



การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถชะละลายทองแดง และสภาวะที่เหมาะสม
ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองในการนำแร่โลหะทองแดง กลับมาใช้ใหม่จากผลิตภัณฑ์
แผ่นวงจรพิมพ์ที่ถูกทิ้ง

Isolation and Selection of Copper Bioleaching Bacteria and Optimization
using Response Surface Methodology on Copper Recovery from Discarded
Printed Circuit Boards

ชญลักษณ์ จุ๋นหัวโทน¹ ชีรศักดิ์ สมดี² และชัชวาล อัยยาริธิ^{1*}

¹สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

²สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

Thanyaluk Junhuathoen¹ Theerasak Somdee² and Chatchaval Aiyathiti^{1*}

¹Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen, 40002 Thailand

¹Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen, 40002 Thailand

*Corresponding Author, E-mail: chapiy@kku.ac.th

Received: 17 November 2020 | Revised: 25 December 2020 | Accepted: 19 January 2021

บทคัดย่อ

ผลิตภัณฑ์แผ่นวงจรพิมพ์ที่ถูกทิ้งจัดเป็นขยะอิเล็กทรอนิกส์ที่มีโลหะหนักในปริมาณสูง ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์และสิ่งแวดล้อม แต่ในขณะเดียวกันแร่โลหะดังกล่าวสามารถสร้างผลตอบแทนสูง การศึกษารังนี้ใช้เทคโนโลยีการชะละลายทางชีวภาพ เพื่อชะละลายทองแดงออกจากแผ่นวงจรพิมพ์ โดยมีการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถชะละลายทองแดงจากตัวอย่างดินและตะกอนดิน พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต FM-3 มีความสามารถนี้ เมื่อทำการระบุชนิดโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าเป็นแบคทีเรียชนิด *Pseudomonas stutzeri* strain FM-3 และเมื่อทำการหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยเทคนิคพื้นผิวตอบสนอง ที่มีการออกแบบชุดการทดลองแบบบล็อกซ์-เบห์นเคน เพื่อศึกษาผลของ 3 ปัจจัย ได้แก่ อัตราส่วนผงแผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลาย จำนวนเซลล์แบคทีเรีย และอุณหภูมิ พบว่าทั้ง 3 ปัจจัยมีผลต่อสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงจากแผ่นวงจรพิมพ์ ข้อมูลของชุดทดลองที่ได้มีความเหมาะสมกับสมการการทำนายสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดง เนื่องจากให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจสูง ($R^2 = 0.988$)

ABSTRACT

Discarded printed circuit board (PCB) is classified as an electronic waste containing high amounts of heavy metals. These elements pose a threat to human health and the environment. However, at the same time, such metals can generate high return income. This study uses biological leaching technology to leach the copper out of

the printed circuit board. The bacteria with copper leachate ability were isolated and selected from soil and sediment samples. The bacterium isolate FM-3 was found to have this ability. Based on the use of 16S rRNA gene sequencing, it was found that the bacterium was classified as *Pseudomonas stutzeri* strain FM-3. The optimum conditions were determined using the Response Surface Methodology (RSM) and the Box-Behnken Design experiment set was used to investigate the effects of three factors, including the pulp density, bacterial cell density and temperature. It was found that these three factors influence the optimum conditions for leaching of copper from printed circuit boards. The data of the experimental set were appropriate for predicting the optimum conditions for copper leaching because it gives a high coefficient of determination ($R^2 = 0.988$).

คำสำคัญ: กระบวนการชะละลายทางชีวภาพ ทองแดง แผ่นวงจรพิมพ์ วิธีการพื้นผิวผลตอบสนอง

Keywords: Bioleaching process, Copper, Printed Circuit Board, Response Surface Methodology

บทนำ

ขยะอิเล็กทรอนิกส์ (Electronic waste) คือของเสียจำพวกเครื่องใช้ไฟฟ้า และอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ที่เสื่อมสภาพหรือไม่เป็นที่ต้องการของผู้ใช้งาน (Zhang and Xu, 2016) ความก้าวหน้าของเทคโนโลยีมีส่วนสำคัญในการเร่งให้สินค้าอิเล็กทรอนิกส์ตกฐ่นเร็วขึ้น โดยเฉพาะเครื่องคอมพิวเตอร์ และโทรศัพท์มือถือ (อรวรรณ และศุสิทธิ์, 2553) ปัญหาเหล่านี้ เป็นปัจจัยทำให้มีขยะอิเล็กทรอนิกส์เพิ่มขึ้น (Silva et al., 2015) โดยมีมากกว่าขยะมูลฝอยในชุมชนถึง 3 เท่า (นภาพร และปราโมทย์, 2551) องค์ประกอบของขยะอิเล็กทรอนิกส์ส่วนมากประกอบด้วยโลหะหนัก เช่น ทองแดง ตะกั่ว ปปรอท แคดเมียม นิเกิล และสายหน่วงการติดไฟในแผ่นวงจรพิมพ์ (Flame Retardants in PCB) เป็นต้น (กรมควบคุมมลพิษ, 2550) องค์ประกอบเหล่านี้ก่อให้เกิดมลพิษที่อันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ และสิ่งแวดล้อม (Tsydenova and Bengtsson, 2011)

ปัจจุบันขยะอิเล็กทรอนิกส์ กลายเป็นขุมทรัพย์ของกลุ่มผู้ประกอบการธุรกิจรีไซเคิลขยะ เนื่องจากในขยะอิเล็กทรอนิกส์ประกอบไปด้วยแร่โลหะหลากหลายชนิด เช่น ทองคำ เงิน ทองแดง และอะลูมิเนียม ซึ่งแร่โลหะดังกล่าวสามารถสร้างผลตอบแทนสูงถึง 6-8 เท่าของต้นทุนการรับซื้อ (Arshadi et al., 2016) โดยเฉพาะขยะอิเล็กทรอนิกส์ประเภทแผ่นวงจรพิมพ์ (İşildara et al., 2016) มีโลหะร้อยละ 35 ของน้ำหนักแผ่นวงจรทั้งหมด (Hubau et al., 2018) ดังนั้นการนำแร่โลหะจากขยะอิเล็กทรอนิกส์กลับมาใช้และสร้างมูลค่าจึงเป็นเรื่องท้าทายของธุรกิจรีไซเคิลขยะ (Saiden and Tarawneh, 2015)

โดยทั่วไปเทคโนโลยีการรีไซเคิลขยะอิเล็กทรอนิกส์เพื่อแยกแร่โลหะที่มีค่าออกจากขยะอิเล็กทรอนิกส์จะอาศัยกระบวนการทางกายภาพ (Physical process) เช่น ถอดแยกชิ้นส่วน (Disassembly) การลดขนาดของวัตถุโดยใช้การตัด การทุบ การบด เพื่อให้อนุภาคของแร่ในวัตถุดิบแยกออกจากกัน (ชมพูนุท, 2554) กระบวนการทางเคมี (Chemical process) เช่น การแยกโลหะด้วยการชะละลาย (Hydrometallurgy) (ฉวีวรรณ และศรารกร, 2560) และกระบวนการทางชีวภาพ (Biological process) เช่น กระบวนการดูดซับทางชีวภาพ (Biosorption process) คือ การดูดซับแร่โลหะด้วยจุลินทรีย์ (Das, 2010) กระบวนการชะละลายทางชีวภาพ (Bioleaching process) เป็นกระบวนการทางชีวเคมีโดยใช้จุลินทรีย์ (Microorganisms) ได้แก่ แบคทีเรีย (Bacteria) อาเคีย (Archaea) เชื้อรา (Mold) และยีสต์ (Yeast) (Ghosh et al., 2015) ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะชะแร่โลหะจากขยะอิเล็กทรอนิกส์ให้อยู่ในรูปสารละลาย โดยจุลินทรีย์จะใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน และผลิตกรดเมตาบอลิก (Metabolic acid) ในการชะโลหะจากขยะอิเล็กทรอนิกส์มี 3 ขั้นตอนประกอบไปด้วย (1) กลไกการผลิตกรดเมตาบอลิก (Acidolysis) (2) กลไกการแลกเปลี่ยนเลขออกซิเดชัน (Redoxolysis) และ (3) กลไกการเปลี่ยนรูปสารประกอบเชิงซ้อน (Complexolysis) (ฉัตรฤดี และอาณัติ, 2560)

กระบวนการชะละลายทางชีวภาพ (Bioleaching process) เป็นกระบวนการที่ง่าย และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ในการชะละลายทองแดงจากขยะอิเล็กทรอนิกส์ให้อยู่ในรูปสารละลายด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (Bioleaching of copper)

สามารถเกิดได้ทั้งทางตรง และทางอ้อม โดยการชะทองแดงทางตรง จุลินทรีย์จะออกซิไดซ์โลหะทองแดงได้โดยอาศัยกลไกการผลิตภัณฑ์เมตาบอลิซึม (Acidolysis) และกรดจะทำการชะโลหะทองแดง (Cu^0) ให้อยู่ในรูปสารละลาย (Cu^{2+}) (Liu et al., 2016) และการชะทองแดงทางอ้อม จุลินทรีย์จะเกิดกลไกการแลกเปลี่ยนเลขออกซิเดชัน (Redoxolysis) โดยจะออกซิไดซ์เหล็กเฟอร์รัส (Fe^{2+}) และกลายเป็นเหล็กเฟอร์ริก (Fe^{3+}) (Shang and Liu, 2013) ซึ่งเหล็กเฟอร์ริกจะเป็นตัวทำหน้าที่ออกซิไดซ์ทองแดงให้อยู่ในรูปละลาย (Cardenas et al., 2016)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธีการพื้นผิวผลตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM) เป็นวิธีการรวบรวมเอาเทคนิคทั้งทางคณิตศาสตร์และทางสถิติ ที่มีประโยชน์ต่อการสร้างแบบจำลองและการวิเคราะห์ปัญหา โดยที่ผลตอบสนองที่สนใจขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย (Kumar, 2018) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มีความยุ่งยาก และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถชะละลายทองแดง และหาสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดง ได้แก่ จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (Bacterial cell density) อุณหภูมิ (Temperature) และอัตราส่วนผงแผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลาย (Pulp density) เพื่อสร้างแบบจำลองคณิตศาสตร์ ทำนายสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงจากแบคทีเรียที่แยกจากดินโดยใช้เทคนิคพื้นผิวผลตอบสนอง

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วัสดุที่จะนำมาชะละลาย

จัดหาผงทองแดงบริสุทธิ์ 99.98 เปอร์เซ็นต์ขนาด 50 mesh (297 ไมโครเมตร) จากบริษัท เอส.พี.ซี.พี.รีเซิร์ช เมททอล จำกัด นิคมอมตะซิตี้ จังหวัดชลบุรี และจัดหาซากแผ่นวงจรพิมพ์จากผู้ประกอบการรีไซเคิลวัสดุรับซื้อของเก่าโชคทวีทรัพย์ จังหวัดขอนแก่น โดยนำมาแยกชิ้นส่วนที่ไม่ต้องการออก ทำความสะอาดและบดให้มีขนาดเล็กกว่า 500 ไมโครเมตรโดยใช้ตะแกรงขนาด 35 mesh (500 ไมโครเมตร)

2. การแยก และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถชะละลายทองแดง

เก็บตัวอย่างตะกอนดินจากบ่อบำบัดน้ำเสียมหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น และตัวอย่างดินจากหลุมฝังกลบขยะบ้านคำบอน จังหวัดขอนแก่น และสถานกำจัด

ขยะบ้านโคกสะอาด อำเภออัญชัย จังหวัดกาฬสินธุ์ นำมาผสมให้เข้ากันในอัตราส่วนอย่างละ 1 กรัม จากนั้นนำมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Minimal medium broth (อัตราส่วนต่อน้ำ 1 ลิตร : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 กรัม KH_2PO_4 0.7 กรัม และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 กรัม) และเติมผงทองแดงบริสุทธิ์ 1 กรัม นำมาบ่มเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 192 ชั่วโมง (เปรียบเทียบกับกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ที่สามารถชะโลหะทองแดง 1 กรัมได้) จากนั้นดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรใส่ในอาหาร Minimal medium broth ใหม่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและมีผงทองแดงบริสุทธิ์ 1 กรัม ทำซ้ำเช่นนี้จำนวน 3 ครั้ง โดยนำสารละลายครั้งที่ 3 จำนวน 0.1 มิลลิลิตรมาเกลี่ยแบบกระจาย (Spread plate technique) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Peptone yeast extract agar (อัตราส่วนต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร : Peptone 20 กรัม Yeast extract 2 กรัม Glucose 0.75 กรัม KH_2PO_4 0.75 กรัม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75 กรัม และ Agar 15.0 กรัม) (Shabani et al., 2013)

การทดสอบการชะละลายทองแดงด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงในอาหารสูตร Peptone yeast extract broth ที่มี $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 กรัมต่อลิตร (Wang et al., 2014) และผงทองแดงบริสุทธิ์ 1 กรัม จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 1.0 บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 192 ชั่วโมง (เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง) วิเคราะห์ปริมาณทองแดงในรูปสารละลายด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงของอะตอม (AAS) แล้วนำมาคำนวณหาสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายโดยการแสดงผลในรูปประสิทธิภาพดังแสดงในสมการที่

$$\text{Recovery efficiency} = \left[1 - \left(\frac{C_{in} - C_{out}}{C_{in}} \right) \right] \times 100 \quad (1)$$

เมื่อ Recovery efficiency คือ ประสิทธิภาพในการชะละลายทองแดง (เปอร์เซ็นต์)

C_{in} คือ ปริมาตรทองแดงทั้งหมดที่อยู่ในแผ่นวงจรพิมพ์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

และ C_{out} คือ ปริมาตรทองแดงที่ถูกชะละลาย (มิลลิกรัมต่อลิตร)

3. การระบุชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีนบริเวณ 16s rRNA

การระบุชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16s rRNA (Stackebrandt and Goebel, 1994) โดยการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ จากนั้นเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16s rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction) โดยไพรเมอร์ที่ใช้ คือ 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') และ 1492R (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC-3') (Frank et al., 2008) ปริมาตรทั้งหมดของปฏิกิริยา คือ 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Tap Master Mix จำนวน 25 ไมโครลิตร MgCl₂ 1 ไมโครลิตร gDNA 1 ไมโครลิตร Rnase free 21 ไมโครลิตร ไพเมอร์ 27F 1 ไมโครลิตร และไพเมอร์ 1492R 1 ไมโครลิตร ภายใต้สภาวะที่ (1) 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (2) 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ (3) 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ทำซ้ำสภาวะที่ (1) ถึง (3) จำนวน 30 รอบ ตรวจสอบผลการสกัดจีโนมิกส์ ดีเอ็นเอ และเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16s rRNA ด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) จากนั้นทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์เพื่อชะล้างสารเคมีต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจากการทำพีซีอาร์ และส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Ward Medic Ltd. ประเทศไทย และสุดท้ายนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ

ศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ประเทศสหรัฐอเมริกา (National Center for Biotechnology Information; NCBI) โดยใช้โปรแกรม Nucleotide BLAST search ที่ <http://www.ncbi.nlm.gov/> เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรีย

4. ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการชะละลาย

นำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการชะละลายทองแดง มาทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายเพื่อชะทองแดงออกจากแผ่นวงจรพิมพ์ (PCB) ตามหลักการการวิเคราะห์สถิติด้วยวิธีการพื้นผิวผลตอบสนอง โดยกำหนดลำดับการทดลอง และออกแบบชุดการทดลองแบบ บ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken Design) ที่มี 3 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ค่าระดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 เพื่อออกแบบสูตรคำนวณสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดง และตรวจสอบผลกระทบของแต่ละตัวแปรอิสระในการทดลองการชะทองแดงโดยนำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการชะโลหะทองแดงมาทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงจากแผงวงจรพิมพ์ ตามหลักการการวิเคราะห์สถิติด้วยวิธีการพื้นผิวผลตอบสนอง กำหนดลำดับการทดลอง และออกแบบการทดลองแบบ บ็อกซ์-เบห์นเคน ที่มี 3 ปัจจัย ได้แก่ อัตราส่วนผงแผงวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลาย จำนวนเซลล์แบคทีเรีย และอุณหภูมิ ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยมีจำนวนหน่วยการทดลองทั้งหมด 15 การทดลอง

ตารางที่ 1 ตัวแปรและค่าระดับที่ใช้ในการทดลองชะละลายทองแดง

ตัวแปร	หน่วย	ค่าต่ำสุด	ค่ากลาง	ค่าสูงสุด
จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (Cell density)	OD ₆₀₀	0.5 ^a	1 ^b	1.5 ^c
อุณหภูมิ (Temperature)	องศาเซลเซียส	30	35	40
อัตราส่วนผงแผงวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะ ^d (Pulp density)	ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร	1	3	5

(a) จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ค่าดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร (OD₆₀₀) เท่ากับ 0.5 มีค่า 3.8×10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร

(b) จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 1.0 มีค่า 9.7×10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร

(c) จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 1.5 มีค่า 2.1×10^9 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร

(d) ผงแผงวงจรพิมพ์ 1 กรัม มีอัตราส่วนทองแดงต่อแผงวงจรพิมพ์ประมาณ 30 ± 2 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัยและอภิปราย

1. ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถชะละลายทองแดง

จากตัวอย่างดิน และตะกอนดินทั้ง 3 แหล่ง เมื่อนำมาแยก และคัดเลือกแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Minimal medium broth ที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ (จุดประสงค์เพื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน และกำหนดให้แบคทีเรียใช้

ทองแดงที่เติมลงไป เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญ ดังนั้นแบคทีเรียที่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ในอาหารดังกล่าวน่าจะสามารถใช้ทองแดงได้) พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 1 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการชะโลหะทองแดงให้อยู่ในรูปสารละลายได้ คือ แบคทีเรีย ไอโซเลต FM-3

ผลทดลองการชะละลายทองแดงทางชีวภาพ พบว่าชุดควบคุม (ปราศจากเชื้อแบคทีเรีย) สามารถชะละลายทองแดงได้ร้อยละ 27 (272 มิลลิกรัมทองแดงต่อกรัมผง ทองแดง) ส่วนแบคทีเรียไอโซเลต FM-3 สามารถชะละลายทองแดงได้ร้อยละ 57 (576 มิลลิกรัมทองแดงต่อกรัมผงทองแดง) ที่วัดด้วยเครื่องเครื่องวัดการดูดกลืนแสงของอะตอม (AAS) เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่มีความสามารถชะละลายทองแดงที่อื่นจากรายงานของ Isildar et al. (2019) เมื่อเทียบในหน่วยมิลลิกรัมทองแดงต่อกรัมของผงแผ่นวงจรพิมพ์ พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต FM-3 มีความสามารถในการชะทองแดงได้มากกว่าเมื่อเทียบกับแบคทีเรียในจีโนม *Pseudomonas* sp. ด้วยกัน (ตารางที่ 2) แต่ยังด้อยกว่าแบคทีเรียในจีโนม *Acidithiobacillus* sp.

2. การระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต FM-3 โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16s rRNA

ผลการตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียไอโซเลต FM-3 ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบยีนที่ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส และเมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ NCBI โดยโปรแกรม Blast พบว่ามีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Pseudomonas stutzeri* strain C35-ITI (MT798814) *Pseudomonas stutzeri* strain MN1 (KU708859) *Pseudomonas stutzeri* strain C40-ITI (MT80462) *Pseudomonas* sp. strain BAB-5900 (KX609741) และ *Pseudomonas* sp. BAB-4342 (KX350119) จำนวน 100 เปอร์เซ็นต์ทั้งหมด

ตารางที่ 2 แบคทีเรียที่มีความสามารถชะละลายทองแดงที่อื่นที่รายงานโดย Isildar et al. (2019)

ชนิดของแบคทีเรีย	อุณหภูมิ	กลไก	ระยะเวลา	ความสามารถละลายทองแดง
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> , <i>acidophilic</i> isolate	45 °C	Acidolysis (H ₂ SO ₄), Redoxolysis (Fe ³⁺)	7 วัน	Cu 89% (76 มิลลิกรัม/กรัม)*
<i>Acidithiobacillus</i> sp., <i>Gallionella</i> sp., <i>Leptospirillum</i> sp.	30 °C	Redoxolysis (Fe ³⁺)	12 วัน	Cu 95% (219 มิลลิกรัม/กรัม)
<i>At. ferrooxidans</i> , <i>At. thiooxidans</i>	28 °C	Acidolysis (H ₂ SO ₄), redoxolysis (Fe ³⁺)	5 วัน	Cu (94%)
<i>Acidophilic consortium</i> (genera <i>Acidithiobacillus</i> และ <i>Gallionella</i>)	30 °C	Redoxolysis (Fe ³⁺)	12 วัน	Cu 95% (106 มิลลิกรัม/กรัม)
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	30 °C	Acidolysis (H ₂ SO ₄)	8 วัน	Cu 98% (132 มิลลิกรัม/กรัม)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	30 °C	Complexolysis	8 วัน	Cu 10%
<i>Ps. chlororaphis</i>	25 °C	Complexolysis, Acidolysis (H ₂ SO ₄)	8 วัน	Cu (52%)
<i>Ps. putida</i> (two-step)	30 °C	Complexolysis, Redoxolysis (Fe ³⁺)	7 วัน	Cu 98% (164 มิลลิกรัม/กรัม)
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain FM-3 (การทดลองลำดับที่ 1 จากตารางที่ 3)	30 °C	Redoxolysis (Fe ³⁺)	8 วัน	Cu 73% (221 มิลลิกรัม/กรัม)

*หน่วย มิลลิกรัมทองแดงที่ชะได้ต่อกรัมของผงแผ่นวงจรพิมพ์

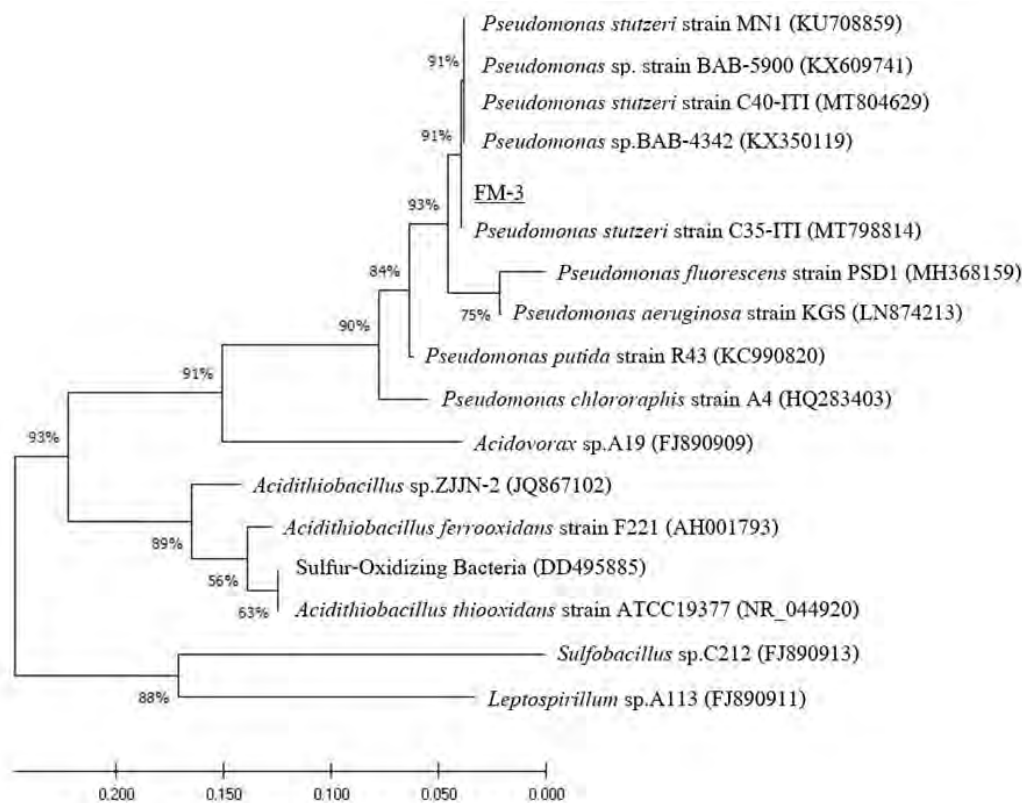
3. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสายวงศ์วานวิวัฒนาการ

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสายวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) สร้างด้วยโปรแกรม MEGA10 โดยวิธี Maximum likelihood โดยสับเปลี่ยนข้อมูล (Bootstrap) 1,000 ครั้ง เปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่คล้ายคลึงในฐานข้อมูล NCBI พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต FM-3 ที่มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียอื่น 5 ไอโซเลต ได้แก่ *Pseudomonas stutzeri* strain

C35-ITI (MT798814) *Pseudomonas stutzeri* strain MN1 (KU708859) *Pseudomonas stutzeri* strain C40-ITI (MT80462) *Pseudomonas* sp. strain BAB-5900 (KX609741) และ *Pseudomonas* sp. BAB-4342 (KX350119) แต่เมื่อนำมาสร้างสายวงศ์วานวิวัฒนาการมีแบคทีเรียเพียงไอโซเลตเดียวที่มีแขนงของสายวงศ์วานวิวัฒนาการ (Tree branch) สายใกล้เคียงกับแบคทีเรียไอโซเลต FM-3 คือ *Pseudomonas stutzeri* strain

C35-ITI (MT798814) ที่ค่าสนับสนุนการสับเปลี่ยน (Bootstrap support) จำนวน 91 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า แบคทีเรียชนิด *Pseudomonas stutzeri* มีความสามารถในการตรึงออกซิเจนโดยอาศัยเอนไซม์ Cytochrome oxidase ซึ่งอาจช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยาในการถ่ายเทอิเล็กตรอนจาก Reduced cytochrome ไปยังออกซิเจน ซึ่งสอดคล้องกลไกการชะละลายทางอ้อมโดยอาศัยเหล็กเฟอร์ริก (Fe^{3+}) เป็นตัวกลางในการชะละลาย ทำให้สามารถออกซิไดซ์เหล็กเฟอร์ริก (Fe^{2+}) และกลายเป็นเหล็กเฟอร์ริก (Fe^{3+}) ซึ่งเหล็กเฟอร์ริกจะเป็นตัวทำ

หน้าที่ออกซิไดซ์ทองแดงให้อยู่ในรูปละลายและยังได้ผลิตภัณฑ์เป็นเหล็กเฟอร์ริก และจะถูกเปลี่ยนกลับไปเป็นเหล็กเฟอร์ริกอีกครั้ง (Cárdenas et al., 2016) และแบคทีเรียชนิดนี้ยังสามารถทนต่อสถานะที่มีทองแดงได้ (Wang et al., 2013) นอกจากนี้ในรูปที่ 1 ยังได้แสดงความสัมพันธ์ของสายวงศ์วานวิวัฒนาการของแบคทีเรียไอโซเลต FM-3 กับแบคทีเรียที่มีความสามารถชะละลายทองแดงจันส์อื่นที่รายงานโดย İşildar et al. (2019) ดังแสดงในตารางที่ 2



รูปที่ 1 สายวงศ์วานวิวัฒนาการของแบคทีเรียไอโซเลต FM-3 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่คล้ายคลึงในฐานข้อมูล NCBI (*Pseudomonas stutzeri* strain C35-ITI; MT798814, *Pseudomonas stutzeri* strain MN1; KU708859, *Pseudomonas stutzeri* strain C40-ITI; MT804629, *Pseudomonas* sp. strain BAB-5900; KX609741, *Pseudomonas* sp. BAB-4342; KX350119 และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน 16s rRNA ของกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการชะละลายทองแดงในฐานข้อมูล NCBI (*Pseudomonas aeruginosa* strain KGS; LN874213, *Pseudomonas fluorescens* strain PSD1; MH368159, *Pseudomonas putida* strain R43; KC990820, *Pseudomonas chlororaphis* strain A4; HQ283403, *Acidovorax* sp. A19; FJ890909, *Acidithiobacillus* sp. ZJJN-2; JQ867102, *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC19377; NR_044920, Sulfur-oxidizing bacteria; DD495885, *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain: F221; AH001793, *Sulfobacillus* sp. C212; FJ890913, *Leptospirillum* sp. A113; FJ890911)

4. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

เมื่อทำการทดลองสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงทั้ง 15 การทดลอง แล้วนำผลการทดลองมาตรวจสอบความเหมาะสมของคุณภาพของข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ความถูกต้องของแบบจำลอง หากข้อมูลมีความเหมาะสมจึงนำมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R-Square; R-Sq) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

4.1 การตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง 3 ขั้นตอน การตรวจสอบการกระจายของค่าส่วนตกค้างในรูปที่ 2ก พบว่า มีการกระจายตัวตามแนวเส้นตรง ค่าส่วนตกค้างมีการแจกแจงแบบปกติ

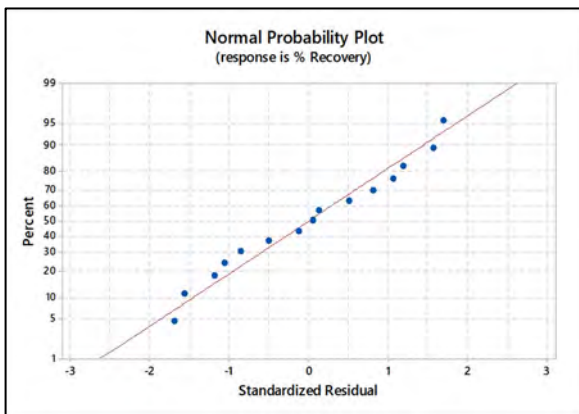
การตรวจสอบความเป็นอิสระของค่าส่วนตกค้างโดยใช้แผนภูมิการกระจาย จากรูปที่ 2ข มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ แสดงว่าข้อมูลมีความเป็นอิสระ

การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวนโดยใช้แผนภูมิการกระจายของส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัย จาก

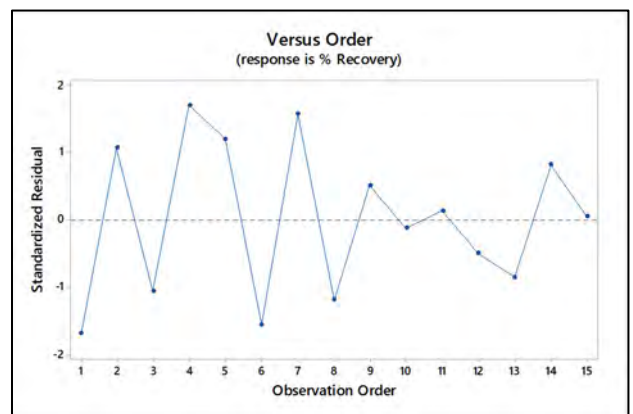
รูปที่ 2ค พบว่าส่วนตกค้างมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอทั้งทางบวกและทางลบ แสดงว่าข้อมูลมีความเสถียรของความแปรปรวน

จากการตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบการทดลอง พบว่าส่วนตกค้างของข้อมูลเป็นไปตามสมมติฐานทั้ง 3 ข้อ จึงสรุปได้ว่าผลการทดลองจากการออกแบบชุดการทดลองแบบ บ็อกซ์-เบห์นเคนมีความถูกต้องและเหมาะสมสำหรับการนำไปวิเคราะห์ปัจจัยหลัก และอันตรากิริยาที่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตอบสนองวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ และวิเคราะห์ความแปรปรวน

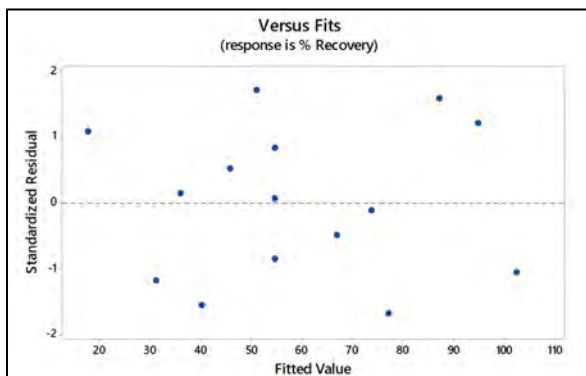
4.2 การวิเคราะห์ปัจจัยหลักและอันตรากิริยาที่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตอบสนอง ปัจจัยที่มีผลต่อสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดง ซึ่งมีค่า P-value น้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ อัตราส่วนผงแผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลาย จำนวนเซลล์แบคทีเรีย และอุณหภูมิ พจนากำลังสองของอัตราส่วนผงแผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลาย ดังในรูปที่ 2ง



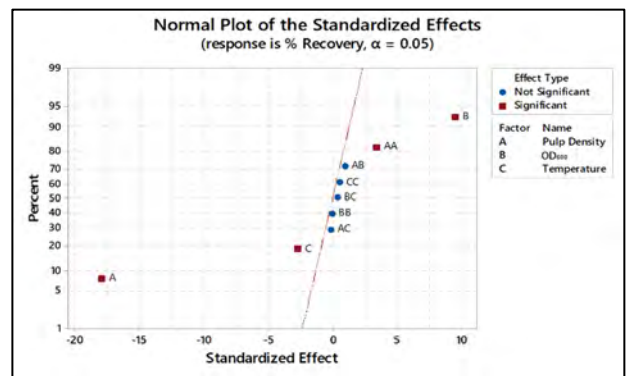
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

รูปที่ 2 (ก) ความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้าง (ข) การกระจายของส่วนตกค้างเทียบกับลำดับของข้อมูล (ค) การกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัย (ง) Normal plot ของปัจจัยหลักและอันตรากิริยาที่มีผลต่อตัวแปรตอบสนอง

ตารางที่ 3 สภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงของแต่ละหน่วยการทดลอง

ลำดับการทดลอง	ปัจจัยที่ศึกษา			ประสิทธิภาพในการชะละลายทองแดง (%)
	(A) อัตราส่วนผงแผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลาย	(B) จำนวนเซลล์แบคทีเรีย	(C) อุณหภูมิ	
1	1	0.5	35	73.37
2	5	0.5	35	20.21
3	1	1.5	35	100.00
4	5	1.5	35	54.83
5	1	1	30	97.37
6	5	1	30	36.87
7	1	1	40	90.54
8	5	1	40	28.71
9	3	0.5	30	46.98
10	3	1.5	30	73.36
11	3	0.5	40	36.36
12	3	1.5	40	65.74
13	3	1	35	51.58
14	3	1	35	57.52
15	3	1	35	54.80

4.3 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Sq) เป็นค่าที่ใช้บอกร้อยละการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามที่สามารถอธิบายได้ด้วยตัวแปรอิสระในสมการถดถอยจากผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์การถดถอยในตารางที่ 4 จะเห็นว่า ค่า R-Sq มีค่าเท่ากับ 0.9885 หมายความว่า ตัวแปรอิสระ (อัตราส่วนผงแผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลาย จำนวนเซลล์แบคทีเรีย และอุณหภูมิ) สามารถอธิบายความผันแปรหรือการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตาม (สภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดง) ได้ร้อยละ 98.85 แสดงว่าแบบจำลองสามารถนำไปสร้างสมการทำนายเพื่อหาค่าผลตอบได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

4.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวน การวิเคราะห์ความแปรปรวนเป็นการตรวจสอบแหล่งผันแปรของแบบจำลอง จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่า ค่า P-value ของเทอมของปัจจัยหลักมีค่าเท่ากับ 0.0003 แสดงว่ามีส่วนโค้งเกิดขึ้นที่พื้นผิวตอบสนอง และเมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ (Lack of fit) พบว่าค่า P-value มีค่าเท่ากับ 0.2666 ซึ่งมีค่ามากกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 จึงไม่สามารถปฏิเสธสมมติฐานหลักได้ แสดงว่า รูปแบบการถดถอยนี้มีความเหมาะสม

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์การถดถอยของพื้นผิวตอบสนอง

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Constant	54.63	2.51	21.74	0
Pulp density	-27.58	1.54	-17.93	0.00001
OD ₆₀₀	14.63	1.54	9.51	0.00022
Temperature	-4.15	1.54	-2.7	0.04281
Pulp density * Pulp density	7.62	2.26	3.36	0.02005

S = 4.3523, R-Sq = 98.85%, R-Sq (Adj) = 84.61%

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดง

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	8172.19	908.02	47.94	0.00025
Linear	3	7936.05	2645.35	139.65	0.00003
Square	3	217.49	72.5	3.83	0.09132
2-Way Interaction	3	18.65	6.22	0.33	0.80599
Error	5	94.71	18.94		
Lack-of-Fit	3	77.02	25.67	2.9	0.2666
Pure Error	2	17.69	8.84		
Total	14	8266.9			

4.5 การสร้างสมการทำนายสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงจากแบคทีเรีย *Pseudomonas stutzeri* strain FM-3 การสร้างสมการทำนายสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงโดยนำค่าปัจจัยที่ได้จากการวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยของสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงมาเขียนให้อยู่ในรูปสมการดังนี้ คือ

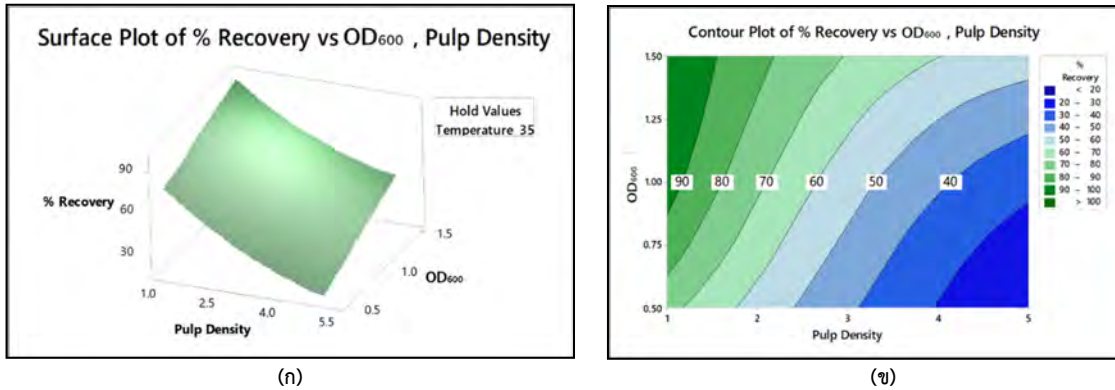
$$\begin{aligned} \%Cu \text{ recovery} = & 180 - 26.04A + 14B - 4.18C \\ & + 1.904A^2 - 0.59B^2 + 0.045C^2 \\ & + 2AB - 0.033AC + 0.3BC \end{aligned}$$

เมื่อ A คือ อัตราส่วนผงแผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลาย B คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรีย และ C คือ อุณหภูมิ

4.6 การสร้างพื้นผิวตอบสนองของสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงจากแบคทีเรีย *Pseudomonas stutzeri* strain FM-3 เมื่อได้สมการสำหรับทำนายสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงแล้ว จึงนำมาสร้างกราฟพื้นผิวผลตอบสนอง และกราฟโครงร่างของสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลาย

กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองของสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงในรูปที่ 3ก ระหว่างจำนวนเซลล์แบคทีเรียกับอัตราส่วนผงแผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลาย โดยอุณหภูมิอยู่ระดับกลาง (35 องศาเซลเซียส) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงจะเพิ่มขึ้น เมื่ออัตราส่วนผงแผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลายลดลง และจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น อาจเนื่องจากเมื่อปริมาณผงแผ่นวงจรพิมพ์ลดลง ปริมาณของทองแดงจึงมีจำนวนน้อยตาม ซึ่งง่ายต่อการชะละลายโดยจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เพิ่มสูงขึ้น

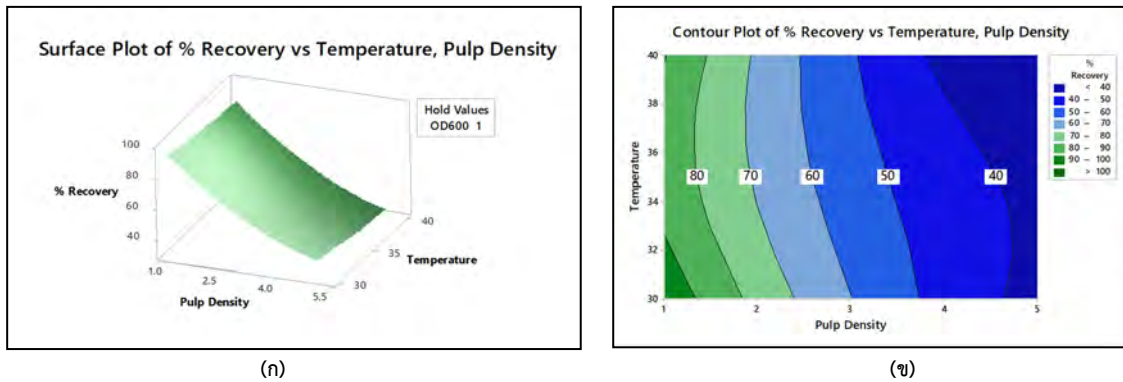
เมื่อนำกราฟพื้นผิวผลตอบสนองของสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงในรูปที่ 3ก มาแสดงในลักษณะกราฟโครงร่างและกำหนดอุณหภูมิอยู่ที่ระดับกลาง จะเห็นความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรียกับอัตราส่วนผงแผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลายที่ ส่งผลต่อสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงมีลักษณะไม่เป็นเส้นตรง ดังรูปที่ 3ข โดยเส้นโค้งซ้ายบนของกราฟ แสดงถึงสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายที่เพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนเซลล์แบคทีเรียเพิ่มสูง และอัตราส่วนผงแผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลายอยู่ในระดับต่ำ



รูปที่ 3 (ก) พื้นผิวผลตอบสนองสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงระหว่างจำนวนเซลล์แบคทีเรียกับอัตราส่วนผงแผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลาย (ข) โครงร่างระหว่างจำนวนเซลล์แบคทีเรียกับอัตราส่วนผงแผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลาย

กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงในรูปที่ 4ก ระหว่างอุณหภูมิกับอัตราส่วนผงแผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลาย โดยให้จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ระดับกลาง ($OD_{600} = 1$) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงจะเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราส่วนผงแผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลาย และอุณหภูมิลดลง อาจเนื่องจากปริมาณผงแผ่นวงจรพิมพ์ลดลง ปริมาณของทองแดงจึงมีจำนวนลดตามไปด้วย ทำให้ง่ายต่อการชะละลาย และแบคทีเรียที่ใช้อยู่ในจีนิส *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Zachariah and Liston, 1973) ความสามารถในการชะละลายจึงเพิ่ม เมื่ออุณหภูมิลดลง

เมื่อนำกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงในรูปที่ 4ก มาแสดงในลักษณะกราฟโครงร่าง และกำหนดจำนวนเซลล์แบคทีเรียอยู่ที่ระดับกลาง จะเห็นความสัมพันธ์ของอุณหภูมิ กับอัตราส่วนผงแผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลาย ที่ส่งผลต่อสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงมีลักษณะไม่เป็นเส้นตรง ดังรูปที่ 4ข โดยเส้นโค้งซ้ายล่างของกราฟ แสดงถึงสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิลดลง และอัตราส่วนผงแผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลายอยู่ในระดับต่ำ



รูปที่ 4 (ก) พื้นผิวผลตอบสนองสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงระหว่างอุณหภูมิ กับอัตราส่วนผง แผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลาย (ข) โครงร่างระหว่างอุณหภูมิ กับอัตราส่วนผงแผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลาย

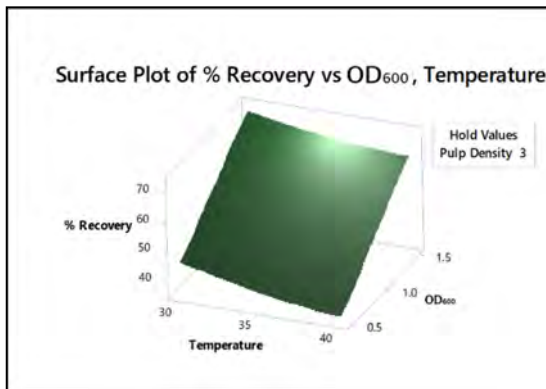
กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงในรูปที่ 5ก ระหว่างจำนวนเซลล์แบคทีเรียกับอุณหภูมิโดยให้อัตราส่วนผงแผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลาง (ผงแผ่นวงจรพิมพ์ร้อยละ 3 ต่อตัวกลาง) การชะละลายอยู่ที่

ระดับกลาง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิลดลง และจำนวนเซลล์แบคทีเรียเพิ่มขึ้น จากที่กล่าวไปในรูปที่ 4ก กลุ่มแบคทีเรียที่ใช้อยู่ในจีนิส

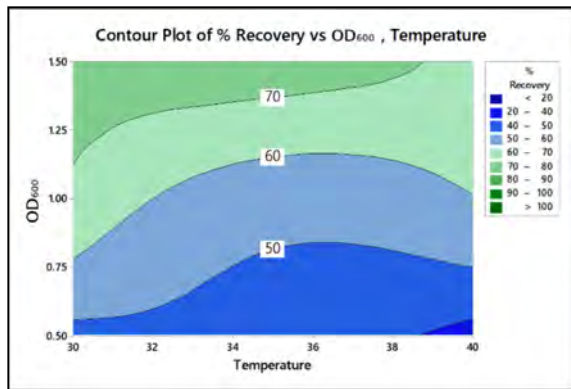
Pseudomonas เป็นแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำ เมื่ออุณหภูมิยิ่งลด สภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายยิ่งสูง

เมื่อนำกราฟพื้นผิวผลตอบสนองของสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงในรูปที่ 5ก มาแสดงในลักษณะกราฟโครงร่าง และกำหนดอัตราส่วนผงแผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลาย อยู่ที่ระดับกลาง จะเห็นความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรีย

กับอุณหภูมิที่ส่งผลต่อสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงมีลักษณะไม่เป็นเส้นตรง ดังรูปที่ 5ข โดยเส้นโค้งซ้ายบนของกราฟ แสดงถึงสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายที่เพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เพิ่มสูง และอุณหภูมิอยู่ในระดับต่ำ



(ก)



(ข)

รูปที่ 5 (ก) พื้นผิวผลตอบสนองของสภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดงระหว่าง จำนวนเซลล์แบคทีเรียกับอุณหภูมิ (ข) โครงร่างระหว่างจำนวนเซลล์แบคทีเรียกับอุณหภูมิ

สรุปผลการวิจัย

จากการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากตะกอนดินและดินธรรมชาติ พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต FM-3 มีความสามารถในการชะละลายทองแดง เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rRNA เทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ NCBI สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้ว่าเป็นแบคทีเรีย *Pseudomonas stutzeri* strain FM-3

เมื่อนำออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยในการชะละลายทองแดง ตามหลักการออกแบบการทดลองแบบบล็อกซ์-เบห์นเคนที่มี 3 ปัจจัยคือ อัตราส่วนผงแผ่นวงจรพิมพ์ต่อตัวกลางการชะละลาย จำนวนเซลล์แบคทีเรีย และอุณหภูมิ ซึ่งทั้ง 3 ปัจจัยมีผลสัมพันธ์กันสามารถแสดงในรูปสมการได้ คือ สภาวะที่เหมาะสมในการชะละลายทองแดง = $180 - 26.04A + 14B - 4.18C + 1.904A^2 - 0.59B^2 + 0.045C^2 + 2AB - 0.033AC + 0.3BC$ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ เท่ากับ 0.9885

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนวิจัยสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านการจัดการสารและของเสียอันตราย จุฬาลงกรณ์-

มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 และ ทุนสนับสนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

- กรมควบคุมมลพิษ. (2550). ยุทธศาสตร์การจัดการซากผลิตภัณฑ์เครื่องใช้ไฟฟ้าและขยะอิเล็กทรอนิกส์เชิงบูรณาการ. สำนักจัดการกากของเสียและสารอันตราย กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. หน้า 23-28.
- ฉวีวรรณ จันทร์เนตร และศรากร อักษรแก้ว. (2560). การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการผลิตโลหะเป้าหมายจากแร่ ที่อยู่ภายใต้การกำกับดูแลของกรมอุตสาหกรรมพื้นฐานและการเหมืองแร่ เพื่อเป็นแนวทางในการรีไซเคิลโลหะ จากของเสียที่มีศักยภาพ. กรมอุตสาหกรรมพื้นฐานและการเหมืองแร่. หน้า 24-25.
- ฉัตรฤดี ศิริลำตวน และอานัติ ตีพิมพ์. (2560). การนำทองแดงกลับมาใช้ใหม่จากสารละลายสังเคราะห์ของสารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับกรดอินทรีย์ที่ได้จากการสกัดขยะอิเล็กทรอนิกส์ด้วยการสกัดทางชีวภาพด้วยเรซิน. วารสารวิจัยสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 10(3): 76-90.
- ชมพูนุท พรหมภักดี. (2554). แนวทางการรับมือปัญหาขยะอิเล็กทรอนิกส์ในประเทศไทย (The ways to cope with the problem of electronic waste in Thailand). สำนักวิชาการ สำนักงานเลขาธิการวุฒิสภา 2(9): 11-15
- นภาพร อรุณเกียรติกิจ และปราโมทย์ ภูพานทอง. (2551). บทที่ 2 เศษทิ้งหรือของเสียอิเล็กทรอนิกส์ (Electronics wastes). ต้นแบบการ

- แยกสกัดโลหะทองแดงจากแผ่นวงจรอิเล็กทรอนิกส์: กรม
อุตสาหกรรมพื้นฐาน และการเหมืองแร่. หน้า 2-8.
อรวรรณ พุทธิสุทธิ และศุภสิทธิ์ แสงกระจ่าง. (2553). ความเป็นพิษของขยะ
อิเล็กทรอนิกส์. วารสารพิษวิทยาไทย 25(1): 67–76.
- Arshadi, M., Mousavi, S. M. and Rasoulnia, P. (2016). Enhancement
of simultaneous gold and copper recovery from
discarded mobile phone PCBs using *Bacillus megaterium*:
RSM based optimization of effective factors and
evaluation of their interactions. *Waste Management* 57:
158–167.
- Cárdenas, J. P., Quatrini, R., and Holmes, D. (2016). Genomic and
metagenomic challenges and opportunities for
bioleaching: a mini- review. *Research in Microbiology*
167(7): 529–538.
- Das, N. (2010). Recovery of precious metals through biosorption - A
review. *Hydrometallurgy* 103(1–4): 180–189.
- Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A. and
Olsen, G. (2008). Critical evaluation of two primers
commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA
genes. *Applied and Environmental Microbiology* 74(8):
2461–2470.
- Ghosh, B., Ghosh, M. K., Parhi, P., Mukherjee, P. S., and Mishra, B. K.
(2015). Waste printed circuit boards recycling: an
extensive assessment of current status. *Journal of
Cleaner Production* 94: 5–19.
- Hubau, A., Minier, M., Chagnes, A., Jouliau, C., Perez, C. and
Guezennec, A. G. (2018). Continuous production of a
biogenic ferric iron lixiviant for the bioleaching of printed
circuit boards (PCBs). *Hydrometallurgy* 180: 180–191.
- Iqbal, A., Ahsan, K., Afzal, S., Shang, Z-H., Sajjad, W., Rehmen, M.,
Usman, K. and Usman, M. (2018). Evaluation of copper
extraction potential of *Pseudomonas aeruginosa* from
low- grade copper ore. *International Journal of
Biosciences* 13(6): 115–121.
- Işıldar, A., Hullebuscha, E. D., Lenz, M., Laing, G. D., Marra, A., Cesaro,
A., Panda, S., Akcil, A., Kucuker, M. A. and Kuchta, K. (2019).
Biotechnological strategies for the recovery of valuable
and critical raw materials from waste electrical and
electronic equipment (WEEE) – a review. *Journal of
Hazardous Materials* 362: 467–481.
- Işıldar, A., Vossenber, J., Rene, E. R., Hullebusch, E. D. and Len, P.
(2016). Two-step bioleaching of copper and gold from
discarded printed circuit boards (PCB) . *Waste
Management* 57: 149–157.
- Kumar, A. (2018). Bioleaching of metals (Cu, Au and Ag) from waste
computer printed circuit boards using cyanogenic
microorganisms. doctor of philosophy. Department of
Biotechnology and Bioinformatics, Jaypee University of
Information Technology, India. 128 pp.
- Liu, R., Li, J. and Ge, Z. (2016). Review on *Chromobacterium
violaceum* for gold bioleaching from e-waste. *Procedia
Environmental Sciences* 31: 947–953.
- Saiden, M. and Tarawneh, A. (2015). Estimation of potential E-waste
generation in Jordan. *Ekoloji* 24(97): 60–64.
- Shabani, M. A., Irannajad, M., Azadmehr, A. R. and Meshkini, M.
(2013). Bioleaching of copper oxide ore by *Pseudomonas
aeruginosa*. *International Journal of Minerals, Metallurgy
and Materials* 20(12): 1130–1133.
- Shang, J. Q. and Liu, P. (2013). Soil cementation generated and
enhanced by electrokinetics. In geotechnical special
publication. In: University of Science and Technology of
China. October 2013. 205–212.
- Silva, R. A., Park, J., Lee, E., Park, J., Choi, S. Q. and Kim, H. (2015).
Influence of bacterial adhesion on copper extraction from
printed circuit boards. *Separation and Purification
Technology* 143: 169–176.
- Stackebrandt, E. and Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place
for DNA- DNA reassociation and 16s rRNA sequence
analysis in the present species definition in bacteriology.
International Journal of Systematic Bacteriology 44(4):
846–849.
- Tsydenova, O. and Bengtsson, M. (2011). Chemical hazards
associated with treatment of waste electrical and
electronic equipment. *Waste Management* 31(1): 45–58.
- Wang, G-W., Chen, T-H., Yue, Z-B., and Wang, J. (2013). Isolation and
characterization of *Pseudomonas stutzeri* capable of
reducing Fe (III) and nitrate from skarn-type copper mine
tailings. *Geomicrobiology* 10: 16–19.
- Zachariah, P. and Liston, J. (1973). Temperature adaptability of
psychrotrophic *Pseudomonas*. *Applied Microbiology*
26(3): 437–438.
- Zhang, L. and Xu, Z. (2016). A review of current progress of recycling
technologies for metals from waste electrical and
electronic equipment. *Journal of Cleaner Production* 127:
19–36.

