

การย่อยสลายบิสฟีนอล เอ โดย *Bacillus cereus* BPW4 ที่ตรึงในเจลแลนแกมและอัลจิเนต



นางสาวนันทธร เการาช

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEGRADATION OF BISPHENOL A BY *Bacillus cereus* BPW4 IMMOBILIZED IN GELLAN
GUM AND ALGINATE



Miss Nanthorn Paorach

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การย่อยสลายบิสฟีนอล เอ โดย *Bacillus cereus* BPW4 ที่
ตรึงในเจลแลนแกมและอัลจิเนต

โดย

นางสาวนันท์ธร เการาช

สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร. อลิสา ว่างโน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธีเนียนัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. อลิสา ว่างโน)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรฤทัย ภิญญาคง)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร. อรมาศ สุทธิรุ่ง)

นันทิธร ภาวราช : การย่อยสลายบิสฟีนอล เอ โดย *Bacillus cereus* BPW4 ที่ตรึงในเจลแลนแกมและอัลจิเนต (DEGRADATION OF BISPENOL A BY *Bacillus cereus* BPW4 IMMOBILIZED IN GELLAN GUM AND ALGINATE) อาจารย์ที่ปรึกษา
 วิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย, อาจารย์ที่ปรึกษา
 วิทยานิพนธ์ร่วม : รองศาสตราจารย์ ดร. อลิสา วังโน, 136 หน้า.

บิสฟีนอล เอ (Bisphenol A, BPA) เป็นสารเคมีที่ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรม ส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและก่ออันตรายต่อสุขภาพ งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาวิธีการสำหรับส่งเสริมการย่อยสลาย BPA โดยการทดลองเบื้องต้นได้ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Methylobacterium* sp. NP3 *Enterobacter* sp. BPR1, *Enterobacter* sp. BPW5, *Bacillus cereus* BPW4 และ *Sphingobium* sp. P2 และศึกษาเปรียบเทียบสารอาหาร 3 ชนิด คือ 0.1% เปปโตเน 0.1% กลูโคส และ 0.1% สารสกัดจากยีสต์ ผลการทดลองพบว่า *Bacillus cereus* BPW4 สามารถย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 66% ซึ่งเป็นค่าสูงที่สุด และ 0.1% กลูโคส เป็นสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับเสริมการย่อยสลาย BPA อย่างไรก็ตามแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 ย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นสูงได้ไม่ค่อยดี งานวิจัยนี้จึงเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA โดยใช้วิธีตรึงเซลล์ในเจลแลนแกมและอัลจิเนตแบบกักขัง ผลการทดลองพบว่าเซลล์ตรึงในเม็ดเจลแลนแกมและอัลจิเนต สามารถย่อยสลาย BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 37% และ 62% ตามลำดับ ส่วนเม็ดเจลที่ไม่มีแบคทีเรียสามารถลดปริมาณ BPA ได้เพียง 3% และเซลล์อิสระสามารถย่อยสลาย BPA ได้ 30% เท่านั้น นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียในอัลจิเนตมีปริมาณสูงกว่าในเจลแลนแกมหลังจากบ่ม 15 วัน แสดงว่าอัลจิเนตปกป้องแบคทีเรียจากความเป็นพิษของ BPA ได้ดีกว่าเจลแลนแกม และส่งผลให้แบคทีเรียตรึงในอัลจิเนตมีประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ได้มากกว่า การเติมกลูโคสยังช่วยเสริมการทำงานของเซลล์ตรึง โดยเซลล์ตรึงในอัลจิเนตมีประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ต่ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่ไม่เติม 0.1% กลูโคส เซลล์ตรึงในเม็ดเจลอัลจิเนตยังสามารถนำมาใช้ซ้ำเป็นระยะเวลา 35 วัน ดังนั้นจึงอาจใช้เซลล์ตรึงในเม็ดเจลอัลจิเนตร่วมกับการเติมกลูโคสสำหรับบำบัด BPA ในระบบถังปฏิกรณ์ต่อไป

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อ.....*นันทิธร ภาวราช*.....
 สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....*นันทิธร ภาวราช*.....
 ปีการศึกษา 2552.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....*เอกวัล ลือพร้อมชัย*.....

5172337923 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : Bisphenol A/ Biodegradation/ Bacillus/ Immobilization

NANTHORN PAORACH : DEGRADATION OF BISPHENOL A BY *Bacillus cereus* BPW4 IMMOBILIZED IN GELLAN GUM AND ALGINATE. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. EKAWAN LUEPROMCHAI, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. ALISA VANGNAI, Ph.D., 136 pp.

Bisphenol A (BPA) has been used extensively in industries, thus resulted in widespread contamination and posed potential health threats. This research aimed to develop a technique for increase BPA degradation. The preliminary experiment investigated BPA degradability of five bacterial strains including *Methylobacterium* sp. NP3, *Enterobacter* sp. BPR1, *Enterobacter* sp. BPW5, *Bacillus cereus* BPW4, and *Sphingobium* sp. P2 and compared three supplement nutrients including 0.1% peptone, 0.1% glucose, and 0.1% yeast extract. Of the tested bacteria, *Bacillus cereus* BPW4 had the highest degrading activity and it could degrade over 66% of 5 mg/L BPA. In addition, 0.1% glucose was the most effective supplement nutrient. However, strain BPW4 had lower activity on degrading high BPA concentrations. Therefore, the study increased BPA degrading efficiency of strain BPW4 by immobilizing the cells in natural polymer using entrapment approaches. Cells immobilized in gellan gum and aliginate degraded 37% and 62% of 40 mg/L BPA, respectively. Meanwhile, only 3% and 30% of BPA was removed by uninoculated gel beads and free cells, respectively. In addition, bacterial count in alginate was higher than in gellan gum after 15 days. These results indicated that alginate protected the cells from BPA better than gellan gum and thereby increased BPA degrading activity. The supplement of glucose was also beneficial to the immobilized cells, since they had low BPA degrading activity in CFMM medium without 0.1% glucose. Additionally, alginate-immobilized cells could be used repeatedly for 35 days. Therefore, the immobilized cells along with glucose should be further applied in reactor for BPA treatment.

Department Microbiology Student's..... Nanthorn Paosach
Field of Study..... Industrial Microbiology Advisor's..... Ekawan
Academic Year... 2009 Co-Advisor's Signature... Alisa Vangnai

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ด้วยดี โดยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วนสมบูรณ์ ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านอื่นๆ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อลิสา วั่งโน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านอื่นๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธานีวัน ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณทัย ภิญญาคง และอาจารย์ ดร.อรมาศ สุทธิบูรณ์ เป็นอย่างสูงที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยในการดำเนินงานวิจัย จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยการบำบัดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี สถาบันวิจัยแห่งชาติ และศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย ที่ให้การสนับสนุนในด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำต่างๆ ตลอดมา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ร่วมรุ่นทุกคน และพี่ๆ น้องๆ ทุกคน ที่มีส่วนช่วยเหลือในหลายๆ ด้าน สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดาและมารดาที่เป็นแรงบันดาลใจ และกำลังใจในการศึกษาตลอดมา รวมถึงคอยสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป.....	ฅ
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	ด
บทที่	
1. บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	4
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2. ปรีทัศน์วรรณกรรม	
2.1 ปัญหาของ BPA ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม.....	5
2.1.1 สมบัติทางกายภาพของ BPA	5
2.1.2 ความเป็นพิษของ BPA	7
2.1.3 แหล่งที่มาของ BPA ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม.....	7
2.2 จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย BPA.....	8
2.2.1 แบคทีเรียย่อยสลาย BPA ที่ใช้ในการศึกษานี้.....	11
2.2.2 วิธีการย่อยสลาย BPA.....	13
2.2.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย BPA.....	16
2.3 การตรึงเซลล์แบคทีเรีย.....	17
2.3.1 กระบวนการตรึงเซลล์.....	17
2.3.2 การตรึงเซลล์เพื่อย่อยสลาย BPA	19
2.4 เจลแลนแกม (Gellan gum).....	19
2.4.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเจลแลนแกม.....	19

2.4.2 การสังเคราะห์เม็ดเจลเจลแลนแกม.....	21
2.4.3 การตรึงเซลล์ในเม็ดเจลเจลแลนแกมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของ เซลล์ในการย่อยสลายสารเคมีอันตราย.....	21
2.5 อัลจีเนต (Alginate).....	22
2.5.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับอัลจีเนต.....	22
2.5.2 การสังเคราะห์เม็ดเจลอัลจีเนต.....	23
2.5.3 การตรึงเซลล์ในเม็ดเจลอัลจีเนตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ ในการย่อยสลายสารเคมีอันตราย.....	25
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินงานวิจัย	
อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	27
เคมีภัณฑ์.....	28
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	29
3.1 ภาพรวมของวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	29
3.2 การเพาะเลี้ยง <i>Methylobacterium</i> sp. NP3, <i>Enterobacter</i> sp. BPR1, <i>Enterobacter</i> sp. BPW5, <i>Bacillus cereus</i> BPW4 และ <i>Sphingobium</i> sp. P2.....	31
3.2.1 จุลินทรีย์.....	31
3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	32
3.3 การศึกษาสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับเสริมการย่อยสลาย BPA โดยแบคทีเรียแต่ละชนิด.....	32
3.3.1 การเตรียมหัวเชื้อ.....	32
3.3.2 การทดสอบการย่อยสลาย BPA.....	33
3.4. การตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นต่างๆ และตรวจหาสารมัธยันตร์ของกระบวนการย่อยสลาย BPA.....	34
3.4.1 ตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นต่างๆ...	34
3.4.2 การตรวจหาสารมัธยันตร์ของกระบวนการย่อยสลาย BPA.....	34
3.5 การตรึงแบคทีเรียในวัสดุพอลิเมอร์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ การย่อยสลาย BPA และศึกษาลักษณะของเซลล์ตรึง.....	35

3.5.1 การสังเคราะห์เม็ดเจล.....	35
3.5.1.1 การสังเคราะห์เม็ดเจลเจลแลนแกม.....	35
3.5.1.2 การสังเคราะห์เม็ดเจลอัลจิเนต.....	36
3.5.2 การศึกษาลักษณะของวัสดุตั้งและเซลล์ตั้ง.....	37
3.5.2.1 สัณฐานวิทยา.....	37
3.5.2.2 ขนาดของเม็ดเจล.....	38
3.5.2.3 การแตกของเม็ดเจลหลังการสังเคราะห์.....	38
3.5.3 การศึกษาสมบัติของวัสดุตั้ง.....	38
3.5.3.1 การทำปฏิกิริยากับ BPA.....	38
3.5.3.2 การดูดซับ BPA.....	38
3.5.4 การตั้งแบบที่เร็วในวัสดุตั้ง.....	38
3.5.4.1 การตั้งแบบที่เร็วในเจลแลนแกม.....	38
3.5.4.2 การตั้งแบบที่เร็วในอัลจิเนต.....	39
3.5.5 การศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์ตั้งในการย่อยสลาย BPA.....	39
3.5.5.1 การตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ของเซลล์ตั้ง.....	39
3.5.5.2 ความสามารถในการใช้เซลล์ตั้งซ้ำอย่างต่อเนื่อง และความเสถียรของเซลล์ตั้ง.....	40
3.6 การวิเคราะห์.....	41
3.6.1 การวิเคราะห์ปริมาณ BPA.....	41
3.6.2 การวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียอิสระ.....	41
3.6.3 การวิเคราะห์จำนวนของแบคทีเรียในวัสดุตั้ง.....	41
4. ผลการทดลอง	
4.1 การศึกษาสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับเสริมการย่อยสลาย BPA โดยแบคทีเรียแต่ละชนิด.....	43
4.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นต่างๆ และตรวจสอบหารมัยันตร์ของกระบวนการย่อยสลาย BPA	47

4.2.1 การตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA	
ความเข้มข้นต่างๆ.....	47
4.2.2 การตรวจหาสารมัธยันตร์ของกระบวนการ	
ย่อยสลาย BPA	52
4.3 การศึกษาลักษณะและสมบัติของเม็ดเจลและเซลล์ตรึง.....	54
4.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ตรึงและเม็ดเจล	
ทั้ง 2 ชนิด.....	54
4.3.2 การทำปฏิกิริยากับ BPA และการดูดซับ BPA.....	57
4.4 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ของเซลล์ตรึง.....	59
4.4.1 การย่อยสลาย BPA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4	
ที่ตรึงในเจลแลนกัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM	
ที่เติม 0.1% กลูโคส.....	59
4.4.2 การย่อยสลาย BPA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4	
ที่ตรึงในอัลจิเนต ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM	
ที่เติม 0.1% กลูโคส.....	62
4.4.3 การย่อยสลาย BPA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4	
ที่ตรึงในอัลจิเนต ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM	
ที่ไม่เติม 0.1% กลูโคส.....	65
4.4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ตรึงในเม็ดเจลแลนกัม	
และเม็ดเจลอัลจิเนตที่ผ่านการบำบัด BPA.....	68
4.5 การศึกษาประสิทธิภาพการนำเซลล์ตรึงมาใช้ย่อยสลาย BPA	
อย่างต่อเนื่อง และความเสถียรของเซลล์ตรึง.....	70
4.5.1 การย่อยสลาย BPA อย่างต่อเนื่องของเซลล์ตรึง	
ในเม็ดเจลอัลจิเนต.....	70
4.5.2 การศึกษาความเสถียรของเซลล์ตรึงเมื่อนำมาใช้ย่อยสลาย BPA	
อย่างต่อเนื่อง.....	71
5. วิจัยณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง	
5.1 ผลของสารอาหารที่มีต่อการย่อยสลาย BPA	73

บทที่	หน้า
5.2 ชนิดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย BPA.....	75
5.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ของเซลล์ตรึง.....	77
5.3.1 ลักษณะและสมบัติของเม็ดเจล.....	77
5.3.2 การตรวจสอบการย่อยสลาย BPA ของเซลล์ตรึง.....	78
5.3.3 การนำเซลล์ตรึงมาใช้อย่อยสลาย BPA ซ้ำ.....	80
5.4 ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยต่อไป.....	81
รายการอ้างอิง.....	83
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.....	92
ภาคผนวก ข.....	94
ภาคผนวก ค.....	96
ภาคผนวก ง.....	99
ภาคผนวก จ.....	116
ภาคผนวก ฉ.....	132
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	136

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า	
2.1	สูตรโครงสร้างและสมบัติทางกายภาพของ BPA.....	6
2.2	แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย BPA	10
2.3	อนุกรมวิธานของ <i>Methylobacterium</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp. BPR1, <i>Enterobacter</i> sp. BPW5, <i>Bacillus cereus</i> BPW4 และ <i>Sphingobium</i> sp. P2.....	13
2.4	การเปรียบเทียบการสังเคราะห์เม็ดเจลอัลจินต.....	24
3.1	แหล่งที่มาและลักษณะของแบคทีเรียแต่ละชนิด.....	31
4.1	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 และ P2.....	51
5.1	เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย BPA หลังป้อนด้วยแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี การเติมสารอาหารเป็นเวลา 7 วัน.....	74
ค.1	ความเข้มข้นของ BPA ที่ความเจือจาง 1,000 เท่า สำหรับเซลล์อิสระ.....	96
ค.2	ความเข้มข้นของ BPA ที่ความเจือจาง 1,000 เท่า สำหรับเซลล์ตรึง และเซลล์อิสระ.....	97
ค.3	ความเข้มข้นของ HBA.....	98
ง.1	ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของชุดควบคุม ในการย่อยสลาย BPA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	99
ง.2	ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของ <i>Methylobacterium</i> sp. NP3 ในการย่อยสลาย BPA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	100
ง.3	ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของ <i>Enterobacter</i> sp. BPR1 ในการย่อยสลาย BPA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	100
ง.4	ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของ <i>Bacillus cereus</i> BPW4 ในการย่อยสลาย BPA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	101
ง.5	ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของ <i>Enterobacter</i> sp. BPW5 ในการย่อยสลาย BPA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	102

ตาราง	หน้า
ง.6 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของ <i>Sphingobium</i> sp. P2 ในการย่อยสลาย BPA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	102
ง.7 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของชุดควบคุม ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส.....	103
ง.8 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของ <i>Bacillus cereus</i> BPW4 ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส.....	104
ง.9 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของ <i>Sphingobium</i> sp. P2 ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส.....	106
ง.10 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของชุดควบคุมเม็ดเจลเจลแลนแกม ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส.....	107
ง.11 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเซลล์ตรึง BPW4 ในเม็ดเจลเจล แลนแกม ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ใน อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส.....	109
ง.12 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของชุดควบคุมเม็ดเจลอัลจิเนต ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส.....	110
ง.13 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเซลล์ตรึง BPW4 ในเม็ดเจล อัลจิเนต ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส.....	111
ง.14 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของชุดควบคุมในเม็ดเจลอัลจิเนต ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกลูโคส.....	113
ง.15 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเซลล์ตรึง BPW4 ในเม็ด เจลอัลจิเนต ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกลูโคส.....	114

ตาราง	หน้า
ง.16 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเซลล์ตรึงในเม็ดเจลอัลจิเนต เมื่อใช้ในการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างต่อเนื่อง.....	115
จ.1 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ของ <i>Methylobacterium</i> sp. NP3 ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	116
จ.2 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ของ <i>Enterobacter</i> sp. BPR1 ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	117
จ.3 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ของ <i>Bacillus cereus</i> BPW4 ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	117
จ.4 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ของ <i>Enterobacter</i> sp. BPW5 ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	118
จ.5 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ของ <i>Sphingobium</i> sp. P2 ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	119
จ.6 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ของ <i>Bacillus cereus</i> BPW4 ที่ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส.....	119
จ.7 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ของ <i>Sphingobium</i> sp. P2 ที่ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส.....	121
จ.8 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ของเซลล์ตรึง BPW4 ในเม็ดเจล เจลแลนแกม ที่ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม กลูโคส.....	122
จ.9 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ของเซลล์ตรึง BPW4 ในเม็ดเจล อัลจิเนต ที่ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม กลูโคส.....	125
จ.10 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ของเซลล์ตรึง BPW4 ในเม็ดเจล อัลจิเนต ที่ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม กลูโคส.....	128
จ.11 จำนวนแบคทีเรีย ณ วันที่ 0 และ 35 ของเซลล์ตรึง BPW4 ในเม็ดเจลอัลจิเนต ในการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	131

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	การย่อยสลาย BPA โดยแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ MV1.....	15
2.2	การย่อยสลาย BPA โดย <i>Achromobacter xylosoxidans</i> สายพันธุ์ B-16.....	16
2.3	การตรึงเซลล์แบบกักขัง.....	18
2.4	ลักษณะโครงสร้างของเจลแลนกัม.....	20
2.5	ลักษณะผงเจลแลนกัม.....	20
2.6	ลักษณะโครงสร้างของอัลจิเนต.....	23
2.7	ลักษณะผงอัลจิเนต.....	23
3.1	แผนผังการดำเนินงานวิจัย.....	29
3.2	อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมกลูโคสที่เลี้ยงแบคทีเรียชนิดต่างๆ เป็นเวลา 2-4 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลา 0 วัน.....	33
3.3	สูตรโครงสร้างของสารมัธยันตร์ของกระบวนการย่อยสลาย BPA.....	35
3.4	การสังเคราะห์เม็ดเจลแลนกัม.....	36
3.5	การสังเคราะห์เม็ดเจลอัลจิเนต.....	37
4.1	ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (%) ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ไม่มีการเติมสารอาหาร (a) 0.1% เปปโตน (b) 0.1% กลูโคส (c) และ 0.1% สารสกัดจากยีสต์ (d).....	44
4.2	การเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิด ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ไม่มีการเติมสารอาหาร (a) 0.1% เปปโตน (b) 0.1% กลูโคส (c) และ 0.1% สารสกัดจากยีสต์ (d).....	45
4.3	ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (%) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 (a) แบคทีเรียสายพันธุ์ P2 (b) และชุดควบคุม (c) ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.1% กลูโคส.....	48
4.4	จำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 (a) และแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 (b) ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.1% กลูโคส.....	50

รูปที่	หน้า
4.5 ความเข้มข้นของกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4.....	52
4.6 การเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 ระหว่างการย่อยสลายกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก ความเข้มข้น 50-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM.....	53
4.7 ลักษณะของเม็ดเจลเจลแลนแกม (a) และเม็ดเจลเม็ดเจลอัลจิเนต (b) ที่ไม่มีแบคทีเรีย.....	55
4.8 ลักษณะพื้นผิวภายนอกและพื้นผิวภายในของเม็ดเจลเจลแลนแกม (a,b) และเม็ดเจลอัลจิเนต (c,d) ก่อนการตรึงเซลล์ (a-d -1) และหลังการตรึงเซลล์ (a-d -2) ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า.....	56
4.9 เม็ดเจลเจลแลนแกมและเม็ดเจลอัลจิเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม BPA ความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 0 วัน (a) และที่เวลา 2 วัน (b).....	57
4.10 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากใส่เม็ดเจลเจลแลนแกม และเม็ดเจลอัลจิเนต เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	58
4.11 ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อและเม็ดเจลเจลแลนแกม (a) เม็ดเจลอัลจิเนต (b) หลังจากทดสอบการดูดซับเป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	58
4.12 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (%) ของเซลล์ตรึง (a) และชุดควบคุม (b) ในเม็ดเจลเจลแลนแกม ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.1% กลูโคสและ BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	60
4.13 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ของเซลล์ตรึงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.1% กลูโคส และในเม็ดเจลเจลแลนแกม.....	61
4.14 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (%) ของเซลล์ตรึง (a) และชุดควบคุม (b) ในเม็ดเจลอัลจิเนต ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.1% กลูโคสและ BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	63
4.15 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ของเซลล์ตรึงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.1% กลูโคส และในเม็ดเจลอัลจิเนต.....	64

รูปที่	หน้า
4.16 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (%) ของเซลล์ตริง (a) และชุดควบคุม (b) ในเม็ดเจลอัลจินต ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ไม่เติม 0.1% กลูโคสและ BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	66
4.17 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ของเซลล์ตริงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม 0.1% กลูโคส และในเม็ดเจลอัลจินต.....	67
4.18 ลักษณะของเซลล์ตริงในเม็ดเจลเจลแลนแกม (a,c) และเม็ดเจลอัลจินต (b,d) ก่อนและหลังบำบัด BPA	68
4.19 ลักษณะพื้นผิวภายนอกและพื้นผิวภายในของเซลล์ตริงในเม็ดเจลเจลแลนแกม (a,b) และเม็ดเจลอัลจินต (c,d) ที่ผ่านการบำบัด BPA เป็นเวลา 15 วัน ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า.....	69
4.20 การนำเซลล์ตริงในเม็ดเจลอัลจินตมาใช้ในการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างต่อเนื่อง ลูกศรแสดงการเติม BPA ให้ได้ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	71
4.21 ลักษณะของเม็ดเจลอัลจินต (a) และเซลล์ตริงในเม็ดเจลอัลจินต (b) เมื่อใช้บำบัด BPA อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 35 วัน.....	72
ค.1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ BPA ที่ความเจือจาง 1,000 เท่า สำหรับ เซลล์อิสระ.....	95
ค.2 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ BPA ที่ความเจือจาง 1,000 เท่า สำหรับ เซลล์ตริงและเซลล์อิสระ.....	96
ค.3 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ HBA.....	97
ข.1 โครมาโตแกรมของไฮดรอกซีอะซิโตน.....	132
ข.2 โครมาโตแกรมของกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก.....	133
ข.3 โครมาโตแกรมของกลูโคส.....	133
ข.3 โครมาโตแกรมของการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ของชุดควบคุม วันที่ 0 (a) และวันที่ 15 (c).....	134
ข.4 โครมาโตแกรมของการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 วันที่ 0 (a) และวันที่ 15 (c).....	135

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

OD ₆₀₀	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
%	=	เปอร์เซ็นต์
:	=	อัตราส่วนต่อ
x	=	เท่าทวีคูณ
CFU	=	colony forming unit



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

บิสฟีนอล เอ (Bisphenol A, BPA) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีความสำคัญโดยใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตพอลิคาร์บอเนตพลาสติก และอีพอกซีเรซิน เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้ใช้ทั้งในอุตสาหกรรมและของใช้ในบ้านเรือนโดยใช้เคลือบกระป๋องบรรจุอาหาร กระจก เป็นส่วนผสมในขวดนม ขวดพลาสติก สี ใช้เป็นตัวยึดติด และอื่นๆ (Staples และคณะ, 1998) เนื่องจากมีการผลิตและใช้ผลิตภัณฑ์ที่มี BPA เป็นส่วนผสมเป็นจำนวนมาก จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนของ BPA ในสิ่งแวดล้อมทั้งในดิน ดินตะกอน น้ำจืด น้ำทะเล รวมทั้งอากาศ (Staples และคณะ, 1998; Zhang และคณะ, 2007; Yamanaka และคณะ, 2008) BPA เป็นสารที่ละลายน้ำได้ปานกลาง ระเหยได้น้อย ส่วนใหญ่ถูกดูดซับในดินและดินตะกอน ในแหล่งน้ำพบการปนเปื้อนมากรองจากดิน ส่วนในอากาศพบการปนเปื้อนน้อย สาเหตุหลักของการปนเปื้อน BPA ในแหล่งน้ำ คือระยะเวลาที่ให้ความร้อนและอุณหภูมิที่ใช้ระหว่างกระบวนการผลิตสิ่งของหรือสารชนิดต่างๆ ที่ใช้ BPA เป็นสารตั้งต้นในการผลิต (Kang และคณะ, 2006) ส่วนสาเหตุหลักของการปนเปื้อน BPA ในดิน คือของเสียจากมนุษย์ (Kawahata และคณะ, 2004) แหล่งที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของ BPA ในสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่พบในน้ำชะจากหลุมฝังกลบของเสียอันตราย ซึ่งพบ BPA ความเข้มข้นสูงถึง 17.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (Yamamoto และคณะ, 2001) ระบบบำบัดน้ำเสีย และระบบบำบัดสิ่งปฏิกูล (Lee และ Peart, 2000; Furhacker และคณะ, 2004) เช่น ประเทศจีนตรวจพบ BPA ความเข้มข้น 825 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่ท่อน้ำเข้าของโรงงานบำบัดน้ำเสีย (Du, 2003) BPA เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของ Endocrine disrupting chemical ซึ่งเป็นสารเคมีที่รบกวนการทำงานของระบบฮอร์โมน โดยเลียนแบบการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจน ทำให้มีผลต่อการพัฒนาทั้งในมนุษย์โดยเฉพาะเด็กทารก และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ BPA ความเข้มข้น 1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเป็นพิษต่อสาหร่าย ปลา และสัตว์อื่นๆ (Alexander และคณะ, 1988) ในขณะที่ความเข้มข้น 2.28×10^{-6} - 2.28×10^{-8} มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ได้ (Takahashi และคณะ, 2001) สำหรับการปนเปื้อน BPA ในประเทศไทยยังไม่มีรายงาน แต่มีการใช้ BPA เป็นสารตั้งต้นในการผลิตขวดน้ำดื่ม และขวดนม ดังนั้นถ้ามีการผลิตและใช้ขวดน้ำดื่ม และขวดนม ปริมาณมาก อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนของ BPA ในประเทศไทยต่อไปในอนาคตได้

การปนเปื้อนของ BPA ในสิ่งแวดล้อมจึงเป็นที่วิตกกังวลกันมาก เนื่องจากมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย BPA มีบทบาทสำคัญในการลด BPA ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ในปัจจุบันพบว่าแบคทีเรียหลายชนิดที่คัดแยกได้จากสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น ดิน น้ำ และระบบบำบัดน้ำเสีย มีความสามารถในการย่อยสลาย BPA เช่น *Pseudomonas paucimobilis* FJ-4, *Sphingomonas bisphenolicum* AO1, *Streptomyces* sp. และ *Achromobacter xylosoxidans* B-16 เป็นต้น (Ike และคณะ, 1995; Oshiman และคณะ, 2007; Zhang และคณะ, 2007) ส่วนราที่มีความสามารถในการย่อยสลาย BPA ก็มีหลายชนิด เช่นเดียวกัน เช่น *Phanerochaete chrysosporum* ME-446 และ *Pleurotus ostreatus* เป็นต้น ซึ่งการย่อยสลาย BPA โดยราส่วนใหญ่ จะใช้เอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโอไลติก (ligninolytic) เช่น แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase หรือ MnP) และแลคเคส (laccase) ส่งผลให้ BPA มีความเป็นพิษน้อยลงหรือหมดความเป็นพิษได้ (Hirano และคณะ, 2000; Tsutsumi และคณะ, 2001) วิธีการย่อยสลาย BPA ของแบคทีเรียแต่ละชนิดจะต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ ซึ่งส่งผลให้ได้สารมัธยันตร์ที่ต่างกัน จากงานวิจัยของ Spivack และคณะ (1994) พบวิธีการย่อยสลาย BPA ของแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ MV1 มี 2 วิธี คือ วิธีหลักทำให้ได้สารมัธยันตร์ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ ไฮดรอกซีอะซิโตฟีโนน (Hydroxyacetophenone) และกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (Hydroxybenzoic acid) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และมวลเซลล์ ส่วนวิธีการรองได้สารมัธยันตร์ 2 ชนิด เช่นเดียวกัน แต่ไม่ถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และมวลเซลล์ แบคทีเรียสามารถใช้ทั้งไฮดรอกซีอะซิโตฟีโนนและกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานได้ นอกจากนี้ยังพบสารมัธยันตร์อื่นๆ นอกจากไฮดรอกซีอะซิโตฟีโนนและกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการย่อยสลาย BPA เช่น ไฮดรอกซีควิโนน เป็นต้น (Zhang และคณะ, 2007)

การย่อยสลาย BPA ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ความเค็ม จำนวนเชื้อ ลักษณะของเชื้อ สารฮิวมิก และสารอาหาร เป็นต้น จากการรายงานของ Sakai และคณะ (2007) พบว่าสารอาหารมีผลต่อการย่อยสลาย BPA ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ BP-7 โดยพบว่าการเติมสารอาหาร เช่น 0.1% เปปโตน 0.1% กลูโคส และ 0.05% สารสกัดจากยีสต์ เป็นต้น จะทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ดีกว่าการไม่เติมสารอาหารเหล่านี้ นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้น BPA ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการย่อยสลาย BPA ซึ่งเห็นได้จากรายงานของ Zhang และคณะ (2007) ที่พบว่าถ้า BPA มี

ความเข้มข้นสูงการย่อยสลายจะลดลงเนื่องจากที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีความเป็นพิษมาก จึงส่งผลให้มีการยับยั้งการเจริญของ *Achromobacter xylosoxidans* สายพันธุ์ B-16

จากการศึกษาการย่อยสลาย BPA โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่ นิยมใช้เซลล์อิสระ แต่ BPA ที่ความเข้มข้นสูงมักยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ดังเช่นงานวิจัยของ Zhang และคณะ (2007) ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย BPA ของแบคทีเรานั้น งานวิจัยนี้สนใจจะตรึงแบคทีเรียบนวัสดุพอลิเมอร์ธรรมชาติ เนื่องจากเซลล์ตรึงมีข้อดีหลายประการ เช่น สามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ได้ง่ายและสะดวก ช่วยปกป้องเซลล์จากความเป็นพิษของสารพิษมากขึ้นกว่าการใช้เซลล์อิสระ จากข้อดีเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึงมีความเหมาะสมต่อการนำมาใช้บำบัดสารพิษ เช่น ฟีนอล ควิโนลีน (Wang และคณะ, 2007) เป็นต้น โดยวัสดุที่นำมาใช้ในการตรึงเซลล์ทั่วไปแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ พอลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น อะกาโรส อัลจิเนต เจลแลนแกม ไคโตซาน และคาร์ราจีแนน เป็นต้น และพอลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น พอลิยูรีเทน และพอลีสไตรีน เป็นต้น (Cassidy และคณะ, 1996) ดังเช่น รายงานของ Hsieh และคณะ, 2008 ที่ตรึง *Pseudomonas putida* ด้วยไคโตซานที่เชื่อมกับไฮเดียมไตรฟอสเฟต สำหรับใช้ในการย่อยสลายฟีนอล และพบว่าเซลล์ตรึงที่ได้ทนต่อความเป็นกรด-ด่าง และฟีนอลความเข้มข้นสูง ได้มากขึ้นกว่าการใช้เซลล์อิสระ

การวิจัยนี้จะศึกษาการย่อยสลาย BPA โดยแบคทีเรียทั้งแบบเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง โดยใช้แบคทีเรียที่คัดแยกจากดินที่สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 1 ชนิด ได้แก่ *Methylobacterium* sp. NP3 (นันทธร ภาวราช, 2550) เนื่องจากฟีนอลมีวงเบนซีนเป็นส่วนประกอบเช่นเดียวกับ BPA จึงคาดว่าแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟีนอลได้น่าจะมีความสามารถในการย่อยสลาย BPA ได้เช่นเดียวกัน และใช้แบคทีเรียที่คัดแยกจากสารละลาย half-strength Hoagland's nutrient ที่เลี้ยงพืชระหว่างการย่อยสลาย BPA (Saiyood และคณะ, 2010) จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Enterobacter* sp. BPR1, *Enterobacter* sp. BPW5 และ *Bacillus cereus* BPW4 ซึ่งพบว่าสามารถย่อยสลาย BPA ได้ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังใช้แบคทีเรีย *Sphingobium* sp. P2 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันและสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้ดี (Supaka และคณะ, 2001) จึงคาดว่า *Sphingobium* sp. P2 น่าจะสามารถย่อยสลาย BPA ได้เช่นเดียวกัน ในขั้นแรกจะศึกษาหาสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับเสริมการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิด แล้วคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ที่ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารที่เสริมการย่อยสลาย BPA เพื่อนำมาใช้ทดสอบ BPA ที่ความเข้มข้นสูง ในขั้นสุดท้ายจะตรึงแบคทีเรียด้วย

วัสดุตั้งแบบพอลิเมอร์ธรรมชาติ 2 ชนิด เพื่อต้องการให้แบคทีเรียมีความทนต่อความเป็นพิษของ BPA มากขึ้น และให้แบคทีเรียมีประสิทธิภาพต่อการย่อยสลาย BPA ที่ความเข้มข้นสูงได้ดีมากกว่าแบคทีเรียแบบเซลล์อิสระ และศึกษาลักษณะของเซลล์ตั้งภายในวัสดุตั้งรวมทั้งสมบัติของวัสดุตั้ง นอกจากนี้จะตรวจสอบความสามารถในการนำเซลล์ตั้งกลับมาใช้ใหม่ (Reusability) และความเสถียรของเซลล์ตั้ง (Stability) ทั้งนี้เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาถึงรายละเอียดของแบคทีเรียย่อยสลาย BPA ทั้งแบบเซลล์อิสระและเซลล์ตั้งต่อไป และเป็นแนวทางในการศึกษาการบำบัด BPA ในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนของสารชนิดนี้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

วัตถุประสงค์หลัก คือ เพื่อพัฒนาวิธีการสำหรับส่งเสริมการย่อยสลาย BPA และวัตถุประสงค์รอง คือ

1. เพื่อศึกษาสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับเสริมการย่อยสลาย BPA โดยแบคทีเรีย
2. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นสูง
3. เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ของแบคทีเรีย โดยการตรึงเซลล์ในวัสดุพอลิเมอร์ธรรมชาติ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นสูง ทราบชนิดของสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับเสริมการย่อยสลาย BPA และทราบชนิดของวัสดุพอลิเมอร์ธรรมชาติสำหรับตรึงแบคทีเรีย ให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย BPA ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นกว่าแบคทีเรียแบบเซลล์อิสระ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 ปัญหาของ BPA ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

ปัจจุบันปัญหามลพิษทางสิ่งแวดล้อมในประเทศต่างๆ ทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย เป็นปัญหาที่สำคัญมาก การปนเปื้อนและการสะสมของสารเคมีชนิดต่างๆ เกิดจากการผลิตและใช้สารเคมีปริมาณมากในภาคอุตสาหกรรม การเกษตรกรรม การบริโภค และการประกอบกิจกรรมประเภทต่างๆ ของมนุษย์ อย่างไรก็ตามก็มีความเอาใจใส่ในเรื่องการรักษาสิ่งแวดล้อมก็ไม่ได้ได้รับความร่วมมือจากทุกฝ่ายเท่าที่ควร ดังนั้นสารเคมีซึ่งจัดว่าเป็นสารมลพิษจึงปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมมากขึ้น ในปัจจุบันได้มีการนำ BPA ซึ่งเป็นสารเคมีชนิดหนึ่งมาใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ BPA เป็นสารเคมีที่ใช้ทั่วไปในการผลิตภาชนะบรรจุภัณฑ์ หรือผลิตภัณฑ์พลาสติก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมากที่สุดในโลก โดยมีการผลิตมากถึงเจ็ดพันล้านปอนด์ต่อปี BPA จึงจัดว่าเป็นสารมลพิษตัวหนึ่งที่ทำให้สิ่งแวดล้อมเสื่อมโทรมมาก และเป็นสารที่ทั่วโลกให้ความสนใจ อาทิ ประเทศแคนาดา ฝรั่งเศส อังกฤษ ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ และไทย เป็นต้น ดังนั้นการกำจัด BPA ออกจากสิ่งแวดล้อมจึงเป็นเรื่องที่จำเป็น เนื่องจาก BPA เป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและระบบนิเวศน์ต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม

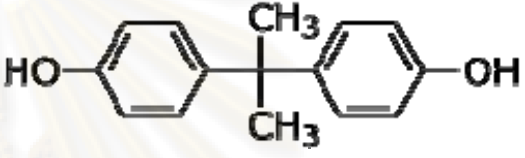
2.1.1 สมบัติทางกายภาพของ BPA

BPA (2,2-bis[4-hydroxyphenyl]propane หรือ Bisphenol A) คือ สารประกอบอินทรีย์ที่เกิดจากการรวมตัวกันระหว่าง 2 โมล ฟีนอล และ 1 โมล อะซิโตน โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริก หรือซัลโฟเนต พอลิสไตรีน เรซิน เป็นต้น BPA มีลักษณะเป็นผงหรือเกล็ดสีขาว มีกลิ่นคล้ายฟีนอลอ่อนๆ สูตรโครงสร้างและสมบัติทางกายภาพของ BPA แสดงในตารางที่

2.1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 สูตรโครงสร้างและสมบัติทางกายภาพของ BPA

ชื่อเรียก	4,4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropane, 4,4'-(propan-2-ylidene)diphenol, p, p'-isopropylidenebisphenol, 4,4'-isopropylidenediphenol, 4,4'-dihydroxydiphenyldimethylmethane
โครงสร้างทางเคมี	
น้ำหนักโมเลกุล	228.29
สูตรอย่างง่าย	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
จุดหลอมเหลว °C	158 - 159 °C
จุดเดือด °C	220 °C / 4 mm Hg
ความหนาแน่นที่ 20 °C	1.20 g/cm ³
ค่าการละลายในน้ำ g/L ที่ 21.5 °C	120–300 mg/l
ความดันไอที่ 25 °C	4.0E-8 mm Hg 3.96E-7 mm Hg 8.70E-10 mm Hg 3.96E-9 mm Hg
Log K _{ow}	2.20-3.82
Log K _{oc} สำหรับดินและดินตะกอน	314-1524

(ที่มา: Staples และคณะ, 1998)

นอกจากนี้ BPA ยังสามารถละลายได้ในเอทานอล ไดเอทิลอีเธอร์ อะซีโตน อะซีโตนไทรอ์ เบนซีน สารละลายต่างและสามารถละลายได้เล็กน้อยในไฮโดรคาร์บอน และคาร์บอนเตตระคลอไรด์

2.1.2 ความเป็นพิษของ BPA

BPA เป็นสารที่มีความเป็นพิษปานกลาง จัดเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของ Endocrine disrupting chemical ซึ่งเป็นสารเคมีที่รบกวนการทำงานของระบบฮอร์โมนต่อมไร้ท่อ โดยเลียนแบบการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนทำให้มีผลต่อการพัฒนาในเรื่องสมองและพฤติกรรมทั้งในมนุษย์โดยเฉพาะเด็กทารก และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ถ้าผู้หญิงตั้งครรภ์ได้รับพิษของ BPA จะส่งผลให้ทารกในครรภ์ตาย หรือทำให้ทารกมีอาการผิดปกติและมีน้ำหนักน้อยกว่าปกติ (Takeuchi และคณะ, 2004) ถ้าสัมผัสผิวหนังและตาจะก่อให้เกิดการระคายเคือง BPA ความเข้มข้น 1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเป็นพิษต่อสาหร่าย ปลา และสัตว์อื่นๆ (Alexander และคณะ, 1988) ในขณะที่ความเข้มข้น 2.28×10^{-6} - 2.28×10^{-8} มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ได้ (Takahashi และคณะ, 2001) เช่น มะเร็งเต้านม เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า BPA เป็นส่วนกระตุ้นให้เกิดโรคอ้วนและโรคหัวใจ (Lang และคณะ, 2008; Rubin และ Soto, 2009) การรับประทานอาหารในภาชนะที่มีส่วนผสมของ BPA นั้นเป็นแหล่งแรกๆ ที่มนุษย์จะได้รับความเป็นพิษของ BPA นอกจากนี้ยังได้รับจากอากาศ ฝุ่นละออง และน้ำ

2.1.3 แหล่งที่มาของ BPA ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

BPA เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญที่ใช้ผลิตพอลิคาร์บอเนตพลาสติก และอีพอกซีเรซิน เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้ใช้ทั้งในอุตสาหกรรมและของใช้ในบ้านเรือนโดยใช้เคลือบกระป๋องบรรจุอาหาร กระดาษ เป็นส่วนผสมในขวดนม ขวดพลาสติก สี เลนส์แว่นตา แผ่นซีดี อุปกรณ์ทางการแพทย์ ใช้เป็นสารป้องกันการเกิดแอนติออกซิเดนท์ ใช้เป็นตัวยึดติด ใช้เป็นตัวห่อหุ้มอุปกรณ์ไฟฟ้าชนิดต่างๆ เป็นตัวทำให้พอลิไวนิลคลอไรด์มีความเสถียรระหว่างกระบวนการผลิต และอื่นๆ (Staples และคณะ, 1998) เนื่องจากมีการผลิตและใช้ผลิตภัณฑ์ที่มี BPA เป็นส่วนผสมเป็นจำนวนมาก จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนของ BPA ในสิ่งแวดล้อมทั้งในดิน ดินตะกอน น้ำจืด น้ำทะเล รวมทั้งอากาศ (Staples และคณะ, 1998; Zhang และคณะ, 2007; Yamanaka และคณะ, 2008) BPA เป็นสารที่ละลายน้ำได้ปานกลาง ระเหยได้น้อย ส่วนใหญ่ถูกดูดซับในดินและดินตะกอน ในแหล่งน้ำพบการปนเปื้อนมากองจากดิน ส่วนในอากาศพบการปนเปื้อนน้อย จากคุณสมบัติทางกายภาพของ BPA แสดงให้เห็นว่าเมื่อ BPA ถูกปล่อยสู่แหล่งน้ำจืดจะมีค่าครึ่งชีวิต เท่ากับ 3-5 วัน ในขณะที่แหล่งน้ำเค็มจะมีค่าครึ่งชีวิต นานกว่า คือ 30 วัน (Dorn และคณะ, 1987; Kang และ Kondo, 2005) แต่ถ้า BPA ถูกปล่อยสู่อากาศจะมีค่าครึ่งชีวิต เท่ากับ 0.74-7.4 ชั่วโมง (Staples และคณะ, 1998) ส่วนค่าครึ่งชีวิต ของ BPA ที่ปนเปื้อนในดิน มีค่าน้อยกว่า 3 วัน (Fent และคณะ, 2003) จากค่าครึ่งชีวิต ของ BPA ทั้งในน้ำ อากาศ และดิน แสดงให้เห็นว่า BPA เป็นสารเคมีที่ไม่คงทนใน

สิ่งแวดล้อม ซึ่ง BPA ถูกย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางกายภาพ เช่น งานวิจัยของ Ohko และคณะ (2001) ศึกษาการย่อยสลาย BPA ในแหล่งน้ำโดยใช้ TiO_2 photocatalysis พบว่าภายในเวลา 20 ชั่วโมง BPA ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ถูกเปลี่ยนเป็น CO_2 หรืองานวิจัยของ Neamtu และ Frimmel (2006) ที่ศึกษาการย่อยสลาย BPA ในแหล่งน้ำตามธรรมชาติและน้ำเสียโดยใช้กระบวนการ $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ oxidation พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง สามารถลด estrogenic activity ของ BPA ได้ นอกจากนี้ BPA ยังถูกย่อยสลายด้วยกระบวนการทางชีวภาพได้โดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ซึ่งงานวิจัยนี้สนใจศึกษาการย่อยสลาย BPA ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

สาเหตุหลักของการปนเปื้อน BPA ในแหล่งน้ำ คือ ระยะเวลาที่ให้ความร้อนและอุณหภูมิที่ใช้ระหว่างกระบวนการผลิตของหรือสารชนิดต่างๆ ที่ใช้ BPA เป็นสารตั้งต้นในการผลิต (Kang และคณะ, 2006) ส่วนสาเหตุหลักของการปนเปื้อน BPA ในดิน คือ ของเสียจากมนุษย์ (Kawahata และคณะ, 2004) แหล่งที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของ BPA ในสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่พบในน้ำชะจากหลุมฝังกลบของเสียอันตราย ซึ่งพบ BPA ความเข้มข้นสูงถึง 17.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (Yamamoto และคณะ, 2001) ระบบบำบัดน้ำเสีย และระบบบำบัดสิ่งปฏิกูล (Lee และ Peart, 2000; Furhacker และคณะ, 2004) เช่น ประเทศจีนตรวจพบ BPA ความเข้มข้น 825 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่ท่อน้ำเข้าของโรงงานบำบัดน้ำเสีย (Du, 2003) และ Zhao และคณะ (2008) ตรวจพบ BPA จากสิ่งปฏิกูลตามบ้านเรือนความเข้มข้น 5.8 ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับการปนเปื้อน BPA ในประเทศไทยยังไม่มีรายงาน แต่มีการใช้ BPA เป็นสารตั้งต้นในการผลิตขวดน้ำดื่ม และขวดนม ดังนั้นถ้ามีการผลิตขวดน้ำดื่ม และขวดนมปริมาณมากอาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนของ BPA ในประเทศไทยต่อไปในอนาคตได้

2.2 จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย BPA

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย BPA มีทั้งรา และแบคทีเรีย ในปัจจุบันพบว่าแบคทีเรียหลายชนิดที่คัดแยกได้จากสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น ดิน น้ำ และระบบบำบัดน้ำเสีย มีความสามารถในการย่อยสลาย BPA เช่น *Pseudomonas paucimobilis* FJ-4, *Sphingomonas bisphenolicum* AO1, *Streptomyces* sp. และ *Achromobacter xylosoxidans* B-16 เป็นต้น (Ike และคณะ, 1995; Oshiman และคณะ, 2007; Zhang และคณะ, 2007) ส่วนราที่มีความสามารถในการย่อยสลาย BPA ก็มีหลายชนิดเช่นเดียวกัน เช่น *Phanerochaete chrysosporum* ME-446, *Pleurotus ostreatus*, *Stereum hirsutum* และ *Heterobasidium insulare* เป็นต้น ซึ่งการย่อยสลาย BPA โดยราส่วนใหญ่จะใช้เอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโกลิติก

(ligninolytic) เช่น แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase หรือ MnP) ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase) และแลคเคส (laccase) ส่งผลให้ BPA มีความเป็นพิษน้อยลงหรือหมดความเป็นพิษได้ (Hirano และคณะ, 2000; Lee และคณะ, 2005; Tsutsumi และคณะ, 2001) แต่ในงานวิจัยนี้สนใจที่จะใช้แบคทีเรียในการย่อยสลาย BPA เนื่องจากแบคทีเรียเลี้ยงง่าย โตเร็ว และมีเอนไซม์ที่หลากหลายกว่ารา แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย BPA แสดงดังตารางที่ 2.2



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย BPA

แบคทีเรีย	แหล่งที่มาของแบคทีเรีย	ความเข้มข้นเริ่มต้นของ BPA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความสามารถในการย่อยสลาย BPA (%)	เวลา	เอกสารอ้างอิง
<i>Streptomyces</i> sp.	แม่น้ำประเทศญี่ปุ่น	1	>90	10 วัน	Kang และคณะ, 2004
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> B-16	น้ำชะหลุมฝังกลบขยะประเทศจีน	50	>18	>3 วัน	Zhang และคณะ, 2007
<i>Bacillus pumilus</i>	กิมจิประเทศญี่ปุ่น	50	100	5 วัน	Yamanaka และคณะ, 2007
<i>Sphingomonas bisphenolicum</i> strain AO1	ดินประเทศญี่ปุ่น	100	100	6 ชั่วโมง	Oshiman และคณะ, 2007
<i>Sphingomonas</i> sp. strain BP-7 และ <i>Pseudomonas</i> sp. strain BP-14	น้ำทะเลประเทศญี่ปุ่น	100	100	7 วัน	Sakai และคณะ, 2007
<i>Pseudomonas monteilii</i>	ดิน ประเทศญี่ปุ่น	500	100	10 วัน	Masuda และคณะ, 2007

2.2.1 แบคทีเรียย่อยสลาย BPA ที่ใช้ในการศึกษานี้

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ในการย่อยสลาย BPA นั้นเป็นเซลล์อิสระ ไม่ค่อยมีการศึกษาเรื่องการใช้เซลล์ตรึงในการย่อยสลาย BPA ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีที่ทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลาย BPA ที่มีความเข้มข้นสูงมากขึ้นได้ โดยการแปรรูปสารอาหารให้กับแบคทีเรียและนำแบคทีเรียมาตรึงในวัสดุตรึงแบบพอลิเมอร์ธรรมชาติ ซึ่งงานวิจัยนี้ศึกษาแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Methylobacterium* sp. NP3, *Enterobacter* sp. BPR1, *Enterobacter* sp. BPW5, *Bacillus cereus* BPW4 และ *Sphingobium* sp. P2

2.2.1.1 *Methylobacterium* sp. NP3

โดยทั่วไป *Methylobacterium* เป็นแบคทีเรียจำพวก facultative methylotroph หมายถึง เป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้สารประกอบที่มีคาร์บอนหนึ่งตัว เช่น มีเทน หรือที่มีคาร์บอนมากกว่าได้ (Chistoserdova และคณะ, 2003) เป็นแบคทีเรียที่เคลื่อนที่ได้เพราะมีแฟลกเจลล่าที่ขั้ว มีรูปร่างเป็นแท่ง จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ และเป็น obligately aerobic สามารถเรียกได้ว่า PPFMs ซึ่งย่อมาจาก pink-pigmented facultative methylotrophs เนื่องจากสายพันธุ์ส่วนใหญ่ของ *Methylobacterium* จะผลิตรงควัตถุสีชมพู อนุกรมวิธานของ *Methylobacterium* sp. แสดงดังตารางที่ 2.3

Methylobacterium sp. NP3 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน สามารถย่อยสลายพีนอลอย่างมีประสิทธิภาพ แต่เจริญช้า สามารถย่อยสลายพีนอลได้ที่ความเข้มข้นสูงสุด 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (นันท์ธร เการาซ, 2550) แต่ยังไม่มียางานการวิจัย *Methylobacterium* sp. ในการย่อยสลาย BPA ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำ *Methylobacterium* sp. NP3 มาใช้ย่อยสลาย BPA เนื่องจากพีนอลมีวงเบนซีนเป็นส่วนประกอบ เช่นเดียวกับ BPA จึงคาดว่า *Methylobacterium* sp. NP3 ที่ย่อยสลายพีนอลได้น่าจะมีความสามารถในการย่อยสลาย BPA ได้เช่นเดียวกัน

2.2.1.2 *Enterobacter* sp. BPR1 และ *Enterobacter* sp. BPW5

แบคทีเรียในสกุล *Enterobacter* มีลักษณะที่สำคัญ คือ เป็นแบคทีเรียรูปร่างแท่ง จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียประเภทแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ เจริญเติบโตได้ง่ายทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน อนุกรมวิธานของ *Enterobacter* sp. แสดงดังตารางที่ 2.3 มีการรายงานว่แบคทีเรียในสกุล *Enterobacter* สามารถย่อยสลายสารพิษได้ ดังเช่นงานวิจัยของ Veeranagouda, และคณะ (2006) ที่ศึกษาการย่อยสลายสารบิวทานอลโดย *Enterobacter* sp. VKGH12 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่

ทนต่อตัวทำละลาย และงานวิจัยของ Jia และคณะ, 2008 ที่ได้ใช้ *Enterobacter* sp. ในการย่อยสลายสารพอลิคลอริเนต ไบฟีนิล ซึ่งเป็นสารที่คงทนในสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Enterobacter sp. BPR1 และ *Enterobacter* sp. BPW5 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกจากสารละลาย half-strength Hoagland's nutrient ที่เลี้ยงพีระหว่างการย่อยสลาย BPA (Saiyood และคณะ, 2010) ซึ่งพบว่าสามารถย่อยสลาย BPA ได้ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกศึกษาแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้เพื่อใช้ในการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นสูงกว่า 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.1.3 *Bacillus cereus* BPW4

แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มีลักษณะที่สำคัญ คือ เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างแท่ง จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียประเภทแกรมบวก ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ สร้างสปอร์และสร้างสารพิษ ซึ่งจะขับสารพิษออกมาขณะปนเปื้อนอยู่ในอาหาร ทนความร้อนและสารเคมีได้ดี แบคทีเรียชนิดนี้อาศัยอยู่ตามดิน น้ำ อาหาร ถ้าใส่คนและสัตว์ การเจริญเติบโตของแบคทีเรียนี้เป็นแบบ facultatively-anaerobic หรือ aerobic โดยแบคทีเรียจะสร้างสารพิษเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อย ลักษณะที่สำคัญของ *Bacillus cereus* คือ รูปร่างแท่งเรียงต่อกันเป็นสาย สปอร์รูปไข่หรือทรงกระบอก อยู่ตรงกลางเซลล์ เคลื่อนที่รวดเร็ว อนุกรมวิธานของ *Bacillus* แสดงดังตารางที่ 2.3 แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกที่ปนเปื้อนในดินและน้ำ (Crawford, 1975)

Bacillus cereus BPW4 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกจากสารละลาย half-strength Hoagland's nutrient ที่เลี้ยงพีระหว่างการย่อยสลาย BPA (Saiyood และคณะ, 2010) เช่นเดียวกับเชื้อ *Enterobacter* sp. BPR1 และ *Enterobacter* sp. BPW5 ซึ่งพบว่าสามารถย่อยสลาย BPA ได้ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกศึกษาแบคทีเรียชนิดนี้เพื่อใช้ในการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นสูงกว่า 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.1.4 *Sphingobium* sp. P2

Sphingobium เป็นสายพันธุ์ที่ต่างจาก Sphingomonads ชนิดอื่น ส่วนใหญ่คัดแยกมาจากแหล่งดิน แบคทีเรียในสกุล *Sphingobium* มีลักษณะที่สำคัญ คือ เป็นแบคทีเรียรูปร่างแท่ง ประเภทแกรมลบ ผลิตตรงควัตถุสีเหลือง ลักษณะของโคโลนี คือ สีเหลือง กลม นูน และมีขนาดเล็ก อนุกรมวิธานของ *Sphingobium* sp. แสดงดังตารางที่ 2.3 แบคทีเรียในสกุล *Sphingobium*

สามารถย่อยสลายสารพิษได้หลายประเภท เช่น สารประกอบอะโรมาติก สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน และฟีนอล เป็นต้น (Tao และคณะ, 2009)

สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน เช่น พีแนทรีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนทรีน และไพรีน เป็นต้น และสามารถใช้พีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายน้ำมันได้ค่อนข้างดี ดังนั้นจึงเลือกศึกษาแบคทีเรียชนิดนี้ในการย่อยสลาย BPA เนื่องจากว่าทั้ง BPA และพีแนทรีน มีวงเบนซีนเป็นส่วนประกอบเช่นเดียวกัน จึงคาดว่า *Sphingobium* sp. P2 น่าจะย่อยสลาย BPA ได้เช่นเดียวกัน

ตารางที่ 2.3 อนุกรมวิธานของ *Methylobacterium* sp. NP3, *Enterobacter* sp. BPR1, *Enterobacter* sp. BPW5, *Bacillus cereus* BPW4 และ *Sphingobium* sp. P2

Kingdom	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Phylum	Proteobacteria	Proteobacteria	Firmicutes	Proteobacteria
Class	Alpha Proteobacteria	Gamma Proteobacteria	Bacilli	Alpha Proteobacteria
Order	Rhizobiales	Enterobacteriales	Bacillales	Sphingomonadales
Family	Methylobacteriaceae	Enterobacteriaceae	Bacillaceae	Sphingomonadaceae
Genus	Methylobacterium	Enterobacter	Bacillus	Sphingobium

2.2.2 วิธีการย่อยสลาย BPA

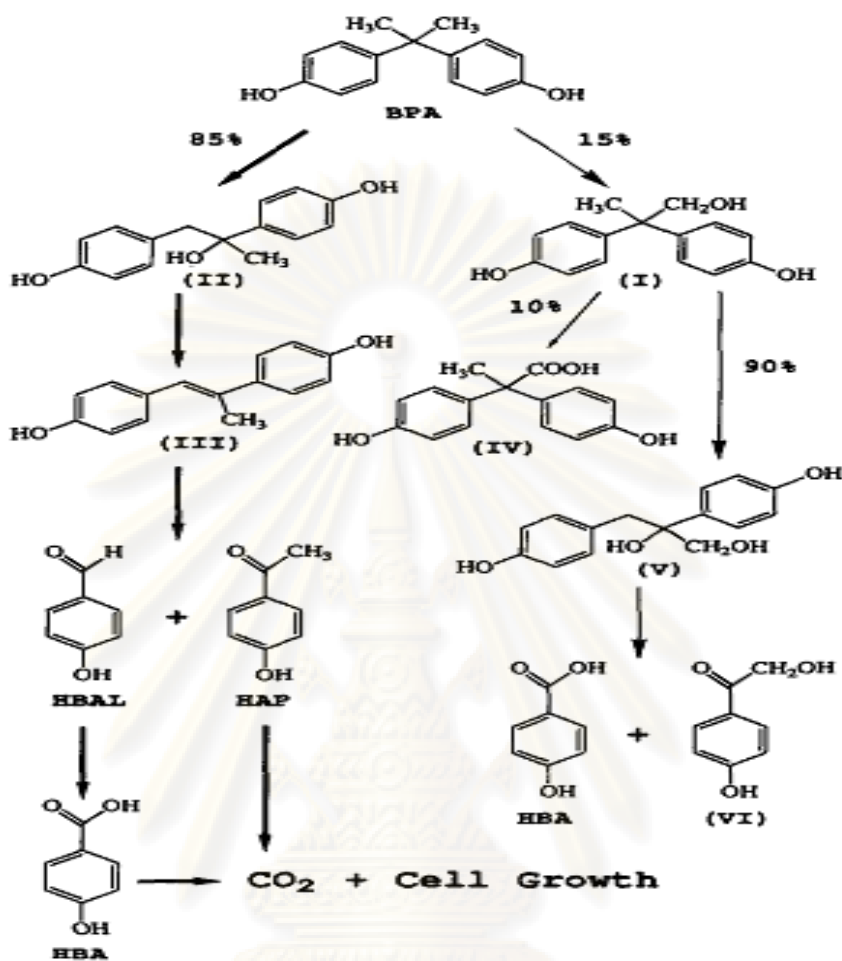
วิธีการย่อยสลาย BPA ของแบคทีเรียแต่ละชนิดจะต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ ซึ่งส่งผลให้ได้สารมัธยันตร์ที่ต่างกัน BPA มีโครงสร้างคล้ายกับฟีนอลและแอลคิลเบนซีน ดังนั้นวิธีการย่อยสลาย BPA น่าจะคล้ายกับวิธีการย่อยสลายของฟีนอลและแอลคิลเบนซีน ซึ่งย่อยสลายสารได้ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Spivack และคณะ, 1994) งานวิจัยส่วนใหญ่สนใจการย่อยสลาย BPA ในภาวะที่มีออกซิเจน ดังเช่น งานวิจัยของ Spivack และคณะ (1994) ที่ศึกษาวิธีการย่อยสลาย BPA ของแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ MV1 วิธีการย่อยสลาย BPA มี 2 วิธี คือ วิธีหลักทำให้ได้สารมัธยันตร์ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ ไฮดรอกซีอะซิโตฟีโนน (Hydroxyacetophenone หรือ HAP) และกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (Hydroxybenzoic acid หรือ HBA) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และมวลเซลล์ ส่วนวิธีรองได้สารมัธยันตร์ 2 ชนิดเช่นเดียวกัน คือ กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก และไฮดรอกซีฟีนาคิล แอลกอฮอล์ แต่ไม่ถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และมวล

เซลล์ แสดงดังรูปที่ 2.1 แบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ MV1 สามารถใช้ทั้งไฮดรอกซีอะซิโตฟีโนนและกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ วิธีการย่อยสลาย BPA ของแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ MV1 นี้ส่วนใหญ่ใช้เอนไซม์หลัก 3 ชนิด คือ เอนไซม์ไฮโดรซีเลส เอนไซม์ดีไฮเดรราเทส และเอนไซม์ไดออกซิจีเนส

Zhang และคณะ (2007) ศึกษาวิธีการย่อยสลาย BPA ของ *Achromobacter xylosoxidans* สายพันธุ์ B-16 พบว่ามีวิธีการย่อยสลาย BPA คล้ายกับแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ MV1 แต่พบสารมัธยันตร์ชนิดอื่น นอกจากไฮดรอกซีอะซิโตฟีโนนและกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการย่อยสลาย BPA คือ ไฮดรอกซีควิโนน ซึ่งไฮดรอกซีควิโนนนี้จะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และมวลเซลล์ในที่สุดเช่นเดียวกับไฮดรอกซีอะซิโตฟีโนนและกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก แต่เปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และมวลเซลล์ได้ช้ากว่าไฮดรอกซีอะซิโตฟีโนนและกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (รูปที่ 2.2)

ซึ่งคาดว่า *Methylobacterium* sp. NP3, *Enterobacter* sp. BPR1, *Enterobacter* sp. BPW5, *Bacillus cereus* BPW4 และ *Sphingobium* sp. P2 อาจจะมีการย่อยสลาย BPA แบบใช้ออกซิเจน เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ นอกจากนี้ยังสนใจที่จะศึกษาสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการย่อยสลาย BPA เพื่อวิเคราะห์ชนิดของสารมัธยันตร์ว่าเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อแบคทีเรีย (Dead end metabolite) หรือแบคทีเรียสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ และทำนายวิถีของการย่อยสลาย BPA ของแบคทีเรียสายพันธุ์เหล่านี้ โดยงานวิจัยนี้สนใจสารมัธยันตร์ 2 ชนิด คือ ไฮดรอกซีอะซิโตฟีโนนและกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ที่พบได้บ่อยจากกระบวนการย่อยสลาย BPA โดยแบคทีเรียชนิดต่างๆ (Lobos, และคณะ, 1992; Spivack และคณะ, 1994; Oshiman และคณะ, 2007; Zhang และคณะ, 2007)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

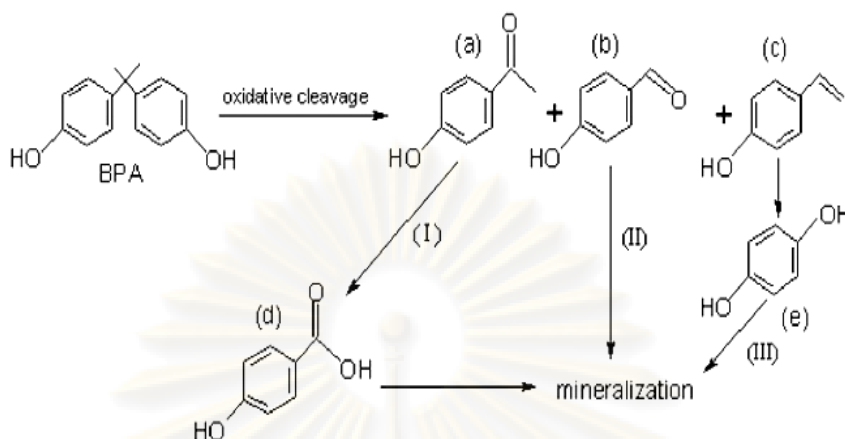


- (I) = 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)-1-propanol; (II) = 1,2-bis(4-hydroxyphenyl)-2-propanol;
 (III) = 4,4'-dihydroxy- α -methylstilbene; (IV) = 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propanoic acid;
 (V) = 2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-1,2-propanediol; (VI) = 4-hydroxyphenyl alcohol

รูปที่ 2.1 การย่อยสลาย BPA โดยแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ MV1

(ที่มา: Spivack และคณะ, 1994)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(a) = p-hydroxyacetophenone; (b) = p-hydroxybenzaldehyde; (c) = p-isopropenylphenol; (d) = p-hydroxybenzoic acid; (e) = p-hydroquinone

รูปที่ 2.2 การย่อยสลาย BPA โดย *Achromobacter xylosoxidans* สายพันธุ์ B-16 (ที่มา: Zhang และคณะ, 2007)

2.2.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย BPA

การย่อยสลาย BPA ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ความเค็ม จำนวนเชื้อ ลักษณะของเชื้อ สารฮิวมิก และสารอาหาร เป็นต้น ซึ่งปัจจัยที่ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ดีขึ้น คือ สารอาหาร จากการรายงานของ Sakai และคณะ (2007) พบว่า สารอาหารมีผลต่อการย่อยสลาย BPA ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ BP-7 โดยพบว่าการเติมสารอาหาร เช่น 0.1% เปปโตน 0.1% กลูโคส และ 0.05% สารสกัดจากยีสต์ เป็นต้น ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ดีกว่าการไม่เติมสารอาหารเหล่านี้

Masuda และคณะ (2007) ศึกษาการย่อยสลาย BPA โดย *Pseudomonas monteilii* สายพันธุ์ N-502 ซึ่งเป็นเชื้อที่ทนและสามารถย่อยสลาย BPA ได้ดี ผู้วิจัยได้เติม Ca^{2+} , Mg^{2+} และกรดฟอสฟอริกไปในกระบวนการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 100, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าทั้งโลหะไอออนและวิตามินส่งผลให้การย่อยสลาย BPA ทุกความเข้มข้นที่นำมาทดสอบเป็นไปได้เร็วขึ้นกว่าการไม่เติม Ca^{2+} และ Mg^{2+} หรือกรดฟอสฟอริก ซึ่ง Ca^{2+} และ Mg^{2+} มีส่วนช่วยให้การเจริญของเชื้อมีค่าคงที่เมื่อเจอกับความเป็นพิษของ BPA ส่วนวิตามินยังไม่ทราบว่าทำหน้าที่อย่างไรในการช่วยให้การย่อยสลาย BPA เป็นไปได้เร็วขึ้น จึงต้องทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

Oshiman และคณะ (2007) พบว่าการเติม 0.1% และ 1.0% กลูโคสจะทำให้อัตราการย่อยสลาย BPA ของ *Sphingomonas bisphenolicum* สายพันธุ์ AO1 เกิดได้เร็วขึ้น โดยเชื้อสามารถย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้หมดภายในเวลา 6 ชั่วโมง แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกลูโคส เชื้อจะย่อยสลาย BPA ได้หมดภายในเวลา 44 ชั่วโมง ทั้งนี้ นักวิจัยไม่ได้ศึกษาว่ากลูโคสมีส่วนช่วยให้อัตราการย่อยสลาย BPA เกิดได้เร็วขึ้นได้อย่างไร จึงต้องทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้น BPA ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการย่อยสลาย BPA ซึ่งเห็นได้จากรายงานของ Zhang และคณะ (2007) ที่พบว่าถ้า BPA ความเข้มข้นสูง (50 มิลลิกรัมต่อลิตร) การย่อยสลายจะลดลงเนื่องจาก BPA ความเข้มข้นสูงจะมีความเป็นพิษเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้มีการยับยั้งการเจริญของ *Achromobacter xylosoxidans* สายพันธุ์ B-16

2.3 การตรึงเซลล์แบคทีเรีย

2.3.1 กระบวนการตรึงเซลล์

เทคนิคในการตรึงเซลล์มี 3 วิธี คือ

1. การยึดด้วยตัวนำ (Carrier-binding method) เป็นการตรึงเซลล์ด้วยวิธีทางเคมีโดยการเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์กับสารพาหะโดยตรง การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้แบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ

1.1 การใช้พันธะโควาเลนต์ (Covalent binding method) เป็นวิธีการเชื่อมเซลล์โดยตรงกับสารพาหะ วิธีนี้มีข้อดีคือ เซลล์เชื่อมอยู่ผิวหน้าของตัวอย่างอย่างสม่ำเสมอ มีความคงตัวดี และการรั่วไหลของเซลล์น้อย (Cheetham, 1980) แต่มีข้อเสีย เนื่องจากการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ค่อนข้างรุนแรง และความเป็นพิษของสารที่ใช้ อาจทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถได้

1.2 การเกาะหรือดูดซับ (Adsorption method) เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยให้เซลล์ดูดซับกับสารที่เป็นตัวนำด้วยพันธะไอออนิก หรือพันธะไฮโดรเจน (Cheetham, 1980) โดยอาศัยหลักการทางธรรมชาติเคมี การตรึงวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่แรงดูดซับค่อนข้างอ่อนและมีการสูญเสียเซลล์ได้ง่าย เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่า pH การไหลของน้ำ การเกิดฟองอากาศ และเมื่อมีการแบ่งเซลล์

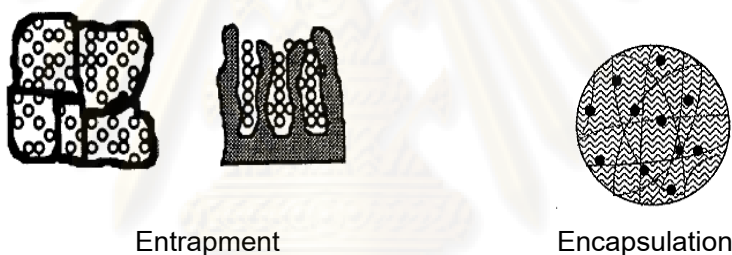
2. การเชื่อมขวาง (Cross-linking method) เป็นการตรึงเซลล์ด้วยวิธีทางเคมีโดยการเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกัน โดยใช้สารพวกไบ (bi-) หรือมัลติฟังก์ชันนอลรีเอเจนต์ (multifunctional reagent) วิธีนี้จะใช้สารเคมีภายใต้ภาวะที่ค่อนข้างรุนแรง ทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการดำรงชีวิต

3. การกักขัง (Entrapment and Encapsulation method) ซึ่งการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ต่างจากการตรึงเซลล์ด้วยวิธีทางเคมีโดยที่ไม่ได้มีการเชื่อมติดหรือไม่มีพันธะเกิดขึ้นระหว่างเซลล์กับ

สารพาหะ ดังนั้นจึงสามารถใช้ได้กับเซลล์ทุกชนิด การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้แบ่งได้เป็น 2 วิธี (รูปที่ 2.3) คือ

3.1 การตรึงแบบไมโครแคปซูล (Microencapsulation) หมายถึง การกักขังเซลล์ไว้ในเยื่อผ่านได้ (semipermeable membrane) ซึ่งป้องกันการซึมผ่านของเซลล์ได้ แต่ยอมให้สารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ซึมผ่านได้อย่างอิสระ การตรึงด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายแต่ไม่แข็งแรงพอที่จะใช้ในอุตสาหกรรม และอาจมีปัญหาการตกตะกอนของเซลล์เกิดขึ้นด้วย (Cheetham, 1980)

3.2 การตรึงเซลล์แบบแลตทิซ (Lattice type) หมายถึง การตรึงเซลล์โดยการกักขังไว้ในช่องว่าง 3 มิติ ในเจลของสารพอลิเมอร์ การตรึงเซลล์ด้วยวิธีกักขังทั่วไปจะหมายถึง แบบแลตทิซ ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและประสบความสำเร็จมากที่สุด เนื่องจากใช้ได้กับเซลล์ทุกชนิด (Cheetham, 1980)



รูปที่ 2.3 การตรึงเซลล์แบบกักขัง

(ที่มา: Cassidy และคณะ, 1996)

เนื่องจากวิธีการตรึงเซลล์มีหลายวิธี ดังนั้นการเลือกใช้สารพาหะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์แต่ละวิธีขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญในการพิจารณา คือ สมบัติเชิงกล สมบัติทางกายภาพ ความแข็งแรง ความชอบน้ำ (hydrophilicity) สภาพให้ซึมผ่านได้ (permeability) ความทนต่อสภาวะแวดล้อมทางกายภาพ สารเคมี การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ และแรงกระทบ เนื่องจากการตรึงเซลล์ต้องทำในภาวะปลอดเชื้อ จึงต้องเลือกสารพาหะที่ทนต่อความร้อนและความดันสูงได้ สารพาหะไม่ควรเป็นอันตรายต่อเซลล์และสิ่งแวดล้อม และไม่ควรถูกกระทบกระเทือนต่อระบบเมตาบอลิซึม

ในการทดลองนี้ได้เลือกใช้วิธีการตรึงเซลล์แบบกักขัง ในวัสดุพอลิเมอร์ธรรมชาติ 2 ชนิด คือ เจลแลนกันและอัลจิเนต เนื่องจากวิธีนี้มีข้อดีในเรื่องของการเพิ่มกิจกรรมทางเมแทบอลิซึม เพิ่มปริมาณการสร้างสารเมแทบอลิท์ ปกป้องเซลล์จากสารที่มีความเป็นพิษ เพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์ให้สูงยิ่งขึ้น เพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ ส่งเสริมการเจริญของเซลล์ ปกป้องเซลล์

จากสารที่มีความเป็นพิษและสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม สามารถนำมาใช้ได้หลายครั้งและสามารถใช้อย่างต่อเนื่องได้ และเหมาะสมต่อการนำประยุกต์ใช้ในกระบวนการย่อยสลายสารเคมีอันตราย ซึ่งมีหลายงานวิจัยที่นำเซลล์ตรึงแบบกักขังในวัสดุพอลิเมอร์ธรรมชาติไปใช้ประโยชน์ในการย่อยสลายสารเคมีอันตรายได้หลายชนิด เช่น ฟีนอล ไพริดีน โทลูอิน แนพทาลิน และควิโนลีน เป็นต้น และพบว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายสารเคมีอันตรายชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสูงได้ดีกว่าเซลล์อิสระ (Cassidy และคณะ, 1996; Paje และคณะ, 1998; Suzaki และคณะ, 1998; Wang และคณะ, 2007)

2.3.2 การตรึงเซลล์เพื่อย่อยสลาย BPA

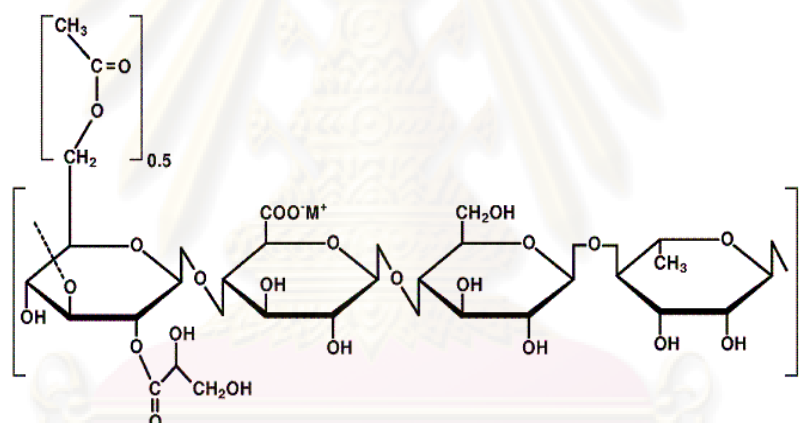
ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับใช้เซลล์ตรึงในการย่อยสลาย BPA มีน้อยมาก โดยงานวิจัยของ Yamanaka และคณะ (2008) ได้ศึกษาการย่อยสลาย BPA โดยตรึง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ BP7 และ *Sphingomonas yanoikuyae* BP-11R บนถ่านกัมมันต์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อตรึงเชื้อทั้ง 2 ชนิด บนถ่านกัมมันต์จะทำให้มีประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ดีขึ้น โดยขั้นแรกถ่านกัมมันต์จะดูดซับ BPA จนเหลือความเข้มข้น 3.1 และ 8.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้น *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ BP7 และ *Sphingomonas yanoikuyae* BP-11R จะย่อยสลาย BPA ที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจนหมด จากงานวิจัยดังกล่าวนี้ พบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย BPA ที่ความเข้มข้นสูงได้ดี แต่เซลล์ตรึงที่ได้มีราคาแพง นอกจากนี้ถ่านกัมมันต์ไม่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ต้องมีการกำจัดในภายหลัง จึงทำให้ค่าใช้จ่ายในการบำบัด BPA มีค่าสูงขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจตรึงแบคทีเรียในวัสดุพอลิเมอร์ธรรมชาติ 2 ชนิด คือ เจลแลนแกมและอัลจิเนต เนื่องจากทั้งเจลแลนแกมและอัลจิเนตมีราคาไม่แพง สังเคราะห์เม็ดเจลได้ง่าย วิธีการเตรียมไม่ยุ่งยาก ทนต่อแรงกระทำทางกายภาพและทางเคมีย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์หรือเอนไซม์ และสามารถนำมาใช้ได้หลายครั้งและสามารถใช้อย่างต่อเนื่องได้

2.4 เจลแลนแกม (Gellan gum)

2.4.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเจลแลนแกม

เจลแลนแกมเป็นสารชนิดเอ็กตราเซลลูลาร์ แอนไอออนิก พอลิแซ็กคาไรด์ (extracellular anionic polysaccharide) ผลิตมาจากแบคทีเรียชนิด *Sphingomonas elodea* โครงสร้างจัดเรียงตัวในรูปแบบเทตระแซ็กคาไรด์ ซึ่งประกอบด้วย (1-3)- β -D-glucose, (1-4)- β -D-

glucuronic acid, (1-4)- β -D-glucose และ (1-4)- α -L-rhamnose แสดงดังรูปที่ 2.4 เมื่อนำโครงสร้างของเจแลนกันมาเชื่อมขวางด้วยไอออนบวกของแคลเซียม เช่น Ca^{2+} หรือ Mg^{2+} จะทำให้เกิดเป็นเจล เรียกว่าการเกิดเจลแบบไอโอโนโทรปิก (Ionotropic gelation) (Woodward, 1988; Moritaka และคณะ, 2003) การเกิดเป็นเจลมีหลายรูปแบบขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของแอซิด (Kuo และคณะ, 1986) เจแลนกันมีลักษณะเป็นผงก้อนขี้งาหยาบสีขาว (รูปที่ 2.5) เป็นสารที่ละลายน้ำได้ แต่ไม่ละลายในเอทานอล ส่วนใหญ่เจแลนกันนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร มีคุณสมบัติเป็นสารที่ทำให้เกิดความข้น ทำให้เกิดเจล โดยนำมาผสมในเยลลี่ ไอศกรีม และโยเกิร์ต เป็นต้น (Sanderson และ Clark, 1983) นอกจากนี้มีงานวิจัยหลายงานที่ใช้เจแลนกันเป็นวัสดุสำหรับบรรจุเซลล์หรือเอนไซม์ เพื่อใช้ในการย่อยสลายสารเคมีอันตราย (Lazaro และคณะ, 2003; Wang และคณะ, 2007)



รูปที่ 2.4 ลักษณะโครงสร้างของเจแลนกัน

(ที่มา: Omoto และคณะ, 1999)



รูปที่ 2.5 ลักษณะผงเจแลนกัน

2.4.2 การสังเคราะห์เม็ดเจลเจลแลนแกม

การสังเคราะห์เม็ดเจลจากเจลแลนแกมจะใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็นตัวที่ทำให้เกิดเป็นเม็ดเจล โดยมีการกวนและให้ความเย็นขณะที่ทำการสังเคราะห์เม็ดเจล เพื่อให้เม็ดเจลแห้งตัวและมีความเสถียร ซึ่งขนาดของเม็ดเจลที่สังเคราะห์ได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้นของสารละลายเจลแลนแกม และเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์

ข้อดี ข้อเสียของเม็ดเจลเจลแลนแกม

เจลแลนแกมเป็นสารที่มีราคาถูก สังเคราะห์เป็นเม็ดเจลได้ง่าย และใช้สภาวะที่ไม่รุนแรงในการสังเคราะห์ ย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์หรือเอนไซม์ที่นำมาตรึงทนต่อความร้อนสูงได้ดี (Norton และ Lacroix, 1990) อย่างไรก็ตามเม็ดเจลเจลแลนแกมมีความเสถียรน้อย ดังนั้นต้องเพิ่มความเสถียรให้มากขึ้นโดยหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์เม็ดเจล และเมื่อสังเคราะห์เสร็จควรนำเม็ดเจลไปแช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ล้างเม็ดเจลด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ปลอดเชื้อและน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เพื่อล้างแคลเซียมไอออนส่วนเกินออก และเป็นการเพิ่มความเสถียรให้กับเม็ดเจล

2.4.3 การตรึงเซลล์ในเม็ดเจลเจลแลนแกมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ในการย่อยสลายสารเคมีอันตราย

การนำเม็ดเจลเจลแลนแกมมาตรึงเซลล์จุลินทรีย์ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์และปราศจากการปนเปื้อน ป้องกันเซลล์จากสิ่งแวดล้อมภายนอก และสามารถนำวัสดุกลับมาใช้ใหม่ได้ (Wang และคณะ, 2007) งานวิจัยต่อไปนี้จะใช้เซลล์ตรึงในเจลแลนแกมมาย่อยสลายสารเคมีอันตราย

Mosley และคณะ (2002) ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันเชื้อเพลิง (gasoline) โดยใช้กลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเชื้อเพลิงมาตรึงในเจลแลนแกมแบบวิธีกักขัง พบว่าเมื่อเติมเซลล์ตรึงลงไปในระบบจำลองดิน น้ำมันเชื้อเพลิงความเข้มข้น 50, 100, 200, 400 และ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ถูกย่อยสลายทันที ในขณะที่เมื่อใส่เซลล์อิสระลงไป น้ำมันเชื้อเพลิงความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ถูกย่อยสลายทันที แต่ที่ความเข้มข้น 200, 400 และ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมันเชื้อเพลิงจะถูกย่อยสลายวันที่ 1, 2 และ 5 ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้แสดงว่าเซลล์ตรึงจะมีช่วงการปรับตัวลดลงเมื่อน้ำมันเชื้อเพลิงมีความเข้มข้นสูง แต่เซลล์อิสระ

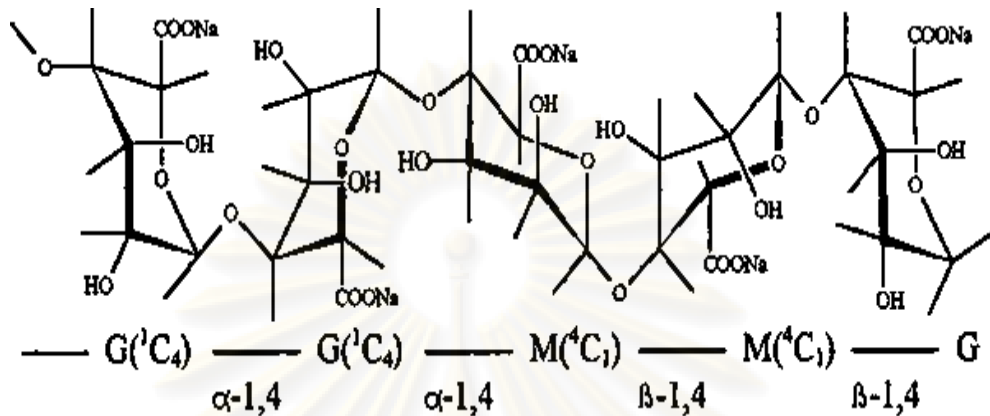
จำเป็นต้องมีช่วงการปรับตัวค่อนข้างนาน เมื่อน้ำมันเชื้อเพลิงมีความเข้มข้นสูง ทั้งนี้เนื่องมาจาก เจลแลนแกมมีส่วนช่วยในการปกป้องเซลล์จากความเสียหายของน้ำมันเชื้อเพลิง

Wang และคณะ (2007) ศึกษาการย่อยสลายคาร์บาซอล (carbazole) โดยเซลล์ตรึง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ XLDN2-5 ซึ่งใช้วัสดุพอลิเมอร์ธรรมชาติ 4 ชนิด ในการตรึงเซลล์ พบว่าวัสดุที่ใช้ตรึงเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายคาร์บาซอล คือ เจลแลนแกม ซึ่งเป็นวัสดุ ตรึงที่มีการดูดซับคาร์บาซอลได้ดี ทำให้ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ XLDN2-5 ที่ตรึงอยู่ สามารถย่อยสลายคาร์บาซอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่นักวิจัยพบว่าการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการ กักขัง จะมีปัญหาในเรื่องการแพร่ของสารเข้าสู่ภายในเม็ดเจล ซึ่งส่งผลให้เซลล์ที่ตรึงอยู่ในเม็ด เจลใช้คาร์บาซอลได้น้อย

2.5 อัลจิเนต (Alginate)

2.5.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับอัลจิเนต

อัลจิเนตหรือที่เรียกว่าโซเดียมอัลจิเนต (Sodium Alginate) เป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ แบบเส้นตรง (heteropolysaccharide) ซึ่งสกัดมาจากสาหร่ายสีน้ำตาลจากทะเล เช่น *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, และ *Ecklonia cava* เป็นต้น นอกจากนี้แบคทีเรีย บางชนิดก็ผลิตอัลจิเนตได้ เช่น *Azotobacter vinelandii* และหลายสายพันธุ์ของ pseudomonads (Cassidy และคณะ, 1996) โครงสร้างอัลจิเนตประกอบด้วย D-mannuronic acid และ L-guluronic acid (รูปที่ 2.6) ถ้านำมาเชื่อมขวางด้วยไอวาเลนท์แคทไอออน เช่น Ca^{2+} , Sr^{2+} หรือ Ba^{2+} นอกจากนี้อาจเชื่อมขวางด้วยไตรวาเลนท์แคทไอออน เช่น Fe^{3+} หรือ Al^{3+} ทำให้เกิด เป็นเจล ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างอัลจิเนตและไอวาเลนท์แคทไอออนหรือไตรวาเลนท์แคท ไอออน เรียกว่าการเกิดเจลแบบไฮโอโนโทรปิก ทำให้เจลมีรูพรุนขนาด 5-200 นาโนเมตร ซึ่งทำให้ สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กสามารถผ่านได้ (Smidsrod และ Skjak-Braek, 1990; Li และคณะ, 1996; Klinkenberg และคณะ, 2001; Abubakr และคณะ, 2009) อัลจิเนตมีลักษณะเป็นผง ละเอียดสีขาวถึงสีเหลืองน้ำตาล (รูปที่ 2.7) เป็นสารที่ละลายน้ำได้แต่ช้า ไม่ละลายในเอทานอล และอีเทอร์ อัลจิเนตมีคุณสมบัติเป็นสารที่ทำให้เกิดความข้น และความเสถียร



รูปที่ 2.6 ลักษณะโครงสร้างของอัลจิเนต

(ที่มา: www.chemyq.com/En/xz/xz1/529qguvr.htm)

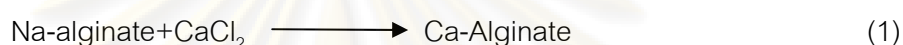


รูปที่ 2.7 ลักษณะผงอัลจิเนต

2.5.2 การสังเคราะห์เม็ดเจลอัลจิเนต

การเกิดเจลของอัลจิเนตเป็นแบบไอโอโนโทรปิก (Woodward, 1988) เช่นเดียวกับเจลดแลนแกม โดยการเกิดเจลจะเกิดจากการเชื่อมขวางของไอออนระหว่างหมู่กรดคาร์บอกซิลิกของโซเดียมอัลจิเนตกับแคลเซียมไอออนในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เพื่อขึ้นรูปเป็นแคลเซียมอัลจิเนต (สมการที่ 1) การเกิดเป็นเม็ดเจลขึ้นกับอุณหภูมิซึ่งอยู่ในช่วง 0 ถึง 80 องศาเซลเซียส แต่ถ้ามี่ฟอสเฟต เลคเตรต และซีเตรต ซึ่งเป็น chelating agents จะทำให้ลดความเสถียรของเม็ดเจลเนื่องจากสารทั้ง 3 ชนิดนี้ จะไปจับกับแคลเซียมไอออนได้ดี นอกจากนี้ถ้ามีโซเดียมไอออนหรือแมกนีเซียมไอออนความเข้มข้นสูง ก็จะทำให้เม็ดเจลมีความเสถียรลดน้อยลงเช่นกัน ดังนั้นความ

เสถียรของเม็ดเจลขึ้นกับความเข้มข้นของสารละลายอัลจิเนต ขนาดของเม็ดเจล และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Smidsrod และ Skjak-Braek, 1990; Idris และ Suzana, 2006) วิธีการตรึงเซลล์ในเม็ดเจลแบบกักขังจะแปรผันความเข้มข้นของอัลจิเนตระหว่าง 1 ถึง 8 % (w/v) ของโซเดียมอัลจิเนตในน้ำ ส่วนสารละลายแคลเซียมคลอไรด์อยู่ในช่วง 0.05 ถึง 2 โมล การกวนและให้ความเย็นขณะที่ทำการสังเคราะห์เม็ดเจล จะทำให้เม็ดเจลแข็งตัวและมีความเสถียร ขนาดของเม็ดเจลที่สังเคราะห์ได้ขึ้นกับความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้นของสารละลายอัลจิเนต และเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์ แสดงดังตารางที่ 2.4



ตารางที่ 2.4 การเปรียบเทียบการสังเคราะห์เม็ดเจลอัลจิเนต

ความเข้มข้นของอัลจิเนต (%)	ความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (โมล)	ขนาด (มิลลิเมตร)	เอกสารอ้างอิง
3.5	2	2	Mukerjee-Dhar และคณะ, 1998
2	0.2	2.69	Lazaro และคณะ, 2003
2	0.1	2.60	Tsen และคณะ, 2003
3	2	3	Manikandan และคณะ, 2007
7.5	0.2	3	Chorao และคณะ, 2009
2	2	1.65-1.70	Ha และคณะ, 2009
3	2	2	Tao และคณะ, 2009

ข้อดี ข้อเสียของเม็ดเจลอัลจิเนต

อัลจิเนตเป็นสารที่มีราคาถูก สังเคราะห์เป็นเม็ดเจลได้ง่ายและใช้สภาวะที่ไม่รุนแรงในการสังเคราะห์ ย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ และไม่เป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์หรือเอนไซม์ที่นำมาตรึง จึงเหมาะสมต่อการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ได้หลายชนิด (Cassidy และคณะ, 1996) อย่างไรก็ตามเม็ดเจลอัลจิเนตมีข้อเสีย คือ มีสมบัติบวมน้ำ และมีความเสถียรน้อย (Ha และคณะ, 2009) ดังนั้นต้องเพิ่มความเสถียรให้มากขึ้น โดยหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์เม็ดเจล และเมื่อ

สังเคราะห์เม็ดเจลเสิร์ฟให้ใช้ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ให้ล้างเม็ดเจลด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อและน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เพื่อล้างแคลเซียมไอออนส่วนเกินออก และเป็นการเพิ่มความเสถียรให้กับเม็ดเจล (Manikandan และคณะ, 2007; Choro และคณะ, 2009)

2.5.3 การตรึงเซลล์ในเม็ดเจลอัลจิเนตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ในการย่อยสลายสารเคมีอันตราย

เนื่องจากอัลจิเนตมีข้อดีหลายประการ เช่น การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ในเม็ดเจลอัลจิเนตใช้วิธีการที่ไม่ยุ่งยาก ราคาไม่แพง และไม่เป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์หรือเอนไซม์ที่นำมาตรึง นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ และปราศจากการปนเปื้อน ป้องกันเซลล์จากสิ่งแวดล้อมภายนอก (Mukerjee-Dhar และคณะ, 1998) จากข้อดีต่างๆ เหล่านี้ นักวิจัยจึงสนใจนำเซลล์ตรึงในเม็ดเจลอัลจิเนตมาประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายสารเคมีอันตราย ดังเช่นงานวิจัยดังต่อไปนี้

Mukerjee-Dhar และคณะ (1998) ได้ใช้ *Rhodococcus opacus* สายพันธุ์ TSP203 ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถย่อยสลาย polychlorinated biphenyls หรือ PCBs ได้ มาตรึงในอัลจิเนต เพื่อใช้ในการย่อยสลาย Kaneclor 300, Kaneclor 400 และ Kaneclor 500 โดยเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ พบว่าการย่อยสลาย Kaneclor 300 และ Kaneclor 400 ทั้งเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน แต่การย่อยสลาย Kaneclor 500 พบว่าเซลล์ตรึงจะย่อยสลายได้ดีกว่าเซลล์อิสระ และพบว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลาย Kaneclor 300, Kaneclor 400 และ Kaneclor 500 ได้อย่างต่อเนื่องจำนวน 3 ครั้ง ในขณะที่เซลล์อิสระใช้ได้เพียงครั้งเดียวเท่านั้นเนื่องจากเซลล์เกิดการแตกสลายเพราะ Kaneclor มีความเป็นพิษต่อเซลล์

Manikandan และคณะ (2007) ได้ตรึง crude cell extract ในอัลจิเนต ซึ่ง crude cell extract ได้จากการสกัดจาก *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี ultrasonic disintegration แล้วปั่นเหวี่ยง เพื่อเอาส่วนน้ำใสที่มีเอนไซม์สำหรับการย่อยสลายคลอโรเบนซีน (chlorobenzene) ซึ่งเป็นเอ็กตราเซลล์ลูลาร์เอนไซม์ ทำการทดสอบใน packed bed column เพื่อใช้ในการย่อยสลายคลอโรเบนซีนความเข้มข้น 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์ตรึงแบบ crude cell extract สามารถย่อยสลายคลอโรเบนซีนได้เร็วกว่าใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลาย ที่คลอโรเบนซีนความเข้มข้น 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายคลอโรเบนซีนได้ 83%, 40% และ 46% ตามลำดับ ภายในเวลา 35 นาที

Ha และคณะ (2009) ศึกษาการย่อยสลาย coumaphos ซึ่งเป็นยาฆ่าแมลงชนิดหนึ่ง และ chlorferon ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการไฮโดรไลซิส โดยใช้กลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารเหล่านี้มาตรึงในอัลจิเนต พบว่าเซลล์ตรึงในระบบถังปฏิกรณ์ มีอัตราการย่อยสลาย coumaphos ได้ดีกว่าเซลล์อิสระมากถึง 2.5 เท่า ส่วน chlorferon พบว่าเซลล์ตรึงมีอัตราการย่อยสลายดีกว่าเซลล์อิสระมากถึง 5 เท่า ซึ่งสาเหตุที่เซลล์ตรึงมีอัตราการย่อยสลายสารดีกว่าเซลล์อิสระ เนื่องจากเม็ดเจลช่วยปกป้องเซลล์ที่อยู่ภายในเม็ดเจลจากความเป็นพิษของ coumaphos และ chlorferon และส่วนประกอบของอัลจิเนตจะทำให้สรีระวิทยาของเซลล์เปลี่ยนแปลงซึ่งส่งผลให้เซลล์ทนต่อความเป็นพิษของสารพิษได้ดีขึ้น นอกจากนี้การตรึงเซลล์ในแคลเซียมอัลจิเนตจะทำให้เซลล์เมมเบรนเพิ่มสภาพให้สารซึมผ่านได้

Tao และคณะ (2009) ศึกษาการย่อยสลายฟีนานทรินโดย *Sphingomonas* sp. GY2B ที่ตรึงในอัลจิเนต ซึ่ง *Sphingomonas* sp. GY2B เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนานทรินดี พบว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายฟีนานทรินได้ดีทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด mineral salts medium (MSM) และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด 80% artificial seawater (AS) และย่อยสลายฟีนานทรินได้ดีกว่าเซลล์อิสระ โดยเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายฟีนานทรินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้มากกว่า 90% ภายในเวลา 36 ชั่วโมง และย่อยสลายฟีนานทรินได้มากกว่า 99.8% ในชั่วโมงที่ 72

จากงานวิจัยข้างต้น จะเห็นว่าประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในเม็ดเจลมีความแตกต่างกันตามวิธีการสังเคราะห์เม็ดเจล สารตั้งต้นที่ใช้ และเทคนิคการนำเซลล์ตรึงไปใช้ประโยชน์ งานวิจัยนี้จึงได้สังเคราะห์เม็ดเจลทั้งจากเจลแลนกันและอัลจิเนต แล้วนำมาตรึงแบคทีเรีย เพื่อไปใช้สำหรับย่อยสลาย BPA ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่อง HPLC รุ่น 10-AV ของบริษัท Shimadzu, Japan.
1. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
2. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius, USA.
3. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan, Japan.
4. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ "ISSCO" laminar flow รุ่น BVT – 124 ของบริษัท International Scientetific Supply, USA.
5. ตู้ดูดควัน (fume hood) รุ่น airone 12009s ของบริษัท Safelab systems, England.
5. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunswick Scientific, USA.
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys20 บริษัท Thermospectonic, Japan.
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น Sorvall® Biofuge Stratos บริษัท Heraeus, Germany.
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น KM-15200 บริษัท Kubota, Japan.
9. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS400 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England.
10. ตู้ป่นเชื้อ รุ่น Heraeus type B 5050 E ของบริษัท Heraeus, Germany.
11. เครื่องบด (blender) รุ่น MX-T31GH ของบริษัท Matsushita Electric, Taiwan.
12. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
13. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20° C ของบริษัท Sanyo Electric, Japan.
14. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -70° C รุ่น ULT1786 ของบริษัท Forma Scientific, USA.
15. ปิเปตต์ (pipette) ขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร ของบริษัท Gilson, France.

16. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 20 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร ของบริษัท Drummond Scientific, USA.
17. ขวดแก้วฝาเกลียว (vial) ขนาด 22 มิลลิลิตร (Screw Cap with Teflon Liner) ของบริษัท Lab System, Thailand.
18. ขวดขนาด 50 มิลลิลิตร (serum type reaction vial) ของบริษัท Supelco, USA.
19. ฝาปิดขวดขนาด 50 มิลลิลิตร (20 mm aluminium crimp seals)
20. Headspace septa teflon
21. หลอดฉีด HPLC (Shell vial clear) ของบริษัท Bellico lass Inc, USA.
22. หัวกรอง PTFE ขนาด 0.2 ไมครอน ของบริษัท Agela Technologies, USA.
23. กระดาษกรองไนลอน ขนาด 0.45 ไมครอน ของบริษัท Albet, Spain.
24. กระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตรต ขนาด 0.2 ไมครอน ของบริษัท Corning Incorporated, Germany.
23. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
24. เครื่องคนแม่เหล็ก
25. เครื่องแก้วพื้นฐานที่มีในห้องปฏิบัติการ

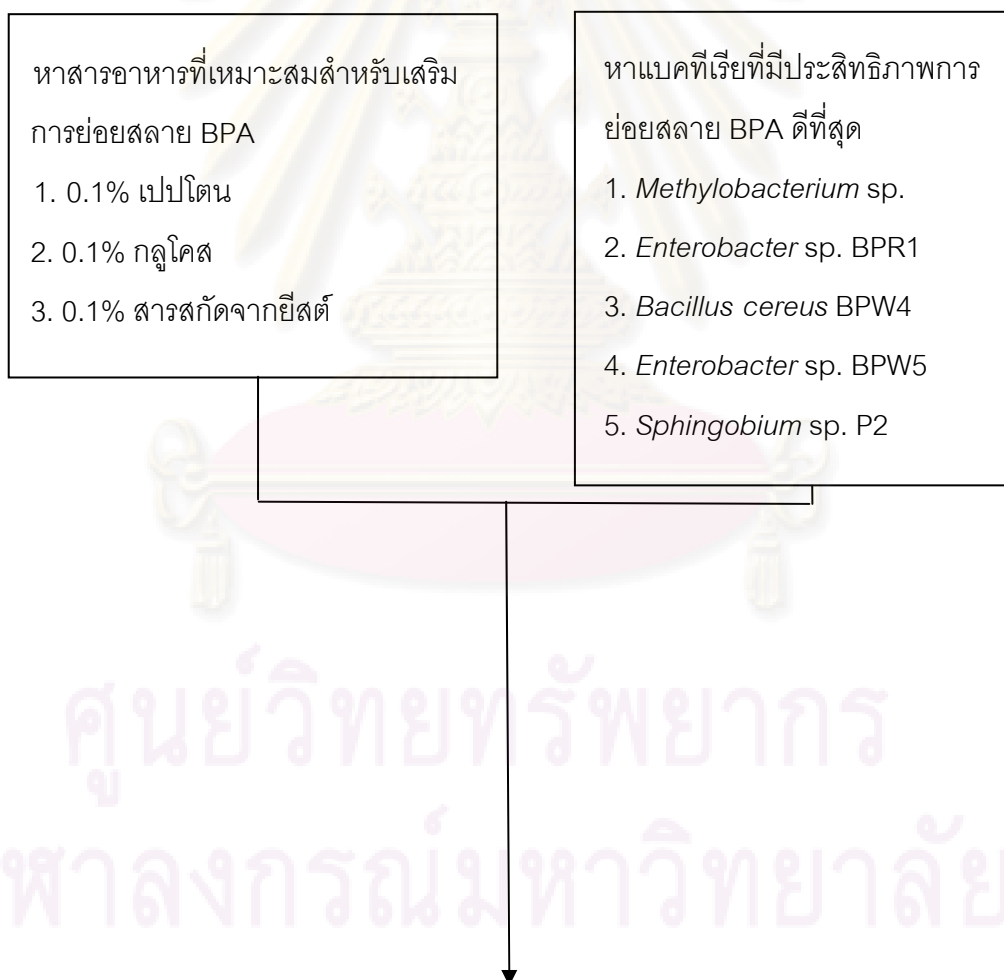
เคมีภัณฑ์

1. บิสฟีนอล เอ (Bisphenol A, BPA) ของบริษัท Merck, Germany.
2. อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile) ของบริษัท Merck, Germany.
3. ไฮดรอกซีอะซิโตฟีโนน (Hydroxyacetophenone, HAP) ของบริษัท Merck, Germany
4. กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (Hydroxybenzoic acid, HBA) ของบริษัท Merck, Germany.
5. กลูโคส (Glucose) ของบริษัท Merck, Germany.
6. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท Bio springer, France.
7. เปปโตน (Peptone) ของบริษัท Becton and Dickinson, USA.
8. เมทานอล (Methanol) ของบริษัท Fisher scientific
9. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
10. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
11. แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.

12. เฟอริกคลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท May & Baker, England.
13. แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
14. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany.
15. โซเดียมซีเตรต ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Merck, Germany.
16. โซเดียมอัลจีเนต (Sodium alginate) ของบริษัท Fluka, Norway.
17. เจลแลนแกม (Gellan gum) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA.

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 ภาพรวมของวิธีการดำเนินงานวิจัย



รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย



รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย (ต่อ)

3.2 การเพาะเลี้ยง *Methylobacterium* sp. NP3, *Enterobacter* sp. BPR1, *Bacillus cereus* BPW4, *Enterobacter* sp. BPW5 และ *Sphingobium* sp. P2

3.2.1 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองมี 5 ชนิด ได้แก่ *Methylobacterium* sp. NP3, *Enterobacter* sp. BPR1, *Bacillus cereus* BPW4, *Enterobacter* sp. BPW5 และ *Sphingobium* sp. P2 ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดคัดแยกมาจากแหล่งต่างๆ และมีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันเมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Carbon Free Mineral Medium (CFMM) (ภาคผนวก) ที่เติม 0.1% กลูโคส ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แหล่งที่มาและลักษณะของแบคทีเรียแต่ละชนิด

ชนิดแบคทีเรีย	แหล่งแบคทีเรีย	ลักษณะแบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
<i>Methylobacterium</i> sp. NP3	ดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน	โคโลนีกลมขนาดเล็ก ขอบเรียบ สีชมพู	นันทธร ภารราช, 2550
<i>Enterobacter</i> sp. BPR1	สารละลาย half-strength Hoagland's nutrient ที่เลี้ยงพืช ย่อยสลาย BPA	โคโลนีกลมขนาดเล็ก ขอบเรียบ สีขาวครีม	Saiyood และคณะ, 2010
<i>Bacillus cereus</i> BPW4	สารละลาย half-strength Hoagland's nutrient ที่เลี้ยงพืช ย่อยสลาย BPA	โคโลนีค่อนข้างกลม ขนาดใหญ่ ขอบไม่เรียบ สีขาว	Saiyood และคณะ, 2010
<i>Enterobacter</i> sp. BPW5	สารละลาย half-strength Hoagland's nutrient ที่เลี้ยงพืช ย่อยสลาย BPA	โคโลนีกลมขนาดเล็ก ขอบเรียบ สีขาวครีม	Saiyood และคณะ, 2010
<i>Sphingobium</i> sp. P2	ดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน ปิโตรเลียม	โคโลนีกลมขนาดเล็ก ขอบเรียบ สีเหลือง อ่อน	Supaka และคณะ, 2001

3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อรักษาแอกทิวิตี จะขึ้นกับชนิดของแบคทีเรีย โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *Methylobacterium* sp. NP3 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมฟีนอลความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของ *Methylobacterium* sp. NP3 ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *Enterobacter* sp. BPR1, *Bacillus cereus* BPW4 และ *Enterobacter* sp. BPW5 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม BPA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของ *Enterobacter* sp. BPR1, *Enterobacter* sp. BPW5 และ *Bacillus cereus* BPW4 และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *Sphingobium* sp. P2 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมน้ำมันเครื่อง 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของ *Sphingobium* sp. P2

3.3 การศึกษาสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับเสริมการย่อยสลาย BPA โดยแบคทีเรียแต่ละชนิด

3.3.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Methylobacterium* sp. NP3, *Enterobacter* sp. BPR1, *Bacillus cereus* BPW4, *Enterobacter* sp. BPW5 และ *Sphingobium* sp. P2 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่แปรผันสารอาหาร ได้แก่ 0.1% เปปโตน 0.1% กลูโคส และ 0.1% สารสกัดจากยีสต์ (Sakai และคณะ, 2007) ซึ่งสารอาหารเหล่านี้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย ถ้าแบคทีเรียเจริญได้ดีก็น่าจะส่งผลให้แบคทีเรียมีประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ดี เป็นเวลา 2-4 วัน ดังรูปที่ 3.2 จากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM และละลายเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% เปปโตน หรือ 0.1% กลูโคส หรือ 0.1% สารสกัดจากยีสต์ เพื่อให้เซลล์มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1.0 เพื่อนำมาทดสอบการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมกลูโคสที่เลี้ยงแบคทีเรียชนิดต่างๆ เป็นเวลา 2-4 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลา 0 วัน

3.3.2 การทดสอบการย่อยสลาย BPA

นำเซลล์ที่มีค่า OD_{600} เท่ากับ 1.0 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมสารอาหารแต่ละชนิดให้ได้ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.8 และเติม BPA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เก็บผลการทดลองวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เวลาต่างๆ ตามวิธีข้อ 3.6.1 และวัดการเจริญของแบคทีเรียตามวิธีข้อ 3.6.2 การทดลองนี้มีชุดควบคุม 2 ชุด คือ

ชุดควบคุมเพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพต่อการลดลงของ BPA ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมสารอาหารแต่ละชนิด และ BPA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชุดควบคุมเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลาย BPA โดยไม่มีการเติมสารอาหาร ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM แบคทีเรีย ซึ่งเตรียมหัวเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมกลูโคส เป็นเวลา 2-4 วัน จากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM และละลายเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ใช้กลูโคสให้หมด หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อีกครั้ง แยกส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM และละลายเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เพื่อให้เซลล์มีค่า OD_{600} เท่ากับ 1.0 และ BPA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทุกชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA และการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่เติมสารอาหารที่ต่างกัน และคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ที่ดีที่สุดและมีการเจริญค่อนข้างดี เพื่อนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.4 การตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นต่างๆ และตรวจหาสารมัธยันตร์ของกระบวนการย่อยสลาย BPA

3.4.1 ตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นต่างๆ

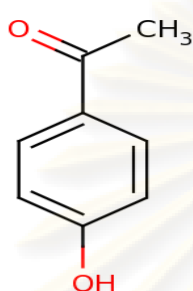
นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ดีที่สุดที่ได้จากข้อ 3.3.2 มาใช้ทดสอบเพื่อดูประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นต่างๆ โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM และเติมสารอาหารที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.2 ทำการทดลองตามวิธีข้อ 3.3.2 แต่ BPA ที่ใช้ในการตรวจสอบประสิทธิภาพมี 6 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพิ่มปริมาณเซลล์เริ่มต้นโดยให้มีค่า OD_{600} เท่ากับ 1.0 ซึ่งมีจำนวนเซลล์แบคทีเรีย 10^{11} CFU ต่อมิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน เก็บผลการทดลองวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 9, 12 และ 15 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เวลาต่างๆ ตามวิธีข้อ 3.6.1 และวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียตามวิธีข้อ 3.6.2 การทดลองนี้มีชุดควบคุม 1 ชุด คือ

ชุดควบคุมเพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพต่อการลดลงของ BPA ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.3.2 และ BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร

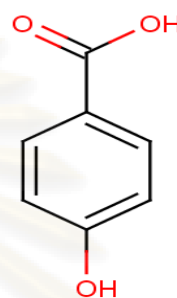
3.4.2 การตรวจหาสารมัธยันตร์ของกระบวนการย่อยสลาย BPA

ตรวจหาสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการย่อยสลาย BPA เพื่อวิเคราะห์ชนิดของสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลาย BPA ว่าเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อแบคทีเรีย (Dead end metabolite) หรือแบคทีเรียสามารถนำสารนี้ไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ และทำนายวิถีของการย่อยสลาย BPA ของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ โดยนำตัวอย่างมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วเก็บส่วนน้ำใส หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยการฉีดสารมัธยันตร์ที่ทราบมาจางานวิจัยก่อนหน้า เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ ดังเช่นงานวิจัยของ Sakai และคณะ (2007) และ Zhang และคณะ (2007) ที่ตรวจพบสารมัธยันตร์ชนิดไฮดรอกซีอะซิโตฟีโนน และกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการย่อยสลาย BPA ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 3.3 ดังนั้นในการทดลองนี้

จึงใช้สารมาตรฐานชนิดไฮดรอกซีอะซิโตฟีโนน และกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก เป็นสารมาตรฐาน สำหรับเปรียบเทียบ ค่า retention time ของสารมาตรฐานที่เกิดขึ้น ซึ่งไฮดรอกซีอะซิโตฟีโนนมีค่า retention time เท่ากับ 2.699 ส่วนกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกมีค่า retention time เท่ากับ 1.636



(a) ไฮดรอกซีอะซิโตฟีโนน



(b) กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก

รูปที่ 3.3 สูตรโครงสร้างของสารมาตรฐานของกระบวนการย่อยสลาย BPA

3.5 การตรึงแบคทีเรียในวัสดุพอลิเมอร์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA และศึกษาลักษณะของเซลล์ตรึง

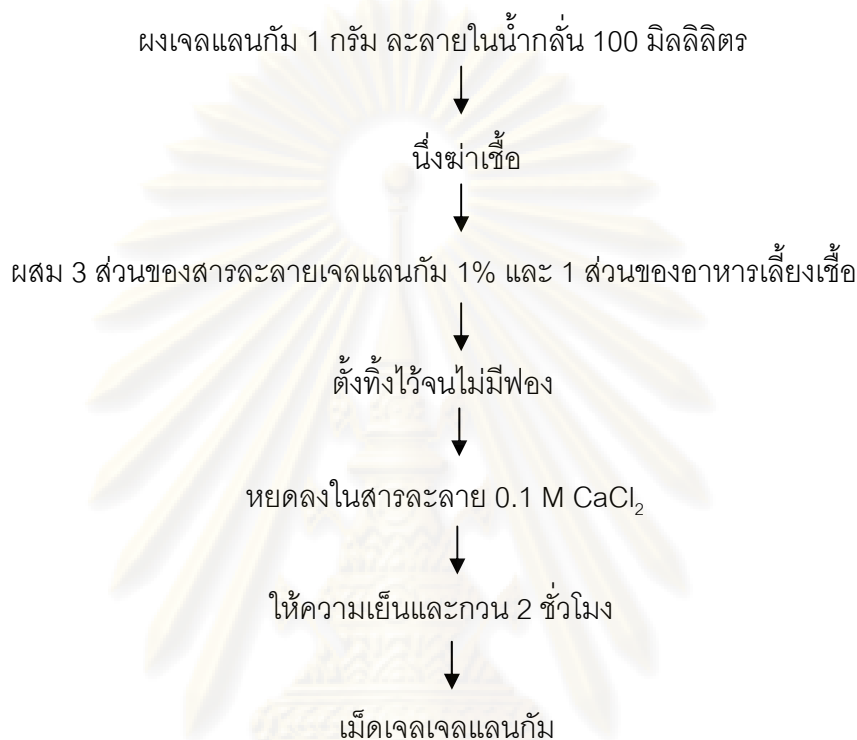
เนื่องจาก BPA มีความเป็นพิษต่อแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียมีอัตราการรอดชีวิตน้อยเมื่อเจอกับ BPA ความเข้มข้นสูง ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ไม่ดี (Zhang และคณะ, 2007) ดังนั้นจึงทำการทดลองโดยการตรึงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ดีที่สุดด้วยวัสดุตรึงพอลิเมอร์ธรรมชาติ เพื่อช่วยปกป้องแบคทีเรียจากความเป็นพิษของ BPA และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ที่ความเข้มข้นสูงให้ดีขึ้น ซึ่งวัสดุตรึงพอลิเมอร์ธรรมชาติที่นำมาใช้ในการทดสอบมี 2 ชนิด คือ เจลแลนกัม และอัลจิเนต

3.5.1 การสังเคราะห์เม็ดเจล

3.5.1.1 การสังเคราะห์เม็ดเจลเจลแลนกัม

การสังเคราะห์เม็ดเจลเจลแลนกัมทำตามวิธีการของ Wang และคณะ (2007) โดยละลายผงเจลแลนกัม 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น หลังจากนั้นนำสารละลายเจลแลนกัมผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วน 3:1 แล้วใช้ทิปขนาด 5 มิลลิลิตร ในการหยดส่วนผสมลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 M ที่กวนและให้ความเย็นอยู่ตลอดเวลา

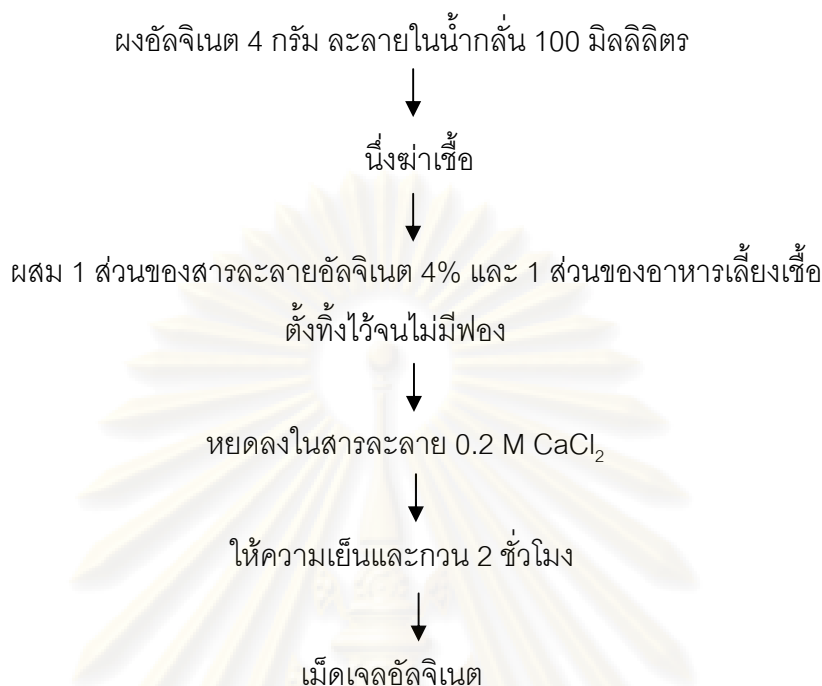
เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลแข็งตัว ซึ่งวิธีการสังเคราะห์เม็ดเจลเจลดแลนแกมตามที่กล่าวมาสามารถสรุปเป็นแผนผังได้ดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 การสังเคราะห์เม็ดเจลดแลนแกม

3.5.1.2 การสังเคราะห์เม็ดเจลอัลจิเนต

การสังเคราะห์เม็ดเจลอัลจิเนตทำตามวิธีการของ Ha และคณะ (2009) และ Tsen และคณะ (2003) โดยละลายผงไซเดียมอัลจิเนต 4 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งให้เย็น หลังจากนั้นนำสารละลายอัลจิเนตผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วน 1:1 แล้วใช้ปิพขนาด 5 มิลลิลิตร ในการหยดส่วนผสมลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.2 M ที่กวนและให้ความเย็นอยู่ตลอดเวลา เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลแข็งตัว ซึ่งวิธีการสังเคราะห์เม็ดเจลอัลจิเนตตามที่กล่าวมาสามารถสรุปเป็นแผนผังได้ดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 การสังเคราะห์เม็ดเจลอัลจิเนต

3.5.2 การศึกษาลักษณะของวัสดุจริงและเซลล์จริง

ลักษณะของเซลล์จริงที่ศึกษาคือ ศึกษาพื้นฐานวิทยาของวัสดุจริงและเซลล์จริง ขนาดของเม็ดเจล และการแตกของเม็ดเจลหลังการสังเคราะห์

3.5.2.1 พื้นฐานวิทยา

ศึกษาพื้นฐานวิทยาของวัสดุจริงและเซลล์จริงทั้งเซลล์ภายในวัสดุจริงก่อนและหลังการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม BPA โดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope หรือ SEM) ในการเตรียมตัวอย่างที่มีเทคนิคที่เรียกว่าวิธีกราด ดังนี้ แช่ตัวอย่างใน 1% ออสเมียมเตตรอกไซด์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ขจัดน้ำออกด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 30%, 50%, 70% และ 90% ตามลำดับ ขั้นตอนละ 10 นาที และตามด้วยเอทานอลความเข้มข้น 99.99% เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำไปทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤต ด้วยเครื่อง Critical Point Dryer ยี่ห้อ Balzers model CPD 020 จากนั้นนำตัวอย่างมาติดที่แท่นทองด้วยน้ำยาทาเล็บ แล้วนำตัวอย่างไปฉาบทองด้วยเครื่อง Ino sputter ยี่ห้อ Balzers model SCD 040 และนำตัวอย่างที่ได้ไปถ่ายภาพโดยใช้เครื่อง Scanning

Electron Microscope รุ่น JEOL, model JSM-5410LV เพื่อดูการเกาะของแบคทีเรียในเม็ดเจล ณ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.2.2 ขนาดของเม็ดเจล

วัดขนาดของเม็ดเจล โดยการวัดด้วยเครื่อง vernier caliper ซึ่งสุ่มนับเม็ดเจลแต่ละชนิดจำนวน 30 เม็ดเจล

3.5.2.3 การแตกของเม็ดเจลหลังการสังเคราะห์

วัดการแตกของเม็ดเจลหลังจากการสังเคราะห์เม็ดเจลเสร็จ โดยนับจำนวนเม็ดเจลที่แตกหารด้วยจำนวนเม็ดเจลทั้งหมด ตามวิธีการของ Wang และคณะ (2007)

3.5.3 การศึกษาสมบัติของวัสดุจริง

3.5.3.1 การทำปฏิกิริยากับ BPA

นำวัสดุจริงทั้ง 2 ชนิดมาทดสอบกับ BPA ก่อน เพื่อดูว่าวัสดุจริงแต่ละชนิดทำปฏิกิริยากับ BPA หรือไม่ โดยนำเม็ดเจลแต่ละชนิดใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมสารอาหารที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.2 และเติม BPA ความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 1 กรัม เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อและเม็ดเจล

3.5.3.2 การดูดซับ BPA

ทดสอบการดูดซับ BPA ของวัสดุจริงแต่ละชนิด โดยนำเม็ดเจลแต่ละชนิดจำนวน 1 กรัม ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมสารอาหารที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.2 และเติม BPA ความเข้มข้น 20 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เม็ดเจลดูดซับ BPA ได้อย่างสมบูรณ์ และวิเคราะห์ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามวิธีข้อ 3.6.1

3.5.4 การตรึงแบคทีเรียในวัสดุจริง

3.5.4.1 การตรึงแบคทีเรียในเจลแลนกัม

การตรึงแบคทีเรียในเจลแลนกัมทำตามวิธีข้อ 3.5.1.1 โดยนำแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมสารอาหารที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.2 เป็นเวลา 3 วัน ไปปั่นแยก

เซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM และละลายเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมสารอาหารที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.2 หลังจากนั้นนำแบคทีเรียที่มีเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^{14} CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายเจลแลนกัน ความเข้มข้น 1% (w/v) ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนไม่มีฟองอากาศ แล้วหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ปล่อยให้เม็ดเจลแข็งตัว 2 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเซลล์สุดท้ายในเม็ดเจลประมาณ 10^{12} CFU ต่อกรัมเม็ดเจล ล้างเม็ดเจลด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อและน้ำกลั่นปลอดเชื้อก่อนนำไปทดลองในขั้นต่อไป

3.5.4.2 การตรึงแบคทีเรียในอัลจินต

การตรึงแบคทีเรียในอัลจินตทำตามวิธีข้อ 3.5.1.2 โดยนำแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมสารอาหารที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.2 เป็นเวลา 3 วัน ไปปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM และละลายเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมสารอาหารที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.2 หลังจากนั้นนำแบคทีเรียที่มีเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^{13} CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายโซเดียมอัลจินตความเข้มข้น 4% (w/v) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนไม่มีฟองอากาศ แล้วหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีการกวนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลแข็งตัว โดยมีปริมาณเซลล์สุดท้ายในเม็ดเจลประมาณ 10^{12} CFU ต่อกรัมเม็ดเจล ล้างเม็ดเจลด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อและน้ำกลั่นปลอดเชื้อก่อนนำไปทดลองในขั้นต่อไป

3.5.5 การศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการย่อยสลาย BPA

3.5.5.1 การตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ของเซลล์ตรึง

นำเซลล์ตรึงในเม็ดเจลแลนกันที่ได้จากวิธีข้อ 3.5.4.1 จำนวน 2 กรัม ซึ่งมีปริมาณเซลล์สุดท้ายในเม็ดเจลประมาณ 10^{12} CFU ต่อกรัมเม็ดเจล และเซลล์ตรึงในเม็ดเจลอัลจินตที่ได้จากวิธีข้อ 3.5.4.2 จำนวน 2 กรัม ซึ่งมีปริมาณเซลล์สุดท้ายในเม็ดเจลประมาณ 10^{12} CFU ต่อกรัมเม็ดเจล ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.2 10 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้น BPA ตั้งแต่ 5, 10, 20, 40, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน เก็บผลการทดลองวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 9, 12 และ 15 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เวลาต่างๆ ตามวิธีข้อ 3.6.1 และวิเคราะห์

จำนวนของแบคทีเรียทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อและแบคทีเรียในเม็ดเจล ตามวิธีข้อ 3.6.2 และ 3.6.3 การทดลองนี้มีชุดควบคุม 2 ชุด คือ

ชุดควบคุมเพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพต่อการลดลงของ BPA ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.3.2 และ BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชุดควบคุมเพื่อศึกษาการดูดซับ BPA โดยวัสดุตั้ง ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.3.2 วัสดุตั้งที่ไม่มีแบคทีเรีย จำนวน 2 กรัม และ BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทุกชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ของชุดทดลองต่างๆ และคัดเลือกเซลล์ตั้งที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ดีที่สุด เพื่อนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.5.5.2 ความสามารถในการใช้เซลล์ตั้งซ้ำอย่างต่อเนื่อง และความเสถียรของเซลล์ตั้ง

ศึกษาเซลล์ตั้งที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ดีที่สุด โดยตรวจสอบความสามารถในการนำเซลล์ตั้งกลับมาใช้ใหม่ (Reusability) โดยเก็บเซลล์ตั้งที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5.5.1 มากองด้วยกระดาษกรองปลอดเชื้อ เพื่อมาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิตร โดยเติมเซลล์ตั้งประมาณ 10 กรัม ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 50 มิลลิตร 2 ชนิด คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมสารอาหารที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.2 โดยทดสอบ BPA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บผลการทดลองวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 9, 12 และ 15 โดยการปั่นเก็บส่วนน้ำใสแล้ววิเคราะห์ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ตามวิธีข้อ 3.6.1 และวิเคราะห์จำนวนของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อและแบคทีเรียที่ตรงในวัสดุตั้งโดยใช้เทคนิค total plate count ตามวิธีข้อ 3.6.2 และ 3.6.3 เมื่อเก็บผลการทดลองครบ 15 วัน ให้เติม BPA เพิ่ม โดยใช้ BPA จาก stock ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ละลายในอะซิโตนไตรล์ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับเมื่อเริ่มต้นการทดลอง ทำซ้ำหลายๆ ครั้ง เพื่อหาประสิทธิภาพของเซลล์ตั้งว่าสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้กี่ครั้ง ทั้งนี้พิจารณาจากเวลาที่ใช้อย่อยสลาย BPA จนหมด และจำนวนแบคทีเรียที่เหลือในเม็ดเจลหลังจากการใช้งาน ซึ่งได้ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และตรวจสอบความเสถียร (Stability) ของเซลล์ตั้ง ว่าเซลล์ตั้งไม่หลุดออกมาข้างนอก เนื่องจากการแตกหรือการละลายของวัสดุตั้ง โดยดูจากการทดลองการนำเซลล์ตั้งกลับมาใช้ใหม่

3.6 การวิเคราะห์

3.6.1 การวิเคราะห์ปริมาณ BPA

วิเคราะห์ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวด้วย HPLC ยี่ห้อ Shimadzu คอลัมน์ชนิด Inertsil ODS-3 ขนาด 4.6x150 มม. ตามวิธีการวิเคราะห์ของ Ohko และคณะ (2001) ซึ่งมีตัวชะสาร (mobile phase) คือ อะซิโตนไทรล์ 50% และน้ำกลั่นปลอดประจุ 50% มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ความยาวคลื่นแสงอุลตราไวโอเล็ตที่ใช้ตรวจวิเคราะห์คือ 275 นาโนเมตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยนำแต่ละตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ได้ส่วนน้ำใส แล้วนำส่วนน้ำใสมากรองผ่านเมมเบรนชนิด PTFE ขนาด 0.22 ไมครอน ซึ่ง BPA มีค่า retention time เท่ากับ 5.546 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่จะคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับวันที่ 0 ซึ่งคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ BPA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อคำนวณปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก)

3.6.2 การวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียอิสระ

การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมีวิธีวัด 2 วิธี คือ วัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร และเทคนิค total plate count โดยนำแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM มาเจือจางเชื้อโดยวิธี 10-fold dilution และนำความเข้มข้นที่เหมาะสมมาเกลี่ยให้ทั่วผิวน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่เติมสารอาหารที่เหมาะสมจากวิธีข้อ 3.3.2 บ่มเชื้อประมาณ 2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีในช่วง 30-300 โคโลนี แล้วคำนวณค่า CFU ต่อมิลลิลิตร

3.6.3 การวิเคราะห์จำนวนของแบคทีเรียในวัสดุตั้ง

วิเคราะห์จำนวนของแบคทีเรียในวัสดุตั้งโดยใช้เทคนิค total plate count สำหรับแบคทีเรียในเจลแลนก็มักจะวิเคราะห์จำนวนของแบคทีเรียโดยนำเม็ดเจลแลนก็ที่มีแบคทีเรียตรึงอยู่มาบดให้ละเอียด แล้ว sonicate ด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex ประมาณ 3 นาที และทำซ้ำหลายๆ ครั้งเพื่อให้แน่ใจว่าแบคทีเรียที่อยู่ในวัสดุตั้งหลุดออกมาจนหมด และนำแบคทีเรียที่หลุดออกจากวัสดุตั้งมาเจือจางเชื้อโดยวิธี 10-fold dilution และนำความเข้มข้นที่เหมาะสมมาเกลี่ยให้ทั่วผิวน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่เติมสารอาหารที่เหมาะสมจากวิธีข้อ 3.3.2 บ่มเชื้อประมาณ 2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

จากนั้นนับจำนวนโคโลนีในช่วง 30-300 โคโลนี แล้วคำนวณค่า CFU ต่อกรัม ส่วนแบคทีเรียในอัลจินเตจะวิเคราะห์จำนวนของแบคทีเรียโดยเติมสารละลายโซเดียมซิติเรตความเข้มข้น 1% ลงในเม็ดเจลอัลจินเตที่มีแบคทีเรียตรึงอยู่ แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลละลาย ตามวิธีการของ Tsen และคณะ (2003) หลังจากนั้นนำแบคทีเรียมาเจือจางเชื้อโดยวิธี 10-fold dilution เช่นเดียวกับแบคทีเรียในเจลแลนก็ัม



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

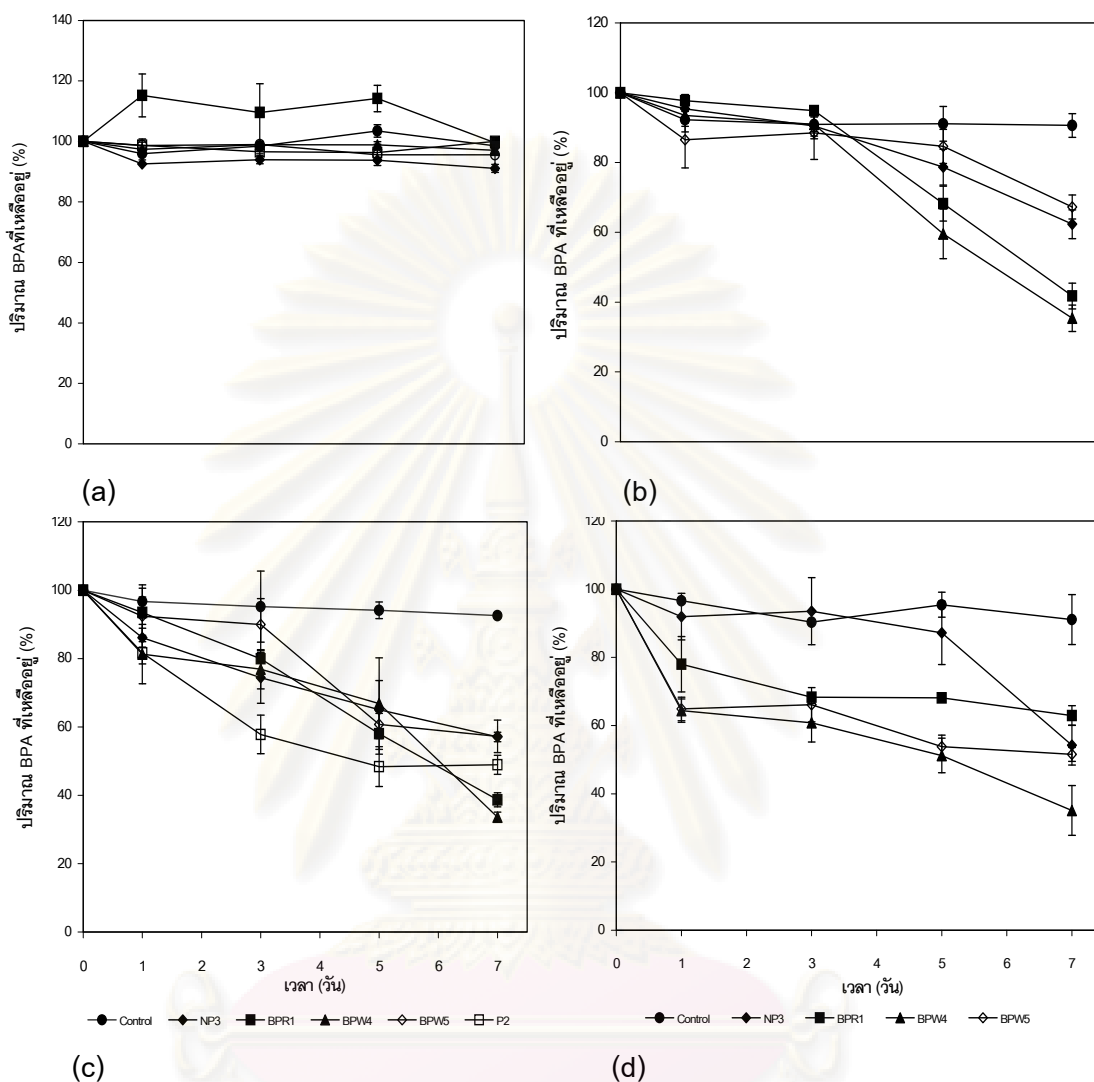
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับเสริมการย่อยสลาย BPA โดยแบคทีเรียแต่ละชนิด

การทดลองนี้ศึกษาสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับเสริมการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้แบคทีเรียแบบเซลล์อิสระ 5 ชนิด ได้แก่ *Methylobacterium* sp. NP3, *Enterobacter* sp. BPR1, *Enterobacter* sp. BPW5, *Bacillus cereus* BPW4 และ *Sphingobium* sp. P2 ซึ่งสารอาหารที่ใช้ในการทดสอบมี 3 ชนิด คือ 0.1% เปปโตน 0.1% กลูโคส และ 0.1% สารสกัดจากยีสต์ ทั้งนี้เนื่องจากเป็นสารอาหารที่แบคทีเรียนำไปใช้ได้ง่าย จึงอาจเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ให้ดีขึ้น

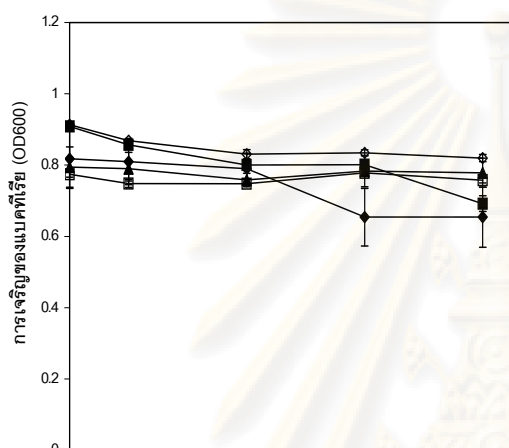
ในขั้นแรกผู้วิจัยได้ทำการทดลองโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ไม่เติมสารอาหารพบว่าแบคทีเรียทุกชนิดย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้น้อยมากหรือไม่มีการย่อยสลายเลย โดยย่อยสลายได้ประมาณ 0-9% (รูปที่ 4.1a) ส่วนการย่อยสลาย BPA ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% เปปโตน พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BPR1 และ BPW4 สามารถย่อยสลาย BPA ได้มากกว่า 50% ในวันที่ 7 ในขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ NP3 และ BPW5 ย่อยสลาย BPA ได้ต่ำกว่า 45% (รูปที่ 4.1b) สำหรับการย่อยสลาย BPA ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% กลูโคส พบว่าแบคทีเรียทุกชนิดสามารถย่อยสลาย BPA ได้ค่อนข้างดี ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ BPR1 และ BPW4 สามารถย่อยสลาย BPA ได้มากกว่า 60% ในวันที่ 7 ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 สามารถย่อยสลาย BPA ได้ 51% ในขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ NP3 และ BPW5 ย่อยสลาย BPA ได้ประมาณ 43% (รูปที่ 4.1c) และการย่อยสลาย BPA ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% สารสกัดจากยีสต์ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียทั้งหมด พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 ย่อยสลาย BPA ได้ดีที่สุด คือ สามารถย่อยสลาย BPA ได้ประมาณ 65% ในวันที่ 7 ในขณะที่แบคทีเรียอีก 4 ชนิด ย่อยสลาย BPA ได้ต่ำกว่า 50% (รูปที่ 4.1d) ในขณะเดียวกันชุดควบคุมซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM สารอาหาร และ BPA แต่ไม่มีเชื้อ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน BPA ถูกย่อยสลายได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งย่อยสลายได้ประมาณ 1-9% (รูปที่ 4.1a - 4.1d)



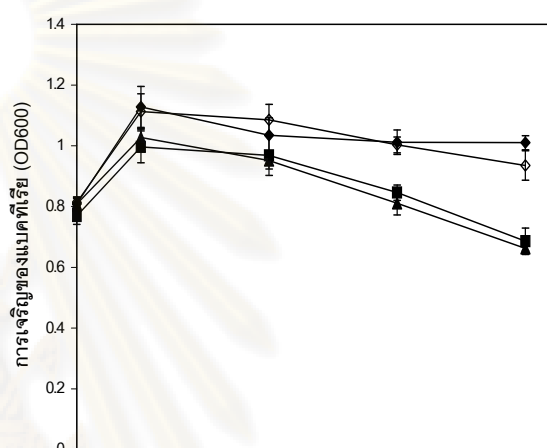
รูปที่ 4.1 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (%) ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ไม่มีการเติมสารอาหาร (a) 0.1% เปปโติน (b) 0.1% กลูโคส (c) และ 0.1% สารสกัดจากยีสต์ (d)

สำหรับการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิด พบว่าแบคทีเรียทุกชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ไม่เติมสารอาหาร มีการเจริญลดลงตั้งแต่วันที่ 0 จนถึงวันที่ 7 ดังรูปที่ 4.2a โดยเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ NP3 ที่มีการเจริญลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยมีค่า OD_{600} ลดลงจาก 0.8 เป็น 0.6 ส่วนการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% เปปโติน 0.1% กลูโคส และ 0.1% สารสกัดจากยีสต์ พบว่าแบคทีเรียทุกชนิดมีการเจริญสูงสุดในวันที่ 1 โดยมีค่า OD_{600} เพิ่มขึ้นจาก 0.8 เป็น 1.0 -1.1 และการเจริญของแบคทีเรีย

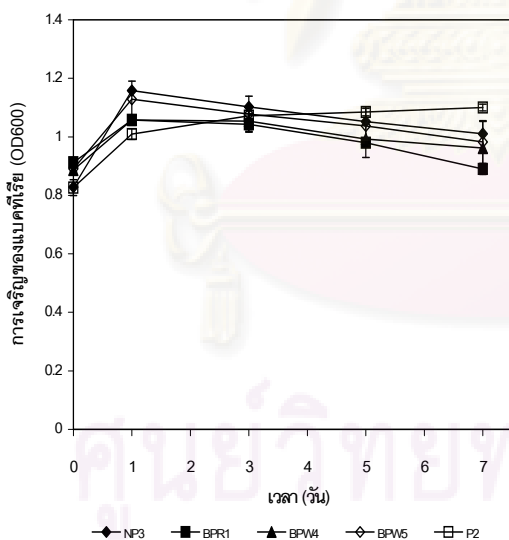
ค่อยๆ ลดลงหลังจากนั้น (รูปที่ 4.2b – 4.2d) และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารอาหารแต่ละชนิด พบว่าแบคทีเรียทุกชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% กลูโคส เจริญดีกว่าเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% เปปโตน และ 0.1% สารสกัดจากยีสต์



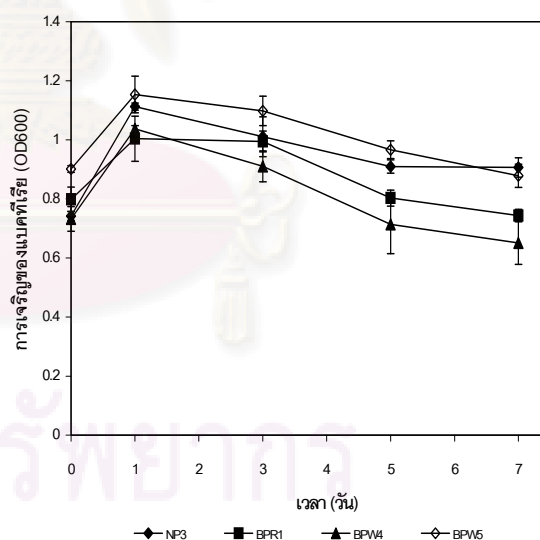
(a)



(b)



(c)



(d)

รูปที่ 4.2 การเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิด ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ไม่มีการเติมสารอาหาร (a) 0.1% เปปโตน (b) 0.1% กลูโคส (c) และ 0.1% สารสกัดจากยีสต์ (d)

ดังนั้นการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือก *Bacillus cereus* BPW4 มาตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นต่างๆ เนื่องจากเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ดีที่สุด และเจริญได้ค่อนข้างดีเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% กลูโคส ทั้งนี้ผู้วิจัยยังเลือก *Sphingobium* sp. P2 มาศึกษาเพิ่มเติมอีกด้วย เนื่องจากแบคทีเรียนี้ย่อยสลาย BPA ได้ค่อนข้างดี เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% กลูโคส และยังมีความสามารถย่อยสลายน้ำมัน และสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน เช่น พีแนนทรีนได้ (Supaka และคณะ, 2001) จึงคาดว่าจะเหมาะสำหรับการนำไปใช้งานจริงเมื่อมีสารปนเปื้อนหลายชนิดพร้อมกัน

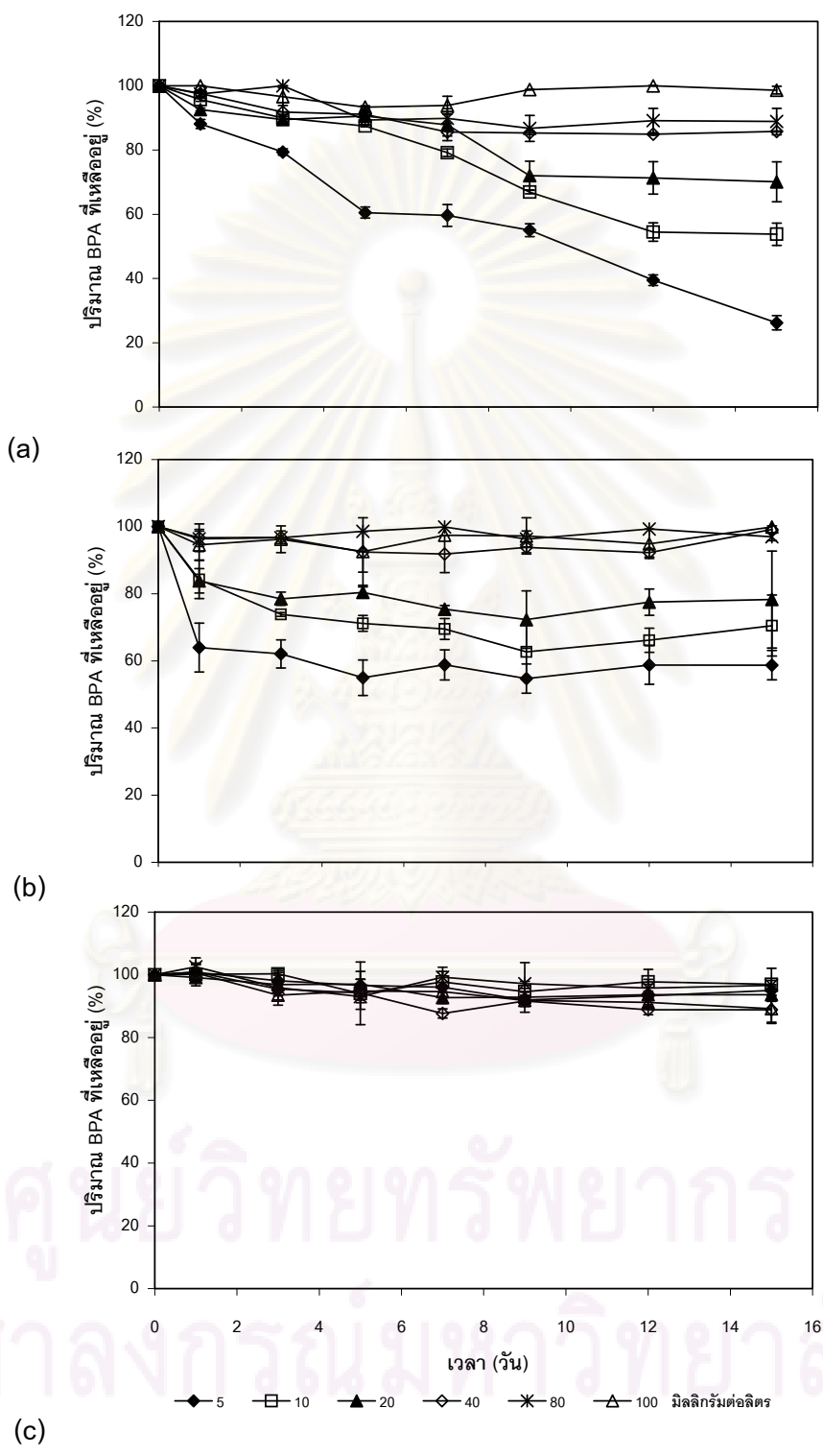


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นต่างๆ และตรวจหาสารมัยันตร์ของกระบวนการย่อยสลาย BPA

4.2.1 การตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นต่างๆ

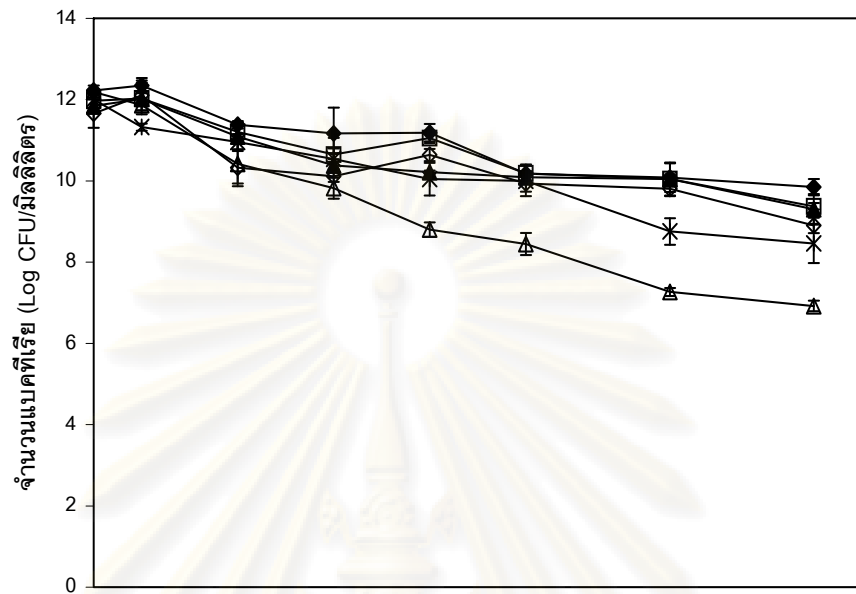
เมื่อนำแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 และสายพันธุ์ P2 มาตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% กลูโคส พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 สามารถย่อยสลาย BPA ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 74%, 46% และ 30% ตามลำดับ ในวันที่ 15 ในขณะที่ BPA ความเข้มข้น 40, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร การย่อยสลายเกิดขึ้นได้เพียง 14%, 11% และ 1% ตามลำดับ ในวันที่ 15 ดังรูปที่ 4.3a สำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 พบว่าสามารถย่อยสลาย BPA ได้น้อยกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 โดยที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียสายพันธุ์ P2 สามารถย่อยสลาย BPA ได้ประมาณ 40% และ 30% ตามลำดับ ในวันที่ 15 ในขณะที่ความเข้มข้น 20, 40, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียสายพันธุ์ P2 ย่อยสลาย BPA ได้น้อยกว่า 10% ดังรูปที่ 4.3b ในขณะเดียวกันชุดควบคุมซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมกลูโคส และ BPA แต่ไม่มีเชื้อ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน ที่ความเข้มข้นต่างๆ BPA มีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 4.3c) จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่าแบคทีเรียแบบเซลล์อิสระสามารถย่อยสลาย BPA ได้ดี เมื่อ BPA มีความเข้มข้นน้อย (5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงจะพัฒนาวิธีเพิ่มความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นสูงต่อไป โดยตรึงเซลล์แบคทีเรียในวัสดุตรึงพอลิเมอร์ธรรมชาติ



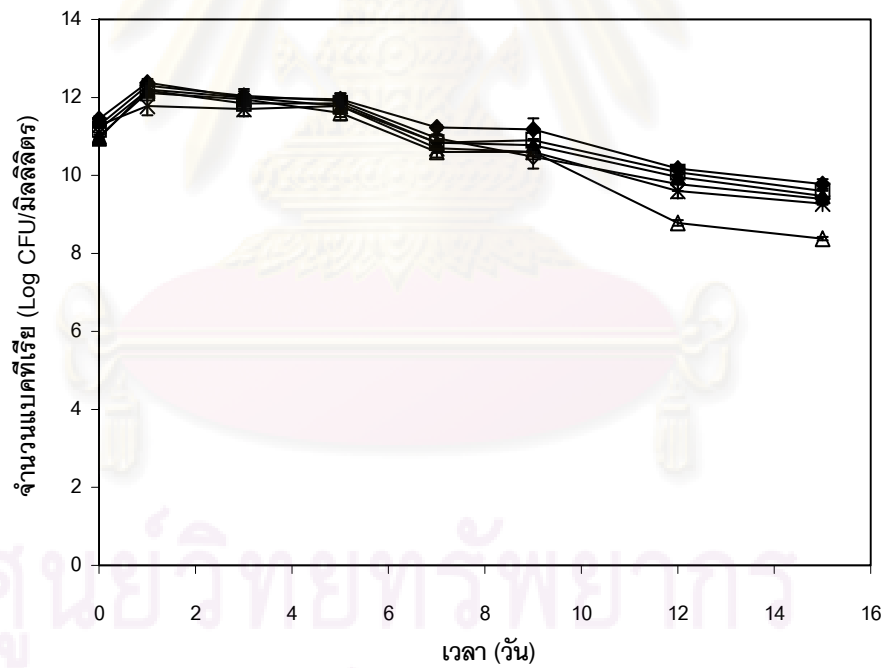
รูปที่ 4.3 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (%) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 (a) แบคทีเรียสายพันธุ์ P2 (b) และชุดควบคุม (c) ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.1% กลูโคส

ผลการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.1% กลูโคสและ BPA ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ความเข้มข้น BPA 5, 10, 20, 40, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าประมาณ 12.22, 11.97, 11.84, 11.66, 12.00 และ 12.18 Log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมีจำนวนเป็น 9.84, 9.37, 9.30, 8.90, 8.46 และ 6.92 Log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.4a) ทั้งนี้ BPA ทั้ง 4 ความเข้มข้น มีการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 สูงสุดในวันที่ 1 ยกเว้น BPA ความเข้มข้น 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่การเจริญลดลงตั้งแต่วันที่ 0

ส่วนผลการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.1% กลูโคสและ BPA ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ความเข้มข้น BPA 5, 10, 20, 40, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าประมาณ 11.43, 11.21, 10.97, 11.24, 11.27 และ 11.06 Log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมีจำนวนเป็น 9.86, 9.69, 9.56, 9.41, 9.26 และ 8.39 Log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.4b) การเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 ที่ BPA ความเข้มข้นทั้ง 6 ความเข้มข้น สูงสุดในวันที่ 1 และหลังจากนั้นการเจริญค่อยๆ ลดลง ซึ่งการย่อยสลาย BPA ก็ค่อนข้างคงที่



(a)



(b)

◆ 5 □ 10 ▲ 20 ◇ 40 ✱ 80 △ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

รูปที่ 4.4 จำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 (a) และแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 (b) ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.1% กลูโคส

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน จำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 และ P2 มีค่าใกล้เคียงกัน ที่ BPA ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ BPA ความเข้มข้น 40, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 มีมากกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 แสดงว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 ทนต่อ BPA ความเข้มข้นสูงได้ดีกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่ามิลลิกรัม BPA ที่ถูกย่อยสลายต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและมิลลิกรัม BPA ที่ถูกย่อยสลายต่อ Log CFU ต่อมิลลิลิตร ของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 มีค่ามากกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 ที่ BPA ความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนที่ BPA ความเข้มข้น 5 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมีค่าเท่ากัน (ตารางที่ 4.1) แสดงว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 มีประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นต่างๆ ดีกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 ซึ่งงานวิจัยนี้สนใจเรื่องประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA มากกว่าการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงเลือกใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 ในการทดลองขั้นต่อไป

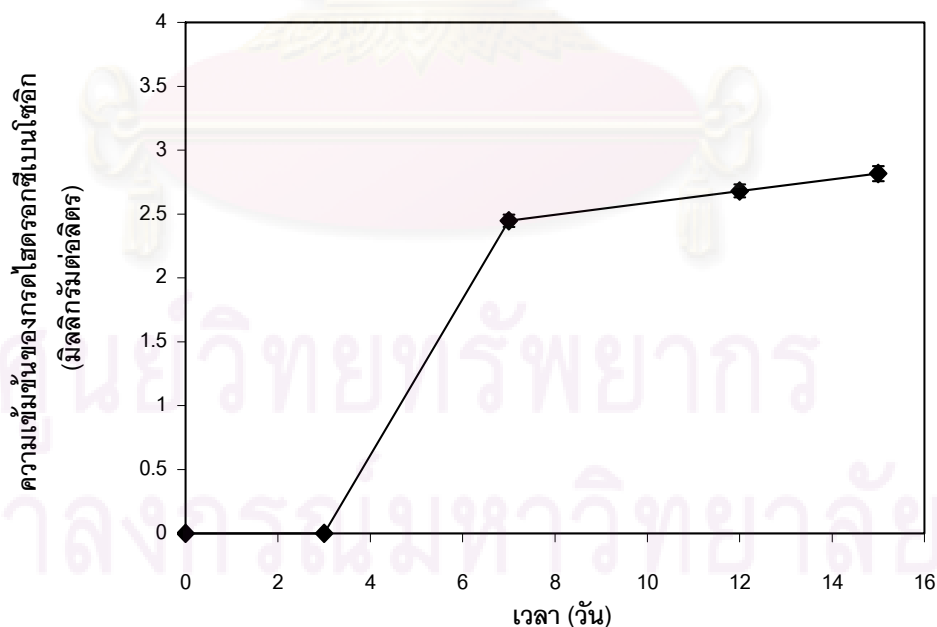
ตารางที่ 4.1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 และ P2

ความเข้มข้น BPA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	มิลลิกรัม BPA ที่ถูกย่อยสลายต่อ มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง		มิลลิกรัม BPA ที่ถูกย่อยสลาย ต่อ Log CFU ต่อมิลลิลิตร	
	BPW4	P2	BPW4	P2
5	0.010±0	0.011±0.002	0.011±0.001	0.011±0.002
10	0.017±0.001	0.013±0.004	0.020±0.001	0.013±0.003
20	0.025±0.005	0.011±0.007	0.029±0.006	0.010±0.007
40	0.024±0	0.001±0.002	0.028±0	0.001±0.002
80	0.029±0.003	0.007±0.003	0.033±0.004	0.008±0.003
100	0.004±0.003	0.004±0.002	0.005±0.004	0.004±0.002

*หมายเหตุ มิลลิกรัม BPA ที่ถูกย่อยสลายต่อมิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้งและมิลลิกรัม BPA ที่ถูกย่อยสลายต่อ Log CFU ต่อมิลลิลิตร คำนวณจากมิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นและค่า Log CFU ต่อมิลลิลิตรเริ่มต้น

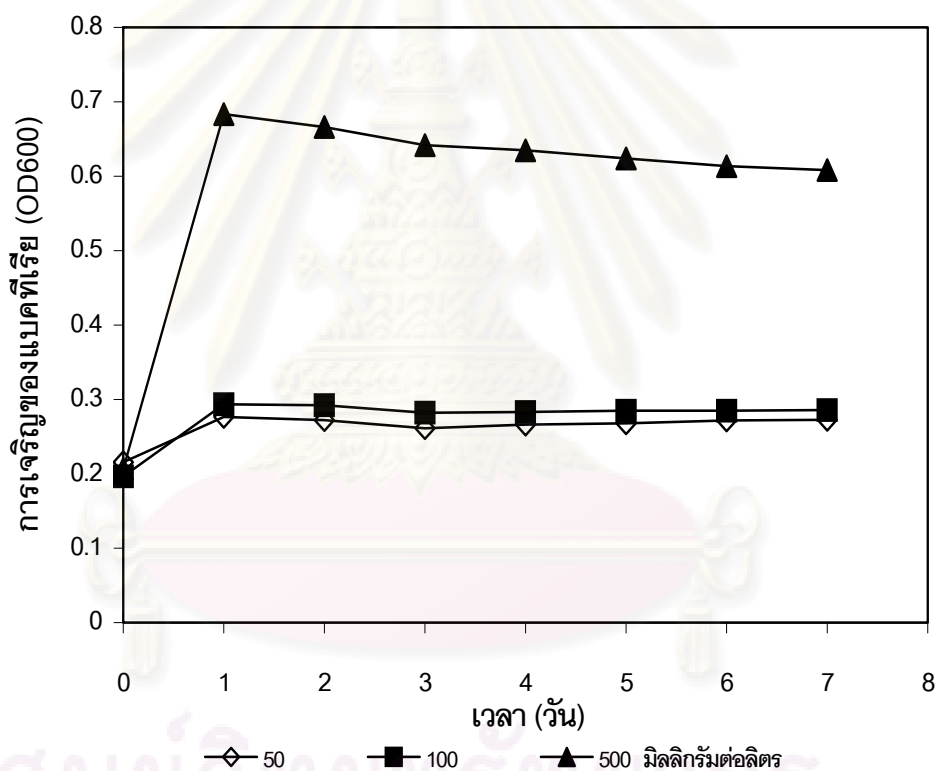
4.2.2 การตรวจหาสารมัธยันตร์ของกระบวนการย่อยสลาย BPA

งานวิจัยนี้ได้ตรวจหาสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการย่อยสลาย BPA แบบเบื้องต้น โดยใช้ไฮดรอกซีอะซิโตน (Hydroxyacetophenone หรือ HAP) และกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (Hydroxybenzoic acid หรือ HBA) เป็นสารมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบค่า retention time ของสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้น เมื่อนำตัวอย่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 วันที่ 0, 3, 7, 12 และ 15 มาฉีด HPLC ผลปรากฏว่าวันที่ 0 และวันที่ 3 ไม่มีค่า retention time ที่ใกล้เคียงกับสารมัธยันตร์ตัวอย่าง แต่การทดลองวันที่ 7, 12 และ 15 พบว่ามีกราฟที่มีค่า retention time ประมาณ 1.636 (ภาคผนวก) ซึ่งใกล้เคียงกับสารมัธยันตร์ชนิดกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก ในขณะที่ช่วงควบคุมที่ไม่มีเชื้อ ในการทดลองวันที่ 0 ถึงวันที่ 15 ไม่พบว่ามีกราฟที่มีค่า retention time ที่ใกล้เคียงกับสารมัธยันตร์ชนิดกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (ภาคผนวก) โดยความเข้มข้นของกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกที่เกิดขึ้นจากวันที่ 7 ถึงวันที่ 15 มีค่าเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.5) จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าเมื่อแบคทีเรียย่อยสลาย BPA จะทำให้เกิดการสะสมของสารมัธยันตร์ชนิดกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก โดยในช่วงวันแรกๆ ของการทดลองไม่พบสารมัธยันตร์ชนิดนี้เนื่องจากมีปริมาณน้อย แต่เมื่อเวลาผ่านไปมีการสะสมของสารมากขึ้น จึงสามารถตรวจพบได้



รูปที่ 4.5 ความเข้มข้นของกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4

นอกจากนี้ยังได้ทดสอบว่ากรดไฮดรอกซีเบนโซอิกที่เกิดขึ้นเป็น dead end product หรือ แบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้หรือไม่ โดยทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก 3 ความเข้มข้น คือ 50, 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกความเข้มข้นต่างๆ โดยเฉพาะความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียสายพันธุ์นี้เจริญได้ดีมาก และการเจริญของแบคทีเรียนี้จะค่อนข้างคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.6 การเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 ระหว่างการย่อยสลายกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก ความเข้มข้น 50-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM

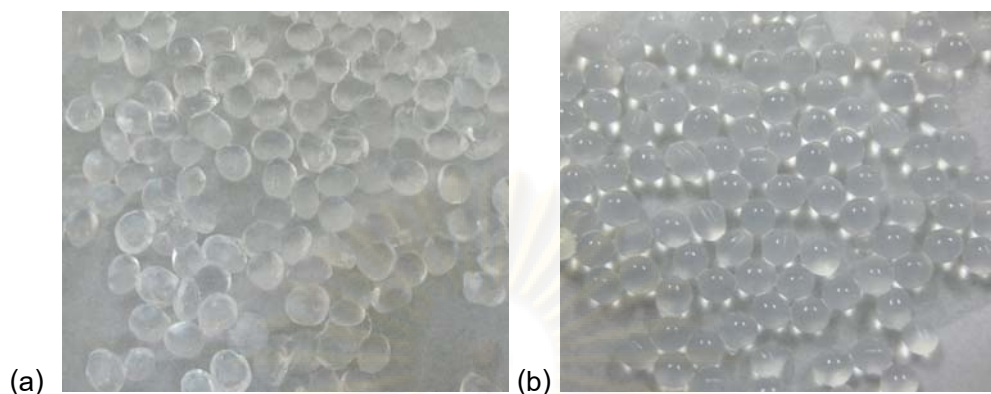
4.3 การศึกษาลักษณะและสมบัติของเม็ดเจลและเซลล์ตรึง

จากผลการทดสอบการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นต่างๆ ของแบคทีเรียแบบเซลล์อิสระ พบว่าเซลล์อิสระสามารถย่อยสลาย BPA ได้ดีที่ความเข้มข้นต่ำ ส่วน BPA ความเข้มข้นสูง การย่อยสลายเกิดขึ้นได้น้อยมาก ผู้วิจัยต้องการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA โดยใช้วิธีตรึงเซลล์ในวัสดุตรึงพอลิเมอร์ธรรมชาติ โดยงานวิจัยนี้ทดสอบพอลิเมอร์ 2 ชนิด คือ เจลแลนกันและอัลจิเนต ซึ่งเป็นวัสดุตรึงที่มีราคาถูก สังเคราะห์เม็ดเจลได้ง่าย วิธีการเตรียมไม่ยุ่งยาก ไม่เป็นต่อพิษแบคทีเรียและสิ่งแวดล้อม ปกป้องเซลล์จากสารที่มีความเป็นพิษและสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม สามารถนำมาใช้ได้หลายครั้งและสามารถใช้อย่างต่อเนื่องได้ และเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการย่อยสลายสารเคมีอันตราย (Cassidy และคณะ, 1996; Paje และคณะ, 1998; Suzaki และคณะ, 1998; Wang และคณะ, 2007)

4.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ตรึงและเม็ดเจลทั้ง 2 ชนิด

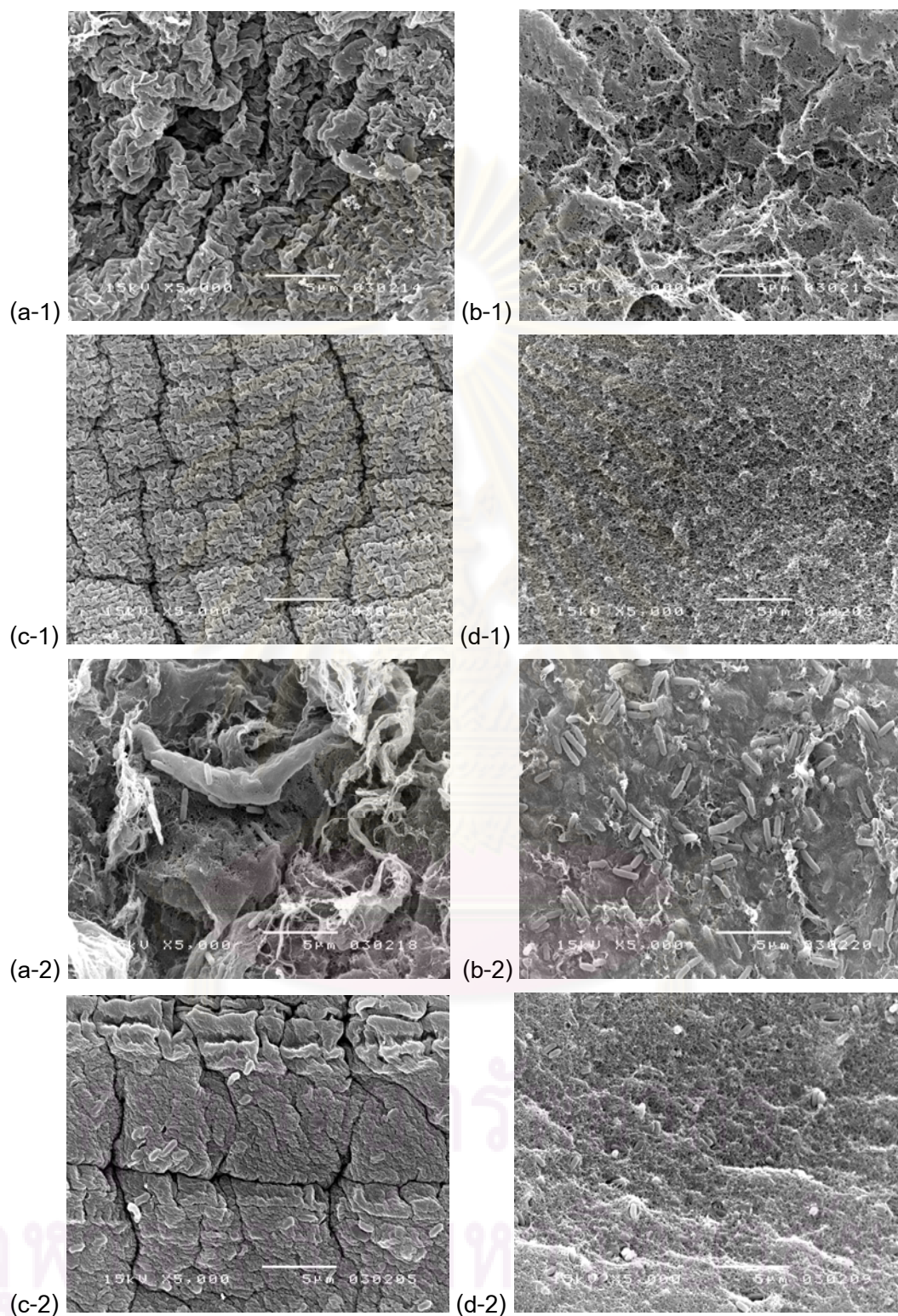
พบว่าลักษณะของเม็ดเจลเจลแลนกันมีรูปร่างค่อนข้างแบนรีและใส ผิวเรียบ มีขนาดประมาณ 3.0x5.0x2.0 ลูกบาศก์มิลลิเมตรต่อก้อน ดังรูปที่ 4.7a ส่วนลักษณะของเม็ดเจลอัลจิเนตมีรูปร่างกลมและใส ผิวเรียบ มีขนาดประมาณ 3.0x3.0x3.0 ลูกบาศก์มิลลิเมตรต่อก้อน ดังรูปที่ 4.7b เมื่อทดสอบการแตกของเม็ดเจลแต่ละชนิดหลังการสังเคราะห์เสร็จ พบว่าทั้งเม็ดเจลเจลแลนกันและเม็ดเจลอัลจิเนตไม่มีการแตกของเม็ดเจล แสดงว่าเม็ดเจลทั้ง 2 ชนิด มีความแข็งแรงจึงเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการย่อยสลายเคมีอันตรายต่อไป

เมื่อนำแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 ไปตรึงในเจลแลนกันและอัลจิเนตโดยวิธีแบบกักขัง (encapsulation) พบว่าลักษณะของเม็ดเจลเจลแลนกันที่มีแบคทีเรียตรึงจะมีรูปร่างค่อนข้างแบนรี สีเหลืองอ่อนตามปริมาณเชื้อที่ผสมกับสารละลายเจลแลนกัน ส่วนลักษณะของเม็ดเจลอัลจิเนตที่มีแบคทีเรียตรึงอยู่จะมีรูปร่างกลม สีเหลืองอ่อนตามปริมาณเชื้อที่ผสมกับสารละลายอัลจิเนต



รูปที่ 4.7 ลักษณะของเม็ดเจลเจลแลนกัม (a) เม็ดเจลอัลจิเนต (b) ที่ไม่มีแบคทีเรีย

จากการนำเม็ดเจลก่อนตรึงแบคทีเรียไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) พบว่าลักษณะพื้นผิวภายนอกของเม็ดเจลเจลแลนกัม และเม็ดเจลอัลจิเนตมีรูพรุน แต่พื้นผิวภายนอกของเม็ดเจลเจลแลนกัมมีรูพรุนเห็นได้ชัดเจนกว่า (รูปที่ 4.8a-1 และรูปที่ 4.8b-1) เช่นเดียวกับลักษณะพื้นผิวภายในของเม็ดเจลเจลแลนกัมที่มีรูพรุน ขนาดใหญ่กว่าเม็ดเจลอัลจิเนต (รูปที่ 4.8c-1 และรูปที่ 4.8d-1) เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเม็ดเจลที่ผ่านการตรึงเซลล์ พบว่าแบคทีเรียบางส่วนเข้าไปอยู่ตามรูพรุนของเม็ดเจลและแบคทีเรียบางส่วนเกาะอยู่บนผิวภายนอกของเม็ดเจลเจลแลนกัม (รูปที่ 4.8a-2) แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถเข้ามาอยู่ภายในเม็ดเจล ดังรูปที่ 4.8b-2 สำหรับเม็ดเจลอัลจิเนต พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่จะฝังตัวอยู่ตามพื้นผิวของเม็ดเจล (รูปที่ 4.8c-2 และรูปที่ 4.8d-2)

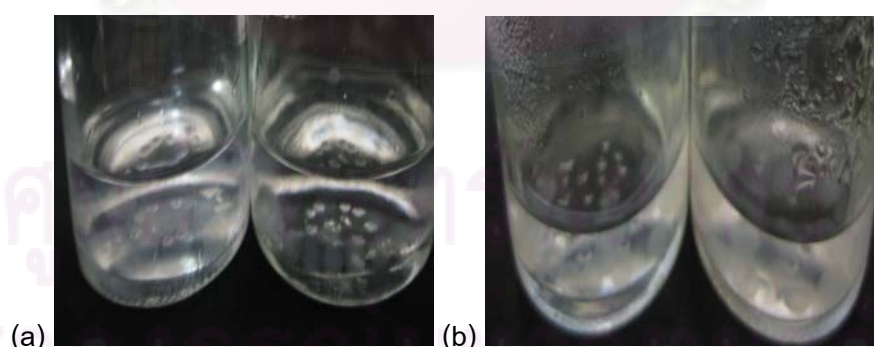


รูปที่ 4.8 ลักษณะพื้นผิวภายนอกและพื้นผิวภายในของเม็ดเจลเจลาแลนแกม (a,b) และเม็ดเจลอัลจิเนต (c,d) ก่อนการตรึงเซลล์ (a-d -1) และหลังการตรึงเซลล์ (a-d -2) ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า

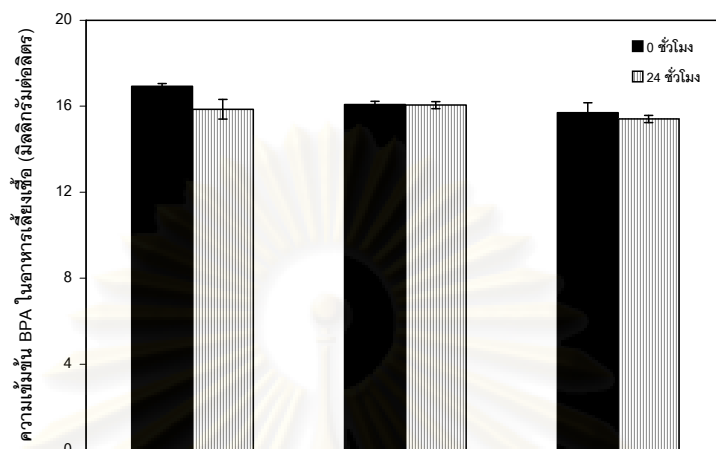
4.3.2 การทำปฏิกิริยากับ BPA และการดูดซับ BPA

เพื่อดูว่าเม็ดเจลแต่ละชนิดทำปฏิกิริยากับ BPA หรือไม่ และตรวจสอบว่าเม็ดเจลที่นำมาใช้ว่ามีความสามารถในการดูดซับ BPA หรือไม่ โดยการทดสอบการทำปฏิกิริยากับ BPA จะใช้ BPA ความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อและเม็ดเจล หลังจากเขย่าเป็นเวลา 2 วัน พบว่าในวันที่ 0 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่เม็ดเจลเจลแลนกัมชุ่มเล็กน้อย ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่เม็ดเจลอัลจินเตไสไม่มีการเปลี่ยนแปลง (รูปที่ 4.9a) และเมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อของเม็ดเจลทั้ง 2 ชนิด มีความชุ่มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับวันที่ 0 (รูปที่ 4.9b) ในขณะที่ลักษณะของเม็ดเจลทั้ง 2 ชนิด ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ไม่มีการแตกของเม็ดเจล จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่าเม็ดเจลทั้ง 2 ชนิด ไม่ทำปฏิกิริยากับ BPA

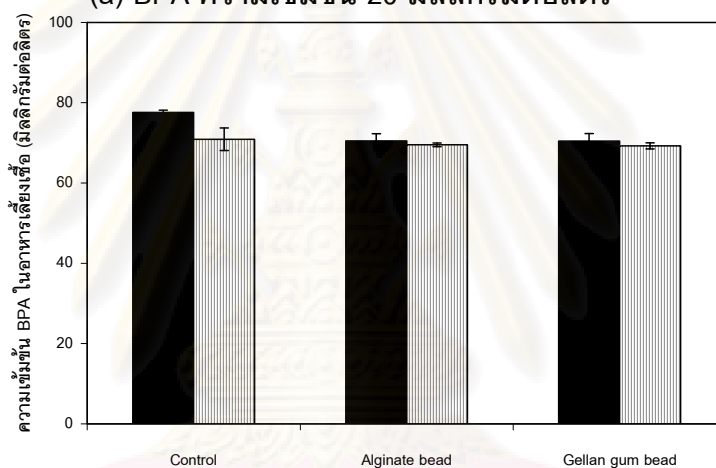
ส่วนการทดสอบการดูดซับ BPA จะใช้ BPA ความเข้มข้น 20 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งทั้ง 2 ความเข้มข้นนี้เป็นตัวแทนของ BPA ความเข้มข้นต่ำและสูง โดยมีชุดควบคุมที่ไม่ใส่เม็ดเจลเป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่าทั้ง BPA ความเข้มข้น 20 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่เม็ดเจลเจลแลนกัมและเม็ดเจลอัลจินเตมีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าเม็ดเจลทั้ง 2 ชนิดนี้ดูดซับ BPA ได้เล็กน้อย ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่ใส่เม็ดเจลินั้นความเข้มข้น BPA มีค่าลดลงเล็กน้อย (รูปที่ 4.10a และ รูปที่ 4.10b) จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่าเม็ดเจลทั้ง 2 ชนิด ดูดซับ BPA ความเข้มข้นอื่นได้เล็กน้อยเช่นกัน และเมื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อและเม็ดเจล พบว่าทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อและเม็ดเจลไม่มีการเปลี่ยนแปลง (รูปที่ 4.11a และ รูปที่ 4.11b)



รูปที่ 4.9 เม็ดเจลเจลแลนกัมและเม็ดเจลอัลจินเตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม BPA ความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 0 วัน (a) และที่เวลา 2 วัน (b)

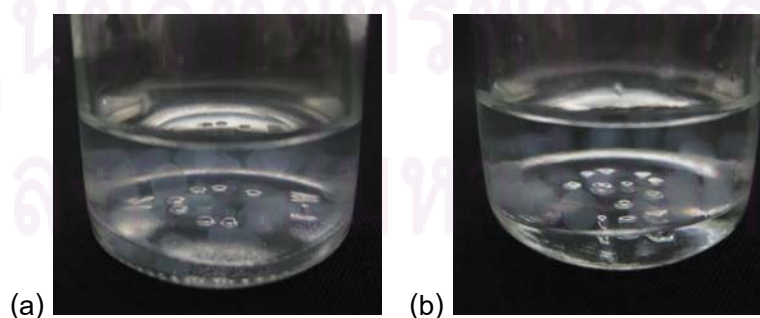


(a) BPA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร



(b) BPA ความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร

รูปที่ 4.10 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากใส่เม็ดเจลาเจลแลนกันและเม็ดเจลาอัลจินต เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4.11 ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อและเม็ดเจลาเจลแลนกัน (a) เม็ดเจลาอัลจินต (b) หลังจากทดสอบการดูดซับเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

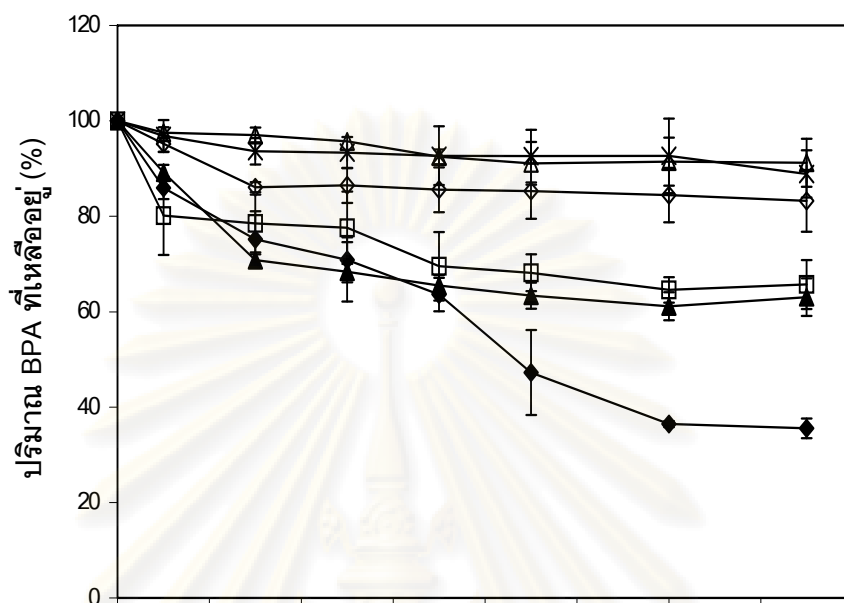
4.4 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ของเซลล์ตรึง

4.4.1 การย่อยสลาย BPA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 ที่ตรึงในเจลแลนแกม ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% กลูโคส

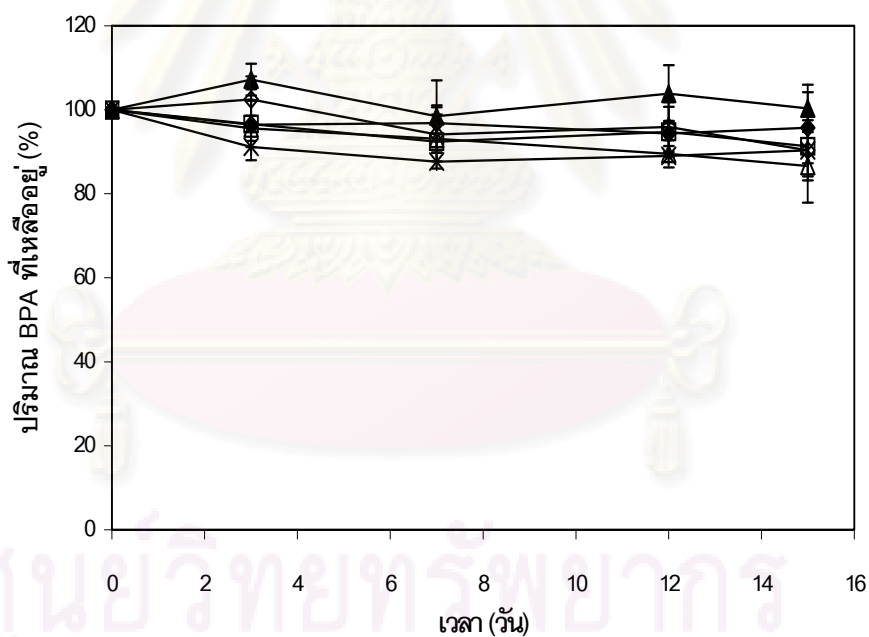
จากการตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นต่างๆ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 แบบเซลล์อิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% กลูโคส พบว่าเชื้อสามารถย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นต่ำได้ดี แต่ที่ BPA ความเข้มข้นสูงแบคทีเรียย่อยสลายได้ไม่ดี (รูปที่ 4.3a) ดังนั้นจึงตรึงแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 ในเจลแลนแกม เพื่อป้องกันแบคทีเรียจากความเป็นพิษของ BPA ที่ความเข้มข้นสูง แล้วนำมาศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยนำเซลล์ตรึงในเม็ดเจลแลนแกม จำนวน 2 กรัม ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% กลูโคส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทดสอบในระบบขวดเขย่า

ผลการย่อยสลายพบว่าเซลล์ตรึง BPW4 ในเม็ดเจลแลนแกม สามารถย่อยสลาย BPA ได้ค่อนข้างดีที่ BPA ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับเซลล์อิสระ พบว่าที่ BPA ทั้ง 2 ความเข้มข้นนี้ เซลล์ตรึงในเม็ดเจลแลนแกมย่อยสลาย BPA ได้น้อยกว่าเซลล์อิสระ คือ ย่อยสลาย BPA ได้เพียง 64% และ 34% ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์อิสระย่อยสลายได้ 74% และ 46% ตามลำดับ ในวันที่ 15 ส่วนที่ความเข้มข้น 20, 40, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์ตรึงสามารถย่อยสลาย BPA ได้ดีกว่าเซลล์อิสระ คือ ย่อยสลาย BPA ได้ตั้งแต่ 9-37% ในขณะที่เซลล์อิสระย่อยสลายได้ตั้งแต่ 1-30% ในวันที่ 15 (รูปที่ 4.3a และรูปที่ 4.12a) ในขณะที่เดียวกันชุดควบคุมซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% กลูโคส BPA และเม็ดเจลแลนแกม แต่ไม่มีเชื้อ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน ที่ความเข้มข้นต่างๆ BPA มีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 4.12b)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(a)

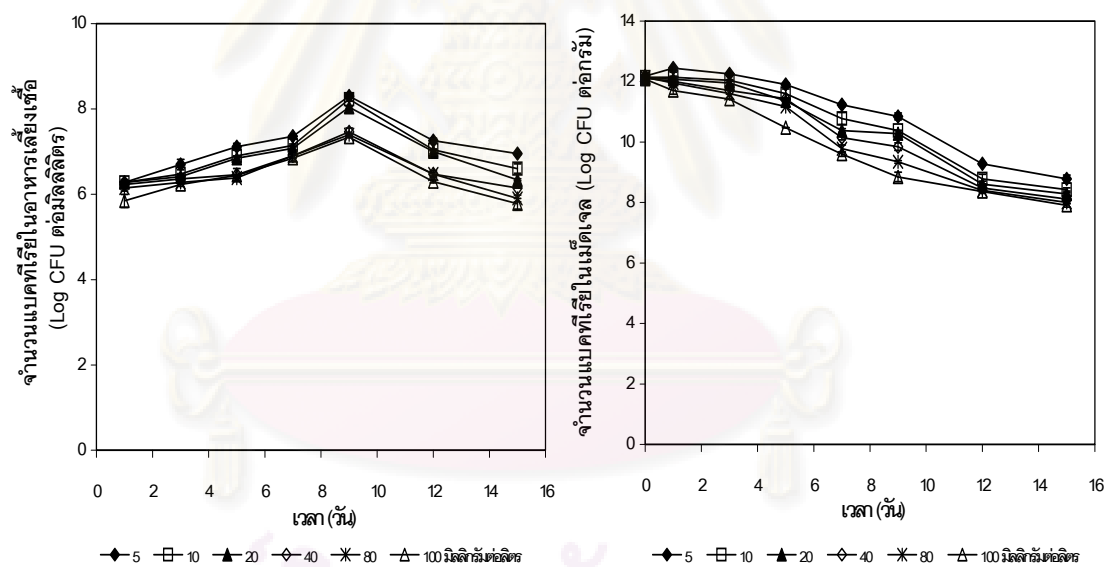


(b)

◆ 5 □ 10 ▲ 20 ◇ 40 * 80 △ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

รูปที่ 4.12 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (%) ของเซลล์ตริง (a) และชุดควบคุม (b) ในเม็ตเจล เจลเลนกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.1% กลูโคสและ BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลการเจริญของเซลล์ตรึง BPW4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ความเข้มข้น BPA ทั้ง 6 ความเข้มข้น มีค่าเริ่มต้นประมาณ 0 Log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 5.75-6.94 Log CFU ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.13a) ส่วนผลการเจริญของเซลล์ตรึงในเม็ดเจล พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ความเข้มข้น BPA ทั้ง 6 ความเข้มข้น มีค่าเริ่มต้นประมาณ 12 Log CFU ต่อกรัม เมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 7.90-8.75 Log CFU ต่อกรัม (รูปที่ 4.13b) จากรูปที่ 4.13a จะเห็นได้ว่าช่วงวันที่ 0 ถึงวันที่ 1 จำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นมากถึง 5-6 Log CFU ต่อมิลลิลิตร และการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อดีที่สุดในวันที่ 9 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ BPA ที่ลดลง ในขณะที่การเจริญของแบคทีเรียในเม็ดเจลลดลงตั้งแต่วันที่ 0



(a) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

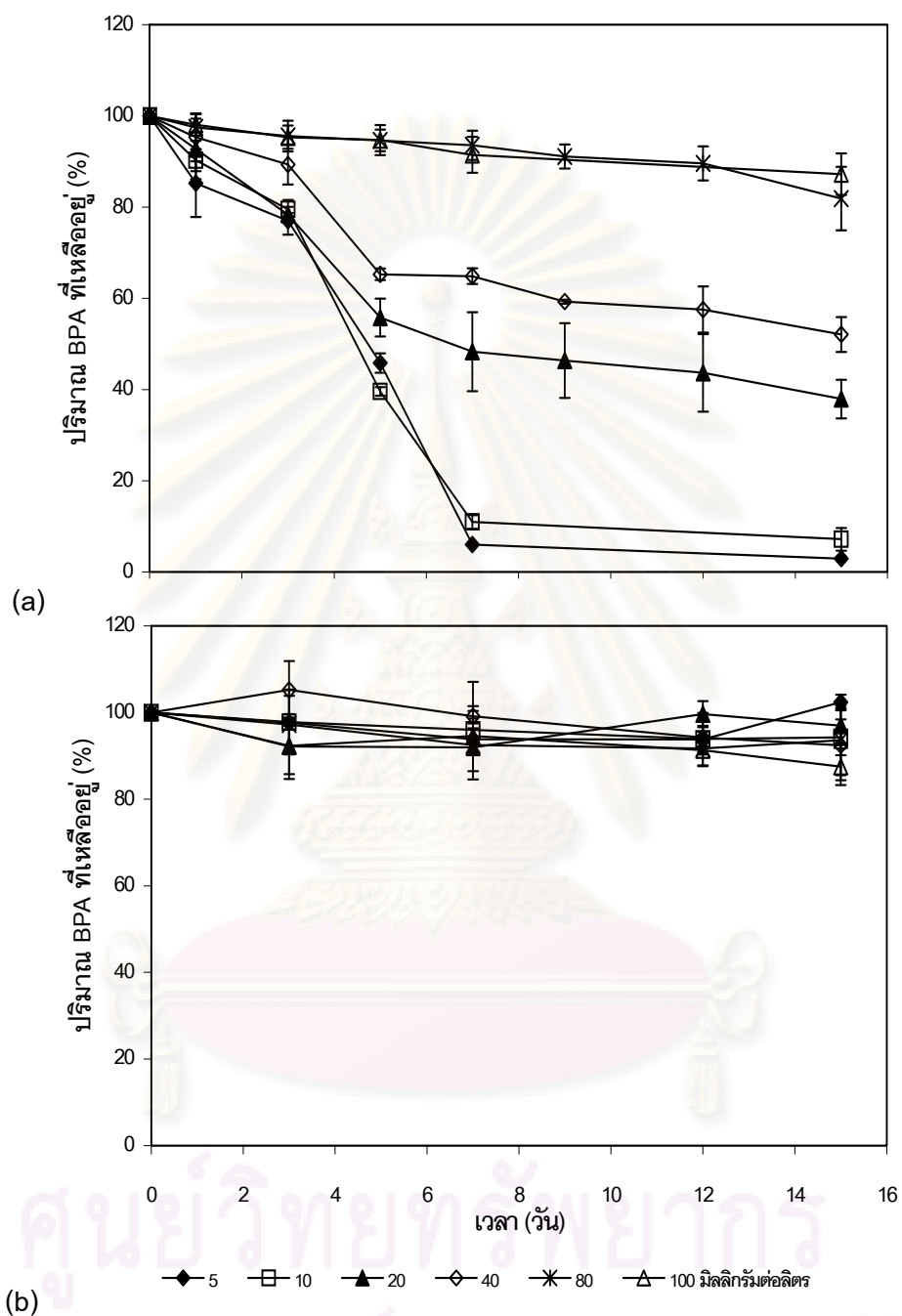
(b) เม็ดเจลเจลแลนกัม

รูปที่ 4.13 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ของเซลล์ตรึงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.1% กลูโคสและในเม็ดเจลเจลแลนกัม

4.4.2 การย่อยสลาย BPA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 ที่ตรึงในอัลจิเนต ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% กลูโคส

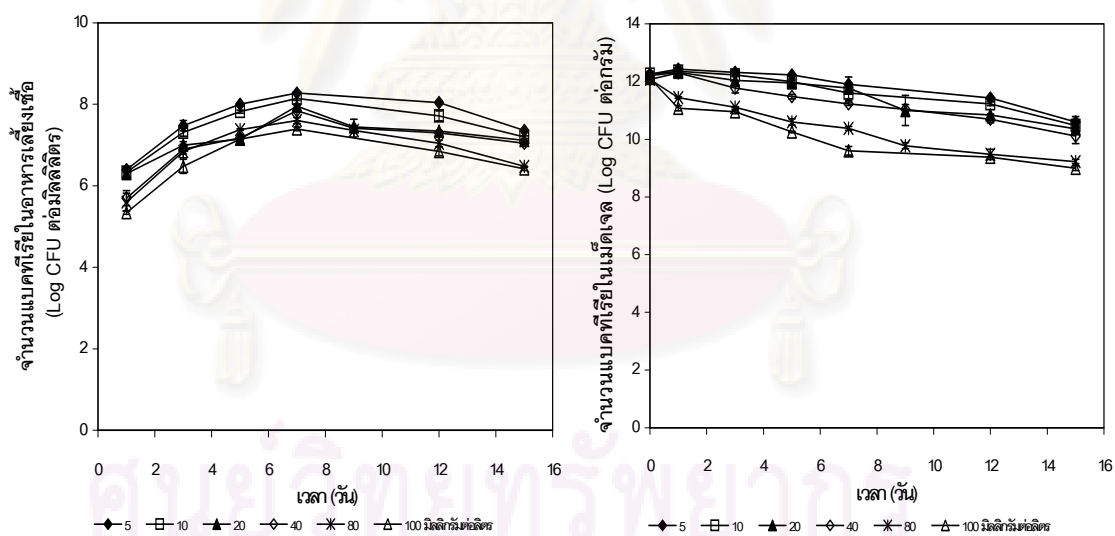
นอกจากการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 ให้เกิดได้ดีขึ้นด้วยการตรึงในเจลแลนกันแล้ว ผู้วิจัยยังได้ตรึงแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 ในอัลจิเนตเพื่อใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA อีกด้วย เนื่องจากเป็นวัสดุตรึงที่มีความแข็งแรงและไม่ทำปฏิกิริยากับ BPA เช่นเดียวกับเจลแลนกัน จึงนำเซลล์ตรึง BPW4 มาศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยนำเซลล์ตรึงในเม็ดเจลอัลจิเนตจำนวน 2 กรัม ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% กลูโคส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทดสอบในระบบขวดเขย่า

ผลการย่อยสลายพบว่าเซลล์ตรึง BPW4 ในเม็ดเจลอัลจิเนตที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% กลูโคส สามารถย่อยสลาย BPA ได้ดีที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยย่อยสลาย BPA ได้ถึง 97%, 93%, 62% และ 48% ตามลำดับ ในวันที่ 15 ในขณะที่ BPA ความเข้มข้น 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์ตรึงย่อยสลาย BPA ได้เพียง 18% และ 12% ตามลำดับ ในวันที่ 15 (รูปที่ 4.14a) ในขณะที่เดียวกันชุดควบคุมซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% กลูโคส BPA และเม็ดเจลอัลจิเนต แต่ไม่มีเชื้อ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน ที่ความเข้มข้นต่างๆ BPA มีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 4.14b)



รูปที่ 4.14 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (%) ของเซลล์ตรง (a) และชุดควบคุม (b) ในเม็ดเจล อัลจิเนต ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.1% กลูโคสและ BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลการเจริญของเซลล์ตรึง BPW4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ความเข้มข้น BPA ทั้ง 6 ความเข้มข้น มีค่าเริ่มต้นประมาณ 0 Log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 6.40-7.35 Log CFU ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.15a) ส่วนผลการเจริญของเซลล์ตรึงในเม็ดเจล พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ความเข้มข้น BPA ทั้ง 6 ความเข้มข้น มีค่าเริ่มต้นประมาณ 12 Log CFU ต่อกรัม เมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 9.03-10.67 Log CFU ต่อกรัม (รูปที่ 4.15b) จากรูปที่ 4.15a จะเห็นได้ว่าช่วงวันที่ 0 ถึงวันที่ 1 จำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นมากถึง 5-6 Log CFU ต่อมิลลิลิตร และมีการเจริญสูงสุดในวันที่ 7 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ BPA ที่ลดลง ในขณะที่การเจริญของแบคทีเรียในเม็ดเจล ที่ BPA ความเข้มข้นตั้งแต่ 5-40 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนเพิ่มขึ้นในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงหลังจากนั้น ในขณะที่ BPA ความเข้มข้น 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร การเจริญของแบคทีเรียในเม็ดเจลมีจำนวนลดลงตั้งแต่วันที่ 0



(a) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

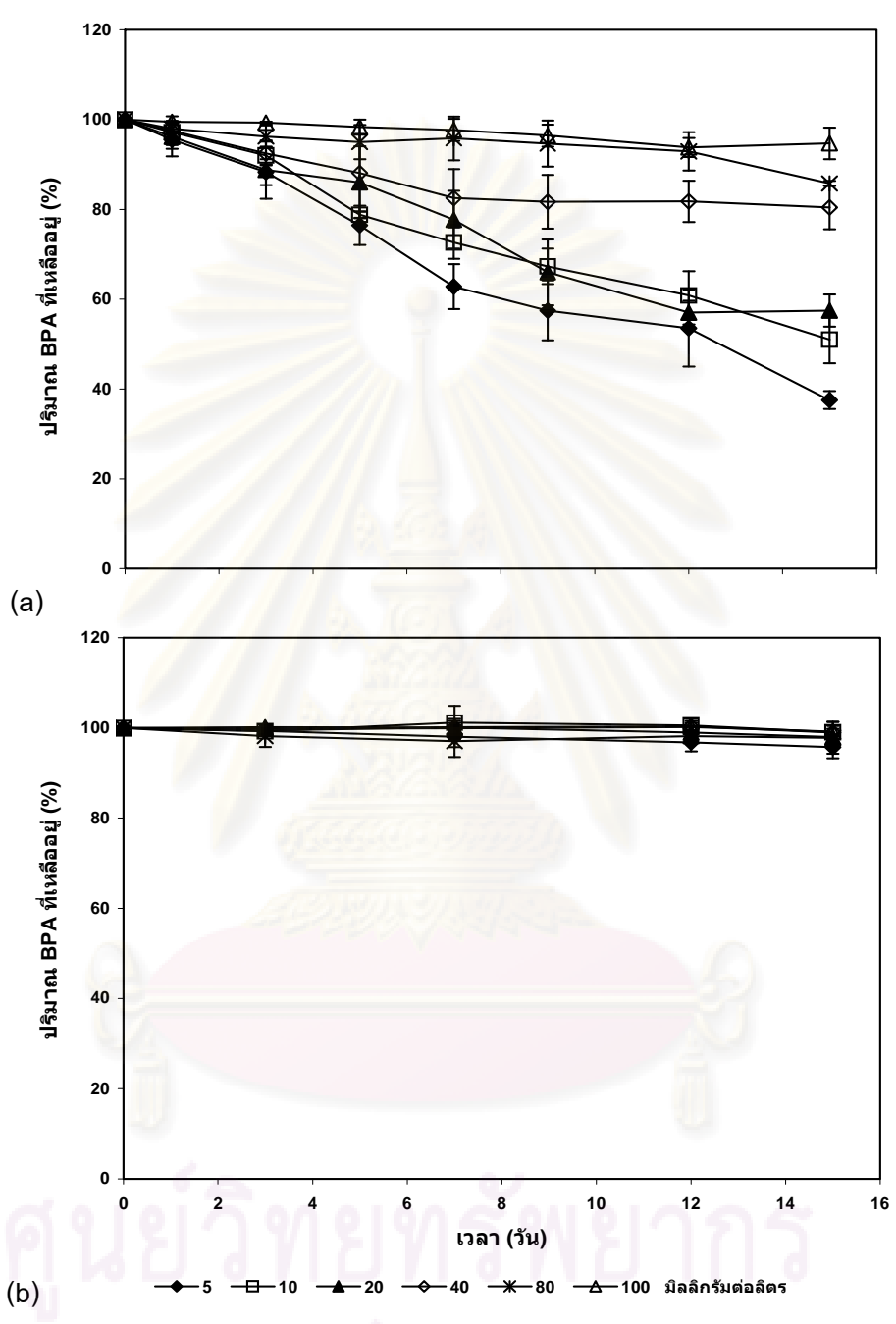
(b) เม็ดเจลอัลจิเนต

รูปที่ 4.15 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ของเซลล์ตรึงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.1% กลูโคสและในเม็ดเจลอัลจิเนต

4.4.3 การย่อยสลาย BPA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 ที่ตรึงในอัลจิเนต ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ไม่เติม 0.1% กลูโคส

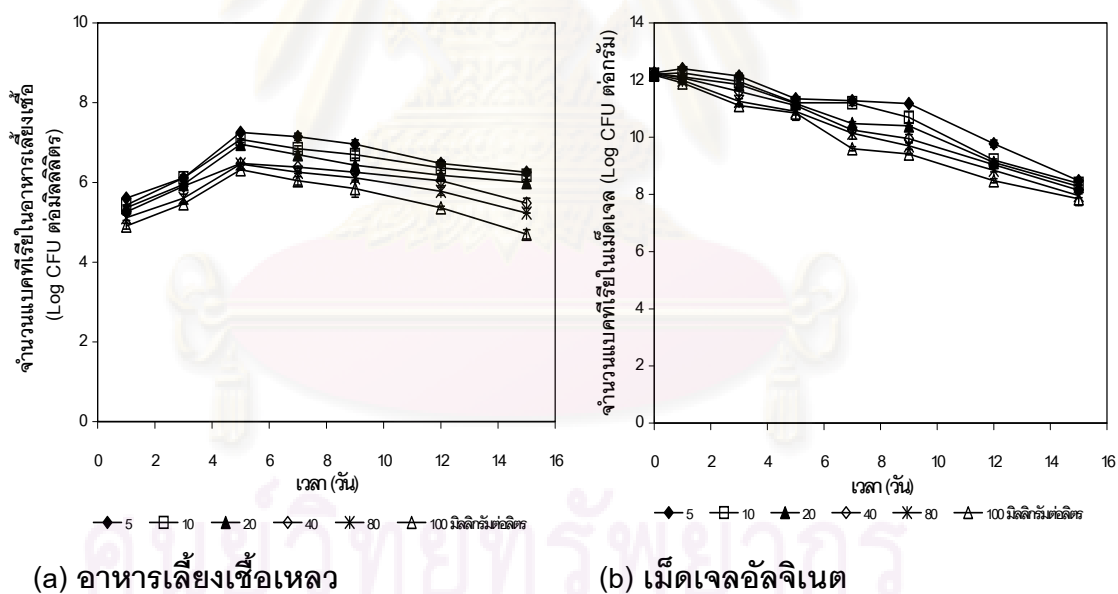
จากการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ของเซลล์ตรึง BPW4 ในเม็ดเจลเจลแลนกัมและเม็ดเจลอัลจิเนต ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% กลูโคส พบว่าเซลล์ตรึงในเม็ดเจลอัลจิเนตสามารถย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นต่างๆ ได้ดีกว่าเซลล์ตรึงในเม็ดเจลเจลแลนกัม ดังนั้นจึงนำเซลล์ตรึงในเม็ดเจลอัลจิเนตมาศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ไม่เติม 0.1% กลูโคส เนื่องจากว่าการบำบัด BPA ที่ปนเปื้อนในพื้นที่จริง การเติมกลูโคสลงไปจะทำให้ค่าใช้จ่ายในการบำบัดมีค่าสูงขึ้น มีความยุ่งยากในการทำและควบคุมได้ยาก

ผลการย่อยสลายพบว่าเซลล์ตรึง BPW4 ในเม็ดเจลอัลจิเนตที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ไม่เติมกลูโคส สามารถย่อยสลาย BPA ได้ดีที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ เซลล์ตรึงสามารถย่อยสลาย BPA ได้มากกว่า 62%, 49% และ 43% ตามลำดับ ในวันที่ 15 ในขณะที่ BPA ความเข้มข้น 40, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์ตรึงย่อยสลาย BPA ได้เพียง 20%, 14% และ 5% ตามลำดับ ในวันที่ 15 (รูปที่ 4.16a) ในขณะที่เดียวกันชุดควบคุมซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM BPA และเม็ดเจลอัลจิเนต แต่ไม่มีเชื้อ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน ที่ความเข้มข้นต่างๆ BPA มีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 4.16b)



รูปที่ 4.16 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (%) ของเซลล์ตรึง (a) และชุดควบคุม (b) ในเม็ด เจลอัลจิเนต ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม 0.1% กลูโคสและ BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร

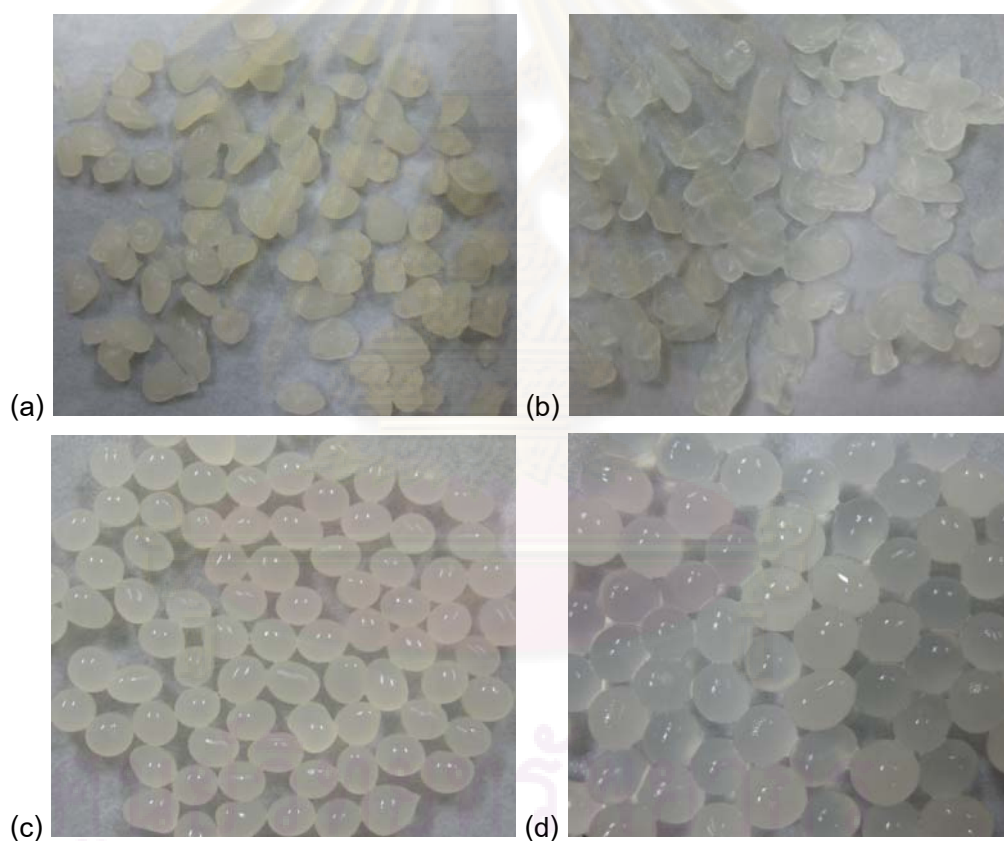
ผลการเจริญของเซลล์ตรึง BPW4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ความเข้มข้น BPA ทั้ง 6 ความเข้มข้น มีค่าเริ่มต้นประมาณ 0 Log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 4.77-6.27 Log CFU ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.17a) ส่วนผลการเจริญของเซลล์ตรึงในเม็ดเจล พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ความเข้มข้น BPA ทั้ง 6 ความเข้มข้น มีค่าเริ่มต้นประมาณ 12 Log CFU ต่อกรัม ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 7.77-9.47 Log CFU ต่อกรัม (รูปที่ 4.17b) จากรูปที่ 4.17a จะเห็นได้ว่าช่วงวันที่ 0 ถึงวันที่ 1 จำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นมากถึง 5 Log CFU ต่อมิลลิลิตร และมีการเจริญสูงสุดในวันที่ 5 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ BPA ที่ลดลง แต่มีจำนวนน้อยกว่าแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคสประมาณ 1 Log CFU ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การเจริญของแบคทีเรียในเม็ดเจล พบว่าทุกความเข้มข้นของ BPA การเจริญของแบคทีเรียมีจำนวนลดลงตั้งแต่วันที่ 0



รูปที่ 4.17 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ของเซลล์ตรึงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม 0.1% กลูโคสและในเม็ดเจลอัลจิเนต

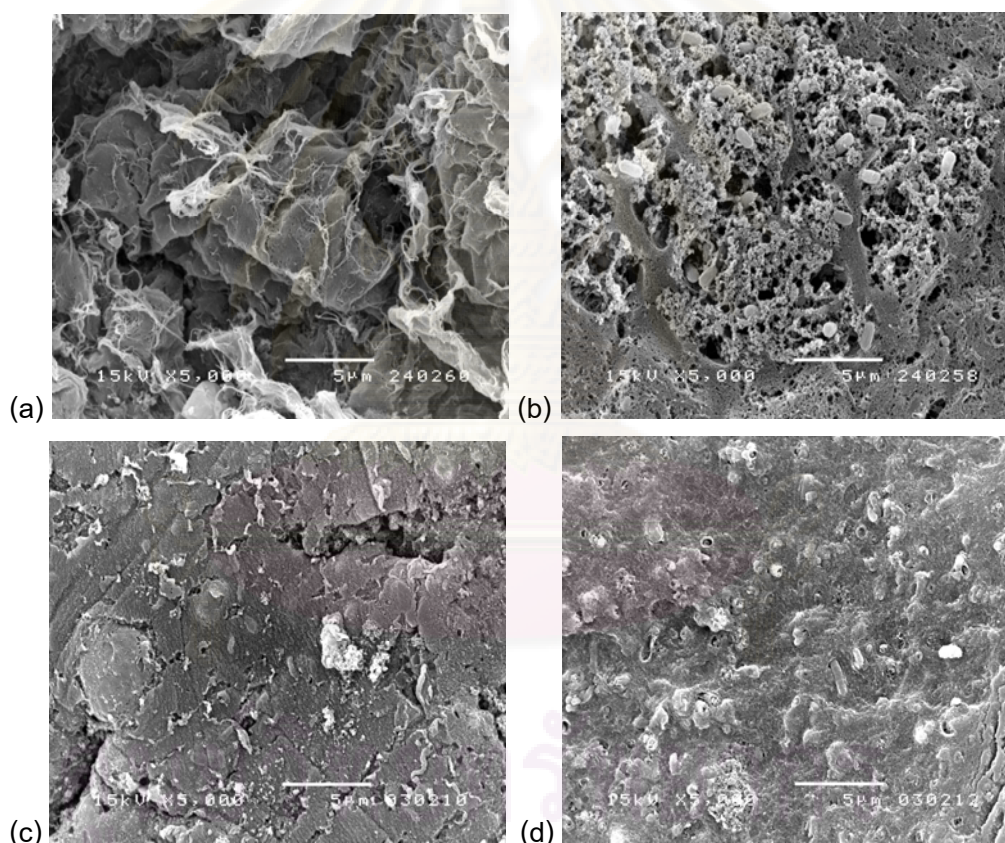
4.4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ตรึงในเม็ดเจลเจลาเลนกันัมและเม็ดเจลอัลจิเนตที่ผ่านการบำบัด BPA

เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ตรึงในเม็ดเจลหลังการบำบัด BPA เป็นเวลา 15 วัน พบว่าเซลล์ตรึงในเม็ดเจลเจลาเลนกันัมมีขนาดเล็กกว่าเดิมจากความหนา 2 มิลลิเมตร เป็น 1 มิลลิเมตร เม็ดเจลินี้มากกว่าเดิม เม็ดเจลบางส่วนแตกเป็นชิ้นเล็กๆ และลักษณะของเม็ดเจลใสขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ตรึงก่อนการบำบัด BPA ดังรูปที่ 4.18a และรูปที่ 4.18b ส่วนเซลล์ตรึงในเม็ดเจลอัลจิเนตมีขนาดใหญ่ขึ้นจาก 3 มิลลิเมตร เป็น 5 มิลลิเมตร เม็ดเจลินี้มากกว่าเดิมเล็กน้อย และลักษณะของเม็ดเจลใสขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ตรึงก่อนการบำบัด BPA ดังรูปที่ 4.18c และรูปที่ 4.18d



รูปที่ 4.18 ลักษณะของเซลล์ตรึงในเม็ดเจลเจลาเลนกันัม (a,b) และเม็ดเจลอัลจิเนต (c,d) ก่อนและหลังบำบัด BPA

การวิเคราะห์ด้วย Scanning Electron Microscopy (SEM) เพื่อดูว่าโครงสร้างของเม็ดเจลและเซลล์จริงว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างไรหลังการบำบัด BPA ปรากฏผลดังรูปที่ 4.189 และรูปที่ 4.19b จากรูปจะเห็นได้ว่าไม่มีแบคทีเรียเกาะอยู่ตามพื้นผิวด้านนอกของเม็ดเจลแลนแกม แบคทีเรียส่วนใหญ่เกาะอยู่ตามรูพรุนและแบคทีเรียมีจำนวนน้อยลงเมื่อเทียบกับแบคทีเรียก่อนการบำบัด BPA ส่วนลักษณะเซลล์จริงในเม็ดเจลอัลจินตพบว่าแบคทีเรียที่ฝังตัวอยู่กับเม็ดเจลมีการหลุดไปบางส่วน (รูปที่ 4.19c และรูปที่ 4.19d) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรียในการทดลองข้อ 4.4.1 และ 4.4.2 ที่พบว่าในวันที่ 15 ของการทดลองแบคทีเรียในเม็ดเจลมีจำนวนลดลง



รูปที่ 4.19 ลักษณะพื้นผิวภายนอกและพื้นผิวภายในของเซลล์จริงในเม็ดเจลแลนแกม (a,b) และเม็ดเจลอัลจินต (c,d) ที่ผ่านการบำบัด BPA เป็นเวลา 15 วันที่กำลังขยาย 5,000 เท่า

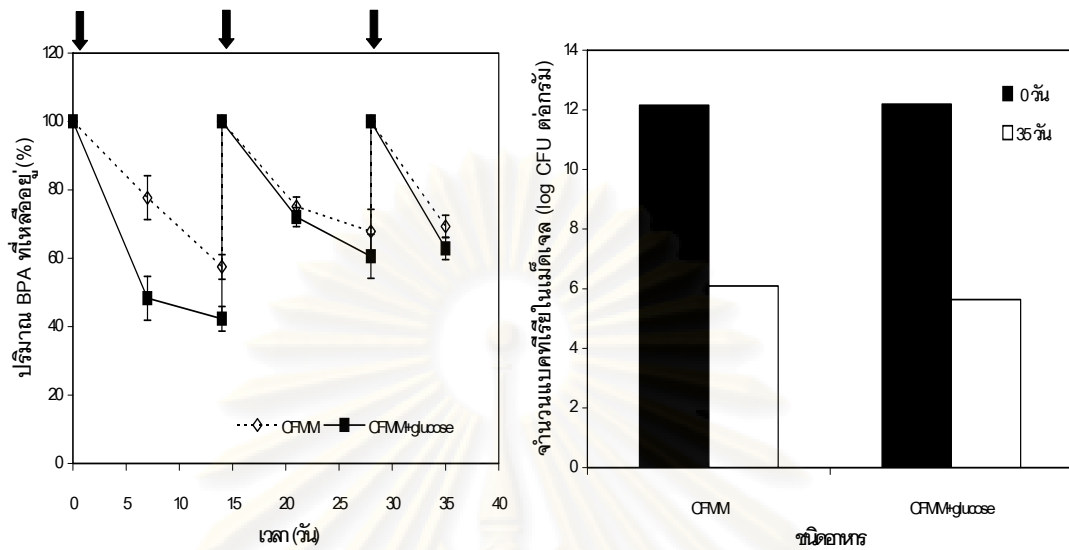
4.5 การศึกษาประสิทธิภาพการนำเซลล์ตรึงมาใช้ย่อยสลาย BPA อย่างต่อเนื่อง และ ความเสถียรของเซลล์ตรึง

4.5.1 การย่อยสลาย BPA อย่างต่อเนื่องของเซลล์ตรึงในเม็ดเจลอัลจิเนต

จากการนำเซลล์ตรึง BPW4 ในเม็ดเจลอัลจิเนตมาใช้ในการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วพบว่าสามารถย่อยสลาย BPA ได้ดีกว่าเซลล์อิสระ และจำนวนแบคทีเรียในเม็ดเจลก็ยังมีจำนวนมากถึง 7-10 Log CFU ต่อกรัม ดังนั้นจึงต้องการทดสอบความสามารถในการใช้เซลล์ตรึงซ้ำ เพื่อดูว่าเซลล์ตรึงสามารถใช้ในการย่อยสลาย BPA ได้อย่างต่อเนื่อง และยังคงมีประสิทธิภาพดีเหมือนเมื่อนำมาใช้เพียงครั้งเดียวหรือไม่

ในขั้นแรกได้เลือกความเข้มข้น BPA มา 1 ความเข้มข้น คือ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นค่อนข้างต่ำและเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายได้ค่อนข้างดี โดยทดสอบในระดับขวดเยาะทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM และที่ไม่เติม 0.1% กลูโคส และในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% กลูโคส ในวันที่ 0 ได้เติม BPA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด พบว่าเซลล์ตรึงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกลูโคส และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส ใช้เวลา 15 วัน ในการย่อยสลาย BPA ได้ประมาณ 43% และ 58% ตามลำดับ จากนั้นเติม BPA ใหม่อีกครั้งให้ได้ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ครั้งนี้เซลล์ตรึงสามารถย่อยสลาย BPA ได้เพียง 32% และ 39% ตามลำดับ และเมื่อเติม BPA ใหม่อีกครั้งให้ได้ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งครั้งนี้เซลล์ตรึงสามารถย่อยสลาย BPA ได้ 31% และ 37% ตามลำดับ ในวันที่ 7 (รูปที่ 4.20a)

ผลการศึกษาการเจริญของเซลล์ตรึงที่ย่อยสลาย BPA อย่างต่อเนื่องทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ไม่เติมกลูโคสและในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมกลูโคส พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในเม็ดเจลมีค่าเริ่มต้นประมาณ 12.16 และ 12.20 Log CFU ต่อกรัม ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 35 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมีจำนวนลดลง ซึ่งมีจำนวนเท่ากับ 6.09 และ 5.64 Log CFU ต่อกรัม ตามลำดับ (รูปที่ 4.20b) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อใช้เซลล์ตรึงในการย่อยสลาย BPA อย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน 35 วัน จำนวนของแบคทีเรียทั้งหมดในเม็ดเจลมีจำนวนลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยลดลงประมาณ 6 Log CFU ต่อกรัม



(a) ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (%)

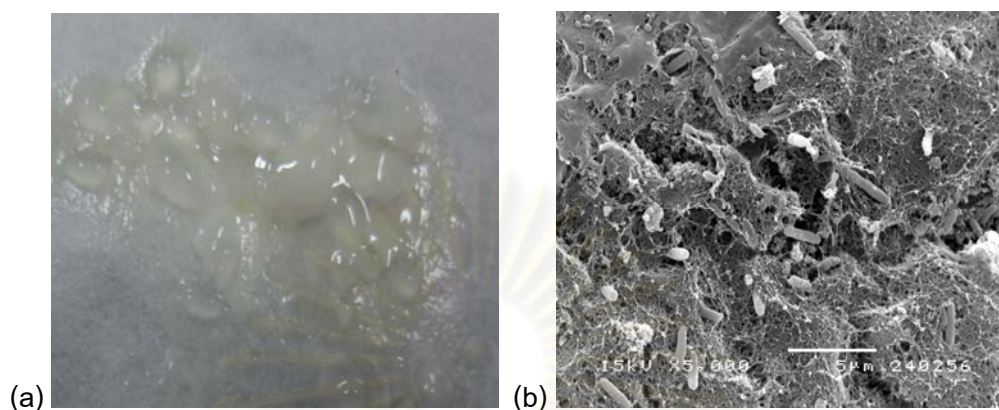
(b) จำนวนแบคทีเรียในเม็ดเจล

รูปที่ 4.20 การนำเซลล์ตรึงในเม็ดเจลอัลจิเนตมาใช้ในการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างต่อเนื่อง ลูกศรแสดงการเติม BPA ให้ได้ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.5.2 การศึกษาความเสถียรของเซลล์ตรึงเมื่อนำมาใช้ย่อยสลาย BPA อย่างต่อเนื่อง

จากผลการทดสอบการใช้เซลล์ตรึงซ้ำอย่างต่อเนื่องของเซลล์ตรึง BPW4 ในเม็ดเจลอัลจิเนต ผลปรากฏว่าเซลล์ตรึงสามารถทำงานได้อย่างต่อเนื่องเป็นเวลาถึง 35 วัน แต่ไม่ได้ทำการศึกษาต่อเนื่องจากว่าเม็ดเจลส่วนใหญ่มีขนาดเล็กน้อยกว่าเดิมมาก บางส่วนก็แตกตัวจนหมด และเม็ดเจลมีลักษณะใสกว่าก่อนบ่มมาก ดังรูปที่ 4.21a จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึงในเม็ดเจลอัลจิเนตมีประสิทธิภาพในการเอามาใช้ซ้ำได้อย่างต่อเนื่องและมีความเสถียรพอสมควร

เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเม็ดเจลอัลจิเนตและเซลล์ตรึง BPW4 ในเม็ดเจลอัลจิเนตที่ใช้บำบัด BPA อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 35 วัน โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ Scanning Electron Microscopy (SEM) พบว่าโครงสร้างของเม็ดเจลมีรูพรุนมากกว่าเดิม ซึ่งส่งผลให้เซลล์บางส่วนที่เกาะบนพื้นผิวภายนอกและรูพรุนของเม็ดเจลหลุดออกจากเม็ดเจล ดังรูปที่ 4.21b ซึ่งเซลล์ตรึงนี้ยังสามารถทำหน้าที่ในการย่อยสลาย BPA ได้อย่างต่อเนื่องแต่มีประสิทธิภาพไม่ดีเท่ากับนำมาใช้บำบัด BPA เป็นเวลา 15 วัน



รูปที่ 4.21 ลักษณะของเม็ดเจลาอัลจิเนต (a) และเซลล์ตรึงในเม็ดเจลาอัลจิเนตที่กำลังขยาย 5,000 เท่า (b) เมื่อใช้บำบัด BPA อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 35 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง

5.1 ผลของสารอาหารที่มีต่อการย่อยสลาย BPA

จากการศึกษาสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับเสริมต่อการย่อยสลาย BPA โดยแบคทีเรียแต่ละชนิด พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมสารอาหารทั้ง 3 ชนิด สามารถย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ดีกว่าเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ไม่เติมสารอาหาร คือ สามารถย่อยสลาย BPA ได้ตั้งแต่ 30-67% เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ไม่เติมสารอาหารนั้น แบคทีเรียทุกชนิดย่อยสลาย BPA ได้น้อยมากหรือไม่มีการย่อยสลายเลย ดังตารางที่ 5.1 และชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อ พบว่า BPA ถูกย่อยสลายได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งน่าจะเกิดจากกระบวนการทางกายภาพ เช่น เกิดจากการย่อยสลายโดยแสงในธรรมชาติ เป็นต้น จากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Sakai และคณะ (2007) ซึ่งศึกษาการย่อยสลาย BPA ของ *Sphingomonas* sp. BP-7 และพบว่าการเติมสารอาหาร เช่น 0.1% เปปโตเนน 0.1% กลูโคส และ 0.05% สารสกัดจากยีสต์ เป็นต้น จะทำให้ *Sphingomonas* sp. BP-7 มีประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ดีกว่าการไม่เติมสารอาหารเหล่านี้ อย่างไรก็ตาม Sakai และคณะ (2007) ไม่ได้รายงานว่า 0.1% เปปโตเนน 0.1% กลูโคส และ 0.1% สารสกัดจากยีสต์ ทำหน้าที่อย่างไรในการช่วยให้การย่อยสลาย BPA เป็นไปได้ดีขึ้น จึงต้องทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

จากรูปที่ 4.2a – 4.2d และรูปที่ 4.4a -4.4b จะเห็นว่าแบคทีเรียทุกชนิดมีการเจริญดีที่สุดในวันที่ 1 และหลังจากนั้นการเจริญของแบคทีเรียลดลง แต่การย่อยสลาย BPA ยังคงเกิดขึ้นได้เนื่องจากแบคทีเรียสามารถใช้สารอาหารทั้ง 3 ชนิด ที่เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อ เพื่อเสริมเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญได้ ส่วนสาเหตุที่การเจริญของแบคทีเรียลดลงหลังวันที่ 1 เพราะว่าความเข้มข้นของกลูโคสที่ใส่ลงไปเพียงแค่ 0.1% ดังนั้นแบคทีเรียจึงอาจใช้กลูโคสหมดตั้งแต่วันที่ 1 แต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสมากขึ้นเป็น 1-4% แบคทีเรียจะใช้กลูโคสแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้มากขึ้นและเจริญมากกว่าการเติมกลูโคสเพียง 0.1% แต่อาจไม่ช่วยให้การย่อยสลาย BPA ดีขึ้น เพราะว่าแบคทีเรียจะย่อยสลายกลูโคสแทน BPA นอกจากนี้

แบคทีเรียยังสามารถใช้ BPA เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญได้เช่นกัน แต่ใช้ BPA ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งผลการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมสารอาหารนั้น พบว่าแบคทีเรียแต่ละชนิดย่อยสลาย BPA ได้น้อยมาก หรือ BPA ไม่ได้มีผลในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย แต่อาจช่วยในการชักนำการสร้างเอนไซม์สำหรับย่อยสลาย BPA

ตารางที่ 5.1 เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย BPA หลังบ่มด้วยแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารอาหารเป็นเวลา 7 วัน

สายพันธุ์ แบคทีเรีย	ชนิดสารอาหาร			
	ไม่เติม	0.1% เปปโตน	0.1% กลูโคส	0.1% สารสกัด จากยีสต์
ไม่มี	1%±2	9%±3	7%±1	9%±7
NP3	9%±1	37%±4	43%±1	46%±6
BPR1	0%	58%±4	61%±2	37%±3
BPW4	3%±0	65%±4	66%±2	65%±7
BPW5	4%±5	43%±4	43%±5	48%±2
P2	0%	NA	51%±3	NA

*หมายเหตุ NA หมายถึง Not applicable

จากตารางที่ 5.1 จะเห็นได้ว่าการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแบคทีเรียทุกชนิดเกิดขึ้นได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% กลูโคส และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารอาหารแต่ละชนิด พบว่าแบคทีเรียทุกชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% กลูโคส เจริญดีกว่าเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติม 0.1% เปปโตน และ 0.1% สารสกัดจากยีสต์ เนื่องจากกลูโคสเป็นสารอาหารที่

มีสูตรโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อน แบคทีเรียจึงนำกลูโคสไปใช้ได้ง่ายและสิ่งมีชีวิตทุกชนิดใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญ ดังนั้นการเติม 0.1% กลูโคส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM จึงเป็นสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับเสริมต่อการย่อยสลาย BPA

5.2 ชนิดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย BPA

จากผลการทดลองข้อ 4.1 และข้อ 4.2 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 สามารถย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น และสามารถย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารอาหารทั้ง 3 ชนิด ได้ดี ดังตารางที่ 5.1 นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ค่อนข้างดี และย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 40, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้เล็กน้อย เนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 เป็นแบคทีเรียชนิด *Bacillus cereus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้ ทำให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี เช่น บริเวณที่มีการปนเปื้อนสารเคมีอันตราย เมื่อแบคทีเรียทนต่อสารเคมีอันตรายได้ดี อาจทำให้แบคทีเรียมีการปรับตัวและสามารถย่อยสลายสารเคมีอันตรายได้เช่นกัน (Crawford, 1975; Setlow, 1995) นอกจากนี้แบคทีเรียชนิดนี้ได้คัดแยกจากดินโดยวิธี enrichment ด้วย BPA จึงทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 มีการปรับตัวต่อ BPA ได้ดี ซึ่งส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย BPA ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 เป็นแบคทีเรียชนิด *Sphingobium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีส่วนของเซลล์เมมเบรนส่วนนอก (outer membrane) ซึ่งเซลล์เมมเบรนส่วนนอกนี้มีไฮดรอกซิล เช่น แมกนีเซียมไฮดรอกซิล และแคลเซียมไฮดรอกซิล ที่เป็นส่วนทำให้ทนต่อสารเคมีอันตรายได้ดีขึ้น นอกจากนี้ cell surface ของแบคทีเรียชนิดนี้มีความไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่น และที่เมมเบรนส่วนนอกมี glycosphingolipids เป็นส่วนประกอบ ซึ่งส่วนนี้แบคทีเรียชนิดอื่นไม่มี องค์ประกอบต่างๆ นี้ มีรายงานว่าทำให้แบคทีเรียในจินตน์สามารถย่อยสลายสารที่มีความไม่ชอบน้ำได้ดี (Kawahara และคณะ, 1999; Johnsen และ Karlson, 2004) ซึ่ง BPA ก็เป็นสารที่มีความไม่ชอบน้ำ ดังนั้นทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์ P2 สามารถย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ค่อนข้างดี แต่แบคทีเรียสายพันธุ์ P2 ย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นสูงกว่า 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้น้อยกว่า 10% ซึ่งสาเหตุที่แบคทีเรียสายพันธุ์ P2 มี

ประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ได้น้อยกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 อาจเนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 ไม่ได้คัดแยกเชื้อโดยวิธี enrichment ด้วย BPA แบบแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4

แม้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 และ P2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย BPA ได้ดี แต่พบว่าการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดลดลงหลังจากการย่อยสลาย BPA จึงคาดว่า BPA หรือผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายของ BPA น่าจะมีพิษต่อแบคทีเรีย ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลาย BPA ในงานวิจัยนี้คือ กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก จากรูปที่ 4.6 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก แสดงว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 สามารถใช้กรดไฮดรอกซีเบนโซอิกเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ แต่ที่มีการสะสมของสารนี้เมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน (รูปที่ 4.5) อาจเนื่องจากความเป็นพิษของ BPA ที่มีต่อแบคทีเรีย ซึ่งพบว่าแบคทีเรียมีจำนวนลดลงเมื่อเวลาผ่านไป จึงไม่สามารถย่อยสลายกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกต่อได้ นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียอีกหลายชนิดที่สามารถย่อยสลายกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกได้เช่นเดียวกัน เช่น แบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ MV1, *Sphingobium* sp. สายพันธุ์ BP-7 และ *Achromobacter xylosoxidans* สายพันธุ์ B-16 ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้ย่อยสลายกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกในภาวะที่มีออกซิเจน และใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญ (Sakai และคณะ, 2007; Spivack และคณะ, 1994; Zhang และคณะ, 2007) ส่วน *Enterobacter cloacae* EM ย่อยสลายกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยมีเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสทำให้ได้ฟีนอล (Valkova และคณะ, 2001)

ดังนั้นงานวิจัยนี้คาดว่าความเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดลดลง เนื่องจากความเป็นพิษของ BPA ซึ่งอาจเกิดจากลักษณะของ BPA ที่ประกอบด้วยฟีนอล 2 วง จึงอาจก่อพิษต่อแบคทีเรียได้เช่นเดียวกับฟีนอล โดยทั่วไปฟีนอลทำให้แบคทีเรียสูญเสียความสมบูรณ์ของเยื่อเซลล์ ทำให้เซลล์เมมเบรน ปลดปล่อยโพแทสเซียมไอออนและ ATP ออกมา และรบกวนการทำงานของ membrane barrier รวมทั้งยับยั้งการทำงานของ membrane protein จึงส่งผลให้แบคทีเรียตาย (Keweloh และคณะ, 1990 และ Heipieper และคณะ, 1992, Unell และคณะ, 2007) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่มีการศึกษาก่อนหน้า เช่น งานวิจัยของ Zhang และคณะ (2007) ที่ได้ศึกษาการย่อยสลาย BPA โดย *Achromobacter xylosoxidans* B-16 พบว่า BPA ที่ความเข้มข้นสูง (50 มิลลิกรัมต่อลิตร) จะส่งผลให้ยับยั้งการเจริญของ *Achromobacter*

xylosoxidans B-16 เนื่องจากความเป็นพิษของ BPA เพิ่มมากขึ้น ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ลดลง และงานวิจัยของ Yamanaka และคณะ (2008) ที่พบว่าการเจริญของ *Sphingomonas* sp. BP-7 ถูกยับยั้งด้วยความเป็นพิษของ BPA ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถทนต่อ BPA ได้แตกต่างกัน

5.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ของเซลล์ตรึง

จากการย่อยสลาย BPA โดยแบคทีเรีย *Bacillus cereus* BPW4 แบบเซลล์อิสระ พบว่า BPA มีความเป็นพิษต่อแบคทีเรีย โดยเฉพาะ BPA ความเข้มข้นสูงทำให้การเจริญของแบคทีเรียลดลงมาก และส่งผลให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายเกิดได้ไม่ดี ดังนั้นจึงได้ตรึงเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus cereus* BPW4 ในวัสดุตรึงพอลิเมอร์ธรรมชาติ 2 ชนิด คือ เจลแลนแกมและอัลจิเนต เนื่องจากวัสดุตรึงทั้ง 2 ชนิดนี้มีรูพรุนมาก จึงคาดว่าจะส่งผ่านสารได้ค่อนข้างดี

5.3.1 ลักษณะและสมบัติของเม็ดเจล

เมื่อวัดขนาดของเม็ดเจลที่สังเคราะห์ได้ในงานวิจัยนี้ พบว่าเม็ดเจลเจลแลนแกมมีขนาดใหญ่กว่าเม็ดเจลในงานวิจัยของ Wang และคณะ (2007) ที่มีขนาด 2.57x2.57x2.57 ลูกบาศก์มิลลิเมตรต่อก้อน ส่วนเม็ดเจลอัลจิเนตมีขนาดเท่ากับเม็ดเจลในงานวิจัยของ Choraอ และคณะ (2009) แต่มีขนาดใหญ่กว่าเม็ดเจลในงานวิจัยของ Tsen และคณะ (2003) และ Kiyono และคณะ (2007) ที่มีขนาด 2.6x2.6x2.6 - 2.7x2.7x2.7 ลูกบาศก์มิลลิเมตรต่อก้อน เม็ดเจลทั้ง 2 ชนิด ไม่มีการแตกของเม็ดเจลเมื่อสังเคราะห์เสร็จ ในขณะที่งานวิจัยของ Wang และคณะ (2007) ที่ศึกษาการตรึง *Sphingomonas* sp. XLDN2-5 ในเจลแลนแกมและอัลจิเนตเพื่อใช้ในการย่อยสลายสารคาร์บาซอล (carbazole) พบว่าเม็ดเจลอัลจิเนตมีการแตก 100% ในขณะที่เม็ดเจลเจลแลนแกมไม่มีการแตกของเม็ดเจล ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารละลายอัลจิเนตที่ใช้ในตรึงเซลล์ต่างกัน โดยในงานวิจัยนี้ได้ใช้สารละลายอัลจิเนตความเข้มข้น 4% ในขณะที่งานวิจัยของ Wang และคณะ ใช้สารละลายอัลจิเนตความเข้มข้น 3% และเมื่อทดสอบการดูดซับ พบว่าเม็ดเจลทั้ง 2 ชนิดดูดซับ BPA ได้เล็กน้อย ซึ่งถ้าเม็ดเจลดูดซับ BPA จะทำให้แบคทีเรียที่ถูกตรึงสามารถนำ BPA ไปใช้ได้ง่าย แล้วส่งผลให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายเกิดได้ดีขึ้น

5.3.2 การตรวจสอบการย่อยสลาย BPA ของเซลล์ตรึง

เมื่อนำเซลล์ตรึง BPW4 มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส พบว่าเซลล์ตรึงในเม็ดเจลเจลแลนกัมย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้น้อยกว่าเซลล์อิสระ BPW4 (รูปที่ 4.12a) อาจเนื่องมาจากความเข้มข้น BPA น้อยเกินไป BPA จึงเข้าสู่ภายในเม็ดเจลได้น้อย ทำให้แบคทีเรียที่อยู่ภายในเม็ดเจลด่อยสลาย BPA ได้น้อย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang และคณะ (2007) ที่กล่าวว่า การตรึงเซลล์แบบวิธีกักขังจะมีผลในเรื่องการส่งผ่านสารเข้าสู่ภายในเม็ดเจล นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของสารละลายอัลจินเตที่ใช้ในการสังเคราะห์เม็ดเจล ก็มีผลต่อการส่งผ่านสารเข้าสู่ภายในเม็ดเจล โดยพบว่าความเข้มข้นของสารละลายอัลจินเตยิ่งมากจะทำให้ลดการส่งผ่านสาร ซึ่งงานวิจัยของ Idris และ Suzana, 2006 และงานวิจัยของ Tao และคณะ, 2009 กล่าวว่าใช้สารละลายอัลจินเตความเข้มข้น 2% ในการสังเคราะห์เม็ดเจลเป็นความเข้มข้นที่ทำให้การส่งผ่านสารเข้าสู่ภายในเม็ดเจลได้ดีที่สุด เนื่องจากในเม็ดเจลมีความหนาแน่นน้อยทำให้การส่งผ่านสารเกิดขึ้นได้ดี ในขณะที่เซลล์ตรึงนี้สามารถย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นสูงกว่า 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ดีกว่าเซลล์อิสระ เนื่องจากแบคทีเรียฝังอยู่ตัวภายในเม็ดเจล ซึ่งเม็ดเจลเป็นส่วนที่ปกป้องความเป็นพิษของ BPA ทำให้แบคทีเรียสามารถที่จะอยู่รอดและเกิดการย่อยสลาย BPA ได้ดีกว่าเซลล์อิสระ ส่วนการย่อยสลาย BPA ของเซลล์ตรึงในเม็ดเจลอัลจินเต พบว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลาย BPA ทั้ง 6 ความเข้มข้นได้ดีกว่าเซลล์อิสระประมาณ 17-50% เนื่องจากอัลจินเตได้ปกป้องแบคทีเรียจากความเป็นพิษของ BPA เช่นเดียวกับเจลแลนกัม และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นต่างๆ ระหว่างเซลล์ตรึงในเม็ดเจลเจลแลนกัมและเซลล์ตรึงในเม็ดเจลอัลจินเตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส พบว่าเซลล์ตรึงในเม็ดเจลอัลจินเตมีประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ดีกว่าเซลล์ตรึงในเม็ดเจลเจลแลนกัม โดยเซลล์ตรึงในเม็ดเจลอัลจินเตสามารถย่อยสลาย BPA ได้ดีกว่าเซลล์ตรึงในเม็ดเจลเจลแลนกัมประมาณ 30-60% เนื่องจากจำนวนแบคทีเรียของเซลล์ตรึงในเม็ดเจลอัลจินเตที่อยู่ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อและเม็ดเจล ในการทดลองวันที่ 15 มีมากกว่าจำนวนแบคทีเรียของเซลล์ตรึงในเม็ดเจลเจลแลนกัม ประมาณ 0.5 Log CFU ต่อมิลลิลิตร และ 2 Log CFU ต่อกรัม ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากอัลจินเตสามารถปกป้องแบคทีเรียจากความเป็นพิษของ BPA ได้ดีกว่าเจลแลนกัม จากการศึกษาได้เรียงลำดับการย่อย

สลาย BPA ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคสจากน้อยไปมาก คือ เซลล์อิสระ < เซลล์ตรึงในเม็ดเจล เจลแลนแกม < เซลล์ตรึงในเม็ดเจลอัลจิเนต

สำหรับการเจริญของแบคทีเรียทั้งในเม็ดเจลแลนแกมและในเม็ดเจลอัลจิเนตช่วงวันที่ 0 ถึงวันที่ 1 เพิ่มขึ้นมากถึง 5-6 Log CFU ต่อมิลลิลิตร เนื่องจากว่าลักษณะพื้นผิวของเม็ดเจลทั้ง 2 ชนิดมีรูพรุนมาก ทำให้แบคทีเรียมีโอกาสหลุดออกจากเม็ดเจลได้เมื่อเขย่า (รูปที่ 4.8a-1 และรูปที่ 4.8c-1) การเจริญของแบคทีเรียในเม็ดเจลแลนแกมในอาหารเลี้ยงเชื้อดีที่สุดในวันที่ 9 (รูปที่ 4.13a) ส่วนการเจริญของแบคทีเรียในเม็ดเจลอัลจิเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อดีที่สุดในวันที่ 7 (รูปที่ 4.15a) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ BPA ที่ลดลง แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสามารถย่อยสลาย BPA โดยใช้ทั้ง BPA และกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญ นอกจากนี้จำนวนของแบคทีเรียที่เพิ่มมากขึ้นอาจมาจากแบคทีเรียหลุดออกจากเม็ดเจลเพิ่มมากขึ้น สำหรับการเจริญของแบคทีเรียในเม็ดเจลแลนแกมลดลงตั้งแต่วันที่ 0 สำหรับทุกความเข้มข้นของ BPA (รูปที่ 4.13b) ในขณะที่การเจริญของแบคทีเรียในเม็ดเจลอัลจิเนต ที่ BPA ความเข้มข้นตั้งแต่ 5-40 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มขึ้นในวันที่ 1 และค่อยๆ ลดลงหลังจากนั้น ส่วน BPA ความเข้มข้น 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร การเจริญของแบคทีเรียในเม็ดเจลลดลงตั้งแต่วันที่ 0 (รูปที่ 4.15b) เมื่อศึกษาลักษณะของเม็ดเจลทั้ง 2 ชนิด พบว่าไส้ขึ้นเมื่อเทียบกับเม็ดเจลก่อนการบำบัด BPA (รูปที่ 4.18b และรูปที่ 4.18d) และเมื่อส่องเม็ดเจลด้วย SEM ก็พบว่าแบคทีเรียที่เกาะอยู่กับเม็ดเจลมีจำนวนลดลง อาจเนื่องจากแบคทีเรียตายหรือหลุดออกจากเม็ดเจล (รูปที่ 4.19b และรูปที่ 4.19d)

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นต่างๆ ของเซลล์ตรึงในเม็ดเจลอัลจิเนตทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคสและไม่เติมกลูโคส พบว่าการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นต่างๆ ของเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส มีประสิทธิภาพดีกว่าเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกลูโคส (รูปที่ 4.14a และ รูปที่ 4.16a) ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของเซลล์ตรึง ที่พบว่าการเจริญของเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคสดีกว่าการเจริญของเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกลูโคส และสอดคล้องกับการย่อยสลาย BPA ของเซลล์อิสระที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส (รูปที่ 4.3a) จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการย่อยสลาย BPA ของเซลล์ตรึงจำเป็นต้องเติมกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เพื่อ

เสริมให้มีการย่อยสลาย BPA ดีขึ้น เนื่องจากว่ากลูโคสที่เติมลงไป แบคทีเรียสามารถนำไปใช้เพื่อเสริมเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญได้

5.3.3 การนำเซลล์ตรึงมาใช้ย่อยสลาย BPA ซ้ำ

เมื่อนำเซลล์ตรึง BPW4 ในเม็ดเจลอัลจิเนตมาใช้ซ้ำทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคสและไม่เติมกลูโคส พบว่าการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ในครั้งที่ 2 มีประสิทธิภาพไม่ดีเท่าครั้งแรก แต่เมื่อเติม BPA ครั้งที่ 3 (รูปที่ 4.20a) พบว่าแบคทีเรียที่ถูตรึงอยู่สามารถปรับตัวกับภาวะแวดล้อมที่มี BPA ได้ จึงทำให้ใช้เวลาน้อยลงในการย่อยสลาย BPA แต่การปรับตัวจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ จากผลการทดลองที่ได้จะเห็นว่าเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคสและไม่เติมกลูโคสพบว่ามีประสิทธิภาพใกล้เคียงกันเนื่องจากว่างานวิจัยนี้ได้เติมกลูโคสเพียงครั้งเดียว และผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึงในเม็ดเจลอัลจิเนตมีประสิทธิภาพในการเอามาใช้ซ้ำได้ และมีความเสถียรพอสมควร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mukerjee-Dhar และคณะ (1998) ที่ใช้ *Rhodococcus opacus* TSP203 ตรึงในอัลจิเนต ย่อยสลาย Kaneclor 300, Kaneclor 400 และ Kaneclor 500 พบว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลาย Kaneclor 300, Kaneclor 400 และ Kaneclor 500 ได้อย่างต่อเนื่องจำนวน 3 ครั้ง ทั้งนี้ความเสถียรของเม็ดเจลอัลจิเนตขึ้นกับความเข้มข้นของสารละลายอัลจิเนตที่ใช้ในการสังเคราะห์ จากการศึกษาท่อนำพบว่าความเข้มข้นของสารละลายอัลจิเนต 3% และ 4% เป็นความเข้มข้นที่ทำให้เม็ดเจลมีความเสถียรมากที่สุด (Tao และคณะ, 2009) ขนาดของเม็ดเจล และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีผลต่อความเสถียรของเม็ดเจลเช่นกัน ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีฟอสเฟต เลคเตรต และซีเตรต ซึ่งเป็น chelating agents จะทำให้ลดความเสถียรของเม็ดเจล เนื่องจากสารทั้ง 3 ชนิดนี้ จะไปจับกับแคลเซียมไอออนได้ดี นอกจากนี้ถ้ามีไฮเดียมไอออนหรือแมกนีเซียมไอออนความเข้มข้นสูง ก็จะทำให้เม็ดเจลมีความเสถียรลดน้อยลงเช่นกัน (Smidsrod และ Skjak-Braek, 1990; Idris และ Suzana, 2006) มีการรายงานว่าการเติมแคลเซียมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อก็ทำให้เม็ดเจลเสถียรได้ (Mukerjee-Dhar และคณะ, 1998)

ดังนั้นงานวิจัยนี้พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 มีประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น และ 0.1% กลูโคส เป็นสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับเสริมการย่อยสลาย

BPA ของทั้งเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง นอกจากนี้การตรึงแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 ในอัลจิเนต ส่งผลให้ประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้นสูงดีขึ้นกว่าการย่อยสลายของแบคทีเรียแบบเซลล์อิสระ ซึ่งเซลล์ตรึงย่อยสลาย BPA ได้ดีที่ความเข้มข้น 5-20 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากว่าอัลจิเนตน่าจะเป็นส่วนที่ปกป้องแบคทีเรียจากความเป็นพิษของ BPA ได้ เซลล์ตรึงที่ผลิตขึ้นยังสามารถนำมาใช้ซ้ำได้ โดยมีประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ค่อนข้างดีและมีความเสถียรพอสมควร

5.4 ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยต่อไป

1. ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์เม็ดเจล เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์ เช่น ใช้ความเข้มข้นของสารละลายอัลจิเนตที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ขนาดเม็ดเจลที่มีความเสถียรมากกว่าเดิม และให้มีการส่งผ่านของสารดีขึ้น หรือหาระยะเวลาที่ทำให้เม็ดเจลแข็งตัว สำหรับนำไปใช้งานในอนาคต

2. หาวัสดุตรึงที่มีความแข็งแรงมากกว่าเจลแลนกันและอัลจิเนต เช่น ไบโอเซอร์ (biocers) ซึ่งเป็นการใช้ซิลิกาและเซรามิกในการตรึงแบคทีเรียโดยเตรียมผ่านกระบวนการโซล-เจล ซึ่งการเตรียมไบโอเซอร์มีหลายวิธีเพื่อให้เหมาะสมกับการใช้งาน เช่น coated biocer, fiber-reinforced biocers และ freeze-gelation biocers เป็นต้น (Fiedler และคณะ, 2004; Soltmann และคณะ, 2008) หรือใช้วัสดุตรึงชนิดอื่นที่มีความแข็งแรงรวมกับเจลแลนกันหรืออัลจิเนต เช่น ตรึงแบคทีเรียในอัลจิเนตและเคลือบผิวด้วยซิลิกา ซึ่งซิลิกาจะช่วยให้แบคทีเรียไม่หลุดออกจากเม็ดเจลอัลจิเนต โดยส่วนใหญ่อัลจิเนตจะเปราะบางจึงทำให้แบคทีเรียหลุดได้ง่าย (Collone และคณะ, 2008) เมื่อได้วัสดุตรึงที่มีความแข็งแรงทำให้นำกลับมาใช้ซ้ำได้อย่างต่อเนื่องนานกว่า 35 วัน

3. อาจใช้เชื้อผสมระหว่าง *Bacillus cereus* BPW4 และ *Sphingobium* sp. สายพันธุ์ BP-7 หรือ *Achromobacter xylosoxidans* สายพันธุ์ B-16 สำหรับการตรึงเซลล์ ซึ่ง *Sphingobium* sp. สายพันธุ์ BP-7 และ *Achromobacter xylosoxidans* สายพันธุ์ B-16 เป็นแบคทีเรียสามารถย่อยสลายกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกได้ (Sakai และคณะ, 2007; Zhang และคณะ, 2007) เพื่อให้ประสิทธิภาพการย่อยสลาย BPA ดีขึ้น

4. จากงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองในระบบขวดเขย่าเท่านั้น เราควรเพิ่มการทดลองในระบบถังปฏิกรณ์ เพื่อศึกษาและพัฒนาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการย่อยสลาย BPA ต่อไป ซึ่งการปนเปื้อน BPA ในสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากน้ำชะจากหลุมฝังกลบของเสียอันตรายมีความเข้มข้น 17.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (Yamamoto และคณะ, 2001) ในขณะที่เซลล์ตรึงที่ผลิตขึ้นจากงานวิจัยนี้สามารถย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ดี ดังนั้นสามารถนำเซลล์ตรึงที่ผลิตขึ้นมาใช้บำบัด BPA ที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำโดยใช้ระบบถังปฏิกรณ์ โดยทดสอบทั้งในระบบที่ไม่มีกลูโคสและมีกลูโคส โดยระบบที่มีกลูโคสจะเป็นแบบการเติมแบบต่อเนื่อง หรืออาจใช้วัสดุตรึงชนิดอื่นที่มีความแข็งแรงมากกว่าอัลจิเนต เช่น ไบโอะเซอร์ เป็นต้น หรือใช้วิธีการรวมกับอัลจิเนตในการตรึงแบคทีเรีย เพื่อป้องกันไม่ให้แบคทีเรียหลุดออกจากวัสดุตรึงได้ง่าย ส่งผ 82 ประสิทธิภาพการย่อยสลายเกิดขึ้นได้ดี และถ้าใช้วัสดุตรึงที่มีความแข็งแรงก็เหมาะที่จะนำมาใช้บำบัด BPA ได้อย่างต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ (Fiedler และคณะ, 2004; Collone และคณะ, 2008; Soltmann และคณะ, 2008)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

นันทธร เภาราช. 2550. การคัดแยกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่เรี่ยทนต่อตัวทำละลายจากดิน.
โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. วิทยาลัยนิพนธ์ปริญญาบัณฑิต สาขาวิชา
จุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Abubakr, N., Jayemanne, A., Audrey, N., Lin, S.X. and Chen, X.D. 2009. Effects of encapsulation process parameters of calcium alginate beads on vitamin B12 drug release kinetics. Asia-Pacific Journal of Chemical engineering DOI : 10.1002/apj.398.

Alexander, H.C., Dill, D.C., Smith, L.W., Guiney, P.D., Dorn, P.B. and Dorn, P.B. 1988. Bisphenol A: acute aquatic toxicity. Environment Toxicology and Chemistry 7 : 19-26.

Callone, E., Campostrini, R., Carturan, G., Cavazza, A. and Guzzon, R. 2008. Immobilization of yeast and bacteria cells in alginate microbeads coated with silica membranes: procedures, physico-chemical features and bioactivity. Journal of Materials Chemistry 18 : 4839-4848.

Cassidy, M.B., Lee, H. and Trevors, J.T. 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: a Review. Journal of Industrial Microbiology 16 : 79-101.

Cheetham, P.S.J., Blunt, K.W. and Bucke, C. 1980. Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gel. Biotechnology and Bioengineering 21 : 2155-2618.

ChemYQ. Sodium alginate, physical properties, suppliers, CAS, MSDS, structure, molecular. [online]. Available from : <http://www.chemyq.com/En/xz/xz1/529qguvr.htm>. [2010, March, 29].

Chen, J., Huang, X. and Lee, D. 2008. Bisphenol A removal by a membrane bioreactor. Process Biochemistry 43 : 451-456.

- Chorao, C., Charmantray, F., Hoggan, P.B., Sancelme, M., Cincilei, A., Traikia, M., Mailhot, G. and Delort, A.M. 2009. 2-Aminobenzothiazole degradation by free and ca-alginate immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrous*. Chemosphere 75 : 121-128.
- Crawford, R.L. 1975. Degradation of 3-hydroxybenzoate by bacteria of the Genus *Bacillus*. Applied Microbiology 30 : 439-444.
- Dorn, P.B., Chou, C.S. and Gentempo, J.J. 1987. Degradation of bisphenol A in natural waters. Chemosphere 16 : 1501-1507.
- Du, B. 2003. The fate and modeling of environmental disrupting chemicals (EDCs) in a typical sewage treatment plant. Master thesis. University of Tsinghua, Beijing, Chinese.
- Fent, G., Hein, W.J., Moendel, M.J. and Kubiak, R. 2003. Fate of 14C-bisphenol A in soils. Chemosphere 51 : 735-746.
- Fiedler, D., Thron, A., Soltmann, U. and Bottcher, H. 2004. New packing materials for bioreactors based on coated and fiber-reinforced biocers. Chemistry of Materials 16 : 3040-3044.
- Furhacker, M., Scharf, S. and Weber, H. 2004. Bisphenol A: emissions from point sources. Chemosphere 41 : 751-756.
- Ha, J., Engler, C.R. and Wild, J.R. 2009. Biodegradation of coumaphos, chlorferon, and diethylthiophosphate using bacteria immobilized in Ca-alginate gel beads. Bioresource Technology 100 : 1138-1142.
- Heipieper, H. J., Diefenbach, R., and Keweloh, H. 1992. Conversion of cis unsaturated fatty acids to trans, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. Applied and Environmental Microbiology 58 : 1847-1852.
- Hirano, T., Honda, Y., Watanabe, T. and Kuwahara, M. 2000. Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. Bioscience Biotechnology Biochemistry 64 : 1958-1962.

- Hsieh, F.M., Huang, C., Lin, T.F., Chen, Y.M. and Lin, J.C. 2008. Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation. Process Biochemistry 43 : 83-92.
- Idris, A. and Suzana, W. 2006. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. Process Biochemistry 41 : 1117-1123.
- Ike, M., Jin, C.S. and Fujita, M. 1995. Isolation and characterization of a novel bisphenol degrading bacterium *Pseudomonas paucimobilis* strain FJ-4. Japanese Journal of Water Treatment Biology 31 : 203-212.
- Jia, L.Y., Zheng, A.P., Xu, L., Huang, X.D., Zhang, Q. and Yang, F.L. 2008. Isolation and characterization of comprehensive polychlorinated biphenyl degrading bacterium, *Enterobacter* sp. LY402. Journal of Microbiology and Biotechnology 18 : 952-957.
- Johnsen, A.R. and Karlson, U. 2004. Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. Applied Microbiology and Biotechnology 63 : 452-459.
- Kang, J.H., Ri, N. and Kondo, F. 2004. *Streptomyces* sp. strain isolated from river water has high bisphenol A degradability. Letters in Applied Microbiology 39 : 178-180.
- Kang, J.H., and Kondo, F. 2005. Bisphenol A degradation in river water is different from that in seawater. Chemosphere 60 : 1288-1292.
- Kang, J.H., Katayama, Y. and Kondo, F. 2006. Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals. Toxicology 217 : 81-90.
- Kawahara, K., Kuraishi, H. and Zähringer, U. 1999. Chemical structure and function of glycosphingolipids of *Sphingomonas* spp and their distribution among members of the α -4 subclass of Proteobacteria. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 23 : 408-413.
- Kawahata, H., Ohta, H., Inoue, M. and Suzuki, A. 2004. Endocrine disrupter nonylphenol

- and bisphenol A contamination in Okinawa and Ishigaki islands. Japan-within coral reefs and adjacent river mouths. Chemosphere 55 : 1519-1527.
- Keweloh, H. and Heipieper, H.J. 1990. Phenol induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. Applied Microbiology and Biotechnology 33 : 66-71.
- Kiyono, M., Omura, H., Omura, T., Murata, S. and Pan-Hou, H. 2003. Removal of inorganic and organic mercurials by immobilized bacteria having mer-ppk fusion plasmids. Applied Microbiology and Biotechnology 62 : 274-278.
- Klinkenberg, G., Lystad, K.Q., Levine, D.W. and Dyrset, N. 2001. Cell release from alginate immobilized *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* in chitosan and alginate coated beads. Journal of Dairy Science 84 : 1118-1127.
- Kuo, M.S., Mort, A.J. and Dell, A. 1986. Identification and location of L-glycerate, an unusual scyl substituent in gellan gum. Carbohydrate Research 156 : 173-187.
- Lang, I.A., Galloway, T.S. and Scarlett, A. 2008. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. Journal of the American Medical Association 300 : 1303-1310.
- Lazaro, N., Sevilla, A.L., Morales, S. and Marques, A.M. 2003. Heavy metal biosorption by gellan gum gel beads. Water Research 37 : 2118-2126.
- Lee, H.B. and Peart, T.E. 2000. Bisphenol A contamination in Canadian municipal and industrial wastewater and sludge samples. Water Quality Research Journal of Canada 35 : 283-289.
- Lee, S.M., Koo, B.W., Choi, J.W., Choi, D.H., An, B.S., Jeung, E.B. and Choi, I.G. 2005. Degradation of bisphenol A by white rot fungi, *Stereum hirsutum* and *Heterobasidium insulare*, and reduction of its estrogenic activity. Biological & Pharmaceutical Bulletin 28 : 201-207.
- Li, R.H., Altreuter, D.H. and Gentile, F.T. 1996. Transport characterization of hydrogen matrices for cell-encapsulation. Biotechnology and Bioengineering 50 : 365-373.
- Lobos, J.H., Leib, T.K. and Su, T.M. 1992. Biodegradation of bisphenol A and other bisphenols by a gram-negative aerobic bacterium. Applied and

Environmental Microbiology 58 : 1823-1831.

- Lopez, A., Lazaro, N. and Mosbach, A.M. 1997. The interphase technique: a simple method of cell immobilization in gel-beads. Journal of Microbiology Methods 30 : 231-234.
- Manikandan, R., Prabhu, H.J. and Sivashanmugam, P. 2007. Biodegradation of chlorobenzene using immobilized crude extracts in packed bed column. African Journal of Biotechnology 6 : 2259-2266.
- Moritakaa, H., Kimurab, S. and Fukuba, H. 2003. Rheological properties of matrix-particle gellan gum gel: effects of calcium chloride on the matrix. Food Hydrocolloids 17 : 653-660.
- Moslemy, P., Neufeld, R.J. and Guiot, S.R. 2002. Biodegradation of gasoline by gellan gum-encapsulated bacterial cells. Biotechnology and Bioengineering 80 : 175-184.
- Mukerjee-Dhar, G., Shimura, M. and Kimbara, K. 1998. Degradation of polychlorinated biphenyl by cells of *Rhodococcus opacus* strain TSP203 immobilized in alginate and in solution. Enzyme and Microbial Technology 23 : 34-41.
- Neamtu, M. and Frimmel, F.H. 2006. Degradation of endocrine disrupting bisphenol A by 254nm irradiation in different water matrices and effect on yeast cells. Water Research 40 : 3745-3750.
- Norton, S. and Lacroix, C. 1990. Gellan gum gel as entrapment matrix for high temperature process: a rheological study. Biotechnology Techniques 4 : 351-356.
- Ohko, Y., Ando, I., Niwa, C., Tatsuma, T., Yamamura, T., Nakashima, T., Kubota, Y. and Fujishima, A. 2001. Degradation of bisphenol A in water by TiO₂ photocatalyst. Environmental Science & Technology 35 : 2365-2368.
- Omoto, T., Uno, Y. and Asai, I. 1999. The latest technologies for the application of gellan gum. Progress in Colloid and Polymer Science 114 : 123-126.
- Oshiman, K., Tsutsumi, Y., Nishida, T. and Matsumura, Y. 2007. Isolation and

- characterization of a novel bacterium, *Sphingomonas bisphenolicum* strain AO1, that degrades bisphenol A. Biodegradation 18 : 247-255.
- Paje, M.L., Marks, P. and Couperwhite, I. 1998. Degradation of benzene by a *Rhodococcus* sp. using immobilized cell systems. World Journal of Microbiology & Biotechnology 14 : 675-680.
- Rubin, B.S. and Soto, A.M. 2009. Review Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. Molecular and Cellular Endocrinology 304 : 55-62.
- Saiyooda, S., Vangnai, A.S., Thiravetyand, P. and Inthorn, D. 2010. Bisphenol A removal by the *Dracaena* plant and the role of plant-associating bacteria. Journal of Hazardous Materials 178 : 777-785.
- Sakai, K., Yamanaka, H., Moriyoshi, K., Ohmoto, T. and Ohe, T. 2007. Biodegradation of bisphenol A and related compound by *Sphingomonas* sp. strain BP-7 isolated from seawater. Bioscience Biotechnology Biochemistry 71 : 51-57.
- Sanderson, G.R., and Clark, R.C. 1983. Gellan gum: Laboratory-produced microbial polysaccharide has many potential food applications as a gelling, stabilizing, and texturizing agent. Food Technology 37 : 63-70.
- Setlow, P. 1995. Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species. Annual Review of Microbiology 49 : 29-54.
- Smidsrod, O., and Skjak-Bræk, G. 1990. Alginate as an immobilization matrix for cells. Trends in Biotechnology 8 : 71-78.
- Soltmann, U. and Bottcher, H. 2008. Utilization of sol-gel ceramics for the immobilization of living microorganisms. Journal of Sol-Gel Science and Technology 48 : 66-72.
- Spivack, J., Leib, T.K. and Lobos, J.H. 1994. Novel pathway for bacterial metabolism of bisphenol A. The Journal of Biological Chemistry 269 : 7323-7329.
- Staples, C.A., Dom, P.B., Klecka, G.M., O'Blook, S.T. and Harris, L.R. 1998. A review of the environmental fate, effect, and exposures of bisphenol A. Chemosphere 36 : 2149-2173.
- Supaka, N., Pinphanichakarna, P., Pattaragulwanit, K., Thaniyavarna, S., Omori, T. and

- Juntongjin, K. 2001. Isolation and characterization of a phenanthrene-degrading *Sphingomonas* sp. strain P2 and its ability to degrade fluoranthene and pyrene via cometabolism. ScienceAsia 27 : 21-28.
- Takahashi, S., Chi, X.J., Yamaguchi, Y., Suzuki, H., Sugaya, S., Kita, K., Hiroshima, K., Yamamori, H., Ichinose, M. and Suzuki, N. 2001. Mutagenicity of bisphenol A and its suppression by interferon-alpha in human R5a cells. Mutation Research 490 : 199-207.
- Takeuchi, T., Tsutsumi, O., Ikezaki, Y., Takai, Y. and Taketani, Y. 2004. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. Endocrine Journal 51 : 165-169.
- Tao, X.Q., Lu, G.N., Liu, J.P., Li, T. and Yang, L.N. 2009. Rapid degradation of phenanthrene by using *Sphingomonas* sp. GY2B immobilized in calcium alginate gel beads. International Journal of Research Public Health 6 : 2470-2480.
- Tsen, J.H., Lin, Y.P. and King, V.E. 2003. Banana puree fermentation by *Lactobacillus acidophilus* immobilized in ca-alginate. Journal of General and Applied Microbiology 49 : 357-361.
- Tsutsumi, Y., Haneda, T. and Nishida, T. 2001. Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. Chemosphere 42 : 271-276.
- Unell, M., Kabelitz, N., Jansson, J.K. and Heipieper, H.J. 2007. Adaptation of the psychrotroph *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 to growth temperature and the presence of phenols by changes in the anteiso/iso ratio of branched fatty acids. FEMS Microbiology Letters 266 : 138-143.
- Valkova, E., Lepine, F., Valeanu, L., Dupont, M., Labrie, L., Bisailon, J., Beaudet, R., Shareck, F. and Villemur, R. 2001. Hydrolysis of 4-hydroxybenzoic acid esters (parabens) and their aerobic transformation into phenol by the resistant *Enterobacter cloacae* strain EM. Applied and Environmental Microbiology 67 : 2404-2409.

- Veeranagouda, Y., Vijaykumar, M.H., Patil, N.K., Nayak, A.S. and Karegoudar, T.B. 2006. Degradation of 1-butanol by solvent-tolerant *Enterobacter* sp. VKGH12. International Biodeterioration & Biodegradation 57 : 186-189.
- Wang, X., Gai, Z., Yu, B., Feng, J., Xu, C., Yuan, Y., Lin, Z. and Xu, P. 2007. Degradation of carbazole by microbial cells immobilized in magnetic gellan gum gel beads. Applied and Environmental Microbiology 73 : 6421-6428.
- Woodward, J. 1988. Methods of immobilization of microbial cells. Journal of Microbiological Methods 8 : 91-102.
- Yamamoto, T., Yasuhara, A., Shiraishi, H. and Nakasugi, O. 2001. Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates. Chemosphere 42 : 415-418.
- Yamanaka, H., Moriyoshi, K., Ohmoto, T., Ohe, T. and Sakai, K. 2008. Efficient microbial degradation of bisphenol A in the presence of activated carbon. Journal of Bioscience and Bioengineering 105 : 157-160.
- Zhang, C., Zeng, G., Yuan, L., Yu, J., Li, J., Huang, G., Xi, B. and Liu, H. 2007. Aerobic degradation of bisphenol A by *Achromobacter xylosoxidans* strain B-16 isolated from compost leachate of municipal solid waste. Chemosphere 68 : 181-190.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Medium (CFMM)

ก.	แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
	ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเดคะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	5.5	กรัม
	โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8	กรัม
ข.	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01	กรัม
	เฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.005	กรัม
	แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.005	กรัม

ซึ่งสารส่วน ก. ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลายในส่วน ข. ที่ทำการเตรียมแยกแต่ละชนิดและทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรู 0.45 ไมครอนเมตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM (CFMM agar)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเหลว CFMM ละลายผงวุ้น 15 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลาย ก. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้จนได้อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลายในส่วน ข. ที่ปราศจากเชื้อแล้วก่อนนำไปใช้

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM+glucose

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM แต่เพิ่มกลูโคส 1 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM+peptone

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM แต่เพิ่มเปปโตน 1 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM+yeast extract

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM แต่เพิ่มสารสกัดจากยีสต์ 1 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ชั่งแคลเซียมคลอไรด์ 11.102 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 1,000 มิลลิลิตร สุดท้ายจะได้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ หนึ่งชาม่า เชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

ชั่งแคลเซียมคลอไรด์ 22.204 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 1,000 มิลลิลิตร สุดท้ายจะได้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ หนึ่งชาม่า เชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. สารละลายโซเดียมซิติเรต 1%

ชั่งโซเดียมซิติเรต 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร หนึ่งชาม่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. สารละลายเจลแลนกัม 1%

ชั่งเจลแลนกัม 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร หนึ่งชาม่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 4%

ซังโซเดียมอัลจิเนต 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

ซังโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. 70% เอทานอล

ละลายเอทานอลสัมบูรณ์ ปริมาตร 700 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร

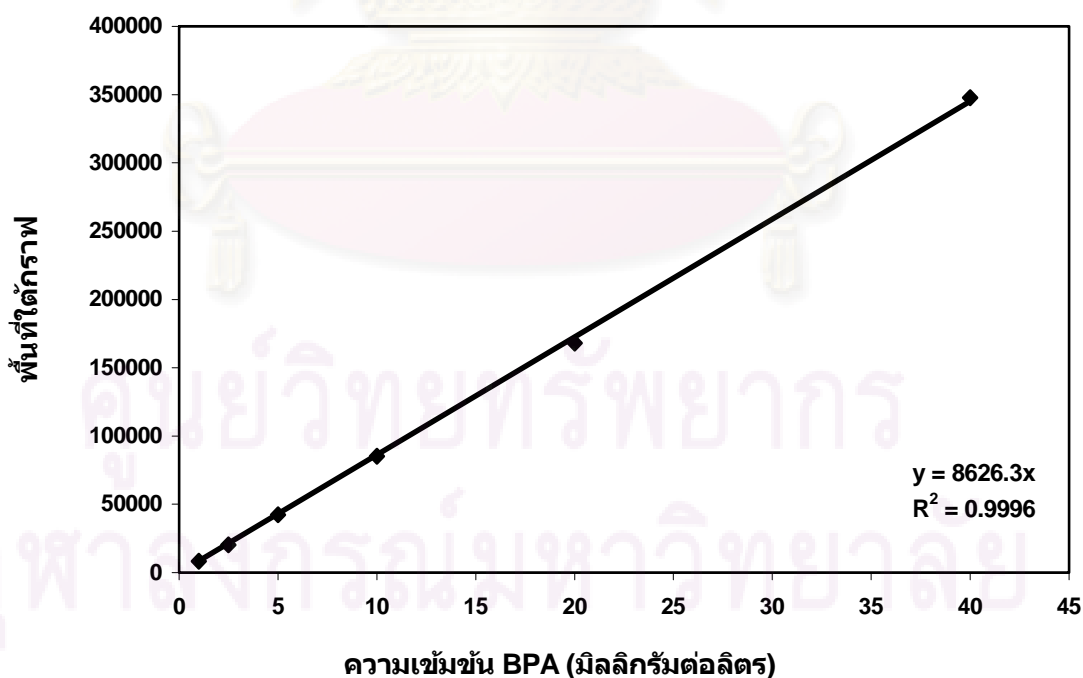
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

ตารางที่ ค.1 ความเข้มข้นของ BPA ที่ความเจือจาง 1,000 เท่า สำหรับเซลล์อิสระ

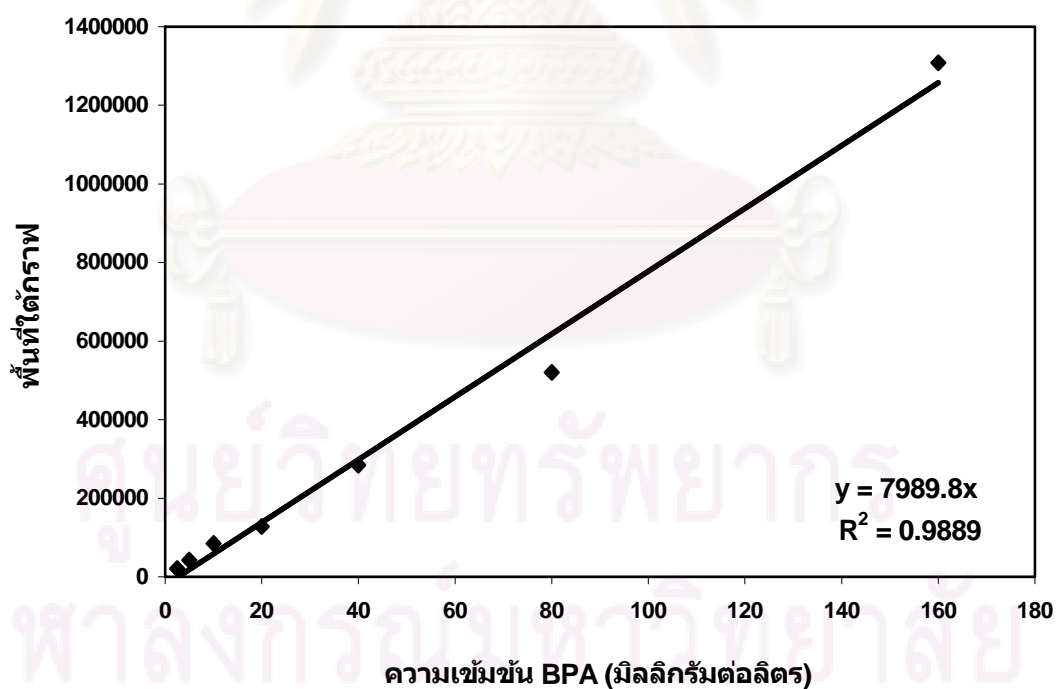
ความเข้มข้น BPA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
1	8417	8143	8275	8278.33	137.03
2.5	20267	20805	20086	20386	373.98
5	42863	42558	41523	42314.67	702.36
10	85165	87572	82885	85207.33	2343.79
20	169116	167016	167972	168034.70	1051.40
40	363673	351660	327907	347746.70	18201.30



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ BPA ที่ความเจือจาง 1,000 เท่า สำหรับ
เซลล์อิสระ

ตารางที่ ค.2 ความเข้มข้นของ BPA ที่ความเจือจาง 1,000 เท่า สำหรับเซลล์ตริงและเซลล์อิสระ

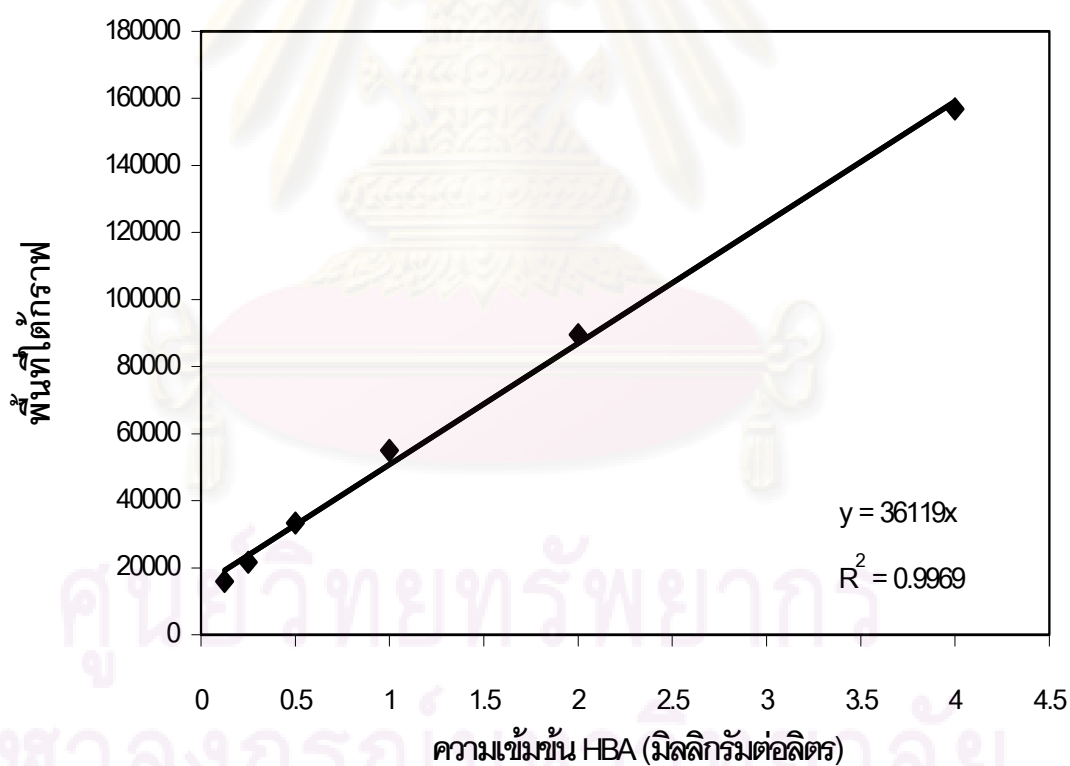
ความเข้มข้น BPA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
2.5	20267	20805	20086	20386	373.98
5	42863	42558	41523	42314.67	702.60
10	85165	85572	82885	84540.67	1448.22
20	126116	126777	130972	127955	2633.62
40	263673	261660	327907	284413.30	37680.07
80	517671	518070	524623	520121.30	3903.66
160	1219890	1325921	1378430	1308080	80761.69



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ BPA ที่ความเจือจาง 1,000 เท่า สำหรับเซลล์ตริงและเซลล์อิสระ

ตารางที่ ค.3 ความเข้มข้นของ HBA

ความเข้มข้น BPA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0.125	15002	15976	16772	15916.67	886.49
0.25	21506	21681	21751	21646	126.19
0.5	33281	33300	33611	33397.33	185.28
1	55010	55046	56022	55028	574.17
2	83552	86801	98071	89474.67	7619.82
4	149011	160544	161234	156929.7	6866.44



รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ HBA

ภาคผนวก ง

ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่

ตารางที่ ง.1 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของชุดควบคุม ในการย่อยสลาย BPA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม สารอาหาร			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเปปโตน		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	4.13	4.17	4.48	0	4.67	5.00	5.54
1	3.90	4.06	4.56	1	4.55	4.61	4.84
3	4.04	4.18	4.43	3	4.52	4.55	4.71
5	4.24	4.41	4.56	5	4.52	4.62	4.65
7	4.08	4.22	4.41	7	4.46	4.53	4.75
เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัด จากยีสต์		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	4.74	5.27	5.28	0	4.62	4.65	5.62
1	4.50	4.90	5.39	1	4.44	4.99	5.46
3	4.17	4.78	5.65	3	4.66	4.95	5.07
5	4.58	4.82	4.98	5	4.40	4.61	5.16
7	4.37	4.87	4.92	7	4.30	4.52	4.66

ศูนย์วิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง.2 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของ *Methylobacterium* sp. NP3 ในการย่อยสลาย BPA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม สารอาหาร			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเปปโติน		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	3.88	4.58	4.76	0	3.79	3.86	5.27
1	3.92	4.24	4.41	1	3.50	3.79	4.05
3	3.98	4.35	4.43	3	3.35	3.57	3.77
5	3.98	4.31	4.45	5	3.03	3.21	3.85
7	4.01	4.22	4.29	7	2.25	3.26	3.44
เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัด จากยีสต์		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	4.30	4.52	4.75	0	4.33	4.37	5.62
1	3.83	3.86	3.98	1	4.19	4.62	4.90
3	2.97	3.60	4.44	3	4.28	4.35	4.62
5	2.38	3.23	3.25	5	3.57	4.29	4.56
7	2.42	2.54	2.79	7	2.39	2.61	2.70

ตารางที่ ง.3 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของ *Enterobacter* sp. BPR1 ในการย่อยสลาย BPA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม สารอาหาร			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเปปโติน		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	4.15	4.80	5.03	0	4.23	4.31	4.53
1	4.89	5.19	5.51	1	4.15	4.28	4.34
3	4.30	4.92	5.86	3	4.02	4.13	4.24
5	4.54	5.22	5.81	5	2.65	3.02	3.26
7	4.58	4.99	5.02	7	1.68	1.70	2.08

เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัด จากยีสต์		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	4.17	4.91	5.16	0	4.50	4.97	5.05
1	4.29	4.34	5.09	1	3.09	4.13	4.16
3	3.30	3.92	4.17	3	3.09	3.41	3.41
5	2.70	2.75	2.75	5	3.11	3.36	3.42
7	1.71	1.84	1.93	7	2.98	3.01	3.13

ตารางที่ ง.4 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของ *Bacillus cereus* BPW4 ใน การย่อยสลาย BPA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม สารอาหาร			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเปปโตน		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	4.52	5.21	5.22	0	4.82	5.03	5.28
1	4.89	5.02	5.18	1	4.70	4.73	4.90
3	5.04	5.13	5.20	3	4.53	4.70	4.79
5	5.08	5.12	5.20	5	3.04	3.33	3.88
7	4.80	5.08	5.33	7	2.20	2.44	2.67
เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัด จากยีสต์		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	4.79	5.08	5.35	0	4.40	4.49	4.60
1	3.43	4.49	4.50	1	2.76	2.79	3.14
3	3.51	3.75	4.47	3	2.39	2.88	2.94
5	2.46	3.77	4.01	5	2.00	2.41	2.50
7	1.68	1.70	1.72	7	1.27	1.50	1.98

ตารางที่ ง.5 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของ *Enterobacter* sp. BPW5 ใน การย่อยสลาย BPA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม สารอาหาร			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเปปโตน		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	5.12	5.63	6.12	0	4.40	4.41	5.46
1	5.30	5.59	6.15	1	4.06	4.42	4.42
3	5.37	5.62	6.05	3	3.78	4.28	4.50
5	5.22	5.38	6.04	5	3.67	3.97	4.40
7	5.39	5.60	5.79	7	2.83	2.93	3.88
เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัด จากยีสต์		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	4.23	5.04	5.12	0	4.23	5.04	5.12
1	4.17	4.42	4.65	1	4.17	4.42	4.65
3	4.15	4.20	4.53	3	4.15	4.20	4.53
5	2.71	2.85	3.15	5	2.71	2.85	3.15
7	2.33	2.72	3.21	7	2.33	2.72	3.21

ตารางที่ ง.6 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของ *Sphingobium* sp. P2 ในการ ย่อยสลาย BPA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม สารอาหาร			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	4.42	4.67	4.98	0	4.71	4.74	5.41
1	4.36	4.66	5.20	1	3.77	4.04	4.30
3	4.35	4.48	4.66	3	2.48	3.02	3.09
5	4.25	4.40	4.68	5	1.99	2.55	2.66
7	4.92	5.24	5.47	7	2.20	2.46	2.60

ตารางที่ ง.7 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของชุดควบคุม ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	5.35	5.49	5.55	0	10.71	10.77	10.78
1	5.29	5.71	5.53	1	10.71	10.78	10.81
3	5.06	5.40	5.60	3	10.70	10.82	10.84
5	4.32	5.23	5.44	5	8.86	10.58	10.91
7	4.52	5.27	5.33	7	10.05	10.68	10.79
9	4.85	5.05	5.19	9	9.87	10.09	10.59
12	4.55	5.10	5.20	12	10.44	10.49	10.60
15	4.94	5.18	5.47	15	10.04	10.22	11.01
เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	20.81	21.94	23.07	0	45.41	47.50	47.19
1	21.24	21.28	22.70	1	47.10	47.11	47.12
3	18.99	21.82	23.09	3	44.45	44.53	44.66
5	19.23	21.80	22.93	5	38.72	43.99	45.22
7	19.69	19.94	21.38	7	39.08	41.90	41.90
9	19.57	19.97	21.57	9	41.90	42.62	43.87
12	19.71	20.56	21.33	12	41.02	41.43	42.03
15	19.31	21.07	21.24	15	39.19	41.01	44.32

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	77.30	77.36	78.18	0	90.10	90.86	97.43
1	77.08	79.25	82.41	1	91.31	93.38	95.21
3	72.77	74.64	75.86	3	84.56	87.64	87.84
5	68.89	71.80	76.02	5	87.39	88.18	88.24
7	75.17	75.46	80.43	7	86.04	86.95	90.41
9	69.78	75.42	81.07	9	79.37	86.92	89.43
12	69.39	74.25	79.45	12	80.78	84.40	88.66
15	58.54	74.61	75.69	15	78.16	85.62	84.42

ตารางที่ ง.8 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของ *Bacillus cereus* BPW4 ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ เต็มกลูโคส

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	4.46	4.55	5.03	0	10.05	10.33	10.91
1	4.01	4.50	4.59	1	9.62	9.94	10.38
3	3.78	3.81	4.17	3	9.03	9.18	9.94
5	3.09	3.21	3.37	5	8.78	9.07	9.52
7	3.10	3.22	3.25	7	7.93	8.31	8.53
9	2.85	2.93	3.31	9	6.77	6.85	7.32
12	2.02	2.44	2.54	12	5.21	5.59	6.27
15	1.84	1.92	2.15	15	5.01	5.72	6.13

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	22.88	23.25	23.40	0	45.41	45.87	46.27
1	21.30	21.50	21.58	1	43.79	45.15	45.26
3	20.39	20.60	21.20	3	40.91	41.31	44.06
5	20.46	21.01	21.53	5	38.55	40.75	42.27
7	18.79	21.07	21.26	7	38.48	38.98	40.28
9	15.30	17.34	17.48	9	38.96	39.17	39.24
12	15.57	15.98	18.06	12	38.68	39.04	39.13
15	14.81	15.97	17.99	15	38.98	39.40	39.63
เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	75.29	76.08	75.81	0	95.73	99.60	104.46
1	73.26	74.79	75.94	1	96.03	104.22	104.47
3	76.37	80.46	81.15	3	96.43	98.45	99.98
5	67.42	68.90	69.83	5	90.37	94.67	98.78
7	67.68	69.33	70.15	7	89.65	97.30	98.22
9	65.40	65.46	70.13	9	100.28	102.25	103.44
12	66.90	67.36	71.58	12	97.98	104.16	110.60
15	66.82	68.76	71.56	15	95.80	99.20	102.58

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง.9 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของ *Sphingobium* sp. P2 ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ เต็มกลูโคส

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	5.61	5.68	6.40	0	8.94	10.12	10.24
1	3.12	3.88	4.35	1	7.09	8.40	9.26
3	3.22	3.70	4.07	3	6.55	7.47	7.61
5	2.76	3.19	3.81	5	6.60	7.09	7.12
7	3.07	3.61	3.72	7	5.93	7.05	7.43
9	2.82	3.12	3.76	9	5.10	6.91	8.34
12	2.94	3.61	3.86	12	5.80	6.41	7.19
15	3.36	3.54	3.45	15	5.51	7.10	8.17
เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	17.59	18.61	20.78	0	37.00	41.60	42.39
1	15.23	16.76	22.48	1	36.64	39.06	42.22
3	14.71	15.88	21.04	3	36.34	39.91	41.81
5	15.27	15.79	21.17	5	35.82	37.02	41.20
7	14.39	15.37	21.82	7	37.15	37.79	41.01
9	13.34	15.67	21.37	9	35.05	39.38	40.97
12	15.11	15.17	20.55	12	37.99	38.87	40.16
15	13.58	17.04	19.56	15	37.22	41.58	41.88

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	70.25	76.57	85.54	0	102.69	103.34	105.31
1	73.79	75.23	81.57	1	95.98	96.68	105.17
3	78.47	79.77	83.02	3	97.24	102.54	113.96
5	79.60	82.62	84.48	5	90.69	103.07	112.06
7	73.54	76.50	86.37	7	100.53	103.46	108.95
9	72.48	72.98	84.04	9	95.28	103.39	105.84
12	73.12	77.74	84.98	12	94.29	100.96	103.33
15	67.91	75.09	92.94	15	103.27	104.51	105.84

ตารางที่ ง.10 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของชุดควบคุมเม็ดเจลเจลแลนกัน ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	3.90	5.02	6.06	0	9.98	10.32	10.55
3	3.76	5.26	5.33	3	9.37	10.27	10.48
7	3.52	4.97	6.12	7	9.35	9.54	10.30
12	3.56	4.88	5.72	12	9.51	10.02	10.17
15	3.55	5.29	5.49	15	9.65	9.39	11.65

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	12.82	16.79	21.23	0	33.67	40.59	43.74
3	14.16	17.29	22.97	3	34.24	41.99	43.88
7	14.18	15.82	19.20	7	33.53	36.00	43.09
12	14.01	17.79	20.45	12	32.53	39.62	42.28
15	13.37	14.48	20.45	15	30.13	33.08	42.28
เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	77.58	86.76	86.86	0	101.37	104.14	106.02
3	74.58	78.18	83.99	3	98.53	103.13	104.78
7	72.60	74.68	83.82	7	96.72	102.77	104.53
12	73.68	76.63	82.93	12	95.23	96.03	97.79
15	72.94	77.27	85.48	15	87.76	90.99	103.51

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง.11 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเซลล์ตริง BPW4 ในเม็ด เจลเจลแลนกัม ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ใน อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	4.85	5.42	5.72	0	10.46	10.75	10.97
1	4.25	4.74	5.19	1	8.52	8.97	10.13
3	3.73	4.22	4.86	3	8.38	9.14	9.72
5	3.52	4.23	4.49	5	8.27	8.93	9.84
7	2.85	3.70	4.12	7	7.81	8.78	11.26
9	2.72	2.76	3.70	9	7.76	8.46	8.61
12	2.38	2.63	3.69	12	7.62	8.01	8.36
15	2.43	2.47	2.70	15	7.51	8.12	8.64
เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	15.86	18.85	20.72	0	39.60	40.39	41.40
1	11.53	16.58	18.72	1	37.60	39.20	40.26
3	11.44	13.31	14.44	3	35.14	36.40	37.17
5	11.94	12.56	13.10	5	34.56	36.20	38.35
7	10.49	11.88	13.93	7	34.29	35.46	38.55
9	10.28	11.35	13.48	9	33.86	35.38	38.80
12	10.20	11.03	12.55	12	33.68	35.05	38.54
15	10.56	12.03	12.19	15	32.98	34.85	38.37

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	71.05	74.93	80.78	0	93.38	101.21	105.67
1	70.65	71.90	81.17	1	92.33	98.85	106.01
3	68.79	70.35	84.97	3	93.67	98.35	104.28
5	66.47	76.02	78.15	5	90.67	101.90	105.69
7	65.10	78.12	78.98	7	87.51	96.72	100.38
9	64.82	74.19	75.53	9	85.69	93.52	102.82
12	64.49	73.94	81.53	12	84.34	96.65	101.93
15	64.24	71.94	71.94	15	84.14	96.85	101.43

ตารางที่ ง.12 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของชุดควบคุมเม็ดเจลอัลจินต ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ เต็มกลูโคส

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	4.60	4.91	6.06	0	8.23	9.82	10.05
3	4.46	4.72	5.96	3	7.78	9.78	9.98
7	4.40	4.41	5.60	7	7.67	9.58	9.77
12	4.28	4.89	5.17	12	7.39	9.15	9.92
15	4.80	4.98	4.99	15	7.40	9.27	9.90

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	18.43	20.18	20.26	0	38.85	40.36	41.49
3	18.23	17.73	19.35	3	39.71	41.91	43.88
7	18.20	18.46	18.57	7	38.10	40.53	41.32
12	18.45	19.62	20.63	12	35.55	39.77	40.22
15	17.55	19.58	20.49	15	34.21	39.32	40.48
เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	75.12	80.16	89.87	0	97.05	103.76	104.88
3	77.13	78.04	84.75	3	92.64	92.89	103.53
7	74.90	77.14	80.23	7	96.21	96.85	100.64
12	73.28	74.32	84.28	12	82.64	97.74	98.01
15	75.52	77.59	80.84	15	85.38	96.35	97.30

ตารางที่ ง.13 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเซลล์ตริง BPW4 ในเมล็ด
เจลอัลจินต ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหาร
เลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	4.35	4.71	4.76	0	9.72	10.21	10.76
1	3.79	3.93	4.52	1	9.39	9.64	10.11
3	3.52	3.80	4.03	3	8.76	9.03	9.70
5	2.57	2.61	2.75	5	6.89	7.01	7.32
7	1.20	1.22	1.24	7	5.44	5.64	5.65
15	1.09	1.10	1.13	15	5.24	5.34	5.57

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	21.61	22.20	22.44	0	35.24	36.39	36.40
1	17.26	19.55	21.87	1	32.53	35.89	36.02
3	11.73	17.34	17.64	3	32.23	32.64	34.88
5	11.42	13.04	16.48	5	26.26	27.47	33.07
7	9.11	12.08	15.78	7	26.07	27.45	32.73
9	8.78	11.58	15.51	9	25.04	25.56	30.86
12	8.13	11.03	15.05	12	23.05	23.79	25.96
15	7.55	9.09	11.44	15	22.57	23.18	24.91
เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	70.59	73.90	78.27	0	96.95	104.28	108.33
1	70.96	71.44	78.00	1	96.34	104.24	105.16
3	69.39	69.44	76.77	3	95.96	100.62	103.85
5	67.10	70.38	76.72	5	95.15	98.44	105.86
7	69.20	69.27	73.65	7	94.27	96.18	102.69
9	67.58	67.96	72.64	9	NA	NA	NA
12	64.80	66.60	74.64	12	NA	NA	NA
15	58.71	62.78	72.30	15	92.63	93.89	98.42

*หมายเหตุ NA หมายถึง Not applicable

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง.14 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของชุดควบคุมในเม็ดเจล อัลจิเนต ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกลูโคส

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	4.34	4.51	4.51	0	9.21	9.96	10.12
3	4.27	4.49	4.51	3	9.16	9.85	10.09
7	4.14	4.46	4.49	7	9.66	9.88	10.02
12	4.10	4.40	4.44	12	9.33	10.03	10.07
15	4.03	4.37	4.39	15	8.99	9.97	10.08
เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	20.92	23.62	24.47	0	33.94	34.30	36.99
3	20.95	23.73	24.41	3	33.92	34.21	36.48
7	20.79	23.30	25.01	7	33.84	34.53	36.99
12	20.64	23.13	24.55	12	33.56	34.18	37.85
15	20.42	22.59	24.63	15	33.43	34.81	35.82
เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	76.46	79.94	81.42	0	100.07	101.65	106.37
3	73.88	79.46	81.35	3	99.98	101.47	106.27
7	72.54	78.96	81.30	7	99.72	102.92	105.18
12	75.08	78.46	81.13	12	99.60	102.54	106.34
15	75.06	76.60	82.34	15	99.35	100.69	106.26

ตารางที่ ง.15 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเซลล์ตริง BPW4 ในเม็ด
เจลอัลจินเต ระหว่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหาร
เลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกลูโคส

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	4.00	4.40	4.99	0	8.91	9.77	9.79
1	3.77	4.38	4.62	1	8.68	9.53	9.56
3	3.46	4.03	4.34	3	8.21	8.95	9.28
5	3.10	3.15	4.00	5	7.27	7.87	9.56
7	2.31	2.98	3.14	7	6.57	7.20	7.76
9	2.00	2.63	3.13	9	6.02	6.88	7.27
12	1.81	2.34	3.11	12	5.35	6.42	6.77
15	1.56	1.59	4.02	15	3.62	5.14	5.81
เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	20.39	20.97	22.78	0	34.30	35.28	35.78
1	19.22	20.56	25.91	1	32.68	35.47	35.70
3	15.76	17.67	21.28	3	30.86	32.51	34.08
5	13.82	16.85	20.89	5	27.13	28.95	33.67
7	11.88	15.34	18.74	7	26.13	29.00	31.89
9	11.74	14.64	16.09	9	26.03	28.73	31.42
12	11.26	12.60	12.70	12	26.27	29.41	30.54
15	10.90	12.28	13.76	15	25.86	28.52	30.45

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	74.55	79.62	88.91	0	87.31	99.35	103.04
1	73.86	77.66	88.59	1	87.09	99.48	102.61
3	73.97	76.49	86.70	3	91.90	99.00	102.41
5	72.69	78.78	83.52	5	86.85	98.96	100.52
7	74.43	78.30	83.24	7	86.72	98.86	99.28
9	73.24	78.68	82.30	9	86.53	97.15	98.54
12	70.26	74.93	87.62	12	87.70	94.02	99.60
15	67.95	72.79	80.63	15	86.35	95.47	96.71

ตารางที่ ง.16 ปริมาณ BPA ที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเซลล์ตรังในเม็ดเจล อัลจิเนต เมื่อใช้ในการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างต่อเนื่อง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส

เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม กลูโคส		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	21.61	22.20	22.44	0	20.39	20.97	22.78
7	9.11	12.08	15.78	7	11.88	15.34	18.74
14	7.55	9.09	11.44	14	10.90	12.28	13.76
14	20.25	20.52	21.68	14	20.59	20.72	22.12
21	13.98	14.59	16.47	21	15.12	15.26	17.32
28	11.33	12.81	13.73	28	12.52	14.40	16.22
28	20.94	22.50	22.78	28	19.48	23.45	23.48
35	13.44	13.61	14.57	35	14.22	15.67	16.01

ภาคผนวก จ

จำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ และในเม็ดเจล

ตารางที่ จ.1 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ของ *Methylobacterium* sp. NP3 ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม สารอาหาร			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเปปโตน		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	0.749	0.794	0.910	0	0.807	0.831	0.789
1	0.760	0.801	0.868	1	1.204	1.106	1.075
3	0.764	0.767	0.840	3	1.015	1.100	0.989
5	0.605	0.610	0.747	5	1.050	1.016	0.970
7	0.598	0.613	0.751	7	1.027	0.994	0.982
เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัด จากยีสต์		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	0.826	0.831	0.836	0	0.741	0.727	0.758
1	1.092	1.130	1.186	1	1.117	1.122	1.099
3	1.039	1.076	1.128	3	1.081	1.005	0.946
5	0.969	1.043	1.061	5	0.919	0.926	0.884
7	0.915	0.986	1.036	7	0.933	0.916	0.870

ศูนย์วิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ จ.2 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ของ *Enterobacter* sp. BPR1 ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม สารอาหาร			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเปปโตน		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	0.909	0.911	0.905	0	0.747	0.760	0.800
1	0.863	0.857	0.851	1	1.027	1.027	0.936
3	0.812	0.798	0.790	3	1.031	0.975	0.900
5	0.809	0.799	0.796	5	0.854	0.866	0.818
7	0.668	0.711	0.697	7	0.728	0.689	0.641
เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัด จากยีสต์		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	0.904	0.912	0.914	0	0.818	0.827	0.751
1	1.051	1.053	1.070	1	1.060	0.917	1.035
3	1.037	1.040	1.051	3	1.000	1.027	0.957
5	0.972	0.979	0.98	5	0.815	0.822	0.772
7	0.891	0.881	0.899	7	0.741	0.766	0.724

ตารางที่ จ.3 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ของ *Bacillus cereus* BPW4 ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม สารอาหาร			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเปปโตน		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	0.745	0.782	0.856	0	0.831	0.810	0.784
1	0.759	0.770	0.842	1	1.011	1.010	1.062
3	0.746	0.749	0.780	3	0.942	0.930	0.984
5	0.757	0.759	0.834	5	0.773	0.809	0.850
7	0.753	0.757	0.826	7	0.653	0.664	0.670

เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัด จากยีสต์		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	0.880	0.888	0.893	0	0.762	0.750	0.685
1	1.030	1.050	1.066	1	1.032	1.050	1.030
3	0.995	1.046	1.062	3	0.940	0.941	0.850
5	0.884	0.986	0.999	5	0.778	0.764	0.600
7	0.806	0.955	0.969	7	0.714	0.669	0.571

ตารางที่ ๑.4 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ของ *Enterobacter* sp. BPW5 ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม สารอาหาร			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเปปโตน		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	0.912	0.915	0.913	0	0.816	0.825	0.801
1	0.875	0.868	0.862	1	1.178	1.096	1.065
3	0.816	0.835	0.841	3	1.132	1.094	1.031
5	0.825	0.839	0.840	5	1.026	1.009	0.975
7	0.830	0.819	0.810	7	0.952	0.974	0.881
เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัด จากยีสต์		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	0.873	0.874	0.907	0	0.892	0.914	0.898
1	1.150	1.068	1.189	1	1.083	1.199	1.179
3	1.043	1.112	1.166	3	1.041	1.133	1.120
5	1.004	1.070	1.136	5	0.937	0.997	0.965
7	0.951	1.014	1.096	7	0.842	0.920	0.873

ตารางที่ ๑.5 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ของ *Sphingobium* sp. P2 ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม สารอาหาร			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	0.765	0.778	0.780	0	0.800	0.825	0.854
1	0.736	0.751	0.758	1	0.990	1.013	1.025
3	0.746	0.748	0.750	3	1.067	1.067	1.081
5	0.774	0.780	0.782	5	1.071	1.088	1.096
7	0.751	0.756	0.766	7	1.087	1.105	1.109

ตารางที่ ๑.6 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ของ *Bacillus cereus* BPW4 ที่ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	12×10^{11}	17×10^{11}	21×10^{11}	0	6×10^{11}	8×10^{11}	14×10^{11}
1	13×10^{11}	23×10^{11}	30×10^{11}	1	3×10^{11}	14×10^{11}	15×10^{11}
3	20×10^{10}	22×10^{10}	30×10^{10}	3	9×10^{10}	14×10^{10}	25×10^{10}
5	17×10^9	14×10^{10}	28×10^{10}	5	12×10^9	4×10^{10}	8×10^{10}
7	8×10^{10}	18×10^{10}	20×10^{10}	7	8×10^{10}	12×10^{10}	14×10^{10}
9	14×10^9	14×10^9	17×10^9	9	8×10^9	18×10^9	20×10^9
12	4×10^9	13×10^9	19×10^9	12	8×10^9	11×10^9	14×10^9
15	4×10^9	7×10^9	10×10^9	15	19×10^8	26×10^8	26×10^8

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	4×10^{11}	7×10^{11}	10×10^{11}	0	16×10^{10}	4×10^{11}	8×10^{11}
1	7×10^{11}	10×10^{11}	14×10^{11}	1	4×10^{11}	14×10^{11}	20×10^{11}
3	4×10^{10}	15×10^{10}	18×10^{10}	3	5×10^9	18×10^9	4×10^{10}
5	10×10^9	22×10^9	4×10^{10}	5	9×10^9	13×10^9	17×10^9
7	15×10^9	16×10^9	18×10^9	7	3×10^{10}	4×10^{10}	6×10^{10}
9	8×10^9	14×10^9	15×10^9	9	5×10^9	8×10^9	13×10^9
12	3×10^9	13×10^9	17×10^9	12	4×10^9	6×10^9	9×10^9
15	6×10^8	25×10^8	29×10^8	15	5×10^8	7×10^8	12×10^8
เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	6×10^{11}	9×10^{11}	15×10^{11}	0	13×10^{11}	15×10^{11}	18×10^{11}
1	18×10^{10}	19×10^{10}	26×10^{10}	1	5×10^{11}	8×10^{11}	9×10^{11}
3	6×10^{10}	7×10^{10}	14×10^{10}	3	7×10^9	12×10^9	6×10^{10}
5	20×10^9	24×10^9	6×10^{10}	5	3×10^9	8×10^9	9×10^9
7	3×10^9	14×10^9	16×10^9	7	4×10^8	6×10^8	9×10^8
9	3×10^9	13×10^9	14×10^9	9	16×10^7	18×10^7	5×10^8
12	3×10^8	3×10^8	11×10^8	12	15×10^6	17×10^6	23×10^6
15	6×10^7	3×10^8	5×10^8	15	6×10^6	8×10^6	11×10^6

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๑.7 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ของ *Sphingobium* sp. P2 ที่ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	22×10^{10}	28×10^{10}	30×10^{10}	0	12×10^{10}	15×10^{10}	22×10^{10}
1	19×10^{11}	24×10^{11}	29×10^{11}	1	15×10^{11}	15×10^{11}	25×10^{11}
3	10×10^{11}	10×10^{11}	14×10^{11}	3	3×10^{11}	7×10^{11}	13×10^{11}
5	6×10^{11}	9×10^{11}	12×10^{11}	5	3×10^{11}	7×10^{11}	10×10^{11}
7	15×10^{10}	17×10^{10}	20×10^{10}	7	7×10^{10}	7×10^{10}	16×10^{10}
9	5×10^{10}	15×10^{10}	16×10^{10}	9	3×10^{10}	8×10^{10}	13×10^{10}
12	12×10^9	15×10^9	17×10^9	12	10×10^9	12×10^9	13×10^9
15	6×10^9	6×10^9	10×10^9	15	3×10^9	4×10^9	8×10^9
เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	9×10^{10}	9×10^{10}	10×10^{10}	0	15×10^{10}	19×10^{10}	19×10^{10}
1	13×10^{11}	16×10^{11}	20×10^{11}	1	13×10^{11}	20×10^{11}	24×10^{11}
3	6×10^{11}	10×10^{11}	16×10^{11}	3	10×10^{11}	11×10^{11}	11×10^{11}
5	4×10^{11}	6×10^{11}	9×10^{11}	5	7×10^{11}	8×10^{11}	10×10^{11}
7	7×10^{10}	7×10^{10}	15×10^{10}	7	7×10^{10}	9×10^{10}	9×10^{10}
9	5×10^{10}	6×10^{10}	10×10^{10}	9	3×10^{10}	3×10^{10}	10×10^{10}
12	7×10^9	9×10^9	9×10^9	12	5×10^9	6×10^9	11×10^9
15	3×10^9	3×10^9	5×10^9	15	25×10^8	25×10^8	28×10^8

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร			เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	18×10^{10}	19×10^{10}	19×10^{10}	0	10×10^{10}	10×10^{10}	15×10^{10}
1	5×10^{11}	6×10^{11}	14×10^{11}	1	11×10^{11}	13×10^{11}	14×10^{11}
3	3×10^{11}	5×10^{11}	7×10^{11}	3	7×10^{11}	9×10^{11}	10×10^{11}
5	25×10^{10}	6×10^{11}	9×10^{11}	5	19×10^{10}	4×10^{11}	4×10^{11}
7	4×10^{10}	5×10^{10}	7×10^{10}	7	4×10^{10}	4×10^{10}	7×10^{10}
9	4×10^{10}	4×10^{10}	6×10^{10}	9	3×10^{10}	4×10^{10}	5×10^{10}
12	3×10^9	4×10^9	7×10^9	12	6×10^8	6×10^8	8×10^8
15	17×10^8	19×10^8	19×10^8	15	22×10^7	24×10^7	27×10^7

ตารางที่ ๑.8 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ของเซลล์ตรึง BPW4 ในเม็ดเจลเจลแลนกัม ที่ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)
0	14×10^{11}	0	15×10^{11}	0	18×10^{11}	0
1	28×10^{11}	19×10^5	28×10^{11}	19×10^5	30×10^{11}	25×10^5
3	17×10^{11}	4×10^6	18×10^{11}	5×10^6	20×10^{11}	7×10^6
5	8×10^{11}	11×10^6	8×10^{11}	13×10^6	10×10^{11}	16×10^6
7	15×10^{10}	21×10^6	17×10^{10}	23×10^6	20×10^{10}	25×10^6
9	7×10^{10}	19×10^7	7×10^{10}	20×10^7	11×10^{10}	24×10^7
12	17×10^8	16×10^6	19×10^8	18×10^6	20×10^8	21×10^6
15	4×10^8	8×10^6	6×10^8	9×10^6	7×10^8	9×10^6

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)
0	12×10^{11}	0	14×10^{11}	0	14×10^{11}	0
1	13×10^{11}	17×10^5	14×10^{11}	19×10^5	26×10^{11}	20×10^5
3	11×10^{11}	29×10^5	11×10^{11}	3×10^6	12×10^{11}	3×10^6
5	3×10^{11}	8×10^6	4×10^{11}	8×10^6	6×10^{11}	8×10^6
7	3×10^{10}	14×10^6	6×10^{10}	14×10^6	7×10^{10}	16×10^6
9	23×10^9	14×10^7	24×10^9	17×10^7	24×10^9	17×10^7
12	5×10^8	11×10^6	6×10^8	11×10^6	10×10^8	12×10^6
15	22×10^7	3×10^6	27×10^7	4×10^6	28×10^7	5×10^6
เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)
0	12×10^{11}	0	13×10^{11}	0	16×10^{11}	0
1	9×10^{11}	17×10^5	12×10^{11}	19×10^5	14×10^{11}	19×10^5
3	7×10^{11}	26×10^5	9×10^{11}	26×10^5	10×10^{11}	28×10^5
5	23×10^{10}	6×10^6	23×10^{10}	7×10^6	26×10^{10}	7×10^6
7	20×10^9	11×10^6	24×10^9	12×10^6	26×10^9	14×10^6
9	19×10^9	10×10^7	19×10^9	11×10^7	19×10^9	11×10^7
12	4×10^8	9×10^6	4×10^8	10×10^6	6×10^8	11×10^6
15	17×10^7	22×10^5	19×10^7	22×10^5	20×10^7	24×10^5

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)
0	13×10^{11}	0	13×10^{11}	0	16×10^{11}	0
1	10×10^{11}	17×10^5	10×10^{11}	17×10^5	11×10^{11}	17×10^5
3	4×10^{11}	23×10^5	5×10^{11}	23×10^5	7×10^{11}	26×10^5
5	27×10^{10}	28×10^5	27×10^{10}	29×10^5	29×10^{10}	5×10^6
7	11×10^9	8×10^6	14×10^9	8×10^6	15×10^9	10×10^6
9	5×10^9	27×10^6	7×10^9	29×10^6	9×10^9	4×10^7
12	27×10^7	4×10^6	3×10^8	6×10^6	3×10^8	6×10^6
15	13×10^7	14×10^5	13×10^7	14×10^5	15×10^7	14×10^5
เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)
0	12×10^{11}	0	14×10^{11}	0	14×10^{11}	0
1	8×10^{11}	11×10^5	9×10^{11}	14×10^5	9×10^{11}	15×10^5
3	27×10^{10}	18×10^5	4×10^{11}	19×10^5	6×10^{11}	21×10^5
5	14×10^{10}	24×10^5	15×10^{10}	24×10^5	15×10^{10}	26×10^5
7	4×10^9	5×10^6	6×10^9	8×10^6	7×10^9	9×10^6
9	21×10^8	25×10^6	22×10^8	25×10^6	25×10^8	27×10^6
12	25×10^7	27×10^5	25×10^7	3×10^6	25×10^7	3×10^6
15	10×10^7	7×10^5	10×10^7	8×10^5	11×10^7	10×10^5

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)
0	11×10^{11}	0	12×10^{11}	0	16×10^{11}	0
1	4×10^{11}	5×10^5	5×10^{11}	7×10^5	7×10^{11}	10×10^5
3	25×10^{10}	14×10^5	26×10^{10}	17×10^5	26×10^{10}	17×10^5
5	3×10^{10}	27×10^5	3×10^{10}	28×10^5	3×10^{10}	28×10^5
7	3×10^9	5×10^6	4×10^9	7×10^6	4×10^9	7×10^6
9	7×10^8	22×10^6	7×10^8	22×10^6	13×10^8	22×10^6
12	20×10^7	19×10^5	23×10^7	20×10^5	23×10^7	22×10^5
15	7×10^7	4×10^5	8×10^7	6×10^5	9×10^7	7×10^5

ตารางที่ จ.9 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ของเซลล์ตรึง BPW4 ในเม็ดเจลอัลจิเนต ที่ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)
0	14×10^{11}	0	18×10^{11}	0	19×10^{11}	0
1	25×10^{11}	21×10^5	27×10^{11}	25×10^5	27×10^{11}	27×10^5
3	20×10^{11}	3×10^7	21×10^{11}	3×10^7	21×10^{11}	5×10^7
5	17×10^{11}	10×10^7	17×10^{11}	10×10^7	19×10^{11}	10×10^7
7	5×10^{11}	18×10^7	8×10^{11}	19×10^7	16×10^{11}	21×10^7
12	26×10^{10}	9×10^7	27×10^{10}	11×10^7	27×10^{10}	11×10^7
15	3×10^{10}	21×10^6	4×10^{10}	23×10^6	7×10^{10}	23×10^6

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)
0	12×10^{11}	0	18×10^{11}	0	18×10^{11}	0
1	23×10^{11}	21×10^5	23×10^{11}	22×10^5	24×10^{11}	22×10^5
3	15×10^{11}	16×10^6	17×10^{11}	22×10^6	18×10^{11}	25×10^6
5	8×10^{11}	6×10^7	10×10^{11}	7×10^7	12×10^{11}	7×10^7
7	4×10^{11}	10×10^7	4×10^{11}	15×10^7	11×10^{11}	18×10^7
9	14×10^{10}	4×10^7	17×10^{10}	5×10^7	19×10^{10}	7×10^7
12	27×10^9	15×10^6	3×10^{10}	15×10^6	3×10^{10}	17×10^6
15	12×10^{11}	0	18×10^{11}	0	18×10^{11}	0
เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)
0	14×10^{11}	0	16×10^{11}	0	18×10^{11}	0
1	20×10^{11}	15×10^5	21×10^{11}	20×10^5	23×10^{11}	21×10^5
3	9×10^{11}	10×10^6	11×10^{11}	10×10^6	16×10^{11}	14×10^6
5	7×10^{11}	14×10^6	9×10^{11}	14×10^6	11×10^{11}	17×10^6
7	3×10^{11}	8×10^7	6×10^{11}	9×10^7	6×10^{11}	9×10^7
9	9×10^{10}	28×10^6	10×10^{10}	28×10^6	13×10^{10}	29×10^6
12	7×10^{10}	22×10^6	7×10^{10}	22×10^6	8×10^{10}	23×10^6
15	20×10^9	13×10^6	23×10^9	13×10^6	24×10^9	13×10^6

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)
0	12×10^{11}	0	12×10^{11}	0	14×10^{11}	0
1	18×10^{11}	3×10^5	20×10^{11}	5×10^5	21×10^{11}	7×10^5
3	3×10^{11}	8×10^6	6×10^{11}	8×10^6	6×10^{11}	13×10^6
5	3×10^{11}	12×10^6	3×10^{11}	15×10^6	4×10^{11}	17×10^6
7	15×10^{10}	4×10^7	17×10^{10}	7×10^7	20×10^{10}	13×10^7
9	6×10^{10}	24×10^6	11×10^{10}	26×10^6	12×10^{10}	6×10^7
12	3×10^{10}	18×10^6	5×10^{10}	20×10^6	5×10^{10}	20×10^6
15	5×10^9	10×10^6	13×10^9	11×10^6	15×10^9	11×10^6
เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)
0	12×10^{11}	0	14×10^{11}	0	14×10^{11}	0
1	8×10^{11}	11×10^5	9×10^{11}	14×10^5	9×10^{11}	15×10^5
3	27×10^{10}	18×10^5	4×10^{11}	19×10^5	6×10^{11}	21×10^5
5	14×10^{10}	24×10^5	15×10^{10}	24×10^5	15×10^{10}	26×10^5
7	4×10^9	5×10^6	6×10^9	8×10^6	7×10^9	9×10^6
9	21×10^8	25×10^6	22×10^8	25×10^6	25×10^8	27×10^6
12	25×10^7	27×10^5	25×10^7	3×10^6	25×10^7	3×10^6
15	10×10^7	7×10^5	10×10^7	8×10^5	11×10^7	10×10^5

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)
0	11×10^{11}	0	13×10^{11}	0	16×10^{11}	0
1	11×10^{10}	21×10^4	12×10^{10}	22×10^4	16×10^{10}	25×10^4
3	7×10^{10}	3×10^6	9×10^{10}	3×10^6	9×10^{10}	6×10^6
5	18×10^9	13×10^6	18×10^9	14×10^6	20×10^9	15×10^6
7	3×10^9	25×10^6	4×10^9	25×10^6	6×10^9	3×10^7
12	24×10^8	5×10^6	24×10^8	7×10^6	26×10^8	8×10^6
15	9×10^8	23×10^5	10×10^8	26×10^5	13×10^8	27×10^5

ตารางที่ จ.10 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย BPA ของเซลล์ตรึง BPW4 ในเม็ดเจลอัลจิเนต ที่ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกลูโคส

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)
0	17×10^{11}	0	18×10^{11}	0	18×10^{11}	0
1	23×10^{11}	3×10^5	25×10^{11}	4×10^5	26×10^{11}	4×10^5
3	11×10^{11}	12×10^5	14×10^{11}	13×10^5	17×10^{11}	14×10^5
5	22×10^{10}	13×10^6	22×10^{10}	18×10^6	24×10^{10}	19×10^6
7	17×10^{10}	9×10^6	19×10^{10}	14×10^6	23×10^{10}	14×10^6
9	13×10^{10}	7×10^6	15×10^{10}	9×10^6	16×10^{10}	10×10^6
12	4×10^9	26×10^5	6×10^9	3×10^6	7×10^9	3×10^6
15	3×10^8	18×10^5	3×10^8	18×10^5	3×10^8	20×10^5

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)
0	16×10^{11}	0	16×10^{11}	0	17×10^{11}	0
1	13×10^{11}	27×10^4	18×10^{11}	27×10^4	18×10^{11}	27×10^4
3	9×10^{11}	12×10^5	9×10^{11}	13×10^5	11×10^{11}	13×10^5
5	15×10^{10}	12×10^6	16×10^{10}	12×10^6	18×10^{10}	16×10^6
7	12×10^{10}	6×10^6	16×10^{10}	7×10^6	18×10^{10}	9×10^6
9	29×10^9	4×10^6	5×10^{10}	5×10^6	7×10^{10}	5×10^6
12	14×10^8	22×10^5	16×10^8	23×10^5	16×10^8	23×10^5
15	21×10^7	13×10^5	24×10^7	15×10^5	25×10^7	15×10^5
เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)
0	15×10^{11}	0	17×10^{11}	0	18×10^{11}	0
1	13×10^{11}	21×10^4	13×10^{11}	23×10^4	16×10^{11}	24×10^4
3	7×10^{11}	7×10^5	7×10^{11}	9×10^5	7×10^{11}	9×10^5
5	14×10^{10}	8×10^6	15×10^{10}	9×10^6	15×10^{10}	10×10^6
7	3×10^{10}	3×10^6	3×10^{10}	5×10^6	4×10^{10}	5×10^6
9	25×10^9	27×10^5	25×10^9	27×10^5	25×10^9	29×10^5
12	12×10^8	15×10^5	13×10^8	15×10^5	13×10^8	18×10^5
15	17×10^7	8×10^5	19×10^7	10×10^5	20×10^7	11×10^5

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)
0	17×10^{11}	0	17×10^{11}	0	17×10^{11}	0
1	12×10^{11}	16×10^4	12×10^{11}	18×10^4	14×10^{11}	20×10^4
3	27×10^{10}	7×10^5	4×10^{11}	8×10^5	5×10^{11}	8×10^5
5	12×10^{10}	3×10^6	13×10^{10}	3×10^6	13×10^{10}	3×10^6
7	13×10^9	23×10^5	18×10^9	24×10^5	20×10^9	26×10^5
9	5×10^9	15×10^5	9×10^9	18×10^5	9×10^9	20×10^5
12	9×10^8	7×10^5	11×10^8	11×10^5	11×10^8	12×10^5
15	14×10^7	3×10^5	14×10^7	3×10^5	15×10^7	5×10^5
เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)
0	14×10^{11}	0	16×10^{11}	0	19×10^{11}	0
1	8×10^{11}	11×10^4	10×10^{11}	13×10^4	13×10^{11}	15×10^4
3	14×10^{10}	4×10^5	18×10^{10}	4×10^5	22×10^{10}	6×10^5
5	7×10^{10}	27×10^5	8×10^{10}	29×10^5	12×10^{10}	29×10^5
7	6×10^9	16×10^5	14×10^9	18×10^5	14×10^9	18×10^5
9	4×10^9	9×10^5	5×10^9	13×10^5	7×10^9	14×10^5
12	6×10^8	4×10^5	7×10^8	6×10^5	8×10^8	6×10^5
15	8×10^7	17×10^4	9×10^7	17×10^4	11×10^7	17×10^4

เวลา (วัน)	BPA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	ในเม็ดเจล (CFU/กรัม)	ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)
0	15×10^{11}	0	15×10^{11}	0	18×10^{11}	0
1	8×10^{11}	6×10^4	8×10^{11}	8×10^4	10×10^{11}	8×10^4
3	11×10^{10}	29×10^4	13×10^{10}	29×10^4	13×10^{10}	3×10^5
5	3×10^{10}	20×10^5	7×10^{10}	21×10^5	9×10^{10}	21×10^5
7	3×10^9	8×10^5	4×10^9	11×10^5	4×10^9	13×10^5
9	24×10^8	3×10^5	26×10^8	7×10^5	27×10^8	7×10^5
12	3×10^8	20×10^4	3×10^8	23×10^4	4×10^8	24×10^4
15	3×10^7	5×10^4	7×10^7	5×10^4	8×10^7	8×10^4

ตารางที่ จ.11 จำนวนแบคทีเรีย ณ วันที่ 0 และ 35 ของเซลล์ตรึง BPW4 ในเม็ดเจล
อัลจิเนต ในการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

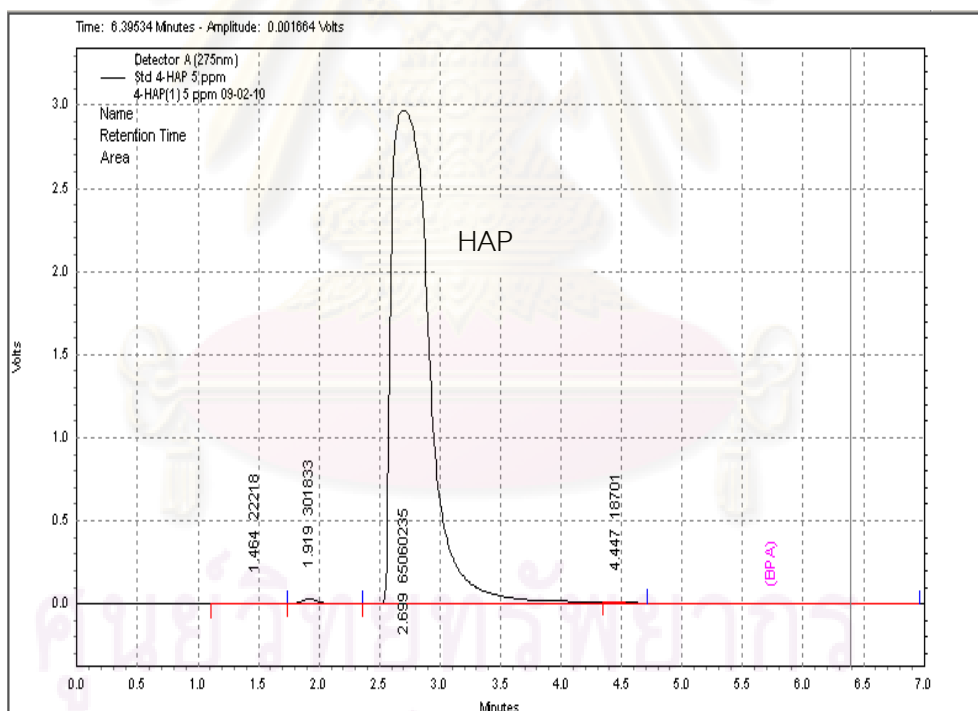
เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกลูโคส			เวลา (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
	ในเม็ดเจล	ในเม็ดเจล	ในเม็ดเจล		ในเม็ดเจล	ในเม็ดเจล	ในเม็ดเจล
	(CFU/กรัม)				(CFU/กรัม)		
0	13×10^{11}	14×10^{11}	16×10^{11}	0	15×10^{11}	15×10^{11}	17×10^{11}
35	11×10^5	13×10^5	13×10^5	35	3×10^5	4×10^5	6×10^5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

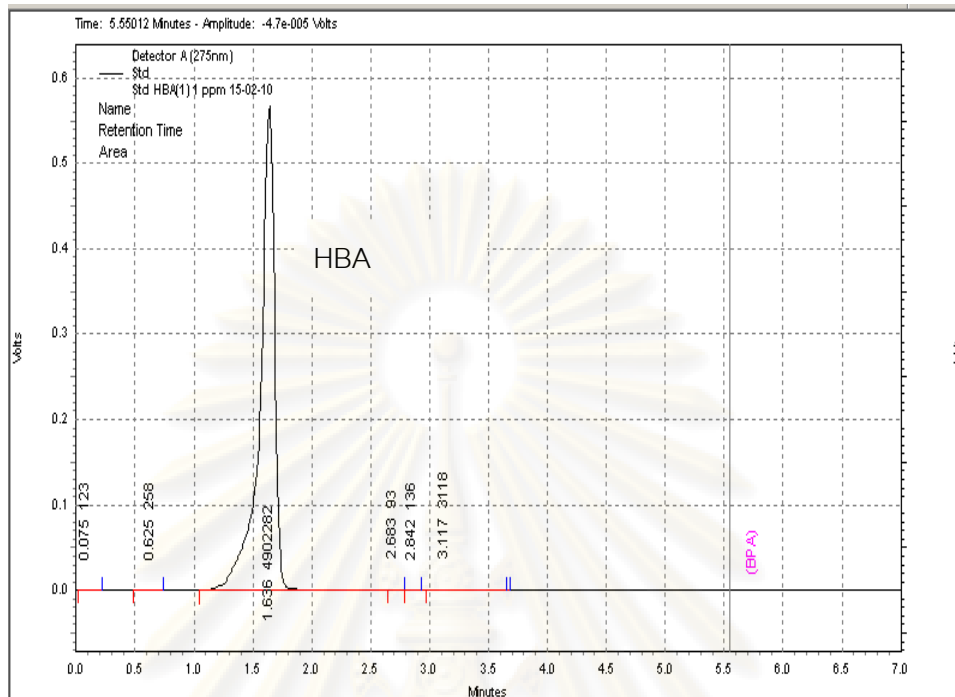
ภาคผนวก จ

โครมาโตแกรมของสารมัธยันตร์

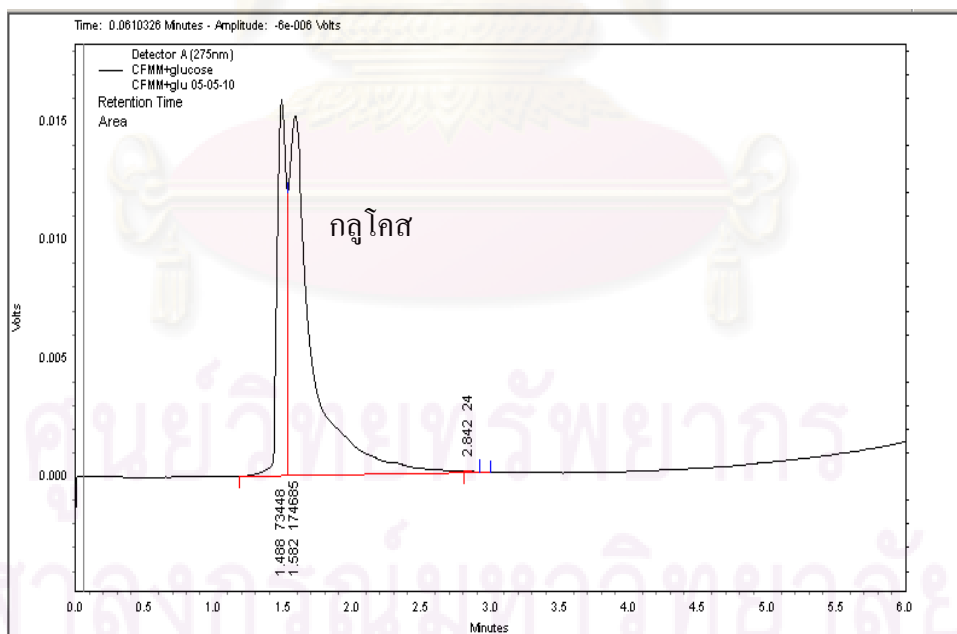
งานวิจัยนี้ได้ตรวจหาสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการย่อยสลาย BPA แบบเบื้องต้น โดยใช้ไฮดรอกซีอะซิโตนฟีโนน (Hydroxyacetophenone หรือ HAP) และกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (Hydroxybenzoic acid หรือ HBA) เป็นสารมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบ ค่า retention time ของสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้น เมื่อนำตัวอย่างการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 วันที่ 7 มาฉีด HPLC ผลปรากฏว่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้มีค่า retention time ที่ใกล้เคียงกับสารมัธยันตร์ชนิดกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก แต่ไม่มีพื้นที่ใต้กราฟที่มีค่า retention time ที่ใกล้เคียงกับสารมัธยันตร์ชนิดไฮดรอกซีอะซิโตนฟีโนน



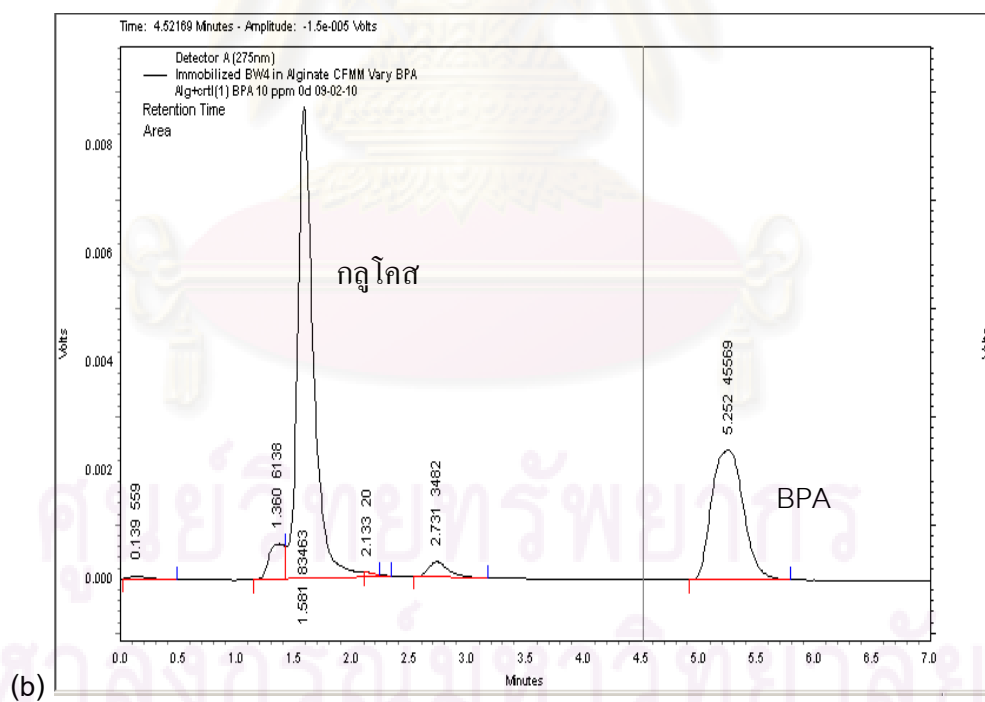
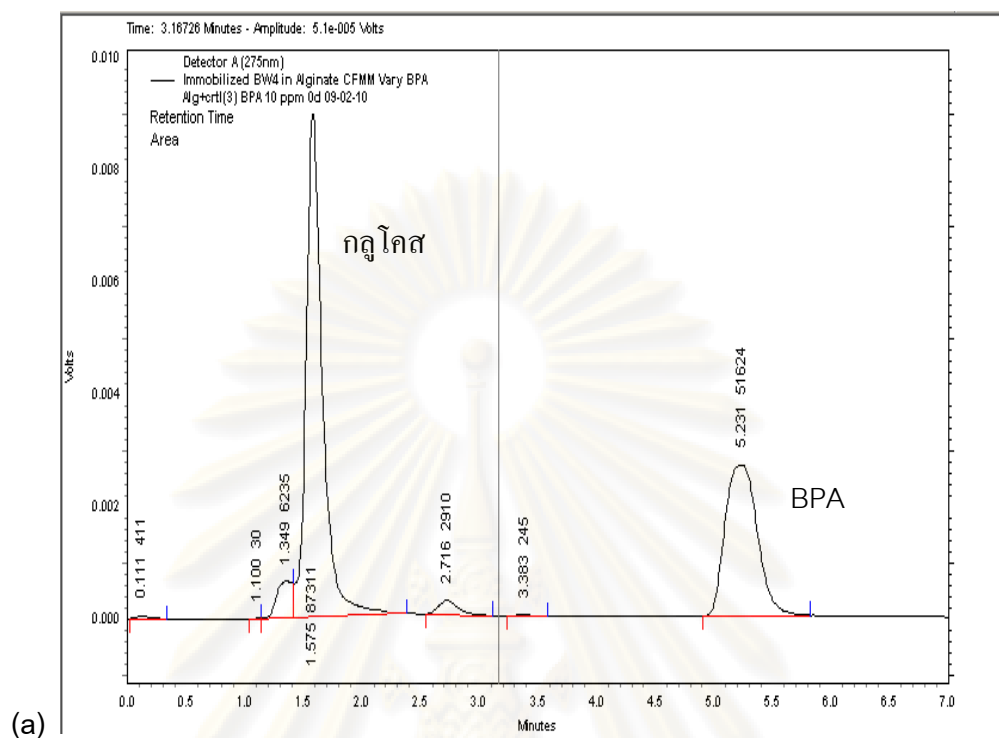
รูปที่ จ.1 โครมาโตแกรมของไฮดรอกซีอะซิโตนฟีโนน



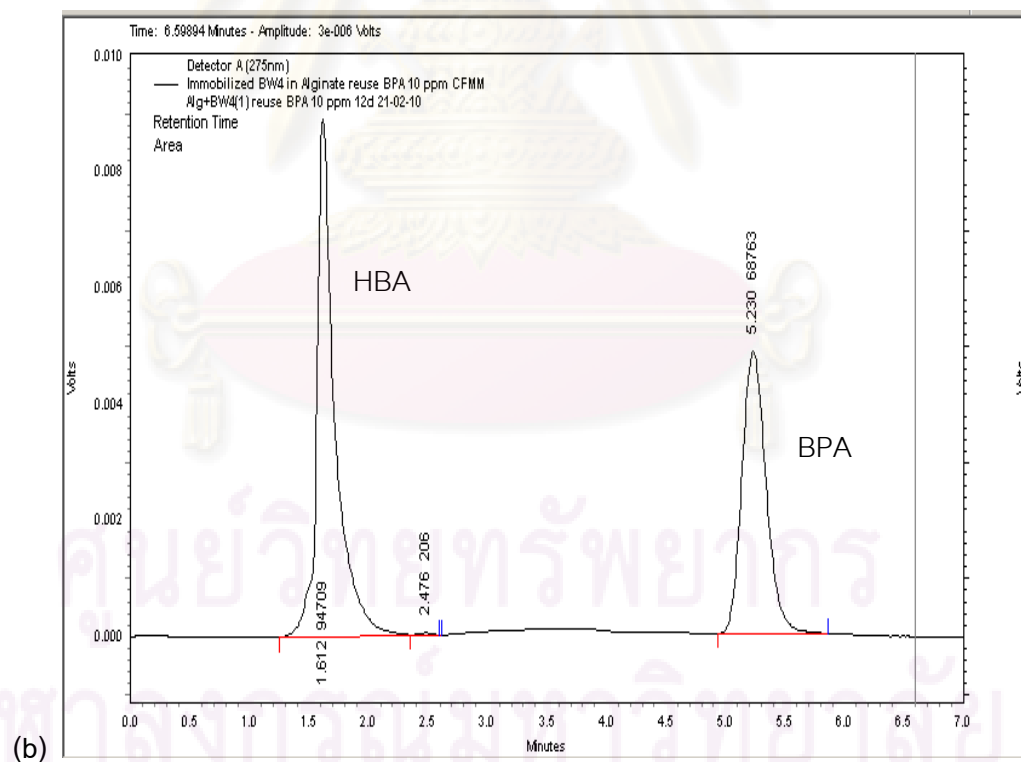
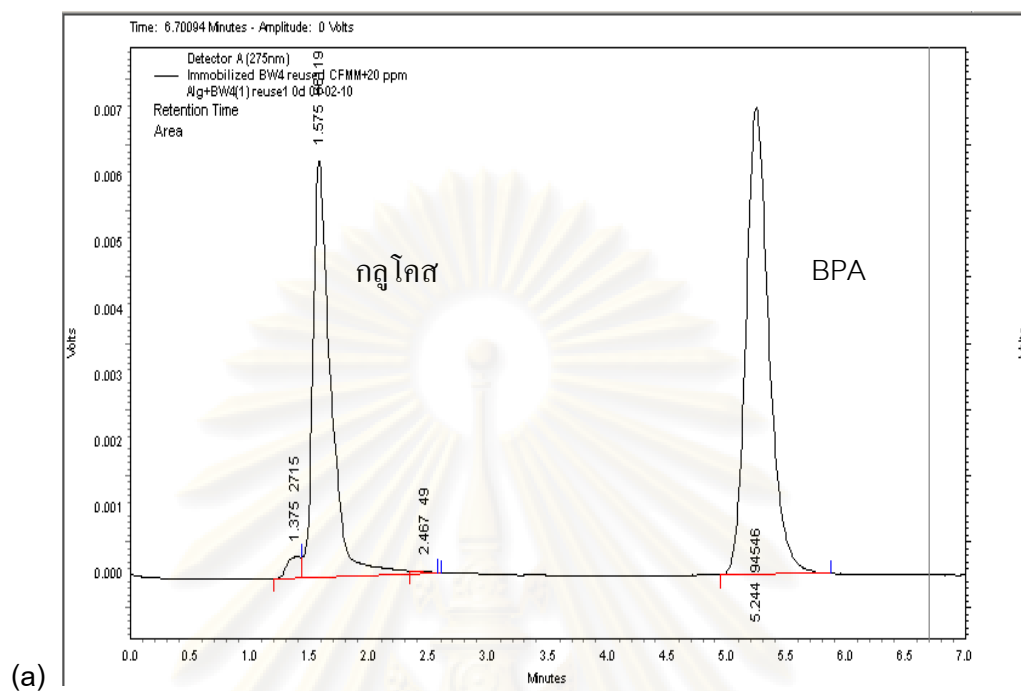
รูปที่ ๑.2 โครมาโตแกรมของกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก



รูปที่ ๑.3 โครมาโตแกรมของกลูโคส



รูปที่ ๑.4 โครมาโตแกรมของการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ของ
ชุดควบคุม วันที่ 0 (a) และวันที่ 15 (b)



รูปที่ ๑.5 โครมาโตแกรมของการย่อยสลาย BPA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BPW4 วันที่ 0 (a) และวันที่ 15 (b)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนันทธร เถาราช เกิดเมื่อวันที่ 25 สิงหาคม พ.ศ.2527 ที่จังหวัดชลบุรี สำเร็จ การศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 และเข้ารับการศึกษต่อในระดับ ปริญญาโทวิทยาศาสตร์ สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551

ผลงานที่เผยแพร่

1. ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ “The 21st Annual meeting and International Conference of The Thai Society for Biotechnology” ระหว่างวันที่ 24-25 กันยายน 2552 ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ ในหัวข้อเรื่อง Effects of nutrients on bisphenol A biodegradation. ร่วมกับรองศาสตราจารย์ ดร.อลิสา วังโน และผู้ช่วย ศาสตราจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย