ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกแบคทีเรียและสภาวะที่เหมาะสมในการดูดซับสารหนูด้วยวิธีทางชีวภาพ

ผู้เขียน นางสาวปัทมาภรณ์ อักษรชู

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2549

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนของโลหะหนักเช่นสารหนูนับว่าเป็นสิ่งที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะสารหนูที่มีวาเลนซี่ 3 (อาร์เซไนต์, As(III)) ซึ่งเป็นสารหนูที่อยู่ในรูปรีดิวซ์ มีความเป็นพิษสูงและสามารถเคลื่อนที่ได้ดีกว่าสารหนูที่มีวาเลนซี่ 5 (อาร์เซเนต, As(V)) วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อสารหนูจากแหล่งดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูในบริเวณอำเภอร่อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราช หลังจากนั้นทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถดูดซับสารหนูได้ ซึ่งจากการศึกษาพบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์ 24 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ในอาหาร BSYM I ที่ความเข้มข้นของสารหนูสูงถึง 40 มิลลิโมลาร์ (2,981 มิลลิกรัมของสารหนูต่อลิตร) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีการให้อากาศ เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 24 สายพันธุ์มาทำการเทียบเคียงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าสามารถจัดแบ่งออกได้เป็น 7 สกุล คือ *Enterobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Xanthobacter* และ *Xanthomonas*

เมื่อศึกษาระยะการเจริญที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ต่อการดูดซับสารหนูพบว่าปริมาณสารหนูจะลดลงเมื่อเชื้อแบคทีเรียอยู่ในระยะ log phase ของการเจริญ และปริมาณของสารหนูในรูปของอาร์เซเนตมีปริมาณที่ค่อนข้างคงที่ไม่แตกต่างกันในช่วงระยะเวลาต่างๆ จึงมีความเป็นไปได้ที่ปริมาณสารหนูที่ลดลงเกิดจากการดูดซับไว้บนจุลินทรีย์ ซึ่งปริมาณของอาร์เซไนต์ที่ลดลงโดยเชื้อจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ พบว่าเชื้อ B-13 สามารถลดปริมาณอาร์เซไนต์ลงได้มากที่สุดเท่ากับร้อยละ 96.93 รองลงมาคือเชื้อ B-8, B-7, B-10, และ B-4 เท่ากับร้อยละ 87.08, 86.72, 84.36 และ 80.90 ตามลำดับ สำหรับเชื้อที่สามารถลดปริมาณอาร์เซไนต์ลงได้น้อยที่สุดคือ เชื้อ B-18 ซึ่งสามารถลดปริมาณลงได้เพียงร้อยละ 36.87 เมื่อนำเชื้อ B-4, B-7, B-8, B-10 และ B-13 มาบ่มเลี้ยงจนมีอายุที่เหมาะสมต่อการดูดซับสารหนูแล้วปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ไว้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการดูดซับสารหนู พบว่าเชื้อ B-4 มีสภาวะที่เหมาะสมคือพีเอช

เริ่มต้นของสารละลายเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของสารหนูเริ่มต้นเท่ากับ 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาณชีวมวลเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมงสามารถลดปริมาณสารหนูได้ร้อยละ 50.92 เชื้อ B-7 และB-8 มีสภาวะที่เหมาะสมคือ พีเอชเริ่มต้นของสารละลายเท่ากับ 8.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของสารหนูเริ่มต้นเท่ากับ 80 มิลลิโมลาร์ ปริมาณชีวมวลเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมงสามารถลดปริมาณสารหนูได้ร้อยละ 34.24 และ 45.00 ตามลำดับ เชื้อ B-10 มีสภาวะที่เหมาะสมคือพีเอชเริ่มต้นของสารละลายเท่ากับ 8.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาณชีวมวลเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 ชั่วโมงสามารถลดปริมาณสารหนูได้ร้อยละ 35.66 สำหรับเชื้อ B-13 มีสภาวะที่เหมาะสมคือพีเอชเริ่มต้นของสารละลายเท่ากับ 8.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของสารหนูเริ่มต้นเท่ากับ 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาณชีวมวลเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมงสามารถลดปริมาณสารหนูได้ร้อยละ 46.50

เมื่อศึกษาการดูดซับ-ปลดปล่อยสารหนู พบว่าเชื้อแต่ละชนิดสามารถดูดซับสารหนูโดยใช้เซลล์ที่ถูกเตรียมด้วย 0.1 โมลาร์ EDTA ซึ่งจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเชื้อทุกสายพันธุ์สามารถดูดซับสารหนูโดยใช้เซลล์ที่ถูกเตรียมได้อย่างน้อยที่สุด 3 ครั้งโดยมีประสิทธิภาพในการปลดปล่อยสารหนูเท่ากับร้อยละ 38.49 - 26.45, 52.85 - 16.99, 26.99 - 38.44, 30.55 - 20.19 และ 30.91 - 22.09 ในเชื้อ B-4, B-7, B-8, B-10 และ B-13 ตามลำดับ

จากการเทียบเคียงเชื้อแบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ 16S rDNA พบว่าเชื้อ B-7, B-8 และ B-10 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Microbacterium oxydans* ร้อยละ 97 *Achromobacter* sp. ร้อยละ 99 และ *Ochrobactrum anthropi* ร้อยละ 97 ตามลำดับ สำหรับเชื้อ B-4 และ B-13 ยังไม่สามารถจำแนกได้ว่าใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใด ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่เชื้อทั้งสองเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติการดูดซับสารหนู (อาร์เซไนต์)

Thesis Title	Screening and Optimization of Bacterial Isolates for Arsenic Bioadsorption
Author	Miss Pattamaporn Aksornchu
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2006

ABSTRACT

The disposal of toxic heavy metals such as arsenic posed high risk to the environment. Arsenite [As(III)], a reduced form of arsenic, is more toxic and mobile than arsenate [As(V)]. The aim of this work was to isolate arsenic-resisting bacteria from contaminated soil collected in Ronpiboon District, Nakorn Srithammarat Province followed by screening these bacteria for their ability to adsorb arsenite. Twenty four bacterial isolates were obtained from samples cultivated in basal salts medium containing 1% yeast extract and up to 40 mM arsenite (2981 mg As/l) at 30^{o}C under aerobic condition. Based upon morphological and biochemical characteristics these isolates were found to be representatives of the genus *Enterobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Xanthobacter* and *Xanthomonas*.

Optimal incubation time for arsenic adsorption was shown to occur during log phase of growth. Furthermore, arsenate concentrations were found to be stable while arsenite levels were reduced from the initial concentration. Thus, suggesting that arsenic was adsorbed to microbial cell rather than transformed arsenite to arsenate. Bacterial strains that gave high percentage of arsenic removal were B-4, B-7, B-8, B-10 and B-13 which reduced arsenic concentration 80.90%, 86.72%, 87.08%, 84.36% and 96.93%, respectively. The strain with the lowest arsenic removal ability was found to be B-18 (36.87% arsenic removal).

The biomass of 5 bacterial strains with the highest arsenic removal ability, B-4, B-7, B-8, B-10 and B-13 were then selected for arsenic adsorption optimization studies. Before optimization, the bacterial isolates were incubated to achieve optimal culture age and then cells were collected and stored in phosphate buffer. The parameters studied were pH, temperature,

adsorption time, initial arsenic concentration and cell concentration. The results showed optimum conditions for arsenic adsorption by strain B-4 was pH 7.0 at 25^{o}C in 12 hours with 40 mM arsenic concentration and 0.5 g/l biomass concentration which gave arsenic removal of 50.92%. For strains B-7 and B-8 the optimal arsenic adsorption conditions were pH 8.0 at 30^{o}C in 12 hours with 80 mM arsenic concentration and 0.5 g/l biomass concentration which gave arsenic removal of 34.24% and 45.00%, respectively. Strain B-10 had an optimal arsenic adsorption condition of pH 8.0 at 30^{o}C in 8 hours with 40 mM arsenic concentration and 0.5 g/l biomass concentration and strain B-13 optimal adsorption conditions were pH 8.0 at 30^{o}C in 2 hours with 40 mM arsenic concentration and 0.5 g/l biomass concentration which gave arsenic removal of 35.66% and 46.50%, respectively.

In order to utilize bacterial cells efficiently as bioadsorbent, their ability to be reutilized had to be assessed. Arsenic adsorbed to the bacterial biomass could be desorbed with 0.1 M EDTA and the result showed strains B-4, B-7, B-8, B-10 and B-13 could be reused at least 3 time and the efficiency of arsenic recovery by these strains were 38.49 - 26.45%, 52.85 - 16.99%, 26.99 - 38.44%, 30.55 - 20.19% and 30.91 - 22.09%, respectively.

Identification of the isolates by 16S rDNA sequences analysis showed that the strains B-7, B-8, and B-10 have 97%, 99% and 97% similarity to *Microbacterium oxydans*, *Achromobacter* sp. and *Ochrobactrum anthropi*, respectively. While isolates B-4 and B-13 seems to be novel arsenite adsorbing bacteria.