การบำบัดเฮกซะวาเลนท์โครเมียมด้วยแหนแดง

Phytoremediation of Hexavalent Chromium by *Azolla pinnata*

พัชรี สินธุนาวา[1] และจันทร์เพ็ญ มะลิพันธ์[2*]
Patcharee Sinthunawa[1] and Chanphen Malipant[2*]

บทคัดย่อ

เฮกซะวาเลนท์โครเมียมเป็นโลหะหนักที่มีการใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรม เมื่อเฮกซะวาเลนท์โครเมียมปนเปื้อนในแหล่งน้ำก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม การบำบัดด้วยพืชเป็น เทคโนโลยีที่ใช้พืชมาดูดซับสิ่งปนเปื้อนในดินและน้ำ พืชที่สะสมโลหะหนักในตัวเองได้สูงเรียกว่า พืชสะสมโลหะหนักได้ดี (hyperaccumulator) ซึ่งแหนแดงก็เป็นหนึ่งในนั้น ในการวิจัยครั้งนี้ เป็นการศึกษาประสิทธิภาพการเป็นพืชบำบัดของแหนแดง ในการกำจัดเฮกซะวาเลนท์โครเมียม ในน้ำสังเคราะห์ โดยใช้แหนแดง 50 กรัม ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีเฮกซะวาเลนท์โครเมียม ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0 (ชุดควบคุม), 1.1, 5.9, 12 และ 53 ppm ในน้ำเสียเฮกซะวาเลนท์โครเมียม สังเคราะห์ปริมาตร 5 ลิตร pH ช่วง 6.5-7.5 อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างแหนแดงในวันที่ 5, 10 และ15 วัดปริมาณน้ำหนักสด การเจริญเติบโตสัมพัทธ์ และการเจริญเติบโตเป็นสองเท่า ผลการศึกษาในระยะเวลา 15 วันของการวิจัยพบว่า การเจริญเติบโตสัมพัทธ์ในชุดทดลองลดลงร้อยละ 28.39-89.22 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม การเจริญเติบโตเป็นสองเท่าในชุดทดลองคือ 6.24 วัน การกำจัดโครเมียมที่ความเข้มข้น 1.1, 5.9, 12 และ 53 ppm คือ 0.33, 1.03, 2.70 และ 4.00 ppm ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากผลการวิจัยแสดงว่าสามารถใช้แหนแดง ในการกำจัดโครเมียมในแหล่งน้ำได้

คำสำคัญ: การบำบัดด้วยพืช แหนแดง เฮกซะวาเลนท์โครเมียม

Received: 20 November 2020; Accepted: 20 December 2021

[1] สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา 13000
[1] Division of Microbiology, Faculty of Science and Technology, Phranakhon Si Ayutthaya Rajabhat University, Phranakhon Si Ayutthaya, 13000
[2] สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา 13000
[2] Division of Food Science and Technology, Faculty of Science and Technology, Phranakhon Si Ayutthaya Rajabhat University, Phranakhon Si Ayutthaya, 13000
* Corresponding author: patcharee_pra@yahoo.com

Abstract

Hexavalent chromium is a compound widely used in industry, contaminated in water, and causing environmental problems. Phytoremediation is a technology that uses various plants to adsorb contaminants from soil and water. Plants that can accumulate high amounts of heavy metals are called hyperaccumulators and one of them is the water fern *A. pinnata*. This study aimed to investigate the phytoremediation potential of *A. pinnata* for the removal of hexavalent chromium from synthetic solutions. *A. pinnata* 50 g was cultured on synthetic solution containing hexavalent chromium ions at concentrations 0 (control), 1.1, 5.9, 12 and 53 ppm in 5l synthetic solution at pH 6.5-7.5 and temperature 28-30°C. *A. pinnata* was harvested at 5, 10 and 15 days and wet weight was obtained to determine relative growth and doubling time. During the 15 days of the experiment, biomass productivity and relative growth of *A. pinnata* were decreased by 28.39 - 89.22% in the treatments compared to the controls. The control has a doubling time of 6.24 days. The removal of hexavalent chromium by *A. pinnata* revealed that at initial hexavalent chromium concentration of 1.1, 5.9, 12 and 53 ppm, were respectively absorbed 0.33, 1.03, 2.70 and 4.00 ppm which was significantly different at 0.05 statistical level. These results suggest that *A. pinnata* could be considered for the removal of hexavalent chromium from water.

Keywords: phytoremediation, Azolla pinnata, hexavalent chromium

บทนำ

สารโลหะหนักที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตเมื่อปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติเป็นสาเหตุให้เกิด ความเป็นพิษ ทั้งในแหล่งน้ำดื่ม แหล่งน้ำใช้ รวมถึงแหล่งน้ำทางการเกษตร โลหะหนักที่อันตรายหากไม่มี การกำจัดที่ถูกวิธีจะก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพอนามัย ทรัพย์สินและสิ่งแวดล้อมได้ อันตรายของ โลหะหนักต่อสิ่งแวดล้อมที่สำคัญมี 3 ประการ คือ การคงอยู่ของโลหะหนัก การสะสมทางชีวภาพ และ ความเป็นพิษ โลหะหนักเป็นสารเคมีตกค้างที่ไม่สามารถย่อยสลายได้มีระยะเวลาคงอยู่ยาวนานในสิ่งแวดล้อมและค่อย ๆ เข้าสู่ห่วงโซ่อาหารผ่านสัตว์และพืช โดยพืชจะดูดและสะสมโลหะหนักไว้ที่ส่วนต่าง ๆ ของพืช และเมื่อสัตว์ไปกินพืชโลหะหนักจะถ่ายทอดมาที่สัตว์ เมื่อโลหะหนักสะสมในระดับที่สูงขึ้นจะก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ (Mandakini *et al*., 2016) โลหะหนักชนิดหนึ่งที่ใช้ในอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย คือ โครเมียมและสารประกอบโครเมียม ที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น การชุบด้วยไฟฟ้า การฟอกหนัง การทำตู้เย็น การผลิตเยื่อกระดาษ แร่ และการกลั่นน้ำมันปิโตรเลียม

โครเมียมและสารประกอบโครเมียมมีหลายกลุ่มโดยแบ่งตามวาเลนท์ (valence) ได้แก่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 6 (จิระฉัตร, 2555) โครเมียมเฮกซะวาเลนท์มีความเป็นพิษทั้งต่อพืชและสัตว์ โดยเป็นสารออกซิไดซ์ที่รุนแรงและเป็นสารก่อมะเร็ง น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมประกอบด้วยโครเมียมชนิดเฮกซะวาเลนท์โครเมียม และไตรวาเลนท์โครเมียม ส่วนใหญ่มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 10 - 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (Park *et al*., 2004) การได้รับโครเมียมความเข้มข้นสูงทำให้มีผลต่อทางเดินอาหาร และปอดได้ (Andrew *et al*., 2014) ความเป็นพิษของโครเมียมถ้าได้รับปริมาณมากกว่า 50-70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว จะส่งผลกระทบต่อตับ ไต และระบบเลือด แบบเฉียบพลัน ทำให้เกิดอาการ อาเจียน อุจจาระร่วง ตกเลือด มีเลือดไหลเข้าสู่ลำไส้ และอาจเสียชีวิตได้ (จินตนา, 2541) ตามประกาศของกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เรื่องกำหนดมาตรฐานควบคุมการระบาย น้ำทิ้งจากโรงงาน

อุตสาหกรรม นิคมอุตสาหกรรม และเขตประกอบการอุตสาหกรรม กำหนดให้น้ำทิ้ง มีปริมาณโครเมียมชนิดเฮกซะวาเลนท์ ไม่เกิน 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และโครเมียมไตรวาเลนท์ไม่เกิน 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร (กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2559) ดังนั้นน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีโครเมียมเป็นองค์ประกอบต้องผ่านการบำบัดน้ำเสียเพื่อลดการปนเปื้อนของโครเมียมก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนโครเมียมจากโรงงานอุตสาหกรรมมีหลายวิธี เช่น การตกตะกอนโลหะหนัก (chemical precipitation) การเร่งปฏิกิริยาด้วยแสง (photocatalysis) การแลกเปลี่ยนไอออน (Ion exchange) การกรองด้วยเยื่อเมมเบรน (membrane filtration) การกรองด้วยเมมเบรนที่มีรูขนาดเล็ก (ultrafiltration) การรีเวิร์สออสโมซีส (reverse osmosis) การแยกกรองด้วยไฟฟ้า (electrodialysis) (Kanamarlapudi *et al.*, 2018) การระเหย การสกัดกลับคืนด้วยไฟฟ้า การสกัดด้วยตัวทำละลายและการเติมโอโซน เป็นต้น (พอตา, 2548) ซึ่งวิธีการทั้งหลายเหล่านี้มีค่าใช้จ่ายในการจัดการสูง มีการกำจัดโลหะที่ไม่สมบูรณ์ ต้องการพลังงาน และเกิดการสร้างตะกอนพิษหรือของเสียอื่น ๆ ที่ต้องมีการกำจัด หรือบำบัดเพิ่มเติม แต่วิธีการทั่วไปสำหรับกำจัดโลหะหนักที่เป็นพิษจะไม่ได้ผลเมื่อระดับความเข้มข้นของโลหะหนักในน้ำเสียต่ำมาก (ระหว่าง 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (Volesky, 1990)

การบำบัดด้วยพืช (phytoremediation) เป็นเทคนิคที่นำพืชมาลด แยก บรรจุ หรือตรึงสิ่งปนเปื้อนที่อยู่ในน้ำหรือในดิน ซึ่งวิธีการนี้มีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม คุ้มค่า และประหยัดพลังงาน พืชที่เต็มไปด้วยสารปนเปื้อนต้องนำออกจากแหล่งได้ง่าย และสามารถนำไปทำแห้งเผาเป็นเถ้าหรือหมักเป็นปุ๋ยได้ กลไกการบำบัดด้วยพืชมี 6 ลักษณะ ประกอบด้วยการสกัดด้วยพืช (phytoextraction) การย่อยสลายด้วยพืช (phytodegradation) การระเหยด้วยพืช (phytovolatilization) การตรึงด้วยพืช (phytostabilization) การย่อยสลายด้วยรากพืช (rhizodegradation) และการกรองด้วยรากพืช (rhizofiltration) (Sachdeva and Sharma, 2012) ความสามารถของพืชที่จะนำมาใช้สำหรับบำบัด ขึ้นอยู่กับปริมาณโลหะหนักที่สามารถสะสมในพืช และอัตราการเจริญเติบโตของพืช คุณสมบัติของพืช ที่ใช้เป็นพืชบำบัดจำเป็นต้องทนต่อมลพิษ เจริญเติบโตได้เร็ว สะสมโลหะหนักได้มาก สามารถเก็บเกี่ยว หรือแยกจากสิ่งแวดล้อมได้ ซึ่งพบว่ามีพืชที่สะสมโลหะได้ดี (hyperaccumulator) มากกว่า 400 ชนิด แหนแดงก็เป็นหนึ่งในนั้น

แหนแดงเป็นพืชที่อยู่รวมกันแบบภาวะพึ่งพากันกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินพวก *Nostoc* และ *Anabaena* สาหร่ายกลุ่มนี้มีความสามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศได้ แหนแดงจึงเจริญได้ในแหล่งน้ำที่ขาดไนโตรเจน (Arora *et al.*, 2006) ทำให้สามารถใช้แหนแดงเป็นแหล่งปุ๋ยไนโตรเจนให้กับนาข้าว ทำให้ต้นข้าวแข็งแรง น้ำหนักเมล็ดข้าวเพิ่มขึ้น และทำให้ดินในนาข้าวดีขึ้นด้วย นอกจากมีคุณสมบัติเป็นปุ๋ยที่ดีในธรรมชาติแล้ว แหนแดงสามารถดูดซับโลหะหนักในแหล่งน้ำได้ เมื่อเลี้ยงแหนแดงเพื่อผลิตปุ๋ยไนโตรเจนให้กับข้าวในนาแล้ว แหนแดงสามารถลดความเป็นพิษของโครเมียมที่จะเกิดกับต้นข้าว โดยแหนแดงจะเคลื่อนย้ายโครเมียมเข้าสะสมบริเวณราก ลำต้น และใบ แต่เมื่อโครเมียมสะสมในเซลล์มากขึ้นส่งผลให้แหนแดงมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง เนื่องจากโครเมียมไปผลต่อการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ ปฏิกิริยาของฮิลล์ (Hill reaction) ปริมาณโปรตีนในเนื้อเยื่อ และออกซิเดทีฟ เอนไซม์ลดลง (Sarkar and Jana, 1986; Pati and Satapathy, 2016)

ในปัจจุบันมีงานวิจัยด้านการบำบัดด้วยพืช (phytoremediation) โดยใช้แหนแดงบำบัด โลหะหนัก เช่น การศึกษาความสามารถของแหนแดง *A. caroliniana* ในการกำจัดโลหะหนัก ปรอท ไตรวาเลนท์โครเมียม เฮกซะวาเลนท์โครเมียม จากน้ำเสียบ้านเรือน พบว่าใน 12 วัน แหนแดงในน้ำเสีย ที่มีโครเมียมเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ลดโครเมียมได้ร้อยละ 100 (Bennicelli *et al.*, 2004) การศึกษาความทนและการสะสมโครเมียมของแหนแดง 3 ชนิด พบว่าแหนแดงชนิด *A. microphylla* มีศักยภาพในการสะสมโครเมียมทางชีวภาพ (bioconcentration potential) สูงสุด (Arora *et al.*, 2006) การศึกษาการสะสมโลหะหนักโดยแหนแดง (*A. pinnata*) ในทะเลสาบพบว่า แหนแดงมีความทนต่อโลหะหนักดังนี้ Zn>Cu>Pb>Cr>Cd ตามลำดับ (Shafi *et al.*, 2015) งานวิจัยของ Pati และ Satapathy ในปี 2016 ใช้แหนแดง และจอกหูหนูยักษ์ ในการกำจัดโครเมียมพบว่า มีประสิทธิภาพ การกำจัดโครเมียมร้อยละ70-90 ที่ความเข้มข้น0.07-0.13 มิลลิกรัมต่อลิตร และการศึกษาการกำจัด โครเมียมและทองแดงโดยใช้แหนแดง และผักตบชวา ที่ความเข้มข้นโครเมียม 10 ppm มีประสิทธิภาพ การกำจัดร้อยละ 62.5 ในเวลา 28 วัน (Pandharipande and Gadpayle, 2016)

ในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแหนแดงในการเป็นพืชบำบัดเฮกซะวาเลนท์โครเมียมในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยใช้แหนแดง (*A.*

pinnata) ที่เลี้ยงไว้ในโรงเรือนของ สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมแหนแดง

การเตรียมแหนแดง (*Azolla pinnata*) โดยนำแหนแดงที่เลี้ยงไว้ในบ่อของโรงเรือนเพาะปลูก ของสาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา นำมาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ที่ล้างสะอาด และตากไว้จนแห้ง ขนาด 3 x 1 เมตร ในบ่อบรรจุน้ำประปาที่พักให้คลอรีนหมดแล้วสูง 20 เซนติเมตร ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร16-16-16 เพื่อป้องกันสารปนเปื้อนโลหะหนัก ใส่แหนแดงไปลงไปพื้นที่ครึ่งหนึ่งของบ่อ เลี้ยงจนแหนแดงเต็มบ่อแล้วแยกแหนแดงออกมาครึ่งหนึ่ง แล้วเลี้ยงต่อไปจนเต็มบ่อ ทำแบบนี้ 3 ครั้ง ก่อนนำแหนแดงมาวิจัย

การคัดเลือกแหนแดง

การคัดเลือกแหนแดง งานวิจัยนี้เลือกแหนแดงที่มีอายุใกล้เคียงกันจากขนาดของแหนแดง โดยคัดเลือกแหนแดงที่สามารถผ่านช่องสี่เหลี่ยมขนาด 1.27 x 1.27 เซนติเมตร และไม่ผ่านช่องที่มีขนาด 1 x 1 เซนติเมตร เพื่อนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร IRRI 2 (Pereira and Carrapico, 2009) เป็นเวลา 13 - 15 วัน แหนแดงที่เจริญในอาหารนำมาคัดเลือกอีกครั้งด้วยช่องขนาดเดิมข้างต้น แล้วนำมาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน ซับด้วยกระดาษทิชชู และผึ่งลมให้แห้งก่อนนำไปใช้

การเตรียมน้ำเสียเฮกซะวาเลนท์โครเมียมสังเคราะห์

การเตรียมน้ำเสียเฮกซะวาเลนท์โครเมียมสังเคราะห์ใช้อาหารสูตร IRRI 2 สำหรับเลี้ยงแหนแดง แล้วเติมโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) เพื่อเป็นตัวแทนของโครเมียมเฮกซะวาเลนท์

โดยเตรียมโครเมียมความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

ชุดควบคุม อาหารสูตร IRRI 2

ชุดทดลองที่ 1 อาหารสูตร IRRI 2 + เฮกซะวาเลนท์โครเมียม เข้มข้นประมาณ 1 ppm

ชุดทดลองที่ 2 อาหารสูตร IRRI 2 + เฮกซะวาเลนท์โครเมียม เข้มข้นประมาณ 5 ppm

ชุดทดลองที่ 3 อาหารสูตร IRRI 2 + เฮกซะวาเลนท์โครเมียม เข้มข้นประมาณ 10 ppm

ชุดทดลองที่ 4 อาหารสูตร IRRI 2 + เฮกซะวาเลนท์โครเมียม เข้มข้นประมาณ 50 ppm

น้ำเสียเฮกซะวาเลนท์โครเมียมสังเคราะห์ในแต่ละชุดทดลองประกอบด้วย น้ำเสียเฮกซะวาเลนท์โครเมียมสังเคราะห์ปริมาตร 45 ลิตร ปรับให้มี pH ช่วง 6.5-7.5 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ แต่ละชุดทดลองเตรียมครั้งเดียว นำไปวิเคราะห์ปริมาณโครเมียมเริ่มต้นแล้วแบ่งใส่ในอ่างพลาสติกขนาด 28 x 28 x15 เซนติเมตร จำนวน 9 ใบ ใบละ 5 ลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เพื่อเก็บตัวอย่าง 3 วัน คือ เก็บข้อมูลในวันที่ 5, 10 และวันที่ 15

การวิเคราะห์ปริมาณเฮกซะวาเลนท์โครเมียม

น้ำเสียเฮกซะวาเลนท์โครเมียมสังเคราะห์ส่งตรวจวิเคราะห์ที่บริษัท ศูนย์วิเคราะห์น้ำ จำกัด จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ซึ่งวิเคราะห์โครเมียมด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer

การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเฮกซะวาเลนท์โครเมียม

1. รูปแบบการวิจัยเป็นแบบสุ่มตลอด (CRD) เปรียบเทียบการประสิทธิภาพการดูดซับ เฮกซะวาเลนท์โครเมียมของแหนแดงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำ 3 ซ้ำ คัดเลือกแหนแดงช่วงเดียวกัน จากขนาดที่ใกล้เคียงกัน มาเลี้ยงในอาหารสูตร IRRI 2 ที่ความเข้มข้นของเฮกซะวาเลนท์โครเมียมประมาณ 0, 1, 5, 10 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) จำนวนวันที่เลี้ยงแหนแดงในน้ำเสียสังเคราะห์ คือ15 วัน นำแหนแดงมาชั่งน้ำหนักในวันที่ 5, 10 และ 15

2. การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเฮกซะวาเลนท์โครเมียมในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยใช้แหนแดงน้ำหนักประมาณ 50 กรัม ในน้ำเสียเฮกซะวาเลนท์โครเมียมสังเคราะห์ปริมาตร 5 ลิตร เลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ให้แสงสว่างตามธรรมชาติประมาณ 8 ชั่วโมงต่อวัน (เนื่องจากได้ทำการวิจัย ในครั้งแรกพบว่า เมื่อเปิดไฟให้แสงสว่างในชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแสงสว่างใกล้แหนแดงมากเกินไปทำให้ แหนแดงตายภายใน 5 วัน การวิจัยจึงไม่เห็นผล เพราะแหนแดงไม่ชอบแสงมาก) อุณหภูมิน้ำทุกตัวอย่าง ประมาณ 28 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้องประมาณ 30 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชในน้ำเสีย โดยใช้ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ให้มีพีเอชประมาณ 6.5-7.5 (น้ำเสียสังเคราะห์เฮกซะวาเลนท์โครเมียม มีความเป็นกรดสูง ซึ่งไม่เหมาะต่อการเจริญของแหนแดงจึงต้องปรับพีเอชให้เหมาะสมกับการเจริญ) และเติมน้ำที่มีสารอาหารสูตร IRRI 2 เมื่อน้ำระเหยไปมาก

3. วิเคราะห์ปริมาณเฮกซะวาเลนท์โครเมียมในน้ำเสียก่อนและหลังจากบำบัดน้ำโดยแหนแดง แล้วนำข้อมูลที่ได้มาศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเฮกซะวาเลนท์โครเมียมในน้ำ (Removal efficiency) จากสูตร (Abu Bakar *et al*., 2013)

$$\text{ประสิทธิภาพการบำบัด} = \frac{(\text{ความเข้มข้นโลหะหนักเริ่มต้น-ความเข้มข้นโลหะหนักสุดท้าย})}{\text{ความเข้มข้นโลหะหนักเริ่มต้น}} \times 100$$

การศึกษาการเจริญเติบโตของแหนแดงในน้ำเสียเฮกซะวาเลนท์โครเมียมสังเคราะห์

1. ศึกษาการเจริญเติบโตเป็นสองเท่าของแหนแดง โดยชั่งน้ำหนักของแหนแดงก่อนการดูดซับเฮกซะวาเลนท์โครเมียม แล้วนำแหนแดงมากรองบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 ซับจนแห้ง และชั่งน้ำหนัก ทุก ๆ 5 วัน ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.การเจริญเติบโตของแหนแดงเป็นสองเท่า คำนวณจากสมการของ Aziz และ Watanabe (1983)

Doubling time = t/r ซึ่ง

T = เวลาที่แหนเจริญเติบโต

r = [log(wt/wo)/0.301]

wt = น้ำหนักแหนที่เวลาใด ๆ

wo = น้ำหนักของแหนที่เวลาเริ่มต้น

3.ร้อยละการเจริญของแหนแดงที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบ เทียบกับชุดควบคุม คำนวณจากสูตร (Arora *et al*., 2006)

$$\text{ร้อยละการเจริญเติบโตแหนแดง} = \frac{(\text{น้ำหนักแหนแดงของชุดทดลอง–น้ำหนักแหนแดงของชุดควบคุม})}{\text{น้ำหนักแหนแดงของชุดควบคุม}} \times 100$$

4.การเจริญเติบโตสัมพัทธ์ของพืช คำนวณจากสูตร (Lu *et al*., 2004)

$$\text{การเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (\textbf{Relative growth})} = \frac{\text{น้ำหนักสดสุดท้าย}}{\text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}$$

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การคำนวณน้ำหนักแหนแดงใช้ค่าเฉลี่ยของข้อมูล วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one –way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย (Post hoc test-LSD) (p = 0.05) จากการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่าง และจัดกลุ่ม

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

ประสิทธิภาพการกำจัดเฮกซะวาเลนท์โครเมียมของแหนแดง

การเตรียมความเข้มข้นของเฮกซะวาเลนท์โครเมียมในน้ำเสียสังเคราะห์เริ่มต้นในแต่ละชุดทดลอง มีปริมาณเฮกซะวาเลนท์โครเมียมเริ่มต้นดังนี้ ชุดทดลองที่ 1 มีปริมาณเฮกซะวาเลนท์โครเมียม 1.1 ppm ชุดทดลองที่ 2 มีปริมาณเฮกซะวาเลนท์โครเมียม 5.9 ppm ชุดทดลองที่ 3 มีปริมาณเฮกซะวาเลนท์ โครเมียม 12 ppm และชุดทดลองที่ 4 มีปริมาณเฮกซะวาเลนท์โครเมียม 53 ppm ปริมาตรน้ำเสีย สังเคราะห์ 5 ลิตร ต่อแหนแดงประมาณ 50 กรัม พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของเฮกซะวาเลนท์โครเมียม แตกต่างกัน คือ 1.1, 5.9, 12 และ53 ppm การกำจัดเฮกซะวาเลนท์โครเมียมของแหนแดงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยแหนแดงดูดซึมเฮกซะวาเลนท์โครเมียมออกจากน้ำเสียสังเคราะห์ได้ 0.33, 1.03, 2.7 และ 4 ppm. ตามลำดับ เมื่อคำนวณประสิทธิภาพการกำจัดเฮกซะวาเลนท์โครเมียมที่ความเข้มข้นของ โครเมียม 1.1, 5.9, 12 และ 53 ppm พบว่าแหนแดงกำจัดเฮกซะวาเลนท์โครเมียมได้ร้อยละ 30.0, 17.45, 22.50 และ 7.55 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ความสามารถในการบำบัดเฮกซะวาเลนท์ โครเมียมในงานวิจัยนี้ มีความใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Pandharipande และ Gadpayle (2016) ที่ศึกษาความสามารถของแหนแดง (*A. pinnata*) บำบัด

เฮกซะวาเลนท์โครเมียมที่ความเข้มข้น 10 ppm ในเวลา 14 วัน แหนแดงกำจัดเฮกซะวาเลนท์โครเมียมได้ร้อยละ 36 ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้ คือ ที่ความเข้มข้นเฮกซะวาเลนท์โครเมียม 12 ppm แหนแดงบำบัดเฮกซะวาเลนท์โครเมียมได้ร้อยละ 22.50 งานวิจัยส่วนใหญ่ศึกษาการบำบัดเฮกซะวาเลนท์โครเมียมที่ช่วงความเข้มข้นระหว่าง 1-20 ppm โดยใช้แหนแดงที่มีชีวิต (Bannicelli *et al*., 2004; Arora *et al*., 2006; Rai, 2009; Pati and Satapathy 2016; Pandharipande and Gadpayle 2016) ส่วนที่ความเข้มข้นของ เฮกซะวาเลนท์โครเมียม 53 ppm ไม่พบงานวิจัยที่ใช้แหนแดงที่มีชีวิตบำบัดเฮกซะวาเลนท์ โครเมียมที่มีความเข้มข้นสูงเช่นนี้ แต่พบในการบำบัดเฮกซะวาเลนท์โครเมียมโดยใช้ผักตบชวา (Pandharipande and Gadpayle, 2016) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกที่ความเข้มข้นของเฮกซะวาเลนท์โครเมียมที่ 50 ppm ด้วย เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของแหนแดงในการเป็นพืชบำบัดโลหะหนัก ผลการวิจัยพบว่า แหนแดงไม่มีการเจริญเติบโต แต่มีความสามารถในการบำบัดเฮกซะวาเลนท์ โครเมียมได้ถึง 4 ppm ซึ่งสูงที่สุดในงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นของเฮกซะวาเลนท์ โครเมียมสูง ๆ แหนแดงสามารถบำบัดเฮกซะวาเลนท์โครเมียมได้มากขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากที่ระดับความเข้มข้นของเฮกซะวาเลนท์โครเมียมสูง การแพร่ของเฮกซะวาเลนท์โครเมียมเข้าสู่เซลล์จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว และปริมาณที่สูงกว่าระดับความเข้มข้นต่ำ แหนแดงจึงมีความสามารถสะสมเฮกซะวาเลนท์โครเมียมที่ความเข้มข้นสูงได้มากกว่าความเข้มข้นต่ำ

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพการกำจัดโครเมียมในระยะเวลา 15 วัน

การทดลอง	**ความเข้มข้นเฮกซะวาเลนท์โครเมียมเริ่มต้น (ppm)**	**ความเข้มข้นเฮกซะวาเลนท์โครเมียมวันสุดท้าย (ppm)**	**การกำจัดโครเมียม (ppm)**	**ประสิทธิภาพการกำจัดโครเมียม (%)**
Control	0	0	0	0
1	1.1	0.77±0.09	0.33[a]	30.00
2	5.9	4.87±0.25	1.03[b]	17.45
3	12	9.30±0.26	2.70[c]	22.50
4	53	49.0±1.00	4.00[d]	7.55

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b, c, d ในการกำจัดโครเมียมของแหนแดงแต่ละความเข้มข้น แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ วิเคราะห์โดย one-way ANOVA และ post-hoc test-LSD (p= 0.05)

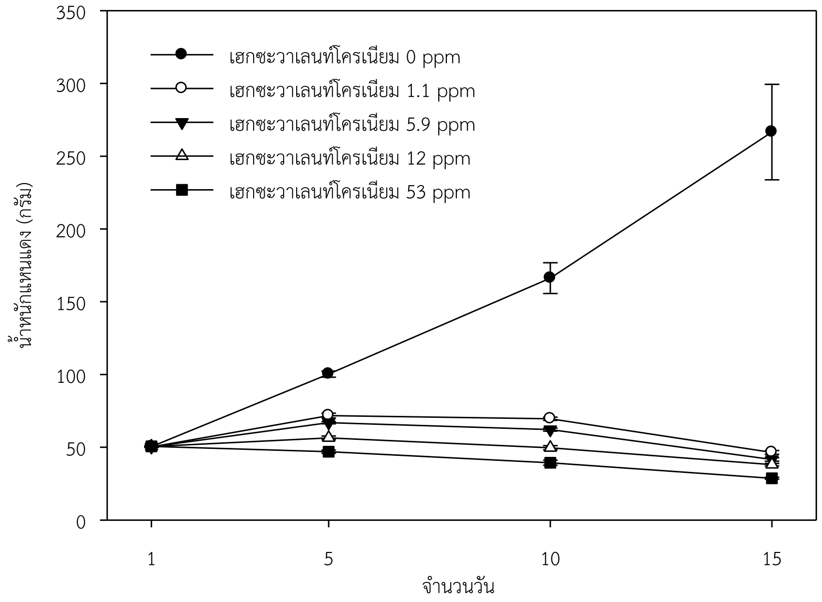
ผลการเจริญของแหนแดงในน้ำเสียเฮกซะวาเลนท์โครเมียมสังเคราะห์

ผลของโครเมียมต่อการเจริญของแหนแดงพบว่า ชุดทดลองที่ความเข้มข้นของเฮกซะวาเลนท์ โครเมียมต่ำ คือ ไม่เกิน 10 ppm แหนแดงสามารถเจริญเติบโตในสภาวะนี้ได้ประมาณ 10 วัน และตายทั้งหมดในวันที่ 15 สังเกตจากแหนแดงจมน้ำทั้งหมด ส่วนชุดทดลองที่ความเข้มข้นเฮกซะวาเลนท์ โครเมียมสูงกว่า 10 ppm แหนแดงจะตายทั้งหมดภายในวันที่ 10 น้ำหนักแหนแดงในแต่ละช่วงเวลา แสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 1

ตารางที่ 2 น้ำหนักแหนแดงสดแต่ละช่วงเวลา

การทดลอง	**เฮกซะวาเลนท์โครเมียม(ppm)**	**น้ำหนักแหนแดงเริ่มต้น (g)**	**น้ำหนักแหนแดงวันที่ 5 (g)**	**น้ำหนักแหนแดงวันที่ 10 (g)**	**น้ำหนักแหนแดงวันที่ 15(g)**
control	0	50.40 ±0.11	100.27 +2.14	166.20±10.61	266.59±32.83
1	1.1	50.28 ±0.21	71.80 +1.65	69.61 ±1.07	46.46±1.28
2	5.9	50.31 ±0.35	66.88 +0.70	62.14 ±1.02	41.64 ±1.19
3	12.0	50.52 ±0.12	56.48 +1.26	49.68 ±1.47	38.04 ±0.89
4	53.0	50.59 ±0.41	46.97 +1.12	39.41 ±1.70	28.73 ±0.62

หมายเหตุ น้ำหนักแหนแดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 3 ซ้ำ



ภาพที่ 1 น้ำหนักของแหนแดงที่ความเข้มข้นของเฮกซะวาเลนท์โครเมียม

เมื่อนำน้ำหนักแหนแดงสดของชุดทดลองมาคำนวณร้อยละการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่3) เมื่อชุดควบคุมคือการเจริญปกติของแหนแดงในอาหารที่ไม่มีเฮกซะวาเลนท์โครเมียม เท่ากับร้อยละ 100 พบว่าชุดทดลองทั้งหมดมีอัตราการเจริญไปในแนวทาง เดียวกัน คือ การเจริญต่ำกว่าชุดควบคุม โดยในชุดทดลองที่ความเข้มข้น 1.1 ppm, 5.9 ppm, 12 ppm และ 53 ppm ในวันที่ 15 มีอัตราการเจริญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมลดลงร้อยละ 82.57, 84.38, 85.73 และ89.22 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Arora *et al*. (2006) ที่ศึกษาความทนของ แหนแดง 3 ชนิดพบว่า แหนแดงที่เลี้ยงในอาหารเฮกซะวาเลนท์โครเมียมสังเคราะห์มีอัตราการเจริญ ต่ำกว่าชุดควบคุมทั้งหมด ที่ความเข้มข้น 1 ppm ระยะเวลา 7 วัน มีการเจริญเติบโตต่ำกว่าชุดควบคุมตั้งแต่ร้อยละ 28-54 และสอดคล้องกับการทดลองของ Bennicelli *et al*. (2014) ที่พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของ *A. caroliniana* ลดลงร้อยละ 27 ในเวลา 12 วัน ที่ความเข้มข้นของเฮกซะวาเลนท์โครเมียม 1.0 ppm แสดงว่า เฮกซะวาเลนท์โครเมียมมีผลต่อการการเจริญเติบโตของแหนแดงทำให้การเจริญเติบโตลดลง

ตารางที่ 3 น้ำหนักสดของแหนแดงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

การทดลอง	**น้ำหนักแหนแดงวันที่ 5 ร้อยละ**	**น้ำหนักแหนแดงวันที่ 10 ร้อยละ**	**น้ำหนักแหนแดงวันที่ 15 ร้อยละ**
ชุดควบคุม	100	100	100
ชุดทดลอง 1	-28.39	-56.28	-82.57
ชุดทดลอง 2	-33.30	-60.97	-84.38
ชุดทดลอง 3	-43.67	-68.79	-85.73
ชุดทดลอง 4	-53.16	-75.24	-89.22

เมื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตเป็นสองเท่าของแหนแดง พบว่าในชุดควบคุมมีอัตราการเจริญ เป็น 2 เท่าใน 6.24 วัน แสดงในตารางที่ 4 ส่วนชุดทดลองไม่ได้คำนวณ เนื่องจากแหนแดงตายหมด จากการวิเคราะห์การที่แหนแดงมีการเจริญเติบโตเป็นสองเท่าในเวลา 6.24 วัน แสดงว่าแหนแดงที่เลือก มาอยู่ในช่วงอายุที่น้อย เพราะแหนแดงถ้าเจริญเติบโตเต็มที่สามารถเพิ่มเป็น 2

เท่าได้ในเวลา 2- 3 วันในห้องปฏิบัติการ ถ้าเจริญเติบโตในธรรมชาติประมาณ 5-10 วัน (Shafi *et al.,* 2015)

การเจริญเติบโตสัมพัทธ์พบว่า ความเข้มข้นของเฮกซะวาเลนท์โครเมียมมีผลต่อการเจริญเติบโต สัมพัทธ์ โดยชุดควบคุมที่ไม่มีเฮกซะวาเลนท์โครเมียม มีการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ 5.29 ส่วนชุดทดลองที่มี โครเมียม 1.1, 5.9, 12 และ 53 ppm อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์เป็น 0.92, 0.83, 0.75 และ 0.57 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า อัตราการเจริญลดลงตามความเข้มข้นของเฮกซะวาเลนท์โครเมียมที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Mandakini *et al.*(2016) ที่มีอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ลดลงตาม ความเข้มข้นของเฮกซะวาเลนท์โครเมียมที่เพิ่มขึ้น การเจริญเติบโตที่ลดลงเนื่องจากรากพืชนำโครเมียม เข้าสู่เนื้อเยื่อและลำเลียงไปส่วนต่าง ๆ ของแหนแดงเมื่อเข้าไปสะสมในปริมาณที่มากขึ้นความเป็นพิษของ โลหะหนักมีผลต่อกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์ เช่น การสร้างรงควัตถุ การสังเคราะห์ด้วยแสงการทำงานของออกซิเดทีฟ เอนไซม์ (oxidative enzyme) ลดลง ในงานวิจัย Sarkar และJana (1986) ศึกษาการบำบัดโลหะหนัก As, Pb, Cu, Cd และ Cr ที่ความเข้มข้น 2 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้แหนแดง (*A. pinnata*) พบว่าโลหะหนักมีผลลดปฏิกิริยาของฮิลล์ (Hill reaction) ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง รวมถึงปริมาณโปรตีนในใบ และน้ำหนักแห้งลดลง ในกรณีที่ความเข้มข้นของ เฮกซะวาเลนท์โครเมียมปริมาณต่ำ เช่น ในการวิจัยของ Pati และSatapathy (2016) ที่ศึกษาศักยภาพการบำบัดเฮกซะวาเลนท์โครเมียมในแหนแดง *A. pinnata* และจอกหูหนู โดยใช้เฮกซะวาเลนท์โครเมียมเข้มข้นเพียง 0.07- 0.13 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการเจริญเติบโตแตกต่างจากที่ความเข้มข้นของเฮกซะวาเลนท์โครเมียมสูง คือ การเจริญเติบโตสัมพัทธ์จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ เฮกซะวาเลนท์โครเมียมที่เพิ่มขึ้น โดยในชุดควบคุมมีการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ 2.978 ส่วนชุดทดลองที่มี เฮกซะวาเลนท์โครเมียม 0.13 พบว่า การเจริญสัมพัทธ์เพิ่มถึง 5.959 ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยอื่น ที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโครเมียมการเจริญเติบโตสัมพัทธ์จะลดลง แต่การทดลองของ Pati และSatapathy (2016) มีจุดที่น่าสังเกต คือ น้ำหนักแห้งของแหนแดงในวันสุดท้ายของ ชุดควบคุมมากกว่าน้ำหนักแห้งของแหนแดงในชุดทดลองทั้งหมด ทั้ง ๆ ที่น้ำหนักสดในชุดทดลอง มากกว่าชุดควบคุมประมาณ 1 เท่า คือชุดควบคุม 5.95 และชุดทดลอง 11.92 กรัม แต่เมื่อเป็น น้ำหนักแห้งเหลือเพียง 0.67 และ 0.59 ตามลำดับ แสดงว่าน้ำหนักแหนแดงจริง ๆ ในชุดทดลองต่ำกว่าชุดควบคุม แต่เนื่องการเจริญสัมพัทธ์คำนวณมาจากน้ำหนักแหนสดจึงได้ค่าดังกล่าว ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า ในเซลล์แหนแดงที่อยู่ในสารโครเมียมที่ความเข้มข้นสูงขึ้นภายในมีน้ำแทรกอยู่มาก จึงทำให้น้ำหนักสดมีน้ำหนักมาก

สรุปและข้อเสนอแนะ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของแหนแดงในการเป็นพืชบำบัดเฮกซะวาเลนท์โครเมียม ทำให้น้ำที่มีการปนเปื้อนของโครเมียมชนิดเฮกซะวาเลนท์โครเมียมมีปริมาณลดลง ผลการศึกษาความสามารถในการเป็นพืชบำบัดของแหนแดงที่ความเข้มข้นของเฮกซะวาเลนท์โครเมียมต่างกัน 4 ระดับ คือ ที่ระดับความเข้มข้น 1.1 ppm 5.9 ppm 12 ppm และ 53 ppm แหนแดงสามารถลดปริมาณเฮกซะวาเลนท์โครเมียมได้ 0.33, 1.03, 2.70 และ 4.00 ppm หรือประสิทธิภาพการกำจัด เฮกซะวาเลนท์โครเมียม เป็นร้อยละ 30, 17.45, 22.50 และ 7.55 ตามลำดับ (ประสิทธิภาพการกำจัด เฮกซะวาเลนท์โครเมียมคำนวณจากปริมาณความเข้มข้นของเฮกซะวาเลนท์โครเมียมเริ่มต้นกับปริมาณ เฮกซะวาเลนท์โครเมียมที่ลดลง ดังนั้นความเข้มข้นเฮกซะวาเลนท์โครเมียม 53 ppm ที่สามารถบำบัด เฮกซะวาเลนท์โครเมียมได้ถึง 4 ppm ซึ่งดูดซับได้สูง แต่เมื่อคำนวณเป็นประสิทธิภาพการกำจัด เฮกซะวาเลนท์โครเมียมร้อยละที่ได้จะต่ำกว่า ความเข้มข้นของเฮกซะวาเลนท์โครเมียมที่เริ่มต้นต่ำกว่า)

สำหรับการเจริญเติบโตเป็นสองเท่าของแหนในชุดควบคุมใช้เวลา 6.24 วัน ส่วนในชุดทดลอง ทั้งหมดแหนแดงตายภายใน 15 วัน จึงไม่สามารถคำนวณอัตราการเจริญเป็นสองเท่า ด้านการเจริญ เติบโตสัมพัทธ์ของแหนแดงจะลดลงตามปริมาณความเข้มข้นของโครเมียมที่สูงขึ้น คือ ชุดควบคุม ชุดทดลองที่ความเข้มข้นของโครเมียม 1.1, 5.9, 12 และ 53 ppm มีการเจริญเติบโตสัมพัทธ์เป็น 5.29, 0.92, 0.83, 0.75 และ 0.57 ตามลำดับ การเจริญเติบโตของแหนแดงลดลงเนื่องจาก แหนแดงจะดูด โครเมียมเข้าทางราก หรือรอยแตกทางต้น และใบ เข้าไปสะสมในส่วนต่าง ๆของพืช ซึ่งการสะสมโครเมียมขึ้นกับสภาพแวดล้อม (Shafi *et al.*, 2015) เมื่อโครเมียมเข้าไปและสะสมในแหนแดง ถ้าปริมาณน้อยแหนแดงสามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้ ถ้าสะสมปริมาณมากขึ้น จะทำให้การสังเคราะห์ด้วยแสงลดลง เพราะโครเมียมมีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง ปริมาณโปรตีนในเนื้อเยื่อลดลง ออกซิเดทีฟ เอนไซม์ลดลง

ข้อเสนอแนะสำหรับผู้สนใจงานด้านบำบัดโครเมียมโดยใช้แหนแดงจากการทำงานวิจัยในครั้งนี้ คือ

แหนแดงไม่ชอบแสงมาก ควรเลี้ยงในที่แสงน้อย อุณหภูมิไม่สูง และอายุของแหนที่นำมาใช้ควรใช้แหน ที่โตเต็มที่ (แหนมีขนาดใหญ่แต่ใบยังไม่เปลี่ยนสี) เพื่อให้ทนต่อความเข้มข้นของโครเมียมและมีพื้นผิวในการสะสมโครเมียมเพิ่มขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา ที่ให้ทุนสนับสนุน การทำวิจัยตลอดทั้งโครงการ

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2559.ประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. ค้นเมื่อ 28 มกราคม 2561, จาก https://www.ieat.go.th/handbook/Program_IEAT/pdf/laws/full/ENV157.pdf

จินตนา สายวรรณ์. 2541. การศึกษาการกำจัดสารโครเมียมออกจากน้ำทิ้งโรงงานชุบโครเมียมโดยใช้พอลิ อิเล็กโตรไลต์. กรุงเทพฯ : วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จิระฉัตร ศรีแสน. 2555. ผลกระทบของสารประกอบโครเมียมต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม. กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 60 (189), 10-12.

พอตา ประสานนาม. 2547. การกำจัดโลหะหนักออกจากสารละลายโดยใช้สารแลกเปลี่ยนไอออนที่ผลิตจาก Hydroxyethyl cellulose. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการและวิศวกรรมพอลิเมอร์ ภาควิชาวิทยาการและวิศวกรรมวัสดุ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

Abu Bakar, A.F., I. Yusoff, N.T. Fatt, F. Othman, and M.A. Ashraf. 2013. Arsenic, zinc, and aluminium removal from gold mine wastewater effluents and accumulation by submerged aquatic plants (*Cabomba piauhyensis*, *Egeria densa*, and *Hydrilla verticillata*). BioMed Research International. 2013, 1–7.

Andrew, O.E., A.A. Olushola, O.G. Opeoluwa, and W.O. Dada. 2014. Detoxification of chromium (VI) ions in aqueous solution via adsorption by raw and activated carbon prepared from sugarcane waste. Covenant Journal of Physical and Life Sciences. 2(2), 110-122.

Arora, A., S. Saxena, and D.K. Sharma. 2006. Tolerance and phytoaccumulation of chromium by three *Azolla* species. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 22(2), 97–100.

Aziz, T., and I. Watanabe. 1983. Influence of nutrients on the growth and mineral composition of *Azolla pinnata* R. Br. (Bicol, Philippines). Bangladesh Journal of Botany. 12(2), 166–170.

Bennicelli, R., Z. Stępniewska, A. Banach, K. Szajnocha, and J. Ostrowski. 2004. The ability of *Azolla caroliniana* to remove heavy metals (Hg (II), Cr (III), Cr (VI)) from municipal waste water. Chemosphere. 55(1), 141–146.

Kanamarlapudi, S.L.R.K., V.K. Chintalpudi, and S. Muddada. 2018. Application of Biosorption for Removal of Heavy Metals from Wastewater. *In*: Derco, J. and B. Vrana (Eds.). Biosorption. London, UK: IntechOpen.

Lu, X., M. Kruatrachue, P. Pokethitiyook, and K. Homyok. 2004. Removal of cadmium and zinc by water hyacinth, *Eichhornia crassipes*. ScienceAsia. 30(2), 93-109.

Mandakini, L. L. U., N.J.G.J. Bandara and D. Gunawardana. 2016. A study on the phytoremediation potential of *Azolla pinnata* under laboratory conditions. Journal of Tropical Forestry and Environment. 6(01), 36-49.

Pandharipande, S., and P. Gadpayle. 2016. Phytoremediation studies for removal of copper & chromium using *Azolla pinnata* and water hyacinth. International Journal of Innovative Research in Science,

Engineering and Technology. 5(5), 7078–7083.

Park, D., Y. S. Yun, and J.M. Park. 2004. Reduction of hexavalent chromium with the brown seaweed *Ecklonia* biomass. Environmental Science & Technology. 38(18), 4860–4864.

Pati, S., and K. B. Satapathy. 2016. Phytoremediation potential of aquatic macrophyte *Azolla pinnata* R. Br. and *Salvinia molesta* Mitchell for removal of Chromium from waste water. International Journal of Science, Environment and Technology. 5(4), 2146–2160.

Pereira, A. L., and F. Carrapiço. 2009. Culture of *Azolla filiculoides* in artificial conditions. Plant Biosystems. 143(3), 431–434.

Rai, P. K. 2009. Microcosm investigation on phytoremediation of Cr using *Azolla pinnata*. International Journal of Phytoremediation. 12(1), 96–104.

Sachdeva, S., and A. Sharma. 2012. *Azolla*: role in phytoremediation of heavy metals. International Journal Engineering Science. 1(2277), 9698.

Sarkar, A., and S. Jana. 1986. Heavy metal pollutant tolerance of *Azolla pinnata*. Water, Air, and Soil Pollution. 27(1), 15–18.

Shafi, N., A.K. Pandit, A.N. Kamili, and B. Mushtaq. 2015. Heavy metal accumulation *by Azolla pinnata* of Dal lake ecosystem, India. Journal of Environment Protection and Sustainable Development. 1(1), 8–12.

Volesky, B., 1990. Biosorption of heavy metals. Boca Raton, USA: CRC Press.