

# การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกจางสีย้อมเอโซโดยแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* PD10

## Optimization of azo dyes decolorization by bacteria *Klebsiella pneumoniae* PD10

พินิดา ภูผา<sup>1\*</sup>, อุทัย สาขี<sup>2</sup>, นิชชา จำเริญศักดิ์ศรี<sup>2</sup>, รุ่งฤดี ทิวทอง<sup>2</sup>

Pinida Poopa<sup>1\*</sup>, Uthai Sakee<sup>2</sup>, Nitcha Chamroensaksri<sup>2</sup>, Rungruedee Thiwthong<sup>2</sup>

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพและสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกจางสีย้อมกลุ่มเอโซ 4 ชนิด ได้แก่ Methyl Orange (MO), Remazol Brilliant Violet 5 R (RBV-5R), Reactive Black 5 (RB-5) และ Allura Red AC (AR-AC) โดยแบคทีเรียไอโซเลต PD10 ซึ่งจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA และการศึกษาสายวิวัฒนาการพบว่าแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียแกรมลบ *Klebsiella pneumoniae* NBRC 14438<sup>T</sup> โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.50 พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการฟอกจางสีย้อมคือน้ำตาลซูโครส ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมมีความแตกต่างกันในการฟอกจางสีแต่ละชนิดคือ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (MO และ RBV-5R), urea (RB-5) และ NH<sub>4</sub>Cl (AR-AC) จากการศึกษาพบว่าไอโซเลต PD10 สามารถฟอกจางสี MO และ RBV-5R ได้สูงโดยมีอัตราการฟอกจางสีภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเท่ากับ 98.6% และ 95.8% ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมสำหรับฟอกจางสีย้อม MO คือความเข้มข้นของสีย้อม 0.02 %w/v, sucrose 0.5 %w/v, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ที่ C:N ratio เท่ากับ 2:1, pH 8.5 และความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 3 %v/v ที่อุณหภูมิ 40 °C ภายใต้สภาวะหนึ่งให้อากาศเล็กน้อยสำหรับสภาวะที่เหมาะสมของการฟอกจางสีย้อม RBV-5R เป็นเช่นเดียวกับสภาวะสำหรับการฟอกจางสีย้อม MO แต่แตกต่างกันที่ค่า pH (pH 8.0) พบอัตราการฟอกจางสีต่ำที่สุดในสีย้อม AR-AC โดยมีอัตราการฟอกจางสีต่ำกว่า 41.3% ภายใต้สภาวะหนึ่งให้อากาศเล็กน้อยการศึกษานี้บ่งชี้ถึงศักยภาพของแบคทีเรียไอโซเลต PD10 ในการฟอกจางสีย้อมเอโซและเป็นแนวทางในการนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการบำบัดการปนเปื้อนของสีย้อมเอโซในสภาพแวดล้อมได้

คำสำคัญ : แบคทีเรีย สีย้อมเอโซ การฟอกจางสี *Klebsiella pneumoniae*

### Abstract

This study aims to investigate the potential and optimum conditions for the decolorization of four azo dyes, Methyl Orange (MO), Remazol Brilliant Violet 5 R (RBV-5R), Reactive Black 5 (RB-5) and Allura Red AC (AR-AC) by bacteria. Bacterial identification was carried out using 16S rRNA sequence, which found that bacterial isolates PD10 is close to gram-negative bacteria *Klebsiella pneumoniae* strains NBRC 14438<sup>T</sup> with the sequence similarity of 99.50%. Sucrose was found to be the best carbon source for dyes decolorization while nitrogen source was varies among dye which found to be (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (MO and RBV-5R), urea (RB-5) and NH<sub>4</sub>Cl (AR-AC). Isolate PD10 effectively decolorize MO and RBV-5R with the decolorization rate of 98.6% and 95.8% under optimum condition. Optimum condition for MO decolorization was 0.02 %w/v dye concentration, 0.5 %w/v sucrose, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at C:N ratio of 2:1, pH 8.5, 3 %v/v inoculum size at temperature of 40°C under microaerophilic condition. The optimum condition of RBV- 5R Decolorization was almost the

<sup>1</sup>นิสิตปริญญาโท, <sup>2</sup>อาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

<sup>1</sup> Master degree student, <sup>2</sup> Lecturer Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, MahaSarakhm 44150, Thailand.

\* Corresponding author: PinidaPoopa, E-mail address: pinidapoopa@gmail.com, Tel : 0942562097

same as MO decolorization but medium pH was different (pH 8.0). Lowest dye decolorization was observed in AR-AC with the decolorization rate of 41.3% under microaerophilic condition. This study show the potential of isolate PD10 in azo dyes decolorization and might pave the way for its application in bioremediation of azo dyes in environment.

**Keywords:** Bacteria, Azo dye, Decolorization, *Klebsiella pneumoniae*

## บทนำ

สีย้อมเอโซ (azo dyes) เป็นสารประกอบ อะโรเมติกที่ประกอบด้วยหมู่เอโซ (-N=N-) หนึ่งหมู่หรือมากกว่าหนึ่งหมู่ขึ้นไป ซึ่งในปัจจุบันสีกลุ่มนี้ได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมเครื่องหนัง อุตสาหกรรมสิ่งพิมพ์ และอุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น จากการศึกษาของ Moutaouakkil *et al.*<sup>1</sup> พบว่าทั่วโลกมีการผลิตสีย้อมสังเคราะห์มากกว่า 800,000 ตันต่อปี ซึ่งเป็นสีย้อมกลุ่มเอโซประมาณ 60-70 เปอร์เซ็นต์ และมีประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมในระหว่างกระบวนการผลิต<sup>2</sup> ซึ่งสีที่ปล่อยออกมานี้เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของแหล่งน้ำธรรมชาติ เนื่องจากสีย้อมเหล่านี้จะไปลดอัตราการนำเข้าของออกซิเจนที่เข้าสู่ผิวหน้าของแหล่งน้ำและบดบังปริมาณแสงอาทิตย์ที่ตกลงสู่ผิวน้ำ ทำให้พืชน้ำไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ จึงส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำลดลง และเป็นสาเหตุที่ทำให้สัตว์น้ำตาย<sup>3</sup> และนอกจากนี้สีย้อมกลุ่มเอโซยังพบว่าเป็นสารก่อมะเร็งในกระเพาะปัสสาวะ ม้าม และตับ รวมทั้งเป็นสารก่อการกลายพันธุ์ในมนุษย์อีกด้วย ส่วนในสัตว์ทดลองนั้นพบว่า ก่อให้เกิดความผิดปกติของนิวเคลียส และเกิดความผิดปกติของโครโมโซมในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม<sup>2</sup>

ในปัจจุบันแม้ว่าจะมีการนำเทคโนโลยีต่างๆ มาใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีการปนเปื้อนของสีย้อมกลุ่มเอโซทั้งกระบวนการทางกายภาพและเคมี เช่น การกรองด้วยแผ่นเยื่อ (Membrane filtration) การใช้โอโซน (Ozone treatment) การตกตะกอนด้วยสารเคมี (Chemical coagulation) การแลกเปลี่ยนไอออน (Ion Exchange) เป็นต้น แต่วิธีเหล่านี้มีข้อจำกัดอยู่หลายประการ คือ สามารถบำบัดได้น้อย ค่าใช้จ่าย

ในการบำบัดสูง ผลผลิตที่ได้จากการบำบัดยังคงเป็นสารที่มีความเป็นพิษ และมีปัญหาในเรื่องของการตกตะกอน<sup>4</sup> ด้วยเหตุนี้เองจึงทำให้มีการศึกษาวิธีการอื่นๆ ที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัย เพื่อนำมาใช้ในการกำจัดสีย้อมเหล่านั้น ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วจะให้ความสำคัญกับสิ่งมีชีวิตพวกจุลินทรีย์ โดยในปัจจุบันนี้พบว่ามีจุลินทรีย์อยู่หลายกลุ่มที่มีความสามารถในการย่อยสลายสีย้อมสังเคราะห์เหล่านั้นได้ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ แต่เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการฟอกจางสีแล้วพบว่าจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียพบว่ามีประสิทธิภาพฟอกจางสีได้ดีกว่า เพราะแบคทีเรียมีวงจรชีวิตสั้น และมีการเจริญที่รวดเร็ว ซึ่งแตกต่างจากเชื้อราและยีสต์ที่มีวงจรชีวิตที่ยาวกว่าและเจริญได้ช้า<sup>5</sup>

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพและสภาวะที่เหมาะสมในการฟอกจางสีย้อมกลุ่มเอโซของแบคทีเรียไอโซเลต PD10 งานวิจัยนี้จะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยบำบัดน้ำทิ้งที่ปนเปื้อน สีย้อมกลุ่มเอโซได้ อีกทั้งยังช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษอีกด้วย

## วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 1. สีย้อมและสารเคมี

สีย้อมเอโซ 4 ชนิดที่ใช้ในการวิจัยในครั้งนี้ ได้แก่ สีย้อมเอโซชนิดโมโนเอโซ ได้แก่ สี AR-AC (Allura Red AC;  $\lambda_{max}$  = 501 และ 506 nm เมื่อละลายในน้ำและเมทานอล) MO (Methyl Orange;  $\lambda_{max}$  = 463 nm เมื่อละลายในน้ำ) และ RBV-5R (Remazol Brilliant Violet 5R;  $\lambda_{max}$  = 558 และ 563 nm เมื่อละลายในน้ำและ เมทานอล) และสีชนิดไดเอโซ ได้แก่ สี



RB-5 (Reactive Black;  $\lambda_{\max}$  = 598 nm เมื่อละลายในน้ำและ 588, 593 nm เมื่อละลายในเมทานอล) สีข้อมทั้งหมดผลิตโดยบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

อาหารที่ใช้ในการทดสอบคืออาหารสูตร Mineral Salts Medium (MSM) ดัดแปลงจาก Ayed *et al.*<sup>6</sup> ซึ่งใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อและใช้เป็นน้ำเสียสังเคราะห์โดยการเติมสีข้อมเอโซลงไปให้อาหารด้วยโดยปริมาตรต่อ 1 ลิตร ประกอบด้วย : sucrose 10.0g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.6g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0g; MgSO<sub>4</sub> 1.0g; Fe(NH<sub>4</sub>) citrate (ferric ammonium citrate) 0.01g; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1g; yeast nitrogen base without amino acid 0.2g และ trace element solution containing ปริมาตร 0.5 ml และ trace element solution containing ประกอบด้วย ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g; MnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.15g; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.05g; NiSO<sub>4</sub> 0.1g; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.15g; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1.5g และ CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.05g (ปริมาตรต่อ 1 ลิตร)

## 2. แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

แบคทีเรียไอโซเลต PD10 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ถูกคัดแยกจากตัวอย่างดินโดยวิธี Selective enrichment วิธี *in vitro* acclimatization และวิธี *in situ* acclimatization จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้จากการคัดแยกตามวิธีดังกล่าวมาทดสอบความสามารถในการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียม<sup>7</sup>

## 3. วิธีเตรียมเซลล์

นำแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงในฟลasks ขนาด 250 ml ที่บรรจุอาหาร Mineral Salts Medium (MSM) ปริมาตร 50 ml แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเซลล์ให้ได้ความขุ่นเริ่มต้น 1.0 หน่วย OD<sub>600 nm</sub> ก่อนถ่ายเชื้อสำหรับทดสอบในแต่ละการทดลอง

## 4. การพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรีย

ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA เพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ (Universal primer) ได้แก่ 518F

(CCAGCAGCCGCGTAATACG) และ 800R (TACCAGGGTATCTAATCC) ทำโดยนำผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลของบริษัท MACROGEN Advancing through Genomics ประเทศเกาหลี มาเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.gov/>) เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน แล้วนำมาวิเคราะห์สร้างต้นไม้แห่งวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม MEGA 4.1 ด้วยวิธี Neighbour-joining

## 5. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกจางสี

ถ่ายเชื้อ 3 %v/v ลงในอาหาร MSM ที่มีสีข้อมเอโซเข้มข้น 0.01 %w/v โดยที่สภาวะให้อากาศ (Aerobic condition) ใช้อาหารปริมาตร 50 ml บรรจุในฟลask ขนาด 250 ml แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิห้อง

สภาวะหนึ่งไม่ให้อากาศ (Anaerobic condition) และสภาวะหนึ่งให้อากาศเล็กน้อย (Microaerophilic condition) ใช้อาหารปริมาตร 30 ml บรรจุในหลอดฝาเกลียวขนาด 50 ml ปิดฝาให้สนิทไม่ให้อากาศเข้า แล้วนำไปตั้งไว้ในตู้บ่มที่มียางซีลกันอากาศเข้าสำหรับสภาวะหนึ่งไม่ให้อากาศและในสภาวะหนึ่งให้อากาศเล็กน้อยปิดฝาหลอดโดยคลายฝาเกลียวเล็กน้อย แล้วนำไปตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องภายใต้สภาวะหนึ่ง โดยทั้ง 3 ชุดการทดลองบ่มเป็นเวลา 7 วัน ชุดควบคุมจะไม่ใส่เชื้อ

สภาวะให้อากาศตามด้วยสภาวะหนึ่งให้อากาศเล็กน้อย (Sequential Aerobic-Microaerophilic condition) ใช้อาหารปริมาตร 50 ml บรรจุในฟลask ขนาด 250 ml แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาบ่มต่อภายใต้สภาวะหนึ่งให้อากาศเล็กน้อย โดยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอีก 7 วัน ชุดควบคุมจะไม่ใส่เชื้อ

## 6. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการฟอกจางสี

ทำการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการฟอกจางสีข้อมเอโซโดยแบคทีเรียไอโซเลต PD10 โดยทุกปัจจัยที่ศึกษาทำการทดลอง 3 ซ้ำ ดังนี้

### 6.1 ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อลงในอาหาร MSM ที่มีซี้อยมเอโซอยู่ โดยปริมาตรของเชื้อที่ใช้ คือ 3, 5, 10 และ 15 %w/v สำหรับชุดควบคุมจะไม่ใส่เชื้อ จากนั้นนำไปบ่มภายใต้สภาวะที่กำหนดไว้

### 6.2 ความเข้มข้นของสีเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อโดยปริมาตรตามความเข้มข้นที่กำหนดลงในพลาสติกขนาด 250 ml บรรจุอาหาร MSM ที่มีซี้อยมเอโซเข้มข้น 0.005, 0.0075, 0.01, 0.015 และ 0.02 %w/v สำหรับชุดควบคุมไม่ใส่เชื้อ นำไปบ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 7 วัน

### 6.3 แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

แหล่งคาร์บอน ได้แก่ glucose, sucrose, glycerol, sodium citrate และ sodium glutamate (1 %w/v)

ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 5.0 %w/v

แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ yeast extract, ammonium chloride, sodium nitrate, ammonium sulphate และ urea (0.1 %w/v)

ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน โดยศึกษาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน ในอัตราส่วน 1:1, 2:1, 5:1, 10:1, 20:1 และ 40:1

โดยเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่างๆ ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นสี 0.02 %w/v และใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 3 %v/v เพาะเลี้ยงที่เหมาะสม

### 6.4 ความเป็นกรด-ด่างของอาหาร

ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการฟอกจางซี้อยมเอโซแต่ละชนิดโดยใช้ค่า pH ของอาหาร MSM ที่มีซี้อยมเอโซตามความเข้มข้นที่กำหนด โดยจะปรับค่าความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกัน ได้แก่ pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0

### 6.5 ผลของอุณหภูมิในการบ่ม

ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการฟอกจางซี้อยมเอโซแต่ละชนิด ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม และนำไปบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

### 7. วิธีการวัดการฟอกจางสี

นำอาหารเหลว MSM สูตรที่เหมาะสมที่มีซี้อยมเอโซอยู่ของชุดทดสอบ และที่ไม่มีซี้อยมเอโซของชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม มาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 9,100 x g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด ( $\lambda_{max}$ ) ของซี้อยมเอโซแต่ละชนิดโดยใช้อาหารเหลว MSM หรือน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็น blank และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีตามสูตร<sup>9</sup> ดังนี้

$$\text{Decolorization (\%)} = [(A_i - A_o) \times 100] / A_i$$

เมื่อ  $A_i$  คือ Initial absorbance

$A_o$  คือ Observed absorbance

### 8. ตรวจวัดการลดลงของซี้อยมเอโซด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร MSM สูตรที่เหมาะสมที่มีซี้อยมเอโซตามความเข้มข้นที่กำหนด ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงต่างๆ เมื่อครบตามระยะเวลาของการบ่ม จากนั้นเก็บอาหารปริมาตร 10 ml มาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 9,100 x g และนำส่วนใสที่ได้ไปวัดการลดลงของซี้อยมเอโซด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (HP 8453 UV-Visible Spectrophotometer, Germany)

### 9. วิธีวัดการเจริญของเซลล์

นำเซลล์ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนมาล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปวัดค่าการเจริญที่  $OD_{660 \text{ nm}}$

## 10. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation: S.D) สถิติที่ใช้ในการทดสอบสมมติฐานใช้ สถิติ F-Test (One-way และ Two-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยแบบรายคู่ตามวิธีของ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

## ผลการทดลอง

### การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต PD10 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียแกรมลบในสกุล *Klebsiella* โดยมีความเหมือนกันกับ *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์ NBRC 14438<sup>T</sup> โดยมีร้อยละความเหมือนเท่ากับ 99.50 (Figure 1) ซึ่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียได้

ฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูลโดยมี Accession Number เป็น LC093514 สำหรับไอโซเลต PD10

### การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกจางสี

จากการศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีผลต่อการฟอกจางสีของเชื้อ 4 ชนิด โดยใช้แบคทีเรียไอโซเลต PD10 พบว่าภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงทั้ง 4 สภาวะพบการฟอกจางสีได้ดีในสื่อย้อมเอโซชนิด MO (Figure 2) จะเห็นได้ว่าภายใต้สภาวะ Microaerophilic พบการฟอกจางสีสูงที่สุด ตามด้วยสภาวะ Sequential Aerobic-Microaerophilic สภาวะ Aerobic และสภาวะ Anaerobic ซึ่งมีค่าการฟอกจางสีอยู่ที่  $99.52 \pm 0.03$ ,  $95.92 \pm 0.31$ ,  $86.86 \pm 0.85$  และ  $77.77 \pm 0.33$  เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าภายใต้สภาวะ Microaerophilic แบคทีเรียนี้สามารถให้ประสิทธิภาพในการฟอกจางสีของเอโซทั้ง 4 ชนิดได้ดี ซึ่งมีค่าการฟอกจางสีอยู่ระหว่าง 65-99 เปอร์เซ็นต์

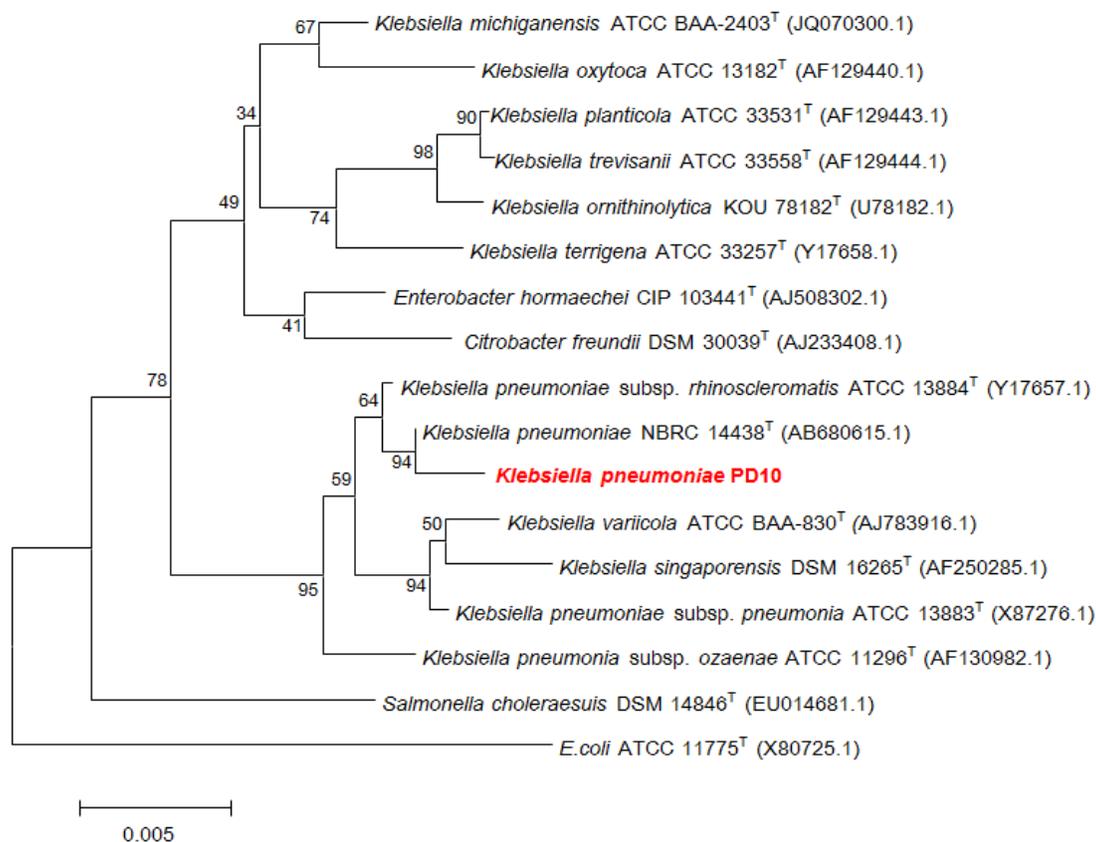


Figure 1 Phylogenetic tree of isolate PD10 for the partial sequences based on 16S rRNA.

### การศึกษาปัจจัยส่งเสริมการฟอกจางสี

เมื่อศึกษาความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการฟอกจางสีย้อม พบว่าการฟอกจางสีย้อมชนิด MO และ RBV-5R มีการฟอกจางสีไม่แตกต่างกันใน 4 ความเข้มข้นทั้งภายใต้สภาวะ Microaerophilic และภายใต้สภาวะ Anaerobic โดยมีการฟอกจางสีอยู่ระหว่าง 97-99 เปอร์เซ็นต์ และ 90-99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในสีย้อมชนิด RB-5 และ AR-AC พบการฟอกจางสีไม่แตกต่างกันเมื่อใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่ 10 และ 15 %v/v (Table 1)

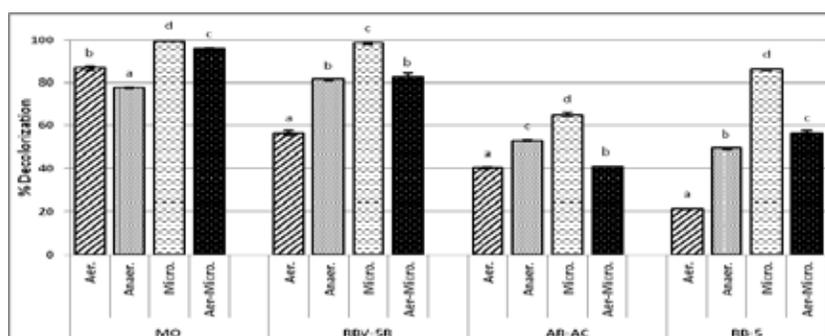
การศึกษาประสิทธิภาพในการฟอกจางสีย้อมเอโซที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันโดยเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ Microaerophilic และใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่ 3 %v/v พบว่าที่ความเข้มข้นของสีเริ่มต้นระหว่าง 0.005-0.02 %w/v ไอโซเลต PD10 มีการฟอกจางสีย้อมชนิด MO, RBV-5R และ RB-5 ได้ดีซึ่งฟอกจางสีได้ถึง 96-99 เปอร์เซ็นต์ใน 7 วัน ขณะที่พบการฟอกจางสีย้อมชนิด AR-AC ระหว่าง 65-79 เปอร์เซ็นต์และที่ความเข้มข้นสีเริ่มต้น 0.0075 %w/v มีการฟอกจางสี 79.37±0.03 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) และยังพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสีย้อมแบคทีเรียนี้มีอัตราการฟอกจางสีลดลง

การศึกษาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นที่ใช้พบว่าในสีย้อมชนิด MO และ RBV-5R ไอโซเลตนี้มีประสิทธิภาพในการฟอกจางสีได้ดีเมื่อเติม sucrose เป็นแหล่งคาร์บอนและในสีย้อม AR-AC ถูกฟอกจางสีได้ดีเมื่อเติม glucose หรือ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอนในขณะที่สีย้อมชนิด RB-5 ถูกฟอกจางสีได้ดีเมื่อใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน

จากการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการฟอกจางสีในสีย้อมแต่ละชนิด (Table 1) และนำมาศึกษาหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมพบว่าเมื่อใช้ sucrose ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5-5 %w/v ไอโซเลต PD10 มีประสิทธิภาพในการฟอกจางสีได้ดี โดยพบการฟอกจางสีสูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ในสีย้อมเอโซชนิด MO และ RBV-5R ในขณะที่พบการฟอกจางสีย้อมเอโซชนิด RB-5 ระหว่าง 81-88 เปอร์เซ็นต์ และพบการฟอกจางสีระหว่าง 55-66 เปอร์เซ็นต์ ในสีย้อมเอโซชนิด AR-AC

การศึกษาและเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของไนโตรเจนโดยใช้สูตรอาหารตาม Table 2 พบว่าสีย้อมเอโซชนิด MO มีการฟอกจางสีสูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์เมื่อใช้ yeast extract, NH<sub>4</sub>Cl และ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> เป็นแหล่งไนโตรเจนซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการไม่เติมแหล่งไนโตรเจน และสีย้อมเอโซชนิด RBV-5R และ RB-5 จะถูกฟอกจางสีได้ดีเมื่อใช้ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, urea และ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนซึ่งมีค่าการฟอกจางสีอยู่ในช่วง 94-97 เปอร์เซ็นต์และ 80-97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่พบการฟอกจางสีย้อมเอโซชนิด AR-AC ได้ดีเมื่อใช้ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, และ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน

การศึกษาสัดส่วนของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการฟอกจางสีย้อมเมื่อใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสัดส่วนที่เหมาะสมคือ 1:1 เมื่อใช้ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> สำหรับฟอกจางสีย้อมเอโซชนิด MO และ RBV-5R ซึ่งสามารถฟอกจางสีได้สูงถึง 98.62±0.01 และ 97.37±0.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับภายใน 6 วัน



The letter has raised different. In the same graph There is a difference significantly (p < 0.05).

**Figure 2** Decolorization of azo dyes by bacteria isolate PD10 under various culture conditions.

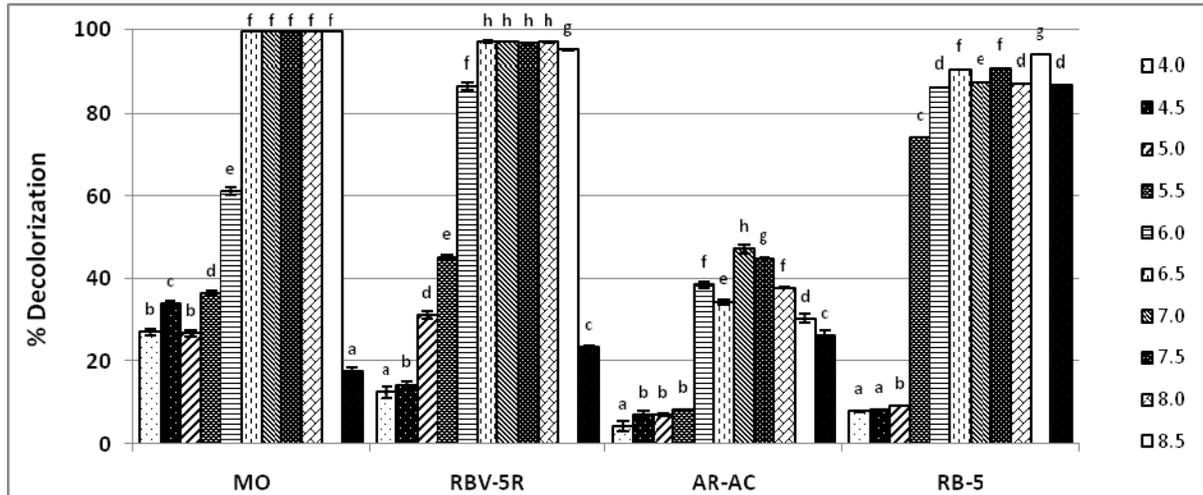

**Table 1** Factors influencing decolorization of four azo dyes by isolate PD10 under microaerophilic condition.

Factors		% Decolorization			
		MO	RBV-5R	RB-5	AR-AC
Inoculum size (% v/v)	3	99.49±0.01 <sup>j</sup>	97.90±0.08 <sup>h</sup>	94.63±0.26 <sup>e</sup>	73.39±0.43 <sup>a</sup>
	5	99.49±0.06 <sup>j</sup>	98.47±0.16 <sup>i</sup>	95.30±0.50 <sup>f</sup>	77.41±0.77 <sup>b</sup>
	10	99.47±0.03 <sup>j</sup>	99.18±0.20 <sup>j</sup>	97.34±0.19 <sup>g</sup>	92.14±0.11 <sup>c</sup>
	15	99.54±0.01 <sup>j</sup>	99.57±0.04 <sup>j</sup>	97.97±0.01 <sup>h</sup>	92.90±0.77 <sup>d</sup>
Dye concentration (% w/v)	0.005	99.57±0.02 <sup>k</sup>	98.01±0.24 <sup>i</sup>	96.90±0.09 <sup>h</sup>	65.61±0.72 <sup>a</sup>
	0.0075	99.48±0.01 <sup>k</sup>	98.18±0.00 <sup>j</sup>	93.06±0.05 <sup>f</sup>	79.37±0.03 <sup>c</sup>
	0.01	99.51±0.03 <sup>k</sup>	98.13±0.08 <sup>j</sup>	93.37±0.01 <sup>f</sup>	66.19±0.90 <sup>a</sup>
	0.015	99.66±0.00 <sup>k</sup>	93.81±0.13 <sup>g</sup>	92.01±0.04 <sup>e</sup>	65.57±0.72 <sup>a</sup>
	0.02	99.73±0.06 <sup>k</sup>	92.68±0.18 <sup>e</sup>	87.00±0.03 <sup>d</sup>	68.74±0.73 <sup>b</sup>
C-source (conc. 1.0% w/v)	sucrose	99.57±0.01 <sup>s</sup>	85.94±0.10 <sup>f</sup>	78.95±0.04 <sup>o</sup>	36.11±1.00 <sup>d</sup>
	glucose	71.85±0.22 <sup>k</sup>	80.11±0.09 <sup>p</sup>	74.95±0.02 <sup>l</sup>	38.80±0.45 <sup>f</sup>
	glycerol	51.67±0.17 <sup>i</sup>	75.20±0.74 <sup>l</sup>	76.55±0.07 <sup>m</sup>	28.76±0.27 <sup>c</sup>
	glutamate	41.29±0.15 <sup>h</sup>	57.52±0.09 <sup>j</sup>	40.52±0.02 <sup>g</sup>	17.83±0.81 <sup>a</sup>
	citrate	37.79±0.41 <sup>e</sup>	82.96±0.03 <sup>q</sup>	77.78±0.07 <sup>n</sup>	23.46±0.83 <sup>b</sup>
N-source (conc. 0.1%w/v)	None*	95.47±0.08 <sup>h</sup>	81.99±0.06 <sup>k</sup>	58.03±0.58 <sup>i</sup>	29.72±0.77 <sup>b</sup>
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	99.52±0.00 <sup>r</sup>	98.04±0.03 <sup>q</sup>	86.18±0.04 <sup>m</sup>	49.64±0.23 <sup>f</sup>
	NH <sub>4</sub> Cl	99.55±0.03 <sup>r</sup>	97.79±0.04 <sup>q</sup>	84.06±0.05 <sup>l</sup>	55.62±0.36 <sup>h</sup>
	NaNO <sub>3</sub>	52.48±0.74 <sup>g</sup>	37.08±0.97 <sup>d</sup>	29.86±0.57 <sup>b</sup>	17.18±0.20 <sup>a</sup>
	urea	67.64±0.03 <sup>j</sup>	96.85±0.06 <sup>o</sup>	97.28±0.16 <sup>p</sup>	33.53±0.34 <sup>c</sup>
	yeast extract	99.14±0.04 <sup>r</sup>	97.96±0.15 <sup>q</sup>	81.56±0.05 <sup>k</sup>	47.00±0.37 <sup>e</sup>
C : N-source concentration **	1:1	99.37±0.01 <sup>p</sup>	97.81±0.02 <sup>n</sup>	91.23±0.01 <sup>k</sup>	29.90±1.05 <sup>a</sup>
	2:1	99.58±0.00 <sup>p</sup>	97.65±0.17 <sup>m</sup>	87.43±0.00 <sup>j</sup>	35.96±0.59 <sup>b</sup>
	5:1	99.38±0.02 <sup>p</sup>	97.49±0.02 <sup>m</sup>	79.23±0.00 <sup>g</sup>	48.59±0.34 <sup>d</sup>
	10:1	99.19±0.03 <sup>o</sup>	97.2±0.04 <sup>m</sup>	80.63±0.00 <sup>h</sup>	57.28±0.53 <sup>e</sup>
	20:1	96.67±0.03 <sup>l</sup>	96.73±0.10 <sup>l</sup>	79.55±0.05 <sup>g</sup>	36.63±0.38 <sup>c</sup>
	40:1	98.69±0.09 <sup>o</sup>	82.05±0.08 <sup>i</sup>	69.4±0.00 <sup>f</sup>	36.66±0.28 <sup>c</sup>

The letter has raised different. In the same factors There is a difference significantly (p <0.05).

\*, without nitrogen source.

\*\*, Dye decolorization was performed using sucrose as carbon source(0.5% w/v for MO and RBV-5R and 1% w/v for RB-5 and AR-AC) and nitrogen source was varies in different dye, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (MO and RBV-5R), urea (RB-5) and NH<sub>4</sub>Cl (AR-AC).



The letter has raised different. In the same graph There is a difference significantly ( $p < 0.05$ ).

**Figure 3** Effect of initial pH on azo dyes decolorization by isolate PD10.

และฟอกจางสีได้  $91.23 \pm 0.01$  เปอร์เซ็นต์ภายใน 7 วัน ในสีย้อมเอโซชนิด RB-5 เมื่อใช้ urea ในสัดส่วน 1:1 และสำหรับการฟอกจางสีย้อมเอโซชนิด AR-AC จะมีประสิทธิภาพในการฟอกจางสีย้อมได้ดีเมื่อใช้ความเข้มข้นของ  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ในสัดส่วน 10:1 (Table 1)

การศึกษาความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่มีผลต่อการฟอกจางสี โดยศึกษาในช่วง pH 4.0-9.0 (Figure 3) พบว่าในช่วง pH 6.0-8.5 สีย้อมเอโซชนิด MO ถูกฟอกจางสี 99 เปอร์เซ็นต์และมีการฟอกจางสีย้อมเอโซชนิด RBV-5R ระหว่าง 95-97 เปอร์เซ็นต์เมื่ออาหารมีค่า pH 6.5-8.5 และสำหรับการฟอกจางสีย้อมเอโซชนิด RB-5 พบว่าไอโซเลต PD10 สามารถฟอกจางสีย้อมเอโซได้ดีเมื่ออาหารมีค่า pH 6.0-9.0 โดยพบการฟอกจางสีอยู่ระหว่าง 86-94 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พบการฟอกจางสีย้อมเอโซชนิด AR-AC ได้ดีเมื่ออาหารมีค่า pH 6.0-8.5

จากผลการศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงและปัจจัยส่งเสริมการฟอกจางสีที่เหมาะสมสำหรับสีย้อมเอโซทั้ง 4 ชนิดโดยใช้แบคทีเรียไอโซเลต PD10 ข้างต้นสามารถสรุปได้ใน Table 2 จะเห็นได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการฟอกจางสีย้อมเอโซชนิด MO และ RBV-5R เป็นสภาวะเดียวกัน ซึ่งจากการศึกษาในข้างต้นพบสีย้อมเอโซทั้ง 2 ชนิดนี้ถูกฟอกจางได้ดีกว่าการฟอกจางสีย้อมชนิด RB-5 และ AR-AC

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกจางสีแต่ละชนิดโดยแบคทีเรียไอโซเลต PD10 ข้างต้น ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบการฟอกจางสีและการเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรที่เตรียมจากการศึกษาข้างต้น (Table 2) พร้อมทั้งได้ทำการตรวจวัดการลดลงของสีย้อมเอโซด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (HP 8453 UV-Visible Spectrophotometer, Germany) เพื่อเป็นการยืนยันถึงการลดลงของสีย้อมเอโซจริง ซึ่งผลการฟอกจางสีย้อมและการเจริญของเชื้อโดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมแสดงใน Figure 4

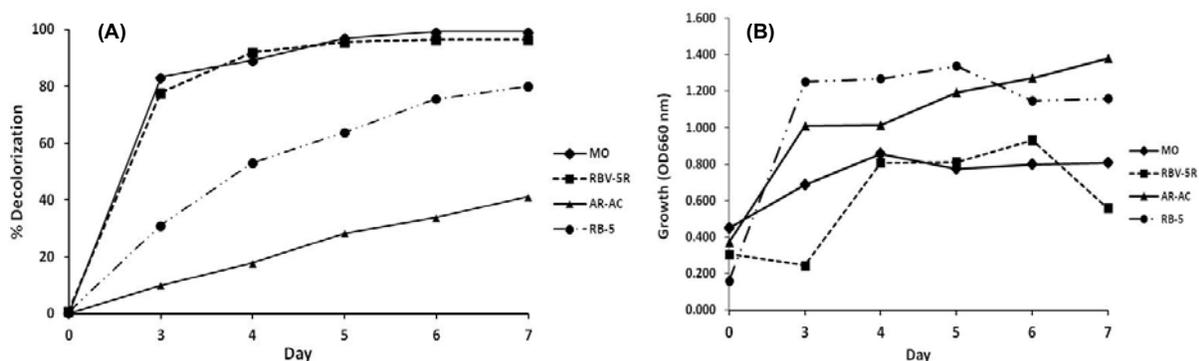
#### ผลการตรวจวัดการลดลงของสีย้อมเอโซด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer

จากการตรวจวัดการลดลงของสีย้อมเอโซด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer เพื่อสังเกตดูการเปลี่ยนแปลงของค่าความยาวคลื่นที่ถูกดูดกลืน ซึ่งค่าความยาวคลื่นนี้จะลดลงเมื่อสีย้อมเอโซถูกฟอกจางลงโดยแบคทีเรียดังแสดงใน Figure 5 ซึ่งจากภาพพบว่าสีย้อมเอโซชนิด MO และ RBV-5R มีค่าการดูดกลืนแสงลดลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วง 400-800 nm ภายใน 7 วัน สอดคล้องกับค่าการฟอกจางสีย้อมเอโซ



**Table 2** Optimum condition for azo dyes decolorization by bacteria isolate PD10 under microaerophilic condition.

	Azo dyes			
	MO	RBV-5R	RB-5	AR-AC
<b>Media</b>	Mineral Salts Medium (MSM)			
<b>Inoculum size</b>	3% v/v	3% v/v	3% v/v	3% v/v
<b>Dye concentration</b>	0.02% w/v	0.02% w/v	0.02% w/v	0.02% w/v
<b>C-source</b>	Sucrose	Sucrose	Sucrose	Sucrose
<b>Concentration of C-source</b>	0.5 %w/v	0.5 %w/v	1.0 %w/v	1.0 %w/v
<b>N-source</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Urea	NH <sub>4</sub> Cl
<b>C:N ratio</b>	2:1	2:1	0.9:1	16:1
<b>pH medium</b>	8.5	8.0	8.5	7.0

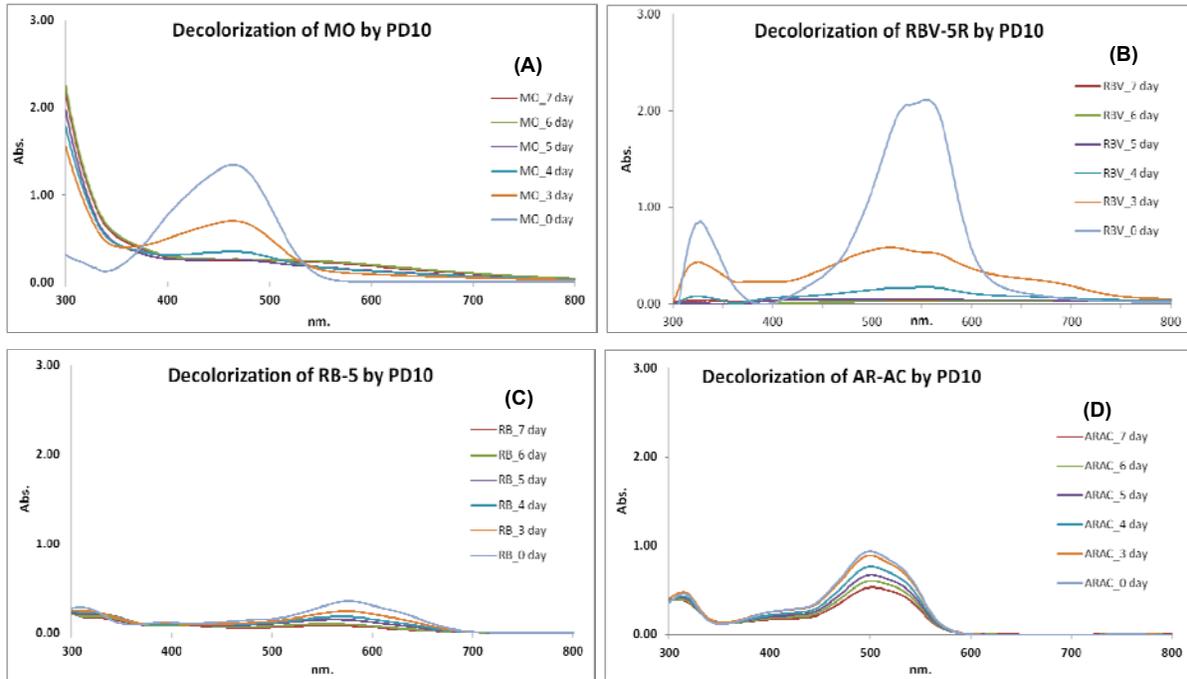


**Figure 4** Growth (A) and azo dyes decolorization (B) by isolate PD10 under optimize condition and incubation at room temperature for 7 day : MO(-◆-), RBV-5R(-■-), AR-AC(-▲-), RB-5(-●-)

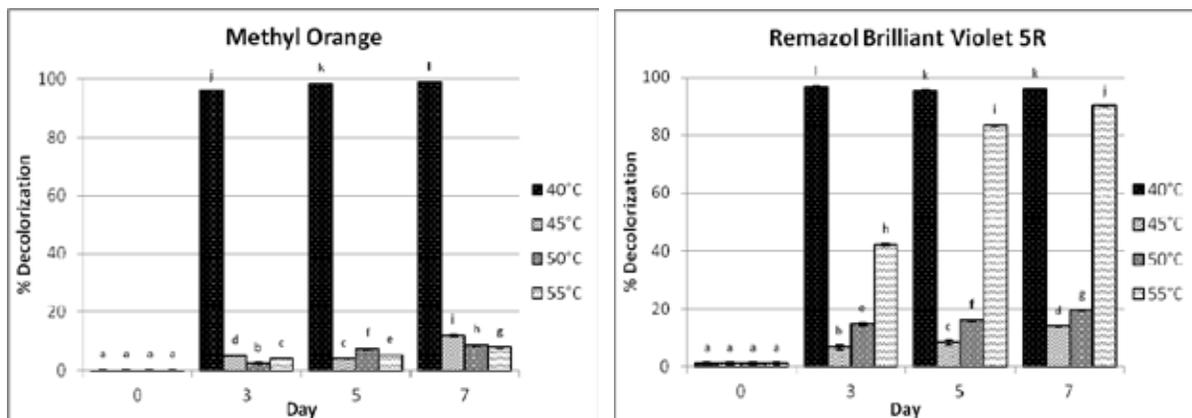
ใน Figure 4 ซึ่งมีการฟอกจางสีสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สีย้อมเอโซชนิด RB-5 มีการฟอกจางสีต่ำกว่า 2 ชนิดแรก จึงให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่า เช่นเดียวกับสีย้อมเอโซชนิด AR-AC ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงมากเนื่องจากยังมีสีย้อมหลงเหลืออยู่ในความเข้มข้นที่สูงสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีที่พบว่ามีการฟอกจางสีต่ำกว่า 45 เปอร์เซ็นต์

จากผลของการเจริญและการฟอกจางสีที่แสดงใน Figure 4 และผลการตรวจวัดการลดลงของสีดังแสดงใน Figure 5 ผู้วิจัยจึงได้เลือกทำการศึกษา

อุณหภูมิและผลต่อการฟอกจางสีของเอโซ 2 ชนิด ได้แก่ MO และ RBV-5R โดยแบคทีเรียไอโซเลต PD10 ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะสมที่มีสีย้อมเอโซเข้มข้น 0.02% w/v และใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่ 5% v/v เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ Microaerophilic เป็นเวลา 7 วัน พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสสีย้อมเอโซทั้ง 2 ชนิดถูกฟอกจางได้มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสสีย้อมเอโซชนิด RBV-5R ถูกฟอกจางสีสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (Figure 6)



**Figure 5** UV-visible spectral changes observed during decolorization of 4 azo dyes (non diluted A: MO; B: RBV-5R; C: RB-5 and D: AR-AC diluted 1:10) by bacteria isolate PD10 used optimize condition.



The letter has raised different . In the same graph There is a difference Significantly ( $p < 0.05$ ).

**Figure 6** Effect of temperature on decolorization of MO and RBV-5R by isolate PD10 under microaerophilic condition.

### สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต PD10 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียแกรมลบ *Klebsiella pneumoniae* NBRC 14438<sup>T</sup> ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม facultative anaerobic และมีรายงานว่า

ส่วนใหญ่พบแบคทีเรียกลุ่มนี้ในดินและน้ำที่ปนเปื้อนแบคทีเรียกลุ่ม facultative anaerobic และมีรายงานว่าส่วนใหญ่พบแบคทีเรียกลุ่มนี้ในดินและน้ำที่ปนเปื้อน และพบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ยังมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบที่เป็นพิษอื่น ๆ<sup>8-10,12</sup>



จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกจางสีย้อมเอโซของแบคทีเรียโอโซเลต PD10 พบว่าทั้ง 4 สภาวะการเพาะเลี้ยงมีการฟอกจางสีได้ดี และภายใต้สภาวะไม่ให้อากาศ หรือให้อากาศเล็กน้อย พบการฟอกจางสีได้สูงซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Parshettiet al.<sup>11</sup> ที่ศึกษาการฟอกจางสี และการย่อยสลายสีย้อมเอโซชนิด MO โดยแบคทีเรีย *Kocuriarosea* MTCC 1532 ภายใต้สภาวะหนึ่ง พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีการฟอกจางสีได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกับ Wang et al.<sup>12</sup> ที่พบการฟอกจางสีย้อมเอโซชนิด RB-5 ภายใต้สภาวะไม่ให้อากาศ สูงถึง 92 เปอร์เซ็นต์โดยแบคทีเรีย *Enterobacter* sp. EC3 ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่ม facultative anaerobe และพบการฟอกจางสีสูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ภายใน 10 ชั่วโมงเมื่อใช้แบคทีเรีย *Shewanella oneidensis* WL-7<sup>13</sup> และในงานวิจัยของ Oturkaret al.<sup>14</sup> และ Wang et al.<sup>15</sup> ที่ได้ศึกษาการฟอกจางสีย้อมเอโซชนิด RR ภายใต้สภาวะหนึ่งไม่ให้อากาศพบการฟอกจางสีสูงกว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงอื่น และนอกจากนี้เมื่อนำ 2 สภาวะมาทำงานต่อเนื่องกันพบการฟอกจางสีมีประสิทธิภาพสูงขึ้น ดังในงานวิจัยของ Supaka<sup>16</sup> ที่ทำการศึกษการฟอกจางสีชนิด RBV-5R โดยใช้เชื้อแบคทีเรียผสม (consortium) พบการฟอกจางสีได้ถึง 78.9 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะ anaerobic-aerobic system

จากการศึกษาความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่สามารถฟอกจางสีย้อมเอโซของแบคทีเรียโอโซเลต PD10 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อสูงขึ้นจะทำให้มีอัตราการฟอกจางสีเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน<sup>17</sup>

จากผลการศึกษาความเข้มข้นของสีย้อมเอโซ เห็นได้ชัดว่าความเข้มข้นของสีย้อมต่างๆ ที่ได้ศึกษาในเบื้องต้น พบว่าการฟอกจางสีได้ทุกความเข้มข้นแต่จะฟอกจางสีได้ต่ำลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสีขึ้น<sup>11,13,34</sup> เนื่องจากความเข้มข้นของสีย้อมเอโซที่เติมลงไปนั้นจะมีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย และนอกจากนี้โครงสร้างของสีย้อมเอโซที่ใช้ในการศึกษานี้ยังมีลักษณะเป็นวงเโรเมติกที่มีความซับซ้อน ย่อยสลายได้ยาก และมีความเป็นพิษสูง ดังนั้นแบคทีเรียจึงต้องใช้ระยะเวลาในการปรับตัว

เพิ่มขึ้นเพื่อให้ทนต่อสภาวะที่มีพิษก่อน จากนั้นแบคทีเรียจึงจะย่อยสลายสีย้อมเอโซดังกล่าวเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญ และพบว่า การฟอกจางสีแต่ละชนิดก็แตกต่างกันด้วย เนื่องจากโครงสร้างของสีย้อมเอโซแต่ละชนิดมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน<sup>18-22</sup> เช่นในสีกลุ่มรีแอคทีฟจะมีกลุ่มที่เป็น sulfonic acid (SO<sub>3</sub>H) บนวงแหวนเโรเมติก โดยสารกลุ่มเหล่านี้จะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเมื่อมีสีย้อมเอโซที่ความเข้มข้นสูง<sup>23-24</sup>

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการฟอกจางสีนั้นจะแตกต่างกันไปตามชนิดของสีย้อม เช่นในการศึกษาของ Wang et al.<sup>11</sup> พบการฟอกจางสีย้อมชนิด MO โดยแบคทีเรีย *Enterobacter* sp. EC3 ได้ดีเมื่อใช้ sucrose และ glucose เป็นแหล่งพลังงาน และในสีย้อมชนิด RB-5 พบว่าสามารถฟอกจางสีสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์เมื่อใช้ glucose เข้มข้น 1-8 g/L และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 12 g/L จะพบการฟอกจางสีต่ำกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าที่ความเข้มข้นของคาร์บอนเพียง 1 g/L ก็เพียงพอสำหรับการฟอกจางสีชนิดนี้ภายใน 36 ชั่วโมง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคาร์บอนเป็น 2 และ 4 g/L จะทำให้สามารถฟอกจางสีได้ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 48 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามเมื่อไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนจะทำให้เกิดการยับยั้งหรือลดกิจกรรมของการฟอกจางสีของเชื้อได้

จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนพบการฟอกจางสีได้ดีเมื่อใช้ yeast extract, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl และ urea เป็นแหล่งไนโตรเจนซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Parshettiet al.<sup>11</sup> พบแบคทีเรียสายพันธุ์ *K. rosea* MTCC 1532 สามารถฟอกจางสีย้อมเอโซชนิด MO ในอาหาร SM ที่ไม่มีการเติมแหล่งพลังงานเพียง 8.3 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น และเมื่อมีการเติม yeast extract เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่ามีการฟอกจางสีสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Ponrajat al.<sup>25</sup> ที่พบการฟอกจางสีย้อมชนิด O3R เท่ากับ 82.81, 70.17, 53.91 และ 81.25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยแบคทีเรียในจีแนส *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp. *Salmonella* sp. และ *Pseudomonas* sp. เมื่อใช้ yeast extract เป็นแหล่ง



ไนโตรเจน และจากงานวิจัยของ Wang *et al.*<sup>26</sup> พบการฟอกจางสีย้อมเอโซชนิด RB-5 ถึง 83 เปอร์เซ็นต์เมื่อใช้  $\text{NH}_4\text{Cl}$  เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่อย่างไรก็ตามในการฟอกจางสีแต่ละชนิดนั้นจะใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันซึ่งอาจจะขึ้นอยู่กับโครงสร้างของสีที่มี N เป็นองค์ประกอบอยู่ในโครงสร้าง หรืออาจจะขึ้นอยู่กับสูตรอาหารที่ใช้ด้วยเช่นกัน

จากการศึกษาความเป็นกรด-ด่างของอาหารพบการฟอกจางสีได้ดีเมื่ออาหารอยู่ในช่วง pH 7.0-8.5 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang *et al.*<sup>27</sup> ได้ศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม พบว่าที่ช่วง pH 5-10 แบคทีเรีย *Rhodospseudomonas palustris* มีประสิทธิภาพในการฟอกจางสีย้อมเอโซชนิด RB-5 ได้ดี และที่ pH 6-8 พบการฟอกจางสีสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และนอกจากนี้ยังพบว่าที่ pH 7.0 พบการฟอกจางสีสูงกว่า 92 เปอร์เซ็นต์ภายใน 108 ชั่วโมง และที่ pH 8.0-12.0 (ใน 120 ชั่วโมง) และพบอัตราการฟอกจางสีต่ำมากเมื่อ pH เป็นกรด (pH เท่ากับ 4.0 และ 6.0)<sup>11</sup> ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างถือว่าเป็นส่วนสำคัญหลักที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการฟอกจางสีย้อมเอโซ ซึ่งค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการฟอกจางสีโดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 6.0-10.0<sup>23,25,27-29</sup>

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิพบว่าแบคทีเรียไอโซเลต PD10 สามารถฟอกจางสีได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางประมาณ 37-55 องศาเซลเซียส ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Supaka<sup>30</sup> ที่พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสีย้อมเอโซคือ อุณหภูมิที่สูงปานกลางประมาณ 37-50 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และเมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นมากกว่านี้พบว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีย้อมเอโซจะลดลง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Oturkaret *al.*<sup>14</sup> ที่พบการฟอกจางสีย้อมเอโซชนิด RR120 โดยแบคทีเรีย *Bacillus lentus* BI377 ถึง 97 เปอร์เซ็นต์ภายใน 12 ชั่วโมง เมื่อปรับที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และยังพบว่าอุณหภูมิช่วง 35-45 องศาเซลเซียสแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีการฟอกจางสีได้ดีและจากการศึกษาของศศิพงษ์<sup>31</sup> พบว่าเอนไซม์เอโซรีดักเตสเป็นเอนไซม์ที่สามารถทนต่ออุณหภูมิที่ 60 องศา

เซลเซียสเป็นระยะเวลาสั้น ๆ เท่านั้น ดังนั้นประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีย้อมเอโซจะสอดคล้องกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์เอโซรีดักเตสจะอยู่ที่ประมาณ 35-45 องศาเซลเซียส และประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีย้อมจะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการทำงานของเอนไซม์เอโซรีดักเตส<sup>32-34</sup> และจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงของสีย้อมเอโซด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ซึ่งให้ค่าความยาวคลื่นลดลงในช่วง 400-800 nm เมื่อสีย้อมเอโซถูกฟอกจางโดยแบคทีเรีย<sup>5,24,35-38</sup>

จากการศึกษาศักยภาพและสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการฟอกจางสีย้อมกลุ่มเอโซที่รายงานข้างต้น จะเป็นส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการฟอกจางสีนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปใช้พัฒนาด้านการฟอกจางสีและการย่อยสลายสีย้อมกลุ่มเอโซต่าง ๆ ได้ โดยในอนาคตอาจจะมีการศึกษาที่เจาะลึกลงไปถึงโครงสร้างของสีแต่ละชนิดและเพิ่มปัจจัยส่งเสริมอื่นๆ เข้ามาช่วยเพื่อให้การฟอกจางสีและการย่อยสลายสีย้อมกลุ่มเอโซเป็นไปอย่างสมบูรณ์มากที่สุดจากผลการศึกษาข้างต้นเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่เกิดจากการปนเปื้อนของสีย้อมสังเคราะห์เหล่านี้ได้ทั้งในปัจจุบันและอนาคต

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้วัสดุ อุปกรณ์ สำหรับใช้ในการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี



## เอกสารอ้างอิง

- Moutaouakkil A, Zeroual Y, Dzayri FZ, Talbi M, Lee K, Blaghen M. Bacterial decolorization of the azo dye methyl red by *Enterobacteragglomerans*. J Annals Microbiol 2003;53:161-169.
- Mansour HB, Corroler D, Barillier D, Ghedira K, Chekir L, Mosrati R. Evaluation of genotoxicity and pro-oxidant effect of the azo dyes: Acids yellow 17, violet 7 and orange 52, and of their degradation products by *Pseudomonas putida* mt-2. Food ChemToxicol 2007;45:1670-1677.
- Talarposhti AM, Donnelly T, Anderson GK. Colour removal from a simulated dye wastewater using a two phase anaerobic packed bed reactor. J Water Res 2001;35:425-432.
- Sugiura W, Miyashita T, Yokoyama T, Arai M. Isolation of azo-dye-degrading microorganisms and their application to white discharge printing of fabric. J BiosciBioeng 1999;88(5):577-581.
- Fang H, Wenrong H, Yuezhong L. Biodegradation mechanisms and kinetics of azo dye 4BS by a microbial consortium. Chemosphere 2004;57:293-301.
- Ayed L, Mahdhi A, Cheref A, Bakhrouf A. Decolorization and degradation of azo dye Methyl Red by an isolated *Sphingomonaspaucimobilis*: Biototoxicity and metabolites characterization. Desalin 2011;274:272-277.
- มาลินี เรืองคง. การคัดแยกและการศึกษา ลักษณะของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน น้ำมันดีเซล และน้ำมันเครื่อง. โครงการงานชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม; 2550.
- Elisangela F, Andrea Z, Fabiana FG, Isis SS, Artur CP, Lucia RD. Microaerophilic-aerobic sequential decolorization/biodegradation of textile azo dyes by a facultative *Klebsiella* sp. strain VN-31. Process Biochem 2009;44:446-452.
- Wong PK, Yuen PY. Decolorization and biodegradation of methyl red by *Klebsiella pneumonia* RS-13. Water Res 1996;30:1736-44.
- Kao CM, Liu JK, Lou HR, Lin CS, Chen SC. Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiellaoxytoca*. Chemosphere 2003;50:1055-61.
- Parshetti GK, Telke AA, Kalyani DC, Govindwar SP. Decolorization and detoxification of sulfonated azo dye methyl orange by *Kocuriarosea* MTCC 1532. J Hazard Mater 2010;176:503-509.
- Wang H, Zheng, XW, Su JQ, Tian Y, Xiong XJ, Tian LZ. Biological decolorization of the reactive dyes Reactive Black 5 by a novel isolated bacterial strain *Enterobacter* sp. EC3. J Hazard Mater 2009;171:654-659.
- Wu J, Kim KS, Sung NC, Kim CH, Lee YC. Isolation and characterization of *Shewanellaoneidensis* WL-7 capable decolorizing azo dye Reactive Black 5. ApplMicrobiol 2009;55:51-55.
- Oturkar CC, Nemade HN, Mulik PM, Patole MS, Hawaldar RR, Gawai, KR. Mechanistic investigation of decolorization and degradation of Reactive Red 120 by *Bacillus lentus* BI377. BioresourTechnol 2011;102:758-764.
- Wang H, Su JQ, Zheng XW, Tian Y, Xiong XJ, Tian LZ. Bacterial decolorization and degradation of the reactive dye Reactive Red

- 180 by *Citrobacter* sp. CK3. *IntBiodeteriorBiodegrad* 2009;63:395-399.
16. Supaka N, Juntongjin K, Damronglerd S, Delia ML, Strehaiano P. Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. *J InstChemEng*2004;99:169-176.
  17. Ngwasiri PN, Augustin M, Bosco TJ. Biodecolourisation of textile dyes by local microbial consortia isolated from dye polluted soils in ngaoundere (Cameroon). *Int Environ Sci* 2011;1:7.
  18. Dafale N, Rao NN, Meshram SU, Wate SR. Decolorization of azo dyes and simulated dye bath wastewater using acclimatized microbial consortium-biostimulation and halo tolerance. *BioresourTechnol* 2008;99:2552-2558.
  19. Jadhav SU, Jadhav MU, Kagalkar AN, Govindwar SP. Decolorization of Brilliant Blue G dye mediated by degradation of the microbial consortium of *Galactomycesgeotrichum* and *Bacillus* sp. *J Chin InstChemEng* 2008;39:563.
  20. Sani RK, Banerjee UC. Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dyestuff effluent by *Kurthia* sp. *Enzyme MicrobTechnol* 1999;24:433.
  21. Saratale RG, Saratale GD, Chang JS, Govindwar SP. Ecofriendly degradation of sulfonated diazo dye C.I. Reactive Green 19A using *Micrococcus glutamicus* NCIM-2168. *BioresourTechnol* 2009;100:3897-3905.
  22. Tony BD, Goyal D, Khanna S. Decolorization of Direct Red 28 by mixed bacterial culture in an up-flow immobilized bioreactor. *J IndMicrobiolBiotechnol* 2009;36(7):955-960.
  23. Chen KC, Wu TJ, Liou JD, Hwang JS. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. *Biotechnol* 2003;101:57-68.
  24. Kalyani DC, Patil PS, Jadhav JP, Govindwar SP. Biodegradation of reactive textile dye Red BLI by an isolated bacterium *Pseudomonas* sp. SUK1. *BioresourTechnol* 2008;99:4635-4641.
  25. Ponraj M, Gokila K, Zambare V. Bacterial decolorization of textile dye-Orange 3R. *AdvBiotechnol* 2011;2(1):168-177.
  26. Wang X, Cheng X, Dezh S, Hong Q. Biodecolorization and partial mineralization of Reactive Black 5 by a strain of *Rhodopseudomonaspalustris*. *J Environ Sci* 2008;20:1218-1225.
  27. Chen KC, Huang WT, Wu JY, Hounq JY. Microbial decolorization of azo dyes by *Proteus mirabilis*. *J IndMicrobiolBiotechnol*1999;23:686-690.
  28. Guo J, Kang L, Wang X, Jingliang Y. Decolorization and degradation of azo dyes by redox mediator system with bacteria, Biodegradation of azo dyes. *The Handbook of Environmental Chemistry* 2010;9:85-100
  29. Kilic NK, Nielsen JL, Yuce M. Characterization of a simple bacterial consortium for effective treatment of wastewaters with reactive dyes and Cr(VI). *Chemosphere* 2007;67:826-831.
  30. Supaka N. Microbial Decolorization of Reactive Dyes in Anaerobic Aerobic Treatment System. Ph. D. Thesis. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand; 2003.
  31. ศติพงษ์ ปลายเงิน. การย่อยสลายสีอะโซโดยแบคทีเรียผสม. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี; 2550.



32. Chang JS, Chou C, Lin YC, Lin PJ, Ho JY, Hu TL. Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. J Water Res 2001;35:2841-2850.
33. Pearce CI, Lloyd JR, Guthrie JT. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cell : a review. J Dyes Pigm 2003;58:179-196.
34. Wang H, Su JQ, Zheng XW, Tian Y, Xiong XJ, Tian LZ. Bacterial decolorization and degradation of the reactive dye Reactive Red 180 by *Citrobacter* sp. CK3. IntBiodeteriorBiodegrad 2009;63:395-399.
35. Alireza NE, Mahshid K. Heterogeneous photodecolorization of Eriochrome Black T using Ni/P zeolite catalyst. Desalination 2010;262:79-85.
36. Hsueh CC, Chen BY. Exploring effects of chemical structure on azo dye decolorization characteristics by *Pseudomonas luteola*. J Hazard Mater 2008;154:703-710.
37. Kim SY, An JY, Kim BW. The effects of reductant and carbon source on the microbial decolorization of azo dyes in an anaerobic sludge process. J Dyes Pigm 2008;76:256-263.
38. Chen L, Cui Y, Qian G, Wan M. Synthesis and spectroscopic characterization of an alkoxy silane dye containing azo-benzothiazole chromophore for nonlinear optical applications. J Dyes Pigm 2007;73:338-343.