บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ในระยะ 20 ปีที่ผ่านมาประเทศไทยมีการพัฒนาทางด้านอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอุตสาหกรรมหนักที่เกี่ยวข้องกับโลหะชนิดต่างๆเช่น ตะกั่ว, สังกะสี, แคดเมียม และทองแดง ทำให้เกิดปัญหาของการปนเปื้อนโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม อันเกิดจากการปล่อยของเสียของโรงงานดังกล่าวโดยปราศจากการบำบัดที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะการปนเปื้อนของตะกั่วในช่วง 20-30 ปีที่ผ่านมาอันเกิดจากการนำตะกั่วมาใช้เพิ่มขึ้นในอุตสาหกรรมต่างๆ (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2538) ส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายไปยังแหล่งต่างๆในสิ่งแวดล้อมทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะการสะสมและการเกิดพิษจากโลหะหนักดังกล่าวในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องหาทางแก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยการบำบัดความเป็นพิษของโลหะหนักหรือการกำจัดโลหะหนักด้วยวิธีต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการใช้วิธีการทางเคมี เช่น ตกตะกอนโดยสารเคมีพวกปูนขาว (Ahalya *et al*., 2003) หรือกระบวนการทางชีวภาพเช่นใช้จุลินทรีย์ในการกำจัดโลหะหนัก (Volesky and Holan, 1995; Spaulding-Jensen *et al*., 2003) อย่างไรก็ตามการใช้วิธีการทางเคมีในการบำบัดจะก่อให้เกิดปัญหาสารพิษตกค้างอีกทั้งยังมีค่าใช้จ่ายสูงกว่าวิธีทางชีวภาพ ดังนั้นการกำจัดโลหะหนักโดยวิธีทางชีวภาพเช่นการใช้แบคทีเรีย *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ในการกำจัดโลหะตะกั่วและทองแดง (Leung *et al*., 2001) จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่ได้รับความสนใจและมีศักยภาพสูงในการที่จะใช้ลดมลพิษของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม

กลไกในการกำจัดโลหะของแบคทีเรียโดยทั่วไปจะมีอยู่หลายวิธีด้วยกัน เช่นการดูดซับโลหะหนักที่เกิดขึ้นบริเวณผนังเซลล์ การตกตะกอนของโลหะหนักภายนอกเซลล์ การนำโลหะหนักเข้าสู่เซลล์ หรือ การดูดซับโดยโพลิเมอร์ที่แบคทีเรียผลิตขึ้น (Berierley, 1990 อ้างโดย รัชยาภรณ์ ผลมั่ง และ พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, 2540) โดยพบว่าการดูดซับทางชีวภาพจะมีลักษณะที่แตกต่างกันไปแล้วแต่ประเภทของแบคทีเรีย ชนิดและความเข้มข้นของโลหะหนัก (Valls and Lorenzo, 2002)

โพลิเมอร์ชีวภาพ (Biopolymer) ที่ผลิตโดยแบคทีเรียมีอยู่ 2 ชนิดด้วยกันคือ โพลิเมอร์ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ (Intracellular polymers) เช่น Polyhydroxyalkanoate (PHA) และโพลิเมอร์ที่สร้างขึ้นมาภายนอกเซลล์ (Extracellular polymers) ซึ่งประกอบด้วย ฟอสฟอลิปิด โปรตีน และ lipopolysaccharide เช่นโพลิเมอร์ที่สร้างโดย *Erwinia chrysanthemi* spp. (Ding *et al*., 2002) ทั้งนี้

พบว่าโพลิเมอร์ทั้ง 2 ชนิดสามารถที่จะจับหรือดูดซับกับโลหะหนักชนิดต่างๆได้ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะได้มีการศึกษาถึงการนำโพลิเมอร์ที่แบคทีเรียผลิตออกมานี้มาประยุกต์ใช้ในการกำจัดโลหะหนักที่เป็นพิษหรือเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม

งานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโพลิเมอร์ชีวภาพประเภท Extracellular polysaccharides (EPS) จากแบคทีเรียที่ผ่านการแยกได้จากทะเลและคัดเลือกแล้วว่าสามารถผลิตโพลิเมอร์ชีวภาพที่สามารถดูดซับตะกั่วได้ โดยจะศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ การสกัด และการทำให้บริสุทธิ์ของโพลิเมอร์ รวมถึงการนำโพลิเมอร์ที่แยกได้ไปประยุกต์ใช้ในการจับกับตะกั่วและโลหะหนักชนิดอื่นๆ เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์ในการกำจัดโลหะในสิ่งแวดล้อมต่อไป และจากการค้นคว้าข้อมูลทางด้านสิทธิบัตรที่สำคัญ เช่น สิทธิบัตรสหรัฐอเมริกา (United States Patent and Trademark Office, USPTO) สิทธิบัตรยุโรป (European Patent Office, EPO) และองค์การทรัพย์สินทางปัญญาแห่งโลก (World Intellectual Property Organization, WIPO) พบว่ายังไม่มีสิทธิบัตรที่เกี่ยวกับโพลิเมอร์จากแบคทีเรียที่สามารถจับกับโลหะหนักได้ ดังนั้นผลที่ได้จากงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีศักยภาพที่จะพัฒนาให้เกิดการใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไปได้

บทตรวจเอกสาร

1. ความเป็นพิษของตะกั่ว

ตะกั่ว เป็นธาตุที่พบในดิน เช่นเดียวกับธาตุอื่นๆ มีคุณสมบัติเป็นโลหะอ่อน จุดหลอมเหลวต่ำ ทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย ทนต่อการผุกร่อนได้ดี ในช่วง 20-30 ปีที่ผ่านมาได้มีการนำเอาตะกั่วมาใช้ประโยชน์เพิ่มขึ้นอย่างมากในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง การเกษตร อุตสาหกรรมน้ำมัน เป็นต้น และทำให้มีการปนเปื้อนของตะกั่วเข้าสู่อากาศ ดิน น้ำ และสิ่งมีชีวิตในสภาวะแวดล้อมในปริมาณที่สูงเกินมาตรฐาน (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2538) พบรายงานการปนเปื้อนของตะกั่วทั่วโลกในปี 2549 ซึ่งยังคงมีปริมาณที่สูง แสดงดังตารางที่1 สำหรับประเทศไทยก็ได้พบการปนเปื้อนของตะกั่วที่บริเวณชายฝั่งทะเลในปริมาณที่สูงเช่นกัน (ตารางที่2) ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับปริมาณการนำเข้าของตะกั่วและโลหะหนักอื่นๆที่สูงเป็นลำดับที่ 8 ของสินค้านำเข้าในประเทศไทย ในระหว่างปี 2544-2549 โดยมีมูลค่าสูงถึง 3,975.2 ล้านเหรียญสหรัฐฯ (กระทรวงพาณิชย์. 2550)

ตารางที่ 1 ปริมาณของตะกั่วที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่างๆ

Table 1. Amount of lead contamination.

Sources	Lead (ppm)	Reference
The Gulf of Suez, Red Sea (Egypt)	36-52-42.15	Hamed and Emara (2006)
Kabwe town (Zambia)	0.1-234	Tembo *et al*. (2006)
Kayseri (Turkey)	2.96-123	Tokalýoglu and Kartal (2006)
Mediterranean, Izmir (Turkey)	7-11.1	Muezzinoglu *et al*. (2006)
Mining sites (South Morocco)	20,412-30,100	Boularbah *et al*. (2006)
The Naples Harbor , Tyrrhenian Sea (Southern Italy)	270.24	Ferraro *et al.* (2006)
The Ebro basin (Spain)	17.54-27.95	Martýn *et al*. (2006)
Mining and Smelting in East Belgium (Belgium)	19,206	Cappuyns *et al*. (2006)

ตารางที่ 2 รายงานปริมาณโลหะหนักในชายฝั่งทะเลของประเทศไทยปีพ.ศ. 2541

Table 2. Analysis of heavy metals contents of seawater in Thailand in 1998.

Metals	Metals contents (mg/Kg)	
	East coast	West coast
As	1.8	0.7
Cd	0.3	0.4
Cr	19.8	18.6
Cu	10.8	10.1
Hg	0.11	0.12
Pb	31.3	20.2
Zn	22.6	23.2

หมายเหตุ ปริมาณตะกั่วที่กำหนดให้มีในสิ่งแวดล้อมตามมาตรฐานโลกคือ 4.0 ppm

ที่มา : กรมควบคุมมลพิษฝ่ายคุณภาพทะเล (http://www.hemmerthed.gistda.or.th)

โดยทั่วไปตะกั่วจะเข้าสู่ร่างกายโดยระบบหายใจและทางผิวหนังและในเด็กจะมีการสะสมของตะกั่วในเลือดมากกว่าผู้ใหญ่ ตะกั่วจะไปสะสมที่กระแสเลือดและอวัยวะต่างๆ เช่น ตับ ไต โดยพบว่า 95 % ของการสะสมตะกั่วจะอยู่ที่ เนื้อเยื่อกระดูก (Levi, 2000a) การเกิดพิษของตะกั่วจะอยู่ที่การสร้างเซลล์เม็ดเลือด (hematopoietic system) และ ระบบประสาท โดยที่ตะกั่วจะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฮีม (heme) ได้แก่ delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) และ heme systhase (HS) โดยมีผลทำให้การสังเคราะห์ฮีมลดน้อยลง (Levi, 2000a) นอกจากนี้ยังพบว่า ALAD จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ porphyrin ซึ่งจะทำหน้าที่จับกับ glycine และ succinyl CoA และตัวกลางของระบบ Tricarboxylic acid cycle (TCA) ให้ไปเป็น α-amino และ β-ketoadipic acids เพื่อใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์ aminolevulinic acid และ vitamin B_6 (Medeiros *et al.*,1997) สำหรับระบบประสาทซึ่งเป็นเป้าหมายที่สำคัญในการเกิดความเป็นพิษของตะกั่วโดยเฉพาะในเด็กทารกและเด็กที่ระบบประสาทกำลังพัฒนานั้นพบว่าตะกั่วจะไปยับยั้งการทำงานประสานกันของกล้ามเนื้อ ทำให้เกิดอาการมึนงง, ไม่รู้สึกตัว และ อาการสั่นของร่างกาย (convulsion) (Levi, 2000b) เนื่องจากตะกั่วสามารถที่จะจับกับ calmodulin แทน calcium โดยปกติ calcium-calmodulin จะรวมตัวกับเอนไซม์ kinase เกิดเป็น calcium protein kinase ที่จะพัฒนาต่อไป

เป็นเนื้อเยื่อประสาทและเป็นตัวกำหนดให้เกิด neurotransmitter release (Medeiros *et al*.,1997) แต่ถ้ามีตะกั่วในปริมาณที่เกิดความเป็นพิษจะก่อให้เกิดการทำลายแขนงเส้นเลือดแดง (arterioles) และเส้นเลือดฝอย (capillaries) เป็นผลให้เกิดการทำลายของระบบประสาท (Levi, 2000b) ในกรณีการเกิดความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันของตะกั่ว อาการที่เกิดขึ้นได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน จุกเสียด แน่นท้อง ตามด้วยท้องผูก มีการขับโปรตีนออกทางปัสสาวะ เกิดการสะสมพิษที่ตับ การเสียชีวิตจะเกิดจากระบบการหายใจล้มเหลว

2. แหล่งที่พบสารตะกั่ว

โดยทั่วไปตะกั่วสามารถพบได้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน เช่น

2.1 ในดิน สารตะกั่วที่พบในดินส่วนใหญ่มีแหล่งที่มาจากยาฆ่าแมลงชนิดต่างๆ ซึ่งประกอบด้วยตะกั่วซึ่งอยู่ในรูปของตะกั่วอาร์ซิเนต (lead arsenate) และมักพบที่บริเวณผิวหน้าดิน (Roanc, 1988)

2.2 ในอากาศ แหล่งที่มาของตะกั่วในบรรยากาศ คือ ยานพาหนะที่ใช้น้ำมันเบนซินที่มีตะกั่วผสม โดยตะกั่วจะเจือปนออกมากับไอเสียรถยนต์หลังจากการเผาไหม้ของน้ำมันเชื้อเพลิง เนื่องจากตะกั่วที่เติมในน้ำมันเบนซินอยู่ในรูปของ lead alkyl compounds (tetramethyl lead และ tetraethyl lead) เพื่อช่วยป้องกันการน็อคของเครื่องยนต์ (anti-knock) (Levi, 2000b)

2.3 ในน้ำ สารตะกั่วที่พบในน้ำสำคัญที่สุดคือ galena หรือ สารตะกั่วซัลไฟด์ ซึ่งอยู่ในสภาพไม่ละลายน้ำ แต่จะถูกออกซิไดซ์จากอากาศอย่างช้าๆ ทำให้ได้สารละลายของตะกั่วซัลเฟต ซึ่งละลายน้ำได้ แหล่งที่มาที่สำคัญของตะกั่วที่ปนเปื้อนในน้ำ คือ ระบบการจัดส่งน้ำ ท่อส่งน้ำที่ทำด้วยตะกั่ว (Levi, 2000b)

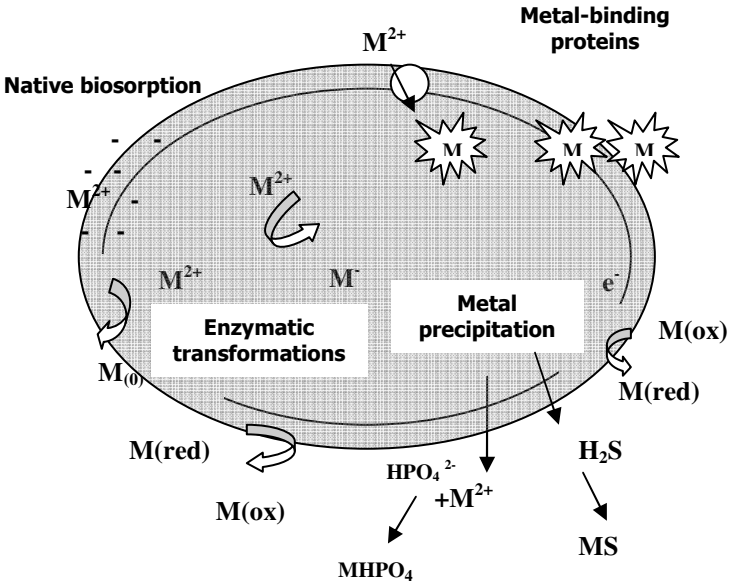
2.4 บริเวณโรงงานอุตสาหกรรม โดยพบว่าตะกั่วจะมีปริมาณสูง ในบริเวณที่มีอุตสาหกรรมหนาแน่น ทั้งนี้เนื่องจาก มีอุตสาหกรรมหลายประเภทที่ใช้ตะกั่วเป็นวัตถุดิบเป็นจำนวนมาก เช่น โรงงานแบตเตอรี่ โรงถลุงแร่ โดยพบว่าดินในตัวเมืองย่านอุตสาหกรรมมีปริมาณตะกั่วสูงถึง 17 เท่าของดินในชนบท (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2538)

2.5 สิ่งมีชีวิต สัตว์ทะเลที่อยู่ใน Class Crustacean มีการสะสมของทองแดง สังกะสี และตะกั่วในปริมาณที่ค่อนข้างสูง จากการวิเคราะห์โลหะหนักในกุ้งกุลาดำพบว่ามีปริมาณตะกั่ว 0.18-3.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมและมีแคดเมี่ยม 0.02 – 1.64 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ปริมาณโลหะหนักที่อนุญาตให้มีได้ในสัตว์ทะเล ในกรณีของตะกั่วจะเท่ากับ 1.5 ppm และปริมาณ

แคดเมียมเท่ากับ 0.2 ppm (สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล, 2534 อ้างโดย ประภาพร วิถีสวัสดิ์, 2538) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าตะกั่วสามารถสะสมในไข่ไก่ได้สูงถึง 2.9 ppm (Kertesz *et al*., 2006)

3. การกำจัดโลหะหนัก

ในการกำจัดโลหะหนักออกจากสิ่งแวดล้อมนั้นมีอยู่หลายวิธีด้วยกันไม่ว่าจะเป็นวิธีทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ ตัวอย่างของการกำจัดโลหะหนักทางกายภาพ เช่นการใช้วิธีการ reverse osmosis และ electrodialysis ซึ่งเป็นการแยกโดยใช้ semi-permeable และ semi-permeable ion selective membranes แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือค่าใช้จ่ายจะสูงมาก (Ahalya *et al.*, 2003) ส่วนในการกำจัดโลหะหนักโดยวิธีทางเคมีจะใช้วิธีการตกตะกอนโดยสารที่ทำให้เกิดการจับตัว (coagulant) เช่น สารส้ม ปูนขาว หรือสารอินทรีย์อื่นๆ เพื่อส่งเสริมให้เกิดการจับกันของโลหะกับสารที่ทำให้เกิดการจับตัวเกิดเป็นตะกอนขึ้น เนื่องจากการจับกันของอิออนโลหะหนักกับอิออนของสารเคมีโดยพันธะ ionic แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือ ตะกอนจะมีความเข้มข้นของโลหะหนักในปริมาณที่สูงมาก อาจจะยากต่อการกำจัดและทำลายต่อไป (Volesky, 2001) สำหรับวิธีการกำจัดโลหะหนักทางชีวภาพเป็นการกำจัดโลหะโดยตรงโดยอาศัยการดูดซับ และความสามารถในการดูดซับโลหะหนักจะขึ้นอยู่กับกลไกในการดูดซับ หรือชนิดของวัสดุที่นำมาดูดซับ (Fourest and Roux, 1992 อ้างโดย Ahalya *et al.*, 2003) เช่นการใช้พืชในการดูดซับ (Phytoremediation) วิธีการนี้จะใช้พืชดูดซับเอาโลหะหนักมาไว้ในลำต้นผ่านทางระบบราก และเก็บสะสมไว้ในส่วนต่างๆของพืช เพื่อลดความเป็นพิษในดินหรือแหล่งน้ำหรือทำให้โลหะหนักเปลี่ยนรูปจากที่เป็นพิษกลายเป็นไม่เป็นพิษแล้วจึงปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก (Clemens *et al*., 2002) แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือใช้เวลานานในการบำบัด (Ahalya *et al.*, 2003) ส่วนการใช้จุลินทรีย์ในการดูดซับโลหะหนักเป็นวิธีที่มีความสำคัญ เนื่องจาก มีประสิทธิภาพสูงจากการที่ไม่มีจุดอิ่มตัวในการดูดซับในกรณีที่เซลล์มีการเพิ่มจำนวนตลอดเวลา การกำจัดโดยใช้เซลล์ของจุลินทรีย์ จึงเป็นกระบวนการที่ประหยัดกว่าการบำบัดโดยใช้สารเคมีซึ่งมีขั้นตอนมากมาย และอาจเกิดปัญหาสารเคมีตกค้างในสิ่งแวดล้อม (Spaulding-Jensen *et al*., 2003) เป็นที่น่าสนใจว่าแบคทีเรียจะมีกลไกกำจัดโลหะหนักในธรรมชาติ โดยที่ชนิดและปริมาณของโลหะหนักที่แบคทีเรียสามารถกำจัดได้จะขึ้นกับกลไกที่แบคทีเรียมีอยู่ ซึ่งสามารถแบ่งออกได้ 5 ประเภทด้วยกัน คือ (1) การดูดซับโลหะหนักโดยผนังเซลล์ (2) การจับกันของโลหะโดยโปรตีนภายในเซลล์ (3) การใช้เอนไซม์ (4) การตกตะกอน และ (5) การจับโลหะหนักโดยสารที่แบคทีเรียปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ซึ่งรายละเอียดของแต่ละกลไกจะมีดังนี้



รูปที่ 1 กลไกการดูดซับโลหะหนักโดยแบคทีเรีย

Figure 1. Mechanism of metal absorption by bacterial cell.

ที่มา : Valls และ Lorenzo (2002)

3.1 การดูดซับโลหะหนักโดยผนังเซลล์

การที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกมีคุณสมบัติที่ต่างกัน โดยพบว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus* sp. ที่ประกอบด้วยร่างแหของเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งหนาและจับกับสารโมเลกุลใหญ่บางชนิดได้ดีจะมีประสิทธิภาพสูงในการจับโลหะหนัก นอกจากนี้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะประกอบด้วยกรดไทโคอิก (teichoic acid) และกรดไทคูโรนิก (teichuronic acid) ซึ่งส่งผลให้ผนังเซลล์มีประจุเป็นลบ ในขณะที่พันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester bond) ของกรดสองชนิดนี้จะให้หมู่คาร์บอกซิลซึ่งทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange) ที่ผนังของเซลล์ได้ อีกทั้งโมเลกุลของไนโตรเจนและออกซิเจนของผนังเซลล์สามารถทำหน้าที่เชื่อมจับกับโลหะหนักได้โดยตรง (Valls and Lorenzo, 2002) และยังพบว่าบริเวณของ phosphosyl บน lipopolysaccharides และ phospholipid จะมีตำแหน่งที่สามารถจับอิเลคตรอนได้ดี (electronegativity sites) อยู่มาก จึงทำให้แบคทีเรียแกรมบวกมีความสามารถในการจับโลหะหนักได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Ford and Mitchell, 1992)

3.2 การจับกันของโลหะโดยโปรตีนภายในเซลล์

การจับกันของโลหะหนักภายในเซลล์ ด้วยโปรตีนที่สามารถจับกับโลหะหนัก (metal-binding หรือ metal chelating proteins) จะเกิดที่บริเวณไซโตพลาสซึม โปรตีนที่สร้างขึ้นมาจับโลหะหนักนี้คือ metallothioneins (MTs) ที่มีปริมาณของ cystein อยู่มาก ซึ่งเป็นผลให้มีการเพิ่มการจับกันของโลหะหนักได้มากขึ้น (Romerc-Isart and Kasak, 2002) โดย MTs นี้จะเป็นกลไกสำคัญที่จะป้องกันแบคทีเรียจากการเป็นพิษในกรณีที่แบคทีเรียนั้นเจริญอยู่ในสภาวะที่มีโลหะหนักปนอยู่มาก (Mejare and Mulow, 2001) โดยประสิทธิภาพการจับกันของโลหะหนักกับ MTs นี้จะขึ้นกับชนิดและปริมาณโลหะที่ผ่านเข้ามาในเซลล์ การทำหน้าที่ของ MTs ในตัวเซลล์จะไม่ยุ่งยากซับซ้อน แต่จะมีปัญหาในเรื่องของความคงตัวและการมีครึ่งชีวิตที่สั้นมาก (half-life) นอกจากนี้ในกรณีที่มี cystein เป็นองค์ประกอบสูงมากใน MTs จะทำให้เกิดการรบกวนวิถีรีดอกซ์ (redox pathways) ในไซโตซอล (cytosol) ของเซลล์ (Mejare and Mulow, 2001) นอกจาก MTs แล้วยังมีโปรตีนอีกชนิดคือ Phytochelatin (PCs) ที่สามารถดูดซับโลหะหนักได้อีก โดย PCs นี้จะพบมากในพวกพืชและรา ซึ่ง PCs นั้นจะมีองค์ประกอบของพวก glutathione ที่สูงจึงทำให้มีความสามารถในการดูดซับโลหะหนักหลายชนิดโดยเฉพาะ Cd, Hg, Ni, Au, Pb และ Zn ได้ดี (Cloete, 2003)

3.3 การใช้เอนไซม์

แบคทีเรียใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นตัวยับยั้งการเกิดพิษของโลหะหนักโดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน รีดักชัน เมทิลเลชัน (methylation และ alkylation) เพื่อเปลี่ยนรูปให้โลหะหนักเกิดการตกตะกอน และเคลื่อนที่ไม่ได้ ซึ่งวิธีนี้สามารถที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการกำจัดโลหะหนักในกรณีที่พบโลหะหนักในปริมาณที่ไม่สูงมากนัก ได้มีการศึกษาการกำจัด Hg(II) ในจุลินทรีย์โดยใช้เอนไซม์ (enzymatic detoxification) ซึ่งกระบวนการกำจัดนี้เอนไซม์จะไป รีดิวซ์ Hg (II) ให้กลายเป็น Hg (0) ซึ่งอยู่ในรูปที่ไม่เป็นพิษ (Cloete, 2003) กระบวนการใช้เอนไซม์กำจัดปรอทมีการทำงานด้วยกันอยู่ 2 รูปแบบ คือ (1) เอนไซม์ mercuric ion reductase จะทำหน้าที่ รีดิวซ์ Hg (II) ไปเป็น Hg (0) ภายในไซโตพลาสซึม (Cloete, 2003) (2) เอนไซม์ organomercurial lyase ไปทำลายพันธะของ C-Hg ซึ่งอยู่ในพลาสมิด ตามด้วยการรีดิวซ์ Hg (II) ไปเป็น Hg (0)โดยอาศัย flavin adenine dinucleotide (FAD) เป็นปัจจัยร่วม (co-factor) และ Hg (0) จะถูกส่งเข้าสู่ไซโตพลาสซึม (Roane and Paper, 2000) แต่พบว่าข้อเสียของการใช้เอนไซม์ organomercurial lyase ในการกำจัดโลหะหนักคือเอนไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงหลากหลายกับสารตั้งต้นเช่น primary secondary tertiary alkyl mercuric halide จึงทำให้เอนไซม์ชนิดนี้มีความตอบสนองต่อโลหะหนักช้ากว่า mercuric ion reductase (Bruins *et al*., 2000)

3.4 การตกตะกอน (Precipitation)

การตกตะกอนโลหะหนักโดยแบคทีเรียเกิดจากการที่แบคทีเรียผลิตสารซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับโลหะหนัก แล้วทำให้เกิดสารประกอบของโลหะหนักที่ไม่ละลายน้ำ เช่นในกรณีของเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม sulfate oxidizing bacteria (SOB) ได้แก่เชื้อในกลุ่ม *Thiobacillus* และ *Thioxidans* ที่สามารถใช้ HS^-, SO^{2-} ในการให้อิเล็กตรอนในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน ซึ่งจากปฏิกิริยานี้จะได้สารประกอบซัลเฟอร์ที่ไม่ละลายน้ำ (Bruins *et al*., 1999) พบว่าได้มีการพัฒนานำ SOB มาใช้กำจัดโลหะหนักในดิน โดย SOB ทำหน้าที่เปลี่ยนซัลไฟด์ให้เป็นกรดซัลฟูริกขึ้นมาแทน ทำให้บริเวณนั้นมีสภาวะเป็นกรดซึ่งทำให้โลหะถูกกำจัดออกไปได้โดยง่าย (Gadd, 2004) เนื่องจาก pH ที่เป็นกรดทำให้โลหะอยู่ในรูปของอิออนอิสระ (free ions) จึงทำให้ความสามารถของโลหะซึ่งจับอยู่กับดินลดลงเมื่อเทียบกับโลหะที่รวมตัวกันเป็นโครงสร้าง (Roane and Paper, 2000) นอกจากนี้จุลินทรีย์ในกลุ่ม sulfate reducing bacteria (SRB) ได้แก่เชื้อในกลุ่ม Desulfovibrio และ Desulfitomaculum จะทำหน้าที่ออกซิไดซ์สารอินทรีย์กลุ่มซัลเฟตให้เป็นสารกลุ่มซัลไฟต์ โดย SRB จะทำหน้าที่เปลี่ยนระบบให้มีสภาวะเป็นกรดทำให้สภาวะสมดุลเปลี่ยนไปเพื่อให้ซัลเฟตถูกเปลี่ยนไปเป็นซัลไฟต์ ส่งผลให้เกิดไฮดรอกไซด์ ซึ่งจะไปจับกับโลหะเกิดเป็นสารประกอบโลหะซัลไฟต์ทำให้เกิดการจับตัวกันเป็นก้อนและไม่สามารถละลายน้ำได้ (Gadd, 2004)

3.5 การจับโลหะหนักโดยสารที่แบคทีเรียปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์

การจับโลหะหนักโดยสารที่แบคทีเรียปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ แบ่งออกเป็น 2 ชนิดด้วยกันคือ (1) ไซเดอโรฟอร์ (siderophores) ซึ่งเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและมีเหล็กเป็นองค์ประกอบหลัก (ion complexing) ไซเดอโรฟอร์ สามารถจับกับโลหะชนิดอื่นได้ แต่โลหะนั้นต้องมีคุณสมบัติที่คล้ายกับเหล็ก เช่น อะลูมิเนียม แกลเลียม และโครเมียม (ซึ่งมีลักษณะเป็น trivalent ions และมีขนาดที่ใกล้เคียงกับเหล็ก) (Gadd, 2004; Roane and Paper, 2000) กลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถผลิตไซเดอโรฟอร์ ได้แก่ *Pseudomas, Actinomycetes, Azetobacter* และ *Arthrobacter* (2) โพลีเมอร์ (exopolymer) เป็นสารประกอบกลุ่ม คาร์โบไฮเดรต โพลีแซคคาร์ไรด์ กรดนิวคลีอิก และไขมัน โพลีเมอร์ที่เชื้อสร้างขึ้นอาจอยู่ในรูปเมือกที่หลุดแยกจากเซลล์ (slime) หรือเป็นแคบซูล (capsule) ที่ติดแน่นกับผนังเซลล์ก็ได้ โดยทั่วไปการสร้างสารกลุ่มนี้จะสร้างขึ้นเพื่อป้องกันการย่อย และการถูกจับกิน (phagocytosis) จากแบคทีเรียชนิดอื่น สารกลุ่มนี้สามารถจับกับโลหะได้โดยอาศัยหมู่ฟังก์ชันที่เป็นประจุลบ (Ding *et al*., 2002) ทำให้โลหะไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (immobilization) และเป็นการป้องกันไม่ให้โลหะเข้าสู่ภายในเซลล์ (Gadd, 1992; Roane and Paper, 2000) Ford และ Mitchell (2000) พบว่าการจับกันของโลหะหนักกับ ไซเดอโรฟอร์ หรือ โพ

ลีเมอร์นั้นเป็นกระบวนการที่ไม่ต้องอาศัยพลังงานจากแบคทีเรีย แต่ในการสร้างสารกลุ่มนี้ต้องอาศัยพลังงานจากกระบวนการเมตาบอลิซึม

การจับโลหะหนักโดยโพลิเมอร์ชีวภาพ

การจับกันของโลหะหนักกับโพลิเมอร์ชีวภาพนั้นจะขึ้นกับหมู่ฟังก์ชันที่เป็นประจุลบบนโพลิเมอร์ชีวภาพ ซึ่งหมู่ฟังก์ชันจะประกอบไปด้วย pyruvate, phosphate, hydroxyl, uronic acid, sialic acid, glucuronic acid และกลุ่มของ carboxylate ซึ่งหมู่ดังกล่าวนี้จะมีกลุ่มของอิเล็กตรอนอยู่มากจึงส่งผลให้มีความหลากหลายในการจับกันของโลหะหนัก (Ford and Mitchell, 2000) โดยทั่วไปแล้วการจับกันของโพลิเมอร์ชีวภาพ และโลหะจะอยู่ในรูปแบบ ionic และ electrostatic binding พบว่าแบคทีเรียที่สร้างโพลิเมอร์ชีวภาพที่มีองค์ประกอบหลักเป็น acid polysaccharides จะจับกับโลหะหนักแล้วอยู่ในรูปของสะพานเกลือ (salt bridge) โดยทำให้การจับกับโลหะและ EPS มีความแข็งแรง (Spaulding,2004) แต่พบว่าโพลิเมอร์ชีวภาพ ที่ถูกสร้างขึ้นมาในสภาวะที่เป็นกลางนั้นจะมีกลุ่มของ anion มาทำหน้าที่ในการจับกับโลหะ และการจับกันของโลหะกับโพลิเมอร์ชีวภาพจะเป็นพันธะอ่อนของ electrostatic bond จึงทำให้การจับกันนั้นไม่แข็งแรง (Geesey and Jang, 1989; Beech *et al*., 1995)

พบว่าโพลีเมอร์จากแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีตำแหน่งสำหรับจับโลหะหนักต่างกัน (Rud *et al*., 1984) โดยโพลีเมอร์จาก *Klebsiella aerogenes* สามารถจับนิกเกิลได้สูงสุด รองลงมาคือ ทองแดง แคดเมียม แมงกานีส และ โคบอลท์ ตามลำดับ ส่วน *P. manganicum* สามารถดูดซับสังกะสีได้ในปริมาณสูง แสดงให้เห็นว่าโพลีเมอร์มีประสิทธิภาพในการจับโลหะหนักแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน (รัชยาภรณ์ ผลมั่ง และ พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, 2540)

4. โพลิเมอร์ชีวภาพ

โพลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymer) เป็นโพลิเมอร์ที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตที่สร้างขึ้นมาเพื่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เช่น เพื่อการเจริญเติบโตเช่น dextrans ซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ เช่น โปรตีน เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น แป้ง และ glycogen หรือเพื่อปรับตัวให้อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่อาศัยอยู่นั้น เช่น pullulan (Bruins, 2000)

โพลิเมอร์ชีวภาพที่สร้างขึ้นมาจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จะมีคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ รวมถึงองค์ประกอบที่แตกต่างกันไป โพลิเมอร์ชีวภาพที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียนอกจากจะมี

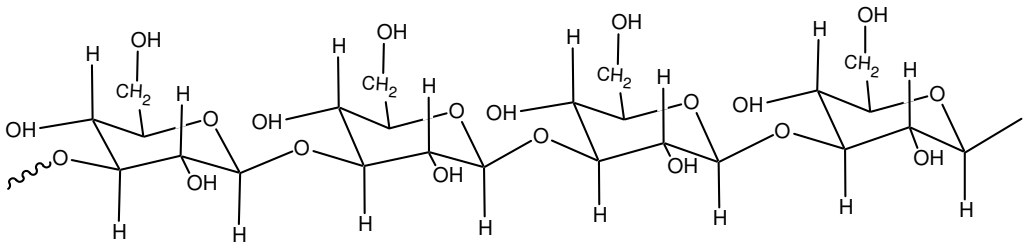
กรดอะมิโน ในเปปติโดไกลแคน และ กรดไขมัน ที่แตกต่างกันแล้วยังประกอบด้วย teichoic acid ประเภท polysaccharides และ lipopolysaccharide ที่แตกต่างกันอีกด้วย (Lindberg, 1998)

โพลิเมอร์ชีวภาพ ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมานั้นจะมีอยู่ด้วยกัน 2 ลักษณะคือ (1)โพลิเมอร์ที่ผลิตขึ้นมาในเซลล์ (intracellular polysaccharides) โพลิเมอร์ชนิดนี้มีลักษณะเป็นแกรนูล (granules) โดยการสร้างขึ้นมาของโพลิเมอร์ชนิดนี้จะใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการสร้างสปอร์ (Sturgeon, 1975) หรือนำมาใช้เพื่อเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นท่อน (structural building blocks) (Brock, 1991) และ (2)โพลิเมอร์ที่ผลิตขึ้นมาภายนอกเซลล์ ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ที่สร้างขึ้นเพื่อป้องกันตนเองจากแบคทีเรียชนิดอื่นจากการถูกกิน (Gadd, 1992; Roane and Paper, 2000) และป้องกันความเป็นพิษของโลหะอันเนื่องจากโลหะเข้าสู่เซลล์

Extracellular Polysaccharides (EPS) ที่ผลิตจากแบคทีเรียจะประกอบไปด้วย โปรตีน และ/หรือ กรดนิวคลีอิกซึ่งมีหมู่ฟังก์ชัน pyruvate, phosphate, hydroxyl, uronic acid, sialic acid และกลุ่มของ carboxylate (Ford and Mitchell, 2000) ที่สามารถจับกับอิออนของโลหะหนักและตกตะกอนร่วมกันได้ น้ำหนักของโพลิเมอร์ชีวภาพชนิดนี้ จะอยู่ในช่วง 0.3 ถึง 2.1 x10^6 ดาลตัน (Ding *et al*., 2002) ซึ่ง EPS ที่สร้างขึ้นมานี้อาจอยู่ในรูปของเมือกที่หลุดแยกออกมาจากเซลล์หรืออยู่ติดกับเซลล์ในรูปของแคปซูลก็ได้ (Morin, 1998) EPS สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามชนิดของโครงสร้าง คือ Homopolysaccharides และ Heteropolysaccharides

4.1. Homopolysaccharides ซึ่งได้แก่กลุ่มของโมโนมอร์ชนิดเดียวกันมาเชื่อมต่อกัน สามารถแบ่งออกได้เป็นกลุ่มย่อยต่างๆดังนี้

4.1.1 β-D-glucans เป็นกลุ่มของโมโนเมอร์ที่ต่อกันด้วย β-D-glucans เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 2) ประกอบไปด้วยโพลิเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ Cellulose, Curdlan และ Scleroglucan (ตารางที่ 3)



รูปที่ 2 ภาพแสดงโครงสร้างของ β-D-glucans

Figure 2. Structure of β-D-glucans.

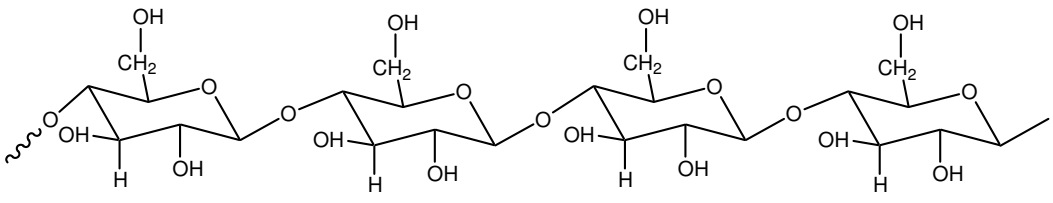
ที่มา: Gerald และ Tilak (1991)

ตารางที่ 3 แสดงชนิดของโพลิเมอร์ชีวภาพที่ผลิตในกลุ่มของ β-D-glucans

Table 3. Types of biopolymer from β-D-glucans group.

Types	Producer	EPS structure	Reference
Cellulose	*Acerobacter* spp. , mainly gram – negative bacteria species and algae	1,3 - β-D glucan are linked together through β (1⟶4)-glycosidic bonds	Bertocchi *et al*. (1997)
Scleroglucan	Several fungi species	1, 3 - β-D linked, attached to 1,6 - D glucosyl residues, relative molecular mass of about1.3 x 10^5 Da	Sutherland (1990)
Curdlan	*Rhizobium, Agrobacterium* and *Alcaligenes faecalis*	1,3 - β-D glucans, relatively low-molecular mass polymer of 7.4x10^5 Da insoluble in water	Sutherland (1990)

4.1.2 α -D-glucans เป็นกลุ่มของโมโนเมอร์ที่ต่อกันด้วย α-D-glucans เพียงอย่างเดียว (รูปที่3) ประกอบด้วยโพลิเมอร์ 4 ชนิด ได้แก่ เด็กซ์แตน (Dextrans) อีซิแนน (Elsinan) พูลลูแลน(Pullulan) และไซลิก เอซิก (Sialic acid) (ตารางที่4)



รูปที่ 3 ภาพแสดงโครงสร้างของ α -D-glucans

Figure 3. Structure of α -D-glucans.

ที่มา: Donald และ Judith (2004)

ตารางที่ 4 แสดงชนิดของโพลิเมอร์ชีวภาพที่ผลิตในกลุ่มของ α-D-glucans

Table 4. Types of biopolymer from α-D-glucans.

Types	Producer	EPS structure	Reference
Dextrans	Several bacteria species	α-(1-6) linked D glucosyl residues, high molecular mass about $4\text{-}5x10^7$	Shingel (2002)
Elsinan	*Elsinoe leucospila*	1,3 -α maltotriose units linked, soluble in water, gels are formed at higher concentrations	Sutherland (1990)
Pullulan	Fungi	α-1,4- and α -1,6-glucan, connected by an α-1,4 glycosidic bond, high molecular mass 105- 106 Da	Shingel (2002)
Sialic acid	*Neisseria meningitidis, E. coli, Pasteurell haemolytica, Moraxella nonliquefaciens* and *Salmonella* sp.	Generic term for the N- or O-substituted derivatives of neuraminic acid, a nine cabon monosaccharide, (2,9) linked	Revilla-Nuin (1998)

4.2 Heteropolysacchsrides ซึ่งได้แก่กลุ่มของโมโนมอร์มากกว่าหนึ่งชนิดมาเชื่อมต่อกัน สามารถแบ่งออกได้เป็น 8 ชนิดได้แก่ แบคทีเรียที่สร้างเอลจิเนต (Bacterial alginates) อีมัลสัน และโพลีแซคคาร์ไรด์ที่เกี่ยวข้อง (Emulsion and related polysaccharides) เกลแลน และโพลิเมอร์ที่เกี่ยวข้อง (Gellan and related polymers) เฮปปาริน (Heparin) เอ็กซ์เอ็มซิกซ์ (XM6) ไฮยาลูโรนิก เอซิก (Hyaluronic acid) ไรโซเบียม เฮดเทอโรไกลแคน (Rhizobium heteroglycan) แซนแทน (Xanthan)(ตารางที่5)

ตารางที่ 5 แสดงชนิดของโพลิเมอร์ชีวภาพที่ผลิตในกลุ่มของ Heteropolysaccharides

Table 5. Types of biopolymer from Heteropolysaccharides.

Types	Producer	EPS struture	Reference
Bacterial alginates	Algal *Azotobacter* spp. *Pseudomonas* spp.	copolymer of (1-4)-linked β-D-mannuronic acid and its C(5) epimer, α- L-gluronic acid	Crescenzi (1995)
Emulsion and related polysaccharides	*Acinetobacter calcoaceticus*	Mainly of rhamnose, mannose, glucose and glucuronic acid. Several composed D - galactosamine aminouronic acid and amino sugar, molecular mass about $5x10^5$ Da	Sutherland (1990)

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (Cont.).

Types	Producer	EPS structure	Reference
Gellan and related polymers	*Auromonas elodea* *Pseudomonas* spp. *Sphingomonas paucimobilis*	Monosaccharide of β-D-glucose , β-D-glucoronic acid and α-(1-4)- L rhamnose in molar ratios of 2:1:1, high molecular mass anionic polysaccharides	Nampoothiri (2000)
Heparin	*Escherichia coli serotype* K 5	Disaccharides repeating unit of 4 -β-D-glucuronosyl-1,4 α- N acetyl-D-glucosamine	Sutherland (1990)
XM6	*Enterobacter* XM6	Closely EPS from *Klebsiella aerogenes* type 54, composed of the same tetrasaccharides repeat unit	Sutherland (1990)

ตารางที่ 5 (ต่อ)

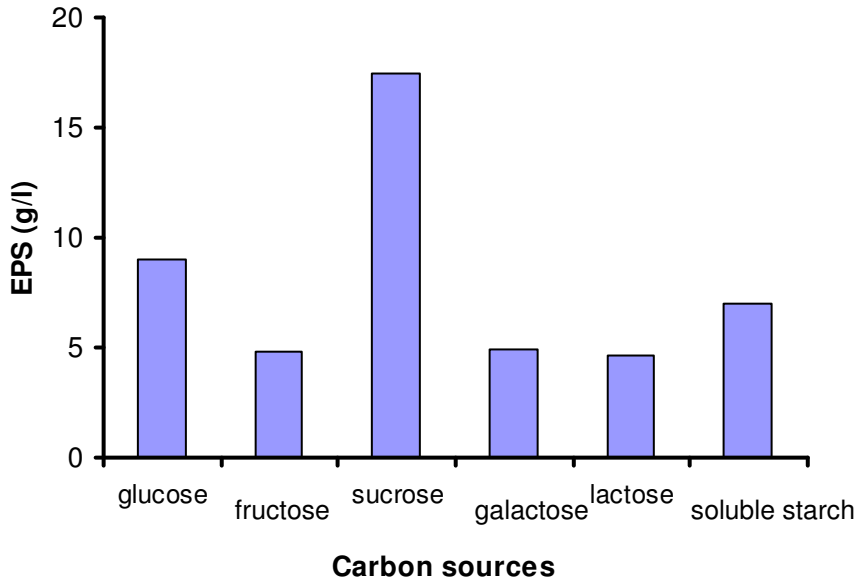
Table 5. (Cont.).

Types	Producer	EPS structure	Reference
Hyaluronic acid	*Pseudomonas aeruginosa*	Disaccharide repeating unit, 1,4 -β-linked disaccharides of D-glucuronosyl-1,3 β- N acetyl-D-glucosamine, high molecular mass size from 5,000 to 20,000,000, insoluble water	Crescenzi (1995)
Rhizobium Heteroglycan	Some species of *Rhizobium, namely, R. trifolii, R. meliloti* and *R. leguminosarum*	Hetero polysaccharide of D-glucose, D-galactose and D-mannose in the molar ratio 1: 3: 2, forming a hexasaccharide repeat unit, insoluble water	Sutherland (1996)
Xanthan	*Xanthomonas campestris*	Closely cellulose, the terminal β-D-mannosyl residue replaced by an L-rhamnosyl, high molecular mass about 4.7×10^7 Da	Sutherland (1996)

5. ปัจจัยในการผลิตโพลิเมอร์ชีวภาพ

5.1 แหล่งของคาร์บอน

ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการสร้าง EPS จากแบคทีเรียที่ผ่านมามีรายงานการใช้ เช่น กลูโคส ซูโครส แลกโตส และแป้ง สำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต EPS (Nompoothiri *et al.*, 2002; Morin, 1998) พบว่าปริมาณของ gellan ที่ผลิตจาก *Sphingomonas paucimobilis* จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของแป้งที่ละลายน้ำได้ ที่เป็นแหล่งของคาร์บอน ในกรณีของ *Bacillus polymyxa* พบว่าเชื้อจะสร้าง EPS ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต EPS (Lee *et al.*, 1997) แต่ในกรณีของ *Lactobacillus* sp. จะผลิต EPS ได้เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งคาร์บอนและEPS

Figure4. Effect of various carbon sources on EPS formation.

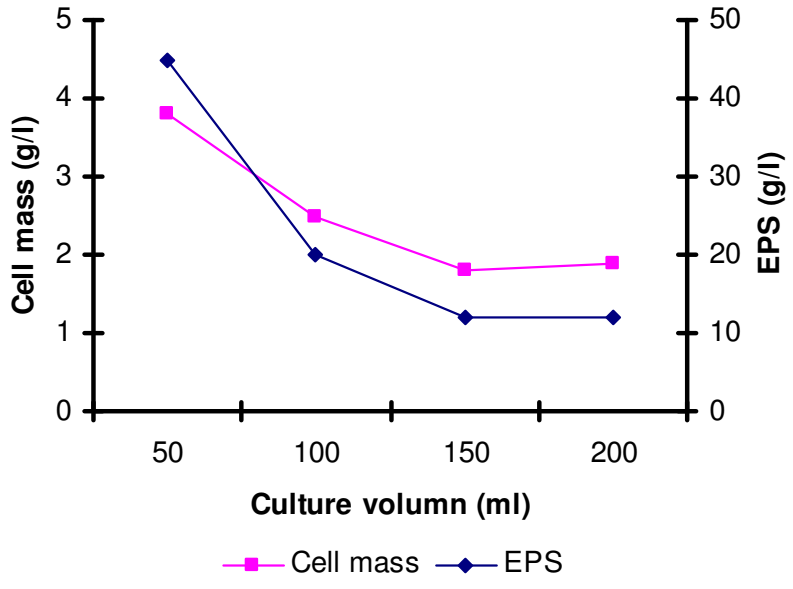
ที่มา: Lee และคณะ (1997)

5.2 แหล่งของไนโตรเจน

แหล่งของไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิต EPS ที่มีรายงานประกอบไปด้วย ammonium sulfate, peptone, sodium nitrate, urea และ yeast extract และพบว่าเมื่อมีการใช้อินทรีย์ไนโตรเจน (organic nitrogen) ที่เป็นแหล่งในการสร้าง EPS จะมีการผลิต EPS ในอัตราที่สูงขึ้น (Morin, 1998) แต่ก็มีรายงานในกรณีของ *Azotobacter vinelandii* ที่สามารถจะใช้อนินทรีย์ไนโตรเจน (inorganic nitrogen) ได้ดีกว่าในการผลิต EPS (Vermani *et al* , 1995)

5.3 ปริมาณของออกซิเจน

ออกซิเจนนั้นมีความจำเป็นอย่างยิ่งในกระบวนการเมตาบอลิซึมขั้นพื้นฐาน และเป็นตัวออกซิไดซ์ น้ำตาลให้เป็น แอลกอฮอล์ หรือเป็นตัวรีดิวซ์ให้เป็น pyridine nucleotides พบว่าปริมาณการให้ออกซิเจนที่มากขึ้นนั้นมีผลโดยตรงต่อการผลิตโพลิเมอร์ชีวภาพ และการเพิ่มขึ้นของ EPS เนื่องจากแบคทีเรียส่วนมากจะเป็นพวกใช้อากาศในการเจริญเติบโตดังนั้นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนจึงมีผลต่อการเจริญและการสร้าง EPS ที่เพิ่มขึ้นด้วย (Morin, 1998) ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการให้อากาศและปริมาณของEPS

Figure 5. Effect of various culture valumn on EPS formation.

ที่มา: Lee และคณะ (1997)

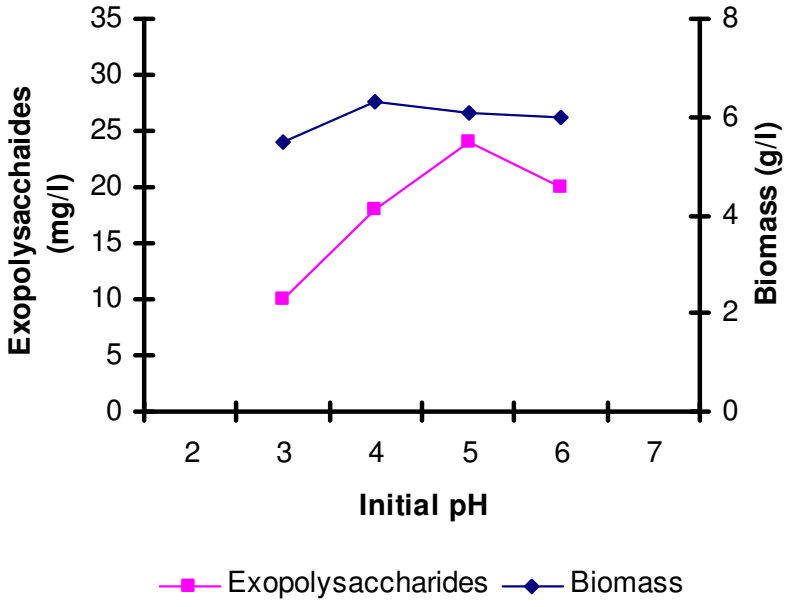
นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *Bacillus polymyxa* ที่ต่างๆกันในฟลาสก์ขนาด 500 มล. จะมีผลต่อปริมาณของ EPS โดยที่ปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มล. เชื้อสามารถจะผลิต EPS ได้มากที่สุด และปริมาณของอาหารที่มากขึ้นทำให้อัตราการผลิต EPS น้อยลง เนื่องจากอากาศถูกรีดิวซ์ให้เหลือน้อยลง ดังนั้นจึงทำให้เห็นว่าปริมาณของออกซิเจนมีผลต่อการผลิตEPS (Lee *et al*,. 1997)

5.4 อุณหภูมิ

แบคทีเรียสามารถผลิต EPS ได้ในช่วงของอุณหภูมิที่ค่อนข้างจะกว้างและพบว่าอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียจะทำให้การผลิต EPS ดีขึ้น เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำอัตราการเจริญและมวลเซลล์ (cell mass) จะต่ำกว่าที่อุณหภูมิสูง ปริมาณของมวลเซลล์ต่ำจะทำให้การผลิต EPS สูงขึ้นเนื่องจากเมื่อเซลล์มีการเจริญที่ช้าลงการสังเคราะห์ผนังเซลล์ก็จะช้าลงและปริมาณของ isoprenoid phosphate ถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์ EPS ได้มากขึ้น (Morin, 1998) นอกจากนี้ Tallon และคณะ (2003) พบว่า *Lactobacillus plantarum* EP 56 จะผลิต EPS ได้ดีที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียสและจะผลิต EPS ลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่พบว่าจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (*Thermophilic microorganism*) จะเจริญและผลิต EPS ได้ดีเมื่ออุณหภูมิอยู่ระหว่าง 60-80 องศาเซลเซียส (Nicolaus, 2002)

5.5 พีเอช

แบคทีเรียโดยทั่วไปแล้วต้องการการเจริญที่พีเอชที่แตกต่างกันเพราะฉะนั้นจึงส่งผลต่อการผลิต EPS ด้วย โดยพีเอชที่เหมาะสมที่จะสร้าง EPS จะขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียที่จะผลิต EPS Shu และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของพีเอชและปริมาณของ EPS ที่ได้จากเชื้อ *Antrodia camporata* พบว่า พีเอช จะส่งผลถึงปริมาณและคุณภาพของ EPS ด้วย กล่าวคือ พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการผลิต EPS โดย *Antrodia camporata* คือ พีเอช 5 นอกจากนี้ที่ พีเอชต่ำจะทำให้มวลโมเลกุลของ EPS สูงขึ้น แต่ปริมาณ EPS ที่ผลิตได้จะมีปริมาณน้อย ส่วนที่ พีเอชสูงจะมีผลต่อปริมาณ EPS ที่ผลิตได้สูงตามด้วย แต่กลับพบว่ามวลโมเลกุลที่ผลิตได้นี้จะค่อนข้างต่ำ มีรายงานพบว่า *Bacillus polymyxa* จะสร้าง EPS ที่พีเอชเป็นกลาง (7) และจะสร้างลดลงเมื่อพีเอชลดลง (Lee *et al*., 1996) เช่นเดียวกับ Thermophillic microorganism ซึ่งจะเจริญและผลิต EPS ได้ดีเมื่อ พีเอช 7.6 (Nicolaus, 2002) ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6. แสดงผลของพีเอชที่มีต่อการเพิ่มขึ้นของ EPS ในระยะเวลา 14 วันที่ พีเอช ระหว่าง 3-6

Figure 6. Effect of various pH range from 3-6 on EPS formation for 14 days of cultivation.

ที่มา : Shu และคณะ (2004)

5.6 อายุของเซลล์ที่ผลิต EPS

แบคทีเรียที่ผลิต EPS โดยทั่วไปจะเพิ่มปริมาณใน 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงและพบว่าปริมาณของ EPS ที่มากที่สุดจะอยู่ในช่วงของการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) (Vermani, 1995; Morin, 1998; Tallon *et al*, 2003) โดยที่ขนาดและอายุของแบคทีเรียนั้นจะมีผลต่อการผลิตของ EPS ด้วย คือเมื่ออายุของเซลล์มากขึ้นเลยระยะคงที่การผลิตโพลิเมอร์จะลดน้อยลงเนื่องจากตัวเซลล์จะเกิดการสร้างเอนไซม์ขึ้นมาย่อยโพลิเมอร์ ในกรณีที่เซลล์มีขนาดใหญ่การสร้างโพลิเมอร์จะน้อยลงเนื่องจากแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนที่จะใช้ในการสร้างโพลิเมอร์จะถูกนำมาใช้ในการสร้างตัวเซลล์แทน (Morin, 1998)

5.7 อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน (C/N)

การผลิต EPS จะสูงขึ้นถ้าปริมาณของ C และ N มีปริมาณที่มากขึ้น โดยมีรายงานว่าการผลิต EPS ที่ดีที่สุดถ้ามีปริมาณของ C/N ในปริมาณ 10:1 และจะส่งผลต่อปริมาณของแบคทีเรียที่ผลิต EPS ด้วย Burdman และคณะ (2000) ได้ศึกษาพบว่าปริมาณของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน

และไนโตรเจนที่มีมากจะส่งผลต่อการผลิต EPS ของเชื้อ *Azospirillum brasilense* สายพันธุ์ Cd, Sp7 และ FASO 204 F โดยปริมาณของ EPS จะเพิ่มขึ้นประมาณ 15, 40 และ 60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

6. แนวทางการประยุกต์ใช้โพลิเมอร์ชีวภาพ

เนื่องจากโพลิเมอร์ชีวภาพมีโครงสร้างหลากหลายขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆอย่างทำให้ชนิดของโพลิเมอร์ชีวภาพที่ผลิตขึ้นมาก็แตกต่างไปด้วย จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลากหลายขึ้นกับวัตถุประสงค์ที่จะนำไปใช้ เช่น ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร ทางการแพทย์ เภสัชกรรม และการบำบัดรักษาสิ่งแวดล้อม เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงชนิดของโพลิเมอร์ที่ผลิตจากแบคทีเรียในทะเลและการนำไปประยุกต์ใช้

Table 6. Biopolymer from marine bacteria with potential commercial application.

Types	Polymer	Potential applications
Complex polysaccharides and related extracellular polymeric substance	adhesins	Under water surface coatings, bioadhesives
	Drag reducers	Drilling, ship efficiency
	Emulsion	Oil cleaning and viscosity reduction
	Surfactant	Dispersing agent, grinding aid
	Alginate	Food, textile
	Metal-binding EPS	Toxic-metals bioremediation
Pigment	Melanins	Biotechnology, reporter gene, cosmetics, dyes, colorings, sun screens
Polyesters	Poly3 -hydroxyalkanoates	Biodegradable plastics

ที่มา : Weiner (1997)

ได้มีการศึกษา pullulan ที่ผลิตได้จาก *Aureobasidium pullulans* มาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยนำ pullulan มาขึ้นรูปเป็นฟิล์มสำหรับห่อหุ้มอาหารแทนพลาสติก เนื่องจาก pullulan สามารถที่จะย่อยสลายได้ง่ายตามธรรมชาติ อีกทั้งยังได้มีการพัฒนา pullulan มาเป็นตัวให้ความหนืดในผลิตภัณฑ์อาหารด้วย (Lin *et a*l., 2007)

Salehizadeh และ Shojaosadati (2003) ได้ทำการศึกษาการดูดซับโลหะตะกั่วและทองแดง โดยใช้ EPS ที่ผลิตจาก *Bacillus firmus* MS-105 ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน พบว่า EPS ที่แยกได้จากเชื้อ *B. firmus* สามารถดูดซับโลหะตะกั่วที่ความเข้มข้น 1000 ppm ได้ถึง 98.3% ที่ pH 4.5 และสามารถดูดซับโลหะ ทองแดงได้ถึง 74.9% ที่ pH 4

Loaec และคณะ (1996) พบว่า EPS ที่ผลิตจาก *Alteromonas naclecdii* สามารถดูดซับตะกั่วได้มากที่สุด 316 mg/g polymer รองลงมาเป็นแคดเมี่ยม 125 mg/g polymer และ สังกะสี 75 mg/g polymer ที่เวลา 3 ชั่วโมงหลังจากนั้นความสามารถในการดูดซับจะคงที่

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโพลิเมอร์ชีวภาพที่สามารถดูดซับตะกั่วจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากทะเล
2. ศึกษาวิธีประยุกต์ใช้โพลิเมอร์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียในทะเลเพื่อดูดซับตะกั่ว
3. ศึกษาวิธีการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของโพลิเมอร์ที่ผลิตได้รวมถึงคุณสมบัติเบื้องต้นของโพลิเมอร์ได้

ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตโพลิเมอร์ชีวภาพของแบคทีเรียในทะเลที่สามารถดูดซับตะกั่วได้ วิธีการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของโพลิเมอร์ที่ผลิตได้ คุณสมบัติเบื้องต้น ของโพลิเมอร์ รวมถึงการนำเอาโพลิเมอร์ชีวภาพที่ผลิตได้มาประยุกต์ใช้ในการกำจัดโลหะตะกั่ว แคดเมียม และแมงกานีส

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถทราบแนวทางในการผลิตโพลิเมอร์ชีวภาพที่ใช้ในการดูดซับตะกั่วได้
2. สามารถศึกษาแนวทางในการประยุกต์ใช้กิจกรรมทางชีวภาพในการลดมลพิษของตะกั่วในสิ่งแวดล้อมได้