

การกำจัดสปอร์ของ *Bacillus subtilis* ในน้ำด้วยวิธีเฟนตัน Disinfection of *Bacillus subtilis* spores in water using Fenton

รัตน์ยาภรณ์ ฉายศรี (Rattayaporn Chaisri)¹
ภารดี ช้วยบำรุง (Paradee Chuaybamroong)^{2*}

บทคัดย่อ

วิธีเฟนตันในที่นี้ใช้เฟอร์รัสซัลเฟตความเข้มข้น 0.05-10 mM ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1-180 mM ในสถานะที่มีแสงอัลตราไวโอเล็ตความเข้มแสง 4 mW/cm² กำจัดสปอร์ของ *Bacillus subtilis* ในน้ำที่ pH 2.8 และศึกษาผลของ pH ในช่วง 2-5 และผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แต่เพียงอย่างเดียวในช่วงความเข้มข้น 1-600 mM ทั้งในสถานะที่ไม่มีและมีแสงอัลตราไวโอเล็ตในการกำจัดสปอร์ของแบคทีเรียดังกล่าว

การศึกษพบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียวสามารถกำจัดสปอร์ของ *B. subtilis* ได้ 61-100% ในกรณีที่ไม่มีแสงอัลตราไวโอเล็ต และ 89-100% ในกรณีที่แสงร่วมด้วย โดยความเข้มข้นยิ่งมาก การกำจัดสปอร์ของ *B. subtilis* ยิ่งเพิ่มขึ้น แต่ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 250-300 mM ไปจนถึง 600 mM นั้นให้ความแตกต่างในการกำจัดสปอร์อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่า pH ที่เหมาะสมพบอยู่ในช่วง 2.5 – 3 ความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟตที่เหมาะสม คือ 0.05-0.1 mM แม้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟตช่วยกำจัดสปอร์ในน้ำได้ดีขึ้น แต่กลับพบการตกตะกอนและพบสปอร์มีชีวิตรอดอยู่ในตะกอนทุกตัวอย่างที่ศึกษา โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สามารถกำจัดสปอร์ของ *B. subtilis* ได้อย่างสมบูรณ์ 100% และไม่ก่อให้เกิดการตกตะกอนคือ 0.1:180 mM

Abstract

Fenton in this study was from a combination of 0.05-10 mM ferrous sulfate and 1-180 mM hydrogen peroxide, being irradiated with ultraviolet-A (UV-A) radiation, intensity of 4 mW/cm², to disinfect *Bacillus subtilis* spores in water at pH 2.8. Effect of solely 1-600 mM hydrogen peroxide with and without UV-A radiation and effect of pH in a range of 2-5 were also examined.

The results reveal that hydrogen peroxide alone could disinfect *B. subtilis* spores in a range of 61-100% with no irradiation and 89-100% with UV-A irradiation. Although it was found that the higher the concentration the better

¹ นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

² ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

* Corresponding author. E-mail: paradee@tu.ac.th

the disinfection, beyond the concentration of 180 mM, the disinfection was insignificantly different. The suitable pH was 2.8 and suitable ferrous sulfate concentration was 0.05-0.1 mM. Higher concentration than 0.1 mM of ferrous sulfate induced precipitation and spores were found in it although spores in the water were reduced. Therefore, the appropriate combination of ferrous sulfate and hydrogen peroxide that completely eliminated all *B. subtilis* spores and did not create precipitation was 0.1 mM and 180 mM, respectively.

คำสำคัญ: สปอร์ของบาซิลลัส ซับทิลิส, เฟนตัน, การกำจัดจุลินทรีย์ในน้ำ

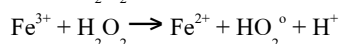
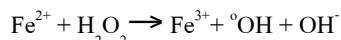
Keywords: *Bacillus subtilis* spores, Fenton, water disinfection

บทนำ

Bacillus subtilis เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างสปอร์ที่มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้เป็นอย่างดี โดยสปอร์ของ *B. subtilis* สามารถทนสภาพร้อน-ชื้นได้ถึง 100°C และต้องใช้เวลา 20-30 นาทีจึงจะทำให้ความสามารถในการมีชีวิตของมัน (viability) ลดจำนวนลง 1-log ได้ แต่ถ้าเป็นสภาวะที่ร้อน-แห้ง ความสามารถในการมีชีวิตของมันจะเพิ่มขึ้นอีกถึง 1000 เท่า (Nicholson et al., 2000) สปอร์ของ *Bacillus subtilis* จึงนิยมใช้เป็นตัวแทนจุลินทรีย์กลุ่มที่มีความทนทานสูงในสิ่งแวดล้อม โดยคลอรีนไม่สามารถกำจัดมันได้แม้จะให้ความเข้มข้นสูงถึง 100 ppm เป็นเวลา 3 ชั่วโมงแล้วก็ตาม (สุจิตรา, 2553)

วิธีหนึ่งที่สามารถกำจัดสปอร์ของ *B. subtilis* ได้ คือการใช้ปฏิกิริยาเฟนตันซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของกระบวนการออกซิเดชันขั้นก้าวหน้าที่ใช้อนุมูลอิสระเป็นตัวการหลักในการทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์จนทำให้เกิดการรั่วไหลขององค์ประกอบภายในเซลล์ และทำให้จุลินทรีย์ตายไปในที่สุด ปฏิกิริยาของเฟนตันมาจากเหล็ก Fe^{2+} หรือ Fe^{3+} ทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ได้เป็นอนุมูลอิสระ

ไฮดรอกซิล ($^{\circ}OH$) หรือ HO_2° (Rincón and Pulgarin, 2006) ดังปฏิกิริยา



และถ้ามีแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ร่วมด้วย จะช่วยเร่งปฏิกิริยาให้เกิด $^{\circ}OH$ เพิ่มขึ้นได้ (Ma et al., 2005) $Fe^{III}(OH)^{2+} + UV \longrightarrow Fe^{2+} + ^{\circ}OH$ ส่วนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยพลังงานจากแสง สามารถแตกตัวได้เป็นอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลเช่นกัน (Mamane et al., 2007) คือ $H_2O_2 + h\nu \longrightarrow 2 ^{\circ}OH$

การนำปฏิกิริยาเฟนตันไปใช้ส่วนใหญ่มักเป็นในลักษณะของการกำจัดสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม เช่น ฟีนอล (Kavitha and Palanivelu, 2004) สารฆ่าแมลง (Huston and Pignatello, 1999; Fallmann et al., 1999) พอร์มาลดีไฮด์ (Kajitvichyanukul et al., 2008) ฯลฯ ส่วนการนำไปใช้กำจัดจุลินทรีย์ที่มีความทนทานในสิ่งแวดล้อมสูงยังคงมีอยู่น้อยมาก ที่ปรากฏก็มักเป็นการศึกษากับเชื้อ *E. coli* (Diao et al., 2004; Rincón and Pulgarin, 2006, 2007) ซึ่งมีความทนทานต่ำกว่าสปอร์ของแบคทีเรีย การศึกษานี้จึงทดสอบความสามารถของปฏิกิริยาเฟนตันในการทำลายสปอร์ของ *B. subtilis* ในสภาวะที่มีแสงอัลตราไวโอเล็ตร่วมด้วย โดยศึกษาสภาพ pH ที่เหมาะสมต่อการกำจัดสปอร์ รวมถึงผลของการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แต่เพียงอย่างเดียว (ทั้งที่มีแสงและไม่มีแสงอัลตราไวโอเล็ต) ในการกำจัดสปอร์ของ *B. subtilis*

วิธีการศึกษา

การเตรียมสปอร์ของ *B. subtilis*

แบคทีเรีย *B. subtilis* ในการศึกษาครั้งนี้จัดซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยในรูปแบบของผงแห้ง นำมาผสมกับน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้เข้ากันดี แล้วใช้ปิเปตหยดเชื้อมา 1 หยดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar (TSA) เกลี่ยให้ทั่ว แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 7 วันจนมีสปอร์ขึ้นเต็ม การเตรียมสปอร์ทำโดยแยกเชื้อ *B. subtilis* มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่ 80°C นาน 10 นาทีเพื่อกำจัด vegetative cell ให้เหลือแต่สปอร์ จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 2000 รอบ/นาทีนาน 5 นาที จึงนำสปอร์ที่อยู่ในส่วนของสารละลายไปผสมกับน้ำตัวอย่าง (น้ำกลั่น) สำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

การใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว

การศึกษาเริ่มจากการวิเคราะห์หาจำนวนโคโลนีเริ่มต้นของ *B. subtilis* ในน้ำตัวอย่างที่ผสมสปอร์ของ *B. subtilis* ลงไปแล้ว โดยคูนน้ำตัวอย่างมาเจือจางกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อในอัตราส่วน 1:9 ก่อนหยดน้ำที่เจือจางแล้วจำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA เกลี่ยให้ทั่ว แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 12-24 ชั่วโมง จำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นกำหนดให้เป็นจำนวนเริ่มต้น (N_0) จากนั้นนำน้ำตัวอย่างที่ผสมสปอร์มาแบ่งใส่ปิเปกเกอร์ 2 ใบๆละ 600 มิลลิลิตร เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1 mM ลงไป ใบที่ 1 นำไปวางไว้ใต้แสงไฟอัลตราไวโอเลตชนิดเอที่มีความยาวคลื่นหลัก 365 นาโนเมตร ความเข้มแสง 4 mW/cm² (วัดที่ผิวหน้าด้วยอุปกรณ์ radiometer ของ Cole Palmer, model LW09811-50) นาน 3 ชั่วโมง ขณะที่อีกใบไม่มีแสงอัลตราไวโอเลตมาเกี่ยวข้องเพื่อการเปรียบเทียบ เมื่อครบเวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที คูนน้ำตัวอย่างจากทั้งสองใบ (1 มิลลิลิตร+น้ำเจือจาง 9 มิลลิลิตร หยดบนอาหาร TSA 0.1 มิลลิลิตร) ในลักษณะเดียวกันกับการวิเคราะห์จำนวนโคโลนีเริ่มต้น โดยจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นกำหนดให้เป็นจำนวนโคโลนีที่เวลาต่างๆ (N_t) การ

ศึกษาได้กระทำซ้ำในลักษณะเดิมแต่เปลี่ยนความเข้มข้นของไฮโดรเจนไฮดรอกไซด์เป็น 10, 40, 70, 100, 180, 250, 300 และ 600 mM ตามลำดับ ซึ่งทั้งหมดนี้ทำการศึกษาอย่างละ 1 ซ้ำ

การศึกษา pH ที่เหมาะสม

หลังจากวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อเริ่มต้น (N_0) ในน้ำตัวอย่างแล้ว นำน้ำมาแบ่งใส่ปิเปกเกอร์ทั้งหมด 5 ใบๆละ 600 มิลลิลิตร จำนวน 2 ชุด ทำการปรับ pH ของน้ำทั้ง 2 ชุดด้วยกรดซัลฟูริกให้มีค่าอยู่ที่ 2, 2.5, 3, 3.5, 4 และ 5 ในใบที่ 1 ถึง 5 ตามลำดับ โดยทุกใบเติมเฟอร์รัสซัลเฟตความเข้มข้น 0.1 mM ลงไป จากนั้นเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 40 mM ในน้ำในชุดที่ 1 และ 100 mM ในน้ำชุดที่ 2 คนให้เข้ากันดีก่อนนำไปวางภายใต้แสงไฟอัลตราไวโอเลตชนิดเอ ความเข้มแสง 4 mW/cm² และทำการวิเคราะห์หาจำนวน *B. subtilis* (N_t) ที่เวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ตามลำดับ ทำการศึกษาอย่างละ 1 ซ้ำในแต่ละ pH และความเข้มข้น

วิธีเฟนตัน

การศึกษาเริ่มจากการวิเคราะห์หาจำนวนโคโลนีเริ่มต้นของ *B. subtilis* ในน้ำ (N_0) และแบ่งน้ำตัวอย่างใส่ปิเปกเกอร์ใบละ 600 มิลลิลิตร ปรับ pH ไว้ที่ 2.8 แล้วเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ละความเข้มข้น (1, 10, 40, 70, 100 และ 180 mM) ในน้ำแต่ละชุด จากนั้นมีการเติมเฟอร์รัสซัลเฟตความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 ไปจนถึง 10 mM ลงไปในน้ำ (ในแต่ละชุดใช้ความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟตไม่เท่ากัน) คนให้เข้ากันดีก่อนนำไปวางภายใต้แสงไฟอัลตราไวโอเลตชนิดเอ ความเข้มแสง 4 mW/cm² และทำการวิเคราะห์หาจำนวน *B. subtilis* ที่เวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที (N_t) เช่นเดิม ในกรณีที่พบว่ามีตะกอนเกิดขึ้นในปิเปกเกอร์ เมื่อครบเวลา 180 นาทีแล้ว ได้มีการดูดตะกอนมาวิเคราะห์หา *B. subtilis* ในลักษณะเดียวกันกับน้ำตัวอย่างด้วย แต่ละชุดทำการศึกษาอย่างละ 1 ซ้ำ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

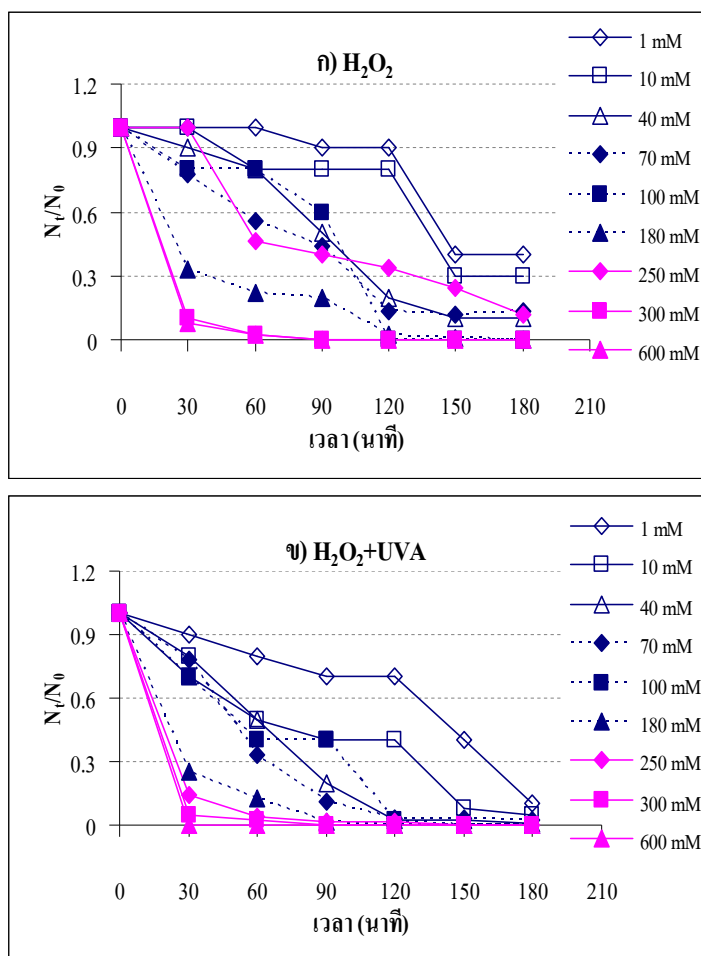
การเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติในการศึกษานี้ ใช้การวิเคราะห์ด้วย Paired t-test และ ANOVA ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 17.0

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

การกำจัดสปอร์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียวในสถานะที่ไม่มีแสงอัลตราไวโอเล็ต สามารถกำจัดสปอร์ของ *B. subtilis* ได้ตั้งแต่ 61-100% ในเวลา 180 นาที (รูปที่ 1 ก) ขณะที่เมื่อมีแสงร่วมด้วย สามารถกำจัดเพิ่มขึ้นเป็น 89-100% (รูปที่ 1 ข) ซึ่งชัดเจนว่าเป็นผลมาจากอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลที่มาจากปฏิกิริยาของ $H_2O_2 + h\nu \rightarrow 2^\circ OH$ (Mamane et al., 2007) ทั้งนี้ การเพิ่มความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ตั้งแต่ 1 mM ไปจนถึง 70

mM ร่วมกับแสงอัลตราไวโอเล็ต (รูปที่ 1 ข) ช่วยให้การกำจัดสปอร์ของ *B. subtilis* เพิ่มขึ้นจากการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แต่เพียงอย่างเดียวในความเข้มข้นเดียวกัน (รูปที่ 1 ก) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.003-0.035$) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นจาก 100 mM ไปจนถึง 600 mM ความแตกต่างระหว่างการไม่มีแสงและการมีแสงอัลตราไวโอเล็ตกลับไม่มีนัยสำคัญอีกต่อไป ($p = 0.077-0.308$) (ยกเว้นที่ 250 mM) ซึ่งเป็นไปได้ว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มากเกินไปจะไปทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลกลายเป็นอนุมูลอิสระไฮดรอกซีเปอร์ออกซิล ซึ่งมีอำนาจในการทำลายสปอร์ที่น้อยกว่ามาก ($H_2O_2 + ^\circ OH \rightarrow HO_2^\circ + H_2O$) (Rincón and Pulgarin, 2006)



รูปที่ 1. การกำจัดสปอร์ของ *B. subtilis* ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่างๆกัน ก) ในสถานะที่ไม่มีแสงอัลตราไวโอเล็ตชนิดเอ, ข) สถานะที่มีแสงอัลตราไวโอเล็ตชนิดเอ

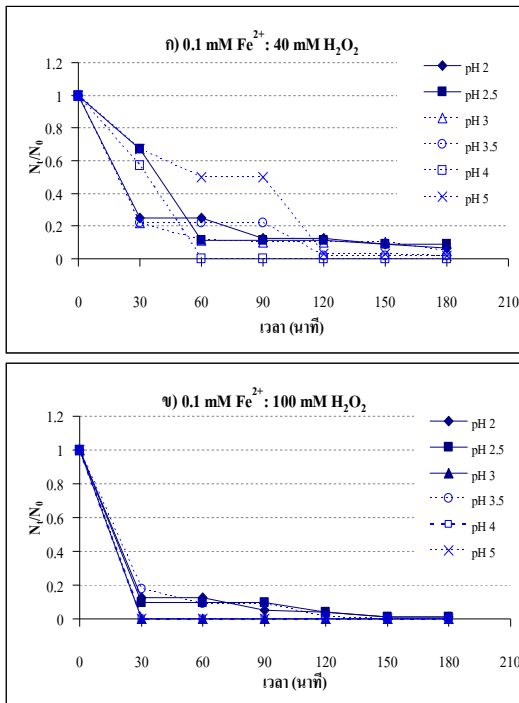
ทั้งนี้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แต่เพียงอย่างเดียว สามารถทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ก่อให้เกิดการทำลายหรือกลายพันธุ์ของเซลล์ได้ โดย Imlay and Linn (1986) พบว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่ำ (1-2 mM) ทำลายโครงสร้าง DNA ของ *E. coli* ผ่านกระบวนการเมตาโบลิซึมระหว่างการเจริญเติบโตในสภาวะที่ใช้อากาศ ขณะที่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นสูงสามารถทำลายเซลล์ได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการเมตาโบลิซึม แต่ความเข้มข้นที่ต่ำกว่านี้อาจไม่มีผลใดๆ เนื่องจาก Mamane et al. (2007) ศึกษาการกำจัดสปอร์ของ *B. subtilis* โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ตั้งแต่ 0-25 mg/L (0.735 mM) ร่วมกับแสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น >295 nm พบว่าปฏิกิริยาไม่สามารถทำลายสปอร์ของแบคทีเรียได้เลย ซึ่งในการศึกษานี้ จากรูปที่ 1 จะเห็นได้ว่า ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยิ่งมาก การกำจัดสปอร์ของ *B. subtilis* ยิ่งเพิ่มขึ้น ยกเว้นที่ความเข้มข้น 250 mM ในสภาวะที่ไม่มีแสง (รูปที่ 1 ก) ที่พบการกำจัดสปอร์ได้น้อยกว่าที่ความเข้มข้น 180 mM ซึ่งเป็นไปได้ว่าสปอร์ของแบคทีเรียในชุดที่ใช้ความเข้มข้น 250 mM มีความแข็งแรงทนทานกว่าชุดของความเข้มข้น 180 mM เนื่องจากการศึกษานี้ไม่ได้กระทำพร้อมๆ กันในคราวเดียวกันจากข้อจำกัดในเรื่องของปริมาณงานที่มีมากกว่าจำนวนคน จึงจำเป็นต้องแบ่งการศึกษาออกเป็นหลายๆ ครั้ง ซึ่งในแต่ละครั้งจำนวนโคโลนีเริ่มต้นก็มีความคลาดเคลื่อนแตกต่างกันไป และด้วยเหตุนี้ การเปรียบเทียบการลดลงของโคโลนีในที่นี้จึงกระทำในรูปของสัดส่วนระหว่างจำนวนโคโลนีที่เวลาใดๆ ต่อจำนวนเริ่มต้น (N_t/N_0)

ในแง่ของการกำจัดสปอร์อย่างสมบูรณ์จนไม่พบโคโลนีของ *B. subtilis* หลงเหลืออยู่ในน้ำเลยนั้นพบว่า ในสภาวะที่ไม่มีแสง (รูปที่ 1 ก) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 mM ไปจนถึง 600 mM สามารถกำจัดสปอร์จนหมดได้ในเวลาตั้งแต่ 90 นาที จนถึง 120 นาทีเป็นต้นไป โดยการเพิ่มความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ตั้งแต่ 300 mM ไปจนถึง

600 mM ให้ความแตกต่างในการกำจัดสปอร์อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.356$) ขณะที่เมื่อมีแสงอัลตราไวโอเล็ตมาร่วมด้วย (รูปที่ 1 ข) เวลาที่ใช้ในการกำจัดสปอร์อย่างสมบูรณ์นั้นลดลงเหลือเพียง 30 นาทีไปจนถึง 90 นาทีเป็นต้นไป ซึ่งความเข้มข้นตั้งแต่ 250 mM ไปจนถึง 600 mM ให้ความแตกต่างที่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน ($p = 0.121$)

ปัจจัยด้าน pH

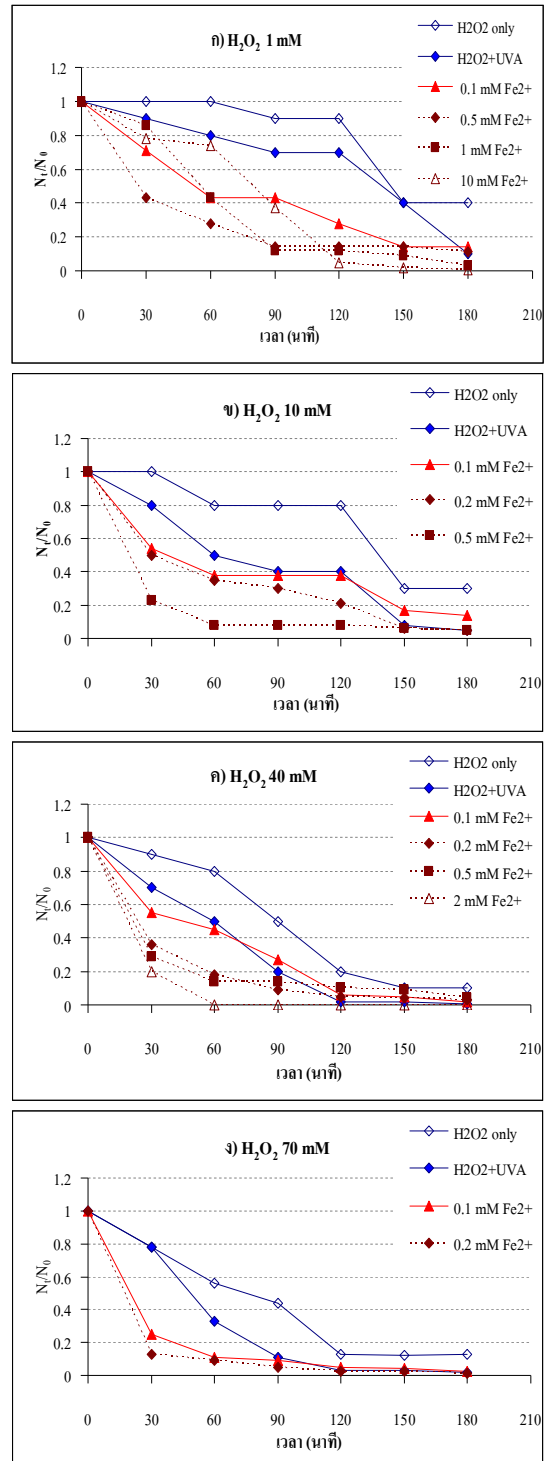
ในการศึกษานี้ทดสอบ pH ตั้งแต่ 2 ถึง 5 ในการกำจัดสปอร์ของ *B. subtilis* เนื่องจาก pH ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาเฟนตันนั้นมีรายงานตั้งแต่ pH 2.6 ในการสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของ Kajitvichyanukul (2008) หรือ pH 2.8 สำหรับกำจัดสารฆ่าแมลง 10 ชนิดในงานของ Fallmann et al. (1999) หรือ pH 3 สำหรับการสลาย atrazine ในงานของ Arnold et al. (1995) รวมไปถึง pH 4 ในการกำจัด *E. coli* ของ Diao et al. (2004) เป็นต้น ซึ่งผลของการศึกษานี้แสดงได้ดังรูปที่ 2 จากการใช้อัตราส่วนของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 2 อัตราในสภาวะที่มีแสง เส้นประในรูปหมายถึงพบการตกตะกอนของน้ำตัวอย่างและในตะกอนนั้นมี *B. subtilis* หลงเหลืออยู่ด้วย (พบได้ตั้งแต่ 1 ถึง 93 โคโลนี) ซึ่ง pH ที่ไม่ก่อให้เกิดตะกอนอยู่ที่ 2-2.5 เมื่อใช้อัตราส่วนของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.1:40 mM (รูปที่ 2 ก) และอยู่ที่ 2-3 เมื่อใช้อัตราส่วน 0.1:100 mM (รูปที่ 2 ข) ทั้งนี้ ตะกอนนั้นสามารถเกิดได้จากการเปลี่ยนรูปของเฟอร์รัส (Fe^{2+}) ไปเป็นเฟอร์ริกไฮดรอกไซด์ ($Fe(OH)_3$) ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันเมื่อมีออกซิเจนและ pH ที่เพิ่มขึ้น (Metcalf & Eddy, 2004) โดยในกรณีของอัตราส่วน 0.1:100 mM นั้น เมื่อใช้ pH 3 พบว่าสปอร์ของ *B. subtilis* ถูกกำจัดได้หมดสิ้นตั้งแต่เวลา 30 นาทีเป็นต้นไป ส่วนที่ pH 2 และ 2.5 ความแตกต่างนั้นไม่มีนัยสำคัญทางสถิติในทั้งสองอัตราส่วน ($p = 0.220-0.338$) การศึกษานี้จึงเลือกใช้ pH 2.8 ซึ่งอยู่ในช่วงของ pH ที่กำจัดสปอร์ได้ดีที่สุดโดยไม่มีตะกอนเกิดขึ้น



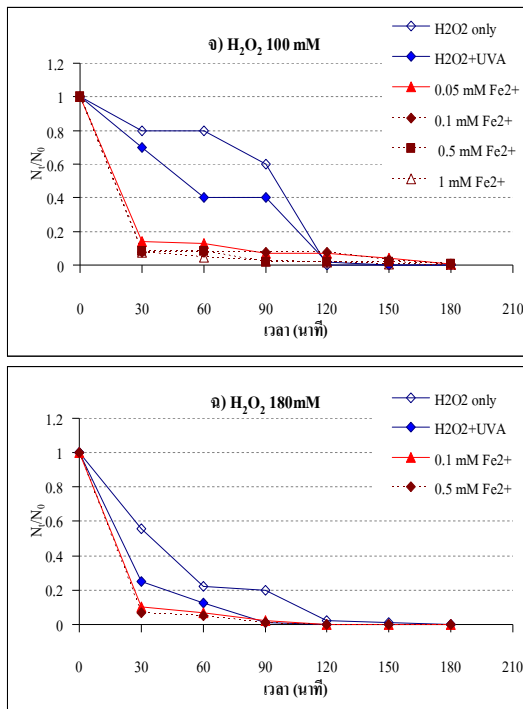
รูปที่ 2. การกำจัดสปอร์ของ *B. subtilis* ด้วยวิธีเฟนตัน ที่ pH ต่างๆ ก) ใช้เฟอร์รัสซัลเฟตต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.1:40 mM, ข) ใช้เฟอร์รัสซัลเฟตต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.1:100 mM

การกำจัดสปอร์ด้วยวิธีเฟนตัน

ความสามารถของวิธีเฟนตันในการกำจัดสปอร์ของแบคทีเรียเมื่อใช้อัตราส่วนของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อัตราต่างๆ แสดงได้ดังรูปที่ 3 โดยในรูปมีการนำผลของการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แต่เพียงอย่างเดียวทั้งในสภาวะที่ไม่มีแสงและมีแสงมาเปรียบเทียบไว้ด้วย เส้นประในรูปหมายถึงอัตราส่วนนั้นมีการเกิดตะกอนของน้ำตัวอย่าง และภายในตะกอนพบ *B. subtilis* หลงเหลืออยู่ในทุกตัวอย่างด้วย (พบได้ตั้งแต่ 2 ถึง 138 โคโลนี)



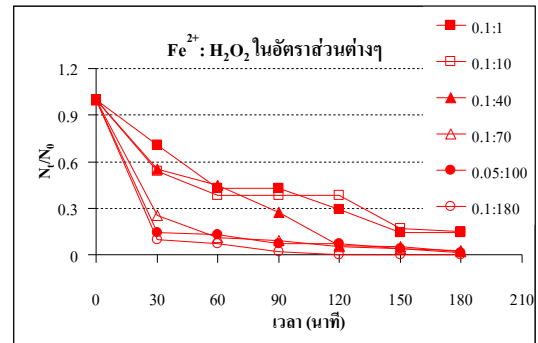
รูปที่ 3. การกำจัดสปอร์ของ *B. subtilis* ด้วยวิธีเฟนตัน เมื่อใช้อัตราส่วนของ Fe^{2+} : H_2O_2 ต่างๆ กัน



รูปที่ 3. การกำจัดสปอร์ของ *B. subtilis* ด้วยวิธีเฟนตัน เมื่อใช้อัตราส่วนของ $\text{Fe}^{2+}:\text{H}_2\text{O}_2$ ต่างๆ กัน (ต่อ)

จากรูปที่ 3 จะเห็นได้ว่าวิธีเฟนตันนั้นช่วยกำจัดสปอร์ของ *B. subtilis* ได้ดีกว่าการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แต่เพียงอย่างเดียว (ทั้งในสภาวะที่ไม่มีและไม่มีแสงอัลตราไวโอเล็ต) โดยความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟตในช่วงของ 0.05 mM ถึง 1 mM พบว่าความเข้มข้นยิ่งมาก ยิ่งช่วยกำจัดสปอร์ของแบคทีเรียในน้ำได้ดี แต่ความเข้มข้นที่มากเกินไป 0.1 mM ล้วนก่อให้เกิดการตกตะกอน ซึ่งสปอร์ของแบคทีเรียอาจหลบซ่อนอยู่ในตะกอนจึงไม่ถูกกำจัดด้วยอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยาได้ ความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟตที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษาครั้งนี้จึงอยู่ที่ 0.1 mM ส่วนในกรณีที่ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 100 mM พบว่าการใช้เฟอร์รัสซัลเฟต 0.1 mM ก่อให้เกิดตะกอนเล็กน้อยและมี *B. subtilis* หลงเหลืออยู่ 2 โคโลนี เมื่อลดความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟตให้เหลือ 0.05 mM ก็ไม่พบการตกตะกอนอีกต่อไป และเมื่อนำเฉพาะอัตราส่วนที่ดีที่สุดของวิธีเฟนตัน (ในสภาวะที่มีแสง) ในการกำจัดสปอร์ของแบคทีเรียโดยไม่ก่อให้เกิด

เกิดตะกอนมาเปรียบเทียบกัน สามารถแสดงผลได้ดังรูปที่ 4 ดังนี้



รูปที่ 4. อัตราส่วนของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (มิลลิโมลาร์) ที่ไม่ก่อให้เกิดตะกอนในการกำจัดสปอร์ของ *B. subtilis*

รูปที่ 4 แสดงให้เห็นว่ายิ่งเพิ่มความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความสามารถในการกำจัดสปอร์ของแบคทีเรียยิ่งเพิ่มขึ้น โดยพบประสิทธิภาพการกำจัดตั้งแต่ 86% ไปจนถึง 100% แต่ก็มีแนวโน้มว่าถ้ายังคงเพิ่มความเข้มข้นต่อไปอีกเรื่อยๆ การกำจัดสปอร์อาจไม่มากไปกว่านี้อีกซักเท่าใด และเมื่อย้อนกลับไปพิจารณารูปที่ 1 การเพิ่มความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเรื่อยๆ ก็ไม่ได้ทำให้การกำจัดสปอร์เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนอีกต่อไปเช่นกัน ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 180 mM จึงเป็นความเข้มข้นที่สามารถกำจัดสปอร์ได้อย่างสมบูรณ์ (100%) ในเวลา 180 นาที ขณะที่ความเข้มข้นอื่นๆ ยังคงพบสปอร์หลงเหลือในน้ำตั้งแต่ 1 โคโลนีจนถึง 19 โคโลนี (จากโคโลนีเริ่มต้นเฉลี่ย 113 ± 33 โคโลนี) ในช่วงเวลา 180 นาทีที่ทำการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Diaio et al. (2004) ที่ใช้ปฏิกิริยาเฟนตันกำจัด *E. coli* ในน้ำ (จำนวน 10^9 - 10^{10} โคโลนี/มิลลิลิตร) โดยใช้เฟอร์รัส 0.003 mM และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.25 mM สามารถกำจัดแบคทีเรียได้ 99.4% ในเวลา 10 นาที และ 99.8% ในเวลา 30 นาทีซึ่งไวกว่าการศึกษานี้มาก อาจเนื่องมาจากความทนทานของจุลินทรีย์ที่มีไม่เท่ากัน ส่วนการศึกษาของ Rincón and Pulgarin

(2006) พบว่า การเติม Fe^{3+} 0.001 mM ช่วยลดเวลาในการกำจัด *E. coli* จำนวน 10^4 - 10^6 โคโลนี/มิลลิลิตร ให้เหลือ <1 โคโลนี/มิลลิลิตร จาก 120 นาที เป็น 60 นาที ได้ ซึ่งการศึกษาทั้งสองนี้ไม่มีรายงานการเกิดตะกอนแต่อย่างใด อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของเฟอร์รัส (หรือเฟอร์ริก) ที่ใช้ต่ำกว่าในการศึกษานี้มาก

สรุปผลการศึกษา

ความสามารถในการกำจัดสปอร์ของ *B. subtilis* ในน้ำสามารถเรียงลำดับจากน้อยไปหามากได้ดังนี้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว < ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับแสงอัลตราไวโอเล็ต < ปฏิกริยาเฟนตัน โดยการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียวพบว่า ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยิ่งมาก การกำจัดสปอร์ของแบคทีเรียยิ่งดีขึ้น แต่ความเข้มข้นตั้งแต่ 250-300 mM (ขึ้นกับว่ามีแสงอัลตราไวโอเล็ตร่วมด้วยหรือไม่) จนถึง 600 mM ความแตกต่างนั้นไม่สำคัญในทางสถิติ

ในส่วนของวิธีเฟนตัน pH ที่เหมาะสมพบอยู่ในช่วง 2.5-3 อัตราส่วนระหว่างเฟอร์รัสซัลเฟตต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เหมาะสมคือ 0.1:180 mM โดยหากเพิ่มความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟต จะช่วยลดจำนวนสปอร์ของแบคทีเรียในน้ำลงได้ แต่กลับพบตะกอนเกิดขึ้น ซึ่งมีโคลินของ *B. subtilis* หลงเหลืออยู่ด้วย

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ประจำปี 2553

เอกสารอ้างอิง

สุจิตรา นาวรัตน์. 2553. การกำจัดจุลินทรีย์ในน้ำเสีย
โรงพยาบาลด้วยปฏิกิริยาไทเทเนียมไดออกไซด์โฟโตคะตะลิสต์ การใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตซี และการเติมคลอรีน. วิทยานิพนธ์

ปริญญาโทบัณฑิตมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขา
วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

- Arnold S.M., Hickey W.J., and Harris R.F. 1995. Degradation of atrazine by Fenton's reagent: condition optimization and product quantification. **Environmental Science & Technology** 29(8): 2083-2089.
- Diao H.F., Li X.Y., Gu J.D., Shi H.C., and Xie Z.M. 2004. Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction. **Process Biochemistry** 39: 1421-1426.
- Fallmann H., Krutzel T., Bauer R., Malato S., and Blanco J. 1999. Applicability of the Photo-Fenton method for treating water containing pesticides. **Catalysis Today** 54: 309-319.
- Huston P.L. and Pignatello J.J. 1999. Degradation of selected pesticide active ingredients and commercial formulations in water by the photo-assisted Fenton reaction. **Water Research** 33 (5): 1238-1246.
- Imlay J.A. and Linn S. 1986. Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. **Journal of Bacteriology** 166(2): 519-527.
- Kajitvichyanukul P., Lu M-C., and Jamroensan A. 2008. Formaldehyde degradation in the presence of methanol by photo-Fenton process. **Journal of Environmental Management** 86:545-553.
- Kavitha V. and Palanivelu K. 2004. The role of ferrous ion in Fenton and photo-Fenton processes for the degradation of phenol. **Chemosphere** 55: 1235-1243.

- Ma J., Song W., Chen C., Ma W., Zhao J., and Tang Y. 2005. Fenton degradation of organic compounds promoted by dyes under visible irradiation. **Environmental Science & Technology** 39(15): 5810-5815.
- Mamane H., Shemer H., and Linden K.G. 2007. Inactivation of *E. coli*, *B. subtilis* spores, and MS2, T4, and T7 phage using UV/H₂O₂ advanced oxidation. **Journal of Hazardous Materials** 146: 479-486.
- Metcalf & Eddy. 2004. Wastewater Engineering Treatment and Reuse. 4th Edition. Singapore: McGraw-Hill,
- Nicholson W.L., Munakata N., Horneck G., Melosh H.J., and Setlow P. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 64(3): 548-572.
- Rincón A.G. and Pulgarin C. 2006. Comparative evaluation of Fe³⁺ and TiO₂ photoassisted processes in solar photocatalytic disinfection of water. **Applied Catalysis** 63: 222-231.
- Rincón A.G. and Pulgarin C. 2007. Fe³⁺ and TiO₂ solar-light-assisted inactivation of *E. coli* at field scale implications in solar disinfection at low temperature of large quantities of water. **Catalysis Today** 122: 128-136.