทีเรียบนฟองน้ำแล้วนำไปบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ พบว่า เอฟซีโอดีจะค่อย ๆ ลดลงในวันที่ 2 และลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยวันเริ่มต้นของการทดลองมีค่าเอฟซีโอดีเท่ากับ 1,350 มิลลิกรัมต่อลิตร และวันสุดท้ายของการทดลองเหลือค่าเอฟซีโอดีเท่ากับ 867 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพ 25) เมื่อนำมาคิดเป็นค่าร้อยละการกำจัดเอฟซีโอดีของน้ำเสียสังเคราะห์ มีค่าเท่ากับ 35.7 (ภาพ 26) ทั้งนี้แสดงว่าแบคทีเรียที่ถูกตรึงอยู่บนตัวกลางฟองน้ำ มีความสามารถในการกำจัดเอฟซีโอดีในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบได้

การตรึงแบคทีเรียบนแผ่นพลาสติกแล้วนำไปบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ พบว่า เอฟซีโอดีลดลงจากวันเริ่มต้นของการทดลองที่มีค่าเอฟซีโอดี เท่ากับ

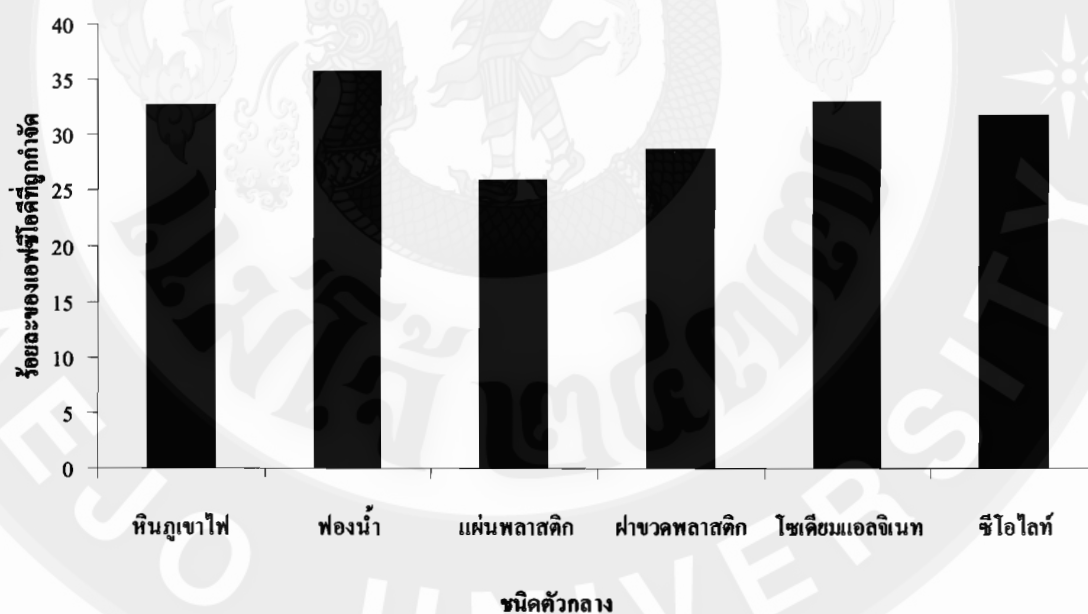
1,350 มิลลิกรัมต่อลิตร และวันสุดท้ายของการทดลองเหลือค่าเอฟซีไอดี เท่ากับ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพ 25) เมื่อนำมาคิดเป็นค่าร้อยละการกำจัดเอฟซีไอดีของน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีการลดลงเพียงร้อยละ 25.9 (ภาพ 26) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากระยะเวลาในการตรึงเซลล์แบคทีเรียที่อาจต้องมีการเพิ่มระยะเวลาในการตรึงให้มากขึ้น รวมไปถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการตรึงเซลล์แบคทีเรียลงบนแผ่นพลาสติก ส่วนการตรึงแบคทีเรียบนฝาชวดพลาสติกแล้วนำไปบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ พบว่า เอฟซีไอดีจะค่อย ๆ ลดลงอย่างต่อเนื่องโดยวันเริ่มต้นของการทดลองมีค่าเอฟซีไอดีเท่ากับ 1,350 มิลลิกรัมต่อลิตรและวันสุดท้ายของการทดลองเหลือค่าเอฟซีไอดี เท่ากับ 962 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพ 25) เมื่อนำมาคิดเป็นค่าร้อยละการกำจัดเอฟซีไอดีของน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีการลดลงเพียง ร้อยละ 28.6 (ภาพ 26) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากระยะเวลาในการตรึงเซลล์แบคทีเรียที่อาจต้องมีการเพิ่มระยะเวลาในการตรึงให้มากขึ้น ลักษณะของฝาชวดพลาสติกที่มีลักษณะเป็นผิวมัน ไม่ขรุขระจึงอาจไม่เอื้ออำนวยต่อการตรึงเซลล์แบคทีเรีย รวมไปถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการตรึงเซลล์แบคทีเรียลงบนฝาชวดพลาสติก

และเมื่อทดสอบความประสิทธิภาพในการกำจัดเอฟซีไอดีหลังจากที่มีการตรึงแบคทีเรียบน ซีโอไลต์แล้วนำไปบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ พบว่า เอฟซีไอดีมีค่าลดลงตั้งแต่วันที่ 1 โดยวันเริ่มต้นของการทดลองมีค่าเอฟซีไอดี เท่ากับ 1,350 มิลลิกรัมต่อลิตร และวันสุดท้ายของการทดลองเหลือค่าเอฟซีไอดี เท่ากับ 904 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพ 25) ทั้งนี้แสดงว่าแบคทีเรียที่ถูกตรึงอยู่บนตัวกลางซีโอไลต์มีความสามารถในการกำจัดเอฟซีไอดีในน้ำเสียสีสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบได้ และเมื่อนำมาคิดเป็นค่าร้อยละการกำจัดเอฟซีไอดี เท่ากับ ร้อยละ 31.7 (ภาพ 26)

จากผลการทดลองการตรึงแบคทีเรียลงในโซเดียมแอลจิเนต แล้วนำไปบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ พบว่า เอฟซีไอดีลดลงอย่างต่อเนื่องโดยวันเริ่มต้นของการทดลองมีค่า เอฟซีไอดีเท่ากับ 1,350 มิลลิกรัมต่อลิตรและวันสุดท้ายของการทดลองเหลือค่าเอฟซีไอดีเท่ากับ 906 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพ 25) เมื่อนำมาคิดเป็นค่าร้อยละการลดเอฟซีไอดีของน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีการลดลงได้เท่ากับ ร้อยละ 33.0 (ภาพ 26)



ภาพ 25 ประสิทธิภาพการกำจัดคลอโรฟิลล์ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบของ แบคทีเรีย Mk-8 ตรึงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ



ภาพ 26 ร้อยละการกำจัดคลอโรฟิลล์ของแบคทีเรียโอโซเลท Mk-8 ที่ตรึงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ

ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบของแบคทีเรียจากการทดลองสรุปได้ว่า การตรึงเซลล์ลงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ นั้นให้ประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ โดยพบว่า หินภูเขาไฟให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสูงสุดคิดเป็นร้อยละ 67.9 โดยที่ฟองน้ำและโซเดียมแอลจิเนทมีมีประสิทธิภาพการกำจัด

เท่ากับร้อยละ 66.5 และ 58.4 ตามลำดับ ส่วนประสิทธิภาพในการลดเอฟซีโอดี พบว่า ฟองน้ำมีร้อยละการกำจัดเอฟซีโอดีมากกว่าตัวกลางชนิดอื่น สามารถคิดเป็นร้อยละการกำจัดเอฟซีโอดีได้เท่ากับร้อยละ 35.7 จากผลการทดลองข้างต้นนั้นทำให้สามารถคัดเลือกตัวกลางหินภูเขาไฟและฟองน้ำที่มีร้อยละการกำจัดสูงกว่ตัวกลางชนิดอื่น ๆ ไปทำการวิจัยในขั้นต่อไป (ตาราง 10) ทั้งนี้การที่ประสิทธิภาพในการกำจัดของแบคทีเรียที่ตรึงบนหินภูเขาไฟมีประสิทธิภาพดีกว่าตรึงบนฟองน้ำแต่การกำจัดเอฟซีโอดีมีประสิทธิภาพน้อยกว่า เป็นผลมาจากการที่ตัวกลางหินภูเขาไฟมีการดูดซับสารสีเข้าสู่ตัวกลางหินภูเขาไฟมากกว่าตัวกลางฟองน้ำดังนั้นจึงส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกำจัดเอฟซีโอดีมีค่าน้อยกว่าแบคทีเรีย Mk-8 ที่ตรึงบนฟองน้ำ

ตาราง 10 ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบของตัวกลางชนิดต่าง ๆ

ชนิดของตัวกลาง	ประสิทธิภาพการกำจัด (ร้อยละ)	
	สี	เอฟซีโอดี
หินภูเขาไฟ	54.8 ^a	32.6 ^{ab}
ฟองน้ำ	52.0 ^a	35.7 ^a
แผ่นพลาสติก	31.7 ^d	25.9 ^c
ฝาชวดพลาสติก	25.1 ^d	28.6 ^{bc}
ซีโอไลท์	33.8 ^c	31.7 ^{ab}
โซเดียมแอลจิเนตบีด	39.9 ^b	33.0 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

**ผลการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ตรึงลงบนตัวกลาง
ชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเซลล์ แบคทีเรีย
ในรูปเซลล์แขวนลอยในการบำบัดน้ำเสีย
สังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์
ประกอบในระดับ
ห้องปฏิบัติการ**

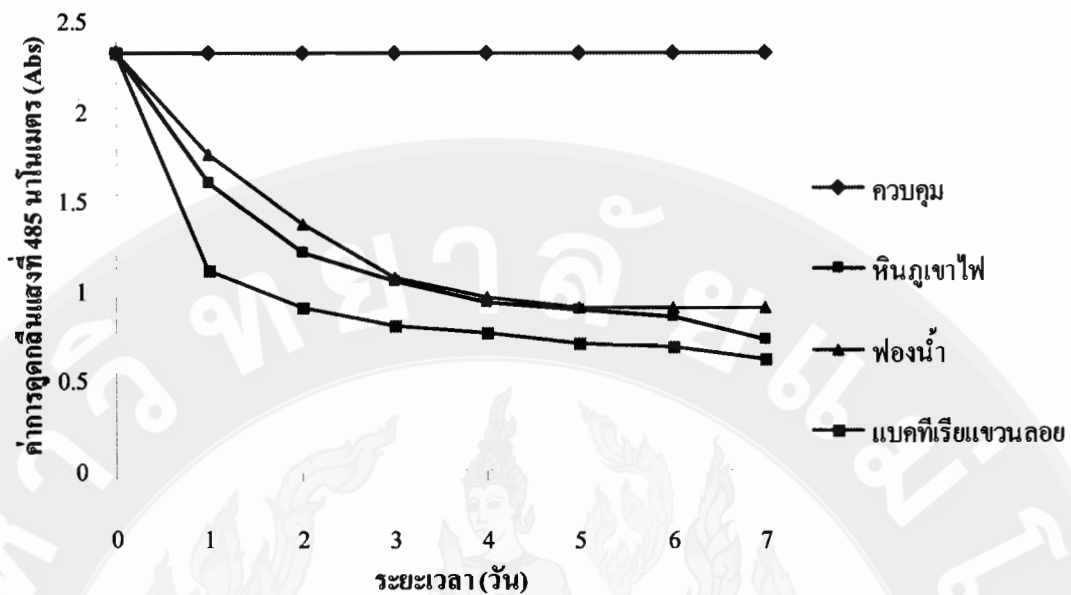
จากการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดสีของแบคทีเรีย Mk-8 ที่ตรึงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ พบว่า แบคทีเรีย Mk-8 ที่ตรึงบนตัวกลางหินภูเขาไฟและฟองน้ำมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีและเอฟซีไอดีได้ดีกว่าตัวกลางชนิดอื่น ๆ ดังนั้นในการทดลองในขั้นตอนนี้ จึงได้นำตัวกลางหินภูเขาไฟและฟองน้ำที่ตรึงด้วยแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 เป็นระยะเวลา 7 มาทำการทดสอบประสิทธิภาพเปรียบเทียบกับ การบำบัดด้วยเซลล์แบคทีเรียแบบแขวนลอย ทำการทดสอบโดยนำตัวกลางที่ผ่านการตรึงด้วยเซลล์แบคทีเรียเป็นระยะเวลา 7 วัน และแบคทีเรียในรูปแบบเซลล์แขวนลอยมาทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ โดยมีการเติมสี congo red 0.2 กรัมต่อลิตร เติมน้ำ yeast extract ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปรับพีเอช เท่ากับ 7 ทำการศึกษาในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในสภาวะไร้อากาศ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าหลังจากที่ทำการเติมแบคทีเรียที่ตรึงลงบนตัวกลางและเซลล์แบคทีเรียในรูปแขวนลอยในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ 485 นาโนเมตร ในแต่ละตัวกลางที่ผ่านการตรึงด้วยเซลล์แบคทีเรีย และเซลล์แบคทีเรียในรูปเซลล์แขวนลอยมีค่าลดลงตั้งแต่ในวันที่ 1 โดยแบคทีเรียที่ตรึงบนหินภูเขาไฟมีความสามารถในการกำจัดสีได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับแบคทีเรียที่ตรึงบนฟองน้ำและเซลล์แบคทีเรียแขวนลอย ซึ่งลดลงในวันที่ 1 และลดลงเรื่อยจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง (ภาพ 27) สามารถคิดประสิทธิภาพการลดลงของสีได้ดังนี้ หินภูเขาไฟ ฟองน้ำ ที่ตรึงด้วยเซลล์แบคทีเรีย และเซลล์แบคทีเรียแขวนลอย สามารถกำจัดสีอะโซที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเสียได้ดีที่สุดเท่ากับ ร้อยละ 68.8, 61.1 และ 73.3 ตามลำดับ โดยเซลล์แบคทีเรียแขวนลอยมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีอะโซได้ดีกว่าการตรึงแบคทีเรียลงบนหินภูเขาไฟและฟองน้ำ อาจเป็นผลมาจากลักษณะของตัวกลางและระยะเวลาในการตรึงแบคทีเรียลงบนตัวกลาง

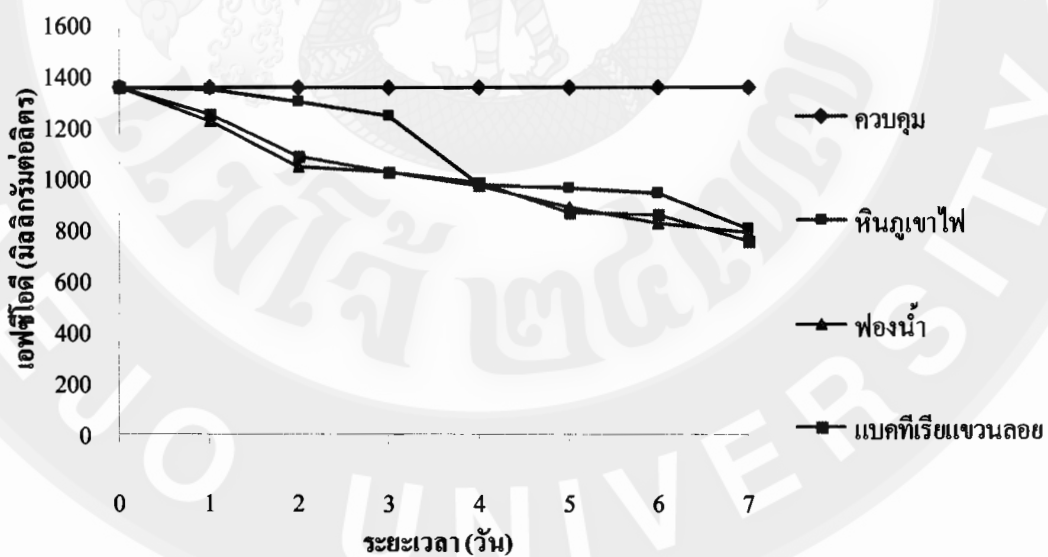
จากผลการทดลองพบว่า หลังจากทำการเติมแบคทีเรียที่ตรึงลงบนตัวกลางและเซลล์แบคทีเรียในรูปแขวนลอยในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ พบว่า

ประสิทธิภาพในการกำจัดเอพซีโอดีในแต่ละตัวกลางที่ผ่านการตรึงด้วยเซลล์แบคทีเรียมีค่าลดลง ตั้งแต่ในวันที่ 1 ส่วนหินภูเขาไฟและฟองน้ำ พบว่า มีประสิทธิภาพในการกำจัดเอพซีโอดี เท่ากับ ร้อยละ 40.5, 41.5 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัดเอพซีโอดีกับแบคทีเรีย แววนลอย พบว่า แบคทีเรียแวนลอยสามารถกำจัดเอพซีโอดีเท่ากับ ร้อยละ 44.4 (ภาพ 28) ซึ่งมีค่ามากกว่า หินภูเขาไฟ และฟองน้ำ การที่ค่าการกำจัดเอพซีโอดี มีค่าที่แตกต่างกันนั้นอาจเป็นผลมาจากพื้นผิวสัมผัสของตัวกลางและปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่เกาะอยู่บนตัวกลางอาจมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ azoreductase เพื่อใช้ในการย่อยสลายสี ดังนั้นจึงสมควรที่จะมีการศึกษาในเรื่องของ พื้นผิวสัมผัสของตัวกลางต่อการตรึงเซลล์แบคทีเรียในขั้นต่อไป

ในการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพในการกำจัดสีกำจัดเอพซีโอดีของ ไอโซเลท Mk-8 ในรูปเซลล์แวนลอย มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าในรูปเซลล์ตรึงนั้น เป็นผลมาจากการทดลองเป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการซึ่งง่ายต่อการควบคุมปริมาณของเซลล์แบคทีเรียแต่ถ้ามีการนำไปประยุกต์ใช้จริงในระบบบำบัดการใช้เซลล์แบคทีเรียในรูปเซลล์แวนลอยจะต้องมีการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ เพื่อไม่ให้ส่งผลกระทบต่อเซลล์แบคทีเรีย เช่น การควบคุมปริมาณของสารอาหาร หรือความเป็นพิษที่อาจเข้าสู่ระบบบำบัดซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อเซลล์ในรูปแวนลอยแต่แบคทีเรียในรูปเซลล์ตรึงยังเจริญอยู่ได้ ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียในรูปเซลล์ตรึงจะมีการเกิดของแผ่นฟิล์มขึ้นรอบ ๆ ของตัวกลางซึ่งจะมีเซลล์แบคทีเรียจากด้านในของตัวกลางและในระบบที่ทำการตรึงเซลล์แบคทีเรียบนตัวกลางจะมีปริมาณเซลล์แบคทีเรียทั่วทั้งระบบเนื่องจากแบคทีเรียจะเกาะอยู่บนตัวกลาง เมื่อเกิดสภาวะเป็นพิษขึ้นในระบบจึงทำให้ยังมีปริมาณของเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่ด้านในของตัวกลางจึงยังสามารถให้ประสิทธิภาพในการบำบัดได้อยู่ ดังนั้น ผู้ทำการวิจัยเห็นสมควรว่าควรใช้แบคทีเรียในรูปเซลล์ตรึงเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสีและเอพซีโอดีให้แก่ระบบบำบัดและเมื่อนำไปใช้จริงในระบบบำบัด ยังเป็นการง่ายต่อการควบคุมปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียและลดต้นทุนทางเศรษฐศาสตร์อีกด้วย



ภาพ 27 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบภายใต้การเติมแบคทีเรียที่ตรึงลงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 ในรูปแวนลอย



ภาพ 28 การกำจัดเอฟซีไอดีของแบคทีเรียที่ตรึงลงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 ในรูปแวนลอยในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ

**ผลการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ตรึงลงบนตัวกลางและ
เปรียบเทียบกับแบคทีเรียในรูปเซลล์แขวนลอยในการบำบัด
น้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมบาติก อ.ป่าซาง
จ.ลำพูน ในระดับห้องปฏิบัติการ**

จากการนำน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมบาติก อ.ป่าซาง จ.ลำพูน ซึ่งเป็นน้ำเสียจริงที่ได้จากอุตสาหกรรมมาใช้ในการศึกษาวิจัย พบว่า น้ำเสียเป็นน้ำเสียที่อยู่ในบ่อทิ้งรวมจึงทำให้มีการผสมกันของสีหลายชนิด จากการศึกษาองค์ประกอบของน้ำเสียโดยทำการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง พีเอช เอฟซีไอดี และสี พบว่า มีลักษณะที่แสดงตามในตาราง 11 และภาพ 29

ตาราง 11 ลักษณะน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมบาติก อ.ป่าซาง จ.ลำพูน

พารามิเตอร์	ผลที่ได้
ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 605 นาโนเมตร	9.815
พีเอช	8-8.5
เอฟซีไอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)	4800
สี	สีเขียวเข้ม



ภาพ 29 น้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมบาติก อ.ป่าซาง จ.ลำพูน

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Mk-8* ที่ตรึงบนตัวกลางและในรูปแขวนลอย โดยนำตัวกลางที่ผ่านการตรึงด้วยเซลล์แบคทีเรียเป็นระยะเวลา 7 วัน และแบคทีเรียในรูปเซลล์แขวนลอยมาทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียที่ทำการเจือจางน้ำเสียกับน้ำประปาในอัตราส่วน 50:50, 30:70, 20:80, 10:90 และ 5:95 (ภาพ 30) โดยทำการศึกษาในขวดรูปชมพู่ ในสภาวะไร้อากาศ ที่มีความเข้มข้นของ yeast extract ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรฟิเอช 7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า ที่ระดับอัตราเจือจาง เท่ากับ 20:80 เป็นระดับอัตราเจือจางที่เหมาะสมต่อแบคทีเรีย *Mk-8* ที่ตรึงบนหินภูเขาไฟ ฟองน้ำ และเซลล์แบคทีเรียแขวนลอยในการกำจัดสีที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเสียอุตสาหกรรมฟอกย้อมบาติก อ.ป่าซาง จ. ลำพูน พบว่า เซลล์แบคทีเรียแขวนลอยมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีสูงสุด สามารถคิดเป็นร้อยละการกำจัดสีในวันที่ 4 ของการทดลอง เท่ากับ ร้อยละ 83.1 (ภาพ 31) และประสิทธิภาพในการกำจัดสีของแบคทีเรียที่ตรึงบนหินภูเขาไฟและฟองน้ำสามารถคิดเป็นร้อยละการกำจัดสีในวันที่ 4 ของการทดลอง เท่ากับ ร้อยละ 37.5 และ 34.4 ตามลำดับ และประสิทธิภาพในการกำจัดสีของแบคทีเรียแขวนลอย แบคทีเรียที่ตรึงบนหินภูเขาไฟและฟองน้ำ ในวันสุดท้ายของการทดลอง สามารถคิดเป็นร้อยละการกำจัด เท่ากับ ร้อยละ 90.7, 52.4 และ 50.2 ตามลำดับ (ภาพ 32) ประสิทธิภาพในการลดค่าพีเอชจากการบำบัดด้วยแบคทีเรียแขวนลอย แบคทีเรียตรึงบนหินภูเขาไฟและฟองน้ำ พบว่า มีประสิทธิภาพในการลดค่าพีเอชไอทีที่ต่างกันไปแสดงในตาราง 12, 13 และ 14 ตามลำดับ

ทั้งนี้ ประสิทธิภาพของการกำจัดสีในระดับอัตราเจือจาง 50:50 เป็นระดับที่ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับอัตราเจือจางต่าง ๆ สามารถคิดเป็นร้อยละการกำจัดสีของแบคทีเรียแขวนลอย แบคทีเรียตรึงบนหินภูเขาไฟและฟองน้ำ เท่ากับ ร้อยละ 35.5, 34.8 และ 32.2 ตามลำดับ ปริมาณการลดลงของสีนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะของโครงสร้างของสี โดยโครงสร้างขนาดเล็กแบคทีเรียจะสามารถย่อยสลายได้ดี (Hu, 1999) และน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมบาติก อ.ป่าซาง จ. ลำพูน เป็นลักษณะน้ำเสียแบบน้ำเสียรวมที่มีการรวมของน้ำที่ผ่านการย้อมหลากหลายสี ซึ่งมีลักษณะ โครงสร้างสีทางเคมีแตกต่างกันทั้งลักษณะ โมเลกุลขนาดเล็ก และขนาดใหญ่ ดังนั้นปริมาณการลดลงของสีจึงอาจจะมีการคงเหลือสีที่มีลักษณะ โมเลกุลขนาดใหญ่



ก) ข) ค) ง) จ)

ภาพ 30 ลักษณะน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมบาติก อ.ป่าซาง จ. ลำพูน ที่ระดับการเจือจางต่าง ๆ

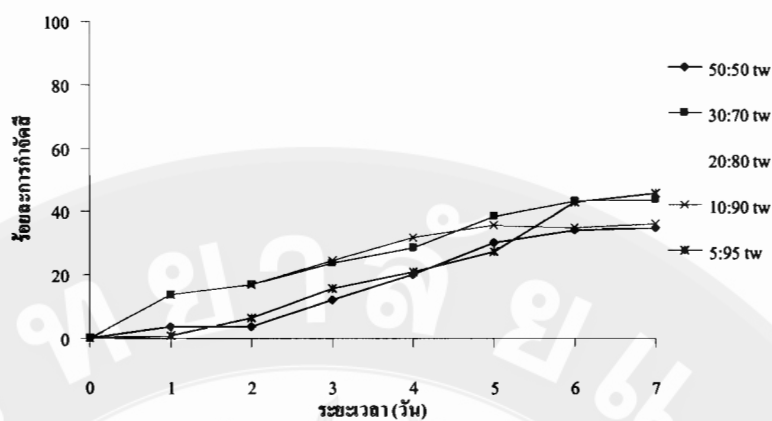
- ก) อัตราเจือจาง น้ำเสียต่อน้ำประปา เท่ากับ 50:50
- ข) อัตราเจือจาง น้ำเสียต่อน้ำประปา เท่ากับ 30:70
- ค) อัตราเจือจาง น้ำเสียต่อน้ำประปา เท่ากับ 20:80
- ง) อัตราเจือจาง น้ำเสียต่อน้ำประปา เท่ากับ 10:90
- จ) อัตราเจือจาง น้ำเสียต่อน้ำประปา เท่ากับ 5:95



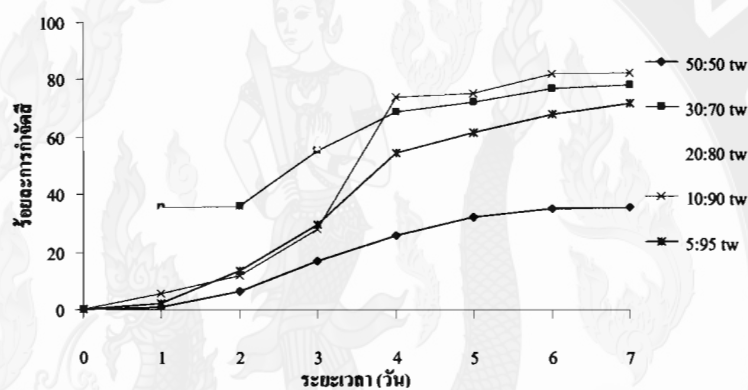
ก) ข)

ภาพ 31 ลักษณะน้ำเสียอุตสาหกรรมฟอกย้อมบาติก อ.ป่าซาง จ. ลำพูน ที่อัตราเจือจาง 20:80 ก่อนและหลังการบำบัดด้วยแบคทีเรีย Mk-8 แบบเซลล์แขวนลอย

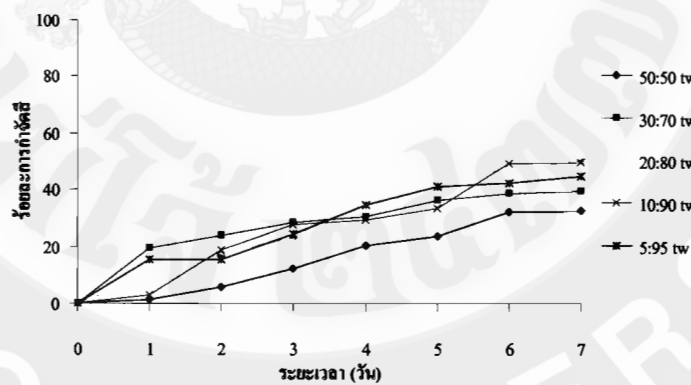
- ก) ก่อนบำบัด
- ข) หลังผ่านการบำบัดเป็นระยะเวลา 4 วัน



ก)



ข)



ค)

ภาพ 32 ร้อยละการกักน้ำในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมบาติก อ.ป่าซาง จ. ลำพูน
ของแบคทีเรียไฮโซเลท Mk-8 ที่ตรึงบนตัวกลางหินภูเขาไฟ ฟองน้ำ และในรูปเซลล์
แขวนลอย
ก) หินภูเขาไฟ
ข) เซลล์แขวนลอย
ค) ฟองน้ำ

ตาราง 12 ค่าเอฟซีไอดีของน้ำเสียก่อนและหลังบำบัดด้วยแบคทีเรียตรึงบนหินภูเขาไฟ

อัตราเจือจางของน้ำเสีย (น้ำเสีย : น้ำประปา)	เอฟซีไอดีก่อนบำบัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เอฟซีไอดีหลังบำบัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการกำจัด เอฟซีไอดี
50:50	2460	2000	18.6
30:70	1760	1140	35.2
20:80	1420	840	40.8
10:90	800	360	55.0
5:95	660	200	69.0

ตาราง 13 ค่าเอฟซีไอดีของน้ำเสียก่อนและหลังบำบัดด้วยแบคทีเรียแขวนลอย

อัตราเจือจางของน้ำเสีย (น้ำเสีย : น้ำประปา)	เอฟซีไอดีก่อนบำบัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เอฟซีไอดีหลังบำบัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการกำจัด เอฟซีไอดี
50:50	2460	1840	25.2
30:70	1760	1260	28.4
20:80	1420	680	52.1
10:90	800	320	60.0
5:95	660	240	63.6

ตาราง 14 ค่าเอฟซีไอของน้ำเสียก่อนและหลังบำบัดด้วยแบคทีเรียตรึงบนฟองน้ำ

อัตราเจือจางของน้ำเสีย (น้ำเสีย : น้ำประปา)	เอฟซีไอต่อก่อนบำบัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เอฟซีไอหลังบำบัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการกำจัด เอฟซีไอ
50:50	2460	1960	20.3
30:70	1760	1280	27.2
20:80	1420	860	39.4
10:90	800	480	40.0
5:95	660	320	51.0

ผลการจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) ของแบคทีเรียทดสอบ

จากการนำแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายสี congo red มาตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบและทดสอบทางชีวเคมีเพื่อบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียในระดับจีโนส เมื่อนำมาเทียบกับลักษณะแบคทีเรียในหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th (Holt et al., 1994) แสดงผลดังตาราง 15 และจากการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยานบนอาหารสูตร nutrient agar พบว่าเป็นแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาวครีม ลักษณะของ โคโลนีกลม ผิวหน้าแบนราบ (flat) และขอบเรียบ (entire) แสดงดังภาพ 33 เมื่อศึกษาความสามารถในการทนความร้อน อุณหภูมิสูงสุดที่เซลล์สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ 35 – 45 องศาเซลเซียส เมื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า มีลักษณะเป็นท่อนต่อกัน มีขนาดความกว้างของเซลล์ 0.5 - 0.8 ไมโครเมตร ความยาวของเซลล์ 2.5- 5 ไมโครเมตร เป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ ข้อมติคสี แกรมบวก (ภาพ 34ก) และสร้างเอนโดสปอร์อยู่ระหว่างส่วนหัวและส่วนกลางของเซลล์ (ภาพ 34ข) ซึ่งลักษณะต่าง ๆ ที่ได้ทำการศึกษาทั้งทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีสรุปได้ว่าเป็น *Bacillus* sp.

จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus cereus* มีความสามารถในย่อยสลายสีอะโซ (Wuhmann et al., 1998) *Bacillus subtilis* สามารถย่อยสลายสี

p-Aminoazobenzene (Horitsu et. al., 1977) และ *Paenibacillus azoreducens* สามารถย่อยสลายสี Remazol Black B (Hu, 2001)



ภาพ 33 ลักษณะ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Mk- 8

ตาราง 15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 เทียบกับ *Bacillus* sp.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมี	<i>Bacillus</i> sp.	ไอโซเลท Mk-8
rod-shaped in young culture	+	+
diameter over 2.5 μm	-	-
filaments	-	ND
rods or filaments curved	-	-
cocci in tetrads or packets	-	-
endospores produced	+	+
motile	+	+
Gram's stain positive at least in young cultures	+	+
strict aerobes	D	-
facultative an aerobes or microaerophiles	D	+
strict anaerobes	-	+
product of carbohydrate fermentation is almost all lactate	D	+
sulfate actively reduced to sulfide	-	-
catalase	+	+
oxidase	D	-
marked acidity from glucose	+	+
nitrate reduced to nitrite	D	+
requires 3-12% NaCl for growth	D	-

หมายเหตุ ทำการเปรียบเทียบข้อมูลจากหนังสือ Bergey's manual of determinative bacteriology 9th

สัญลักษณ์: + หมายถึง ร้อยละ 90 ให้ผลบวก D หมายถึง ให้ผลแตกต่างในแต่ละสายพันธุ์
- หมายถึง ร้อยละ 90 ให้ผลลบ ND หมายถึง ไม่สามารถตัดสินใจ



ก)



ข)

ภาพ 34 ลักษณะของ *Bacillus* sp. Mk-8

ก) *Bacillus* sp. Mk-8 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า

ข) ลักษณะการเกิดเอนโดสปอร์ของ *Bacillus* sp. Mk-8

ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยชุดทดสอบสำเร็จรูป

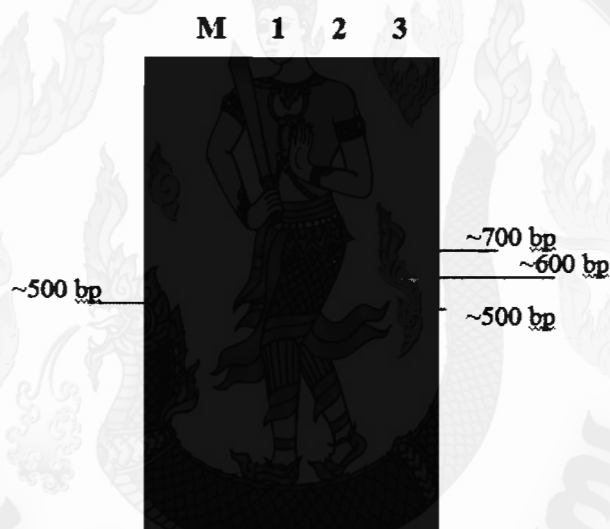
จากการจำแนกแบคทีเรียที่อาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยการใช้ชุดทดสอบแบบสำเร็จเป็นวิธี การที่สะดวก ง่าย มีความรวดเร็ว และมีความแม่นยำค่อนข้างสูง โดยจากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลต Mk-8 โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต Mk-8 มีคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายกับแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ร้อยละ 85.8 ดังนั้นเพื่อยืนยันผลการจำแนกแบคทีเรีย จึงนำแบคทีเรียไอโซเลต Mk-8 ไปทำการหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ต่อไป

ผลการหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA

จากการนำแบคทีเรียไอโซเลต Mk-8 ที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียที่มีองค์ประกอบของสีอะโซมากที่สุดมาสกัดดีเอ็นเอโดยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป และนำ genomic DNA ที่ได้มาทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มจำนวนปริมาณยีน 16S rRNA โดยใช้ universal primer 3 คู่ คือ 27F และ 520R, 357F และ 1080R และ 920F และ 1522R จากนั้นนำมาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของแบคทีเรีย พบว่า ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์มีขนาดประมาณ 500, 700 และ 600 คู่เบสตามลำดับ (ภาพ 35) นำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ TaKaRa SUPREC™-PCR แล้วนำ PCR product ที่บริสุทธิ์นี้ไปหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA ซึ่งได้ลำดับเบส ดังภาพภาคผนวก 2 ถึงภาคผนวก 7 จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้จาก primer ทั้ง 3 คู่ ของแบคทีเรียไอโซเลต Mk-8 ไปเทียบกันในโปรแกรม BioEdit ซึ่งได้ลำดับเบสแสดงดังภาพ 36 นำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบความคล้ายจากฐานข้อมูลลำดับเบสใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ได้ผลดังนี้คือ แบคทีเรียไอโซเลต Mk-8 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่คล้ายกับ *Bacillus subtilis* ร้อยละ 99.5 (ตาราง 16 และภาพ 37) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Majinder et al. (2006) ซึ่งศึกษาการย่อยสลายสี C.I. acid red 88 โดยใช้ระบบบำบัดแบบต่อเนื่องคือ up flow fixed-film column reactor (UFCR) และ continuously stirred aerobic reactor (CSAR) ซึ่งในถึงปฏิกรณ์แบบ up flow fixed-film column มีการตรึงเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus* sp. บนตัวกลาง polyurethane foam (PUF) พบว่า สามารถกำจัดสีได้ถึงร้อยละ 98 และลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 95

ตาราง 16 การจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 โดยการหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนของ ยีน 16S rRNA

ไอโซเลท	แบคทีเรีย	accession number	identities	ร้อยละ homology
Mk-8	<i>Bacillus subtilis</i>	EF502020.1	1537/154	99.5



ภาพ 35 ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ในส่วนของยีน 16S rRNA

หมายเหตุ Lane M คือ λ -HindIII digest

Lane 1 คือ ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 โดยใช้ไพรเมอร์ชุด 27F และ 520R

Lane 2 คือ ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 โดยใช้ไพรเมอร์ชุด 357F และ 1080R

Lane 3 คือ ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 โดยใช้ไพรเมอร์ชุด 920F และ 1522R

TAGTTTGNACCTGGCTCANGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCG
 AGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACG
 TGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGA
 TGGTTGTCTGAACCGCATGGTTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACA
 GATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGA
 TGCCTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAGAAGTCTGACGGA
 GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
 GAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA
 ATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCC
 GGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG
 TGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCG
 AAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAAC
 AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGG
 GTTTCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
 GTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTCTATGGA
 GCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCT
 GACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGG
 TTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
 TTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAA
 CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA
 CACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCC
 CACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGA
 ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGATAC
 ACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTT
 TATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGT
 AGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTAGA

ภาพ 36 ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต Mk-8

```

>|_chr185502v20.1 Sacillus subcilis strain EDR4 16S ribosomal RNA gene, partial
Sequence
Length=1543
Score = 2755 bits (3032), Expect = 0.0
Identities = 1537/1543 (99%), Gaps = 5/1543 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 AGTTTGA-CCTGGCTCAG-ACGAAACGCTGGCGGGGGTGGCTTAATACATGCAAGTCCGAGCGG 55
Subject 3 AGTTTGAATCCTGGCTCAGGAACGAACGCTGGCGGGGGTGGCTTAATACATGCAAGTCCGAGCGG 52
Query 59 ACAGATGGGAGCTTGGCTCCCGGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAAACAGTGGGTAAAC 158
Subject 67 ACAGATGGGAGCTTGGCTCCCGGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAAACAGTGGGTAAAC 122
Query 119 TGGCGGTAAAGACTGGGTAACTCGGGGAAACGGGGGTAAATACGGGTGATGGTTCCTGAAC 175
Subject 127 TGGCGGTAAAGACTGGGTAACTCGGGGAAACGGGGGTAAATACGGGTGATGGTTCCTGAAC 122
Query 179 GCGATGGTTACACATAAAGAGTGGCTTCGGGTACCGACTTACGATGGACCGGCGCGCGCA 236
Subject 183 GCGATGGTTACACATAAAGAGTGGCTTCGGGTACCGACTTACGATGGACCGGCGCGCGCA 242
Query 239 TTAGCTAGTGGGGAGGTAAAGGCTCAGCAAGGGGAGGATGGGTAGCGGAGCTGAGAGGG 298
Subject 243 TTAGCTAGTGGGGAGGTAAAGGCTCAGCAAGGGGAGGATGGGTAGCGGAGCTGAGAGGG 302
Query 299 TGATCGGGCAACCTGGGACTGAGACAGCGCCCGAGCTCTTACGGGAGGGGAGCGAGTAGGA 358
Subject 305 TGATCGGGCAACCTGGGACTGAGACAGCGCCCGAGCTCTTACGGGAGGGGAGCGAGTAGGA 362
Query 359 ATCTTCGGCAACGAGAGAGTGTGGAGGGAGGACGGCGGTGAGTGAAGGATGAGGTTTC 418
Subject 367 ATCTTCGGCAACGAGAGAGTGTGGAGGGAGGACGGCGGTGAGTGAAGGATGAGGTTTC 418

Query 479 AGGGTACCTAACGAGAAAGCCACGGGCTAACAGCTGGCGGAGCGCGGGGTAAATAGTAG 538
Subject 482 AGGGTACCTAACGAGAAAGCCACGGGCTAACAGCTGGCGGAGCGCGGGGTAAATAGTAG 540
Query 539 GTGGCAAGCGTGTCCGGGAATTATTGGGGCTAAAGGGCTTCGAGGGCGGTTCCTTAAGTCT 598
Subject 541 GTGGCAAGCGTGTTCGGGAATTATTGGGGCTAAAGGGCTTCGAGGGCGGTTCCTTAAGTCT 600
Query 599 GATGTGAAAGCGCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCTATTGGAAACTGGGGAAGTGGGTGCA 658
Subject 601 GATGTGAAAGCGCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCTATTGGAAACTGGGGAAGTGGGTGCA 660
Query 659 GAGAGGAGAGGTGGAAATCCACGCTGATCGGTGAAATGCGGTAGAGATGGTGGAGGACCC 718
Subject 661 GAGAGGAGAGGTGGAAATCCACGCTGATCGGTGAAATGCGGTAGAGATGGTGGAGGACCC 720
Query 719 ATGGGCGAGGGGACTGCTGGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGGAAAGCGTGGGGAGCG 778
Subject 721 ATGGGCGAGGGGACTGCTGGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGGAAAGCGTGGGGAGCG 720
Query 779 AACAGGATTAGAAACCTGGTAGTCCAGCGCGGTAAACGATGAGTGGTAAAGTGTAGGGGG 838
Subject 781 AACAGGATTAGAAACCTGGTAGTCCAGCGCGGTAAACGATGAGTGGTAAAGTGTAGGGGG 840
Query 839 TTCCCGCGCCCTTAGTGGCTGACGCTAACGCAATTAGGACTTGGGCTGGGGAGTACGGTCCG 898
Subject 841 TTCCCGCGCCCTTAGTGGCTGACGCTAACGCAATTAGGACTTGGGCTGGGGAGTACGGTCCG 900
Query 899 AAGACTGAAGCTCAAGAGGAATTGACGGGGGCGCGCAAGAGCGGTCTATGGAGCATGTGGT 958
Subject 901 AAGACTGAAGCTCAAGAGGAATTGACGGGGGCGCGCAAGAGCGGT----GGAGCATGTGGT 956
Query 959 TTAATTCGAGGCAAGCGGAGAAAGCTTACAGGTTGTTGACATCTGTTGACAAATCCAGAG 1018
Subject 957 TTAATTCGAGGCAAGCGGAGAAAGCTTACAGGTTGTTGACATCTGTTGACAAATCCAGAG 1016
Query 1019 ATAGGAGCTCCCGCTTGGGGGAGAGTGAAGAGTGGTGGATGGGTGCTGGTCCAGCTCGGTGT 1078
Subject 1017 ATAGGAGCTCCCGCTTGGGGGAGAGTGAAGAGTGGTGGATGGGTGCTGGTCCAGCTCGGTGT 1076
Subject 1077 CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGGAAAGAGCGCAAGCTTGAATCTTAAATTGCGCAAT 1136
Query 1139 CAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCGGGTACCAACCGGAGGAGGTGGGATGACGTCA 1198
Subject 1137 CAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCGGGTACCAACCGGAGGAGGTGGGATGACGTCA 1196
Query 1199 AATCTCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGGCTAATGGATAGAGACAAAGGGC 1258
Subject 1197 AATCTCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGGCTAATGGATAGAGACAAAGGGC 1256
Query 1259 AGCGAAACCGCGAGGTAAAGCCAAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTG 1318
Subject 1257 AGCGAAACCGCGAGGTAAAGCCAAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTG 1316
Query 1319 CAACTCGAGTGGCTGAAAGTGGAAATCGCTAGTAATCGGGGATCAGGATCGCGGGGTGAAT 1378
Subject 1317 CAACTCGAGTGGCTGAAAGTGGAAATCGCTAGTAATCGGGGATCAGGATCGCGGGGTGAAT 1376
Query 1379 ACGTTCCGGGGCTTGTACACACCGCGGCTCACACACGAGAGTTGTAAACACCGGAAGT 1438
Subject 1377 ACGTTCCGGGGCTTGTACACACCGCGGCTCACACACGAGAGTTGTAAACACCGGAAGT 1436
Query 1439 CGGTGAGGTAACTTTATGGAGCGAGCGCGGAGGTGGGACAGATGATGGGGTGAAGT 1498
Subject 1437 CGGTGAGGTAACTTTATGGAGCGTACCGCGGAGGTGGGACAGATGATGGGGTGAAGT 1496
Query 1499 CGTAACAAAGGTAGCGGTATCGGAAGGTGGGGGTGGATCAGCTCCCT 1543
Subject 1497 CGTAACAAAGGTAGCGGTATCGGAAGGTGGGGGTGGATCAGCTCCCT 1541

```

ภาพ 37 ลำดับชื่อของแบคทีเรียที่มีลำดับเบสคล้ายแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8

ผลการศึกษาผลของความเป็นพิษจากน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดด้วย

แบคทีเรียแบบเซลล์แขวนลอย

เมื่อนำน้ำที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 ในรูปเซลล์แขวนลอย มาทำการทดสอบผลต่อการรอดชีวิตของไรแดง (*Daphnia* sp.) (ภาพ 38) พบว่า ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 10, 25 , 50 และ 100 ที่ทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับไรแดงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ไรแดง ทั้งหมดไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ (อัตราการตายร้อยละ 100) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 ไรแดงทั้งหมด สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ (อัตราการตายร้อยละ 0) ส่วนในความเข้มข้นร้อยละ 5 พบว่า มีอัตราการ ตายร้อยละ 80 (ตาราง 17) ในการทดสอบความเป็นพิษของน้ำที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรีย ไอโซเลท Mk-8 แล้วนำไปเติมออกซิเจน(ภาพ 39) พบว่า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 5 และ 10 ไม่มี อัตราการตายของไรแดง (ตาราง 18) ทั้งนี้เนื่องมาจากความเป็นพิษของน้ำถูกออกซิไดส์เป็น สารอินทรีย์ชนิดอื่นที่มีความเป็นพิษน้อยลง ส่วนในความเข้มข้น 25 , 50 และ 100 พบว่า มีอัตรา การตายของไรแดงลดลงคิดเป็นอัตราการตายร้อยละ 20,40 และ 80 ตามลำดับ สอดคล้องกับ งานวิจัยของ Mustafa and Delia (2005) พบว่า น้ำที่ออกมาจากการบำบัดด้วยสภาวะไร้ออกซิเจนมี ความพิษจึงส่งผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของไรแดง (*Daphnia magna*) โดยที่ความเข้มข้นร้อยละ 12.5, 25, 50, 75 และ 100 ของน้ำที่ผ่านการบำบัดด้วยสภาวะไร้ออกซิเจนทำให้ไรแดงไม่สามารถ ดำรงชีวิตอยู่ได้เมื่อทำการทดสอบเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง คือ มีอัตราการตายร้อยละ 99-100 แต่ เมื่อนำน้ำไปบำบัดต่อที่สภาวะมีออกซิเจนพบว่ามีอัตราการตายลดลงตามระดับความเข้มข้นของ น้ำที่ทำการเจือจางเพื่อทำการทดสอบ

ตาราง 17 การทดสอบความเป็นพิษของน้ำที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8

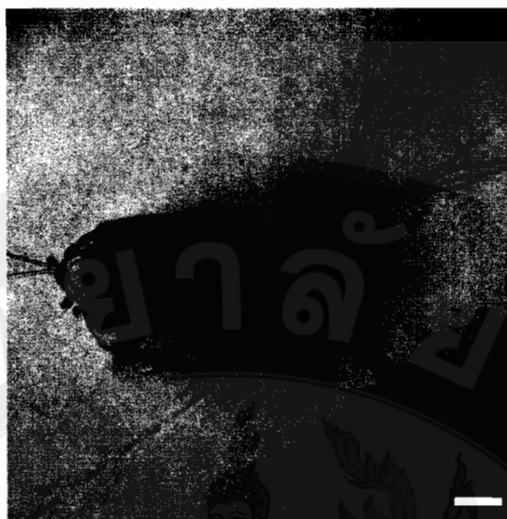
		ร้อยละความเข้มข้นน้ำที่ผ่านการบำบัด ด้วยแบคทีเรีย Mk-8					
		0	5	10	25	50	100
อัตราการตาย ของไรแดง (ร้อยละ)	NI	100	100	100	100	100	100
	NI	80	100	100	100	100	100
	NI	100	100	100	100	100	100
	NI	80	100	100	100	100	100
	NI	80	100	100	100	100	100
	NI	80	100	100	100	100	100

หมายเหตุ NI หมายถึง ไม่ยับยั้งการเจริญ

ตาราง 18 การทดสอบความเป็นพิษของน้ำที่ผ่านการเติมออกซิเจนเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง

		ร้อยละความเข้มข้นของน้ำที่ผ่านการ เติมออกซิเจน					
		0	5	10	25	50	100
อัตราการตาย ของไรแดง (ร้อยละ)	NI	NI	NI	NI	40	80	80
	NI	NI	NI	NI	40	80	80
	NI	NI	NI	20	40	80	80
	NI	NI	NI	20	40	80	80
	NI	NI	NI	20	40	80	80
	NI	NI	NI	20	20	80	80

หมายเหตุ NI หมายถึง ไม่ยับยั้งการเจริญ



ภาพ 38 ไรแดงที่ใช้ในการทดลอง



ภาพ 39 การทดลองที่มีการเติมออกซิเจนในน้ำที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรียไฮโซเลท Mk-8

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1. การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสีอะโซของแบคทีเรียไอโซเลท Mju-20(1), Mju-20(2), Mju-20(3), Mk-8, Lp-1 และ Mju-17 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสี แต่พบว่าแบคทีเรีย Mk-8 มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีสูงสุด
2. ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 พบว่า ที่พีเอช 7.0 เติม yeast extract ร้อยละ 2 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักและสีอะโซ 0.2 กรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการกำจัดสีของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8
3. แบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 เมื่อตรึงลงบนตัวกลางชนิดต่าง ๆ และเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรีย แล้วทำการสังเกตลักษณะของตัวกลางในแต่ละวัน พบว่า การตรึงเซลล์เป็นระยะเวลา 7 วัน ให้ประสิทธิภาพในการกำจัดที่ดี (ส่วนในการตรึงเซลล์ลงในโซเดียมแอลจินเนทมีวิธีการตรึงที่แตกต่างจากการตรึงลงบนตัวกลางชนิดอื่นๆ ซึ่งเรียกวิธีการนี้ว่า บีค เอนเทรปเมนต์ (bead entrapment))
4. เมื่อนำตัวกลางชนิดต่าง ๆ ที่ผ่านการตรึงด้วยเซลล์แบคทีเรียมาทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียสีสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบของสีอะโซ พบว่า ตัวกลางที่ผ่านการตรึงมีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ โดยร้อยละการกำจัดสีที่ดีที่สุดคือตัวกลางภูเขาไฟและร้อยละการกำจัดเอฟซีโอดีที่ดีที่สุด คือ ตัวกลางฟองน้ำ ตัวกลางที่มีประสิทธิภาพดีในการบำบัดน้ำเสียที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ คือ หินภูเขาไฟ และ ฟองน้ำ จึงได้เลือกมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป
5. การเปรียบเทียบแบคทีเรีย Mk-8 ที่ตรึงลงบนตัวกลางและเซลล์แบคทีเรียในรูปเซลล์แขวนลอยในการบำบัดน้ำเสียสีสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ พบว่า เซลล์แบคทีเรียในรูปเซลล์แขวนลอยมีประสิทธิภาพการบำบัดดีกว่าแบบการตรึงเซลล์ลงบนตัวกลาง
6. ประสิทธิภาพของแบคทีเรีย Mk-8 ที่ตรึงลงบนตัวกลางและแบบเซลล์แขวนลอยในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมสิ่งทอ จ.ลำพูน พบว่า ที่อัตราเจือจาง 20:80 มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีที่ดีกว่าอัตราเจือจางอื่น ๆ โดยที่เซลล์แบคทีเรียแขวนลอยมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีดีกว่าในการตรึงเซลล์แบคทีเรียบนหินภูเขาไฟและฟองน้ำ สามารถคิดเป็นร้อยละการกำจัดสี เท่ากับร้อยละ 83.1, 37.5 และ 34.4 ตามลำดับ

7. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 มีคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายกับแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ร้อยละ 85.8 และพบว่า แบคทีเรียไอโซเลท Mk-8 มีลำดับเบสยีน 16S rRNA ที่คล้ายกับ *Bacillus subtilis* ร้อยละ 99.5

8. น้ำที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรีย Mk-8 ในสภาวะไร้อากาศมีความเป็นพิษต่อไรแดง แต่เมื่อมีการเติมออกซิเจน พบว่า มีความเป็นพิษลดลงตามความเข้มข้นของอัตราการเจือจางน้ำที่ผ่านการบำบัด

ข้อเสนอแนะ

1. เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในงานบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมฟอกย้อม พบว่า การทดลองประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ตรึงบนตัวกลางในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบสามารถลดค่าการดูดกลืนแสงได้ดีแต่การย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียได้น้อยดังนั้นจึงเห็นสมควรอย่างยิ่งว่า ควรมีการนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรียที่ตรึงบนตัวกลางมาบำบัดต่อด้วยวิธีการบำบัดอื่น เช่น ระบบบำบัดแบบแเอโรบิก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดให้ดียิ่งขึ้นดังตัวอย่างงานวิจัยของ Nuttapun et al. (2003) ซึ่งทำการทดสอบการย่อยสลายสีอะโซในระบบบำบัดต่อเนื่องแบบแอนแอโรบิก-แเอโรบิกพบว่า ในสภาวะแอนแอโรบิกสามารถกำจัดสีอะโซได้ดี ส่วนสภาวะแเอโรบิกสามารถกำจัดเอฟซีไอได้ดี

2. การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่ตรึงบนตัวกลางที่ได้ในการทดลอง เมื่อมีการนำไปใช้จริงในการบำบัดน้ำเสียปริมาณมาก อาจต้องใช้ปริมาณของตัวกลางที่มากขึ้น ดังนั้นควรมีการศึกษาการเพิ่มปริมาณของเชื้อและปริมาณของตัวกลางเพื่อให้เหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียต่างๆ รวมไปถึงควรมีการศึกษาลักษณะของพื้นผิวสัมผัสของตัวกลางและปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงเซลล์ ทั้งยังจะช่วยส่งผลให้ตัวกลางที่ผ่านการตรึงด้วยเซลล์แบคทีเรียมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

3. วิธีการตรึงเซลล์ลงในโซเดียมแอลจิเนทบีดซึ่งในการทดลองนี้ได้ทำการตรึงโดยใช้เซลล์แบคทีเรียทั้งหมด ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพในการกำจัดสียังมีประสิทธิภาพที่ค่อนข้างต่ำ ดังนั้นควรมีการศึกษากการตรึงเซลล์ลงในโซเดียมแอลจิเนทบีด โดยใช้องค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรียในรูปอื่น ๆ เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อม

4. จากการทดสอบความเป็นพิษของน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรียในสภาวะไร้อากาศยังคงมีความเป็นพิษอยู่นั้น ควรมีการบำบัดต่อด้วยระบบการบำบัดแบบใช้อากาศเพื่อลดความเป็นพิษในน้ำเสีย

บรรณานุกรม

- กาวิ ศรีภูถกิจ. 2545. หลักการย้อมสิ่งทอ. กรุงเทพฯ ฯ: บริษัทศูนย์หนังสือกรุงเทพ. 165 น.
- กงศักดิ์ คุณจันทร์โชติ. 2538. สมรรถนะของถังกรองชีวภาพแบบไม่ใช้ออกซิเจนร่วมกับแบบใช้ออกซิเจนด้วยตัวกลางแบบโมดูลาร์ในการบำบัดน้ำเสีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 128 น.
- จันทิมา รอดมาและวิราภรณ์ อมรแก้ว. 2544. การศึกษาลักษณะของน้ำเสียจากโรงงานย้อมผ้าภายในจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน: รายงานวิจัย. ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 177 น.
- พรพรรณ เพ็ญอักษร. 2546. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายสีย้อมสิ่งทอสังเคราะห์และหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อม. โครงร่างปัญหาพิเศษ. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 115 น.
- ศิริภรณ์ โตเต็ม. 2536. การใช้พลาสติกเป็นตัวกลางยึดเกาะในระบบบำบัดน้ำเสียแบบเลี้ยงตะกอน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยมหิดล. 112 น.
- Adnane, M., Z. Youssef, Z.D. Fatima, T. Mohamed, L. Kangmin and B. Mohamed. 2003. Purification and partial characterization of azoreductase from *Enterobacter agglomerans*. **Arch. Biochem. Biophys.** 413:139-146.
- Balan, D. S. L and R. T. R. Monteiro. 2001. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. **Journal of Biotechnology** 89: 141-145.
- Banat, I. M., P. Nigam, D. Singh and R. Marchant. 1996. Microbial decolorization of textile dye containing effluents: a review. **Bioresour. Technol.** 58:217-227.

Bragger, J.L., A.W. Lloyd, S.H. Soozandehfar, S.F. Bloomfield, C. Marriott and G.P. Martin.

1997. Investigations into the azo reducing activity of a common colonic microorganism.

Int. J. Pharm. 157:61–70.

Carliell, C.M., S.J. Barclay, N. Naidoo, C. Buckley, D.A. Mulholland and E. Senior.

1994. Anaerobic decolourisation of reactive dyes in conventional sewage treatment processes. **Water Res.** 20(4):341–400.

Chang J.S. and T.S. Kuo. 2000. Kinetics of bacterial decolorization of azo dye with *Escherichia coli* NO3. **Bioresour. Technol.** 75:107–110.

Chang, J.S., C. Chou, Y.-C. Lin, J.Y. Ho and T. L. Hu. 2001. Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolourisation by *Pseudomonas luteola*. **Water Res.** 35(12): 41–50.

Chipperfield, P. N. 1967. Performance of plastic filter media in industrial and domestic wastewater treatment. **J. Water. Pollut. Control Fed.** 39: 1860-1874.

Coughlin, M. F., B. K. Kinkk and P. L. Bishop. 2002. Degradation of acid orange 7 in anaerobic biofilm. **Chemosphere** 46: 11-19.

Coughlin, M. F., B. K. Kinkk, A. Tepper and P. L. Bishop. 1997. Characteristics of aerobic azo dyes degrading bacteria and their activity in biofilm. **Water Sci. Technol.** 36: 215 -223.

Cristina, M., M.T.P. Amorim and M.C. Ferreira. 2003. Biotransformation of industrial reactive azo dyes by *Geotrichum* sp. CCMI 1019. **Enzyme Microb. Technol.** 32:145-151.

Chen, J. P. and Y. S. Lin. 2007. Decolorization of azo dye by immobilized *Pseudomonas luteola* entrapped in alginate–silicate sol–gel beads. **Process Biochem.** 42 : 934–942.

- Dafale, N., N.N Rao, Meshram U.S. and S.R. Wate. 2007. Decolorization of dyes and simulated Dye bath wastewater using acclimatized microbial consortium biostimulation and halo tolerance. **Bioresour. Technol.** 88:115-119
- Direk, F. B., H. M. Taplamacioglu and E. Tarlan. 1999. Colour and AOX removal from pluping effluents by algae. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 52:585-590.
- Fukada, H. 1995. Immobilized microorganism bioreactor. pp. 339-375. In J.A Asenjo. and J.C. Merchuk (Eds), **Bioreactor System Design**. New York: Marcel Dekker, Inc. 450 p.
- Giovana, K.T., Z. Adriana, G.M. Cristina de Souza and M.P. Rosane. 2003. Decolourisation of industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus pulmonarius*. **Process Biochem.** 38:1183-1192
- Gingell, R. and R. Walker. 1971. Mechanisms of azo reduction by *Streptococcus faecalis*. II. The role of soluble flavins. **Xenobiotica.** 1(3):231-240.
- Gray, N. F and M. F. Learner. 1984. Comparative pilot – scale investigation into uprating the performance of percolating filter by partial medium replacement. **Water Research** 18: 409-422.
- Guimaraes, C., C. Matos, J. Azeredo, M. Mota and R. Oliveira. 2002. The importance of the morphology and hydrophobicity of different carriers on the immobilization and sugar refinery effluent degradation activity of *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnol. Lett.** 24:795-800.
- Holt, J.C., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. **Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology Ninth Edition**. New York :Williams & Wilkins. 985 p.

- Horitsu, H., Takada, M., Idaga, E., Tomoyeda, M. and Ogawa T. 1977. Degradation of p-amonoazobenzene by *Bacillus subtilis*. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 21:17-24.
- Hu, T. L. 1999. Decolorization of reactive azo dyes by transformation with *Pseudomonas luteola*. **Bioresour. Technol.** 49:47-51.
- _____. 2001. Kinetics of azoreductase and assessment of toxicity of metabolic Product from azo dye *Pseudomonas luteola*. **Water Sci. Technol.** 43:261-269.
- Ilgi, K. K. and S. Alparslan. 2004. Application of anaerobic-aerobic sequential treatment system to real textile wastewater for color and COD removal. **Enzyme Microb. Technol.** 36: 273-279.
- Jadhav, J.P., G.K. Parshetti, S.D. Kalme and S.P. Govindwar. 2007. Decolourization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. **Chemosphere.** 68 : 394–400.
- Joshu, C., C. Chien and C. Shan-Yu. 2001. Decolorization of azo dyes with immobilized *Pseudomonas luteola*. **Process Biochem.** 36:757-763.
- Kalyani D.C., A.A. Telke, R.S. Dhanve and Jadhav J.P. 2009. Ecofriendly biodegradation and detoxification of Reactive Red 2 textile dye by newly isolated *Pseudomonas* sp. SUK1. **J. Hazard. Mater.** 163:735–742.
- Kawaguti H. Y. and Sato H. H.. 2007. Palatinose production by free and Ca-alginate gel immobilized cells of *Erwinia* sp. **Biochem. Eng. J.** 36: 202–208.
- Keck, A., J. Klein, M. Kudlich, A. Stolz, H. J. Knackmuss and R. Mattes. 1997. Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas* sp. strain BN6. **Appl. Environ. Microbiol.** 63:3684-3690.
- Khehra, M. S., H. S. Saini, D. K. Sharma, B. S. Chadha and S. S. Chimmi. 2005. Decolorization of various azo dyes by bacterial consortium. **Dyes and Pigments** 67: 55-61.

_____. 2006. Biodegradation of azo dye C.I. Acid Red 88 by an anoxic-aerobic

sequential bioreactor. **Dyes and Pigments** 70: 1-7.

Kuo, C.C., Y.W. Jane, C.C. Huang, Y.M. Liang and J.H. Sz-Chuwun. 2003. Decolorization of azo dye using PVA-immobilized microorganisms. **J. Biotechnol.** 101: 241- 252.

Kuo, C.C., Y.W. Jane, J.L.Dar and J.H. Sz-Chuwun. 2003. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. **J. Biotechnol.** 101:57-68.

Learner, M. A. 1975. **The Ecology and distribution of Invertebrates Which Inhabit The Percolating Filter of Sewage-work.** Doctoral dissertation, University of London.206 p.

Majinder, S. K., H. S. Saini, D. K. Sharma, B. S. Chadha and S. S. Chimmi. 2006.

Biodegradation of azo dye C.I.Acid Red 88 by an anoxic-aerobic sequential bioreactor.

Dyes And Pigments .70: 1-7.

Martin, M. A. M., M. H. Cardoso, M. J. Queiroz, M .T. Ramalno and A. M. O. Campos. 1999. Biodegradation of azo dyes by the yeast *Candida zeylanoides* in batch aerated culture. **Chemosphere.** 38:2455-2460.

Mustafa, I. and T.S. Delia, 2002. Effect of oxygen on decolorization of azo dyes by *Escherichia coli*. and *Pseudomonas* sp. and fate of aromatic amines. **Process Biochem.** 38:83-92.

_____. 2004. Monitoring of toxicity and intermediates of C.I. Direct Black 38 azo dye through decolorization in an anaerobic/aerobic sequential reactor system. **J. Hazard. Mater.** B114:29-39.

Nigam, P. and R. Marchant. 1995. Selection of a substratum for composing biofilm system of a textile effluent decolorizing bacteria. **Biotechnol. Lett** 17: 993-996.

Nigam P., I. M. Banat, D. Singh, R. Marchant. 1995. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing Azo, Diazo and reactive dyes. **Process Biol.** 31:435-442.

- Nuttapun, S., K. Juntongjin, S. Damronglard, M. L. Delia and P. Strehaiano. 2003. Microbial decolorization of reactive azo dye in a sequential anaerobic-aerobic system. **Chem. Eng. J.** 99: 169-170.
- Park, J.K. and Chang, H.N. 2000. Research review paper: Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnol. Adv.** 18:303-319.
- Pearce, C. I., J. R. Lloyd and J. G. Guthrie. 2003. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. **Dyes and Pigments.** 58:179-196.
- Reife, A., Betowski, D. and Freeman, H.S. 1999. Dyes and pigment: environmental chemistry. pp. 475-480, In R.A. Meyers (Ed.), **The wiley encyclopedia of environmental pollution and clean up.** New York: John Wiley and Son, Inc. 568 p.
- Robinson, T., B. Chandran and P. Nigam. 2002. Removal of dyes from a synthetic textile dye effluent by biosorption on apple pomace and wheat straw. **Water Res.** 36:2824-2830.
- Safia, M., X. Kher and D. Madamwar. 2006. Isolation, characterization and decolorization of textile dye by a mixed bacterium JW-2. **Dye and Pigments.** 74: 723-729.
- Sani, R.K. and U.C. Banerjee, 1999. Decolorization of triphenylmethane dyes and dye-stuff effluent by *Kurthia sp.* **Enzyme Microb. Technol.** 24:433-437.
- Sriamornsak P. 1998. Preliminary investigation of some polysaccharides as a carrier for cell entrapment. **Eur J. Pharm Biopharm.** 46:233- 239.
- Steffana S., Bardib L. and M. Marzona. 2005. Azo dye biodegradation by microbial cultures Immobilized in alginate beads. **Environ. Int.** 31:201- 205.
- Tal, Y., B. Schwartzburd, A. Nussinovitch and J. Rijn. 2001 Enumeration and factors influencing the relative abundance of a denitrifier, *Pseudomonas sp.* JR12, entrapped in alginate beads. **Environ Pollut.** 112:99-106.

Textile Industry Division. 2005. **Thai textile static 2004**. Bangkok: Department of industrial

Promotion.142 p.

Van, D. Z. ,F.P., R.H.M. Bouwman, D.P.B.T.B. Strik, G. Lettinga and J.A. Field. 2001.

Application of redox mediators to accelerate the transformation of reactive azo dyes

In anaerobic bioreactors. **Biotechnol. Bioeng.** 75(6):691–701.

Wang, S., Li H., Xie S., Liu S. and Xu L.. 2006. Physical and chemical regeneration of zeolitic

adsorbents for dye removal in wastewater treatment. **Chemosphere.** 65:82–87.

Wuhrmann, K., Mechsner, K. and Kappereler T .1980. Investigations on rate

determining factors in the microbial reduction of azo dye. **Eur. J. Appl. Microbio.**

Biotechnol .9:25-38.

Yann, D. and Christophe L. 2005. **Cell immobilization for the dairy industry**. Zurich:

Switzerland Laboratory of Food Technology, Institute of Food Science and Nutrient.

254 p.

Yoo, E. S., J. Libra and L. Adrian. 2001. Mechanism of decolorization of azo dyes in anaerobic

mixed culture. **J. Environ. Eng.** 127:844-849.

ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.อาหารเหลวสูตร Nutrient Broth (NB)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม

ละลายส่วนผสมข้างต้นด้วยน้ำกลั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2.อาหารแข็งสูตร Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar (วุ้น)	15	กรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เติมผงวุ้น 15 กรัม ต้มให้ผงวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.อาหารแข็งสูตร Nutrient Agar (NA) ที่มีสี congo red เป็นองค์ประกอบ

Congo Red	0.2	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar (วุ้น)	15	กรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เติมผงวุ้น

15 กรัม ต้มให้ผงวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที





ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีและวิธีวิเคราะห์ COD

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ COD

1. สารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมต

ละลายโปแตสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ซึ่งอบแห้งที่ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงหนัก 4.913 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 167 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ปล่อยให้เย็น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

2. กรดซัลฟูริกและซิลเวอร์ซัลเฟต

ซังซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) 8.8 กรัม ใส่ลงในกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1,000 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 – 2 วัน เพื่อให้ซิลเวอร์ซัลเฟตละลายได้ทั้งหมดก่อนนำไปใช้

3. สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 นอร์มัล

ละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$) 39.2 กรัมในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

4. สารละลายเฟอร์โรอินอินดิเคเตอร์

ละลาย 1,10 – ฟีนันโทโรลีน โมโนไฮเดรต (1,10 – phenanthroline monohydrate, $C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$) 1.485 กรัม และเฟอร์รัสซัลเฟต (ferrous sulfate, $FeSO_4 \cdot H_2O$) 695 มิลลิกรัม ใน น้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์ COD (Chemical oxygen demand)

1. ล้างหลอดย่อยสลายและฝาจุกด้วยกรดซัลฟูริก 20 เปอร์เซ็นต์ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสารอินทรีย์

2. เลือกใช้ปริมาตรของตัวอย่างน้ำและสารเคมีที่เหมาะสม

3. นำตัวอย่างน้ำมาใส่ในหลอดย่อยสลาย แล้วเติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต

4. ค่อย ๆ เทกรดซัลฟูริกหรือเอเจนต์ให้ไหลลงก้นหลอดเพื่อให้ชั้นของกรดอยู่ภายใต้ตัวอย่างน้ำและสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต

5. ปิดฝาหลอดแก้วให้แน่นแล้วคว่ำหลอดไปมาหลาย ๆ ครั้งเพื่อให้สารละลายผสมกันอย่างทั่วถึง

6. นำหลอดทดสอบนี้ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง โดยนำมาวางในที่วางหลอดทดลอง

7. เทสารผสมลงในขวดรูปชมพู่ แล้วเติมเฟอโรอินอินดิเคเตอร์ 1 – 2 หยด นำไปไตเตรทกับ 0.1 โมลาร์เฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต จนถึงจุดยุติเมื่อสารละลายเปลี่ยนสีจากฟ้าอมเขียวเป็นน้ำตาลแดง

8. ด้วยวิธีการเดียวกันให้รีฟลักซ์น้ำกลั่น (blank) ในปริมาตรเท่ากับปริมาตรน้ำตัวอย่างรวมทั้ง

ใช้รีเอเจนต์เดียวกันและไตเตรทด้วยสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น

1.0 โมลาร์

การคำนวณ

$$\text{COD (มิลลิกรัม O}_2\text{ต่อ ลิตร)} = [(A - B) \times M \times 8,000] / \text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}$$

โดย A = ปริมาตรของ 1.0 โมลาร์ เฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรท blank (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของ 1.0 โมลาร์ เฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรท น้ำตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

M = โมลาริตีของเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต

ตารางผนวก 1 ปริมาณน้ำตัวอย่างและรีเอเจนท์ที่เหมาะสมสำหรับหลอดย่อยสลายขนาด
ต่างๆ

ขนาดหลอด ย่อยสลาย	ปริมาตร น้ำตัวอย่าง (มิลลิลิตร)	โพแทสเซียม ไดโครเมต (มิลลิลิตร)	กรดซัลฟูริก รีเอเจนท์ (มิลลิลิตร)	ปริมาตร ทั้งหมด (มิลลิลิตร)
หลอดย่อยสลาย				
16 x 100 มม.	2.5	1.5	3.5	7.5
20 x 150 มม.	5.0	3.0	7.0	15.0
25 x 150 มม.	10	6.0	14.0	30.0
แอมพูลมาตรฐาน				
10 มิลลิลิตร	2.5	1.5	3.5	7.5

สีย้อมแบบแกรม

1. acetone alcohol (decolorizer for Gram's straining)

- 95 % ethanol 250 มิลลิลิตร
- acetone 250 มิลลิลิตร

2. crystal violet strain

- crystal violet 0.5 กรัม
- น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3. Gram iodine

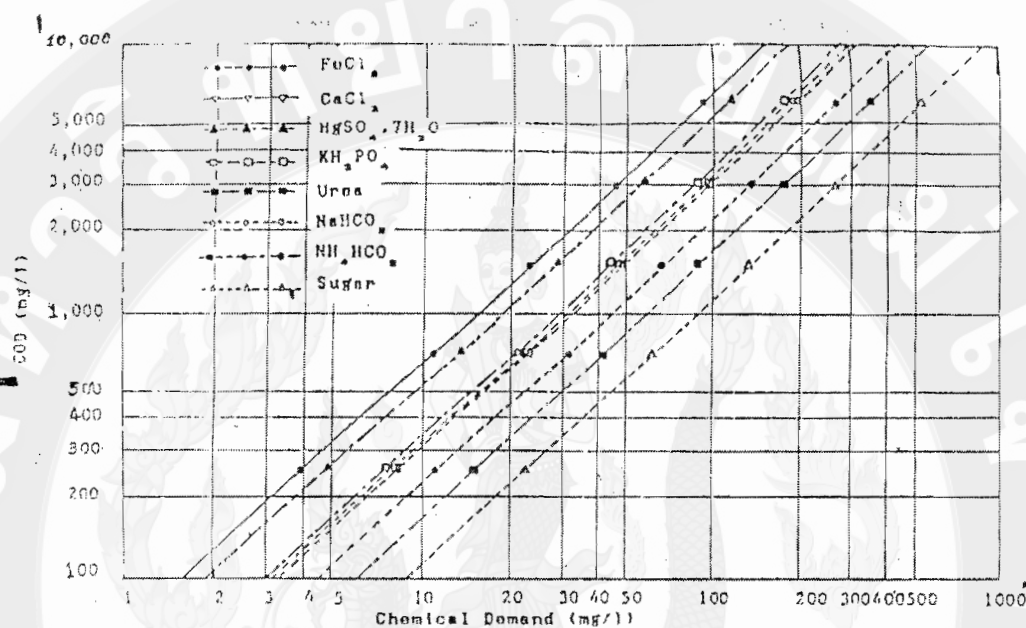
- iodine 1.0 กรัม
- potassium Iodine 2.0 กรัม
- น้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร

4. safranin

- safranin 2.5 กรัม
- 95 % ethanol 100 มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร

การเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบของสีอะโซ

กราฟมาตรฐานสำหรับใช้เตรียมน้ำเสียสังเคราะห์



ภาพผนวก 1 กราฟมาตรฐานสำหรับใช้เตรียมน้ำเสียสังเคราะห์

Chemical Demand (mg/L) สำหรับ FeCl_3 , CaCl_2 (เส้นทึบ) ค่าที่ได้

คูณด้วย 10^{-1} Chemical Demand (mg/L) สำหรับ NaHCO_3 , NH_4HCO_3 และ Sugar (จุดไข่ปลา) ค่าที่ได้ต้องคูณด้วย 10

สี Congo red 0.2 g/L

น้ำเสียสังเคราะห์ที่เตรียมที่ระดับ Chemical Oxygen Demand เท่ากับ 1000 (mg/L)

การวิเคราะห์ร้อยละการกำจัดสี

$$\text{ร้อยละการกำจัดสี} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงก่อนบำบัด} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงหลังบำบัด} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงก่อนบำบัด}}$$

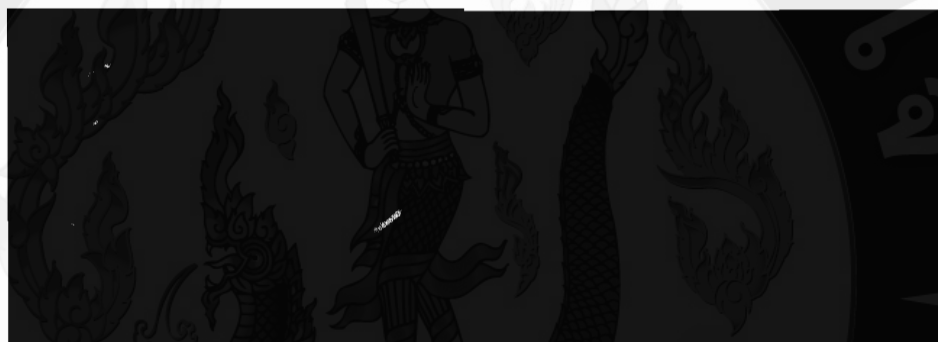
ภาคผนวก ค

ตัวกลางชนิดที่ใช้ในการตรึงแบคทีเรียและลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วน 16S rRNA



ก)

ข)



ค)

ง)



จ)

ฉ)

ภาพผนวก 2 ตัวกลางชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการตริ้งเบคที่เรีย

ก) ฟองน้ำ

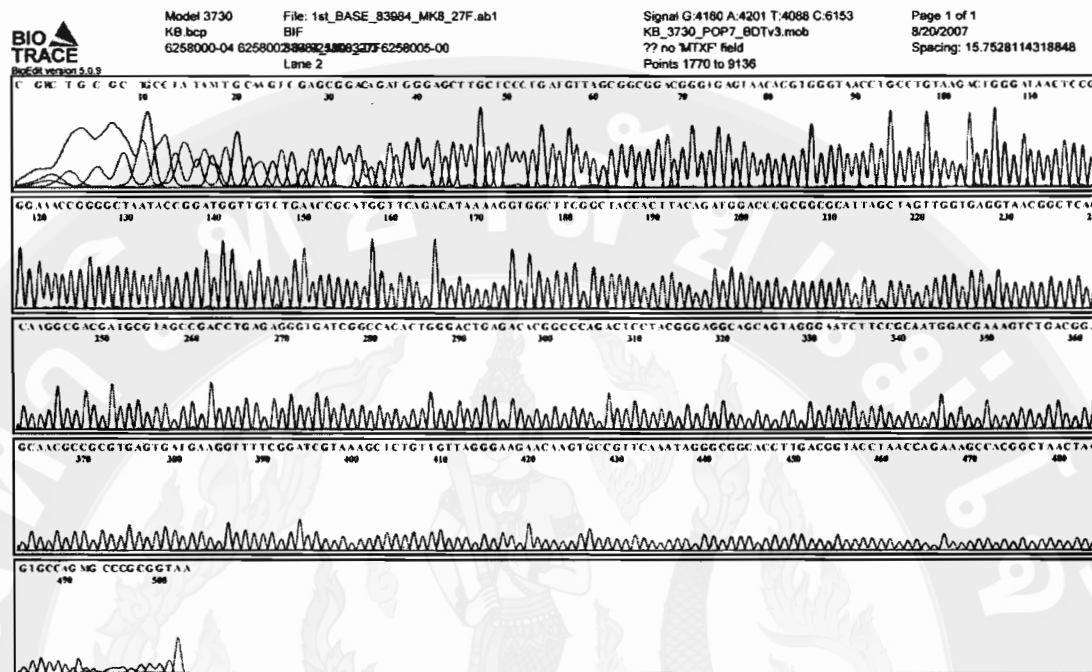
ข) หินภูเขาไฟ

ค) แผ่นพลาสติก

ง) ฝาขวดน้ำพลาสติก

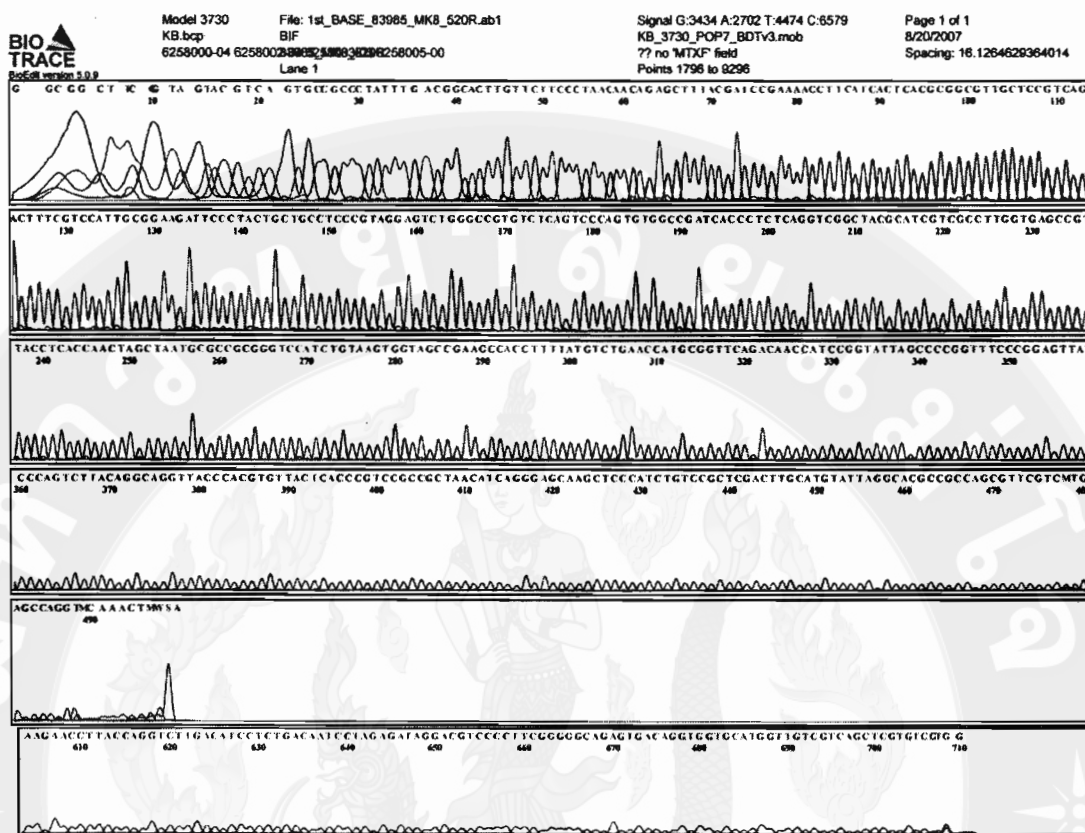
จ) โซเดียมแอลจิเนตบีค

ฉ) ซีโอไลท์



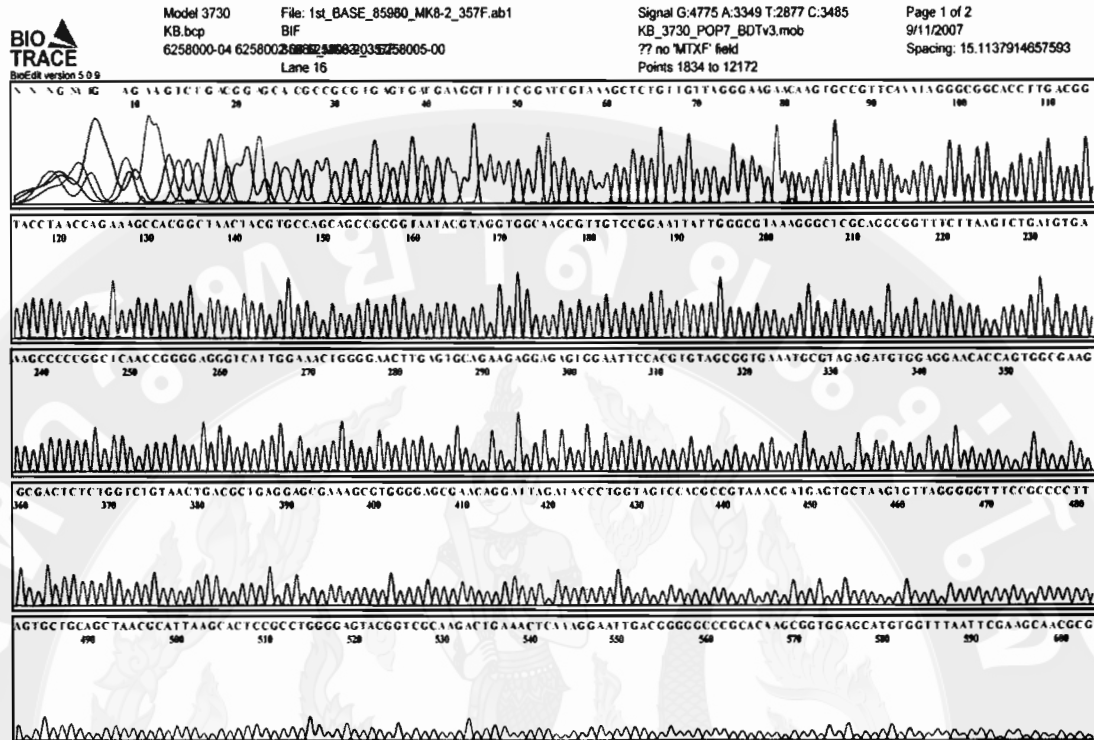
5' CTGCCTATACtTGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAG
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCC
GGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAA
AGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
AGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC
ACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT
TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTT
GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCA
CCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGGCCCGCGGTA
A3'

ภาพผนวก 3 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียโอโซเลท Mk-8 ที่ได้จาก primer 27F



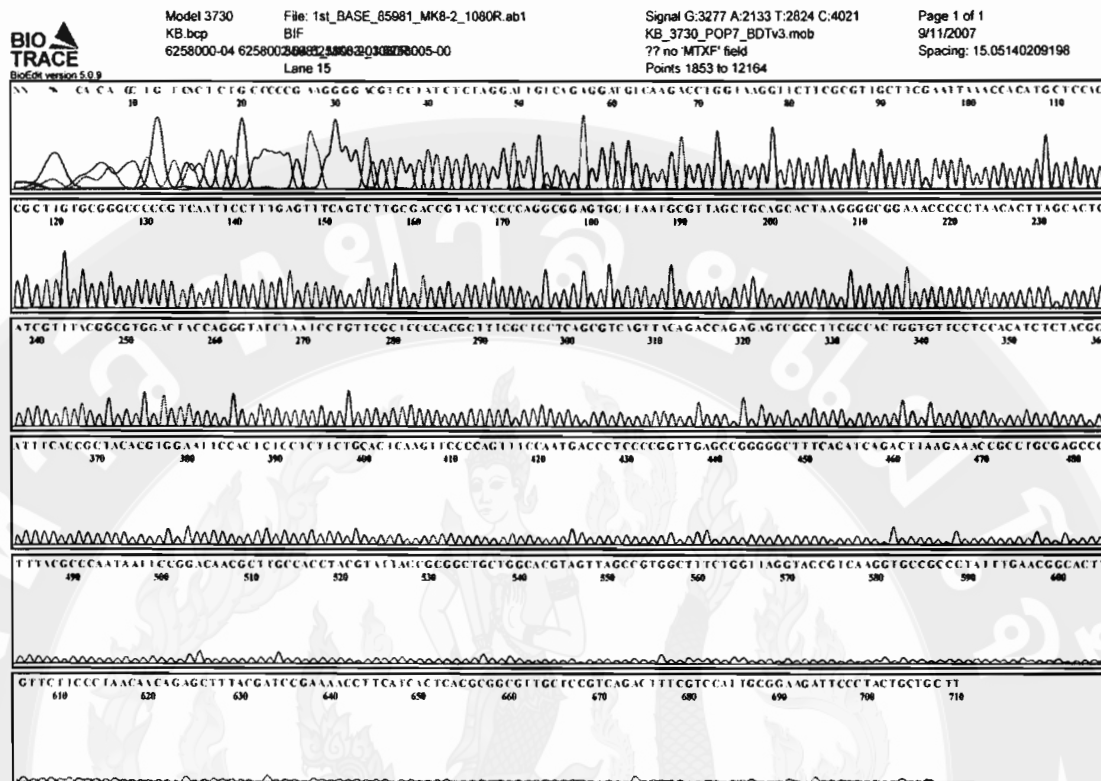
5' CTTCGGTAGTACGTCACTGCGGCCCTATTTGACGGCACTTGTCTTCCCTAAC
AACAGAGCTTTACGATCCGAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAG
ACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCC
GTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGC
CTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAG
TGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGCGGTTTACAGACAACCATCCGG
TATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCAGCTG
TTACTCACCCGTCCGCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGA
CTTGATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTTCGTCTGAGCCAGGTCAAACCT3'

ภาพผนวก 4 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียโอโซเลท Mk-8 ที่ได้จาก primer 520R



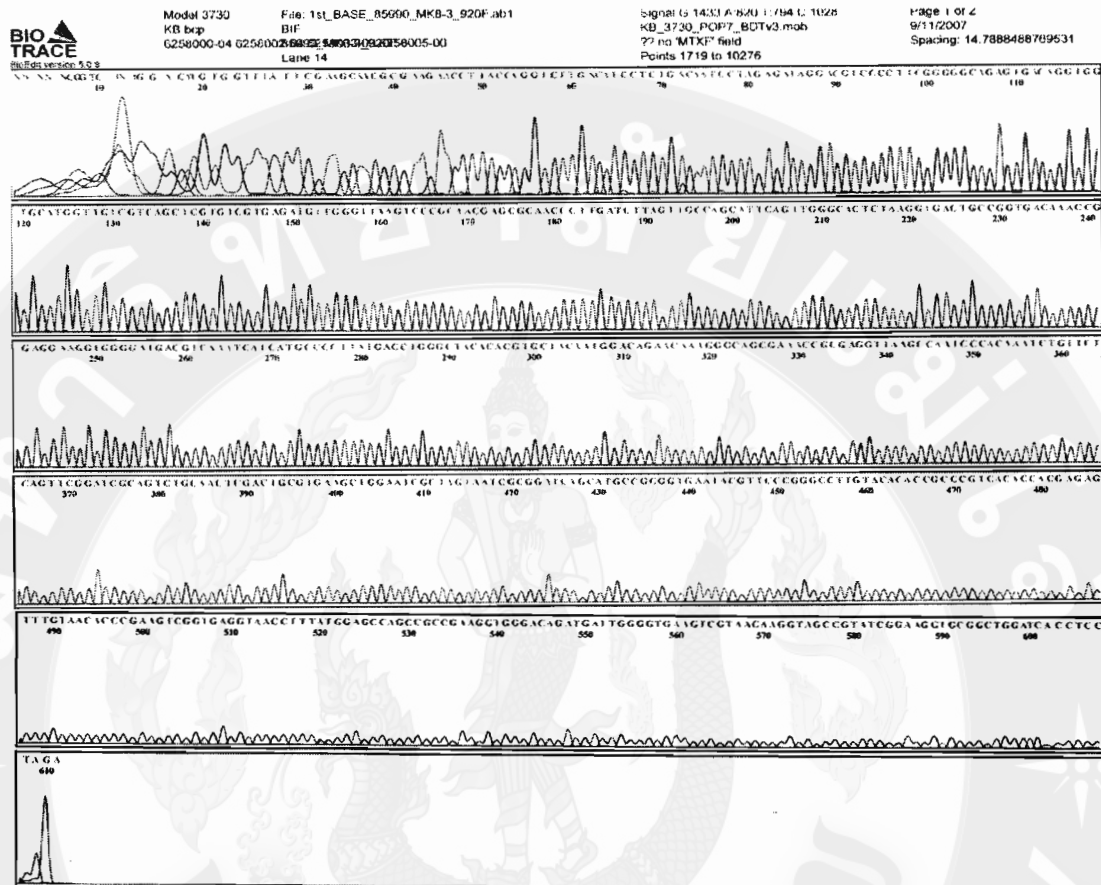
5' GATGAGAAGTCTGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGT
AAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGAC
GGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCT
TAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGG
AACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
AGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTG
AGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACG
CATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTG
ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGA
ACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCG
GGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGCGTGG3'

ภาพผนวก 5 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียโอโซเลท Mk-8 ที่ได้จาก primer 357F



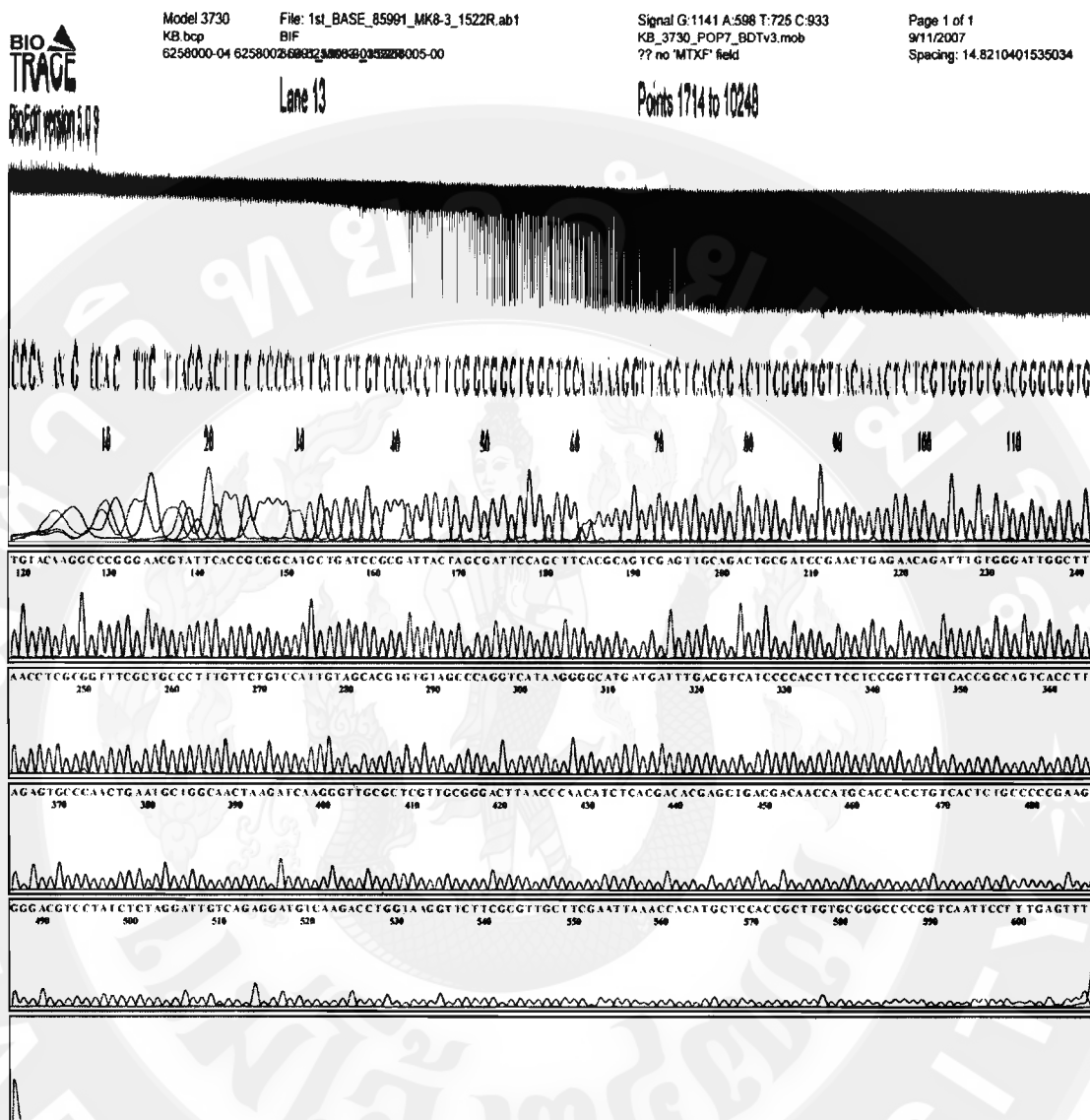
5' CACAGCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTC
CACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTAC
TCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCC
TAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT
CGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCG
CCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCAC
TCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCTCCCCGGTTGAGCC
GGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCCAATAA
TTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGC
CGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGT
TCTTCCCTAACAACAGAGCTTACGATCCGAAACCTTCATCACTCACGCGGCGT
TGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCTT3'

ภาพผนวก 6 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียโอโซเลท Mk-8 ที่ได้จาก primer 1080R



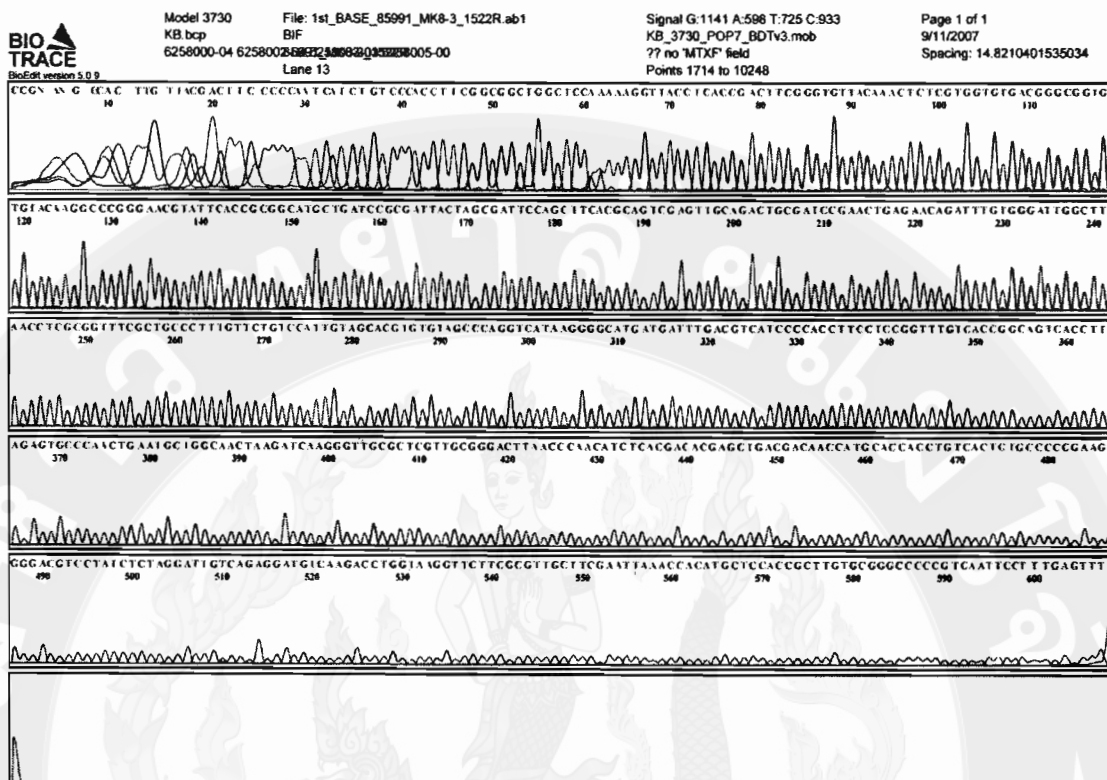
5' CGGTCTATGGACATGTGGTTTATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC
TTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCTTTCGGGGGCAGAGTGAC
AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTG
ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT
TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCG
CGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACT
CGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT
ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCC
GAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATT
GGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCT
AGA3'

ภาพผนวก 7 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียโอโซเลท Mk-8 ที่ได้จาก primer 920F



5' CCGAGCCACTTGTTACGACTTCCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGGCTG
GCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGAC
GGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGAT
TACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGA
ACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCA
TTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCC
CACCTTCCTCCGGTTTGTCAACGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTG
GCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGAC
ACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCC
TATCTCTAGGATTGTCAAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTT
CGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCCTTTGAGT
TT3'

ภาพผนวก 8 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียโอโซเลท Mk-8 ที่ได้จาก primer 1522



5' CCGAGCCACTTGTTACGACTTCCCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTG
GCTCCAAAAGGTTACCTCACCAGCTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGAC
GGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGAT
TACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAAGTGA
GAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCA
TTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCC
CACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTG
GCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGAC
ACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGACGTCC
TATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTT
CGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTGAGT
TT3'

ภาพผนวก 8 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียโอโซเลท Mk-8 ที่ได้จาก primer 1522



ภาคผนวก ง

กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของน้ำเสีย



ภาพผนวก 9 การดูคลื่นแสงสูงสุดของน้ำเลี้ยวสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ



ภาพผนวก 10 การดูคลื่นแสงสูงสุดของน้ำเลี้ยวจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมผ้าบาติก อ.ป่าซาง จ. ลำพูน

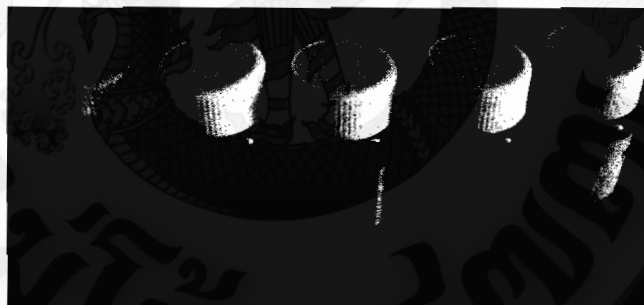
ภาคผนวก จ

ประสิทธิภาพการกำจัดสีและการกำจัดเอฟซีไอดีของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลทและ
ลักษณะของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรีย

ตารางผนวก 2 ประสิทธิภาพการกำจัดสีและการกำจัดเอฟซีไอดีของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ร้อยละการกำจัดสี	ร้อยละการกำจัดเอฟซีไอดี
	Congo red	
Mju 20 (1)	64.8 ^b	48.4 ^c
Mju 20 (2)	55.7 ^d	41.5 ^d
Mju 20 (3)	46.8 ^e	40.1 ^d
Lp-1	40.7 ^f	50.6 ^b
Mju-17	61.2 ^c	47.5 ^c
Mk-8	85.8 ^a	54.7 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



ภาพผนวก 11 ลักษณะน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรีย Mk-8 ที่

ตรึงบนหินภูเขาไฟในวันสุดท้ายของการทดลอง

- ก) อัตราเจือจาง น้ำเสียต่อน้ำประปา เท่ากับ 50:50
- ข) อัตราเจือจาง น้ำเสียต่อน้ำประปา เท่ากับ 30:70
- ค) อัตราเจือจาง น้ำเสียต่อน้ำประปา เท่ากับ 20:80
- ง) อัตราเจือจาง น้ำเสียต่อน้ำประปา เท่ากับ 10:90
- จ) อัตราเจือจาง น้ำเสียต่อน้ำประปา เท่ากับ 5:95



ก) ข) ค) ง) จ)

ภาพผนวก 12 ลักษณะน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรีย

Mk-8 ที่ครึ่งบนฟองน้ำในวันสุดท้ายของการทดลอง

- ก) อัตราเจือจาง น้ำเสียต่อน้ำประปา เท่ากับ 50:50
- ข) อัตราเจือจาง น้ำเสียต่อน้ำประปา เท่ากับ 30:70
- ค) อัตราเจือจาง น้ำเสียต่อน้ำประปา เท่ากับ 20:80
- ง) อัตราเจือจาง น้ำเสียต่อน้ำประปา เท่ากับ 10:90
- จ) อัตราเจือจาง น้ำเสียต่อน้ำประปา เท่ากับ 5:95



ก) ข) ค) ง) จ)

ภาพผนวก 13 ลักษณะน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อมที่ผ่านการบำบัดด้วยแบคทีเรีย

Mk-8 ในรูปเซลล์แขวนลอยในวันสุดท้ายของการทดลอง

- ก) อัตราเจือจาง น้ำเสียต่อน้ำประปา เท่ากับ 50:50
- ข) อัตราเจือจาง น้ำเสียต่อน้ำประปา เท่ากับ 30:70
- ค) อัตราเจือจาง น้ำเสียต่อน้ำประปา เท่ากับ 20:80
- ง) อัตราเจือจาง น้ำเสียต่อน้ำประปา เท่ากับ 10:90
- จ) อัตราเจือจาง น้ำเสียต่อน้ำประปา เท่ากับ 5:95



ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวรัตนันท์ คำใจ
เกิดเมื่อ	30 สิงหาคม 2526
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2544 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนอยุธยาวิทยาลัย จังหวัดพระนครศรีอยุธยา พ.ศ. 2548 วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
งานวิจัยเผยแพร่	1. การนำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ในการประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 31 ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เรื่อง ประสิทธิภาพของแบคทีเรียอัดเม็ดในการบำบัดน้ำเสีย จากอุตสาหกรรมฟอกย้อม ระหว่างวันที่ 18-20 ตุลาคม 2548 2. การนำเสนอผลงานภาคบรรยายในการประชุมวิชาการเทคโนโลยี และนวัตกรรมสำหรับการพัฒนาอย่างยั่งยืน (TISD2006) คณะวิศวกรรมศาสตร์ จังหวัดขอนแก่น เรื่อง ประสิทธิภาพ ของแบคทีเรียอัดเม็ดในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอก ย้อม ระหว่างวันที่ 25-26 มกราคม 2549 3. การนำเสนอผลงานภาคบรรยายในการประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อม ครั้งที่ 7 ณ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ กรุงเทพมหานคร เรื่อง การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการบำบัดน้ำเสียที่มี สีอะโซเป็นองค์ประกอบ ระหว่างวันที่ 12-14 มีนาคม 2551