

### บทที่ 3

#### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 1. การแยกเชื้อแบคทีเรียในทะเลจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนด้วยตะกั่ว

การแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีตะกั่วในปริมาณ 125 พีพีเอ็ม จากแหล่งที่มีการปนเปื้อนของตะกั่วทั้ง 8 แหล่ง ณ บริเวณท่าเรือน้ำลึก จังหวัดสงขลาพบว่าสามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งที่มีการปนเปื้อนของตะกั่ว

Table 7. Characteristics of lead tolerant marine bacteria.

Samples	Colonies Morphology
1. Sea water	Turbid white with slime, yellow combine with brown with slime
2. Sea water	Turbid white with slime, turbid white point in clear white with slime
3. Sea water	Turbid white with slime, yellow combine with brown with slime
4. Waste	Turbid white with slime, red with slime
5. Plastic	Turbid white with slime, turbid white point in clear white with slime, yellow combine with brown with slime
6. Sediment with sea water	Turbid white with slime, turbid white point in clear white with slime
7. Plastic bottom	Turbid white with slime, turbid white point in clear white with slime
8. Rope	Turbid white with slime, turbid white point in clear white with slime

ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ ทั้ง 8 แหล่ง ณ บริเวณท่าเรือน้ำลึกสงขลา พบว่า โคลินี่ที่แยกได้จะมีลักษณะเป็นเมือกเยิ้มและมีสีต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 7

## 2. คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างโพลิเมอร์ดูดจับกับตะกั่ว

จากการนำเชื้อที่แยกได้จากข้อ 1 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมตะกั่วในสูตร B พบเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตในอาหารชนิดนี้ 4 สายพันธุ์ ดังแสดงในตาราง 8

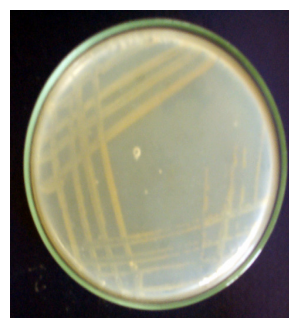
ตารางที่ 8 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างน้ำทะเลบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร B

Table 8. Characteristics of marine - derived bacteria on medium B.

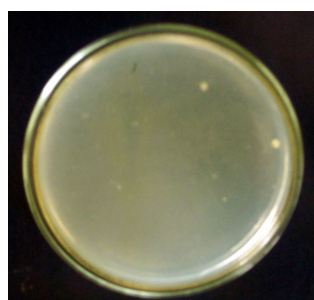
Bacteria	Gram strain	Shape
CNBP001	+	Short rod
CNBP002	+	Oval
CNBP003	+	Rod
CNBP004	-	Coccus



CNBP001



CNBP002



CNBP003



CNBP004

รูปที่ 7 แสดงลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกแล้วว่ามีความสามารถในการสร้างโพลีเมอร์ชีวภาพ

Figure 7. Characteristics of marine - derived bacteria produce Extracellular polysaccharides (EPS).

พบว่าเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ซึ่งประกอบไปด้วย เชื้อ CNBP001, CNBP002, CNBP003 และ CNBP004 มีความสามารถในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของตะกั่วอยู่ 125 พีพีเอ็ม และนอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์นี้มีการสร้างโพลีเมอร์ชนิดภายนอกเซลล์ด้วย จะสังเกตได้จากลักษณะของโคโลนีของเชื้อจะมีลักษณะเป็นเมือกเยิ้ม อาจเนื่องมาจากแบคทีเรีย ทั้ง 4 สายพันธุ์นี้ต้องปรับตัวให้สามารถที่จะทนอยู่ในสภาวะที่มีตะกั่วอยู่ (Bruins, 2000) และเมื่อนำส่วนใสของอาหารที่แยกเอาตัวเซลล์ออกไปแล้วมาตกตะกอนโดยเอทานอล (1:4) เพื่อให้ได้โพลีเมอร์ออกมา และนำโพลีเมอร์ที่ผลิตได้จากเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์นี้มาทดสอบความสามารถในการดูดซับตะกั่ว แสดงในตารางที่ 9

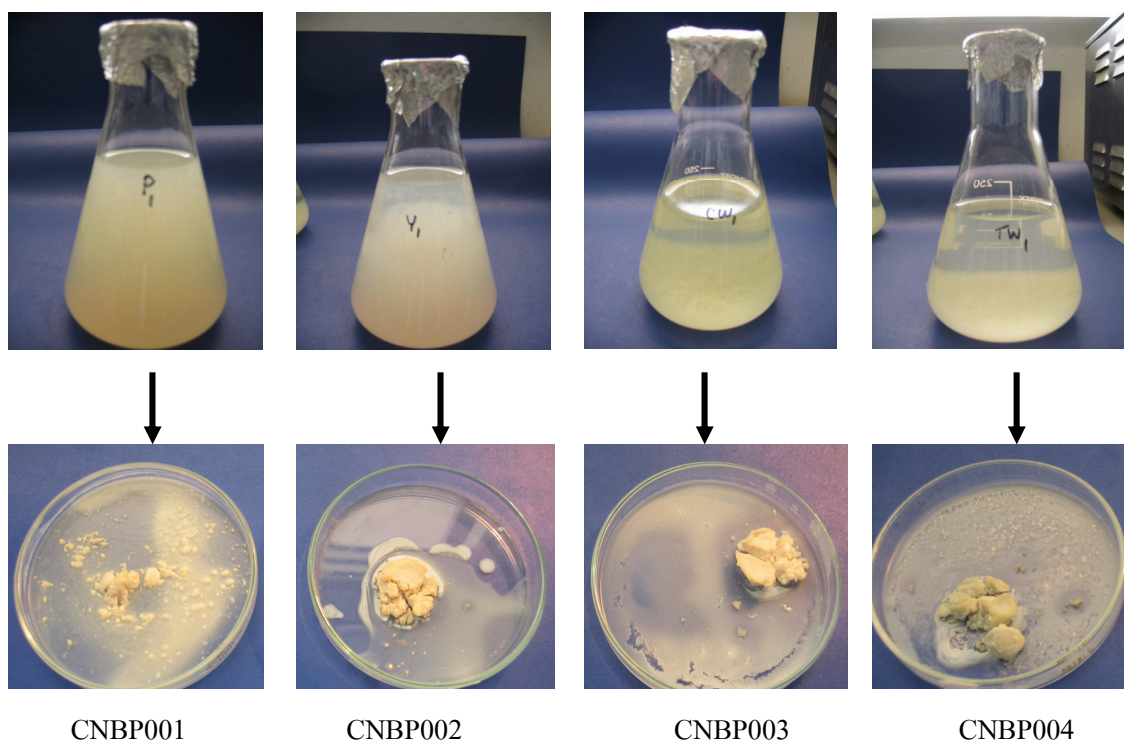
ตารางที่ 9 ความสามารถในการดูดซับตะกั่วของโพลิเมอร์จากเชื้อ 4 สายพันธุ์ ที่เวลา 2 และ 12 ชั่วโมง

Table 9. Lead absorption by EPS from 4 isolates.

Bacteria polymer	% Lead absorption	
	2 hours	12 hours
CNBP001	41.94	45.77
CNBP002	41.40	15.80
CNBP003	36.36	38.57
CNBP004	48.55	25.56

พบว่าความสามารถในการดูดซับตะกั่วของโพลิเมอร์จากเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ จะมีความสามารถในการดูดซับที่ดีเมื่อเวลา 2 ชั่วโมง โดยเฉพาะเชื้อ CNBP001 CNBP002 และ CNBP004 แต่เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมงพบว่าความสามารถในการดูดซับตะกั่วจะลดลงอย่างมาก โดยเฉพาะ โพลิเมอร์จากเชื้อ CNBP002 และ CNBP004 แต่ยังคงพบว่าโพลิเมอร์จากเชื้อ CNBP001 และ CNBP003 ยังคงมีความสามารถในการดูดซับที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากโพลิเมอร์ที่ผลิตจากเชื้อคนละสายพันธุ์จะมีความสามารถในการผลิตโพลิเมอร์ที่แตกต่างกัน (Lindberg, 1998) ดังนั้นจึงเลือกโพลิเมอร์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย CNBP001 มาทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโพลิเมอร์ที่มีความสามารถในการดูดซับตะกั่วต่อไปเนื่องจากโพลิเมอร์ที่ผลิตจากเชื้อ CNBP001 มีความสามารถในการดูดซับตะกั่วได้ดีที่สุด

จากผลการศึกษาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตโพลิเมอร์ที่ใช้ดูดซับตะกั่วทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่ามีลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาดังในตารางที่ 10 โดยมี 2 สายพันธุ์ที่เป็นแกรมบวก และมีลักษณะเป็นแท่ง คือ CNBP001 และ CNBP003 มี 1 สายพันธุ์ที่เป็นแกรมบวกและมีลักษณะเป็นรูปกลมรี คือ CNBP002 และมี 1 สายพันธุ์ที่เป็นแกรมลบและมีลักษณะเป็นรูปกลมคือ CNBP004



ภาพที่ 8 การตะกอน โพลีเมอร์ด้วยเอทานอลและลักษณะของโพลีเมอร์ที่ได้จากแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์  
 Figure 8. Precipitation of EPS with ethanol and polymer characteristics.

เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีแสดงในตารางที่ 10 พบว่าสามารถจำแนกเชื้อได้ทั้งหมด 4 กลุ่มคือ เชื้อในกลุ่ม *Brevibacterium* sp. (CNBP001) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ให้ผลบวกในการทดสอบคาตาเลส มีการเคลื่อนที่และเมื่อมีการใช้น้ำตาลกลูโคสจะเกิดการสร้างกรดแต่ไม่สร้างแก๊ส กลุ่ม *Staphylococcus* sp. (CNBP002) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ให้ผลบวกในการทดสอบคาตาเลส ไม่มีการเคลื่อนที่และเมื่อมีการใช้น้ำตาลกลูโคสจะเกิดการสร้างกรดแต่ไม่สร้างแก๊ส กลุ่ม *Bacillus* sp. (CNBP003) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกให้ผลบวกในการทดสอบคาตาเลส มีการเคลื่อนที่และเมื่อมีการใช้น้ำตาลกลูโคสจะเกิดการสร้างกรดแต่ไม่สร้างแก๊ส ซึ่งเป็นแบบ fermentation และเมื่อทำการช้อมแกรมสปอร์จะเห็นสปอร์อยู่ที่ด้านปลายของเซลล์

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อที่คัดเลือกได้

Table 10. Morphological and biochemical characteristic of selected bacteria strains.

Morphological and biochemical characteristic	Selected bacteria			
	CBBP001	CNBP002	CNBP003	CNBP004
Gram strain	+	+	+	-
Cell shape	Short rod	Oval	Rod	Coccus
Motility	+	-	+	ND
Catalase test	+	+	+	ND
Oxidation/Fermentation(O-F)	O	O	F	ND
Spore forming	-	-	+	ND
Result	<i>Brevibacterium</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	Un identified

หมายเหตุ    -: Negative  
 +: Positive  
 O: Oxidation  
 F: Fermentation  
 ND: Non detected

และสำหรับเชื้อ CNBP004 นั้น จากการดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาคาดว่าเชื้อชนิดนี้เป็นกลุ่มของ Neisseriaceae ซึ่งเป็นลักษณะของจุลินทรีย์กลุ่มเดียวที่เป็นแกรมลบและมีลักษณะเป็นทรงกลม

### 3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโพลิเมอร์ชีวภาพที่ดูดซับตะกั่ว

#### 3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตโพลิเมอร์

##### 3.1.1 การแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน

จากแหล่งของคาร์บอนที่นำมาทดลองเพื่อหาแหล่งของคาร์บอนที่จะนำไปใช้ในการผลิตโพลิเมอร์มากที่สุดและมีความสามารถในการดูดซับโลหะตะกั่วซึ่งประกอบด้วย ซูโครส กลูโคส และกากน้ำตาล พบว่ากากน้ำตาลจะเป็นแหล่งคาร์บอนของการผลิตโพลิเมอร์ที่ดีที่สุด รองลงมาเป็น ซูโครส และ กลูโคส ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 11)

แต่เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการดูดซับตะกั่วกลับพบว่าโพลิเมอร์ที่ผลิตจาก กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน จะมีความสามารถในการดูดซับตะกั่วได้ดีที่สุดรองลงมาเป็น ซูโครส และ กากน้ำตาล ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึง C:N ratio ของแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิดพบว่าการผลิต EPS ของ เชื้อ CNBP001 จะเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อ C:N ratio เพิ่มขึ้นเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เช่นเดียวกับเมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่กลับพบว่าการผลิต EPS จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อ C:N ratio เพิ่มสูงขึ้นในแหล่งคาร์บอนที่ใช้กากน้ำตาลซึ่งสังเกตได้จากค่าของ Relative production ( $\text{Relative production} = \frac{\text{ปริมาณโพลิเมอร์ที่เชื้อผลิตได้}}{\text{ปริมาณโพลิเมอร์ที่น้อยที่สุดที่เชื้อผลิตได้}}$ ) จะเห็นได้ว่าแหล่งของคาร์บอนมีผลต่อปริมาณและความสามารถ EPS ที่เกิดขึ้น (Sutherland, 1990; Nompoothiri *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังพบว่า *Lactobacillus plantarum* EP56 จะผลิต EPS ได้เพิ่มขึ้นเมื่อใช้กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน (Tallon *et al.*, 2003) และแต่เมื่อพิจารณาถึง ความสัมพันธ์ เปอร์เซ็นต์การดูดซับตะกั่วและปริมาณของโพลิเมอร์ที่ผลิตได้ กลับพบกากน้ำตาลซึ่งสามารถผลิตโพลิเมอร์ได้ดีที่สุดกลับมีความสามารถในการดูดซับที่น้อย ดังนั้นเกณฑ์ในการเลือกแหล่งของคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตโพลิเมอร์ที่มีความสามารถในการดูดซับตะกั่วคือ เปอร์เซ็นต์การดูดซับตะกั่ว ดังนั้นพบว่า กลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์มีค่าการดูดซับที่สูงที่สุด แต่พบว่าโพลิเมอร์ที่ผลิตได้จาก กลูโคสที่ความเข้มข้น 4 และ 10 เปอร์เซ็นต์ก็มีความสามารถในการดูดซับตะกั่วที่สูงและไม่มีความแตกต่างในการดูดซับทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับโพลิเมอร์ที่ผลิตได้จากกลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น แต่ในการทดลองนี้ได้เลือก ซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ซึ่งสามารถผลิตโพลิเมอร์ได้ 0.40 กรัมโพลิเมอร์ต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีความสามารถในการดูดซับ 37.44 เปอร์เซ็นต์มาเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อไปเนื่องจากซูโครสมีราคาที่ถูกกว่ากลูโคสและยังให้ค่าที่ดูดซับที่ดี

ตาราง 11 แสดงความสามารถในการดูดซับโลหะหนักในชนิดของแหล่งคาร์บอนและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่ต่าง ๆ กัน

Table 11. Effect of various carbon sources on EPS formation and ability of absorbing.

C source	Weight of polymer (g/100 ml)	Relative production	Lead absorption (%)
su2%	0.40±0.04 <sup>ab</sup>	1.27 <sup>b</sup>	37.44±2.50 <sup>bc</sup>
su4%	0.51±0.06 <sup>bcd</sup>	1.62 <sup>cd</sup>	35.26±1.48 <sup>abc</sup>
su6%	0.54±0.02 <sup>cde</sup>	1.71 <sup>cde</sup>	33.33±0.64 <sup>ab</sup>
su10%	0.47±0.06 <sup>abc</sup>	1.49 <sup>abc</sup>	48.22±9.58 <sup>cde</sup>
glu2%	0.32±0.06 <sup>a</sup>	1.00 <sup>a</sup>	36.17±10.92 <sup>bc</sup>
glu4%	0.41±0.05 <sup>ab</sup>	1.29 <sup>b</sup>	54.37±1.51 <sup>de</sup>
glu6%	0.42±0.02 <sup>ab</sup>	1.32 <sup>b</sup>	57.24±0.63 <sup>de</sup>
glu10%	0.61±0.01 <sup>def</sup>	1.92 <sup>def</sup>	50.00±0.50 <sup>de</sup>
mo2%	1.01±0.00 <sup>g</sup>	3.19 <sup>g</sup>	24.66±0.67 <sup>a</sup>
mo4%	0.66±0.02 <sup>ef</sup>	2.07 <sup>f</sup>	27.42±2.65 <sup>ab</sup>
mo6%	0.72±0.06 <sup>f</sup>	2.26 <sup>f</sup>	45.50±1.17 <sup>cd</sup>
mo10%	0.43±0.12 <sup>abc</sup>	1.35 <sup>abc</sup>	28.1±0.74 <sup>ab</sup>

หมายเหตุ Significant at  $p \leq 0.05$

su = sucrose , glu = glucose , mo = molasses

### 3.1.2 แปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

แหล่งของไนโตรเจนที่นำมาใช้ทดลองเพื่อหาแหล่งของไนโตรเจนที่จะนำไปใช้ในการผลิตโพลิเมอร์ที่มากและมีความสามารถในการดูดซับโลหะตะกั่วซึ่งประกอบด้วยไนโตรเจนจากแหล่งยีสต์สกัด เปปโตน และ นมถั่วเหลือง (soy milk) ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่ายีสต์สกัดจะให้ปริมาณของโพลิเมอร์ที่สูงที่สุด รองลงมาเป็น เปปโตน และ นมถั่วเหลือง (แสดงในตารางที่12) ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตโพลิเมอร์จาก *Agaricus brasiliensis* จะมีค่าที่สูงเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่ง



ไนโตรเจน (Andrea *et al.*, 2005) เมื่อพิจารณา ถึง C:N ratio ของแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิด พบว่าการผลิต EPS ของเชื้อ CNBP001 จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อ C:N ratio ต่ำๆ พบว่า EPS จะผลิตได้สูงที่สุดเมื่อ C:N ratio เท่ากับ 1:5 เมื่อ ยีสต์สกัด และ เปปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งขัดแย้งกับ Burdman และคณะ (2000) รายงานว่าการผลิต EPS จะเพิ่มขึ้นเมื่อ C:N ratio เท่ากับ 10:1

ตาราง 12 แสดงความสามารถในการดูดซับโลหะหนักในชนิดของแหล่งไนโตรเจนและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่ต่างๆกัน

Table 12. Effect of various nitrogen sources on EPS formation and ability of absorbing.

N sources	Weight of Polymer (g/100 ml)	Relative production	Lead absorption (%)
p1%	0.48±0.02 <sup>ab</sup>	1.11 <sup>ab</sup>	50.09±0.87 <sup>b</sup>
p4%	1.11±0.08 <sup>abc</sup>	2.60 <sup>abc</sup>	59.70±0.14 <sup>c</sup>
p7%	1.73±0.11 <sup>cde</sup>	4.02 <sup>cde</sup>	68.58±5.76 <sup>d</sup>
p10%	2.55±0.20 <sup>e</sup>	5.93 <sup>e</sup>	74.56±7.59 <sup>de</sup>
s1%	0.43±0.05 <sup>ab</sup>	1.00 <sup>a</sup>	77.15±2.16 <sup>d</sup>
s4%	0.83±0.37 <sup>abc</sup>	1.93 <sup>abc</sup>	68.87±0.66 <sup>d</sup>
s7%	1.44±0.41 <sup>bcd</sup>	3.35 <sup>bcd</sup>	94.13±0.33 <sup>g</sup>
s10%	2.13±0.75 <sup>de</sup>	4.96 <sup>de</sup>	ND <sup>a</sup>
y1%	0.49±0.02 <sup>a</sup>	1.14 <sup>ab</sup>	87.81±2.53 <sup>fg</sup>
y4%	1.33±0.01 <sup>abcd</sup>	3.10 <sup>abcd</sup>	85.46±1.07 <sup>f</sup>
y7%	2.23±0.71 <sup>de</sup>	5.18 <sup>de</sup>	93.80±0.13 <sup>g</sup>
y10%	2.55±0.44 <sup>e</sup>	5.93 <sup>e</sup>	89.13±0.84 <sup>fg</sup>

หมายเหตุ Significant at  $p \leq 0.05$

p = peptone , s = soy milk , y = yeast extract

ND = Non detected

ในการผลิตโพลิเมอร์ของแบคทีเรียที่เรี่ยนั้นจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการจำกัดปริมาณของไนโตรเจน เช่น เชื้อ *Pseudomonas* และ *Xanthomonas* (Sutherland, 1990) แต่พบว่ามีรายงานของเชื้อบางชนิด เช่น *Streptococcus* LY03 (Degeest and De Vuyst, 1999) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* PP (Kimmel *et al.*, 1998) และ *Pediococcus damnosus* 2.6 (Duenas *et al.*, 2003) จะผลิตโพลิเมอร์มากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของไนโตรเจนซึ่งสอดคล้องกับเชื้อ CNBP001 จะสามารถผลิตโพลิเมอร์มากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของไนโตรเจนลงในอาหาร นอกจากนี้พบว่าเมื่อมีการใช้ไนโตรเจนอินทรีย์ที่เป็นแหล่งในการสร้าง EPS จะมีการผลิต EPS ในอัตราที่สูงขึ้นด้วย (Morin, 1998) เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการดูดซับตะกั่วของโพลิเมอร์พบว่า โพลิเมอร์ที่มียีสต์สกัดเป็นแหล่งของไนโตรเจนจะมีความสามารถในการดูดซับตะกั่วได้ดีที่สุด รองลงมาเป็น นมถั่วเหลืองและ เปปโตน แต่เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่านมถั่วเหลือง 7 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด 1, 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างในการดูดซับทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกใช้ นมถั่วเหลือง 7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถผลิตโพลิเมอร์ได้สูงถึง 1.44 กรัม ต่อ 100 มิลลิกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อและมีความสามารถในการดูดซับตะกั่วได้สูงถึง 94.13 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งของไนโตรเจนเนื่องจาก นมถั่วเหลือง นั้นมีราคาที่ถูกกว่ายีสต์สกัดมากจึงทำให้สามารถลดต้นทุนในการผลิตได้

### 3.2 ปัจจัยทางกายภาพในการเลี้ยงเชื้อ

#### 3.2.1 พีเอช เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการศึกษาระดับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ค่า 3, 5, 7, 8, 10 และชุดควบคุม (พีเอช 5.5) ตามลำดับเพื่อหาพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตโพลิเมอร์ที่สูงที่สุดที่มีความสามารถนำไปจับกับตะกั่วได้ พบว่าน้ำหนักของโพลิเมอร์ที่ผลิตได้ในสภาวะที่เป็นกรดและเป็นกลางนั้นจะไม่มี ความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ แต่พบว่าเมื่อพีเอชสูงขึ้น (ด่าง) กลับพบว่าการสร้างโพลิเมอร์มีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 13) ซึ่งสอดคล้องจากรายงานของ Shu และ Lung (2003) พบว่า เมื่อ พีเอชในอาหารมีค่าสูงปริมาณของโพลิเมอร์ก็จะมากขึ้นด้วย แต่เมื่อพีเอชในอาหารลดลง (กรด) ปริมาณของโพลิเมอร์ก็จะลดลงด้วย เมื่อพิจารณาความสามารถในการดูดซับตะกั่วของโพลิเมอร์ที่ผลิตจากพีเอชต่างกันั้นพบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในการดูดซับตะกั่วอย่างมีนัยสำคัญยกเว้นที่พีเอช 3 อาจจะเป็นเนื่องมาจาก แบคทีเรียแต่ละชนิดจะสร้างโพลิเมอร์ที่แตกต่างกันเมื่อ พีเอช ต่างกัน (Shu *et al.*, 2003) พบว่า *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 จะผลิตโพลิเมอร์ได้ดีที่ พีเอช 5.5 (Looijesteljn and Hugenholtz, 1999) ดังนั้นจึงเลือก พีเอชชุดควบคุม (5.5) ซึ่งสามารถผลิตโพลิเมอร์ได้ 1.01 กรัมต่อ 100 มิลลิกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อและมี

ความสามารถในการดูดซับตะกั่วได้สูงถึง 83.94 เปอร์เซ็นต์ (อาหารที่เตรียมโดยไม่มีการปรับพีเอช) มาใช้ทดลองเพื่อหาสภาวะต่อไป

ตารางที่ 13 ผลของพีเอชในการผลิตโพลิเมอร์และการดูดซับตะกั่ว

Table 13. Effect of pH on EPS production and lead absorption.

pH	Weight of polymer (g/100ml)	Relative production	Lead absorption (%)
3	1.07±0.03 <sup>ab</sup>	1.13 <sup>c</sup>	61.73±5.18 <sup>a</sup>
5	1.00±0.03 <sup>a</sup>	1.00 <sup>ab</sup>	81.77±8.53 <sup>b</sup>
7	1.05±0.06 <sup>ab</sup>	1.11 <sup>bc</sup>	78.63±8.05 <sup>b</sup>
8	1.14±0.01 <sup>b</sup>	1.21 <sup>d</sup>	73.94±0.43 <sup>ab</sup>
10	1.37±0.02 <sup>c</sup>	1.45 <sup>c</sup>	73.79±4.81 <sup>ab</sup>
control(5.50)	1.01±0.10 <sup>ab</sup>	1.07 <sup>a</sup>	83.94±3.00 <sup>b</sup>

หมายเหตุ Significant at  $p \leq 0.05$

### 3.2.2 อุณหภูมิ

จากการศึกษาช่วงของอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโพลิเมอร์ที่ 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับนั้น พบว่าที่ อุณหภูมิ 25 จะให้การผลิตโพลิเมอร์ที่สูงที่สุดคือ 1.16 กรัมต่อ 100 มิลลิกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อ และพบว่าที่อุณหภูมินี้จะไม่มี ความแตกต่างทางสถิติ ในการดูดซับอย่างมีนัยสำคัญกับ อุณหภูมิที่ต่ำกว่า (20 องศาเซลเซียส) หรือสูงกว่า (30 และ 35 องศาเซลเซียส) (ตารางที่14)

ตาราง 14 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตโพลิเมอร์และความสามารถในการดูดซับตะกั่ว

Table 14. Effect of temperature on EPS production and lead absorption.

Temperature (°C)	Weight of polymer (g/100ml)	Relative production	Lead absorption (%)
20	1.04±0.10 <sup>a</sup>	1.01 <sup>a</sup>	82.39±0.20 <sup>a</sup>
25	1.16±0.06 <sup>a</sup>	1.21 <sup>a</sup>	77.88±0.68 <sup>a</sup>
30	1.03±0.06 <sup>a</sup>	1.00 <sup>a</sup>	81.68±5.31 <sup>a</sup>
35	1.10±0.03 <sup>a</sup>	1.15 <sup>a</sup>	79.60±5.23 <sup>a</sup>

หมายเหตุ Significant at  $p \leq 0.05$

ซึ่งพบว่าแบคทีเรียจะมีความสามารถผลิตโพลิเมอร์ได้ในช่วงที่ค่อนข้างกว้าง (Morin, 1998) โดย *Rahnella aquatilis* สามารถผลิตโพลิเมอร์ได้ตั้งแต่อุณหภูมิช่วง 5-40 องศาเซลเซียส (Matsuyama *et al.*, 1999) และเมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการดูดซับตะกั่วของโพลิเมอร์ที่ผลิตได้ในอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียสนี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการดูดซับตะกั่วกับโพลิเมอร์ที่ผลิตได้ในอุณหภูมิที่สูงกว่า (25-35 องศาเซลเซียส) ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียสซึ่งมีความสามารถในการดูดซับตะกั่วได้ 81.68 เปอร์เซ็นต์มาใช้เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในหัวข้อต่อไป เนื่องจากที่อุณหภูมินี้ไม่ต้องทำการปรับอุณหภูมิในการใช้เครื่องเขย่ามาก จึงประหยัดค่าใช้จ่าย แต่พบว่าแบคทีเรียบางชนิดเช่น *Lactobacillus plantarum* EP 56 จะผลิต EPS ได้ดีที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส และจะผลิต EPS ลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (Tollon *et al.*, 2003)

### 3.2.3 ความเร็วรอบในการเขย่า

การให้อากาศในการผลิตโพลิเมอร์เป็นสิ่งสำคัญซึ่งพบว่า จากการศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสมในการเขย่าต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโพลิเมอร์ที่ความเร็วรอบ 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที พบว่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ให้อากาศในการผลิตโพลิเมอร์ที่สูงสุด แต่จะไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ความเร็วรอบอื่น (150 และ 200 รอบต่อนาที) Lee และคณะ (1996) พบว่าการผลิต EPS จากเชื้อ *Bacillus polymyxa* จะลดลงเมื่อมีปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์สูงขึ้น ซึ่ง

ออกซิเจนมีผลโดยตรงต่อการผลิต โพลีเมอร์ โดยการเพิ่มขึ้นของโพลีเมอร์จะขึ้นกับปริมาณของออกซิเจนที่เพิ่มขึ้น (Morin, 1998) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ผลของความเร็วรอบที่มีต่อการผลิต โพลีเมอร์และความสามารถในการดูดซับตะกั่ว

Table 15. Effect of aeration (rpm) on EPS production on lead absorption.

Agitation speed	Weight of polymer ( g/100ml)	Relative production	Lead absorption (%)
150 rpm	0.98±0.04 <sup>a</sup>	1.00 <sup>a</sup>	95.46±0.48 <sup>a</sup>
200rpm	0.99±0.03 <sup>a</sup>	1.00 <sup>a</sup>	94.80±2.57 <sup>a</sup>
250rpm	1.04±0.04 <sup>a</sup>	1.06 <sup>a</sup>	94.00±0.54 <sup>a</sup>

หมายเหตุ Significant at  $p \leq 0.05$

แต่เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่าการผลิตโพลีเมอร์จากความเร็วรอบ 150-250 rpm นั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในความสามารถการดูดซับการดูดซับของตะกั่ว เช่นเดียวกับโพลีเมอร์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* NIZO B40 จะไม่มีความแตกต่างเมื่อผลิตโพลีเมอร์ในความเร็วรอบระหว่าง 50-800 rpm (Looijesteljn and Hugenholtz, 1999) พบว่าการดูดซับตะกั่วจากการหาความเร็วรอบที่เหมาะสมในการทดลองนี้จะให้เปอร์เซ็นต์การดูดซับได้สูงถึง 95.46 เมื่อใช้ความเร็วรอบ 150 rpm ดังนั้นจึงเลือกความเร็วรอบที่ 150 rpm เป็นความเร็วรอบที่เหมาะสมในการผลิตโพลีเมอร์เนื่องจากเป็นความเร็วรอบที่น้อยที่สุดที่ให้ค่าการผลิตและการดูดซับที่สูง ซึ่งค่าความเร็วรอบที่น้อยจะมีผลต่อการประหยัดพลังงานในการผลิต

### 3.2.4 การชักนำการสร้างโพลีเมอร์

จากการศึกษาการชักนำการสร้างโพลีเมอร์ที่มีความสามารถในการดูดซับโลหะโดยการใส่สารละลายตะกั่วที่ความเข้มข้น 50 และ 300 พีพีเอ็ม ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าน้ำหนักของโพลีเมอร์ที่สร้างขึ้นมาในอาหารทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 16)

ตาราง 16 ผลของการชักนำที่มีต่อการผลิตโพลิเมอร์และความสามารถในการดูดซับตะกั่ว

Table 16. Effect of various induce on EPS formation and ability of lead absorbing.

polymer	Weight of polymer (g/100ml)	Relative production	Lead absorption (%)
NPb	1.00±0.10 <sup>a</sup>	1.12 <sup>a</sup>	80.39±0.35 <sup>ab</sup>
Pb50	1.02±0.04 <sup>a</sup>	1.14 <sup>a</sup>	82.10±2.37 <sup>b</sup>
Pb300	0.97±0.07 <sup>a</sup>	1.08 <sup>a</sup>	72.81±6.32 <sup>a</sup>

หมายเหตุ Significant at  $p \leq 0.05$

NPb = Non lead, Pb50 = 50 ppm lead, Pb300 = 300 ppm lead

จากการทดลองพบว่าความสามารถในการดูดซับตะกั่วจะลดลงเป็น 82.10 และ 72.81 เปอร์เซ็นต์ เมื่อความเข้มข้นของตะกั่วเพิ่มขึ้นเป็น 50 และ 300 พีพีเอ็ม ตามลำดับ (ตารางที่ 15) โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 300 พีพีเอ็ม นั้นเปอร์เซ็นต์การดูดซับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจจะเกิดจากโพลิเมอร์ที่สร้างขึ้นมาในอาหารที่มีตะกั่วอยู่สูงนั้นจะทำให้การดูดซับเอาตะกั่วไว้บางส่วนเพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่อาศัยอยู่ (Bruins, 2000) จึงทำให้ความสามารถในการดูดซับลดลงเมื่อนำเอาโพลิเมอร์นั้นมาใช้ในการดูดซับในสารละลายตะกั่ว

### 3.3 ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการตกตะกอนโพลิเมอร์

จากการใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ เช่น เอทานอล, เมทานอล และ อะซิโตน มาทำการตกตะกอนโพลิเมอร์เพื่อให้ได้ปริมาณโพลิเมอร์ที่มากที่สุด พบว่า อะซิโตนจะตกตะกอนโพลิเมอร์ได้มากกว่า เอทานอล และ เมทานอล ได้น้ำหนัก 1.47 1.03 และ 0.88 กรัมโพลิเมอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาความสามารถในการดูดซับตะกั่วของโพลิเมอร์ที่ถูกตกตะกอนด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดนี้ พบว่าความสามารถในการดูดซับตะกั่วของโพลิเมอร์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญดังแสดงในตารางที่ 17

ตาราง 17 ผลของตัวทำละลายที่มีต่อการตกตะกอนของโพลิเมอร์และความสามารถในการดูดซับตะกั่ว  
Table 17. Effect of organic solvents on precipitated EPS and ability of absorbing.

Solvents	Weight of polymer (g/100ml)	Relative production	Lead absorption (%)
Acetone	1.47±0.05 <sup>c</sup>	1.80	81.53±3.10 <sup>a</sup>
EtOH	1.03±0.06 <sup>b</sup>	1.26	81.15±5.60 <sup>a</sup>
MeOH	0.88±0.05 <sup>a</sup>	1.08	85.71±1.30 <sup>a</sup>

หมายเหตุ Significant at  $p \leq 0.05$

พบว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใส่ลงไปใต้น้ำหมักที่มีโพลิเมอร์อยู่นั้นจะไปทำให้ค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (dielectric constant) ของสารละลายลดลง ซึ่งค่านี้จะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการละลายน้ำ พบว่าถ้าตัวทำละลายที่มีค่าคงที่ไดอิเล็กทริกต่ำจะมีคุณสมบัติในการลดความสามารถในการละลายน้ำได้ดีกว่าตัวทำละลายที่มีค่าคงที่ไดอิเล็กทริกสูง (เอทานอล(24.3), เมทานอล(32.6) และ อะซิโตน (20.7)) (อาภัสตรา ชมิคท์, 2537) ซึ่งมีผลให้ความสามารถในการละลายน้ำของโพลิเมอร์ลดลงและในขณะเดียวกันจะส่งผลให้เกิดการเพิ่มการจับกันของโพลิเมอร์จึงทำให้โพลิเมอร์สามารถรวมตัวแล้วตกตะกอนลงมาได้มากขึ้น (Robyt and White, 1987) ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ อะซิโตนเป็นตัวตกตะกอนของโพลิเมอร์ได้ดีที่สุดและสามารถตกตะกอนโพลิเมอร์ได้สูงถึง 1.47 กรัม

#### 4 ศึกษาวิธีการประยุกต์ใช้

##### 4.1 ศึกษาความสามารถในการดูดซับตะกั่วของโพลิเมอร์ที่แยกได้

###### 4.1.1 ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของโพลิเมอร์ต่อการดูดซับตะกั่ว

จากการศึกษาปริมาณโพลิเมอร์ที่ 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 และ 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักรวมต่อปริมาตรของสารละลายตะกั่วมาตรฐานที่ความเข้มข้น 125 พีพีเอ็ม พบว่า ความสามารถในการดูดซับตะกั่วของโพลิเมอร์นั้นมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น จนถึงปริมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักรวมต่อปริมาตร หลังจากนั้นความสามารถในการดูดซับตะกั่วจะมีแนวโน้มลดลง (ตารางที่ 18) ทั้งนี้อาจจะเกิดจากปริมาณโพลิเมอร์ที่น้อยไปจะเพิ่มความสามารถในการดูดซับโลหะ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของโพลิเมอร์ลงไปจะทำ

ให้เกิดการรบกวนระหว่างตำแหน่งของการจับของโพลิเมอร์และตะกั่ว (Gadd *et al.*, 1988 อ้างโดย Ahalya *et al.*, 2003) จึงทำให้ความสามารถในการดูดซับตะกั่วลดลงเมื่อปริมาณของโพลิเมอร์เพิ่มขึ้นดังนั้นจึงเลือกปริมาณโพลิเมอร์ 0.3 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรมาใช้ในการดูดซับ เนื่องจากให้ค่าการดูดซับสูงถึง 80.85 เปอร์เซ็นต์แต่ Salehizadeh และ Shojaosadati (2003) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ EPS กับผลของการดูดซับโลหะหนักพบว่าเมื่อมีการเพิ่มปริมาณของ EPS จะมีการเพิ่มการดูดซับด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 18 แสดงปริมาณของโพลิเมอร์ที่มีผลต่อการดูดซับตะกั่ว

Table 18. Effect of EPS concentration on Lead absorption.

%EPS concentration(w/v)	Lead absorption (%)
0.1	73.83±2.50 <sup>a</sup>
0.3	80.85±2.34 <sup>b</sup>
0.5	70.6±1.93 <sup>a</sup>
0.7	71.71±1.16 <sup>a</sup>
1.0	69.95±1.88 <sup>a</sup>

หมายเหตุ Significant at  $p \leq 0.05$

#### 4.1.2 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการดูดซับตะกั่วของโพลิเมอร์ที่ระยะเวลาต่างๆ

จากการทดสอบการดูดซับโพลิเมอร์ ที่เวลา 2, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงนั้น พบว่าค่าการดูดซับจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในชั่วโมงที่ 2 ถึงชั่วโมงที่ 6 และค่าการดูดซับจะคงที่ (6, 12 และ 24 ชั่วโมง) หลังจากนั้นค่าการดูดซับจะลดลงในชั่วโมงที่ 48 (ตารางที่19) ทั้งนี้อาจจะเกิดจากปฏิกิริยาในการดูดซับอาจจะเกิดการผันกลับหลังจากเกิดการอิ่มตัวในการดูดซับตะกั่วแล้ว ซึ่งมีผลตรงกันข้ามกับ EPS ที่ผลิตจาก *Ochrobactrum anthropi* ซึ่งจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการดูดซับโลหะหนักเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงเวลาหลังจาก 2 ชั่วโมง (Ozdemir *et al.*, 2003) ดังนั้นจึงทำการเลือกการดูดซับตะกั่วที่ 6 ชั่วโมงมาใช้ในการทดลองต่อไปเนื่องจากที่เวลานี้ให้ค่าการดูดซับที่ดีและยังใช้เวลาน้อยในการดูดซับอีกทั้งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชั่วโมงที่ 12 และ 24



ตารางที่ 19 แสดงความสามารถของโพลีเมอร์ในการดูดซับตะกั่วที่เวลาต่างๆ

Table 19. Effect of contact time of Lead absorption.

Contact time (hr)	Lead absorption (%)
2	93.49±0.07 <sup>a</sup>
6	95.58±0.62 <sup>b</sup>
12	95.85±0.69 <sup>b</sup>
24	93.77±0.79 <sup>ab</sup>
48	93.03±0.62 <sup>a</sup>

หมายเหตุ Significant at  $p \leq 0.05$

#### 4.1.3 ศึกษาผลพีเอชที่ใช้ในการดูดซับตะกั่วของโพลีเมอร์

จากการศึกษาผลของพีเอชในสารละลายตะกั่วที่มีผลต่อการดูดซับของโพลีเมอร์ที่ พีเอช 3, 5, 10 และ 4.5 (ชุดควบคุม) พบว่า ค่าการดูดซับตะกั่วสูงสุดถึง 92.19 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพีเอชในการดูดซับตะกั่วคือ 4.5 (ตารางที่ 20) นอกจากนี้ยังพบว่าพีเอชที่มากขึ้นค่าการดูดซับจะน้อยลง เนื่องจากสารละลายตะกั่วจะมีคุณสมบัติในการตกตะกอนที่พีเอชมากกว่า 5.5 (Kratochvil and Volesky, 1998) แต่ในขณะที่เดียวกันที่พีเอชต่ำๆ อีออนของโลหะหนักจะมีการแข่งขันกับประจุบวกในสารละลาย ในการเข้าจับกับประจุลบของโพลีเมอร์ จึงทำให้ค่าการดูดซับของโลหะลดลงที่ พีเอชต่ำๆ แต่ในขณะที่พีเอชที่สูงประจุลบในสารละลายจะแข่งขันกันกับประจุลบของโพลีเมอร์ในการจับกับอีออนของโลหะหนักจึงเป็นผลให้ความสามารถในการจับกับตะกั่วของโพลีเมอร์ลดลง (Leung *et al.*, 2001) Salehizadeh และ Shojaosadati (2003) ได้ทำการศึกษาการดูดซับตะกั่ว ทองแดง และสังกะสี โดยใช้ EPS ที่ผลิตจาก *Bacillus firmus* MS-105 พีเอช มีผลต่อการดูดซับโลหะของ EPS ที่ได้จาก *B. firmus* พบว่า EPS สามารถดูดซับโลหะตะกั่ว ได้ถึง 98.3 เปอร์เซ็นต์ที่ พีเอช 4.5 ทองแดง สามารถดูดซับโลหะ 74.9 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 4 และ สังกะสี สามารถถูกดูดซับได้ 61.8 เปอร์เซ็นต์ที่พีเอช 6 นอกจากนี้พบว่าพีเอชที่เป็นกรดจะมีความสามารถในการดูดซับโลหะได้ดีกว่าพีเอชที่เป็นด่าง ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติของ EPS ที่มีประจุเป็นไอออนลบ และ Ozdemir และคณะ (2003) พบว่าพีเอช ที่เหมาะสมกับการดูดซับของ *Ochrobactrum anthropi* สำหรับ chromium (IV), cadmium (II) และ copper (II) คือที่พีเอช 2, 8 และ 3 ตามลำดับ

ตารางที่ 20 แสดงความสามารถของโพลิเมอร์ในการดูดซับตะกั่วที่ พีเอช ต่างๆ

Table 20. Effect of initial pH on Lead absorption.

Initial pH	Lead absorption (%)
control *	92.19±1.28 <sup>b</sup>
3	92.10±1.78 <sup>b</sup>
5	85.54±0.13 <sup>b</sup>
10	16.47±12.54 <sup>a</sup>

หมายเหตุ \* Control = 4.5

Significant at  $p \leq 0.05$

## 4.2 ศึกษาผลของโลหะหนักอื่นๆที่มีผลต่อการดูดซับของโพลิเมอร์

### 4.2.1 ศึกษาผลความสามารถของโลหะหนักอื่นๆที่มีผลต่อการดูดซับของโพลิเมอร์

จากการศึกษาความสามารถของโพลิเมอร์ต่อโลหะหนักแคดเมียม แมงกานีส และ ตะกั่วที่ ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ความสามารถในการดูดซับของโพลิเมอร์กับตะกั่วที่ความเข้มข้น 200 rpm จะมีค่าที่สูงที่สุด รองลงมาคือแคดเมียมที่ความเข้มข้น 50 rpm และแมงกานีสที่ความเข้มข้น 10 rpm คือ 98.46 77.72 และ 56.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (แสดงดังตารางที่ 21) เนื่องจากโพลิเมอร์แต่ละชนิดจะมีผลต่อการดูดซับโลหะได้แตกต่างกัน ซึ่งการจับกันของโลหะและโพลิเมอร์นั้นอยู่บนพื้นฐานของทฤษฎีกรด-เบส (อิเล็กตรอนตัวให้-รับ) โดยโลหะแต่ละชนิดจะมีค่าความเป็นกรดและเบสที่แตกต่างกันซึ่งจะส่งผลต่อการเคลื่อนที่และความมีขั้วของโลหะนั้น (Huber *et al.*, 1990)

ตารางที่ 21 แสดงความสามารถของโลหะชนิดอื่นที่มีผลต่อการดูดซับของโพลีเมอร์

Table 21. Effect other heavy metals on absorption of EPS.

Metal	Concentration (ppm)	Absorption (%)
Cd	5	47.67±4.28 <sup>a</sup>
	10	53.08±6.28 <sup>a</sup>
	20	71.20±1.93 <sup>b</sup>
	50	77.72±1.50 <sup>b</sup>
	100	75.20±2.26 <sup>b</sup>
Mn	5	43.25±3.83 <sup>a</sup>
	10	56.50±2.85 <sup>b</sup>
	20	55.75±5.47 <sup>b</sup>
	50	41.88±3.60 <sup>a</sup>
	100	50.13±1.12 <sup>ab</sup>
Pb	5	26.00±10.10 <sup>a</sup>
	20	47.18±7.78 <sup>b</sup>
	50	76.51±4.76 <sup>c</sup>
	100	87.89±0.77 <sup>d</sup>
	125	95.63±1.25 <sup>de</sup>
	200	98.46±0.50 <sup>e</sup>

หมายเหตุ Significant at  $p \leq 0.05$

พบว่าตะกั่วจะอยู่ในกลุ่มของความเป็นกรดที่มากกว่า แคลเซียมและแมงกานีส ตามลำดับ จึงเป็นเหตุให้ตะกั่วสามารถเข้าจับกับโพลีเมอร์ได้ดีกว่าแคลเซียมและแมงกานีส นอกจากนี้ยังพบว่ารัศมีของไอออน (ionic radii) ของโลหะ (ตะกั่ว 112 pm > แคลเซียม 97 pm > แมงกานีส 80 pm) ก็มีผลต่อการจับกันของโพลีเมอร์ด้วยซึ่งโลหะที่มีค่ารัศมีไอออนที่สูง (ตะกั่ว และ แคลเซียม) จะจับกับโพลีเมอร์ได้อย่างซับซ้อนด้วยพันธะโคออดิเนต (coordinate bond) ในขณะที่กลุ่มของโลหะที่มีรัศมีไอออนต่ำ (แมงกานีส) จะจับกับโพลีเมอร์ผ่านทางปฏิกิริยาไฟฟ้าสถิตภายในโมเลกุล

(intramolecular electrostatic interactions) (Loace *et al.*, 1997) นอกจากนี้ค่าสภาพไฟฟ้าลบ (electronegativity) ของโลหะ (ตะกั่ว 2.33 > แคดเมียม 1.69 > แมงกานีส 1.55) แต่ละชนิดจะมีผลต่อการจับกันของโพลิเมอร์โดยค่าสภาพไฟฟ้าลบที่สูงจะสามารถจับกับโพลิเมอร์ได้ดีเนื่องจากมีแรงดึงดูดระหว่างประจุ (electrostatic force) ที่สูงจึงทำให้เกิดเป็นพันธะเชิงซ้อนอออนได้ดีกว่าโลหะที่มีค่าสภาพไฟฟ้าลบน้อย (Nui and Volesky, 2003) จึงเป็นสาเหตุให้โพลิเมอร์จับกับตะกั่วได้สูงที่สุดรองลงมาเป็นแคดเมียม และแมงกานีส ตามลำดับ

นอกจากนี้พบว่าความสามารถในการดูดซับของโพลิเมอร์กับโลหะตะกั่ว แคดเมียม และแมงกานีสจะเพิ่มขึ้นเป็น 98.46, 75.2 และ 50.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับเมื่อความเข้มข้นของโลหะหนักเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Aksu และ Dommez (2006) พบว่าการดูดซับแคดเมียมและนิกเกิลของเชื้อ *Cholorella vulgaris* จะเพิ่มมากขึ้นถึง 86.6 และ 58.4 เปอร์เซ็นต์เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโลหะหนักจาก 25 พีพีเอ็ม เป็น 150 พีพีเอ็ม เช่นเดียวกับ Iyer และคณะ (2005) พบว่าโพลิเมอร์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *Enterobacter cloaceae* ที่แยกได้จากทะเลชายฝั่งตะวันตกประเทศอินเดียสามารถจับกับโลหะแคดเมียม ทองแดง และโคบอลต์ ได้มากขึ้นถึง 65.95, 20.2 และ 8.35 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโลหะสูงขึ้นจาก 25 พีพีเอ็ม เป็น 100 พีพีเอ็ม เนื่องจากบริเวณตำแหน่งที่จับกันของโลหะและโพลิเมอร์ยังไม่อิ่มตัวจึงส่งผลให้ค่าการดูดซับเพิ่มขึ้น (Loace *et al.*, 1997)

ตารางที่ 22 แสดงความสามารถของโลหะผสมของตะกั่วและแคดเมียมที่มีผลต่อการดูดซับของโพลิเมอร์

Table 22. Effect of cadmium and lead on absorption of EPS.

Metals concentration	Absorption (%)	
	Cadmium	Lead
Cd:Pb (100:0)	75.20±2.26 <sup>b</sup>	-
Cd:Pb (0:100)	-	87.89±0.77 <sup>b</sup>
Cd:Pb (5:100)	62.50±8.59 <sup>a</sup>	99.32±0.11 <sup>c</sup>
Cd:Pb (100:5)	76.94±0.83 <sup>b</sup>	55.52±4.77 <sup>a</sup>
Cd:Pb (100:200)	80.81±1.27 <sup>b</sup>	97.64±0.44 <sup>c</sup>

หมายเหตุ Cd = Cadmium, Pb = Lead

Significant at  $p \leq 0.05$

จากการศึกษาความสามารถในการดูดซับโลหะผสมระหว่างตะกั่วและแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของโพลิเมอร์พบว่า ความสามารถในการดูดซับแคดเมียมของโพลิเมอร์จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อใส่โลหะตะกั่วความเข้มข้น 5 และ 200 พีพีเอ็ม ลงไปในสารละลายแคดเมียม ซึ่งการดูดซับเพิ่มขึ้นจาก 75.20 เปอร์เซ็นต์ไปเป็น 76.94 และ 80.81 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 22) โดยความสามารถในการดูดซับแคดเมียมที่เพิ่มขึ้นจากการเพิ่มความเข้มข้นของตะกั่วจะไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่กลับพบว่า การดูดซับตะกั่ว โดยมีแคดเมียมผสมอยู่จะมีความสามารถในการดูดซับที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการดูดซับตะกั่วของโพลิเมอร์จะเพิ่มขึ้นจาก 87.89 เปอร์เซ็นต์เป็น 99.32 และ 97.64 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคดเมียมเป็น 5 และ 100 พีพีเอ็ม ตามลำดับ เนื่องจากความสามารถในการดูดซับโลหะของโพลิเมอร์อาจจะถูกชักจูงได้ด้วยโลหะอีกชนิดหนึ่งในระบบการดูดซับที่โลหะมากกว่าหนึ่งชนิดเนื่องจากการดูดซับที่มีโลหะมากกว่าหนึ่งชนิดจะเกิดการจับกันด้วยพันธะโคเวเลนต์ (Ahalya *et al.*, 2003) ซึ่งเป็นการจับกันด้วยการซ้อนทับกันของกลุ่มหมอกอเล็กตรอน

นอกจากนี้ Tsezos และ Volesky (1982) พบว่าการดูดซับยูเรเนียม (uranium) ของ *Rhizopus arrhizus* จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการใส่เหล็ก และสังกะสีลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับความสามารถในการดูดซับแคดเมียมของ *Ascophyllum nodosum* จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการเติมทองแดงและสังกะสีลงไปในสารละลาย (Volesky and Holan, 1995)

Leung และคณะ (2001) ได้ศึกษาพบว่า *Pseudomonas pseudoalcaligenes* สามารถที่จะดูดซับโลหะตะกั่วได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับโลหะหนักตัวอื่นๆอีกทั้งประจุที่อยู่บนโพลิเมอร์จะมีความสามารถที่จะจับกับประจุของโลหะหนักได้แตกต่างกัน (Gutnick and Bach, 2000) จึงทำให้การจับโลหะหนักมีความแตกต่างกัน นอกจากนี้เมื่อโลหะหนักชนิดใดที่สามารถที่จะจับกับโพลิเมอร์ได้ดีที่สุดแล้วจะเกิดการสร้าง anionic co-ion

ตารางที่ 23 เปรียบเทียบการดูดซับตะกั่วของโพลิเมอร์ที่ไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์และผ่านการทำบริสุทธิ์

Table 23. The comparison of lead absorption between crude and purified polymer.

Polymer	Lead absorption (%)
crude	98.84±0.59 <sup>a</sup>

purified

99.06±0.56<sup>a</sup>

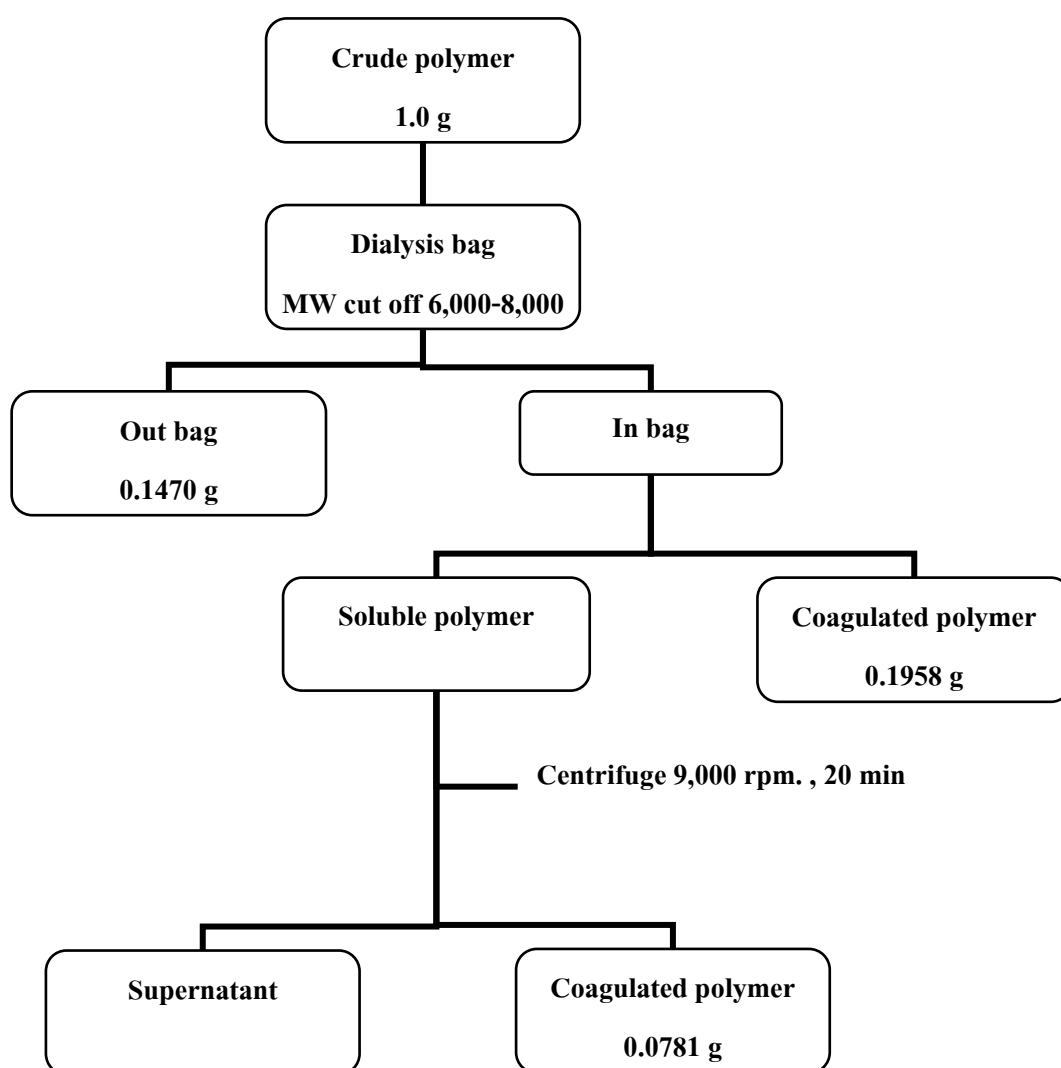
หมายเหตุ Significant at  $p \leq 0.05$

จากการศึกษาถึงคุณสมบัติของการดูดซับตะกั่วของ โพลีเมอร์สกัดหยาบและโพลีเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนแล้วด้วยถุงไดอะไลซิสแสดงผลดังรูปที่ 9 พบว่าโพลีเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วได้ดีกว่าโพลีเมอร์สกัดหยาบ โดยสามารถดูดซับได้สูงถึง 99.06 และ 98.84 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 23) ซึ่งการดูดซับของโพลีเมอร์ทั้งสองชนิดนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Hoyle และ Beveridge (1984) และ Beveridge และ Koval (1981) พบว่าผนังเซลล์ของ *E.coli* K -12 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วสามารถจับกับโลหะสตรอนเทียม (strontium; Sr<sup>2+</sup>) ได้สูงถึง 2.2 มิลลิกรัมต่อกรัมโพลีเมอร์ แต่ผนังเซลล์สกัดหยาบจะสามารถดูดซับสตรอนเทียมได้เพียง 0.1 มิลลิกรัมต่อกรัมโพลีเมอร์ สาเหตุสำคัญที่ทำให้โพลีเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วได้ดีกว่าโพลีเมอร์สกัดหยาบเนื่องจากหมู่ฟังก์ชันของโพลีเมอร์ที่จับกับโลหะหนักสามารถจับกับโลหะได้โดยตรง แต่ในขณะที่หมู่ฟังก์ชันที่ใช้ในการจับกับโลหะของโพลีเมอร์อาจจะถูกรบกวนด้วยหมู่ฟังก์ชันอื่นที่อยู่ใกล้เคียงจึงส่งผลให้ความสามารถในการจับกับโลหะลดลง (Beveridge and Murray, 1981)

## 5 ศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของโพลิเมอร์

### 5.1 ศึกษาการทำบริสุทธิ์ของโพลิเมอร์

ในการทำบริสุทธิ์ของโพลิเมอร์ที่ผลิตได้จากเชื้อ CNBP 001 จะใช้ ถุงไดอะไลซิส ที่มี MW cut off 6,000-8,000 และใช้ deionize water เป็นบัฟเฟอร์เพื่อการทำบริสุทธิ์เป็นเวลา 48 ชั่วโมงหลังจากนั้น จะได้ส่วนที่อยู่นอกถุงซึ่งละลายในน้ำ deionize water นำส่วนนี้ไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศและได้น้ำหนักสารที่ได้ในส่วนนี้คือ 0.1470 กรัมซึ่งเป็นส่วนที่มี MW ต่ำกว่า 6,000



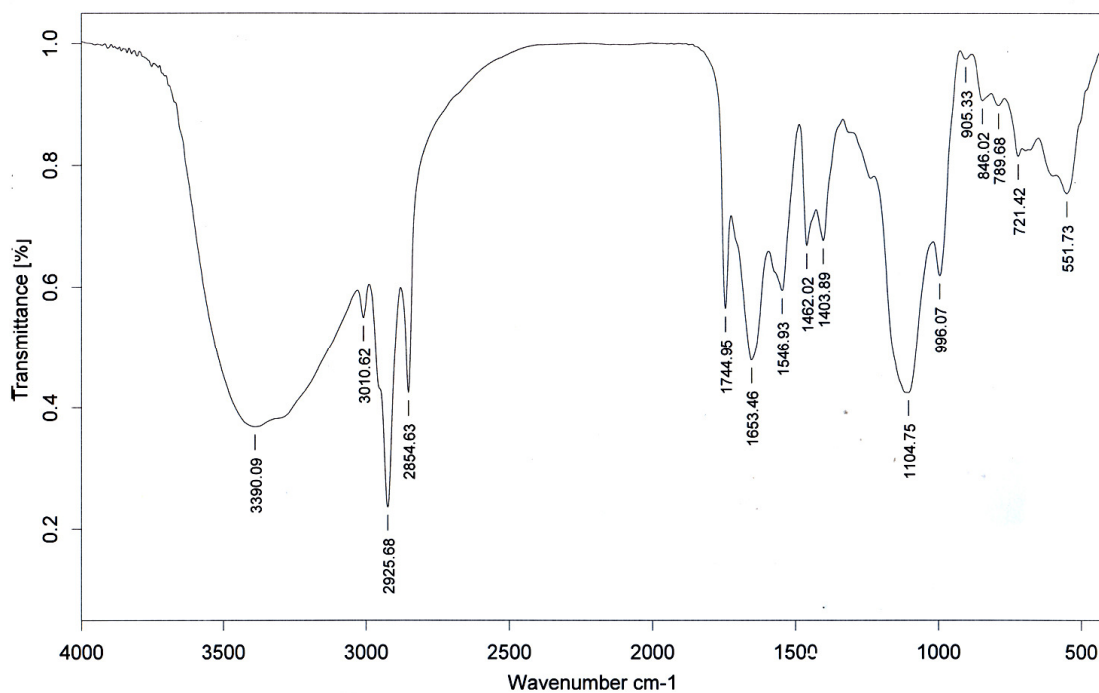
รูปที่ 9 ไดอะไลซิสแสดงขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ของโพลิเมอร์

Figure 9. Purification diagram of polymer.

และโพลิเมอร์ที่อยู่ในถุงจะแบ่งออกเป็นสองส่วนคือ ส่วนที่เป็นตะกอนได้ 0.1958 กรัม และส่วนที่ละลายเป็นส่วนใสได้ 0.0781 กรัม ดังนั้นจึงเลือกส่วนโพลิเมอร์ในส่วนที่เป็นตะกอนไปทำการทดลองต่อไป เนื่องจากเป็นโพลิเมอร์ที่มีความบริสุทธิ์และมีปริมาณมาก (แสดงในรูปที่ 9)

## 5.2 ศึกษาองค์ประกอบพื้นฐานของโพลิเมอร์ โดยวิธี Fourier- Transform Infrared (FT - IR) spectroscopy

เมื่อนำโพลิเมอร์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ไปทำการวิเคราะห์เพื่อหาหมู่ฟังก์ชันของโพลิเมอร์ที่ผลิตได้ โดยใช้เทคนิค KBr (Pellet) และสภาวะที่ทดสอบคือช่วงคลื่น 4,000-400  $\text{cm}^{-1}$  ผลการวิเคราะห์พบว่า โพลิเมอร์ที่วิเคราะห์มีหมู่ของ COOH ซึ่งทราบได้จากกราฟที่ปรากฏในช่วงความยาวคลื่นที่ 3390.09 เป็นหมู่ OH ซึ่งต่อกับ หมู่ C=O ที่ความยาวคลื่น 1744.95 นอกจากนี้ยังพบสัญญาณที่ความยาวคลื่นที่ 1670-1650 และ 1550-1535 เป็นหมู่ของ amide และ ที่ความยาวคลื่น 1104.75 เป็นสัญญาณของสารกลุ่ม polysaccharides ซึ่งจากข้อมูลที่ได้จากการแปลผลของ IR ทำให้ทราบว่าโพลิเมอร์ที่สกัดได้จากเชื้อ CNBP 001 มีองค์ประกอบของ carboxylic, hydroxyl และ amide อยู่ในน้ำตาลที่เป็นโครงสร้างของโพลิเมอร์



รูปที่ 10 สเปกตรัม IR ของโพลิเมอร์

Figure 10. The IR spectrum of EPS.



ตารางที่ 24 หมู่ฟังก์ชันของโพลิเมอร์จาก IR

Table 24. Main functional groups observed with IR-spectra.

Wave number (cm <sup>-1</sup> )	Vibration type	Functional type
3750-2050	Stretching vibration of OH	OH in polymeric compound
3020-3000	Stretching vibration of CH <sub>3</sub> , C=H	
2950-2900	Asymmetric stretching vibration of CH <sub>2</sub>	
2900-2850	Symmetric stretching vibration of CH <sub>2</sub>	
1750-1740	Deformation vibration of C=O	Carboxylic acid
1670-1650	Stretching vibration of C-N and C=O	Amide I (protein peptidic bond)
1550-1535	Stretching vibration of C-N and Deformation vibration of N-H	Amide II (protein peptidic bond)
1470-1460	Deformation vibration of CH <sub>2</sub>	
1410-1400	Stretching vibration of C=O and Deformation vibration of OH	Carboxylic acid Alcohols and phenols
1150-1000	Stretching vibration of C-O-C	Polysaccharides
<1000	“Fingerprint” zone	Phosphate or sulphur functional groups

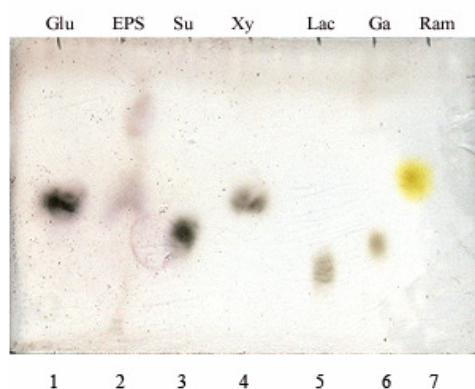
### 5.3 Gel Permeation Chromatography (GPC)

เมื่อนำโพลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ปริมาณ 2 มิลลิกรัม ลงไปละลายใน 0.05 M sodium bicarbonate buffer (pH11) 1 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วย nylon 66 membrane (ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน) หลังจากนั้นนำตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง GPC ซึ่งมี Pollulan เป็นตัวมาตรฐาน โดยใช้ Ultrahydrogel linear และ guard column และใช้ Refractive Index Detector เป็นตัวจับสัญญาณ ด้วยอัตราเร็ว 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 นาที ผลการทดลองพบว่าตัวอย่างของโพลิเมอร์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28,004 Da แต่น้ำหนักโมเลกุลที่หาได้นั้นเป็นส่วนหนึ่งของโพลิเมอร์ที่สามารถละลายได้ใน 0.05 M sodium bicarbonate buffer เท่านั้น

เนื่องจากตัวอย่างละลายได้ไม่หมดในตัวทำละลาย และ 0.05 M sodium bicarbonate buffer ที่ใช้ในการละลายโพลิเมอร์นี้เป็นตัวทำละลาย เพื่อขจัดสิ่งรบกวนที่เครื่อง GPC สามารถที่จะทำทดสอบได้

#### 5.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิเมอร์ด้านเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC)

จากการทดลองหาชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในโพลิเมอร์ซึ่งผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนและทำการย่อยด้วย Trifluoroacetic acid (TFA) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงเพื่อให้โพลิเมอร์ถูกย่อยได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นบางซึ่งมีตัวเคลื่อนที่ในระบบคือ บิวทานอล-เมทานอล-น้ำ ในอัตราส่วน 3: 3: 1 หลังจากนั้นพ่นด้วยสารละลายผสมระหว่างเมทานอลและกรดซัลฟูริกในอัตราส่วน 3: 1 รอให้แห้งและนำไปให้ความร้อนที่ 110 องศาเซลเซียสจนกระทั่งปรากฏจุดสีน้ำตาล พบว่าเมื่อเทียบค่า Rf ของโพลิเมอร์และสารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส และไซโลส มีค่าเท่ากับ Rf เท่ากับ 0.77 จึงคาดว่าน่าจะมีน้ำตาลกลูโคส และไซโลสเป็นองค์ประกอบในโพลิเมอร์ แต่เพื่อความแน่ชัดจึงทำการทดลองด้วยเทคนิคอื่นเพื่อใช้ในการยืนยันผล



รูปที่ 11 โครมาโทกราฟีแผ่นบางของโพลิเมอร์ในระบบของสารละลาย บิวทานอล-เมทานอล-น้ำ ในอัตราส่วน 3: 3: 1

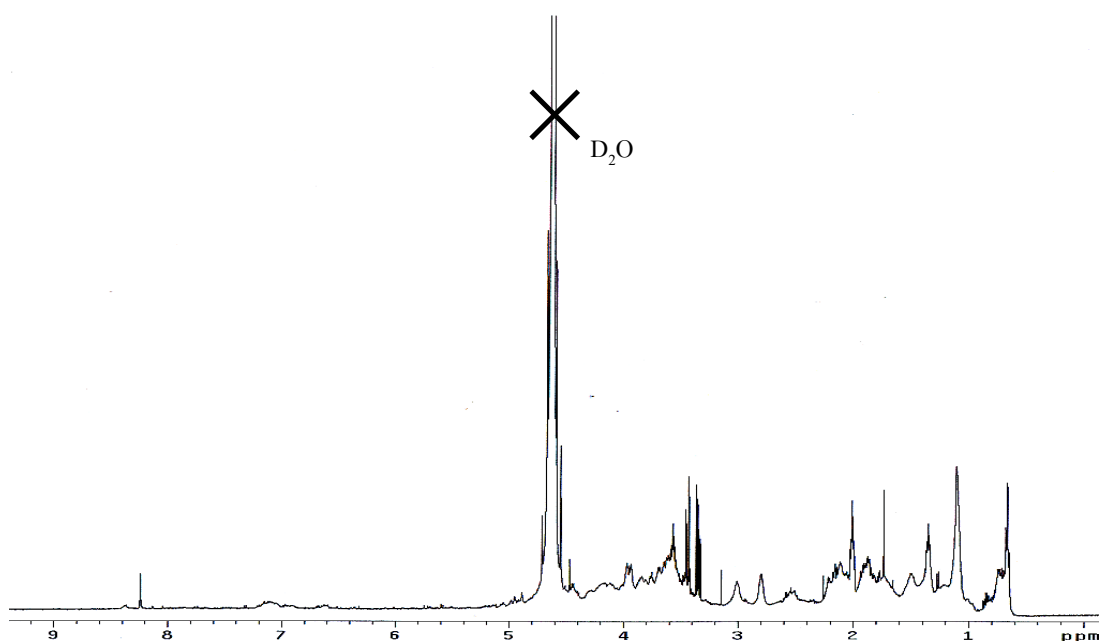
แถวที่: 1. กลูโคส 2. โพลิเมอร์ที่ย่อยแล้ว 3. ซูโครส 4. ไซโลส 5. แลคโตส 6. กาแลคโตส 7. แรมโนส

Figure 10. Thin layer chromatography (TLC) of partially purified EPS in the system n-butanol: methanol: water; 3:3:1.

Lanes: 1 glucose; 2 hydrolyzed EPS; 3 sucrose; 4 xylose; 5 lactose; 6 galactose; 7 rhamnose

### 5.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิเมอร์ด้วยเทคนิค (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR))

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิเมอร์ด้วยเทคนิค NMR โดยใช้  $D_2O$  เป็นตัวทำละลาย พบว่าสัญญาณที่ปรากฏใน  $^1H$  NMR ของโพลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีความใกล้เคียงกับสัญญาณของ glucosamine, xylose, gluconic acid และ glucose (ภาคผนวก ค) จากสเปกตรัม  $^1H$  NMR ของโพลิเมอร์พบสัญญาณของ  $D_2O$  ขึ้นที่ตำแหน่งค่า Chemical shift ที่ 4.8 พีพีเอ็ม นอกจากนี้ในสเปกตรัมของโพลิเมอร์ยังประกอบไปด้วยสัญญาณของหมู่ฟังก์ชันนอล amine, methine, methylene และ hydroxyl ซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำตาล glucosamine, xylose, gluconic acid และ glucose ซึ่งค่า Chemical shift  $^1H$  NMR ของหมู่ฟังก์ชันนอลทั้ง 4 ชนิดดังแสดงในตารางที่ 24



รูปที่ 12  $^1H$  NMR สเปกตรัมของโพลิเมอร์

Figure 12. The  $^1H$  NMR spectrum of EPS.

ตารางที่ 25  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts ของโพลิเมอร์และน้ำตาลมาตรฐาน

Table 25.  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  values) of EPS and standard sugars

Functional group	Chemical shift (ppm)				
	$^1\text{H}$				
	Gluconic acid	Glucosamine	G	lucose	EPS
$\text{NH}_2$	-	2.00	-	-	2.00
CH	3.37	3.37	3.37	3.37	3.38
	3.38	3.38	3.38	3.38	3.60
	3.70	3.75	3.60	3.60	3.75
	4.17	9.72	4.16	4.16	4.16
	-	-	9.72	9.72	8.24
$\text{CH}_2$	3.68	3.68	3.68	3.68	3.68
OH	2.00	2.00	2.0	2.0	2.00
	11.00	-	-	-	-

จากค่า Chemical shift ที่ปรากฏเมื่อเทียบกับโพลิเมอร์แล้วจึงคาดว่าโพลิเมอร์ที่ผลิตได้จากเชื้อ CNBP001 มี glucosamine, xylose, gluconic acid และ glucose เป็นองค์ประกอบ เนื่องจากโพลิเมอร์ที่ได้นี้มีสัญญาณของหมู่ฟังก์ชันนอลที่มีค่า Chemical shift ใกล้เคียงกัน