การกำจัดสี Reactive Black 5 ในน้ำเสียสีย้อม โดยใช้ *Pseudomonas* sp.

นางสาวภัคพรรณ ปล้องนิราศ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ ภาควิชาวัสดุศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DECOLORIZATION OF REACTIVE BLACK 5 DYE WASTEWATER USING *Pseudomonas* sp.

Miss Pakaphan Plongniras

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Applied Polymer Science and Textile Technology
Department of Materials Science
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การกำจัดสี Reactive Black 5 ในน้ำเสียสีย้อม โดยใช้ *Pseudomonas* sp.
โดย	นางสาวภัคพรรณ ปล้องนิราศ
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุษา แสงวัฒนาโรจน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. ธิดารัตน์ นิ่มเชื้อ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. มัณฑนา โอภาประกาสิต)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุษา แสงวัฒนาโรจน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร. ธิดารัตน์ นิ่มเชื้อ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริวรรณ กิตติเนาวรัตน์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร. นราพร รังสิมันตกุล)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภัคพรรณ ปล้องนิราศ : การกำจัดสี Reactive Black 5 ในน้ำเสียสีย้อม โดยใช้ *Pseudomonas* sp. (DECOLORIZATION OF REACTIVE BLACK 5 DYE WASTEWATER USING *Pseudomonas* sp.) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. อุษา แสงวัฒนาโรจน์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร. ธิดารัตน์ นิ่มเชื้อ, 92 หน้า.

งานวิจัยนี้ใช้เทคโนโลยีทางชีวภาพเพื่อกำจัดสีย้อมในสารละลายสี โดยคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. จำนวน 49 สายพันธุ์ (คัดเลือกมาจากคลังเชื้อจุลินทรีย์ใน Thailand Bioresource Research Center (TBRC) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) มาทดลองเบื้องต้นในการกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) ที่ภาวะการบ่มแบบหยุดนิ่ง อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และพีเอช 8 พบว่าเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* แสดงประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดสีได้เท่ากับ 54.57 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงทดลองใช้เชื้อดังกล่าวในการกำจัดสี Reactive Black 5 ในสารละลายสีย้อมที่เหลือจากการย้อมจริงที่ใช้ด่างช่วยในการย้อม และปรับลดความเข้มข้นสีให้เป็น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อและที่ภาวะการบ่มเดิม พบว่าเมื่อวิเคราะห์การกำจัดสีของแบคทีเรียในภาวะที่มีและไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียดังกล่าวสามารถกำจัดสีย้อมในภาวะที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากกว่าภาวะที่ไม่มีอาหาร 72.42 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 48 ชั่วโมงของการบ่ม นอกจากนั้นเมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของสีย้อมก่อนและหลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรียเพื่อศึกษากลไกการกำจัดสีโดยใช้เทคนิค FTIR และ HPLC พบว่าการใช้แบคทีเรียย่อยสลายสีย้อม Reactive Black 5 จะทำให้หมู่เอโซ (-N=N-) ของสีย้อมถูกทำลายและเปลี่ยนไปเป็นหมู่แอมิโน ($-NH_2$) และมีผลิตภัณฑ์ของกรดออกซาลิกเกิดขึ้นหลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรียเป็นเวลา 5 วัน ทำให้เฉดสีในสารละลายสีย้อมมีสีอ่อนลง และเมื่อบ่มสารละลายสีในแบคทีเรียเป็นเวลา 6 วัน แบคทีเรียสามารถกำจัดสีได้ถึง 87.61 เปอร์เซ็นต์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาควิชา	วัสดุศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต	.....
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก	.....
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม	.....
ปีการศึกษา	2560		

5872012523 : MAJOR APPLIED POLYMER SCIENCE AND TEXTILE TECHNOLOGY
KEYWORDS:

PAKAPHAN PLONGNIRAS: DECOLORIZATION OF REACTIVE BLACK 5 DYE WASTEWATER USING *Pseudomonas* sp.. ADVISOR: ASST. PROF. USA SANGWATANAROJ, Ph.D., CO-ADVISOR: THIDARAT NIMCHUA, Ph.D., 92 pp.

This research used an application of biotechnology for decolorization of reactive dye in wastewater. Forty-nine bacteria (from Thailand Bioresource Research Center (TBRC)) of National Center for Genetic Engineering and Biotechnology) from *Pseudomonas* isolates were preliminary tested on the decolorization of Reactive Black 5 dye solution at a concentration of 100 mg/l, in mineral salt medium (MSM) at 35°C, pH 8 and at static condition. It was found that the isolated of *Pseudomonas aeruginosa* showed the highest decolorization of 54.57% within 24 hours of incubation. Then the isolate was used for decolorization of the after dyeing solution of Reactive Black 5 (diluted to 100 mg/l) containing alkali, in the same MSM and incubation condition, and this decolorization was analyzed in comparison between decolorization of after dyeing solution mixed MSM and decolorization of after dyeing solution mixed water. Results indicated that within 48 hours of incubation, this isolate performed 72.42% higher decolorization in sample containing MSM than in sample containing water. In addition, the study also confirmed the potential of *Pseudomonas aeruginosa* for dye degradation of Reactive Black 5 based on Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and High-performance liquid chromatography (HPLC) analyses. It was found that decolonization of Reactive Black 5 with *Pseudomonas aeruginosa* produced the cleavage of azo group (-N=N-) in the dye structure and transformed it into amino group ($-NH_2$) and also found the occurrence of oxalic acid after 5 days of incubation. After 6 days of incubation, 87.61% decolorization was found.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Department:	Materials Science	Student's Signature .....
Field of Study:	Applied Polymer Science and Textile Technology	Advisor's Signature .....
		Co-Advisor's Signature .....
Academic Year:	2017	

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์อย่างสมบูรณ์ ทั้งนี้ผู้วิจัยได้รับคำแนะนำ รวมถึงแนวทางการแก้ไขปัญหาในการทำงานวิจัย ตลอดจนการเขียนวิทยานิพนธ์ ด้วยความดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดีจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุษา แสงวัฒนาวิโรจน์ และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ดร. ธิดารัตน์ นิ่มเชื้อ ผู้วิจัยจึงขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. มัณฑนา โอภาประกาสิต ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริวรรณ กิตติเนาวรัตน์ และ ดร. นราพร รังสิมันตกุล ที่สละเวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ให้คำแนะนำในการเขียนวิทยานิพนธ์ และแนวคิดซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์

ผู้วิจัยขอขอบคุณนางสาวจุฑามาส สุวรรณประทีป และนางสาวปวีณา ทองเกร็ด ผู้ช่วยนักวิจัยห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีเอนไซม์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และเจ้าหน้าที่ในหน่วยงานทุกท่านที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และที่สำคัญคือการเลี้ยงแบคทีเรีย ซึ่งเป็นความรู้ใหม่ของผู้วิจัย

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคลธนไพศาลที่ให้ความอนุเคราะห์สำหรับข้อมูลต่างๆที่นำมาอ้างอิงในการทำงานวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ เครื่องทดสอบที่ใช้ในการวิจัย รวมถึงเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบคุณพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนและให้กำลังใจผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์ และขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ สำหรับการช่วยเหลือและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฐ

สารบัญรูปภาพ 1

สารบัญแผนภาพ 4

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 การเกิดสีและสีย้อม 4

2.2 สีรีแอกทีฟ (reactive dyes) 5

2.2.1 ประเภทของสีรีแอกทีฟ 5

2.2.2 ลักษณะทั่วไปของโครงสร้างสีรีแอกทีฟ 6

2.3 การย้อมเส้นใยเซลลูโลสด้วยสีรีแอกทีฟ 7

2.4 การย้อมแบบจุ่มอัด-หมัก (pad-batch dyeing) 8

2.5 แหล่งที่มาของน้ำเสียในอุตสาหกรรมฟอกย้อม 11

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

2.6 ลักษณะของน้ำเสียของอุตสาหกรรมฟอกย้อมโดยทั่วไป 13
2.7 การบำบัดน้ำเสีย 14
2.7.1 กระบวนการทางเคมี (chemical process) 14
2.7.2 กระบวนการทางชีววิทยา (biological Process) 14
2.7.3 กระบวนการทางกายภาพ (physical process) 14
2.7.4 กระบวนการทางกายภาพ-เคมี (physical-chemical process) 15
2.8 วิธีการบำบัดน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรม 15
2.8.1 การบำบัดขั้นต้น (primary treatment) 15
2.8.2 การบำบัดขั้นที่สอง (secondary treatment) 16
2.8.3 การบำบัดขั้นที่สาม (tertiary treatment) 17
2.9 แบคทีเรีย (bacteria) 17
2.9.1 นิยามของแบคทีเรีย 17
2.9.2 ขนาดและรูปร่างของแบคทีเรีย 18
2.9.3 ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ 19
2.9.3.1. ประเภทของระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ 19
2.9.3.2. ข้อแตกต่างระหว่างกระบวนการใช้อากาศ และไม่ใช้อากาศ 21
2.9.4 การกำจัดสีโดยใช้เอนไซม์และการดูดซับของจุลินทรีย์ 22
2.9.4.1 ใช้เอนไซม์ในการกำจัดสี 22
2.9.4.2 ใช้จุลินทรีย์ในการดูดซับเพื่อกำจัดสี 22
2.9.5 กลไกการย่อยสลายสีเอโซด้วยแบคทีเรีย 22
2.9.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย 23
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 24
บทที่ 3 การทดลอง 28

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี 28
3.1.1 ผ้าฝ้าย 28
3.1.2 ผงสี 28
3.1.3 แบคทีเรีย 28
3.1.4 สารเคมี 29
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ 29
3.3 วิธีการทดลอง 31
3.3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถกำจัดสี Reactive Black 5 32
3.3.2 การเตรียมสารละลายสีย้อมที่ใช้ในการย้อมสีที่เหลือหลังย้อม 33
3.3.3 การศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดสีย้อมด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ที่คัดเลือกมาจากข้อ 3.3.1 33
3.3.3.1 ประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมของแบคทีเรียที่มีการเติมปริมาณแบคทีเรียตั้งต้นแบบเพียงครั้งเดียว (single addition) และการเติมปริมาณแบคทีเรียแบบหลายครั้ง (multi addition) 34
3.3.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมก่อนและหลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย 35
3.3.4.1 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมหลังการย้อม 35
3.3.4.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมหลังการย้อมที่ผสมกับอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) ก่อนการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย 35
3.3.4.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมหลังการย้อมที่ผสมกับอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) หลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย 35
3.3.4.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมหลังการย้อมที่ผสมกับน้ำก่อนการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย 36

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

3.3.4.5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมหลังการย้อมที่ผสมกับน้ำหลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย โดยไม่ใช้อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย 36
3.3.5 การวิเคราะห์โครงสร้างสีย้อมก่อนและหลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย 36
3.3.5.1 การวิเคราะห์การย่อยสีของแบคทีเรียด้วยเทคนิค FTIR 36
3.3.5.1.1 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสี Reactive Black 5 ด้วยเทคนิค FTIR 36
3.3.5.1.2 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสี Reactive Black 5 ในสารละลายสีผสมกับอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) ก่อนกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค FTIR 37
3.3.5.1.3 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีสี Reactive Black 5 ในสารละลายสี ผสมกับอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) หลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค FTIR 37
3.3.5.2 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสีย้อมหลังกำจัดสีด้วยแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค HPLC 37
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 39
4.1 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถกำจัดสี Reactive Black 5 จากจำนวน 49 สายพันธุ์ในกลุ่มของ *Pseudomonas* sp. 39
4.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดสีย้อมด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ที่คัดเลือกมา 41
4.2.1 ลักษณะทั่วไปของสารละลายสีย้อมหลังการย้อม 41
4.2.2 ประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมของแบคทีเรียที่มีการเติมหัวเชื้อตั้งต้นเพียงครั้งเดียว (single addition) และแบบการเติมหัวเชื้อหลายครั้ง (multi addition) 42
4.2.3 สรุปผลการกำจัดสีในสารละลายสีย้อมด้วยแบคทีเรีย 45
4.3 ผลการกำจัดสีในสารละลายสีย้อมด้วยแบคทีเรียโดยวัดค่าความเข้มข้นของสีในสารละลายสี 46

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

4.3.1 ผลของทำกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายย้อม Reactive Black 5 46

4.3.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมหลังการย้อม 46

4.3.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการกำจัดสารละลายสีย้อมในภาวะที่ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) 47

4.3.4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการกำจัดสารละลายสีย้อมในภาวะที่ผสมกับน้ำ 51

4.3.5 การเปรียบเทียบผลการศึกษาประสทธิภาพของแบคทีเรียในการกำจัดสารละลายสีย้อมในภาวะที่ผสมกับอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย(MSM, mineral salt medium) กับสารละลายสีย้อมที่ผสมน้ำ 53

4.4 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสีหลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย 56

4.4.1.1 ผลการวิเคราะห์ผงสี Reactive Black 5 57

4.4.1.2 ผลการวิเคราะห์สี Reactive Black 5 ผสมกับอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) ก่อนการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย 58

4.4.1.3 ผลการวิเคราะห์สี Reactive Black 5 ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) หลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย 59

4.4.1.4 ผลการวิเคราะห์สี Reactive Black 5 ก่อนและหลังการบ่มในแบคทีเรียเป็นเวลา 6 วัน เพื่อการกำจัดสี 60

4.4.2 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC 61

4.4.2.1 โครมาโตแกรมของสารละลายกรดออกซาลิก อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย และสารละลายสี Reactive Black 5 (ก่อนการกำจัดสี) 61

4.4.2.2 โครมาโตแกรมของสารละลายสี Reactive Black 5 หลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย เป็นเวลา 1-6 วัน 63

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 69

5.1 สรุปผลการทดลอง 69

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

รายการอ้างอิง 87

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 92

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 ในสารละลายสี (ไม่ผ่านการย้อม) ของแบคทีเรียจำนวน 41 สายพันธุ์ จากจำนวน 49 สายพันธุ์ในกลุ่มของ *Pseudomonas* sp. 39

ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมหลังย้อมที่ก่อนและหลังปรับค่าพีเอชเป็น 8 และเจือจางด้วยอาหาร MSM และด้วยน้ำ 47

ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้น blank ของสารละลายสีย้อมที่ผสมกับ MSM ที่วัดได้ในทุกๆวัน 49

ตารางที่ 4.4 ความเข้มข้น blank ของสารละลายสีย้อมที่ผสมกับน้ำที่วัดได้ในทุกๆวัน 52

ตารางที่ 4.5 เลขคลื่นของพีคที่ปรากฏใน IR Spectrum ของผงสี Reactive Black 5 57

ตารางที่ 4.6 เลขคลื่นของพีคที่ปรากฏใน IR Spectrum ของสี Reactive Black 5 ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรียก่อนการกำจัดสี 59

ตารางที่ 4.7 เลขคลื่นของพีคที่ปรากฏใน IR Spectrum ของสี Reactive Black 5 ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรียหลังการกำจัดสี 60

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 ตัวอย่างโครงสร้างสีย้อมรีแอกทีฟ 6

รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาการแทนที่ของนิวคลีโอไฟล์ หรือ cellulosate ion ของเซลลูโลส กับ –Cl บนสี ย้อมรีแอกทีฟ 7

รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสีรีแอกทีฟ 7

รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาการเติม (addition reaction) 8

รูปที่ 2.5 การย้อมสีรีแอกทีฟแบบจุ่มอัด-หมัก 9

รูปที่ 2.6 สูตรและภาวะของการย้อมสี Reactive Black 5 ด้วยวิธีการจุ่มอัด-หมัก 10

รูปที่ 2.7 ขั้นตอนการเตรียมการกำจัดสิ่งสกปรกและการฟอก และการย้อมสีเส้นด้ายสำหรับผ้าถัก 12

รูปที่ 2.8 รูปร่างของแบคทีเรีย 18

รูปที่ 2.9 การเปรียบเทียบสมดุล COD และ พลังงานของกระบวนการบำบัดแบบใช้อากาศและไม่ใช้อากา 21

รูปที่ 3.1 โครงสร้างทางเคมีของสี Reactive Black 5 28

รูปที่ 4.1 สารละลายสีย้อม Reactive Black 5 หลังการย้อม 42

รูปที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 (วัดจากค่า OD) ในสารละลายสี (ผ่านการย้อม) เมื่อบ่มด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* 10%(v/v), 15%(v/v) และ 20%(v/v) ครั้งเดียวในวันแรกของการบ่ม บ่มเป็นเวลา 0-144 ชั่วโมง 43

รูปที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 (วัดจากค่า OD) ในสารละลายสี (ผ่านการย้อม) เมื่อบ่มด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* 20%(v/v) ในวันแรกของการบ่ม และเติมแบคทีเรียเพิ่มในชั่วโมงที่ 24 หรือชั่วโมงที่ 48 ของการบ่มอีก 10%(v/v), 15%(v/v) และ 20%(v/v) 43

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 4.4 ความเข้มข้นของสี Reactive Black 5 ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) ที่ผ่านการกำจัดสีด้วย *Pseudomonas aeruginosa* เป็นเวลา 1-6 วัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 48

รูปที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 ด้วย *Pseudomonas aeruginosa* ที่มีอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) บ่มที่ภาวะหยุดนิ่ง อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-6 วัน 50

รูปที่ 4.6 ความเข้มข้นของสี Reactive Black 5 ผสมน้ำ ที่ผ่านการกำจัดสีด้วย *Pseudomonas aeruginosa* เป็นเวลา 1-6 วัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 51

รูปที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 ของ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ผสมน้ำ บ่มที่ภาวะหยุดนิ่ง อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-6 วัน 52

รูปที่ 4.8 เปรียบเทียบความเข้มข้นสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) กับที่ผสมน้ำ หลังการกำจัดสีด้วย *Pseudomonas aeruginosa* เป็นเวลา 1-6 วัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 53

รูปที่ 4.9 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 ที่ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) และที่ผสมน้ำ หลังการกำจัดสีด้วย *Pseudomonas aeruginosa* เป็นเวลา 1-6 วัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 54

รูปที่ 4.10 ลักษณะสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 ก่อนและหลังบ่มแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียและน้ำเป็นเวลา 1-6 วัน 55

รูปที่ 4.11 ลักษณะผงสีย้อมก่อนและหลังการบ่มเพื่อกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย เมื่อผ่านการทำแห้งเยือกแข็ง 56

รูปที่ 4.12 ลักษณะ FTIR สเปกตรัมแสดงหมู่ฟังก์ชันของผงสี Reactive Black 5 ในช่วงเลขคลื่น 400-4000 cm^{-1} 57

รูปที่ 4.13 ลักษณะ FTIR สเปกตรัมแสดงหมู่ฟังก์ชันของสี Reactive Black 5 ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) ก่อนการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย ในช่วงเลขคลื่น 600-4000 cm^{-1} 58

รูปที่ 4.14 ลักษณะ FTIR สเปกตรัมแสดงหมู่ฟังก์ชันของสี Reactive Black 5 ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) หลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย ในช่วงเลขคลื่น 600-4000 cm^{-1} 59

รูปที่ 4.15 HPLC โครมาโตแกรมของสารละลายกรดออกซาลิก 61

รูปที่ 4.16 HPLC โครมาโตแกรมของอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย MSM 62

รูปที่ 4.17 HPLC โครมาโตแกรมของสารละลายสี Reactive Black 5 ก่อนการกำจัดสี..... 62

รูปที่ 4.18 HPLC โครมาโตแกรมของสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 หลังการกำจัดสีเป็นเวลา 1 วัน..... 63

รูปที่ 4.19 HPLC โครมาโตแกรมของสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 หลังการกำจัดสีเป็นเวลา 2 วัน..... 64

รูปที่ 4.20 HPLC โครมาโตแกรมของสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 หลังการกำจัดสีเป็นเวลา 3 วัน..... 65

รูปที่ 4.21 HPLC โครมาโตแกรมของสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 หลังการกำจัดสีเป็นเวลา 4 วัน..... 66

รูปที่ 4.22 HPLC โครมาโตแกรมของสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 หลังการกำจัดสีเป็นเวลา 5 วัน และของสารละลายกรดออกซาลิก..... 67

รูปที่ 4.23 HPLC โครมาโตแกรมของสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 หลังการกำจัดสีเป็นเวลา 6 วัน..... 68

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญแผนภาพ

หน้า

แผนภาพที่ 3.1 วิธีการทดลองทั้งหมด 31

แผนภาพที่ 3.2 การเติมปริมาณแบคทีเรียตั้งต้นแบบเพียงครั้งเดียวและแบบหลายครั้ง 34

แผนภาพที่ 4.1 แสดงเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 ด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ที่ได้ผลดีที่สุดในการศึกษาปริมาณและวิธีการใช้แบคทีเรียที่เหมาะสมเมื่อบ่มเป็นเวลาทั้งหมด 6 วัน..... 45

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

สีสังเคราะห์เป็นสารเคมีที่เข้ามามีบทบาทสำคัญต่อชีวิตประจำวันของมนุษย์ ซึ่งสิ่งของเครื่องใช้เกือบทุกชนิดมักมีสีสังเคราะห์เป็นส่วนประกอบ ดังนั้นในปัจจุบันทั่วโลกจึงมีการผลิตสีสังเคราะห์ในปริมาณที่สูงมาก โดยอุตสาหกรรมสิ่งทอเป็นอุตสาหกรรมที่ใช้สีย้อมมากที่สุด โดยสีเอโซเป็นสีกลุ่มที่นิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างแพร่หลายทั่วโลก เช่น อุตสาหกรรมสิ่งทอ อาหาร เครื่องสำอาง และกระดาษ เป็นต้น เนื่องจากมีราคาถูกและผลิตได้ง่ายในปริมาณมาก มีความเสถียรและมีหลายเฉดสีให้เลือกในการใช้งานได้อย่างเหมาะสม [1]

สีเอโซเป็นสีที่มีโครงสร้างเป็นสารประกอบแอโรแมติกที่มีหมู่เอโซ (-N=N-) 1 หมู่หรือมากกว่าในโครงสร้าง [2] ซึ่งอุตสาหกรรมสิ่งทอเป็นอุตสาหกรรมที่ใช้สีชนิดนี้มากที่สุด สีย้อมสามารถปนเปื้อนอยู่ในน้ำเสียของโรงงานได้ตั้งแต่ร้อยละ 2-50 ทำให้น้ำผิวดินและน้ำใต้ดินบริเวณโดยรอบโรงงานย้อมผ้ามีการปนเปื้อนสีย้อม ในปี ค.ศ. 1978 พบว่าสีย้อมประมาณร้อยละ 2 (9,000 ตัน) ของปริมาณที่ผลิตขึ้นในกระบวนการผลิตสี (450,000 ตัน) ถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม [3] เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการประมาณการว่าในแต่ละปีทั่วโลกมีการปนเปื้อนของสีย้อมในน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมประมาณ 280,000 ตัน [4] และสีรีแอกทีฟเป็นหนึ่งในกลุ่มของสีเอโซที่ใช้มากในอุตสาหกรรมสิ่งทอ สีชนิดนี้มีความสามารถในการละลายน้ำได้สูงและมีหมู่รีแอกทีฟที่สามารถสร้างพันธะโคเวเลนซ์ระหว่างสีย้อมและเส้นใย [5, 6]

จากอดีตจนถึงปัจจุบันมีการศึกษาการใช้วิธีทางกายภาพ และวิธีทางเคมี ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนสีย้อมอย่างแพร่หลาย [7-9] ไม่ว่าจะเป็นการใช้เทคนิคการตกตะกอน (coagulation) ร่วมกับการจับตัวเป็นก้อน (flocculation) การใช้เทคนิคการดูดซับ (adsorption) การใช้แผ่นเมมเบรน (membrane technology) และการที่ใช้สารออกซิไดส์ที่รุนแรงเช่น H_2O_2 (ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์), TiO_2 (ไททาเนียมไดออกไซด์), ZnO (ซิงค์ออกไซด์) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามการใช้เทคโนโลยีเหล่านี้มักมีข้อจำกัดหรือข้อเสียเมื่อนำมาดำเนินการในระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรม ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการผลักดันให้มีการใช้เทคโนโลยีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อลดผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นต่อสิ่งแวดล้อม รวมทั้งลดการใช้น้ำในกระบวนการผลิต ลดการปล่อยน้ำเสีย [10] และลดการกระทำความผิดตามข้อบังคับของกฎหมายในเรื่องการปล่อยน้ำเสียของโรงงานออกสู่สิ่งแวดล้อม เนื่องจากตลอดระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา รัฐบาลในหลายประเทศได้ออกข้อบังคับที่เข้มงวดเกี่ยวกับการปล่อยน้ำเสียออกสู่สิ่งแวดล้อมของโรงงานอุตสาหกรรม โดยเฉพาะ

อย่างยิ่งในประเทศที่พัฒนาแล้ว ซึ่งแรงกดดันทางกฎหมายนี้ จะทำให้โรงงานอุตสาหกรรมใช้กระบวนการบำบัดน้ำเสียที่มีสีย้อมปนเปื้อน เพื่อทำให้น้ำเสียผ่านมาตรฐานก่อนปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมีหลายวิธีที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย ถึงแม้ว่าในปัจจุบันมีหลายวิธีที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีทางชีวภาพถือว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด รวมทั้งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและสามารถนำไปสู่การย่อยสลายสีย้อมได้อย่างสมบูรณ์ จากการศึกษางานวิจัยต่างๆ พบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดเช่น รา แบคทีเรีย ยีสต์ และสาหร่ายมีความสามารถในการย่อยสลายสีเอโซได้อย่างสมบูรณ์ [11] การลดความเข้มสีและการย่อยสลายสีด้วยแบคทีเรียได้รับความสนใจในการศึกษาอย่างกว้างขวาง เนื่องจากแบคทีเรียมีวงจรชีวิตสั้น สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งแบคทีเรียยังสามารถย่อยสลายสีเอโซได้อย่างมีประสิทธิภาพในระยะเวลาอันสั้นเมื่อเปรียบเทียบการใช้จุลินทรีย์ชนิดอื่น [10, 12] ทำให้การกำจัดสีย้อมด้วยแบคทีเรียเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและแพร่หลาย ต้นทุนต่ำ และเป็นกระบวนการไม่ซับซ้อน

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำแบคทีเรียมาใช้ในการกำจัดสีในน้ำเสียสีย้อมรีแอกทีฟ เพราะเป็นวิธีทางชีวภาพที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี และเสียค่าใช้จ่ายในการดำเนินการไม่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางเคมี โดยแบคทีเรียจะทำลายพันธะเอโซที่อยู่ในโครงสร้างของสีรีแอกทีฟให้กลายเป็นสารแอมีน และย่อยสลายสารแอมีนเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งอาหาร เช่น ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการเจริญเติบโต โดยในงานวิจัยนี้จะคัดเลือกแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. ที่มีศักยภาพกำจัดสีย้อมรีแอกทีฟที่มีหมู่เอโซในน้ำเสีย รวมทั้งศึกษาภาวะ ประสิทธิภาพ และกลไกการกำจัดสีในน้ำเสียของแบคทีเรียที่คัดเลือกมาดังกล่าวเพื่อใช้เป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียจากสีย้อมในอุตสาหกรรมสิ่งทอต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดสี Reactive Black 5 ในน้ำเสียที่ได้จากการย้อมผ้าได้สูงที่สุด
2. เพื่อศึกษาภาวะการเติมปริมาณแบคทีเรีย ประสิทธิภาพ และโครงสร้างของสีหลังการกำจัด จากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1) คัดเลือกแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดสี Reactive Black 5 ที่อยู่ในน้ำที่ได้จากการย้อมผ้า
2) ศึกษาปริมาณแบคทีเรีย จำนวนครั้งในการเติมปริมาณแบคทีเรีย และช่วงเวลาในการเติมปริมาณแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อกระบวนการกำจัดสีย้อมมากที่สุด

3) ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย ในการกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 โดยใช้เครื่อง UV-Vis spectrophotometer เป็นเครื่องมือวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสีย้อมน้ำสีที่ได้จากการย้อมทั้งก่อนและหลังการกำจัดสี

4) ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสีย้อม Reactive Black 5 ก่อนและหลังการกำจัดสีด้วยเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้เทคนิค FT-IR spectroscopy และ HPLC choromatography

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 และกรรมวิธีในการใช้แบคทีเรียดังกล่าวในการกำจัดสีย้อม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

น้ำเป็นสิ่งที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต เพราะว่าน้ำเป็นส่วนประกอบหลักสำคัญของร่างกายสิ่งมีชีวิต ทำให้กลไกต่างๆภายในร่างกายสิ่งมีชีวิตดำเนินไปได้อย่างเป็นปกตินอกจากนี้ยังเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิต เช่น สัตว์น้ำต่างๆ เป็นต้น ซึ่งถ้าหากเกิดมลพิษและสิ่งเจือปนปนเปื้อนในน้ำ จะทำให้เกิดผลกระทบตามมามากมาย เช่น ปัญหาความเน่าเสียของแหล่งน้ำ และในปัจจุบันอุตสาหกรรมสิ่งทอก็เป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมที่ทำให้เกิดปัญหาความเน่าเสียของของแหล่งน้ำ คือ การปล่อยน้ำเสียลงสู่สิ่งแวดล้อม เพราะในปัจจุบันนั้นมีการผลิตสีสังเคราะห์ในปริมาณที่สูงมาก เนื่องมาจากสิ่งของเครื่องใช้เกือบทุกชนิดของมนุษย์มักเกี่ยวข้องกับสีสังเคราะห์ ซึ่งในกระบวนการผลิตสิ่งทอนี้ต้องใช้น้ำเป็นปริมาณมากตลอดกระบวนการผลิต จึงมีการปล่อยน้ำเสียซึ่งจะประกอบด้วยสารเคมีต่างๆหลายๆชนิด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะกำจัดสารเคมีเหล่านี้ในน้ำทิ้งอุตสาหกรรมก่อนที่จะปล่อยลงสู่แหล่งแม่น้ำ และการกำจัดสารเคมีเหล่านี้มีหลายวิธีด้วยกัน เช่น วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ สำหรับงานวิจัยนี้จะใช้วิธีทางชีวภาพเพราะเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เป็นการนำเอาจุลินทรีย์มากำจัดสิ่งเจือปนในน้ำเสียโดยเฉพาะสารคาร์บอนอินทรีย์ ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส [9] โดยความสกปรกเหล่านี้จะถูกใช้เป็นอาหารและเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์เพื่อการเจริญเติบโต ทำให้น้ำเสียมีค่าความสกปรกลดลง ซึ่งถ้าสามารถที่จะแก้ไขปัญหาน้ำเสียไปจากประเทศได้ก็จะทำให้ประชาชนในประเทศมีความเป็นอยู่ที่ดีขึ้น รวมถึงสิ่งมีชีวิตภายในน้ำก็มีโอกาสในการรอดชีวิตที่สูงขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.1 การเกิดสีและสีย้อม

สีที่ปรากฏออกมาทำให้สายตาคนปกติมองเห็นได้นั้นเกิดมาจากการจัดเรียงตัวของอะตอมและหมู่ฟังก์ชันภายในโมเลกุลของสีย้อม เรียกว่า หมู่โครโมฟอร์ (chromophores) ซึ่งได้แก่ [13]

- หมู่ไนโตรเจน (nitro groups)
- หมู่เอโซ (azo groups)
- หมู่คาร์บอนิล (carbonyl groups)
- อนุพันธ์ของแอลคิลแอมโมเนียม (alkyl ammonium derivatives)

หมู่โครโมฟอร์ต่างๆเหล่านี้เป็นตัวไปเพิ่มสีให้แก่สารประกอบแอโรแมติก โดยดูดกลืนแสงสีขาวไว้บางแถบแสง และปล่อยออกมาบางแถบแสง ทำให้มนุษย์มองเห็นสีย้อมมีโทนสีที่แตกต่างกันออกไป

สีย้อมโดยทั่วไปนอกจากมีหมู่โครโมฟอร์แล้ว ยังมีอีกหมู่หนึ่ง ได้แก่ หมู่ออกโซโครม (auxochromes) ได้แก่ –OH, $-NH_2$, -NHR, $-NR_2$, $-SO_3$ และ –COOH ซึ่งอาจเป็นหมู่ที่ทำให้สีสามารถละลายน้ำหรืออาจเป็นหมู่ที่ทำปฏิกิริยากับเส้นใย โดยทั่วไปหมู่โครโมฟอร์และหมู่ออกโซโครมจะเชื่อมต่อกันเรียกรวมกันว่า โครโมเจน (chromogen) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการจำแนกกลุ่มของสีย้อมตามโครงสร้างทางเคมี

2.2 สีรีแอกทีฟ (reactive dyes)

สีรีแอกทีฟมีโครงสร้างพิเศษกว่าสีย้อมประเภทอื่นๆ คือ หมู่ทำปฏิกิริยา (reactive groups) เพิ่มขึ้นมาจากส่วนที่ให้สี (chromophores) และส่วนที่ช่วยทำให้สีละลายน้ำ (water soluble groups) ตัวอย่างโครงสร้างของสีรีแอกทีฟที่ชื่อว่า Procion Blue MX-R ซึ่งเป็นสีรีแอกทีฟในยุคต้นๆจะมีหมู่ anthraquinone เป็นส่วนให้สีที่ละลายน้ำด้วยหมู่ sulfonate และมีหมู่ dichlorotriazine (DCT) หรือหมู่ vinyl sulfone ที่สามารถทำปฏิกิริยากับเส้นใย กล่าวคือถ้าสี Procion Blue MX-R นั้นไม่มีหมู่ DCT ก็จะเปรียบเสมือนสีน้ำเงินธรรมดาที่แค่ละลายน้ำแต่ย้อมไม่ติดผ้าใยเซลลูโลส ซึ่งหมู่ DCT ของสีนอกจากจะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของเส้นใยเซลลูโลสในภาวะด่างได้เป็นสีที่ผนึกติดกับเส้นใยด้วยพันธะโคเวเลนส์แล้ว ก็ยังสามารถทำปฏิกิริยากับน้ำได้เป็นสีที่ถูกไฮโดรไลซ์ (hydrolyzed reactive dye) ได้ด้วยเช่นกัน เนื่องจากว่าน้ำก็มีหมู่ไฮโดรไลซิลเช่นกัน ดังนั้นการย้อมสีรีแอกทีฟบนเส้นใยเซลลูโลสจำเป็นต้องเติมเกลือเพื่อผลักให้สีเข้าใกล้เส้นใยมากที่สุดก่อนที่จะเติมด่างลงไปในน้ำย้อมสีเพื่อสีจะได้ทำปฏิกิริยากับเส้นใยได้มากกว่าที่น้ำจะทำปฏิกิริยากับสีจนเกิดเป็นสีที่ถูกไฮโดรไลซ์ [14]

2.2.1 ประเภทของสีรีแอกทีฟ

สีรีแอกทีฟเป็นสีที่ใช้มากที่สุดในอุตสาหรรมฟอกย้อมสิ่งทอ เป็นสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างซับซ้อน ละลายน้ำได้ดี และย้อมเส้นใยเซลลูโลสได้ดี โดยจะแสดงประจุลบเมื่ออยู่ในน้ำย้อมที่มีฤทธิ์เป็นด่าง สามารถแบ่งสีรีแอกทีฟตามความว่องไวของการเกิดปฏิกิริยาได้เป็น 2 กลุ่ม คือ [14]

- สีรีแอกทีฟที่ไม่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (low reactivity dyes)
- สีรีแอกทีฟที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (high reactivity dyes)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2.2 ลักษณะทั่วไปของโครงสร้างสีรีแอกทีฟ

ประกอบด้วย 4 องค์ประกอบหลัก คือ [15, 16]

1. ส่วนให้สี (chromophores)

2. ส่วนที่ละลายน้ำ (water soluble group)

3. ส่วนที่เชื่อมต่อระหว่างส่วนให้สีกับส่วนทำปฏิกิริยา (linking group)

4. ส่วนทำปฏิกิริยา (reactive group)

1) ส่วนให้สี (chromophore) เป็นส่วนประกอบหลักในโครงสร้างสี ซึ่งหมู่ทางเคมีที่มักพบ เช่น โมโนเอโซ พอลิเอโซ ไดเอโซ ทาโลไซยานีน และแอมิโนแอนทราควิโนน

2) ส่วนที่ละลายน้ำ (water soluble group) เป็นส่วนที่ช่วยให้สีละลายน้ำได้ดีขึ้น หมู่ทางเคมีที่มักพบ คือ หมู่ซัลโฟเนต (-SO_3H หรือ –SO_3Na)

3) ส่วนที่เชื่อมต่อระหว่างส่วนให้สีกับส่วนทำปฏิกิริยา (linking group) เป็นส่วนที่เชื่อมระหว่างส่วนที่ให้สีกับส่วนทำปฏิกิริยา มีหมู่ที่นิยมใช้ คือ

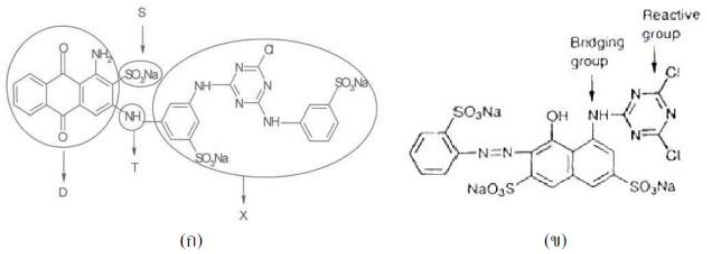
- หมู่แอมิโน (amino group; NH_2)

- หมู่แอลคิลแอมิโน (alkyl amino group; -NR_2)

- ออกไซด์และซัลไฟด์ (oxide and sulfide; -O-, -S-)

4) ส่วนทำปฏิกิริยา (reactive group) เป็นส่วนที่สำคัญที่สุดของสีรีแอกทีฟ เพราะสีจะเกาะติดอยู่บนเส้นใยได้มากน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาของหมู่เคมีในส่วนนี้ สีรีแอกทีฟที่มีขายอยู่ในท้องตลาดมีความหลากหลายในเรื่องของความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยากับเส้นใย ตั้งแต่อุณหภูมิ 30-95 องศาเซลเซียส ตัวอย่างของส่วนที่ทำปฏิกิริยา เช่น Cl, F

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



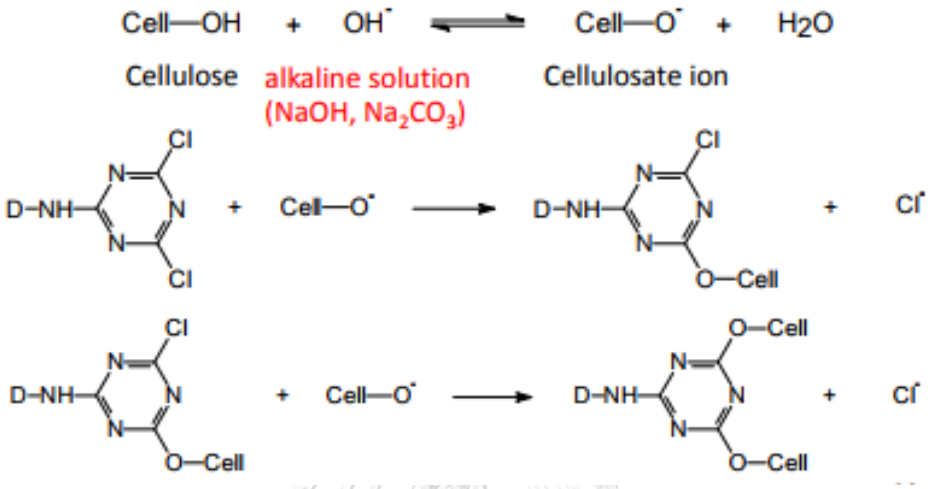
(ก) (ข)

รูปที่ 2.1 ตัวอย่างโครงสร้างสีย้อมรีแอกทีฟ
(ก) Reactive Black 5 (ข) โครงสร้างสีย้อม Reactive Red 1 [15]

2.3 การย้อมเส้นใยเซลลูโลสด้วยสีรีแอกทีฟ

การแบ่งประเภทของสีรีแอกทีฟ สามารถแบ่งตามประเภทของปฏิกิริยาระหว่างสีกับเส้นใยเซลลูโลสภายใต้ภาวะด่าง แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ [17]

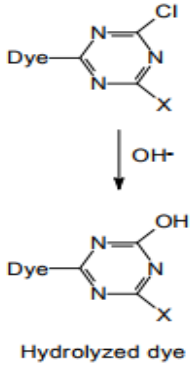
1. ปฏิกิริยาการแทนที่ของนิวคลีโอไฟล์ (nucleophilic substitution)



หมายเหตุ D คือ Dye

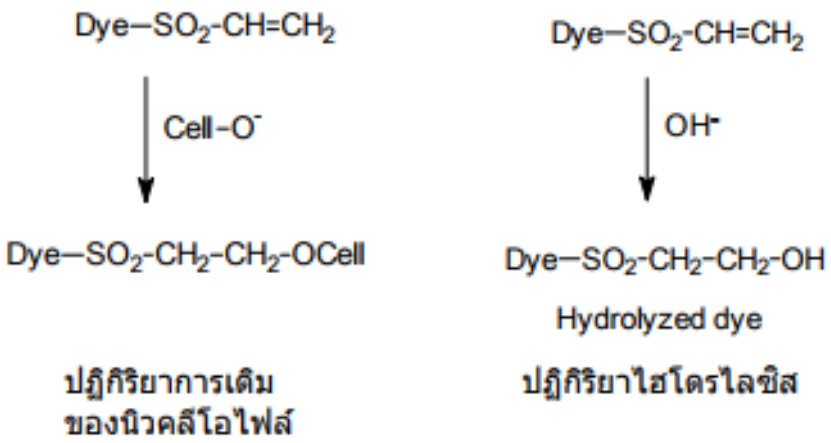
รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาการแทนที่ของนิวคลีโอไฟล์ หรือ cellulosate ion ของเซลลูโลส กับ –Cl บนสีย้อมรีแอกทีฟ [17]

ปฏิกิริยาที่เกิดแข่งขันกับปฏิกิริยาการแทนที่ของนิวคลีโอไฟล์ คือ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสีรีแอกทีฟ (hydrolyzed reactive dye) เกิดเป็นโมเลกุลที่ไม่สามารถทำปฏิกิริยาสร้างพันธะโคเวเลนซ์กับเซลลูโลสหลังการย้อม จึงต้องล้างเอาสีที่ถูกไฮโดรไลซ์ส่วนนี้ออกจากเส้นใยเซลลูโลส



รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสีรีแอกทีฟ [17]

2. ปฏิกิริยาการเติม (addition reaction)



รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาการเติม (addition reaction) [17]

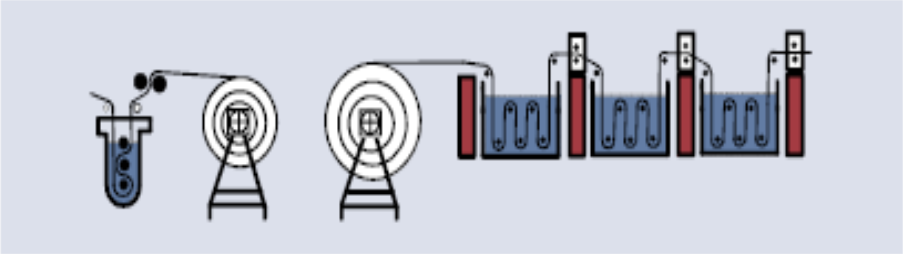
2.4 การย้อมแบบจุ่มอัด-หมัก (pad-batch dyeing)

การย้อมแบบจุ่มอัด-หมัก เป็นเทคนิคที่ลงทุนต่ำที่สุดในการย้อมสีเส้นใยเซลลูโลสแบบเย็น (cold dyeing) จึงเหมาะกับการย้อมสีรีแอกทีฟที่มีความว่องไวต่อปฏิกิริยามาก [18]

การย้อมแบบจุ่มอัด สามารถทำได้โดยเอาผ้าจุ่มลงไปในอ่างที่มีสีรีแอกทีฟและด่าง แล้วใช้ลูกกลิ้งรัดสารละลายสีย้อมให้อยู่บนผ้า ประมาณ 60-80% ต่อน้ำหนักผ้า (%wet pick up) จากนั้นห่อผ้าด้วยแผ่นพลาสติกเพื่อกันน้ำระเหยออก และไม่ให้ด่างทำปฏิกิริยากับคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ แล้วเก็บหรือหมักผ้าไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ถึง 45 ชั่วโมง (ส่วนใหญ่ 24 ชั่วโมง) ซึ่งขึ้นอยู่กับความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสีย้อมกับเส้นใยบนผ้า หลังจากนั้นล้างผ้าด้วยน้ำเย็นหรือน้ำร้อนก็ได้ เทคนิคนี้สามารถใช้ย้อมผ้าจากใยผสมพอลิเอสเทอร์กับฝ้ายได้

รูปที่ 2.5 การย้อมสีรีแอกทีฟแบบจุ่มอัด-หมัก [18]

รูปนี้ 2.6 แสดงรายละเอียดการย้อมสีรีแอกทีฟแบบจุ่มอัด-หมักของโรงงาน ซึ่งทางโรงงานจะใช้วิธีนี้ในการย้อมสี ซึ่งจะประกอบด้วยรายละเอียดต่างๆ เช่น ข้อมูลในส่วนของการเติมสารเคมีปริมาณต่างๆลงไปในการย้อมสี



รูปที่ 2.6 สูตรและภาวะของการย้อมสี Reactive Black 5 ด้วยวิธีการจุ่มอัด-หมัก [19]

Padding [19]

x	g/l	Reactive Black 5
1-2	g/l	ALBAFLOW CONTI
2	g/l	ALBATEX DBS
20	ml/l	soda ash
4-16	ml/l	caustic soda 36°Be´(66° Tw)

Padding temperature 20-30°C

Liqour pick up 60-80%

Fixation 12-24 hours at 25°C

Required amount of alkali

Reactive Black 5	g/l	up to 10	20	30	40	50	60	>70
Soda ash	ml/l	10	20	20	20	20	20	20
Caustic soda	ml/l	4	6	8	10	12	14	16

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.5 แหล่งที่มาของน้ำเสียในอุตสาหกรรมฟอกย้อม

แหล่งที่มาของน้ำเสียในโรงงานฟอกย้อมสิ่งทอ นอกจากจะเกิดขึ้นจากน้ำที่ใช้ในการกระบวนการผลิตแล้ว ยังมีน้ำเสียที่เกิดจากน้ำหล่อเย็น น้ำที่ใช้ในหม้อไอน้ำ ฯลฯ ซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้ [20]

1. น้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิต ได้แก่ น้ำที่ใช้ในการฟอกย้อม ไม่ว่าจะเป็นขั้นตอนการเตรียมผ้าหรือเส้นด้ายก่อนย้อม ขั้นตอนการย้อม พิมพ์และตกแต่งสำเร็จ ซึ่งน้ำที่ใช้ในส่วนนี้อาจมีการระเหยไปบ้างในระหว่างขั้นตอนการผลิต แต่ส่วนใหญ่จะถูกปล่อยออกมาเป็นน้ำเสียภายหลังการผลิต ดังรูปที่ 2.7

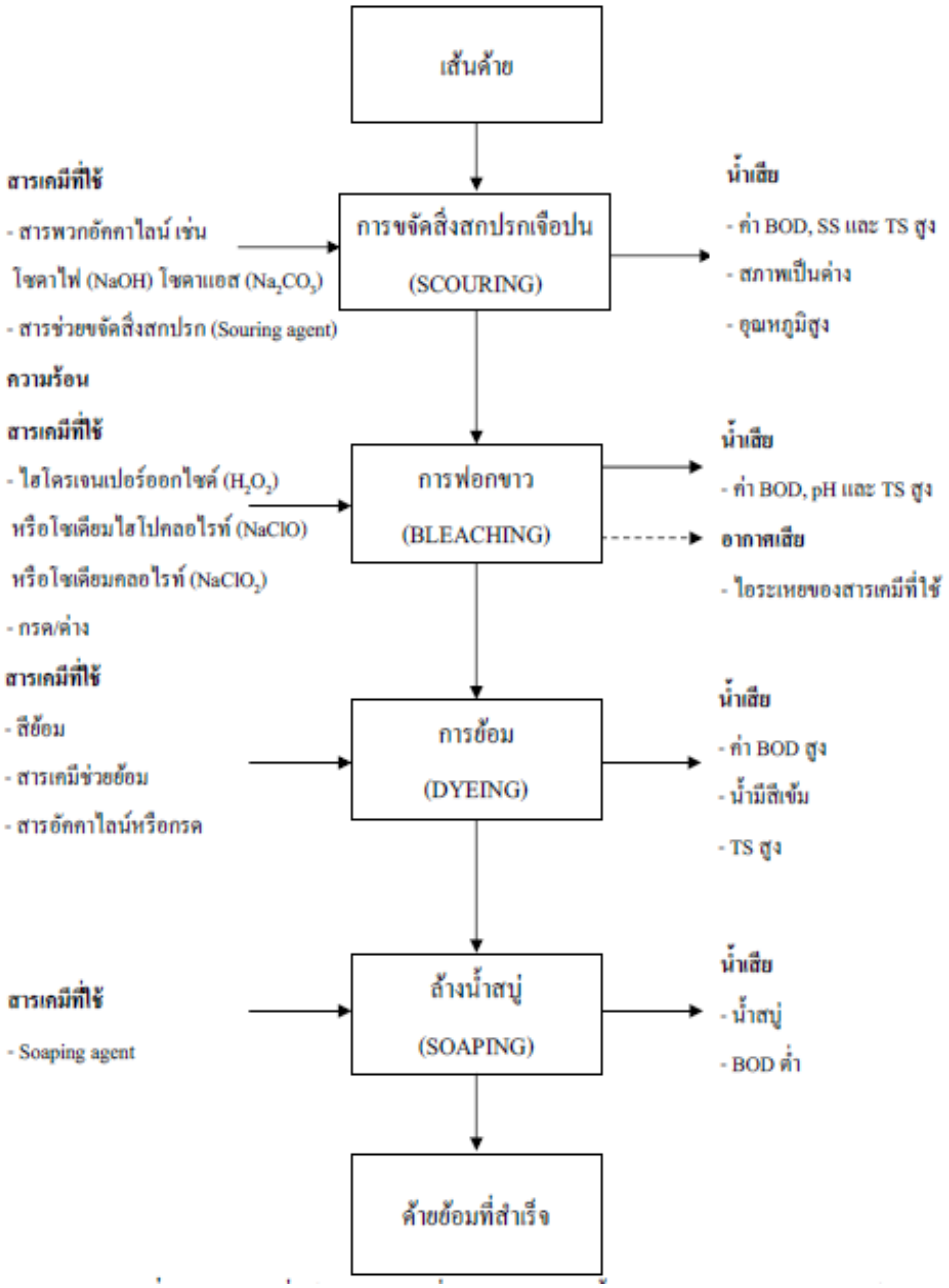
2. น้ำที่ใช้ในหม้อไอน้ำ มักจะมีการอาศัยไอน้ำเป็นตัวให้ความร้อนแก่น้ำที่ใช้ในกระบวนการและเป็นตัวให้ความร้อนในตู้อบไอน้ำ ถ้าไอน้ำที่ใช้ถูกปล่อยให้เย็นลงและกลั่นตัวในท่อไอน้ำก็จะได้น้ำที่สะอาดสามารถนำกลับไปใช้ใหม่ได้ แต่ถ้าไอน้ำถูกส่งเข้าไปให้ความร้อนแก่สารละลายสีย้อมโดยตรงก็จะเป็นการเพิ่มปริมาตรของสารละลายสีย้อม และจะถูกรวมเป็นน้ำเสียในที่สุด

3. น้ำที่ใช้ในการหล่อเย็น มีบ่อยครั้งที่ทางโรงงานจำเป็นต้องลดอุณหภูมิของสารละลายสีย้อมลงในเวลาอันสั้น ซึ่งจะทำได้โดยอาศัยการใช้น้ำหล่อเย็น ซึ่งน้ำหล่อเย็นนี้ส่วนใหญ่จะเป็นน้ำสะอาดสามารถนำกลับไปใช้ใหม่ได้

4. น้ำที่ใช้ในการล้างเครื่องจักรและทำความสะอาดโรงงาน ซึ่งในบางกรณีอาจเป็นน้ำเสียที่มีความสกปรกสูงมากด้วย เช่น น้ำล้างถังเตรียมสีย้อม เป็นต้น

5. น้ำเสียจากแหล่งอื่น เช่น น้ำใช้ของคนงาน น้ำจากโรงอาหารและห้องน้ำ เป็นต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 2.7 ขั้นตอนการเตรียมการกำจัดสิ่งสกปรกและการฟอก และการย้อมสีเส้นด้ายสำหรับผ้าถัก [20]

2.6 ลักษณะของน้ำเสียของอุตสาหกรรมฟอกย้อมโดยทั่วไป

ลักษณะของน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อมสิ่งทอมีลักษณะดังต่อไปนี้ [21]

1. มีปริมาณสารอินทรีย์สูง ซึ่งมีสาเหตุจากแป้ง สีย้อม กรดแอซิติก เส้นใยและเส้นด้ายที่ปนออกมาจากกระบวนการเตรียมการย้อมและการตกแต่งสำเร็จ นอกจากนี้แล้วยังอาจเกิดจากสบู่ ไขมัน น้ำมัน ซึ่งจะเป็นฝ้าคลุมผิวน้ำ และสารทำความสะอาดซึ่งมีลักษณะเป็นฟอง โดยทั่วไปแล้วน้ำเสียนี้มักมีค่าบีโอดี (biochemical oxygen demand, BOD) ประมาณ 100-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าซีโอดี (chemical oxygen demand, COD) ประมาณ 500-1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. มีค่าความเป็นกรดและด่าง (pH) และค่าสภาพด่าง (alkalinity) สูง โดยมีค่า pH ประมาณ 9-12 และมีค่าสภาพความเป็นด่างประมาณ 300-900 มิลลิกรัมหินปูนต่อลิตร สารที่ทำให้น้ำเสียฟอกย้อมมีค่า pH และค่าสภาพด่างสูง ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และโซเดียมคาร์บอเนต ซึ่งมีการใช้ในขั้นตอนการกำจัดสิ่งสกปรก (scouring)

3. มีอุณหภูมิของน้ำเสียสูง โดยทั่วไปจะมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะในขั้นตอนที่มีการใช้ความร้อนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น ขั้นตอนการกำจัดสิ่งสกปรก ขั้นตอนการย้อม และขั้นตอนการตกแต่งสำเร็จ

4. มีปริมาณทีดีเอสหรือของแข็งละลายน้ำสูง (total dissolved solid, TDS) ส่วนใหญ่เป็นการละลายของแข็งพวกเกลือโซเดียมและกรดต่างๆ

5. มีความเข้มสีสูง เนื่องจากในการย้อมสีสิ่งทอ สิ่งทอจะดูดซึมสีย้อมเพียงบางส่วนเท่านั้น ดังนั้นจึงมีสีย้อมหลงเหลืออยู่ในสารละลายสีย้อม และจะถูกปล่อยออกมากับน้ำเสียในที่สุด ปริมาณของสีย้อมในน้ำเสียจะแตกต่างกันไปตั้งแต่ร้อยละ 5-50 ขึ้นอยู่กับประเภทของสีย้อมที่ใช้

6. มีโลหะหนักเจือปน เนื่องจากการนำสีย้อมบางชนิดที่มีโลหะหนัก เช่น ทองแดง ตะกั่ว โครเมียม และสังกะสี เป็นองค์ประกอบมาใช้ย้อมสิ่งทอ

7. มีค่าทีเอสเอสหรือของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (total suspended solid, TSS) โดยเฉพาะเศษเส้นใยที่หลุดออกมา ซึ่งเศษเส้นใยนี้หากมีปริมาณมาก อาจทำให้เกิดปัญหาการอุดตันของน้ำเสียในเครื่องย้อมได้

8. มีการปนเปื้อนของสารเคมีหลายประเภท ส่วนใหญ่ที่คงเหลืออยู่ในสารละลายสีย้อมหรือน้ำซักล้าง และถูกปล่อยปนออกมากับในน้ำเสีย

2.7 การบำบัดน้ำเสีย

การบำบัดน้ำเสีย หมายถึง การกำจัดหรือทำลายสิ่งปนเปื้อนในน้ำเสียให้หมดไป หรือเหลือน้อยที่สุดให้ได้มาตรฐานที่กำหนดและไม่ทำให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม น้ำเสียจากแหล่งต่างกันจะมีสมบัติไม่เหมือนกัน ดังนั้นกระบวนการบำบัดน้ำจึงมีหลายวิธี โดยระบบบำบัดน้ำเสียทั่วไปมี 4 วิธี ดังต่อไปนี้ [22]

2.7.1 กระบวนการทางเคมี (chemical process)

เป็นวิธีการบำบัดน้ำเสียโดยการแยกสารต่างๆ หรือสิ่งปนเปื้อนในน้ำเสียที่บำบัด เช่น โลหะหนัก สารพิษ สภาพความเป็นกรด ด่างสูงๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ ด้วยการเติมสารเคมีต่าง ๆ ลงไปเพื่อให้เข้าไปทำปฏิกิริยาเพื่อแยกสาร แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ การเติมสารเคมีลงในน้ำเสียจะทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและวิธีนี้จะมีค่าใช้จ่ายสำหรับสารเคมีค่อนข้างสูง ดังนั้นกระบวนการทางเคมีจะเลือกใช้ก็ต่อเมื่อไม่สามารถบำบัดน้ำเสียได้ด้วยกระบวนการทางกายภาพหรือทางชีวภาพ

2.7.2 กระบวนการทางชีววิทยา (biological Process)

กระบวนการทางชีววิทยา เป็นการอาศัยหลักการใช้จุลินทรีย์ต่างๆ ย่อยสลายเปลี่ยนสารอินทรีย์เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และแอมโมเนีย เป็นการบำบัดน้ำเสียที่ดีที่สุดในแง่ของการลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสีย [24] แต่หลักการนี้ต้องเลือกภาวะแวดล้อมให้เหมาะกับการทำงานของจุลินทรีย์ ที่สัมพันธ์กับปริมาณของจุลินทรีย์ และเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย แบคทีเรียใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์สามารถแยกออกได้เป็น 2 ประเภท คือ แบคทีเรียที่ต้องใช้ออกซิเจน (aerobic bacteria) และแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria) ในการย่อยสลาย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.7.3 กระบวนการทางกายภาพ (physical process)

กระบวนการทางกายภาพ เป็นการบำบัดน้ำเสียอย่างง่ายซึ่งจะแยกของแข็งที่ไม่ละลายน้ำออก วิธีนี้จะแยกตะกอนได้ประมาณ 50-65% และแยกความสกปรกในรูปของสารอินทรีย์ (BOD) ประมาณ 20-30% เท่านั้น วิธีการแยกของแข็งที่ไม่ละลายน้ำมีหลายวิธี เช่น การดักด้วยตะแกรง (screening) เป็นการแยกเศษขยะต่าง ๆ ที่มากับน้ำเสีย เช่น เศษไม้ ถุงพลาสติก กระดาษ ตะแกรงมีหลายขนาด การดักด้วยตะแกรงจึงเป็นการแยกขั้นตอนแรกในการบำบัดน้ำเสีย การตัดย่อย (combination) คือ การใช้เครื่องตัดทำลายเศษขยะขนาดใหญ่ให้มีขนาดเล็กลง การกวาด (skimming) เป็นการกำจัดน้ำมันและไขมันโดยการดักหรือกวาดออกจากน้ำเสีย การทำให้ลอย (floating) จะใช้กับตะกอนที่มีความถ่วงจำเพาะน้อยกว่าน้ำ การตกตะกอน (sedimentation) เป็น

การแยกตะกอนออกจากน้ำเสียโดยอาศัยหลักการเรื่องแรงโน้มถ่วง ซึ่งจะใช้กับตะกอนที่มีความถ่วงจำเพาะมากกว่าน้ำ

2.7.4 กระบวนการทางกายภาพ-เคมี (physical-chemical process)

เป็นกระบวนการที่ต้องมีอุปกรณ์ช่วยมากกว่ากระบวนการที่กล่าวมา ซึ่งกระบวนการนี้จะใช้ในขั้นตอนสุดท้ายในการบำบัดน้ำเสีย ที่ผ่านกระบวนการในขั้นตอนอื่นแล้ว ตัวอย่างของกระบวนการทางกายภาพ-เคมี เช่น

- การดูดซับด้วยถ่าน (carbon adsorption) วิธีการนี้ใช้ผงถ่านหรือคาร์บอนเป็นตัวดูดซับสารเจือปนที่ละลายอยู่ในน้ำเสีย

- การแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange) วิธีการนี้อาศัยหลักการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างสารปนเปื้อนในน้ำเสียกับตัวกลางที่บรรจุสารต่างๆซึ่งมีทั้งประจุบวกและประจุลบ

2.8 วิธีการบำบัดน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรม

ขั้นตอนการบำบัดน้ำเสีย โดยทั่วไปการบำบัดน้ำเสียแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นดังนี้ [21]

2.8.1 การบำบัดขั้นต้น (primary treatment)

เป็นขั้นตอนการแยกสิ่งสกปรกที่มีขนาดใหญ่ ไม่ละลายน้ำออกจากน้ำ

- การกำจัดของแข็งแขวนลอยด้วยตะแกรง

ตะกอนแขวนลอยขนาดใหญ่ เช่น เศษผ้า เศษเส้นด้าย และเส้นใยต่างๆ อาจทำความเสียหายให้กับเครื่องสูบน้ำ ซึ่งการกำจัดของแข็งแขวนลอยเหล่านี้ส่วนใหญ่จะใช้ตะแกรง ซึ่งมีอยู่ 2 แบบ คือ ตะแกรงหยาบ และตะแกรงละเอียด

ตะแกรงหยาบ (coarse screen) จะประกอบด้วยแท่งโลหะ ตะแกรงมีขนาดช่องว่างระหว่างแท่งตั้งแต่ 10 มิลลิเมตร ขึ้นไป ทำหน้าที่ดักเศษขยะขนาดใหญ่เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหายแก่อุปกรณ์ในระบบบำบัด เช่น เครื่องสูบน้ำ ท่อวาล์ว

ตะแกรงละเอียด (fine screen) จะมีช่องเปิดเล็กมากอยู่ในช่วง 2-6 มิลลิเมตร ใช้สำหรับดักเศษเส้นด้ายหรือเส้นใยที่มีขนาดเล็กที่ปนมากับน้ำเสียเพื่อไม่ให้ตกตะกอนในบ่อบำบัดในโรงงานฟอกย้อมที่มีเศษเส้นด้ายหรือเศษเส้นใยปริมาณมาก

- การปรับสภาพสมดุล

โรงงานฟอกย้อมจะมีขั้นตอนการผลิตต่างๆ ซึ่งน้ำเสียที่ออกมาจากแต่ละขั้นตอนจะมีลักษณะสมบัติและการใช้น้ำที่แตกต่างกัน โดยทั่วไประบบการปรับสภาพน้ำเสียจะทำงานได้ดีในภาวะที่มีอัตราการไหลของน้ำเสียและความเข้มข้นของน้ำเสีย (COD, BOD) ที่สม่ำเสมอ เพราะฉะนั้นการปรับสภาพสมดุลเป็นระบบที่จำเป็น เพื่อทำให้อัตราการไหลและความเข้มข้นของน้ำเสียที่จะเข้าสู่ระบบมีอย่างสม่ำเสมอ นอกจากนี้ถังปรับสภาพสมดุลที่ใช้ในโรงงานฟอกย้อมยังทำหน้าที่ช่วยลดอุณหภูมิของน้ำเสียอีกด้วย

- การปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง (พีเอช)

กระบวนการฟอกย้อมในโรงงานจะมีการใช้สารเคมีที่เป็นกรดหรือด่าง เพื่อปรับภาวะการทำงานของกระบวนการต่างๆให้เหมาะสม และเมื่อปล่อยออกมาเป็นน้ำเสียแล้ว ก็ควรปรับค่าความเป็นกรดหรือด่างของน้ำเสียให้มีภาวะเป็นกลาง ซึ่งมีความเหมาะสมในการบำบัดทางชีวภาพ

2.8.2 การบำบัดขั้นที่สอง (secondary treatment)

น้ำเสียจะถูกนำเข้าไปสู่ถังเติมอากาศซึ่งจะมีการเติมอากาศให้แก่แบคทีเรียโดยใช้เครื่องเติมอากาศ แบคทีเรียช่วยย่อยสลายและกำจัดสารอินทรีย์ ซึ่งอยู่ในรูปของสารละลายหรืออนุภาคคอลลอยด์ออกไปจากน้ำ กลายเป็นตะกอนตกลงไปที่ก้นถังกากตะกอนในส่วนนี้จะถูกนำไปกำจัดต่อไป น้ำในส่วนบนของถังตกตะกอนจะใสขึ้น ในขั้นตอนนี้จะช่วยลดค่า BOD ลงได้ประมาณ 75-95% ซึ่งค่า BOD ของน้ำส่วนนี้จะต่ำกว่า 20 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถปล่อยทิ้งลงสู่แม่น้ำได้แต่ถ้าต้องการความสะอาดเหมาะแก่การนำกลับมาใช้ใหม่ควรเพิ่มเข้าสู่การบำบัดขั้นที่ 3 ต่อไป รายละเอียดและหลักการทำงานในการบำบัดขั้นที่สอง ดังนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

- ระบบบ่อเสถียร (stabilization pond)

เป็นบ่อบำบัดน้ำเสียแบบอาศัยธรรมชาติ โดยใช้จุลินทรีย์ย่อยสลายสารอินทรีย์ เกิดเป็นก๊าซคาร์บอนไฮดรอกไซด์ ก๊าซมีเทน จุลินทรีย์ในบ่อจะมีทั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนและจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจน ระบบบ่อปรับเสถียรแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ บ่อมีออกซิเจน (aerobic pond), บ่อกึ่งไร้ออกซิเจน (facultative pond) และบ่อไร้ออกซิเจน (anaerobic pond)

- ระบบสระเติมอากาศ (aerated pond)

เป็นระบบบำบัดน้ำเสียที่จุลินทรีย์ในสระเติมอากาศใช้ออกซิเจนจากเครื่องเติมอากาศแบบจักรกล ระบบสระเติมอากาศประกอบด้วยส่วนที่สำคัญ คือ สระเติมอากาศ และบ่อตกตะกอน (polishing pond) หลักการทำงาน คือ สารอินทรีย์ในน้ำเสียที่ผ่านเข้าสู่สระเติมอากาศจะเกิดการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในสระเติมอากาศ

- ระบบตะกอนเร่ง (activated sludge)

ในระบบตะกอนเร่ง กระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วโดยอาศัยจุลินทรีย์จำนวนมากที่แขวนลอยอยู่ในถังเติมอากาศ และต้องควบคุมความเข้มข้นของจุลินทรีย์ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม โดยการย้อนกลับตะกอนจุลินทรีย์บางส่วนที่ตกตะกอนในถังตกตะกอนเข้าสู่ถังเติมอากาศ ซึ่งแตกต่างจากระบบสระเติมอากาศที่ไม่มีการย้อนจุลินทรีย์กลับ ตะกอนจุลินทรีย์ส่วนเกินที่เกิดขึ้นจะถูกนำไปกำจัด เช่น ผ่านการย่อยสลายหรือนำไปตากแห้ง น้ำใสส่วนบนที่ไหลล้นออกจากถังตกตะกอนจะได้มาตรฐานสามารถระบายสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้ ระบบตะกอนเร่งมีหลายกระบวนการ เช่น conventional process, tapered aeration process เป็นต้น

2.8.3 การบำบัดขั้นที่สาม (tertiary treatment)

กระบวนการบำบัดเป็นกระบวนการเคมีรวมกับกายภาพ น้ำทิ้งจากการบำบัดขั้นตอนที่สองจะถูกนำมาตกตะกอนด้วยวิธีทางเคมีแยกสารประกอบฟอสเฟตออกด้วยปูนขาว จากนั้นจึงนำมากำจัดสารอินทรีย์ที่เหลืออยู่ด้วยกระบวนการทางกายภาพ –เคมีด้วยวิธีการแลกเปลี่ยนประจุ ซึ่งจะได้น้ำที่สะอาดเมื่อผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้ว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.9 แบคทีเรีย (bacteria)

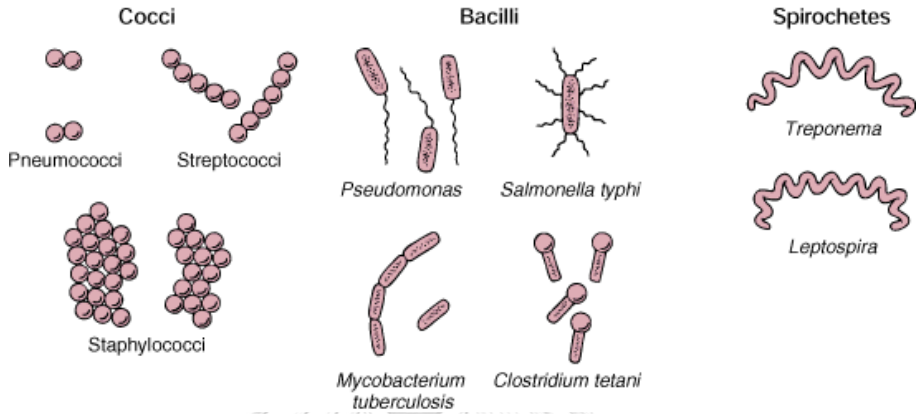
2.9.1 นิยามของแบคทีเรีย

แบคทีเรียมีขนาดกว้างโดยเฉลี่ยประมาณ 1.5 μm และยาวประมาณ 2 μm แต่ละเซลล์มีน้ำหนักประมาณ 10-12 กรัมหรือกล่าวได้ว่า แบคทีเรีย 1 กรัม จะเซลล์แบคทีเรียถึง 1 ล้านเซลล์ แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเซลล์เดียว ในสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม แบคทีเรียแต่ละเซลล์จะแบ่งตัวด้วยวิธี binary fission ทำให้ได้แบคทีเรียใหม่ 2 เซลล์ ขนาดเท่าๆ กัน แบคทีเรียทุกชนิดต้องการน้ำ อาหาร แร่ธาตุ สำหรับการเจริญเติบโต บางชนิดต้องการกรดอะมิโน วิตามิน และสารบางอย่างที่มันไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้ แบคทีเรียจำเป็นต้องใช้อาหารชนิดที่เมื่อผ่านเซลล์เข้าไป แล้วสามารถสร้างส่วนประกอบของเซลล์ หรือให้พลังงานสำหรับการทำงานต่างๆ ของเซลล์ ซึ่งสำหรับการใช้แบคทีเรีย

ในการกำจัดน้ำเสียนี้จะคัดแยกแบคทีเรียมาจากแหล่งน้ำเสียในโรงงาน ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะใช้แหล่งคาร์บอนจากสีในน้ำเสียไปเป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโต จึงเป็นผลให้แบคทีเรียสามารถที่จะลดปัญหาน้ำเสียได้ [23]

2.9.2 ขนาดและรูปร่างของแบคทีเรีย

แบคทีเรียมีขนาด 0.5-10 ไมครอน (micron) มีรูปร่างต่างๆกัน [23]



รูปที่ 2.8 รูปร่างของแบคทีเรีย [23]

แบคทีเรียมีรูปร่างหลายแบบ ดังนี้

1. บาซิลลัส (*bacillus*) มีรูปร่าง เป็นท่อน หรือเป็นแท่ง
เช่น *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* , *Salmonella*

2. สเตรปโทบาซิลลัส (*Streptobacillus*) เมื่อแบ่งเซลล์แล้วเรียงตัวต่อเป็นสายยาว

3. ท่อนโค้ง (curverod) เช่น *Vibrio*

4. ทรงกลมหรือค็อกคัส (*cocus*) เช่น

- ไมโครค็อกคัส (*Micrococcus*) เป็นแบคทีเรีย เซลล์เดี่ยวขนาดเล็ก

- ดิโพค็อกคัส (*Diplococcus*) เมื่อแบ่งเซลล์แล้วติดกันเป็นคู่

- สเตรปโทค็อกคัส (*Streptococcus*) แบ่งตัว เรียงตัวเป็นสายยาว เหมือนโซ่

- สเตรฟิโลค็อกคัส (*Staphylococcus*) เป็นลักษณะของ เซลทรงกลมแบ่งตัวหลายระนาบ อยู่ติดกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น เช่น *Staphylococcus aureus*

- สไปโรคีท (*Spirochete*) รูปร่างบิดเป็นเกลียว ผนังเซลล์ยืดหยุ่นได้
เช่น *Campylobacter jejuni*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.9.3 ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ

ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ คือกระบวนการบำบัดน้ำเสียที่อาศัยจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ (biodegradable organic) โดยจุลินทรีย์จะใช้สารอินทรีย์มาเป็นแหล่งอาหารและสารตั้งต้นในกระบวนการดำรงชีวิต การเจริญเติบโต และการสังเคราะห์เซลล์ใหม่ (new cell) และได้ผลผลิตเป็น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) น้ำ (H_2O) และสารตกค้างที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (non biodegradable) [24]

2.9.3.1. ประเภทของระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ

กระบวนการบำบัดทางชีวภาพ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ ตามชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารย่อยสลายสารอินทรีย์ ได้แก่ การบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศหรือใช้ออกซิเจน (aerobic wastewater treatment) และการบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ หรือไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic wastewater treatment)

- **กระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ (aerobic wastewater treatment)**

เป็นกระบวนการบำบัดน้ำเสียโดยอาศัยจุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องการออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen) หรือ ออกซิเจนอิสระ ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ปฏิกิริยาการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้อากาศ (aerobic bacteria) สามารถจำแนกได้เป็น 2 ขั้นตอน ตามลำดับดังนี้ คือ

ขั้นตอนแรก : เป็นกระบวนการนำสารอินทรีย์หรือสารอาหารเข้าไปในเซลล์ โดยจุลินทรีย์จะส่งเอนไซม์ (enzyme) มาย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เกาะติดผนังเซลล์เพื่อเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของสารโมเลกุลเล็ก ซึ่งสามารถซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้

ขั้นตอนถัดมา : เป็นกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์จุลินทรีย์ เพื่อที่จะผลิตพลังงานไปใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ และการสร้างเซลล์ใหม่ และได้ CO_2, H_2O

- **กระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ (anaerobic wastewater treatment)**

เป็นกระบวนการบำบัดน้ำเสียภาวะไม่มีออกซิเจน โดยจุลินทรีย์จะอาศัยสารประกอบอื่นเป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen) โดยแบ่งได้สี่ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่หนึ่ง : กระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โดยอาศัยเอนไซม์ (enzyme) ที่ถูกส่งออกมานอกเซลล์ เพื่อเปลี่ยนสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ให้เป็นสารโมเลกุลเล็ก

ขั้นตอนที่สอง : กระบวนการสร้างกรด (acidogenesis) โดยแบคทีเรียจะสร้างกรด ซึ่งจะเปลี่ยนผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในขั้นตอนทีหนึ่งไปเป็นกรดไขมันระเหย (volatile fatty acid; VFA)

ขั้นตอนที่สาม : กระบวนการสร้างกรดอะเซติกจากกรดไขมันระเหย (acetogenesis) โดยแบคทีเรียกลุ่มอะซีโตเจนิก (acetogenic bacteria) โดยเปลี่ยนกรดไขมันระเหยไปเป็นผลผลิตสำคัญในการสร้างก๊าซมีเทน ได้แก่ กรดอะเซติก กรดฟอร์มิก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจน

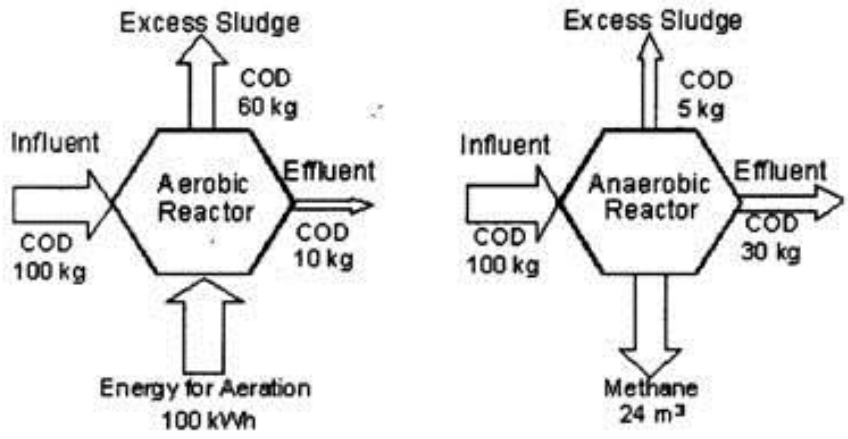
ขั้นตอนที่สี่ : กระบวนการสร้างมีเทน (methanogenesis) โดยผลผลิตที่ได้จากแบคทีเรียสร้างกรดในขั้นตอนที่สาม โดยถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซมีเทนโดยแบคทีเรียกลุ่มสร้างมีเทน (methanogenic bacteria) แบคทีเรียกลุ่มที่สร้างมีเทนนี้ แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ชนิดแรก คือ แบคทีเรียที่สร้างมีเทนจากคาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน (hydrogenotrophic bacteria) โดยได้คาร์บอนมาจากคาร์บอนไดออกไซด์และได้พลังงานจากไฮโดรเจน ชนิดที่สอง คือ แบคทีเรียสร้างมีเทนจากกรดอะเซติก (acetotrophic bacteria) ใช้อะเซเตดเป็นตัวรับอิเล็กตรอน และใช้ไฮโดรเจนเป็นแหล่งพลังงาน

จากกลไกการย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไม่ใช้อากาศทั้งสี่ขั้นตอน สรุปได้ว่ากระบวนการบำบัดแบบไม่ใช้อากาศอาศัยการทำงานของแบคทีเรีย 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สร้างกรด และกลุ่มที่สร้างมีเทน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องให้ภาวะแวดล้อมมีความเหมาะสมต่อการทำงานร่วมกันอย่างต่อเนื่องของแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม ถ้าการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งเปลี่ยนไป ก็จะมีผลต่อการทำงานแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งและประสิทธิภาพโดยรวมของระบบได้ ตัวอย่างเช่น กรณีที่ระบบได้รับสารอาหารหรือปริมาณสารอินทรีย์เพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ แบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดก็จะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้น มีการสร้างกรดอินทรีย์และผลผลิตต่าง ๆ เพิ่มขึ้น ก็จะส่งผลให้แบคทีเรียกลุ่มที่สร้างมีเทนซึ่งมีความสามารถในการเจริญเติบโตต่ำกว่า ไม่สามารถย่อยสลายกรดอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นได้ทัน ก็จะมีปริมาณกรดอินทรีย์สะสมเพิ่มขึ้น ซึ่งถ้าระบบไม่มีกำลังบัฟเฟอร์เพียงพอ ค่า pH ของระบบที่ลดลงก็จะไปมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างมีเทน จนอาจทำให้ประสิทธิภาพของระบบลดลง หรือการทำงานของระบบล้มเหลวได้ในที่สุด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.9.3.2. ข้อแตกต่างระหว่างกระบวนการใช้อากาศ และไม่ใช้อากาศ

โดยทั่วไปแล้วนั้นข้อแตกต่างระหว่างกระบวนการบำบัดแบบใช้อากาศและไม่ใช้อากาศสามารถแสดงได้ดังภาพสมดุล COD และพลังงาน คือ การย่อยสลายแบบใช้อากาศจะได้น้ำทิ้ง (effluent) ที่มีคุณภาพดีกว่า นั้นคือ มีสารที่ต้องการออกซิเจนเหลืออยู่ในน้ำทิ้ง ปริมาณเล็กน้อย โดยสารอินทรีย์ที่ตั้งต้นส่วนใหญ่จะเปลี่ยนรูปไปเป็นตะกอน ในรูปของมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ (bacterial biomass) ส่วนการบำบัดแบบไม่ใช้อากาศ จะมีปริมาณของแข็ง (residual solid) และสารที่ต้องการออกซิเจนเหลืออยู่ในน้ำทิ้งปริมาณมากกว่ากระบวนการใช้อากาศ แต่จะให้ตะกอนปริมาณน้อยกว่าและมีความเสถียร (more stable) กว่ากระบวนการใช้อากาศ นอกจากนั้นระบบที่ไม่ใช้อากาศยังให้ผลผลิตสุดท้ายเป็นก๊าซมีเทน ซึ่งใช้เป็นเชื้อเพลิง และแหล่งพลังงานได้



รูปที่ 2.9 การเปรียบเทียบสมดุล COD และ พลังงานของกระบวนการบำบัดแบบใช้อากาศและไม่ใช้อากาศ [24]

2.9.4 การกำจัดสีโดยใช้เอนไซม์และการดูดซับของจุลินทรีย์

2.9.4.1 ใช้เอนไซม์ในการกำจัดสี

เอนไซม์เป็นโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งเอนไซม์จะมีความจำเพาะต่อซับสเตรต โดยซับสเตรตในที่นี้คือโมเลกุลของสีย้อม โดยเอนไซม์จะไปทำลายโครโมฟอร์และลดสารพิษของสีย้อม อย่างไรก็ตามโมเลกุลของสีมีหลายชนิดมาก ดังนั้นจึงมีเอนไซม์บางชนิดเท่านั้นที่จะทำลายโครงสร้างของสีนั้นๆได้ ในปีที่ 1980 มีงานวิจัยที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการนำเอนไซม์ไปทำลายหมู่เอโซ ซึ่งจะเรียกเอนไซม์เหล่านี้ว่า azoreductase นักวิจัยได้บอกไว้ว่าแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์มีความสามารถในการกำจัดสีเอโซ (orange) แบคทีเรียจะถูกสกัดเป็นรูปโปรตีนเดี่ยว ซึ่งจะไปทำการลดหมู่เอโซ และมีงานวิจัยเป็นจำนวนมากว่าการกำจัดสีที่มีหมู่เอโซด้วยปฏิกิริยา azoreductase แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียสามารถที่จะเจริญเติบโตโดยใช้สีเอโซ นั้นคือใช้คาร์บอนหรือพลังงานอื่นๆที่อยู่ในสี [25]

2.9.4.2 ใช้จุลินทรีย์ในการดูดซับเพื่อกำจัดสี

วิธีนี้เป็นการกำจัดสีด้วยการดูดซับสี วัสดุที่ใช้ ยกตัวอย่าง เช่น charcoals, clays, solid และพอลิเมอร์สังเคราะห์ แต่ถ้าใช้ biomass เป็นตัวดูดซับจะเรียกว่า biosorption

การกำจัดสีโดยวิธีการดูดซับ โดยปกติจะมีการดูดซับโดย fungal mycelia เซลล์ fungal จะทำการดูดซับด้วยการเจริญเติบโตของเซลล์หรือเปลี่ยนรูปเป็น biomass จากงานวิจัย [26] ศึกษา mycelium ของ *Aspergillus niger* พบว่าสามารถกำจัดสีได้ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ โดยพื้นฐานแล้ว fungal สามารถที่จะกำจัดสีได้ดีถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่า pH ระหว่าง 3-7 และกำจัดสีได้ 60 เปอร์เซ็นต์ที่ค่า pH เท่ากับ 12

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.9.5 กลไกการย่อยสลายสีเอโซด้วยแบคทีเรีย

สีของน้ำทิ้งจัดเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของน้ำทิ้งหรือแสดงถึงมลภาวะทางน้ำได้ประการหนึ่ง ในปัจจุบันการย่อยสลายสีเอโซด้วยแบคทีเรียได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากเป็นกระบวนการทางชีวภาพที่เกิดกระบวนการย่อยสลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งสามารถนำมาประยุกต์ในการย่อยสลายสีเอโซได้หลากหลายชนิด มีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการไม่สูง เป็นวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและทำให้เกิดกากตะกอนจากการย่อยสลายในปริมาณไม่มากนัก [27] การทำลายพันธะเอโซเป็นขั้นตอนแรกในการย่อยสลายสีเอโซด้วยแบคทีเรีย ซึ่งขั้นตอนการย่อยสลายสีเอโซว่าประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

1) การทำลายพันธะเอโซภายใต้ภาวะไม่มีออกซิเจน หรือภาวะที่มีออกซิเจนและเกิดสารแอโรแมติกแอมีนเป็นสารตัวกลาง

2) การย่อยสลายสารแอโรแมติกเอมีนของแบคทีเรียภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจนจะอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ monooxygenase และ dioxygenase ในการเติมออกซิเจนในวงแหวนแอโรแมติกก่อนที่จะเกิดการแตกของวงแหวนแอโรแมติกต่อไป หากเกิดการย่อยสลายต่อเนื่องอย่างสมบูรณ์จะทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และแอมโมเนียเป็นผลิตภัณฑ์

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียเดี่ยวและแบคทีเรียผสมหลายชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายสีเอโซเพียงขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งหรือทั้ง 2 ขั้นตอน คือ การทำลายพันธะเอโซและย่อยสลายสารกลุ่มแอมีนอย่างต่อเนื่องเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนในการเจริญเติบโต ซึ่งสีเอโซจะมีสีที่จางลงหรือกลายเป็นสารไม่มีสี เมื่อพันธะเอโซ (-N = N-) ในสีที่ถูกทำลายแยกออกจากส่วนของเฮเทอโรไซคลิกและวงแหวนแอโรแมติกของโมเลกุลสี จะทำให้การดูดกลืนแสงของสีเปลี่ยนไปจากช่วงที่มนุษย์มองเห็นได้ไปเป็นช่วงอัลตราไวโอเลตหรืออินฟราเรด ในขั้นตอนของการย่อยสลายสีเอโซในขั้นตอนแรกส่วนใหญ่แล้วมักจะเกิดขึ้นภายใต้ภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และการย่อยสลายสีเอโซภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนเป็นกระบวนการที่ต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ โดยมีทั้งเอนไซม์ที่จำเพาะเจาะจงและไม่จำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้น เอนไซม์ที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง ได้แก่ เอนไซม์เอโซรีดักเทส (azoreductase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความไวต่อออกซิเจน (oxygen-sensitive) และเป็นเอนไซม์ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) โดยจะได้สารตัวกลาง คือ สารแอโรแมติกเอมีน ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีสี และบางชนิดมีสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง [31] นอกจากนั้นการย่อยสลายสีเอโซของแบคทีเรียบางชนิดเกิดจากเอนไซม์ oxygen catalyzed azoreductase หรือ aerobic azoreductase ซึ่งจะเกิดสารแอโรแมติกเอมีนเป็นสารตัวกลางเช่นเดียวกัน โดยเอนไซม์ชนิดนี้จัดเป็นเอนไซม์ภายในเซลล์ และมีความจำเพาะเจาะจงต่อโครงสร้างของสารตั้งต้น (โครงสร้างสีเอโซ) สูง เอนไซม์เอโซรีดักเทสพบครั้งแรกใน *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ K22 และ KF46 โดย Zimmermann และคณะ [28, 29] นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดยังสามารถผลิตเอนไซม์ lignin peroxidase ที่มีสมบัติในการย่อยสลายสีเอโซได้เช่นเดียวกัน เช่น *Acinetobacter calcoaceticus* NCIM 2890 และ *Bacillus* sp. [30]

2.9.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

1. อุณหภูมิ สามารถแบ่งแบคทีเรียได้ 3 ประเภท ตามความแตกต่างของอุณหภูมิ [31]

– *Psychrophiles* สามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิ 0°C หรือต่ำกว่า

– *Mesophiles* เจริญได้ดีในอุณหภูมิ 25°C – 40°C

2. ความต้องการออกซิเจน สามารถแบ่งแบคทีเรียตามความต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตออกเป็น

– แอโรบิกแบคทีเรีย (aerobic bacteria) คือพวกที่เจริญได้ในบรรยากาศที่มีออกซิเจน

– แอนแอโรบิกแบคทีเรีย (anaerobic bacteria) คือ พวกที่เจริญได้ในบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจน

–แฟคัลเททีฟ แอนแอโรบิคแบคทีเรีย (facultative anaerobic bacteria) คือพวกที่เจริญได้ทั้งในบรรยากาศที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน

– ไมโครแอโรฟิลิก แบคทีเรีย (microaerophilic bacteria) เจริญในบรรยากาศที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย

3. สภาพความเป็นกรด-ด่าง แบคทีเรียส่วนมากเจริญได้ดีในช่วงของ pH 6.5-7.5 พวกราหรือยีสต์ทนต่อกรดได้ดีกว่า คือประมาณ pH 5

4. ความชื้น แบคทีเรียส่วนใหญ่ต้องการความชื้น แต่แบคทีเรียบางชนิดทนต่อความแห้งแล้งได้ดี เช่น *Tubercle bacilli* และ *Staphylococcus aureus*

5. แสงสว่าง แบคทีเรียทั่วไปไม่ต้องการแสงในการเจริญเติบโต ยกเว้นแบคทีเรียพวกที่สังเคราะห์แสงได้เท่านั้นที่ต้องการแสงในการเจริญเติบโต

6. เสียง ความถี่ของเสียงสูง ๆ ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Bouraie และ Din [32] ศึกษาการย่อยสลายสี Reactive Black 5 ด้วยแบคทีเรียทั้งหมด 42 สายพันธุ์ โดยทดลองใช้แบคทีเรียย่อยสลายหรือกำจัดสี Reactive Black 5 กับ mineral salt medium (MSM) และพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีสูงที่สุด หลังจากนั้นจึงศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการกำจัดสี Reactive Black 5 ด้วยแบคทีเรียชนิดนี้ภายใต้ภาวะสถิต โดยทดลองใช้ความเข้มข้นของสี Reactive Black 5 แบคทีเรียดังกล่าวจะสามารถในช่วง 50-250 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ของสี Reactive Black 5 จะสามารถกำจัดสีได้ดีที่สุด ที่ภาวะพีเอชเท่ากับ 7 และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในภาวะสถิต จากนั้นได้ทำการวิเคราะห์การย่อยสลายสีของแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค FTIR และ GCMS พบว่าหลังจากการย่อยสีย้อมด้วยแบคทีเรียพบการลดลงของหมู่เอโซ (-N=N-) และการเพิ่มขึ้นของหมู่

แอมิโน ($-NH_2$) ในสีย้อม นอกจากนั้นจะพบพีคของ C-O และ O-H เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นหมู่ที่แสดงให้เห็นถึงการเกิดกรดออกซาลิกขึ้นในปฏิกิริยาการกำจัดสีย้อมด้วยแบคทีเรียดังกล่าว

Wang และ Liang [33] ได้ศึกษาการกำจัดสี Reactive Black 5 ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp.YZU1 โดยแบคทีเรียสายพันธุ์นี้คัดแยกมาจากโรงงานสีย้อมในท้องถิ่น จะทำการศึกษาการกำจัดสี Reactive Black 5 ของแบคทีเรียที่อยู่ใน nutrient broth (NB) จะนำแบคทีเรีย *Bacillus* sp.YZU1มาศึกษากระบวนการย่อยสี Reactive Black 5 โดยตั้งสมมุติฐานไว้ว่าแบคทีเรียสามารถย่อยสีได้โดยการดูดซับสีและย่อยสลายสีด้วยตัวของมันเอง จากการศึกษาการดูดซับสีของแบคทีเรีย จะทำการฆ่าแบคทีเรียด้วยความร้อน แล้วนำไปกำจัดสีพบว่าประสิทธิภาพการกำจัดสีหรือแบคทีเรียดูดซับสีมีเพียง 3.1 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มไว้เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ซึ่งเป็นไปได้ว่าที่แบคทีเรียกำจัดสีได้ 3.1 เปอร์เซ็นต์นี้อาจเป็นเพราะแบคทีเรียได้ดูดซับสีเอาไว้ และทำการย่อยสลายสีด้วยตัวของมันเอง จะนำแบคทีเรียที่มีชีวิตไปทำการกำจัดสี พบว่าแบคทีเรียสามารถกำจัดสีได้สูงสุดเท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเกิดจากกระบวนการย่อยสีภายในเซลล์ของแบคทีเรีย ต่อมาได้ศึกษาผลของอุณหภูมิ ค่าพีเอช ความต้องการของแบคทีเรียในการใช้ออกซิเจน และความเข้มข้นของเกลือที่มีผลต่อการย่อยสลายของสี ผลของอุณหภูมิ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการกำจัดสีหรือบ่มด้วยแบคทีเรีย คืออุณหภูมิในช่วง 35 ถึง 45 องศาเซลเซียส ถ้าใช้อุณหภูมิในการบ่มต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส จะยับยั้งการทำงานของแบคทีเรีย ต่อมาผลของค่าพีเอช พบว่าค่าพีเอชเท่ากับ 7 ให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีสูงที่สุดเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมงของการบ่ม ต่อมาคือผลของ ความต้องการใช้ออกซิเจนของแบคทีเรีย เมื่อนำแบคทีเรียไปเลี้ยงใน nutrient broth (NB) และเขย่าระหว่าง 100 ถึง 250 รอบต่อนาที เพื่อเติมออกซิเจนขณะบ่ม พบว่าเมื่อให้ออกซิเจนในการกำจัดสีมีเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีมีค่าลดลง เป็นเพราะออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนที่ดีกว่าหมู่เอโซในโมเลกุลของสี จึงมีผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของแบคทีเรีย

Pokharia และ Ahluwalia [34] คัดแยกแบคทีเรียมาจากแหล่งน้ำเสียของโรงงาน 2 แห่งในประเทศอินเดีย และเมื่อได้สายพันธุ์แบคทีเรียที่เหมาะสมแล้วจึงนำไปทดลองกำจัดสีทั้งหมด 6 สีด้วยกัน คือ Black WNN, Blue FNR, Red FN2BL, Blue RC, TURQ Blue และ Diresul RDT Black พบว่าคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 45 สายพันธุ์ โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากโรงงานที่ 1 (Nahar Oswar Denim Co., Ltd.) สกัดได้จากแหล่งน้ำเสียให้ชื่อว่า NF-1 ถึง NF-33 และโรงงานที่ 2 (Abhishek Industries Co., Ltd.) สกัดแบคทีเรียได้จากดิน ให้ชื่อว่า TI-I ถึง TI-III และสกัดได้จากน้ำเสีย ให้ชื่อว่า TrS1-TrS9 หลังจากนั้นทดลองกำจัดสีด้วยแบคทีเรียเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่ามีแบคทีเรียทั้งหมด 17 สายพันธุ์ที่สามารถกำจัดสี Black WNN มีแบคทีเรียทั้งหมด 12 สายพันธุ์ที่สามารถกำจัดสี Blue FNR มีแบคทีเรียทั้งหมด 10 สายพันธุ์ที่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สามารถกำจัดสี Diresul RDT Black และมีแบคทีเรียเพียง 1 สายพันธุ์ที่สามารถกำจัดสีสี Red FN2BL และ TURQ Blue ได้ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดสีเปรียบเทียบระหว่างการกำจัดสีในภาวะหยุดนิ่งและภาวะเขย่า โดยใช้ความเข้มข้นสีที่ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 9 บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรีย NF-22 มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดสี Black WNN ได้สูงสุดที่ 95 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรีย NF-21 มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดสี Blue FNR ได้สูงสุดที่ 50 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรีย NF-23 มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดสี Diresul RDT Black ได้สูงสุดที่ 90 เปอร์เซ็นต์ และกำจัดสี Red FN2BL ได้สูงสุดที่ 80 เปอร์เซ็นต์

นิตยา และ จิรภัทร [35] ได้คัดแยก และคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อกำจัดสีย้อมต้นกก จากพื้นที่ทอเสื่อของจังหวัดจันทบุรี โดยคัดแยกแบคทีเรียที่เป็นเชื้อประจำถิ่นในตัวอย่างของดินและน้ำเสียโดยวิธีเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM) ที่มีสีย้อมกกซึ่งมีสีแดงเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเติมกลูโคส 1 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเพื่อช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ จากผลการทดลองพบว่ามีแบคทีเรียทั้งหมด 18 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญเติบโตได้บนผิวหน้าอาหารแข็ง MSM ที่มีสีย้อมกก และเชื้อแบคทีเรีย A1 และ A8 ซึ่งต่อมาได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ พบว่า คือ *Serratia* sp. A1 และ *Klebsiella* sp. A8 ตามลำดับ เมื่อทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายสีย้อมกกแดง ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ของ *Serratia* sp. A1 และ *Klebsiella* sp. A8 พบว่า *Serratia* sp. A1 สามารถย่อยสลายสีย้อมในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียได้ 11.56 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่า *Klebsiella* sp. A8

Chen และคณะ [36] คัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสีย้อม 24 ชนิด จนได้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Aeromonas hydrophila* ซึ่งมีความสามารถในการกำจัดสีได้ดีที่สุด โดยจากการทดลองพบว่า *Aeromonas hydrophila* สามารถกำจัดสีได้ดีในภาวะที่ไร้อากาศหรือมีอากาศเพียงเล็กน้อย โดยสามารถกำจัดสี RED RBN ที่มีความเข้มข้นสีเริ่มต้น 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้สูงถึงร้อยละ 90 ภายในเวลา 8 วัน ในภาวะที่มีค่าพีเอช 5.5-10.0 และอุณหภูมิ 20-35 องศาเซลเซียส และยังพบอีกว่าแหล่งไนโตรเจน เช่น yeast extract และ peptone สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสีของเชื้อดังกล่าวได้

Wong และ Yuen [37] ได้ศึกษาการย่อยสลายสีเอโซด้วยแบคทีเรีย *Klebsiella pneumonia* ที่แยกได้จากกากตะกอนที่ปนเปื้อนสีสังเคราะห์ และนำไปทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดสี Methyl Red ภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจน พบว่าหลังการย่อยสลายสีด้วย *Klebsiella pneumonia* ได้เกิดสาร 2 ชนิดนี้ เกิดผลิตภัณฑ์จากการย่อย ได้แก่ 2-Aminobenzoic acid และ N-N-Dimethyl-p-phenylene diamine ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้โดยเทคนิค HPLC

Mona และ Mabrouk [38] ได้ศึกษาการการกำจัดสี Fast Red ของ *Bacillus Substilis* HM ที่สกัดได้มาจากแหล่งกำจัดน้ำสีของโรงงาน โดยแบคทีเรีย *Bacillus Substilis* สามารถกำจัดสีเอโซได้ถึง 8 สี และทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการกำจัดสีในภาวะหยุดนิ่งและภาวะเขย่า พบว่าภาวะหยุดนิ่งให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีที่สูงกว่าภาวะเขย่า โดยภาวะหยุดนิ่งให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดสี 85.4 เปอร์เซ็นต์ภายใน 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นผลมาจากการมีออกซิเจนจะเป็นการลดตัวพาอิเล็กตรอนจะเป็นการไปต่อต้านการกำจัดสี และได้ศึกษาการเพิ่มของ glucose ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM จะเป็นการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ในการกำจัดสีถึง 55% เมื่อเปรียบเทียบกับการกำจัดสีที่ไม่มี glucose ซึ่ง glucose จะเป็นลดนิวคลีโอไทด์ (NADH, FADH) โดยนิวคลีโอไทด์พวกนี้จะเป็นตัวที่ช่วยในการกำจัดสี Fast Red

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
การทดลอง

การทดลองในงานวิจัยนี้ประกอบด้วยการคัดเลือกแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับใช้และกำจัดสี Reactive Black 5 ในสารละลายสี การเตรียมสารละลายสี การกำจัดสีในสารละลายสีด้วยแบคทีเรีย และวิเคราะห์ประสิทธิภาพรวมถึงกลไกการกำจัดสีของแบคทีเรีย

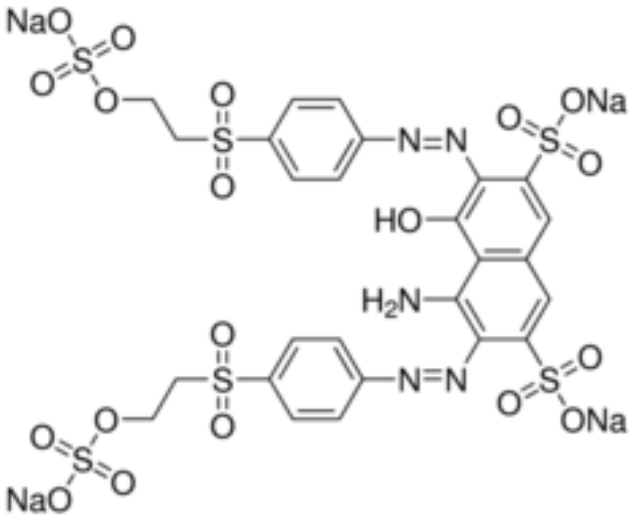
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 ผ้าฝ้าย

ผ้าฝ้าย 100% ทอลายขัดและผ่านการฟอกขาวแล้ว จากบริษัท ศิลปะเสนีพาณิชย์ จำกัด

3.1.2 ผงสี

Reactive Black 5 จากบริษัท ฮันทส์แมน (ประเทศไทย) จำกัด



รูปที่ 3.1 โครงสร้างทางเคมีของสี Reactive Black 5 [33]

3.1.3 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย คือ เชื้อในกลุ่ม *Pseudomonas sp.* จำนวน 49 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์มาจาก Thailand Biosource Research Center (TBRC) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ประเทศไทย

3.1.4 สารเคมี

Nutrient broth

- nutrient broth จากบริษัท เบคตันดิคคินสัน (ประเทศไทย) จำกัด

Mineral salt medium

- diazanium sulfatexylose จากบริษัท Carlo Erba, Italy
- potassium phosphate monobasic จากบริษัท Carlo Erba, Italy
- potassium hydrogen phosphate จากบริษัท Carlo Erba, Italy
- magnesium sulfate heptahydrate จากบริษัท Carlo Erba, Italy
- sodium chloride จากบริษัท Carlo Erba, Italy
- glucose จากบริษัท Carlo Erba, Italy

Alkali

- sodium carbonate จากบริษัท Sigma-Aldrich, Germany
- sodium hydroxide จากบริษัท Sigma-Aldrich, Germany

Others

- oxalic acid จากบริษัท Dr.Ehrentorfer, Germany
- hydrochloric acid จากบริษัท Sigma-Aldrich, Germany

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1) เครื่องวัดพีเอช (pH tester20, Eutech Instrument)
2) เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaker Incubation, 311DS Labnet)
3) ตู้อบ (Incubation Memmert, Model INE-550)
4) ตู้ดูดความชื้น (Auto dry, Nortman, Model VWT-08S)
5) เครื่องชั่ง (Balance, Mettler Toledo, Model AB 204)
6) เครื่องวัดสี (Macbeth reflectance spectrophotometer, COLOR-EYE 7000)

7) เครื่องชั่งระบบอินฟราเรด (Infrared Moisture Balance, Model AD-4715)

8) เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก (Centrifuge, 22332 Hamburg)

เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดใหญ่ (Centrifuge, Model BS-08L, Sorvall)

9) หม้อนึ่งความดัน (Autoclave, Model SX-700, tomy)

10) ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow Biologi hazard Class II, NU-440)

11) UV-Visible spectrophotometer (Spectramax M5 Spectrophotometer)

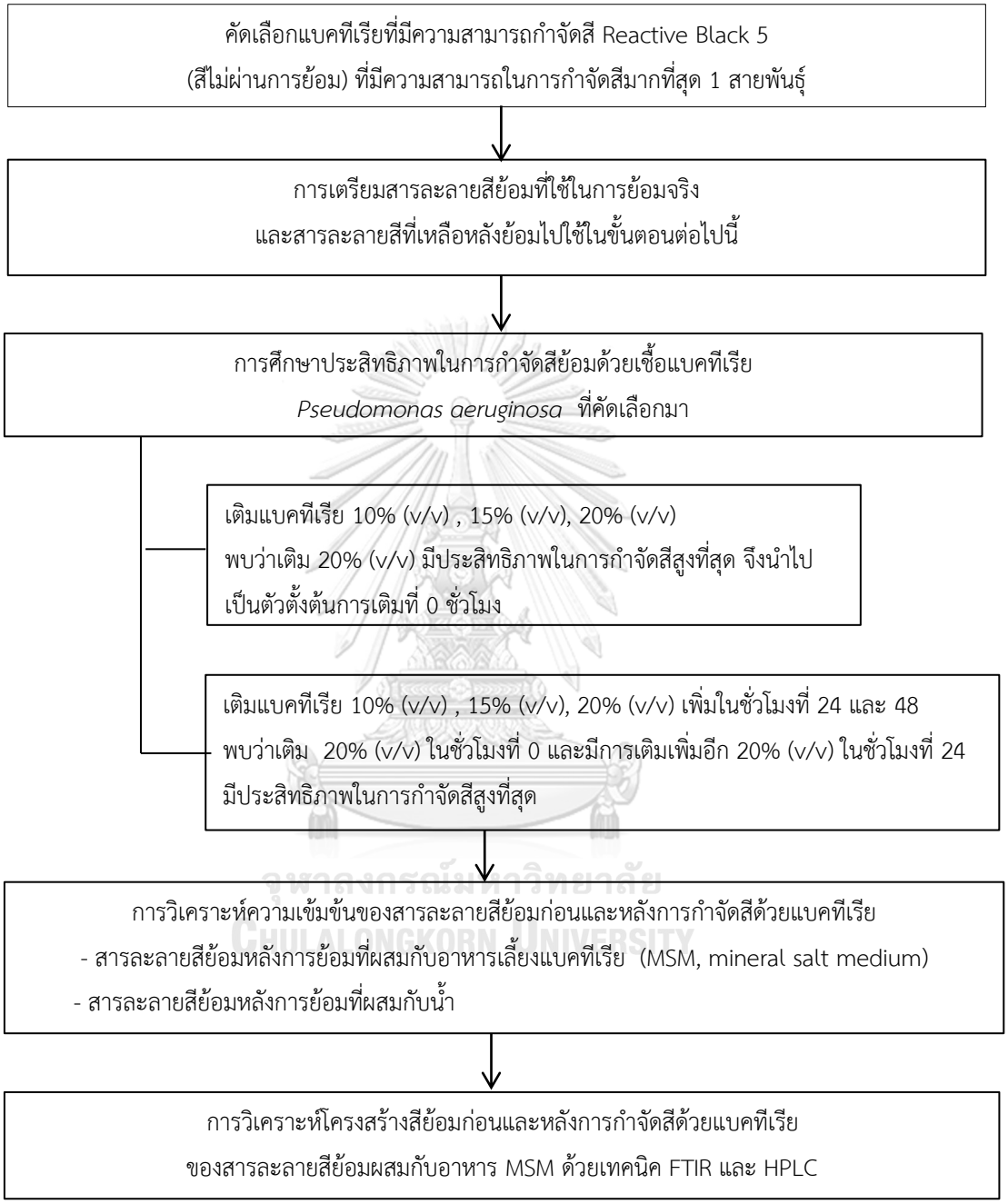
UV-Visible spectrophotometer (Spectrophotometer Model GBC Cintra 404)

12) Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Perkin Elmer Fourier Transform Infrared Spectrometer เทคนิค Micro-ATR (ASTM: E334-01 และ ASTM: E573-01)

13) High-performance liquid chromatography (Prostar Model 410)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3 วิธีการทดลอง



แผนภาพที่ 3.1 วิธีการทดลองทั้งหมด

3.3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถกำจัดสี Reactive Black 5

ในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดสี Reactive Black 5 จากแบคทีเรียทั้งหมด 49 สายพันธุ์ในกลุ่มของ *Pseudomonas* sp. โดยแบคทีเรียทั้งหมดได้รับความอนุเคราะห์มาจาก TBRC ของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ โดยมีขั้นตอนเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียดังต่อไปนี้

1. ทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหารแข็ง (nutrient agar) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2. เตรียมอาหารเหลว (nutrient broth) มีส่วนประกอบของ extrait de boeuf 3 กรัมต่อลิตร และ peptone 5 กรัมต่อลิตร สำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย โดยเติมอาหารเหลว 20 มิลลิลิตรลงในขวดแก้วรูปชมพู่ 50 มิลลิลิตร แล้วนำเข้าเครื่อง autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยไม่มีการปรับค่าพีเอชของอาหาร

3. นำแบคทีเรียที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วในข้อ 1 ใส่ลงในอาหารเหลวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในข้อ 2 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

4. นำแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารเหลวจากข้อ 3 ไปวัดค่า optical density (OD) เพื่อดูการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จะทำการดูดแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารเหลวใส่ลงใน microtite plates หลังจากนั้นนำไปวัดค่า OD ด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยค่า OD ที่เหมาะสม อยู่ในช่วง 0.4-0.6 ซึ่งหากค่า OD ของแบคทีเรียต่ำกว่า 0.4 จะไม่นำมาใช้ในการกำจัดสี [39]

5. ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (MSM, mineral salt medium) มีส่วนประกอบดังต่อไปนี้ คือ NaCl 1 g/l, $MgSO_4$•7 H_2O 0.01 g/l, KH_2PO_4 1 g/l, K_2HPO_4 1 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g/l และ glucose 3 g/l แล้วนำไปปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 8 หลังจากนั้นใส่ลงในขวด duran แล้วนำเข้าเครื่อง autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส

6. เติมสารละลายสี Reactive Black 5 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (สารละลายสีไม่ได้ผ่านการย้อมและไม่มีการใช้ด่าง) ลงในอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM) 20 มิลลิลิตร ที่ได้เตรียมไว้หลังจากนั้นแบ่งใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร

7. เติมมีแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารเหลวปริมาณ 10%(v/v) ลงในหลอดทดลองที่มีสี Reactive Black 5 ผสมกับอาหาร MSM แล้วบ่มในภาวะหยุดนิ่งที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ทำการเก็บตัวอย่างจากวันแรกและวันที่สองมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสของตัวอย่างออกมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ด้วยเครื่อง

Spectramax M5 Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 599 นาโนเมตร และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การกำจัดสี (%decolorization) ตามสูตรการคำนวณดังต่อไปนี้

สูตรการหาเปอร์เซ็นต์การกำจัดสี

$$\% \text{ การกำจัดสี} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงก่อนการบ่มแต่ละวัน} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงหลังการบ่มแต่ละวัน})}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงก่อนการบ่มแต่ละวัน}} \times 100$$

ดังนั้นแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ให้เปอร์เซ็นต์ในการกำจัดสีสูงที่สุด จะถูกคัดเลือกนำไปใช้ในการขั้นตอนต่อไป

3.3.2 การเตรียมสารละลายสีย้อมที่ใช้ในการย้อมสีที่เหลือหลังย้อม

เตรียมสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 ที่มีด่างเพื่อใช้ในการย้อมผ้าฝ้ายด้วยวิธีการย้อมแบบจุ่มอัด (padding) ตามกระบวนการย้อมจริงที่อ้างอิงมาจากห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคลธนไพศาล แล้วนำสารละลายสีย้อมที่เหลือจากการย้อมมาบ่มกับแบคทีเรียที่เหมาะสมเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสีของแบคทีเรียตามวิธีที่แสดงไว้ในข้อ 3.3.1

ทำการย้อมผ้าฝ้ายหนัก 5 กรัม ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยสารละลายที่มีสี Reactive Black 5 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร Na_2CO_3 5.33 กรัมต่อลิตร และสารละลาย NaOH (ความเข้มข้น 36°Be´) 4 มิลลิลิตรต่อลิตร โดยใช้อัตราส่วนน้ำหนักผ้าต่อปริมาตรสารละลายทั้งหมดเท่ากับ 1:10 จากนั้นตั้งทิ้งสารละลายสีที่เหลือจากการย้อมไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (เป็นระยะเวลาโดยเฉลี่ยที่สารละลายสีอยู่ในเครื่องย้อมในแต่ละครั้งของการย้อมผ้าปริมาณมากในโรงงาน รวมถึงส่งสารละลายสีย้อมที่เหลือจากการย้อมไปบ่อบำบัด) เจือจางสารละลายสีให้เหลือความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วจึงนำไปบ่มกับแบคทีเรียที่คัดเลือกมาในขั้นตอนการกำจัดสีต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3.3 การศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดสีย้อมด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ที่คัดเลือกมาจากข้อ 3.3.1

ขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาภาวะและวิธีที่ใช้ในการกำจัดสีในสารละลายสีย้อมด้วยแบคทีเรีย แบคทีเรียที่คัดเลือกมา ถูกเติมลงในอาหารเหลว NB 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำมาผสมกับอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย MSM 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายสีย้อมที่ผ่านการย้อม จากนั้นนำไปบ่มในภาวะหยุดนิ่งที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-6 วันโดยเก็บตัวอย่างส่วนที่ใสทุก 24 ชั่วโมง และนำตัวอย่างไป centrifuge (ตกตะกอน) เพื่อเอาเซลล์แบคทีเรียออก หลังจากนั้นนำไปวัดค่าความทึบแสง (optical density, OD) ด้วยเครื่อง Spectramax M5 Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง

610 นาโนเมตร (พบว่าสารละลายสีย้อมที่มีด่างและผ่านการย้อมจริงมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นแสง 610 นาโนเมตร แต่ความยาวคลื่นแสงของสารละลายสีย้อมที่ไม่มีด่างและไม่ผ่านการย้อมอยู่ที่ 599 นาโนเมตร) และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีด้วยแบคทีเรียตามสูตรข้างต้น

3.3.3.1 ประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมของแบคทีเรียที่มีการเติมปริมาณแบคทีเรียตั้งต้นแบบเพียงครั้งเดียว (single addition) และการเติมปริมาณแบคทีเรียแบบหลายครั้ง (multi addition)

การศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่ใช้ โดยเติมแบคทีเรีย (เติมครั้งเดียวในชั่วโมงที่ 0) ปริมาณต่างๆ คือ 10%(v/v), 15%(v/v) และ 20%(v/v) ลงในอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย MSM ที่ผสมสารละลายสีย้อม บ่มตามภาวะข้างต้นและวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การกำจัดสี จากการทดลองเติมปริมาณแบคทีเรียแบบครั้งเดียว (single addtion) พบว่าการเติมแบคทีเรียปริมาณ 20%(v/v) ในชั่วโมงที่ 0 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีสูงที่สุด จึงเลือกการเติมแบคทีเรียปริมาณ 20%(v/v) มาใช้เป็นปริมาณการเติมในชั่วโมงที่ 0 และจะนำมาใช้ต่อในการเติมปริมาณแบคทีเรียแบบหลายครั้ง (multi addition) โดยจะศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเติมแบคทีเรียเพิ่มอีก คือ เติมเพิ่มในวันที่ 2 เปรียบเทียบกับเติมเพิ่มในวันที่ 3 ในปริมาณ 10%(v/v), 15%(v/v) และ 20%(v/v) บ่มตามภาวะข้างต้นและวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การกำจัดสี เมื่อได้ภาวะในการเติมแบคทีเรียที่เหมาะสมแล้ว คือ การเติมวันแรก 20%(v/v) และเติมเพิ่มอีกในวันที่สองอีก 20%(v/v) จะนำภาวะนี้ไปทำการทดลองในขั้นต่อไป

แผนภาพที่ 3.2 การเติมปริมาณแบคทีเรียตั้งต้นแบบเพียงครั้งเดียวและแบบหลายครั้ง

3.3.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมก่อนและหลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย

ในการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสีของแบคทีเรียจะวิเคราะห์จากค่าความเข้มข้นของสารละลายสีก่อนและหลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรียเปรียบเทียบกัน ซึ่งการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายสีจำเป็นต้องสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ในช่วง 0 ถึง 1 และค่าความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมที่แสดงค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง 0 ถึง 1 (dye concentration) เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานสำหรับหาความเข้มข้นของสารละลายสีจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) 610 นาโนเมตร โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสีด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer Model GBC Cintra 404 โดยมีการวิเคราะห์ต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.3.4.1 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมหลังการย้อม

สารละลายสีย้อมที่เหลือหลังการย้อมถูกนำไปเจือจางด้วยน้ำจนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร ได้ค่าระหว่าง 0 ถึง 1 โดยวัดด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer นำค่าการดูดกลืนแสงนั้นมาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายสีที่เจือจาง จากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเข้มข้นของสารละลายสี และคำนวณความเข้มข้นสารละลายสีย้อมก่อนการเจือจางด้วยน้ำ

3.3.4.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมหลังการย้อมที่ผสมกับอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) ก่อนการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารละลายสีย้อมที่เหลือหลังการย้อมถูกเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) ที่มี pH เท่ากับ 8 เพื่อปรับความเข้มข้นของสารละลายสีย้อม ให้เป็น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และถูกนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมที่แท้จริงที่ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรียจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเข้มข้นของสารละลายสีที่แสดงในบทที่ 4

3.3.4.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมหลังการย้อมที่ผสมกับอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) หลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย

สารละลายสีย้อมที่เหลือหลังการย้อมถูกเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) ที่มี pH 8 เพื่อปรับความเข้มข้นของสารละลายเสียสีย้อม ให้เป็น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อนเติมแบคทีเรียในอาหารเหลว (nutrient broth) ลงไป หลังจากนั้นนำไปบ่มในภาวะหยุดนิ่ง

ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน เก็บตัวอย่างปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร โดยเทคนิคปลอดเชื้อ (ทำ 2 ซ้ำ) ในทุกๆวันเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นสารละลายสีย้อม นำตัวอย่างที่เก็บมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนที่ใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer และคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายสีย้อม จากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเข้มข้นของสารละลายสีที่แสดงในบทที่ 4

3.3.4.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมหลังการย้อมที่ผสมกับน้ำ ก่อนการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย

วิธีการทดลองเหมือนข้อ 3.3.4.2 แต่ใช้น้ำเจือจางสารละลายสีย้อมแทนการใช้อาหารเลี้ยงแบคทีเรียเจือจางสารละลายสีย้อม เพื่อศึกษาความเข้มข้นของสารละลายสีก่อนการกำจัดสีด้วยแบคทีเรียแบบไม่ใช้อาหารเลี้ยงแบคทีเรียแต่ใช้น้ำแทน

3.3.4.5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมหลังการย้อมที่ผสมกับน้ำ หลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย โดยไม่ใช้อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

วิธีการทดลองเหมือนข้อ 3.3.4.3 แต่ใช้น้ำเจือจางสารละลายสีย้อมแทนการใช้อาหารเลี้ยงแบคทีเรียเจือจางสารละลายสีย้อม เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสีด้วยแบคทีเรียโดยไม่ใช้อาหารเลี้ยงแบคทีเรียแต่ใช้น้ำแทน

3.3.5 การวิเคราะห์โครงสร้างสีย้อมก่อนและหลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย

3.3.5.1 การวิเคราะห์การย่อยสีของแบคทีเรียด้วยเทคนิค FTIR

3.3.5.1.1 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสี Reactive Black 5 ด้วยเทคนิค FTIR

วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสี Reactive Black 5 ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy โหมด Micro-ATR ช่วงเลขคลื่นระหว่าง 600-4000 cm^{-1} ตามมาตรฐานการทดสอบ (ASTM: E334-01 และ ASTM: E573-01)

3.3.5.1.2 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสี Reactive Black 5 ในสารละลายสีผสมกับอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) ก่อนกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค FTIR

สารละลายสีย้อมที่เหลือหลังการย้อมถูกเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย ตามวิธีในหัวข้อ 3.3.4.2 และนำไปทำแห้งเยือกแข็ง (freeze dry) โดยนำตัวอย่างไปแช่ในเอทานอลเป็นเวลา 5 นาที เพื่อที่จะทำให้แข็งตัว แล้วนำเข้าเครื่องทำแห้งเยือกแข็ง เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของตัวอย่างด้วย Fourier Transform Infrared Spectroscopy

3.3.5.1.3 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีสี Reactive Black 5 ในสารละลายสีผสมกับอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) หลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค FTIR

สารละลายสีย้อมที่เหลือหลังย้อมถูกเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย เติมแบคทีเรียและบ่มที่ภาวะและเวลาตามวิธีในข้อ 3.3.2 จากนั้นนำเข้าเครื่องตกตะกอน เพื่อแยกแบคทีเรียแล้วนำเข้าเครื่องทำแห้งเยือกแข็งตามขั้นตอนข้างต้น และนำไปวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของตัวอย่างด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy

3.3.5.2 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสีย้อมหลังกำจัดสีด้วยแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค HPLC

จากงานวิจัยของ Boraie และคณะ [32] แสดงให้เห็นว่าการกำจัดสี Reactive Black 5 โดยใช้แบคทีเรีย *Aromatic hydrophila* ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดออกซาลิก การทดลองในงานวิจัยนี้จึงใช้เทคนิค HPLC เพื่อวิเคราะห์หากรดออกซาลิกในสารละลายสีหลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรียโดยมีวิธีดังต่อไปนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

นำสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 ที่ผ่านการย้อมจริง มาบ่มกับแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 3.3.3 ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน(ทั้งหมด 6 วัน) นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงและดูดเฉพาะของเหลวใส เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC Prostar ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร โดยใช้คอลัมน์ phenomenex (300 X 7.80 มิลลิเมตร) ใช้ 5mM H_2SO เฟสเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลาย กรองสารละลายที่เตรียมได้ผ่าน Millipore filter ขนาด 45 ไมครอน แล้วฉีดสารละลายปริมาตร 20 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง HPLC Prostar ใช้อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที โดยวิเคราะห์ตัวอย่าง 8 ตัวอย่างดังต่อไปนี้

- สารละลายกรดออกซาลิก (ความบริสุทธิ์ 99.5%) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium)
- สารละลายสี Reactive Black 5 ก่อนกำจัดสี
- สารละลายสี Reactive Black 5 หลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย เป็นเวลา1-6 วัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถกำจัดสี Reactive Black 5 จากจำนวน 49 สายพันธุ์ในกลุ่มของ *Pseudomonas* sp.

จากแบคทีเรียจำนวน 49 สายพันธุ์ (หมายเลข 1-49 ในตารางที่ 4.1) ในกลุ่มของ *Pseudomonas* sp. พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 41 สายพันธุ์ที่เจริญเติบโตได้ดีในอาหารเหลว NB และเมื่อนำแบคทีเรีย 41 สายพันธุ์นี้ไปทดลองกำจัดสี (เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่สุด) ในสารละลายสี Reactive Black 5 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ผสมในอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย ที่ภาวะหยุดนิ่ง อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ดังแสดงผลในตารางที่ 4.1 พบว่าแบคทีเรียหมายเลข 49 สายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* มีความสามารถในการกำจัดสีดีที่สุด สำหรับการทดลองเพียง 2 วัน *Pseudomonas aeruginosa* ให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีสูงที่สุดในวันแรกของการบ่มคือ 54.6 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยเป็น 65 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มเป็นเวลา 2 วัน ดังนั้นจึงคัดเลือก *Pseudomonas aeruginosa* เพื่อนำไปใช้กำจัดสีในสารละลายสีย้อมที่ผ่านการย้อมจริงในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 ในสารละลายสี (ไม่ผ่านการย้อม) ของแบคทีเรียจำนวน 41 สายพันธุ์ จากจำนวน 49 สายพันธุ์ในกลุ่มของ *Pseudomonas* sp.

สายพันธุ์แบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การลดสีที่ดีที่สุด	วันที่ให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีสูงที่สุด
1	14.98	2
2	21.31	2
3	21.77	2
4	16.27	2
5	15.24	2
6	11.11	2
7	11.26	1
8	13.11	2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สายพันธุ์แบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การลดสีที่ดีที่สุด	วันที่ให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีสูงที่สุด
9	16.14	2
10	17.54	1
11	19.57	2
12	19.25	2
13	18.56	1
14	7.28	1
15	7.05	1
16	5.77	1
17	11.74	2
18	4.97	2
19	8.65	1
20	12.47	2
21	14.66	2
22	14.92	2
23	16.76	2
24	17.01	2
25	16.7	2
26	16.09	2
27	24.76	2
28	21.33	2
29	16.32	1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สายพันธุ์แบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การลดสีที่ดีที่สุด	วันที่ให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีสูงที่สุด
30	17.01	2
31	16.19	2
32	7.00	1
33	15.26	2
34	11.94	2
35	4.76	1
36	16.50	1
37	18.44	2
38	18.71	2
39	18.18	2
40	14.20	2
41	65.03	2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดสีย้อมด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ที่คัดเลือกมา

4.2.1 ลักษณะทั่วไปของสารละลายสีย้อมหลังการย้อม

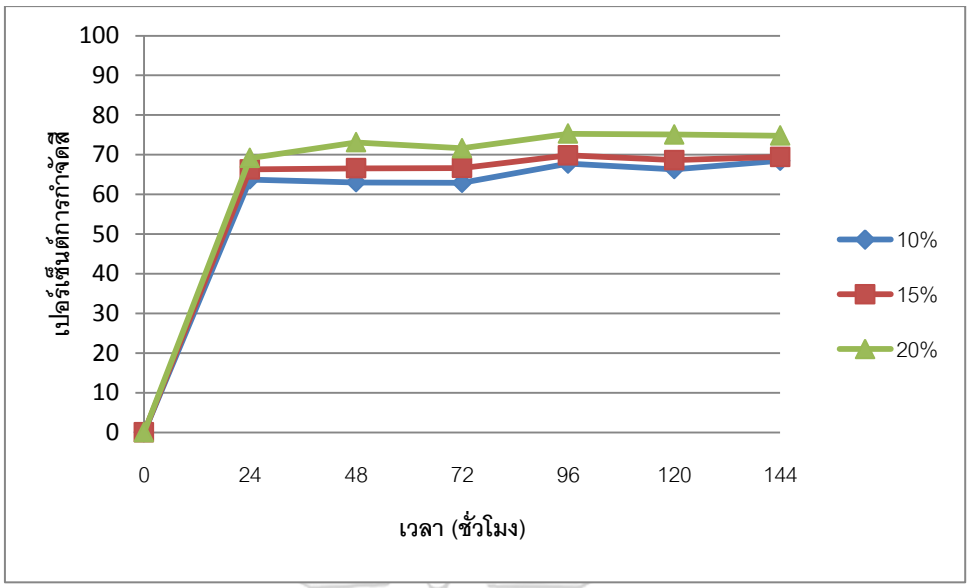
ลักษณะของสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 หลังการย้อมจะเป็นของเหลวสีดำอมน้ำเงินดังรูปที่ 4.1 อย่างไรก็ตามสารละลายสีนี้ยังมีความเข้มข้นของสีที่สูง แบคทีเรียยังไม่สามารถทำลายหรือย่อยสลายโครงสร้างของสีในสารละลายสีได้ จึงต้องเจือจางให้สารละลายสีย้อมเหลือความเข้มข้นประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร [32] แบคทีเรียจึงจะสามารถย่อยสลายสีได้ ซึ่งการเจือจางสารละลายสีนี้ได้เจือจางด้วยการเติมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย MSM เปรียบเทียบกับการเติมน้ำลงในสารละลายสี เพื่อศึกษาด้วยว่าการกำจัดสีด้วยแบคทีเรียจำเป็นต้องให้อาหารกับแบคทีเรียหรือไม่ หรือแบคทีเรียสามารถย่อยสลายสีและใช้สีเป็นอาหารได้ด้วย (ในกรณีที่แบคทีเรียย่อยสลายสีได้โดยไม่มีอาหาร คือ การเจือจางสารละลายสีด้วยน้ำก่อนใช้แบคทีเรียย่อยสลายกำจัดสี)

รูปที่ 4.1 สารละลายสีย้อม Reactive Black 5 หลังการย้อม

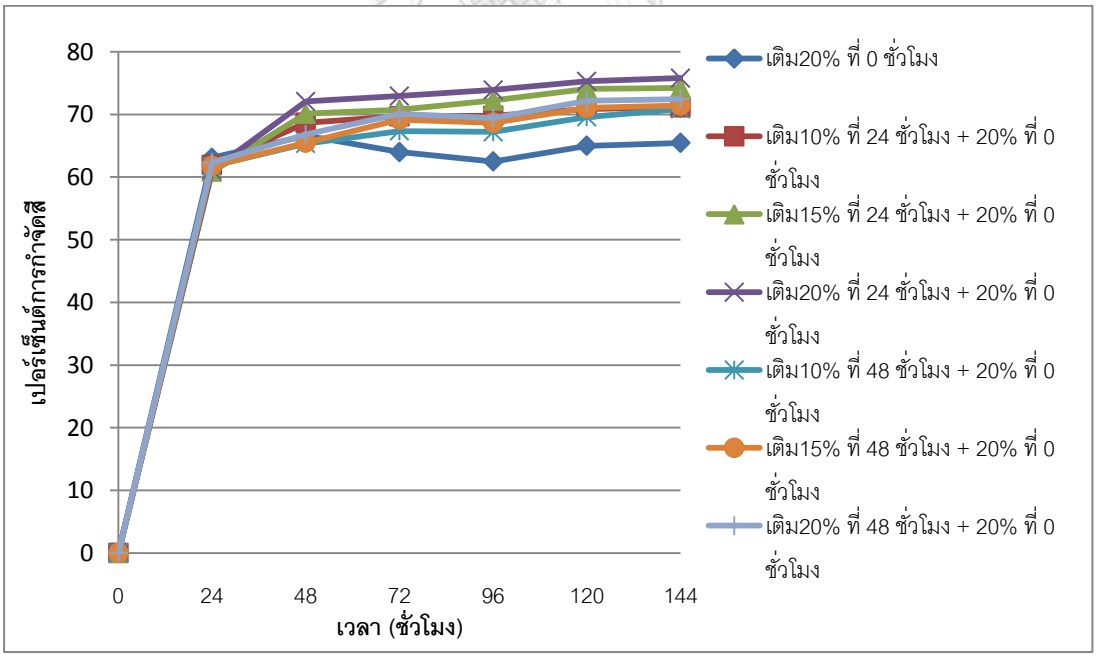
เมื่อได้สารละลายสีย้อมความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการเจือจางแล้ว จึงบ่มสารละลายสีย้อมในแบคทีเรียปริมาณต่างๆกัน และช่วงเวลาในการเติมแบคทีเรียแตกต่างกัน และศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสีด้วยแบคทีเรียได้ค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีจากการวัด optical density ของสารละลายสีก่อนและหลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย ตามวิธีการทดลองในบทที่ 3

4.2.2 ประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมของแบคทีเรียที่มีการเติมหัวเชื้อตั้งต้นเพียงครั้งเดียว (single addition) และแบบการเติมหัวเชื้อหลายครั้ง (multi addition)

การศึกษาหาปริมาณแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* เริ่มต้นที่เหมาะสมในการกำจัดสีออกจากสารละลายสีย้อมที่ผ่านการย้อมจริงโดยทดลองใช้ปริมาณแบคทีเรียครั้งเดียวในวันแรกของการบ่มในปริมาณ 10%(v/v), 15%(v/v) และ 20%(v/v) ตามลำดับเปรียบเทียบกัน พบว่าการใช้แบคทีเรีย 20%(v/v) ครั้งเดียวให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดสี (วัดจากค่า OD) มากที่สุดเท่ากับ 74.82 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มเป็นเวลา 144 ชั่วโมง หรือ 6 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.2 และจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าการกำจัดสีของการเติมปริมาณแบคทีเรีย 10%(v/v), 15%(v/v) และ 20%(v/v) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 144 หรือ 6 วัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกการเติมแบคทีเรีย 20%(v/v) เพราะว่าให้เปอร์เซ็นต์ในการกำจัดสีสูงที่สุด และจะนำการใช้แบคทีเรีย 20%(v/v) ในวันแรกของการบ่มไปใช้ในการทดลองต่อไป นั้นคือการเติมแบคทีเรียเพิ่มอีก 10%(v/v), 15%(v/v) และ 20%(v/v) ในเวลาที่ 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง



รูปที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 (วัดจากค่า OD) ในสารละลายสี (ผ่านการย้อม) เมื่อบ่มด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* 10%(v/v), 15%(v/v) และ 20%(v/v) ครั้งเดียวในวันแรกของการบ่ม บ่มเป็นเวลา 0-144 ชั่วโมง



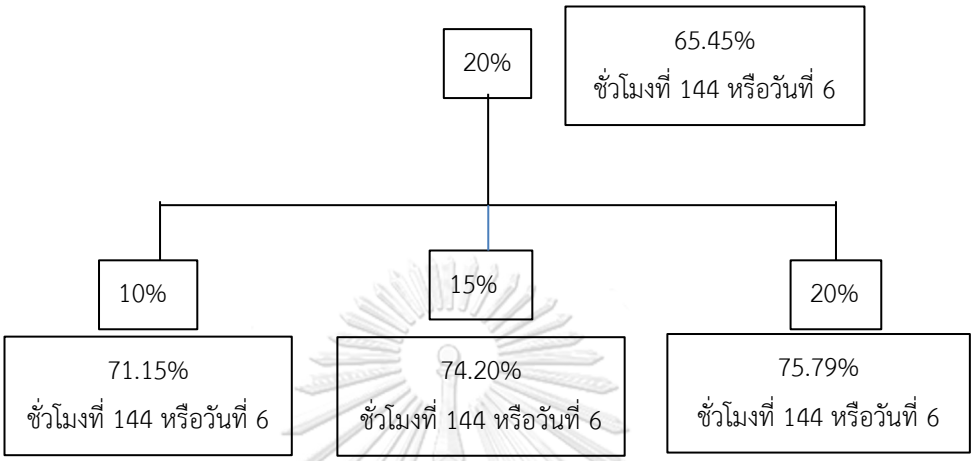
รูปที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 (วัดจากค่า OD) ในสารละลายสี (ผ่านการย้อม) เมื่อบ่มด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* 20%(v/v) ในวันแรกของการบ่มและเติมแบคทีเรียเพิ่มในชั่วโมงที่ 24 หรือชั่วโมงที่ 48 ของการบ่มอีก 10%(v/v), 15%(v/v) และ 20%(v/v)

สำหรับขั้นตอนนี้เป็นแบบการเติมหัวเชื้อหลายครั้ง (multi addition) โดยจะทำต่อจากขั้นตอนที่แล้ว คือ เติมแบคทีเรียไป 20%(v/v) ในเวลาที่ 0 ชั่วโมง เป็นตัวตั้งต้น และมีการการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นในวันชั่วโมงที่ 24 และ 48 ของการบ่มโดยเพิ่มอีก 10%(v/v), 15%(v/v) และ 20%(v/v) เพื่อการกำจัดสีออกจากสารละลายสีย้อมที่ผ่านการย้อมจริง ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.3 พบว่าการใช้แบคทีเรีย 20%(v/v) เพื่อกำจัดสีในชั่วโมงที่ 24 ของการบ่มให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดสี (วัดจากค่า OD) 65.45 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเติมปริมาณแบคทีเรียเพิ่มหลังชั่วโมงที่ 24 ของการบ่มอีก 20%(v/v) ให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีได้สูงสุดเท่ากับ 75.79 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ควรที่จะใช้แบคทีเรียในวันแรกของการบ่ม 20%(v/v) และเติมแบคทีเรียเพิ่มอีกในชั่วโมงที่ 24 ของการบ่มอีก 20%(v/v) จะทำให้ได้ประสิทธิภาพการกำจัดสี Reactive Black 5 ในสารละลายสีย้อมได้มากที่สุด และจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าการกำจัดสีของการเติมปริมาณแบคทีเรียเพิ่มอีกในชั่วโมงที่ 24 และ 48 ของการบ่มเป็นปริมาณ 10%(v/v), 15%(v/v) และ 20%(v/v) พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกการเติมแบคทีเรีย 20%(v/v) ที่ 0 ชั่วโมง และมีการเติมแบคทีเรียเพิ่มอีก 20%(v/v) ที่ 24 ชั่วโมง เพราะว่าภาวะนี้ให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีสูงที่สุด โดยจะนำภาวะนี้ไปทำการทดลองในขั้นต่อไป คือ การกำจัดสีในสารละลายสีย้อมด้วยแบคทีเรียโดยวัดค่าความเข้มข้นของสีในสารละลายสีต่อไป แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียจำเป็นต้องเพิ่มอาหารเลี้ยงแบคทีเรียด้วยซึ่งทำให้ต้องเพิ่มต้นทุนการกำจัดสีเช่นกัน จึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนางานวิจัยต่อไปเพื่อลดต้นทุนในเรื่องอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย เช่น การหาชนิดและปริมาณของอาหารที่เหมาะสมอื่นๆ เพื่อช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่จะใช้ในการกำจัดสีในน้ำเสีย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.2.3 สรุปผลการกำจัดสีในสารละลายสีย้อมด้วยแบคทีเรีย

จากผลการทดลองทั้งหมดในข้อ 4.3 (รูปที่ 4.2 และ 4.3) สามารถสรุปผลการกำจัดสี Reactive Black 5 (วัดจากค่า OD) ด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ดังแผนภาพที่ 4.1



แผนภาพที่ 4.1 แสดงเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 ด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ที่ได้ผลดีที่สุดในการศึกษาปริมาณและวิธีการใช้แบคทีเรียที่เหมาะสมเมื่อบ่มเป็นเวลาทั้งหมด 6 วัน

จากแผนภาพที่ 4.1 แสดงผลสรุปเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 ในสารละลายสี (วัดจากค่าOD) ด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* เป็นเวลา 6 วันหรือ 144 ชั่วโมง พบว่าการทดลองใช้ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น 20%(v/v) ในชั่วโมงที่ 0 ของการบ่ม และเติมเพิ่มอีก 20%(v/v) ในที่ 24 ชั่วโมงของการบ่ม แสดงผลเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีได้สูงที่สุดที่ 75.79 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นได้นำสารละลายสีหลังการบ่มกับแบคทีเรียเป็นเวลา 1-6 วัน ไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสีย้อม Reactive Black 5 หลังการบ่ม เทียบกับความเข้มข้นของสีก่อนการบ่ม และคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีจากค่าความเข้มข้นของสีที่ได้จากการวิเคราะห์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.3 ผลการกำจัดสีในสารละลายสีย้อมด้วยแบคทีเรียโดยวัดค่าความเข้มข้นของสีในสารละลายสี

4.3.1 ผลของทำกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายย้อม Reactive Black 5

ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสีย้อมในสารละลายสีจำเป็นต้องสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร สำหรับสีย้อม Reactive Black 5 เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสีในสารละลายสีย้อมจากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลาย ซึ่งจะอยู่ในภาคผนวก ก

กราฟมาตรฐานจะถูกนำมาใช้อ้างอิงสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดสี Reactive Black 5 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสีย้อมทั้งก่อนและหลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย และคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมก่อนและหลังการกำจัดสีเปรียบเทียบกัน เพื่อนำค่าความเข้มข้นของสารละลายสีมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีด้วยแบคทีเรียต่อไป

4.3.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมหลังการย้อม

ในขั้นตอนการเตรียมสารละลายสีย้อมเพื่อย้อมผ้าฝ้าย ได้เตรียมสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ที่มี Na_2CO_3 5.33 กรัมต่อลิตร และ NaOH (36 °Be´) 4 มิลลิลิตรต่อลิตร อยู่ในสารละลายสีหลังการย้อมผ้าฝ้าย สารละลายสีย้อมที่เหลือจากการย้อมถูกปรับพีเอชเป็น 8 และถูกเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM) หรือด้วยน้ำ ให้ความเข้มข้นลดลงหรือใกล้เคียงกับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร และคำนวณหาความเข้มข้นจริงของสารละลายสีต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

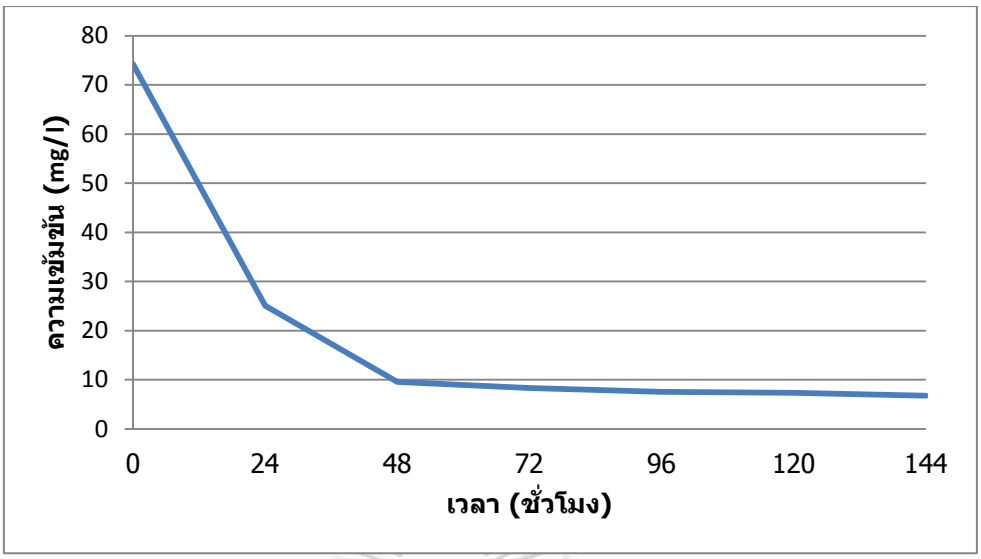
ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมหลังย้อมที่ก่อนและหลังปรับค่าพีเอชเป็น 8 และเจือจางด้วยอาหาร MSM และด้วยน้ำ

สารละลายสีย้อมหลังย้อม	ความเข้มข้นของสารละลายสีย้อม
ก่อนปรับค่าพีเอช	7.147 g/l
หลังปรับค่าพีเอชเป็น 8	6.931 g/l
หลังปรับพีเอชเป็น 8 , เจือจางด้วย MSM	95.23 mg/l
หลังปรับพีเอชเป็น 8 , เจือจางด้วย H_2O	93.73 mg/l
หลังปรับพีเอชเป็น 8 , เจือจางด้วย MSM และเติมแบคทีเรียไป 20%(v/v)	74.28 mg/l
หลังปรับพีเอชเป็น 8 , เจือจางด้วย H_2O และเติมแบคทีเรียไป 20%(v/v)	75.09 mg/l

หมายเหตุ ความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมก่อนย้อม คือ 10 g/l

4.3.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการกำจัดสารละลายสีย้อมในภาวะที่ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium)

ในขั้นตอนนี้จะใช้ภาวะการกำจัดสีตามข้อ 3.3.3 คือใช้ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น 20%(v/v) ที่ชั่วโมงที่ 0 และเติมเพิ่มอีก 20%(v/v) ในชั่วโมงที่ 24 ของการบ่ม ที่ภาวะหยุดนิ่ง อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 144 ชั่วโมงหรือ 6 วัน โดยความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมในแต่ละวันของการบ่ม ถูกวิเคราะห์จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตรของสี Reactive Black 5 และคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารละลายสีจากกราฟมาตรฐาน และได้ผลความเข้มข้นของสารละลายสีก่อนและหลังบ่มด้วยแบคทีเรียเป็นเวลา 1-6 วัน ตามรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 ความเข้มข้นของสี Reactive Black 5 ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) ที่ผ่านการกำจัดสีด้วย *Pseudomonas aeruginosa* เป็นเวลา 1-6 วัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

จากตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 ที่ผสมกับอาหาร MSM ก่อนการกำจัดสีด้วยแบคทีเรียมีความเข้มข้นที่ 95.237 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าหลังจากที่เติมแบคทีเรียไป 20% (v/v) จะทำให้สีมีความเข้มข้นเหลือ 74.28 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อบ่มกับแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของสารละลายสีมีค่าลดลงเหลือ 25.07 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังบ่มไป 48 ชั่วโมง สารละลายสีย้อมเหลือความเข้มข้น 9.58 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่ม 72 ชั่วโมง ความเข้มข้นสารละลายสีย้อมเหลือความเข้มข้น 8.29 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นความเข้มข้นสารละลายสีค่อนข้างคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 144 หรือวันที่ 6 มีความเข้มข้นเหลือ 6.78 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งลักษณะของสารละลายสีในวันที่ 6 ของการบ่มจะมีสีดำอ่อนๆ จางลงมากจากก่อนการบ่ม การลดลงของความเข้มข้นสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 หลังการบ่มกับแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* โดยแบคทีเรียจะทำลายพันธะเอโซที่อยู่ในโครงสร้างของสีรีแอกทีฟให้เปลี่ยนเป็นสารแอมีน และย่อยสลายสารแอมีนเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งอาหาร เช่น ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการเจริญเติบโต [37] โดยกลไกการย่อยสลายสี Reactive Black 5 ด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* มีแสดงในหัวข้อที่ 4.4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เมื่อได้ค่าความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมเมื่อทำการบ่มด้วยแบคทีเรีย หลังจากนั้นจะมีการนำมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ในการกำจัดสี และสมการคิดเปอร์เซ็นต์ในการกำจัดสีมีดังต่อไปนี้

$$\%\text{การกำจัดสี} = \frac{(\text{ค่าความเข้มข้นก่อนการบ่มแต่ละวัน} - \text{ค่าความเข้มข้นหลังการบ่มแต่ละวัน}) \times 100}{\text{ค่าความเข้มข้นก่อนการบ่มแต่ละวัน}}$$

หมายเหตุ : ค่าความเข้มข้นก่อนการบ่มแต่ละวัน คือ ค่าความเข้มข้น blank ของสารละลายสีที่ผสมกับ MSM ที่วัดได้ในทุกๆวัน

ค่าความเข้มข้นหลังการบ่มแต่ละวัน คือ ค่าความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมที่ผสมกับ MSM ที่ผ่านการบ่มด้วยแบคทีเรียที่วัดได้ในทุกๆวัน

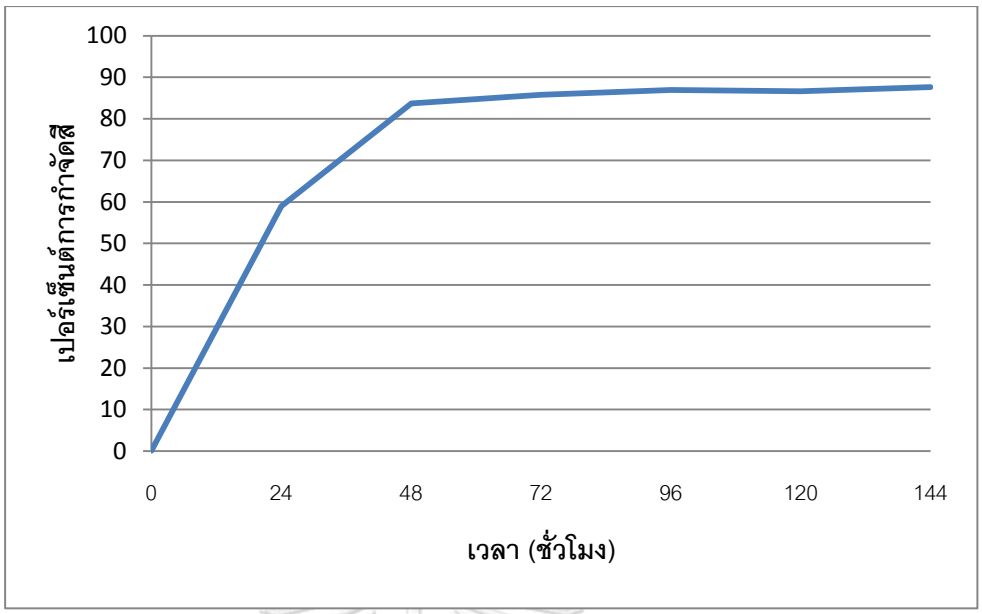
ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของ blank สำหรับสารละลายสีย้อมผสมกับ MSM ที่วัดได้ (0-144 ชั่วโมง)

เวลา(ชั่วโมง)	ค่าความเข้มข้นของ blank
0	74.28
24	61.04
48	58.74
72	58.3
96	57.71
120	55.16
144	54.78

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จากค่าความเข้มข้นของ blank ในตารางที่ 4.3 นั้นจะมีการเติม MSM เพิ่มไป 20%(v/v) ชั่วโมงที่ 0 และ 24 ของปริมาณ blank ทั้งหมด เพื่อให้สอดคล้องกับปริมาณกับเติมแบคทีเรียลงไป จะเป็นการแก้ปัญหาการเจือจางของแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารเหลว NB เมื่อนำไปใส่ในสารละลายสีย้อม

เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีตามสูตรข้างต้นแล้วจะนำไปสร้างกราฟดังรูปที่ 4.5 ซึ่งเป็นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการบ่มของแบคทีเรียและเปอร์เซ็นต์ในการกำจัดสี

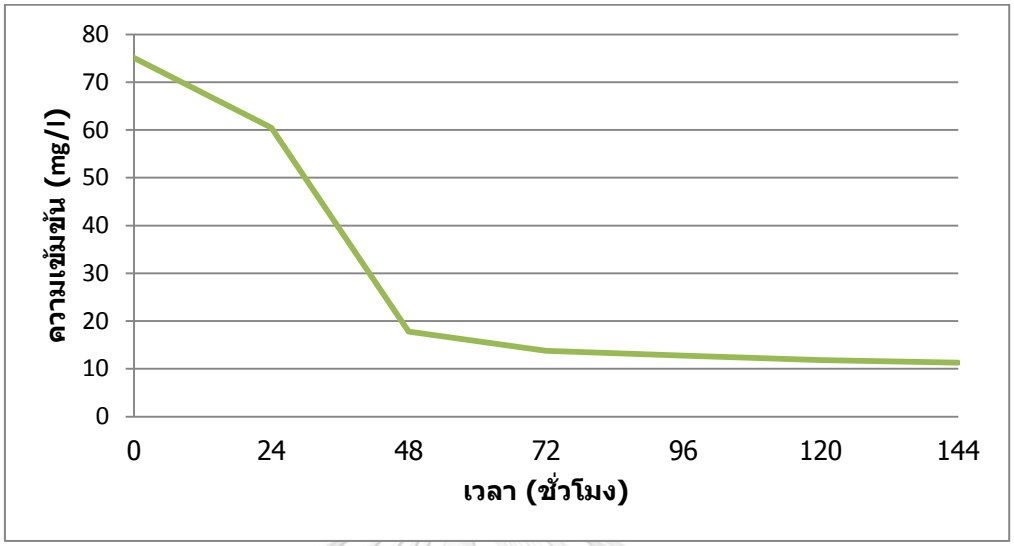


รูปที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 ด้วย *Pseudomonas aeruginosa* ที่มีอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) บ่มที่ภาวะหยุดนิ่ง อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-6 วัน

จากรูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 ที่ผสมกับอาหาร MSM พบว่าหลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์ในการกำจัดสี มีค่า 58.94 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 48 ชั่วโมง มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 83.68 เปอร์เซ็นต์ และในเวลา 72 ชั่วโมง มีค่าเพิ่มขึ้นไปอีก 85.78 หลังจากนั้นเปอร์เซ็นต์ในการกำจัดสีค่อนข้างคงที่ จนถึงชั่วโมงที่ 144 หรือวันที่ 6 มีค่า 87.61 เปอร์เซ็นต์ โดยจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีได้ดีตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรก ใช้เวลาในกำจัดสีค่อนข้างที่จะรวดเร็ว ซึ่งจะดูได้จากในวันแรกก็สามารถกำจัดสีได้ถึง 58.94 เปอร์เซ็นต์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.3.4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการกำจัดสารละลายสีย้อมในภาวะที่ผสมกับน้ำ



รูปที่ 4.6 ความเข้มข้นของสี Reactive Black 5 ผสมน้ำ ที่ผ่านการกำจัดสีด้วย *Pseudomonas aeruginosa* เป็นเวลา 1-6 วัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

จากตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 ที่ผสมกับน้ำก่อนการกำจัดสีด้วยแบคทีเรียมีความเข้มข้นที่ 93.733 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าหลังจากที่เติมแบคทีเรียไป 20%(v/v) จะทำให้มีเหลือความเข้มข้น เมื่อบ่มกับแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชั่วโมงความเข้มข้นสารละลายสีลดลงเหลือ 60.47 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังบ่มไป 48 ชั่วโมง สารละลายสีย้อมเหลือความเข้มข้น 17.80 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่ม 72 ชั่วโมง ความเข้มข้นสารละลายสีย้อมเหลือความเข้มข้น 13.76 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นความเข้มข้นสารละลายสีย้อมค่อนข้างคงที่จนถึง 144 ชั่วโมงหรือวันที่ 6 มีความเข้มข้นเหลือ 11.30 มิลลิกรัมต่อลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เมื่อได้ค่าความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมเมื่อทำการบ่มด้วยแบคทีเรีย หลังจากนั้นจะมีการนำมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ในการกำจัดสี และสมการคิดเปอร์เซ็นต์ในการกำจัดสีมีดังต่อไปนี้

$$\%\text{การกำจัดสี} = \frac{(\text{ค่าความเข้มข้นก่อนการบ่มแต่ละวัน} - \text{ค่าความเข้มข้นหลังการบ่มแต่ละวัน}) \times 100}{\text{ค่าความเข้มข้นก่อนการบ่มแต่ละวัน}}$$

หมายเหตุ : **ค่าความเข้มข้นก่อนการบ่มแต่ละวัน** คือ ค่าความเข้มข้น blank ของสารละลายสีย้อมที่ผสมกับน้ำที่วัดได้ในทุกๆวัน

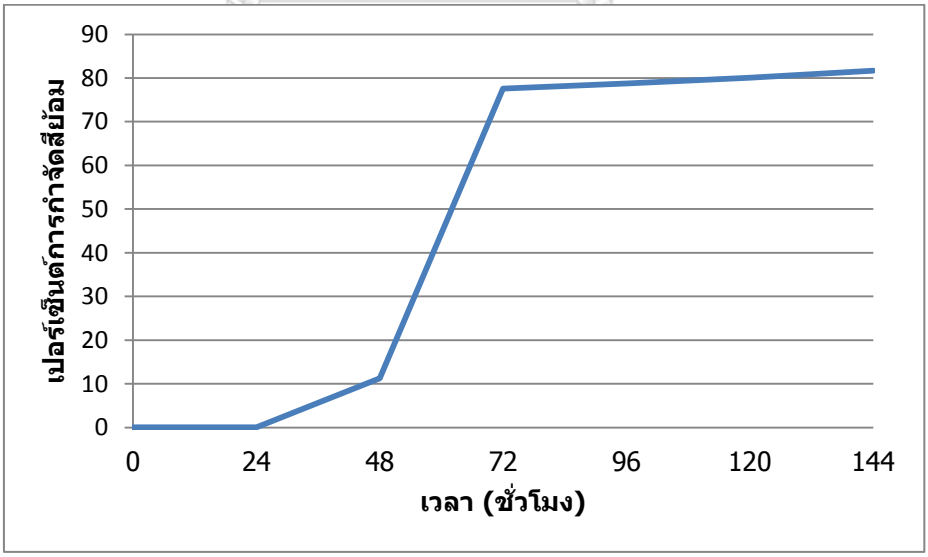
ค่าความเข้มข้นหลังการบ่มแต่ละวัน คือ ค่าความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมที่ผสมกับน้ำที่ผ่านการบ่มด้วยแบคทีเรียที่วัดได้ในทุกๆวัน

ตารางที่ 4.4 ความเข้มข้นของ blank สำหรับสารละลายสีย้อมผสมกับ MSM ที่วัดได้ (0-144 ชั่วโมง)

เวลา(ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของ blank
0	75.09
24	68.14
48	61.54
72	61.38
96	60.18
120	59.5
144	61.64

จากค่าความเข้มข้นของ blank ในตารางที่ 4.4 นั้นจะมีการเติมน้ำเพิ่มไป 20%(v/v) ชั่วโมงที่ 0 และ 24 ของปริมาณน้ำทั้งหมด เพื่อให้สอดคล้องกับปริมาณกับเติมแบคทีเรียลงไป จะเป็นการแก้ปัญหาการเจือจางของแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารเหลว NB เมื่อนำไปใส่ในสารละลายสีย้อม

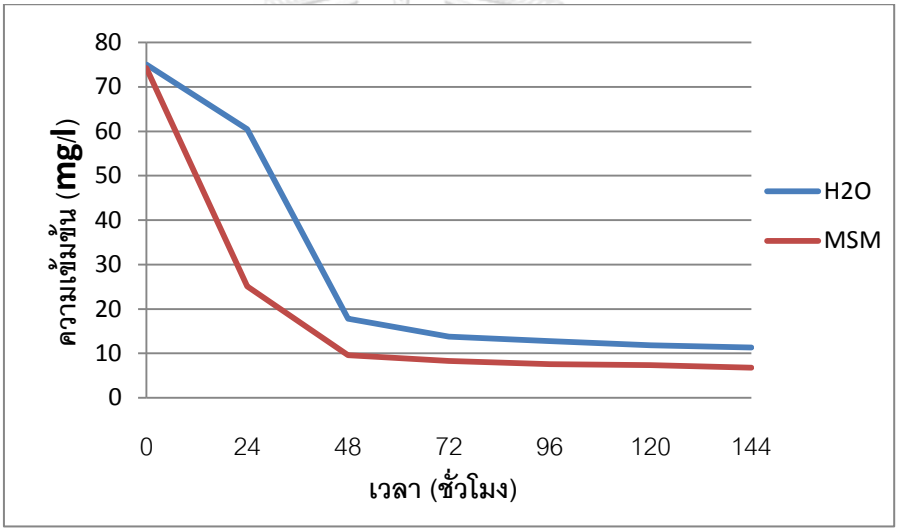
เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีตามสูตรข้างต้นแล้วจะนำไปสร้างกราฟดังรูปที่ 4.7 ซึ่งเป็นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการบ่มของแบคทีเรียและเปอร์เซ็นต์ในการกำจัดสี



รูปที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 ของ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ผสมน้ำ บ่มที่ภาวะหยุดนิ่ง อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-6 วัน

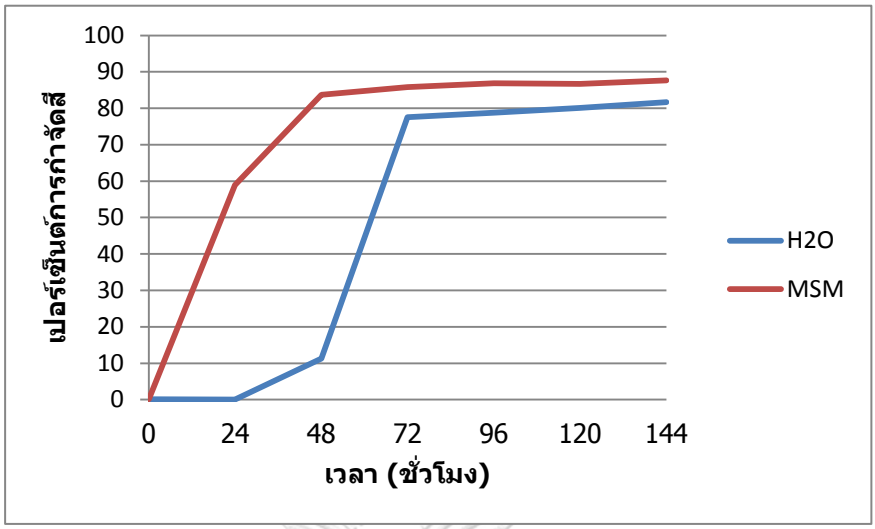
จากรูปที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 ที่ผสมน้ำ พบว่าหลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์ในการกำจัดสีมีค่า 0.06 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่สามารถที่จะกำจัดสีได้ในวันแรก แต่ในชั่วโมงที่ 48 มีค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีเพิ่มขึ้นเป็น 11.26 เปอร์เซ็นต์ และชั่วโมงที่ 72 มีค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีที่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด คือ 77.57 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นเปอร์เซ็นต์ในการกำจัดสีเริ่มที่จะคงที่ จนถึงชั่วโมงที่ 144 หรือวันที่ 6 มีค่า 81.67 เปอร์เซ็นต์ จะพบว่าแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีได้ดีในช่วงชั่วโมงที่ 72 ซึ่งใช้เวลาในกำจัดสีค่อนข้างช้า

4.3.5 การเปรียบเทียบผลการศึกษาประสทธิภาพของแบคทีเรียในการกำจัดสารละลายสีย้อมในภาวะที่ผสมกับอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย(MSM, mineral salt medium) กับสารละลายสีย้อมที่ผสมน้ำ



CHULALONGKORN UNIVERSITY

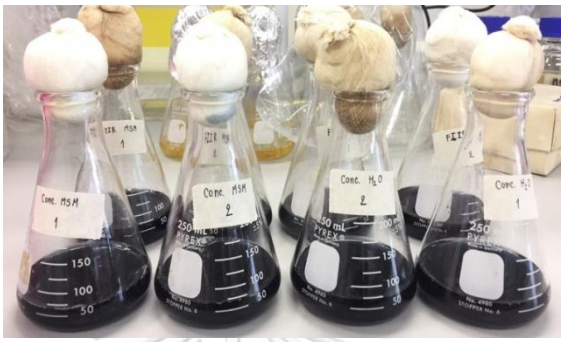
รูปที่ 4.8 เปรียบเทียบความเข้มข้นสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) กับที่ผสมน้ำ หลังการกำจัดสีด้วย *Pseudomonas aeruginosa* เป็นเวลา 1-6 วัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส



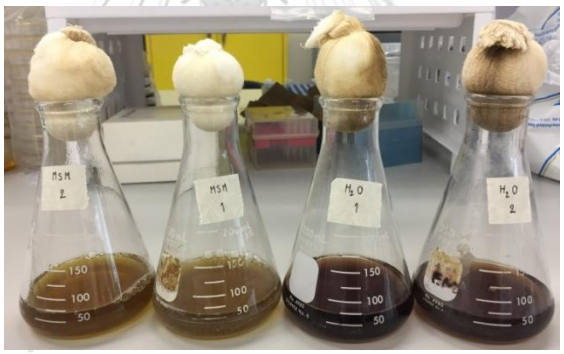
รูปที่ 4.9 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 ที่ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) และที่ผสมน้ำ หลังการกำจัดสีด้วย *Pseudomonas aeruginosa* เป็นเวลา 1-6 วัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 4.8 เป็นการเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของสีย้อม Reactive Black 5 ที่ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) กับที่ผสมน้ำ เมื่อบ่มด้วยกับแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* เป็นเวลา 1-6 วัน ที่แสดงผลแล้วในตารางที่ 4.1 พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถกำจัดสีได้ทั้งในภาวะที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อและไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ (มีแต่น้ำ) จากค่าความเข้มข้นของสารละลายสีที่ลดลงเมื่อบ่มในแบคทีเรียเป็นเวลา 1-6 วัน แต่การบ่มในภาวะที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้ความเข้มข้นของสารละลายสีลดลงมากกว่าการบ่มในภาวะที่ไม่มีอาหาร เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีด้วยแบคทีเรียเมื่อบ่มเป็นเวลา 1-6 วัน ในภาวะมีอาหารเลี้ยงเชื้อจึงมีค่ามากกว่าการบ่มในภาวะไม่มีอาหาร ดังแสดงในรูปที่ 4.9 นั้นคืออาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสีของแบคทีเรียให้ดีมากขึ้น อย่างไรก็ตามแบคทีเรียนี้สามารถย่อยสลายสี Reactive Black 5 ได้โดยไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ และสามารถใช้สีเป็นอาหารจากการย่อยสลายนี้ แต่การที่แบคทีเรียสามารถย่อยสลายสารละลายสี Reactive Black 5 ผสมกับ MSM ให้ผลที่ดีกว่า เนื่องมาจากแบคทีเรียแบคทีเรียดึงอาหาร MSM มาใช้ในการเจริญเติบโต จากงานวิจัยของ [38] ใช้สูตรอาหาร Glucose, $NH_4(SO_4)_2$, K_2HPO_4, KH_2PO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ และ NaCl ซึ่งเป็นสูตรเดียวกับงานวิจัยนี้ จะใช้แบคทีเรีย Bacillus Subtilis โดยการใช้ออกแบบ Plackett-Burman เพื่อวิเคราะห์สารประกอบใน MSM ทั้ง 6 ชนิดว่าชนิดไหนมีความสำคัญต่อกระบวนการกำจัดสี พบว่า $NH_4(SO_4)_2$ และ K_2HPO_4 มีความสำคัญน้อยที่สุด เพราะเมื่อใช้สารทั้งสองชนิดลงไป ทำให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีมีค่าลดลง จึงอาจจะมีการปรับเปลี่ยนสูตรอาหารโดยไม่ใช้สารทั้ง 2 ชนิด เพื่อเป็นการลดต้นทุนของการกำจัดได้ นอกจากนั้น

การที่สารละลายสีย้อมผสมกับน้ำสามารถที่จะกำจัดสีได้อาจเป็นเพราะว่าแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารเหลว NB ใช้อาหารเหลว NB นั้นในการเจริญเติบโต ถ้าจะนำแบคทีเรียไปใช้ในการกำจัดสีในภาวะจริง ความเข้มข้นของสีสูง อาจจะต้องมีการผสมกับ MSM เข้าไป



ก.) สารละลายสีย้อมผสมอาหาร MSM (สองขวดทางซ้ายมือ) และสารละลายสีย้อมผสมน้ำ (สองขวดทางขวามือ) ก่อนนำไปกำจัดสี



Chulalongkorn University

ข.) สารละลายสีย้อมผสมอาหาร MSM (สองขวดทางซ้ายมือ) และสารละลายสีย้อมผสมน้ำ (สองขวดทางขวามือขวามือ) หลังกำจัดสีเป็นเวลา 6 วัน

รูปที่ 4.10 ลักษณะสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 ก่อนและหลังบ่มแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียและน้ำเป็นเวลา 1-6 วัน

ลักษณะสารละลายสีย้อมที่บ่มด้วยแบคทีเรียเป็นเวลา 1-6 วัน พบว่าในวันแรกของการบ่มในแบคทีเรีย สารละลายสีย้อมผสม MSM จะเริ่มที่จะเปลี่ยนสีจากสีดำอมน้ำเงินกลายเป็นสีน้ำตาลเข้ม ส่วนสารละลายสีย้อมผสมน้ำไม่มีการเปลี่ยนสีใดๆ แต่เมื่อบ่มในแบคทีเรียเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สารละลายสีย้อมผสมน้ำเริ่มมีการเปลี่ยนสีจากสีดำอมน้ำเงินกลายเป็นสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งสอดคล้องกับค่าความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์ในการกำจัดสีดังที่ได้บรรยายไปแล้วในข้างต้น

4.4 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสีหลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย

4.4.1 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR

การเตรียมตัวอย่างในขั้นตอนนี้จะเตรียมตัวอย่างจากภาวะการกำจัดสีตามข้อ 3.3.3 คือ จะใช้ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น 20%(v/v) ในชั่วโมงที่ 0 และเติมเพิ่มอีก 20%(v/v) ในชั่วโมงที่ 24 ที่ภาวะหยุดนิ่ง อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 1-6 วัน หลังจากนั้นจะนำตัวอย่างที่ได้จากการบ่ม 6 วันไปทำแห้งเยือกแข็ง (freeze dry) ดังรูปที่ 4.11 เพื่อที่จะทำให้ตัวอย่างเป็นของแข็งเพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสีด้วยเทคนิค ATR-FTIR ต่อไป

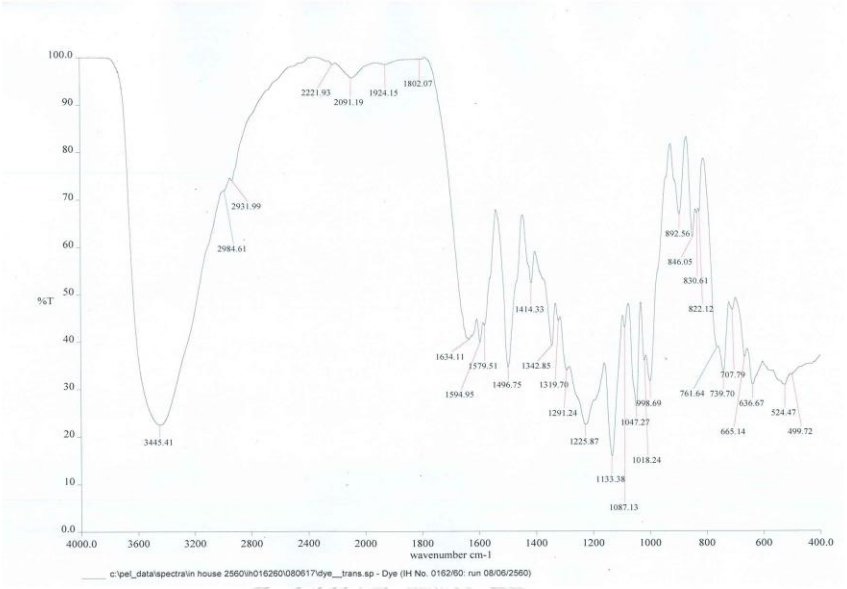
รูป 4.12-4.15 แสดง ATR-FTIR สเปกตรัมหมู่ฟังก์ชันของสีทั้งก่อนและหลังการบ่มในแบคทีเรียเพื่อกำจัดสีเป็นเวลา 6 วัน

ก.) ลักษณะตัวอย่างผงสีก่อนบ่มในแบคทีเรีย

ข.) ลักษณะตัวอย่างผงสีหลังบ่มในแบคทีเรียเป็นเวลา 6 วัน

รูปที่ 4.11 ลักษณะผงสีย้อมก่อนและหลังการบ่มเพื่อกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย เมื่อผ่านการทำแห้งเยือกแข็ง

4.4.1.1 ผลการวิเคราะห์ผงสี Reactive Black 5



รูปที่ 4.12 ลักษณะ FTIR สเปกตรัมแสดงหมู่ฟังก์ชันของผงสี Reactive Black 5 ในช่วงเลขคลื่น 400-4000 cm^{-1}

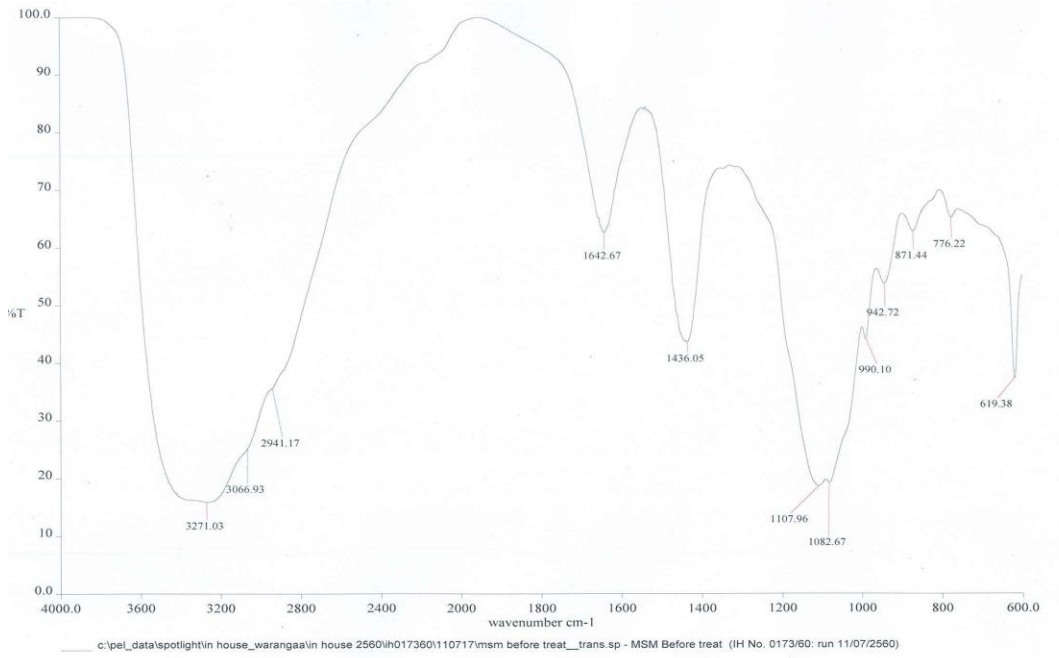
จาก IR Spectrum ของผงสี Reactive Black 5 ที่แสดงในรูป 4.12 ในช่วงเลขคลื่น 400-4000 cm^{-1} ได้พีคที่ปรากฏที่เลขคลื่นดังตารางที่ 4.5 ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันต่างๆในสี Reactive Black 5

ตารางที่ 4.5 เลขคลื่นของพีคที่ปรากฏใน IR Spectrum ของผงสี Reactive Black 5

เลขคลื่น (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน
761.64-499.72	Aromatic ring
998.69-707.79	=C-H aromatics และ N-H aliphatic amines
739.70	Substituted benzene
1291.24-1018.24	C-O ethers และ C-OH alcohols
1496.75-1319.70	CH_2 aliphatic groups
1496.75-1414.13	N=N azo bonds
1634.11-1579.51	C=C aromatics, C=N aromatics และ N-H amines
2984.61	CH_2 aliphatic groups
3445.41	O-H alcohols และ N-H amines

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.4.1.2 ผลการวิเคราะห์สี Reactive Black 5 ผสมกับอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) ก่อนการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย



รูปที่ 4.13 ลักษณะ FTIR สเปกตรัมแสดงหมู่ฟังก์ชันของสี Reactive Black 5 ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) ก่อนการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย ในช่วงเลขคลื่น 600-4000 cm^{-1}

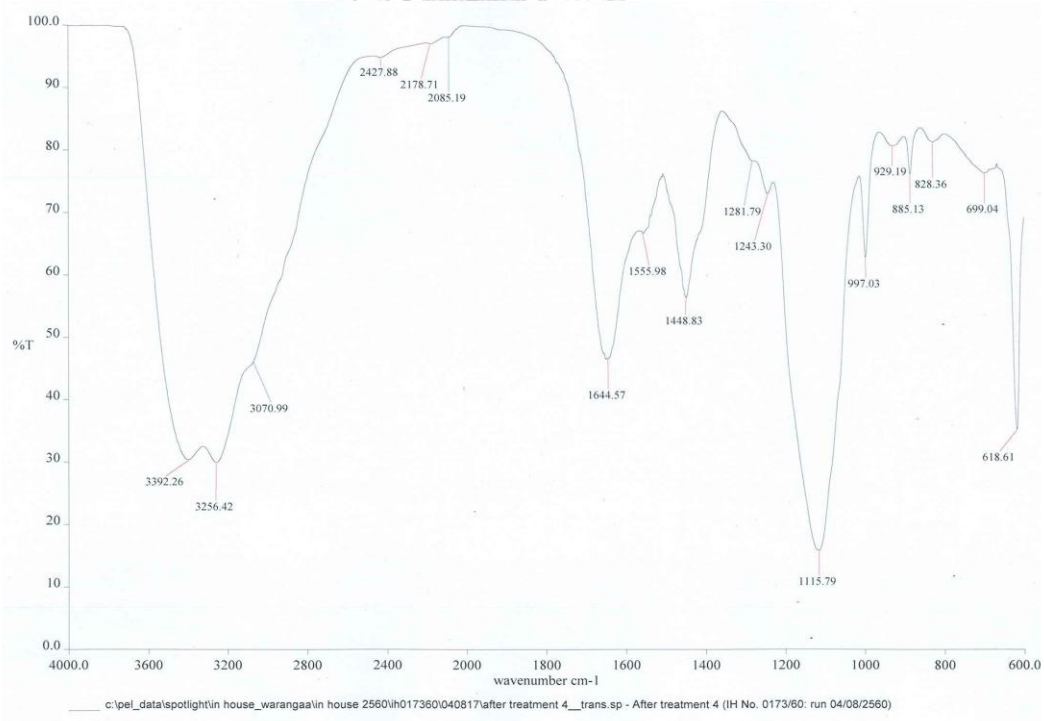
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จาก IR Spectrum ของสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) ก่อนการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย ที่แสดงในรูป 4.13 ในช่วงเลขคลื่น 600-4000 cm^{-1} ได้พีคที่ปรากฏที่เลขคลื่นดังตารางที่ 4.6 ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันต่างๆในสีผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรียก่อนการกำจัดสี

ตารางที่ 4.6 เลขคลื่นของพีคที่ปรากฏใน IR Spectrum ของสี Reactive Black 5 ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรียก่อนการกำจัดสี

เลขคลื่น (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน
776.22-619.38	Aromatic ring
990.10-650	=C-H aromatics และ N-H aliphatic amines
776.22	Substituted benzene
1436.05	CH_2 aliphatic groups
1436.05	N=N azo bonds
1642.67	C=C aromatics, C=N aromatics และ N-H amines
3271.03	O-H alcohols และ N-H amines

4.4.1.3 ผลการวิเคราะห์สี Reactive Black 5 ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) หลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย



รูปที่ 4.14 ลักษณะ FTIR สเปกตรัมแสดงหมู่ฟังก์ชันของสี Reactive Black 5 ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) หลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย ในช่วงเลขคลื่น 600-4000 cm^{-1}

จาก IR Spectrum ของสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) หลังกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย ที่แสดงในรูป 4.14 ในช่วงความยาวคลื่น 600-4000 cm^{-1} ได้พีคที่ปรากฏที่เลขคลื่นดังตารางที่ 4.7 ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันต่างๆสีผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) หลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย

ตารางที่ 4.7 เลขคลื่นของพีคที่ปรากฏใน IR Spectrum ของสี Reactive Black 5 ผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรียหลังการกำจัดสี

เลขคลื่น (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชันที่เปลี่ยนแปลงไป
828.36-699.04	Substituted benzene ลดลง
1448.83	N=N azo bonds ลดลงมาก
1644.57	C=O เพิ่มขึ้น
3392.26-3070.99	N-H amines ลดลง

4.4.1.4 ผลการวิเคราะห์สี Reactive Black 5 ก่อนและหลังการบ่มในแบคทีเรียเป็นเวลา 6 วัน เพื่อการกำจัดสี

ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสีย้อมก่อนและหลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรียหลังจากการบ่มเป็นเวลา 6 วัน โดย ATR-FTIR แสดงดังรูปที่ 4.14-4.15 ตามลำดับ หมู่ฟังก์ชั่นของสีหลังบ่มด้วยแบคทีเรียที่ภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 6 วัน(รูปที่ 4.15) เมื่อเทียบความสูงของแต่ละพีคในสเกลที่เท่ากันพบว่า พีคที่ 3392.26-3070.99 cm^{-1} (N-H) ลดลงจากสีก่อนการบ่ม และพบพีคที่ 1644.57 cm^{-1} (C=O) เพิ่มขึ้น รวมทั้งการลดลงของพีคที่ 1448.83 cm^{-1} (N=N) ด้วยซึ่งเป็นหมู่เอโซ แสดงว่าสีถูกย่อยสลายด้วยแบคทีเรียที่ตำแหน่งเอโซซึ่งเป็นหมู่โคโมฟอร์ของสีให้เกิดเป็นหมู่แอมิโน ($-NH_2$) ทำให้เฉดสีในสารละลายสีย้อมหลังการบ่มมีสีอ่อนลง และพีคที่ 828.36-699.04 cm^{-1} (substituted benzene) ก็ลดลงด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bouraie [32] ที่ศึกษาการกำจัดสี Reactive Black 5 ด้วยแบคทีเรียเช่นกัน

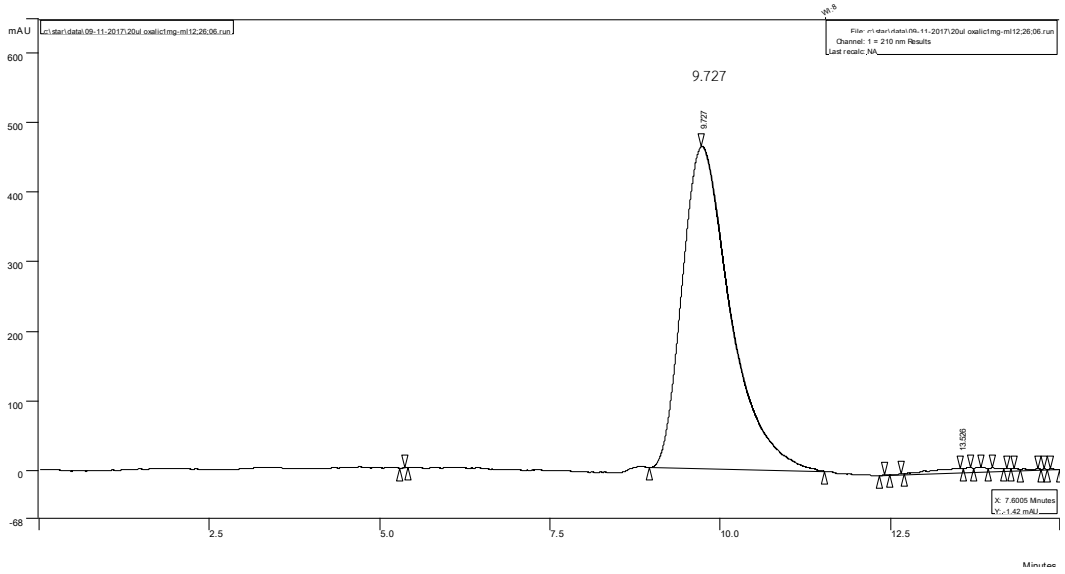
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.4.2 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

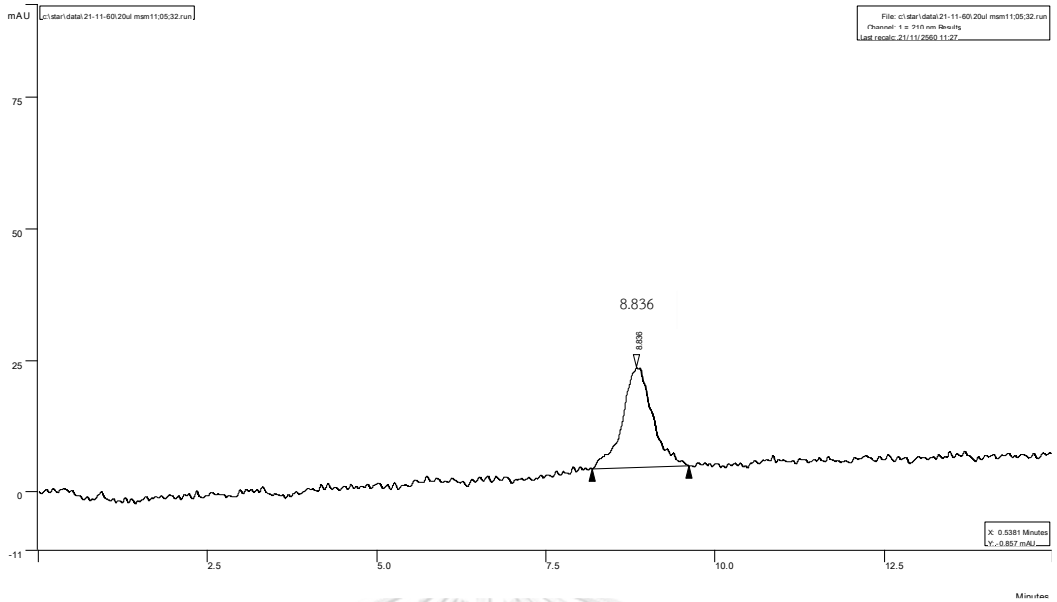
ในเบื้องต้นของการวิเคราะห์สารละลายกรดออกซาลิก อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย และสารละลายสี Reactive Black 5 (ก่อนกำจัดสี) ถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เพื่อหาช่วงระยะเวลาที่สารเหล่านี้แสดงตัว (retention time, นาที) ในโครมาโตแกรม เพื่อใช้เป็นโครมาโตรแกรมมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบกับโครมาโตรแกรมของสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 ที่ถูกกำจัดสีด้วยแบคทีเรียเป็นเวลา 1-6 วัน แสดงผลดังต่อไปนี้

4.4.2.1 โครมาโตแกรมของสารละลายกรดออกซาลิก อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย และสารละลายสี Reactive Black 5 (ก่อนการกำจัดสี)

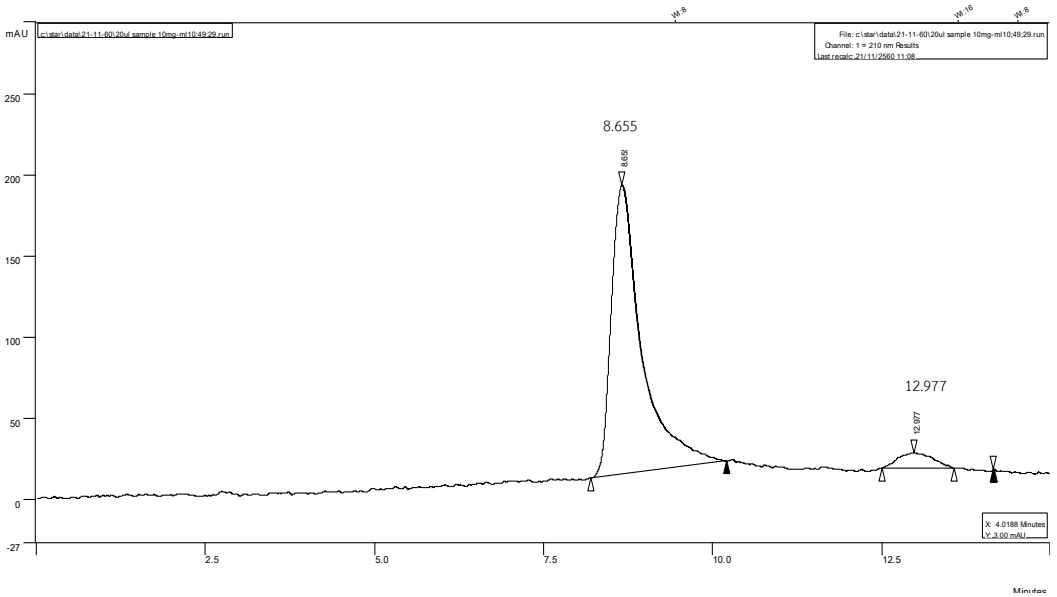
จากโครมาโตแกรมในรูปที่ 4.15-4.17 แสดงให้เห็นว่า retention time ของสารละลายกรดออกซาลิก, อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย MSM และสารละลายสี Reactive Black 5 อยู่ที่ 9.727 นาที, 8.836 นาที และ 8.665, 12.977 นาที ตามลำดับ



รูปที่ 4.15 HPLC โครมาโตแกรมของสารละลายกรดออกซาลิก

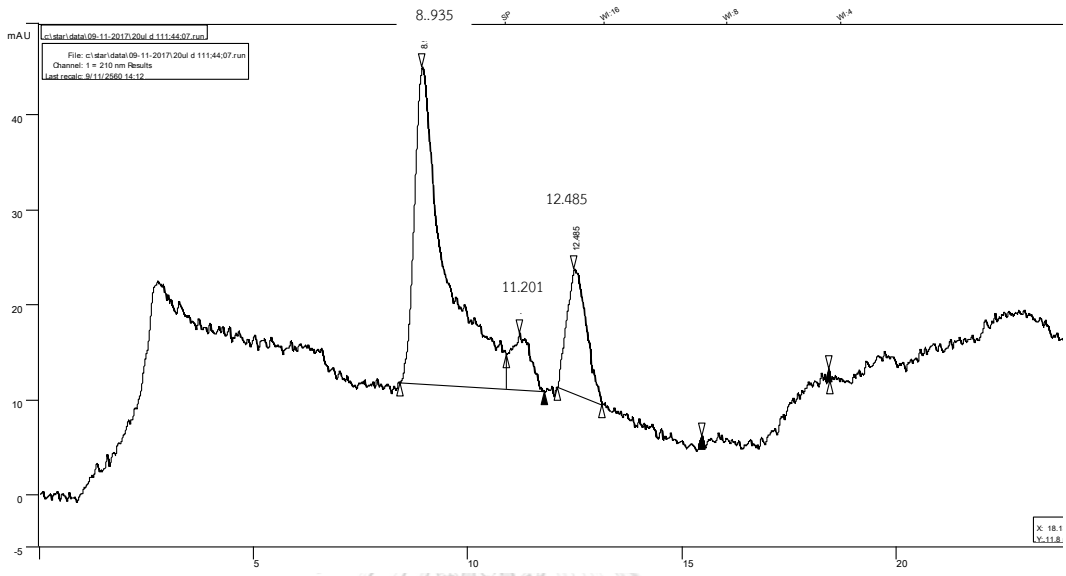


รูปที่ 4.16 HPLC โครมาโตแกรมของอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย MSM



รูปที่ 4.17 HPLC โครมาโตแกรมของสารละลายสี Reactive Black 5 ก่อนการกำจัดสี

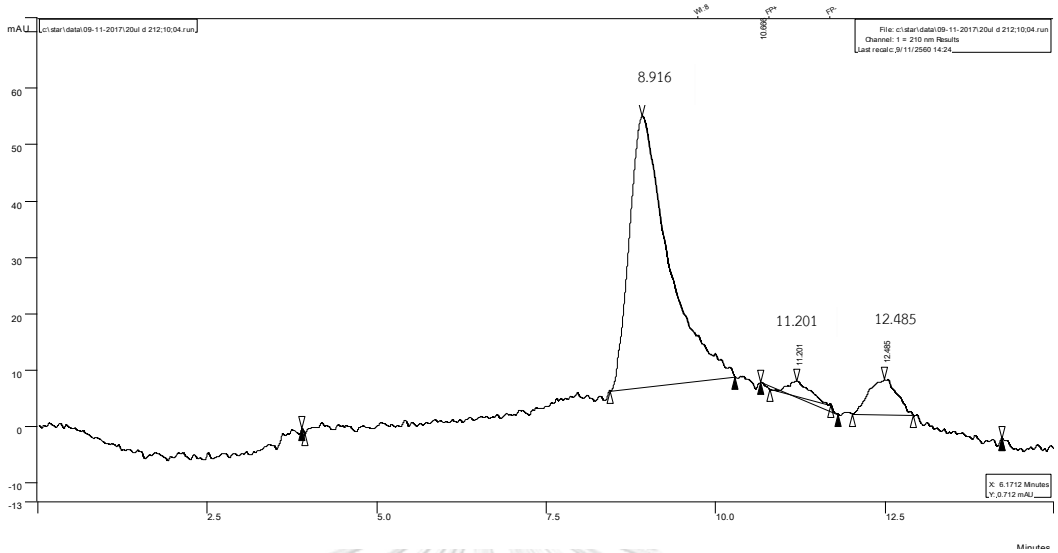
4.4.2.2 โครมาโตแกรมของสารละลายสี Reactive Black 5 หลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย เป็นเวลา 1-6 วัน



รูปที่ 4.18 HPLC โครมาโตแกรมของสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 หลังการกำจัดสีเป็นเวลา 1 วัน

จากรูปที่ 4.18 แสดงค่า retention time (t_R) ของสารละลายสีย้อมหลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรียเป็นเวลา 1 วัน และเมื่อเปรียบเทียบกับในรูปที่ 4.15-4.17 พบว่า ค่า retention time (t_R) ที่ 8.935 นาที คือ สารละลายสี Reactive Black 5 และอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย MSM และค่า retention time (t_R) ที่ 12.485 นาที คือ สารละลายสี Reactive Black 5

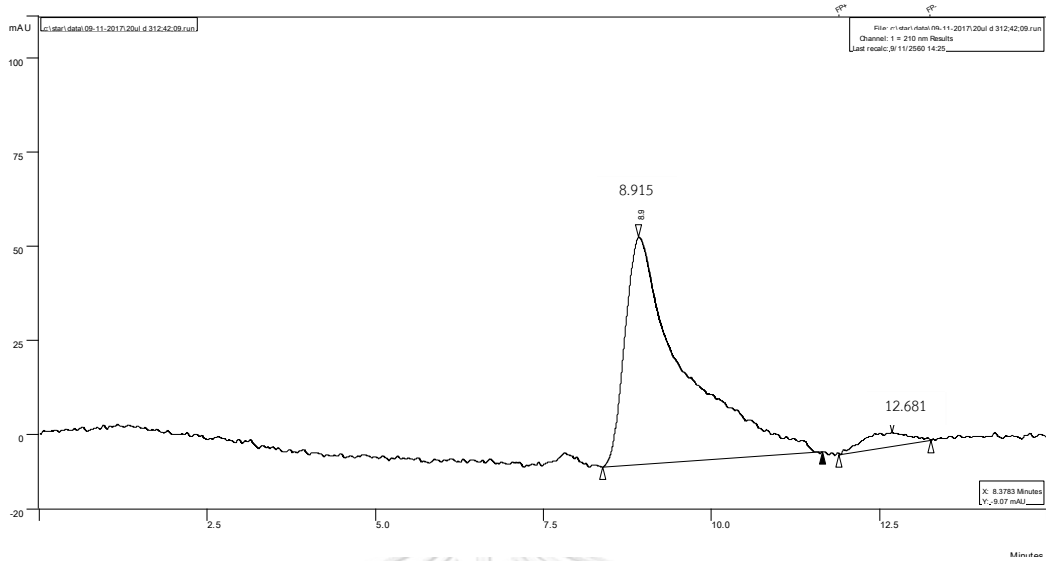
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4.19 HPLC โครมาโตแกรมของสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 หลังการกำจัดสีเป็นเวลา 2 วัน

จากรูปที่ 4.19 แสดงค่า retention time (t_R) ของสารละลายสีย้อมหลังการกำจัดสีเป็นเวลา 2 วัน และพบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับรูปที่ 4.15-4.17 พบว่าค่า retention time (t_R) ที่ 8.916 นาที คือ สารละลายสี Reactive Black 5 และอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย MSM และค่า retention time (t_R) ที่ 12.485 นาที คือ สารละลายสี Reactive Black 5 ซึ่งพีคความสูงของสารละลายสี Reactive Black 5 มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับพีคของสารละลายสี เมื่อดูการกำจัดสีในวันแรก เนื่องมาจากเกิดจากการย่อยสลายสีของแบคทีเรีย

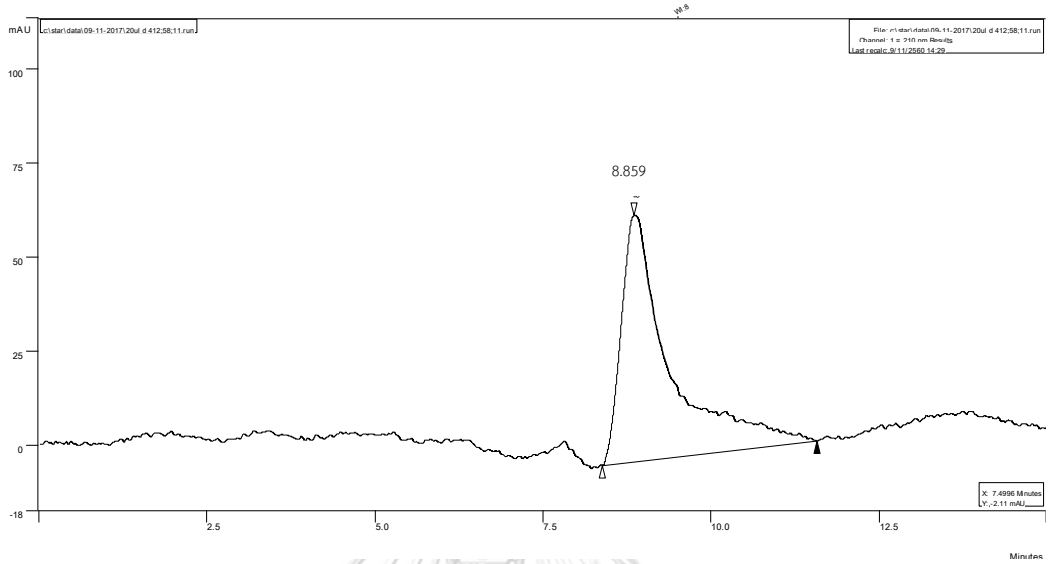
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4.20 HPLC โครมาโตแกรมของสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 หลังการกำจัดสีเป็นเวลา 3 วัน

จากรูปที่ 4.20 แสดงค่า retention time (t_R) ของสารละลายสีย้อมหลังการกำจัดสีเป็นเวลา 3 วัน และเมื่อเปรียบเทียบกับรูปที่ 4.15-4.17 พบว่าค่า retention time (t_R) ที่ 8.916 นาที คือ สารละลายสี Reactive Black 5 และอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย MSM และค่า retention time (t_R) ที่ 12.681 นาที คือ สารละลายสี Reactive Black 5 ซึ่งความสูงของพีคสารละลายสี Reactive Black 5 มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับพีคของสารละลายสี เมื่อถูกกำจัดสีในวันแรกและวันที่สอง เนื่องมาจากเกิดจากการย่อยสลายสีของแบคทีเรียรวมถึงแบคทีเรีย

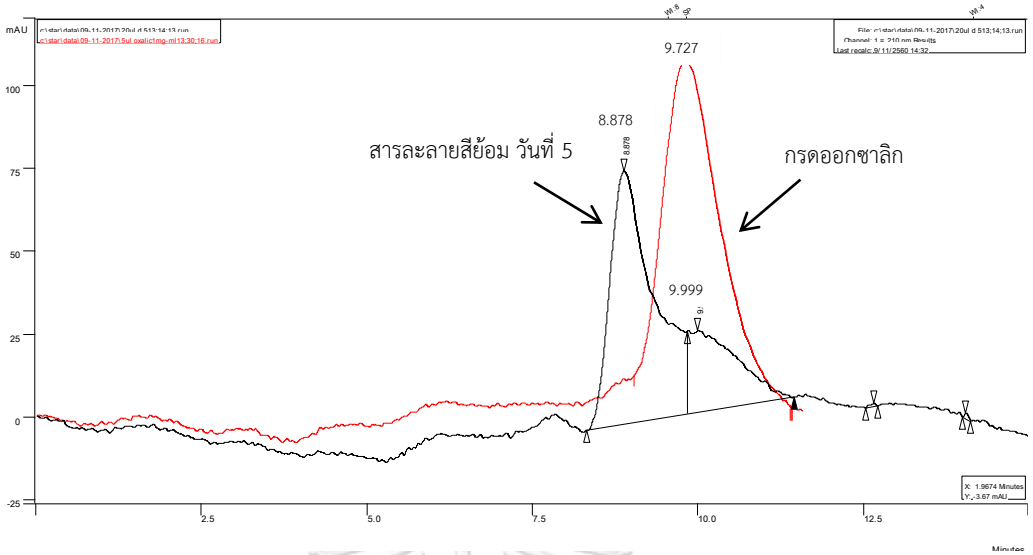
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 4.21 HPLC โครมาโตแกรมของสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 หลังการกำจัดสีเป็นเวลา 4 วัน

จากรูปที่ 4.21 แสดงค่า retention time (t_R) ของสารละลายสีย้อมหลังการกำจัดสีเป็นเวลา 4 วัน และเมื่อเปรียบเทียบกับรูปที่ 4.15-4.17 พบว่ามีค่า retention time (t_R) ค่าเดียว 8.859 นาที คือ สารละลายสี Reactive Black 5 และอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย MSM ส่วนค่า retention time (t_R) ที่ประมาณ 12 เกือบหายไปซึ่งเมื่อเทียบกับรูปที่ 4.16 ก็คือโครมาโตแกรมของสารละลายสี Reactive Black 5 จึงบ่งบอกได้ว่าแบคทีเรียได้ทำการย่อยสลายสีได้จริง ซึ่งในระหว่างกระบวนการย่อยสลายสีด้วยแบคทีเรียอาจจะมีการเปลี่ยนโครงสร้างของสีไปเป็นสารชนิดอื่น เช่น สารแอมีน (แสดงผลในการวิเคราะห์ FTIR) และทำให้ความเข้มข้นของสารละลายสีลดลง

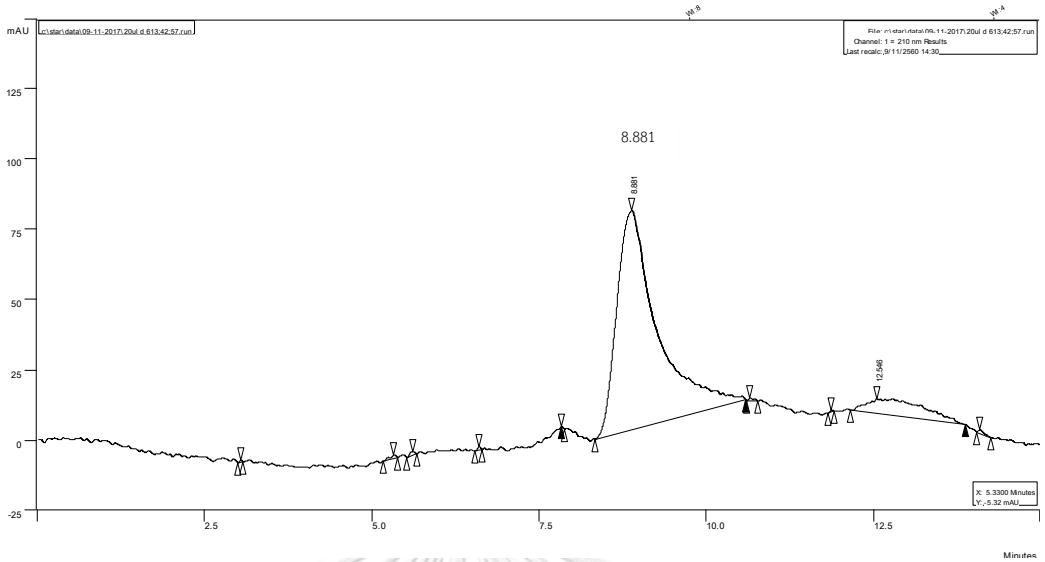
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 4.22 HPLC โครมาโตแกรมของสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 หลังการกำจัดสีเป็นเวลา 5 วันและของสารละลายกรดออกซาลิก

จากรูปที่ 4.22 แสดงค่า retention time (t_R) ของสารละลายสีย้อมหลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรียเป็นเวลา 5 วัน และเมื่อเปรียบเทียบกับรูปที่ 4.15-4.17 พบว่าค่า retention time (t_R) ที่ 8.878 นาที คือ สารละลายสี Reactive Black 5 และอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย MSM และมีค่า retention time (t_R) เพิ่มขึ้นมาที่ 9.999 นาที นั้นก็คือ กรดออกซาลิก ซึ่งพบในช่วงเวลาใกล้เคียงกับสารละลายกรดออกซาลิก ที่เวลา 9.727 นาที จึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียสามารถย่อยสลายสีย้อม Reactive Black 5 ให้กลายเป็นกรดออกซาลิก ในวันที่ 5 ของการบ่มด้วยแบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR ในข้างต้นที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อที่ 4.4.1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4.23 HPLC โครมาโตแกรมของสารละลายสีย้อม Reactive Black 5 หลังการกำจัดสีเป็นเวลา 6 วัน

จากรูปที่ 4.23 แสดงค่า retention time (t_R) ของสารละลายสีย้อมหลังการกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย เป็นเวลา 6 วัน และเมื่อเปรียบเทียบกับรูปที่ 4.16-4.18 พบว่าค่า retention time (t_R) ที่ 8.881 นาที คือ สารละลายสี Reactive Black 5 และอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย MSM และมีค่า retention time (t_R) ที่ 12.546 นาที คือ สารละลายสี Reactive Black 5 และในวันที่ 6 กรดออกซาลิกอาจสลายตัวเป็น CO_2, CO และ H_2O [40] จึงไม่พบกรดออกซาลิกใน HPLC โครมาโตแกรมของสารละลายนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาสูตรอาหารและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อกำจัดสี Reactive Black 5 ของบริษัทฮันทส์แมน(ประเทศไทย) จำกัด จากแบคทีเรียในกลุ่มของ *Pseudomonas* sp. จำนวน 49 สายพันธุ์ (คัดเลือกจาก Thailand Biosource Research Center (TBRC) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ประเทศไทย) จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียที่เหมาะสมมาบ่มในสารละลายสีย้อมที่เหลือหลังการย้อมเพื่อการกำจัดสี และในการทดลองศึกษาเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีด้วยแบคทีเรีย จากค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเข้มข้นของสารละลายสีที่ลดลงระหว่างการบ่มในแบคทีเรียเป็นเวลา 1-6 วัน สุดท้ายศึกษากลไกการกำจัดสีด้วยแบคทีเรียจากการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสีทั้งก่อนและหลังการบ่มในแบคทีเรียเพื่อการกำจัดสีโดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR และ HPLC ซึ่งสามารถสรุปผลเฉพาะตัวอย่างวัสดุทั้งหมดที่ใช้ในการวิจัยนี้ได้ดังต่อไปนี้

1. การศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียที่เหมาะสมในการกำจัดสี Reactive Black 5 จากจำนวนทั้งหมด 49 สายพันธุ์ ในกลุ่มของ *Pseudomonas* sp. พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* มีความสามารถในการกำจัดสีดีที่สุด

2. การศึกษาปริมาณการใช้แบคทีเรียและช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการการเติมแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* เพื่อการกำจัดสี คือ การใช้ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น 20%(v/v) ในวันแรกของการบ่ม และเติมเพิ่มอีก 20%(v/v) ในวันที่ 2 ของการบ่ม เมื่อบ่มเป็นเวลา 6 วันที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ภาวะหยุดนิ่ง

3. การศึกษาความเข้มข้นของน้ำเสียสีย้อมก่อนและหลังการบำบัดด้วยแบคทีเรีย พบว่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 ของการบ่ม ที่ค่าความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 58.94 เปอร์เซ็นต์ และในวันที่ 6 ของการบ่มมีเปอร์เซ็นต์การกำจัดสี 87.61 เปอร์เซ็นต์

4. การศึกษากระบวนการกำจัดสีด้วยแบคทีเรียจากการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสีก่อนและหลังการบ่มในแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค FTIR พบว่าสี Reactive Black 5 ถูกย่อยสลายด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ที่ตำแหน่งเอโซซึ่งเป็นหมู่โคโมฟอร์ของสีให้เกิดเป็นหมู่แอมิโน ($-NH_2$) ทำให้เฉดสีในสารละลายสีย้อมหลังการบ่มมีสีอ่อนลง และปริมาณของหมู่ aromatic ของสีก็ลดลงด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bouraie [32] ที่ศึกษาการกำจัดสี Reactive Black 5

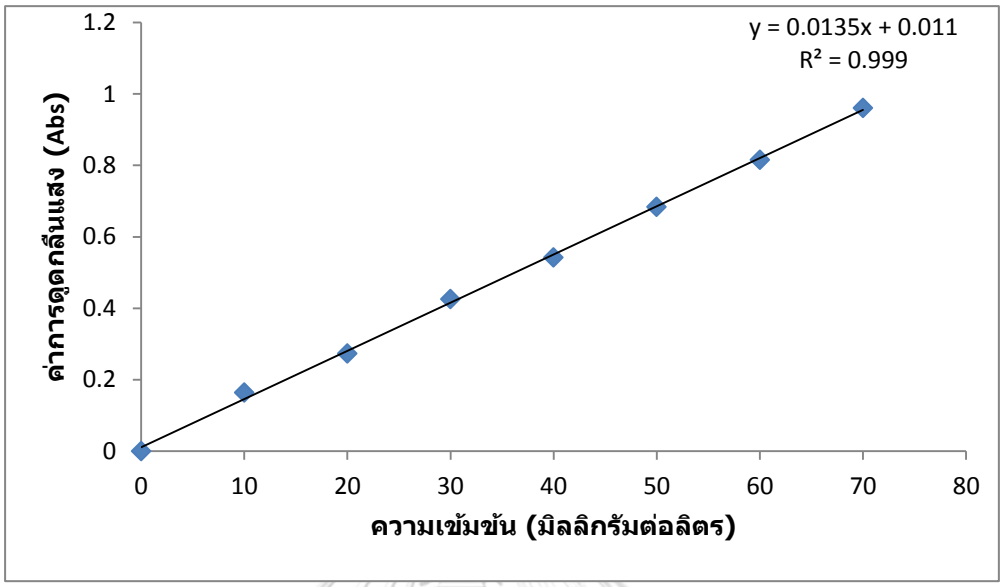
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ด้วยแบคทีเรีย *Areomonas hydrophila* เช่นกัน และผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสีย้อมหลังการบ่มด้วยแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค HPLC พบว่าเจอกรดออกซาลิกในวันที่ 5 ของการบ่ม และกรดออกซาลิกอาจสลายตัวเป็น CO_2, CO และ H_2O [40] ในวันที่ 6 จึงไม่พบกรดออกซาลิกใน HPLC โครมาโตรแกรมของสารละลายนี้ ดังรูปที่ 4.2.4 ซึ่งเป็นการบ่งบอกได้ว่าแบคทีเรียสามารถที่จะย่อยสลายสีได้จริง มีผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bouraie [32] จึงสรุปได้ว่าในระหว่างกระบวนการย่อยสลายสีด้วยแบคทีเรียอาจจะมีการเปลี่ยนโครงสร้างของสีเป็นไปสารชนิดอื่น มีผลทำให้ความเข้มข้นของสารละลายสีลดลง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก

กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสี Reactive Black 5 และค่าการดูดกลืนคลื่นแสง



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ระหว่างความเข้มข้นของสี Reactive Black 5 และค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 599 นาโนเมตร สำหรับหาความเข้มข้นของสีก่อนและหลังบำบัดด้วยแบคทีเรีย ด้วยเครื่อง Spectrophotometer Model GBC Cintra 404

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข

ค่าการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ตารางที่ ข.1 optical density (OD) ของการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดสีได้ในกลุ่มของ *Pseudomonas* sp. จำนวน 49 สายพันธุ์

แบคทีเรีย	ค่า OD	แบคทีเรีย	ค่า OD
1	0.443 ± 0.021	18	0.139 ± 0.003
2	0.628 ± 0.010	19	0.532 ± 0.003
3	0.218 ± 0.019	20	0.636 ± 0.003
4	0.519 ± 0.085	21	0.566 ± 0.001
5	0.632 ± 0.009	22	0.693 ± 0.003
6	0.285 ± 0.009	23	0.321 ± 0.007
7	0.297 ± 0.002	24	0.570 ± 0.002
8	0.632 ± 0.025	25	0.599 ± 0.008
9	0.207 ± 0.071	26	0.666 ± 0.035
10	0.599 ± 0.003	27	0.431 ± 0.005
11	0.578 ± 0.002	28	0.526 ± 0.005
12	0.448 ± 0.002	29	0.443 ± 0.002
13	0.567 ± 0.002	30	0.628 ± 0.009
14	0.421 ± 0.069	31	0.685 ± 0.019
15	0.132 ± 0.063	32	0.519 ± 0.008
16	0.430 ± 0.001	33	0.632 ± 0.009
17	0.431 ± 0.130	34	0.485 ± 0.009

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แบคทีเรีย	ค่า OD
35	0.397 ± 0.014
36	0.632 ± 0.023
37	0.407 ± 0.007
38	0.599 ± 0.003
39	0.526 ± 0.006
40	0.560 ± 0.024
41	0.473 ± 0.006
42	0.649 ± 0.004
43	0.662 ± 0.000
44	0.490 ± 0.001
45	0.531 ± 0.003
46	0.529 ± 0.003
47	0.203 ± 0.009
48	0.500 ± 0.000
49	0.679 ± 0.007

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ ข.2 optical density (OD) ของแบคทีเรีย สำหรับการทดลองใช้ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นในครั้งเดียว

แบคทีเรีย	ค่า OD
Pseudomonas aeruginosa	0.597± 0.054

ตารางที่ ข.3 optical density (OD) ของแบคทีเรีย สำหรับการทดลองใช้การเพิ่มปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

แบคทีเรีย	ค่า OD		
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 24	ชั่วโมงที่ 48
Pseudomonas aeruginosa	0.612 ± 0.011	0.621 ± 0.017	0.598 ± 0.212

ตารางที่ ข.4 optical density (OD) ของแบคทีเรียและจำนวนแบคทีเรีย (cfu/ml) สำหรับการวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำเสียสีย้อม

แบคทีเรีย	ค่า OD	
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 24
Pseudomonas aeruginosa	0.498 ± 0.011	0.523 ± 0.017

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แบคทีเรีย	จำนวนแบคทีเรีย (cfu/ml)	
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 24
Pseudomonas aeruginosa	$3.44 \times 10^4 \pm 0.463$	$4.32 \times 10^4 \pm 0.453$

ตารางที่ ข.5 optical density (OD) ของแบคทีเรียและจำนวนแบคทีเรีย (cfu/ml) จากการวิเคราะห์โครงสร้างสี Reactive Black 5 ด้วยเทคนิค FITR

แบคทีเรีย	ค่า OD	
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 24
Pseudomonas aeruginosa	0.587 ± 0.011	0.598 ± 0.017

แบคทีเรีย	จำนวนแบคทีเรีย (cfu/ml)	
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 24
Pseudomonas aeruginosa	$2.44 \times 10^4 \pm 0.341$	$3.21 \times 10^4 \pm 0.232$

ตารางที่ ข.6 optical density (OD) ของแบคทีเรียและจำนวนแบคทีเรีย (cfu/ml) จากวิเคราะห์โครงสร้างของสี Reactive Black 5 ด้วยเทคนิค HPLC

แบคทีเรีย	ค่า OD	
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 24
Pseudomonas aeruginosa	0.498 ± 0.011	0.523 ± 0.017

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แบคทีเรีย	จำนวนแบคทีเรีย (cfu/ml)	
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 24
Pseudomonas aeruginosa	$3.44 \times 10^4 \pm 0.463$	$4.32 \times 10^4 \pm 0.453$

ภาคผนวก ค

การเตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

สูตรที่1 [40]

NaCl	1	g/l	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	g/l	
KH_2PO_4	1	g/l	*[บัฟเฟอร์]*
Na_2HPO_4	1	g/l	*[บัฟเฟอร์]*
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1	g/l	

สูตรที่ 2 [34]

NaCl	1	g/l	
$\underline{MgSO_4} \cdot 7 \underline{H_2O}$	0.01	g/l	
KH_2PO_4	1	g/l	*[บัฟเฟอร์]*
K_2HPO_4	1	g/l	*[บัฟเฟอร์]*
$(NH_4)_2SO_4$	2	g/l	
Glucose	3	g/l	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ค.1 ผลของน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียสูตรที่ 2 ต่อการกำจัดสี Reactive Black 5 ของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*

การกำจัดสี	เปอร์เซ็นต์การกำจัดสี (วัดจากค่าOD)	
	กลูโคส 3 กรัมต่อลิตร	กลูโคส 9 กรัมต่อลิตร
วันที่ 1	59.67	61.13
วันที่ 2	61.36	66.4
วันที่ 3	64.13	67.78

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Minitab 18 Statistical Software เพื่อใช้ในศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมของแบคทีเรียที่มีการเติมหัวเชื้อตั้งต้นเพียงครั้งเดียว (single addition) และแบบการเติมหัวเชื้อหลายครั้ง (multi addition)

ตาราง ง.1 ประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมของแบคทีเรียที่มีการเติมหัวเชื้อตั้งต้นเพียงครั้งเดียว (single addition)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
การเติมแบคทีเรีย	5	154.1	30.81	2.53	0.050
Error	30	364.9	12.16		
Total	35	519.0			

หมายเหตุ $P \leq 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

$P > 0.05$ แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ

ตารางที่ ง.2 การจัดกลุ่มการเติมหัวเชื้อตั้งต้นเพียงครั้งเดียว (single addition) ในชั่วโมงที่ 144 เป็นชั่วโมงสุดท้ายของการบ่มด้วยแบคทีเรีย ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ปริมาณการเติมแบคทีเรีย	N	Mean	Grouping
10%	2	74.822	A
15%	2	69.45	A B
20%	2	68.47	A

Means that do not share a letter are significantly different.

ตาราง ง.3 ประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมของแบคทีเรียที่มีการเติมหัวเชื้อหลายครั้ง (multi addition)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
การเติมแบคทีเรีย	5	871.5	174.297	20.00	0.000
Error	78	679.9	9.716		
Total	83	1551.4			

หมายเหตุ $P \leq 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

$P > 0.05$ แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ

ตารางที่ ง.2 การจัดกลุ่มการเติมหัวเชื้อที่มีการเติมหัวเชื้อหลายครั้ง (multi addition) ในชั่วโมงที่ 144 เป็นชั่วโมงสุดท้ายของการบ่มด้วยแบคทีเรีย ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ปริมาณการเติมแบคทีเรีย	N	Mean	Grouping
เติมเพิ่มอีก 20% ในชั่วโมงที่ 24	2	75.79	A
เติมเพิ่มอีก 15% ในชั่วโมงที่ 24	2	74.2	A B
เติมเพิ่มอีก 20% ในชั่วโมงที่ 48	2	72.45	B C
เติมเพิ่มอีก 15% ในชั่วโมงที่ 48	2	71.44	B C
เติมเพิ่มอีก 10% ในชั่วโมงที่ 24	2	71.14	C
เติมเพิ่มอีก 10% ในชั่วโมงที่ 48	2	70	C

Means that do not share a letter are significantly different.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก จ

ผลการกำจัดสีย้อม Reactive Black 5 **ในสารละลายสี (ไม่ผ่านการย้อม)**

แบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การกำจัดสี		ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
1	14.72	14.98	14.85	15.85
2	18.11	21.31	19.71	20.71
4	20.67	21.77	21.22	22.2
5	14.21	16.2	15.24	16.24
8	14.72	15.24	14.98	15.98
10	7.49	11.11	9.3	10.3
11	11.26	11.04	11.15	12.15
12	10.24	13.11	11.67	12.67
13	14.21	16.14	15.18	16.18
14	17.54	17.24	17.39	18.39
16	17.92	19.57	18.74	19.74
17	16.64	19.25	17.94	18.94
19	18.56	17.82	18.19	19.19
20	7.28	4.97	6.13	7.13
21	7.05	5.77	6.41	7.41
22	5.77	3.64	4.71	5.71
24	7.29	11.74	9.51	10.51
25	4.72	4.97	4.85	5.85
26	8.65	8.1	8.38	9.38
27	10.54	12.47	11.5	12.5
28	13.69	14.66	14.18	15.18

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การกำจัดสี		ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
29	12.71	14.92	13.81	14.81
30	13.66	16.76	15.21	16.21
31	13.54	17.01	15.27	16.27
32	15.26	16.7	15.98	16.98
33	13.51	16.09	14.8	15.8
34	15.44	24.76	20.1	21.1
35	17.99	21.33	19.66	20.66
36	16.32	15.03	15.67	16.67
37	11.18	17.01	14.1	15.1
38	14.17	16.19	15.18	16.18
39	7	6.5	6.75	7.75
40	14.82	15.26	15.04	16.04
41	11.13	11.94	11.53	12.53
42	4.76	3.38	4.07	5.07
43	16.5	15.85	16.18	17.18
44	17.48	18.44	17.96	18.96
45	16.28	18.71	17.5	18.5
46	17.26	18.18	17.72	18.72
48	12.77	14.2	13.48	14.48
49	54.57	65.03	59.8	60.8

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ฉ

การเติมหัวเชื้อตั้งต้นเพียงครั้งเดียว (single addition) และแบบการเติมหัวเชื้อหลายครั้ง (multi addition)

ตารางที่ จ.1 ประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมของแบคทีเรียที่มีการเติมหัวเชื้อตั้งต้นเพียงครั้งเดียว (single addition)

ปริมาณในการเติมแบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การกำจัดสี					
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6
เติม 10%	64.31	63.40	63.10	67.83	65.21	67.24
	63.21	62.61	62.7	67.69	67.47	69.69
ค่าเฉลี่ย	63.76	63.00	62.90	67.76	66.34	68.46
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.77	0.55	0.28	0.10	1.59	1.73
เติม 15%	65.55	65.14	65.12	69.47	66.61	68.35
	67.05	67.99	68.21	70.19	70.67	70.56
ค่าเฉลี่ย	66.30	66.57	66.66	69.83	68.64	69.45
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	1.060	2.01	2.18	0.50	2.86	1.56
เติม 20%	68.30	68.30	71.86	75.41	74.80	74.11
	70.01	70.01	71.37	75.19	75.35	75.53
ค่าเฉลี่ย	69.16	69.16	71.61	75.30	75.07	74.82
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	1.20	1.20	0.34	0.15	0.38	1.00

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ จ.2 ประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมของแบคทีเรียที่มีการเติมหัวเชื้อหลายครั้ง (multi addition)

ปริมาณในการเติมแบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การกำจัดสี					
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6
เติมเชื้อ20%	63.08	66.54	63.15	61.64	64	65.07
	63.08	66.69	64.82	63.31	66	65.82
ค่าเฉลี่ย	63.08	66.61	63.98	62.47	65	65.45
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0	0.1	1.18	1.17	1.41	0.53
เติมเพิ่ม10% ในชั่วโมงที่ 24	59.92	68.4	68.13	67.38	69.75	71.18
	63.97	68.92	71.3	72.12	71.91	71.1
ค่าเฉลี่ย	61.94	68.66	69.71	69.75	70.83	71.14
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	2.85	0.36	2.24	3.35	1.53	0.05
เติมเพิ่ม15% ในชั่วโมงที่ 24	62.42	69.97	72.07	72.79	74.08	74.2
	59.26	70.26	69.46	71.63	74.08	74.2
ค่าเฉลี่ย	60.84	70.11	70.77	72.21	74.08	74.2
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	2.23	0.21	1.84	0.82	0	0
เติมเพิ่ม20% ในชั่วโมงที่ 24	60.44	72.13	73.2	73.96	75.41	75.87
	61.83	71.98	72.66	73.87	75.16	75.71
ค่าเฉลี่ย	61.13	72.05	72.93	73.91	75.29	75.79
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.98	0.1	0.38	0.05	0.17	0.11

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ปริมาณในการเติมแบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การกำจัดสี					
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6
เติมเพิ่ม10% ในชั่วโมงที่ 48	59.92	64.97	67.42	66.97	68.75	70.1
	63.6	65.72	67.25	67.47	70.41	71.6
ค่าเฉลี่ย	61.76	65.35	67.33	67.22	69.58	70.85
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	2.59	0.526	0.11	0.35	1.17	1.06
เติมเพิ่ม15% ในชั่วโมงที่ 48	59.92	65.27	68.38	68.21	70.66	71.6
	63.6	65.72	69.95	69.13	71.41	71.27
ค่าเฉลี่ย	61.76	65.49	69.17	68.67	71.04	71.44
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	2.59	0.31	1.11	0.64	0.53	0.23
เติมเพิ่ม20% ในชั่วโมงที่ 48	61.83	66.61	68.45	68.21	70.41	71.44
	62.79	66.98	71.68	70.63	73.91	73.45
ค่าเฉลี่ย	62.31	66.8	70.06	69.42	72.16	72.44
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.67	0.26	2.28	1.7	2.47	1.42

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ฉ

การกำจัดสีในสารละลายสีย้อมด้วยแบคทีเรียโดยวัดค่าความเข้มข้นของสีในสารละลายสี

ตารางที่ ฉ.1 ผลการกำจัดสีในสารละลายสีย้อมด้วยแบคทีเรียโดยวัดจากความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) และน้ำ ก่อนและหลังการกำจัดสี

สารละลายสีย้อม	ความเข้มข้น			
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 24	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72
MSM	74.19	25.57	9.68	8.12
	74.25	24.55	9.49	8.45
ค่าเฉลี่ย	74.22	25.06	9.58	8.28
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.04	0.72	0.13	0.23
H_2O	74.19	61.22	14.11	14.11
	74.25	59.71	13.41	13.41
ค่าเฉลี่ย	74.22	60.46	13.76	13.76
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.04	1.06	0.49	0.49

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารละลายสีย้อม	ความเข้มข้น		
	ชั่วโมงที่ 96	ชั่วโมงที่ 120	ชั่วโมงที่ 144
MSM	7.19	7.09	6.64
	7.92	7.62	6.93
ค่าเฉลี่ย	7.55	7.35	6.78
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.51	0.37	0.20
H_2O	13.31	12.49	11.52
	12.26	11.23	11.08
ค่าเฉลี่ย	12.78	11.86	11.3
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.74	0.89	0.31

ตารางที่ ฉ.2 เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีในสารละลายสีย้อมด้วยแบคทีเรียโดยวัดจากความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมผสมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (MSM, mineral salt medium) และน้ำ ก่อนและหลังการกำจัดสี

สารละลายสีย้อม	เปอร์เซ็นต์การกำจัดสี			
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 24	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72
MSM	0.12	58.1	83.51	86.06
	0.03	59.77	83.83	85.49
ค่าเฉลี่ย	0.07	58.93	83.67	85.77
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.06	1.18	0.22	0.40
H_2O	0.02	10.15	70.4	77.87
	0.09	12.37	71.73	79.61
ค่าเฉลี่ย	0.05	11.26	71.06	78.74
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.04	1.56	0.94	1.23

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารละลายสีย้อม	เปอร์เซ็นต์การกำจัดสี		
	ชั่วโมงที่ 96	ชั่วโมงที่ 120	ชั่วโมงที่ 144
MSM	87.53	87.14	87.87
	86.27	86.16	87.34
ค่าเฉลี่ย	86.9	86.65	87.605
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.89	0.69	0.37
H_2O	77.87	79	81.3
	79.61	81.12	82.01
ค่าเฉลี่ย	78.74	80.06	81.655
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	1.23	1.49	0.50

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รายการอ้างอิง

1. Ganesh, R., et al., *Fate of azo dyes in sludges.* Pergamon, 1993. **28**(6): p. 1367-137.
2. Zollinger, H, *Color chemistry: syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments*, ed. C. 15. 2003, Zurich (Switzerland).
3. Brown, D., *Effects of colorants in the aquatic environment.* Ecotoxicoloxiy and environmentalsafety, 1987. **13**: p. 139-147.
4. Jin, X., et al*., Decolorization of a dye industry effluent Aspergillus fumigatus XC6.* Applied microbiology and biotechnolog, 1987. **74**(1): p. 239-243.
5. Vijaykumar, M.H., et al., *Decolourization of naphthalene-containing sulfonated azo dyes by Kerstersia sp. strain VKY1.* Enzyme and microbial technology, 2007. **40**(2): p. 204-211.
6. Asad, S., et al., *Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria.* Bioresour technol, 2007. **98**(11): p. 2082-8.
7. Forgacs, E., Cserhati, T. and Oros, G, *Removal of synthetic dyes from wastewaters.* Environ int, 2004. **30**: p. 953-971.
8. Vandevivere, P.C., Binachi, R., *Treatment of wastewater from textile wet processing industry: review of emerging technologies.* Chem technol biot, 1998. **72**: p. 289-302.
9. Pearce, C., *The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review.* Dyes and pigments, 2003. **58**(3): p. 179-196.
10. Petek, P.G., *An integral approach to waste minimization in process industries* resources. Conservation and recycling, 1996. **17**: p. 169-188.
11. Saratale, R.G., et al*., Bacterial decolorization and degradation of azo dyes.* Taiwan inst chem eng, 2011. **42**: p. 138-157.
12. Paszczynski, A., et al*., Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by Phanerochaete chrysosporium and Streptomyces chromofuscus.* Appl environ microb, 1992. **58**: p. 3598-3604.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

13. สิริรัตน์ จารุจินดา และ อุษา แสงวัฒนาวิโรจน์, ปฏิบัติการเคมีสิ่งทอ. 2547: ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
14. เคมีฟิสิกส์ของสิ่งทอ อาหาร และของรอบตัว. 2560; Available from: https://www.facebook.com/textile.phys.and.chem.
15. การจำแนกชนิดของสีย้อม. 2559; Available from: http://www.science.mju.ac.th/chemistry.
16. การย้อมสีเส้นใยเซลลูโลส. 2558; Available from: http://www.tpa.or.th/writer/read.
17. การย้อมสีเส้นใย. 2558; Available from: http://www.science.mju.ac.th/chemistry.
18. วิธีการย้อมผ้า. Available from: http://www.thaitextileacademy.com/.
19. *NOVACRON dyeing processes*. สมุทรปราการ: บริษัท ฮันทส์แมน(ประเทศไทย) จำกัด.
20. ขั้นตอนการเตรียมการกำจัดสิ่งสกปรกและการฟอก และการย้อมสีเส้นด้ายเพื่อผ้าถัก. Available from: http://library.dip.go.th/.
21. การบำบัดน้ำเสีย. 2555; Available from: http://www.il.mahidol.ac.th/.
22. Vidyasagar, A. *Live Science Contributor*. Available from: https://www.livescience.com/51641-bacteria.html.
23. พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์, *Bacteria:* แบคทีเรีย. Available from: http://www.foodnetworksolution.com
24. สิริรัตน์ สุวณิชย์เจริญ และ ปราโมท เชี่ยวเชาญ, ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ. มุมวิชาการด้านอาชีวอนามัยและสิ่งแวดล้อม, 2548. **3**.
25. Šíma, J., J. Pocedič, and P. Hasal, *Decolorization of reactive orange 16 in rotating drum biological contactor.* Environmental chemical engineering, 2016. **4**(4): p. 4540-4548.
26. Lu, T., et al., *Efficient decolorization of dye-containing wastewater using mycelial pellets formed of marine-derived Aspergillus niger.* Chinese chemical engineering, 2017. **25**(3): p. 330-337.
27. Gingell, R.a.W., R., *Mechanisms of azo reduction by Streptococcus faeclis II.* the role of soluble flavins. Xenobiotics, 1997. **1**: p. 231-239.
28. Zimmermann T, Kulla H, and L. T, *Properties of purified orange II-azoreductases by Pseudomonas KF46.* Eur biochem, 1982. **129**: p. 197-203.
29. Zimmermann T, et al., *Comparison of two bacterial azoreductases acquired during adaptation to growth on azo dyes.* Arch microbial, 1984. **138**: p. 37-43.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

30. Taruna Joshi, et al., *Isolation, identification and application of novel bacterial consortium TJ-1 for the decolourization of structurally different azo dyes.* Bioresource technology, 2008. **99**: p. 7115-7121.

31. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย. Available from: https://namknowledgeround.wordpress.com.

32. Bouraie, EL, M. and W.S. El Din, *Biodegradation of reactive black 5 by Aeromonas hydrophila strain isolated from dye-contaminated textile wastewater.* Sustainable environment research, 2016. **26**(5): p. 209-216.

33. Wang, Z.W., J.S. Liang, and Y. Liang, *Decolorization of Reactive Black 5 by a newly isolated bacterium Bacillus sp. YZU1.* International biodeterioration & biodegradation, 2013. **76**: p. 41-48.

34. Pokharia A and A. S, *Isolation and screening of dye decolorizing bacterial isolates from contaminated sites.* Textiles and light industrial science and technology(TLIST), 2013. **2**(2).

35. นิตยา เลี้ยงถนอม และ จิรภัทร จันทมาลี. ศักยภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งปนเปื้อนสีย้อมในการลดความเข้มสีในน้ำเสียที่ได้จากการย้อมกก. 2556. วารสารวิทยาศาสตร์ มข.

36. Bor-Yann Chen, et al., *Revealing azo-dye decolorization of indigenous Aeromonas hydrophila from fountain spring in Northeast Taiwan.* The Chinese institute of chemical engineers, 2008. **39**: p. 495-501.

37. Wong P.K and Y. P.Y, *Declorization and biodegradation of N-N´- dimethyl-p-phenylenediamine by Klebsiella pneumoniae RS-13 and Acetobacter liquefaciens.* Appl microbiol, 1998. **85**: p. 79-87.

38. Mona E.M. Mabrouk and H.H. Yusef, *Decolorization of fast red by Bacillus Subtilis HM.* Applied science reserach, 2008. **4**(3): p. 262-269.

39. Banat I.M, et al., *Microbial Decolorization of textile-dye-containting effluent.* Bioresour technol, 1996. **58**: p. 217.

40. James Higgins, X.Z., Ruifeng Liu, and Thomas T.S. Huang, *Theoretical study of thermal decomposition mechanism of oxalic acid.* Physical chemistry A, 1997. **101**(14): p. 2702–2708.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวภัคพรรณ ปล้องนิราศ เกิดเมื่อวันที่ 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2535 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาปิโตรเคมีและวัสดุพอลิเมอร์ ภาควิชาวิทยาการและวิศวกรรมวัสดุ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ในปีการศึกษา 2558 หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำเร็จการศึกษาในภาคต้น ปีการศึกษา 2560

ประสบการณ์

ปี พ.ศ. 2556 ฝึกงานที่สถาบันวิจัยและเทคโนโลยี ปตท. (วังน้อย)

ผลงานที่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่

ภัคพรรณ ปล้องนิราศ ธิดารัตน์ นิ่มเชื้อ จุฑามาส สุวรรณประทีป และอุษา แสงวัฒนาโรจน์ “การกำจัดสีในน้ำเสียสีย้อมรีแอกทีฟโดย Pseudomonas sp.” รายงานสืบเนื่องการประชุม การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 44 วันที่ 19-20 ตุลาคม 2560 ณ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี, 89-97.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University