บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณของสารหนูในตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อน

จากการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณของสารหนูในตัวอย่างดินที่ได้จากบริเวณโครงการปฏิบัติการแก้ไขและลดการแพร่กระจายของสารหนูโดยใช้พืช ตัวอย่างดินบริเวณบ่อฝังกลบกากแร่สารหนู ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 6

จากผลการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่างในตัวอย่างดิน พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างดินออกเป็น 2 กลุ่ม ตามแหล่งที่เก็บตัวอย่าง โดยกลุ่มแรกตัวอย่างดินมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เป็นกลางจนถึงเป็นเบสอ่อน โดยมีค่าอยู่ในช่วง 7.22 - 8.13 สำหรับตัวอย่างดินในกลุ่มที่สอง ความเป็นกรด-ด่างมีค่าเป็นกรดอ่อนจนถึงเป็นกลาง โดยมีค่าอยู่ในช่วง 5.39 - 7.20 สำหรับปริมาณสารหนูในตัวอย่างดินที่ได้ทำการศึกษาโดยใช้การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ICP-AES ซึ่งวัดปริมาณสารหนูทั้งหมดในตัวอย่างดิน พบว่าปริมาณสูงสุดของสารหนูในตัวอย่างดินบริเวณแรกมีค่าอยู่ในช่วง 613.13 มิลลิกรัมของสารหนูต่อกิโลกรัมดิน และมีปริมาณสารหนูต่ำสุดเท่ากับ 42.14 มิลลิกรัมของสารหนูต่อกิโลกรัมดิน ตัวอย่างดินที่ทำการเก็บจากแหล่งปนเปื้อนที่สองพบว่ามีปริมาณสารหนูสูงสุดเท่ากับ 1010.96 มิลลิกรัมของสารหนูต่อกิโลกรัมดินและมีปริมาณสารหนูต่ำสุดเท่ากับ 73.17 มิลลิกรัมของสารหนูต่อกิโลกรัมดิน ซึ่งจากปริมาณของสารหนูที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างดินจะได้ว่ามีร้อยละ 84 ของตัวอย่างดินที่มีปริมาณสารหนูไม่เกิน 250 มิลลิกรัมของสารหนูต่อกิโลกรัมดิน ร้อยละ 8 ของตัวอย่างมีปริมาณสารหนูอยู่ในช่วง 500 - 750 มิลลิกรัมของสารหนูต่อกิโลกรัมดิน และร้อยละ 4 ของตัวอย่างดินทั้งหมดมีปริมาณสารหนูอยู่ในช่วง 251 - 500 มิลลิกรัมของสารหนูต่อกิโลกรัมดิน และ 750 - 1000 มิลลิกรัมของสารหนูต่อกิโลกรัมดิน ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการวิเคราะห์ปริมาณสารหนูในตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนโดย อารีย์ สุวรรณมณี (2530) ซึ่งสามารถตรวจวัดปริมาณสารหนูได้เท่ากับ 50 - 5300 มิลลิกรัมของสารหนูต่อกิโลกรัมดิน ผลการทดลองพบว่าปริมาณสารหนูที่พบในตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนมีปริมาณสูงกว่าดินที่ไม่มีการปนเปื้อนซึ่งจะมีปริมาณสารหนูในตัวอย่างดินที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 1 - 40 มิลลิกรัมของสารหนูต่อกิโลกรัมดิน สาเหตุดังกล่าวเกิดจากพฤติกรรมของสารหนูในดินโดยเป็นผลเนื่องมาจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ค่าพีเอชและ redox potential ของดิน ชนิดของหินที่เป็นแหล่งกำเนิดของดิน สารอินทรีย์ในดิน และความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวกของดิน

ตารางที่ 6 ปริมาณของสารหนูและค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างดิน

Table 6. Arsenic concentration and pH value of soil samples.

Sample area	pH	Total arsenic concentration (mg As/kg soil)
Area within the Phytoremediation Project site		
Site-1	7.35	123.52
Site-2	7.97	168.44
Site-3	7.88	102.15
Site-4	7.53	157.33
Site-5	7.71	140.07
Site-6	7.85	130.95
Site-7	7.22	42.14
Site-8	7.43	65.96
Site-9	8.00	94.76
Site-10	7.90	108.18
Site-11	7.95	140.77
Site-12	8.13	86.02
Site-13	7.51	613.13
Site-14	7.39	56.37
Area surrounding landfill containing arsenic contaminated soil		
Site-15	6.90	154.19
Site-16	6.95	73.17
Site-17	5.82	195.62
Site-18	7.02	91.49
Site-19	5.39	180.42
Site-20	5.58	102.00
Site-21	6.65	199.77
Site-22	6.72	132.43
Site-23	6.72	367.65
Site-24	6.26	1010.96
Site-25	7.20	641.94

จากการที่ชนิดของสารหนูสัมพันธ์กับค่าพีเอชและ redox potential จึงทำให้ในสภาวะที่ดินเป็นกรด สารหนูที่พบจะอยู่ในรูปของอาร์เซเนต (As(V)) ในดินทรายจะมีปริมาณของสารหนูต่ำสุด ในขณะที่ดินที่มีสารอินทรีย์สูงความเข้มข้นของสารหนูสูงกว่า นอกจากนี้ในสภาวะที่มีอากาศพบสารหนูในรูปของอาร์เซเนตและสามารถจับกับสารอินทรีย์ในดินได้ แต่ในสภาวะที่ไม่มีอากาศพบสารหนูในรูปของอาร์เซไนต์ (As(III)) เป็นต้น (Mandal and Suzuki, 2002)

2. การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารหนู

จากการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีสารหนูสูงสุด (40 มิลลิโมลาร์) พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อสารหนูความเข้มข้นสูงได้มีทั้งหมด 24 สายพันธุ์ ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งได้จากการสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 24 สายพันธุ์บนอาหารแข็ง BSMY I ที่มีการเติมสารโซเดียมอาร์เซไนต์ 40 มิลลิโมลาร์พบว่า โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นโคโลนีที่มีสีขาว กลม แบนราบผิวหน้าเรียบและโปร่งแสง เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้บางสายพันธุ์พบว่าสีของโคโลนีที่พบมีทั้งโคโลนีสีส้ม (B-10 และ B-19) สีชมพู (B-6 และ B-18) สีเหลือง (B-9, B-13, B-20 และ B-22) และโคโลนีใส (B-8 และ B-11) นอกจากนี้แบคทีเรียบางสายพันธุ์ยังมีการสร้างสารโพลิแซคคาไรด์ออกนอกเซลล์ (B-2, B-3, B-4, B-21, B-25 และ B-27) (ตารางที่ 7; ภาพที่ 7A และ 7B) แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ได้จากตัวอย่างดินในบริเวณที่มีการบำบัดสารหนูโดยใช้พืช ซึ่งอาจเป็นเพราะดินในบริเวณดังกล่าวมีความอุดมสมบูรณ์ของดินมากกว่าดินที่ได้จากบริเวณบ่อฝังกลบทำให้พบเชื้อแบคทีเรียได้หลากหลาย นอกจากนี้จากการสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า เชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบโดยมีทั้งหมด 19 สายพันธุ์ ขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกมีด้วยกัน 5 สายพันธุ์ โดยที่แบคทีเรียแกรมบวกสามารถแบ่งตามลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบว่าเซลล์มีรูปร่างกลม 4 สายพันธุ์และเซลล์รูปร่างแท่ง 1 สายพันธุ์ สำหรับแบคทีเรียแกรมลบเมื่อมองภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามารถแบ่งลักษณะของเซลล์ได้เป็นเซลล์รูปร่างกลม 11 สายพันธุ์และเซลล์รูปร่างแท่ง 8 สายพันธุ์ ดังตัวอย่างในภาพที่ 8

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีความหลากหลาย ซึ่งการแพร่กระจายและความหลากหลายของแบคทีเรียเป็นผลเนื่องจากลักษณะของตัวอย่างดินที่นำมาใช้ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย กลไกที่ทนทานต่อโลหะที่แตกต่างกันของเชื้อแบคทีเรียและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น ค่าพีเอช ปฏิกิริยารีดอกซ์ ชนิดไอออนของโลหะ อนุภาคของดินและสารอินทรีย์ที่ละลายได้ เป็นต้น นอกจากนี้ความไวของแบคทีเรียต่อโลหะยังขึ้นอยู่กับแหล่งของตัวอย่างที่นำมาใช้ในการคัดเลือกซึ่งได้แก่ตัวอย่างน้ำหรือตัวอย่างดิน (Kapoor *et al.*,

1995; Roane and Pepper, 2000; Srinath *et al.,* 2002; Zoubilis *et al.,* 2003) ซึ่งทำให้จุลินทรีย์ลดความเป็นเป็นพิษของโลหะลงได้ และจากการศึกษาการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ทนต่อสารหนูจากดินพบว่ามีเชื้อแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแกรมบวก เป็นเพราะแบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์ที่มีความซับซ้อนถึง 3 ชั้น โดยแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกเป็นสารประเภท lipopolysaccharide ที่เป็นพวก bilayer ที่มีองค์ประกอบของไขมันซึ่งเป็นพวก endotoxin และทำหน้าที่เป็น hydrophobic barrier แต่สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกมีชั้นของ murein ที่หนาเป็นชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกสุด ซึ่งในส่วนนี้ประกอบด้วย glycoprotein และ peptidoglycan ซึ่งจะมีผลต่อโครงสร้างของเซลล์และภายในชั้นนี้มีแรงดันออสโมติกที่สูง นอกจากนี้ผนังเซลล์ในแบคทีเรียแกรมบวกยังประกอบด้วย muramic acid ขณะที่ในแบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วยชั้นของ peptidoglycan จากความแตกต่างของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบจึงทำให้การป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมของแบคทีเรียแตกต่างกัน ซึ่งความซับซ้อนของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างที่ซับซ้อนกว่าแบคทีเรียแกรมบวก จึงส่งผลให้แบคทีเรียแกรมลบมีความสามารถในการจับโลหะได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก Horitsu และคณะ (1983 อ้างโดย Srinath *et al.,* 2002) พบว่า ความแตกต่างขององค์ประกอบของกรดไขมันในผนังเซลล์มีผลต่อการดูดซับโลหะที่แตกต่างกัน

จากการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์พบว่าไม่พบเชื้อยีสต์และราในการคัดเลือกอาจเป็นเพราะเชื้อรามีรูปร่างเซลล์ที่ใหญ่กว่าและมีหนาแน่นกว่า ทำให้กลไกต่างๆภายในเซลล์แข็งแรงน้อยกว่าแบคทีเรีย (Kapoor, 1995) ดังนั้นความเข้มข้นของโลหะในปริมาณที่ต่ำก็สามารถชักนำให้ลักษณะรูปร่างของเชื้อราเปลี่ยนแปลงและส่งผลให้เซลล์ถูกทำลายได้ง่าย (Ladin, 2000 อ้างโดย Zouboulis *et al.,* 2004) และอาจขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียมากกว่าเชื้อยีสต์และรา

ผลการทดลองที่ได้ต่างจากการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีโครเมียม(VI) พบว่าเชื้อจุลินทรีย์คัดแยกได้มีร้อยละ70 เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อทำการจำแนกเชื้อจะพบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus laterosporus* และ *B. licheniformis* (Zouboulis *et al.,* 2004) ผลการศึกษาของ Green-Ruiz (2005) ซึ่งทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากตะกอนดินที่มีความสามารถออกซิไดซ์แมงกานีส(II)ได้ดีที่สุด พบเชื้อในสกุล *Bacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก การศึกษาของ Yamamura และคณะ (2003) ซึ่งได้คัดแยกเชื้อจากตะกอนดินที่มีการปนเปื้อนของซิลิเนียม พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ซิลิเนียมได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น นอกจากนี้จากการคัดเลือกเชื้อที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีโครเมียม(VI) โดย Srinath และคณะ (2002) พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีโครเมียม(VI) ทั้งหมด 71 สายพันธุ์ตาม

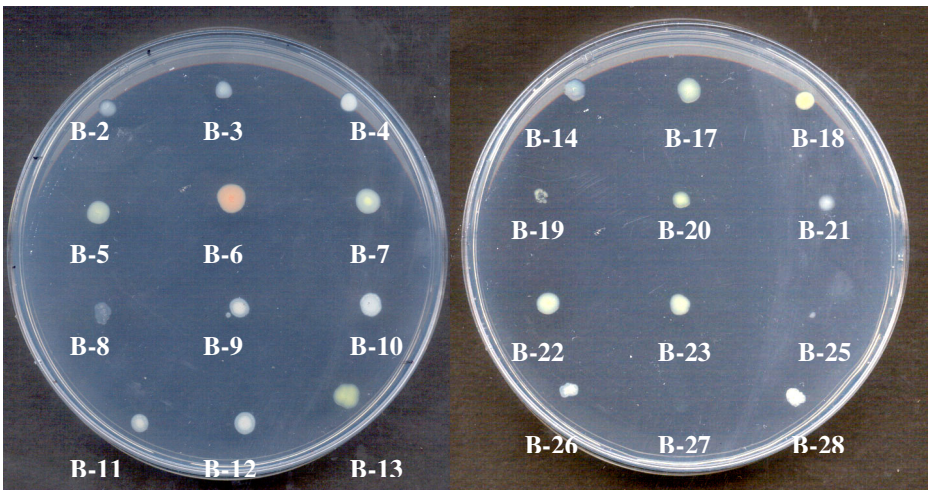
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเมื่อนำไปทดสอบการเจริญในสภาวะที่มีความเข้มข้นของโครเมียม (VI) 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถทนต่อความเข้มข้นระดับนี้ได้ 2 สายพันธุ์ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และเมื่อทำการเทียบเคียงเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีการทางชีวเคมีพบว่าเป็นเชื้อในสกุล *Bacillus* จากผลการศึกษาจะเห็นว่าความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อโลหะจะขึ้นอยู่กับแหล่งของตัวอย่างที่นำมาใช้ในการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ Tangaromsuk และคณะ (2002) ได้คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนของโลหะพบว่า เชื้อส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งเมื่อทำการจำแนกเชื้อแล้วพบว่าเชื้อที่คัดแยกได้เป็นเชื้อแบคทีเรีย *Sphingomanas paucimobilis* strain BKK1 ซึ่งสามารถทนต่อความเข้มข้นของแคดเมียมสูงถึง 200 มิลลิกรัมต่อลิตร Viti และคณะ (2003) พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 8 สายพันธุ์ โดยมี 7 สายพันธุ์ที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและ 1 สายพันธุ์ที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อทำการจำแนกเชื้อ พบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus maroccanus*, *B. megaterium*, *Cellulomonas turbata*, *Corynebacterium hoagii* และ*Pseudomonas* sp. เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ไปทดสอบความสามารถในการทนต่อโครเมียมพบว่าเชื้อ *Bacillus maroccanus* สามารถทนต่อความเข้มข้นของโครเมียมได้สูงกว่า 14 มิลลิโมลาร์และเชื้อ *Corynebacterium hoagii* สามารถทนต่อความเข้มข้นของโครเมียมได้สูงที่สุด นอกจากนี้การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากน้ำทิ้งในอุตสาหกรรมโดย Lu และคณะ (2006) เพื่อคัดเลือกเชื้อที่สามารถทนต่อความเข้มข้นของโลหะได้ พบว่ามีเชื้อแบคทีเรีย 1 สายพันธุ์ที่สามารถทนต่อความเข้มข้นของโลหะได้สูงกว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นเมื่อทำการจำแนกเชื้อพบว่าคือเชื้อ *Enterobacter* sp.

ตารางที่ 7 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่สารหนู

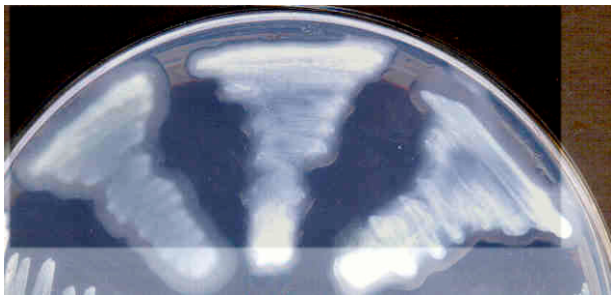
Table 7. Colony morphology of bacterial strains grown in medium with added arsenite.

Isolates	Colony morphology	Soil sample area
B-2	off-white, circular, convex, smooth edge, opaque, slime	Site-1
B-3	off-white, circular, convex, smooth edge, opaque, slime	Site-1
B-4	white, circular, convex, smooth edge, opaque, slime	Site-1, 11
B-5	white, circular, convex, smooth edge, opaque	Site-1, 20
B-6	pink, circular, flat, smooth edge, translucent	Site-1
B-7	off-white, circular, flat, smooth edge, translucent	Site-1, 12, 20 and 24
B-8	colorless, circular, flat, smooth edge, translucent	Site-1, 2 and 20
B-9	yellow, circular, flat, smooth edge, translucent	Site-1, 11 and 19
B-10	orange, circular, flat, smooth edge, translucent	Site-2
B-11	colorless, circular, flat, smooth edge, translucent	Site-1
B-12	white, circular, flat, smooth edge, translucent	Site-2 and 20
B-13	yellow, circular, flat, smooth edge, translucent	Site-4, 11 and 19
B-14	off-white, circular, convex, smooth edge, translucent	Site-4
B-17	white, circular, flat, smooth edge, translucent	Site-6 and 20
B-18	pink, circular, flat, smooth edge, translucent	Site-6
B-19	orange, circular, flat, smooth edge, translucent	Site-7
B-20	yellow, circular, flat, smooth edge, translucent	Site-7, 12 and 19
B-21	off-white, circular, convex, smooth edge, translucent, slime	Site-8
B-22	yellowish, circular, flat, smooth edge, translucent	Site-9
B-23	off-white, circular, flat, smooth edge, translucent	Site-9
B-25	off-white, circular, flat, smooth edge, opaque, slime	Site-11, 20 and 23
B-26	white, circular, flat, smooth edge, translucent	Site-9 and 20
B-27	white, circular, convex, smooth edge, translucent, slime	Site-11
B-28	white, circular, flat, smooth edge, translucent	Site-1 and 20

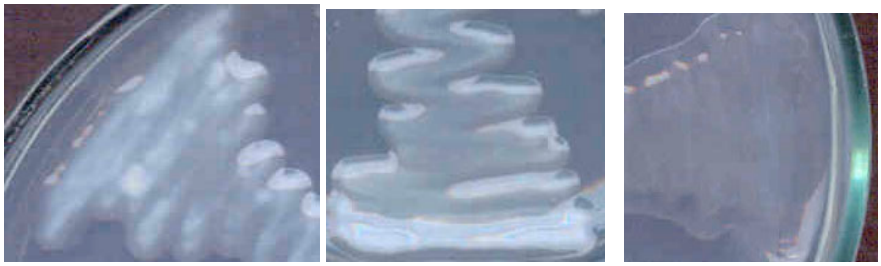
(A)



(B)



B-2 B-3 B-4



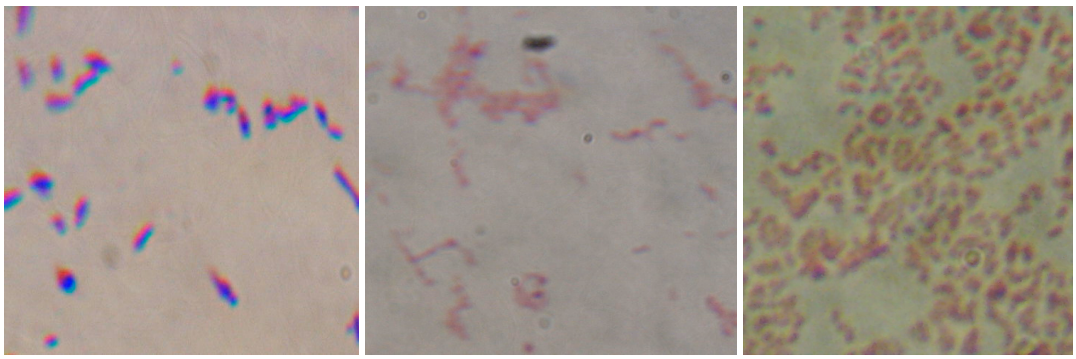
B-21 B-25 B-27

ภาพที่ 7 (A) โคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญได้บนอาหาร BSYM ที่เติม 40 มิลลิโมลาร์สารหนูบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 3 วัน

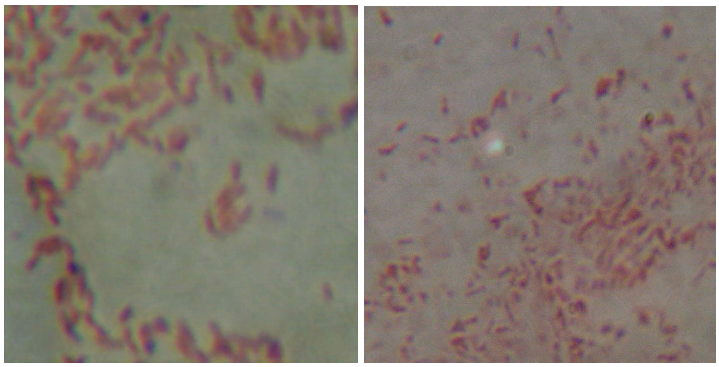
(B) แบคทีเรียที่สามารถผลิตโพลิแซคคาไรด์ออกมานอกเซลล์เมื่อเจริญบนอาหาร BSYM ที่เติม 40 มิลลิโมลาร์บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 3 วัน

Figure7. (A) Bacterial isolates grown on BSYM agar with 40 mM sodium arsenite at 30ºC.

(B) Bacterial isolates with extracellular polymeric-liked substance surrounding the colonies when grown on BSYM agar with 40 mM sodium arsenite at 30ºC for 3 days.



B-4 B-7 B-8



B-10 B-13

ภาพที่ 8 การย้อมแกรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ B-4, B-7, B-8, B-10 และ B-13

Figure 8. Gram's stain of isolates B-4, B-7, B-8, B-10 and B-13.

3. ศึกษาระยะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารหนู

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารหนูพบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียได้ 24 สายพันธุ์ จากนั้นได้นำเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมาศึกษาระยะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อหาอายุที่เหมาะสมของเชื้อต่อการดูดซับสารหนูซึ่งได้ผลดัง ภาพที่ 9 – ภาพที่ 13 ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีระยะการเจริญในช่วง lag phase ที่กว้าง อาจเป็นเพราะสารหนูมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทำให้การเจริญเติบโตช้ากว่าสภาวะที่ไม่มีสารหนู ปริมาณของสารหนูในรูปของอาร์เซเนตมีปริมาณที่ค่อนข้างคงที่ไม่แตกต่างกันในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ แสดงว่าสารหนูไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปจากอาร์เซไนต์เป็นอาร์เซเนต ทำให้การลดลงของปริมาณสารหนูในรูปอาร์เซไนต์เป็นผลเนื่องจากการดูดซับสารหนูโดยแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่าการดูดซับสารหนูส่วนใหญ่เกิดในช่วง exponential และ stationary phase ของการเจริญซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียได้เป็น 3 กลุ่มตามลักษณะการดูดซับสารหนูดังนี้

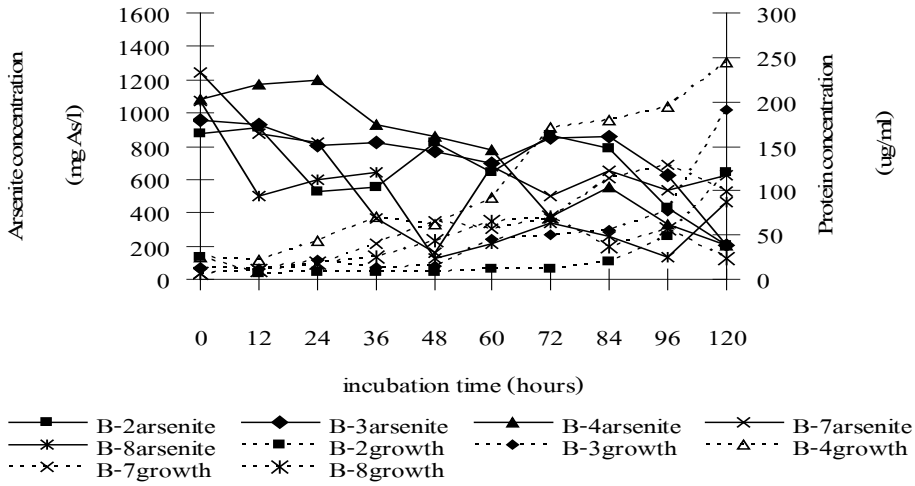
กลุ่มแรก สารหนูสามารถดูดซับได้ดีที่สุดในช่วงระยะ exponential phase ของการเจริญดังภาพที่ 9 - 10 ซึ่งประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย B-2, B-3, B-4, B-7, B-8, B-10, B-11, B-23 และ B-26 ซึ่งสามารถลดปริมาณสารหนูสูงสุดที่เวลา 120 ชั่วโมง (B-2, B-3, B-4), 48 ชั่วโมง (B-7), 60ชั่วโมง(B-8), 72 ชั่วโมง (B-23) , 96 ชั่วโมง (B-10, B-26) และ 108 ชั่วโมง (B-11)

แบคทีเรียกลุ่มที่สองสามารถดูดซับได้ดีที่สุดในช่วงระยะ stationary phase ของการเจริญดังภาพที่11 - 12 ซึ่งประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย B-5, B-6, B-9, B-12, B-13, B-14, B-17, B-18, B-19, B-22 และ B-28 ซึ่งสามารถลดปริมาณสารหนูสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง (B-5, B-6), 84 ชั่วโมง (B-22) , 96 ชั่วโมง (B-17, B-18) , 108 ชั่วโมง (B-14, B-19) และ 120 ชั่วโมง (B-9, B-12, B-13, B-28)

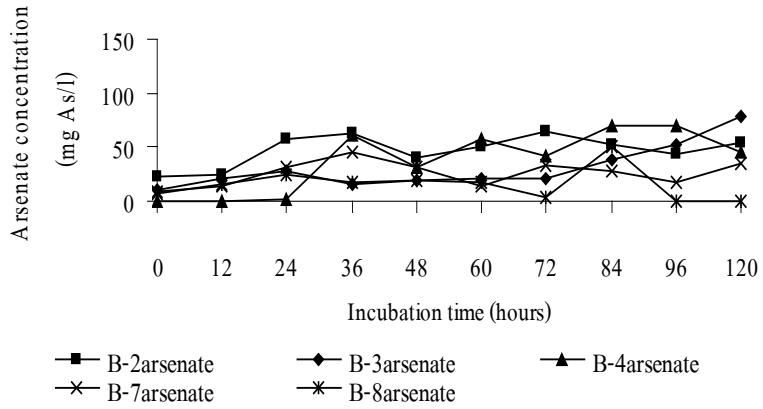
แบคทีเรียในกลุ่มที่สาม การเจริญเติบโตมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยดังภาพที่ 13 ซึ่งประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย B-20, B-21, B-25 และ B-27 ซึ่งสามารถลดปริมาณสารหนูได้ดีที่สุดที่เวลา 72 ชั่วโมง (B-20), 84 ชั่วโมง (B-21) และ 120 ชั่วโมง (B-25, B-27)

ร้อยละการลดลงของสารหนูสูงสุดของเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์แสดงได้ดังภาพที่ 14 ซึ่งพบว่าเชื้อ B-13 สามารถลดปริมาณอาร์เซไนต์ลงได้มากที่สุดคือร้อยละ 96.93 รองลงมาคือเชื้อ B-8, B-7, B-10, และ B-4 ซึ่งสามารถลดปริมาณของอาร์เซไนต์ลงได้ร้อยละ 87.08, 86.72, 84.36 และ 80.90 ตามลำดับ สำหรับเชื้อที่สามารถลดปริมาณอาร์เซไนต์ลงได้น้อยที่สุดคือ เชื้อ B-18 ซึ่งสามารถลดปริมาณลงได้เพียงร้อยละ 36.87

A.



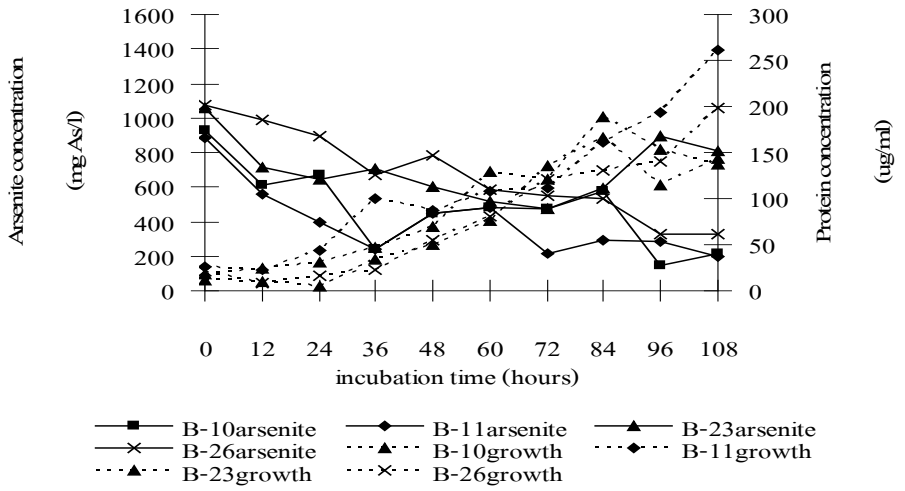
B.



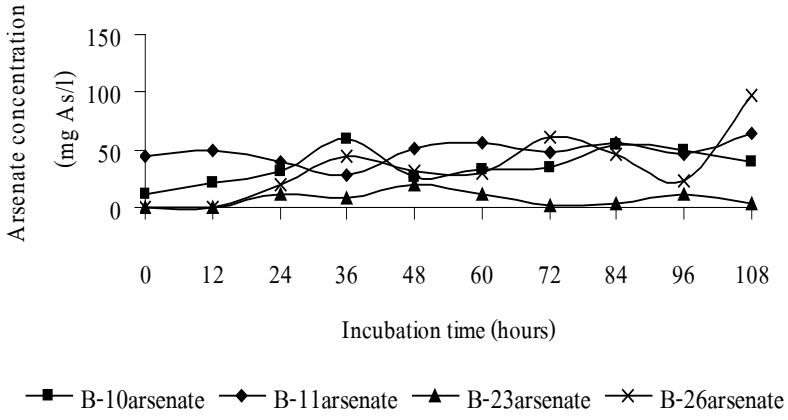
ภาพที่ 9 การลดลงของสารหนูและการเจริญของแบคทีเรีย B-2, B-3, B-4, B-7 และ B-8ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารหนูความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์: (A) การเจริญของเชื้อแบคทีเรียและปริมาณของอาร์เซไนต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ (B) ปริมาณของอาร์เซเนตที่เวลาต่างๆ

Figure 9. Arsenic removal and bacterial growth (B-2, B-3, B-4, B-7 and B-8) in arsenite-containing BSYM medium (40mM): (A) Bacterial growths and arsenite concentrations at incubation time (B) Arsenate concentrations at incubation time.

A.



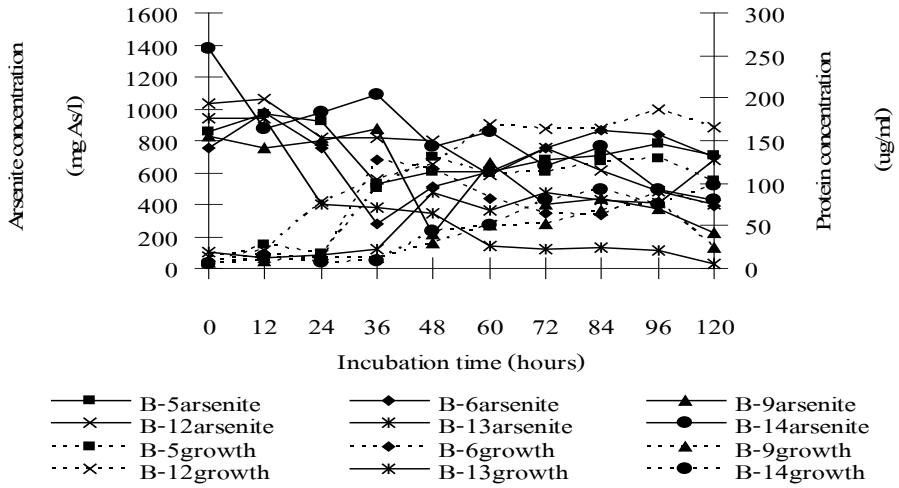
B.



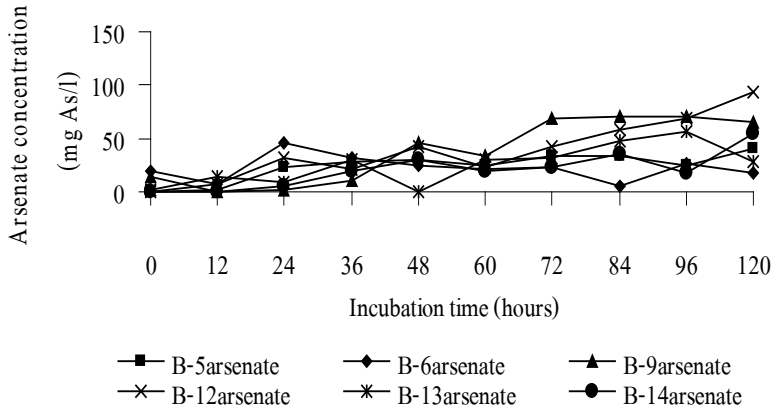
ภาพที่ 10 การลดลงของสารหนูและการเจริญของแบคทีเรีย B-10, B-11, B-23 และ B-26 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารหนูความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์: (A) การเจริญของเชื้อแบคทีเรียและปริมาณของอาร์เซไนต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ (B) ปริมาณของอาร์เซเนตที่เวลาต่างๆ

Figure 10. Arsenic adsorption and bacterial growth (B-10, B-11, B-23 and B-26) in arsenite-containing BSYM medium (40mM): (A) Bacterial growths and arsenite concentrations at incubation time (B) Arsenate concentrations at incubation time.

A.



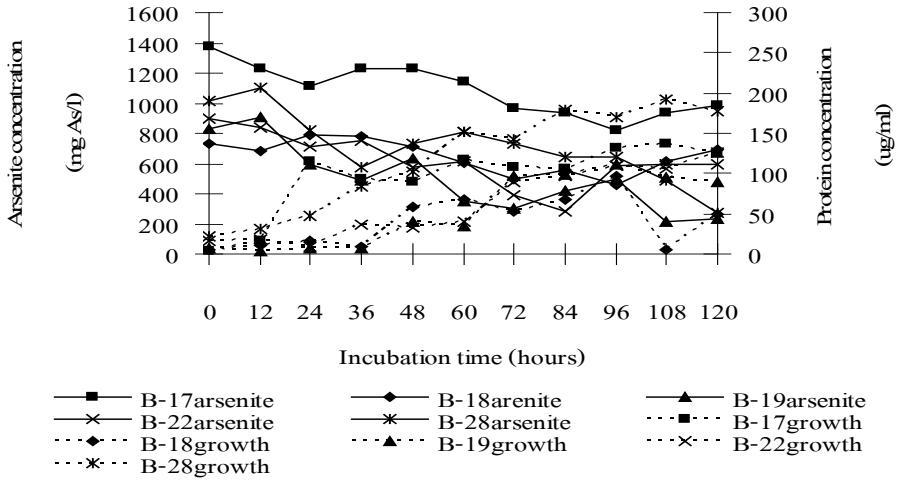
B.



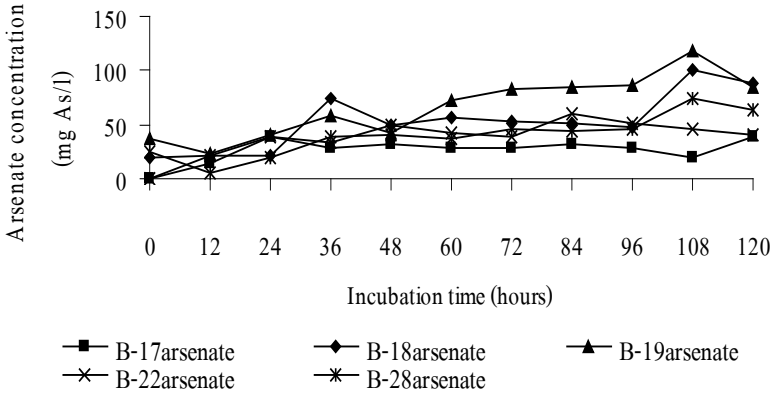
ภาพที่ 11 การลดลงของสารหนูและการเจริญของแบคทีเรีย B-5, B-6, B-9, B-12, B-13 และ B-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารหนูความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์: (A) การเจริญของเชื้อแบคทีเรียและปริมาณของอาร์เซไนต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ (B) ปริมาณของอาร์เซเนตที่เวลาต่างๆ

Figure 11. Arsenic adsorption and bacterial growth (B-5, B-6, B-9, B-12, B-13 and B-14) in arsenite-containing BSYM medium (40mM): (A) Bacterial growths and arsenite concentrations at incubation time (B) Arsenate concentrations at incubation time.

A.



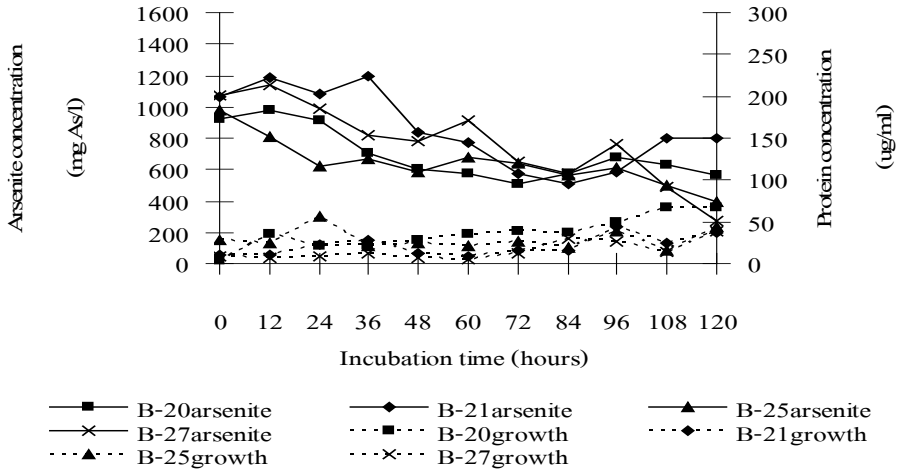
B.



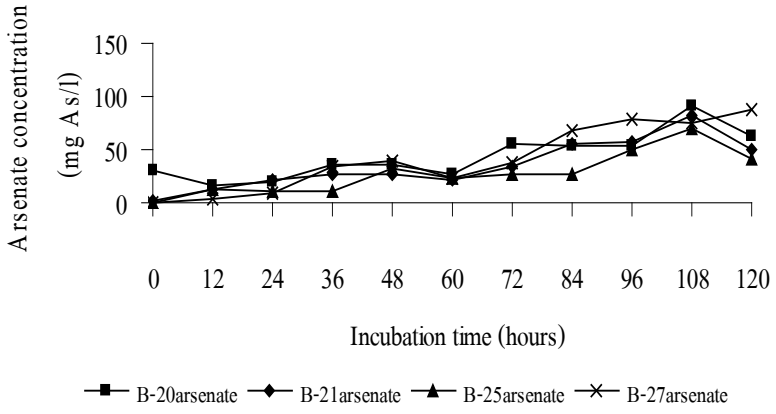
ภาพที่ 12 การลดลงของสารหนูและการเจริญของแบคทีเรีย B-17, B-18, B-19, B-22 และ B-28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารหนูความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์: (A) การเจริญของเชื้อแบคทีเรียและปริมาณของอาร์เซไนต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ (B) ปริมาณของอาร์เซเนตที่เวลาต่างๆ

Figure 12. Arsenic adsorption and bacterial growth (B-17, B-18, B-19, B-22 and B-28) in arsenite-containing BSYM medium (40mM): (A) Bacterial growths and arsenite concentrations at incubation time (B) Arsenate concentrations at incubation time.

A.

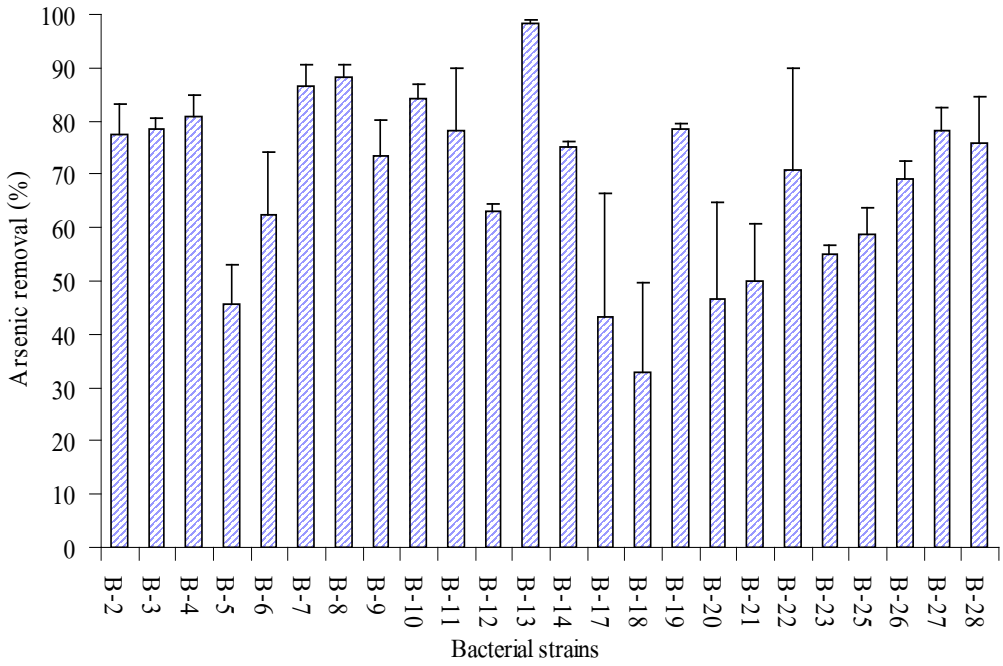


B.



ภาพที่ 13 การลดลงของสารหนูและการเจริญของแบคทีเรีย B-20, B-21, B-25 และ B-27 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารหนูความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์: (A) การเจริญของเชื้อแบคทีเรียและปริมาณของอาร์เซไนต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ (B) ปริมาณของอาร์เซเนตที่เวลาต่างๆ

Figure 13. Arsenic adsorption and bacterial growth (B-20, B-21, B-25 and B-27) in arsenite-containing BSYM medium (40mM): (A) Bacterial growths and arsenite concentrations at incubation time (B) Arsenate concentrations at incubation time.



ภาพที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการลดลงของสารหนูกับสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อน

Figure 14. Arsenic removal efficiency of bacterial strains isolated from contaminated soil.

ผลการศึกษาที่ได้คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Yilmaz (2003) ซึ่งได้ศึกษาผลของโลหะแคดเมียม ทองแดง โคบอลท์ นิกเกิล สังกะสี และแมงกานีส ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus circulan* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดิน โดยจากการศึกษาพบว่าลำดับความเป็นพิษของโลหะต่อเซลล์เรียงลำดับได้ดังนี้ แคดเมียมมีความเป็นพิษเท่ากับโคบอลท์ > ทองแดง > นิกเกิล > สังกะสี > แมงกานีส และเมื่อนำเซลล์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายแคดเมียมความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีระยะการเจริญในช่วง lag phase กว้างกว่าในสภาวะที่ไม่มีโลหะ และการเจริญจะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์เมื่อความเข้มข้นของแคดเมียมเท่ากับ 2 มิลลิโมลาร์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเจริญของแบคทีเรียลดลงเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของโลหะและรูปแบบการเจริญจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย นอกจากนี้จากการศึกษาการดูดซับทองแดงด้วยเชื้อชนิดเดียวกันพบว่าจะดูดซับได้ดีที่สุดในระยะ stationary phase ของการเจริญ การดูดซับสังกะสี และแมงกานีสเกิดขึ้นดีที่สุดในระยะ mid-log phase สำหรับโคบอลท์และนิกเกิลเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถดูดซับได้

Tangaromsuk และคณะ (2002) ศึกษาผลของแคดเมียมต่อการเจริญของ *Sphingomonas paucimobilis* พบว่าการเจริญของเชื้อในสภาวะที่ไม่มีแคดเมียมแตกต่างกับรูปแบบการเจริญในสภาวะที่มีแคดเมียมความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 25 - 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งในการเจริญในสภาวะที่ไม่มีแคดเมียมรูปแบบการเจริญมี 3 ช่วงคือ log phase, stationary phase และ death phase แต่ในอาหารที่มีการเติมแคดเมียมปริมาณเซลล์แบคทีเรียไม่มีการเปลี่ยนแปลงแต่มีปริมาณเท่ากับตอนเริ่มต้น ซึ่งแสดงว่าที่ระดับความเข้มข้นของแคดเมียมดังกล่าวมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ แต่อย่างไรก็ตามเชื้อดังกล่าวยังมีความสามารถในการทนต่อแคดเมียมได้

Srinath และคณะ (2002) ได้คัดแยกเชื้อที่ทนต่อโครเมียมแล้วนำมาศึกษาผลการเจริญของเชื้อในสภาวะที่มีโครเมียมพบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ H และ A มีรูปแบบการเจริญที่คล้ายคลึงกันในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายโครเมียม ในสภาวะที่มีแคดเมียมเชื้อแบคทีเรียจะมีระยะ lag phase ที่กว้างกว่าในสภาวะที่ไม่มีโครเมียม นอกจากนี้ปริมาณเชื้อที่เกิดขึ้นในสภาวะที่มีโครเมียมความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมหรือสูงกว่าจะมีปริมาณต่ำกว่าร้อยละ 90 ของปริมาณเชื้อในสภาวะที่ไม่มีโครเมียม

Anderson และ Cook (2004) ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินและน้ำจากแหล่งแร่ทองคำเพื่อนำมาใช้ในการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้สารหนูเป็นแหล่งพลังงาน พบว่าไม่มีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถใช้สารหนูเป็นตัวให้หรือรับอิเล็กตรอนได้ แต่พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนรูปของสารหนูได้ เมื่อทำการจำแนกเชื้อแล้วพบว่าเป็นเชื้อ *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. และ *Exiguobacterium* sp. เชื้อเหล่านี้สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอาร์เซเนต 0 - 100 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Exiguobacterium* sp. สามารถเจริญได้ในสภาวะมีอาร์เซไนต์ 50 มิลลิโมลาร์

Clausen (2000) ได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะและลดปริมาณของทองแดง โครเมียมและสารหนูจากไม้แปรรูป พบว่าเชื้อที่ทำการคัดเลือกได้เป็นเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* FN02, *Aureobacterium estoroaromaticum* VV03, และ *Klebsiella oxytoca* CC08 ซึ่งสามารถลดปริมาณโครเมียมได้ร้อยละ94 เชื้อ *Bacillus licheniformis* CC01 สามารถลดปริมาณของทองแดงลงได้ร้อยละ 93 และเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* FN02 และ *Bacillus licheniformis* CC02 สามารถปริมาณของสารหนูได้ร้อยละ 44 - 48

Wang และคณะ (1997) ทำการศึกษาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของแคดเมียม 0 - 3 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 50 ชั่วโมง พบว่าการเจริญจะเริ่มคงที่ ในขณะที่ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ การเจริญของเชื้อค่อนข้างช้ากว่า เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่ำและที่ความเข้มข้นของแคดเมียม 10 มิลลิโมลาร์ เชื้อแบคทีเรียไม่มีการเจริญเติบโต สำหรับการลดลงของแคดเมียมจะลดลงอย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้นของแคดเมียมเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ โดยเกิดขึ้น

ภายใน 40 ชั่วโมง การกำจัดแคดเมียมของเชื้อแบคทีเรียจะเกิดขึ้นในช่วงหลัง exponential phase แสดงว่าการลดลงของโลหะขึ้นอยู่กับอายุของเชื้อจุลินทรีย์

Albarracin และคณะ (2005) ศึกษาผลของทองแดงต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้สายพันธุ์ ABO โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของทองแดงเท่ากับ 39 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมงเชื้อแบคทีเรียถูกยับยั้งการเจริญเติบโตไปร้อยละ 18 - 28 และความเข้มข้นของทองแดงในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในเวลา 48 - 120 ชั่วโมงซึ่งเป็นช่วง log phase สามารถลดปริมาณทองแดงได้ร้อยละ 38 - 11 มิลลิกรัมต่อลิตร และที่เวลา 120 - 144 ชั่วโมง ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและการสะสมของทองแดงโดยเชื้อแบคทีเรีย

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการดูดซับสารหนูโดยเชื้อจุลินทรีย์

4.1 การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่อการดูดซับสารหนู

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการดูดซับสารหนูโดยเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกศึกษาโดยการนำเชื้อแบคทีเรีย B-4, B-7, B-8, B-10 และ B-13 ซึ่งได้ทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจนมีอายุที่เหมาะสมต่อการดูดซับแล้วทำการเก็บเซลล์แบคทีเรียที่ได้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม โดยการศึกษาในขั้นแรกศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นของสารหนูที่เหมาะสมต่อการดูดซับสารหนูโดยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ จากการศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง (พีเอช) ต่อการดูดซับสารหนูโดยจุลินทรีย์ ซึ่งทำการปรับค่าพีเอชของสารละลายให้อยู่ในช่วง 4 - 8 และความเข้มข้นเริ่มต้นของสารหนูเท่ากับ 40 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 15) พบว่าเชื้อ B-4 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการดูดซับคือ 7 ซึ่งให้ค่าการลดลงของสารหนูเท่ากับร้อยละ 83.30 และค่าการดูดซับสารหนูเท่ากับ 4404 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวล สำหรับเชื้อ B-7, B-8, B-10 และ B-13 ค่าช่วงของพีเอช 4 - 8 ให้ค่าการดูดซับที่ไม่แตกต่างกันในทางสถิติที่ $P>0.05$ ดังนั้นพีเอช 8 จึงเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการดูดซับเนื่องจากพีเอชเริ่มต้นของสารหนูเมื่อทำการวัดค่าพีเอชพบว่ามีค่าเท่ากับ 10.9 และจากผลการศึกษาที่ได้แสดงว่าพีเอช 8เป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการดูดซับเนื่องจากไม่สิ้นเปลืองสารเคมีที่ใช้ในการปรับพีเอช โดยที่พีเอช 8 เชื้อแบคทีเรีย B-7, B-8, B-10 และ B-13 จะให้ร้อยละการลดลงของสารหนูเท่ากับ 33.30, 16.27, 28.19 และ 30.01 ตามลำดับและให้ค่าการดูดซับสารหนูเท่ากับ 1863, 926, 2817และ 1693 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวล ตามลำดับ

จากการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า พีเอชเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อกระบวนการดูดซับโดยวิธีทางชีวภาพ พีเอชที่เหมาะสมต่อการดูดซับสารหนูมีค่าที่เป็นกลางจนถึงเบสอ่อน และในกรณีของเชื้อ B-4, B-7 และ B-8 พบว่าที่พีเอชต่ำให้ค่าการดูดซับสารหนูที่ต่ำกว่าพีเอชสูง สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเคมีของโลหะและผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ที่

สามารถดูดซับโลหะได้เช่น หมู่คาร์บอนิล หมู่ฟอสเฟต หมู่เอมีน เป็นต้น หมู่ฟังก์ชันเหล่านี้มีผลโดยตรงต่อกลไกการดูดซับบนผิวของจุลินทรีย์และคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพระหว่างโลหะกับเซลล์จุลินทรีย์ (Goyal *et al.,* 2003) เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีค่าพีเอชสูงทำให้เกิดการกำจัดไฮโดรเจนออกจากหมู่ฟังก์ชันส่งผลให้สามารถจับกับโลหะได้ (Chen *et al.*, 2002) และที่พีเอชต่ำบริเวณผิวหน้าของเซลล์ที่ใช้ในการดูดซับโลหะจับกับโปรตอนมากกว่าที่จะจับกับโลหะอื่นทำให้ความสามารถในการดูดซับลดลง (Gong *et al.*, 2005) นอกจากนี้ค่าพีเอชที่สูงกว่าจุด isoelectric point ของเซลล์ มีผลทำให้ประจุบนเซลล์เป็นลบ ทำให้หมู่ฟังก์ชันที่อยู่บนผนังเซลล์สามารถทำปฏิกิริยากับโลหะได้ และที่พีเอชต่ำประจุบนผิวเซลล์ของจุลินทรีย์ทั้งหมดมีประจุเป็นบวกซึ่งจะยับยั้งการดูดซับโลหะ (Goyal *et al.*, 2003; Zoubilis *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาที่ได้เมื่อเทียบกับการดูดซับโลหะชนิดอื่นด้วยจุลินทรีย์พบว่าในโลหะที่ต่างชนิดกันและจุลินทรีย์ที่ต่างชนิดกันจะได้ค่าที่แตกต่างกันดังในการศึกษาของ Chen และคณะ (2000) ซึ่งศึกษาการดูดซับสังกะสีและทองแดงโดยใช้เชื้อ *Desulfovibrio desulfuricans* และทำการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของสารละลายให้อยู่ในช่วง 4 - 7 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการดูดซับสังกะสีเท่ากับ 6.6 และเมื่อพีเอชต่ำกว่า 4 ทำให้ค่าการดูดซับสังกะสีของเชื้อแบคทีเรียลดลง และจากการศึกษาของ Sar และ Souza (2002) ได้ศึกษาเชื้อ *Pseudomonas* ในการดูดซับทอเรียม (IV) โดยทำการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของสารละลายให้อยู่ในช่วง 2 - 6 พบว่าที่พีเอช 4 เป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการดูดซับและพบว่าเมื่อพีเอชมีค่าต่ำกว่า 4 ความสามารถในการดูดซับจะลดลง

Liu และคณะ(2004) ได้ศึกษาการดูดซับโดยใช้เชื้อ *Thiobacillus thiooxidants* ที่ยังไม่ถูกเตรียม และเตรียมแล้วด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยทำการศึกษาสภาวะที่มีพีเอชเท่ากับ 2, 4 และ 6 พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีและไม่มีการเตรียมด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ผลที่เหมือนกัน คือมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการดูดซับเท่ากับพีเอช 6 และที่ค่าพีเอชต่ำจะมีทำให้ความสามารถในการดูดซับลดต่ำลง การศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการดูดซับแคดเมียมโดย Tangaromsuk และคณะ (2002)โดยเชื้อ *Sphingomonas paucimobilis* strain BKK 1 โดยศึกษาที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.0 - 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า พีเอชที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการดูดซับแคดเมียมเนื่องจากที่พีเอชสูงส่งผลให้ลดการแข่งขันของไฮโดรเจนไอออนในสารละลายที่จะจับกับหมู่ฟังก์ชั่นที่ใช้สำหรับจับโลหะ (Puranik *et al.,* 1995; Chang *et al.,* 1997; Kefala *et al.,* 1999; Yin *et al.,* 1999) ซึ่งในการศึกษาพบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการดูดซับแคดเมียมเท่ากับ 5.0 - 6.0

Padmavathy และคณะ (2003) ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการดูดซับนิกเกิลโดยเชื้อยีสต์ที่ผ่านการเตรียมด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1โมลาร์ ทำการปรับพีเอชของสารละลายนิกเกิลเท่ากับ 3, 4, 5, 6, 6.75 และ 7 ในการศึกษาพบว่าเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นความสามารถในการดูดซับ

จะเพิ่มขึ้นและที่พีเอชเท่ากับ 6.75 ให้ประสิทธิภาพในการดูดซับสูงสุดเนื่องจากเมื่อมีการเพิ่มพีเอชจะส่งผลให้เพิ่มการเกิดไอออนของประจุลบบนชีวมวล และที่ค่าพีเอชต่ำความเข้มข้นของไฮโดรเนียมไอออนจะสูงทำให้ไปจับกับผนังเซลล์ของเชื้อยีสต์ นิกเกิลจึงไม่สามารถเข้าไปจับได้

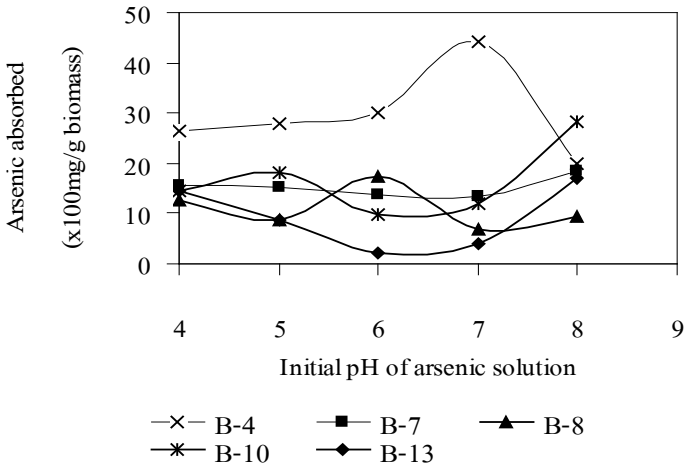
Green-Ruiz (2005) พบว่าที่พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของการดูดซับเท่ากับ 4.5 - 6.0 ซึ่งทำให้การดูดซับปรอทโดยแบคทีเรียมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเนื่องจากที่พีเอชต่ำบริเวณที่เป็น binding site บนเซลล์แบคทีเรียจะเกิดการแข่งขันกันระหว่างแคทไอออนของโลหะและโปรตอนสูง ขณะที่พีเอช 7.0 หรือสูงกว่า โลหะจะเกิดเป็นสารประกอบไฮดรอกไซด์ซึ่งไม่สามารถจับกับบริเวณที่เป็น binding site บนเซลล์แบคทีเรียได้

Selatnia และคณะ (2004) ศึกษาผลของพีเอชในการดูดซับตะกั่วโดยชีวมวลที่ผ่านการเตรียมด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าพีเอชเริ่มต้นไม่มีผลต่อการดูดซับตะกั่วเนื่องจากการ treat เซลล์แบคทีเรียด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำให้เกิดการเปลี่ยนประจุระหว่างไฮโดรเจนไอออนและโซเดียมไอออนบนผนังเซลล์ทำให้ความสัมพันธ์ระหว่างไอออนของโซเดียมและตะกั่วเกิดการเปลี่ยนแปลง

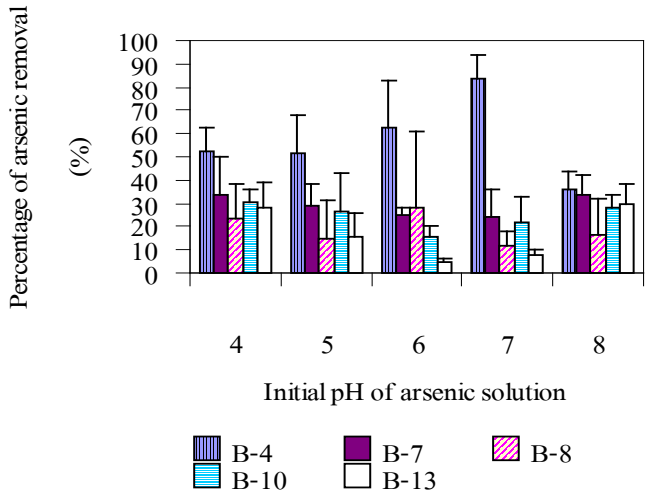
Yan และ Viraghavan (2003) ศึกษาผลของพีเอชต่อการดูดซับตะกั่ว แคดเมียม นิกเกิล และสังกะสีที่พีเอช 2 - 6 ด้วยชีวมวลของ *Mucor rouxii* ที่ผ่านการเตรียมด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าที่พีเอชเริ่มต้นต่ำกว่าหรือเท่ากับ 4 มีการดูดซับโลหะเกิดขึ้นเล็กน้อย โดยเฉพาะที่พีเอช 2.0 ไม่มีการดูดซับโลหะเกิดขึ้นยกเว้นนิกเกิล การดูดซับเพิ่มขึ้นในช่วงที่มีพีเอชเท่ากับ 4 - 5 และที่พีเอชเท่ากับ 5.0 การดูดซับตะกั่วจะคงที่แต่ในกรณีของแคดเมียมและนิกเกิลจะยังเพิ่มขึ้นแต่ไม่มากนัก ดังนั้นชนิดโลหะที่แตกต่างกันมีพีเอชที่เหมาะต่อการดูดซับแตกต่างกัน ความสามารถในการดูดซับต่ำเมื่อมีค่าพีเอชต่ำ ซึ่งเป็นผลมาจากความเข้มข้นของโปรตอนที่สูง ความหนาแน่นของประจุลบบนผนังเซลล์ลดลง ทำให้การจับกับโลหะลดลง

Vilar และคณะ (2005) ศึกษาผลของพีเอชต่อการดูดซับตะกั่วโดยใช้สาหร่าย *Gelidium* พบว่าพีเอชมีผลต่อการดูดซับโดยที่พีเอชของสารละลายเท่ากับ 3.0 การดูดซับจะถูกยับยั้ง เมื่อเพิ่มพีเอชจะมีผลให้ ligand เช่น หมู่คาร์บอกซิล หมู่ฟอสเฟต หมู่อิมิดาโซล (imidazole) และหมู่อะมิโนจะมีประจุเป็นลบและเกิดการจับกับโลหะ นอกจากนี้ที่ค่าพีเอชสูงมีผลต่อ zero-charge point ทำให้ผนังเซลล์มีประจุเป็นลบ และก่อให้เกิดแรง electrostatic ระหว่างประจุบวกของตะกั่วกับประจุลบของบริเวณ binding site

A



B



ภาพที่ 15 ผลพีเอชเริ่มต้นของสารหนูที่ 4, 5, 6, 7 และ 8 ต่อการลดลงของสารหนู (A) สารหนูที่ถูกดูดซับ (x100 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวล), (B) ร้อยละการลดลงของสารหนู (%)

Figure 15. Effect of initial pH (4, 5, 6, 7, 8) on arsenic biosorption: (A) arsenic absorbed (x100mg/g biomass), (B) Percentage of arsenic removal (%).

การใช้สาหร่าย *Lessonia nigrescens* เพื่อดูดซับอาร์เซเนตโดยใช้สาหร่ายปริมาณ 2 กรัม ความเข้มข้นของอาร์เซเนตเริ่มต้นเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการศึกษาที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 2.5, 4.5 และ 6.5 พบว่าที่พีเอชต่ำสุดคือ2.5 ให้ค่าการดูดซับดีที่สุดคือเท่ากับร้อยละ 55 และที่พีเอช 6.5 ให้ร้อยละการดูดซับเท่ากับร้อยละ 40 ซึ่งแสดงว่าพีเอชมีผลต่อการดูดซับ(Hansen *et al.,* 2006)

Mohanty และคณะ (2006) ได้ศึกษาผลของพีเอชต่อการดูดซับพบว่าพีเอชเป็นตัวแปรสำคัญในการลดปริมาณโครเมียม ที่พีเอชเท่ากับ 1.0 ให้ค่าการดูดซับสูงสุด แต่เมื่อพีเอชมีค่าสูงขึ้น การดูดซับลดลง ที่พีเอช 1.0 โครเมียมมีประจุเป็นลบทำให้สามารถจับกับหมู่ฟังก์ชันซึ่งเป็นประจุบวกได้โดยจะจับกันด้วยแรง electrostatic

4.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการดูดซับสารหนู

จากผลพีเอชเริ่มต้นของสารละลายสารหนูที่เหมาะสมต่อการดูดซับสารหนูของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด นำผลที่ได้มาใช้ในการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของสารละลายสารหนูเพื่อให้เหมาะสมต่อการดูดซับโดยเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ เมื่อทำการปรับค่าพีเอชแล้วจึงศึกษาอุณหภูมิการดูดซับที่เหมาะสมโดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิแตกต่างกันคือ 25, 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ได้ผลดังภาพที่ 16 พบว่าเชื้อ B-4 สามารถดูดซับสารหนูได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสโดยให้ค่าการลดลงของสารหนูและการดูดซับสารหนูบนเซลล์เท่ากับร้อยละ 62.05 และ 2795 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลตามลำดับ สำหรับเชื้อ B-7, B-8, B-10 และ B-13 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการดูดซับสารหนู ได้แก่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยให้ค่าการลดลงของสารหนูเท่ากับร้อยละ 25.64, 32.00, 24.92 และ 5.76 ตามลำดับและให้ค่าการดูดซับบนชีวมวลเท่ากับ 1319, 1684, 1272 และ 296 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวล ตามลำดับ และจากการศึกษาพบว่าเมื่ออุณหภูมิในการดูดซับสูงขึ้นการดูดซับสารหนูโดยเชื้อแบคทีเรียมีแนวโน้มลดลง ในกรณีการศึกษานี้อาจเป็นไปได้ว่าการดูดซับโดยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้เป็นผลมาจากคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพระหว่างโลหะกับเชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็นกลไกแบบไม่อาศัยพลังงาน เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิทำให้ความสามารถในการดูดซับเพิ่มขึ้นเนื่องจากพื้นที่ในการจับกับโลหะบนเซลล์มีมากขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิสูงเกินไปมีผลไปทำลายบริเวณผิวของเซลล์ที่ใช้ในการดูดซับโลหะ (Puranik and Paknikar, 1999 และ Zouboulis *et al.*, 2004) ซึ่งอุณหภูมิที่นิยมใช้ศึกษาการดูดซับโลหะหนักโดยแบคทีเรียอยู่ในช่วง 25 - 35 องศาเซลเซียส (Blackwell *et al.*, 1995)

จากผลการทดลองที่ได้พบว่ามีผลใกล้เคียงกับการดูดซับโลหะชนิดอื่นโดยวิธีทางชีวภาพ ดังในการศึกษาการดูดซับโครเมียม (VI) โดยเชื้อ *Streptococcus equisimilis*, *Saccharomyces*

cerevisiae, *Aspergillus niger* ที่อุณหภูมิในช่วง 25 - 45 องศาเซลเซียส พบว่า *S. equisimilis* และ *A. niger* ให้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการดูดซับอยู่ในช่วง 35 - 40 องศาเซลเซียสและ30 - 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ สำหรับเชื้อ *S. cerevisiae* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการดูดซับเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส (Goyal *et al.*, 2003)

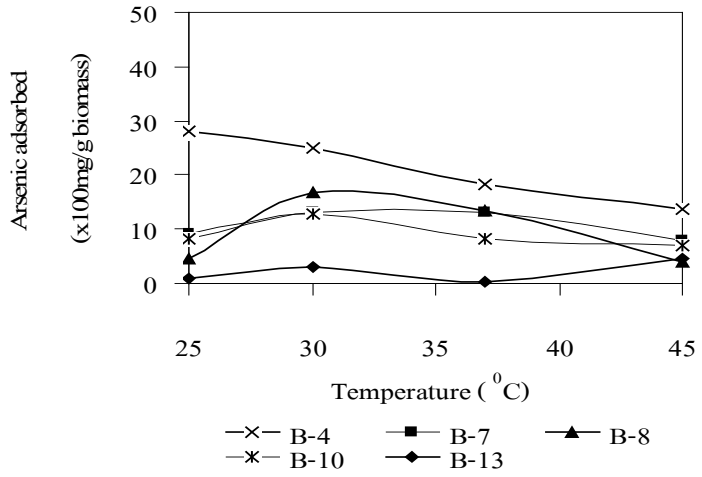
ในการศึกษาการดูดซับแคดเมียม(II) โดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* พบว่าเมื่อทำการดูดซับโลหะที่พีเอช 7 และอุณหภูมิในการดูดซับอยู่ในช่วง 25 – 50 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิไม่มีผลต่อการดูดซับ ซึ่งอาจเป็นเพราะอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซับโลหะโดยกระบวนการแบบใช้พลังงานแต่ในกระบวนการดูดซับแบบไม่ใช้พลังงานนั้นอุณหภูมิมีผลต่อการดูดซับน้อยมาก

Gourdon และคณะ (1990) ได้ทำการศึกษาการดูดซับแคดเมียมโดยแบคทีเรียจากตะกอนเร่งโดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 5 - 50 องศาเซลเซียส พบว่าการดูดซับแคดเมียมสูงขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ Gulnaz และคณะ(2005) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ 20, 35 และ 50 องศาเซลเซียสต่อการดูดซับทองแดงที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 โดยใช้ชีวมวลที่ได้จากกระบวนการ activated sludge ซึ่งพบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 20 องศาเซลเซียสเป็น 50 องศาเซลเซียส ทำให้ความสามารถในการดูดซับโลหะลดลง แสดงว่าการดูดซับทองแดงเป็นการดูดซับแบบ exothermic และอุณหภูมิเหมาะสมที่ใช้ในการดูดซับคือ 20 องศาเซลเซียสโดยให้ค่าการดูดซับเท่ากับ 76 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง การศึกษาอุณหภูมิในการดูดซับโลหะโดยเชื้อราที่คัดแยกได้ พบว่าเมื่อศึกษาการดูดซับที่อุณหภูมิ10 - 40 องศาเซลเซียส ให้ค่าการลดลงของโครเมียมและการดูดซับสูงสุดเท่ากับร้อยละ 78 และ 8.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Srivastava and Thakar, 2006)

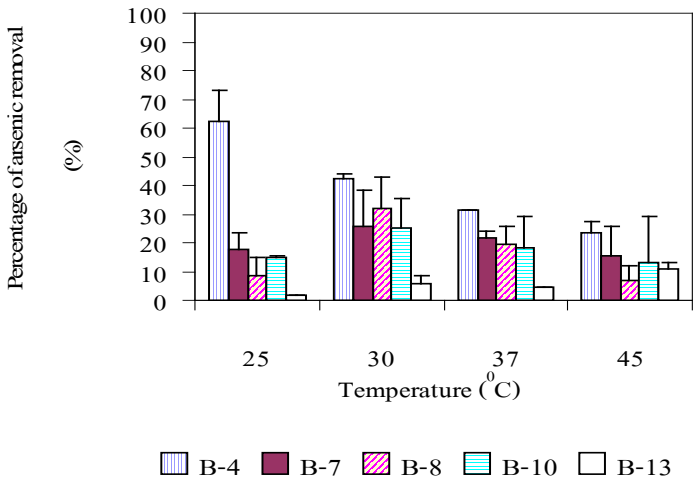
§ahin และ Ötink (2005) พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการดูดซับโลหะน้อยกว่าค่าพีเอชของสารละลายการดูดซับโดยทั่วไปนั้นเป็นปฏิกิริยาแบบ exothermic จึงทำให้การดูดซับลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น โดยในการศึกษาการดูดซับโครเมียมด้วยเชื้อ *Bacillus thuringiensis* อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการดูดซับเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส ให้ค่าการลดลงของทองแดงเท่ากับร้อยละ 38.3 และ 59.3 เมื่อใช้ vegetative cell และ สารผสมของสปอร์ตามลำดับในการดูดซับโลหะ

Zouboulis และคณะ (2004) ได้ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* ในการดูดซับโลหะที่อุณหภูมิ 25, 37 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิไม่มีผลต่อการดูดซับ ซึ่งแสดงว่าการดูดซับโดยเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เป็นกระบวนการที่ไม่อาศัยพลังงานแต่เกี่ยวข้องกับแรง electrostatic ซึ่งเป็นคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพระหว่างตัวดูดซับกับโลหะ

A



B



ภาพที่ 16 ผลอุณหภูมิที่ใช้ในการดูดซับสารหนูที่ 25, 30, 37และ 45 องศาเซลเซียส: (A) สารหนูที่ถูกดูดซับ (x100 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวล), (B) ร้อยละการลดลงของสารหนู (%)

Figure 16. Effect of temperature (25, 30, 37, 45°C) on arsenic biosorption: (A) arsenic absorbed (x100mg/g biomass), (B) Percentage of arsenic removal (%).

Han และคณะ (2006) ได้นำเชื้อยีสต์มาใช้ในการดูดซับทองแดงและตะกั่วซึ่งมีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.315 และ 0.393 มิลลิโมลาร์ตามลำดับและมีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ทำการดูดซับที่อุณหภูมิ 293, 298, 303, 313 และ 323 องศาเคลวิน พบว่าการดูดซับทองแดงและตะกั่วให้ผลการดูดซับที่แตกต่างกัน ในกรณีของการดูดซับทองแดงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิทำให้การดูดซับโลหะเพิ่มขึ้นในขณะที่การดูดซับตะกั่วจะให้ค่าการดูดซับลดลง แสดงว่าการดูดซับทองแดงเป็นกระบวนการ endothermic แต่ตะกั่วเป็นกระบวนการ exothermic ในการดูดซับสังกะสีและทองแดงที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าที่ 30 องศาเซลเซียส ให้ค่าการดูดซับโลหะสูงสุดคือเท่ากับ 172.4 และ 39.84 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งสำหรับการดูดซับทองแดงและสังกะสี อย่างไรก็ตามในการศึกษาพบว่าอุณหภูมิไม่มีผลต่อการดูดซับทองแดงมากนัก และที่ความเข้มข้นของทองแดงต่ำเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นจะทำให้การดูดซับเพิ่มมากขึ้น (Liu *et al.,* 2004)

4.3 การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการดูดซับ

จากผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของสารละลายสารหนูและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการดูดซับสารหนูโดยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ จึงนำผลการศึกษามาใช้ในการปรับสภาวะดังกล่าวเพื่อให้เหมาะสมต่อการดูดซับสารหนูโดยเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดเพื่อนำมาทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการดูดซับสารหนูพบว่า เชื้อB-4, B-7 และ B-8 มีระยะเวลาในการดูดซับสารหนูดีที่สุดที่เวลา 12 ชั่วโมงซึ่งสามารถลดปริมาณสารหนูลงได้ร้อยละ 62.05 25.64 และ 41.08 ตามลำดับ และดูดซับบนเซลล์ได้เท่ากับ 2795, 1319 และ2245 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวล ตามลำดับ เชื้อ B-10 มีเวลาที่เหมาะสมต่อการดูดซับคือ 8 ชั่วโมง และเชื้อ B-13 พบว่าที่ 2 ชั่วโมงของการดูดซับเป็นเวลาที่เหมาะสมซึ่งจะให้ร้อยละการลดลงของสารหนูเท่ากับ 28.36 และ 10.32 ตามลำดับและให้ค่าการดูดซับต่อชีวมวลเท่ากับ 1414 และ 540 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวล ตามลำดับ(ภาพที่ 17) จากการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการดูดซับนานขึ้นปริมาณการลดลงของสารหนูจะเพิ่มขึ้นจนถึงระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการดูดซับของเชื้อแต่ละชนิด หลังจากนั้นความสามารถในการดูดซับมีแนวโน้มลดลง จากการที่เซลล์มีระยะเวลาในการจับกับโลหะนานขึ้น และเมื่อถึงระยะเวลาหนึ่งผิวของชีวมวลจะเกิดการอิ่มตัวทำให้ไม่สามารถดูดซับสารหนูต่อไปได้ นอกจากนี้ในการทดลองที่แตกต่างกันอาจให้ผลการดูดซับที่แตกต่างกันเนื่องจากปัจจัยที่แตกต่างกันส่งผลให้กลไกในการดูดซับต่างกันซึ่งสัมพันธ์กับคุณสมบัติของชีวมวลและคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพระหว่างไอออนของโลหะกับชีวมวล (Singleton and Simmons, 1996) เช่น ลักษณะของตัวดูดซับซึ่งได้แก่พื้นที่ผิว สารประกอบของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ความสามารถของประจุที่ผิวเซลล์ ความชอบในการจับกับโลหะและสภาวะที่ใช้ในการศึกษา (Kacar *et al.,* 2002) จากผลการศึกษาการดูดซับโดยวิธีทางชีว

ภาพพบว่ากลไกการดูดซับ โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดใช้ระยะเวลาในการดูดซับโลหะหนักแต่ละชนิดแตกต่างกัน ดังนั้นการดูดซับโลหะที่ใช้เวลารวดเร็วมีความเป็นไปได้ในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวดูดซับเพื่อจับกับโลหะต่อไป เมื่อนำผลการศึกษาที่ได้เปรียบเทียบกับการศึกษาอื่นๆ พบว่าผลการศึกษาที่ได้แตกต่างกันดังในการศึกษาจากการดูดซับตะกั่วโดยใช้สาหร่าย *Spirulina munima* ซึ่งพบอัตราการจับกับตะกั่วของสาหร่ายจะเริ่มเกิดขึ้นในช่วง 0 - 30 นาที หลังจากนั้นการสะสมตะกั่วจะเพิ่มขึ้นจนกระทั่งเมื่อถึง 60 นาทีของการดูดซับ อัตราการดูดซับจะคงที่ (Gong *et al.*, 2005) และจากการศึกษาผลการดูดซับทองแดงและนิกเกิลโดยเชื้อ *Pseudomonas* ที่ถูก lyophilized พบว่าเชื้อจุลินทรีย์เริ่มมีการดูดซับโลหะภายใน 10 นาทีและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเวลา 20 นาทีของการดูดซับ หลังจากนั้นจะเริ่มคงที่ (Sar *et al.,* 1999)

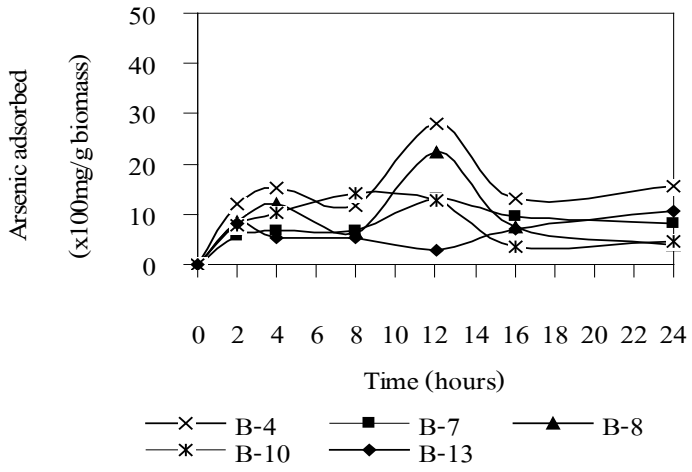
Visoottiviseth และ Panviroj (2001) ทำการลดปริมาณของอาร์เซเนตและอาร์เซไนต์ โดยใช้ mycelium จากเชื้อราที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน พบว่าการสะสมของอาร์เซไนต์และอาร์เซเนตเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 - 4 และให้ค่าการดูดซับสูงสุดในวันที่ 6

Green-Ruiz (2005) ศึกษาการดูดซับปรอทซึ่งมีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยเชื้อ *Bacillus* sp. เป็นเวลา 0 - 120 นาที พบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของโลหะมีผลต่อระยะเวลาในการดูดซับ โดยที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรการดูดซับเริ่มคงที่ที่เวลา 40 นาที ในขณะที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรการดูดซับจะเริ่มคงที่ที่เวลา 60 นาที

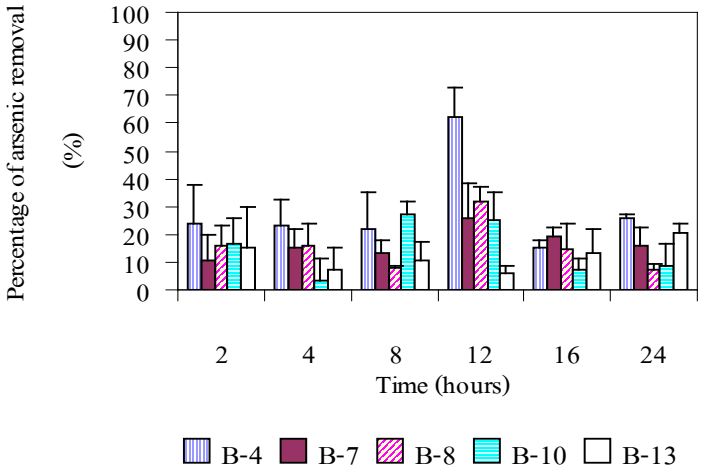
Srivastava และ Thakur (2006) ศึกษาการลดลงของโครเมียมโดยใช้เชื้อราที่คัดแยกได้จากน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมพบว่าเชื้อราสามารถลดปริมาณของโครเมียมลงได้ร้อยละ 85 ในวันที่7ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมโครเมียมลงไป แต่เมื่อใช้น้ำทิ้งที่มีโครเมียมปนอยู่มาศึกษาการดูดซับพบว่าสามารถลดปริมาณโครเมียมลงได้ร้อยละ 65 ในวันที่ 7 ซึ่งแสดงว่าความเป็นพิษของโครเมียมทำให้การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และการดูดซับโครเมียมลดต่ำลง

Ceribasi และ Yetis (2001) ศึกษาการดูดซับตะกั่วและนิกเกิลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 50 มิลลิกรัมพีเอชเท่ากับ 5.0 โดยเชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* พบว่าใน 5 นาทีแรกการดูดซับจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและดำเนินต่อไปด้วยอัตราเร็วที่ช้าลงจนได้ค่าการดูดซับสูงสุด และเริ่มคงที่ที่เวลา 3 ชั่วโมง แสดงว่าในการดูดซับประกอบด้วยกลไก 2 ขั้นตอนคือการดูดซับอย่างรวดเร็วที่ผิวหน้าและการแพร่เข้าไปในเซลล์

A



B



ภาพที่ 17 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการดูดซับสารหนูที่ 0, 2, 4, 8, 12, 16 และ 24 ชั่วโมง: (A) สารหนูที่ถูกดูดซับ (x100 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวล), (B) ร้อยละการลดลงของสารหนู (%)

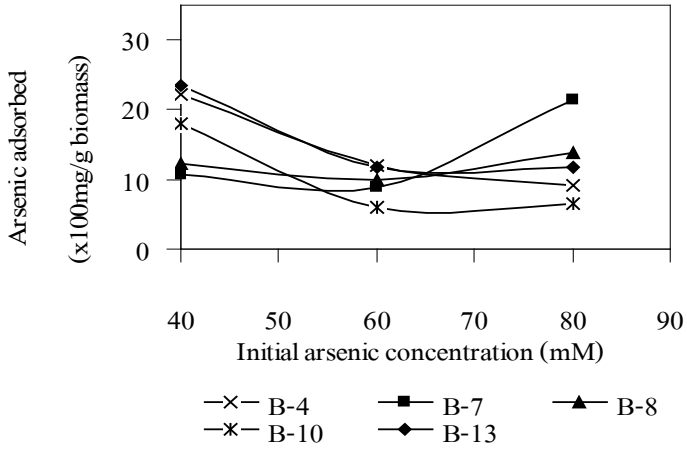
Figure 17. Time course (0, 2, 4, 8, 12, 16 and 24) of arsenic biosorption: (A) arsenic absorbed (x100mg/g biomass), (B) Percentage of arsenic removal (%)

4.4 ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารหนูที่ใช้ในการดูดซับ

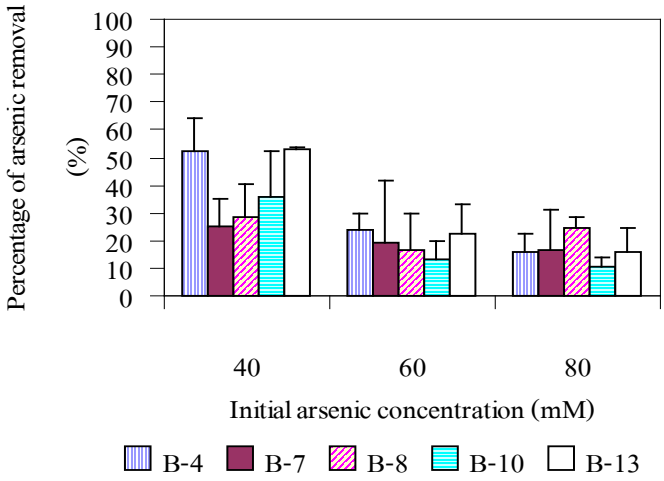
ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของพีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการดูดซับสารหนูโดยเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ได้ถูกนำมาใช้ปรับให้เหมาะสมต่อการดูดซับเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นสารหนูที่เหมาะสมที่เชื้อแบคทีเรียสามารถดูดซับได้ แสดงผลดังภาพที่ 18 ซึ่งพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถดูดซับสารหนูโดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารหนูที่เหมาะสมต่อการดูดซับของเชื้อแต่ละชนิดดังนี้ เชื้อ B-4, B-10 และ B-13 ความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมเท่ากับ 40 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสามารถลดปริมาณสารหนูลงได้ร้อยละ 52.62, 35.85 และ 53.03 ตามลำดับและให้ค่าการดูดซับเท่ากับ 2214, 1799 และ 2347 ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้นประสิทธิภาพในการดูดซับสารหนูของเชื้อ 3 สายพันธุ์จะลดลงอาจเป็นเพราะที่ความเข้มข้นสูงมีผลไปทำลายพื้นที่ผิวบนชีวมวลที่ใช้ในการดูดซับ แต่สำหรับเชื้อ B-7 และ B-8 ความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการดูดซับเท่ากับ 80 มิลลิโมลาร์ ซึ่งประสิทธิภาพในการลดลงของสารหนูเท่ากับร้อยละ 16.49 และ 24.70 ตามลำดับและมีค่าการดูดซับเท่ากับ 2142 และ 1381 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวล อาจเป็นเพราะที่ความเข้มข้นสูงทำให้สารหนูมีโอกาสที่จับกับผิวของชีวมวลทั้ง 2 สายพันธุ์ได้สูงขึ้น

ผลการทดลองที่ได้พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถลดปริมาณสารหนูได้สูงและความเข้มข้นเริ่มต้นของสารหนูที่เชื้อสามารถทนได้มีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับผลการศึกษาการลดลงของสารหนูโดยใช้เชื้อรา ซึ่งในการศึกษาได้ศึกษาที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วันโดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารหนูเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดปริมาณของสารหนูลงได้สูงสุดร้อยละ20.40-42.14 (Visoottiviseth and Panviroj, 2001) และเมื่อเปรียบเทียบการดูดซับในโลหะอื่นอย่างเช่นการดูดซับโครเมียมโดยสาหร่าย Chlorella โดยทำการศึกษาในสภาวะที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของโครเมียมเท่ากับ 3, 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร จะพบว่าที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดปริมาณโครเมียมลงได้ทั้งหมดที่เวลา 10 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้น 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร โครเมียมถูกดูดซับได้คิดเป็นร้อยละ 96.97 และ 96.41 ในชั่วโมงที่ 12 และ 96 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อจุลินทรีย์ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถดูดซับโลหะที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นสูงและใช้เวลาที่รวดเร็วกว่าการใช้สาหร่ายในการดูดซับ (วีนา ชูโชติ และมงคล เพ็ญสายใจ, 2543)

A



B



ภาพที่ 18 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของสารหนูที่ 40, 60 และ 80 mM: (A) สารหนูที่ถูกดูดซับ (x100 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวล), (B) ร้อยละการลดลงของสารหนู (%)

Figure 18. Effect of arsenic concentration (40, 60 and 80 mM) on arsenic biosorption: (A) arsenic absorbed (x100mg/g biomass), (B) Percentage of arsenic removal (%).

Selatnia และคณะ (2004) ศึกษาการดูดซับตะกั่วโดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นในช่วง 10 - 800 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยใช้เชื้อ *Streptomyces rimosus* พบว่าปริมาณของตะกั่วที่ถูกดูดซับต่อชีวมวลจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นเริ่มต้นของโลหะในสารละลาย ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตะกั่วสูงขึ้นปริมาณของตะกั่วที่ถูกดูดซับจะเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งเชื้อ *S. rimosus* สามารถดูดซับตะกั่วได้สูงสุดเท่ากับ 135 มิลลิกรัมตะกั่วต่อกรัมเซลล์

Green-Ruiz (2005) ได้นำ nonviable cell ของเชื้อ *Bacillus* sp. มาดูดซับปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าการดูดซับปรอทจะเพิ่มขึ้นคือเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นอยู่ในช่วง 0.250 - 10.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรอทถูกดูดซับอยู่เท่ากับ 0.023 - 0.681 มิลลิกรัมต่อลิตร สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากการมีค่า ionic strength ของปรอท (II) สูงขึ้น กระตุ้นให้การดูดซับปรอทเกิดได้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามร้อยละการลดลงของปรอทในสารละลายจะมีประสิทธิภาพมากกว่าถ้าความเข้มข้นเริ่มต้นของปรอทต่ำ ดังเช่นที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.025 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดปริมาณปรอทลงได้ร้อยละ 92 แต่ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดปริมาณปรอทลงได้ร้อยละ 68.1

Sar และคณะ (1999) ศึกษาการดูดซับนิกเกิลและทองแดงที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1-1000 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยเชื้อ *Pseudomonas sp.* พบว่าแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการดูดซับโลหะสูงเมื่อมีความเข้มข้นต่ำ การดูดซับโลหะบนชีวมวลจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นเริ่มต้นของโลหะจนกระทั่งถึงจุดที่การดูดซับคงที่ดังเช่นที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 430 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถดูดซับโลหะได้ 262.34 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งความสามารถในการดูดซับจะไม่เพิ่มขึ้นอีก Han และคณะ(2006) ศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของทองแดงและตะกั่วต่อการดูดซับโดยเชื้อยีสต์พบว่าการดูดซับโลหะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโลหะ สาเหตุจากแรง concentration gradient ซึ่งเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น ทำให้เมื่อความเข้มข้นของโลหะสูงขึ้นบริเวณที่จับกับโลหะบนเซลล์ยีสต์ถูกล้อมรอบด้วยโลหะจำนวนมากทำให้ประสิทธิภาพในการดูดซับเพิ่มขึ้น

4.5 การศึกษาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการดูดซับสารหนู

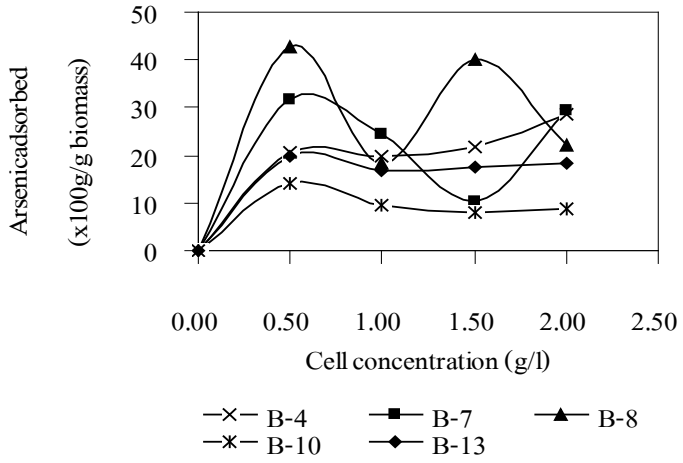
จากการปรับสภาวะที่เหมาะสม (พีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิ ระยะเวลา ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารหนู) ต่อการดูดซับสารหนูโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดซึ่งได้จากผลการศึกษาในข้างต้น นำมาทำการศึกษาปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการดูดซับสารหนู พบว่าเมื่อทำการศึกษาที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 กรัมต่อลิตร ร้อยละการลดลงของสารหนูไม่มีความแตกต่างกันที่ปริมาณเซลล์ต่างกัน (ภาพที่ 19) แสดงว่าที่ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตรเป็นปริมาณเชื้อที่เหมาะสมต่อการดูดซับสารหนูของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 สายพันธุ์ ซึ่งB-4, B-7,

B-8, B-10 และ B-13 จะให้ร้อยละการลดลงของสารหนูเท่ากับร้อยละ 50.92, 34.24, 45.00, 35.66 และ 46.50 ตามลำดับ ให้ค่าการดูดซับสารหนูเท่ากับ 2044, 3154, 4261, 1398 และ 1977 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวล ตามลำดับ ผลการศึกษาที่ได้มีสาเหตุเนื่องจากผลของปริมาณตัวถูกละลาย แรง electrostatic การเกิด interference ในบริเวณที่ใช้จับกับโลหะ และการผสมกันของชีวมวลและสารหนูลดลงเมื่อความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณเซลล์เป็นการเพิ่มพื้นที่ดูดซับให้มากขึ้นแต่การมีปริมาณเซลล์ที่สูงเกินไปอาจมีผลทำให้เซลล์รวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนทำให้บริเวณการดูดซับให้น้อยลง (Goyal *et al.*, 2003; Meikle *et al.*, 1990; Foirest and Roux, 1992)

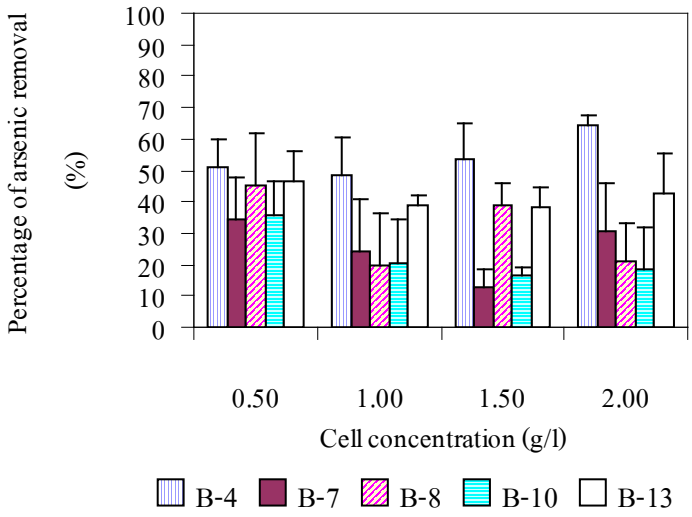
จากการศึกษาของ Gong และคณะ (2005) ซึ่งได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของเชื้อต่อการดูดซับตะกั่วโดยสาหร่าย *Spilurina maxima* โดยใช้ปริมาณสาหร่ายเท่ากับ 0.1 - 2.0 กรัมต่อลิตร ช่วยเพิ่มร้อยละการดูดซับตะกั่วได้เท่ากับ 24 - 84 แต่ปริมาณของตะกั่วที่ถูกดูดซับจะลดลงประมาณ 121 - 21 มิลลิกรัมตะกั่วต่อกรัมเซลล์ นอกจากนี้ Wightman และ Fein (2005) ได้ศึกษาการกำจัดเหล็กโดยใช้ความเข้มข้นของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 0 - 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งจากการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้นของเซลล์ 2 กรัมต่อลิตร ให้ร้อยละการลดลงของเหล็กสูงสุดคือเท่ากับร้อยละ 90 Goyal และคณะ (2003) ศึกษาผลของปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ที่ 5 - 40 มิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อการดูดซับโครเมียมที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยในการศึกษาพบว่าที่ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ 40 มิลลิกรัมสามารถดูดซับโครเมียมได้ 18.5, 7.5 และ 30.25 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้งขณะที่เมื่อใช้ปริมาณเชื้อ 5 มิลลิกรัมสามารถดูดซับโครเมียมได้ 83.6, 35.2 และ121 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้งสำหรับเชื้อ *Streptococcus equisimilis, Saccharomyces cerevisiae* และ *Aspergillus niger* ตามลำดับ

Padmavathy และคณะ (2003) ศึกษาปริมาณเชื้อยีสต์ที่ 0.5 - 8 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อใช้ในการดูดซับนิกเกิลเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การดูดซับนิกเกิลจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการดูดซับและจะค่อยๆช้าลงเมื่อเวลาผ่านไป ขณะที่ปริมาณเซลล์สูง (4 และ 8 กรัมต่อลิตร) สมดุลการดูดซับจะเกิดขึ้นในเวลา 20 - 30 นาทีแต่ที่ปริมาณเซลล์ต่ำ (0.5 - 1.0 กรัมต่อลิตร) สมดุลในการดูดซับเกิดขึ้นใน 60 นาที ดังนั้นเวลาที่ใช้ในการดูดซับจึงแตกต่างกันเมื่อมีปริมาณเชื้อยีสต์ที่ใช้ในการดูดซับต่างกัน โดยเมื่อมีปริมาณเชื้อยีสต์สูงเวลาในการดูดซับจะสั้นลงแต่อย่างไรก็ตามความสามารถในการดูดซับนิกเกิลต่อปริมาณเชื้อที่ใช้ในการดูดซับจะลดลงเมื่อปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น Srivata และ Thukar (2006) ศึกษาผลของปริมาณเชื้อราที่ร้อยละ 5, 10, 20 และ30 (น้ำหนักเซลล์ต่อปริมาตรสารละลาย) เพื่อใช้ในการดูดซับโครเมียมความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ปริมาณเชื้อราร้อยละ 20 สามารถลดปริมาณของโครเมียมได้สูงสุดคือเท่ากับร้อยละ 78 และให้ค่าการดูดซับเท่ากับ 8.25 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

A



B



ภาพที่ 19 ผลของปริมาณของจุลินทรีย์ 0.5 1.0 1.5 และ 2.5 กรัมต่อลิตร: (A) สารหนูที่ถูกดูดซับ (x100 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวล), (B) ร้อยละการลดลงของสารหนู (%)

Figure 19. Effect of cell concentration (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 g/l) on arsenic biosorption: (A) arsenic absorbed (x100mg/g biomass), (B) Percentage of arsenic removal (%).

5. การศึกษาปลดปล่อยสารหนูออกจากเซลล์จุลินทรีย์

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการดูดซับสารหนูโดยเชื้อแบคทีเรียซึ่งได้จากผลการศึกษาข้างต้นจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับสารหนู แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการดูดซับสารหนูจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อสามารถนำตัวดูดซับและปริมาณสารกลับมาใช้ใหม่ได้ซึ่งสามารถทำได้โดยการปลดปล่อยสารหนูโดยใช้สารเคมีเพื่อทำการปลดปล่อย ดังนั้นในการศึกษาการปล่อยสารหนูของเชื้อแบคทีเรียพบว่าการนำเซลล์ที่ถูกเตรียมด้วย 0.1 โมลาร์ EDTA มาทำการดูดซับสารหนูให้ผลดังตารางที่ 8 เชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถดูดซับสารหนูโดยใช้เซลล์ที่เตรียมด้วย 0.1โมลาร์ EDTA ซึ่งให้ประสิทธิภาพในการนำกลับมาใช้ใหม่ลดลงในทุกๆ เชื้อแบคทีเรีย ดังนี้ เชื้อ B-4 ให้ประสิทธิภาพในการนำกลับมาใช้ใหม่เท่ากับร้อยละ 30.19, 50.09, 26.39 มีร้อยละการปลดปล่อยสารหนูเท่ากับ 38.49 - 26.45 ตามลำดับ เชื้อ B-7ให้ประสิทธิภาพในการนำกลับมาใช้ใหม่เท่ากับร้อยละ 22.73, 79.31, 68.28 มีร้อยละการปลดปล่อยสารหนูเท่ากับ 7.27 - 7.76 ตามลำดับ เชื้อ B-8 ให้ประสิทธิภาพในการนำกลับมาใช้ใหม่เท่ากับร้อยละ 15.57, 60.77, 67.97 มีร้อยละการปลดปล่อยสารหนูเท่ากับ 29.57 - 38.44 ตามลำดับ เชื้อ B-10 ให้ประสิทธิภาพในการนำกลับมาใช้ใหม่เท่ากับร้อยละ 34.48, 56.63, 59.30 มีร้อยละการปลดปล่อยสารหนูเท่ากับ 30.55 - 20.19 ตามลำดับ และเชื้อ B-13 ให้ประสิทธิภาพในการนำกลับมาใช้ใหม่เท่ากับร้อยละ 45.30, 73.74, 40.55 มีร้อยละการปลดปล่อยสารหนูเท่ากับ 30.91 - 22.09 ตามลำดับ

ในการดูดซับและการปลดปล่อยนิกเกิลโดยยีสต์ที่ถูกเตรียมด้วย 10 มิลลิโมลาร์ EDTA (pH 7.0) พบว่านิกเกิลจะถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์โดยใช้ chelating agent และเซลล์สามารถนำกลับไปใช้ใหม่ได้อีกอย่างน้อย 3 ครั้ง (Kambe-Hanjon, 1997) Gardea-Torresday และคณะ (1998) ศึกษาการปลดปล่อยไอออนของทองแดง ตะกั่ว นิกเกิล และแคดเมียม โดยใช้สารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พบว่าเซลล์สามารถปลดปล่อยสารหนูออกมาได้ร้อยละ 97± 10.3, 99±9.2, 42±3.3 และ 79±20.0 หลังจากทำการดูดซับ-ปลดปล่อยเป็นจำนวน 4 รอบ ความสามารถในการสะสมตะกั่วลดลงเล็กน้อยโดยในครั้งสุดท้ายสามารถดูดซับได้ร้อยละ 75 ของความสามารถในการดูดซับเริ่มต้น และแต่ละรอบสามารถปลดปล่อยตะกั่วได้มากกว่าร้อยละ 90 ซึ่งผลที่ได้คล้ายกับกรณีของทองแดงโดยในครั้งสุดท้ายสามารถดูดซับได้ร้อยละ 79 ของความสามารถในการดูดซับเริ่มต้นสามารถปลดปล่อยทองแดงได้ร้อยละ92 - 98 สำหรับแคดเมียมความสามารถในการดูดซับเท่ากับร้อยละ 90 - 96ของทุกรอบ และมีการปลดปล่อยแคดเมียมเท่ากับร้อยละ 93 - 99 (Lu *et al.,*2006) Goyal และคณะ (2003) ศึกษาการปลดปล่อยโครเมียมด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พบว่าการปลดปล่อยโครเมียมจากเชื้อ *Streptococcus equisimilis, Aspergillus niger* และ *Saccharomyces cerevisiae* เท่ากับร้อยละ 42, 30 และ 27.5 ตามลำดับ การที่

S. equisimilis ให้ร้อยละการปลดปล่อยสูงกว่าเชื้อจุลินทรีย์อื่นเนื่องจากมีพื้นที่ผิวต่อน้ำหนักเซลล์สูงที่สุด

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพการนำมากลับมาใช้ใหม่ของตัวดูดซับชีวภาพและการปลดปล่อยสารหนูระหว่างกระบวนการดูดซับ-ปลดปล่อย

Table 8. Efficiency of biosorbent regeneration and metal recovery during repeated adsorption-desorption (A/D) cycles.

Isolated bacteria	A/D cycle	Biosorbent regeneration efficiency (%)	Metal recovery efficiency (%)
B-4	1	37.19	38.49
	2	50.09	29.11
	3	26.39	26.45
B-7	1	22.73	52.85
	2	79.31	21.09
	3	68.28	16.99
B-8	1	15.57	29.57
	2	60.77	28.39
	3	66.97	38.44
B-10	1	34.48	30.55
	2	56.63	23.71
	3	59.30	20.19
B-13	1	45.30	30.91
	2	73.74	13.29
	3	40.55	22.09

6. การจำแนกเชื้อโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการหาลำดับเบสของ 16S rDNA

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 24 สายพันธุ์มาจำแนกเชื้อโดยคุณสมบัติทางชีวเคมีซึ่งประกอบด้วย การเคลื่อนที่ของเชื้อ การรีดิวซ์ไนไตรต์ การทดสอบอินโดล การผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ การใช้ซิเตรต การย่อยสลายแป้งและเจลาติน การทดสอบเอนไซม์คาตาเลสและออกซิเดส การทดสอบการออกซิเดชัน-การหมัก การผลิตกรดและก๊าซจากคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลกโตส น้ำตาลซูโครส ผลการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้แสดงในตารางที่ 9

จากการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 24 สายพันธุ์มีคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการที่เหมือนกันคือ สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่มีการสร้างสารอินโดล ไม่สามารถย่อยสลายแป้งได้ สามารถผลิตกรดและก๊าซโดยใช้น้ำตาลซูโครส นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรีย B-15 และ B-16 ให้ผลบวกในการทดสอบการเกิดกรดด้วยเมทิลเรด (methyl red test) เชื้อแบคทีเรีย B-7, B-8, B-9, B-10, B-11, B-21, B-22, B-23 และ B-24 สามารถใช้ซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้ เชื้อแบคทีเรีย B-1, B-4, B-6, B-7, B-8, B-9, B-10, B-11, B-18, B-19, B-20, B-21, B-22, B-23 และ B-24 สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้ การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์พบได้จากเชื้อแบคทีเรีย B-13 แสดงว่าแบคทีเรียสามารถรีดิวซ์ซัลเฟอร์เป็นซัลไฟด์ได้ แบคทีเรียที่ให้ผลลบในการทดสอบเอนไซม์คาตาเลส ได้แก่ เชื้อ B-2, B-3, B-4, B-16, B-18 และ B-21 แบคทีเรียที่ให้ผลบวกในการทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส ได้แก่ เชื้อ B-1, B-2, B-3, B-7, B-8, B-9, B-10, B-11, B-13, B-18, B-21, B-22 และ B-24 ซึ่งผลการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเหล่านี้สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน ในการทดสอบออกซิเดชันและการหมัก พบว่า แบคทีเรีย B-1, B-2, B-3, B-8, B-9, B-10, B-11, B-12, B-18, B-21, B-22 และ B-24 ให้ผลเป็นบวก ผลการทดสอบเกิดเฉพาะการออกซิเดชัน แสดงว่ามีการออกซิไดซ์คาร์โบไฮเดรตในสภาวะที่มีอากาศแล้วมีกรดเกิดขึ้น สำหรับเชื้อ B-27 สามารถเกิดการหมักได้ เนื่องจากแบคทีเรียสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ มีเพียงแบคทีเรีย B-14 ที่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ เชื้อแบคทีเรีย B-2, B-3, B-4, B-9, B-10, B-11, B-12, B-13, B-21, B-25, B-26, B-27 และ B-28 สามารถผลิตกรดได้โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในขณะที่เชื้อ B-2, B-5, B-6, B-9, B-11, B-12, B-27 และ B-28 สามารถผลิตกรดได้จากน้ำตาลแลกโตส การทดสอบการผลิตกรดโดยใช้น้ำตาลต่างชนิดกันเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 24 สายพันธุ์ พบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียออกเป็นกลุ่มได้ดังนี้ กลุ่มแรกสามารถใช้น้ำตาลได้ทั้งสามชนิดได้แก่ B-1, B-8, B-10, B-23 และ B-24 กลุ่มที่สองสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและซูโครสได้แก่ B-2, B-3, B-9, B-12, B-18, B-21 และ B-22 กลุ่มที่สามสามารถใช้น้ำตาล

ซูโครสและแลคโตสได้แก่ B-4 และ B-5 กลุ่มที่สี่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ชนิดเดียวได้แก่ B-6, B-7, B-13, B-14, B-15, B-16, B-17, B-18 และ B-19

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

Table 9. Morphology and biochemical characterization of isolated bacteria.

Cell morphology and Biochemical characteristics	B-2	B-3	B-4	B-5	B-6	B-7	B-8	B-9	B-10	B-11	B-12	B-13
Gram stain	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Cell shape	rod	rod	rod	rod	rod	cocci	cocci	rod	rod	rod	rod	rod
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl red test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate utilization	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Starch hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
H_2S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Oxidation/fermentation (O/F)	O	O	O	N	N	N	N	O	O	O	O	O
Gelatin liquefaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from carbohydrates:												
Glucose	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Lactose	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ตารางที่ 9 (ต่อ)

Table 9 (cont.)

Cell morphology and Biochemical characteristics	B-14	B-17	B-18	B-19	B-20	B-21	B-22	B-23	B-25	B-26	B-27	B-28
Gram stain	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Cell shape	rod	rod	cocci	cocci	cocci	rod	rod	cocci	rod	rod	rod	rod
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl red test	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate utilization	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Starch hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
H_2S production	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
Oxidase test	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
Oxidation/fermentation (O/F)	N	N	N	N	N	O	N	N	O	O	F	O
Gelatin liquefaction	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from carbohydrates:												
Glucose	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

จากคุณสมบัติทางชีวเคมีที่กล่าวมาทั้งหมดสามารถจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ออกเป็น 7 สกุล (ตารางที่ 10) ดังนี้

<u>แบคทีเรียกลุ่มที่หนึ่ง</u> ได้แก่ *Enterobacter* ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย B-6, B-17, B-22 และ B-27 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเซลล์รูปแท่งติดสีแกรมลบ ผลิตกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคสและคาร์โบไฮเดรตอื่นๆให้ผลการทดสอบเอนไซม์คาตาเลสเป็นบวก ไม่สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ให้ผลการทดสอบกรดโดยเมทิลเรดที่เป็นลบ

<u>แบคทีเรียกลุ่มที่สอง</u> ได้แก่ *Neisseria* ประกอบด้วยเชื้อ B-7, B-8 และ B-21 ซึ่งเซลล์มีรูปร่างกลมหรือแท่ง ติดสีแกรมลบ มีการสร้างเอนไซม์คาตาเลสและออกซิเดส เนื่องจากให้ผลเป็นบวกในการทดสอบ

แบคทีเรียกลุ่มที่สาม ได้แก่ *Pseudomonas* ประกอบด้วยเชื้อ B-2, B-3, B-9, B-10, B-14, B-25, B-26 และ B-28 ซึ่งเซลล์มีรูปร่างกลมและติดสีแกรมลบ ไม่มีการหมักคาร์โบไฮเดรต สังเกตได้จากผลทดสอบการออกซิเดชันและการหมักซึ่งจะให้ผลเป็นบวกเฉพาะการออกซิเดชัน

แบคทีเรียกลุ่มที่สี่ ได้แก่ *Staphylococcus* ประกอบด้วยเชื้อ B-5, B-18, B-20 และ B-23 ซึ่งเซลล์จะมีรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก ให้ผลบวกในการทดสอบเอนไซม์คาตาเลส ไม่มีการสร้างสารอินโดล และสามารถใช้สารพวกคาร์โบไฮเดรตได้โดยกระบวนการออกซิเดชันและการหมัก

แบคทีเรียในกลุ่มที่ห้า ได้แก่ *Streptococcus* ประกอบด้วยเชื้อ B-4 และ B-19 โดยเซลล์จะมีรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก ให้ผลการทดสอบเอนไซม์คาตาเลสเป็นลบ

แบคทีเรียในกลุ่มที่หก ได้แก่ *Xanthobacter* ประกอบด้วยเชื้อ B-11 และ B-12 โดยเซลล์จะมีรูปร่างแท่ง ให้ผลบวกในการทดสอบเอนไซม์คาตาเลสและออกซิเดส สามารถผลิตกรดได้จากสารพวกคาร์โบไฮเดรต สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้ ไม่สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ไม่สามารถย่อยแป้งและเจลาตินได้

แบคทีเรียในกลุ่มที่เจ็ด ได้แก่ *Xanthomonas* ประกอบด้วยเชื้อ B-13 ซึ่งมีรูปร่างแท่ง ติดสีแกรมลบ โคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งมีสีเหลือง ผลการทดสอบเอนไซม์ออกซิเดสเป็นลบ แต่การทดสอบเอนไซม์คาตาเลสให้ผลเป็นบวก มีการรีดิวซ์ไนเตรต ไม่สร้างสารอินโดล

ผลการศึกษาที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับการคัดเลือกเชื้อที่สามารถทนต่อสารหนูจากไม้ที่มีการปนเปื้อนและทำการจำแนกเชื้อแล้ว พบว่าเชื้อที่คัดเลือกได้เป็นเชื้อในสกุล *Acinetobacter, Aureobacterium, Bacillus, Klebsiella, Microococcus, Pseudomonas, Rhodococcus* และ *Stenotrophomonas* (Clausen, 2000)

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารรีดิวซ์อาร์เซเนตจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนของสารหนู พบว่าเชื้อที่คัดแยกได้เป็นเชื้อในกลุ่ม *Aeromonas, Pseudomonas, Bacillus, Escherichia* และ *Acinetobacter* (Anderson and Cook, 2004)

ตารางที่ 10 ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ตามคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

Table 10. Genus of the isolates according to their morphology and biochemical characteristics.

Bacterial genus	Bacterial isolates
Enterobacter	B-6, B-17, B-22, B-27
Neisseria	B-7, B-8, B-21
Pseudomonas	B-2, B-3, B-9, B-10, B-14, B-25, B-26, B-28
Staphylococcus	B-5, B-18, B-20, B-23
Streptococcus	B-4, B-19
Xanthobacter	B-11, B-12
Xanthomonas	B-13

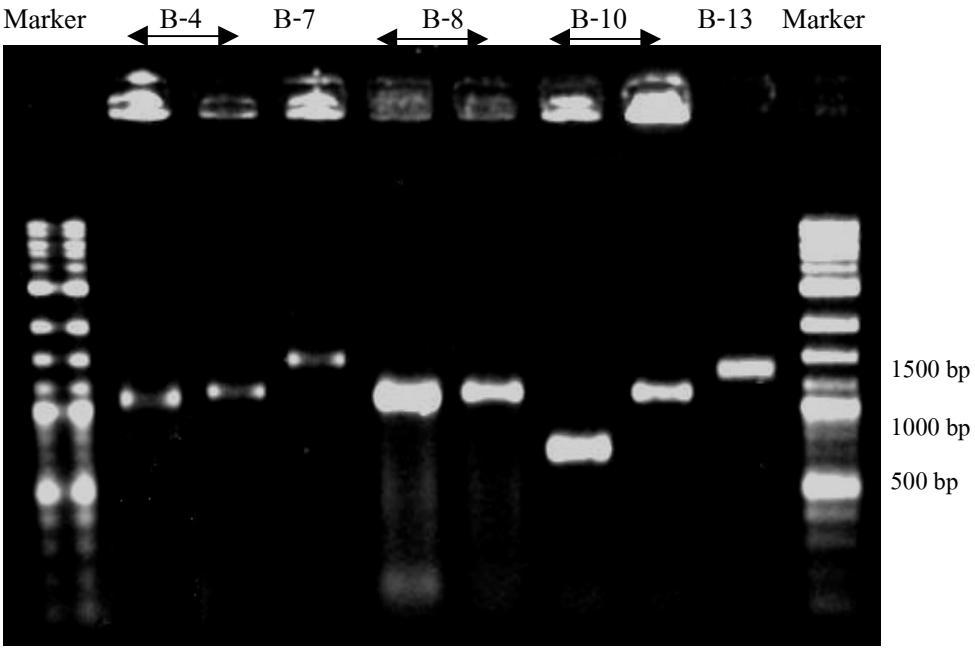
จากการที่เชื้อ B-4, B-7, B-8, B-10 และ B-13 มีความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นของสารหนูสูงได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่ทำการคัดแยกได้ในขั้นต้น จึงนำเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์มาทำการจำแนกเชื้อเพิ่มเติมโดยหาลำดับเบสของ 16S rDNA ในขั้นแรกเมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วจึงทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ต่างๆซึ่งพบว่าเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์สามารถเพิ่มจำนวนด้วยชุดไพรเมอร์ได้ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียด้วยไพรเมอร์ชุดต่างๆ

Table 11. DNA amplification with 16S rDNA various primers.

Isolated bacteria	Primer
B-4	27F-531R, 27F-802R, 27F-1115R, 27F-1492R, 339F-1492R, 785F-1492R and 1099F-1492R
B-7	27F-531R, 27F-802R, 27F-1115R, 27F-1492R, 339F-1492R, 785F-1492R and 1099F-1492R
B-8	27F-531R, 27F-802R, 27F-1115R, 339F-1492R, 785F-1492R and 1099F-1492R
B-10	27F-531R, 27F-802R, 339F-1492R, 785F-1492R and 1099F-1492R
B-13	27F-531R, 27F-802R,27F-1492R, 339F-1492R, 785F-1492R and 1099F-1492R

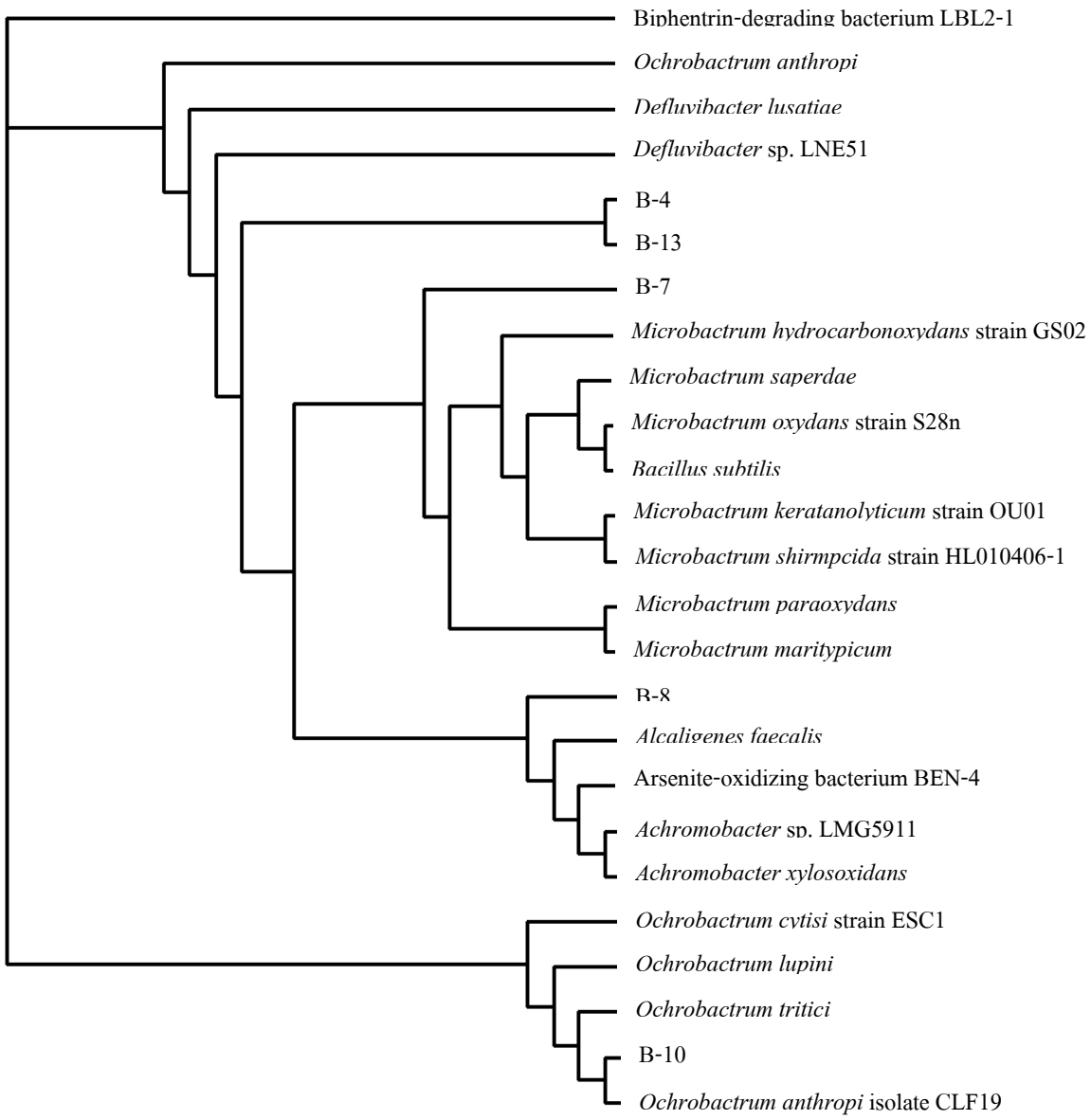
จากผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ต่างๆ ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ให้ผลดังภาพที่ 20 จึงทำการเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากผล PCR ที่ได้เพื่อนำไปใช้ในการหาลำดับเบส โดยเชื้อแต่ละสายพันธุ์เลือกใช้ผล PCR ดังนี้คือ B-4 ใช้ผล PCR ที่ได้จาก 27F-1115R และ 339F-1492R เชื้อ B-7 ใช้ผล PCR ที่ได้จาก 27F-1492R เชื้อ B-8 ใช้ผล PCR ที่ได้จาก 27F-1115R และ 339F-1492R เชื้อ B-10 ใช้ผล PCR ที่ได้จาก 27F-802R และ 339F-1492R เชื้อ B-13 ใช้ผล PCR ที่ได้จาก 27F-1492R ตามลำดับ ซึ่งสาเหตุที่มีการใช้ไพรเมอร์หลายชุดในการหาลำดับเบสเนื่องจากในการศึกษานั้นต้องการได้ลำดับเบสของ 16S rDNA ที่เป็นสายยาวและมีขนาดประมาณ 1500 คู่เบส



ภาพที่ 20 เจลอิเล็คโตรโฟริซิสดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ของเชื้อ B-4, B-7, B-8, B-10 และ B-13 โดยใช้ไพรเมอร์ต่าง ๆ (เลน B-4: 27F-1115R และ 339F-1492R, B-7 : 27F-1492R, B-8: 27F-1115R และ 339F-1492R, B-10: 27F-802R และ 339F-1492R, B-13 : 27F-1492R, Marker: Tridye 2 log DNA ladder)

Figure 20. Gel electrophoresis of PCR product of B-4, B-7, B-8, B-10 and B-13with different primers. (Lane B-4: 27F-1115R และ 339F-1492R, B-7 : 27F-1492R, B-8: 27F-1115R and 339F-1492R, B-10: 27F-802R และ 339F-1492R, B-13 : 27F-1492R).

เมื่อนำดีเอ็นเอดังกล่าวไปหาลำดับเบสด้วย ABI 3700 automated DNA sequencerโดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492 R และทำการจำแนกเชื้อโดยใช้โปรแกรม clustal X พบว่าสามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียได้ดังภาพที่ 21 ซึ่งจากภาพพบว่าเชื้อ B-7 มีความใกล้เคียงร้อยละ 97 กับเชื้อแบคทีเรีย *Microbarterium oxydans* เชื้อ B-8 มีความใกล้เคียงร้อยละ 99 กับเชื้อแบคทีเรีย *Achromobacter* sp. เชื้อ B-10 มีความใกล้เคียงร้อยละ 97 กับเชื้อแบคทีเรีย *Ochrobactrum anthropi* สำหรับเชื้อแบคทีเรีย B-4 และ B-13 มีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันมากแต่ยังไม่สามารถบอกได้ว่าใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใด ซึ่งผลที่ได้แตกต่างจากผลการจำแนกเชื้อเบื้องต้นด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องทำการตรวจสอบให้แน่ชัดต่อไป



ภาพที่ 21 ไฟโรจินิกทรีของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ B-4, B-7, B-8, B-10 และ B-13 ตามผลการวิเคราะห์ 16S rDNA

Figure 21. Phylogenic tree of strains B-4, B-7, B-8, B-10 and B-13 based on 16S rDNA analysis.

จากผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบสของ 16S rDNA พบว่าแตกต่างจากผลการเทียบเคียงเชื้อโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี แต่อย่างไรก็ตามจากคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *Microbacterium oxydans* *Achromobater* sp. และ *Ochrobactrum antropi* ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มีคุณสมบัติดังนี้ *Microbacterium oxydans* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ เกิดการออกซิไดซ์เมื่อใช้น้ำตาลซูโครส ไม่เจริญบนอาหาร Simmons' citrate ทดสอบเอนไซม์คาตาเลสให้ผลเป็นบวกแต่เอนไซม์ออกซิเดสให้ผลเป็นลบ การทดสอบเมทิลเรดให้ผลเป็นลบ เชื้อ *Achromobater* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ทดสอบเอนไซม์ออกซิเดสให้ผลเป็นบวก สามารถเกิดการออกซิเดชั่นและผลิตกรดได้จากน้ำตาลกลูโคส ไม่ย่อยสลายเจลาติน สามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ ไม่ผลิตแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ ไม่เกิดการสร้างอินโดล ไม่ย่อยสลายแป้ง เชื้อ *Ochrobactrum antropi* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ต้องการอากาศให้ผลการทดสอบเอนไซม์ออกซิเดสและคาตาเลสเป็นบวก สามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ และสามารถใช้กลูโคสได้ (Schumann *et al*., 1999; Chester and Cooper, 1979; Laura *et al*., 1996; Moller *et al*., 1999) ซึ่งจากคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับเชื้อแบคทีเรีย B-7, B-8 และ B-10 ตามลำดับ