สัญญาเลขที่ **RMU5180028**

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: เปรียบเทียบการดูดซึม/ซับทางชีวภาพของบิสฟีนอล เอ โดยใช้สาหร่าย พืช และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

(Comparison of Bisphenol A removal by using microalgae, plant and agriculture waste)

ผู้วิจัย รศ. ดร. ดวงรัตน์ อินทร
สังกัด ภาควิชาวิทยาศาสตร์อนามัยสิ่งแวดล้อม
คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
E-mail: phdit@mahidol.ac.th

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสำนักงานการอุดมศึกษาแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนทุนนักวิจัยรุ่นกลางแก่ดิฉัน ซึ่งทำให้สามารถเริ่มทำการวิจัยในภาควิชาวิทยาศาสตร์อนามัยสิ่งแวดล้อมที่สังกัดอยู่ได้ตลอดสามปีที่ผ่านมา และขอขอบคุณ ศ. ดร. เอกลักษณ์ คาน Civil Engineering Department, North Dakota State University ที่ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในงานวิจัยนี้ และขอบคุณ รศ. ดร ไพทิพย์ ธีรเวชญาณ สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพและทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในงานวิจัยนี้ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการขอใช้เครื่องมือต่างๆที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารธนบุรี ขอบคุณรศ.ดร. อลิสา วังใน ภาควิชาชีวเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยและให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัยในส่วนของการศึกษาแบคทีเรียในรากต้นกวนอิม ขอบคุณคุณ จิรา แก้วดำ คุณวชิราภรณ์ คำยัง และคุณสาวิตรี สายหยุด ที่ได้ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลงด้วยดี ผู้วิจัย ขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์อนามัยสิ่งแวดล้อม คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้สนับสนุนให้ผู้วิจัยได้มีโอกาสทำวิจัยนี้ ขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม คณะพลังงานและวัสดุ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียนที่ได้ให้ใช้เครื่องมือในการทดลองการดูดซับที่อุณหภูมิต่างๆ ภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีที่กรุณาให้ใช้เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer analysis (FTIR) ขอบคุณศูนย์เครื่องมือกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องอิเลคตรอนไมโครสโคป ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ได้กรุณาช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกเป็นอย่างดี และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาให้ทุนสนับสนุนบางส่วนสำหรับนักศึกษาในการไปนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 8 ที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

ชื่อโครงการ : เปรียบเทียบการดูดซึม/ซับทางชีวภาพของบิสฟีนอล เอโดยใช้สาหร่าย พืช และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (Comparison of Bisphenol A removal by using microalgae, plant and agriculture waste)

สัญญาเลขที่ RMU5180028

ระยะเวลาโครงการ 14 พฤษภาคม 2551 ถึง 14 พฤษภาคม 2554

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน รศ. ดร. ดวงรัตน์ อินทร
ที่ทำงาน ภาควิชาวิทยาศาสตร์อนามัยสิ่งแวดล้อม คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
E-mail: phdit@mahidol.ac.th

การดำเนินงาน

☐ ได้ดำเนินงานตามแผนที่วางไว้
☐ ได้ดำเนินงานล่าช้ากว่าแผนที่วางไว้
☑ ได้เปลี่ยนแผนที่วางไว้ดังนี้

ทำตามแผนที่วางไว้ทุกประการ ยกเว้นในส่วนที่ 3 ซึ่งเป็นการศึกษาเรื่องการใช้วัสดุดูดซับในการกำจัดบิสฟีนอลเอ ผู้วิจัยตัดการศึกษาการดูดซับโดยขี้เถ้าลอยชานอ้อยในระบบคอลัมน์ตรึงออก เนื่องจากพบว่าเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการกำจัดบิสฟีนอลเอ ทางชีวภาพทั้งสามวิธี นั้นการใช้พืช และสาหร่ายมีประสิทธิภาพและความเป็นไปได้มากกว่าในการนำมาประยุกต์ใช้จริง การประยุกต์ใช้วัสดุดูดซับในคอลัมน์ตรึงจะมีข้อจำกัดหลายประการ

Project Code : RMU5180028
รหัสโครงการ สัญญาเลขที่ RMU5180028
Project Title : Comparison of Bisphenol A removal by using microalgae, plant and agriculture waste
ชื่อโครงการ : เปรียบเทียบการดูดซึม/ซับทางชีวภาพของบิสฟีนอลเอโดยใช้สาหร่าย พืช และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

Investigator : Assoc. Prof. Dr. Duangrat Inthorn, Department of Environmental Health Sciences, Faculty of Public Health, Mahidol University
ชื่อนักวิจัย: รศ.ดร. ดวงรัตน์ อินทร ภาควิชาวิทยาศาสตร์อนามัยสิ่งแวดล้อม คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
E-mail Address : phdit@mahidol.ac.th

Project Period : 14 May 2008 -14 May 2011
ระยะเวลาโครงการ 14 พฤษภาคม 2551-14 พฤษภาคม 2554

บทคัดย่อ

ศึกษาการกำจัดบิสฟีนอลเอโดยต้นกวนอิม (*Dracaena sanderina*) พบว่าสามารถกำจัดบิสฟีนอลเอได้ดีและทนได้ในความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ 80 ไมโครโมลาร์ซึ่งที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้พืชไม่สามารถทนได้ ในการเลี้ยงในสารละลายที่มีบิสฟีนอลเอพบว่าที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์ ต้นกวนอิมกำจัดบิสฟีนอลเอได้ ร้อยละ 50 ศึกษาการเคลื่อนย้ายของบิสฟีนอลเอในต้นกวนอิมพบว่ามีการสะสมบิสฟีนอลเอที่ราก และลำต้นแต่ไม่สะสมในใบ เมื่อเลี้ยงต้นกวนอิมในบิสฟีนอลเอ พบว่ามีการปล่อยโพลิแซคคาร์ไรด์ออกมาซึ่งเป็นกลไกป้องกันสารพิษของพืช การเลี้ยงในสภาวะไม่ปราศจากเชื้อพบว่า มีการกำจัดบิสฟีนอลเอจากทั้งต้นกวนอิมและสิ่งมีชีวิตที่บริเวณรากสูงถึง ร้อยละ 85 ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากรากต้นกวนอิมได้ 6 ชนิด พบว่า แบซีรัส ซีเรียส BPW4และ แอนเทโรแบคเตอร์ BPW5 ช่วยในการกำจัดบิสฟีนอลเอ ศึกษาการกำจัดบิสฟีนอลเอในน้ำชะขยะ พบว่าต้นกวนอิมสามารถกำจัดบิสฟีนอลเอในน้ำชะขยะได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในน้ำเสียและน้ำชะขยะอุตสาหกรรม

ศึกษาการใช้สาหร่ายในการกำจัดบิสฟีนอลเอ ผลของอายุเซลล์ต่อการกำจัดบิสฟีนอลเอของไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon hibernicus* ที่อายุเซลล์ 7 และ 14 วัน พบว่าสามารถกำจัดบิสฟีนอล เอ ได้ร้อยละ 37 และ 42 และมีค่าอัตราการอัพเทค (q) เท่ากับ 11.94 และ 12.94 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ตามลำดับ ศึกษาการเพิ่มความสามารถในการกำจัดบิสฟีนอลเอโดยเซลล์ที่ผ่านการแอคไคมาไทซ์ ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ ที่ 40 45 50 และ 55 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลาหนึ่งเดือนมาแล้ว พบว่าเซลล์ดังกล่าวสามารถกำจัดบิสฟีนอลเอได้เท่ากับร้อยละ 58 59 68 และ 10 ตามลำดับ โดยมีค่าการอัพเทค (q) เท่ากับ 9.70 18.50 12.07 และ 1.33 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ตามลำดับ เมื่อนำ *Hapalosiphon hibernicus* มากำจัดบิสฟีนอล เอ ในน้ำชะขยะจากหลุมฝังกลบขยะอันตรายแห่งหนึ่ง พบว่าภายในเวลา 9 วัน เซลล์ที่ไม่ผ่านการแอคไคมาไทซ์ สามารถกำจัดบิสฟีนอลเอ ในน้ำชะขยะที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 40 และ 60 ได้ร้อยละ 90 78 และ 71 ตามลำดับ แต่เมื่อนำเซลล์ที่ผ่านการแอคไคมาไทซ์ มากำจัดบิสฟีนอลเอ พบว่าสามารถกำจัดบิสฟีนอลเอ ได้สูงกว่า คือ ร้อยละ 98 91 และ 79 ตามลำดับ และในระหว่างการทดลองพบว่า *Hapalosiphon hibernicus* ผลิตโพลีแซคคาไรด์ออกมานอกเซลล์ ซึ่งเป็นกลไกป้องกันความเป็นพิษต่อเซลล์ ทำการสกัดโพลิแซคคาร์ไรด์และนำไป วิเคราะห์องค์ประกอบโพลิแซคคาร์ไรด์ พบว่าประกอบด้วยน้ำตาล โมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ ฟรุคโตส กาแลคโตส การแลคทูโลนิค เอซิด กลูโคส กลูคูโรนิค เอซิด และแมนโนส

ศึกษาการกำจัดบิสฟีนอลเอในวัสดุดูดซับ 7 ชนิด ได้แก่ เถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย เปลือกถั่ว เปลือกไข่ กาบมะพร้าว แกลบและซังข้าวโพด พบว่า เถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย และเปลือกถั่ว มีประสิทธิภาพในการกำจัดบิสฟีนอลเอได้สูง ที่ปริมาณตัวดูดซับที่เหมาะสม พบว่าปริมาณของเถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย และเปลือกถั่วร้อยละ 3 3 และ 5 น้ำหนักต่อปริมาตร มีประสิทธิภาพในการกำจัดบิสฟีนอลเอ ได้สูงสุดที่ร้อยละ 99 99 และ 86 ตามลำดับ ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอเริ่มต้นมีผลในการกำจัดบิสฟีนอลเอในทั้งสามตัวดูดซับส่วนพีเอชมีผลต่อการกำจัดเฉพาะใน เถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย เมื่อนำเถ้าลอยชานอ้อยมาแอคคามาไทด์ ด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 800 องศาเซลเซียส พบว่ากำจัดบิสฟีนอลเอได้เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 99.7 เมื่อเปรียบเทียบกับแอคติแวเต็คคาร์บอนทางการค้า ซึ่งกำจัดได้ร้อยละ 99.8

สำหรับการดูดซับด้วยเถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย และเปลือกถั่ว สอดคล้องกับไอโซเทอร์มการดูดซับแบบแลงเมียร์และกำจัดได้สูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียส ผลจาก FTIR พบว่าการดูดซับเกิดที่ผิวของวัสดุดูดซับทั้งสามชนิด และการดูดซับของเปลือกถั่วเป็นแบบแอคโซเทอร์มิกรีแอคชั่น ส่วนการดูดซับในเถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อยและถ่านกัมมันต์เถ้าลอยชานอ้อย และถ่านกัมมันต์ทางการค้า เป็นเอ็นโดเทอร์มิครีแอคชั่นซึ่งคาดว่าจะเป็นการดูดซับทางเคมี ทำการทดลองการดูดซับในน้ำชะขยะที่ปนเปื้อนบิสฟีนอลเอ พบว่า วัสดุดูดซับทั้งสามชนิดนั้นสามารถกำจัดได้ในช่วงร้อยละ 74-98 ซึ่สามารถงเปรียบเทียบกับถ่านกัมมันต์ที่ใช้ในทางการค้าสามารถกำจัดได้ ร้อยละ 73

คำหลัก: บิสฟีนอล เอ, *Dracaena sanderina*, plant-associating bacteria, plant-associating *Enterobacter* sp., plant-associating *Bacillus* sp., *Hapalosiphon hibernicus* แอคไคมาไทซ์เซชัน การดูดซับ เถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย เปลือกถั่ว

Abstract

Dracaena sanderiana demonstrated significantly higher BPA removal capability and tolerated BPA toxicity levels up to 80 μM, while higher BPA concentrations damaged the plant. In the sterile hydroponic system with an initial BPA concentration of 20 μM, the plant could uptake approximately 50% of the BPA. The plant's ability to translocate BPA was confirmed by the detection of BPA that accumulated at the roots and stems, but not at the leaves of the plant. Upon BPA exposure, the *D. sanderiana* secreted extracellular plant mucilage as a protective barrier to the toxic compound. In the non-sterile treatment, the BPA dissipation was contributed not only by the *D. sanderiana* plant, but also by the co-existing microbes. The BPA reached 85% of the initial concentration at 20 μM. Among the six plant-associating bacterial isolates, *Bacillus cereus* strain BPW4 and *Enterobacter* sp. strain BPW5 colonized the *D. sanderiana* root surface and facilitated BPA dissipation in the hydroponic treatment system. In addition, the success of the BPA treatment in the hazardous waste landfill leachate demonstrated the potential application of the *D. sanderiana* plant in the phytoremediation of BPA contaminated wastewater or industrial leachate.

The effect of cell ages on Bisphenol A removal of cyanobacteria *Hapalosiphon hibernicus* were studied. *H. hibernicus* at the cell ages of 7 and 14 days showed Bisphenol A removal at 37% and 42% and the Bisphenol A uptake rates (q) were equivalent to 11.94 and 12.94 mg/g cell dry wt., respectively. In order to improve Bisphenol A removal, the cells were acclimatized with Bisphenol A at the concentrations of 40, 45, 50 and 55 μM for one month before being used. The results showed that Bisphenol A removal by the acclimatized cells were 58%, 59%, 68% and 10%, respectively, and the Bisphenol A uptake rates (q) were 9.70, 18.50, 12.07 and 1.33 mg/g cell dry wt., respectively. When being tested to remove Bisphenol A in a landfill leachate the cyanobacterium was mixed with the leachate at the concentrations of 20%, 40% and 60% for 9 days and it was found that the non-acclimatized cells were able to remove Bisphenol A at 90%, 78% and 71%, respectively while that with the acclimatized cells were 98%, 91% and 79%, respectively,. The *H. hibernicus* cells collected from the treatment study were found to secrete polysaccharide as the defense mechanism of the cells during their exposure to Bisphenol A.

Seven adsorbents, sawdust bottom ash, bagasse fly ash, groundnut shell, egg shell, coconut husk, rice straw and corn husk, were screened for their ability to remove bisphenol A (BPA) from water in a batch system. The first three adsorbents provided the highest BPA removal and were investigated further. At the optimal adsorbent dosages of 3%, 3% and 5% (w/v), sawdust bottom ash, bagasse fly ash and groundnut shell removed 99%, 99% and 86% of BPA, respectively. The initial BPA concentration affected the removal efficiency of all three adsorbents while the initial pH influenced BPA removal by sawdust bottom ash and bagasse fly ash. After activating bagasse fly ash by steam at 800^{O}C, its BPA removal increased to 99.7% comparable to that by commercial activated carbon 99.8%. The adsorption results by all adsorbents agreed with the Langmuir model and were the highest at 50^{O}C. A Fourier Transformed Infrared analysis indicated BPA adsorption on the surface of all three adsorbents. The BPA adsorption by groundnut shell was exothermic while those by sawdust bottom ash, bagasse fly ash, bagasse fly ash activated carbon and commercial activated carbon were endothermic implying chemisorption. The adsorbents were also tested with actual landfill leachate containing BPA. The BPA removal by all three sorbents and activated baggage fly ash ranged from 74 % to 98 % compared to 73 % by activated carbon.

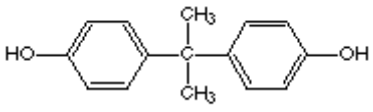
Keywords: Bisphenol A; *Dracaena* plant; plant-associating bacteria; plant-associating *Enterobacter* sp.; plant-associating *Bacillus* sp., *Hapalosiphon hibernicus*, acclimatization, adsorption, sawdust bottm ash, bargasses fly ash, groundnut shell

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาความสามารถในการกำจัดบิสฟีนอลเอ โดยใช้วัสดุดูดซับที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ เถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย และการดูดซึม/ดูดซับทางชีวภาพ โดยใช้พืชและสาหร่าย
2. ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึม/ดูดซับและศึกษากลไกการดูดซึม/ดูดซับ
3. เพื่อเปรียบเทียบการกำจัดจากทั้งสามระบบว่าระบบไหนดีกว่ากันและเลือกระบบที่เหมาะสมเพื่อนำไปพัฒนาเทคโนโลยีการกำจัด บิสฟีนอลเอ ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าการใช้พืชเหมาะที่สุดในการนำไปประยุกต์ใช้
4. เป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ในงานวิจัยเกี่ยวกับการกำจัดบิสฟีนอลเอ จากน้ำชะขยะในหลุมฝังกลบขยะในประเทศไทย

บทนำ

บิสฟีนอลเอ เป็นสารในกลุ่มสารรบกวนฮอร์โมนต่อมไร้ท่อ (Endocrine disrupting chemicals) ที่กำลังได้รับความสนใจเพราะสารกลุ่มนี้จะไปยับยั้งการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อของมนุษย์และสัตว์ ส่งผลต่อการเกิดมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 เพิ่มขึ้น (1) และนอกจากนี้ยังทำให้เกิดความเป็นพิษเฉียบพลันอย่างอ่อนกับสิ่งมีชีวิตในน้ำ (2) โดยส่วนใหญ่จะใช้เป็นสารตัวกลางในการผลิตพลาสติกพวกโพลีคาร์บอเนตและอีพอกซีเรซิน(3) บิสฟีนอลเอพบปนเปื้อนได้หลายแหล่งในสิ่งแวดล้อม แต่แหล่งที่พบเป็นจำนวนมากคือ น้ำชะขยะ โดยในประเทศญี่ปุ่น ในปี 2001 มีรายงานการพบระดับความเข้มข้นของบิสฟีนอล เอในน้ำชะจากหลุมฝังกลบขยะอันตราย ในช่วง 0.01-75.34 ไมโครโมลาร์ (4) ซึ่งอาจเสี่ยงต่อการกระจายสู่สิ่งแวดล้อมอื่นๆได้ ดังนั้นจึงต้องมีกระบวนการบำบัดสารที่เหมาะสม ซึ่งการบำบัดด้วยวิธีการทางกายภาพ-เคมีโดยการใช้วัสดุดูดซับเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย มีประสิทธิภาพสูง



Bisphenol A

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของ Bisphenol A (BPA)

วิธีการบำบัดบิสฟีนอลเอ โดยทั่วไปมีทั้งทางฟิสิกส์-เคมี ได้แก่ การกรอง การปรับค่าพีเอช การให้โอโซน การดูดซับ กระบวนการ photodegradation และกระบวนการทางชีวภาพซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความ

สนใจมากขึ้นในปัจจุบันเนื่องจากเป็นมิตรกับ สิ่งแวดล้อม มีการศึกษาโดยนำสิ่งมีชีวิตหลายชนิดไปใช้ในการบำบัดบิสฟีนอล เอ เช่น แบคทีเรีย (5, 6) รา (7, 8) สาหร่าย (9, 10) เป็นต้น

การวิจัยนี้ทำการศึกษาการกำจัดบิสฟีนอลเอ โดยใช้ พืช สาหร่ายและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ดังนี้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมการกำจัดบิสฟีนอลเอโดยต้นกวนอิม ศึกษาการ เคลื่อนย้ายของบิสฟีนเอลเอในต้นกวนอิม กลไกการกำจัดบิสฟีนอลเอของต้นกวนอิม และชนิดของแบคทีเรียที่รากของต้นกวนอิม ตลอดจนความสัมพันธ์ของแบคทีเรียและต้นกวนอิมในการกำจัดบิสฟีนอลเอ และกำจัดบิสฟีนอลเอในน้ำชะขยะได้

ศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดบิสฟีนอลเอ โดย *Hapalosiphon hibernicus* ศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดบิสฟีนอลเอ โดยเซลล์ที่ผ่านการแอคไคมาไทซ์เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดบิสฟีนอลเอ สกัดและวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลในโพลิแซคคาไรด์ นอกจากนี้ยังศึกษาการกำจัดบิสฟีนอลเอ ในน้ำชะขยะจากหลุมฝังกลบขยะอันตรายแห่งหนึ่งโดยเปรียบเทียบระหว่าง เซลล์ปกติและเซลล์ที่ผ่านการแอคไคมาไทซ์ และศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผิวเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยใช้วัสดุดูดซับ คือเถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย ซึ่งเป็นเถ้าเหลือทิ้งจากการเผาไหม้เชื้อเพลิง และเปลือกถั่ว มาใช้ในการศึกษาการดูดซับบิสฟีนอล เอโดยศึกษาผลของปริมาณวัสดุดูดซับ ความเข้มข้นของบิสฟีนอล เอ ระยะเวลาการสัมผัส พีเอช การศึกษาลักษณะทางกายภาพของวัสดุดูดซับ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning Electron Microscope : SEM) และวิเคราะห์ BET surface area ศึกษากลไกของการดูดซับบิสฟีนอลเอ โดยศึกษาไอโซเทอร์มการดูดซับ การชะออกของบิสฟีนอล เอ และศึกษาการดูดซับบิสฟีนอลเอ ในน้ำชะจากหลุมฝังกลบขยะอันตราย

เอกสารอ้างอิง

1. Krishnan A., Starhis P., Permuth S., Tokes L., and Feldman D. Bisphenol A : an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. Endocrinology. (1993), 132(16): 2279-2286.
2. Alexander H.C., Dill D.C., Smith L.A., Guiney P.A., and Dorn P.B. Bisphenol A : acute aquatic toxicity. Environmental Toxicological and Chemistry. (1998), 7: 19-26.
3. Staples C., Dorn P., and Klecka G. A review of the environmental fate, effects and exposures of bisphenol A. Chemosphere. (1998), 36: 2149-2173.
4. Yamamoto T., Yasuhara A., Shiraishi H., and Nakasugi O. Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates. Chemosphere. (2001), 42:415-418.
5. Kang J.H. and Kondo F. Bisphenol A degradation by bacteria isolated from river water. Arch. Environ Contam Toxicol. (2002), 43: 265-269.
6. Sasaki M., Maki J.I., Oshiman K.I., Matsumura Y. and Tsuchido T. Biodegradation of Bisphenol A by cells and cell lysate from *Sphingomonas* sp. strain AO1. Biodegradation. (2005), 16: 449-459.

7. Hirano T., Honda Y., Watanabe T. and Kuwahara M. Degradation of Bisphenol A by the lignin-degrading enzyme manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete. Biosci Biotechnol biochem. (2000), 64:1958-1962.
8. Yim S.H., Kim H.J. and Lee I.S. Microbial metabolism of the environmental estrogen Bisphenol A. Arch Pharm Res. (2003), 37: 1256-1260.
9. Hirooka T., Nagase H., Uchida K., Hiroshige Y., Ehara Y., Nishikawa J.I., NishiharaT., Miyamoto K. and Hirata K. Biodegradation of Bisphenol A and disappearance of its estrogenic activity by the green alga *Chlorella fusca* var. *varcuolata.* Environ Toxicol Chem. (2005), 24: 1896-1901.
10. Inthorn D., Srivichai P. and Srinetre V. Removal of Bisphenol A by microalgae. Poll Res. (2006), 25: 589-596.

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์นี้แบ่งออกเป็น 3 ส่วน

ส่วนที่ 1 การกำจัดบิสฟีนอลเอทางชีวภาพโดยใช้ต้นกวนอิม

ส่วนที่ 2 การกำจัดบิสฟีนอลเอทางชีวภาพโดยใช้สาหร่ายขนาดเล็ก

ส่วนที่ 3 การกำจัดบิสฟีนอลเอโดยใช้วัสดุดูดซับที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

ส่วนที่ 1 การกำจัดบิสฟีนอลเอโดยโดยใช้ต้นกวนอิม

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกพืชที่เหมาะสมในการกำจัด (อัพเทค) บิสฟีนอลเอ
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดบิสฟีนอลเอ เช่น ความเข้มข้นบิสฟีนอลเอ พีเอช และอายุของพืชที่เหมาะสม เป็นต้น
3. ศึกษากลไกการกำจัดบิสฟีนอลเอในพืช
4. ศึกษาการสะสมของบิสฟีนอลเอในส่วนต่างๆของพืช
5. คัดแยกแบคทีเรียที่บริเวณรากของต้นกวนอิม
6. ศึกษาการกำจัดบิสฟีนอลเอของต้นกวนอิมร่วมกับแบคทีเรียที่บริเวณรากของต้นกวนอิม
7. สร้างองค์ความรู้ใหม่ในงานวิจัยพื้นฐานเกี่ยวกับการใช้พืชในการกำจัดบิสฟีนอลเอจากน้ำชะขยะในหลุบฝังกลบขยะในประเทศไทย

พืชที่ใช้ทดลอง

พืชในตระกูล Dracaenaeae family และ Araceae family ได้แก่ ต้นพลูฉลุ (*Monstera oblique*, window leaf), ต้นพลูด่าง (*Scindapsus aureu,* Devils ivys), ต้นกวนอิม (*Draceana sanderiana*, Ribbon plant) และ ต้นวาสนา (*Draceana fragrance*, “ *Massangeana*”, corn plant)

สถานที่ทำการทดลอง

การทดลองในครั้งนี้ทำในห้องปฏิบัติการของภาควิชาวิทยาศาสตร์อนามัยสิ่งแวดล้อม คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และวิเคราะห์ปริมาณบิสฟีนอลเอโดยใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มแมนลิคิดโครมาโตกราฟีที่ศูนย์เครื่องมือกลางของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคัดแยกแบคทีเรียทำที่ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชนิดของพืช

การศึกษาครั้งนี้ใช้พืชอื่น ได้แก่ ต้นพลูฉลุ ต้นพลูด่าง ต้นวาสนา และต้นกวนอิมในการศึกษา โดยนำต้นกวนอิมมาจากตลาดนัดจตุจักร อายุของต้นกวนอิมที่เลือกใช้ในการศึกษา คือ ต้นกวนอิมอายุ 2 4 และ 6 เดือน ตามลำดับ

อายุต้นกวนอิม

อายุ 2 เดือน: ต้นกวนอิมที่มีความยาวประมาณ 30-40 เซนติเมตร มีใบ 10-12 ใบ และมีเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น 0.3-0.5 เซนติเมตร

อายุ 4 เดือน: ต้นกวนอิมที่มีความยาวประมาณ 45-50 เซนติเมตร มีใบ 12-14 ใบ และมีเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น 0.5-0.7 เซนติเมตร

อายุ 6 เดือน: ต้นกวนอิมที่มีความยาวประมาณ 60-65 เซนติเมตร มีใบ 10-11 ใบ และมีเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น 0.7-1.0 เซนติเมตร

วัสดุและอุปกรณ์

อุปกรณ์

1. Balance meter, AT-201, Switzerland
2. Autoclave, HA-240M, Hirayama, Japan
3. Hot air oven, Mammert, Germany
4. Desiccator, Auto-C series, Samplatec, Japan
5. Cool white fluorescence lamp
6. High Performance Liquid Chromatography with a diode array detector (HP 1100) at 221 nm using a reversed-phase column (Alltima C-18 Column 250x4.6 mm, Ligand Scientific Co., Ltd.)
7. Syringe filter (cellulose acetate): pore size 0.2 μm, diameter 13 mm, Chromtech, USA
8. Filter paper: pore size 0.45 μm, diameter 40 mm, Whattman GF/C
9. Deionized water
10. Micropipette 20, 200, 1000 μl, Gilson, France
11. Pipette tip
12. Syringe size 1.0 ml

13. Aluminum foil

เครื่องแก้ว

1. Erlenmeyer flask size 250 and 2000 ml
2. Volumetric flask size 25, 50, 100, 500 and 1000 ml
3. Beaker size 50, 100, 250, 500, 1000 and 2000 ml
4. Cylinder size 50 and 100 ml
5. Pipette size 1, 5 and 10 ml
6. Bottle lab W/Screw cap size 500 and 1000 ml, Schott Duran
7. Funnel
8. Dropper
9. Ram vial, Amber size 12x32 mm, Ligand Scientific Co., Ltd.

สารเคมี

1. Bisphenol A ($(CH_3)_2C(C_6H_4OH)_2$), Kishada Chemical Co., Ltd., Osaka , Japan
2. Acetonenitrite, HPLC grade, BDH Laboratory Supplies, England
3. Potassium dihydroxyl phosphate (KH_2PO_4), Merck Germany
4. Ortho-Phosphoric acid 85% GR ISO Merck, Germany
5. Nitric acid (HNO_3) 69%, BDH Laboratory Supplies, England
6. Sodium hydroxide (NaOH), Merck, Germany
7. Sulfuric acid (H_2SO_4), Merck, Germany
8. Methyl alcohol (MeOH), HPLC Grade, Merck, Germany
9. Ethyl alcohol (EtOH), HPLC Gread, Merck, Germany
10. Potassium Nitrate (KNO_3), Merck, Germany
11. Calcium nitrate tetrahydrate ($Ca(NO_3)_2.4H_2O$), Merck, Germany
12. Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4$.$7H_2O$), Merck, Germany
13. Iron (III) chloride hexahydrate ($FeCl_3.6H_2O$), Merck, Germany
14. Boric acid (H_3BO_3), Merck, Germany
15. Manganese (II) chloride tetrahygrate ($MnCl_2$ .4H2O), Merck, Germany
16. Zinc sulfate heptahydrate ($ZnSO_4.7H_2O$), Merck, Germany
17. Cupric sulfate pentahydrate ($CuSO_4$.$5H_2O$), Merck, Germany
18. $H_2MoO_4 2H_2O$
19. Bisphenol A ($(CH_3)_2C(C_6H_4OH)_2$), Kishada Chemical Co., Ltd., Osaka , Japan
20. Acetonenitrite, HPLC grade, BDH Laboratory Supplies, England

21. Potassium dihydroxyl phosphate (KH_2PO_4), Merck Germany
22. Ortho-Phosphoric acid 85% GR ISO Merck, Germany
23. Nitric acid (HNO_3) 69%, BDH Laboratory Supplies, England
24. Sodium hydroxide (NaOH), Merck, Germany
25. Sulfuric acid (H_2SO_4), Merck, Germany
26. Methyl alcohol (MeOH), HPLC Grade, Merck, Germany
27. Ethyl alcohol (EtOH), HPLC Gread, Merck, Germany
28. Potassium Nitrate (KNO_3), Merck,Germany
29. Calcium nitrate tetrahydrate ($Ca(NO_3)_2.4H_2O$), Merck, Germany
30. Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4$.$7H_2O$), Merck, Germany
31. Iron (III) chloride hexahydrate ($FeCl_3.6H_2O$), Merck, Germany
32. Boric acid (H_3BO_3), Merck, Germany
33. Manganese (II) chloride tetrahygrate ($MnCl_2$ .4H2O), Merck, Germany
34. Zinc sulfate heptahydrate ($ZnSO_4.7H_2O$), Merck, Germany
35. Cupric sulfate pentahydrate ($CuSO_4$.$5H_2O$), Merck, Germany
36. $H_2MoO_4 2H_2O$

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมพืช

นำต้นพืชประกอบด้วยต้นพลูฉลุ (*Monstera oblique*, window leaf) ต้นพลูด่าง (*Scindapsus aureu,* Devils ivys) ต้นกวนอิม (Draceana sanderiana, Ribbon plant) และ ต้นวาสนา (Draceana fragrance, " Massangeana", corn plant) มาล้างผ่านน้ำก๊อกเพื่อกำจัด ดิน ฝุ่นและโคลนออกให้หมด หลังจากนั้นเด็ดใบที่เป็นสีน้ำตาลออกจากต้นและล้างอีกครั้งด้วยน้ำกลั่น นำต้นไม้ไปเลี้ยงในโหลแก้วที่มีสารละลายอาหาร สูตรฮอกแลนด์ (Hoaglang's) ปริมาตร 2000 มิลลิลิตร ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์โดยให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และไม่ให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยทำการเปลี่ยนสารอาหารสัปดาห์ละ 1 ครั้ง จากนั้นนำต้นไม้ไปล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วชั่งน้ำหนักสดเริ่มต้นก่อนเริ่มนำมาใช้ทดลอง

2. การคัดเลือกพืชที่เหมาะสมในการอัพเทคบิสฟีนอลเอ

นำต้นพืชประกอบด้วยต้นพลูฉลุ (*Monstera oblique*, window leaf) พลูด่าง (*Scindapsus aureu,* Devils ivys) กวนอิม (Draceana sanderiana, Ribbon plant) และ ต้นวาสนา (Draceana fragrance, " Massangeana", corn plant) มาเพาะเลี้ยงเหมือนดังวิธีในข้อ 1 แต่ใส่น้ำกลั่นแทน สารละลายอาหารสูตรฮอกแลนด์และทดลองหาประสิทธภาพการกำจัดบิสฟีนอลเอที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลลาร์ เป็นระยะเวลา 8 วัน คำนวนหาความสามารถในการกำจัดบิสฟีนอลเอ และค่าการอัพเทค (*q*)

รูปที่ 1 แสดงการเตรียมต้นกวนอิมเพื่อใช้ในการทดลองในโหลแก้วที่มีสารละลายอาหาร สูตรฮอกแลนด์ ปริมาตร 2000 มิลลิลิตร ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ โดยให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

รูปที่ 2 แสดงการเลี้ยงต้นกวนอิมในสภาวะการทดลอง ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ โดยให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงและไม่ให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส)

3. การศึกษาการอัพเทคบิสฟีนอลเอโดยใช้พืช

นำพืชอายุ 4 เดือนน้ำหนักประมาณ 50 กรัม มาเลี้ยงในน้ำกลั่นที่มีบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์ ในสภาวะการทดลองที่ควบคุมความเข้มแสงที่เหมาะสม โดยให้แสง 1,200-1,300 ลักซ์ ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ ชนิด cool white เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (Photo period) ที่อุณหภูมิห้อง 28-30 องศาเซลเซียส เมื่อถึงเวลาที่กำหนด เก็บตัวอย่างที่เวลา 1 2 4 8 12 16 และ 20 วัน และทำการวัดบิสฟีนอลเอด้วยไฮ-เฟอร์ฟอร์เมนลิคิดโครมาโตกราฟฟี ทันทีหลังเก็บตัวอย่าง หรือ เก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสไม่เกิน 3-5 วัน ทำการกรองตัวอย่างด้วยที่กรองที่มี pore size 0.2 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวัดปริมาณบิสฟีนอลเอด้วยเครื่องเครื่อง ไฮเพอร์ฟอร์มแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี

หาการอัพเทคบิสฟีนอลเอโดยการคำนวณจากปริมาณบิสฟีนอลเอ ที่หายไปจาก สารละลาย ดังนี้

$$\text{ความสามารถในการ อัพเทค บิสฟีนอลเอ} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ BPA ตั้งต้น - ความเข้มข้นของ BPA ที่เหลือ}}{\text{ความเข้มข้น BPA ตั้งต้น}} \times 100\%$$

โดยคัดเลือกพืชที่สามารถอัพเทคบิสฟีนอลเอได้สูงเพื่อทำการทดลองศึกษาต่อไป

4. ผลของอายุต้นกวนอิมต่อความสามารถในการกำจัดบีพี เอ

นำต้นกวนอิมที่มีอายุ 2 4 และ 6 เดือนมา เลี้ยงในร้อยละ 50 ของสารลายอาหารสูตรฮอก-แลนด์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังจาก 4 สัปดาห์ ทำการล้างรากอย่างระมัดระวังด้วยน้ำกลั่นเป็นจำนวนมาก หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักต้นกวนอิมในแต่ละอายุให้ได้ 80 กรัม ซึ่งในแต่ละการทดลอง นำพืชใส่ในขวดแก้วที่บรรจุสารละลายบิสฟีนอลเอปริมาตร 400 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์ แล้วปิดปากขวดแก้วด้วยกระดาษฟอยล์ ซึ่งการทดลองทั้งหมดทำ 3 ซ้ำ โดยใช้อัตราส่วนของน้ำหนักพืชทั้งหมดกับปริมาตรของสารละลายบิสฟีนอลเอ เท่ากับ 80 กรัม ต่อ 400 มิลลิลิตร เลี้ยงต้นกวนอิม ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ โดยให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และไม่ให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เลี้ยงพืชทั้งหมดในสารละลายบิสฟีนอลเอที่มีความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 20 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 4 วัน โดยเก็บวันที่ 0 4 8 12 16 และ 20 แล้วเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการกรองตัวอย่างด้วยที่กรองที่มี pore size 0.2 ไมโครเมตร และใช้ปริมาตรบิสฟีนอลเอ 40 ไมโครลิตร สำหรับฉีดเข้าเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี เพื่อวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการกำจัดบิสฟีนอลเอ และความสามารถในการอัพเทคบิสฟีนอลเอ และทำการวัดพีเอชที่เปลี่ยนแปลงในระบบทุๆ 4 วัน โดยใช้เครื่องวัดพีเอช

5. ผล ของพีเอชที่เหมาะสมในการกำจัดต้นกวนอิม

นำต้นกวนอิมที่กำจัดบิสฟีนอลเอ ได้สูงสุด (ต้นกวนอิมอายุ 2 เดือน) เลี้ยงในขวดแก้วที่บรรจุสารละลายบิสฟีนอลเอ สังเคราะห์ ที่ค่าพีเอชต่างๆ คือ พีเอช 4 5 6 7 และ 8 โดยที่ค่าพีเอช 4 5 และ 6 ปรับพีเอชด้วย 0.1 M ของซิเตรตบัฟเฟอร์ และที่ค่าพีเอช 7 และ 8 ปรับพีเอชด้วย 0.1 M ของฟอสเฟส

บัฟเฟอร์ ปริมาตรของสารละลายบิสฟีนอลเอ 400 มิลลิลิตร ทำการปิดปากขวดด้วยกระดาษฟอยล์ ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ชนิด cool white ที่ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ ปรับให้มืด 12 ชั่วโมง และสว่าง 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันที่ 0 4 8 12 16 และ 20 นำสารละลาย ตรวจวัดความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโต-กราฟฟี แล้วนำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์กำจัดบิสฟีนอลเอ

6. ผลของความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอที่มีผลต่อความสามารถในกำจัดบิสฟีนอลเอ

เลือกต้นกวนอิมอายุ 2 เดือน ที่มีความสามารถในการกำจัดบิสฟีนอลเอได้สูงสุดมาทำการทดลองต่อ โดยนำต้นกวนอิมอายุ 2 เดือน เลี้ยงในสารละลายอาหารสูตรฮอกแลนด์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ แล้วล้างรากต้นกวนอิมด้วยน้ำกลั่น แล้วชั่งน้ำหนักต้นกวนอิมให้ได้ประมาณ 80 กรัม แล้วนำไปใส่ในขวดแก้วที่บรรจุสารละลายบิสฟีนอลเอที่มีปริมาตร 400 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้น 20 40 60 80 100 150 และ 200 ไมโครโมลาร์ ปิดปากขวดแก้วด้วยกระดาษฟอยล์ในระหว่างการทดลอง เป็นเวลา 20 วัน ทำการทดลองภายใต้สภาวะการทดลองที่เหมือนกัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 4 วัน และเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี ทำการกรองตัวอย่างด้วยที่กรองที่มี pore size 0.2 ไมโครเมตร และใช้ปริมาตรบีพีเอ 40 ไมโครลิตร สำหรับฉีดเข้าเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี เพื่อวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการกำจัดบิสฟีนอลเอและความสามารถในการอัพเทคบิสฟีนอลเอ ทั้งนี้ทำการวัดพีเอชที่เปลี่ยนแปลงในระบบทุๆ 4 วัน โดยใช้เครื่องวัดพีเอช

7. การเตรียมสารละลายอาหาร

ส่วนประกอบของสารละลายอาหาร สูตรฮอกแลนด์ ที่ใช้สำหรับเลี้ยงพืช ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสารเคมีของสารอาหารสูตร สูตรฮอกแลนด์ (1)

สารเคมี	กรัมต่อลิตร	ความเข้มข้น	ปริมาตร (มิลลิลิตร) ในสารละลายอาหาร (1 ลิตร
Macronutrients			
Stock A: KH_2PO_4	136.09	1M	1
Stock B: KNO_3	101.11	1M	5
Stock C: $Ca(NO_3)_2.4H_2O$	236.15	1M	5
Stock D: $MgSO_4.7H_2O$	246.48	1M	2
Stock E: $FeCl_3.6H_2O$	27.00	5 mg Fe/ml	1
Micronutrients			
H_3BO_3	2.86	0.5 mg B/ml	
$MnCl_2.4H_2O$	1.81	0.5 mg Mn/ml	
$ZnSO_4.7H_2O$	0.22	0.05 mg Zn/ml	1
$CuSO_4.5H_2O$	0.08	0.02 mg Cu/ml	
$H_2MoO_4.2H_2O$	0.02	0.01 mg Mo/ml	

สารละลายอาหารฮอกแลนด์สูตรเข้มข้นเตรียมโดยเติม 1 มิลลิลิตร ของ stock A 5 มิลลิลิตร ของ stock B 5 มิลลิลิตร ของ stock C 2 มิลลิลิตร ของ stock D 1 มิลลิลิตร ของ stock E และ 1 มิลลิลิตร ของไมโครนิวเทรียนท์ ในขวดวัดปริมาตรและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ร้อยละ50 ของสารละลายอาหารสูตรฮอกแลนด์เตรียมโดยเติม 500 มิลลิลิตรของสารละลายอาหารออกแลนด์สูตรเข้มข้น ใส่ในขวดวัดปริมาตรแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน และปรับพีเอชของสารละลายอาหารให้มีค่าพีเอช 6.0±0.05 ด้วย NaOH หรือ HNO_3

8. การเตรียมสารละลายบิสฟีนอล เอ

สารละลายบิสฟีนอล เอ

เตรียมสารละลายบิสฟีนอลเอ โดยเตรียมจากสต๊อคของสารละลายบิสฟีนอลเอ (ละลายในเอทานอล) ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยทำการเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ในแต่ละความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ

กลุ่มควบคุม

กลุ่มควบคุมทำการทดลองเหมือนกับสภาวะการทดลอง คือมีบิสฟีนอล เอแต่จะไม่มีพืช

แบลงค์

แบลงค์ทำการทดลองเหมือนกับสภาวะการทดลองแต่มีพืชไม่มีบิสฟีนอลเอ

9. การคำนวณ

ความสามารถในการกำจัดบิสฟีนอลเอ (%)

ความสามารถในการกำจัดบิสฟีนอลเอ คำนวณได้ตามสูตรนี้

$$\text{ร้อยละของการกำจัดบิสฟีนอลเอ} = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100$$

เมื่อ C_i : ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายบิสฟีนอลเอ (ไมโครโมลต่อลิตร)

C_f : ความเข้มข้นที่สมดุลของสารละลายบิสฟีนอลเอ (ไมโครโมลต่อลิตร)

ความสามารถในการอัพเทคบิสฟีนอลเอ

ความสามารถในการอัพเทคบิสฟีนอลเอ คำนวณได้ตามสูตรนี้

$$q = \frac{(C_i - C_f) \times V}{W}$$

เมื่อ q : ค่าการอัพเทคบิสฟีนอลเอ (ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)

C_i : ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายบิสฟีนอลเอ (ไมโครโมลต่อลิตร)

C_f : ความเข้มข้นที่สมดุลสารละลายของบิสฟีนอลเอ (ไมโครโมลต่อลิตร)

V : ปริมาตรของสารละลายบิสฟีนอลเอ (ลิตร)

W : น้ำหนักแห้งของต้นกวนอิม (กรัม)

10. การวิเคราะห์ บิสฟีนอลเอ ด้วย เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มแมนลิคิดโครมาโตกราฟี (HPLC)

การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์

นำตัวอย่างมากรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่องเพื่อป้องกันการอุดตันของ Column HPLC

การเตรียม Mobile Phase

การใช้ Mobile phase ที่ไม่ได้เป็น HPLC grade ต้องทำการกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ทั้งหมด รวมทั้งน้ำ deionized และ Methanol 50 มิลลิโมลลาร์ และ KH_2PO_4 พีเอช 2.5 ก่อนนำไปใช้

11. การคัดแยกแบคทีเรียจากรากพืช (plant-associated bacteria)

นำรากต้นกวนอิมมาคัดแยกแบคทีเรียโดยล้างรากต้นกวนอิมด้วยน้ำให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นก่อน นำมาวางบน จานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี บิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์เพื่อคัดแยกแบคทีเรีย และนำไปวางบน potato dextrose agar ที่มี บิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์ เพื่อคัดแยกเชื้อรา นำส่วนของอาหารเลี้ยงต้นไม้นำมา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสอง นำเชื้อที่แยกขึ้นบนจานเพาะเชื้อที่เป็น โคโลนีเดี่ยว ๆมาstreak บนจานเพาะเชื้อใหม่จนได้เชื้อบริสุทธิ์ ทำการแยก โครโมโซมมอลดีเอนเอ โดยใช้วิธีมาตรฐาน(2) และ บ่งชี้ (identify) โดยใช้ 16SrRNA gene sequence analysis ตามด้วย PCR amplification โดยใช้ primer 63f และ 1387r (3) ทำตามวิธีของ กองพลและวังใน (4) นำ PCR product มาโคลนใน pGEM-T easy vector (Promega, Madison, USA) และ ทำการ sequence (Macrogen, Seoul, Korea) ทำการวิเคราะห์ โดยใช้ BLAST searh program (5)

12. การวิเคราะห์ Extracellular exopolysaccharide mucilage (EPM) โดยใช้วิธี phenol-sulfuric acid

นำ Exopolysacchride ที่สร้างขึ้นโดยต้นกวนอิมมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธี phenol-surfuric acid โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารมาตรฐาน (6, 7) โดยนำ ตัวอย่างจากสารละลายปริมาณ 2 มิลลิลิตรมาผสมกับ 0.05 มิลลิลิตรของสารละลายฟีนอล ร้อยละ 80 และใส่กรดซัลฟูริคเข้มข้น 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรโดยใช้ spectrophotometer (DU800, Backman Coulter, USA)

13. การศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนไมโครสโคป

ตัดรากพืชให้มีขนาด 3x5x3 มิลลิเมตร และนำรากพืชที่มีเซลแบคทีเรียไปแช่ใน ร้อยละ 2.5 กลูทาราดิไฮด์ ใน 0.1 โมล ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 7.2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลสองครั้งด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ โดยล้างอย่างละ 10 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างมา dehydrate ด้วย เอทธานอลโดยเริ่มใช้ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 30 จนถึงสิ้นสุดที่ ร้อยละ 90 (อย่างละ 10 นาที) หลังจากนั้นนำตัวอย่างมา dehydrate 3 ครั้งด้วย absolute ethanol และ critical point drying ด้วยน้ำแข็งแห้ง (Balzer CPD020, Balzers AG, Liechtenstein) ทำการ mount บน metal stubs coated ด้วย gold-palladium (Ion sputter, Balzer CPD040, Balzers AG, Liechtenstein) และนำไปส่องด้วยกล้อง JEOL SEM, model JSM-5410LV (JEOL, Tokyo, Japan) ที่ 15 kV

14. ศึกษาความเป็นไปได้ในการกำจัดบิสฟีนอลเอในน้ำชะขยะ

ศึกษาคุณสมบัติของน้ำชะขยะ ทางกายภาพและเคมี รวมถึงกลิ่น สี Chemical oxygen demand (COD) Biological oxygen demand (BOD) Total solid (TS) Total dissolved solid (TDS) Total suspended solid (TSS) Total Kjelgahl nitrogen (TKN) โลหะหนักต่าง ๆ เช่น แคดเมียม ปรอท และ

ตะกั่ว โดยวิเคราะห์หาด้วยวิธีมาตรฐาน (8) และวิเคราะห์หาปริมาณของบิสฟีนอลเอด้วย ไฮเปอร์-ฟอร์มเมนลิคิวโครมาโตกราฟี (HPLC)

นำน้ำเสียมากรองด้วยกระดาษกรอง GF/C และกระดาษกรองเบอร์ 5 และทำการทดลองสองแบบ คือ แบบที่หนึ่งนำน้ำชะขยะมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 20 40 60 80 และ100 (ปริมาตรต่อปริมาตร) แบบที่สองตกตะกอนน้ำชะขยะด้วยอัลลัมน์ (alum) ร้อยละ 25 น้ำหนักต่อปริมาตร และนำสารละลายไปใช้ในการทดลองเพื่อเลี้ยงต้นกวนอิมเป็นเวลา 20 วัน ดังวิธีการทดลองเลี้ยงพืชดังกล่าวข้างต้น และนำสารละลายในขวดทดลองไปวัดปริมาณบิสฟีนอลเอที่เหลือด้วยไฮเปอร์ฟอร์มเมนลิคิวโครมา-โตกราฟี (HPLC)

ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. การคัดเลือกพืชที่เหมาะสมในการกำจัดบิสฟีนอลเอ

ทำการศึกษาการกำจัดบิสฟีนอลเอในพืช 4 ชนิด คือ ต้นกวนอิม (*Dracaena sanderina)* ต้นวาสนา (*Dracaena fragrans*) ต้นพลูด่าง (*Scindapsus aureus*) และต้นพลูฉลุ (*Monstera oblique*) โดยเลี้ยงในขวดแก้วที่มีสารละลายบิสฟีนอลเอความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 วัน พบว่าพืชสามารถโตได้ในสารละลายบิสฟีนอลเอ นำสารละลายไปวัดปริมาณบิสฟีนอลเอที่เหลือในสารละลายโดยเครื่องไฮเฟอร์ฟอร์มเมนลิคิวโครมาโตกราฟฟี พบว่า ต้นกวนอิม (*Dracaena sanderina*) สามารถกำจัดบิสฟีนอลเอได้สูงสุดที่ร้อยละ 86.93 และ 0.8960 ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และ ต้นวาสนา (*Dracaena fragrans*) กำจัดได้ต่ำสุดที่ร้อยละ 77.70 และ 0.0525 ไมโครโมลต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วน ต้นพลูด่าง (*Scindapsus aureus*) และ ต้นพลูฉลุ (*Monstera oblique*) กำจัดได้ใกล้เคียงกันที่ร้อยละ 82.79 และ 81.66 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 จากผลการทดลองพบว่าต้นกวนอิมกำจัดบิสฟีนอลเอได้ดีที่สุดจึงเลือก ต้นกวนอิมเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไปเนื่องจากเป็นพืชที่เลี้ยงง่าย โตเร็วและสามารถเลี้ยงได้ทั้งในดินและในน้ำจึงเหมาะกับการนำไปประยุกต์ใช้

ตารางที่ 2 การคัดเลือกพืชที่เหมาะสมในการกำจัดบิสฟีนอลเอ ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน

พืช	**บิสฟีนอลเอที่เหลือในสารละลาย (μM)**	**การกำจัดบิสฟีนอลเอ (%)**	**ความสามารถในการอัฟแทคบิสฟีนอล เอ (q; μM/g dry wt.)**
ต้นกวนอิม	2.52 ± 1.29	86.93 ± 5.93	0.8960 ± 0.0295
ต้นวาสนา	4.26 ± 1.40	77.70 ± 6.39	0.0525 ± 0.0080
ต้นพลูด่าง	3.22 ± 1.00	82.79 ± 6.13	0.6729 ± 0.0863
ต้นพลูฉลุ	3.44 ± 2.40	81.66 ± 13.28	0.7801 ± 0.1223

ค่า Relative growth rate

นำพืชที่เลี้ยงในสารละลายบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 วัน และคำนวนหาค่า relative growth rate ผลการทดลองพบว่าต้นกวนอิม (*Dracaena sanderina*) มีค่า relative growth rate สูงสุด ที่ 0.0159 และรองลงมาคือ ต้นพลูฉลุ (*Monstera oblique*) ที่ 0.0145 ต้นพลูด่าง (*Scindapsus aureus*) ที่ 0.0120 และ ต้นวาสนา (*Dracaena fragrans*) มีค่าต่ำสุดที่ 0.0011 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่า relative growth rate ของพืชนิดต่างๆ ที่เลี้ยงในบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 วัน

	Relative growth rate	
	Control unit	**Treatment unit**
ต้นกวนอิม	0.0219 ± 0.0020	0.0159 ± 0.0012
ต้นวาสนา	0.0024 ± 0.0030	0.0011 ± 0.0057
ต้นพลูด่าง	0.0121 ± 0.0002	0.0120 ± 0.0002
ต้นพลูฉลุ	0.0162 ± 0.0028	0.0145 ± 0.0021

2. การศึกษาปัจจัยต่าง ๆที่มีผลต่อการกำจัดบิสฟีนอลเอ

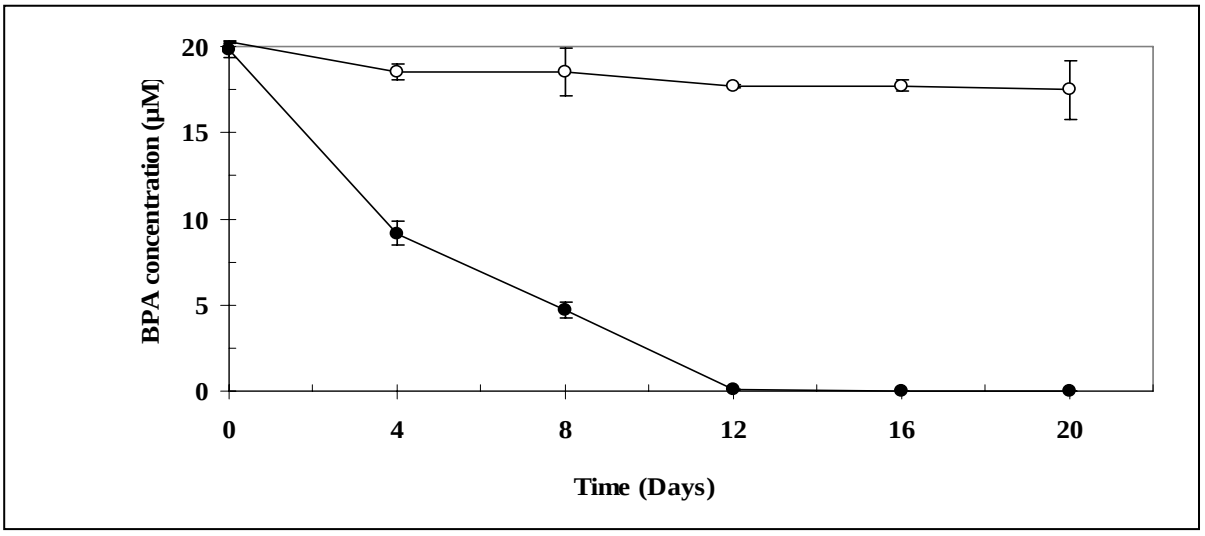
2.1 ผลของระยะเวลาที่สัมผัสต่อการกำจัดบิสฟีนอลเอในต้นกวนอิม

ทำการทดลองเลี้ยงต้นกวนอิม (*Dracaena sanderina*)ในสารละลายบิสฟีนอลเอ ที่ความเข้มข้น 20 40 60 80 100 200 และ 400 ไมโครโมลาร์ โดยทดลองในระยะเวลาสัมผัสต่างๆที่ 0 4 8 12 16 และ 20 วันพบว่าต้นกวนอิมสามารถกำจัดบิสฟีนอลเอจากความเข้มข้นบิสฟีนอลเอตั้งต้น 20 ไมโครโมลาร์ ลดลงเหลือ 9.17 ไมโครโมลาร์ ใน 4 วันและลดลงเหลือ 4.70 ไมโครโมลาร์ ในเวลา 8 วันและลดลงจนไม่สามารถวัดปริมาณได้ในวันที่ 16 ดังแสดงในรูปที่ 3

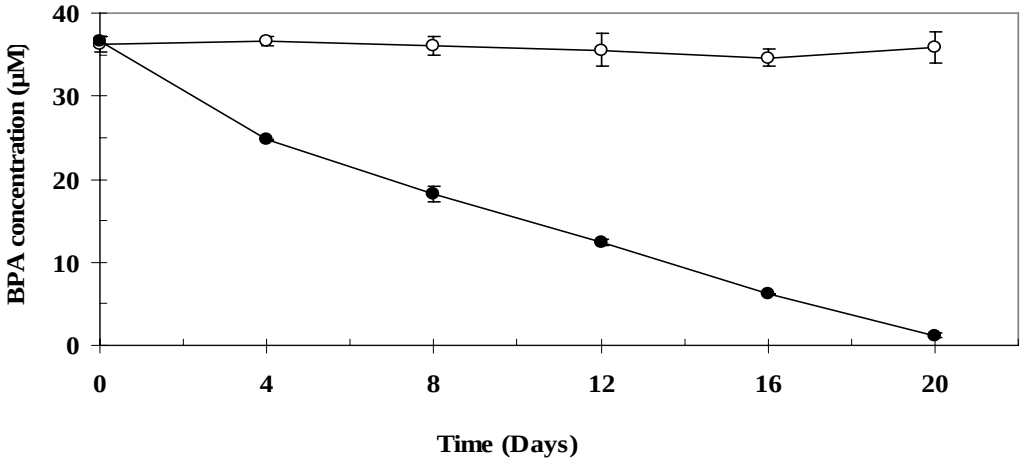
ที่ความเข้มข้นบิสฟีนอลเอตั้งต้น 40 ไมโครโมลาร์ ลดลงเหลือ 24.72 ไมโครโมลาร์ ใน 4 วันและลดลงเหลือ 18.20 ไมโครโมลาร์ ในเวลา 8 วัน 12.40 ไมโครโมลาร์ ในวันที่ 12 และลดลงจนไม่สามารถวัดปริมาณได้ดังรูปที่ 4 ที่ความเข้มข้นบิสฟีนอลเอตั้งต้น 60 ไมโครโมลาร์ ลดลงเหลือ 27.67ไมโครโมลาร์ ใน 4 วันและลดลงเหลือ 17.31 ไมโครโมลาร์ ในเวลา 12 วัน และลดลงเหลือ 13.44 ไมโครโมลาร์ ในวันที่ 20 ดังรูปที่ 5

ที่ความเข้มข้นบิสฟีนอลเอตั้งต้น 80 ไมโครโมลลดลงเหลือ 43.71 ไมโครโมลาร์ ใน 4 วันและลดลงเหลือ 41.73 36.16 34.64 ไมโครโมลาร์ ในวันที่ 8 12 16 ตามลำดับ ดังรูปที่ 6 และที่ความเข้มข้นบิสฟีนอลเอตั้งต้น 100 ไมโครโมลาร์ ลดลงเหลือ 59.04 ไมโครโมลาร์ ใน 4 วัน ลดลงเหลือ 54.14 ไมโครโมลาร์ ใน 12 วัน และค่อยๆลดลงเหลือ 46.67 ไมโครโมลาร์ ในวันที่ 16 และ 45.35 ไมโครโมลาร์ ในวันที่ 20

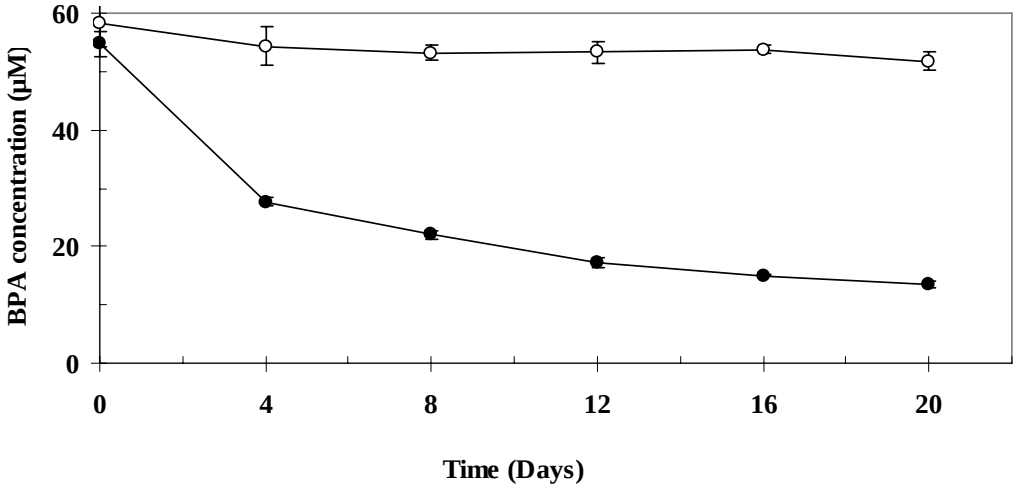
ตามลำดับดังรูปที่ 7 ผลการทดลองที่ความเข้มข้นบิสฟีนอลเอตั้งต้น 200 ไมโครโมลาร์ ลดลงเหลือ 165.32 ไมโครโมลาร์ ใน 4 วัน และลดลงเหลือ 144.70 ไมโครโมลาร์ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ดังรูปที่ 8 และที่ความเข้มข้นบิสฟีนอลเอตั้งต้น 400 ไมโครโมลาร์ ลดลงเหลือ 408.76 ไมโครโมลาร์ใน 4 วัน 381.31 ไมโครโมลาร์ในวันที่ 8 363.51 ไมโครโมลาร์ในวันที่ 12 355.10 ไมโครโมลาร์ในวันที่ 16 และ 354.10 ไมโครโมลาร์ ในวันที่ 20 ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 9



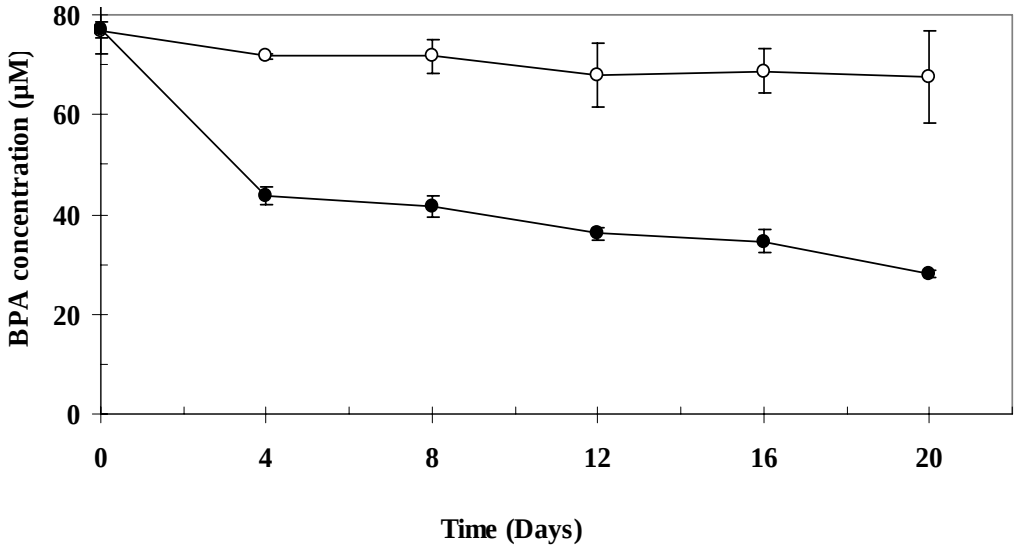
รูปที่ 3 แสดงความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอที่เวลาต่างๆที่ถูกกำจัดโดยต้นกวนอิม (●) และการทดลองควบคุม (○) ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 20 ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง โดยให้แสง 12 ชั่วโมง



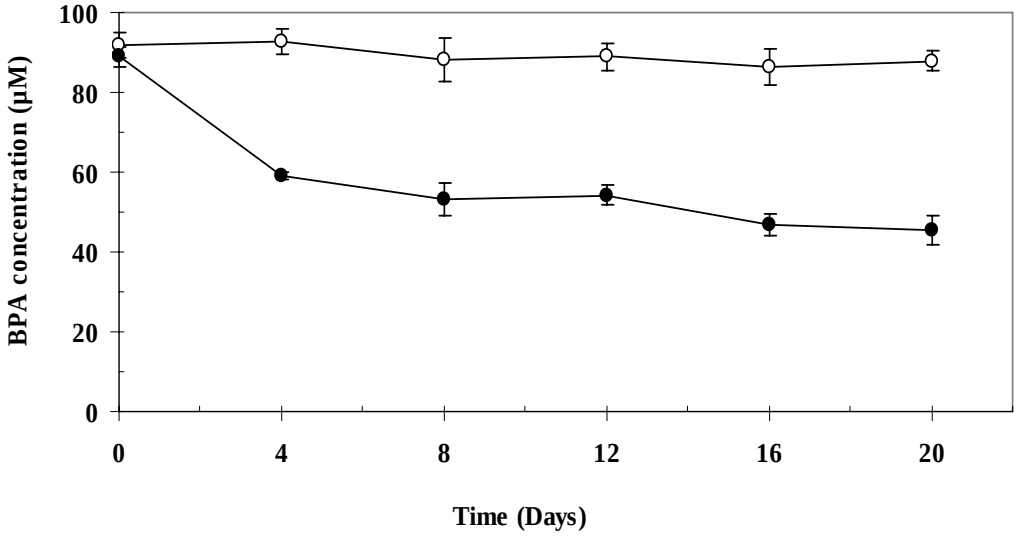
รูปที่ 4 แสดงความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอที่เวลาต่างๆที่ถูกกำจัดโดยต้นกวนอิม (●) และการทดลองควบคุม (○) ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 40 ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง โดยให้แสงที่ ความเข้มแสง ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ชนิด cool white โดยสลับการให้แสง 12 ชั่วโมง และ มืด 12 ชั่วโมง



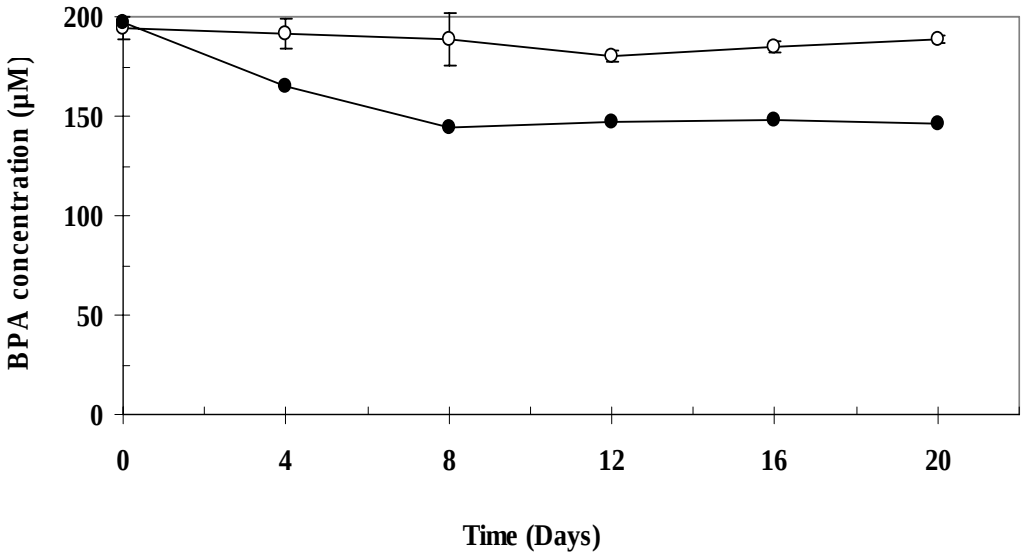
รูปที่ 5 แสดงความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอที่เวลาต่างๆที่ถูกกำจัดโดยต้นกวนอิม (●) และการทดลองควบคุม (○) ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 60 ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง โดยให้แสงที่ความเข้มแสง ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ชนิด cool white โดยสลับการให้แสง 12 ชั่วโมง และมืด 12 ชั่วโมง



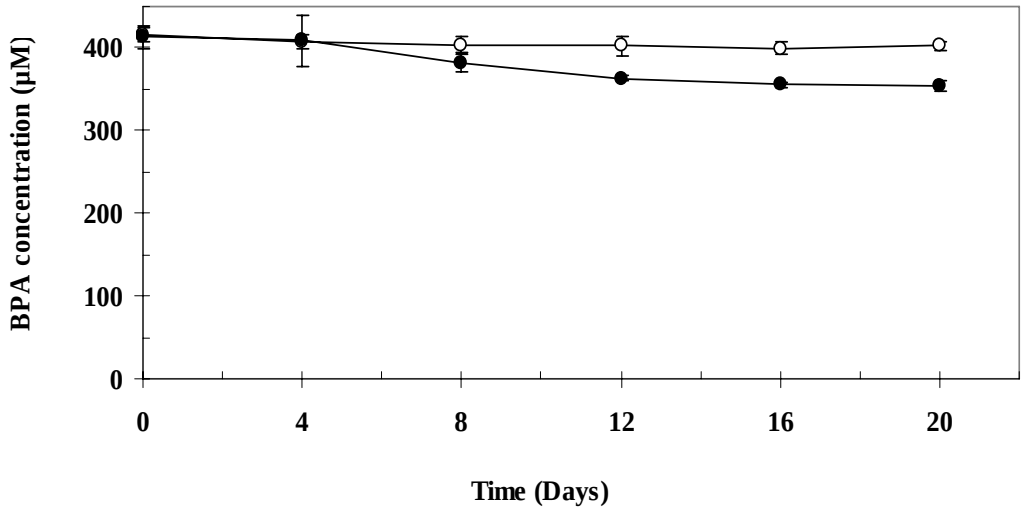
รูปที่ 6 แสดงความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอที่เวลาต่างๆที่ถูกกำจัดโดยต้นกวนอิม (●) และการทดลองควบคุม (○) ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 80 ไมโครโมลาร์ที่อุณหภูมิห้อง โดยให้ แสงที่ ความเข้มแสง ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ชนิด cool white โดยสลับการให้แสง 12 ชั่วโมงและมืด 12 ชั่วโมง



รูปที่ 7 แสดงความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอที่เวลาต่างๆที่ถูกกำจัดโดยต้นกวนอิม (●) และการทดลองควบคุม (○) ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 100 ไมโครโมลาร์ที่อุณหภูมิห้องโดยให้แสงที่ ความเข้มแสง ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ชนิด cool white โดยสลับการให้แสง 12 ชั่วโมงและมืด 12 ชั่วโมง



รูปที่ 8 แสดงความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอที่เวลาต่างๆที่ถูกกำจัดโดยต้นกวนอิม (●) และการทดลองควบคุม (○) ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 200 ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง โดยให้แสงที่ความเข้มแสง ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ชนิด cool white โดยสลับการให้แสง 12 ชั่วโมงและมืด 12 ชั่วโมง

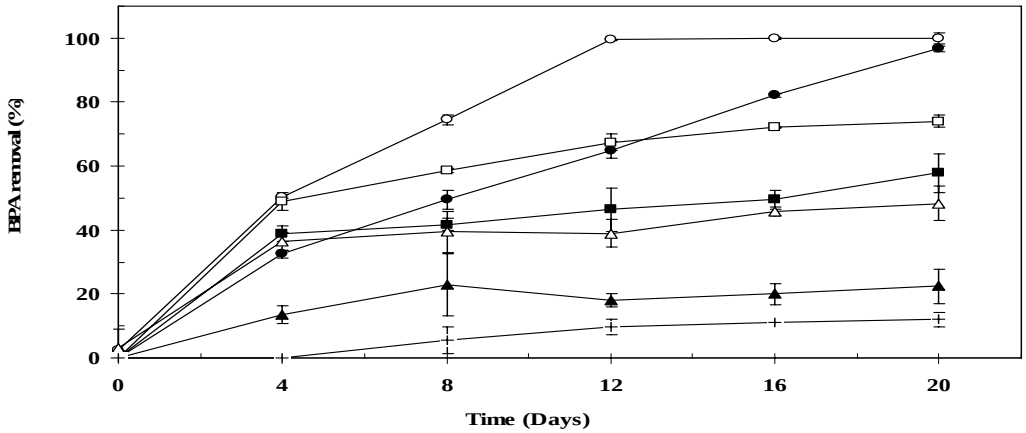


รูปที่ 9 แสดงความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอที่เวลาต่างๆที่ถูกกำจัดโดยต้นกวนอิม (●) และการทดลองควบคุม (○) ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 400 ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง โดยให้แสงที่ความเข้มแสง ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ชนิด cool white โดยสลับการให้แสง 12 ชั่วโมง และมืด 12 ชั่วโมง

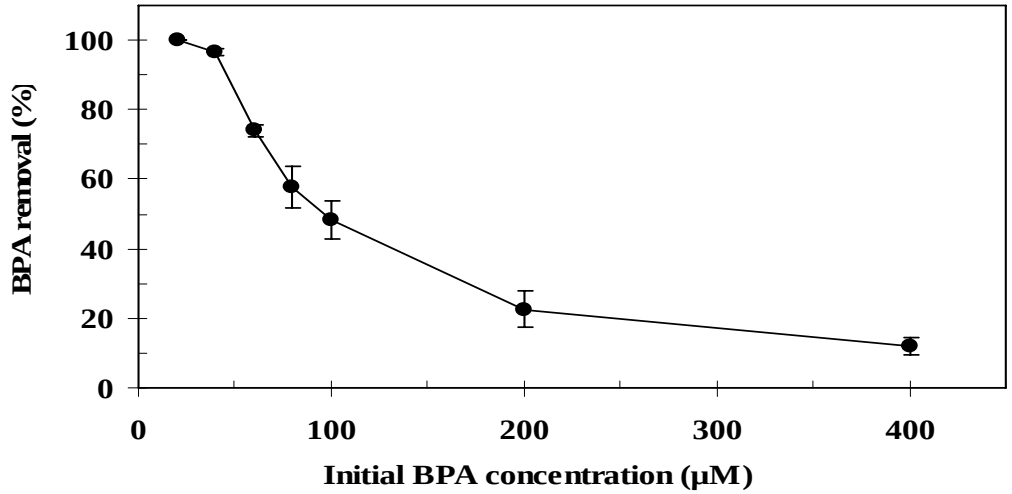
2.2 ผลของความเข้มข้นบิสฟีนอลเอเริ่มต้นต่อการกำจัดบิสฟีนอลเอในต้นกวนอิม

ทำการทดลองโดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอที่ 20 40 60 80 100 200 และ 400 ไมโครโมลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้นบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์ ต้นกวนอิมสามารถกำจัดบิสฟีนอลเอได้รวดเร็วถึงร้อยละ 50.44 ใน 4 วันและกำจัดได้สูงถึงร้อยละ 99.72 ได้ในเวลา 12 วัน และที่ความเข้มข้น

40 60 80 100 200 400 ไมโครโมลาร์ กำจัดได้ร้อยละ 74.02 100 57.86 22.41 11.99 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 10 และแสดงผลค่า บิสฟีนอลเออัพแทค ในตารางที่ 4



รูปที่ 10 แสดงการกำจัดบิสฟีนอลเอ โดยต้นกวนอิม ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอตั้งต้น 20 (○) 40 (●) 60 (□) 80 (■) 100 (Δ) 200 (▲) และ 400 (+) ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเข้มแสง 1200-1300 ลักซ์ ด้วย หลอดฟลูออเรสเซนต์ชนิด cool white โดยให้แสง 12 ชั่งโมงและมืด 12 ชั่วโมงสลับกัน



รูปที่ 11 ร้อยละของการกำจัดบิสฟีนอลเอ ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอต่างๆ ที่ 20 40 60 80 100 200 และ 400 ไมโครโมลาร์ ในเวลา 20 วัน

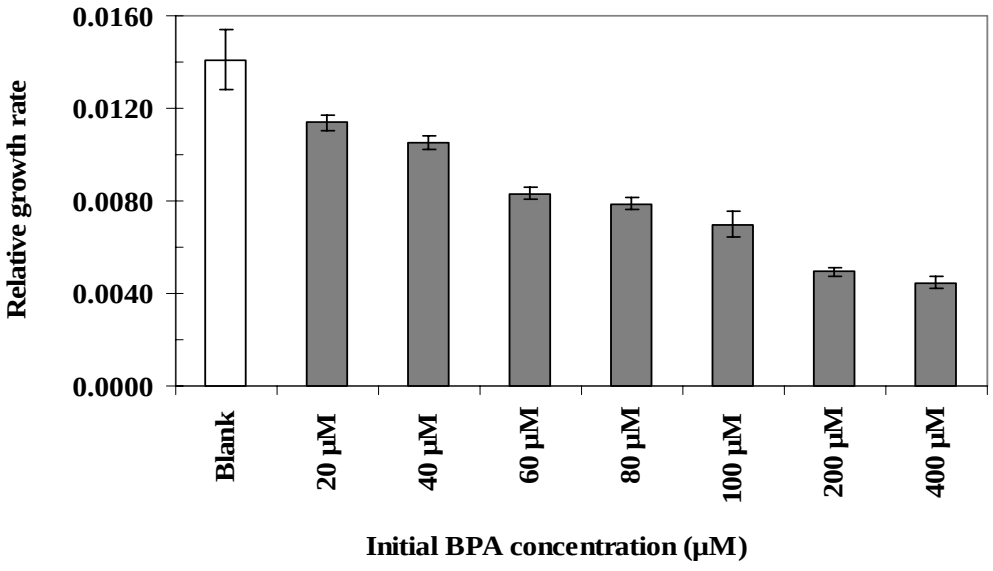
ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ 100 ไมโครโมลลาร์ ต้นกวนอิมสามารภกำจัดบิสฟีนอลเอได้เกือบร้อยละ 50 จากผลนี้พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอมากขึ้น จะมีผลทำให้การกำจัดลดลง ดังแสดงในรูปที่ 11

ตารางที่ 4 BPA uptake capacity (*q*; μM/g dry wt.) โดยต้นกวนอิม (*Dracaena sanderina*) ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 20 40 60 80 100 200 and 400 ไมโครโมลาร์

Initial BPA concentration (μM)	**BPA uptake capacity (*q*; μM/g dry wt.)**
20	0.7419 ± 0.0675
40	1.4950 ± 0.0853
60	1.7321 ± 0.1017
80	1.8034 ± 0.4213
100	1.9698 ± 0.2583
200	2.0454 ± 0.5063
400	2.3584 ± 0.4951

ผลของความเข้มข้นบิสฟีนอลเอเริ่มต้นต่อ relative growth rate ของต้นกวนอิม

ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอตั้งต้น 20ไมโครโมลาร์มีค่า relative growth rate สูงสุดที่ 0.0114 และที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอตั้งต้น 400ไมโครโมลาร์ มีค่า relative growth rate ต่ำสุดที่ 0.0045 จากผลการทดลองนี้แสดงว่าความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอที่สูงจะยับยั้งการเจริญของต้นกวนอิม (รูปที่ 12)

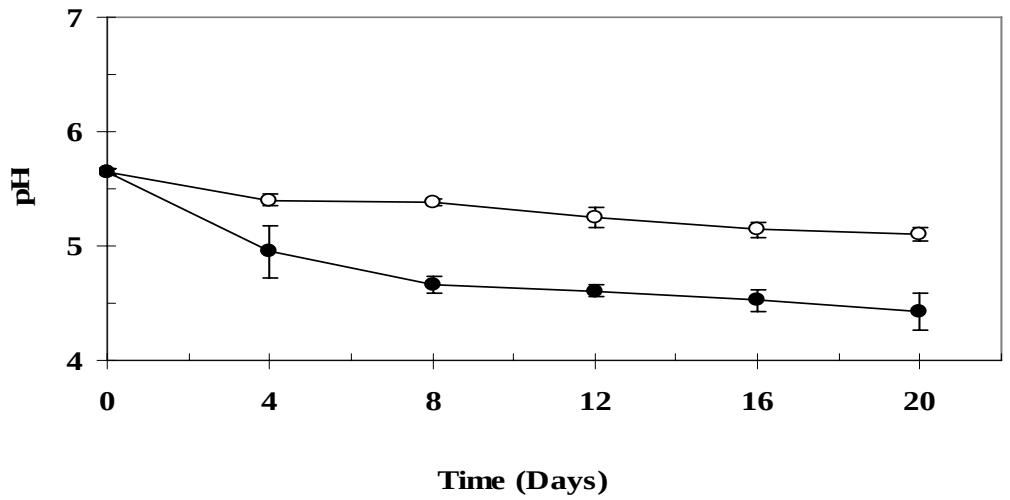


รูปที่ 12 ผลของความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอต่อ relative growth rate ของต้นกวนอิม

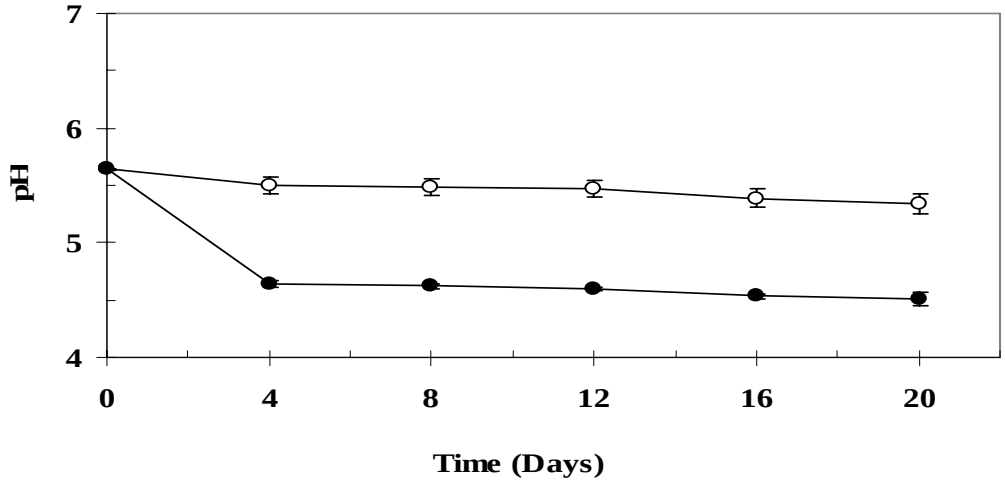
2.3 ผลของความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอเริ่มต้นต่อพีเอช

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของพีเอช ในความเข้มข้นเริ่มต้นของบิสฟีนอลเอต่างๆที่ 20 40 60 80 100 200 และ 400 ไมโครโมลาร์ เมื่อเลี้ยงต้นกวนอิมเป็นเวลา 20 วัน พบว่า พีเอชจะลงลงจากวันแรก

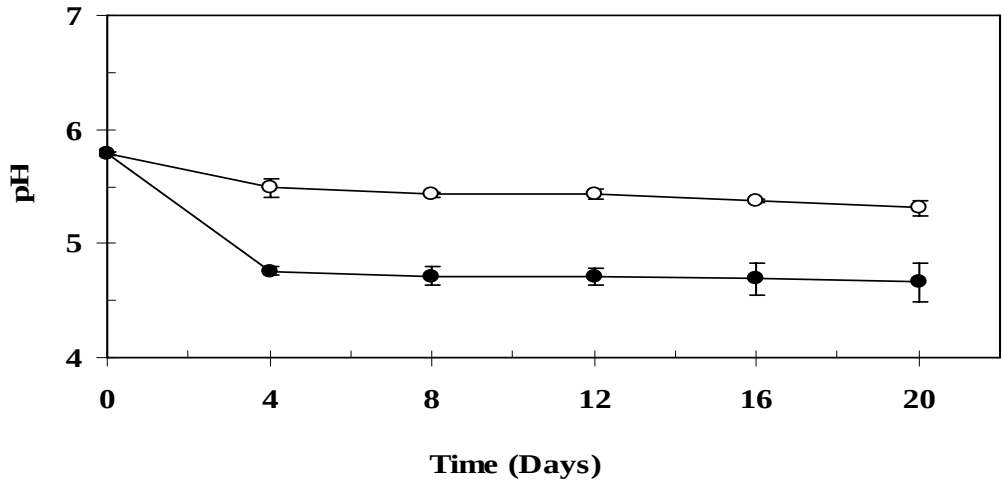
อย่างรวดเร็วใน 4 วันแรก และค่อยๆลดลงในวันที่ 8 12 16 และ 20 ไมโครโมลาร์ ดังแสดงในรูปที่ 13-15 ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 20 40 และ 60 ไมโครโมลาร์ ส่วนที่ความเข้มข้น 80 100 ไมโครโมลาร์ จะลดลงมากกว่า (รูปที่ 16 และ 17) และที่ความเข้มข้น 200 และ 400 ไมโครโมลาร์ พีเอชจะลดลงมากที่สุดในวันสุดท้ายของการทดลอง (รูปที่ 18 และ 19)



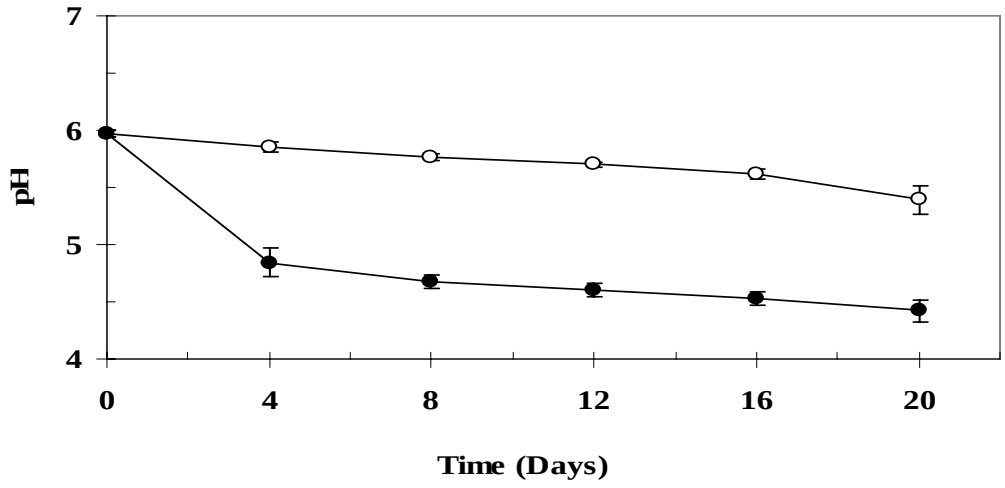
รูปที่ 13 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช เมื่อเลี้ยงต้นกวนอิมในบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์ (●) และการทดลองควบคุม (○)



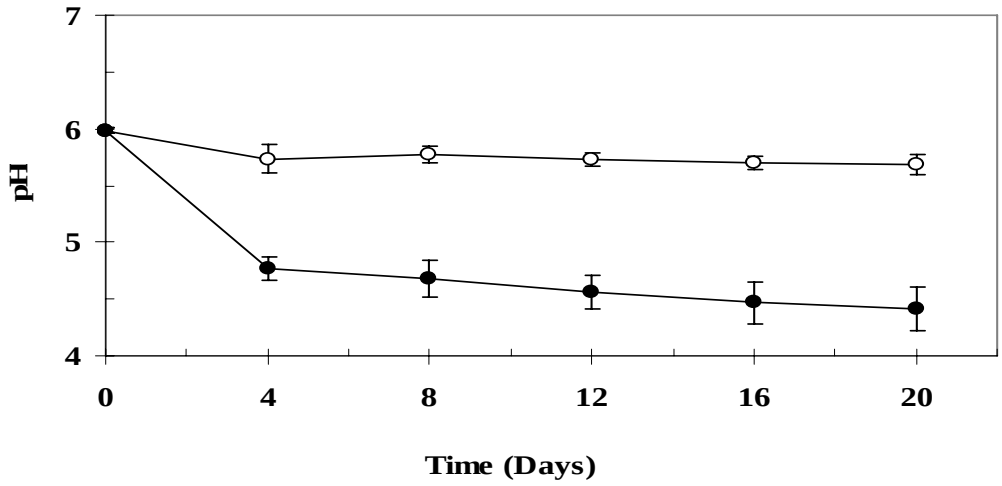
รูปที่ 14 การเปลี่ยนแปลงค่า พีเอช เมื่อเลี้ยงต้นกวนอิมในบิสฟีนอลเอ 40 ไมโครโมลาร์ (●) และการทดลองควบคุม (○)



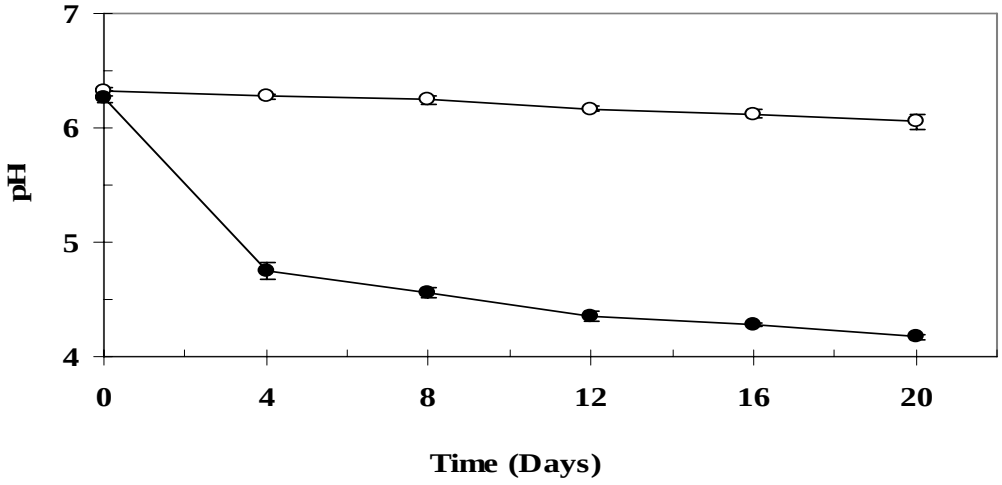
รูปที่ 15 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเมื่อเลี้ยงต้นกวนอิมในบิสฟีนอลเอ 60 ไมโครโมลาร์ (●) และการทดลองควบคุม (○)



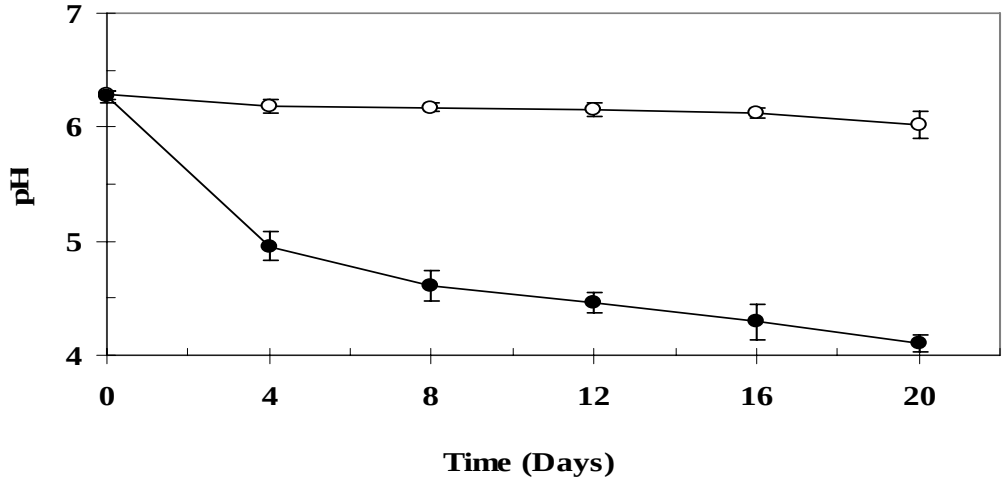
รูปที่ 16 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเมื่อเลี้ยงต้นกวนอิมในบิสฟีนอลเอ 80 ไมโครโมลาร์ (●) และการทดลองควบคุม (○)



รูปที่ 17 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเมื่อเลี้ยงต้นกวนอิมในบิสฟีนอลเอ 100 ไมโครโมลาร์ (●) และการทดลองควบคุม (○)



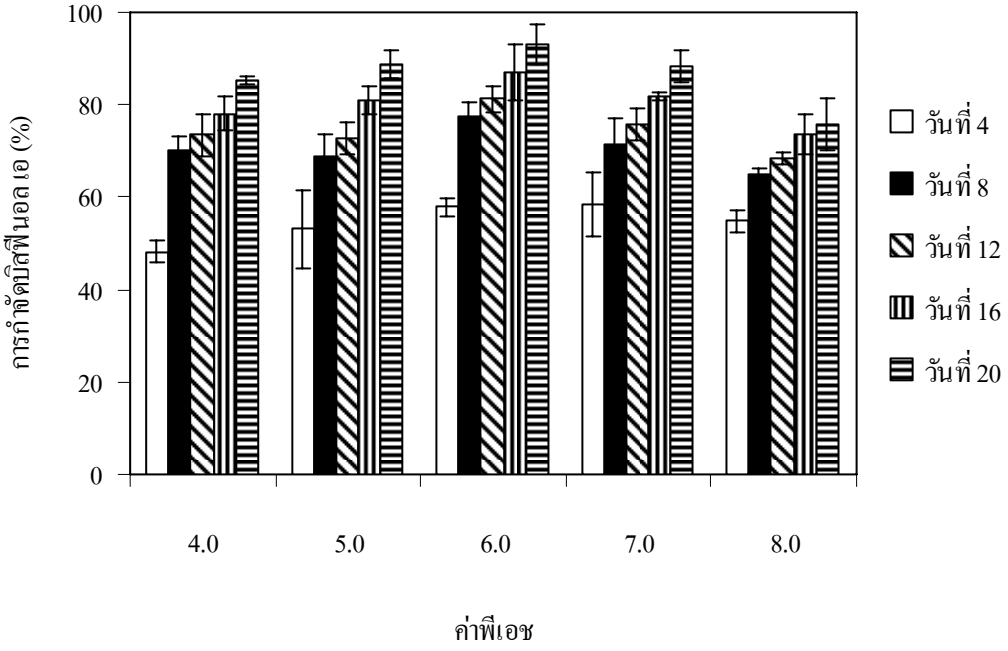
รูปที่ 18 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเมื่อเลี้ยงต้นกวนอิมในบิสฟีนอลเอ 200 ไมโครโมลาร์ (●) และการทดลองควบคุม (○)



รูปที่ 19 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเมื่อเลี้ยงต้นกวนอิมในบิสฟีนอลเอ 400 ไมโครโมลาร์ (●) และการทดลองควบคุม (○)

2.4 ผลของพีเอชต่อการกำจัดบิสฟีนอลเอ

พีเอชเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญมากซึ่งส่งผลต่อความสามารถในการกำจัดสารพิษของพืชในบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารพิษ (9) จากผลการศึกษาการกำจัดบิสฟีนอลเอโดยต้นกวนอิมที่ค่าพีเอชต่างๆ คือ พีเอช 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 20 วัน พบว่าที่ค่าพีเอช 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 ต้นกวนอิมอายุ 2 เดือนกำจัดบิสฟีนอลเอได้ร้อยละ 85 89 93 88 และ 76 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 20

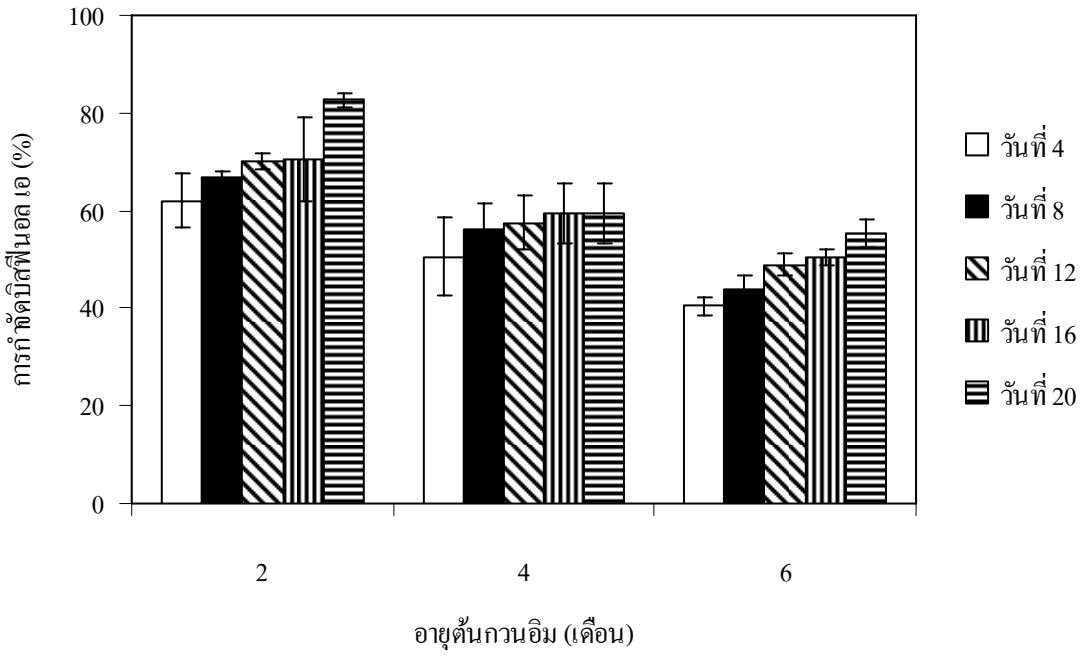


รูปที่ 20 การกำจัดบิสฟีนอลเอ ที่ค่าพีเอช 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์ ด้วยต้นกวนอิมอายุ 2 เดือน เป็นเวลา 20 วัน

ที่ค่าพีเอช 6.0 ต้นกวนอิมสามารถกำจัดบิสฟีนอลเอ ได้เกือบหมดจากสารละลาย ผลนี้สอดคล้องกับผลของ Imai และคณะ (9) พบว่าค่าพีเอช 6.0 มีความเหมาะสมต่อการกำจัดบิสฟีนอลเอด้วยต้นคุณนายตื่นสาย ที่ค่าพีเอช 5.0 และ 6.0 ต้นคุณนายตื่นสายกำจัดบิสฟีนอลเอ ได้สูงกว่าที่พีเอช 7.0 และ 8.0 ดังนั้นการกำจัดบิสฟีนอลเอ กำจัดได้ดีที่พีเอชเข้าใกล้ความเป็นกรดมากกว่าความเป็นด่าง การกำจัดบิสฟีนอลเอลดลงเมื่อพีเอชเข้าใกล้ความเป็นด่างอาจจะเนื่องมาจากกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการเมทาบอลิซึมของบิสฟีนอลเอ นอกจากนี้พืชทั่วไปที่ปลูกในระบบ hydroponic สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 5.5 ถึง 6.8 (10)

2.5. ผลของอายุต้นกวนอิมต่อการกำจัดบิสฟีนอลเอ

อายุพืชเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญที่ส่งผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืช (11) ซึ่งกระบวนการนี้เกี่ยวข้องกับหน้าที่และกิจกรรมของพืช เช่น กระบวนการทางชีวฟิสิกส์ กระบวนการเมททาบอลิซึม และกระบวนการเจริญเติบโตของพืช จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าต้นกวนอิมอายุ 2 เดือนกำจัดบิสฟีนอลเอ ได้สูงสุด ร้อยละ 83 ตามด้วยต้นกวนอิมอายุ 4 เดือน กำจัดบิสฟีนอลเอ ได้ร้อยละ 59 และต้นกวนอิมอายุ 6 เดือนกำจัดได้ร้อยละ 55 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 21 ซึ่งพบว่าใน 4 วันแรก ต้นกวนอิมมีความสามารถในการกำจัดบิสฟีนอลเอ ได้ลดลงอย่างรวดเร็วกว่าวันที่ 8 12 16 และ 20 ซึ่งต้นกวนอิมกำจัดบิสฟีนอลเอ ได้น้อยลง



รูปที่ 21 การกำจัดบิสฟีนอลเอ โดยอายุต้นกวนอิมอายุ 2 4 และ 6 เดือน ในสารละลายที่ความเข้มข้นของบิส ฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 20 วัน

จากผลนี้แสดงให้เห็นว่าต้นกวนอิมอายุน้อยกำจัดบิสฟีนอลเอ ได้สูงกว่าที่ต้นกวนอิมอายุมาก เนื่องจากลักษณะทางสรีรวิทยาของพืชจะเปลี่ยนแปลงไปตามอายุพืช ซึ่งมีอิทธิพลต่อการผลิตมวลชีวภาพ

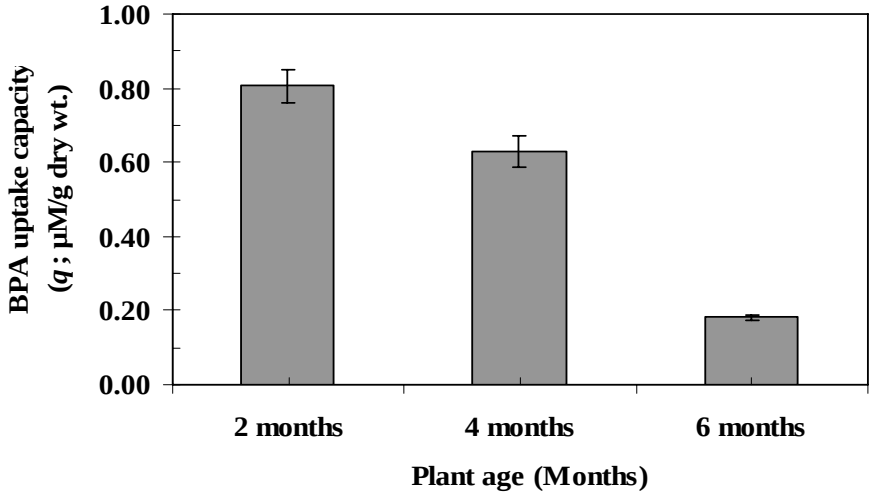
สารอาหาร และการสะสมสารปนเปื้อน เป็นต้น (12) ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Tu และคณะ(11) ที่พบว่าเฟิร์นอายุ 3 เดือนมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารหนูได้มากกว่าเฟิร์นอายุ 12 เดือน ซึ่งผลนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้พืชที่มีอายุน้อยและมีความแข็งแรงทำให้มีความสามารถในการกำจัดสารหนูได้มากกว่าพืชที่อายุมาก เนื่องจากว่าพืชที่อายุมากมีกิจกรรมทางสรีรวิทยาต่ำกว่าเมื่อเทียบกับพืชที่อายุน้อย ในทางตรงกันข้าม Knuteson และคณะ (13) พบว่าสาหร่ายญี่ปุ่น (Parrot feather) และต้นพุทธรักษา (Canna) อายุ 4 สัปดาห์มีความทนต่อสารซิมาซีน (simazine) เพิ่มขึ้นเมื่ออายุของพืชเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ชนิดของพืชที่ใช้ในกระบวนการ phytoremediation จะขึ้นอยู่กับความทนต่อสารพิษประเภทยาฆ่าแมลง ส่วนความสามารถในการอัพเทคบิสฟีนอล เอ ของต้นกวนอิม พบว่าต้นกวนอิมอายุ 2 เดือน สามารถอัพเทคบิสฟีนอลเอ ได้สูงกว่าที่อายุต้นกวนอิม 4 และ 6 เดือน ดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Tu และคณะ (11) พบว่าการอัพเทคสารหนูลดลงเมื่ออายุพืชเพิ่มขึ้น เนื่องจากพืชที่อายุมากมีกระบวนการทางเมทาบอลิกสูงกว่าและมีอัตราการผลิตมวลชีวภาพมากกว่า (12) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลของ Swaider และคณะ (14) และ Anti และคณะ (15) พบว่าอัตราการอัพเทคสารอาหารของต้นฟักทอง และอัตราการอัพเทคไนโตรเจนของต้นข้าวได้ช้ามากเมื่ออายุพืชเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 5 แสดงค่าการอัพเทคบิสฟีนอลเอ ที่อายุต่างๆ ของต้นกวนอิม ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์

อายุพืช (เดือน)	ค่าการอัพเทคบิสฟีนอลเอ (ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)
2	0.147±0.01
4	0.101±0.02
6	0.096±0.01

ผลของอายุของต้นกวนอิมต่อการกำจัดบิสฟีนอลเอ

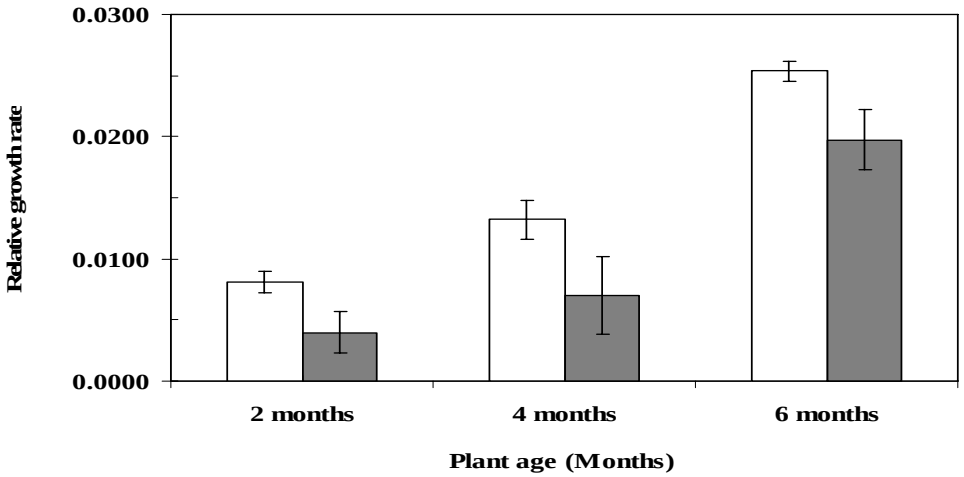
ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 22 พบว่าต้นกวนอิมอายุ 2 เดือนมีค่าการอัพแทคบิสฟีนอลเอสูงที่สุดที่ 0.8052 ไมโครโมลาร์ต่อกรัม น้ำหนักแห้ง และที่ 4 เดือนและ 6 เดือนที่ 0.6283 และ 0.1809 ไมโครโมลาร์ต่อกรัม น้ำหนักตามลำดับ



รูปที่ 22 การอัพแทคบิสฟีนอลเอสูง (กรัม;ไมโครโมลาร์/กรัม น้ำหนักแห้ง) ในต้นกวนอิมอายุ 2 4 และ 6 เดือน ที่บิสฟีนอลเอความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์เลี้ยงต้นกวนอิมเป็นเวลา 20 วัน

ผลของอายุพืชต่อ relative growth rate ของต้นกวนอิม

ผลการทดลองพบว่าในพืชอายุ 6 เดือนเมื่อเลี้ยงในสารละลายบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์ มีค่า relative growth rate สูงที่สุด ที่ 0.0198 และใน blank คือการทดลองเหมือนกันแต่เลี้ยงต้นกวนอิมในน้ำ deionized เท่ากับ ที่ 0.0254 และที่ 4 เดือนมีค่า relative growth rate เท่ากับ 0.0070 และ bank เท่ากับ 0.0132 และที่ 2 เดือนมีค่า relative growth rate เท่ากับ 0.0040 และ bank เท่ากับ 0.0081 ตามลำดับ (รูปที่ 23)



รูปที่ 23 ผลของอายุพืชต่อ relative growth rate ของต้นกวนอิม การทดลองควบคุม (□) และ ต้นกวนอิมที่ใส่บิสฟีนอลเอ (■) เลี้ยงในบิสฟีนอลเอความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์

การสะสมของบิสฟีนอลเอในต้นกวนอิม

ผลการศึกษาการสะสมของบิสฟีนอลเอในต้นกวนอิมพบว่า มีการสะสมที่รากมากที่สุด ที่ 0.743 ไมโครโมลาร์ และที่ใบและลำต้นเท่ากับ 0.0507 และ 0.0390 0.743 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การสะสมของบิสฟีนอลเอในต้นกวนอิม ที่เลี้ยงในบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 20 วัน

	การสะสมบิสฟีนอลเอ (ไมโครโมลาร์)	
	น้ำหนัก 0.1 กรัม	**น้ำหนักรวม**
ราก	0.0743 ± 0.0056	0.1286 ± 0.0110
ลำต้น	0.0390 ± 0.0018	2.0241 ± 0.1069
ใบ	0.0507 ± 0.0020	2.0525 ± 0.0711

การแสดงอาการเป็นพิษจากบิสฟีนอลเอของต้นกวนอิม

ทดลองเลี้ยงต้นกวนอิมที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ ที่ 20 40 60 ไมโครโมลาร์ ไม่พบอาการแสดงออกถึงความเป็นพิษด้วยตา แต่เมื่อเลี้ยงที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ 80 ไมโครโมลาร์เริ่มเห็นอาการใบเหลืองเกิดขึ้นจากการสังเกตด้วยตา

5. **ผลของความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอต่อการกำจัดบิสฟีนอลเอของต้นกวนอิมในสภาวะที่ปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ (Sterile and non-sterile hydroponic system)**

การศึกษาการกำจัดบิสฟีนอลเอด้วยต้นกวนอิมจากการสังเกตพบว่าที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ 20-60 ไมโครโมลาร์ ต้นกวนอิมมีลักษณะแข็งแรงดี ถึงแม้จะมีจุดดำๆเกิดขึ้นที่รากหลังเลี้ยงไปในระยะเวลา 4 วัน แต่เมื่อเลี้ยงที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอเพิ่มขึ้นที่ 80-200 ไมโครโมลาร์จะพบว่าเริ่มเกิดอาการเป็นพิษที่สังเกตได้จาก มีสีน้ำตาลที่ใบ มีจุดดำๆมากขึ้นที่ราก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าต้นกวนอิมสามารถทนทานต่อความเป็นพิษของบิสฟีนอลเอได้ในระดับหนึ่ง

ต้นกวนอิมสามารถอัพแทคบิสฟีนอลเอได้ประมาณ ร้อยละ 50 ของความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอเริ่มต้นที่ 20 ไมโครโมลาร์ใน 4 วันแรกของการทดลองในระบบที่ปราศจากเชื้อ (sterile hydroponic system) แต่ในการเลี้ยงในระบบ non-sterile พบว่าการกำจัดไม่ได้เกิดจากเพียงการอัพแทคของต้นกวนอิมแต่เกิดจากแบคทีเรียหรือสิ่งมีชีวิตอื่นๆที่เกี่ยวข้องด้วย (microbes associated with the plants) ดังแสดงในรูปที่ 24 หลังจากเลี้ยงไปได้ 20 วัน การกำจัดบิสฟีนอลเอ ทั้งหมดเกิดได้ถึง ร้อยละ 60 ในขณะที่การกำจัดในสภาวะที่มีแบคทีเรียด้วยสามารถกำจัดได้เพิ่มขึ้นถึง ร้อยละ 80 ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ ตั้งต้น 20 ไมโครโมลาร์

การกำจัดบิสฟีนอลเอเกิดได้เพิ่มขึ้นเนื่องจากการอัพแทคโดยต้นกวนอิมและการย่อยสลายของบิสฟีนอลเอโดยสิ่งมีชีวิตที่เกี่ยวข้อง (associating microbes) ซึ่งได้ทำการศึกษาความเกี่ยวข้องกันในระบบการทดลองที่เพิ่มความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอตั้งต้นดังแสดงในรูปที่ 25 ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ

ต่ำๆในสภาวะปกติที่ไม่ได้ปลอดเชื้อ (hydrophonic treatment) การกำจัดบิสฟีนอลเอจะสูง และจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอตั้งต้น จาก 20-200 ไมโครโมลาร์ ซึ่งสามารถกำจัดได้ ร้อยละ 50-25 ใน 4 วันแรก แต่หลังจากเลี้ยงไป 20 วันสามารถกำจัดได้เพิ่มขึ้นเป็น ร้อยละ 85-40 การกำจัดบิสฟีนอลเอทั้งในต้นกวนอิมและแบคทีเรียเกิดได้น้อยลงน่าจะเกิดจากความเป็นพิษของบิสฟีนอลเอ เนื่องจากความเข้มข้นบิสฟีนอลเอ ที่เพิ่มขึ้น จากผลในรูปที่ 25 จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าพืชหลายชนิดสามารถอัพแทคและทนทานบิสฟีนอลเอ ในระบบการเลี้ยงแบบไม่ปลอดเชื้อ (hydroponic system) มีการศึกษาการอัพแทคบิสฟีนอลเอในพืชที่ใช้บริโภค เช่น ข้าว (88 มิลลิโมล์) (16) *Ipomoea aquatica* (22 มิลลิโมล์) (17) และพืชที่ใช้ในการบริโภคเช่น *Rumex cripus* (176 มิลลิโมล์) (16) และ *Portulaca oleracea* (250 ไมโครโมล์) (18) ซึ่งจากสภาวะการทดลองที่แตกต่างกัน เช่น ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอตั้งต้น ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ และสัดส่วนของมวลพืชที่ใช้ทดลอง เป็นต้น ดังนั้นทำให้เป็นการยากที่จะนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบกัน จากผลการทดลองนี้ ต้นกวนอิมกำจัดบิสฟีนอลเอได้ร้อยละ 85 ในความเข้มข้นบิสฟีนอลเอ ที่ 20 ไมโครโมลลาร์และยังทนทานได้ดีรวมทั้งมีอัพแทคที่สูงซึ่งแสดงถึงศักยภาพในการที่นำมาใช้ในงานทาง การใช้พืชกำจัดทางชีวภาพ (Phytoremediation) ซึ่งในกระบวนการการกำจัดนี้เกิดขึ้นร่วมกันระหว่าต้นกวนอิมกับแบคทีเรียที่อยู่บริเวณรากของต้นกวนอิม

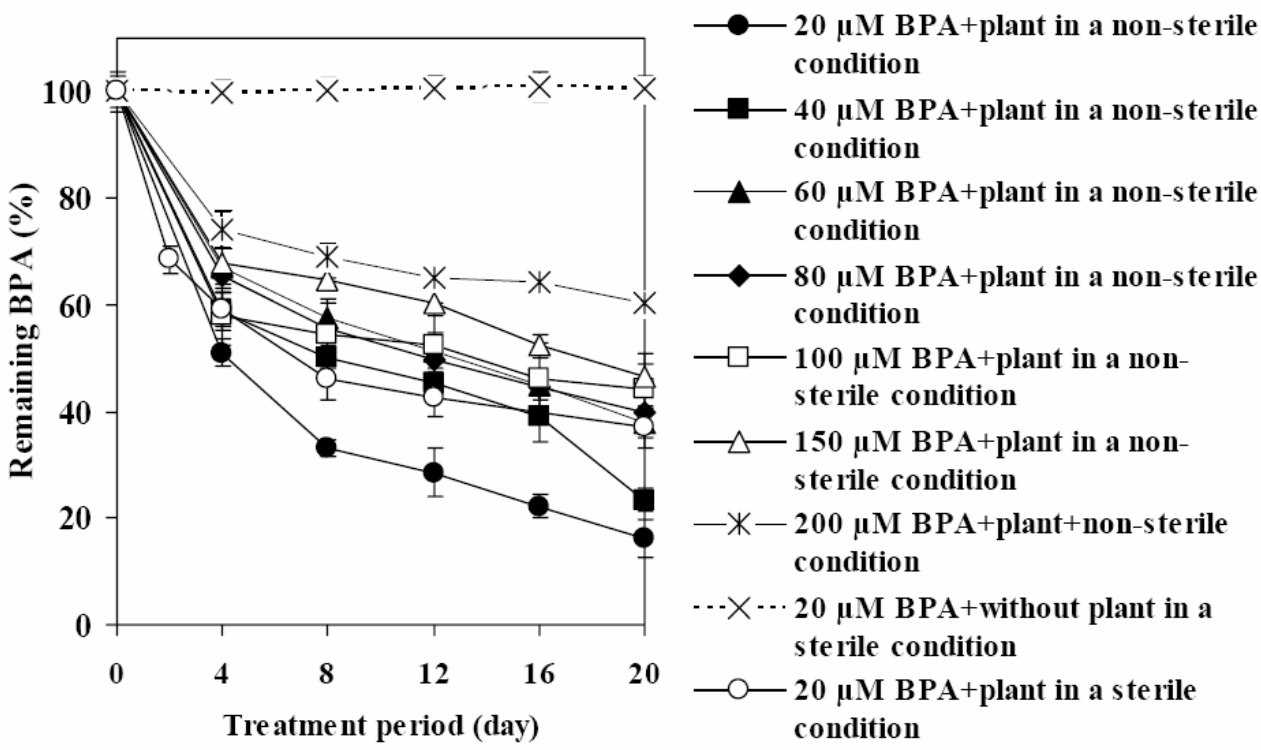


Fig. 1.

รูปที่ 24 การกำจัดบิสฟีนอลเอในhydrophonic system ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ 20 40 60 80 100 150 และ 200 ไมโครโมลลาร์

6. การศึกษาการอัพแทคและการสะสมบิสฟีนอลเอในต้นกวนอิม

เพื่อจะศึกษาว่าบิสฟีนอลเอเคลื่อนย้าย (translocation) ไปอยู่ในส่วนใดของพืช เช่น ในราก และลำต้น พบว่าน้อยกว่าร้อยละ 5 ของบิสฟีนอลเอดูดซับเข้าไปในรากและลำต้นของต้นกวนอิม โดยพบบิสฟีนอลเอในรากเท่ากับ 519.63±78.97 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักพืชทั้งหมด และในลำต้นเท่ากับ 790.87±105.51 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักพืชทั้งหมด ดังแสดงในรูปที่ 25 จากผลการทดลองมีบิสฟีนอลเออยู่ในสารละลายประมาณร้อยละ 19 (338.72 ± 0.14 ไมโครกรัมต่อลิตร บิสฟีนอลเอ) ซึ่งแสดงว่าต้นกวนอิมไม่ได้เมตาโบไลซ์ หรือเปลี่ยนรูปบิสฟีนอลเอ อย่างไรก็ตามต้นกวนอิมสามารถ อัพแทค เคลื่อนย้าย (translocate)และสะสมบิสฟีนอลเอได้ซึ่งศักยภาพเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ในงานทางไฟโตริมิดิเอชั่น

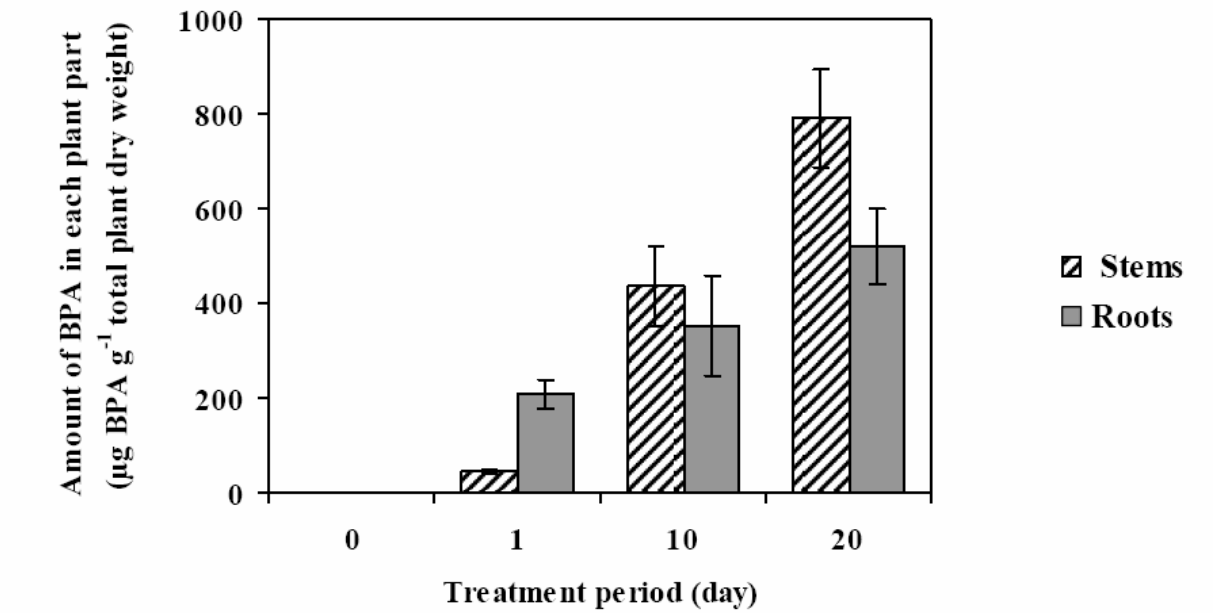


Fig. 2.

รูปที่ 25 แสดงการเคลื่อนย้าย (translocation) และการสะสมของบิสฟีนอลเอ ในต้นกวนอิมที่ระยะเวลาแตกต่างกัน

7. การหลั่งโพลีแซคคาร์ไรด์ (Polysaccharide) ของต้นกวนอิม

โพลีแซคคาร์ไรด์ เป็นส่วนสำคัญของพืชและสัตว์ โพลีแซคคาร์ไรด์เป็นคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน ประกอบไปด้วยโมโนแซคคาร์ไรด์หลายโมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิค (glycocidic bond) โดยทั่วไปโพลีแซคคาร์ไรด์ ในพืชก็คือแป้ง ซึ่งมีความสำคัญและเป็นแหล่งพลังงานแก่พืช (19) ชนิดของโพลีแซคคาร์ไรด์ ต่างๆ สามารถพบได้ในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ฟังไจ พืช และเนื้อเยื่อของสัตว์บางชนิด (20) ซึ่งในการศึกษาเรื่องกลไกในการกำจัดบิสฟีนอล เอ เบื้องต้นพบว่าในการกำจัดบิสฟีนอล เอ ของต้นกวนอิม

นี้เป็นการกำจัดร่วมกันกับแบคทีเรียที่ราก โดยจะเห็นสีดำของแบคทีเรียที่รากของต้นกวนอิม ชัดเจนและได้ทำการแยกแบคทีเรียเหล่านั้นเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างต้นกวนอิมและแบคทีเรียในการกำจัดบิสฟีนอลเอต่อไป (21)

จากผลการทดสอบต้นกวนอิมที่เลี้ยงในสารละลายบิสฟีนอล เอ เปลี่ยนจากสารละลายใสเป็นสีส้มเข้ม ดังแสดงในตารางที่ 7 ซึ่งผลนี้แสดงให้เห็นว่าต้นกวนอิมผลิตโพลีแซคคาร์ไรด์ออกมา เมื่อเทียบกับต้นกวนอิมที่เลี้ยงในน้ำที่ปราศจากไอออนเปลี่ยนจากสารละลายใสเป็นสีส้มอ่อน แสดงว่าเมื่อต้นกวนอิมสัมผัสกับบิสฟีนอล เอ จะไปกระตุ้นการหลั่งโพลีแซคคาร์ไรด์ออกมาเพื่อเป็นการป้องกันตัวเองจากพิษของบิสฟีนอล เอ อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่ได้ทำการวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดของโพลีแซคคาร์ไรด์ที่ต้นกวนอิมหลั่งออกมา Yoon และคณะ (22) พบว่าโพลีแซคคาร์ไรด์ จากต้นลดาวัลย์ *(Porana volubilis)* ประกอบด้วย กาแลคโตส (galactose) กาแลคโตโรนิค แอสิด (galacturonic acid) และแมนโนส (mannose) นอกจากนี้ Femenia และคณะ (23) พบว่าชนิดของโพลีแซคคาร์ไรด์ ส่วนใหญ่ในว่านหางจระเข้ (Aloe vera) ประกอบด้วย แมนโนส (mannose) และเซลลูโลสิค กลูโคส (cellulosic glucose)

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบสีด้วยวิธีฟีนอล ซัลฟิวริก เอซิด (Phenol Sulfuric acid)

ตัวอย่าง	ผลการทดสอบ
น้ำปราศจากไอออน	─
ต้นกวนอิมที่เลี้ยงในน้ำปราศจากไอออน ที่ไม่ใส่บิสฟีนอล เอ	+
น้ำแป้ง	+++
ต้นกวนอิมในสารละลายบิสฟีนอล เอ 20 ไมโครโมลาร์	++

─ : สารละลายไม่เปลี่ยนสี (สีใส)

+ : สารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้มอ่อน

++ : สารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้มเข้ม

+++ : สารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้มเข้มมาก

8. Plant-associated bacteria และการสร้าง Extracellular exopolysaccharide mucilage (EPM)

ในการทดลองเลี้ยงต้นกวนอิมพบว่าระหว่างที่เลี้ยงไป 4 วันสารอาหารที่เลี้ยงเริ่มขุ่นทั้งในระบบปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ (sterile and the non-sterile hydroponic system) ความขุ่นที่เกิดจากระบบปลอดเชื้อเกิดจากต้นกวนอิม secrete Extracellular exopolysaccharide mucilage **(**EPM) ออกมา ในสภาวะที่ไม่ปลอดเชื้อเกิดจากเชื้อแบคทีเรียและ EMP

นำสารละลายขุ่นมาแยกเชื้อในจานเพาะเชื้อที่มี half-strength Hoagland'ที่มี 20 ไมโครโมลลาร์บิสฟีนอลเอ ซึ่งสามารถแยกแบคทีเรียได้ 6 ชนิด ใช้ชื่อว่า BPR1 BPR7 BPW4 BPW5 BPW6 และ BPW10 และไม่พบเชื้อราในระหว่างการแยก นำมาศึกษาความสามารถในการกำจัดบิสฟีนอลเอจากแบคทีเรียแต่ละชนิด พบว่าBPW4 เจริญได้ดีที่สุดและ BPR7 เจริญได้ต่ำสุด ดังรูปที่ 26a พบว่าจากทั้ง 6

สายพันธุ์นี้ BPR1 BPW4 และ BPW5 มีความสามารถในการย่อยสลายสูง หลังการบ่มเลี้ยง 20 วันพบว่าสามารถย่อยบิสฟีนอลเอได้เท่ากับ 93±2 60±2 96±2 ตามลำดับ (ดังรูปที่ 26b)

จากการทำ The 16s rRNA sequence analysis ของ BPR1 พบว่าเป็น Gram-negative *Enterobacter* sp. BPW4 เป็น Gram-positive *Bacillus cereus* ซึ่งจากการศึกษาการเจริญเติบโตในอาหาร half-strenght Hoagland's ที่มีบิสฟีนอลเอ พบว่ามี lag phase สั้นและมีstationary phase สั้น การที่มี lag phase สั้นนั้นเกิดจาก acclimatization ก่อนการบ่มเชื้อ (24) จากการศึกษานี้พบว่า *Enterobacter* sp. สายพันธุ์ BPR1 และสายพันธุ์ BPW5 และ B. cereus สายพันธุ์ BPW4 มีการตอบสนองต่อบิสฟีนอลเอเร็วกว่าโดยมีช่วง lag phase ที่สั้น จากรายงานการศึกษาที่พบช่วง stationary phase ที่สั้นในระหว่างการกำจัดบิสฟีนอลเอพบใน *Achromobacter xylosoxidans* สายพันธุ์ B-16 (24) และใน *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ BP-7 (25) ซึ่งเกิดจากการสะสมของintermediates ที่เป็น สารพิษ (toxic intermediate) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษานี้เพราะว่าไม่พบ intermidiate ในระหว่างการย่อยสลายบิสฟีนอลเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ BPR1 BPW4 หรือ BPW5 การเกิด stationary phase ที่สั้นเกิดจากการจำกัดของแหล่งคาร์บอน การเจริญของแบคทีเรียจะลดลง ภายหลัง 10 วันโดยที่มีบิสฟีนอลเอเหลือต่ำกว่าร้อยละ 20 ของความเข้มข้นบิสฟีนอลเอเริ่มต้น (BPR1 และ BPW5) หรือเมื่อบิสฟีนอลเอไม่ย่อยสลายอีกต่อไป ดังรูปที่ 27b มีรายงานว่า BPA-degrading bacteria ได้แก่ *Pseudonomas paucimobilis* สายพันธุ์ Fj-4, B-16 *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ AO1 และ *Pseudomonas xylosoxidas* สายพันธุ์ B-16 (25, 26, 27) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า unidentify Gram-negative bacteria สายพันธุ์ MV1 และ WH1 สามารถใช้บิสฟีนอลเอเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน

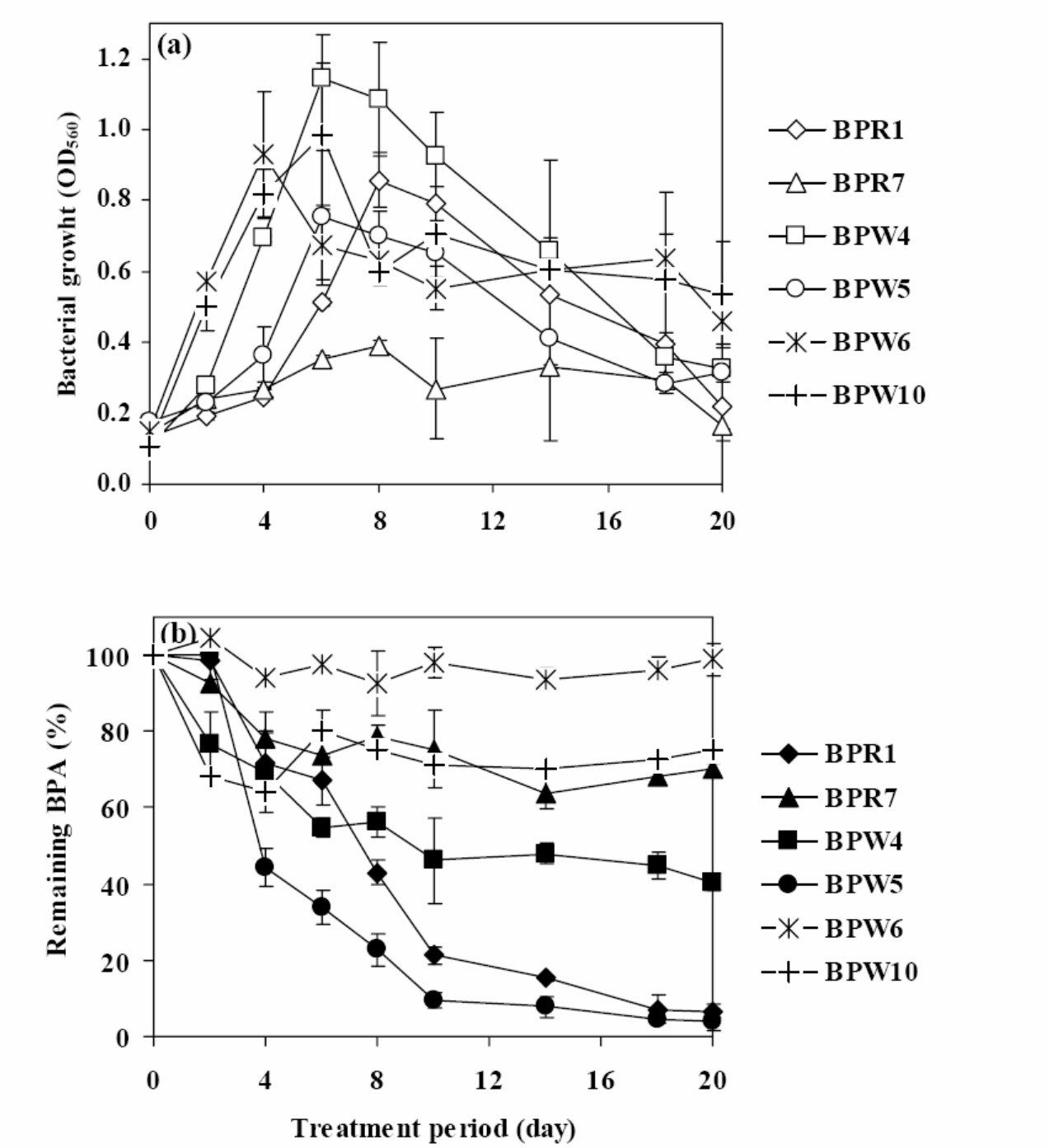


Fig. 3.

รูปที่ 26 แสดงการเจริญและของแบคทีเรียที่เลี้ยงใน half-strength Hoagland's nutrient hydroponic treatment ที่มี บิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์ (a) การเจริญของแบคทีเรีย (b) คือบิสฟีนอลเอที่เหลือ

ศึกษาการเกิด Extracellular exopolysaccharide mucilage (EPM) ในต้นกวนอิมที่เลี้ยงในบิสฟีนอลเอ พบว่าปริมาณของ EPMจะสูงกว่าเมื่อเลี้ยงพืชในสภาวะที่มีแบคทีเรียดังรูปที่ 26 a ซึ่งต้นกวนอิมอาจจะ secret EPM เพื่อเป็นกลไกการป้องกันตนเองของต้นกวนอิมจากความเค้นจากสิ่งแวดล้อม (environmental stresses) เช่น สารพิษ เป็นต้น และพบว่าplant-associating bacteria มีจำนวนมากเมื่อมีบิสฟีนอลเอ

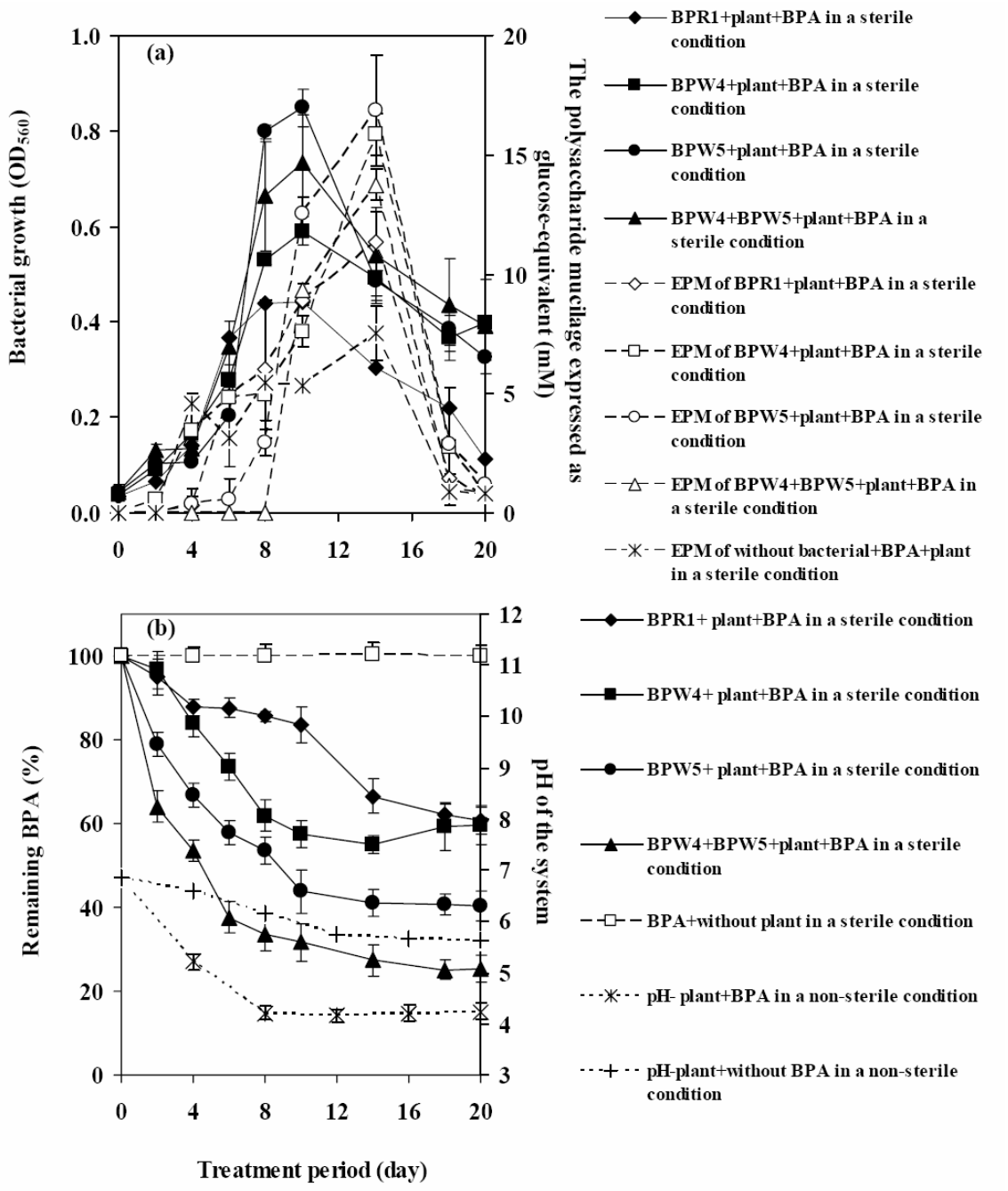


Fig. 4.

รูปที่ 27 แสดงการกำจัดบิสฟีนอลเอของต้นกวนอิม ใน half-strength Hoagland's nutrient-hydroponic system ที่มีบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์และแบคทีเรีย (BPR1, BPW4 และ BPW5) (a) การเจริญของแบคทีเรียและ Extracellular exopolysaccharide mucilage (EPM) (b) บิสฟีนอลเอที่เหลือในสารละลายและพีเอชของระบบ

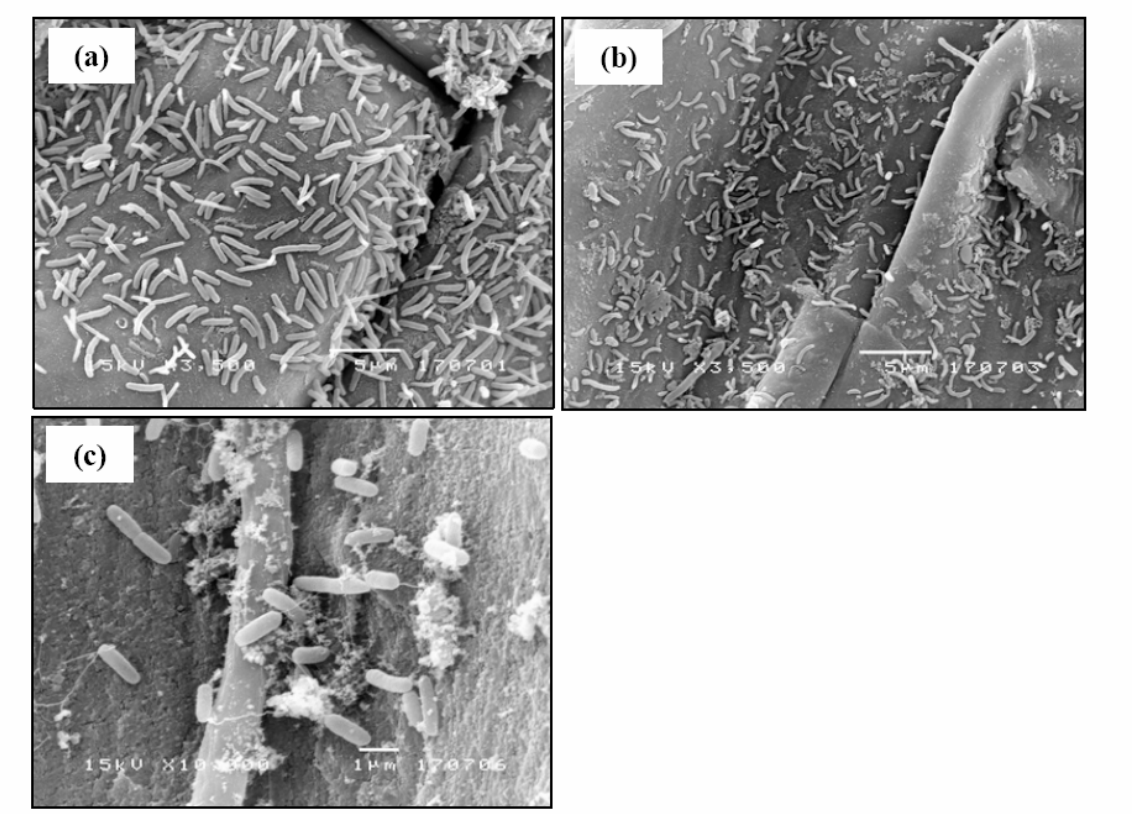


Fig. 5.

รูปที่ 28 ภาพจากกล้องอิเลคตรอนไมโคสโคป แสดงแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 (a) *Enterobacter* sp. strain BPW5 (b) และเชื้อผสม (c) บนรากของต้นกวนอิมที่เลี้ยงเป็นเวลา 10 วันใน half-strength ของสารละลาย Hoagland's ที่มีบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์

9. การกำจัดบิสฟีนอลเอโดยต้นกวนอิมและแบคทีเรียที่รากต้นกวนอิม

การเกิด bioaugmentation ของplant-associating bacteria จะมีผลต่อการเจริญของต้นกวนอิมแตกต่างกัน BPR7, BPW6 และ BPW10 ที่ร้อยละ 1 ปริมาตรต่อปริมาตรของ inoculation หรือประมาณ 10^6 CFU จะทำมีผลต่อต้นกวนอิมทำให้มีสภาวะไม่ปกติ ใบจะเหยี่ยว หงิกงอและมีสีออกน้ำตาลเหลือง รากจะมีจุดสีดำใน 2 วัน

การศึกษาพบว่า BPR1 มีการเจริญสูง (รูปที่ 26a) และพบว่ามีการกำจัดบิสฟีนอลเอน้อย ดังรูปที่ 26a และ 26b และเมื่อ BPR1 มีการเจริญต่ำก็ทำให้การย่อยสลายบิสฟีนอลเอต่ำลงด้วยเนื่องจาก พี่เอชต่ำลงเพราะเกิด EPM ดังรูปที่ 26b แต่เมื่อเลี้ยงในระบบ hydroponic ที่มีต้นกวนอิมพบว่าการเจริญกลับต่ำดังผลในรูปที่ 27aและ b

ลักษณะที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของแบคทีเรียในการเกิด ไฟโตริมิดิเอชั่นคือความสามารถในการเกิด colonization ที่ผิวของราก (28) การเกิด colonization ในพืชแต่ละชนิด ในรูปที่ 28 จากกล้องอิเลคตรอนแสดงการเกิดของ plant-associating Enterobacter sp. สายพันธุ์ BPW5 และ *B. cereus* สายพันธุ์ BPW4 บนรากของต้นกวนอิมเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน พบว่า *Enterobacter* sp. สายพันธุ์ BPW5 หรือ *B. cereus* สายพันธุ์ BPW4 ในเชื้อผสมเกิดการ colozize บนรากต้นกวนอิมและช่วยทำให้เกิดการกำจัดบิสฟีนอลเอ

ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานหลายเรื่องว่ามีส่วนช่วยพืชในการกำจัดสารพิษในสิ่งแวดล้อม (28-31)

10. การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ต้นกวนอิมกำจัดบิสฟีนอลเอในน้ำชะขยะ

วิเคราะห์น้ำชะขยะที่นำมาทดลองพบว่า มีกลิ่น และน้ำมีน้ำตาลดำ พีเอชเท่ากับ 7.72 COD เท่ากับ 92,398 มิลลิกรัมต่อลิตร BOD เท่ากับ 26,400 มิลลิกรัมต่อลิตร TS 48,024 มิลลิกรัมต่อลิตร TDS 47,635 มิลลิกรัมต่อลิตร TSS 380 มิลลิกรัมต่อลิตร TKN 2889 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนโลหะหนัก ไม่พบ ปรอท และพวกตะกั่วเท่ากับ 0.28 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำชะขยะที่นำมาจากโรงงานแห่งหนึ่งนี้พบบิสฟีนอลเอเท่ากับ 169 ไมโครโมลลาร์

นำน้ำชะขยะมาเลี้ยงต้นกวนอิมเป็นเวลา 20วัน พบว่าต้นกวนอิมสามารถอยู่รอดได้ และพบลักษณะอาการจากการเกิดพิษ ในน้ำชะขยะที่เจือจางจากร้อยละ 20-40 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และเหลือบิสฟีนอลเอในสารละลายเท่ากับ 34-68 ไมโครโมลลาร์ซึ่งสามารถกำจัดได้มากกว่า ร้อยละ 60 จากผลการทดลองนี้แสดงว่าสารพิษชนิดอื่นๆที่มีในน้ำชะขยะอาจจะมีผลกับต้นกวนอิม และทำให้ความสามารถในการกำจัดบิสฟีนอลเอลดลง หลังจากเมื่อเลี้ยงไปได้ 10 วัน นำรากต้นกวนอิมมาแยกแบคทีเรีย ที่ราก

การทดลองที่นำ น้ำชะขยะมาตกตะกอนด้วยอัลลัมน์ ก่อนแล้วนำมาเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน พบว่าบิสฟีนอลเอลดลงเหลือ 82.30 ไมโครโมลาร์ และต้นกวนอิมกำจัดบิสฟีนอลเอได้ ร้อยละ 36 และต้นกวนอิมยังสามารถรอดชีวิตได้ ดังรูปที่ 29 a-b ดังนั้นจึงมีความเป้นไปได้ที่จะใช้ต้นกวนอิมเป็น secondary treatment ในการกำจัดบิสฟีนอลเอ

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าต้นกวนอิมสามารถกำจัดบิสฟีนอล เอ จากน้ำเสียอุตสาหกรรมได้น้อย เนื่องมาจากน้ำเสียอุตสาหกรรมมีองค์ประกอบหลายอย่างที่เป็นพิษต่อพืชจึงเป็นข้อจำกัดของพืชที่ไม่สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เพราะน้ำเสียอุตสาหกรรมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีค่าพีเอช ของแข็งละลายได้สูงมาก ซึ่งพารามิเตอร์ต่างๆ ส่งผลต่อประสิทธิภาพทำให้มีความเป็นพิษต่อต้นกวนอิมจึงทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดบิสฟีนอล เอ ได้น้อยลง เมื่อเทียบกับผลที่ได้ในห้องปฏิบัติการซึ่งทำการทดลองในสารละลายบิสฟีนอล เอ สังเคราะห์ เป็นเพราะว่าน้ำเสียจากโรงงานนี้ส่วนใหญ่มีเกลือโซเดียมเป็นส่วนประกอบ อาจจะเป็นไปได้ว่าความเป็นพิษจำเพาะของไอออนมีผลทำให้การซึมผ่านพลาสมาเมมเบรน ซึ่งจะเลือกไอออนที่มีความเป็นพิษน้อยให้ผ่านเข้าไปในเซลล์พืชได้ (32) ซึ่งเกลือโซเดียมถ้ามีมากจนเกินไป อาจจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชได้

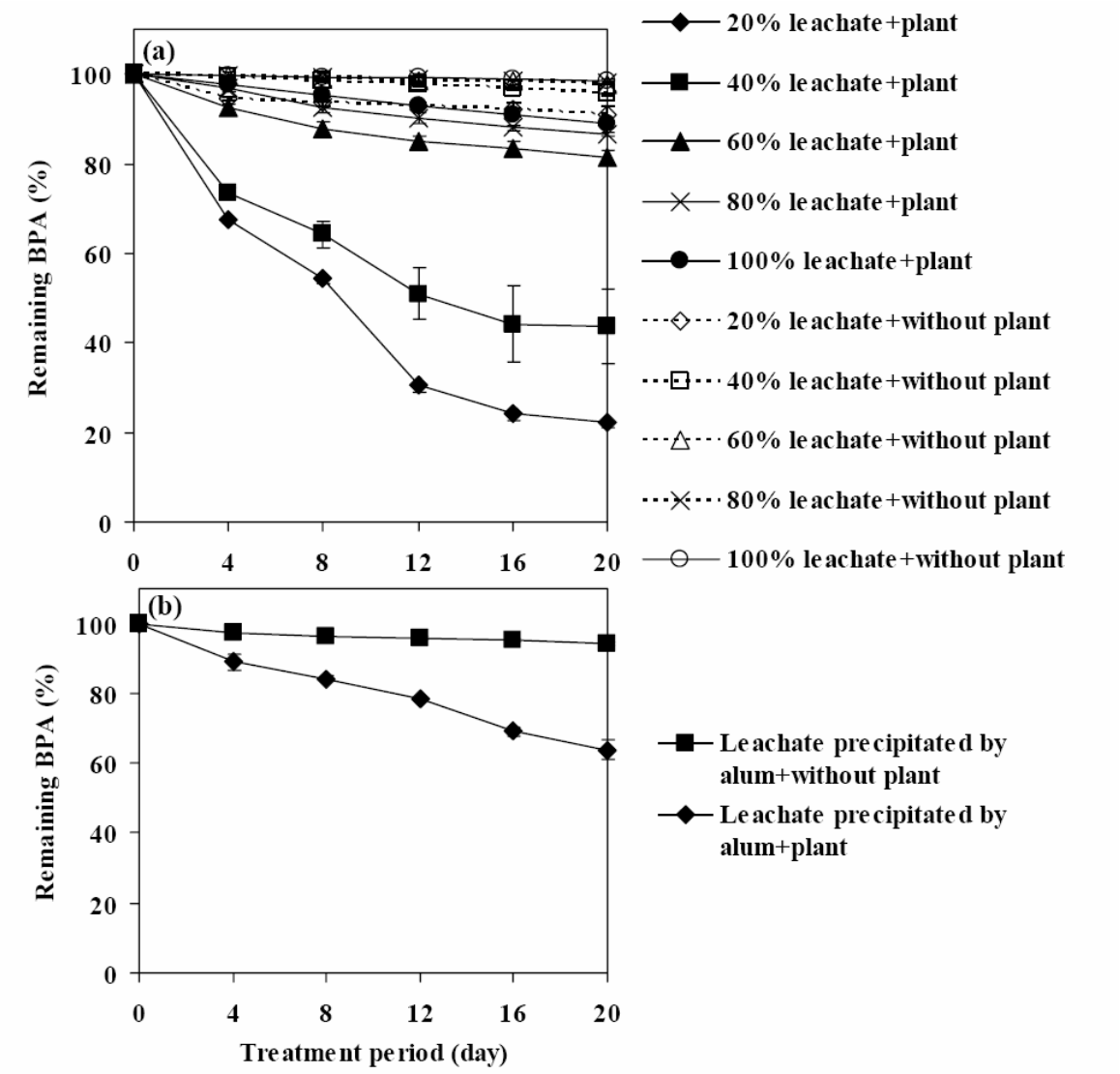


Fig. 6.

รูปที่ 29 การกำจัดบิสฟีนอลเอในน้ำชะขยะโดยต้นกวนอิม (a) ร้อยละของบิสฟีนอลเอที่เหลือในน้ำชะขยะที่ความเข้มข้นต่างๆ (b) ร้อยละของบิสฟีนอลเอที่เหลือในน้ำชะขยะหลังจากตกตะกอนด้วยอัลลัมน์ ร้อยละ 25

สรุปผลการทดลอง

คัดเลือกพืชที่เหมาะสมในการกำจัดบิสฟีนอลเอเพื่อใช้ในการทดลองพบว่า ต้นพลูฉลุ (*Monstera oblique*, window leaf) ต้นพลูด่าง (*Scindapsus aureu,* Devils ivys) ต้นกวนอิม (Draceana sanderiana, Ribbon plant) และ ต้นวาสนา (Draceana fragrance, " Massangeana", corn plant) สามารถกำจัดบิสฟีนอลเอได้ สูงถึงร้อยละ 82 83 87 และ 78 ตามลำดับ และมีค่า *q* (สัมประสิทธิของการอัพเทค) เท่ากับ 0.18 0.15 0.20 และ 0.01 ตามลำดับ เมื่อทดลองที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์ ในเวลา 8 วัน จึงเลือกต้นกวนอิมเพื่อทำการศึกษาต่อไป เนื่องจากเป็นพืชที่กำจัดบิสฟีนอลเอได้

สูง เลี้ยงง่ายและสามารถนำไปปลูกได้ทั้งในดินและน้ำในทุกภูมิภาคของประเทศไทยซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะประยุกต์ใช้ในระบบพื้นที่ชุ่มน้ำ

ศึกษาการกำจัดบิสฟีนอลเอ โดย ต้นกวนอิม (*Dracaena sanderina*) พบว่าสามารถกำจัดบิสฟีนอลเอได้ดี ศึกษาการเคลื่อนย้ายของบิสฟีนอลเอในต้นกวนอิมมีการสะสมบิสฟีนอลเอที่ราก และลำต้นแต่ไม่สะสมในใบ เมื่อเลี้ยงต้นกวนอิมในบิสฟีนอลเอ พบว่ามีการปล่อยโพลิแซคคาร์ไรด์ ออกมาซึ่งเป็นกลไกป้องกันสารพิษของพืช การเลี้ยงในสภาวะไม่ปราศจากเชื้อพบว่า มีการกำจัดบิสฟีนอลเอจากทั้งต้นกวนอิมและสิ่งมีชีวิตที่บริเวณราก สูงถึง ร้อยละ 85 ทำการคัดแยก แบคทีเรียได้ 6 ชนิดจากรากต้นกวนอิม พบว่า แบซีรัส ซีเรียส BPW4และ แอนเทโรแบคเตอร์ BPW5 ช่วยในการกำจัดบิสฟีนอลเอ ศึกษาการกำจัดบิสฟีนอลเอในน้ำชะขยะ พบว่าต้นกวนอิมสามารถกำจัดบิสฟีนอลเอในน้ำชะขยะได้

เอกสารอ้างอิง

1. Hoagland D.R. and Arnon D.I. The water culture method for growing plants without soil. Circ. (1950). 347. University of California Agricultural Experiment Station, Berkeley.
2. Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning: Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 2001.
3. Marchesi J.R., Sato T., Weightman A.J., Martin T.A., Fry J.C., Hiom S.J., Wade W.G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for baterial 16S rRNA, Appl. Environ. Microb. (1998), 64:795-799.
4. Kongpol A., Vangnai A.S. Isolation and characterization of *Deinococcus geothermalis* T27, a slightly thermophilic and organic solvent-tolerant bacterium able to survive in the presence of high concentration of ethyl acetate, FEMS Microbiol. Lett. (2008), 286:227-235.
5. Altschul S.F., Gish W., Myers M. E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol. (1990), 215: 403-410.
6. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. (1965), 28: 350-356.
7. Durmu N., Co K., Kadioglu A., Beyazoglu O. Phenolic and sugar compositions of some *Hieracium* L. (Asteraceae) leaves in north east anatolia. Bulg. J. Plant Physiol. (2002), 28: 30-35.
8. APHA, Standard methods for the experimentation of water and wastewater. 21st ed. American Public Health Association / American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington DC, USA, 2005.
9. Imai S., Shiraishi A., Gamo K., Watanabe I., Okuhata H., Miyasaka H., Ikeda K., Bamba T., Hirata K., Removal of phenolic endocrine disruptors by *Portulaca oleracea*. J. Biosci. Bioeng. (2007), 103: 420-426.
10. Sao V. Phytoremediation of cadmium solution and contaminated soil by *Axonopus Compressus* (Sw.) P. Beauv./ 2004 [[M.Sc. Thesis in Environmental Technology]. Bangkok: King Mongkut's University of Technology Thonburi.

11. Tu S., Lena Q., Ma Abioye., Fayiga O. and Zillioux E.J. Phytoremediation of arsenic-contaminated groundwater by the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata* L. Int. J. Phytorem. (2004), 6(1):35-47.
12. Maria I., Gonzaga S., Lena Q., Ma Jorge and Santos G. Effect of plant age on arsenic hyperaccumulation by *Pteris vittata* L. Water Air Soil poll. (2007), 186: 289-295.
13. Knuteson S..L., Whitwell T. and Klaine S..J. Influence of plant age and size on simazine toxicity and uptake. J. Environ Qual. (2002), 31: 2096-2103.
14. Swiader J.M. Characterization of ammonium and nitrate absorption in pumpkin Cucurbita moschat poir. J. Plant Nutr. (1986), 9: 103-114.
15. Anti A.B., Mortatti J., Cesar P., Trivelin O. and Bendassolli J.A. Radicular uptake kinetics of $^{15}NO_3^-$, $CO(^{15}NH_2)_2$, and $^{15}NH_4^+$ in whole rice plants. J. Plant Nutr. (2001), 24:1695-1710.
16. Takahashi M., Tsukamoto S., Kawaguchi A., Sakamoto A. and Morikawa H. Phytoremediators from abandoned rice field. Plant Biotechnol. (2005), 22:167-170.
17. Noureddin I.M., Furumoto T., Ishida Y., Fukui H. Absorption and metabolism of bisphenol A, a possible endocrine disruptor, in the aquatic edible plant, water convolvulus (*Ipomoea aquatica*). Biosci. Biotechnol. Biochem. (2004), 68:1398-1402.
18. Imai S., Shiraishi A., Gamo K., Watanabe I., Okuhata H., Miyasaka H., Ikeda K., Bamba T., Hirata K., Removal of phenolic endocrine disruptors by *Portulaca oleracea*. J. Biosci. Bioeng. (2007), 103: 420-426.
19. Vartizeti-Nikaki P., Kripoyou S. and Konsta A.A. 2003. The hydration mechanism in plant polysaccharides: a physiochemical and dielectrics study. Proceeding of the 7th International Conference on properties and application of Dielectric Meterails. 535-538.
20. Polysaccharide. Available from: http://www. fibrecrops.nl/Pages/Projects/polysac charides. html. [Assessed 2009 Feb, 27].
21. Saiyood S., Vangnai S., Thiravetyan P. and Inthorn D. Bisphenol A removal by the *Dracaena* plant and the role of the plant-associating bacteria. J. Hazard Mater. (2010), 178: 777-785.
22. Yoon S.J., Pereira M.S., Pavä o M.S.G., Hwang J.K., Pyun Y.R. and Mourä o P.A.S. The medicinal plant *Porana volubilis* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated by heparin cofactor II. Thromb. Res. (2002), 106(1): 51-58.
23. Fememia A., Sánchez E.S., Simal S. and Rosselló C. 1999. Compositional features of polysaccharides from Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. Carbohyd. Polym. (1999), 39(2): 109-17.
24. Zhang C., Zeng G. Yuan L., Yu J., Li G., Huang B, Xi B and Liu H. Aerobic degradation of bisphenol A by *Achromobacter xylosoxidans* strain B-16 isolated from compost leachate of municipal solid waste. Chemosphere. (2007), 68 :181-190.

25. Sakai K., Yamanaka H., Moriyoshi K., Ohmoto T. and Ohe T., Biodegradation of bisphenol A and related compounds by *Sphingomonas* sp. strain BP-7 isolated from seawater. Biosci. Biotech. Bioch. (2007), 71: 51-57.
26. Ike M., Jin C.S., Fujita M. Isolation and characterization of a novel bisphenol A-degrading bacterium *Pseudomonas paucimobilis* strain Fj-4. Jpn. J. Water Treatment Biol. (1995), 31: 203-212.
27. Sasaki M., Maki J., Oshiman K. and Tsushido Y. Biodegradation of bisphenol A by cell and cell lysate from *Sphingomonas* sp. Strain AO1.Biodegradation. (2005), 16 : 449-459.
28. So L.M., Chu L.M. and Wong P.K. Microbial enhancement of Cu^{2+} removal capacity of *Eichhornia crassipes* (Mart.). Chemosphere (2003), 52:1499-1503.
29. O'Connella K.P., Goodmanb R.M. and Handelsman J. Engineering the rhizosphere: expressing a bias. Trends Biotechnol. (1996), 14:83-88.
30. Sheng X.F. and Xia J.J. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. Chemosphere (2006), 64: 1036-1042.
31. Dashti N., Khanafer M., El-Nemr I., Sorkhoh N., Ali N. and Radwan S. The potential of oil-utilizing bacterial consortia associated with legume root nodules for cleaning oily soils. Chemosphere (2009), 74: 1354-1359.
32. Jones D.L., Owen A.G. Williamson. Phytoremediation of landfill leachate. Waste Manage. (2006), 26: 825-837.

ส่วนที่ 2 การกำจัดบิสฟีนอลเอทางชีวภาพโดยใช้สาหร่ายขนาดเล็ก

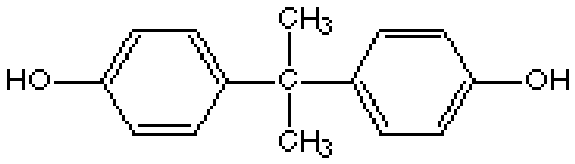
วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีความสามารถในการกำจัดบิสฟีนอลเอและเจริญเติบโตได้ดี
2. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดบิสฟีนอลเอโดยสาหร่ายขนาดเล็ก โดยศึกษาผลของความเข้มข้นบิสฟีนอลเอเริ่มต้น การเจริญเติบโต ผลของพีเอช และระยะเวลาในการสัมผัส เป็นต้น
3. เพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดบิสฟีนอล เอ โดยการทำ แอคคามาไทด์เซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก
4. ศึกษากลไกการกำจัดทางชีวภาพของบิสฟีนอลเอในสาหร่ายขนาดเล็ก โดยวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลีแซคคาไรด์ที่สาหร่ายผลิตออกมานอกเซลล์ และปริมาณของโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้นบิสฟีนอลต่างๆ เป็นต้น
5. ศึกษาการกำจัดบิสฟีนอลเอในน้ำชะขยะโดยสาหร่ายขนาดเล็ก

คำจำกัดความ

1. สาหร่ายขนาดเล็กเป็นสาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กทั้งสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย (สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน) ซึ่งนำมาจาก Biotech Culture Collection (BCC), สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (National Science and Technology Development Agency (NSTDA)) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (The Ministry of Science and Technology) ประเทศไทย

2. สารละลาย คือสารละลายบิสฟีนอลเอซึ่งเตรียมตามขั้นตอนที่ระบุในส่วนของวิธีการทดลอง โดยทำการเตรียมมาจากสารบิสฟีนอลเอสังเคราะห์



Bisphenol A

วิธีและอุปกรณ์การวิจัย

อุปกรณ์

1. Pipette 5 and 10 mL
2. Funnel
3. Micropipette 20, 250, 1,000 μl, Gilson., France
4. Pipette tip
5. Syringe 50 mL
6. Alcohol lamp
7. Nylon sieve (50 μm)
8. Aluminum foil
9. Millipore paper (0.45 μm)
10. Telflon membrane filter diameter 47 mm, pore size 0.45 μm
11. Analytical balance, Mettle model AT-201, Switzerland
12. Autoclave, HA-240M, Hirayama, Japan
13. Hot air oven, Mammert, German
14. Desicator, Auto-C series Samplatec, Japan
15. Shaker
16. Centrifuge, Hetich universal II, D-7200, Japan
17. White fluorescence lamp
18. Laminar air flow, RFC 120000, Australia
19. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) model LC-10 ADvp pump with a model SCL-10 ADvp controller, and a model UV-VIS detector, Shimadzu
20. Reversed-phase column (Alltima C18 column 250×4.6 mm, Ligand Scientific Co., Ltd.)
21. Fourier Transform Infrared Spectrometer, Perkin Elmer FTIR 1760X, USA
22. Transmission Electron Microscope, Hitachi, model H-700, Japan
23. Scanning Electron Microscope, JEOL, model JSM-5410LV

เครื่องแก้ว

1. Erlenmeyer flask size 250 and 2,000 mL
2. Volumetric flask size 25, 50, 100, 500 and 1,000 mL
3. Ram vial, Amber 12×32 mm, Ligand Scientific Co.,Ltd.
4. Cylinder size 1,000 mL

สารเคมี

1. Bisphenol A ($C_{15}H_{16}O_2$), Kishada Chemical Co.,Ltd. (Osaka,.Japan)
2. Acetronitrite, HPLC Grade
3. KH_2PO_4 , Merck, Germany
4. Ortho-Phosphoric acid 85% GR ISO Merck, Germany
5. Nitric acid (HNO_3) 69%, Ajax Finechem, Australia
6. NaOH, Merck, Germany
7. Methyl alcohol (MeOH), HPLC Grade Merck, Germany
8. Ethyl alcohol (EtOH), HPLC Grade Merck, Germany
9. $NaNO_3$, Ajax Finechem, Australia
10. $MgSO_4.7H_2O$, Scharlau, Spain
11. $CaCl_2.2H_2O$, Scharlau, Spain
12. NaCl, Scharlau, Spain
13. K_2HPO_4, Scharlau, Spain
14. $Fe_2 (SO_4)3H_2O$, Scharlau, Spain
15. $NaMoO_4.2H_2O$, Scharlau, Spain
16. H_3BO_3, Ajax Finechem, Australia
17. $MnSO_4.H_2O$, Scharlau, Spain
18. $ZnSO_4.7H_2O$, Scharlau, Spain
19. $CuSO_4.5H_2O$, Merck, Germany
20. $CoCl_2.6H_2O$, Ajax Finechem, Australia
21. $C_{10}H_{16}N_2O_8$, Ajax Finechem, Australia

สถานที่ทำการทดลอง

การทดลองทั้งหมดทำการทดลองในห้องปฏิบัติการภาควิชาวิทยาศาสตร์อนามัยสิ่งแวดล้อม คณะสาธารณสุขศาสตร์ ม.มหิดล ส่วนการวัดบีสฟีนอลเอ วัดด้วยเครื่องไฮด์เฟอร์พอร์แมนลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC) ที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีเจ้าคุณทหารบางมด (วิทยาเขตบางขุนเทียน)

สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง

เป็นสาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กทั้งสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย (สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน) ได้รับสายพันธุ์จาก Biotec Culture Collection (BCC) สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (National Science and Technology Development Agency (NSTDA)) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประเทศไทย

สาหร่ายสีเขียว

1. *Chlamydomonas* sp.	BCC 11
2. *Chlorella* sp.	BCC 13
3. *Chlorella vulgaris var. vulgaris*	BCC 15
4. *Myxosarcina* sp.	BCC 59
5. *Scenedesmus* sp.	BCC 82
6. *Dunaliella salina*	BCC 4402
7. *Scenedesmus acutiformis*	BCC 8477
8. *Scenedesmus acuminatus var. acuminatus*	BCC 8564

ไซยาโนแบคทีเรีย (สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน)

1. *Gloeocapsa* sp.	BCC 25
2. *Hapalosiphon hibernicus*	BCC 27
3. *Nostoc paludosum*	BCC 46
4. *Oscillatoria agardhii*	BCC 52
5. *Nostoc micropicum*	BCC 77
6. *Rivularia* sp.	BCC 80

วิธีการทดลอง

1. การคัดแยกสาหร่ายที่กำจัดบิสฟีนอลเอสูง

ทำการทดลองในสารละลายบิสฟีนอลเอสังเคราะห์ในฟลากส์ เพื่อทำการคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายที่มีความสามารถในการกำจัดสารบิสฟีนอลเอสูงและสามารถเจริญเติบโตได้ดีด้วย ที่ความเข้มข้นบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์ ซึ่งส่วนของสารละลายใสจะถูกนำมาวัดความเข้มข้นของสารบิสฟีนอลเอโดยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนลิควิดโครมาโตรกราฟี (HPLC) และทำการวัดการเจริญเติบโตด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตรมิเตอร์สำหรับสาหร่ายสีเขียว และใช้การหาน้ำหนักแห้งสำหรับไซยาโนแบคทีเรีย (สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน)

2. การเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กที่ใช้ในการทดลอง

ไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon hibernicus* (BCC 27) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้รับมาจากหน่วยปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ คัดแยกเชื้อตัวนี้ได้จากจังหวัดชัยนาท ประเทศไทย

นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Medium-18 (1) ปรับพีเอชให้เป็น 7.5 ด้วย 1 N HNO_3 และ 1 N NaOH เลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ในอาหาร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง 28-32 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาทีที่ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ปรับให้มืด 12 ชั่วโมง และสว่าง 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 14 วันเพื่อใช้ในการทดลอง

รูปที่ 1 แสดงการเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon hybernicus* เพื่อใช้ในการทดลอง โดยเลี้ยงในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที และความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง 28-32 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาทีที่ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ปรับให้มืด 12 ชั่วโมง และสว่าง 12 ชั่วโมง

2. ผลของอายุเซลล์เริ่มต้นต่อการกำจัดบิสฟีนอล เอ

นำสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร Medium-18 นาน 7 และ 14 วัน น้ำหนักเปียกเซลล์ 0.04 กรัม (40 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) มากำจัดบิสฟีนอลเอ ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ในสภาวะการเลี้ยงเหมือนที่เลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียดังกล่าวข้างต้น เป็นเวลา 15 วัน เก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร และนำไปวัดความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอด้วยเครื่องไฮเฟอร์ฟอร์มแมนลิควิโครมาโตกราฟี

3. ผลของแอคไคมาไทซ์เซลล์ ต่อการกำจัดบิสฟีนอลเอ

นำสาหร่ายมาเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดบิสฟีนอลเอ โดยทำการแอคไคมาไทซ์ในสารละลายอาหาร Medium-18 ที่มีบิสฟีนอลเอ เข้มข้น 40 45 50 และ 55 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อได้แอคไคมาไทซ์เซลล์แล้วนำมาศึกษาการกำจัดบิสฟีนอลเอ ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ โดยใช้น้ำหนักเปียกเซลล์ 0.04 กรัม (40 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ในสภาวะการเลี้ยงเหมือนที่เลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียดังกล่าวข้างต้น เก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร และนำไปวัดความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ ด้วยเครื่องไฮเฟอร์ฟอร์มแมนลิคิวโครมาโตกราฟี

4. การเพิ่มความสามารถในการกำจัดบิสฟีนอลเอ โดยการแอคไคมาไทซ์เซลล์

นำสาหร่ายมาเลี้ยงในสารละลายอาหาร Medium-18 ที่มีบิสฟีนอลเอ เข้มข้น 40 45 50 และ 55 ไมโครโมลาร์ จากนั้นนำเซลล์ที่สามารถมีชีวิตรอดมาเลี้ยงต่อในความเข้มข้นเดิมอีกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อได้เซลล์ที่ผ่านการแอคไคมาไทซ์แล้วนำมากำจัด บิสฟีนอล เอ ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 40 กรัมน้ำหนักแห้ง ค่าพีเอชเริ่มต้น 7-7.5 ปริมาตรที่ใช้เลี้ยง 100 มิลลิลิตร เลี้ยงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (28 – 32 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ปรับให้มืด 12 ชั่วโมง และสว่าง 12 ชั่วโมง

5. การศึกษาลักษณะผิวเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน (Scanning Electron Microscope)

ศึกษาลักษณะผิวเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร Medium-18 ที่ไม่มีบิสฟีนอลเอ และที่เลี้ยงในอาหาร ที่ผสมบิสฟีนอล เอ เข้มข้น 55 ไมโครโมลลาร์ การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนโดยใส่ไซยาโนแบคทีเรียในร้อยละ 2.5 กลูตารอลดีไฮล์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลลาร์ พีเอช 7.2 นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น 10 นาที ต่อจากนั้นดีไฮเดรทด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 30 50 70 และ 95 เป็นเวลา 10 นาที ต่อครั้ง และล้างด้วยเอทานอล 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ทำตัวอย่างให้แห้งด้วยเครื่องคริททิเคิลพอยท์ดรายเออร์ (Balzers, รุ่น CPD 020) ติดตัวอย่างบนแท่นวางตัวอย่างด้วยเทปกาวสองหน้าหรือกาว นำตัวอย่างไปฉาบทองด้วยเครื่องไอออนสพัทเทอร์ (Balzers, model SCD 040) แล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน (Scanning Electron Microscope SEM, JEOL รุ่น JSM-5410LV) ที่กำลังขยาย 500 เท่า (2)

6. การเลี้ยงสาหร่ายเพื่อสกัดโพลิแซคคาร์ไรด์

นำไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon hibernicus* ที่อายุเซลล์ 7 วัน มาเลี้ยงในสารละลาย Medium-18 ที่ผสมบิสฟีนอล เอ 40 ไมโครโมลาร์ มีค่าพีเอชเริ่มต้น 7-7.5 ปริมาตรที่ใช้เลี้ยง 1500 มิลลิลิตร เลี้ยงใน Erlenmeyer flask ขนาด 2000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (28 – 32 องศาเซลเซียส) ให้แสงสว่าง 1,500 ลักซ์ โดยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ สว่าง 12 ชั่วโมง มืด 12 ชั่วโมง ในระบบให้อากาศ นาน 7 วัน หลังจากนั้นแยกเซลล์ออกจากสารละลายโดยกรองผ่าน nylon sieve ขนาด 20 mesh นำ โพลิแซคคาร์ไรด์ที่อยู่ในสารละลายมาตกตะกอนด้วย hexadecyl trimethylammonium bromide ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

นาน 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนของ EPS ด้วยสารละลายครั้งละ 10 มิลลิลิตร ตามลำดับดังนี้ 1) saturated sodium acetate ในร้อยละ 95 ethanol, 2) ร้อยละ 95 ethanol, 3) absolute ethanol และ 4) diethyl ether โดยในแต่ละขั้นตอนจะต้องนำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex และแยกตะกอนโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ในขั้นตอนสุดท้ายนำไปทำให้แห้งในตู้ดูดควันจนกระทั่ง diethyl ether ระเหยออกหมด จากนั้นเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้น เตรียมหลายครั้งจนได้น้ำหนักรวมปริมาณ 5 กรัม น้ำหนักแห้ง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวโดย Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) ต่อไป

7. การกำจัดบิสฟีนอลเอ ในน้ำชะขยะโดยเซลล์ปกติและเซลล์ที่แอคไคมาไทซ์

นำเซลล์ปกติที่เลี้ยงในอาหาร Medium-18 อายุเซลล์ 14 วัน และเซลล์ที่ผ่านการแอคไคมาไทซ์ในสารละลายบิสฟีนอลเอ ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ มากำจัดบิสฟีนอล เอ ในน้ำชะขยะจากหลุมฝังกลบขยะอันตรายแห่งหนึ่ง เตรียมน้ำชะขยะโดยการนำน้ำชะขยะมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/C และ Whatman No.5 แล้วเจือจางด้วยน้ำดีไอออไนซ์ให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 20 40 และ 60 ทำการทดลองในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้น้ำหนักเปียกเซลล์ 0.04 กรัม (40 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ในสภาวะการเลี้ยงเหมือนที่เลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียดังกล่าวข้างต้น เก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร และนำไปวัดความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ ด้วยเครื่อง ไฮเฟอร์ฟอร์มแมนลิคิวโครมาโตกราฟี ในการวิจัยนี้ทำการทดลอง 3 ซ้ำทุกการทดลอง

8. **การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรทโดยวิธีการ Phenol-sulfuric**

แยกเซลล์สาหร่ายออกจากสารอาหารโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3600 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำเซลล์ไปวิเคราะห์โพลิแซคคาไรด์ (โพลิแซคคาไรด์ทั้งภายในเซลล์และส่วนที่เคลือบเซลล์รวมกัน)และน้ำ (โพลิแซคคาไรด์ส่วนที่ละลายน้ำ)อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วและเติมสารละลายฟีนอล 5% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากันหลังจากนั้นเติมกรดซัลฟุริกทันที 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร สำหรับการเตรียมกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและทำตามขั้นตอนข้างต้น (2)

9. การวัดปริมาณโพลิแซคคาร์ไรด์

1. การสกัดโพลิแซคคาร์ไรด์ออกจากสาหร่าย ดัดแปลงวิธีการสกัดโพลิแซคคาร์ไรด์ทั้งหมด โดย

1) นำสาหร่ายมา 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดเซนตริฟิวส์เติมแอบโซลูดเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ 4000 รอบต่อนาที นาน 20 นาทีแยกน้ำใสที่ได้ออกเพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

2) เติมแอบโซลุท เอทานอล (absolute ethanol) ร้อยละ 95 ลงไปดดยใช้ปริมาตร 2 เท่าของน้ำใสจากข้อ 1) ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ 4000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ใช้แท่งแก้วคนให้สารที่ติดอยู่ข้างหลอดหลุดออกมาอยู่ในสารละลาย นำสารละลาย 1 มิลลิลิตรไปวัดปริมาณของโพลิแซคคาไรด์ใช้วิธี phenol-sulfuric acid method

ก. เติมสารละลายที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงหรือส่วนที่เป็นน้ำใส 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบฝาเกลียวขนาด 25 x150 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ตามลงไป 1 มิลลิลิตร

ข. เติมกรดกำมะถันเข้มข้นลงไป 5 มิลลิลิตร ลงในสารผสมข้อ 1) ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีแล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า ตั้งทิ้งไว้ต่อไปอีกประมาณ 30 นาที แล้วจึงวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ด้วยเครื่องสเปกโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ค. เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำไปอ่านค่าปริมาณของโพลิแซคคาไรด์จากกราฟมาตรฐานของกลูโคส คำนวณ และรายงานผลเป็นไมโครกรัมต่อลิตร

2.วิธีการสกัดอินตราโพลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายโดย

1) นำอาหารเลี้ยงสาหร่ายมา 20 มิลลิลิตร ไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงสารละลาย ใช้ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เพื่อแยกน้ำใส และเซลล์ออกจากกันวัดปริมาตรน้ำใสที่ได้และจะทราบปริมาตรของเซลล์ที่ได้จากการปั่นหมุนเหวี่ยง

2) นำเซลล์ที่ได้บดด้วยแท่งบดเนื่อเยื่อ (tissue gider) แล้วรินสารละลายใส่ลงในฟลาสต์ขนาด 25 มิลลิลิตร นำไปใส่ในเครื่องอุตราโซนิก วอเตอร์บาท ความสั่นสะเทือน 140 นาน 60-70 นาที เพื่อให้เซลล์แตกออก รอให้สารละลายเซลล์เย็นแล้วย้ายใส่หลอดเซนติฟิวจ์

3) เติมสารละลายไตรคลอโรแอซีติก แอซิค (trichloro acetic acid) ที่แช่เย็น ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ลงไปเขย่าให้เข้ากันเพื่อกำจัดโปรตีนและสารสี (pigment) นำไปเข้าเครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบและเวลาดังกล่าวข้างต้น

4) แบ่งสารผสมจากข้อ 3) มา 5 มิลลิลิตร เติมแอบโซลุทเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ลงไป 10 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงสารละลาย ด้วยความเร็วและเวลาเท่าเดิม อินตราโพลิแซคคาไรด์จะตกตะกอน

5) ใช้แท่งแก้วคนสารละลายและตะกอน ตั้งทิ้งไว้สักครู่ตะกอนเบาจะลอยอยู่บริเวณก้นหลอด ใช้ทรานส์เฟอร์ไปเปตดูดตะกอนเบานี้ขึ้นมาทั้งหมดได้ 1 มิลลิลิตร นำไปผ่านขั้นตอนของ phenol-sulfuric acid method จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องมือและความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร คำนวณปริมาณอินตราโพลิแซคคาร์ไรด์รายงานผลการวัดปริมาณเอกตราโพลิแซคคาร์ไรด์เป็นมิลลิกรัมต่อลิตร

การเตรียมสารเคมี

การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสด้วยวิธี phenol-sulfuric acid Method วิธีนี้จะวัดน้ำตาลได้ประมาณ 1-100 mg เป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณของน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) วิเคราะห์ได้ทั้งที่เป็นมอนอแซคคาร์ไรด์และโพลิแซคคาไรด์ในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสด้วยวิธี phenol-sulfuric acid method และการทำกราฟมาตรฐานของกลูโคส มีขั้นตอนดังนี้

1.สารเคมี

1.1 น้ำตาลกลูโคส (D-Glucose)

1.2 กรดซัลฟูริกเข้มข้น

1.3 ฟีนอล 5% โดยชั่งฟีนอลหนัก 5 กรัม เติมน้ำครบ 100 มิลลิลิตร คนให้ละลายเข้ากัน

2. การทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

2.1 ละลายกลูโคส 100 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 100 มล. สารละลายมีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ก่อนใช้ทำให้สารละลายน้ำตาลเจือจางลง 10 เท่า โดยน้ำกลั่นดังนั้นสารละลายน้ำตาลกลูโคสจะมี

ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำสารละลายให้เจือจางอยู่ในระดับ 10-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่น

2.2 เติม 1.0 มิลลิลตรของสารละลายฟีนอล 5% ลงไปในหลอดที่มีสารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มล. เขย่าให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว

2.3 เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดตั้งวางไว้ ณ อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วนำไปผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วด้วยเครื่องเขย่าหลอดทดสอบ (Vortex mixer) ตั้งหลอดทิ้งไว้ใน Rack 15-20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer บันทึกค่าการดูดกลืนแสง

2.4 ทำเช่นเดียวกันนี้ตั้งแต่ข้อ 2.1-2.3 โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสเป็น 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัม/มล. แยกความเข้มขันละ 1 หลอด สำหรับหลอดที่ใช้เป็น Blank ไม่ต้องใส่สารละลายกลูโคสแต่ใช้น้ำกลั่นแทน

2.5 วัดความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตหรือโพลิแซคคาไรด์หรือกลูดคสจากราฟมาตรฐานหลังจากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่วัดได้ไปพลอตกราฟกับค่าความเข้มข้นของกลูโคสระดับต่างๆคือ 20, 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัม/มิลิลิลตร ตามลำดับ (3)

10. การวิเคราะห์บิสฟีนอลเอ ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี

ดูดละลายตัวอย่างที่เก็บมา 1 มิลลิลิตรโดยใช้ไมโครไซลิ้ง 40 ไมโครลิตร กรองด้วยเซลลูโลสอะซิเตสฟิวเตอร์ และนำไปฉีดเข้าเครื่องไฮเฟอร์ฟอร์มแมนลิคิวโครมาโตกราฟี ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ ใช้ยูวีดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 221 นาโนเมตร ใช้คอลัมน์แบบรีเวิร์สเฟส (Alltima C-18 250×4.6 mm) เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือ อะซิโตไนไตรล์ : โพแทสเซียมไดไฮโดรเจฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50:50 โดยปริมาตร) มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ 40 ไมโครลิตร

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่มีความสามารถในการกำจัดสารบิสฟีนอลเอสูง

ค่า BPA Removal (%) และ BPA Uptake Capacity (q)

ในการศึกษานี้นำไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย(filamentous)และสาหร่ายสีเขียว มาศึกษาหาความสามารถในการกำจัดสารบิสฟีนอลเอที่ความเข้มข้นของสารบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 20 ไมโครโมลาร์ ซึ่งผลแสดงผลในตารางที่ 1 สำหรับสาหร่ายสีเขียวสาหร่าย *Chlorella vulgaris var. vulgaris* มีค่า BPA removal และ BPA uptake capacity สูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 87 และ 2.84 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนสาหร่ายสีเขียวตัวอื่น ๆ เช่น สาหร่าย *Chlamydomonas* sp. มีความสามารถในการกำจัดสูงเช่นกัน โดยมีค่า BPA removal และ BPA uptake capacity เท่ากับ 82% และ 2.65 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และสาหร่าย *Scenedesmus* sp. มีค่าเท่ากับ 78% และ 2.68 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่าไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon hibernicus*, *Oscillatoria agardhii*, *Nostoc paludosum* และ *Rivularia sp.* มีค่าการกำจัดบิสฟีนอลเอสูงกว่าร้อยละ 90 แต่ *Gloeocapsa* sp., *Nostoc micropicum* มีค่าการกำจัดบิสฟีนอลเอเพียงร้อยละ 69 และ 64 ตามลำดับ โดยที่สาหร่ายสองตัว คือ *Oscillatoria agardhii* และ *Hapalosiphon hibernicus* มีค่าการกำจัดบิสฟีนอลเอสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ

97 แต่สาหร่าย *Hapalosiphon hibernicus* มีค่า การอัพแทคบิสฟีนอลเอสูงกว่าสาหร่าย *Oscillatoria agarhi* เท่ากับ 3.46 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง และ 2.33 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนในไซยาโนแบคทีเรียก็สามารถกำจัดบิสฟีนอลเอได้ สูงเช่นกัน ได้แก่ *Nostoc paludosum* และ *Rivularia* sp. มีค่าการกำจัดบิสฟีนอลเอเท่ากับร้อยละ 96 และ 91 ตามลำดับ

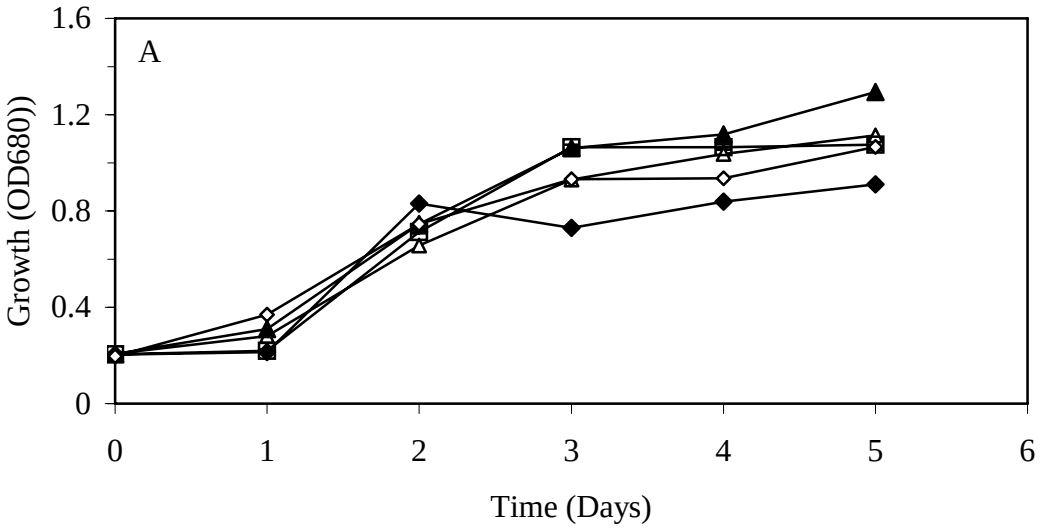
ตารางที่ 1 การคัดเลือกสาหร่ายที่มีความสามารถกำจัดสารบิสฟีนอลเอสูงที่ความเข้มข้นสารบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 20 ไมโครโมลาร์

สาหร่าย	รหัส BCC*	การกำจัดบิสฟีนอลเอ (BPA removal) (%)	การอัพแทคบิสฟีนอลเอ (BPA uptake capacity) (q: มก./ก.น้ำหนักห้ง)
สาหร่ายสีเขียว			
1. *Chlamydomonas* sp.	11	82	2.65
2. *Chlorella* sp.	13	67	1.92
3. *Chlorella vulgaris var. vulgaris*	15	**87**	2.84
4. *Myxosarcina* sp.	59	62	2.10
5. *Scenedesmus* sp.	82	78	2.68
6.*Dunaliella salina*	4402	66	2.20
7. *Scenedesmus acutiformis*	8477	34	1.32
8. *Scenedesmus acuminatus var. acuminatus*	8564	72	2.46
ไซยาโนแบคทีเรีย (สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน) 1. *Gloeocapsa* sp.	25	69	1.40
2. *Hapalosiphon hibernicus*	27	**97**	3.46
3. *Nostoc paludosum*	46	**96**	2.80
4. *Oscillatoria agardhii*	52	**97**	2.33
5. *Nostoc micropicum*	77	64	2.21
6. *Rivularia* sp.	80	**91**	2.59

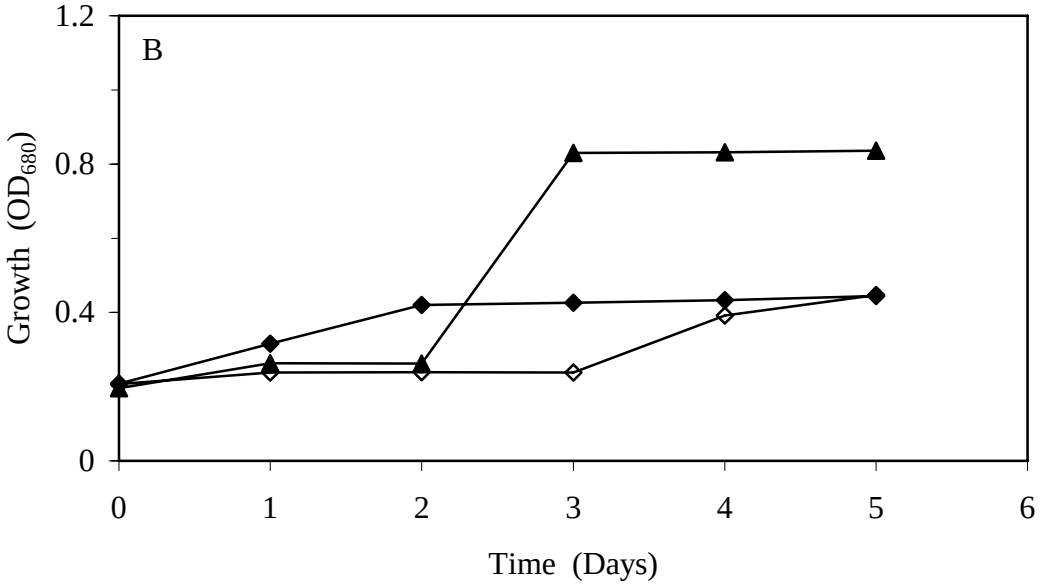
หมายเหตุ* BCC คือ Biotech Culture Collection

2. ความสามารถในการเจริญเติบโตของสาหร่ายในสารละลายบิสฟีนอลเอ

รูป 2A และ 2B แสดงการเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแต่ละตัว ณ วันที่ 5 สาหร่าย *Chlorella vulgaris var. vulgaris*, *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *D. salina* และ *Chlamydomonas* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ค่อนข้างสูง โดยพบว่ามีอัตราการโตที่ค่า OD_{680} เท่ากับ1.294, 1.113, 1.075, 1.066 และ 0.910 ตามลำดับ (รูป 2A) รูป 2B แสดงสาหร่ายที่เจริญเติบโตได้ค่อนข้างต่ำโดยมีค่า OD_{680} ต่ำกว่า 0.9 ในวันที่ 5 โดยสาหร่าย *Scenedesmus acuminatus var. acuminatus*, *Myxosarcina* sp. และ *Scenedesmus acutiformis* มีค่า OD_{680} เท่ากับ 0.836, 0.447 และ 0.444 ตามลำดับ และจากการทดลองพบว่าสาหร่าย *Chlorella vulgaris var. vulgaris* ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดมากเป็น 3 เท่าของสาหร่าย *Scenedesmus acutiformis* ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำที่สุด

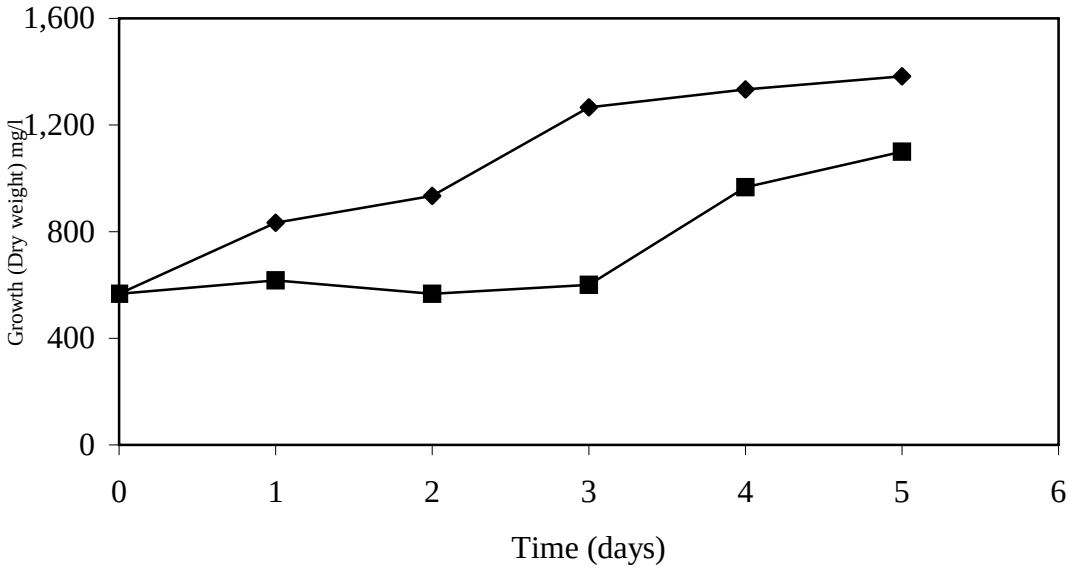


รูปที่2A กราฟแสดงการเจริญเติบโต (OD $_{680}$) ในช่วงระยะเวลา 5 วัน ของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* sp. (◆), *Chlorella* sp. (△), *Chlorella vulgaris var. vulgaris* (▲), *Scenedesmus* sp. (□) and *Dunliella salina* (◇) ใส่เซลล์สาหร่าย (OD_{680} at 0.2) ลงในสารละลายบิสฟีนอลเอความเข้มข้นเริ่มต้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium 18 ทำการกวนผสมบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ที่ พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ จากหลอดcool white ฟลูออร์เรสเซนท์ ที่ 12 ชั่วโมงสว่าง 12 ชั่วโมงมืด



รูปที่ 2B กราฟแสดงการเจริญเติบโต (OD $_{680}$) ในช่วงระยะเวลา 5 วัน ของสาหร่ายสีเขียว *Myxosarcina* sp. (◇), *Scenedesmus acutiformis* (◆), *Scenedesmus acuminatus var. acuminatus* (▲) ใส่เซลล์สาหร่าย (OD_{680} at 0.2) ในสารละลายบิสฟีนอลความเข้มข้นเริ่มต้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium 18 ทำการกวนผสมบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ที่ พีเอชเริ่มต้น 7 ที่ อุณหภูมิห้อง ด้วยความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ จากหลอด cool white ฟลูออร์เรสเซนท์ ที่ 12 ชั่วโมงสว่าง 12 ชั่วโมงมืด

ผลการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญเติบโตระหว่างสาหร่าย *C. vulgaris var. vulgaris* และ *H. hibernicus* เนื่องจากสาหร่ายทั้งสองตัวมีความสามารถในการกำจัดสารบิสฟีนอลเอสูง โดยมีค่า การกำจัดบิสฟีนอลเอและ การอัพแทคบิสฟีนอลเอสูงที่สุด โดยพบว่าสาหร่าย *C. vulgaris var. vulgaris* มีความสามารถในการเจริญเติบโตสูงกว่าสาหร่าย *H. hibernicus* ในสารละลายบิสฟีนอลเอความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ตลอดระยะเวลา 5 วันของการเลี้ยง ซึ่ง ณ วันที่ 5 น้ำหนักแห้งของสาหร่าย *C. vulgaris var. vulgaris* และ *H. hibernicus* มีค่าเท่ากับ 1,383 มิลลิกรัม/ลิตร และ 1,100 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ แสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่างสาหร่าย *Chlorella vulgaris var. vulgaris* (◆) และ *Hapalosiphon hibernicus* (■) ในระยะเวลา 5 วัน โดยใส่เซลล์สาหร่าย (60±10 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง) ในสารละลายบิสฟีนอลเอความเข้มข้นเริ่มต้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium 18 ทำการกวนผสมบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ที่ พีเอช เริ่มต้น 7 ณ อุณหภูมิห้อง ด้วยความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ จากหลอด cool white ฟลูออร์เรสเซนท์ ที่ 12 ชั่วโมงสว่าง 12 ชั่วโมงมืด

จากผลการทดลองได้เลือกสาหร่าย *C. vulgaris var. vulgaris* เป็นตัวแทนของสาหร่ายสีเขียวเพื่อทำการศึกษาต่อไป เพราะสามารถกำจัดสารบิสฟีนอลเอได้ดีที่สุด จากที่มีค่ากำจัดสารบิสฟีนอลเอและ BPA uptake capacity สูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 87 และ 2.84 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และอีกทั้งยังสามารถโตได้รวดเร็วมากที่สุดเมื่อเทียบระหว่างสาหร่ายสีเขียวอื่น ๆ

จากผลการได้เลือกสาหร่าย *H. hibernicus* เป็นตัวแทนของไซยาโนแบคทีเรีย เพราะสามารถกำจัดสารบิสฟีนอลเอได้ดีที่สุด จากที่มีค่า กำจัดสารบิสฟีนอลเอและ BPA uptake capacity สูงที่สุด เท่ากับ 97% และ 3.46 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และสาหร่าย *H. hibernicus* มีลักษณะเซลล์เป็นเส้นใย ซึ่งสามารถแยกออกได้ง่ายจากสารละลายด้วยการกรองด้วยตาข่ายไนลอน และเหมาะที่จะประยุกต์ใช้ในสภาวะจริงต่อไป

2. **การเปลี่ยนแปลงค่า พีเอชในสาหร่ายแต่ละชนิด**

การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในระบบการเลี้ยงสาหร่ายทั้งสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย แสดงในตารางที่ 2 ในสาหร่ายสีเขียววันแรกของการเลี้ยงมีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 7.1–7.5 และเพิ่มขึ้นเป็น 8.1–8.7 ในวันที่ 5 โดยในวันที่ 5 สาหร่าย *Chlamydomonas sp., Chlorella sp*. และ *Chlorella vulgaris var. vulgaris* มีค่าพีเอชเท่ากับ 8.7, 8.6 และ 8.6 ตามลำดับ และสาหร่าย *Senedesmus acutiformis* มีค่าพีเอชต่ำที่สุดเท่ากับ 8.1 ในวันแรกของไซยาโนแบคทีเรีย มีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 7.0–7.7 และเพิ่มขึ้นเป็น 7.4–8.7 ในวันที่ 5 โดยในวันที่ 5 สาหร่าย *Hapalosiphon hibernicus* และ *Rivularia sp.* มีค่าพีเอชเท่ากับ 8.7 และ 8.6 ตามลำดับ และสาหร่าย *Nostoc micropicum* มีค่าพีเอชต่ำที่สุดเท่ากับ 7.8. ในวันที่ 5 และจากการทดลองพบว่าสาหร่ายส่วนมากจะมีค่าพีเอชของระบบเพิ่มขึ้นสูงกว่าชุดควบคุมซึ่งไม่มีสาหร่าย ยกเว้นสาหร่ายใน *N. micropicum* ที่มีค่าพีเอชเท่ากับชุดควบคุมโดยเท่ากับ 7.4 ในวันที่ 5

ตารางที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในสารละลายบิสฟีนอลเอความเข้มข้มเริ่มต้น 20 ไมโครโมลาร์ในอาหาร เลี้ยงเชื้อMedium 18 เป็น ในระยะเวลา 5 วัน ในสาหร่ายแต่ละชนิด

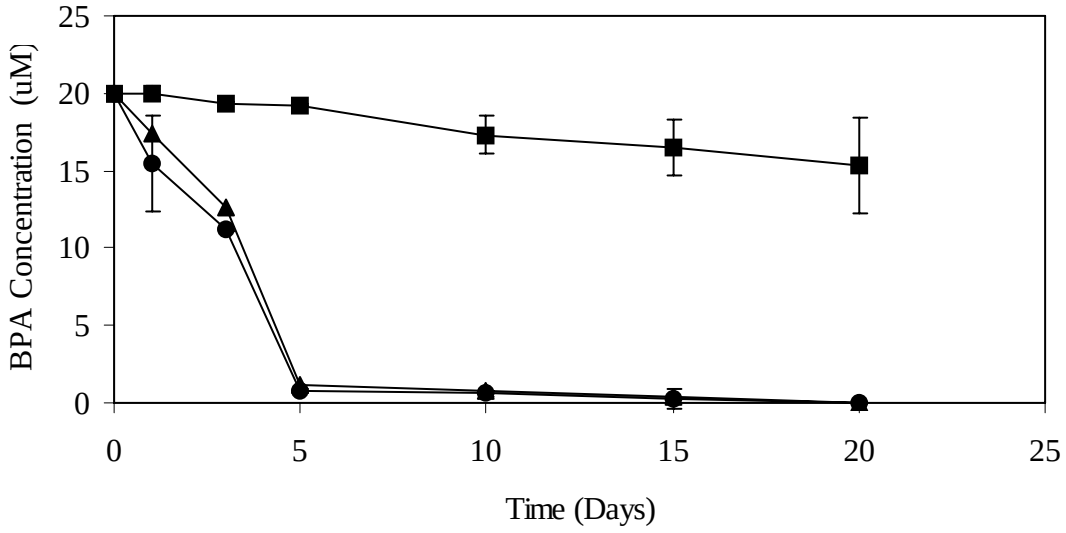
สาหร่าย	การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชระหว่างระยะเวลา 5 วัน					
	0	1	2	3	4	5
สาหร่ายสีเขียว						
1. *Chlamydomonas sp.*	7.0	7.2	7.4	8	8.4	8.7
2. *Chlorella sp*.	7.0	7.4	7.6	8.2	8.6	8.6
3. *Chlorella vulgaris var. vulgaris*	7.0	7.1	7.4	7.9	8.2	8.6
4. *Myxosarcina sp*.	7.0	7.3	7.5	8.1	8.2	8.3
5. *Scenedesmus sp*.	7.0	7.2	7.6	7.7	7.9	8.4
6.*Dunaliella salina*	7.0	7.1	7.5	7.9	8.3	8.4
7. *Scenedesmus acutiformis*	7.0	7.1	7.8	8.0	7.9	8.1
8. *Scenedesmus acuminatus var. acuminatus*	7.0	7.3	7.4	7.7	8.1	8.5
ไซยาโนแบคทีเรีย (สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน)						
1. *Gloeocapsa sp.*	7.0	7.2	7.4	7.5	7.8	7.9
2. *Hapalosiphon hibernicus*	7.0	7.2	7.4	8	8.4	8.7
3. *Nostoc paludosum*	7.0	7.1	7.2	7.2	7.4	7.8
4. *Oscillatoria agardhii*	7.0	7.3	7.5	7.6	8.1	8.1
5. *Nostoc micropicum*	7.0	7.0	7.2	7.2	7.4	7.4
6. *Rivularia sp.*	7.0	7.7	7.8	7.5	8.4	8.6
Medium 18 + 20 µM BPA (ชุดควบคุม)	7.0	7.2	7.2	7.4	7.4	7.4

2. ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดสารบิสฟีนอลเอ

2.1 ผลของระยะเวลาในการสัมผัสต่อประสิทธิภาพการกำจัดสารบิสฟีนอลเอ

ในการทดลองที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 20 ไมโครโมลาร์ สาหร่ายทั้งสองตัวคือ *Chlorella vulgaris var. vulgaris* และ *Hapalosiphon hibernicus* จะค่อย ๆ กำจัดบิสฟีนอลเอในระยะเวลา 3 วัน และจะกำจัดอย่างรวดเร็วในวันที่ 5 หลังจาก 5 วัน ความเข้มข้นของสารบิสฟีนอลเอจะค่อย ๆ ลดลงเล็กน้อย จนกระทั่งไม่สามารถจะตรวจพบได้ในวันที่ 20 สาหร่าย *C. vulgaris var. vulgaris* สามารถกำจัดสารบิสฟีนอลเอจาก 20 ไมโครโมลาร์ เหลือ 15.49 ไมโครโมลาร์ในวันแรก และเป็น 11.18 ไมโครโมลาร์ในวันที่ 3 ตามลำดับ และจะลดลงอย่างรวดเร็วเป็น 0.76 ไมโครโมลาร์ ในวันที่ 5

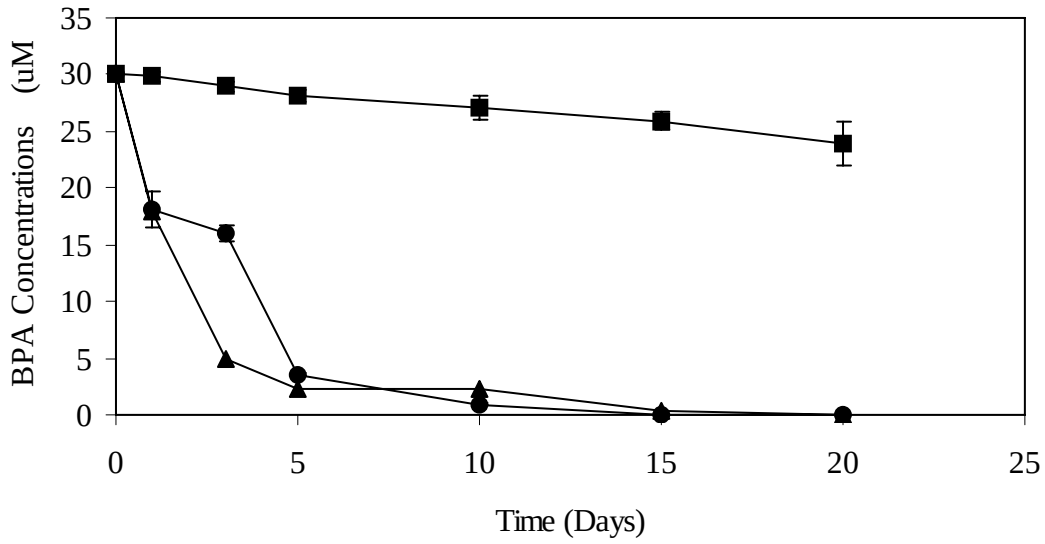
ส่วนในสาหร่าย *H. hibernicus* สามารถกำจัดสารบิสฟีนอลเอจาก 20 ไมโครโมลาร์ เหลือ 12.63 ไมโครโมลาร์ และเป็น 1.18 ไมโครโมลาร์ในวันที่ 5 ในส่วนของชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมสาหร่าย ความเข้มข้นของสารบิสฟีนอลเอจะค่อย ๆ ลดลงจาก 20 ไมโครโมลาร์ เหลือ 19.23 ไมโครโมลาร์ในวันที่ 5 และเหลือ 17.29 ไมโครโมลาร์ ในวันที่ 10 และ16.5 ไมโครโมลาร์ในวันที่ 15 และเหลือ 15.36 ไมโครโมลาร์ในวันที่ 20 ตามลำดับ แสดงไว้ในรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงการกำจัดบีสฟีนอลเอใน *Chlorella vulgaris var. vulgaris* (●), *Hapalosiphon hibernicus* (▲) และ ชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมสาหร่าย (■) ทำการทดลองที่บิสฟีนอลเอความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium 18 ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ทำการกวนผสมบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ที่พีเอชเริ่มต้น 7 ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ จากหลอด cool white ฟลูออร์เรสเซนท์ ที่ 12 ชั่วโมงสว่าง 12 ชั่วโมงมืด

สาหร่ายทั้งสองชนิดสามารถกำจัดสารละลายบิสฟีนอลเอที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 30 ไมโครโมลาร์เหลือ 18.08 ไมโครโมลาร์ในวันแรก และลดลงอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 5 วัน โดยความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอของสาหร่าย *C. vulgaris var. vulgaris* ลดลงเป็น16.05 ไมโครโมลาร์ในวันที่ 3 และลดลงอย่างรวดเร็วเป็น 3.60 ไมโครโมลาร์ในวันที่ 5 และหลังจากวันที่ 5 ค่อย ๆ ลดลงจนกระทั่งไม่สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 15

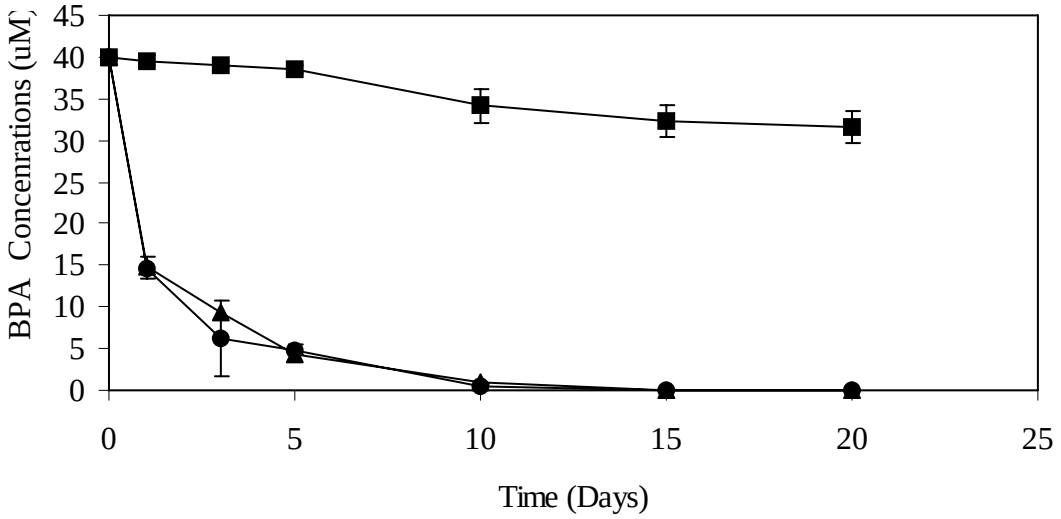
ความเข้มข้นของสารบิสฟีนอลเอหลังจากใส่สาหร่าย *H. hibernicu*s จะลดลงอย่างรวดเร็วจาก 30 ไมโครโมลาร์เหลือ 4.93 ไมโครโมลาร์ในวันที่ 3 และหลังจากวันที่ 3จะค่อยลดลงจนกระทั่งไม่สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 20 ในส่วนของชุดควบคุม ซึ่งไม่มีการเติมสาหร่ายความเข้มข้นของสารบิสฟีนอลเอจะค่อยลดลงจาก 30 ไมโครโมลาร์เหลือ 28.10 ไมโครโมลาร์ภายใน 5 วัน หลังจาก 5 วันจะลดลงเหลือ 27.10 ในวันที่ 10, 25.87 ไมโครโมลาร์ในวันที่ 15 และ 23.85 ในวันที่ 20 ตามลำดับแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงการกำจัดบิสฟีนอลเอในสาหร่าย *Chlorella vulgaris var. vulgaris* (●), *Hapalosiphon hibernicus* (▲)และ ชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมสาหร่าย (■) ทำการทดลองที่บิสฟีนอลเอความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium 18 ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ทำการกวนผสมบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ที่พีเอชเริ่มต้น 7 ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ จากหลอด cool white ฟลูออร์เรสเซนท์ ที่ 12 ชั่วโมงสว่าง 12 ชั่วโมงมืด

ที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 40 ไมโครโมลาร์ สาหร่ายทั้งสองตัวสามารถลดความเข้มข้นของสารบิสฟีนอลเอลงอย่างรวดเร็วจาก 40 ไมโครโมลาร์ในวันแรก *C. vulgaris var. vulgaris*

ลดลงเหลือ 14.68 ไมโครโมลาร์ และ *H. hibernicus* ลดลงเหลือ 14.89 ไมโครโมลาร์ ในวันแรก โดยที่ความเข้มข้นของสารบิสฟีนอลเอของสาหร่าย *C. vulgaris var. vulgaris* ลดลงเหลือ 6.27 ไมโครโมลาร์ในวันที่ 3 และเหลือ 4.89 ไมโครโมลาร์ในวันที่ 5 หลังจาก 5 วันจะค่อย ๆ ลดลงจนกระทั่งไม่สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 15 ขณะที่ความเข้มข้นของสารบิสฟีนอลเอในสาหร่าย *H. hibernicus* ลดลงเหลือ 9.45 ไมโครโมลาร์ในวันที่ 3 และ เหลือ 4.40 ไมโครโมลาร์ในวันที่ 5 และหลังจาก 5 วันค่อย ๆ ลดลงจนกระทั่งไม่สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 15 ในส่วนของชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมสาหร่ายความเข้มข้นของสารบิสฟีนอลเอจะค่อย ๆ ลดลงจาก 40 ไมโครโมลาร์เหลือ 38.52 ไมโครโมลาร์ในวันที่ 3 เหลือ 34.12 ไมโครโมลาร์ในวันที่ 10 เหลือ 32.21 ไมโครโมลาร์ในวันที่ 15 และ เหลือ 31.65 ไมโครโมลาร์ในวันที่ 20 ตามลำดับ ดังที่แสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงการกำจัดบิสฟีนอลเอในสาหร่าย *Chlorella vulgaris var. vulgaris* (●), *Hapalosiphon hibernicus* (▲)และ ชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมสาหร่าย (■) การการทดลองในบิสฟีนอลเอความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium 18 ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ทำการกวนผสมบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ที่พีเอชเริ่มต้น 7 ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ จากหลอด cool white ฟลูออร์เรสเซนท์ ที่ 12 ชั่วโมงสว่าง 12 ชั่วโมงมืด

2.2 ผลของความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้นต่อค่าการกำจัดบีสฟีนอลเอ (BPA removal) ในสาหร่าย *Chlorell vulgaris var. vulgaris*

ผลการของสารละลายบิสฟีนอลเอความเข้มข้นที่ 20, 30 และ 40 ไมโครโมลาร์ ต่อค่าการกำจัดบิสฟีนอลเอโดยสาหร่าย *C. vulgaris var. vulgaris* แสดงดังรูปที่ 7 ระหว่างช่วงระยะเวลา 3 วัน ที่ความเข้มข้นสารละลายบิสฟีนอลเอ 40 ไมโครโมลาร์มีค่าการกำจัดบิสฟีนอลเอสูงที่สุด และที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอ 30 ไมโครโมลาร์มีการกำจัดบิสฟีนอลเอสูงกว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์

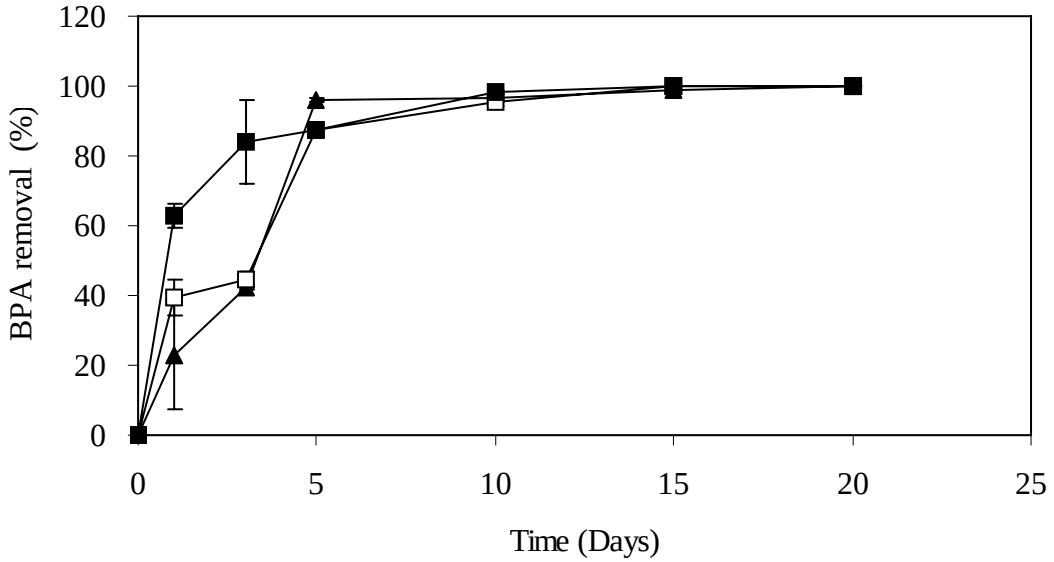
ค่าการกำจัดบิสฟีนอลเอของความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์สามารถกำจัดได้ร้อยละ 23 ในวันแรก และได้ร้อยละ 42 ในวันที่ 3 และการกำจัดได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น ร้อย

ละ 96 ในวันที่ 5 หลังจาก 5 วัน ค่าการกำจัดบิสฟีนอลเอสามารถกำจัดได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนกระทั่งไม่สามารถที่จะตรวจพบได้ในวันที่ 20 คือสามารถกำจัดได้ทั้งหมด

ค่าการกำจัดบิสฟีนอลเอของความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอ 30 ไมโครโมลาร์สามารถกำจัดได้ร้อยละ 39 ในวันแรก และได้ร้อยละ 45 ในวันที่ 3 และการกำจัดได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็นร้อยละ 87 ในวันที่ 5 หลังจาก 5 วัน ค่าการกำจัดบิสฟีนอลเอสามารถกำจัดได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนกระทั่งไม่สามารถที่จะตรวจพบได้ในวันที่ 15 คือสามารถกำจัดได้ ทั้งหมด

ค่าการกำจัดบิสฟีนอลเอของความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอ 40 ไมโครโมลาร์สามารถกำจัดได้อย่างรวดเร็วร้อยละ 63 ในวันแรก และได้ร้อยละ 84 ในวันที่ 3 และการกำจัดได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็นร้อยละ 87 ในวันที่ 5 หลังจาก 5 วัน ค่าการกำจัดบิสฟีนอลเอสามารถกำจัดได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนกระทั่งไม่สามารถที่จะตรวจพบได้ในวันที่ 15 คือสามารถกำจัดได้ทั้งหมด

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าค่าการกำจัดบิสฟีนอลเอของสารละลายบิสฟีนอลเอความเข้มข้นเริ่มต้น 20 30 และ 40 ไมโครโมลาร์จะถูกกำจัดอย่างรวดเร็วภายใน 5 วัน และหลังจาก 5 วันสามารถกำจัดได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อย และท้ายที่สุดแล้วจะไม่สามารถตรวจพบสารบิสฟีนอลเอได้ (ค่า BPA removal เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ100) โดยระหว่างระยะเวลา 5 วันของการเลี้ยงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้นเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ของค่าการกำจัดบิสฟีนอลเอเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นจากผลการทดลองระยะเวลาสัมผัส 5 วันจึงเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมเพราะหลังจากวันที่ 5 ค่าการกำจัดบิสฟีนอลเอกำจัดได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อย



รูปที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลากับค่าการกำจัดบิสฟีนอลเอซึ่งถูกกำจัดโดยสาหร่าย *Chlorella vulgaris var. vulgaris* ที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 20 (▲), 30 (□) และ 40 μM (■) ใส่เซลล์สาหร่าย (OD_{680} ที่ 0.2) ลงในสารละลายบิสฟีนอลเอ ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium 18 ทำการกวนผสมบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ที่ พีเอช

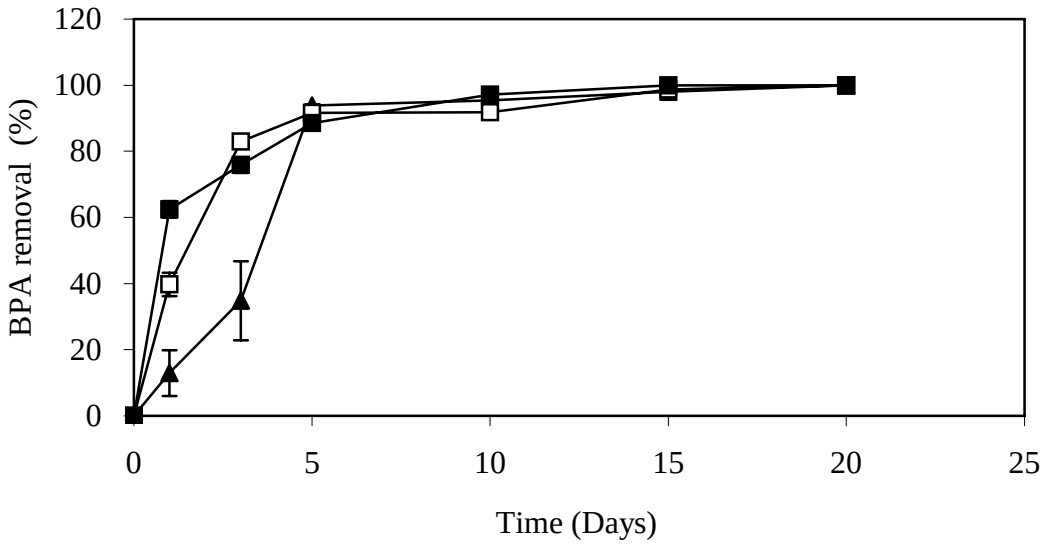
เริ่มต้น 7 ณ อุณหภูมิห้อง ด้วยความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ จากหลอด cool white ฟลูออร์เรสเซนท์ ที่ 12 ชั่วโมงสว่าง 12 ชั่วโมงมืด

ในสาหร่าย *Hapalosiphon hibernicus*

ผลของความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้นที่ 20 30 และ 40 ไมโครโมลาร์ ต่อการกำจัดบิสฟีนอลเอ โดยสาหร่าย *H. hibernicus* แสดงดังรูปที่ 8

ที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 20 ไมโครโมลาร์ สามารถกำจัดบิสฟีนอลเอได้ร้อยละ35 ในวันที่ 3 และการกำจัดได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็นร้อยละ 94 ในวันที่ 5 หลังจาก 5 วัน สามารถกำจัดได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อย จนกระทั่งในวันที่ 20 คือสามารถกำจัดได้ทั้งหมด ที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 30 ไมโครโมลาร์ สามารถกำจัดได้อย่างรวดเร็วถึงร้อยละ 83 ในวันที่ 3 สามารถกำจัดได้ร้อยละ 92 ในวันที่ 5 หลังจาก 5 วัน สามารถกำจัดได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อย จนกระทั่งในวันที่ 20 สามารถกำจัดได้ทั้งหมด และที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 40 ไมโครโมลาร์ สามารถกำจัดได้อย่างรวดเร็วร้อยละ 62 ในวันแรก สามารถกำจัดได้ร้อยละ 76 ในวันที่ 3 และร้อยละ 89 ในวันที่ 5 หลังจาก 5 วัน สามารถกำจัดได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อย จนกระทั่งสามารถกำจัดได้ ทั้งหมดในวันที่ 15

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *H. hibernicus* สามารถกำจัดบิสฟีนอลเอที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 30 และ 40 ไมโครโมลาร์อย่างรวดเร็วภายใน 5 วัน และหลังจาก 5 วันสามารถกำจัดได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อย และท้ายที่สุดแล้วสามารถกำจัดได้ทั้งหมด โดยระหว่างระยะเวลา 5 วันของการเลี้ยง เมื่อความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้นเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้กำจัดได้เพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นจากผลการทดลองระยะเวลาสัมผัส 5 วันจึงเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการกำจัดเพราะหลังจากวันที่ 5 ค่า กำจัดได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อย



รูปที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลากับค่าการกำจัดบิสฟีนอลเอซึ่งถูกกำจัดโดยสาหร่าย *Hapalosiphon hibernicus* ที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 20 (▲), 30 (□) และ 40 ไมโครโมลาร์ (■) นำเซลล์สาหร่าย 60±10 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง ใส่ในสารละลายบิสฟีนอลเอ ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ในอาหาร Medium 18 ทำการกวนผสมบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว

รอบ 100 รอบ/นาที ที่ พีเอชเริ่มต้น 7 ณ อุณหภูมิห้อง ด้วยความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ จากหลอด cool white ฟลูออร์เรสเซนท์ ที่ 12 ชั่วโมงสว่าง 12 ชั่วโมงมืด

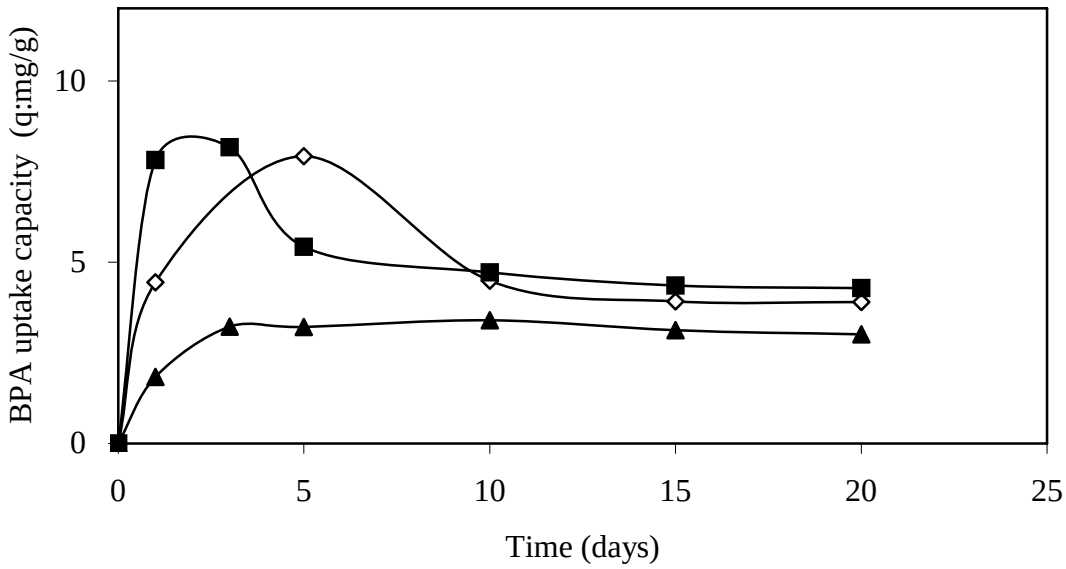
ผลของความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้นต่อค่า BPA uptake capacity ในสาหร่าย *Chlorella vulgaris var. vulgaris*

ผลของความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้นที่ 20 30 และ 40 ไมโครโมลาร์ ต่อค่า BPA uptake capacity โดยสาหร่าย *C. vulgaris var. vulgaris* แสดงดังรูปที่ 9

ที่ความเข้มข้นบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 40 ไมโครโมลาร์มีค่า BPA uptake capacity สูงที่สุดที่ 8.17 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งในวันที่ 3 และที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 30 ไมโครโมลาร์มีค่า maximum BPA uptake capacity สูงกว่าที่ 20 ไมโครโมลาร์ เท่ากับ 7.92 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งในวันที่ 5 และ 3.40 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งในวันที่ 10 ตามลำดับ

ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 20 ไมโครโมลาร์ ที่ BPA uptake capacity สูงที่สุดเท่ากับ 3.40 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งในวันที่10 และหลังจากนั้นจะมีค่าลดลงเล็กน้อยที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 30 ไมโครโมลาร์ ที่ BPA uptake capacity สูงที่สุดเท่ากับ 7.92 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งในวันที่ 5 หลังจากนั้นจะมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วเท่ากับ 4.49 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งในวันที่ 10 และหลังจากนั้นจะมีค่าลดลงเล็กน้อย ที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 40 ไมโครโมลาร์ ที่ BPA uptake capacity สูงที่สุดเท่ากับ 8.17 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งในวันที่ 3 หลังจากนั้นจะมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วเท่ากับ 5.43 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งในวันที่ 5 และหลังจากนั้นจะมีค่าลดลงเล็กน้อย

จากผลการทดลองพบว่าหลังจากวันที่ 10 ค่า BPA uptake capacity ของทุกความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 20 30 และ 40 ไมโครโมลาร์ มีแนวโน้มที่จะลดลงเล็กน้อย เนื่องจากความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอในชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมสาหร่ายมีแนวโน้มที่จะลดลงเล็กน้อย จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การที่ค่าของความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้นมีค่าเพิ่มส่งผลให้ค่า maximum BPA uptake capacity เพิ่มขึ้นด้วย



รูปที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลากับค่า BPA uptake capacity ซึ่งถูกกำจัดโดยสาหร่าย *Chlorella vulgaris var. vulgaris* ที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 20 (▲), 30 (□) และ 40 ไมโครโมลาร์ (■) นำเซลล์สาหร่ายใส่ลงในสารละลายบิสฟีนอลเอ ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ในอาหาร Medium 18 ทำการกวนผสมบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ที่พีเอชเริ่มต้น 7 ณ อุณหภูมิห้อง ด้วยความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ จากหลอด cool white ฟลูออร์เรสเซนท์ ที่ 12 ชั่วโมงสว่าง 12 ชั่วโมงมืด

ในสาหร่าย *Hapalosiphon hibernicus*

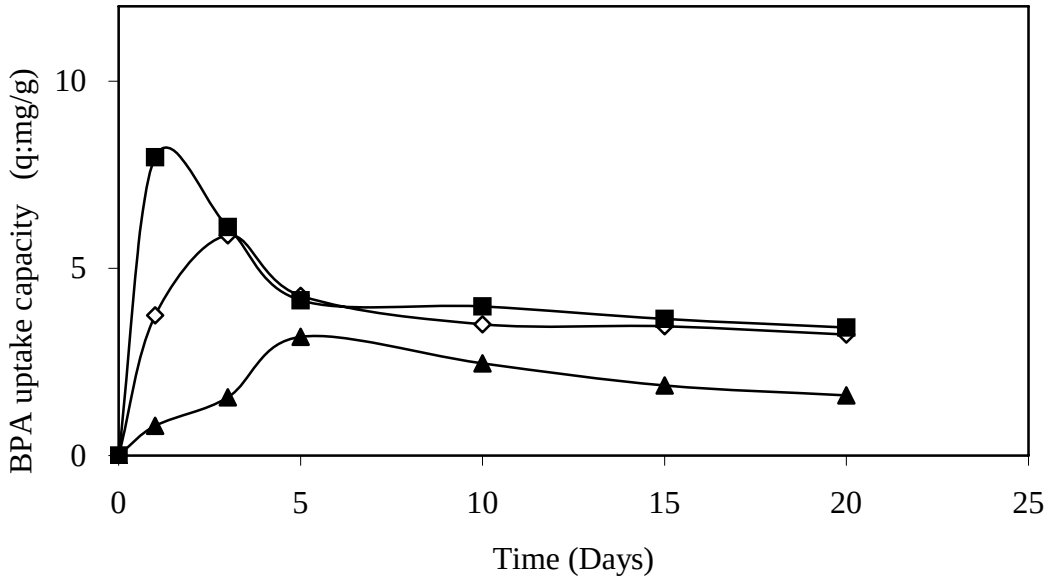
ผลการทดลองแสดงผลของความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้นที่ 20, 30 และ 40 ไมโครโมลาร์ ต่อค่า BPA uptake capacity โดยสาหร่าย *H. hibernicus* แสดงดังรูปที่ 10

ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 40 ไมโครโมลาร์มีค่า BPA uptake capacity สูงที่สุดที่ 7.97 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งภายในวันแรก และที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 30 ไมโครโมลาร์มีค่า Maximum BPA uptake capacity สูงกว่าที่ 20 ไมโครโมลาร์ เท่ากับ 5.88 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งในวันที่ 3 และ 3.17 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งในวันที่ 5 ตามลำดับ

ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 20 ไมโครโมลาร์ ที่ BPA uptake capacity สูงที่สุดเท่ากับ 3.17 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งในวันที่ 5 และหลังจากนั้นจะมีค่าลดลงเล็กน้อย ที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 30 ไมโครโมลาร์มี BPA uptake capacity สูงที่สุดเท่ากับ 5.88 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งในวันที่ 3 หลังจากนั้นจะมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วเท่ากับ 4.27 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งในวันที่ 5 และหลังจากนั้นจะมีค่าลดลงเล็กน้อย ที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 40 ไมโครโมลาร์ มี BPA uptake capacity สูงที่สุดเท่ากับ 7.97 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งภายในวันแรก หลังจากนั้นจะมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วเท่ากับ 4.15 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งในวันที่ 5 และหลังจากนั้นจะมีค่าลดลงเล็กน้อย

จากผลการทดลองพบว่าหลังจากวันที่ 5 ค่า BPA uptake capacity ของทุกความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 20 30 และ 40 ไมโครโมลาร์ มีแนวโน้มที่จะลดลงเล็กน้อย เนื่องจากความ

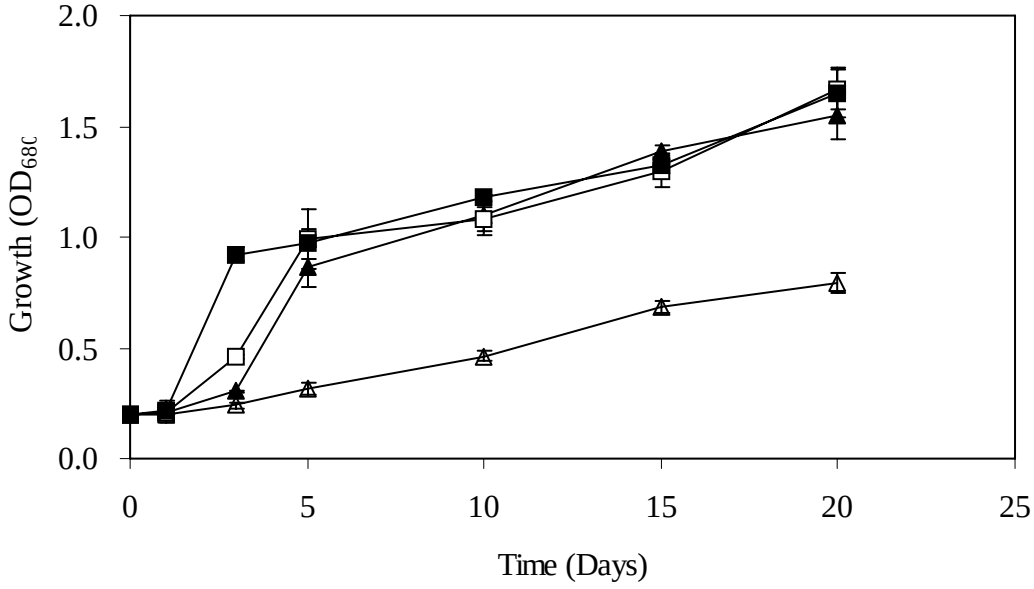
เข้มข้นของบิสฟีนอลเอในชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมสาหร่ายมีแนวโน้มที่จะลดลงเล็กน้อย จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การที่ค่าของความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้นมีค่าเพิ่มส่งผลให้ค่า BPA uptake capacity สูงสุดเพิ่มขึ้นด้วย



รูปที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลกับค่า BPA uptake capacity ซึ่งถูกกำจัดโดยสาหร่าย *Hapalosiphon hibernicus* ที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 20 (▲), 30 (□) และ 40 ไมโครโมลาร์ (■) นำเซลล์สาหร่าย 60±10 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง ใส่ลงในสารละลายบิสฟีนอลเอ ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ในอาหาร Medium 18 ทำการกวนผสมบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ที่ พีเอชเริ่มต้น 7 ณ อุณหภูมิห้อง ด้วยความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ จากหลอด cool white ฟลูออร์เรสเซนท์ ที่ 12 ชั่วโมงสว่าง 12 ชั่วโมงมืด

ผลของความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้นต่อการเจริญเติบโตในสาหร่าย *Chlorella vulgaris var. vulgaris*

รูปที่ 11 แสดงผลของความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. vulgaris var. vulgaris* พบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้นที่ 20 30 และ 40 ไมโครโมลาร์ มีการเจริญเติบโตแตกต่างกันเล็กน้อย และที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 40 ไมโครโมลาร์ มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดและที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 30 ไมโครโมลาร์โตได้ดีกว่าที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารบิสฟีนอลเอที่ความเข้มข้นระหว่าง 20-40 ไมโครโมลาร์สามารถช่วยในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. vulgaris var. vulgaris*

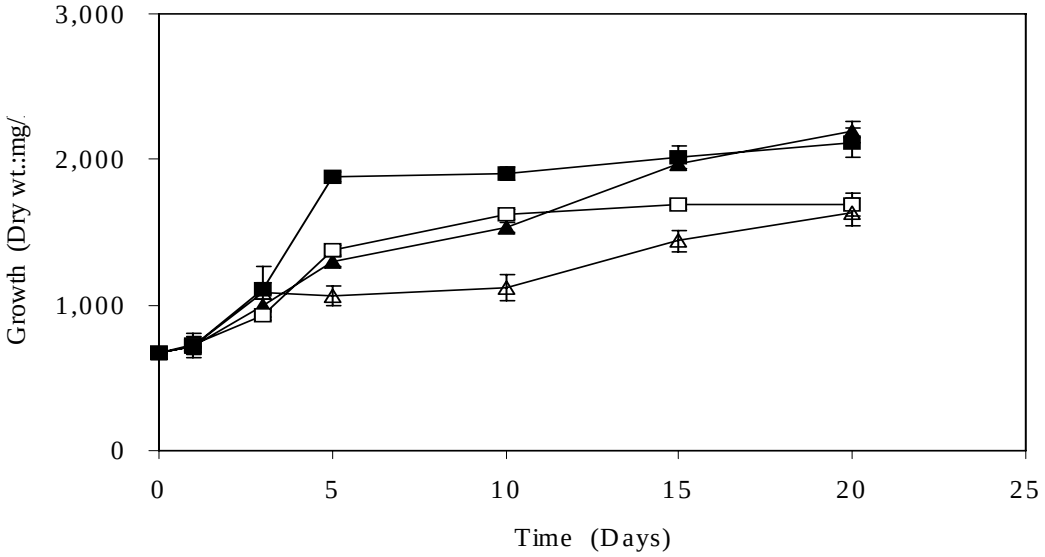


รูปที่ 11 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella vulgaris var. vulgaris* ในสารละลายบิสฟีนอลเอ ที่ความเข้มข้น 20 (▲), 30 (□), 40 ไมโครโมลาร์ (■) และชุดควบคุม (Δ) นำเซลล์สาหร่ายใส่ลงในสารละลายบิสฟีนอลเอ ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ในอาหาร Medium 18 ทำการกวนผสมบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ที่ พีเอชเริ่มต้น 7 ณ อุณหภูมิห้อง ด้วยความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ จากหลอด cool white ฟลูออร์เรสเซนท์ ที่ 12 ชั่วโมงสว่าง 12 ชั่วโมงมืด

ในสาหร่าย *Hapalosiphon hibernicus*

รูปที่ 12 แสดงผลของความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอความเข้มข้นเริ่มต้น 20 30 และ 40 ไมโครโมลาร์ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *H. hibernicus* พบว่าสามารถโตได้อย่างรวดเร็วภายใน 5 วัน และตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งถึงวันที่ 10 ที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 40 ไมโครโมลาร์มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด และที่ความเข้มข้นสารละลายบิสฟีนอลเอเริ่มต้น 30 ไมโครโมลาร์สูงกว่าที่ 20 ไมโครโมลาร์ ในวันที่ 10 ที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอความเข้มข้นเริ่มต้น 20, 30, 40 และแบลงค์มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1,533 1,622 1,900 และ 1,122 มิลลิกรัม/ลิตรตามลำดับ และหลังจากวันที่ 10 ของทุกสภาวะการทดลองน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ในวันที่ 20 ที่ความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอความเข้มข้นเริ่มต้น 20 30 และ 40 มีค่าน้ำหนักแห้งเท่ากับ 2,189 1,689 และ 2,116 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ในส่วนของแบลงค์ซึ่งไม่มีการเติม

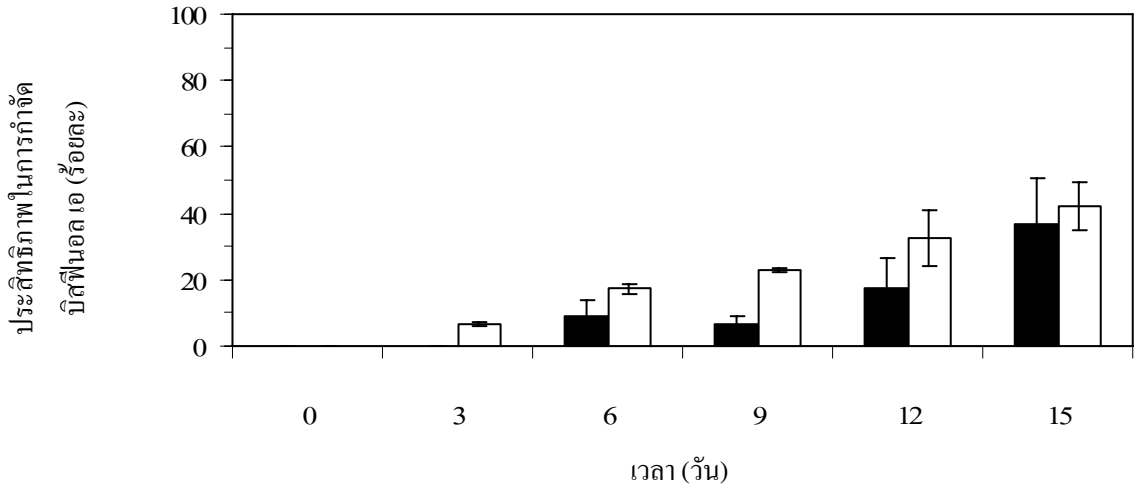
สารบิสฟีนอลเอจะมีอัตรการการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจากเริ่มต้นจนกระทั่งวันที่ 10 และต่อจากนั้นจะมีอัตราการเจริญเพิ่มสูงขึ้นจนในวันที่ 20 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1,639 มิลลิกรัม/ลิตร



รูปที่ 12 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Hapalosiphon hibernicus* ในสารละลายบิสฟีนอลเอ ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 (Δ), 30 (□), 40 ไมโครโมลาร์ (■) และชุดควบคุม (▲) นำเซลล์สาหร่าย 60±10 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง ใส่ลงในสารละลายบิสฟีนอลเอ ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium 18 ทำการกวนผสมบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ที่ พีเอชเริ่มต้น 7 ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ จากหลอดcool white ฟลูออร์เรสเซนท์ ที่ 12 ชั่วโมงสว่าง 12 ชั่วโมงมืด

2.3 ผลของอายุเซลล์เริ่มต่อการกำจัดบิสฟีนอล เอ

จากการทดลองพบว่าที่อายุเซลล์แตกต่างกันทำให้ความสามารถในการกำจัดบิสฟีนอล เอ แตกต่างกัน ดังในรูปที่ 13 แสดงให้เห็นว่าในระหว่างวันที่ 6 ถึงวันที่ 15 ของการทดลองทั้งสองอายุเซลล์มีการกำจัดบิสฟีนอล เอ เพิ่มขึ้น ซึ่งในวันสุดท้ายของการทดลองที่อายุเซลล์ 7 และ 14 วัน สามารถกำจัดบิสฟีนอล เอ ได้ร้อยละ 37 และ 42 ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าที่อายุเซลล์ 14 วัน กำจัดบิสฟีนอล เอ ได้สูงกว่าที่อายุเซลล์ 7 วัน เนื่องจากที่อายุเซลล์ 14 วัน อยู่ในช่วงเอคโปแนนเชียลเฟส ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว ส่วนที่อายุเซลล์ 7 วัน อาจอยู่ในช่วง แลคเฟสซึ่งเป็นระยะที่เซลล์เริ่มปรับตัวจึงไม่มีการแบ่งเซลล์มากเท่าใน 14 วัน ดังนั้นในแต่ละอายุเซลล์ที่มีกิจกรรมของเซลล์ที่แตกต่างกันทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดบิสฟีนอล เอแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Li และคณะ (3) พบว่าในการย่อยสลายบิสฟีนอล เอ โดย *Stephanodiscus hantzschii* ที่ระยะ เอคโปแนนเชียลเฟส สามารถย่อยสลายบิสฟีนอล เอ ได้อย่างรวดเร็ว

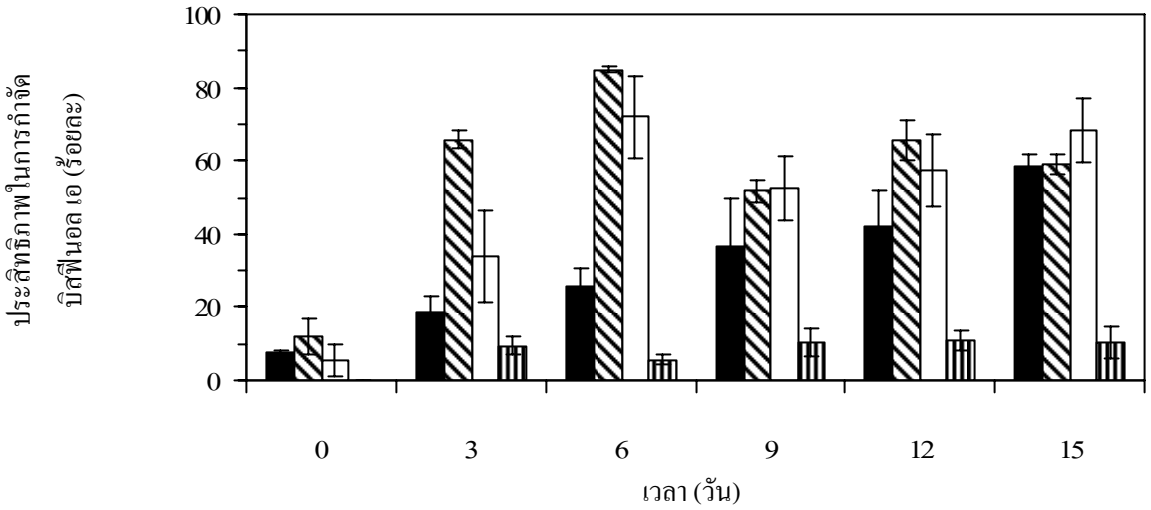


รูปที่ 13 ประสิทธิภาพในการกำจัดบิสฟีนอล เอ ของ *H. hibernicus* ในเซลล์อายุ 7 วัน (■) และอายุเซลล์ 14 วัน (□) เลี้ยงที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอล เอ เริ่มต้น 40 ไมโครโมลาร์ ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 40 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง พีเอชเริ่มต้น 7.5 อุณหภูมิห้อง 28-32 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาทีที่ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ปรับให้มืด 12 ชั่วโมง และสว่าง 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 15 วัน

3. ผลของแอคไคมาไทซ์เซลล์ ต่อการกำจัดบิสฟีนอล เอ

ผลการทดลองในรูปที่ 14 พบว่าเซลล์ที่ผ่านการแอคไคมาไทซ์สามารถสามารถกำจัดบิสฟีนอลเอได้เพิ่มขึ้น โดยเซลล์ที่ผ่านการแอคไคมาไทซ์ที่ความเข้มข้นบิสฟีนอล เอ 40 45 และ 50 ไมโครโมลาร์ จะมีค่าการกำจัดบิสฟีนอล เอ สูงกว่าการใช้เซลล์ปกติเนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียสามารถปรับตัวและลดความเป็นพิษของบิสฟีนอล เอ เพื่อที่จะมีชีวิตรอด ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Chen และคณะ (4) ในน้ำเสียโปรไพโอนิก/แอซิติก แอซิด (propionic/acetic acids) และ activated sludge พบว่ามวลชีวภาพ (biomass) ที่ผ่านการแอคไคมาไทซ์ สามารถอัพเทคออโทฟอสเฟต (ortho-phosphate) ได้มากกว่ามวลชีวภาพที่ไม่ผ่านการแอคไคมาไทซ์ และในการศึกษาของ Ye และ Shen (5) พบว่าอัตราการย่อยสลายของสารคลอโรฟีโนลิก (chlorophenolic) จะเพิ่มขึ้นโดยการแอคไคมาไทซ์เซชั่นของ anaerobic sludge นอกจากนี้ในการศึกษาของ Lobos (6) พบว่าการย่อยสลายบิสฟีนอล เอ โดย gram-negative aerobic bacteria โดยเซลล์ที่เจริญเติบโตในอาหาร PAS ที่ผสมบิสฟีนอล เอ สามารถย่อยสลายบิสฟีนอล เอ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลลาร์ ได้เร็วกว่าเซลล์ที่เจริญเติบโตในอาหาร PAS ที่ผสมกลูโคส 4 ชั่วโมง จากงานวิจัยนี้ศึกษากำจัดบิสฟีนอล เอ โดยใช้เซลล์ที่ผ่านการแอคไคมาไทซ์ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอล เอ 55 ไมโครโลลาร์ พบว่าสามารถกำจัดบิสฟีนอล เอ ได้น้อยกว่าเซลล์ที่ผ่านการแอคไคมาไทซ์ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอล เอ อื่นๆ เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของบิสฟีนอล เอ เพิ่มสูงขึ้นเวลาที่ใช้ในการปรับตัวของการแอคไคมาไทซ์ที่ 4 สัปดาห์ อาจจะไม่เพียงพอต่อการปรับตัวของเซลล์ ซึ่งอาจจะต้องใช้ระยะเวลาที่นานขึ้นในการปรับตัวในสารละลายที่มีบิสฟีนอล เอ ที่สูง จากการศึกษาของ Ozbelge และคณะ (7) ในเชื้อผสม (mix cultured) ของกลุ่มจุลชีพ จากโรงบำบัดน้ำเสีย พบว่าระยะเวลาที่เพียงพอมีความจำเป็นสำหรับการ

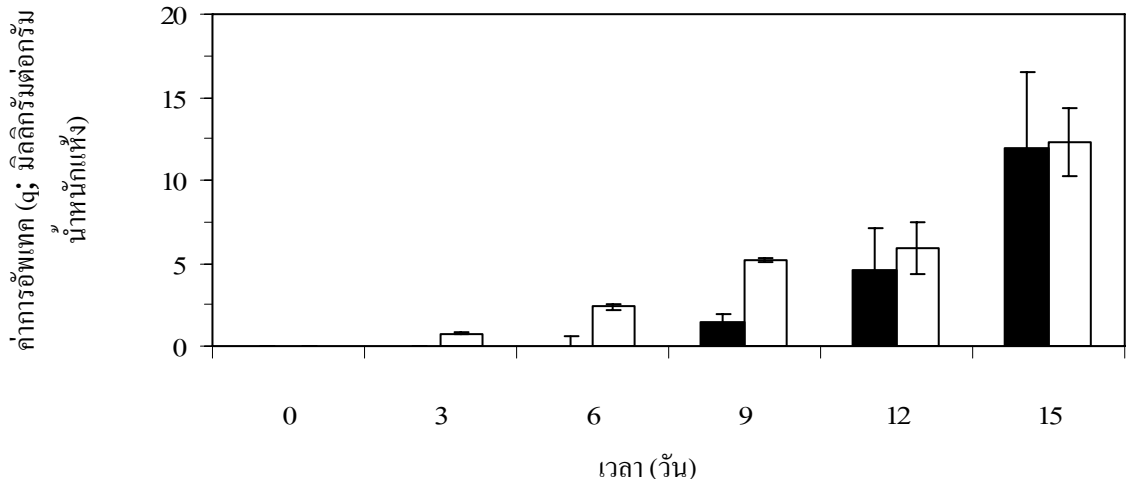
แอคไคมาไทซ์เซชั่นของกลุ่มจุลชีพต่อโลหะหนัก คือเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นกลุ่มจุลชีพสามารถเพิ่มการยับยั้งผลกระทบที่เกิดจากโลหะหนัก



รูปที่ 14 ประสิทธิภาพในการกำจัดบิสฟีนอล เอ ของ *H. hibernicus* ในเซลล์ที่ แอคไคมาไทซ์ ที่ความเข้มข้นบิสฟีนอล เอ 40 ไมโครโมลลาร์ (■), 45 ไมโครโมลลาร์ (▨), 50 ไมโครโมลลาร์ (□) และ 55 ไมโครโมลลาร์ (▥) เลี้ยงที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอล เอ เริ่มต้น 40 ไมโครโมลลาร์ อุณหภูมิห้อง 28-32 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาทีที่ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ปรับให้มืด 12 ชั่วโมง และสว่าง 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 15 วัน

ผลของอายุเซลล์เริ่มต้นต่อการอัพเทคบิสฟีนอล เอ

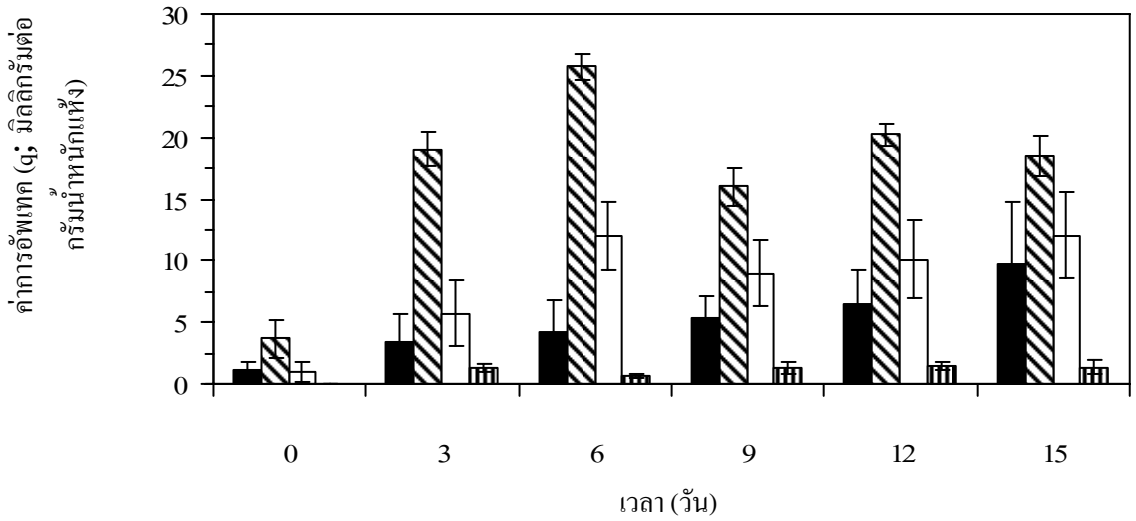
การอัพเทคของเซลล์ทั้งสองจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจากวันแรกถึงวันที่ 15 แต่ค่าการอัพเทคของอายุเซลล์ที่ 14 วัน จะสูงกว่าที่อายุเซลล์ 7 วัน โดยในวันที่ 15 ของการทดลองที่อายุเซลล์ 7 และ 14 วัน มีค่าการอัพเทคเท่ากับ 11.94 และ 12.26 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 15 จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นเซลล์มีการอัพเทคบิสฟีนอล เอ ได้มากขึ้น เนื่องจากเป็นการอัพเทคเข้าไปภายในเซลล์โดยใช้พลังงาน ไม่ใช่การดูดซับที่ผิวเซลล์แบบการแลกเปลี่ยนอิออน



รูปที่ 15 ค่าการอัพเทคบิสฟีนอล เอ ของ *H. hibernicus* ในเซลล์อายุ 7 วัน (■) และอายุเซลล์ 14 วัน (□) เลี้ยงที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอล เอ เริ่มต้น 40 ไมโครโมลาร์ ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 40 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง พีเอชเริ่มต้น 7.5 พีเอชเริ่มต้น 7.5 อุณหภูมิห้อง 28-32 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ปรับให้มืด 12 ชั่วโมง และสว่าง 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 15 วัน

ผลของแอคไคมาไทซ์เซลล์ต่อการอัพเทคบิสฟีนอล เอ

การอัพเทคบิสฟีนอล เอ ของเซลล์ที่ผ่านการแอคไคมาไทซ์ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอล เอ 40 45 50 และ 55 ไมโครโมลาร์มาแล้วเป็นเวลาหนึ่งเดือน พบว่า จากวันแรก ถึงวันที่ 6 ค่าการอัพเทคของเซลล์ที่ผ่านการแอคไคมาไทซ์ ที่ความเข้มข้นบิสฟีนอล เอ 45 ไมโครโมลาร์ เพิ่มขึ้นจาก 3.66 ถึง 25.74 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเซลล์ที่ผ่านการแอคไคมาไทซ์ ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เพิ่มขึ้นจาก 0.89 ถึง 11.97 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แล้วจากวันที่ 6 ถึงวันที่ 9 ของการทดลองค่าการอัพเทคบิสฟีนอล เอ ของทั้งสองเซลล์จะลดลงและหลังจากวันที่ 9 จะเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยจนกระทั่งวันสุดท้ายของการทดลอง สำหรับค่าการอัพเทคบิสฟีนอล เอ จากวันแรกถึงวันที่ 15 ของเซลล์ที่ผ่านการแอคไคมาไทซ์ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอล เอ 40 ไมโครโมลาร์ จะเพิ่มขึ้นจาก 1.19 ถึง 9.70 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จากวันแรกถึงวันที่ 15 ของการทดลองค่าการอัพเทคบิสฟีนอล เอของเซลล์ที่ผ่านการแอคไคมาไทซ์ด้วยบิสฟีนอล เอ ที่ความเข้มข้น 55 ไมโครโมลาร์ ไม่มีความแตกต่างกันตลอดการทดลองโดยในวันที่ 15 ของการทดลองค่าการอัพเทคบิสฟีนอล เอ เท่ากับ 1.33 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง สำหรับเซลล์ที่ผ่านการแอคไคมาไทซ์สามารถเพิ่มการอัพเทคบิสฟีนอล เอ ได้เนื่องจากเซลล์มีการปรับสภาพให้สามารถดำรงชีวิตในสารอาหารที่มีบิสฟีนอล เอสูงขึ้นโดยอาจเพิ่มการอัพเทคเข้าไปในเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 16



รูปที่ 16 ค่าการอัพเทคบิสฟีนอล เอ ของ *H. hibernicus* ในเซลล์ที่แอคไคมาไทซ์ ที่ความเข้มข้นบิสฟีนอล เอ 40 ไมโครโมลาร์ (■), 45 ไมโครโมลาร์ (▨), 50 ไมโครโมลาร์ (□) และ 55 ไมโครโมลาร์ (▥) เลี้ยงที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอล เอ เริ่มต้น 40 ไมโครโมลาร์ ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 40 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง พีเอชเริ่มต้น 7.5 อุณหภูมิห้อง 28-32 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาทีที่ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ปรับให้มืด 12 ชั่วโมง และสว่าง 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 15 วัน

4. การเลี้ยงสาหร่ายเพื่อสกัดโพลิแซคคาร์ไรด์

เลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon hibernicus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ M-18 ที่มีบิสฟีนอล เอความเข้มข้นสูง เพื่อให้เซลล์ปรับตัวให้สามารถทนความเข้มข้นบิสฟีนอล เอ สูงขึ้นได้ และงานอีกส่วนอยู่ในระหว่างเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon hibernicus* เพื่อสกัดโพลิแซคคาไรด์ให้ได้ปริมาณมากเพียงพอไม่น้อยกว่า 5 กรัมน้ำหนักแห้ง เพื่อจะนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำตาลต่อไป

5. การวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิแซคคาไรด์

ทำการสกัดโพลิแซคคาร์ไรด์ และนำไป วิเคราะห์องค์ประกอบโพลิแซคคาร์ไรด์ พบว่าประกอบด้วยน้ำตาล โมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ D (-) fructose ร้อยละ 3.99 D(-)galactose 2.53 D(+)galacturonic acod 8.29 D(-) glucose 9.31 D(-) glucuronic acid 20.31 D(-) mannose 5.08 และอื่นๆ 50.49

6. ผลการนำเซลล์ปกติและแอคไคมาไทซ์เซลล์ มากำจัดบิสฟีนอล เอ ในน้ำชะขยะ

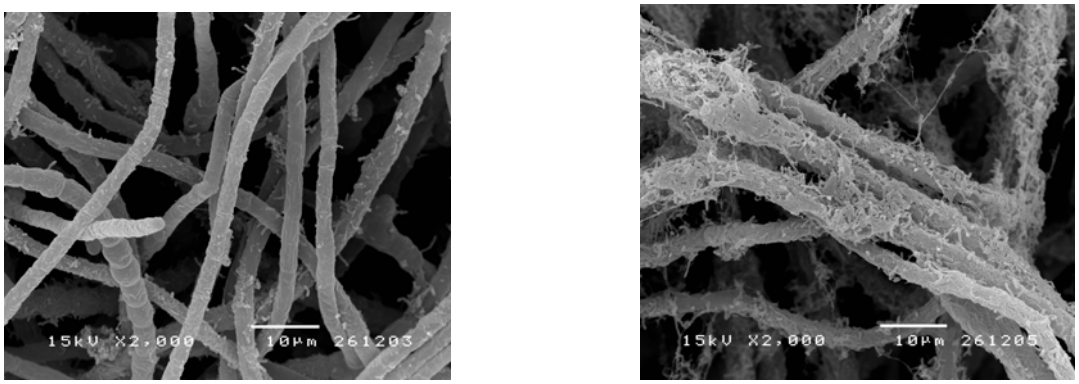
ศึกษาการกำจัดบิสฟีนอลเอในน้ำชะขยะจากหลุมฝังกลบขยะอันตรายแห่งหนึ่ง พบว่าเมื่อนำเซลล์ปกติและเซลล์ที่ผ่านการแอคไคมาไทซ์มากำจัดบิสฟีนอล เอ ในน้ำชะขยะที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 40 60 พบว่าทั้งสองชนิดเซลล์จะมีลักษณะการกำจัดบิสฟีนอล เอ ที่คล้ายคลึงกันคือจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากวันแรกถึงวันที่ 6 และจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึงวันที่ 9 ภายในเวลา 9 วันเซลล์ปกติสามารถกำจัดบิสฟีนอล เอ ในน้ำชะขยะที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 40 60 ได้เท่ากับร้อยละ 90 78 และ 71 ตามลำดับ ส่วนเซลล์ที่

ผ่านการแอคคามาไทซ์สามารถกำจัดบิสฟีนอล เอในน้ำชะขยะที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 40 และ 60 ได้เท่ากับร้อยละ 98 91 และ 79 ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองในน้ำชะขยะที่ปราศจากไซยาโนแบคทีเรียเองก็สามารถกำจัดบิสฟีนอล เอได้ เนื่องจากในน้ำชะขยะเองโดยธรรมชาติมีกลุ่มแบคทีเรีย รา และสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ที่สามารถย่อยสลายบิสฟีนอล เอ ได้ปะปนอยู่โดยจากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า กลุ่มของจุลชีพ (microorganism consortium) จากระบบบำบัดน้ำเสียสามารถมีชีวิตรอดและย่อยสลายสารประกอบฟีโนลิกได้ ซึ่งจากงานวิจัยของ Jusoh และ Razali (8) พบว่า กลุ่มของจุลชีพที่แยกจากระบบบำบัดน้ำเสียสามารถย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ร้อยละ 93 ภายใน 14 วัน และจากการศึกษาของ Zhang และคณะ (9) พบว่า *Achromobacter xylosoxidans* strain B-16 ที่แยกจากน้ำชะขยะสามารถย่อยสลายบิสฟีนอล เอ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ร้อยละ 27.3 ภายใน 3 วัน

ในระหว่างการทดลองหลังจากเลี้ยง *H. hibernicus* ในบิสฟีนอล เอ จากการสังเกตด้วยตาพบว่าไซยาโนแบคทีเรียมีการผลิตโพลีแซคคาไรด์ออกมาภายนอกเซลล์ มีสีครีมขุ่น มีทั้งที่เป็นแผ่นเมือกหุ้มตัวเซลล์และเป็นคอลลอยล์อยู่ในสารละลาย โดยจากการศึกษาก่อนหน้าของ ฐิติพร (10) พบว่า *H. hibernicus* ที่เลี้ยงในสารละลายอาหารที่มีบิสฟีนอล เอ จะผลิตโพลีแซคคาไรด์ออกมาภายนอกเซลล์ เมื่อนำเซลล์มาถ่ายรูปด้วยกล้องอิเลคตรอนพบว่าเซลล์ปกติที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากบิสฟีนอล เอ จะเห็นรูปร่างเป็นเส้นสายของไซยาโนแบคทีเรียตามปกติ (รูปที่ 17 ก) ส่วนเซลล์ที่เลี้ยงในบิสฟีนอลเอจะมีลักษณะ แตกต่างจากเซลล์ปกติ คือมองเห็นเมือกของโพลิแซคคาไรด์เกาะหุ้มตามผิวเซลล์ทั่วไป (รูปที่ 18 ข) สำหรับการผลิตโพลีแซคคาไรด์ของไซยาโนแบคทีเรียนั้นอาจเป็นกลไกในการป้องกันตัวเองของไซยาโนแบคทีเรียจากบิสฟีนอล เอ โดยจากการศึกษาของ Ruangsomboon และคณะ (11) พบว่าในระหว่างการกำจัดตะกั่วของ *Gloeocapsa gelatinosa* และ *Calothix marchuca* จะผลิตแคปซูลลาร์โพลีแซคคาไรด์และเอกโซโพลีแซคคาไรด์ปกคลุมผิวเซลล์ ซึ่งจะทำการศึกษากลไกในการกำจัดบิสฟีนอล เอ ต่อไป

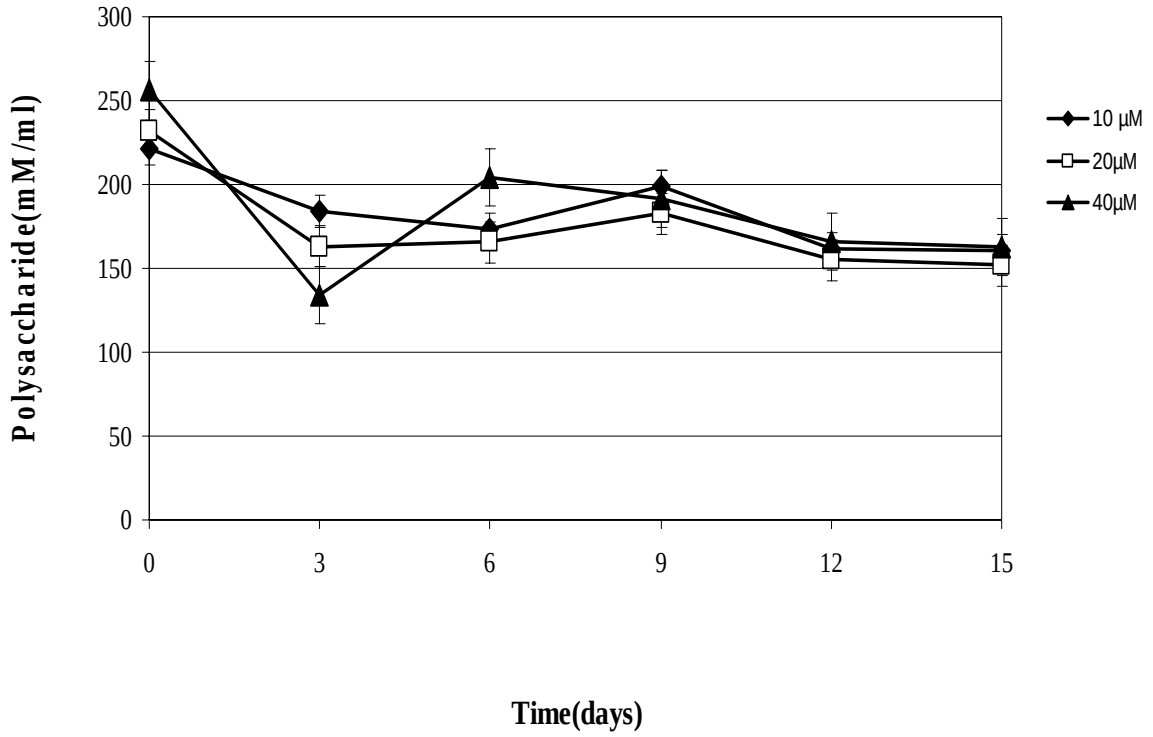
ก ข



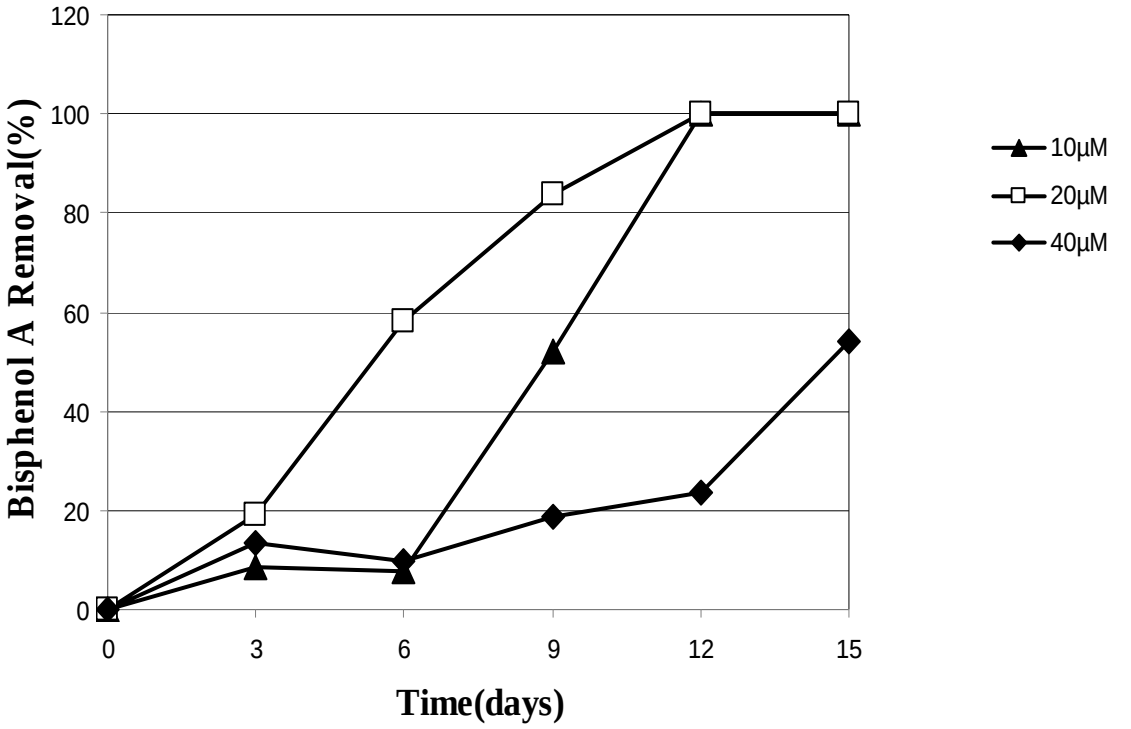
รูปที่ 17 แสดงรูปเซลล์ปกติของ *H. hibernicus* ภายใต้ สแกนนิงอิเลคตรอนไมโครสโคป (SEM: JEOL รุ่น JSM- 5410LV) กำลังขยาย 2000 เท่า ไซยาโนแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากบิสฟีนอล เอ (ก) และที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีบิสฟีนอล เอ เข้มข้น 55 ไมโครโมลาร์ (ข) เป็นเวลา 7 วัน

7. ศึกษาผลของความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอต่อการผลิตโพลิแซคคาร์ไรด์และการกำจัดบิสฟีนอลเอ

รูปที่ 18 แสดง ผลการผลิตโพลีแซ็กคาร์ไรด์ของสาหร่าย *Hapalosiphon hibernicus* ที่ความเข้มข้นบิสฟีนอล เอ ที่ 10 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ พบว่าการผลิตโพลีแซ็กคาร์ไรด์ของ *Hapalosiphon hibernicus* ที่เลี้ยงใน ในทั้ง 3 ความเข้มข้น พบว่าการผลิดโพลีแซ็กคาร์ไรด์นั้นไม่แตกต่างกันและที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ พบโพลีแซคคาร์ไรด์มากที่สุดพบในวันที่ 6 ของการทดลองและพบว่าตั้งแต่วันที่ 12 จนถึงวันที่ 15 ของการทดลองพบว่าการผลิตโพลีแซคคาร์ไรด์คงที่

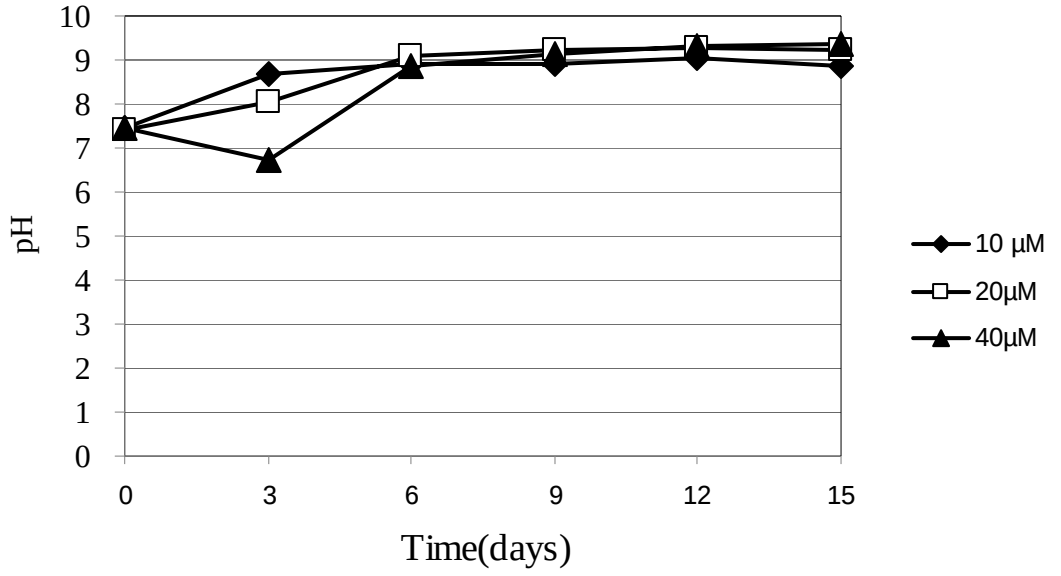


รูปที่ 18 แสดงปริมาณโพลิแซคคาร์ไรด์ที่สาหร่าย *Hapalosiphon hibernicus* ผลิตขึ้น ในสภาวะที่เลี้ยงสาหร่ายในความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ ที่ 10 (◆), 20 (■)และ 40(▲) ไมโครโมลาร์ที่เวลาต่างๆกัน



รูปที่ 19 แสดงการกำจัดบิสฟีนอลเอ โดยสาหร่าย *Hapalosiphon hibernicus* ในสภาวะที่เลี้ยงสาหร่ายในความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ ที่ 10 (◆), 20 (■)และ 40(▲) ไมโครโมลาร์ ที่เวลาต่างๆกัน

รูปที่ 19 แสดงผลการกำจัดสารบิสฟีนอลเอ โดยใช้สาหร่าย *H. hybernicus* ที่ความเข้มข้น 10 20 และ 40 ไมโครโมล พบว่าที่ความเข้มข้นบิสฟีนอลเอ 10 ไมโครโมลการกำจัดสารบิสฟีนอลเอของสาหร่าย จะคงที่จนถึงวันที่ 6 และเพิ่มขึ้นสูงสุดจนสามารถกำจัดได้ทั้งหมดในที่ 12 และที่ความเข้มข้นบิสฟีนอลเอที่ 20 ไมโครโมล สามารถกำจัดบิสฟีนอลเอได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนถึงวันที่ 12 สามารถกำจัดสารบิสฟีนอลเอ ได้ ทั้งหมด (สูงสุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์) และที่ความเข้มข้นบิสฟีนอลเอ 40 ไมโครโมลาร์ สาหร่ายสามารถกำจัดสารบิลฟีนอลเอได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อยระหว่างวันที่ 3-12 และกำจัดได้ ที่ ร้อยละ 54.29 ในวันที่ 15 ของการทดลอง ระหว่างทำการศึกษา ได้วัดค่า pH ของระบบ พบว่า ที่ทุกความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ pH ค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 20



รูปที่ 20 แสดงค่าพีเอชของระบบ ในสภาวะที่เลี้ยงสาหร่าย *Hapalosiphon hibernicus* ที่ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ ที่ 10 (◆), 20 (■)และ 40(▲) ไมโครโมลาร์ ที่เวลาต่างๆกัน

สรุป

ผลจากการคัดแยกสาหร่ายพบว่าสาหร่ายขนาดเล็กมีศักยภาพสูงในการกำจัดบีสฟีนอลเอ โดยทำการเลือกสาหร่ายมาศึกษา 2 ชนิดคือ *C. vulgaris var. vulgaris* และไซยาโนแบคทีเรีย *H. hibernicus* สาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris var. vulgaris* มี การกำจัดบิสฟีนอลเอ และ BPA uptake capacity สูงถึงร้อยละ 87 และ 2.84 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง และมีการเจริญเติบโตสูงสุด และ *H. hibernicus* มีการกำจัดบิสฟีนอลเอ และ BPA uptake capacity สูงถึงร้อยละ 97 และ 3.46 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง และมีการเจริญเติบโตสูงสุด นอกจากนี้การที่ *H. hibernicus* เป็นสาหร่ายที่มีลักษณะเป็นเส้นสายทำให้เหมาะที่จะนำมาประยุกต์ใช้จริงเพราะสามารถแยกเซลล์ออกจากน้ำที่บำบัดแล้วได้ง่ายด้วยการกรอง *C. vulgaris var. vulgaris* มีการเจริญเติบโตสูงกว่า *H. hibernicus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium-18 ที่มี 20 ไมโครโมลาร์ บิสฟีนอลเอ ในการเลี้ยง 5 วัน

ที่ความเข้มข้นของเริ่มต้นบีสฟีนอล เอ 20 30 และ 40 ไมโครโมลาร์ ทั้งใน *Chlorella vulgaris var. vulgaris* และ *H. hibernicus* สามารถกำจัด บีสฟีนอล เอได้อย่างรวดเร็วใน 5 วัน หลังจากนั้นจะกำจัดได้ช้าลงจนหมดใน 20 วัน

ในสาหร่าย *C. vulgaris var. vulgaris* มีการเจริญที่แตกต่างกันในแต่ละความเข้มข้นของบีสฟีนอล เอ โดยที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ มีการเจริญเติบโตสูงสุด และที่ 30 มโครโมลาร์ มีการเจริญมากกว่าที่ 20 มโครโมลาร์ ส่วนใน *H. hibernicus* ที่ความเข้มข้น 20, 30 และ 40 ไมโครโมลาร์ มีค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์สูงสุด ที่ 2,189, 1,689 and 2,116 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ศึกษาการกำจัด บิสฟีนอล เอ ในน้ำชะขยะจากหลุมฝังกลบขยะอันตรายแห่งหนึ่ง พบว่าภายในเวลา 9 วัน เซลล์ที่ผ่านการแอคไคมาไทซ์ กำจัดบิสฟีนอลเอ ได้สูง ร้อยละ 98 91 และ 79 ตามลำดับ และในระหว่างการทดลองพบว่า *H. hibernicus* ผลิตโพลีแซคคาไรด์ออกมานอกเซลล์ ซึ่งเป็นกลไกป้องกันความเป็นพิษต่อเซลล์ ทำการสกัดโพลิแซคคาร์ไรด์ และนำไป วิเคราะห์องค์ประกอบโพลิแซคคาร์ไรด์ พบว่าประกอบด้วยน้ำตาล โมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ ฟรุคโตส กาแลคโตส การแลคทูโลนิค เอซิด กลูโคส กลูคูโรนิค เอซิด และแมนโนส

เอกสารอ้างอิง

1. Inthorn D., Nagase H., Isaji Y., Hirata K. and Miyamoto K. Removal of cadmium from aqueous solution by filamentous cyanobacterium *Tolypothrix tenuis.* J. Ferment. Bioeng. (1996), 82: 580- 584.
2. อทิยา สพานกลาง.2553.กลไกการกำจัดพิษและความสามารถในการดูดซับตะกั่วโดยสาหร่ายขนาดเล็กที่มีชีวิต (Lead(Pb) Detoxification Mechanisms and bioremoval Ability of Living Microalgae).วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง หน้า 34-35
3. สุมตรา หมู่พยัคฆ์.2547.การผลิตโพลิแซคคาร์ไรด์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเมื่อเจริญในอาหารสูตร Jaworsky ที่มีระดับโซเดียมไนเตรตต่างกัน.โปรแกรม ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏนครสวรรค์.84 หน้า.
4. Chen Y., Chen Y.S., Xu Q., Zhou Q. and Gu G. Comparison between acclimated and unacclimated biomass affecting anaerobic-aerobic transformations in the biological removal of phosphorus. Process Biochemistry. (2005), 40: 723-732.
5. Ye F.X. and Shen D.S. Acclimation of anaerobic sludge degrading chlorophenols and the biodegradation kinetics during acclimation period. Chemosphere. (2004), 54: 1573-1580.
6. Lobos J.H., Leib T.K. and Su T.M. Biodegradation of Bisphenol A and Other Bisphenols by Gram-Negative Aerobic Bacterium. Appl Environ Microbiol. (1992),1823-1831.
7. Ozbelge T.A., Ozbelge H.O. and Altmten P. Effect of acclimatization of microorganisms to heavy metals on the performance of activated sludge process. J Hazard Mater. (2007), 142: 332-339.
8. Jusoh N. and Razali F. Microbial consortia from residential wastewater for bioremediation of phenol in a chemostat. Jurnal Teknologi. (2008), 48: 51-60.
9. Zhang C., Zeng G., Yuan L., Yu J., Li J., Huang G., Xi B and Liu H. Aerobic degradation of Bisphenol A by *Achromobacter xylosoxidans* strain B-16 isolated from compost leachate of municipal solid waste. Chemosphere. (2006), 68: 181-190.

10. Pitakamonpan T., Inthorn D., Sihabut T. and Thiravetyan P. Optimum conditions for removal of Bisphenol A by *Hapalosiphon hibernicus*. [M.Sc. Thesis in Environmental Sanitation] Bangkok: Mahidol University; 2007.
11. Raungsomboon S., Chidthaisong A., Bunnag B., Inthorn D. and Harvey N.W. Production, composition and Pb^{2+} adsorption characteristics of capsular polysaccharides extracted from a cyanobacterium *Gloeocapsa gelatinosa*. Water Research. (2006), 40: 3759-3766.

ส่วนที่ 3 การกำจัดบิสฟีนอลเอโดยใช้วัสดุดูดซับ

วัตถุประสงค์

1. ทำการคัดเลือกวัสดุดูดซับที่เหมาะสมในการกำจัดบิสฟีนอลเอจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ เถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย เปลือกไข่ กาบมะพร้าว เปลือกถั่ว ฟางข้าว เปลือกข้าวโพด เป็นต้น
2. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดบิสฟีนอลเอ ได้แก่ ผลของปริมาณตัวดูดซับ ผลของความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ ผลของระยะเวลาสัมผัส เป็นต้น
3. ศึกษากลไกการดูดซับบิสฟีนอลเอ
4. การปรับปรุงประสิทธิภาพของวัสดุดูดซับโดยการทำเป็นแอคติแวเต็ดคาร์บอน เป็นต้น
5. การกำจัดบิสฟีนอลเอในน้ำชะขยะโดยใช้วัสดุดูดซับ

สถานที่ทำการทดลอง

การคัดเลือกวัสดุดูดซับ คือ เถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย เปลือกไข่ กาบมะพร้าว เปลือกถั่ว ฟางข้าว เปลือกข้าวโพด เพื่อมาใช้ในการดูดซับบิสฟีนอลเอ จะทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ ภาควิชาวิทยาศาสตร์อนามัยสิ่งแวดล้อม คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล การศึกษาผลของปริมาณของวัสดุดูดซับ ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ ระยะเวลาสัมผัส และการวัดความเข้มข้นของสารบิสฟีนอลเอ โดยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนลิควิดโครมาโตรกราฟี (HPLC) ที่ห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุอุปกรณ์

1. Incubated shaker, IOC 400××2.C, Gallenkamp
2. Analytical balance, Mettler Toledo, Switzerland
3. Hot air oven, Din 12880-Ki. Memmert, Germany
4. Desiccator, Samplatec Corp. D-box
5. pH meter, Mettler Toledo, Switzerland
6. Surface area analyzer (Quantachrome, Autosorb-1)

7. High Performance Liquid Chromatography, model LC-10 ADvp /pump with a model SCL-10 ADvp controller, and a model UV-Vis /detector, Shimadzu, reversed-phase column (Altima C18, Ligand /Scientific Co. Ltd.)
8. Fourier Transform Infrared Spectrometer, Perkin Elmer FTIR 1760X, USA
9. Sieve number 20 and 60 (U.S. Standard Sieve Series)
10. Micropipette 200 and 1,000 μl, Gilson, France
11. Pipette tip
12. Snap caps vial 1 ml, Scientific Co., Ltd.
13. Syringe size 1.0 ml
14. Ram vial, Amber 12 x 32 mm, Ligan Scientific Co., Ltd.
15. Syringe filter(Cellulose acetate) pore size 0.2 μm, diameter 13 mm.
16. Dropper
17. Volumetric flask size 50, 100, 500, 1000 ml

สารเคมี

1. Bisphenol A ($(CH_3)_2C(C_6H_4OH)_2$), Kishada Chemical Co., Ltd. (Osaka, Japan)
2. Acetonitrite, HPLC grade Lab-Scan, Ireland
3. Ortho-Phosphoric acid 85% GR ISO Merck, Germany
4. Potassuim dihyroxyl phosphate (KH_2PO_4), Scharlau, Spain
5. Nitric acid (HNO_3) 69%, BDH Laboratory Supplies, England
6. Sodium hydroxide (NaOH), Merck, Germany
7. Hydrochloric acid (HCl), Merck, Germany
8. Methyl alcohol (MeOH), HPLC grade, Merck, Germany
9. Ethyl alcohol (EtOH), HPLC grade, Merck, Germany
10. Alum ($Al_2(SO_4)3.18H_2O$), Ajax Finechem, Australia

วิธีการศึกษาและวิจัย

1. การเตรียมวัสดุดูดซับ

นำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ เถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย เปลือกไข่ กาบมะพร้าว เปลือกถั่ว ฟางข้าว เปลือกข้าวโพด มาล้างทรายและสิ่งสกปรกออกด้วยน้ำประปา 5 ครั้ง และน้ำ Deionzed 2 ครั้ง และอบแห้งโดยการอบในเตาอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดในโกร่งบด และทำการแยกขนาดโดยใช้เครื่องร่อน mesh number ที่ขนาดมากกว่า 800 ไมโครเมตร (sieve No. 20) ส่วนถ่านกัมมันต์ทางการค้า จะคัดเลือกที่ขนาดน้อยกว่า 250 ไมโครเมตร (sieve No. 60) นำไปอบในตู้อบอีกครั้ง และใส่ขวดแก้วไว้เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การคัดเลือกวัสดุดูดซับที่เหมาะสมในการกำจัด บิสฟีนอลเอ

วัสดุดูดซับทุกชนิดและวัสดุดูดซับที่ปรับสภาพ (0.1 N H_2SO_4 และ 0.1 N NaOH) คือ เถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย เปลือกไข่ กากมะพร้าว เปลือกถั่ว ฟางข้าว เปลือกข้าวโพด จะใช้ปริมาณ 2 กรัม ในการกำจัดบิสฟีนอลเอที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยทดลองในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และเขย่าในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 720 นาที ทุกการทดลองจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวัดความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอที่เหลืออยู่ในสารละลายด้วยเครื่อง ไฮเพอร์ฟอร์มแมนลิคิดโครมาโตกราฟี (HPLC)

3. ศึกษาผลของปริมาณวัสดุดูดซับต่อการกำจัดบิสฟีนอลเอ

นำวัสดุดูดซับที่คัดเลือกมาที่ปริมาณร้อยละ 2-5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในการกำจัดบิสฟีนอลเอที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยทดลองในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรทุกฟลาสก์จะเขย่าในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 720 นาที ทุกการทดลองจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวัดความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอที่เหลืออยู่ในสารละลายด้วยเครื่อง ไฮเพอร์ฟอร์มแมนลิคิดโครมาโตกราฟี (HPLC)

4. ศึกษาผลของความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอต่อการกำจัดบิสฟีนอลเอ

ใช้สารละลายบิสฟีนอลเอที่ความเข้มข้น 20 40 และ 60 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาใช้ในการดูดซับด้วยวัสดุดูดซับที่ปริมาณที่เหมาะสม (จากผลการทดลอง) โดยทดลองในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทุกฟลาสก์จะเขย่าในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 720 นาที ทุกการทดลองจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวัดความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอที่เหลืออยู่ในสารละลายด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มแมนลิคิดโครมาโตกราฟี (HPLC)

5. ศึกษาผลของระยะเวลาสัมผัสต่อการกำจัดบิสฟีนอลเอ

ศึกษาหาเวลาที่เข้าสู่สมดุลในการดูดซับบิสฟีนอลเอ โดยจะเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาสัมผัส 0 5 10 15 30 60 90 120 180 240 300 นาที ที่ปริมาณวัสดุดูดซับที่เหมาะสม (จากผลการทดลอง) และที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม (จากผลการทดลอง) ใช้ปริมาตรสารละลาย 100 มิลลิลิตร โดยทดลองในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทุกฟลาสก์จะเขย่าในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 720 นาที ทุกการทดลองจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวัดความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอที่เหลืออยู่ในสารละลายด้วยเครื่อง ไฮเพอร์ฟอร์มแมนลิคิดโครมาโตกราฟี (HPLC)

6. ศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการกำจัดบิสฟีนอลเอ

นำวัสดุดูดซับที่คัดเลือกมาศึกษาการดูดซับบิสฟีนอลเอที่ พีเอช 5 7 และ 9 โดยทำการปรับค่าพีเอชของสารละลายบิสฟีนอลเอ ด้วย H_2SO_4 หรือ NaOH นำส่วนผสมมาเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง จนถึงจุดสมดุล (จากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าสมดุลที่ 6 ชั่วโมง) กรองด้วยกระดาษกรอง NO. 1 และนำไปวัดความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอที่เหลือด้วย เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิคิดโครมาโตกราฟี (HPLC)

7. การศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานของตัวดูดซับ

7.1 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของตัวดูดซับ

ลักษณะทางกายภาพพื้นผิวของตัวดูดซับสามารถศึกษาด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) โดยใช้ตัวดูดซับขนาดเล็กกว่า 75 ไมโครเมตร ตรึงบนแท่นผิวเรียบ (Steppes) และฉาบผิวด้วยทอง

7.2 การหาองค์ประกอบของตัวดูดซับ

ศึกษาองค์ประกอบของตัวดูดซับด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) ซึ่งต่อพ่วงกับ Electron dispersive X-ray spectroscopy (EDX) และทำการยืนยันผลการทดลองโดยการเผาและย่อยตัวอย่างให้อยู่ในรูปของสารละลายแล้วตรวจวัดปริมาณธาตุที่มีอยู่ในองค์ประกอบด้วยเครื่อง Inductive Coupled Plasma Mass Spectroscopy (ICP-MS)

7.3 การศึกษารูพรุนของวัสดุดูดซับ โดยนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Surface area analyzer

8.ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการกำจัดบิสฟีนอลเอ

ทำการทดลองเหมือนข้อ 4 โดยเลือกค่า pH ที่เหมาะสมทำการทดลองที่อุณหภูมิ 20 40 60 องศาเซลเซียสโดยใช้ เถ้าลอยขี้เลื่อย 0.3 กรัม ใน 10 มิลลิลิตร สารละลายบิสฟีนอลเอ 20 200 400 600 800 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ ในตู้เขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้

9. การศึกษา Fourier Transform Infrared Spectrometer analysis (FTIR)

ศึกษาการดูดซับของ เถ้าลอยขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย เปลือกถั่ว ถ่านกัมมันต์เถ้าลอยชานอ้อย และ ถ่านกัมมันต์ทางการค้า โดยใช้ FTIR การเตรียมตัวอย่าง เตรียมโดยผสม และบด KBr ที่อัตราส่วน 1:50 และนำไปวิเคราะห์ โดยเครื่อง FTIR (Perkin Elmer FTIR 1760X, USA)

10. การกำจัดบิสฟีนอลเอ ในน้ำชะขยะ

นำน้ำชะขยะมาจากหลุมฝังกลบขยะแห่งหนึ่ง และนำมาเตรียม 2 วิธีเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกำจัดบิสฟีนอลเอ

1) นำน้ำขยะขยะมาเจือจางให้เป็นความเข้มข้นร้อยละ 20 40 60 80 และ 100 โดยน้ำกลั่นก่อนนำไปกำจัดบิสฟีนอเอ โดยตัวดูดซับ คือ เถ้าลอยขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย และ เปลือกถั่ว

2) นำไปตะตะกอนด้วย อลัมน์ร้อยละ 25

ทำการทดลองในเครื่องเขย่า 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 720 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ ด้วยเครื่องไฮด์เพอร์มฟอร์มแมนลิคิวโครมาโตกราฟี (HPLC)

11. การเตรียมเครื่องแก้ว

เครื่องแก้วหลังจากล้างทำความสะอาดแล้วจะนำมาแช่ข้ามคืนในร้อยละ 20 ของ HNO_3 จากนั้นจะล้างด้วยน้ำ Deionzed และอบให้แห้งในเตาอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

12. การวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนลิคิวโครงมาโตกราฟฟี (HPLC)

สารละลายตัวอย่างบิสฟีนอลเอจะวัดโดยใช้เครื่องไฮด์เพอร์มฟอร์มแมนลิคิวโครมาโตกราฟี (HPLC) ที่ความยาวคลื่น 221 นาโนเมตร โดยใช้ reversed-phase คอลัมน์ (Altima C-18, บริษัทลิแกน) และใช้ Mobile phase 2 ตัว คือ Acetronitrile และ Potassium dihydroxyl phosphase buffer (พีเอช 2.5) ในสัดส่วน 50/50 (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และเครื่องจะดูดสารละลายบิสฟีนอลเอ ในปริมาตร 40 ไมโครลิตร

การเตรียม สารละลายมาตรฐานบิสฟีนอลเอ สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ไฮด์เพอร์มฟอร์มแมนลิคิวโครมาโตกราฟี (HPLC)

เตรียมสต็อกบิสฟีนอลเอ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร โดยการละลายด้วยเอทานอล และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนสารละลายมาตรฐานบิสฟีนอล เอ จะเตรียมที่ความเข้มข้น 0 5 10 15 20 50 100 200 300 400 500 600 700 800 900 และ 1000 ไมโครโมลาร์ โดยเจือจางจากสต็อกบิสฟีนอลเอ 10 มิลลิโมลาร์ ด้วยน้ำ Deionized

สารละลายบิสฟีนอลเอ

สารละลายบิสฟีนอลเอ จะเตรียมจากสต็อกบิสฟีนอลเอ โดยเจือจางด้วยน้ำ Deionized

กลุ่มควบคุม

กลุ่มควบคุมจะออกแบบทำเหมือนกลุ่มทดลอง แต่ไม่มีวัสดุดูดซับ

กลุ่มแบลงค์

กลุ่มแบลงค์จะออกแบบทำเหมือนกลุ่มทดลองโดยใช้วัสดุดูดซับ แต่ไม่มีสารละลายบิสฟีนอลเอ

13. การคำนวณ

การคำนวณหา ความสามารถในการกำจัด บิสฟีนอลเอ

$$\text{ความสามารถในการกำจัดบิสฟีนอลเอ} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ BPA ตั้งต้น- ความเข้มข้นของ BPA ที่เหลือ}}{\text{ความเข้มข้น BPA ตั้งต้น}} \times 100\%$$

และการกำจัดบิสฟีนอลเอ (BPA removal (q))

การกำจัดบิสฟีนอลเอ (q; mg/g dry wt.) คำนวนโดย

$$q = \frac{(C_i - C_f)}{W} \times V$$

โดย C_i คือความเข้มข้นตั้งต้นของ บิสฟีนอลเอ (ไมโครกรัมต่อลิตร)

C_f คือความเข้มข้นของ บิสฟีนอลเอ ที่สภาวะสมดุล (ไมโครกรัมต่อลิตร)

V คือ ปริมาตรของบิสฟีนอลเอ (มิลลิลิตร)

W น้ำหนักแห้งของ biomass-added (กรัม)

14. การวิเคราะห์ทางสถิติ

สถิติเชิงพรรณนา

สถิติเชิงพรรณนาที่ใช้ คือ ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ประสิทธิภาพการกำจัดบิสฟีนอลเอ (%) และความสามารถในการดูดซับ (q ; ไมโครโมลลาร์/กรัมน้ำหนักแห้ง)

สถิติเชิงวิเคราะห์

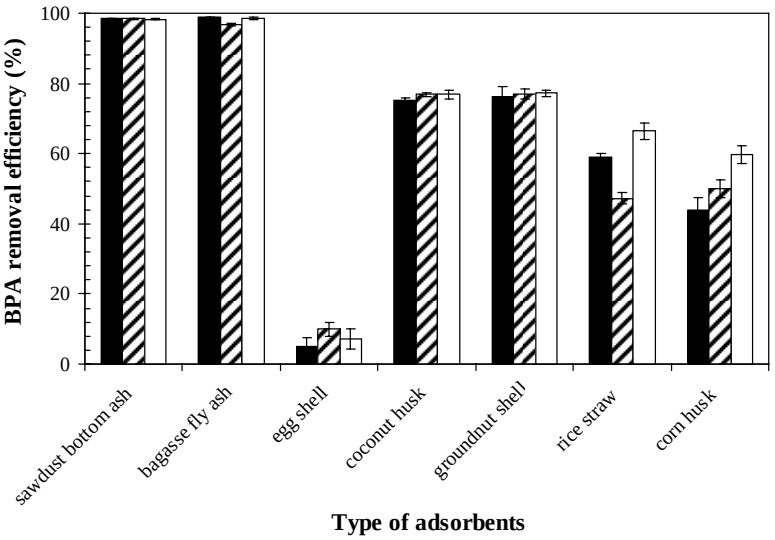
สถิติที่ใช้ คือ ANOVA ซึ่งจะใช้เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของประสิทธิภาพการกำจัดบิสฟีนอลเอ และวัดความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ p-value < 0.05

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. การคัดเลือกวัสดุดูดซับสำหรับการกำจัดบิสฟีนอลเอ

ผลการคัดเลือกวัสดุดูดซับทั้งที่ยังไม่ปรับสภาพและปรับสภาพด้วย 0.1 N H_2SO_4 และ 0.1 N NaOH จำนวน 7 ชนิด คือ เถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย เปลือกไข่ กาบมะพร้าว เปลือกถั่ว ฟางข้าว และเปลือกข้าวโพด โดยทำการดูดซับที่ความเข้มข้นบิสฟีนอล เอ 20 ไมโครโมลาร์ พบว่าวัสดุดูดซับที่ยังไม่ปรับสภาพ มีประสิทธิภาพในการกำจัดบิสฟีนอลเอเท่ากับร้อยละ 99, 99, 5, 75, 76, 59 และ 44 ตามลำดับ และมีบิสฟีนอล เอที่เหลืออยู่ในสารละลายเป็น 0.26, 0.21, 17.12, 4.32, 4.23, 7.02 และ 9.65 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ วัสดุดูดซับที่ปรับสภาพด้วย 0.1 N NaOH มีประสิทธิภาพในการกำจัดบิสฟีนอลเอเท่ากับร้อยละ 99, 97, 10, 76.82, 77, 47 และ 50 ตามลำดับ และมีบิสฟีนอลเอที่เหลืออยู่ในสารละลายเป็น 0.26, 0.55, 16.22, 4.04, 4.11, 8.99 และ 8.62 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และวัสดุดูดซับที่ปรับสภาพด้วย 0.1 N H_2SO_4 มีประสิทธิภาพในการกำจัด บิสฟีนอลเอ เท่ากับร้อยละ 98, 99, 7, 77, 77, 66 และ 60 ตามลำดับ และมีบิสฟีนอลเอที่เหลืออยู่ในสารละลายเป็น 0.29, 0.26, 16.70, 4.03, 4.05, 5.72 และ 6.91 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ สำหรับการกำจัดด้วยเถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย เปลือกไข่ กาบมะพร้าว เปลือกถั่ว ฟางข้าว และเปลือกข้าวโพด ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2

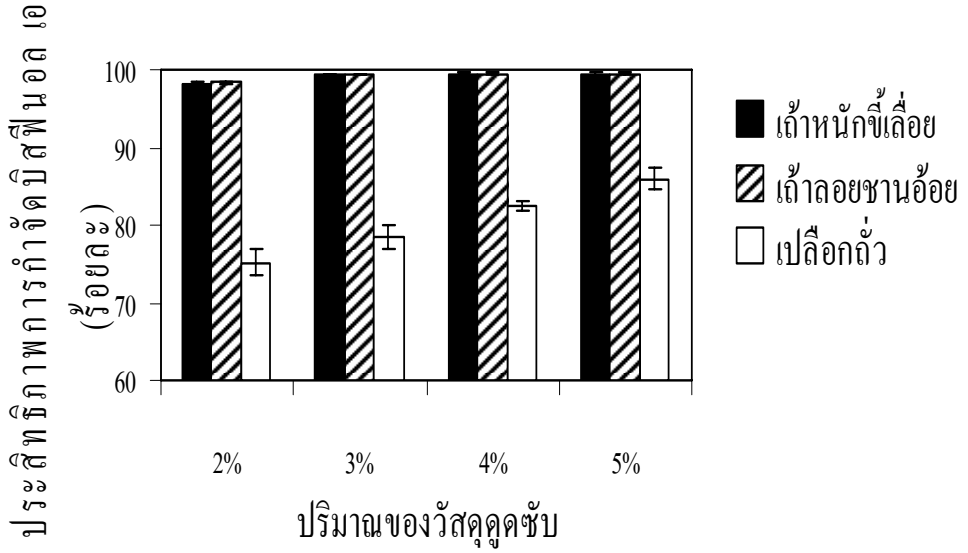
วัสดุดูดซับทั้งที่ยังไม่ปรับสภาพและปรับสภาพด้วย 0.1 N H_2SO_4 และ 0.1 N NaOH จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดบิสฟีนอลเอได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value $<$ 0.05) จึงเลือกศึกษาในวัสดุดูดซับที่ยังไม่ปรับสภาพ และพบว่า เถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย และ เปลือกถั่ว เป็นวัสดุดูดซับที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดบิสฟีนอลเอ ได้สูงที่สุด ที่ร้อยละ 99, 99 และ 76 ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือก เถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย และ เปลือกถั่ว มาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป ซึ่งเถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย เป็นขยะเหลือทิ้งจากการเผาไหม้ในหน่วยของหม้อต้มน้ำและเปลือกถั่วเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่สามารถหาได้ทั่วไป



รูปที่ 2 แสดงประสิทธิภาพการกำจัดบิสฟีนอลเอ ที่ความเข้มข้นบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์ โดยเถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย เปลือกไข่ กากมะพร้าว เปลือกถั่ว ฟางข้าว และเปลือกข้าวโพด ในสามกลุ่มของวัสดุดูดซับคือวัสดุดูดซับที่ยังไม่ปรับสภาพ (■) วัสดุดูดซับปรับสภาพด้วย0.1 N NaOH (▨) และ0.1 N H_2SO_4 (□) โดยใช้ปริมาณวัสดุดูดซับ 2 % น้ำหนัก/ปริมาตร เขย่าเป็นเวลา 720 นาที

3. ผลการศึกษาผลของปริมาณวัสดุดูดซับ

จากการศึกษาพบว่าปริมาณของเถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย และเปลือกถั่วร้อยละ 2-5 น้ำหนักต่อปริมาตร มีประสิทธิภาพในการกำจัดบิสฟีนอลเอได้ร้อยละ 98-99 98-99 และ 75-86 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3

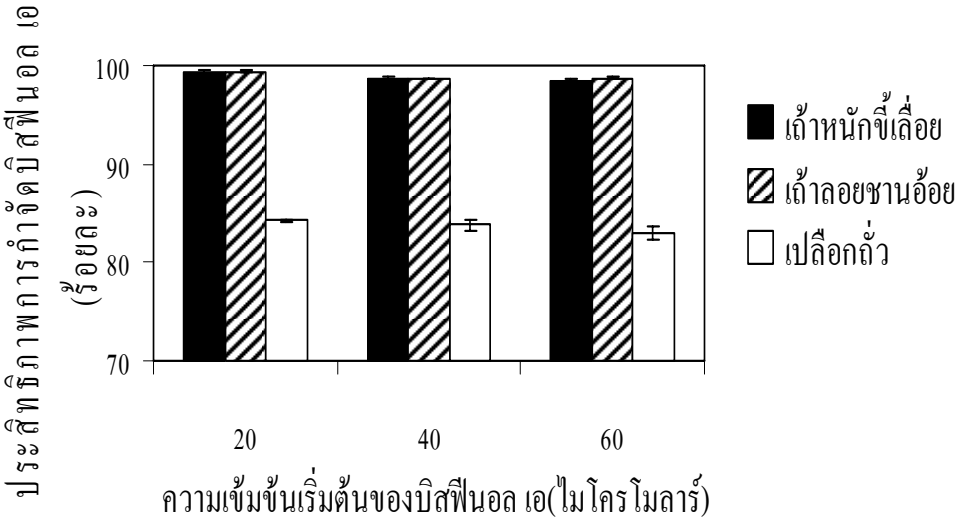


รูปที่ 3 แสดงการกำจัดบิสฟีนอลเอที่ความเข้มข้นบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์ ในแต่ละปริมาณของ เถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย และเปลือกถั่วร้อยละ 2 3 4 และ 5 ตามลำดับ เขย่าที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาทีที่เวลา 720 นาที

พบว่าประสิทธิภาพในการกำจัดบิสฟีนอลเอเพิ่มขึ้น เมื่อปริมาณวัสดุดูดซับที่ใช้เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อมีปริมาณวัสดุดูดซับเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสของการดูดซับเพิ่มขึ้นด้วย ในขณะที่ปริมาณของบิสฟีนอลเอในสารละลายเริ่มต้นยังคงเท่าเดิม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Radhika และ Palanivelu (1) ที่พบว่าปริมาณของถ่าน กัมมันต์ที่เตรียมจากกะลามะพร้าวและถ่านกัมมันต์ทางการค้าเพิ่มขึ้น จะทำให้การดูดซับคลอโรฟีนอลสูงขึ้น

4. ผลการศึกษาผลของความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอ

จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายบิสฟีนอลเอที่ 20 ไมโครโมลาร์ มีประสิทธิภาพในการกำจัดบิสฟีนอลเอได้สูงสุดที่ร้อยละ 99 99 และ 84 ในการกำจัดด้วยเถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย และเปลือกถั่ว ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งประสิทธิภาพในการกำจัดบิสฟีนอลเอลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายบิสฟีนอลเอเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายมีปริมาณบิสฟีนอลเอเพิ่มขึ้นขณะที่ปริมาณพื้นที่ผิวสัมผัสของการดูดซับยังคงเท่าเดิม ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Banat และคณะ (2) ที่พบว่าร้อยละของการดูดซับฟีนอลของเบนโทไนท์ลดลงเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของฟีนอลเพิ่มขึ้น

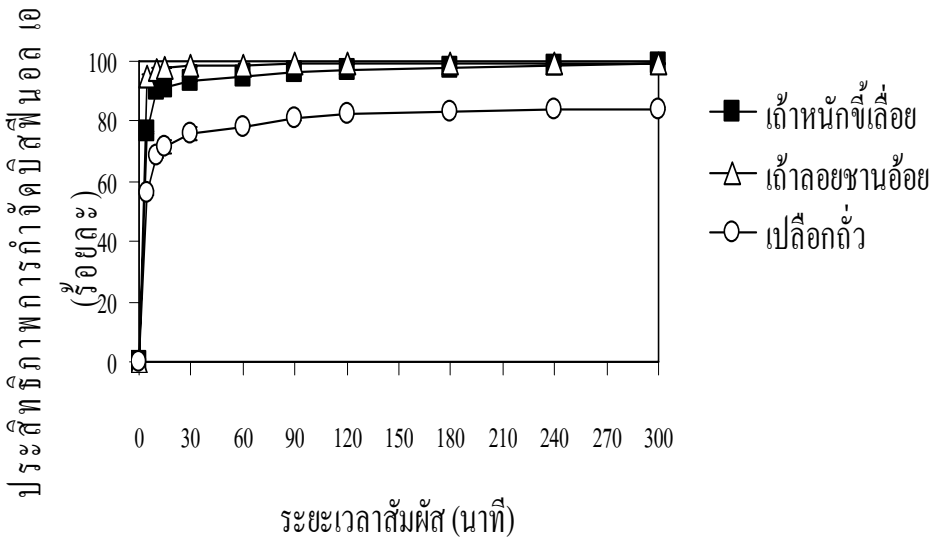


รูปที่ 4 แสดงการกำจัดบิสฟีนอลเอที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของบิสฟีนอลเอเป็น 20 40 และ 60 ไมโครโมลาร์ โดยใช้ปริมาณเถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย และเปลือกถั่วร้อยละ 3 3 5 น้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ ในเครื่อง เขย่า 110 รอบต่อนาทีที่เวลา 720 นาที

5. ผลการศึกษาผลของระยะเวลาการสัมผัส

จากการศึกษาพบว่าระยะเวลาการสัมผัสในช่วง 30 นาทีแรก เถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อยและเปลือกถั่ว สามารถดูดซับบิสฟีนอลเออย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากพื้นผิวของวัสดุดูดซับยังว่างอยู่ จากนั้น

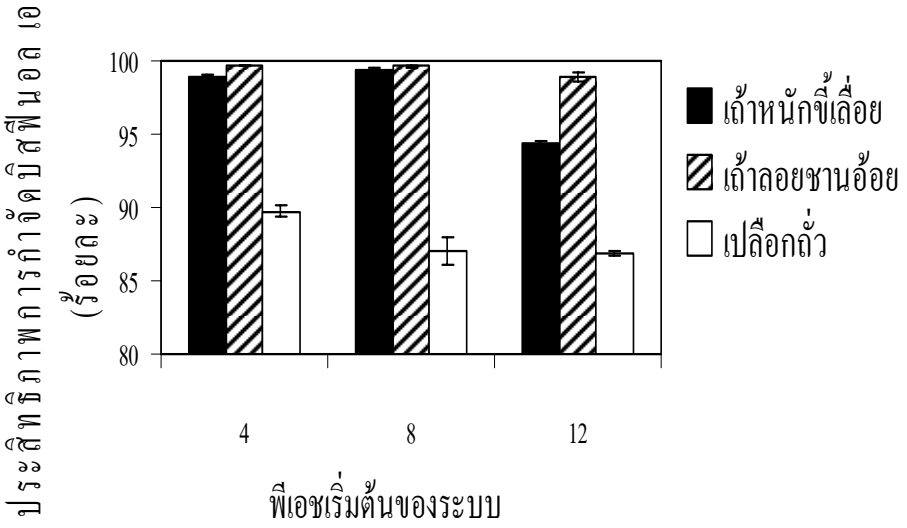
พบว่าประสิทธิภาพในการดูดซับจะค่อย ๆเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อย จนเข้าสู่ภาวะสมดุลที่ระยะเวลาสัมผัส 300 นาที ดังแสดงในรูปที่ 5 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Gupta และคณะ (3) ที่พบว่าโคลนแดงมีการดูดซับสูงในช่วงแรกและเข้าสู่ภาวะสมดุลที่ระยะเวลาสัมผัส 3 ชั่วโมง สำหรับการดูดซับคลอโรฟีนอล และใช้ระยะเวลาเข้าสู่ภาวะสมดุล 4 ชั่วโมง สำหรับการดูดซับฟีนอล



รูปที่ 5 แสดงการกำจัดบิสฟีนอลเอที่ระยะเวลาสัมผัสต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์ โดยใช้ปริมาณเถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย และเปลือกถั่วร้อยละ 3 3 5 น้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ

6. ผลการศึกษาผลของพีเอช

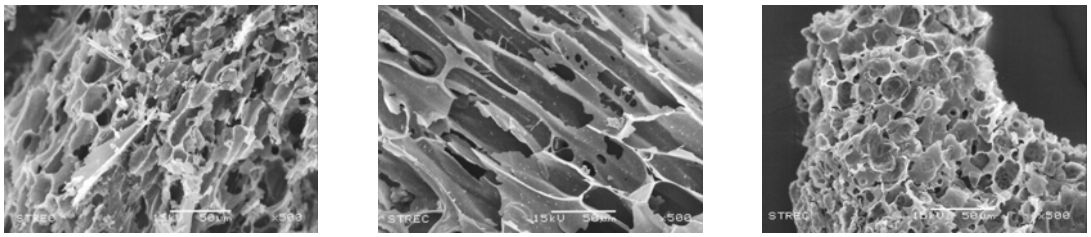
จากการศึกษาพบว่า ประสิทธิภาพในการดูดซับบิสฟีนอลเอ ที่พีเอชเริ่มต้น 4, 8 และ 12 ของเถ้าหนัก ขี้เลื่อยมีค่าร้อยละ 99 99 และ 94 ตามลำดับ เถ้าลอยชานอ้อยมีค่าร้อยละ 100 100 และ 99 ตามลำดับ และเปลือกถั่วมีค่า ร้อยละ 90 87 และ 87 ตามลำดับ โดยจะเห็นว่าประสิทธิภาพการดูดซับจะสูงที่พีเอช 4 และ 8 แต่ที่พีเอช 12 ประสิทธิภาพการดูดซับจะลดลงเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 6 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Rengaraj และคณะ (4) พบว่าถ่านกัมมันต์จากเปลือกหุ้มเมล็ดปาล์มและถ่านกัมมันต์ทางการค้า จะกำจัดฟีนอลได้ดีที่สุดในช่วงพีเอช 4-9 และที่พีเอชสูงกว่า 9 ประสิทธิภาพการกำจัดจะน้อยลง และสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Tsai และคณะ (5) พบว่าถ่านกัมมันต์ทางการค้าที่ผลิตจากกะลามะพร้าวและถ่านหินบิทูมินัสกำจัดบิสฟีนอลเอได้ดีในช่วงพีเอช 3- 9 และที่พีเอชมากกว่า 9-11 ประสิทธิภาพการกำจัดจะน้อยลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากการที่ค่า pK_a ของบิสฟีนอล เออยู่ในช่วง 9.6-10.2 (6) อธิบายได้ว่าความเป็นประจุของบิสฟีนอลเอ จะเกิดในช่วงพีเอช 9-10 ซึ่งอยู่ในรูปของประจุลบของบิสฟีโนเลต ดังนั้นการที่ความสามารถในการดูดซับของวัสดุดูดซับลดลงในช่วงพีเอชมากกว่า 10 ก็อาจเกิดจากแรงผลักกันระหว่างประจุลบของบิสฟีโนเลตกับประจุลบอย่างอ่อนบนผิวของวัสดุดูดซับจากผลของกลุ่มสารอินทรีย์ที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (7)



รูปที่ 6 แสดงการกำจัดบิสฟีนอลเอที่ความเข้มข้นบิสฟีนอลเอ 20 ไมโครโมลาร์ ที่พีเอชเริ่มต้นบิสฟีนอลเอเป็น 4 8 และ 12 โดยใช้ปริมาณเถ้าหนักขี้เลื่อย, เถ้าลอยชานอ้อย และเปลือกถั่วร้อยละ 3 3 5 น้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ

7. ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของวัสดุดูดซับ

นำเถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย และเปลือกถั่วมาส่องดูลักษณะผิวของวัสดุดูดซับด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning Electron Microscope) กำลังขยาย 500 X พบว่าลักษณะโครงสร้างพื้นผิว เป็นดังแสดงในรูปที่ 7 A, B และ C



รูปที่ 7 แสดงลักษณะพื้นผิวของเถ้าหนักขี้เลื่อย (A) เถ้าลอยชานอ้อย (B) และเปลือกถั่ว (C) ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM: JEOL รุ่น JSM-5410LV) กำลังขยาย 500X

จากรูปจะเห็นว่าลักษณะพื้นผิวของวัสดุดูดซับชนิดต่างๆ จะมีลักษณะต่างกัน คือจะมีรูพรุนหลายๆ ขนาด บนพื้นผิว โดยเฉพาะเปลือกถั่วจะมีลักษณะเป็นรูพรุนเล็กๆ จำนวนมากเมื่อเปรียบเทียบกับเถ้าหนักขี้เลื่อย และเถ้าลอยชานอ้อย และนอกจากนี้เถ้าหนักขี้เลื่อยและเถ้าลอยชานอ้อย จะมีผลึกเล็กๆเกาะอยู่บริเวณพื้นผิวและบริเวณภายในรูพรุนจำนวนมาก ซึ่งผลึกเล็กๆนี้อาจจะเป็นสิ่งสกปรกต่างๆที่เกิดขึ้นจากขั้นตอนการเผาไหม้ และจากการวิเคราะห์พื้นที่ผิวของวัสดุดูดซับพบว่าเถ้าลอยชานอ้อยจะมีพื้นที่ผิวสูงที่สุดเป็น 262.25 ตารางเมตรต่อกรัมวัสดุดูดซับ รองลงมาเป็นเถ้าหนักขี้เลื่อย โดยมีพื้นที่ผิวเป็น 227.62

ตารางเมตรต่อกรัมวัสดุดูดซับ และเปลือกถั่วมีพื้นที่ผิวน้อยที่สุดเท่ากับ 5.52 ตารางเมตรต่อกรัมวัสดุดูดซับตามลำดับ ด้วยเหตุนี้จึงส่งผลให้เถ้าลอยชานอ้อยและเถ้าหนักขี้เลื่อยเป็นวัสดุดูดซับที่มีประสิทธิภาพการดูดซับบิสฟีนอล เอได้สูงกว่าเปลือกถั่ว (ดังแสดงในรูปที่ 7 A, B และ C)

ศึกษาโดย Surface area analyzer

ใช้เครื่อง surface area analyzer ศึกษาเพื่อหา BET surface area, Total pore volumn, meso pore volume และ average pore diameter ของเถ้าลอยขี้เลื่อย และถ่านกัมมันต์เถ้าลอยขี้เลื่อย ดังแสดงผลในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 BET surface area, total pore volume และ average pore diameter ของ Sawdust bottom ash, Sawdust bottom ash activated carbon และ Activated carbon

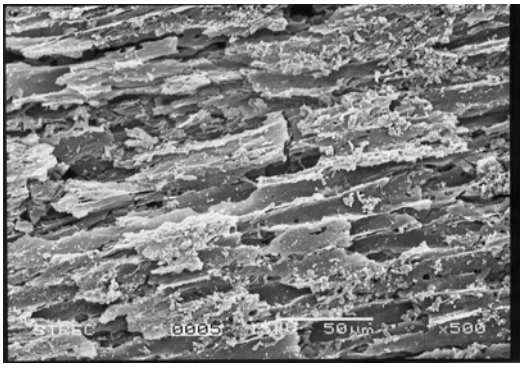
Adsorbents	Multipoint BET (m^2/g)	V_T (m^3/g)	V_{mi} (m^3/g)	V_{me} (m^3/g)	Average pore diameter (A°)
Sawdust bottom ash	84	0.0546	0.0364	0.0182	21.98
Sawdust bottom ash activated carbon	686	0.3772	0.3318	0.0454	26.06
Activated carbon	856	0.4871	0.4426	0.0445	33.23

หมายเหตุ

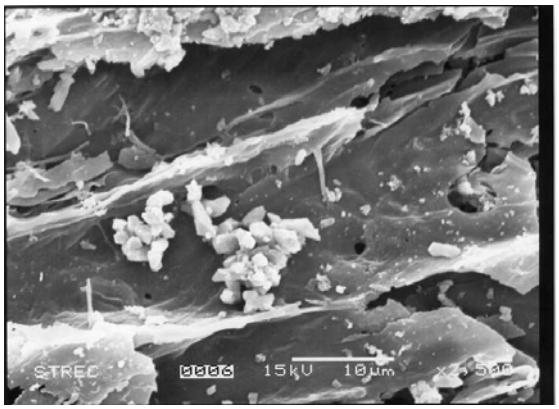
Multipoint BET = Specific surface area V_T = Total pore volume

V_{mi} = Micro pore volume V_{me} = Meso pore volume

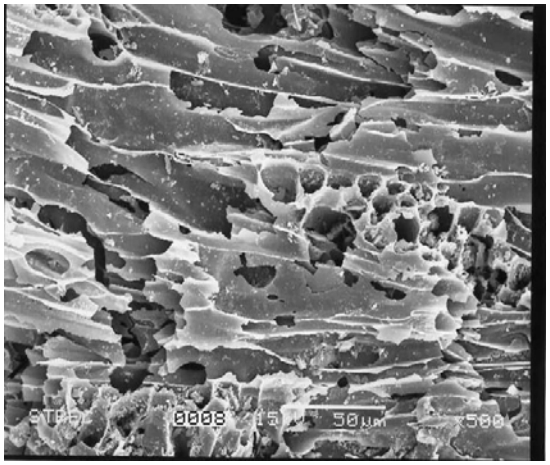
ผลจาก Scanning Electron Microscope (SEM) พบว่าลักษณะของรูพรุนและขนาดของรูพรุนของเถ้าลอยขี้เลื่อยและถ่านกัมมันต์เถ้าลอยขี้เลื่อยมีความแตกต่างกัน พื้นที่ผิวของเถ้าลอยขี้เลื่อยจะมีผลึกปกคลุมและมีรูพรุนทั่วผิว โดยถ่านกัมมันต์เถ้าลอยขี้เลื่อยมีพื้นที่ผิวและรูพรุนมากกว่าเนื่องจากถูกactivated โดยโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ทำให้มีพื้นที่ผิวและรูพรุนเพิ่มขึ้นดังแสดงในรูปที่ 8-12 ตามลำดับ



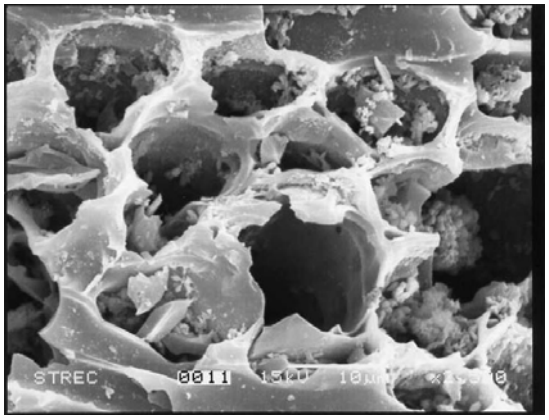
รูปที่ 8 ลักษณะผิวของเถ้าลอยขี้เลื่อย ถ่ายด้วยกล้อง Scanning Electron Microscope (SEM, 500X)



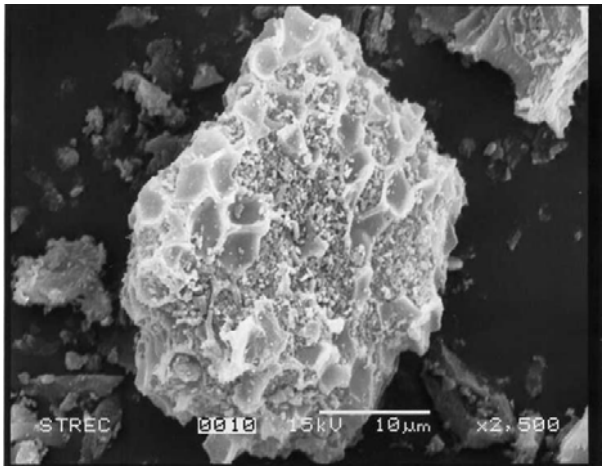
รูปที่ 9 ลักษณะผิวของเถ้าลอยขี้เลื่อย ถ่ายด้วยกล้อง Scanning Electron Microscope (SEM, 2,500X)



รูปที่ 10 ลักษณะผิวของถ่านกัมมันต์เถ้าลอยขี้เลื่อย ถ่ายด้วยกล้อง Scanning Electron Microscope (SEM, 500X)



รูปที่ 11 ลักษณะผิวของถ่านกัมมันต์เถ้าลอยขี้เลื่อย ถ่ายด้วยกล้อง Scanning Electron Microscope (SEM, 2,500X)



รูปที่ 12 ลักษณะผิวของถ่านกัมมันต์ ถ่ายด้วยกล้อง Scanning Electron Microscope (SEM, 2,500X)

การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของเถ้าลอยขี้เลื่อย เถ้าลอยขี้เลื่อย ถ่านกัมมันต์ และถ่านกัมมันต์

องค์ประกอบของเถ้าลอยขี้เลื่อย

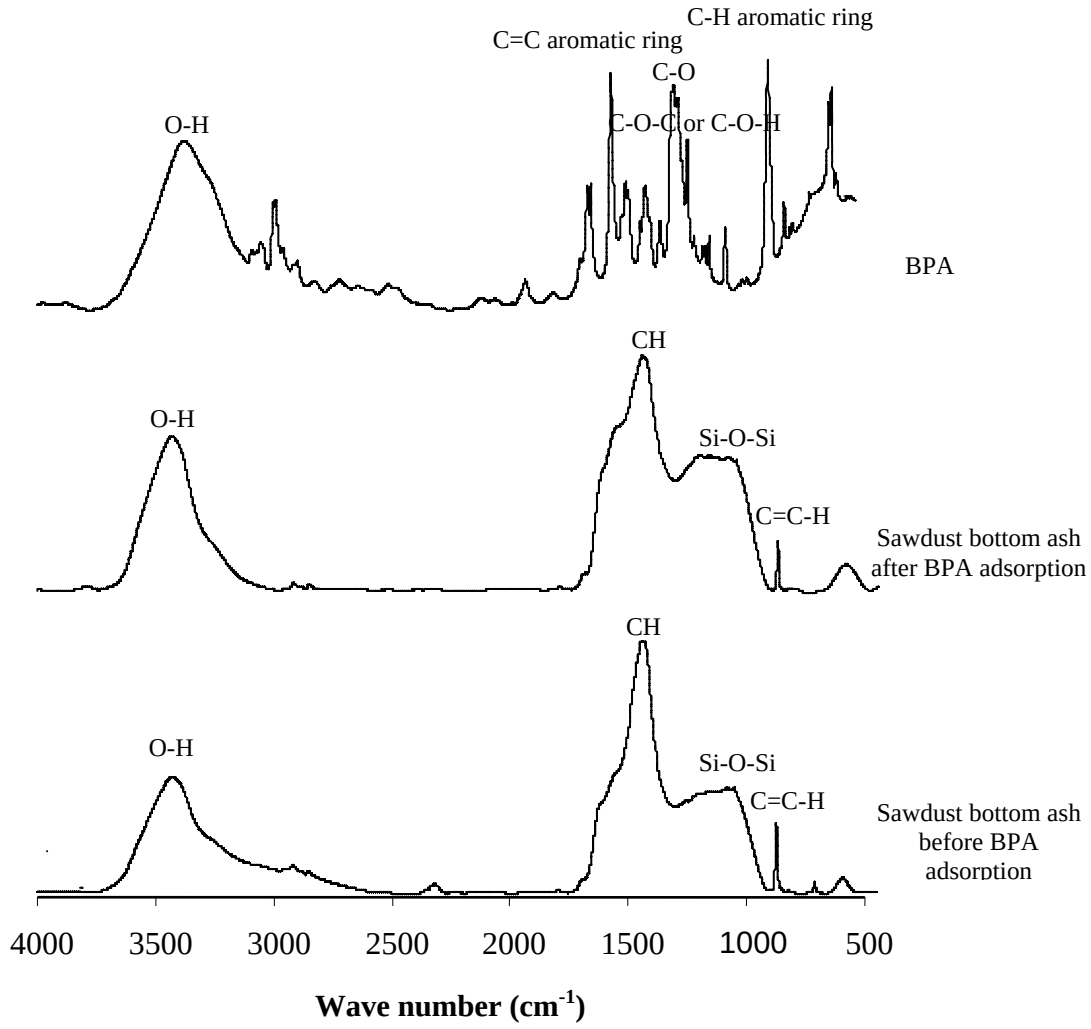
ศึกษาองค์ประกอบของเถ้าลอยขี้เลื่อยโดยใช้เครื่อง Thermo Gravimetric Analyzer (Pyris 1 TGA, Perkin Elmer) พบว่าเถ้าลอยขี้เลื่อยประกอบด้วย volatile ร้อยละ 25.10 fix carbon ร้อยละ 60.50 และ ash ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงองค์ประกอบของเถ้าลอยขี้เลื่อย

องค์ประกอบ	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)
Volatile	25.10
Fix carbon	60.50
Ash	14.40

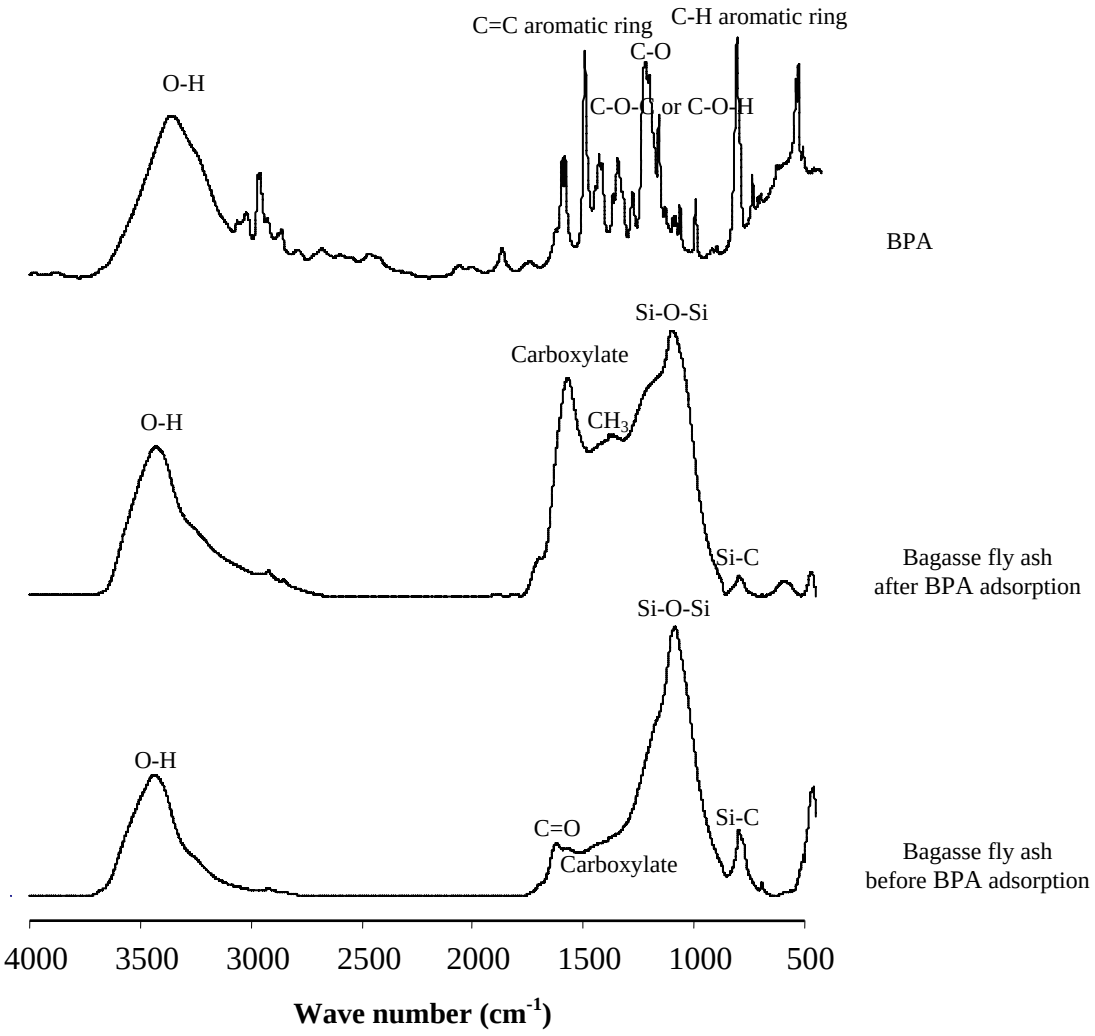
8. การศึกษา Fourier Transform Infrared Spectrometer analysis (FTIR)

เปรียบเทียบการก่อนและหลังการดูดซับบิสฟีนอลเอของเถ้าลอยขี้เลื่อยโดย FTIR พบว่า แสดง main wave length number ที่ 3426 cm^{-1}, 1447 cm^{-1}, 1051 cm^{-1} และ 874 cm^{-1} ซึ่งคือ peak ของ O-H, CH, Si-O-Si และ C=C-H ตามลำดับ ภายหลังการดูดซับบิสฟีนอลเอโดยเถ้าลอยขี้เลื่อย พบ mail wave length ที่ 3431 cm-^{1}, 1448 cm^{-1}, 1051 cm^{-1} และ 874 cm^{-1} ซึ่งคือ peak ของ 0-H, CH, Si-O-Si และ C=C-H ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 13



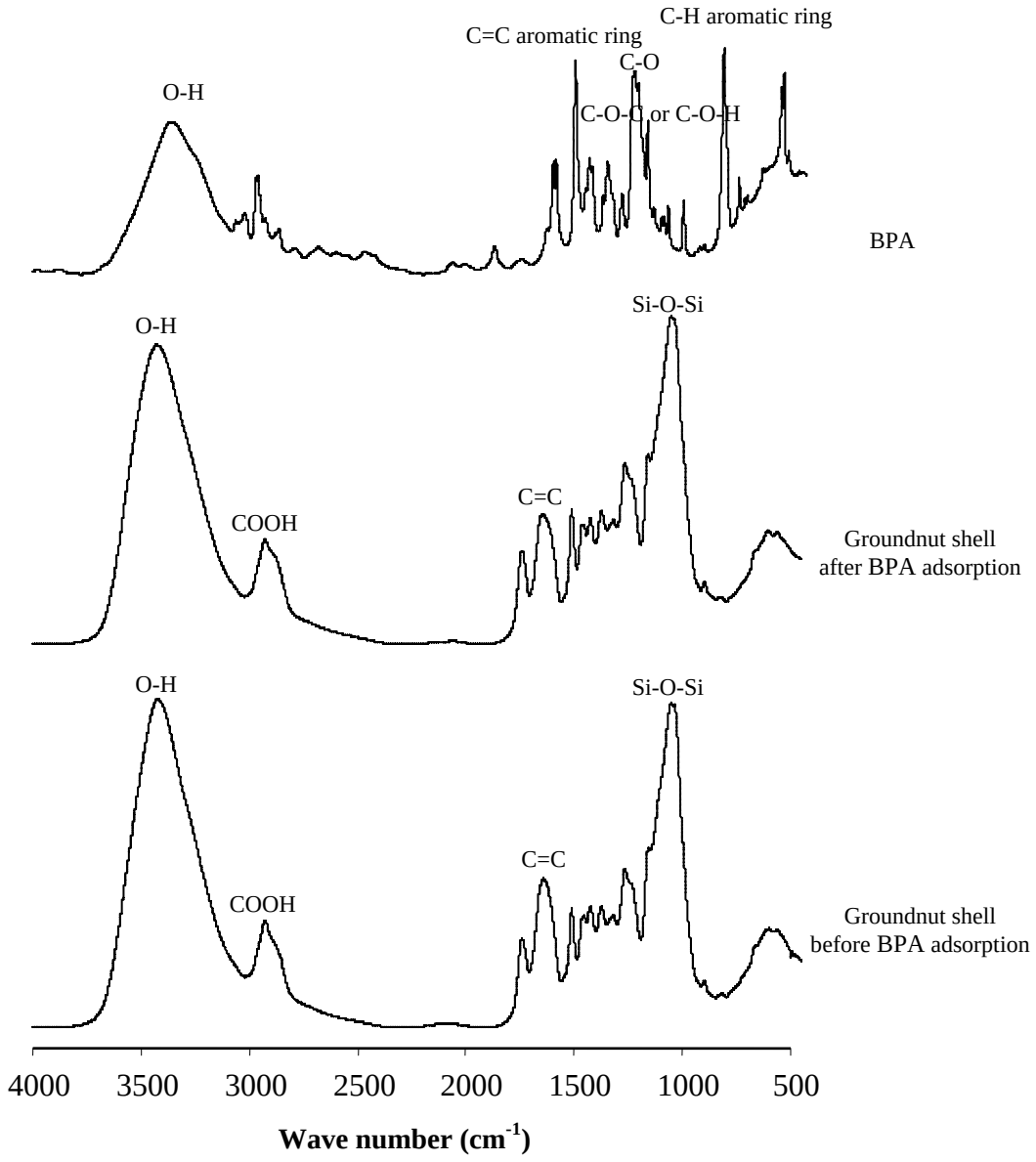
รูปที่ 13 เปรียบเทียบ functional group ของเถ้าลอยขี้เลื่อยก่อนและหลังการดูดซับด้วยบิสฟีนอลเอ โดย FTIR

ในรูปที่ 14 เปรียบเทียบก่อนการดูดซับด้วยบิสฟีนอลเอของเถ้าลอยชานอ้อย พบ main wave number ที่ 3433 cm^{-1}, 1619 cm^{-1}, 1570 cm^{-1} ,1086 cm^{-1} และ 797 cm^{-1} ซึ่งคือ peak ของ O-H, C=O, caboxylate, Si-O-Si และ Si-C ตามลำดับ ภายหลังการดูดซับของเถ้าลอยชายอ้อยพบ main wave number ที่ 3432 cm^{-1}, 1570 cm^{-1}, 1383 cm^{-1} , 1097 cm^{-1} และ 797 cm^{-1} ตามลำดับ



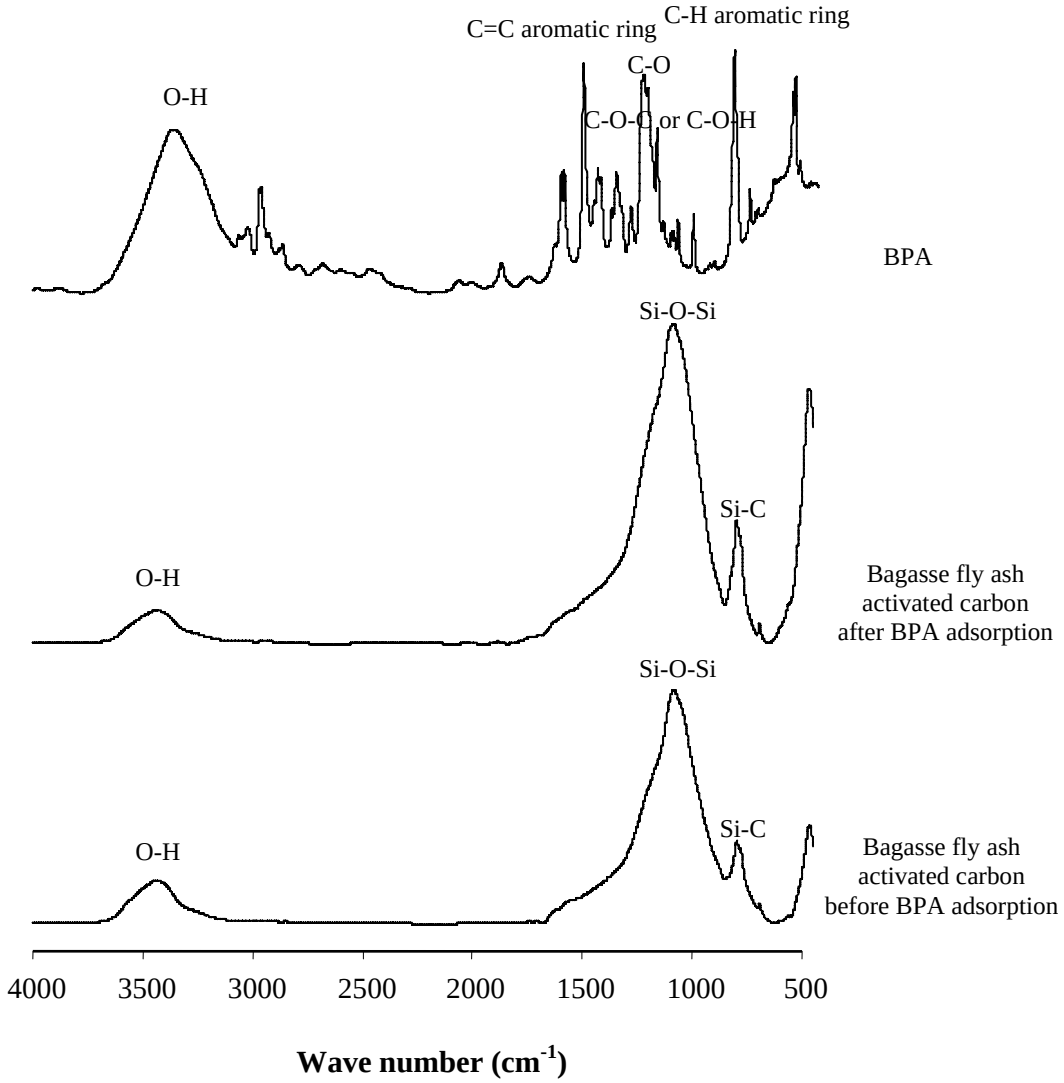
รูปที่ 14 เปรียบเทียบ functional group ของเถ้าลอยชานอ้อยก่อนและหลังการดูดซับด้วยบิสฟีนอลเอ โดย FTIR

รูปที่ 15 เปรียบเทียบก่อนและหลังการดูดซับบิสฟีนอลเอของ เปลือกถั่ว ก่อนการดูดซับด้วยบิสฟีนอลเอ พบ main wave number ที่ 3420 cm^{-1}, 2926 cm^{-1}, 1640 cm^{-1}และ 1050 cm^{-1} ซึ่งคือ peak ของ O-H, COOH, C=C และ Si-O-Si ตามลำดับ ภายหลังการดูดซับของเถ้าลอยชายอ้อยพบ main wave number ที่ 3427 cm^{-1}, 2927 cm^{-1}, 1642 cm^{-1} , และ1050 cm^{-1} ตามลำดับ



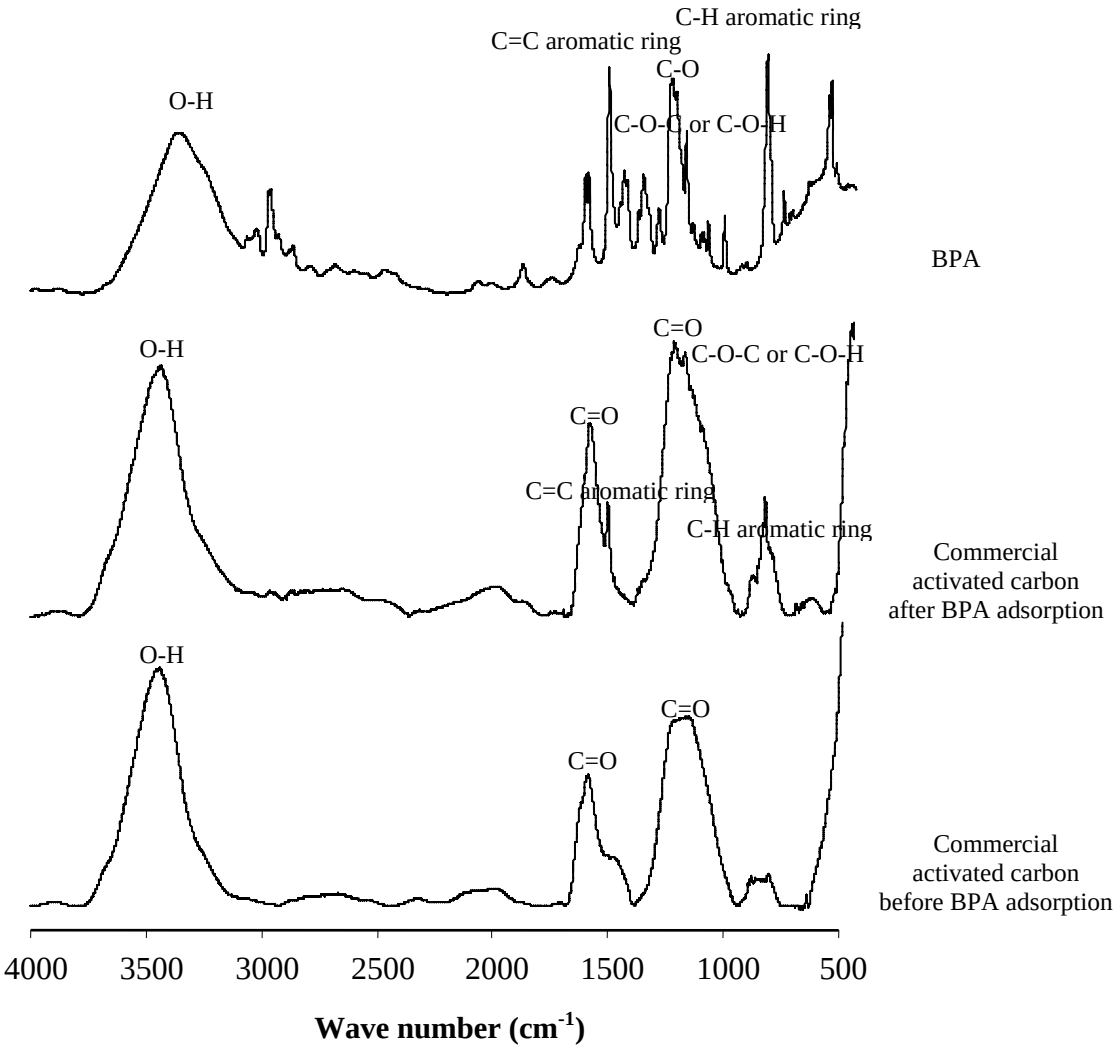
รูปที่ 15 เปรียบเทียบ functional group ของแปลือกถั่วก่อน และหลังการดูดซับด้วยบิสฟีนอลเอ โดย FTIR

รูปที่ 16 เปรียบเทียบก่อนและหลังการดูดซับบิสฟีนอลเอของ ถ่านกัมมันต์เถ้าลอยชานอ้อย ก่อนการดูดซับด้วยบิสฟีนอลเอ พบ main wave number ที่ 3434 cm^{-1}, 1083 cm^{-1}และ 796 cm^{-1} ซึ่งคือ peak ของ O-H, Si-O-Si และ Si-C ตามลำดับ ภายหลังการดูดซับของถ่านกัมมันต์ชานอ้อยพบ main wave number ที่ 3433 cm^{-1}, 1086 cm^{-1}, และ 797 cm^{-1} ตามลำดับ



รูปที่ 16 เปรียบเทียบ functional group ของถ่านกัมมันต์เถ้าลอยชานอ้อยก่อนและหลังการดูดซับด้วยบิสฟีนอลเอ โดย FTIR

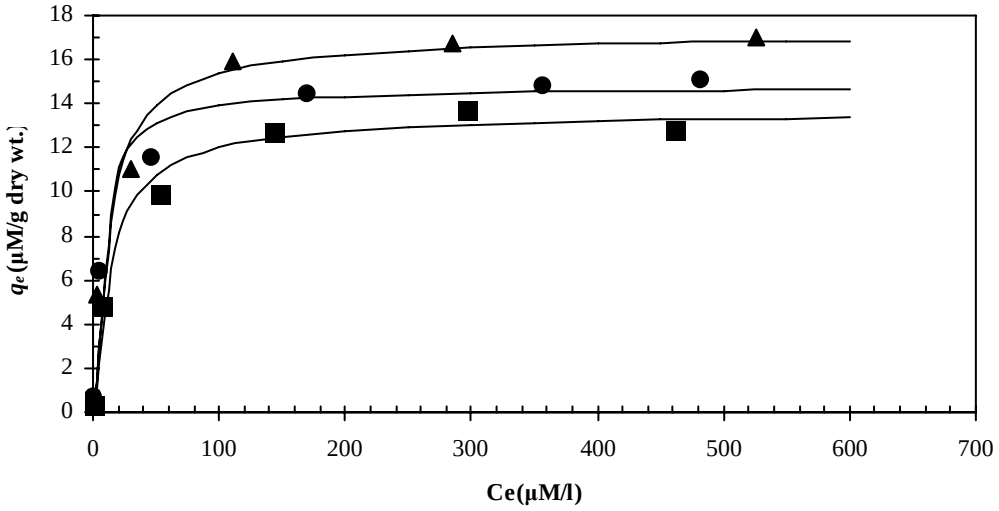
รูปที่ 17 เปรียบเทียบก่อนและหลังการดูดซับบิสฟีนอลเอของถ่านกัมมันต์ทางการค้า ก่อนการดูดซับด้วยบิสฟีนอลเอ พบ main wave number ที่ 3440 cm^{-1}, 1584 cm^{-1}และ 1161 cm^{-1} ซึ่งคือ peak ของ O-H, C-O และ C-O ตามลำดับ ภายหลังการดูดซับของถ่านกัมมันต์ทางการค้าพบ main wave number ที่ 3438 cm^{-1}, 1587 cm^{-1}, 1511 cm^{-1}, 1225 cm^{-1}, 1178 cm^{-1} และ 833 cm^{-1} ซึ่งคือ peak ของ O-H, C-O, C=C aromatic ring, C-O, C-O- C หรือ C-O-H และ C-H ตามลำดับ



รูปที่ 17 เปรียบเทียบ functional group ของถ่านกัมมันต์ทางการค้าก่อนและหลังการดูดซับด้วยบิสฟีนอลเอ โดย FTIR

8. ผลการศึกษาไอโซเทอร์มของการดูดซับที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ผลการศึกษาไอโซเทอร์มการดูดซับของเถ้าลอยขี้เลื่อยที่อุณหภูมิต่างๆที่ 10 30 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่า ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีค่าการกำจัดสูงสุด (q_{max}) สูงสุดที่ 17.19 μM /g dry wt. (3.93 mg/g dry wt.) และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9860 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและ 10 องศาเซลเซียส มีค่า q_{max} 14.80 μM /g dry wt. (3.38 mg/g dry wt.), 13.66 μM /g dry wt. (3.10 mg/g dry wt.) และค่า R^2 เท่ากับ 0.9845 และ 0.9884 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 18 ซึ่งมีค่า ΔH สูงสุดสำหรับการกำจัดบิสฟีนอลเอ ที่ 40 องศาเซลเซียส เท่ากับ -19.63 KJ/mol และที่ 30 และ 10 องศาเซลเซียส เท่ากับ -19.16 and -15.76 KJ/mol ตามลำดับ



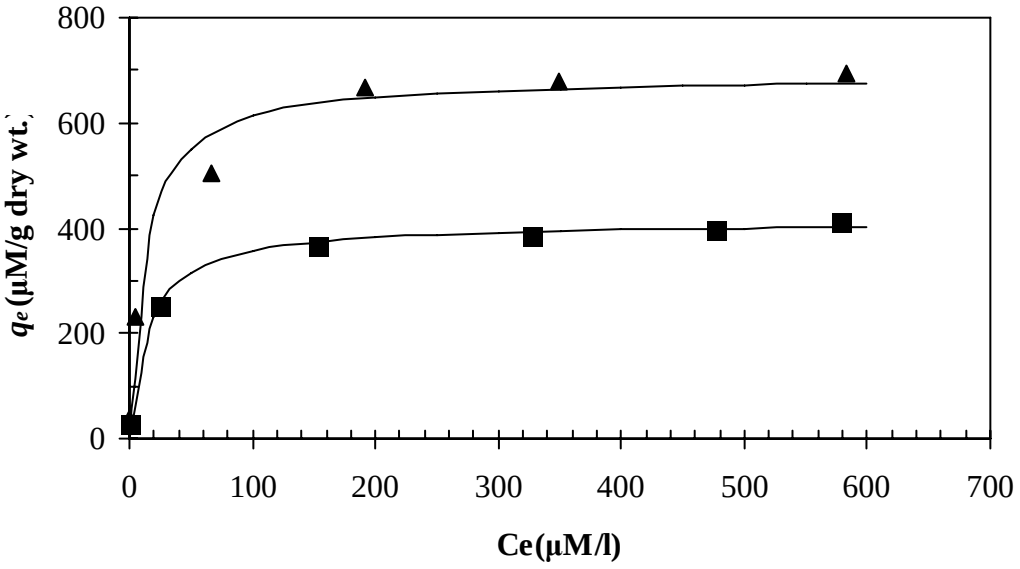
รูปที่ 18 แสดงแลงเมียร์ไอโซเทอร์มของการกำจัดบิสฟีนอลเอโดยเถ้าลอยขี้เลื่อย 0.3 กรัม ใน 10 มิลลิลิตร สารละลายบิสฟีนอลเอ 20, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครโมลลาร์ ที่อุณหภูมิ 10 (■), 30 (●) and 40 องศาเซลเซียส (▲) ระยะเวลาสัมผัส 720 นาที ในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที

ตารางที่ 2 แสดงพารามิเตอร์ของแลงเมียร์เมื่อบิสฟีนอลเอถูกดูดซับด้วยเถ้าลอยขี้เลื่อยที่ อุณหภูมิ 10, 30 และ 40 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ (°C)	q_{max} (μM/g dry wt.)	b x 10^{-3} (l/mg)	ΔH (KJ/mol)	R^2
10	13.66	3.56	-15.76	0.9884
30	14.80	8.79	-19.16	0.9845
40	17.19	8.27	-19.63	0.9860

การศึกษาไอโซเทอร์มการดูดซับของถ่านกัมมันต์เถ้าลอยขี้เลื่อยและถ่านกัมมันต์ที่ อุณหภูมิ 30 เซลเซียส

ผลการศึกษาไอโซเทอร์มการดูดซับของถ่านกัมมันต์เถ้าลอยขี้เลื่อย (Sawdust bottom ash activated carbon) และถ่านกัมมันต์ (activated carbon) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า ถ่านกัมมันต์มีค่าการกำจัดสูงสุด (q_{max}) สูงสุดที่ 688.37 μM /g dry wt. (157.09 mg/g dry wt.) และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9780 ถ่านกัมมันต์เถ้าลอยขี้เลื่อย มีค่า q_{max} 411.41 μM /g dry wt. (93.93 mg/g dry wt.)และค่า R^2 เท่ากับ 0.9961 ดังแสดงในรูปที่ 19 ซึ่งมีค่า ΔH สูงสุดสำหรับการกำจัดบิสฟีนอลเอ โดยถ่านกัมมันต์เถ้าลอยขี้เลื่อยเท่ากับ -33.46 KJ/mol และ ΔH ของถ่านกัมมันต์ เท่ากับ -37.17 KJ/mol ตามลำดับ

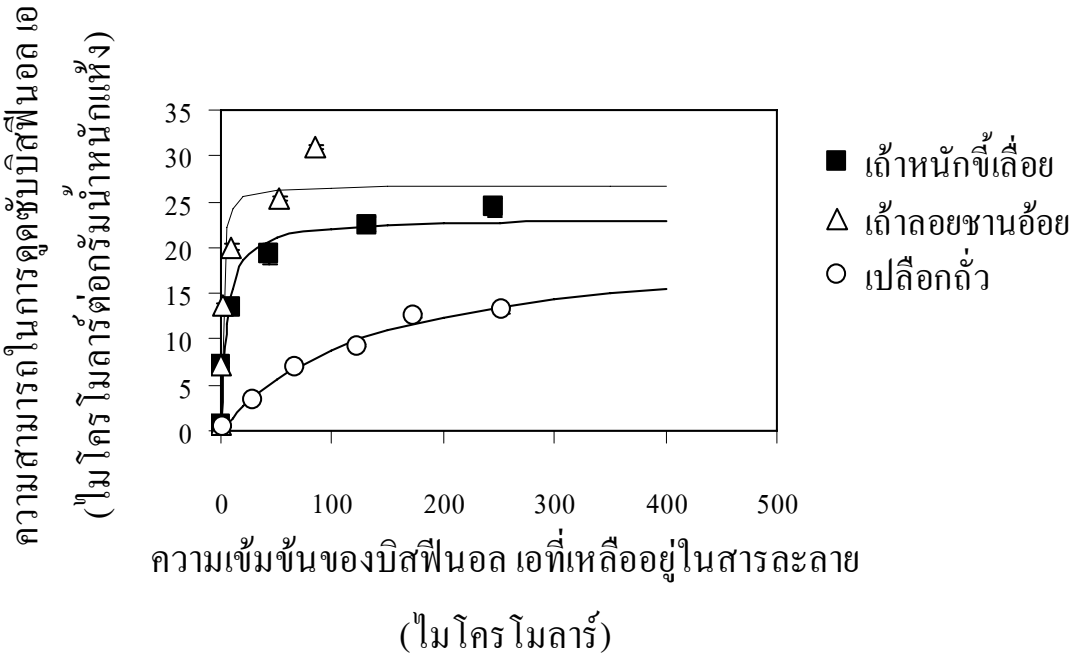


รูปที่ 19 แสดงแลงเมียร์ไอโซเทอร์ม ของการกำจัดบิสฟีนอลเอด้วยถ่านกัมมันต์เถ้าลอยขี้เลื่อย (■)และถ่านกัมมันต์ (▲) 0.006 กรัม ในสารละลายบิสฟีนอลเอ 10 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 20, 200, 400, 600 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาสัมผัส 720 นาที โดยเขย่าในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที

ตารางที่ 3 แสดงแลงเมียร์ไอโซเทอร์มการดูดซับบิสฟีนอลเอโดยเถ้าลอยขี้เลื่อยกัมมันต์ และถ่านกัมมันต์ ที่ 30 องศาเซลเซียส

ตัวดูดซับ	q_{max} (µM /g dry wt.)	b (l/mg)	ΔH (KJ/mol)	R^2
Sawdust bottom ash activated carbon	411.41	2.57	-33.46	0.9961
Activated carbon	688.37	11.22	-37.17	0.9780

จากการศึกษาการดูดซับที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส วัสดุดูดซับทุกชนิดจะมีความสามารถในการดูดซับสูงที่สุด โดยเถ้าหนักขี้เลื่อยมีค่าการดูดซับสูงสุด (q_{max}) เป็น 23.17 ไมโครโมลาร์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เถ้าลอยชานอ้อยเป็น 26.81 ไมโครโมลาร์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเปลือกถั่วเป็น 20.68 ไมโครโมลาร์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งสอดคล้องกับไอโซเทอร์มการดูดซับแบบแลงเมียร์ โดยไอโซเทอร์มการดูดซับแบบแลงเมียร์ของวัสดุดูดซับแต่ละชนิดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสซึ่งมีความสามารถในการดูดซับสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 8 และแสดงค่าค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในตารางที่ 4 และรูปที่ 20



รูปที่ 20 ไอโซเทอร์มการดูดซับแบบแลงเมียร์ของเถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย และเปลือกถั่ว ที่ 50 องศาเซลเซียสเขย่าที่ 110 รอบต่อนาที เวลา 720 นาที

ตารางที่ 4 ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ จากไอโซเทอร์มการดูดซับแบบแลงเมียร์

ชนิดของวัสดุดูดซับ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าความสามารถในการดูดซับสูงสุด (ไมโครโมลาร์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)	$b \times 10^{-3}$ (ลิตรต่อมิลลิกรัม)	R^2
เถ้าหนักขี้เลื่อย	30	21.24	0.12	0.9809
	40	22.94	0.15	0.9620
	50	23.17	0.20	0.9449
เถ้าลอยชานอ้อย	30	23.36	0.17	0.9978
	40	25.57	0.45	0.9673
	50	26.81	0.96	0.9193
เปลือกถั่ว	30	18.81	0.01	0.9677
	40	19.96	0.01	0.9835
	50	20.68	0.01	0.9883

ซึ่งเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นความสามารถในการดูดซับเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะช่วยเพิ่มโอกาสในการสัมผัสกันของตัวถูกดูดซับกับวัสดุดูดซับได้มากขึ้นทำให้เกิดการดูดซับได้มากขึ้น

ผลการศึกษาการชะออกของบิสฟีนอลเอจากวัสดุดูดซับ

จากการศึกษาการชะออกของบิสฟีนอลเอ ด้วย น้ำปราศจากไอออน 0.5 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ และเอทานอล ตามลำดับ พบว่าการชะออกของบิสฟีนอลเอ ทั้งหมด ของเถ้าหนักขี้เลื่อยเป็นร้อยละ 14 เถ้าลอยชานอ้อย เป็นร้อยละ 13 และเปลือกถั่วเป็นร้อยละ 25 จากผลการศึกษาการชะออกของบิสฟีนอลเอและผลการศึกษาการดูดซับบิสฟีนอลเอ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ค่าความสามารถในการดูดซับสูงสุดจะเพิ่มขึ้น จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการดูดซับบิสฟีนอลเอ ของวัสดุดูดซับทั้งสามชนิดโดยส่วนใหญ่เป็นการดูดซับทางเคมี

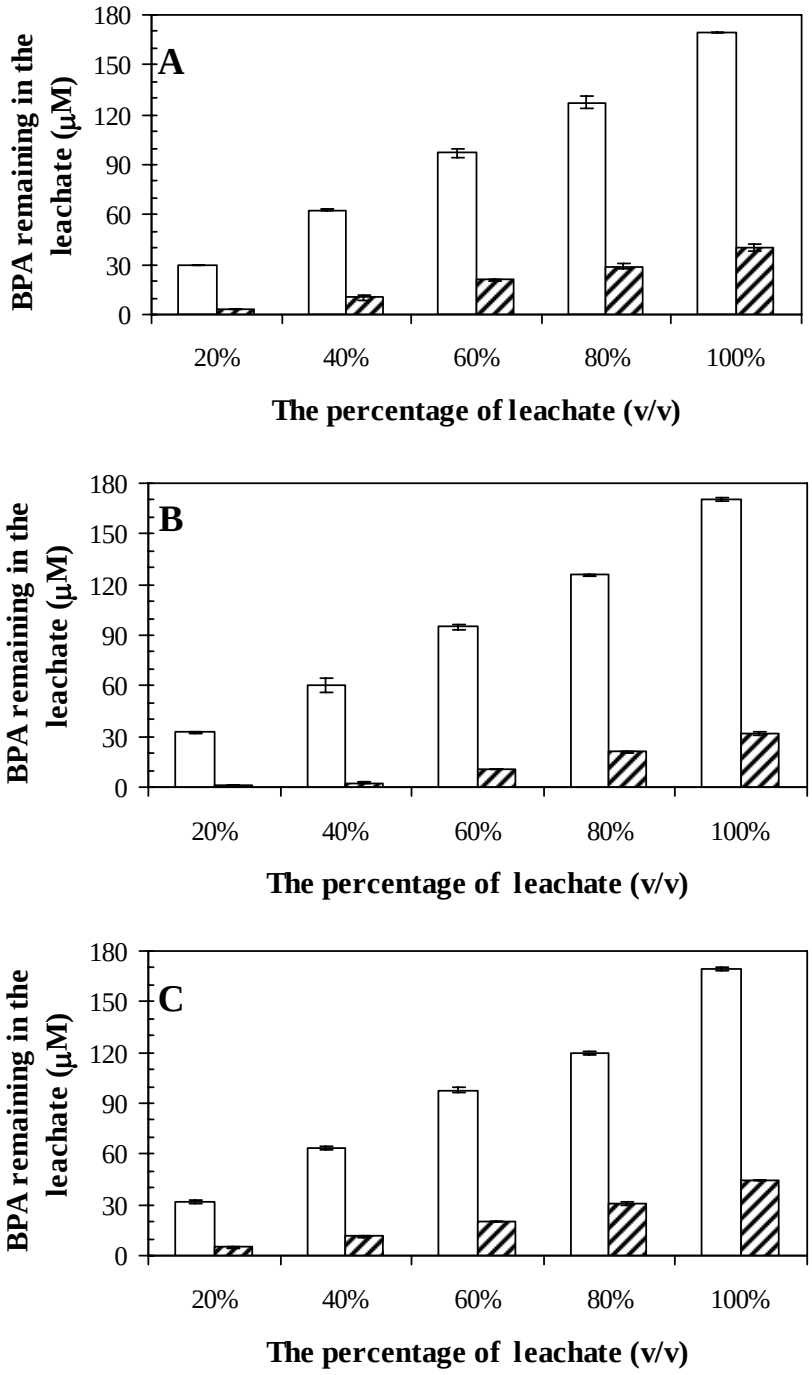
9. ผลการดูดซับบิสฟีนอล เอ ในน้ำชะจากหลุมฝังกลบขยะอันตราย

ศึกษาการกำจัดบิสฟีนอลเอในน้ำชะขยะ นำน้ำชะขยะที่ได้จากหลุมฝังกลบขยะแห่งหนึ่ง มาวิเคราะห์องค์ประกอบต่างดังผลในตารางที่ 3 พบว่ามีบิสฟีนอเออยู่ในช่วง 169 ไมโครโมลาร์ และพบโลหะหนักคือตะกั่วและแคดเมียม

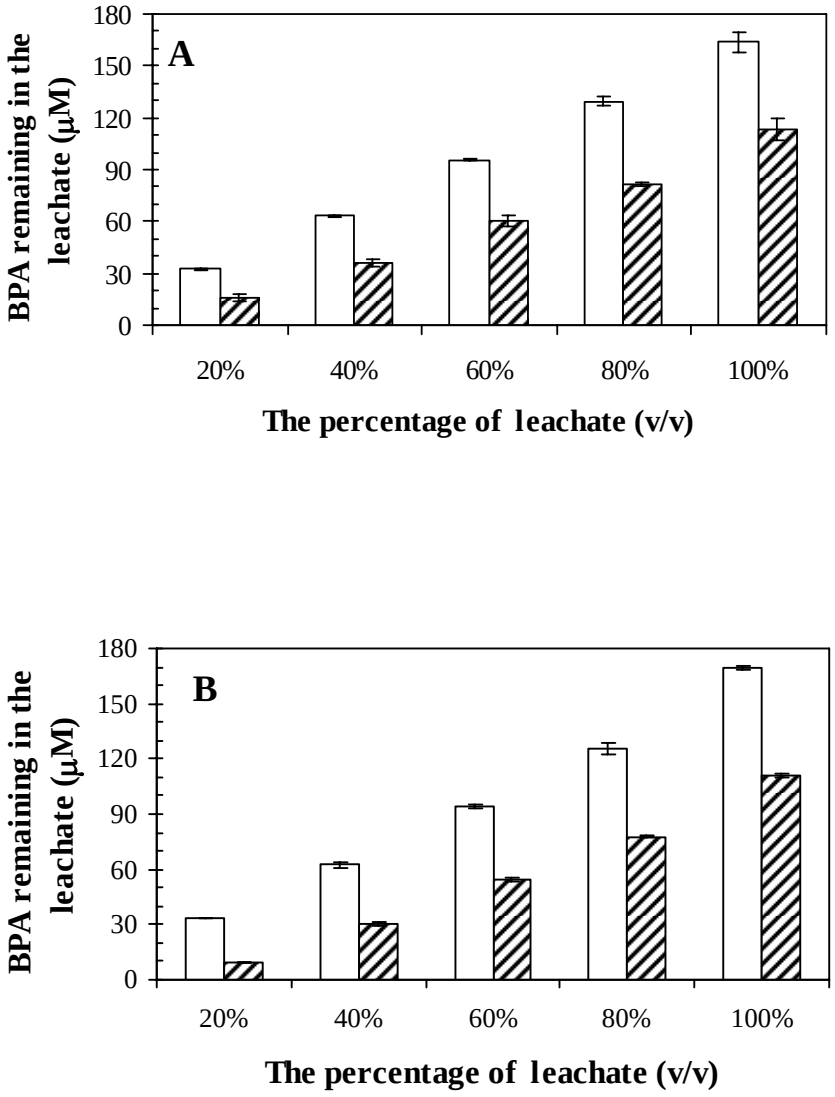
ตารางที่ 3 คุณสมบัติของน้ำชะขยะ

พารามิเตอร์	ค่าที่วัดได้	หน่วย
Odour	foul odour	-
Color	Dark brown	-
pH	7.72	-
Biochemical Oxygen Demand (BOD)	26,400	mg/l
Chemical Oxygen Demand (COD)	92,398	mg/l
Total Kjeldahl Nitrogen (TKN)	2,889	mg/l
Total Solid (TS)	48,024	mg/l
Total Suspended Solid (TSS)	385	mg/l
Total Dissolved Solid (TDS)	47,635	mg/l
BPA concentration	169	μM
Mercury (Hg)	Non detectable	mg/l
Lead (Pb)	0.28	mg/l
Cadmium (Cd)	0.1	mg/l

จากนั้นเปรียบเทียบการกำจัดบิสฟีนอลเอในน้ำขยะขยะ 2 วิธี คือการนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น และการตกตะกอนด้วยอลัมน์ ก่อนนำมาดูดซับ พบว่า การนำน้ำชะขยะมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ร้อยละ 20 40 60 80 และ 100 ก่อนน้ำมาศึกษาการดูดซับบิสฟีนอลเอ โดยวัสดูดดูดซับทั้ง 3 ชนิดคือ เถ้าลอยขี้เลื่อย (sawdust bottom ash) เถ้าลอยชานอ้อย (bagasse fly ash) และ เปลือกถั่ว (groundnut shell) โดยเถ้าลอยขี้เลื่อย (3% W/V) กำจัดได้ ร้อยละ 90 84 79 77 และ 76 ตามลำดับ และโดยเถ้าลอยชายอ้อนกำจัดได้ร้อยละ 98 96 89 84 และ 81 ตามลำดับ และโดยเปลือกถั่ว (5% W/V) กำจัดได้ ร้อยละ 85 82 79 74 และ 74 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 21 A, B และ C

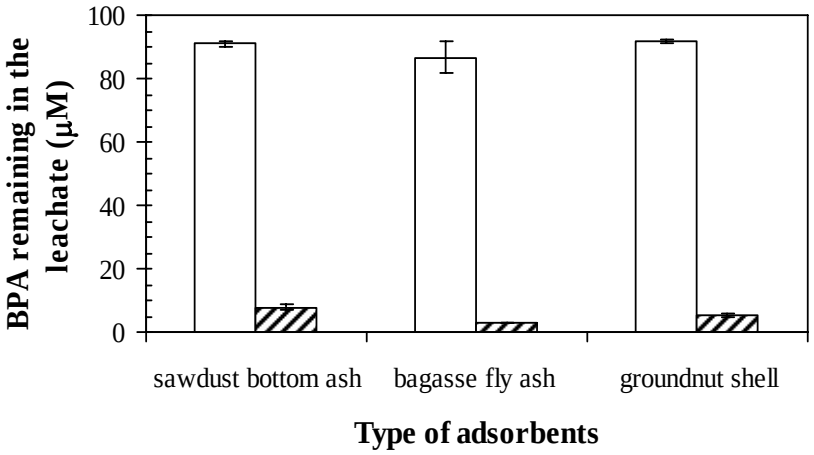


รูปที่ 21 แสดงการกำจัดบิสฟีนอลเอในน้ำชะขยะที่นำมาเจือจางที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 40 60 80 และ 100 ก่อนการกำจัด (□) และ หลังการกำจัด (■) โดย 3% (W/V) เถ้าลอยขี้เลื่อย (A) 3% (W/V) เถ้าลอยชานอ้อย (B) และร้อยละ 5 (W/V) เปลือกถั่ว (C)



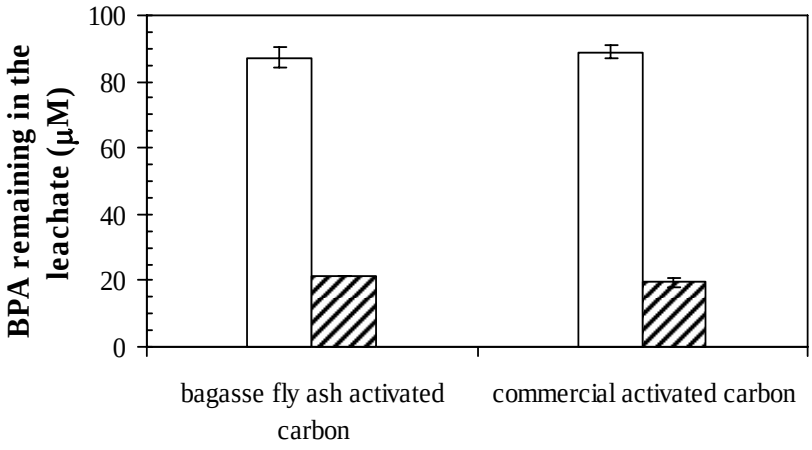
รูปที่ 22 แสดงการกำจัดบิสฟีนอลเอในน้ำชะขยะที่นำมาเจือจางที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 40 60 80 และ 100 ก่อนการกำจัด (□) และ หลังการกำจัด (■) โดย ถ่านกัมมันต์เถ้าลอยชานอ้อย (A) และ ถ่านกัมมันต์ทางการค้า (B) ที่ร้อยละ 0.06 (W/V)

รูปที่ 23 แสดง การกำจัดบิสฟีนอลเอโดยใช้ ถ่านกัมมันต์เถ้าลอยชานอ้อย (A) และถ่านกัมมันต์ทางการค้า (B) พบว่า ในถ่านกัมมันต์ชานอ้อยกำจัดได้ ร้อยละ 50 42 37 37 และ 31 ตามลำดับ ส่วนในถ่านกัมมันต์ทางการค้า กำจัดได้ร้อยละ 73 51 42 38 และ 35 ตามลำดับ



รูปที่ 23 แสดงการกำจัดบิสฟีนอลเอในน้ำชะขยะที่นำมาตกตะกอนด้วยอลัมน์ร้อยละ 25 ก่อนการกำจัด (□) และ หลังการกำจัด (■) โดย 3% (W/V) เถ้าลอยขี้เลื่อยร้อยละ 3 (W/V) เถ้าลอยชานอ้อย และ 5 (W/V) เปลือกถั่ว

เมื่อนำน้ำชะขยะมาตกตะกอนด้วยอลัมน์ร้อยละ 25 (ประมาณ 90 ไมโครโมล) ก่อนนำมาทำการทดลองพบว่า ในเถ้าลอยขี้เลื่อย กำจัดได้สูงถึง ร้อยละ 91 เถ้าลอยชานอ้อยกำจัดได้ สูงถึง ร้อยละ 97 และในเปลือกถั่วกำจัดได้สูงถึง ร้อยละ 94 ดังแสดงในรูปที่ 24



รูปที่ 24 แสดงการกำจัดบิสฟีนอลเอในน้ำชะขยะที่นำมาตกตะกอนด้วยอลัมน์ร้อยละ 25 ก่อนการกำจัด (□) และ หลังการกำจัด (■) โดยถ่านกัมมันต์ เถ้าลอยชานอ้อย และ ถ่านกัมมันต์ทางการค้า 0.06 (W/V)

ส่วนในถ่านกัมมันต์ชานอ้อยและถ่านกัมมันต์ทางการค้า กำจัดได้ ร้อยละ 76 และ 78 ตามลำดับ (รูปที่24) ซึ่งพบว่าเถ้าลอยชานอ้อยสามารถกำจัดบิสฟีนอลเอ ผ่านค่ามาตรฐานน้ำทิ้งของกระทรวงอุตสาหกรรม ที่กำหนดให้สารประกอบในกลุ่มฟีนอลมีค่าไม่เกิน1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้เถ้า

หนักขี้เลื่อย และเปลือกถั่ว เป็นวัสดุดูดซับที่สามารถกำจัดบิสฟีนอลเอ ได้สูง และโดยปกติการบำบัดน้ำชะขยะจากหลุมฝังกลบขยะอันตรายจะต้องผ่านกระบวนการบำบัดขั้นต้นก่อนซึ่งอาจทำให้มีปริมาณความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอลดลง เมื่อนำมาบำบัดด้วยวัสดุดูดซับหรือหากใช้ปริมาณของวัสดุดูดซับเหล่านี้เพิ่มขึ้นจะสามารถกำจัดบิสฟีนอลเอให้ผ่านค่ามาตรฐานน้ำทิ้งของกระทรวงอุตสาหกรรมได้

สรุปผล

เถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย และ เปลือกถั่ว เป็นวัสดุดูดซับที่มีประสิทธิภาพสูงในการดูดซับบิสฟีนอลเอ โดยเฉพาะเถ้าลอยชานอ้อยสามารถกำจัดบิสฟีนอลเอ ผ่านค่ามาตรฐานน้ำทิ้งของกระทรวงอุตสาหกรรม ซึ่งมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดบิสฟีนอล เอในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมและน้ำชะจากหลุมฝังกลบขยะในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Radhika M., and Palanivelu K. Adsorptive removal of chlorophenols from aqueous solution by low cost adsorbent-Kinetics and isotherm analysis. J. Hazardous Materials. (2006), 138: 116-124.
2. Banat F. A., Bashir B. Al., Asheh S. Al., and Hayajneh O. 2000. Adsorption of phenol by bentonite. Environmental Pollution. (2000), 107: 391-398.
3. Gupta V. K., Ali I., and Sani V. K. Removal of chlorophenols from wastewater using red mud, an aluminum industry waste. Environmental Science. (2004), 38: 4012-4018
4. Rengaraj S., Moon S. H., Sivabalan R., Arabindoo B., and Murugesan V. Agricultural solid waste for the removal of organics, adsorption of phenol from water and wastewater by palm seed coat activated carbon. Waste Management. (2002), 22: 543-548.
5. Tsai W. T., Lai C. W., and Su T. Y. Adsorption of bisphenol A from aqueous solution onto minerals and carbon adsorbents. J. Hazardous Materials. (2006), 134: 169-175.
6. Kosky P. E., and Guggenheim E. A. The aqueous phase in the interfacial synthesis of polycarbonates. Ionic equilibrium and experimental solubilities in the BPA-NaOH-H_2O system. Industrial & Engineering Chemistry Research. (1991), 30(3): 462-467.
7. Tsai W. T. and Chang C. Y. Surface characterization and thermodynamics of adsorption of methylene chloride on activated carbons. Environmental Science Health Part A.(1995), 30(3): 525-535.

สรุปผลการดำเนินงานโครงการโดยย่อ

การวิจัยส่วนที่ 1 คัดเลือกพืชที่เหมาะสมในการกำจัดบิสฟีนอลเอ ในพืช 4 ชนิด คือ ต้นกวนอิม (*Dracaena sanderina)* ต้นวาสนา (*Dracaena fragrans*) ต้นพลูด่าง (*Scindapsus aureus*) และต้นพลูฉลุ (*Monstera oblique*) พบว่า ต้นกวนอิม (*Dracaena sanderina*) สามารถกำจัดบิสฟีนอล เอได้สูงสุดที่ร้อยละ 86.93 และ 0.8960 ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และต้นกวนอิมอายุ 2 เดือนสามารถกำจัดบิสฟีนอล เอ ได้สูงสุดร้อยละ 83 และที่ ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดบิสฟีนอลเอ และกลไกการกำจัดบิสฟีนอลเอโดยแบคทีเรียที่ราก ตลอดจนศึกษาการกำจัดบิสฟีนอลเอโดยต้นกวนอิมในน้ำชะขยะ พบว่าสามารถกำจัดได้

การวิจัยส่วนที่ 2 คัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่เหมาะสมในการกำจัดบิสฟีนอลเอ ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดบิสฟีนอลเอโดยแอคคามาไทด์ไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon hibernicus* ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดบิสฟีนอลเอ พบว่ากลไกการกำจัดบิสฟีนอลเอ ของไซยาโนแบคทีเรียมีการผลิต exopolysaccharide ออกมา จึงสกัดโพลิแซคคาไรด์และนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบ ตลอดจนศึกษาการกำจัดบิสฟีนอลเอโดย *Hapalosiphon hibernicus* ในน้ำชะขยะพบว่าสามารถกำจัดได้

การวิจัยส่วนที่ 3 คัดเลือกวัสดุดูดซับใหม่ 7 ชนิด คือ เถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย เปลือกไข่ กาบมะพร้าว เปลือกถั่ว ฟางข้าว และเปลือกข้าวโพด เพื่อศึกษาการกำจัดบิสฟีนอล เอโดยศึกษาการดูดซับโดยเตรียมวัสดุดูดซับ 3 วิธี คือวัสดุดูดซับที่ไม่ปรับสภาพ ปรับสภาพด้วย 0.1 N H_2SO_4 และ 0.1 N NaOH ทำการดูดซับที่ความเข้มข้นบิสฟีนอล เอ 20 ไมโครโมลลาร์ พบว่าวัสดุดูดซับที่ไม่ได้ปรับสภาพมีประสิทธิภาพในการกำจัดบิสฟีนอล เอเท่ากับร้อยละ 99 99 5 75 76 59 และ 44 ตามลำดับ วัสดุดูดซับทั้งที่ยังไม่ปรับสภาพและปรับสภาพด้วย 0.1 N H_2SO_4 และ 0.1 N NaOH จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดบิสฟีนอล เอได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value $<$ 0.05) จึงเลือกศึกษาในวัสดุดูดซับที่ยังไม่ปรับสภาพมาใช้ในการศึกษาต่อไป และพบว่า เถ้าหนักขี้เลื่อย เถ้าลอยชานอ้อย และ เปลือกถั่ว เป็นวัสดุดูดซับที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดบิสฟีนอล เอ ได้สูงที่สุด ที่ร้อยละ 99 99 และ 76 ตามลำดับ

จากการศึกษาเปรียบเทียบการกำจัดบิสฟีนอลเอระหว่าง 3 วิธีการโดยการใช้พืช สาหร่ายและวัสดุดูดซับ พบว่าแต่ละวิธีมีศักยภาพในการกำจัดที่ค่อนข้างสูง และมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกัน ผู้วิจัยคิดว่า ไฟโตริมิดิเอชั่น (phytoremediation)โดยใช้พืชและสาหร่ายมีความเป็นไปได้สูงในการนำมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดบิสฟีนอลเอจากน้ำชะขยะ โดยการนำพืชไปประยุกต์ใช้ในระบบพื้นที่ชุ่มน้ำ ซึ่งวิจัยจะได้ทำการศึกษาต่อไป

ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยี ไฟโตริมิดิเอชั่นในเชิงพาณิชย์โดยมีบริษัทหลายแห่งที่รับจ้างในการกำจัดโลหะหนักโดยใช้เทคโนโลยีดังกล่าว อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีไฟโตริมิดิเอชั่นยังต้องการความร่วมมือจากภาครัฐในการกำหนดมาตราการต่างๆ และสนับสนุนเทคโนโลยีไฟโตริมิดิเอชั่นในระดับอุตสาหกรรม แม้ว่าการใช้เทคโนโลยีไฟโตริมิดิเอชั่นจะมีอุปสรรคหลายด้านในเรื่องการกำจัดมวลชีวภาพของพืช แต่ก็มีข้อดีหลายอย่างมากกว่าข้อเสีย งานวิจัยในอนาคตเกี่ยวกับเทคโนโลยี ไฟโตริมิดิเอชั่น ควรมีการศึกษาให้มากกว่านี้ในประเทศไทยโดยเฉพาะการนำมากำจัดสารบิสฟีนอลเอ (ซึ่งเป็นสารตั้นต้นในกระบวนการผลิตพลาสติก เพราะประเทศไทยมีการใช้พลาสติกเป็นจำนวนมาก ทั้งเป็นขวดขึ้นรูปใส่น้ำดื่ม ขวด PETและถุงใส่อาหารต่างๆ) โดยมีวัตถุประสงค์ในการเสาะหาพืชไฮเปอร์แอกคิวมิวเลเตอร์จากแหล่ง

ธรรมชาติที่มีความทนทานต่อสารพิษอื่นๆหลายชนิดและสามารถดูดซับสารพิษในปริมาณมาก มีอัตราการเติบโตเร็ว มีระบบรากที่แข็งแรงและมีมวลชีวภาพมาก

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ (หากยังไม่มี ให้ระบุชื่อเรื่องและชื่อวารสารนานาชาติที่คาดจะตีพิมพ์ได้ และจะตีพิมพ์ได้เมื่อใด)

ตีพิมพ์ระดับนานาชาติ 1 เรื่อง และอยู่ระหว่างรอพิจารณาเพื่อลงตีพิมพ์ 2 เรื่อง

ตีพิมพ์ระดับชาติ 3 เรื่อง (ภาษาไทย)

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

1. S. Saiyood, A.S. Vangnai, P. Thiravetyan, **D. Inthorn** . Bisphenol A removal by the Dracaena plant and the role of the plant-associating bacteria. Journal of Hazardous Material 178(2010), 777-785

   Impact Factor เท่ากับ 2.975 (ปี 2008)

2. Removal of bisphenol A by Sawdust bottom ash**,** bagasse fly ash and groundnut shell (submitted)

3. Degradation of bisphenol A by *Hapalosiphon hibernicus* (submitted)

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับประเทศ

1. Saiyood S., **Inthorn D.,** Vangnai A. and Thiravetyan P. Bisphenol A removal by Ribbon plant (*Dracaena sanderina*). Thai Environmental Engineering Journal. (2010) Vol. 24 No. 1: 19-28..

2. Kumyoung W., **Inthorn D**., Vangnai A. and Thiravetyan P. Removal of bisphenol A by *Hapalosiphon hibernicus*. Thai Environmental Engineering Journal. (2010) Vol. 24 No. 2: 49-57.

3. Kaewdam J., **Inthorn D.,** Vatanasomboon P. and Thiravetyan P. Adsorption of pisphenol A by sawdust bottom ash, bagass fly ash and groundnut shell. Thai Environmental Engineering Journal. (2010) Vol. 24 No. 2: 69-78.

Proceeding 3 เรื่อง

1. สาวิตรี สายหยุด ดวงรัตน์ อินทร ไพทิพย์ ธีรเวชญาณ และ อลิสา วังใน สภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดบิสฟีนอล เอ ด้วยต้นกวนอิม 26R2-07 การประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 8 ระหว่างวันที่ 25-27 มีนาคม 2552 ณ. สุรสัมมนาคาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา
2. วชิราภรณ์ คำยัง ดวงรัตน์ อินทร อลิสา วังใน และ ไพทิพย์ ธีรเวชญาณ การกำจัดบิสฟีนอล เอ โดยการใช้ไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon hibernicus* 26R2-08 การประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ

ครั้งที่ 8 ระหว่างวันที่ 25-27 มีนาคม 2552 ณ. สุรสัมมนาคาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

3. จิรา แก้วดำ ดวงรัตน์ อินทร พิศิษฐ์ วัฒนสมบูรณ์ และ ไพทิพย์ ธีรเวชญาณ การดูดซับบิสฟีนอล เอ โดยเถ้า หนักขี้เลื่อย, เถ้าลอยชานอ้อย และเปลือกถั่ว 26R2-09 การประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ครั้งที่ 8 ระหว่างวันที่ 25-27 มีนาคม 2552 ณ. สุรสัมมนาคาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวันครราชสีมา

กิจกรรมอื่น ๆที่เกี่ยวข้อง ได้แก่

(1) ผลงานอื่นๆ เช่น การไปเสนอผลงาน การได้รับเชิญไปเป็นวิทยากร

เข้าร่วมงานประชุมวิชาการและนำเสนอผลงาน

ระดับนานาชาติ 2 ครั้ง

1. Oral presentation " Removal of cadmium by immobilized *Rivularia* sp. Duangrat Inthorn, Siriporn Sombatjinda, Nuttaporn Boontong, Prayad Pokethitiyook and Chalermraj Wantawin ในการประชุม Vth Asian Pacific Phycology Forum: Algae in a changing world at Rutherford House, Pipitea Campus, Victoria University of Wellington, Wellington, New Zealand 9-15 November 2008

2. Oral presentation "Application of immobilized cyanobacteria for heavy metal removal" Duangrat Inthorn, Numphung Duangkokkruad, Nalin Sidtitoon, Siriporn Sombatjinda, Nattaporn Boontong, Sudarat Chaichalerm, chonmasuk Sukhum, Paitip Thiravetyan and Aran Incharoensakdi. Cyanobacteria & Algae Biotechnology Symposium (CABS), 31 March 2010, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

ระดับประเทศ 4 ครั้ง

Oral presentation

1. เรื่อง การใช้พืช และสาหร่ายในกำจัดบิสฟีนอล เอ ดวงรัตน์ อินทร วีรยุทธ สิริรัตน์เรืองสุข ปิยะวดี ศรีวิชัย วิเทศ ศรีเนตร ไพทิพย์ ธีรเวชญาณ และพิศิษฐ์ วัฒนสมบูรณ์ การประชุมสาธารณสุขแห่งชาติ ครั้ง ที่ 11 ธันวาคมโรงแรมแอมบาสเดอร์ กรุงเทพฯ , 2551
2. เรื่อง สภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดบิสฟีนอล เอ ด้วยต้นกวนอิม (26R2-07) สาวิตรี สายหยุด ดวงรัตน์ อินทร ไพทิพย์ ธีรเวชญาณ และ อลิสา วังใน proceeding การประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ครั้งที่ 8 ระหว่างวันที่ 25-27 มีนาคม 2552 ณ. สุรสัมมนาคาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา (เอกสารหมายเลข 3)
3. เรื่อง การกำจัดบิสฟีนอลเอโดยการใช้ไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon hybernicus* (26R2-08) วชิราภรณ์ คำยัง ดวงรัตน์ อินทร อลิสา วังใน และ ไพทิพย์ ธีรเวชญาณ proceeding การประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 8 ระหว่างวันที่ 25-27 มีนาคม 2552 ณ. สุรสัมมนาคาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

4.เรื่องการดูดซับบิสฟีนอล เอ โดยเถ้า หนักขี้เลื่อย, เถ้าลอยชานอ้อย และเปลือกถั่ว (26R2-09) จิรา แก้วดำ ดวงรัตน์ อินทร พิศิษฐ์ วัฒนสมบูรณ์ และ ไพทิพย์ ธีรเวชญาณproceeding การประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 8 ระหว่างวันที่ 25-27 มีนาคม 2552 ณ. สุรสัมมนาคาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวันครราชสีมา

Poster presentation

1. เรื่อง Adsorption characteristics and mechanism of bisphenol A onto Sawdust bottom ash ในการประชุมวิชาการประจำปีของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย “นักวิจัยรุ่นใหม่....พบ....เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 9 ระหว่างวันที่ 15-17 ตุลาคม 2552 ที่ โรงแรมฮอลิเดย์ อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี
2. เรื่อง Bisphenol A removal by the Dracaena plant and the role of the plant-associating bacteria ในการประชุมวิชาการประจำปีของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย “นักวิจัยรุ่นใหม่....พบ....เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 10 วันที่ 14-16 ตุลาคม 2553 ที่ โรงแรมฮอลิเดย์ อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี

การเชื่อโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่น ๆทั้งในและต่างประเทศ

งานวิจัยนี้ทำร่วมกับ รศ. ดร. ไพทิพย์ ธีรเวชญาณ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน และ รศ. ดร. อลิสา วังใน ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ดร. อิโรยาสุ นากาเซะ คณะเภสัช มหาวิทยาลัยโอซาก้า ประเทศญี่ปุ่น

ปัญหาและอุปสรรค

การศึกษาวิจัยนี้ เป็นการวิเคราะห์เพียงสารตัวเดียวคือ บิสฟีนอลเอ แล้วรายงานผล ว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดบิสฟีนอลเอได้มากน้อยเพียงไร (ก่อนและหลังการทดลอง) ซึ่งระหว่างการทดลองเราไม่ทราบว่าเกิดการย่อยสลาย หรือสลายตัวเป็นสารกึ่งกลางอื่น (intermediate) หรือไม่ แ ละคือสารอะไร ยังมีความเป็นพิษหรือไม่ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องวิเคาระห์หาสารกึ่งกลางที่พบ (intermediate) ให้ได้ว่าคือสารอะไร เพื่อยืนยันว่าระบบของเรามีประสิทธิภาพและทำให้เกิดความปลอดภัยอย่างแท้จริงควรต้องมีการนำมาทดสอบทางพิษวิทยาต่อไปอีกด้วย

การวิเคราะห์การสารกึ่งกลางทำได้ยากเพราะว่าเราไม่มีสารมาตรฐานในการตรวจสอบ (งานวิจัยในต่างประเทศ สังเคราะห์สารตัวที่สงสัยขึ้นมาเป็นสารมาตรฐานเอง แต่ทางผู้วิจัยไม่มีองค์ความรู้เพียงพอที่จะทำเช่นนั้นได้)

ความเห็นและข้อเสนอแนะ

งานที่จะทำในปีต่อไป

จากผลการศึกษาคิดว่าระบบการบำบัดโดยใช้พืช น่าจะเป็นแนวทางที่นำไปประยุกต์ใช้ได้ง่าย ในระบบ wetland ส่วนการบำบัดโดยใช้สาหร่ายจะสามารถนำเข้าไปเพิ่มแทรกหลังระบบบำบัดน้ำเสียในหลุมฝังกลบขยะ (landfill) ได้ จึงคิดว่าจะศึกษาในปีต่อไปดังนี้

1. ศึกษาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่เกิดที่รากต้นกวนอิมและต้นกวนอิมในการกำจัดบิสฟีนอล เอ เช่น ศึกษา ประชากรของแบคทีเรีย (consortium) ของแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค DGGE และศึกษาการนำ bioaugmentation ไปใช้ในระบบ ระบบบำบัดแบบชุ่มน้ำ (Wet land) เพื่อดูว่าbioaugmentation ในห้องปฏิบัติการจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้จริงในสิ่งแวดล้อมได้หรือไม่

2. ศึกษากลไกของการดูดซับบิสฟีนอล เอ
โดยวิเคราะห์ผิวเซลล์ก่อนและหลังดูดซับด้วย FTIR
โดยวิเคราะห์หาชนิดของสารตัวกลาง (intermidate) ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการกำจัดบิสฟีนอลเอ

3. ศึกษาเพื่อ ศึกษาหารชนิด (identify) สารกึ่งกลางที่พบ (Intermidiate) ที่เกิดระหว่างการทดลอง เพื่อตอบคำถามว่า ยังมีความเป็นพิษหรือไม่

ภาคผนวก

ประกอบด้วย

รูปวัสดุดูดซับเถ้าหนักขี้เลื่อย (Sawdust bottom ash)

บทความวิชาการจำนวน 4 เรื่อง

รูปแสดงวัสดุดูดซับ เถ้าหนักขี้เลื่อย (Sawdust bottom ash)