# การย่อยสลายสีย้อมผ้าสีน้ำเงินโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำทิ้งและดินของโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอ

# (Biodegradation of Blue Dye by the Isolated Bacteria from Waste Water and Soil of Textile Industries)

**อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์***

*สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา 1061 ถนนอิสรภาพ แขวงหิรัญรูจี เขตธนบุรี กรุงเทพฯ 10600

## บทคัดย่อ

จากการคัดแยกสายพันธุ์แบคทีเรียชนิดต้องการอากาศในการเจริญจากน้ำทิ้งและดินบริเวณโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอ อำเภอพระประแดง เขตราษฎร์บูรณะ และเขตบางบอน ที่สามารถย่อยสลายและทนสีย้อมผ้าสีน้ำเงินชนิดเอโซ (azo dye) ได้ พบว่ามีแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ A B D F I J P และ R สามารถเจริญและทนต่อสีย้อมผ้าได้สูงสุด 20 มิลลิกรัม/ลิตร โดยที่สายพันธุ์ B สามารถเจริญได้เล็กน้อยที่ความเข้มข้นของสีย้อม 40 มิลลิกรัม/ ลิตรในอาหารแข็ง PCA เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์ดังกล่าวมาทำการทดสอบการย่อยสลายสีย้อมผ้าในอาหารเหลว MS ที่ผสมสีย้อมผ้าสีน้ำเงิน 0.1-1.2 กรัม/ลิตร พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ R สามารถทนความเข้มข้นของสีย้อมผ้าได้มากกว่าสายพันธุ์อื่นคือ 1.2 กรัม/ลิตร และที่ความเข้มข้น 0.1-0.8 กรัม/ลิตร แบคทีเรียสายพันธุ์ R ให้เปอร์เซ็นต์การลดความเข้มของสีย้อมผ้าไม่แตกต่างกันคืออยู่ในช่วง 93.72 - 98.29 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์จะลดลงเมื่อเลี้ยงที่ความเข้มข้นของสีย้อมผ้ามากกว่า 0.8 กรัม/ลิตร ซึ่งจากการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ R พบว่าคือ *Bacillus cereus*

## บทนำ

น้ำทิ้งจากบ่อย้อมของอุตสาหกรรมสิ่งทอเมื่อถูกใช้แล้วมักจะยังคงมีสี กลิ่น และสารเคมีหลงเหลืออยู่เสมอ เมื่อถูกทิ้งลงสู่ท่อระบายน้ำของโรงงานโดยไม่ผ่านการบำบัดเสียก่อนก็จะทำให้เกิด

การย่อยสลายสีย้อมผ้าในน้ำทิ้งซึ่งส่วนใหญ่เป็นสีย้อมชนิดเอโซ (azo dyes) โดยชีววิธีมีทั้งการใช้แบคทีเรีย รา และเชื้อผสม (mixed culture of microorganisms) ใช้สภาวะการบำบัดทั้งที่เป็นแบบใช้ออกซิเจน (aerobic condition) และไร้ออกซิเจน (anaerobic condition) โดยมีการออกแบบบ่อบำบัดต่างๆ กันหลายแบบ (Olukanni et al., 2006; Maeir et al., 2004) ซึ่งนอกจากจะลดปริมาณสีย้อมแล้วยังสามารถลดค่า BOD (Biological oxygen demand) และ COD (Chemical oxygen demand) ของน้ำเสียอีกด้วย จุลินทรีย์ที่สามารถใช้สีย้อมผ้าในการเจริญเติบโตได้จะต้องมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยสีย้อมให้มีโมเลกุลเล็กลงและนำเข้าสู่เซลล์ได้ (Khehra et al., 2005; Chen et al., 2003) ซึ่งจุลินทรีย์ไม่ทุกชนิดที่จะมีคุณสมบัติดังกล่าว รวมทั้งจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความสามารถในการย่อยสลายสีย้อมได้ต่างๆ กัน (Ajibola et al., 2005; Idris et al., 2007) ดังนั้นการหาชนิดของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดีเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมสิ่งทอของประเทศไทย โดยสามารถเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมของประเทศไทยจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่ง เพราะจะเป็นการช่วยให้สิ่งแวดล้อมดีขึ้นโดยไม่ต้องสั่งซื้อเชื้อจากต่างประเทศซึ่งอาจจะเจริญได้ไม่ดีนัก หรือไม่สามารถเจริญได้ในสภาพแวด ล้อมของประเทศไทย

งานวิจัยในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อคัดแยกสายพันธุ์แบคทีเรียชนิดต้องการอากาศ (aerobic bacteria) ที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายสีย้อมผ้าสีน้ำเงินชนิดเอโซได้ ซึ่งการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียจากแหล่งน้ำทิ้งและดินจากโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอในบริเวณกรุงเทพมหานคร และเขตปริมณฑลมีโอกาสจะพบสายพันธุ์ที่สามารถเจริญและย่อยสลายสีย้อมได้มาก โดยคาดว่าในอนาคตแบคทีเรียที่คัดแยกได้นี้จะมีประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีย่อยสลายทาง

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การเก็บตัวอย่างน้ำและดิน

เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากท่อระบายน้ำโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอในเขตราษฎร์บูรณะ เขตบางบอน และอำเภอพระประแดง จังหวัดสมุทรปราการ สถานที่ละ 1 ตัวอย่าง นำมาบรรจุขวดที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นปิดฝาให้แน่นสนิท และเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณท่อน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอ ในเขตราษฎร์บูรณะ เขตบางบอน และอำเภอพระประแดง จังหวัดสมุทรปราการ สถานที่ละ 1 ตัวอย่าง นำมาบรรจุขวดที่ปลอดเชื้อแล้ว และฝาปิดให้มิดชิด

### การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินและน้ำ

ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม (ถ้าเป็นน้ำใช้ 1 มิลลิลิตร) ทำการเจือจางในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ได้ค่าการเจือจาง (dilution) $10^{-1}$ ถึง $10^{-6}$ ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างค่าการเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA (plate count agar) ผสมสีย้อมผ้าสีน้ำเงินให้ได้ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วใช้แท่งแก้วงอ (glass spreader) กระจายตัวอย่างให้ทั่ว ทำ 3 ซ้ำ ในแต่ละค่าการเจือจาง จากนั้นนำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เก็บคอโลนีแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกันลงในหลอดอาหารเอียง PCA (PCA slant) พร้อมบันทึกลักษณะคอโลนีและแหล่งที่คัดแยกได้

### ความทนทานต่อสีย้อมผ้าของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PCA ผสมสีย้อมผ้าสีน้ำเงิน (azo dye: Blue H5R) ให้มีความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 5, 10, 20, 40, 50 และ 80 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เทลงในจานเพาะเชื้อความเข้มข้นละ 3 จาน แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วยลูป (loop) ประมาณ ½ ลูป ลากลงบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ จานละ 7 เชื้อ (ทำในตู้เขี่ยเชื้อ) แล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกลักษณะการขึ้นของแบคทีเรียในแต่ละความเข้มข้นของสีย้อมผ้าเพื่อคัดเลือกเชื้อที่สามารถทนสีย้อมได้ที่ความเข้มข้นสูงสุดไปใช้ทดลองต่อไป

### ความสามารถในการย่อยสลายสีย้อมผ้าของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแร่ธาตุกลูโคส (mineral salt glucose: MS) ผสมสีย้อมผ้าให้ได้ความเข้มข้นต่างกันคือ 0.1 ถึง 1.2 กรัม/ลิตร (ถ้าเชื้อสามารถขึ้นได้ในอาหารนี้ก็จะเพิ่มความเข้มข้นของสีย้อมขึ้นเรื่อยๆ จนเชื้อไม่สามารถขึ้นได้) ให้เตรียมอาหารเหลวในฟลาสก์ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่อาหาร ฟลาสก์ละ 100 มิลลิลิตร

2. เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยเลี้ยงในอาหารเหลว NB (nutrient broth) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. ใส่หัวเชื้อ 1 มิลลิลิตร ในอาหารที่ผสมสีย้อมผ้าในข้อ 1 ทำซ้ำ 3 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้นของสีย้อมผ้าต่อเชื้อแบคทีเรีย 1 สายพันธุ์

4. นำฟลาสก์ในข้อ 3 ไปเข้าเครื่องเขย่า (shaker) เพื่อเพิ่มออกซิเจน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

5. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างจากฟลาสก์ทุกวัน ครั้งละ 5 มิลลิลิตร โดยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) ใส่หลอดทดลองแล้วนำมาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียออกที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง

6. นำส่วนใสมาตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ บันทึกผลค่า OD ทุกวัน แล้วเปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่เชื้อ เพื่อดูความสามารถของเชื้อในการลดความเข้มของสีย้อม นำข้อมูลค่า OD (3 ซ้ำ) ที่ได้มาเฉลี่ย แล้วคิดคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงของค่าความเข้มสีย้อมในแต่ละวัน โดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับค่า OD ที่เวลานั้น

7. วิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีทางสถิติ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (version 10.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การลดความเข้มของสีย้อมผ้าของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ด้วยวิธี Duncan New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance)

## การตรวจสอบลักษณะของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสีย้อม

1. คุณสมบัติการติดสีแกรม (Gram's stain) นำไปตรวจสอบรูปร่างและลักษณะการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายเลนส์วัตถุ 100 เท่า

2. ความสามารถในการสร้างเอนโดสปอร์ (endospore formation) โดยเทคนิคการย้อมสีเอนโดสปอร์ แล้วนำไปตรวจสอบการสร้างเอนโดสปอร์ภายใต้กล้องจุทรรศน์กำลังขยายเลนส์วัตถุ 100 เท่า

3. การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรีย ด้วยวิธีทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี โดยใช้ลูปเขี่ยคอโลนีของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ต้องการทดสอบ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (tryptic soy broth) 1 หลอดต่อ 1 ชนิด เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง 2-3 ชั่วโมงหรือจนกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อจะขุ่น แล้วนำไปเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ สำหรับทดสอบลักษณะทางชีวเคมี จากนั้นแปลผลการทดสอบทางชีวเคมีและจำแนกชนิดโดยใช้คู่มือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt et al., 1994)

# ผลการศึกษา

## การแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำทิ้งและดินบริเวณโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอ

จากการเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งและดินบริเวณโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอ อำเภอพระประแดง เขตราษฎร์บูรณะและบางบอน พบว่าน้ำทิ้งมีสีย้อมผ้าปะปนอยู่ต่างกัน เมื่อนำมาแยกเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิคกระจายเชื้อบนจานเพาะเชื้อโดยใช้อาหารแข็ง PCA แล้วเลือกค่าการเจือจาง (dilution) ที่มีเชื้อ 30- 300 คอโลนี สามารถเก็บคอโลนีแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกันได้ 14 สายพันธุ์ แบคทีเรียทั้ง 14 สายพันธุ์ได้ถูกนำตรวจสอบความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นของสีย้อมผ้าสีน้ำเงินในเบื้องต้นบนอาหารแข็ง PCA ผสมสีย้อมผ้าสีน้ำเงินความเข้มข้น

เหลวและมีความสามารถในการลดความเข้มของสีย้อมผ้าสีน้ำเงินได้ต่างกันดังนี้

**ความสามารถในการลดความเข้มของสีย้อมผ้าสีน้ำเงินในอาหารเหลวโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้**

เมื่อนำแบคทีเรียสายพันธุ์ A B D F I J P และ R ที่คัดเลือกได้มาทดสอบเลี้ยงในอาหารเหลว MS ผสมสีย้อมผ้าสีน้ำเงินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 - 1.2 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบความเข้มของสีย้อมที่ลดลงโดยวิธีสเปกโตรโฟโทเมตริก (spectrophotometric method) ที่ค่าความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร พบว่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการเจริญเติบโตในอาหาร

**ความสามรถในการเจริญในอาหารเหลว MS ผสมสีย้อมผ้าสีน้ำเงินที่ความเข้มข้น 0.1–1.2 กรัม/ลิตร โดยแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ คือ A B D F I J P และ R**

พบว่าแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ มีสามารถในการเจริญในอาหารเหลวดังกล่าวได้แตกต่างกัน โดยทำการตรวจสอบการเจริญในวันที่ 7 พบว่าสายพันธุ์ R ทนต่อความเข้มข้นของสีย้อมผ้าสีน้ำเงินได้สูงสุด (1.2 กรัม/ลิตร) สายพันธุ์ A ทนความเข้มข้นของสีย้อมผ้าสีน้ำเงินได้น้อยที่สุด (0.1 กรัม/ลิตร) และสายพันธุ์ P ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่ผสมสีย้อมผ้าเข้มข้น 0.1-1.2 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1. ความสามารถในการเจริญในอาหารเหลว MS ผสมสีย้อมผ้าสีน้ำเงินที่ความข้มข้น 0.1-1.2 กรัม/ลิตร

| สายพันธุ์ | ความเข้มข้นของสีย้อมผ้า (กรัม/ลิตร) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 | 1.2 |
| A | √ | - | - | - | - | - | - |
| B | √ | √ | √ | - | - | - | - |
| D | √ | - | - | - | - | - | - |
| F | √ | √ | √ | √ | - | - | - |
| I | √ | √ | √ | √ | - | - | - |
| J | √ | √ | √ | √ | - | - | - |
| P | - | - | - | - | - | - | - |
| R | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |

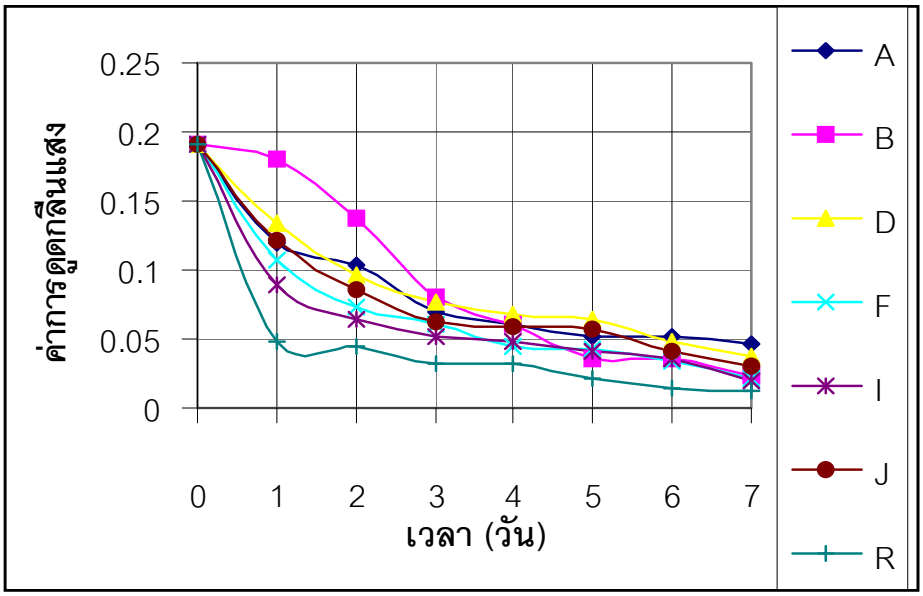
หมายเหตุ √ หมายถึง สามารถเจริญได้; - หมายถึง ไม่สามารถเจริญได้

**ความสามารถทนต่อความเข้มข้นสีย้อมผ้าสีน้ำเงินที่ 0.1 กรัม/ลิตร ของแบคทีเรียสายพันธุ์ R**

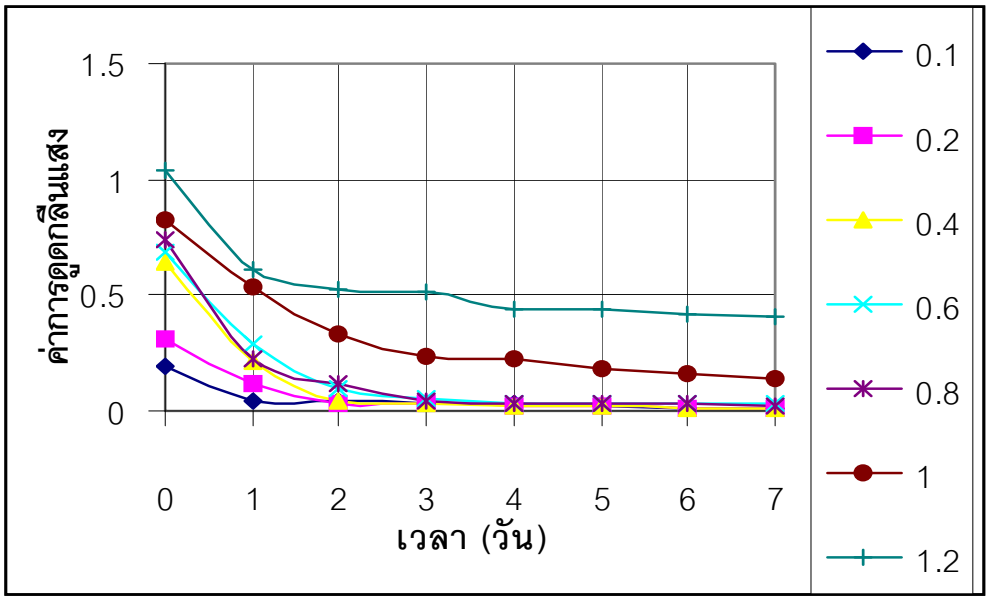
เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ A B D F I J P และR ในอาหารเหลว MS ผสมสีย้อมผ้าสีน้ำเงิน 0.1 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสายพันธุ์ P ไม่สามารถเจริญได้ (ตารางที่ 1) จึงได้ศึกษาประสิทธิภาพในการลดความเข้มของสีย้อมผ้าสีน้ำเงินโดยแบคทีเรีย 7 สายพันธุ์ที่เหลือคือ A B D F I J และ R และตรวจสอบความเข้มของสีย้อมที่ลดลงทุกวัน ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 1 จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การลดลงของความเข้มสีย้อมผ้าสีน้ำเงิน ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.1 กรัม/ลิตร ในวันที่ 7 ของแบคทีเรียสายพันธุ์ A B D F I J และR พบว่าสายพันธุ์ R มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การลดลงสูงกว่าสายพันธุ์ A D และ J อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 สายพันธุ์ I มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์สูงกว่า A และD สายพันธุ์ F สูงกว่า A และสายพันธุ์ B สูงกว่าสายพันธุ์ A ที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.05

**ความสามารถในการลดความเข้มของสีย้อมผ้าสีน้ำเงินที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.1-1.2 กรัม/ลิตร ของแบคทีเรียสายพันธุ์ R**

จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ R มีความสามารถทนต่อความเข้มข้นของสีย้อมผ้าได้มากกว่าสายพันธุ์อื่น อีกทั้งสามารถลดความเข้มของสีย้อมผ้าในเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าสายพันธุ์อื่น ดังนั้นจึงนำสายพันธุ์ดังกล่าวมาทดสอบความสามารถในการลดความเข้มของสีย้อมที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น (0.1-1.2 กรัม/ลิตร) ซึ่งได้ผลดังภาพที่ 2




ภาพที่ 1. การลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมผ้าสีน้ำเงิน 0.1 กรัม/ลิตร ในช่วงเวลา 7 วันโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ A B D F I J และ R




ภาพที่ 2. การลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมผ้าสีน้ำเงิน 0.1 ถึง 1.2 กรัม/ลิตร ในช่วงเวลา 7 วัน โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ R

จากภาพที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การลดความเข้มของสีย้อมผ้าสีน้ำเงินที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.1-1.2 กรัม/ลิตร ของแบคทีเรียสายพันธุ์ R ในวันที่ 7 พบว่าเปอร์เซ็นต์การลดความเข้มของสีย้อมผ้ามีค่าน้อยลงเมื่อความเข้มข้นของสีย้อมผ้าเกิน 0.8 กรัม/ลิตร (ได้แก่ 1.0 และ1.2 กรัม/ลิตร) โดยที่ความเข้มข้นของสีย้อม 0.1 - 0.8 กรัม/ลิตร มีเปอร์เซ็นต์การลดลงไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

## การศึกษาลักษณะการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว MS ผสมสีย้อมผ้าสีน้ำเงิน

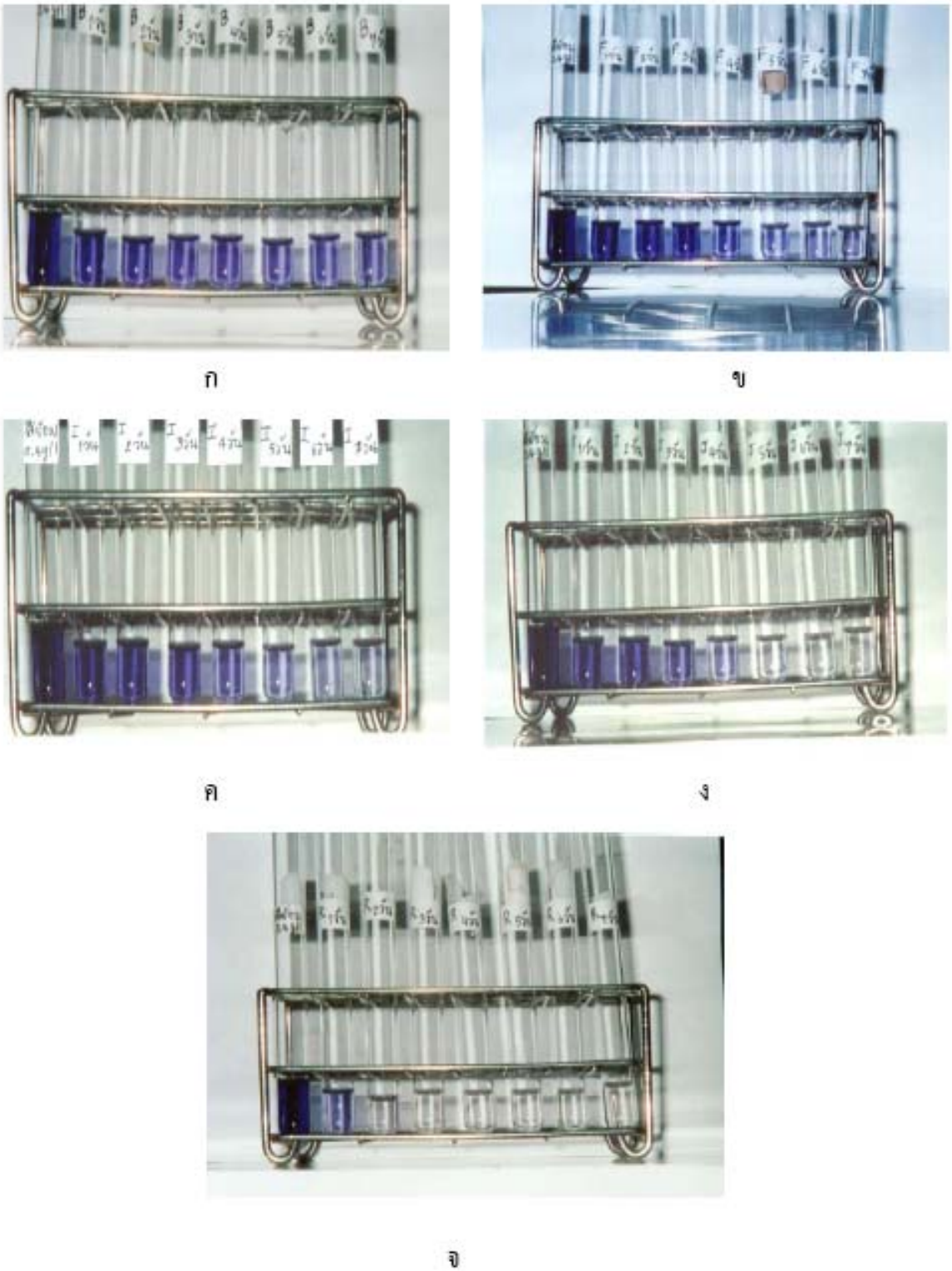
เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ R ในอาหารเหลวผสมสีย้อมผ้าสีน้ำเงิน 0.1 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับอาหารเหลวผสมสีย้อมผ้าที่ความเข้มข้นเดียวกันแต่ไม่ใส่เชื้อพบว่าความเข้มของสีย้อมผ้าลดลงอย่างเห็นได้ชัด และเมื่อตั้งฟลาสก์ทิ้งไว้นิ่งๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงพบว่าเซลล์สามารถตกตะกอนได้อย่างรวดเร็วและตะกอนเป็นกลุ่มมีขนาดใหญ่สีน้ำเงินเข้มทำให้เห็นของเหลวส่วนบนใสขึ้นเปรียบเทียบกับอาหารผสมสีย้อมผ้าสีน้ำเงิน 0.1 กรัม/ลิตรที่ไม่ได้ใส่เชื้อ (ไม่ได้แสดงผลไว้ในที่นี้) และเมื่อทำการเปรียบเทียบความสามารถในการลดลงของความเข้มของสีย้อมผ้าความเข้มข้น0.2 กรัม/ลิตร โดยแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในความเข้มข้นนี้คือแบคทีเรียสายพันธุ์ B F I J และ R โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเหล่านี้ในอาหารเหลว MS ผสมสีย้อมผ้าที่ความเข้มข้น 0.2 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน สังเกตด้วยตาพบว่าแบคทีเรียที่สามารถลดความเข้มของสีย้อมผ้าได้ดีที่สุดคือแบคทีเรียสายพันธุ์ R และน้อยที่สุดคือแบคทีเรียสายพันธุ์ B (ภาพที่ 3)

ภาพที่ 3. การเปรียบเทียบความสามารถในการลดความเข้มของสีย้อมผ้าสีน้ำเงินเข้มข้น 0.2 กรัม/ลิตร ในอาหาร เหลว MS โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ B F I J และ R ตามลำดับ (จากซ้าย) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน และอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสีย้อมผ้าสีน้ำเงินความเข้มข้นเดียวกันที่ไม่ได้ใส่เชื้อ (ซ้ายสุด)

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้โดยสามารถเจริญได้ในอาหารที่ผสมสีย้อมผ้าความเข้มข้นสูงถึง 0.4 กรัม/ลิตร ซึ่งได้แก่ สายพันธุ์ B F I J และ R เป็นเวลา 7 วัน ในแต่ละวันได้เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เอาเซลล์ออก และนำของเหลวมาตรวจสอบการลดลงของสีย้อมโดยเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ และการสังเกตด้วยตา พบว่าแบคทีเรียที่สามารถลดความเข้มข้นของสีย้อมได้เร็วที่สุดคือสายพันธุ์ R โดยไม่สังเกตเห็นสีย้อมผ้าสีน้ำเงินเมื่อเลี้ยงไว้ 3 วัน และสายพันธุ์ที่สามารถลดความเข้มของสีได้น้อยที่สุดคือสายพันธุ์ B ซึ่งสามารถสังเกตเห็นสีย้อมผ้าสีน้ำเงินได้จนถึงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในภาพที่ 4

## การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ R

จากการตรวจสอบลักษณะรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คุณสมบัติการติดสีย้อมแกรม และความสามาถในการสร้างเอนโดสปอร์ พบว่าเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ R มีลักษณะเป็นท่อนยาวต่อกันเป็นสาย ติดสีย้อมแกรมบวก และมีความสามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ (ตารางที่ 2) และเมื่อนำไปตรวจรูปแบบการสร้างกรดโดยกระบวนการหมักแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่าตรงกับลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus cereus* (ตารางที่ 2) ซึ่งผลดังกล่าวสนับสนุนข้อมูลด้านรูปร่างลักษณะ การติดสีแกรม และการสร้างเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ที่เป็นลักษณะของ *B. cereus*




ภาพที่ 4. การลดลงของความเข้มสีย้อมผ้าสีน้ำเงิน (เข้มข้นเริ่มต้น 0.4 กรัม/ลิตร) เมื่อปั่นเอาเซลล์แบคทีเรียออก ในวันต่างๆ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ B (ก) F (ข) I (ค) J (ง) และ R (จ)

ตารางที่ 2. คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ R

| ลักษณะ | ปฏิกิริยา | ลักษณะ | ปฏิกิริยา |
|---|---|---|---|
| Gram reaction | +ve | - arbutine | + |
| Shape | bacillus | - esculine | + |
| Endospore formation | + | - salicine | + |
| Fermentative production of acid form : | | - cellobiose | + |
| - glycerol | + | - maltose | + |
| - erythritol | - | - lactose | - |
| - D-arabinose | - | - melibiose | - |
| - L-arabinose | - | - sucrose | + |
| - ribose | + | - trehalose | + |
| - D-xylose | - | - inuline | - |
| - L-xylose | - | - melezitose | - |
| - adonitol | - | - D-raffinose | - |
| - β-methyl-D-xyloside | - | - starch | + |
| - galactose | - | - glycogene | + |
| -D-glucose | + | - xylitol | - |
| - D-fructose | + | - β-gentibiose | - |
| - D-mannose | - | - D-turanose | + |
| - D-sorbose | - | - D-lyxose | - |
| - rhamnose | - | - D-tagatose | - |
| - dulcitol | - | - D-fucose | - |
| - inocitol | - | - L-fucose | - |
| - mannitol | - | - D- arabitol | - |
| - sorbitol | - | - L- arabitol | - |
| - α-methyl-D-manoside | - | - gluconate | + |
| - α-methyl-D-glucoside | + | - 2- keto-gluconate | - |
| - N-acetyl-glucosamine | + | - 5-keto-gluconate | - |
| - amygdaline | - | | |

หมายเหตุ: +ve คือ Gram positive bacteria; + คือ Positive reaction; - คือ Negative reaction

## อภิปรายผลการทดลอง

ในการทดลองคัดเลือกแบคทีเรียที่ทนต่อสีย้อมผ้าสีน้ำเงินในแหล่งน้ำทิ้งและดินบริเวณโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอ เขตราษฎร์บูรณะ เขตบางบอน และอำเภอพระประแดง จังหวัดสมุทรปราการ ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งผสมสีย้อมผ้า 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งสามารถคัดเลือกแบคทีเรียได้จำนวน 14 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ A B C D F G H I J M P R และ S จากนั้นได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียในขั้นที่สอง โดยทดสอบความสามารถในการทนต่อสีย้อมผ้าสีน้ำเงินที่ความเข้มข้นสูงขึ้นคือ 5-80 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในอาหารแข็ง PCA พบว่าแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ A B D F I J P และ R สามารถทนต่อสีย้อมผ้าได้ถึง 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จึงได้นำแบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์มาทดลองเลี้ยงในอาหาร

สำหรับการศึกษาลักษณะการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทนต่อความเข้มข้นของสีย้อมผ้าสูงเกิน 0.4 กรัม/ลิตรในอาหารเหลว MS คือสายพันธุ์ F I J และ R พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ R มีลักษณะการเจริญในอาหารเหลวที่แตกต่างจากสายพันธุ์อื่น กล่าวคือเซลล์มีการจับกลุ่มกันและตกตะกอนได้อย่างรวดเร็ว (1–2 ชั่วโมง) เมื่อตั้งฟลาสก์ทิ้งไว้นิ่งๆ ทำให้เห็นของส่วนบนใสขึ้น สำหรับเซลล์ที่ตกตะกอนพบว่ามีสีน้ำเงินเข้มอาจเนื่องมาจากการที่เซลล์สามารถใช้สีย้อมผ้าในการเจริญและดูดซับสีไว้ สำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นเซลล์มีสีน้ำเงินเช่นเดียวกันแต่ตกตะกอนได้ยาก โดยต้องใช้เวลาในการตกตะกอนได้เองประมาณ 3-4 วัน ดังนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์ R จึงเป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจในการนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีสีย้อมผ้าปนเปื้อนในระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน เนื่องจากความสามารถในการย่อยสลายสีย้อมผ้าได้ในปริมาณสูงในสภาพที่มีออกซิเจน และความสามารถในการตกตะกอนของเซลล์ ซึ่งทำให้สามารถกำจัดเซลล์ออกได้ง่ายในขั้นตอนสุดท้ายของการบำบัดน้ำเสีย อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสีย้อมผ้าสีอื่น และชนิดของสีย้อมผ้าอื่นๆ ต่อไปด้วยในอนาคต เพื่อให้มั่นใจว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ R จะถูกนำไปใช้ในสภาวะต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้การทดลองเบื้องต้นในการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ R ในบ่อบำบัดของโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอก็มีความจำเป็น เนื่องจากน้ำทิ้งของโรงงานประกอบด้วยสารเคมีต่างๆ นอกจากสีย้อมผ้าและอาจมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียได้ ซึ่งการที่แบคทีเรียสายพันธุ์ R

ได้สารพวกแอโรเมติก เอมีน (aromatic amines) ออกมา ซึ่งสารพวกนี้เป็นพิษต่อมนุษย์และไม่สามารถย่อยสลายต่อไปได้อีกในสภาวะไร้อากาศ (Chung and Stevens, 1993; Do et al., 2002) สำหรับในอนาคตควรศึกษาความสามารถของจุลินทรีย์ชนิดอื่นเช่น ยีสต์ รา สาหร่าย หรือโปรโตซัว ในการย่อยสลายสีย้อมผ้าได้ในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย เพื่อให้ได้จุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการบำบัดน้ำเสียแบบต่างๆ หรือชนิดของสีย้อมที่แตกต่างกัน เพื่อเป็นทางเลือกที่หลากหลายต่อการนำไปใช้ประโยชน์

## สรุปผลการศึกษา

การวิจัยในครั้งนี้สามารถคัดแยกสายพันธุ์แบคทีเรียจากน้ำทิ้งและดินของโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอ ที่มีความสามารถย่อยสลายสีย้อมผ้าสีน้ำเงินชนิดเอโซ ได้จำนวน 8 สายพันธุ์คือสายพันธุ์ A B D F I J P และ R โดยในแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถเจริญและย่อยสลายสีย้อมผ้าชนิดนี้ได้แตกต่างกัน ซึ่งจากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสีย้อมทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ R มีความสามารถในการเจริญและย่อยสลายสีย้อมได้มากที่สุด และความสามารถน้อยที่สุดคือแบคทีเรียสายพันธุ์ P และจากการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ R พบว่าคือ *Bacillus cereus*

ในการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ R พบว่าคือเชื้อ *Bacillus cereus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญ สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ และพบได้ในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะในดิน สปอร์ที่มีความทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมเช่น ความแห้งแล้ง สารเคมี และความร้อน ทำให้แบคทีเรียชนิดนี้สามารถแพร่กระจาย และเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์โดยทั่วไปได้ (Holt et al., 1994) รวมทั้งยังสามารถเก็บรักษาเชื้อนี้ได้ในรูปของผงสปอร์ที่ทำให้แห้งแล้วได้อีกด้วย ดังนั้นถ้าแบคทีเรียนี้ถูกนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอได้จริงก็อาจจะผลิตหัวเชื้อในรูปของผงสปอร์แห้ง ซึ่งสามารถเก็บได้ง่ายและสะดวกต่อการใช้งานมากกว่าแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ นอกจากนี้ข้อเสียของแบคทีเรียที่ไม้ต้องการอากาศในการเจริญ คือเมื่อย่อยสลายสีย้อมชนิดเอโซแล้วจะ

# เอกสารอ้างอิง


Ajibo, V.O., Oniye, S.J., Odeh, C.E., Olugbodi, T., and Umeh, U.G. (2005). Biodegadation of indigo containing textile effluent using some strains of bacteria. **Journal of Applied Science** 5(5): 853-855.

Chen, K.C., Wu, J.Y., Liou, D.J., and Hwang, S.J. (2003). Decolorization of the Textile dyes by Newly Isolated Bacterial Strains. **Journal of Biotechnology** 101: 57-68.

Chung, K.T., Stevens, S.E.J. (1993). Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminthes. **Environmental Toxicology and Chemistry** 12: 2121-2132.

Do, T., Shen, J., Cawood, G., and Jeckins. R. (2002). Biotreatment of textile effluent using *Pseudomonas* spp. Immobilized on polymer supports. In: **Advances in biotreatment for textile processing**. Hardin, I.R; Akin, D.E., and Wilson, J.S.. (Eds). University of Georgia Press.

Holt, J.C., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. (1994). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** ($9^{th}$ ed.). William and Wilkins Co., Baltimore.

Idris, A., Hashim, R., Rahman, R.A., Ahmad W.A., Ibrahim, Z. Razak, P.R.A., et. al. (2007). Application of Bioremediation process for textile wastewater treatment using pilot plant. **International Journal of Engineering and Technology** 4(2): 228-234.

Jirasripongpun, K., Nasanit, R., Niruntasook, J., and Chotikasatian, B. (2007). Decolorization and degradation of C.I. reactive red 195 by *Enterobacter* sp. **Thammasat International Journal of Science and Technology** 12(4): 6-11.

Khehra, M.S., Saini, H.S., Sharma, D.K., Chadha, B.S., and Chimni, S.S. (2005). Comparative Studies on Potential of Consortium and Constituent Pure Bacterial Isolates to Decolorize Azo dyes. **Water Research** 39: 5135-3141.

Machado, K.M.G., Compart, L.C.A., Morais, R.O., Rosa, L.H., and Santos, M.H. (2006). Biodegradation of reactive textile dyes by Basidiomycetous fungi from Brazilian ecosystems. **Brazilian Journal of Microbiology** 37: 481-487.

Maier, J., Kandelbauer, A., Erlacher, A., Cavaco-Paulo, A., and Gubits, G.M. (2004). A new alkali-thermostable azoreductase from *Bacillus* sp. strain SF. **Applied and Environmental Microbiology** 70: 837-844.

Oliver, J., Hao, Hyunook Kim, and Pen-Chi Chieng. (2000). Decolorization of wastewater. **Environmental Science and Technology**. 30(4): 449-505.

Olukanni, O.D., Osuntoki, A.A., and Gbenle, G.O. (2006). Textile effluent biodegradation potentials of textile effluent-adapted and non-adapted bacteria. **African Journal of Biotechnology** 5(20): 1980-1984.

Pourbabaee, A.A., and Malekzadeh, F. (2005). Decolorization of methyl orange (as a model azo dye) by the newly discovered *Bacillus* sp. **Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering** 24(3): 41-45.

Sarnaik, S., and Kanebar, P. (1999). Biodegradation of methylviolet by *Pseudomonas mendocina* MCN B-402**. Journal Applied Microbiology Biotechnology** 52 : 251-254

Togo, A.C., Mutambanengwe, C.C.Z., and Whiteley, C.G. (2008). Decolorisation and degradation of textile dyes using a sulphate reducing bacteria (SRB)-biodigester microflora co-culture. **African Journal of Biotechnology** 5(20): 1980-1984.