ว.วิทย. มข. 43(4) 761-774 (2558) KKU Sci. J. 43(4) 761-774 (2015)

การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของ *Aspergillus* sp. KB2 ในการลดความเข้มสีย้อมกก

Screening and Characterization of *Aspergillus* sp. KB2 for Decolorize Reed Dye

จิรภัทร จันทมาลี[1] มธุรา อุณหศิริกุล[1] ณมนรัก คำฉัตร[1] และ กมลชนก ปกาสิทธิ์[2]*

บทคัดย่อ

น้ำเสียที่เกิดขึ้นจากการย้อมกกมีสีย้อมและรงควัตถุหลายชนิดปนเปื้อนอยู่ในปริมาณสูง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและศึกษาเชื้อราย่อยสลายสีย้อมกกจากตัวอย่างดินและน้ำทิ้งในพื้นที่ทอเสื่อกกของจังหวัดจันทบุรี ซึ่งสามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 19 ไอโซเลท แต่มีเพียง 9 ไอโซเลทที่สามารถเจริญและสร้างวงใสรอบโคโลนีเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Czapek-Dox Agar (CDA) ที่เติมสีย้อมกกสีแดง จากนั้นนำเชื้อราแต่ละไอโซเลทมาทดสอบประสิทธิภาพการลดความเข้มสีในอาหารเหลว Czaped-Dox Broth (CDB) ที่เติมสีย้อมกกสีแดง 100 มก./ล. โดยการเขย่า (80 รอบ/นาที) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน พบว่าไอโซเลท KB2 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดความเข้มสีย้อมกกสีแดง (~87%) จึงคัดเลือกเชื้อราไอโซเลทดังกล่าวไปทดสอบการย่อยสลายสีย้อมกกสีผสมที่ได้จากการผสมสีย้อมกกสีแดง เหลือง เขียว ชมพู ในอัตราส่วน 1:1:1:1 (w/w) พบว่าสามารถลดความเข้มสีได้สูงสุด 90% ในระยะเวลา 9 วัน สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของมวลเซลล์ จากการศึกษาลักษณะโคโลนีและเซลล์ สามารถจัดจำแนกเชื้อ KB2 อยู่ในจีนัส *Aspergillus* หลังจากนั้นทดสอบผลของความเข้มข้นสีย้อมกกต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายของ *Aspergillus* sp. KB2 โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว C-limited CDB ที่เติมสีผสมความเข้มข้น 50-500 มก./ล. บ่มเชื้อที่สภาวะเดิม พบว่าเชื้อ KB2 สามารถลดความเข้มของสีผสม (50 มก./ล.) ได้สูงสุด (~75%) ดังนั้นจึงเลือกใช้สภาวะดังกล่าวสำหรับการตรึงเซลล์โดยเติมกล้าเชื้อราปริมาณ 5 fungal disc ลงในฟลาสก์บรรจุวัสดุตรึงปริมาณ 5 กรัมของน้ำหนักแห้ง บ่มฟลาสก์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ผลการศึกษาพบว่า *Aspergillus* sp. KB2 ที่ตรึงบนซังข้าวโพดทำให้เกิดการลดลงของสีย้อม 79% โดยมีค่าสูงกว่าการตรึงเชื้อรา KB2 บนเส้นใยบวบที่ให้ค่าการลดลงของสีย้อม 72% ในอนาคตอาจจะนำราที่ตรึงบนซังข้าวโพดไปใช้ในการลดความเข้มสีในน้ำเสียจากการย้อมกก

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี อ.เมือง จ. จันทบุรี 22150

[2]หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี อ.เมือง จ. จันทบุรี 22150

*Corresponding Author, Email: jirapatchanthamalee@hotmail.com

ABSTRACT

Wastewater generated from reed mat production contains the high amount of exhausted dyes and pigments. This research aimed to isolate and characterize a fungal strain capable of decolorizing reed dye from soils and effluents collected from the manufacturing areas in Chanthaburi. A total of 19 indigenous fungal strains were obtained, but only nine of them could grow and produce a clear zone around the fungal colony culturing on red reed dye containing Czapek-Dox agar. After that, the dye removal efficiency of the selected strains was determined in Czapek-Dox broth containing 100 mg/l red dye. The treatments were incubated with shaking (80 rpm) at room temperature for 5 days. Isolate KB2, the most effective strain could reduce the color intensity at 87%. Therefore, KB2 was selected to test for its efficiency in reducing intensity of 100 mg/l mixed reed dyes (containing red, yellow, green and pink reed dyes in ratio of 1:1:1:1) and showed approximately 90% efficacy after 9 days incubation according to an increasing of cell mass. The identification results found that KB2 was belonged to genus *Aspergillus* by colony and cells morphological features. After that, the effect of reed dye concentration on KB2 biodegradation efficiency was determined. The treatments were incubated under the same conditions in C-limited Czaped-dox broth containing 50–500 mg/l mixed reed dyes. The results found that the high degradation efficiency (~75%) was obtained when culturing *Aspergillus* sp. KB2 in 50 mg/l reed dye. As a result, this condition was used for immobilization of KB2 cells by adding 5 fungal discs into flasks containing immobilizing agents (5 g dry weight) incubating at room temperature for 7 days. The results showed that the corncob - immobilized KB2 gave higher percentage (79%) of dye reduction compared to the zucchini fiber-immobilized KB2 (72%). In the future, this corncob-immobilized fungi may be used for decolorization of reed dyeing wastewater.

คำสำคัญ: การคัดแยก การศึกษาคุณสมบัติ เชื้อรา การลดความเข้มสีย้อมกก

Keywords: Screening, Characterization, Fungi, Reed Dye Decolorization

บทนำ

“เสื่อจันทบูร” เป็นสินค้าหัตถกรรมขึ้นชื่อของจังหวัดจันทบุรีที่สร้างอาชีพและรายได้ให้แก่ชุมชน ซึ่งมีการรวมกลุ่มผลิตและจำหน่ายผลิตภัณฑ์ทอเสื่อในรูปของ “กลุ่มเกษตรกรทอเสื่อกก” เช่น ที่หมู่บ้านเสม็ดงาม และหมู่บ้านบางสระเก้า โดยใช้เส้นใยกกที่ย้อมด้วยสีสังเคราะห์ (synthetic dyes) ในขั้นตอนการทอเสื่อ เนื่องจากความสะดวกในการใช้งาน ประหยัดต้นทุน ความคงทนในการติดสีและมีให้เลือกใช้งานหลายเฉดสี สำหรับประเภทของสีสังเคราะห์ตามรายงานวิจัยของ Robinson et al. (2001) มีหลายชนิด ได้แก่ สีอะซีดิก (acidic) สีเบสิก (basic) สีดิส-

เพิร์ส (disperse) สีอะโซ (azo) สีไดอะโซ (diazo) สีรีแอกทีฟ (reactive) และสีแอนทราควิโนน (anthra quinone) ในขั้นตอนการย้อม กลุ่มเกษตรกรทอเสื่อกกในจังหวัดจันทบุรีนิยมใช้สีรีแอกทีฟที่มีกลุ่มอะโซ (ประกอบด้วยหมู่ -N=N- เกาะกับวงแอโรมาติก) หนึ่งกลุ่มหรือมากกว่าอยู่ในโครงสร้าง เนื่องจากสีย้อมชนิดนี้สามารถละลายน้ำและย้อมติดเส้นใยเซลลูโลสของกกได้ดี โมเลกุลของสีจะยึดจับกับหมู่ไฮดรอกไซด์ (OH^-) ของเซลลูโลสและเชื่อมโยงติดกันด้วยพันธะโควาเลนท์ในสภาวะที่เป็นด่าง สีรีแอกทีฟให้สีที่มีความสว่างสดใสและติดทนในทุกสภาวะ (วีรานุชและคณะ, 2008) จากขั้นตอนการย้อมดังกล่าวมักมีการปล่อยน้ำย้อมสีหรือน้ำที่ผ่านการแช่กกที่ยังคงปนเปื้อนสีย้อมความเข้มข้นสูง ซึ่งมีปริมาณเกลือและอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูงลงสู่สิ่งแวดล้อมโดยตรง จึงอาจทำให้เกิดผลกระทบในด้านต่าง ๆ ต่อระบบนิเวศและสุขภาพของมนุษย์ เนื่องจากสีสังเคราะห์หลายชนิดมีสมบัติเป็นพิษ (toxicants) สารก่อมะเร็ง (carcinogenic) หรือสารก่อกลายพันธุ์ (mutagenic) รวมทั้งประกอบด้วยสารอินทรีย์ที่ยากต่อการย่อยสลาย (recalcitrant organics) และสารลดแรงตึงผิว (surfactants) (Charumathi and Das, 2010; Vijayalakshmidevi and Muthukumar, 2015) ด้วยเหตุนี้จึงควรมีการใช้วิธีที่เหมาะสมในการลดความเข้มของสีย้อมที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้ง

วิธีการบำบัดน้ำทิ้งปนเปื้อนสีย้อมสามารถทำได้ทั้งวิธีทางกายภาพและชีวภาพ แต่การใช้วิธีกายภาพอาจไม่เหมาะสม เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูง เป็นวิธีการที่ซับซ้อน และคงเหลือสารตกค้างที่ต้องกำจัดต่ออีกในปริมาณมาก (Ghoreishi and Haghighi, 2003; Vijayalakshmidevi and Muthukumar, 2015) ดังนั้นการใช้วิธีทางชีวภาพ (bioremediation) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาทดแทนหรือส่งเสริมระบบบำบัดที่มีอยู่แล้วให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น โดยการใช้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายหรือลดความเข้มข้นของสีย้อมกกมาใช้ในขั้นตอนการบำบัด ซึ่งจุลินทรีย์จะเจริญโดยใช้สีย้อมเป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้วิธีนี้ไม่ส่งผลกระทบในทางลบต่อสิ่งแวดล้อม เสียค่าใช้จ่ายต่ำ และยังอาจกำจัดสีย้อมได้อย่างสมบูรณ์ (Almeida and Corso, 2014) กลุ่มจุลินทรีย์ย่อยสีย้อมประกอบด้วยแบคทีเรีย ยีสต์ รา แอคติโนมัยสีท และสาหร่าย การใช้เชื้อราในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนสีย้อมมีข้อดีหลายประการ เช่น เชื้อราสร้างมัยซีเลียมขนาดใหญ่ที่ช่วยดูดซับสี พบเชื้อราได้ทั่วไปในธรรมชาติ เนื่องจากสามารถปรับระบบเมแทบอลิซึมให้เจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่หลากหลาย มีค่าพีเอชและอุณหภูมิสูง รวมทั้งมีปริมาณสารอาหารจำกัด (Almeida and Corso, 2014) จากรายงานวิจัยต่าง ๆ พบว่ามีราหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพดีในการลดความเข้มของสีที่ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เช่น *Aspergillus alhabadii*, *A. sulphureus*, *A. niger*, *A. flavus*, *Curvularia verruciformis*, *Mucor racemosus, Pahero chaete chrysosporium, Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Geotrichum candidum, Pleurotus oestreatus*, *Cunninghamella elegans*, *Fusarium* sp. และ *Penicillium* sp. (Balaji et al., 2012; Namdhari et al., 2012; Rana et al., 2013) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงในการคัดแยกเชื้อราจากแหล่งปนเปื้อนสีย้อมเพื่อใช้ลดความเข้มของสีย้อมกก

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดแยกและศึกษาเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการลดความเข้มของสีย้อมกก โดยใช้สภาวะการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการที่ใกล้เคียงกับสภาพน้ำเสียจริง เช่น ใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่เติมสีย้อมกกหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน และการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาวิธีทางชีวภาพสำหรับบำบัดสีย้อมกกที่ปนเปื้อน

ในแหล่งน้ำโดยใช้เซลล์ตรึงของเชื้อราสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการลดความเข้มสีย้อมกกที่ตรึงกับวัสดุธรรมชาติ และทดสอบประสิทธิภาพการลดความเข้มสีย้อมกกของหัวเชื้อดังกล่าว เพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้งานในพื้นที่ปนเปื้อนต่อไป

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

ในงานวิจัยนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek-Dox Agar (CDA) และ Czaped-Dox Broth (CDB) ในขั้นตอนการแยกและคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการลดความเข้มสีย้อมกก (สูตรอาหารกรัม/ล. ประกอบด้วย K_2HPO_4: 1.0, $NaNO_3$: 3.0, KCl: 5.0, $MgSO_4.7H_2O$: 0.5, $FeSO_4.7H_2O$: 0.01, rose bengal: 0.03, yeast extract: 5.0, sucrose: 30.0, วุ้น: 15.0) และ C-limited Czaped-Dox Broth (C-limited CDB) ที่จำกัดปริมาณซูโครสเป็น 5 กรัม/ล. ในขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพการลดความเข้มสีย้อมกกของเชื้อรา ตามรายงานวิจัยของ Namdhari et al. (2012) โดยเติมสีเคมีย้อมกกซึ่งเป็นสีประเภทรีแอกทีฟ (ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มทอเสื่อกกใน จ.จันทบุรี) ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งด้วยความดันไอน้ำ (121°C 15 นาที) ในขั้นต้นของงานวิจัยใช้สีย้อมกกสีแดง (นิยมใช้เป็นแม่สีในการผสมให้ได้สีอื่น และมักถูกใช้ในการย้อมเพื่อทำผลิตภัณฑ์เสื่อกก) สำหรับคัดแยกและคัดเลือกเชื้อรา และใช้สีผสม (ได้จากการผสมสีย้อมกกสีแดง เหลือง เขียว ชมพู ในอัตราส่วน 1:1:1:1 เพื่อให้ใกล้เคียงกับการปนเปื้อนในสภาพจริงซึ่งประกอบด้วยสีย้อมหลายชนิดผสมกัน) ในขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราที่คัดเลือก

2. การคัดแยกเชื้อราลดความเข้มสีย้อมกก

การทดลองในขั้นนี้ทำตามวิธีดัดแปลงจาก Balaji et al. (2012) โดยนำดิน 7 ตัวอย่างและน้ำทิ้ง 3 ตัวอย่างจากพื้นที่ย้อมกกของกลุ่มทอเสื่อกก หมู่บ้านบางสระเกล้าและหมู่บ้านเสม็ดงาม จ.จันทบุรี มาเจือจางด้วยสารละลายน้ำเกลือปลอดเชื้อ (0.85% NaCl) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}-10^{-4} และนำมาเกลี่ย (spread plate) ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง CDA ที่เติมสีเคมีย้อมกกสีแดงความเข้มข้น 100 มก./ล. และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 3-5 วัน จากนั้นทำการแยกเชื้อราให้มีความบริสุทธิ์ โดยเขี่ยเฉพาะส่วนที่เป็นเส้นใยรามาเลี้ยงลงบนอาหารคัดเลือกชนิดเดิม บ่มที่สภาวะเดิมจนได้เชื้อราบริสุทธิ์ เก็บรักษาไว้บนอาหารวุ้นผิวเอียง CDA ที่ผสมสีย้อมกก ที่อุณหภูมิ 4°C ในการเตรียมหัวเชื้อสำหรับการทดสอบในขั้นต่อไปใช้การเพาะเชื้อราบนผิวหน้าอาหารแข็ง CDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน ใช้แท่งเจาะวุ้น (cork borer) ขนาด 8 มม. ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราเจริญ (fungal disc) และนำไปทดสอบในขั้นต่อไป

3. การคัดเลือกเชื้อราย่อยสลายสีย้อมกกบนอาหารแข็ง

ทดสอบความสามารถในการย่อยสีย้อมกกของเชื้อราแต่ละไอโซเลท โดยวางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราเจริญบนผิวหน้าอาหารแข็ง CDA ที่ผสมสีย้อมกกสีแดง 100 มก./ล. บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน โดยมีชุดควบคุมเป็นจานอาหารที่ไม่ได้ลงเชื้อ (uninoculated medium) ทุกชุดทดลองทำ 3 ซ้ำ สังเกตวงใสโดยรอบโคโลนีเชื้อราที่แสดงถึงความสามารถในการย่อยสลายสีย้อม และคัดเลือกเฉพาะไอโซเลทดังกล่าวสำหรับการทดลองในข้อต่อไป

4. ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีย้อมกกของราไอโซเลทที่คัดเลือก

ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีย้อมกกสีผสมของราไอโซเลทที่คัดเลือก ตามวิธีดัดแปลงจาก Namdhari et al. (2012) โดยเติมชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราเจริญ ลงในอาหารเหลว C-limited CDB ปริมาตร 100

มล. ที่ผสมสีย้อมกกสีผสมความเข้มข้น 100 มก./ล. บ่มฟลาสก์บนเครื่องเขย่าความเร็ว 80 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน วิเคราะห์การลดลงของสีย้อมทุกวัน โดยเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มล. โดยเทคนิคปลอดเชื้อ (ทำ 3 ซ้ำ) นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใส (super natant) มาตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่า λ_{max} ของสีทดสอบ (550 นาโนเมตร) คัดเลือกไอโซเลทของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายหรือลดความเข้มสีย้อมไว้ใช้สำหรับการทดลองในข้อต่อไป คำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของสีย้อมตามรายงานของ Balaji et al. (2012) ดังนี้: %Dye Decolorization = 100×[(ODzero day – OD sample)/OD zero day] สำหรับการวิเคราะห์มวลเซลล์ของเชื้อราทำโดยนำเส้นใยเชื้อราที่ผ่านการกรองไปอบจนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่ แสดงผลในรูปน้ำหนักเซลล์แห้งมีหน่วยเป็นมิลลิกรัม

5. การจัดจำแนกเชื้อรา

จัดจำแนกชนิดในระดับจีนัสของเชื้อราไอโซเลทที่คัดเลือกจากข้อ 4 โดยใช้ผลการศึกษาลักษณะโคโลนีและเส้นใยตามคู่มือการจัดจำแนกรา A Manual of Soil Fungi (Gilman, 1957)

6. ความเข้มข้นของสีย้อมกกต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายของเชื้อราไอโซเลทที่คัดเลือก

ทดสอบผลของความเข้มข้นสีย้อมต่อประสิทธิภาพการย่อยสีย้อมกกของเชื้อรา โดยใส่กล้าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว C-limited CDB (ค่าพีเอช 7.21) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เติมสีย้อมกกความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วง 50-500 มก./ล. มีชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ วางฟลาสก์บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 80 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างปริมาณ 5 มล.(3 ซ้ำ) ในวันที่ 0 และวันที่ 5 นำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ 5,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร และคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของสีย้อม

7. ประสิทธิภาพการย่อยสลายสีย้อมกกโดยใช้เซลล์ตรึงของเชื้อรา

วิธีการเตรียมวัสดุตรึงใช้วิธีดัดแปลงจากทักษิณ (2552) โดยชั่งวัสดุตรึงคือซังข้าวโพดและเส้นใยบวบที่มีการกระจายขนาดในช่วง 0.30-2.00 มม. (ปั่นบดให้มีขนาดเล็ก ใช้ตะแกรงร่อนเพื่อให้เศษที่เล็กเกินไปหลุดออก) ปริมาณ 5 กรัมของน้ำหนักแห้งใส่ในฟลาสก์ขนาด 500 มล. ปรับความชื้นด้วยอาหารเหลว C-limited CDB ปริมาณ 25 มล. นำวัสดุไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นทำการตรึงเซลล์โดยเติมกล้าเชื้อราลงในฟลาสก์บรรจุวัสดุตรึงที่เตรียมไว้ บ่มฟลาสก์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการบดชิ้นวุ้นที่เชื้อราเกาะและคลุกผสมกับวัสดุทุก ๆ 2 วัน โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ เพื่อให้เชื้อราเจริญกระจายทั่ววัสดุตรึง

ทดสอบประสิทธิภาพในการลดความเข้มสีย้อมกกของกล้าเชื้อ โดยเติมเซลล์ตรึง 0.4 กรัมของน้ำหนักแห้ง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว C-limited CDB ปริมาตร 100 มล. ที่เติมสีย้อมความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 6 ทุกชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ บ่มฟลาสก์บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 80 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน ในแต่ละช่วงเวลา เก็บตัวอย่าง ปริมาตร 5 มล./ฟลาสก์ (ทำ 3 ซ้ำ) นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของสีย้อม

ผลการวิจัย

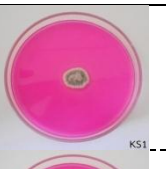
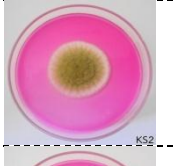
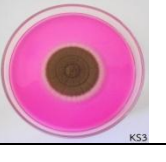
1. การคัดแยกและคัดเลือกเชื้อราย่อยสลายสีย้อมกกสีแดง

ในงานวิจัยนี้สามารถคัดแยกเชื้อราย่อยสลายสีย้อมกกจากพื้นที่ทอเสื่อกกในจังหวัดจันทบุรีได้ทั้งหมด 19 ไอโซเลท ซึ่งมีเพียง 9 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถเจริญและสร้างวงใสโดยรอบโคโลนี เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง CDA ที่เติมสีย้อมกกสีแดง ซึ่งประกอบด้วยเชื้อ 7 สายพันธุ์ ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินปนเปื้อนสีย้อมกก และอีก 2 สายพันธุ์คัดแยกมาจากตัวอย่างน้ำทิ้งจากแหล่งปนเปื้อนสีย้อม การเก็บตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อจากพื้นที่ปนเปื้อนโดยตรงทำให้มีความเป็นไปได้สูงที่จะได้สายพันธุ์เชื้อราที่มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายแม้ในสภาวะที่มีสารปนเปื้อนในปริมาณสูง และเป็นสายพันธุ์ที่สามารถแข่งขันกับสิ่งมีชีวิตอื่นในสภาพแวดล้อม จึงมีผลเพิ่มอัตราการย่อยสลาย (Dritsa et al., 2007; Venkata et al., 2013) โดยทั่วไปเชื้อราที่คัดแยกได้มีเส้นใยสีขาว สร้างสปอร์สีเขียว สีน้ำตาล หรือสีดำ เส้นใยมีลักษณะนูนฟูหรืออัดแน่น โคโลนีแบนราบหรือนูน จากการทดสอบประสิทธิภาพในการลดความเข้มสีย้อมกกของเชื้อราทั้ง 9 ไอโซเลท โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว CDB ที่เติมสีย้อมกกสีแดงความเข้มข้น 100 มก./ล. พบว่าเชื้อราทั้ง 9 ไอโซเลทสามารถลดความเข้มของสีย้อมกกได้ในช่วง 26–87% โดยไอโซเลท KB2 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสีย้อมกกได้ดีที่สุดเท่ากับ 87% (ตารางที่ 1) ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อนี้เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

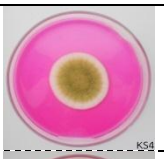
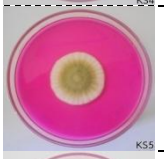
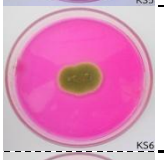
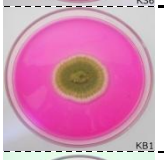
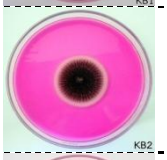
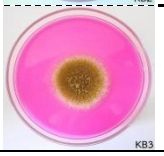
2. ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีย้อมกกสีผสมของเชื้อราไอโซเลทที่คัดเลือก

ในการทดสอบประสิทธิภาพการลดความเข้มสีย้อมกกสีผสมของเชื้อ KB2 ผลการทดลองพบว่าเชื้อนี้สามารถลดความเข้มสีย้อมกกสีผสมได้ 77% ในวันที่ 3 โดยเพิ่มขึ้นเป็น 81% ในวันที่ 5 และ 84% ในวันที่ 7 จนมีค่าสูงสุดเป็น 90% ในวันที่ 9 ของการทดลอง สอดคล้องกับผลการเจริญของเชื้อซึ่งมีมวลเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 0.14 ในวันที่ 0 เป็น 0.67 มก. ในวันที่ 3 และ 0.89 มก. ในวันที่ 9 ของการทดลอง ดังรูปที่ 2

ตารางที่1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและประสิทธิภาพในการลดความเข้มสีย้อมกกสีแดงของเชื้อราทั้ง 9 ไอโซเลท

ไอโซเลท	แหล่งที่คัดแยก	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา*	ภาพแสดงลักษณะโคโลนี	การลดลงของสีย้อมกก (%)**
KS1	ตัวอย่างดิน	เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียว โคโลนีมีลักษณะแน่น ขอบหยัก		38.31±1.57
KS2	ตัวอย่างดิน	เส้นใยสีขาว โคโลนีแน่น สปอร์สีเขียว ขอบเรียบ สีขาว		26.66±5.18
KS3	ตัวอย่างน้ำทิ้ง	เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียวอมดำ โคโลนีแน่น ไม่ฟู มีลักษณะมองเห็นเป็นคลื่น ขอบเรียบ		64.87±1.15

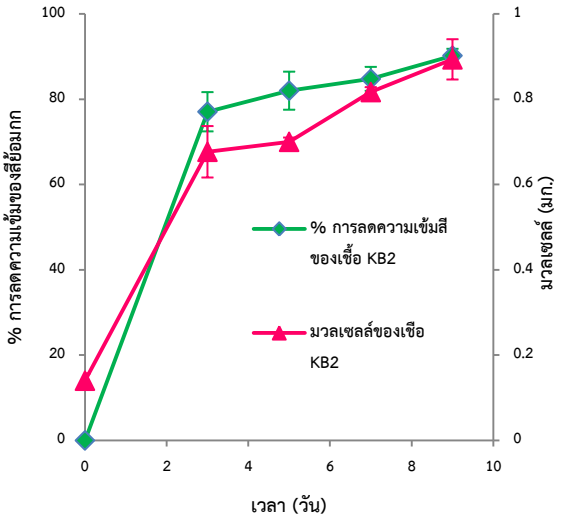
ตารางที่1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและประสิทธิภาพในการลดความเข้มสีย้อมกกสีแดงของเชื้อราทั้ง 9 ไอโซเลท (ต่อ)

ไอโซเลท	แหล่งที่คัดแยก	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา*	ภาพแสดงลักษณะโคโลนี	การลดลงของสีย้อมกก (%)**
KS4	ตัวอย่างดิน	เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียวอ่อนอมเหลือง ขอบเรียบ สีขาว		39.19±0.97
KS5	ตัวอย่างดิน	เส้นใยสีขาว มีลักษณะแน่น		60.33±1.84
KS6	ตัวอย่างดิน	เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียว ขอบสีเขียวอ่อน มีลักษณะฟู		39.16±4.11
KB1	ตัวอย่างดิน	เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียว มีลักษณะฟู		44.33±2.81
KB2	ตัวอย่างน้ำทิ้ง	เส้นใยสีขาว สปอร์สีดำ ลักษณะฟู		87.80±0.81
KB3	ตัวอย่างดิน	เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียวอ่อน ลักษณะเป็นคลื่น ขอบเรียบ		62.22±1.16

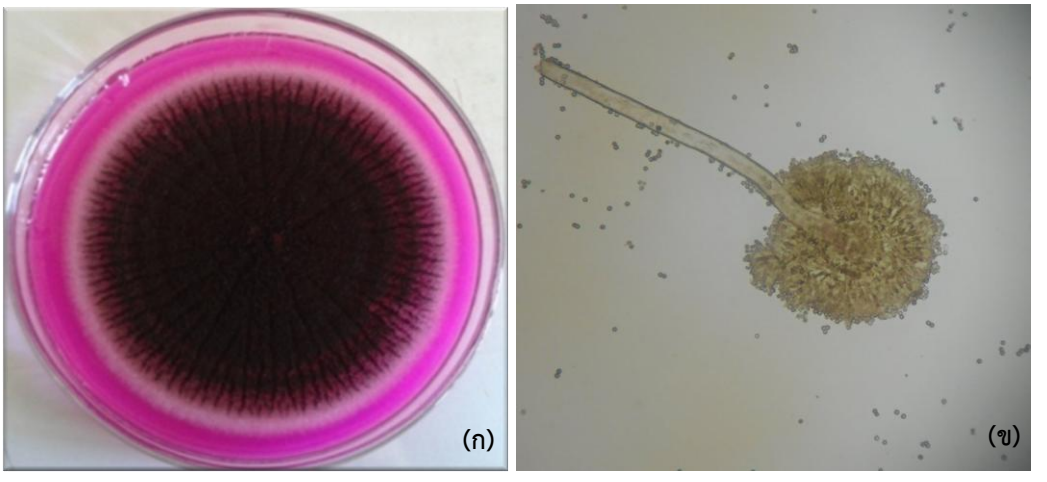
หมายเหตุ: *เพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง CDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน, ** เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว C-limited CDB ที่เติมสีย้อมกกสีแดง 100 มก./ล. บ่มฟลาสก์บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 80 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน ข้อมูลที่แสดงเป็นแบบ mean±SD

3. การจัดจำแนกเชื้อราสายพันธุ์ KB2

เมื่อนำเชื้อราสายพันธุ์ KB2 ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสีย้อมกกสีแองและสีผสม มาจัดจำแนกชนิดในระดับจีนัส โดยอาศัยลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะโครงสร้างตามข้อมูลในหนังสือคู่มือการจัดจำแนกของ Gilman (1957) และวิจัย (2546) พบว่าเชื้อนี้สามารถเจริญและสร้างสปอร์ได้ดีบนอาหารแข็ง CDA มีเส้นใยสีขาว ลักษณะฟู สร้างสปอร์สีดำ (รูปที่ 3ก) ลักษณะของเซลล์ภายกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400X พบว่าเส้นใยของเชื้อราไม่มีสี แตกแขนงและมีผนังกั้น ที่ส่วนปลายของก้านชูสปอร์ (conidiophore) โป่งออกเป็นเวสซิเคิล (vesicle) ลักษณะค่อนข้างกลม conidial head เป็นสีดำหรือสีน้ำตาลดำ (รูปที่ 3ข) จากข้อมูลดังกล่าว จึงจัดจำแนกชนิดของเชื้อรานี้อยู่ในสกุล *Aspergillus* sp.



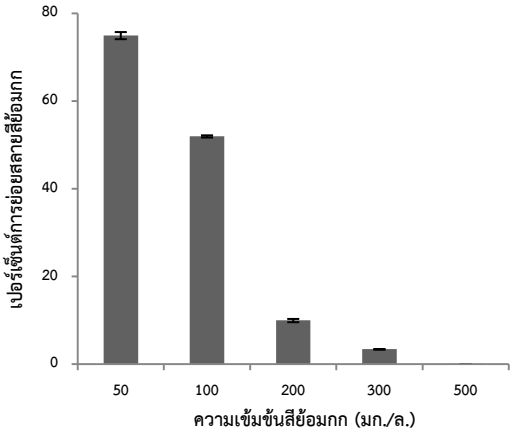
รูปที่ 2 ประสิทธิภาพของเชื้อ KB2 ในการลดความเข้มสีย้อมกกสีผสม จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว C-limited CDB ที่เติมสีย้อม 100 มก./ล. บ่มเชื้อที่ความเร็ว 80 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน ข้อมูลที่แสดงเป็นแบบ mean±SD



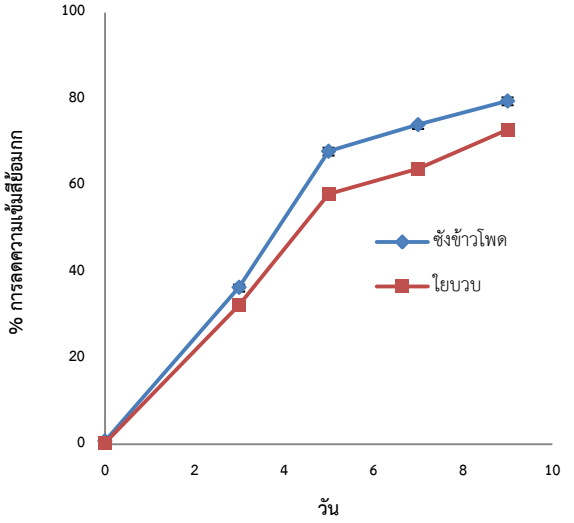
รูปที่ 3 (ก) ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา KB2 บนผิวหน้าอาหารแข็ง CDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน และ (ข) เซลล์ของเชื้อรา KB2 ที่กำลังขยาย 400X

4. ความเข้มข้นของสีย้อมกกต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายของ *Aspergillus* sp. KB2

จากการทดสอบผลของความเข้มข้นสีย้อมกกต่อประสิทธิภาพการย่อยสารสีของเชื้อ โดยเติมสีย้อมกกสีผสมปริมาณต่างกันในอาหารเหลว C-limited CDB พบว่าในวันที่ 5 ของการทดลอง เชื้อ KB2 สามารถลดความเข้มของสีย้อมที่ 50, 100, 200, 300 และ 500 มก./ล. ได้เท่ากับ 75, 53, 9, 3 และ 0% ตามลำดับ ซึ่งในสภาวะที่เติมสีย้อมกกความเข้มข้น 50 มก./ล. มีผลลดความเข้มสีย้อมกกได้สูงที่สุด (รูปที่ 4) ดังนั้นจึงใช้สภาวะดังกล่าวสำหรับการทดสอบในขั้นต่อไป



รูปที่ 4 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสีย้อมกกของ *Aspergillus* sp. KB2 ในสภาวะที่เติมสีย้อมปริมาณต่างกันในอาหารเหลว C-limited CDB บ่มฟลาสก์บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 80 รอบ/นาที พบว่าในวันที่ 5 ข้อมูลที่แสดงเป็นแบบ mean±SD



รูปที่ 5 เปอร์เซ็นต์การลดลงของสีย้อมกกของเซลล์ตรึง *Aspergillus* sp. KB2 ที่ตรึงบนซังข้าวโพดและเส้นใยบวบเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว C-limited CDB ที่เติมสีย้อมกกสีผสม 50 มก./ล. บ่มฟลาสก์บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 80 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน ข้อมูลที่แสดงเป็นแบบ mean±SD

5. ประสิทธิภาพการย่อยสลายสีย้อมกกของเซลล์ตรึง *Aspergillus* sp. KB2

ในการเตรียมเซลล์ของเชื้อราย่อยสลายสีย้อมกกที่ตรึงบนวัสดุธรรมชาติ เพื่อให้สะดวกต่อการนำไปใช้ในพื้นที่ปนเปื้อน และนำเซลล์ตรึงมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีย้อมกกในอาหารเหลว C-limited CDB ที่เติมสีย้อมกกสีผสม โดยในชุดควบคุมที่เติมเฉพาะวัสดุตรึงมีการลดลงของสีย้อมน้อยมากตลอดการทดลอง (ค่าการดูดซับสีในวันที่ 0 และ 9 ของวัสดุตรึงเป็นดังนี้: ซังข้าวโพด 0.77±0.04%, 0.90±0.05%; เส้นใยบวบ 0.29±0.03%; 0.45±0.05%) ส่วนในชุดทดลองที่เติมเซลล์ตรึงของเชื้อราพบว่า

Aspergillus sp. KB2 ที่ตรึงบนซังข้าวโพดสามารถลดความเข้มสีย้อมได้ 79.52±0.81% ในวันที่ 9 ส่วน *Aspergillus* sp. KB2 ที่ตรึงบนเส้นใยบวบสามารถลดความเข้มสีย้อมได้ 72.85±0.21% (รูปที่ 5) โดยสังเกตพบด้วยว่าเชื้อราที่ตรึงบนซังข้าวโพดมีการเจริญได้ดีกว่า ดังนั้นจึงเลือกใช้ซังข้าวโพดเป็นวัสดุตรึงเซลล์สำหรับทดสอบการบำบัดสีในน้ำเสียที่เก็บจากพื้นที่ปนเปื้อนต่อไป

บทสรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้คัดแยกเชื้อราย่อยสีย้อมกกซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสีรีแอกทีฟที่นิยมใช้มากที่สุดในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เนื่องจากสามารถย้อมติดเส้นใยเซลลูโลสและละลายน้ำได้ดี ให้สีสดใส และมีให้เลือกหลายเฉดสี (นิตยาและจิรภัทร, 2556) จากตัวอย่างดินและน้ำทิ้งบริเวณพื้นที่ย้อมกกของจังหวัดจันทบุรี ซึ่งมีการทิ้งน้ำเสียจากการย้อมเส้นใยกกอย่างต่อเนื่อง ผลการทดลองสามารถคัดแยกเชื้อได้จำนวน 19 ไอโซเลท ซึ่งนำไปทำการคัดเลือกเชิงคุณภาพ (qualitative method) เพื่อให้ได้สายพันธุ์ราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีย้อม โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราแต่ละไอโซเลทบนผิวหน้าอาหารแข็ง CDA ที่เติมสีย้อมกก 100 มก./ล. สังเกตการสร้างวงใสโดยรอบโคโลนีภายหลังการบ่มเชื้อ ซึ่งมีหลายรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ใช้วิธีการเช่นเดียวกันนี้ ก่อนที่จะศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายของเชื้อที่คัดเลือกในอาหารเหลวในขั้นต่อไป (Namdhari et al., 2012; Balaji et al., 2012) ผลการทดลองพบว่ามีเชื้อราเพียง 9 ไอโซเลทที่สามารถเจริญและสร้างวงใสโดยรอบโคโลนี ซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่แสดงว่าสายพันธุ์ดังกล่าวมีความสามารถในการย่อยสลายหรือลดความเข้มสีย้อมกก ดังนั้นจึงคัดเลือกเฉพาะเชื้อราย่อยสลายสีย้อมกกจำนวน 9 ไอโซเลทไว้ศึกษาในขั้นต่อไป ซึ่งเป็นเชื้อ 7 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินปนเปื้อนสีย้อมกก โดยสภาพแวดล้อมของดินมีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์เพราะมีปริมาณธาตุอาหารสมบูรณ์ และอีก 2 ไอโซเลทคัดแยกมาจากตัวอย่างน้ำทิ้งจากแหล่งปนเปื้อนสีย้อม ซึ่งการปรากฏของเชื้อราในแหล่งน้ำที่ปนเปื้อนจะพบได้น้อยกว่าในดิน เนื่องจากข้อจำกัดในด้านสารอาหาร ปริมาณออกซิเจน รวมทั้งสภาพแวดล้อมทางกายภาพและเคมี (Namdhari et al., 2012)

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการลดความเข้มสีย้อมกกของเชื้อราทั้ง 9 ไอโซเลท โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว CDB ที่เติมสีย้อมกกสีแดงความเข้มข้น 100 มก./ล. ซึ่งในการทดลองนี้เติมสีย้อมกกความเข้มข้นต่ำโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้สามารถคัดแยกเชื้อไอโซเลทที่ย่อยสลายสีย้อมได้ ในงานวิจัยนี้พบว่าเชื้อราทั้ง 9 ไอโซเลท สามารถลดความเข้มของสีย้อมกกสีแดงซึ่งนิยมใช้การย้อมเส้นใยกก ได้ในช่วง 26-87% โดยไอโซเลท KB2 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสีเคมีย้อมกกได้ดีที่สุด (~87%) จึงคัดเลือกเชื้อราไอโซเลทนี้มาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีย้อมกกสีผสม ที่ความเข้มข้น 100 มก./ล. โดยเชื้อนี้สามารถลดความเข้มสีย้อมกกสีผสมได้ 90% ในวันที่ 9 ของการทดลอง สอดคล้องกับการเพิ่มมวลเซลล์ แสดงถึงความสามารถของเซลล์ในการใช้สีย้อมกกเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ซึ่งกลไกแรกในการลดความเข้มสีย้อมโดยเชื้อราเกิดขึ้นจากการดูดซับหรือการย่อยสลายทางชีวภาพ (adsorption/degradation) ของมัยซีเลียมเชื้อรา (Lade et al., 2012; Almeida and Corso, 2014) โดยเชื้อรา KB2 สร้างกลุ่มเส้นใยขนาดใหญ่และสร้างสปอร์ปริมาณมาก จึงทำให้เชื้ออยู่รอดได้ดีภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ราจึงสามารถดูดซับหรือย่อยสลายสีย้อมกกได้ดี สอดคล้องกับ Chen and Ting (2015) ที่รายงานว่า *Coriolopsis*

sp. 1c3 อาจใช้ทั้งกลไกการดูดซับและการย่อยสลายในการลดความเข้มของสีไตรฟีนิลมีเธน (triphenylmethane) ซึ่งประสิทธิภาพการลดความเข้มสีย้อมกกของเชื้อ KB2 มีค่าใกล้เคียงหรือสูงกว่ารายงานวิจัยอื่น เช่น *Coriolus versicolor* (MTCC 138) สามารถลดความเข้มสี Cibacron Yellow S-3R ที่ความเข้มข้น 100 มก./ล. ได้ 90% ภายหลังการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Sabouraud's Dextrose (Venkatachalam et al., 2008) ซึ่งต่างจาก *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus fumigatus* ที่ลดความเข้มข้นของสี Acidic Blue–G ความเข้มข้น 100 มก./ล. ได้เพียง 50.29 และ 49.53% ตามลำดับ (C Agnes and Sivaraj, 2013) ผลที่ต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากเป็นการทดสอบการย่อยสลายสีย้อมที่ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน โดยใช้เชื้อราต่างชนิดในสภาวะการทดสอบที่แตกต่างกัน

จากการจัดจำแนกชนิดในระดับจีนัสโดยอาศัยลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะโครงสร้างของเซลล์ สามารถจัดจำแนกเชื้อ KB2 อยู่ในจีนัส *Aspergillus* sp. ซึ่งเป็นสกุลเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงในการลดความเข้มสีหรือย่อยสลายสีย้อม เนื่องจากมีการปรับสรีรวิทยาของเซลล์ให้สามารถอยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อม จึงมักคัดแยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมสิ่งทอ เช่น *Aspergillus allhabadii* และ *A. sulphureus* สามารถลดสี Reactive Blue MR ความเข้มข้น 200 มก./ล. ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว C-limited CDB ได้ในช่วง 93–95% ส่วน *A. niger* สามารถลดสีย้อมชนิดดังกล่าวที่ความเข้มข้น 100 มก./ล. ได้ 83% ภายหลังการบ่มนาน 10 วัน (Namdhari, et al., 2012) นอกจากนี้ Balaji et al. รายงานในปี 2012 ถึงประสิทธิภาพของ *A. niger* ในการย่อยสลายสี Red HE7B ความเข้มข้น 200 มก./ล. ได้สูงถึง 94% ภายหลังการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Potato Dextrose เป็นเวลา 5 วัน จากข้อมูลข้างต้นนี้จึงทำให้มีความเป็นไปได้สูงในการนำ *Aspergillus* sp. KB2 ที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้ไปพัฒนาในรูปของเซลล์ที่ตรึงบนวัสดุธรรมชาติ เพื่อให้สะดวกต่อการนำไปใช้บำบัดสีย้อมกกในพื้นที่ปนเปื้อน อย่างไรก็ตามจะต้องมีความระมัดระวังในการใช้งานเชื้อรานี้เพราะมีสปอร์ รวมทั้งควรมีการทดลองเพิ่มในด้านการทดสอบความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการลดลงของสี เพื่อให้แน่ใจในเรื่องความปลอดภัยทั้งต่อผู้เกี่ยวข้องและสิ่งแวดล้อม

ในงานวิจัยนี้ทดสอบสภาวะการย่อยสลายสีย้อมกกของ *Aspergillus* sp. KB2 โดยใช้น้ำเสียสังเคราะห์คือ อาหารเหลว C-limited CDB ที่จำกัดปริมาณซูโครสเพียง 5 กรัม/ล. และเติมสีเคมีย้อมกกที่มีสีหลายชนิดผสมกันเพื่อให้ใกล้เคียงกับพื้นที่จริงที่ปนเปื้อนด้วยสีย้อมกกหลาย ๆ ชนิด สอดคล้องกับ Hosokawa et al. (2009) ที่รายงานว่าการย่อยสลายสารพิษในสภาวะที่ใกล้เคียงกับการนำไปใช้งานในพื้นที่ปนเปื้อนซึ่งมีสารอาหารปริมาณจำกัด ทำให้เชื้อที่เติมลงไปในพื้นที่บำบัดสามารถปรับตัวให้อยู่รอดและเพิ่มจำนวนได้ดี ซึ่งการเติมแหล่งคาร์บอน (co-substrates) ในปริมาณจำกัดมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มการเจริญและอัตราการดูดซับทางชีวภาพหรือการย่อยสลายสารของจุลินทรีย์ เมื่อแหล่งคาร์บอนหลักถูกใช้หมดไปจุลินทรีย์จะปรับวิถีเมแทบอลิซึมให้สามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนได้ จึงทำให้มีการลดลงของสารทดสอบ (Ali et al., 2008 อ้างถึงใน Namdhari et al., 2012)

การทดสอบผลของความเข้มข้นสีย้อมกกสีผสมต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายโดย *Aspergillus* sp. KB2 พบว่าการเติมสีย้อมกกความเข้มข้น 50 มก./ล. ทำให้เกิดการลดลงของสารทดสอบได้มากที่สุด 75% โดยประสิทธิภาพการย่อยสลายของเชื้อ KB2 มีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสีย้อม และเชื้อ

ไม่สามารถย่อยสลายสีย้อมได้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 500 มก./ล. ซึ่งอาจเกิดจากสีย้อมที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นมีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา ดังนั้นความเข้มข้นเริ่มต้นของสีย้อมจึงมีบทบาทสำคัญต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายของเชื้อรา (Chen and Ting, 2015; Torbati et al., 2014; Namdhari et al., 2012) สอดคล้องกับรายงานวิจัยอื่น เช่น *Penicillium. oxalicum* SAR-3 ย่อยสลายสี Acid Red 183 ลดลงจาก 99.8 เป็น 25.15% เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสีจาก 100 เป็น 1,000 มก./ล. (Saroj et al., 2014) รวมทั้ง *Trametes hirsute* และ *Pleurotus florida* ย่อยสลายสี Blcak B133 ที่ความเข้มข้น 25 มก./ล. ได้ 64.67 และ 57.21% แต่เมื่อเพิ่มความเข้มสีเป็น 75 มก./ล. กลับมีผลทำให้เชื้อราลดประสิทธิภาพการย่อยสลายสีเป็น 28.57 และ 24.04% ตามลำดับ (Sathiya moorthi et al., 2007)

Firdaus-e-Bareen (2011) เสนอว่าการตรึงเซลล์ในสภาวะที่จำลองการนำหัวเชื้อไปใช้งานในพื้นที่จริง จะเป็นการคงประสิทธิภาพการย่อยสลายสีย้อมของเซลล์ตรึง จึงเป็นสิ่งน่าสนใจในการนำวัสดุธรรมชาติ เช่น ขี้เลื่อย เศษไม้ ไคติน/ไคโตซาน แป้ง ชานอ้อย มาใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทดลองตรึงเซลล์ในภาวะที่ใกล้เคียงกับการนำไปใช้งาน โดยใช้อาหารเหลวที่จำกัดปริมาณแหล่งคาร์บอนและเติมสีย้อมกกสีผสมเข้มข้น 50 มก./ล. เพื่อเลียนแบบภาวะปนเปื้อนในธรรมชาติซึ่งมักมีสีย้อมปนเปื้อนในปริมาณต่ำ โดยใช้ซังข้าวโพดและเส้นใยบวบซึ่งหาได้ง่ายในท้องถิ่นเป็นวัสดุตรึงเซลล์ ผลการทดลองพบว่าเซลล์ตรึงบนซังข้าวโพดมีประสิทธิภาพในการลดความเข้มของสีย้อมได้สูงกว่าเซลล์ตรึงบนเส้นใยบวบ โดยเชื้อรามีการเจริญบนซังข้าวโพดได้ดีกว่าเส้นใยบวบ จึงอาจส่งผลร่วมต่อประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมของเชื้อรา KB2 ที่ตรึงบนเส้นใยบวบ เช่นเดียวกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่มีการใช้วัสดุธรรมชาติสำหรับการตรึงเซลล์เชื้อราย่อยสลายสีย้อม เช่น มีการใช้เหง้ามันสำหรับการเกาะของ *Pleurotus ostreatus* DOA 10 เพื่อใช้ในการลดความเข้มของสีย้อม 3 ชนิด ได้แก่ Remazol brilliant blue R (RBBR), cibacron red H-B (CR H-B) และ Cibacron yellow W-R (CY W-R) (ทักษิณ, 2552) และใช้ไคโตซานสำหรับการยึดเกาะของ *Rhizopus arrhizus* ที่ใช้ในการบำบัด Cibacron Turquoise HGN และ Remazol Red RGB (Lang et al., 2013) ซึ่งการลดลงของสีย้อมเกิดเนื่องจากการดูดซับทางชีวภาพหรือการย่อยสลายโดยเซลล์จุลินทรีย์ (Ali, 2010)

สรุปว่างานวิจัยนี้ได้คัดแยกและคัดเลือกเชื้อราลดความเข้มสีย้อม จากพื้นที่ทอเสื่อกกในจังหวัดจันทบุรี ได้ *Aspergillus* sp. KB2 ที่สามารถลดความเข้มสีย้อมกกสีแดงและสีผสมได้อย่างมีประสิทธิภาพ และนับเป็นงานวิจัยแรกที่ศึกษาการบำบัดน้ำทิ้งปนเปื้อนสีย้อมกกในจังหวัดจันทบุรีโดยใช้เชื้อราสายพันธุ์ท้องถิ่นที่ตรึงอยู่กับวัสดุธรรมชาติ ภายหลังการศึกษาต่อยอดองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ อาจจะมีความเป็นไปได้ในการนำกล้าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ไปใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำเสียที่เกิดจากขั้นตอนการย้อมของกลุ่มเกษตรกรทอเสื่อกก จึงเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ทอเสื่อกก เนื่องจากผ่านกระบวนการผลิตที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ประจำปีงบประมาณ 2556 ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

ทักษิณ ฤกษ์สำราญ. (2552). การศึกษาชนิดและขนาดของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและสารอาหารที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยลิกนินของ *Pleurotus ostreatus* DOA10 เพื่อใช้กำจัดสีย้อม. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิตยา ลี้ยงถนอม และจิรภัทร จันทมาลี. (2556). ศักยภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งปนเปื้อนสีย้อมในการลดความเข้มสีในน้ำเสียที่ได้จากการย้อมกก. วารสารวิทยาศาสตร์ มข, 41(4): 1043-1056.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. (2546). ราวิทยาเบื้องต้น. จามจุรีโปรดักท์: ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

วีรานุช หลาง, ธนสิริ มีชัย และวิชชุพร จันทร์ศรี. (2008). ความสามารถในการกำจัดสีย้อมผ้าประเภทรีแอกทีฟของ *Burkholderia glumae*. Journal of Environ ment and Natural Resources 1(6): 66-81.

Ali, H. (2010). Biodegradation of synthetic dyes: A review. Water Air Soil Pollution 213: 251-273.

Almeida, E.J.R. and Corso, C.R. (2014). Comparative study of toxicity of azo dye Procion Red MX-5B following biosorption and biodegradation treatments with the fungi *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. Chemosphere 112: 307-322.

Balaji, V., Vinayagamoorthi, D., Palanisamy, A. and Anbalagan, S. (2012). Degradation of Reactive Red HE7B and Yellow FN2R dyes by fungal isolates. Journal Academy Industry Research 1 (3): 132–136.

C Agnes, M.D. and Sivaraj, R. (2013). Comparative studies of Acidic Blue – G dye decolorization by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* from textile sludge, degradation assessed by HPLC. International Journal of Biological & Pharmaceutical Research 4(10): 749-755.

Charumathi, D. and Das, N. (2010). Removal of synthetic dye basic violet 3 by immobilized *Candida tropicalis* grown on sugarcane bagasse extract medium. International Journal of Engineering Science and Technology 2(9): 4325-4335.

Chen, S.H. and Ting, A. Su Yien. (2015). Biodecolorization and biodegradation potential of recalcitrant triphenylmethane dyes by *Coriolopsis* sp. isolated from compost. Journal of Environmental Management 150(1): 274–280.

Dritsa, V., Rigas, F., Natsis, K. and Marchant, R. (2007). Characterization of a fungal strain isolated from a polyphenol polluted site. Bioresource Technology 98(9): 1741-1747.

Firdaus-e-Bareen, Nazir, A. and Ahmad, S. (2011). Role of live autochthonous fungi in removing toxic metals from tannery and textile effluents. African Journal of Biotechnology 10(32): 6072-6081.

Ghoreishi, S.M. and Haghighi, R. (2003). Chemical catalytic reaction and biological oxidation for treatment of non-biodegradable textile effluent. Chemical Engineering Journal 95: 163-169.

Gilman, J.C. (1957). A manual of soil fungi. 2nd ed. Ames, Iowa : Iowa State College Press.

Ghosh, A., Dastidar, M.G. and Sreekrishnan, T.R. (2014). Biosorption and biodegradation of chromium complex dye using *Aspergillus* species. Journal of Hazardous, Toxic and Radioactive Waste 18(4): 1-9.

Hosokawa, R., Motonori, N., Morikawa, M. and Okuyama, H. (2009). Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25: 1519-1528.

Lang, W., Buakaew, P., Buranaporipan, W., Wongchawalit, J., Sakairi, N., Vanichsriratana, W. and Sirisansaneeyakul, S. (2013). Biosorption of lacal textile dyes onto acid-tolerant macro-beads of chitosan-immobilized *Rhizopus arrhizus* biomass. Kasetsart Journal 47: 101-114.

Lade, H.S., Waghmode, T.R., Kadam, A.A. and Govindwar, S.P. (2012). Enhanced biodegradation and detoxification of disperse azo dye Rubine GFL and textile industry effluent by defined fungal-bacterial consortium. International Biodeterioration and Biodegradation 72: 94-107.

Namdhari, B.S., Rohilla, S.K., Salar, R.K., Gahlawat, S.K., Bansal, P. and Saran, A.K. (2012). Decolorization of Reactive Blue MR, using *Aspergillus* species isolated from textile waste water. Journal of Biological Sciences 1(1): 24-29.

Rana, S., Sharma, R. and Chandra, S. (2013). Microbial degradation of synthetic textile dyes: A cost effective and eco-friendly approach. African Journal of Microbiology Research 7(24): 2983-2989.

Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. and Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. Bioresource Technology 77: 247-255.

Saroj, S., Kumar, K., Pareek, N., Prasad, R. and Singh, R.P. (2014). Biodegradation of azo dye Acid Red 183, Direct Blue 15 and Direct Red 75 by the isolate *Penicillium oxalicum* SAR-3. Chemosphere 107: 240-248.

Sathiya moorthi, P., Periyar selvam, S., Sasikalaveni, A. Murugesan, K. and Kalaichelvan, P.T. (2007). Decolorization of textile dyes and their effluents using white rot fungi. African Journal of Biotechnology 6(4): 424-429.

Torbati, S., Khataee, A.R. and Movafeghi, A. (2014). Application of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) for biotreatment of a textile dye: investigation of some physiological responses and effects of operational parameters. Journal of Saudi Chemical Society 18(6): 845-853.

Venkatachalam, S. (2008). Decolorization of Cibacron Yellow S-3R using *Coriolus Versicolor* (MTCC 138). Modern Applied Science 2(5): 3-8.

Venkata G.T., Saranya C., Suneetha V., and Ramalingam, C. (2013). Decolorization of Azo Dyes from ranipet textile industrial spent wash using *Bacillus* VIT SSG5. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences 4(2): 358-368.

Vijayalakshmidevi, S.R. and Muthukumar, K. (2015). Improved biodegradation of textile dye effluent by coculture. Ecotoxicology and Environmental Safety 114: 23–30.

❑❑❑❑❑