



ปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซับแคดเมียมของ *Kirchneriella lunaris*

โดย

นางสาววราภรณ์ พงษ์สวัสดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซับแคดเมียมของ *Kirchneriella lunaris*

โดย

นางสาววราภรณ์ พงษ์สวัสดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

**FACTORS AFFECTING CADMIUM ADSORPTION OF *Kirchneriella lunaris***

**By**

**Waramanee Pongsawat**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree**

**MASTER OF SCIENCE**

**Department of Biology**

**Graduate School**

**SILPAKORN UNIVERSITY**

**2008**

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “ปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซับแคดเมียมของ *Kirchneriella lunaris*” เสนอโดย นางสาววราภณี พงษ์สวัสดิ์ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

*(ม. น.)*

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริชัย ชินะดังกูร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่...20...เดือน...สิงหาคม...พ.ศ. 2551

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

1. รองศาสตราจารย์ ดร.เรณู เวรรัชต์พิมล

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

*อรุณ อารีกิจเสรี*  
..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มยุรา อารีกิจเสรี)  
.....30 / กค. / 51.....

*เรณู เวรรัชต์พิมล*  
..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. เรณู เวรรัชต์พิมล)  
.....30 / กค. / 51.....

*กัมขันธ์ ศรีพงษ์พันธุ์*  
..... กรรมการ  
.....30 / กค. / 51.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.กัมขันธ์ ศรีพงษ์พันธุ์)

*บุษยา บุนนาค*  
..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ บุษยา บุนนาค)  
.....30 / กค. / 51.....

*ปทุมพร เมืองพระ*  
..... กรรมการ  
.....30 / กค. / 51.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ปทุมพร เมืองพระ)

46303211 : สาขาวิชาชีววิทยา

คำสำคัญ : แคมเมียม/การดูดซับ

วราภณี พงษ์สวัสดิ์ : ปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซับแคมเมียมของ *Kirchneriella lunaris*.  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รศ.ดร.เรณู เวชรัชต์พิมล. 153 หน้า.

การศึกษาผลของแคมเมียมต่อการเติบโต และการดูดซับแคมเมียมของสาหร่ายสีเขียว *Kirchneriella lunaris* ในอาหาร Modified Complete medium (MCM) โดยเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสงประมาณ 1,300 ลักซ์ ช่วงเวลาสว่างและช่วงเวลามืด (L:D) 12:12 ชั่วโมง อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ผลการศึกษาอัตราการเติบโตของ *K. lunaris* ในอาหารที่เติมและไม่เติม Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ช่วง log phase พบว่ามีค่า doubling time เป็น 1.33 และ 1.30 วัน หรือ 31.99 และ 31.20 ชั่วโมง การเติบโตของสาหร่าย *K. lunaris* กลุ่มที่เติมและไม่เติม EDTA ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของแคมเมียมต่อ *K. lunaris* โดยศึกษาจากความเข้มข้นแคมเมียมที่ทำให้สาหร่ายมีการเติบโตน้อยกว่ากลุ่มควบคุมครึ่งหนึ่ง ( $EC_{50}$ ) พบว่าค่า  $EC_{50}$  ของแคมเมียมในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงมีค่า 0.117, 0.039 และ 0.010 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาคุณสมบัติการดูดซับ พบว่าระยะเวลาการเข้าสู่สมดุลการดูดซับแคมเมียมของ *K. lunaris* เมื่อความเข้มข้นแคมเมียมเริ่มต้นมีค่า 1 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร จะเข้าสู่สมดุลในเวลา 80 นาที จำนวนเซลล์เริ่มต้นมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การดูดซับและค่าการดูดซับ ณ จุดสมดุล พบว่าเมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคมเมียมสูงสุดถึง 88.51 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรด-เบสมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การดูดซับ ค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมที่สุดในการดูดซับ คือ 6.0 โดยมีเปอร์เซ็นต์การดูดซับ 95.50 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นแคมเมียมเริ่มต้นมีผลต่อเปอร์เซ็นต์และค่าการดูดซับ พบว่าค่าการดูดซับแคมเมียมมีค่าสูงสุด 23.95 มิลลิกรัม/กรัม ที่ความเข้มข้นแคมเมียมเริ่มต้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร จากการศึกษาสมดุลของการดูดซับแคมเมียมพบว่าเป็นไปตามแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของ Langmuir และ Freundlich โดยมีค่า  $R^2$  0.99 และ 0.90 ตามลำดับ และ fit ได้ดีกับสมการ Langmuir มากกว่า Freundlich

ภาควิชาชีววิทยา      บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อนักศึกษา.....*วราภณี พงษ์สวัสดิ์*.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ .....*รศ.ดร.เรณู เวชรัชต์พิมล*.....

46303211 : MAJOR : BIOLOGY

KEY WORD : CADMIUM/SORPTION

WARAMANEE PONGSAWAT : FACTORS AFFECTING CADMIUM ADSORPTION  
OF *Kirchneriella lunaris*. THESIS ADVISOR : ASST.PROF.RENU VEJARAIPIMOL., Ph.D.  
153 pp.

Study of the effect of cadmium on the growth and adsorption of *Kirchneriella lunaris* in modified complete culture medium (MCM) under fluorescent intensity 1,300 lux, light:dark 12:12 hr. and temperature 26±2 °C were conducted. The results showed that the doubling times during log phase period of *K. lunaris* cultured in medium addition with or without EDTA were 1.33 and 1.30 day<sup>-1</sup> or 31.99 and 31.20 hours, respectively. There was no significant difference ( $p>0.05$ ) of growth between EDTA and no EDTA treatment group. The acute toxicity test of Cd to *K. lunaris* found that EC<sub>50</sub> of Cd after 24, 48 and 72 hours were 0.117, 0.039 and 0.010 mg/L, respectively. Equilibrium time of Cd adsorption was 80 min when initial Cd concentrations were 1 and 50 mg/L. The number of inoculation cells affected the percent of adsorption and adsorption capacity. The highest adsorption was 88.51 % at inoculum's size 10<sup>8</sup> cell/ml. The optimum pH of Cd adsorption was 6.0 and caused the highest adsorption, 95.50%, The initial concentration of Cd affected the percent adsorption and adsorption capacity. The highest adsorption capacity of 23.95 mg Cd/g biosorbent was found when initial Cd concentration was 100 mg/L. The kinetic adsorption of *K. lunaris* was followed mathematic models of Langmuir and Freundlich, and R<sup>2</sup> 0.99 and 0.90 obtained, respectively. The adsorption data of *K. lunaris* fit well to Langmuir more than Freundlich model.

Department of Biology Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2008

Student's signature ..... Waramanee Pongsawat

Thesis Advisor's signature ..... Renu Vejaraipimol

## กิตติกรรมประกาศ

ความสำเร็จของการทำวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณ ผศ. ปทุมพร เมืองพระ อาจารย์ผู้ควบคุมการทำวิจัย ที่ให้กรุณาให้แนวคิดและคำแนะนำในการดำเนินการวิจัย ตลอดจนการแก้ไขปัญหาต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยครั้งนี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างยิ่งต่อ รศ.ดร.เรณู เวชรัชต์พิมล , รศ.ดร.กัณหากรีย์ ศรีพงษ์พันธุ์, รศ.นุชยา บุญนาค และ ผศ.ดร. มยุวาท อารีกิจเสรี ที่กรุณามาเป็นกรรมการสอบ รวมทั้งคำปรึกษาและแนะนำให้แกผู้วิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณ ผศ.ดร.ณรงค์ ฉิมพาลี ที่ให้คำแนะนำด้านการวิเคราะห์โลหะหนัก ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เจ้าหน้าที่ที่ภาควิชาชีววิทยา ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศิลปากรที่ให้ความช่วยเหลือในการทำปฏิบัติการ ขอขอบคุณคุณพ่อ คุณแม่ เพื่อนๆ รวมทั้งรุ่นพี่ รุ่นน้อง และทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ คอยเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณทุนวิจัยจากสถาบันวิจัย และพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่สนับสนุนงานวิจัยนี้ ประโยชน์อันใดที่เกิดจากงานวิจัยนี้ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของท่านดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฉ
คำอธิบายคำย่อ.....	ท
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
การใช้สารห่วยเป็นตัวดูดซับ.....	4
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	6
ขอบเขตการวิจัย.....	6
สถานที่ทำการวิจัย.....	6
วิธีการศึกษา.....	7
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	7
เวลาที่ใช้ในการวิจัย.....	8
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
แคดเมียม.....	9
คุณลักษณะของแคดเมียม.....	10
รูปของแคดเมียม.....	10
ประโยชน์ของแคดเมียมทางด้านอุตสาหกรรม.....	11
ความสัมพันธ์ระหว่างแคดเมียมกับมนุษย์.....	11
การสะสมไอออนโลหะของจุลินทรีย์.....	14
ปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมโลหะ.....	18
สารห่วย.....	24
ความเป็นพิษของโลหะหนัก.....	24
การประเมินความเป็นพิษ.....	25

บทที่	หน้า
การทดสอบความเป็นพิษของแหล่งน้ำทางชีววิทยา.....	25
คุณสมบัติของสาหร่ายที่ใช้ในการลดปริมาณโลหะหนัก.....	27
องค์ประกอบทางเคมีของผิวเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และสาหร่ายยูคาริโอต.....	27
การจับโลหะด้วยสาหร่ายที่มีชีวิต.....	30
การจับโลหะด้วยสาหร่ายที่ไม่มีชีวิต.....	33
การแบ่งกลุ่มของไอออนที่จับกับสาหร่าย.....	34
ความสามารถในการสะสมโลหะด้วยสาหร่าย.....	35
กลไกการจับไอออนโลหะกับสาหร่าย.....	36
ประสิทธิภาพของกลไกการจับไอออนโลหะหนักของสาหร่าย.....	37
แบบจำลองสมการทางคณิตศาสตร์ของการสะสมโลหะหนักด้วยจุลินทรีย์..	40
ชีววิทยาของ <i>Kirchneriella lunaris</i> .....	42
สาเหตุที่เลือกศึกษาสาหร่ายสีเขียว <i>Kirchneriella lunaris</i> .....	43
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสาหร่ายและโลหะหนัก.....	44
3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย.....	46
อุปกรณ์การวิจัย.....	46
วิธีการศึกษา.....	48
การเตรียมการทดลอง.....	48
การศึกษาลักษณะทางโครงสร้างของ <i>K. lunaris</i> .....	49
การศึกษาอัตราการเติบโต ( $\mu$ , growth rate) และสภาพการเลี้ยง.....	50
การศึกษาความเข้มข้นของแคดเมียมที่ทำให้ <i>K. lunaris</i> มีการเติบโตลดลง 50% ในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ( $EC_{50}$ ).....	51
การศึกษาระยะเวลาเข้าสู่สมดุล (equilibrium time) ของการดูดซับแคดเมียม ของ <i>K. lunaris</i> .....	51
การศึกษาผลของจำนวนเซลล์ต่อเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียม ของ <i>K. lunaris</i> .....	52
การศึกษาผลของความเป็นกรด-เบสต่อค่าการดูดซับแคดเมียม ของ <i>K. lunaris</i> .....	53

บทที่	หน้า
การศึกษาค่าความสามารถในการดูดซับแคดเมียม (adsorption capacity) หรือค่าการดูดซับ .....	53
4 ผลการทดลอง .....	56
การศึกษาชีววิทยาของ <i>Kirchneriella lunaris</i> .....	56
การศึกษาอัตราการเติบโตจำเพาะ $\mu$ (growth rate) และสภาพการเลี้ยง .....	57
การศึกษาศึกษาความเข้มข้นของแคดเมียมที่ทำให้ <i>K. lunaris</i> มีการเติบโต ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (72 h-EC <sub>50</sub> ) .....	60
การศึกษาระยะเวลาเข้าสู่สมดุลของแคดเมียมของ <i>K. lunaris</i> .....	62
การศึกษาผลของจำนวนเซลล์เริ่มต้นต่อเปอร์เซ็นต์ การดูดซับแคดเมียม ของ <i>K. lunaris</i> .....	66
การศึกษาผลของความเป็นกรด-เบสต่อค่าการดูดซับแคดเมียมของ <i>K. lunaris</i> ....	68
การศึกษาผลของปริมาณแคดเมียมเริ่มต้นต่อค่าการดูดซับแคดเมียมของ <i>K. lunaris</i> .....	69
การศึกษา Kinetic และ equilibrium.....	71
5 สรุปผลการทดลอง และอภิปรายผล และข้อเสนอแนะ .....	77
การศึกษาอัตราการเติบโต $\mu$ (growth rate) และสภาพการเลี้ยง .....	77
การศึกษาศึกษาความเข้มข้นของแคดเมียมที่ทำให้ <i>K. lunaris</i> มีการเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	78
การศึกษาระยะเวลาเข้าสู่สมดุลของแคดเมียมของ <i>K. lunaris</i> .....	79
การศึกษาผลของจำนวนเซลล์เริ่มต้นต่อเปอร์เซ็นต์ การดูดซับแคดเมียมของ <i>K. lunaris</i> .....	82
การศึกษาผลของความเป็นกรด-เบสต่อค่าการดูดซับแคดเมียมของ <i>K. lunaris</i> ....	83
การศึกษาผลของปริมาณแคดเมียมเริ่มต้นต่อค่าการดูดซับแคดเมียมของ <i>K. lunaris</i> .....	84
การศึกษา Kinetic และ equilibrium.....	85
สรุปผลการทดลอง.....	86
ข้อเสนอแนะ .....	87
บรรณานุกรม.....	88
ภาคผนวก.....	102

ประวัติผู้วิจัย ..... 153

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมในการดูดซับโลหะแต่ละชนิด ของจุลินทรีย์.....	20
2	ปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตบนผนังเซลล์สาหร่าย (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง).....	36
3	จำนวนเซลล์ <i>K. lunaris</i> และ ความเป็นกรด-เบส เมื่อเลี้ยงในอาหาร MCM ที่เติมและไม่เติม EDTA.....	58
4	แสดงจำนวนเซลล์ และเปอร์เซ็นต์การรอดของ <i>K. lunaris</i> เมื่อเลี้ยงในแคดเมียมความเข้มข้น 0.025-0.200 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	59
5	แสดงความเป็นกรด-เบสเริ่มต้น และสุดท้าย เปอร์เซ็นต์การดูดซับ และค่าการดูดซับ ของ <i>K. lunaris</i> ในอาหารที่เติมแคดเมียม 1 มิลลิกรัม/ลิตร.....	68
6	แสดงค่าที่ใช้ในการแก้สมการ Langmuir.....	71
7	แสดงค่าที่ใช้ในการแก้สมการ Freundlich.....	73
8	Langmuir และ Freundlich parameters สำหรับ adsorption isotherms ของ <i>K. lunaris</i> เปรียบเทียบกับสาหร่ายชนิดอื่น.....	74
9	การเปรียบเทียบค่าการดูดซับแคดเมียม (q) ของ biosorbents หลายชนิด.....	75

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างผนังเซลล์ของสาหร่าย.....	28
2	โครงสร้าง cellulose, $\beta$ glucose และ Xyloglucan.....	30
3	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการจัดไอออนโลหะของ <i>Chlorella vulgaris</i> กับความเป็นกรด-เบส.....	35
4	แสดงลักษณะของ <i>Kirchneriella lunaris</i> .....	42
5	ภาพโครงสร้างภายนอกของ <i>K. lunaris</i> จากกล้องจุลทรรศน์ ชนิดเลนส์ประกอบ.....	56
6	ภาพโครงสร้างภายนอกของ <i>K. lunaris</i> จากกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องกราด.....	57
7	แสดงลักษณะโคโลนีของ <i>K. lunaris</i> เมื่อเลี้ยงใน อาหารแข็ง MCM.....	57
8	แสดงการเติบโตของ <i>K. lunaris</i> เมื่อเลี้ยงในอาหาร MCM ที่เติมและไม่เติม EDTA.....	58
9	แสดงเปอร์เซ็นต์การเติบโตของ <i>K. lunaris</i> เมื่อเลี้ยงในแคดเมียม ความเข้มข้น 0.025-0.200 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	61
10	แสดงค่าความเป็นกรด-เบสของ <i>K. lunaris</i> เมื่อเลี้ยงในแคดเมียม ความเข้มข้น 0.025-0.200 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	62
11	แสดงเปอร์เซ็นต์การดูดซับของ <i>K. lunaris</i> ของกลุ่มทดลองความเข้มข้น แคดเมียมเริ่มต้น 1 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลา 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 240 นาที และ 5 ชั่วโมง.....	63
12	แสดงการเติบโตของ <i>K. lunaris</i> กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับ แคดเมียมเริ่มต้น 1 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลา 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 240 นาที และ 5 ชั่วโมง.....	64
13	แสดงค่าการดูดซับ (q) ของ <i>K. lunaris</i> ที่ความเข้มข้นแคดเมียม 1 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลา 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 240 นาที และ 5 ชั่วโมง.....	65

ภาพที่		หน้า
14	แสดงผลของจำนวนเซลล์ต่อเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียม ค่าการดูดซับของ <i>K. lunaris</i> ที่เติมแคดเมียมเริ่มต้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร .....	67
15	แสดงค่าความเป็นกรด-เบสและจำนวนเซลล์ <i>K. lunaris</i> เริ่มต้น $10^4$ - $10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร ในอาหารที่ได้รับแคดเมียม 1 มิลลิกรัม/ลิตร .....	67
16	แสดงค่าการดูดซับ ( $q_{ss}$ ) เมื่อเลี้ยง <i>K. lunaris</i> ในอาหารที่เติม แคดเมียมความเข้มข้นเริ่มต้น 1, 5, 10, 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร .....	70
17	แสดงค่าความเป็นกรด-เบส เมื่อเลี้ยง <i>K. lunaris</i> ในอาหารที่เติม แคดเมียมความเข้มข้นเริ่มต้น 1, 5, 10, 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร .....	70
18	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแคดเมียมสุดท้ายกับค่าการดูดซับ ( $q$ ) ของ <i>K. lunaris</i> .....	71
19	กราฟแสดงสมการ Langmuir ของ <i>K. lunaris</i> .....	73
20	กราฟแสดงสมการ Freundlich ของ <i>K. lunaris</i> .....	74

## คำอธิบายคำย่อ

คำย่อ	=	คำเต็ม
$\mu\text{m}$	=	Micrometre
$\mu\text{M}$	=	Micromolar
APHA	=	American Public Health Association
ATP	=	Adenosine triphosphate
AWWA	=	American Water Works Association
CaBP	=	Calcium binding protein
cell/ml	=	cell per milliliter
EC	=	Effective concentration
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
EEC	=	European Economic Community
EPA	=	Environmental Protection Agency
Fmol	=	Femtomole
GF/C	=	Glass microfibrere filters
H	=	Hour
ICPS	=	Inductively Couple Plasma Mass Spectrometer
ISO	=	International Organization for Standardization
<i>K. lunaris</i>	=	<i>Kirchneriella lunaris</i>
L:D	=	Light : Dark
LC	=	Lethal concentration
M	=	Molar
MCM	=	Modified Complete Medium
NAG	=	N- acetylglucosamine
NAM	=	N- acetlymuramic acid
nm	=	Nanometre
OECD	=	Organisation for Economic Co-operation and Development

<b>PEI</b>	<b>=</b>	<b>polyethyleneimine</b>
<b>SEM</b>	<b>=</b>	<b>Scanning electron microscope</b>
<b>w</b>	<b>=</b>	<b>with</b>
<b>w/o</b>	<b>=</b>	<b>without</b>
<b>WC culture medium</b>	<b>=</b>	<b>Wilkins-Chalgren medium</b>

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สภาพแวดล้อมในปัจจุบันมีการปนเปื้อนของโลหะหนักมีผลสืบเนื่องมาจากกิจกรรมต่าง ๆ ของมนุษย์ ได้แก่ กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับน้ำมันและกระบวนการทางอุตสาหกรรมที่ใช้โลหะหนักเป็นองค์ประกอบ รวมทั้งน้ำที่ไหลชะของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เหมืองแร่ และของเสียจากบ้านเรือน โรงงานอุตสาหกรรมที่เป็นแหล่งกำเนิดโลหะหนัก ได้แก่ โรงงานชุบโลหะและโรงงานแบตเตอรี่ ซึ่งโรงงานอุตสาหกรรมเหล่านี้ถ้าขาดการบำบัดน้ำเสียอย่างมีประสิทธิภาพก่อนระบายลงสู่แหล่งน้ำ จะส่งผลให้สภาพแวดล้อมมีการปนเปื้อนของโลหะหนัก เช่น ตะกั่ว แคดเมียม ทองแดง โครเมียม และปรอททั้งในน้ำและดิน องค์การป้องกันสิ่งแวดล้อมของประเทศสหรัฐอเมริกา (United States Environmental Protection Agency, USEPA) ได้จัดว่าปรอท ตะกั่ว และแคดเมียมเป็นโลหะที่เป็นพิษ หากมีการปนเปื้อนลงสู่สภาพแวดล้อมจะส่งต่อผลสิ่งมีชีวิตในห่วงโซ่อาหาร

โดยทั่วไปโลหะหนักไม่แตกตัวในน้ำแต่สะสมอยู่ในตะกอน และ/หรือในอนุภาคแขวนลอย จะค่อยปลดปล่อยลงสู่แหล่งน้ำ และถูกดูดซับโดยสิ่งมีชีวิต ความเป็นพิษของโลหะหนักต่อสิ่งมีชีวิตถูกควบคุมด้วยชนิดของโลหะ (Meylan *et al.* 2003) ปัจจัยทางกายภาพและทางเคมี เช่น ความเป็นกรด-เบส ปฏิกิริยารีดอกซ์ อุณหภูมิ ปริมาณไอออน อนุภาคแร่ธาตุ สารอินทรีย์ และแสง มีผลต่อรูปฟอร์มของโลหะ การเคลื่อนย้าย และปริมาณที่สิ่งมีชีวิตสามารถนำไปใช้ได้ (bioavailability) (de Fillippis and Pallaghy 1994)

สภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนด้วยโลหะหนัก อาจส่งผลโดยตรงและ/หรือโดยอ้อมต่อระบบนิเวศบกและน้ำ (Fleeger *et al.* 2003) มีผลต่อสิ่งมีชีวิตในระดับภายใน เช่น โมเลกุล เซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะ และ/หรือระดับภายนอก เช่น ตัวสิ่งมีชีวิต ประชากร หรือสังคม สิ่งมีชีวิตตอบสนองต่อการปนเปื้อนได้หลายรูปแบบ ไอออนโลหะ เช่น แคดเมียม ตะกั่ว หรือ โครเมียม ซึ่งเป็นไอออนที่ไม่มีส่วนในกิจกรรมเมทาบอลิซึมในสิ่งมีชีวิต เมื่อเข้าไปในเซลล์แม้เพียงเล็กน้อยสามารถยับยั้งกระบวนการเมทาบอลิซึมในสิ่งมีชีวิตหลายกระบวนการได้ (Cervantes *et al.* 2001)

แต่ไอออนโลหะที่จำเป็นบางอย่าง เช่น สังกะสี หรือทองแดง เมื่อเข้าไปในเซลล์ในปริมาณมากจนเกินความต้องการ อาจกลับกลายเป็นพิษได้ (De Fillippis and Pallaghy 1994; Campanella *et al.* 2001)

ประเทศไทยมีรายงานการปนเปื้อนของโลหะหนักในน้ำที่มีสาเหตุมาจากแร่ดีบุก ที่อำเภออ่อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราช ประชาชนได้รับสารหนูจากการดื่มน้ำบ่อตื้น ที่มีสารหนูปะปนในปริมาณสูงที่มีแคดเมียมปนเปื้อนด้วย ทำให้เกิดอาการผิวหนัง ตัวดำผิดปกติ และมีตุ่มตามผิวหนัง วินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งผิวหนังที่เกิดจากการได้รับสารหนูเรื้อรัง โดยทั่วไปความเป็นพิษของโลหะหนักในน้ำขึ้นอยู่กับระดับของการออกซิเดชันของไอออนโลหะ ร่วมกับองค์ประกอบของโลหะในรูปสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ พิษของโลหะหนักที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพจะตรวจไม่พบในระยะแรก แต่จะแสดงอาการเมื่อได้รับสัมผัสเป็นระยะเวลาานาน นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบในตะกอนท้องน้ำของลำน้ำพอง โดยพบว่า ปริมาณโลหะหนักตกค้างช่วงท้ายเขื่อนอุบลรัตน์ถึงฝายมหาสารคามมีปริมาณค่อนข้างสูงในตะกอนท้องน้ำของลำน้ำพอง โดยมีโลหะหนัก 5 ชนิด คือ สังกะสี แคดเมียม ตะกั่ว โครเมียม และ ทองแดง บริเวณบ้านพระมีปริมาณโลหะหนักมากที่สุดเมื่อเทียบกับบริเวณอื่น ๆ สังกะสีมีปริมาณสูงสุด คือ 17.31-235.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม รองลงไปคือ ตะกั่ว 8.75-58.75 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โครเมียม 1.31 – 91.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทองแดง 4.44 – 32.06 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และแคดเมียม 0.38 – 3.35 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (อุไรวรรณ อินทร์ม่วง และคณะ 2543) นอกจากนี้ในรายงานของคาริวรรณ เศรษฐีธรรมและวรรณภา อธิชิตะ (2544) พบว่าระบบบำบัดน้ำเสียรวมในเขตเทศบาลนครขอนแก่น บางจุดบางช่วงมีปริมาณทองแดงเกินมาตรฐาน ส่วนโลหะหนักชนิดอื่นไม่เกินมาตรฐาน ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 2 พ.ศ.2539 (กองจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม 2540) ซึ่งระบุให้ทองแดงมีในน้ำทิ้งที่ระบายออกนอกโรงงานได้ไม่เกิน 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ตะกั่วไม่เกิน 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร โครเมียมไม่เกิน 0.25 มิลลิกรัม/ลิตร และแคดเมียมไม่เกิน 0.03 มิลลิกรัม/ลิตร ชูติมา วงศ์สุขสิน (2540) รายงานว่าปริมาณแคดเมียม ทองแดง และปรอทที่ตรวจพบในสัตว์ทะเลมีแนวโน้มสูงขึ้น จากการตรวจหาสารแคดเมียมในแปลงนาข้าวบริเวณ ตำบลพะเต๊ะ ซึ่งอยู่ใกล้บริเวณแหล่งแร่สังกะสีของอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก จำนวนดินที่สุ่มตรวจทั้งหมด 154 ตัวอย่าง พบว่า มีปริมาณสารแคดเมียมในดินสูงกว่าค่ามาตรฐานของสหภาพยุโรป (EU) ถึง 1,800 เท่า และผลการตรวจเมล็ดข้าว พบว่า ร้อยละ 95 ของเมล็ดข้าวที่สุ่มตัวอย่างมีแคดเมียมปนเปื้อนในปริมาณที่มากกว่าค่าที่พบในข้าวที่ปลูกในประเทศไทยบริเวณอื่น สูงที่สุดถึง 100 เท่า ซึ่งปริมาณสารแคดเมียมที่พบนี้มีค่าในระดับเดียวกับข้าวที่ก่อโรค อีไต-อีไต (Itai- Itai) ในประเทศญี่ปุ่น หากบริโภคติดต่อกันเป็นเวลานาน พบโรคอี

ได-อีได ในประเทศญี่ปุ่น เมื่อปี พ.ศ. 2463 โดยเกิดการระบาดของโรคตามริมฝั่งของแม่น้ำจินด์ชู เนื่องมาจากการทำเหมืองและถลุงโลหะของบริษัทมิตซุบุ ซึ่งผลิตโลหะทองแดง ตะกั่วและสังกะสี และได้นำกากโลหะจากโรงงานมาทิ้งลงแม่น้ำเป็นเวลานาน จนชาวบ้านที่อาศัยในแถบนั้นเกิดอาการปวดกระดูกตามน่อง ซี่โครงและสันหลัง ซึ่งส่วนมากเป็นเพศหญิง โดยเฉพาะหญิงที่มีบุตรหลายคนและวัยหมดประจำเดือน ทำให้มีคนเสียชีวิตกว่า 100 ราย และมากกว่า 180 ราย มีอาการถึงปัจจุบัน โดยมีสาเหตุมาจากการสะสมแคดเมียมในร่างกาย ซึ่งต่อมาได้มีการค้นพบว่าสาเหตุมาจากการบริโภคข้าวที่ปนเปื้อนสารแคดเมียมเป็นเวลานาน 30 ปีขึ้นไป

จากปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนักในสภาพแวดล้อมดังกล่าว ปัจจุบันได้มีการลดปริมาณการนำโลหะหนักบางชนิดมาใช้ในอุตสาหกรรม เช่นปรอท และตะกั่ว เป็นต้น เนื่องจากได้ตระหนักถึงผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อม แต่ยังคงพบว่ามี การนำโลหะแคดเมียมมาใช้โดยทั่วไปในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น ใช้เป็นสีกันสนิมหลังคา ส่วนประกอบของอัลลอย ใช้เป็นตัวนำไฟฟ้า (semiconductors) การชุบโลหะด้วยไฟฟ้า ท่อพีวีซี แบตเตอรี่ แก้ว ฝอย ใช้ผสมกับซีเมนต์ในการผลิตซีเมนต์ผสมในน้ำมันเครื่อง ยางและพลาสติก สิ่งเหล่านี้เป็นสิ่งที่มนุษย์สัมผัสและใช้โดยทั่วไปในชีวิตประจำวัน (ฝ่ายจัดการสารพิษกองมาตรฐานคุณภาพสิ่งแวดล้อม สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ 2541) เมื่อของใช้เหล่านี้หมดสภาพการใช้งาน จึงก่อให้เกิดปัญหาในการกำจัด การปนเปื้อนของแคดเมียมที่พบได้ทั้งในอากาศ ดินและน้ำ เมื่อปนเปื้อนเป็นระยะเวลานานจะเกิดการสะสมของแคดเมียมในสภาพแวดล้อม และส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตบริเวณนั้น เมื่อแคดเมียมปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำ พืชจะสะสมในลำต้น หัว รากอาหารและมีการถ่ายทอดสู่ผู้บริโภคลำดับชั้นต่อไป ปิยะภรณ์ ดวงมนตรี (2545) ศึกษาการสะสมโลหะหนักในสิ่งมีชีวิตผ่านลำดับชั้นการบริโภคในแหล่งน้ำ พบว่ามีการสะสมและเพิ่มขยายได้ในสิ่งมีชีวิตผ่านลำดับชั้นบริโภค และมนุษย์มักเป็นผู้บริโภคชั้นสูงสุดที่อาจได้รับอันตรายจากการสะสมพิษของโลหะหนัก ความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตขึ้นอยู่กับปริมาณ ระยะเวลา ชนิด รูปแบบของสารพิษ และสภาพแวดล้อม หากโลหะหนักสะสมในปริมาณมากอาจถึงแก่ชีวิตได้

การปนเปื้อนของโลหะหนักในสภาพแวดล้อมเป็นที่สนใจในปัจจุบันเป็นอย่างยิ่ง เพราะพิษของโลหะหนักมีผลต่อพืชและสัตว์ และเมื่อมีการตรวจสอบปริมาณโลหะหนักในลำน้ำต่าง ๆ พบว่าเพิ่มขึ้นและมีการสะสมในตะกอน ดังนั้นจึงมีการออกกฎหมายเพื่อควบคุมการปล่อยน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอุตสาหกรรมที่มีการใช้โลหะหนักในกระบวนการผลิตอย่างเข้มข้น ส่งผลให้มีการศึกษาวิจัยกระบวนการกำจัดโลหะหนักในน้ำเสียให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น กระบวนการหนึ่งที่นิยมศึกษา คือ กระบวนการดูดซับโมเลกุลโลหะหนักไว้ที่ผิวของวัสดุหรือสิ่งมีชีวิต เรียกว่า กระบวนการ adsorption หากมีการนำโลหะหนักเข้าไปในเซลล์สิ่งมีชีวิต

เรียกว่า กระบวนการ absorption ซึ่งเป็นเทคโนโลยีอย่างหนึ่งที่อยู่ในความสนใจของนักวิจัยตลอดช่วงหลายสิบปีที่ผ่านมา การดูดซับอาจใช้รา แบคทีเรีย หรือสาหร่ายเป็นตัวดูดซับ (biosorbent) ได้ โดยอาศัยหลักการที่ว่าใช้มวลของตัวดูดซับจับกับไอออนโลหะหนักในสารละลายด้วยกระบวนการทางฟิสิกส์เคมี (physicochemical mechanisms) ประจุของ biopolymers บนผิวเซลล์ เช่น carboxylate และ hydroxyl เป็นต้น จะทำหน้าที่จับกับไอออนโลหะ ทำให้โลหะในสารละลายลดลง ปัจจุบันมีการศึกษาถึงชนิดของรา แบคทีเรีย และสาหร่ายที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงในการดูดซับ เพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายๆ ประเภท

### การใช้สาหร่ายเป็นตัวดูดซับ

สาหร่ายจัดเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก มีบทบาทสำคัญเป็นผู้ผลิตในห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศน้ำ เนื่องจากเป็นอาหารสำคัญของแพลงก์ตอนสัตว์และสัตว์น้ำวัยอ่อน สาหร่ายจะใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนในการสังเคราะห์แสง และดูดซับแร่ธาตุต่าง ๆ จากแหล่งน้ำ เช่น ไนเตรต และฟอสเฟต เพื่อการเติบโต ผิวเซลล์ของสาหร่ายบางชนิด ประกอบด้วยสาร โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) โปรตีน และไขมัน ซึ่งเป็นบริเวณที่โลหะหนักสามารถถูกจับไว้ได้ อีกทั้งผิวเซลล์มีกลุ่มของอะมิโน (amino) คาร์บอกซิลิก (carboxylic) ฟอสเฟต (phosphate) และไทออล (thiol) สามารถรวมกับโลหะหนักได้ (Tein 2002) แต่อย่างไรก็ตามถ้าหากมีปริมาณโลหะหนักมากในแหล่งน้ำเกินกว่าที่กระบวนการภายในเซลล์ หรือโครงสร้างของสาหร่ายจะป้องกันได้ สาหร่ายจะบวม หรือฉีกขาด ซึ่งจะส่งผลต่อการเติบโต ทำให้การเติบโตลดลงจนถึงหายไปจากแหล่งน้ำได้ (Rangsayatom *et al.* 2002) ข้อดีของการใช้สาหร่ายเป็นตัวดูดซับอย่างหนึ่ง คือ เซลล์สาหร่ายมีขนาดเล็ก พบได้ในแหล่งน้ำทุกประเภท มีการเติบโตรวดเร็ว ทำให้เซลล์มีความสามารถในการดูดซับธาตุต่าง ๆ ได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ บางชนิดมีความสามารถในการดูดซับโลหะหนักได้มาก และค่าใช้จ่ายในการใช้สาหร่ายขนาดเล็กดูดซับโลหะหนักมีราคาที่ถูกกว่า เมื่อเทียบกับระบบบำบัดโดยวิธีทางเคมี (สุวีรัตน์ เรื่องสมบูรณ์ 2547; Leusch *et al.* 1995)

สาหร่ายหลายชนิดสามารถใช้ดูดซับโลหะหนักได้ เช่น การศึกษาของ Inthorn *et al.* (2002) ใช้สาหร่ายสีเขียวลดปริมาณแคดเมียม พบว่า *Chlorococcum* sp., T5 เป็นชนิดที่ลดได้ดีที่สุด รองลงไปคือ *Fischerella* sp., *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* และ *Scenedesmus acutus* ตามลำดับ สำหรับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ลดแคดเมียมได้ดีที่สุด คือ *Lyngbya herionymusii* รองลงมาคือ *Gloeocapsa* sp., *Phormidium molle*, *Oscillatoria jatorvensis* และ *Nostoc* sp. ตามลำดับ สุวีรัตน์ เรื่องสมบูรณ์ และคณะ (2548) ศึกษา *Gloeocapsa* sp. ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินน้ำจืด พบว่า

ลักษณะภายนอกของเซลล์สาหร่ายนี้เคลือบด้วย capsular polysaccharide และเมื่อแยกเมือกออกจากสาหร่าย *Gloeocapsa* sp. พบว่าเซลล์ที่ไม่มีเมือกหุ้มดูดซับตะกั่วได้เพียง 16.28 % ส่วนเซลล์ที่มีเมือกหุ้มดูดซับได้มากที่สุดถึง 92.06 % และปริมาณของ capsular polysaccharide ที่ผลิตโดยสาหร่ายนั้นมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย การดูดซับแคดเมียมของเซลล์สาหร่ายนั้นนอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดและลักษณะทางสรีระวิทยาของสาหร่ายแล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม พบว่า ความเป็นกรด-เบสมีผลต่อการดูดซับแคดเมียมของ *Spirulina (Arthrospira) platensis* โดยพบว่าค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7 เหมาะสมต่อการดูดซับแคดเมียม และพบว่าอุณหภูมิไม่มีผลต่อการดูดซับ (Rangsayatorn *et al.* 2002)

การใช้สาหร่ายในการดูดซับแคดเมียมในกระบวนการบำบัดน้ำเสียที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรม จะถูกใช้ภายหลังจากที่โรงงานมีการบำบัดน้ำเสียให้มีปริมาณแคดเมียมลดน้อยลงด้วยกระบวนการทางเคมีและฟิสิกส์แล้ว แต่ยังมีค่าเกินมาตรฐานที่กระทรวงอุตสาหกรรมกำหนด การบำบัดแคดเมียมปริมาณน้อยเหล่านี้ด้วยกระบวนการทางเคมีและฟิสิกส์ในขั้นตอนนี้ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงมาก ดังนั้นการนำสาหร่ายมาใช้บำบัดแคดเมียมปริมาณน้อยจึงเป็นทางเลือกอีกวิธีหนึ่งที่ทำให้ลดค่าใช้จ่ายลง ซึ่งช่วยลดต้นทุนการผลิตของโรงงาน และช่วยลดการปนเปื้อนของแคดเมียมผ่านทางห่วงโซ่อาหารสู่ประชาชน

ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะทำการศึกษา ผลของแคดเมียมต่อการเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Kirchneriella lunaris* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และการดูดซับแคดเมียม เพราะเป็นสาหร่ายที่มีเมือกหุ้มภายนอกเซลล์น่าจะมีการดูดซับได้มากกว่าสาหร่ายที่ไม่มีเมือกและยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน *K. lunaris* เป็นสาหร่ายน้ำจืดที่พบได้ทั่วไป จึงมีโอกาสดังกล่าวจะมีการดูดซับโลหะหนักจากแหล่งน้ำผิวดินเมื่อสาหร่ายดูดซับแคดเมียมเข้าสู่เซลล์ จะมีการถ่ายทอดแคดเมียมไปตามลำดับขั้นของห่วงโซ่ ปริมาณแคดเมียมจะมากขึ้นตามลำดับขั้นของห่วงโซ่อาหาร โดยเกิดจากการสะสมสารพิษและการขยายปริมาณพิษมากขึ้นในห่วงโซ่อาหาร (Bioaccumulation and biomagnification) (Campanella *et al.* 2001) และในที่สุดจะส่งผลกระทบต่อมนุษย์ อีกทั้งข้อมูลทางชีววิทยาของสาหร่ายชนิดนี้ยังมีน้อย ดังนั้นการศึกษาข้อมูลเบื้องต้น เช่น ค่าความเข้มข้นของแคดเมียมที่จะทำให้ *K. lunaris* มีการเติบโตลดลง 50 % ในเวลา 72 ชั่วโมง ( $72 \text{ h-EC}_{50}$ ) ทำให้ทราบความไวในการตอบสนองต่อพิษของแคดเมียม ยิ่งสาหร่ายทนต่อพิษของแคดเมียมได้มาก ยิ่งเหมาะต่อการนำไปใช้ดูดซับแคดเมียม นอกจากนี้การศึกษาศามารถในการดูดซับแคดเมียมและปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซับ เช่น ระยะเวลาในการดูดซับสูงสุด ค่าความเป็นกรด-เบส จำนวนเซลล์เริ่มต้น และปริมาณแคดเมียมเริ่มต้น ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้สาหร่ายในการลดปริมาณแคดเมียมใน

แหล่งน้ำ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของแคคเมียมอย่างยั่งยืนต่อไป อีกทั้งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านชีววิทยาของสาหร่าย *K. lunaris*

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาลักษณะโครงสร้างภายนอกของ *K. lunaris*
2. ศึกษาอัตราการเติบโตของ *K. lunaris*
3. ศึกษาความเข้มข้นของแคคเมียมที่ทำให้ *K. lunaris* มีการเติบโตลดลง 50 % ในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง
4. ศึกษาระยะเวลาการดูดซับและเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคคเมียมสูงสุด
5. ศึกษาผลของระดับความเป็นกรด-เบสต่อการดูดซับแคคเมียม
6. ศึกษาผลของจำนวนเซลล์ต่อการดูดซับแคคเมียม
7. ศึกษาค่าความสามารถในการดูดซับแคคเมียม (adsorption capacity) หรือค่าการดูดซับ

### ขอบเขตการวิจัย

1. เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ
2. ใช้สาหร่ายสีเขียว *K. lunaris* ระยะ early log phase เป็นตัวแทนในการศึกษาการดูดซับโลหะหนัก
3. ใช้สูตรอาหาร Modified Complete Medium (MCM) ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายและเป็นการเลี้ยงแบบ batch culture
4. ความเข้มแสง 1300 ลักซ์ จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมงและมีมืด 12 ชั่วโมง
5. อุณหภูมิห้อง  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ตลอดเวลา

### สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการแพลงก์ตอน ภาควิชาชีววิทยา และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์

### วิธีการศึกษา มีลำดับขั้นตอนดำเนินการศึกษาดังนี้

1. ค้นหาข้อมูลเกี่ยวกับโลหะหนักและชีววิทยาของ *K. lunaris*
2. ศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับการวิเคราะห์โลหะหนักจากเซลล์สาหร่ายและตัวอย่างน้ำ
3. เตรียมอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
4. แยก *K. lunaris* จากแหล่งน้ำในมหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ โดยวิธี streak plating เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และศึกษาการอัตราการเติบโตของ *K. lunaris*
5. ศึกษาลักษณะ โครงสร้างภายนอกของ *K. lunaris*
6. ศึกษาความเข้มข้นของแคดเมียมที่ทำให้ *K. lunaris* มีการเติบโตลดลง 50 % ในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง
7. ศึกษาระยะเวลาการดูดซับและเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียมสูงสุดของ *K. lunaris*
8. ศึกษาผลของระดับความเป็นกรด-เบส ต่อการดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris*
9. ศึกษาผลของจำนวนเซลล์ต่อการดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris*
10. ศึกษาค่าความสามารถในการดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris*
11. รวบรวมข้อมูลและเขียนรายงาน

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบลักษณะ โครงสร้างภายนอกของ *K. lunaris*
2. ทราบอัตราการเติบโตของ *K. lunaris*
3. ทราบความเข้มข้นของแคดเมียมที่ทำให้ *K. lunaris* มีการเติบโตลดลง 50 % ในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง
4. ทราบระยะเวลาการดูดซับและเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียมสูงสุด
5. ทราบผลของระดับความเป็นกรด-เบสต่อการดูดซับแคดเมียม
6. ทราบผลของจำนวนเซลล์ต่อการดูดซับแคดเมียม
7. ทราบค่าความสามารถในการดูดซับแคดเมียม

นอกจากนี้ยังจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาด้านชีววิทยาและสิ่งแวดล้อม อันจะนำไปสู่การบริหารจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมให้เหมาะสม และเป็นการพัฒนาคุณภาพชีวิตให้ดียิ่งขึ้น

**เวลาที่ใช้ในการวิจัย**

เดือนตุลาคม 2549 ถึง ตุลาคม 2550

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. แคลเซียม

แคลเซียมเป็นโลหะหนักชนิดหนึ่งที่พบน้อยในธรรมชาติ เมื่อกล่าวถึงโลหะหนักจะหมายถึง ธาตุที่มีเลขอะตอมในช่วง 23 - 92 อยู่ในคาบ 5 - 7 ในตารางธาตุ แร่ธาตุมีประจุบวก มีความหนาแน่นเกินกว่า 5 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร มีสมบัติเป็นของแข็ง ยกเว้นปรอทเป็นของเหลวที่อุณหภูมิปกติ นำไฟฟ้าได้ทั้งสถานะของแข็งหรือเมื่อหลอมเหลว มีลักษณะเป็นเงามันวาว เป็นตัวนำความร้อนที่ดี เหนียว และสามารถดัดงอได้โดยไม่แตกหัก มีจุดแข็งและจุดหลอมละลายแน่นอน โลหะหนักมีทั้งหมด 68 ธาตุ เช่น ตะกั่ว ปรอท สังกะสี ทองแดง นิกเกิล โครเมียม เหล็ก แมงกานีส โคบอลต์ สารหนู เป็นต้น โลหะหนักที่มีบทบาทต่อสิ่งแวดล้อมมากที่สุด คือ ปรอท ตะกั่ว สารหนู ในสถานะปกติโลหะหนักเมื่ออยู่ในรูปของธาตุบริสุทธิ์มีความเป็นพิษเล็กน้อย สามารถที่จะรวมตัวกันเป็นสารประกอบอื่น ๆ กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนได้หลายรูปที่เสถียรกว่าโลหะอิสระ และจะเป็นอันตรายมาก เมื่อแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมโดยปนเปื้อนในดิน น้ำ อากาศ และพืช หากมนุษย์ได้รับแม้เพียงปริมาณเล็กน้อยอาจทำให้เป็นอันตรายได้ มนุษย์ได้รับโลหะหนักโดยตรง เช่น การบริโภค หรือโดยการสัมผัส หรือได้รับโดยทางอ้อม โลหะหนักมักพบปนเปื้อนอยู่ในตะกอนมากกว่าในน้ำ เพราะตะกอนมีประจุเป็นลบเป็นส่วนใหญ่ ส่วนโลหะหนักมีประจุเป็นบวกจึงมีความสามารถเกาะยึดกันได้ดีกว่าในน้ำ

โลหะหนักเป็นองค์ประกอบอย่างหนึ่งในน้ำเสีย พบว่าการปนเปื้อนของโลหะหนักนั้นสามารถก่อให้เกิดอันตรายจากความเป็นพิษของโลหะหนักต่อสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ อาจทำให้ถึงตายได้ แม้เพียงได้รับในปริมาณน้อย นอกจากนี้ยังสามารถสะสมอยู่ในลำดับห่วงโซ่อาหาร และในร่างกายมนุษย์ได้

### 1.1 คุณสมบัติของแคดเมียม

เป็นโลหะหนักอยู่ในหมู่ II B ของตารางธาตุ เลขอะตอม 48 น้ำหนักอะตอม 112.4 มีวาเลนซ์ 2 จุดหลอมเหลว 320.7 องศาเซลเซียส จุดเดือด 767 องศาเซลเซียส ความหนาแน่น 8.6 กรัม/มิลลิเมตร ที่ 20 องศาเซลเซียส ความดันไอ 1 มิลลิเมตรของปรอท ที่ 394 องศาเซลเซียส มีสถานะเป็นของแข็ง มีสีเงิน ถ้าเป็นผงจะเป็นสีเทา สามารถระเหิดเป็นไอด้วยความร้อนได้ง่าย ค้นพบโดย Friedrich Strohmeyer ชาวเยอรมันในปี ค.ศ. 1817 เป็นธาตุที่มีอยู่น้อยในธรรมชาติ และค่อนข้างหาได้ยาก ส่วนที่พบเป็นปริมาณมากมักเกิดปนอยู่กับแร่สังกะสี ตะกั่ว ทองแดงและคีนุก ในธรรมชาติมักจะรวมตัวกับกำมะถันเป็นแคดเมียมซัลไฟด์ซึ่งมีสีเหลือง อยู่ในแร่ grunockite และมักปนอยู่กับแร่สังกะสีซัลไฟด์ และสำหรับในโรงงานถลุงสังกะสีพบว่าจะได้แคดเมียมเป็นผลพลอยได้ เนื่องจากมีปะปนอยู่ในแร่ที่นำมาถลุง โดยแยกแคดเมียมออกไซด์ที่ปะปนอยู่กับ  $ZnCO_3$  โดยทำให้ตกตะกอนด้วย  $H_2S$  และรีดิวซ์ต่อไปเป็นโลหะอิสระ Strohmeyer เรียกโลหะนี้ว่า "cadmia" จากคำ calamine ซึ่งเรียกซิงค์คาร์บอเนตในสมัยนั้น

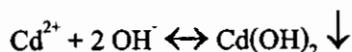
แคดเมียมสามารถทำปฏิกิริยารุนแรงกับกรด และให้ก๊าซไฮโดรเจน และสามารถทำปฏิกิริยารุนแรงกับสารออกซิไดซ์อย่างแรง เนื่องจากเป็นสารที่ไวไฟอาจก่อให้เกิดอัคคีภัยและการระเบิดได้ถ้าอัตราส่วนระหว่างฝุ่นของแคดเมียมและอากาศเหมาะสม หากเกิดการระเบิดควรใช้ผงดับเพลิง ทราซแห้ง อย่าใช้สารดับเพลิงประเภทอื่น เนื่องจากทำปฏิกิริยารุนแรงกับสารดับเพลิง เช่น น้ำ โฟม คาร์บอนไดออกไซด์ และฮาโลน หากนำมาใช้ควรระวังการสะสมของสารตกค้าง หากมีการรั่วไหลเก็บส่วนที่หกไว้ไหลในภาชนะบรรจุที่ปิดมิดชิดเพื่อนำไปกำจัด และล้างบริเวณสารหกไว้ไหลเพื่อความปลอดภัย

### 1.2 รูปของแคดเมียม

แหล่งน้ำธรรมชาติอาจพบอยู่ในรูปต่าง ๆ เช่นในรูปของไอออน สารประกอบของโลหะ - อนินทรีย์ หรือโลหะ - อินทรีย์ แต่ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ divalent cadmium ion ปัจจัยสำคัญที่ทำให้อยู่ในรูปดังกล่าว คือ ความเป็นกรด-เบส และปริมาณสารอินทรีย์ เนื่องจากไอออนของแคดเมียมจะรวมตัวเป็นสารประกอบกับสารหรือไอออนอื่น ๆ ที่อยู่ในน้ำตามลำดับก่อนหลังในแง่ของการจับตัว คือ  $humic\ acid > CO_3^{2-} > OH^- \geq Cl^- \geq SO_4^{2-}$

ในการเปลี่ยนรูปโดยปฏิกิริยาของน้ำ จะรวมตัวเป็นสารประกอบ hydroxyl group ( $OH^-$ ) เช่น  $CdOH^+$ ,  $Cd(OH)_2(aq)$ ,  $Cd(OH)^+$  และ  $Cd(OH)_2^+$  ที่ละลายน้ำเกือบหมด จะอยู่ในรูปของ

ไอออนบวกที่มีวาเลนซ์ 2 (divalent cation) แต่เมื่อน้ำมีความเป็นกรด-เบสสูงขึ้น (ความเป็นกรด-เบสมากกว่า 9) จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่เป็นของแข็งไม่ละลายน้ำ คือ  $\text{Cd}(\text{OH})_2$  ดังปฏิกิริยา



แคดเมียมติดอยู่กับผิวของเกลือแร่หรือ hydrous metal oxides หรือสารอินทรีย์ต่าง ๆ ด้วยกระบวนการ sorption ซึ่งเป็นการกำจัดแคดเมียมออกจากน้ำได้มากกว่าการทำให้ตกตะกอน (precipitation) กระบวนการ sorption จึงเป็นกระบวนการที่สำคัญในการลดปริมาณแคดเมียมในแหล่งน้ำ โดยการเคลื่อนย้ายไปสะสมอยู่ในตะกอน และการเกิด desorption เป็นการปลดปล่อยแคดเมียมให้กระจายออกมาในชั้นน้ำ เมื่อความเค็มของน้ำเพิ่มขึ้น

### 1.3 ประโยชน์ของแคดเมียมทางด้านอุตสาหกรรม

เป็นโลหะนำมาใช้ทำหลอดไฟ หัวเจาะ หัวไม้ ใช้แทนอะลูมิเนียม เหล็ก สแตนเลส และสังกะสีในการฉาบอุปกรณ์ที่เป็นโลหะต่าง ๆ ในอุตสาหกรรมใช้เป็นตัวต่อต้านแรงเสียด (anti-friction agent) เป็นสีกันสนิมหลังคาและอัลลอย ใช้เป็นตัวนำไฟฟ้า (semiconductors) ควบคุมแท่นการเกิดปฏิกิริยานิวเคลียร์ การชุบด้วยไฟฟ้า โรงงาน PVC และแบตเตอรี่อัลคาไลน์ร่วมกับนิกเกิลผลิตแก๊วดี ปู๊ย แบตเตอรี่ เชื่อมโลหะ ใช้ผสมกับซีลีเนียมในการผลิตสี ทำเม็ดสี พลาสติก ยาง หมึกพิมพ์ ในกิจการน้ำมันใช้ในรูปไดเอทิล (diethyl cadmium) ในขบวนการผลิต tetraethyl lead ซึ่งเป็นตัวป้องกันการชกกระตุก (antiknock) ในเครื่องยนต์ และใช้ผสมในสารฆ่าเชื้อรา

### 1.4 ความสัมพันธ์ระหว่างแคดเมียมกับมนุษย์

#### 1.4.1 การได้รับเข้าสู่ร่างกาย

การปนเปื้อนของแคดเมียมในสิ่งแวดล้อมทำให้มนุษย์ได้รับเข้าไปในร่างกาย 2 ทาง คือ ทางปาก โดยการกินอาหารที่มีการปนเปื้อน เช่น ข้าว หรืออาหารทะเล เป็นต้น การปนเปื้อนอีกทางหนึ่ง คือ ทางจมูก โดยการหายใจเอาควัน หรือฝุ่นเข้าไป เช่น จากการทำงานในเหมืองสังกะสี มีข้อกำหนดให้บรรยากาศในเมืองมีปริมาณฝุ่นของแคดเมียมหรือควันของแคดเมียมออกไซด์ ต้องไม่เกิน 0.05 มิลลิกรัม/ลูกบาศก์เมตร และจากการสูบบุหรี่ ผู้สูบบุหรี่ได้รับจากใบยาสูบในบุหรี่ ทำให้ร่างกายมีปริมาณ (body burden) สูงเป็น 2 เท่า ของผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ ปกติในอาหารจะมีการปนเปื้อนของแคดเมียมอยู่ในปริมาณต่ำ เมื่อมีการดูดซึมเข้าไปจะทำให้มีผลต่อ

โปรตีนน้ำหนักรโมเลกุลต่ำ คือ metallothionein และสะสมในไต ตับ และอวัยวะสืบพันธุ์ ปริมาณการสะสมในร่างกายเพิ่มขึ้นตามอายุ มีการประมาณการว่าคนทั่วไปที่มีอายุ 50 ปี มีแคดเมียมสะสมในร่างกาย 10 มิลลิกรัม ถึง 50-60 มิลลิกรัม ขึ้นอยู่กับว่าคน ๆ นั้นอยู่ในพื้นที่ที่มีความเสี่ยงมากหรือน้อย การดูดซึมจะเพิ่มขึ้นถ้าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้รับแคลเซียมต่ำ ๆ ในอาหาร

#### 1.4.2 การดูดซึมและการแพร่กระจายของแคดเมียมเข้าสู่ร่างกาย

เมื่ออยู่ในรูปของฝุ่นจะเข้าสู่ร่างกายผ่านทางระบบทางเดินหายใจ ปริมาณของแคดเมียมในระบบทางเดินหายใจจะขึ้นกับขนาดและคุณสมบัติในการละลายน้ำ เกือบของแคดเมียมที่มีขนาดเล็กจะสามารถเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจตอนล่างได้ แต่ปริมาณที่สะสมของแต่ละชนิดจะไม่เท่ากันและประมาณปริมาณได้ยาก เช่น พวกคลอไรด์ซึ่งละลายน้ำได้ดีจะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้อย่างรวดเร็ว ส่วนพวกออกไซด์ซึ่งไม่ละลายน้ำจะถูกจับโดย aveolar macrophage หรือ mucociliary escalator ในระบบทางเดินหายใจ และถูกกลืนเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารเป็นต้น

เมื่อเข้าสู่ร่างกายทางระบบทางเดินอาหาร พบว่าถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้น้อยมากคือ ประมาณ 0.5- 1.2 % เท่านั้น แต่การดูดซึมนี้อาจเปลี่ยนแปลงได้จากสารอื่น ๆ ที่ร่างกายรับเข้าไปพร้อม ๆ กัน เช่น แคลเซียม เหล็ก และโปรตีน โดยเฉพาะแคลเซียมซึ่งถูกดูดซึมได้ดีในลำไส้เล็กโดยอาศัยโปรตีนชื่อ calcium binding protein หรือ CaBP การดูดซึมแคดเมียมอาศัย CaBP ด้วยเช่นกัน ดังนั้นจึงมีการแข่งขันกัน เมื่อร่างกายขาดแคลเซียมจะมีการกระตุ้นให้ CaBP ถูกสังเคราะห์ขึ้นภายใต้การควบคุมของโปรตีน ชื่อ metallothionein ดังนั้นถ้าร่างกายรับเอาแคลเซียมเข้าไปพร้อม ๆ กับแคดเมียม สารทั้งสองจะแย่งจับกับ CaBP เพื่อให้ถูกดูดซึม เมื่อแคลเซียมถูกดูดซึมน้อยกว่าที่ควร ร่างกายจะกระตุ้นให้มีการสร้าง CaBP เพิ่มขึ้นอีกพร้อมกับจะกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีน metallothionein ด้วย และด้วยเหตุนี้แคดเมียมจะถูกดูดซึมมากขึ้นและไปสะสมที่กระดูก ในขณะที่แคลเซียมถูกดูดซึมไม่มากเท่าที่ควรและไปสะสมที่กระดูกน้อยลง อาการกระดูกโคงและแตกร้าวจึงเกิดขึ้น

แคดเมียมที่ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายจะไปสะสมในตับและไตเป็นส่วนใหญ่ ในไตจะพบสะสมอยู่ที่คอร์เทก (cortex) มากกว่าในแมดูลลา (medulla) สำหรับระยะเวลาที่อยู่ในร่างกายจะขึ้นอยู่กับว่าเกาะกับโปรตีน metallothionein ได้เพียงใด โดยปกติโปรตีนชนิดนี้ประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ 2 ตัวซึ่งแตกต่างกันที่องค์ประกอบของกรดอะมิโน โปรตีนทั้งสองนี้จะมีกลุ่มซัลไฟด์ไรล (sulfhydryl group) ดังนั้นจึงเกาะกับโลหะได้ดี หน้าที่ของโปรตีนพวกนี้คือขนส่งโลหะไปที่อวัยวะต่าง ๆ ดังนั้น หากเกาะกับโปรตีนได้ดีก็จะสะสมในร่างกายได้นาน

### 1.4.3 การกำจัดออกจากร่างกาย

ในมนุษย์นั้นแคดเมียมจะถูกขับออกทางปัสสาวะ ส่วนในสัตว์จะถูกขับออกทางอุจจาระมากกว่า การศึกษาปริมาณที่ขับออกทางปัสสาวะจะช่วยให้สามารถประมาณปริมาณที่ร่างกายได้รับเข้าไปได้ แต่มีข้อสังเกตว่าถ้าร่างกายได้รับเข้าไปในปริมาณต่ำ ๆ การขับจะไม่ใช่สัดส่วนโดยตรงกับปริมาณที่ร่างกายได้รับ ทั้งนี้เพราะอวัยวะต่าง ๆ สามารถสะสมไว้และอาจรับต่อเข้าไปอีกเป็นจำนวนมาก เนื่องจากร่างกายยังสามารถสร้างโปรตีน metallothionein ได้อีก แต่ถ้าเมื่อใดที่ถึงจุดที่ร่างกายสามารถสะสมไว้ได้ และปริมาณ metallothionein ก็ได้เพิ่มจนถึงจุดสูงสุดแล้ว จะพบว่าปริมาณที่ขับออกมาจะเกือบเท่ากับปริมาณที่ร่างกายรับเข้าไป ถ้าหากพบว่าที่ขับออกกลับมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อนั้นแสดงว่าได้ทำลายไตจนไตไม่สามารถเก็บหรือกรองได้อีกต่อไปแล้ว

### 1.4.4 ความเป็นพิษของต่อมนุษย์

แคดเมียมทำให้เกิดโรคอิไตอิไต ซึ่งเป็นโรคที่พบบริเวณฝั่งแม่น้ำจินคชู ในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งทำให้สายตาคิดปกติ ปวดกระดูกตามท้อง ซึ่งโครงและสันหลัง มีฤทธิ์ทำลายไตและระบบทางเดินหายใจ ทั้งยังมีผลต่อการสะสมแคดเมียมในร่างกายด้วย หากได้รับเข้าไปปริมาณมากกว่า 300 มิลลิกรัม อาจทำให้ตายได้ แต่ปริมาณต่ำสุด 10 มิลลิกรัมจะทำให้มีอาการพิษแสดงให้เห็นอย่างชัดเจน ส่วนเด็กที่เพิ่งเกิดใหม่มีในร่างกายได้เพียง 1 มิลลิกรัม แม้ว่าได้รับปริมาณน้อยมาก ๆ จะมีอาการอาเจียน อุจจาระร่วง และถ้าได้อักเสบ (colitis) หากสัมผัสถูกผิวหนังจะก่อให้เกิดการระคายเคือง มีผื่นแดงที่ผิวหนัง

เมื่อได้รับเข้าทางการหายใจในปริมาณมาก พบว่าในเวลา 2-3 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการปอดบวม น้ำ เจ็บหน้าอก คลื่นไส้ และท้องเดิน ถ้าได้รับเข้าไปเป็นเวลานาน ๆ ติดต่อกันประสิทธิภาพในการระบายลมของปอดจะลดลง ทำให้อากาศอยู่ภายในปอดนานกว่าปกติ และทำให้เกิดอาการหายใจไม่ออก อาการชนิดนี้จะเป็นแบบถาวรและมีผลกระทบรุนแรงกว่าได้รับแบบเฉียบพลันทีละมาก ๆ ในสัตว์ทดลองจะพบว่าทำให้เกิดโรคถุงลมโป่งพองและมีพังผืดในปอด การที่เป็นเช่นนี้อธิบายว่าเป็นตัวไปขัดขวางการสร้างสารแอนติทริปซิน (antitrypsin) ซึ่งเป็นตัวควบคุมสารทริปซิน (trypsin) ในร่างกายคน สารทริปซินนี้เป็นตัวการทำให้เกิดโรคถุงลมโป่งพองได้

กรณีที่ผู้ป่วยได้รับทางปากจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดิน เป็นตะคริวที่ท้อง และอาจตายภายใน 24 ชั่วโมง ถ้าเสียน้ำมาก แต่ถ้าปริมาณที่รับเข้าไปไม่มากจนทำให้เสียชีวิต

อาการจะปรากฏที่ไต ดับและหัวใจ พืชต่อไคจะปรากฏโดยผู้ป่วยมีอาการของโปรตีนรั่วปะปนในยูเรีย (proteinuria) คือมีการขับโปรตีนออกมาในปัสสาวะมากกว่าปกติ ขนาดของโปรตีนที่ถูกขับออกมาจะเป็นตัวบอกให้รู้ว่าไตส่วนใดถูกทำลายเช่นกัน ถ้าโปรตีนขนาดใหญ่ถูกขับออกมาแสดงว่าโกลเมอรูลัส (glomerulus) ถูกทำลาย แต่ถ้าเป็นโปรตีนขนาดเล็กแสดงว่าส่วนของทูปลู (tubules) ถูกทำลาย นอกจากโปรตีนแล้วยังอาจมีสารอื่น ๆ ถูกขับออกมาผิดปกติด้วย เช่น กรดอะมิโน (เกิดอาการ aminoaciduria) แคลเซียม (เกิดอาการ hypercalciumuria) และกลูโคส (เกิดอาการ glucosuria) เป็นต้น

นอกจากพืชของแคดเมียมที่มีต่อปอดและไตแล้ว ยังมีพืชต่อกระดูก ทำให้เกิดอาการกระดูกโองง แดกร้าว เนื่องจากร่างกายดูดซึมแคลเซียมได้น้อยลงนั่นเอง ส่วนอาการอื่น ๆ ได้แก่ ผลที่เกิดกับหลอดเลือด คือ ถ้าร่างกายได้รับแคลเซียมในปริมาณน้อย ๆ จะเกิดการบีบตัวของหลอดเลือด แต่ถ้ารับเข้าไปมาก ๆ กลับทำให้หลอดเลือดบวมได้ (ฝ่ายจัดการสารพิษกองมาตรฐานคุณภาพสิ่งแวดล้อม สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ 2541)

## 2. การสะสมไอออนโลหะของจุลินทรีย์

### 2.1 การสะสมไอออนโลหะของจุลินทรีย์

การสะสมไอออนโลหะของจุลินทรีย์เป็นผลสุทธิของการดูดซับโลหะในอัตราที่มากกว่าการกำจัดออก โครงสร้างของจุลินทรีย์มีความซับซ้อน กลไกการสะสมไอออนโลหะของจุลินทรีย์จึงมีหลายกลไกแตกต่างกัน เช่น ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ดูดซับยูเรเนียมไว้ที่ผิวเซลล์ ส่วนแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ดูดซับไอออนโลหะและสะสมไว้ภายในเซลล์ (Strandberg et al. 1981) สาหร่าย *Chlorella vulgaris* สะสมแคดเมียมไว้ที่ผิวเซลล์และภายในเซลล์ (Khummongkol 1982) ยังมีแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Zoogloea ramigera* ดูดซับไอออนโลหะจากสารละลายโดยการผลิตเมทาโบไลต์แล้วขับออกภายนอกเซลล์ (extracellular metabolite) เพื่อสร้างเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะหนัก ซึ่งจะทำให้ปริมาณโลหะหนักในสารละลายลดลงได้ (Norberg and Engors 1982) พอสรุปการสะสมไอออนโลหะได้ดังนี้

#### 2.1.1 การสะสมที่ผิวเซลล์โดยการผลิตสารออกภายนอกเซลล์ (extracellular products)

การผลิตสารออกภายนอกเซลล์ ได้แก่ การผลิตสารโพลีแซคคาไรด์ เมลานิน และสารประกอบฟีนอล กรดอินทรีย์ และก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งสารดังกล่าวสามารถจับกับ

โลหะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำจึงเป็นการสะสมภายนอกเซลล์ (extracellular accumulation) และเกิดการตกตะกอนอยู่ที่บริเวณผิวเซลล์ (precipitation) ทำให้ลดปริมาณโลหะในสารละลายได้

การสร้างสารโพลีเมอร์ออกภายนอกเซลล์ แบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่ แคปซูล (capsule) และ สารที่มีลักษณะคล้ายเมือก เรียกว่า slime layer ทั้งสองโครงสร้างนี้เรียกว่า glycocalyx หมายถึงสารที่ประกอบด้วยสารโพลีแซคคาไรด์และ/หรือโพลีเปปไทด์ อยู่รอบผิวเซลล์ โดยมีลักษณะเป็นเมือกเหนียว (viscous) การเรียงตัวของสารโพลีแซคคาไรด์และโพลีเปปไทด์ ขึ้นกับสารอาหารและสภาพแวดล้อมในขณะเติบโต แคปซูลมีการเรียงของสารโพลีแซคคาไรด์และโพลีเปปไทด์เป็นระเบียบและมีความซับซ้อนมากกว่า slime layer สารที่ผลิตออกมาภายนอกเซลล์เป็นสารที่มีประจุลบ (anionic properties) ซึ่งเกิดจากหมู่ hydroxyl ของโมเลกุลน้ำตาลและหมู่ amine ของโมเลกุลของกรดอะมิโน โครงสร้างดังกล่าวจึงจับกับโลหะได้ ความสามารถในการจับโลหะของจุลินทรีย์แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับความเป็นกรด-เบสของระบบ ความสามารถจะมีค่าลดลงเมื่อความเป็นกรด-เบสต่ำ และมีค่าสูงเมื่อระบบมีค่าความเป็นกรด-เบสอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเติบโต

สารเมลานินและสารประกอบฟีนอลเป็นสารโพลีเมอร์ที่มีน้ำหนักมาก พบในแบคทีเรียและพืช เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกรดอะมิโน เช่น tyrosine และ peptone เป็นส่วนประกอบ และพบในราในส่วนของเส้นใยและสปอร์ ปริมาณเมลานินที่พบในรามีประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และจะถูกผลิตออกมาหุ้มรอบเซลล์ หรืออยู่ที่ผนังเซลล์ เมลานินสามารถจับกับโลหะได้เพราะประกอบด้วยสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) กรดอะมิโน สารโพลีแซคคาไรด์ และลิพิด ซึ่งสารดังกล่าวมี functional group หลายชนิด ได้แก่ carboxyl, phenolic, hydroxyl, methyl, ketone, phosphate, carbonyl และ amine เป็นต้น

กรดอินทรีย์ ได้แก่ citric acid เป็นกรดที่มีคุณสมบัติจับกับโลหะ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน

ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ จุลินทรีย์ เช่น รา แบคทีเรีย และสาหร่ายสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ออกมาสู่ภายนอกเซลล์ได้ โลหะเช่นแคดเมียม ตะกั่ว เงิน และปรอทจะเกิดการตกตะกอนในรูปแคดเมียมซัลไฟด์ ตะกั่วซัลไฟด์ เงินซัลไฟด์ และปรอทซัลไฟด์ ที่บริเวณรอบ ๆ ผิวเซลล์ และเมื่อนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดจะพบว่าบริเวณผิวเซลล์จะปรากฏลักษณะของ electron-dense granule ขนาดใหญ่ของแคดเมียมซัลไฟด์ ตะกั่วซัลไฟด์ เงินซัลไฟด์ และปรอทซัลไฟด์ (Cunningham and Lundie 1993; Simmons and Singleton 1996)

### 2.1.2 การสะสมที่ผนังเซลล์

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีองค์ประกอบของผนังเซลล์แตกต่างกัน ทำให้ความสามารถในการสะสมโลหะหนักแตกต่างกัน แบคทีเรียแกรมบวกผนังเซลล์หนาประมาณ 40 นาโนเมตร (nm) มี peptidoglycan เป็นส่วนประกอบประมาณ 90 % ขององค์ประกอบทั้งหมดของผนังเซลล์ ซึ่งโครงสร้างหลักประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 2 ชนิด คือ NAG และ NAM โดยมี glutamic acid, teichoic acid และ teichuronic acid เป็นกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการจับโลหะ แบคทีเรียแกรมลบ ผนังเซลล์มีความซับซ้อนมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ปริมาณของ peptidoglycan มีเพียง 10 % องค์ประกอบส่วนใหญ่ประกอบด้วย lipopolysaccharide, lipoprotein, phospholipid และ protein เป็นต้น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีผนังเซลล์คล้ายแบคทีเรียแกรมลบ การสะสมที่ผนังเซลล์เกิดขึ้นได้กับเซลล์ที่มีและไม่มีชีวิต

### 2.1.3 การลำเลียง/นำพาสารเข้าไปภายในเซลล์

กระบวนการนำพาสารเข้าสู่ภายในเซลล์ (solute-transport process) ของจุลินทรีย์ เป็นการทำให้จุลินทรีย์มีการสะสมสาร ทำให้ปริมาณสารในสารละลายลดลง เกิดขึ้นได้กับเซลล์ที่มีชีวิต กระบวนการนำพาสารมีวิธีการหลัก 4 วิธี ดังนี้ (Rose 1976)

2.1.3.1 การนำพาสารแบบ passive (passive transport) เป็นการนำพาสาร โดยไม่ต้องอาศัยพลังงาน สารจะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยอาศัยแรงขับเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากความแตกต่างของค่าความเข้มข้นของสาร หรือความแตกต่างของค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าเคมีของสารถูกละลาย (solute) และการนำพาสารจะสิ้นสุดเมื่อถึงจุดสมดุล

2.1.3.2 การนำพาสารแบบแพร่ facilitated (facilitated diffusion) เป็นการนำพาสารโดยอาศัยตัวพาจำเพาะ (specific carrier transport) ซึ่งเป็น โปรตีน โมเลกุลใหญ่อยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ จะทำหน้าที่จับ โมเลกุลของสารถูกละลาย เพื่อนำสารให้เคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยอาศัยแรงขับเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากความแตกต่างของค่าความเข้มข้นของสารถูกละลายระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ โดยไม่ต้องอาศัยพลังงานจากกระบวนการเมแทบอลิซึมเช่นเดียวกับวิธีแรก ส่วนตัวพาจำเพาะที่นำพาสารจะมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสารเพียงเท่านั้น โดยไม่มีผลต่อสมดุลสุดท้ายที่เกิดขึ้น

2.1.3.3 การนำพาสารแบบ active (active process) เป็นการนำพาสารโดยอาศัยตัวพาจำเพาะเช่นกัน แต่แตกต่างจากวิธีที่สอง คือต้องอาศัยพลังงานมาเกี่ยวข้อง เพื่อใช้เป็นแรงขับเคลื่อน โดยโมเลกุลของสาร ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีระหว่างที่มีการนำพาสารจากข้างหนึ่งของเยื่อหุ้มเซลล์ ไปยังอีกด้านหนึ่ง การเคลื่อนที่ของสารที่ต้องอาศัยแรงขับเคลื่อนจากภายนอกจะมีผลทำให้สารเคลื่อนที่จากบริเวณที่มีความเข้มข้นต่ำไปยังบริเวณที่มีความเข้มข้นสูง การเคลื่อนที่ของสารถูกละลายเนื่องจากแรงขับเคลื่อนจำเป็นต้องมีพลังงานมาควบคุม ซึ่งได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึม

2.1.3.4 การนำพาสารแบบการเคลื่อนย้ายหมู่ (group-translocation) เป็นการนำพาสารที่ต้องอาศัยตัวพาจำเพาะเป็นตัวพาสารเข้าไปในภายในเซลล์จุลินทรีย์เช่นกัน แต่มีความแตกต่างจากวิธี facilitated diffusion และ active process คือ สารถูกสลายจะมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีระหว่างที่เกิดกระบวนการนำพาสาร โดยที่ตัวพาจำเพาะจะทำหน้าที่คล้ายกับเอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) group translocation จะมีสารถูกสลายเป็น substrate

เมื่อโลหะถูกเข้ามาในเซลล์จะถูกเก็บสะสมไว้ในไซโทพลาซึม หรือ ออร์แกเนลล์ ในเซลล์ เช่น ไมโทคอนเดรีย และ/หรือ คลอโรพลาสต์ บางส่วนจะถูกทำให้เสื่อมฤทธิ์โดยจับกับโปรตีนโมเลกุลต่ำ เช่น metallothione

โลหะที่ถูกนำเข้ามาจะนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมในเซลล์ เกี่ยวข้องกับการสร้างคลอโรฟิลล์ การสังเคราะห์แสง การหายใจ การสังเคราะห์โปรตีน และเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ ตัวอย่างเช่น แมงกานีสจำเป็นในปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ในกระบวนการการหายใจ และการสังเคราะห์แสง ทองแดงเกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของไนโตรเจน การสังเคราะห์แสง และเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ เหล็กใช้ในกระบวนการสร้างคลอโรฟิลล์ เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง และหน้าที่การทำงานของเอนไซม์ต่างๆ เป็นโลหะสำคัญในปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นใน thylakoid ของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจน แมกนีเซียมเป็นส่วนประกอบของคลอโรฟิลล์ มีหน้าที่ส่วนหนึ่งในการช่วยให้เอนไซม์ที่มีหน้าที่ผลิตคาร์โบไฮเดรต น้ำตาล และไขมันหลายชนิดทำงานได้อย่างปกติ สังกะสีเป็นองค์ประกอบสำคัญต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์หลายชนิดด้วยกัน การสลายพลังงานจากคาร์โบไฮเดรต และการสังเคราะห์โปรตีน เป็นต้น

นอกจากโลหะที่เป็นประโยชน์แล้ว โลหะบางอย่าง เช่น แคดเมียม สามารถเข้าไปแทนที่สังกะสีในระบบเอนไซม์ carboxypeptidase ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสลายตัวของเพปไทด์ (peptide) เนื่องจากมีโครงสร้างอะตอมคล้ายกัน แคดเมียมยังมีผลต่อการใช้ซัลเฟตและไนเตรตของ *Chlamydomonas reinhardtii* โดยพบว่าแคดเมียมหรือทองแดงจะยับยั้งอัตราการใช้ในเตรต 20 % ขณะที่แคดเมียมจะเพิ่มอัตราการใช้ซัลเฟต 40 % ทำให้มีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย (Mosulén 2003)

การศึกษาส่วนใหญ่คาดว่า การสะสมโลหะเป็นกระบวนการแบบ passive โดยที่โลหะจะถูกดูดซับบนเมือกที่ผิวเซลล์ หรือบนผนังเซลล์ (Crist *et al.* 1981; Les and Walker 1984; Skowronski 1984a; ) จากการศึกษาเกี่ยวกับสมดุลและจลศาสตร์การดูดซับของ Failla *et al.* 1976, Norris and Kelly (1977), Gipps and Cooler (1980), Khummonkol (1982), Mowall and Gadd (1983, 1984), Skowronski (1984a, b), Matheickal *et al.* (1999) และ Aksu (2001) รายงานว่าการสะสมโลหะในระบบ batch ส่วนใหญ่จะประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกจะเกิดการสะสม

โลหะอย่างรวดเร็วภายในเวลาไม่กี่นาที เกิดจากปฏิกิริยาทางฟิสิกส์-เคมี ได้แก่ ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange reaction) หรือ electrostatic ที่ผิวเซลล์เพื่อให้เข้าสู่สมดุลการนำเข้า ขั้นตอนต่อมาเป็นการสะสมที่เกิดขึ้นอย่างช้า ๆ เรียกว่าระยะ stabilization จะเกิดกับการทดลองที่ใช้จุลินทรีย์ที่มีชีวิต พฤติกรรมเช่นนี้เป็นผลมาจากผนังเซลล์มีหมู่ functional groups หลายแบบแตกต่างกันในด้านคุณสมบัติการหลุดออก (dissociability) และ อัตราการดูดซับ (adsorption rate) บ้างเชื่อว่าการสะสมที่เกิดขึ้นช้าเกี่ยวข้องกับการเติบโตของเซลล์ เกิดจากการที่จุลินทรีย์นำโลหะผ่านเซลล์เมมเบรนเข้าไปในเซลล์ เป็นการสะสมที่ต้องใช้พลังงาน เรียกกระบวนการสะสมที่ต้องใช้พลังงานนี้ว่า active (Khummongkol *et al.* 2004) กระบวนการสะสมในขั้นตอนนี้ยังไม่กระจ่างนัก

## 2.2 ปัจจัยที่ผลต่อการสะสมโลหะ (วชิรคณา เจริญศักดิ์สุวรรณค์, 2531)

### 2.2.1 แสง

จุลินทรีย์บางชนิดใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานเพื่อการเติบโต การลดปริมาณแสงจะเป็นการจำกัดพลังงานแก่จุลินทรีย์ Hart and Scaife (1977) พบว่า *Chlorella pyrenoidosa* สามารถสะสมแคดเมียมได้ในปริมาณมากถ้าเลี้ยงในที่ที่มีแสง และไม่สามารถสะสมแคดเมียมได้เลยถ้าเลี้ยงในที่ไม่มีแสง เช่นเดียวกับที่ Hasset *et al.*(1981) พบว่าการสะสมโลหะเกิดขึ้นจากกระบวนการ active ซึ่งต้องการพลังงานในรูปของ ATP จากกระบวนการ Photophosphorylation และ Skowronski (1984a) เลี้ยง *Stichococcus bacillaris* ในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง พบว่าในกรณีที่มีแสง เซลล์จะสะสมแคดเมียมได้มากกว่าในกรณีที่ไม่มีแสงถึง 90 % แสดงว่าการสะสมเกิดจากการใช้พลังงานจากเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์จึงเป็นการสะสมแบบ active ขัดแย้งกับ Nakajima *et al.* (1979c) เลี้ยง *Chlorella regularis* เพื่อดูการสะสมของแมงกานีสในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง พบว่า การสะสมทั้งสองสภาวะไม่แตกต่างกัน แสดงว่าการสะสมไม่ขึ้นต่อแสง การสะสมนี้เกิดจากกระบวนการ passive ซึ่งเกิดจากการดูดซับที่ผิวเซลล์ การสะสมโลหะโดยเซลล์ที่แข็งแรงนั้นพบว่าในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสงอาจไม่มีผลต่อการสะสมโลหะ แต่กรณีที่เลี้ยงในสภาวะที่ไม่เหมาะสม แสงจะมีผลต่อการสะสมโลหะ

### 2.2.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีอิทธิพลต่อเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบชีวเคมี เช่น การเกิด denature ของโปรตีนเนื่องจากความร้อน ทำให้โปรตีนเสียคุณสมบัติไป ซึ่งอาจมีผลทำให้สูญเสียความสามารถในการดูดซับโลหะที่บริเวณดูดซับ ดังนั้นการ

สะสมโลหะที่เกิดจากกระบวนการ active ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ แต่ก็อาจถูกควบคุมโดยการดูดซับที่บริเวณผิวเซลล์ด้วย

อุณหภูมิมีผลต่อการดูดซับโลหะของจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้น เช่น การดูดซับยูเรเนียม โมลิบดีนัม แคลเซียม แมงกานีส โดย *C. regularis* ไม่เปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงตั้งแต่ 0 ถึง 30 องศาเซลเซียส (Horikoshi *et al.* 1979; Nakajima *et al.* 1979c; Sakaguchi *et al.* 1979, 1981) การสะสมสังกะสีของเซลล์ *Candida utilis* ที่มีชีวิต พบว่าอุณหภูมิไม่มีผลต่อการสะสมสังกะสีที่ผิวเซลล์ หรือส่วนประกอบภายนอกเซลล์ แต่จะมีผลต่อการสะสมสังกะสีที่ผ่านเข้าสู่เซลล์แมมเบรน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสะสม คือ อุณหภูมิในช่วงที่เหมาะสมต่อการเติบโต ซึ่งอยู่ในช่วง 25-37 องศาเซลเซียส (Failla *et al.* 1976) ส่วน Gipps and Coller (1980) พบว่าการสะสมแคลเซียมของ *Chlorella pyrenoidosa* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มากกว่าที่ 4 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับการศึกษาของ Skowronski (1986a, b) พบว่าการดูดซับแคลเซียมของ *Stichococcus bacillaris* ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ โดยศึกษาในเซลล์ที่มีชีวิตที่อุณหภูมิ 4, 15, 25 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะเกิดการยับยั้งการลำเลียงแคลเซียมเข้าเซลล์อย่างสมบูรณ์ การสะสมแคลเซียมเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่ถ้าเป็นเซลล์ตาย อุณหภูมิจะไม่มีผลต่อการดูดซับแคลเซียม และในเซลล์ตายระดับความเข้มข้นของแคลเซียมในเซลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น อาจเนื่องจากการจับตัวของแคลเซียมโดยกระบวนการดูดซับทางเคมี (Chemical adsorption) ส่วนการดูดซับยูเรเนียมของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น ในช่วง 20-30 องศาเซลเซียส (Strandberg *et al.* 1981)

### 2.2.3 ความเป็นกรด-เบส

ค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายมีผลต่อการดูดซับโลหะทั้งโดยตรงและโดยอ้อม โดยค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อการดูดซับแตกต่างกันไปตามชนิดของโลหะและชนิดของจุลินทรีย์ การสะสมโลหะชนิดต่าง ๆ จะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะของสิ่งแวดล้อมในการเลี้ยงเซลล์ การดูดซับโลหะชนิดเดียวกันในจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่างกัน (ตารางที่ 1)

ความเป็นกรด-เบสมีผลต่อคุณสมบัติการละลายของโลหะ Failla *et al.* (1976) ศึกษาการสะสมสังกะสีโดย *Candida utilis* ที่ความเป็นกรด-เบส 4.8, 5.6, 6.6 และ 7.3 ตามลำดับ พบว่าการสะสมสังกะสีเกิดที่ความเป็นกรด-เบส 4.8 และ 5.6 แต่ที่ความเป็นกรด-เบส 6.6 สังกะสีจะเกิดเป็นตะกอนที่ไม่ละลายน้ำของสารประกอบพวก carbonate และ hydroxide และที่ความเป็นกรด-เบส 7.3 จะเกิด colloid ทำให้ความเป็นกรด-เบส 6.6 และ 7.3 สะสมสังกะสีได้น้อย เช่นเดียวกับ Sakaguchi *et al.* (1979) ที่ศึกษาของความเป็นกรด-เบส 4, 6, 7 ตามลำดับ พบว่าที่ความ

เป็นกรด-เบส 7.0 จะมีการสะสมแคดเมียมได้ดีที่สุด แต่ที่ความเป็นกรด-เบสสูงกว่านี้แคดเมียมจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนในรูปของ  $\text{Cd}(\text{OH})^+$ ,  $\text{Cd}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Cd}(\text{OH})_3$  และ  $\text{Cd}(\text{OH})_4$  ซึ่งไม่ละลายน้ำ

ตารางที่ 1 ค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมในการดูดซับโลหะแต่ละชนิดของจุลินทรีย์

การดูดซับ	จุลินทรีย์	ความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม	งานวิจัย
ยูเรเนียม	<i>Chlorella regularis</i>	5.0	Sakaguchi <i>et al.</i> 1978
แมงกานีส แคดเมียม และยูเรเนียม	<i>C. regularis</i>	7.0	Nakajima <i>et al.</i> 1979c; Sakaguchi <i>et al.</i> 1979; Horikoshi <i>et al.</i> 1979
แคดเมียม	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	8.0	Gipps and Coller 1980
ยูเรเนียม	<i>Actinomyces levoris</i> , <i>Streptomyces</i> <i>viridochromogenes</i>	6.0	Horikoshi <i>et al.</i> 1981
แคดเมียม	<i>Stichococcus bacillaris</i>	7.0	Skowronski 1986b
แคดเมียม	<i>Tolypothrix tenuis</i>	4-8	Inthorn <i>et al.</i> 1996
เหล็ก ตะกั่ว แคดเมียม	<i>Rhizopus arrhizus</i>	2.5 4.0-4.5 5.0	Özer <i>et al.</i> 1997
โครเมียม แคดเมียม ทองแดง	<i>Pantoea sp.</i>	3.0 6.0 5.0	Ozdemir <i>et al.</i> 2004

นอกจากนี้ความเป็นกรด-เบสยังมีผลต่อโครงสร้างของผิวเซลล์ Nakajima *et al.* (1979c) ศึกษาผลของความเป็นกรด-เบสต่อการดูดซับแมงกานีสโดย *Chlorella regularis* ที่เป็นและตาย ภายในเวลา 1 ชั่วโมง โดยการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบสในสารละลายตั้งต้นในช่วง 3-7 พบว่าที่ความเป็นกรด-เบส 3.0 มีการสะสมแมงกานีสน้อยมากทั้งในเซลล์เป็นและเซลล์ตาย แต่เมื่อ

ความเป็นกรด-เบสสูงขึ้นการสะสมเมกานีสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยที่ความเป็นกรด-เบส 7.0 เซลล์เป็นและเซลล์ตายจะสะสมเมกานีสได้ดีที่สุด แต่เซลล์ตายจะสะสมเมกานีสได้ในปริมาณที่สูงกว่าเซลล์เป็น อาจเนื่องจากโครงสร้างของผิวเซลล์ที่เปลี่ยนไป

Gipps and Coller (1980) รายงานว่าการนำเข้าแคดเมียมของ *Chlorella pyrenoidosa* เกิดขึ้น 2 ระยะ ระยะแรกเกิดขึ้นเร็วใช้เวลา 8 นาที ระยะที่สองเกิดขึ้นช้าใช้เวลา 24 ชั่วโมง การนำเข้าช้าขึ้นอยู่กับความเป็นกรด-เบส โดยจะนำเข้าได้มากกว่าที่ความเป็นกรด-เบส 8 มากกว่าที่ความเป็นกรด-เบส 4 ขณะที่การนำเข้าระยะที่เกิดขึ้นเร็วไม่ขึ้นอยู่กับความเป็นกรด-เบส

Inthorn *et al.* (1996) ได้รายงานว่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อการสะสมแคดเมียมของ *Tolythrix tenuis* คือ 4-8 แต่เมื่อความเป็นกรด-เบสต่ำกว่า 3 พบว่าการสะสมแคดเมียมจะลดลง

Vigneault and Campbell (2005) ได้ศึกษาการนำเข้าแคดเมียมโดย *Pseudokirchneriella subcapitata* พบว่าความเป็นกรด-เบส 5 การนำเข้าแคดเมียมจะมากกว่าที่ความเป็นกรด-เบส 7 ถึง 20 เท่า

บางครั้งความเป็นกรด-เบสก็อาจไม่มีผลต่อการดูดซับของจุลินทรีย์บางชนิดได้เช่นกัน เช่น การดูดซับโมลิบดีนัมโดย *C. regularis* จะไม่เปลี่ยนแปลงตามความเป็นกรด-เบสที่เปลี่ยนแปลงในช่วง 3-9 (Sakaguchi *et al.* 1981)

#### 2.2.4 สารให้พลังงาน

สารให้พลังงานมีความสำคัญต่อการสะสมโลหะของเซลล์ที่มีชีวิต แหล่งพลังงานของ photoautotroph คือ แสง และแหล่งพลังงานของ heterotroph คือ สารอินทรีย์ เช่น น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ซึ่งพลังงานจะถูกใช้ในกระบวนการนำพาแบบ active Failla *et al.* (1976) พบว่าการสะสมสังกะสีของ *Candida utilis* ที่ความเป็นกรด-เบส 6.6 และ 7.3 จะสะสมได้มากขึ้นถ้าในสารละลายมีกลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน

#### 2.2.5 การอยู่ร่วมกับไอออนอื่น ๆ

การอยู่ร่วมกันของโลหะตั้งแต่ 1 ชนิดขึ้นไป จะมีผลต่อการดูดซับของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับชนิดของประจุของโลหะหนักที่เติมลงไป และความเข้มข้นที่แท้จริงของโลหะ การอยู่ร่วมกันของโลหะตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป อาจแสดงผลในทางเสริมฤทธิ์กัน หรือ ขัดแย้งฤทธิ์ความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต Sakaguchi *et al.* (1979) พบว่าไอออนของแมกนีสิียม แคดเมียม โคบอลต์ นิกเกิล และสังกะสี จะช่วยลดความเป็นพิษของแคดเมียมได้ใน *Chlorella regularis* Gipps and Cooler (1982) ศึกษาการสะสมแคดเมียมโดย *Chlorella pyrenoidosa* ในสารละลายที่มีไอออนเหล็ก แคดเมียม แมกนีสิียม และสังกะสี พบว่าไอออนของเหล็กและแคดเมียมสามารถยับยั้งความเป็นพิษ

ของแคดเมียมได้ เนื่องจากที่ความเข้มข้นสูง ไอออนเหล็กจะตกตะกอนร่วมกับแคดเมียมซึ่งจะลดความเป็นพิษของแคดเมียมได้ ส่วนไอออนแคลเซียมมีขนาดครึ่งไอออนใกล้เคียงกับของแคดเมียม จึงเกิดการแย่งจับที่บริเวณคูซัป ทำให้ความเป็นพิษของแคดเมียมลดลง ส่วนแมงกานีสจะช่วยเพิ่มความเป็นพิษของแคดเมียมได้เล็กน้อย ส่วน Devi Prasad and Devi Prasad (1982) ศึกษาผลของแคดเมียม ตะกั่ว และนิกเกิล ใน *Ankistodesmus falcatus*, *Scenedesmus obliquus* และ *Chlorococcum* spp. พบว่าถ้าในสารละลายที่มีแคลเซียมและนิกเกิล หรือแคดเมียมและตะกั่ว ก็จะช่วยลดความเป็นพิษของโลหะแต่ละชนิดได้ โดยจะมีการเติบโตได้มากกว่าเมื่อเลี้ยงในสารละลายที่มีโลหะชนิดใดชนิดหนึ่ง

Franklin *et al.* (2005) รายงานการทดลองใน *Chlorella* sp. พบว่าการอยู่ร่วมกันระหว่างทองแดงและแคดเมียมจะออกฤทธิ์เสริมกัน โดยจะพบทองแดงในเซลล์มากขึ้น อธิบายว่าแคดเมียมกระตุ้นให้มีการนำเข้าทองแดงมากขึ้น ทำให้เป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าอยู่เดี่ยว ๆ ขณะที่การอยู่ร่วมกันระหว่างทองแดงและสังกะสี แคดเมียมและสังกะสี และทองแดง แคดเมียมและสังกะสีมีฤทธิ์ต้านกัน ในอาหารที่มีส่วนผสมของทองแดงและสังกะสีพบว่าทองแดงมีความสามารถในการแข่งขันสูงกว่าสังกะสี ทำให้ความเป็นพิษของสังกะสีลดลง สังกะสีไม่มีผลต่อการนำเข้าทองแดง และอธิบายว่า โลหะทั้งสามชนิดมีการนำเข้า และ binding site บนผิวเซลล์ร่วมกัน และทองแดงมีความสามารถในการแข่งขันจับกับ binding sites สูงกว่าแคดเมียมและสังกะสี

การอยู่ร่วมกันของไอออนอื่น ๆ ในสารละลายจะมีผลต่อการสะสมโลหะชนิดต่าง ๆ ได้เช่นกัน เช่น Norris and Kelly (1977) ศึกษาผลของไอออนสังกะสี นิกเกิล แมกนีเซียม แมงกานีส และแคลเซียมที่มีต่อการสะสมแคดเมียมและโคบอลต์ โดย *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าไอออนของสังกะสี นิกเกิล และแมกนีเซียมจะยับยั้งการสะสมโคบอลต์ ส่วนไอออนของแคลเซียมและแมงกานีส จะยับยั้งการสะสมแคดเมียม อาจเป็นเพราะขนาดของไอออนประจุบวกใดที่มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดไอออนของโคบอลต์และแคดเมียม ก็จะสามารถยับยั้งการสะสมของโคบอลต์ และแคดเมียมได้มากกว่าไอออนตัวอื่น ๆ ส่วน Skowronski (1986a) พบว่าไอออนของแมกนีเซียม แมงกานีส โคบอลต์ และสังกะสี จะทำให้การสะสมแคดเมียมโดย *Stichococcus bacillaris* เกิดขึ้นได้น้อยลง เพราะไอออนที่ประจุบวกทั้งหมดต่างก็จะแข่งขันกับแคดเมียมไปจับที่บริเวณคูซัป ทำให้การสะสมแคดเมียมลดลง แสดงว่าผลของโลหะชนิดหนึ่งมีผลต่อการสะสมของโลหะอีกชนิดหนึ่ง

#### 2.2.6 เซลล์เป็นและเซลล์ตาย

การสะสมโลหะของเซลล์เป็นเกิดจากกระบวนการนำพาแบบ active และ passive ส่วนเซลล์ตายเกิดเนื่องจากการบวนการนำพาแบบ passive เพียงอย่างเดียว Nakajima *et*

*al.* (1979a, b); Horikoshi *et al.* (1979, 1981) พบว่าเซลล์ *Chlorella* ที่ตายด้วยความร้อนสะสม แมงกานีส แคลเซียม ยูเรเนียม และ โมลิบดีนัม ได้มากกว่าเซลล์เป็น เช่นเดียวกับ Skowronski (1984b) รายงานว่า *Stichococcus bacillaris* ที่ตายด้วยความร้อนดูดซับแคลเซียมได้มากกว่าเซลล์เป็น แต่ในบางกรณีเซลล์ตายก็ดูดซับได้น้อยกว่าเซลล์เป็น ดังรายงานของวิลาวัลย์ สินรูประภา (2541) ศึกษาใน *Penicillium* sp. PT1 พบว่าความสามารถในการสะสมสังกะสีของเซลล์เป็นจะสูงกว่าเซลล์ตาย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเซลล์เป็นจะมีการสะสมสังกะสีที่ผิวเซลล์และอีกส่วนหนึ่งอาจถูกนำเข้าภายในเซลล์ซึ่งในรูปของสังกะสีโพลีฟอสเฟต ความแตกต่างในการสะสมโดยเซลล์เป็นและเซลล์ตายเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผิวเซลล์ และอาจมีผลจากวิธีฆ่าเซลล์ ซึ่งกระทำได้หลายวิธี เช่นการใช้ความร้อน สารเคมี และรังสี เป็นต้น ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณผิวเซลล์ของจุลินทรีย์ส่งผลต่อการสะสมโลหะ ข้อได้เปรียบของเซลล์เป็น คือ 1) เซลล์เป็นมีประสิทธิภาพเท่าเซลล์ตายถ้าความเข้มข้นโลหะไม่มากนัก และเซลล์เป็นสามารถเติบโตเพิ่มจำนวน จึงทำให้ลดปริมาณโลหะได้มากขึ้น 2) มีการสร้างมวลชีวภาพเสริมได้อย่างรวดเร็ว ข้อเสีย คือ โลหะมีพิษต่อสิ่งมีชีวิต ดังนั้นเซลล์ตายจึงเหมาะแก่การลดปริมาณโลหะปริมาณสูงในสารละลายได้ดีกว่าเซลล์เป็น (Rakhshae *et al.* 2006) และเซลล์เป็นบางชนิดอาจเป็น pathogen

#### 2.2.7 สารคีเลตติ้ง (Chelating agent)

ความเป็นพิษของโลหะหนักที่มีผลต่อจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโลหะหนักในสารละลายที่มีจุลินทรีย์นั้นอยู่ แต่ความเป็นพิษของโลหะหนักถูกทำให้ลดลงโดยการเติมสารคีเลตติ้ง ซึ่งเป็นได้ทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์

โลหะหนักที่อยู่ในสารละลายหรือในแหล่งน้ำต่าง ๆ จะอยู่ในลักษณะของสารประกอบหลายชนิดด้วยกัน ดังนั้นจึงมีผลต่อการสะสมโลหะโดยจุลินทรีย์ แตกต่างกันไปแล้วแต่ลักษณะโครงสร้างของสารประกอบนั้น ๆ Strandberg *et al.* (1981) รายงานว่า *Saccharomyces cerevisiae* ที่ถูก treat ด้วย EDTA หรือ Nitric acid จะสะสมยูเรเนียมได้น้อยกว่าเซลล์ที่ไม่ถูก treat ทั้งนี้เนื่องจาก EDTA ที่อยู่บริเวณผิวเซลล์จุลินทรีย์จะรวมกับยูเรเนียม เป็นสารประกอบเชิงซ้อน ทำให้การสะสมเกิดขึ้นได้น้อยลง ส่วนการศึกษาของ Horikoshi *et al.* (1979, 1981) และ Sakaguchi *et al.* (1979) รายงานว่ายูเรเนียม และแคลเซียมที่ถูกสะสมโดย *Chlorella regularis*, *Actinomyces levoris* และ *Streptomyces viridochromogenes* จะถูกสกัดออกมาเมื่อเติม EDTA ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Les and Walker (1984) ที่รายงานว่า EDTA เป็นตัวทำให้แคลเซียม ทองแดง และสังกะสี ที่ถูกสะสมโดย *Chroococcus parisi* ถูกสกัดออกมาในสารละลาย

Schowaneck *et al.* (1996) รายงานว่าการเติมสารคีเลติงมาก ๆ ลงในอาหารจะทำให้ปฏิกิริยากับ trace metal ทำให้ความเข้มข้นของโลหะอิสระในอาหารเปลี่ยนแปลงไป มีผลต่อการเติบโตของประชากรสาหร่าย

Koukal *et al.* (2003) ศึกษาอิทธิพลของสารอินทรีย์ต่อความเป็นพิษของแคดเมียมและสังกะสีต่อ *Pseudokirchneriella subcapitata* พบว่าสารอินทรีย์สามารถช่วยลดความเป็นพิษของแคดเมียมและสังกะสีโดยการดูดซับไว้ จึงป้องกันเซลล์จากไอออนอิสระของแคดเมียมและสังกะสีได้

Tönsuaadu (2008) รายงานว่า EDTA เป็นสารประกอบคีเลติงที่ฟอร์มเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complexes) ที่มีประจุลบที่ stable มาก  $[Me(II)EDTA^2]$  กับโลหะประจุบวก 2 ในสารละลาย ทำให้ป้องกันการดูดซับและกระบวนการแลกเปลี่ยนประจุบวกบนผิวของ apatite ได้ ทำให้ปริมาณของการนำโลหะออกจากสารละลายลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อความเข้มข้นของสารคีเลติงเพิ่มขึ้น

#### 2.2.8 ความเข้มข้นเริ่มต้นของ โลหะ

ความเข้มข้นของโลหะเริ่มต้นอาจมีผลต่อความสามารถในการสะสมโลหะ เนื่องจากโลหะมีประจุสามารถจับกับ binding site ที่ผิวเซลล์ หากมีความเข้มข้นของโลหะมากอาจทำให้พื้นที่จับบริเวณ binding site ลดน้อยลงดังรายงานของวิลาวัลย์ สินธุประภา (2541) พบว่า เมื่อความเข้มข้นตั้งต้นของสังกะสีเพิ่มขึ้น ความสามารถในการสะสมสังกะสีของเซลล์เป็นและเซลล์ตายของ *Penicillium sp.* PT1 เพิ่มขึ้น จนกระทั่งถึงความเข้มข้นของสังกะสี ณ จุดหนึ่งความสามารถในการสะสมสังกะสีของเซลล์เป็นและเซลล์ตายมีค่าคงที่

### 3. สาหร่าย

#### 3.1 ความเป็นพิษของแคดเมียมต่อสาหร่าย

การปนเปื้อนของแคดเมียมในสภาพแวดล้อมเกิดจากการสุกร่อนตามธรรมชาติ และกิจกรรมของมนุษย์ทั้งด้านเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม แคดเมียมมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตสูงมาก แต่จากปริมาณที่ปรากฏอยู่ตามธรรมชาติและอัตราการหมุนเวียนที่เกิดขึ้นในภาวะปกติ โอกาสที่จะก่อให้เกิดอันตรายแก่สิ่งมีชีวิตน้อยมาก แต่ปัจจุบันวัฏจักรของแคดเมียมถูกรบกวนโดยกิจกรรมของมนุษย์ทั้งทางอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม จนก่อให้เกิดการสะสมและมีพิษต่อสิ่งแวดล้อม แคดเมียมในระบบนิเวศน้ำมีผลต่อการเติบโตหรือเมตาบอลิซึมของพืชและสัตว์

ระดับความเป็นพิษต่อสาหร่ายแต่ละชนิดแตกต่างกันออกไปตามชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ เช่น Stratton and Corke (1979) พบว่าแคดเมียม 0.02 มิลลิกรัม/ลิตร มีผลยับยั้งการเติบโตของ *Anabaena inaequalis* และที่ 0.06 มิลลิกรัม/ลิตร จะยับยั้งการเติบโตอย่างสมบูรณ์ และที่ 1 มิลลิกรัม/ลิตร จะยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสง และ acetylene reduction ส่วน Singh and Yadava (1983) ศึกษาผลของแคดเมียมต่อ *Anacystis nidulans* พบว่าแคดเมียม 4 มิลลิกรัม/ลิตร จะยับยั้ง nitrate uptake โดยแคดเมียมทำให้เกิดการสูญเสียปริมาณ ATP ทำให้เกิดรูรั่วที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ Becker (1983) พบว่า 1-2 มิลลิกรัม/ลิตร จะยับยั้ง nitrogenase activity ใน *Anabaena cylindrical* และแคดเมียม 2 มิลลิกรัม/ลิตร จะชักนำให้เส้นใยของเซลล์เกิดการแตก ส่งผลทำให้เซลล์ตาย เนื่องจากเกิด chlorosis และเซลล์รูปร่างผิดปกติ แคดเมียมมีผลต่อการเติบโต และระยะยาวมีผลต่อการสังเคราะห์กรดไขมันและ sterol ของ *Selenastrum capricornutum* (McLarnon-Riches 1998)

### 3.2 การประเมินความเป็นพิษ

การประเมินความเป็นพิษของสารพิษจะถูกตรวจสอบจากความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของสิ่งมีชีวิตมาตรฐาน อย่างไรก็ตามสิ่งมีชีวิตมาตรฐานอาจไม่ใช่ตัวแทนที่ไวของสังคมสิ่งแวดล้อมนั้นภายใต้สภาวะกดดันของสารพิษที่ทดสอบ ดังนั้นการตรวจความเป็นพิษไม่ควรตรวจด้วยสิ่งมีชีวิตมาตรฐานเพียงชนิดเดียว แต่ควรตรวจด้วยสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่แยกเชื้อจากธรรมชาติด้วยก่อนจะสรุปเป็นระดับความเป็นพิษของสารนั้น ๆ ที่ต้องการควบคุมไม่ให้เกินมาตรฐานสาหร่ายสีเขียวน้ำจืด *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak เป็นสาหร่ายที่ EPA และ OECD แนะนำให้ใช้เป็นสิ่งมีชีวิตมาตรฐานในการตรวจสอบความเป็นพิษของสารที่อยู่ในน้ำ การศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ *Kirchneriella lunaris* ที่แยกได้จากแหล่งน้ำในมหาวิทยาลัยศิลปากรเป็นตัวแทนทดสอบความเป็นพิษของแคดเมียม เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านพิษวิทยาของแคดเมียม

### 3.3 การทดสอบความเป็นพิษของแหล่งน้ำทางชีววิทยา

ปัจจุบันกองจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมมีแนวทางพัฒนาการทดสอบความเป็นพิษของตัวอย่างน้ำ โดยใช้ข้อมูลเกณฑ์ทางพิษวิทยา (Toxicity criteria) บ่งชี้พิษวิทยาต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ เนื่องจากการใช้เกณฑ์ผลการทดสอบตัวอย่างน้ำทางเคมี (Chemical – specific criteria) ในเชิงปริมาณ (quantitative) ในการประเมินสถานการณ์มลพิษทางน้ำไม่สัมพันธ์โดยตรงกับผลกระทบของมลพิษต่อนิเวศวิทยาของ

แหล่งน้ำ นั่นคือสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในแหล่งน้ำตอบสนองต่อผลกระทบของระดับมลพิษนั้น ๆ ในระดับใด เช่น ทำให้สัตว์น้ำตายทันทีหรือเป็นพิษเรื้อรังสะสมในสิ่งมีชีวิต การเติบโตช้าลง การสืบพันธุ์หยุดชะงัก เป็นต้น กองจัดการคุณภาพน้ำได้พัฒนาวิธีการทดสอบความเป็นพิษของตัวอย่างน้ำให้เป็นวิธีมาตรฐาน เพื่อใช้กับการประเมินผลกระทบของน้ำทิ้งจากระบบบำบัดน้ำเสียลงสู่ทะเล (Marine outfall) ดังนี้

3.3.1 การทดสอบการยับยั้งการเติบโตของสาหร่ายทะเล *Skeletonema costatum* (Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum*)

เป็นการทดสอบความเป็นพิษของตัวอย่างน้ำ โดยใช้สาหร่ายทะเล *Skeletonema costatum* เป็นดัชนีบ่งชี้ผลกระทบที่ได้รับจากความเป็นพิษของน้ำ ซึ่งจะมีผลไปยับยั้งการเติบโตของสาหร่ายทะเล แสดงระดับความเป็นพิษด้วยค่า Effective concentration (EC) โดยวัดค่า  $EC_{10}$  และ  $EC_{50}$  คือระดับความเข้มข้นของสารพิษในน้ำที่ทำให้การเติบโตของสาหร่ายลดลง 10 % และ 50 % เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

3.3.2 การทดสอบความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันต่อความอยู่รอดของโคพีพอด *Acartia tonsa* (Copepod acute toxicity test with *Acartia tonsa*)

เป็นการทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน โดยใช้แพลงก์ตอนสัตว์ *Acartia tonsa* เป็นดัชนีบ่งชี้ความเป็นพิษของน้ำ ที่มีผลกระทบต่อการรอดชีวิตแพลงก์ตอนสัตว์ ทำการทดสอบโดยนับจำนวนแพลงก์ตอนสัตว์ที่มีชีวิตรอดหลังจากได้รับปริมาณสารพิษที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงผลการทดสอบด้วยค่า Lethal concentration (LC) โดยวัดค่า  $LC_{10}$  และ  $LC_{50}$  ที่ 48 ชั่วโมง คือความเข้มข้นของสารพิษในน้ำซึ่งจะทำให้สัตว์น้ำตายไป 10 % และ 50 % ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

3.3.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อการยับยั้งแบคทีเรียในกระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification inhibition test)

เป็นการทดสอบความเป็นพิษของตัวอย่างน้ำด้วยแบคทีเรียกลุ่มที่มีกระบวนการตรึงไนโตรเจนจากอากาศว่าสารพิษมีผลต่อการยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแอมโมเนีย-ไนโตรเจนให้เป็นไนเตรท (nitrification) ที่เกิดขึ้นตามวัฏจักรไนโตรเจนในธรรมชาติ และในระบบบำบัดน้ำเสีย ผลการทดสอบแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด nitrification ซึ่งมีผลกระทบต่อความสมดุลของวัฏจักรไนโตรเจน และประสิทธิภาพของการบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน

3.3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อการยับยั้งแบคทีเรียในการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (Oxygen consumption inhibition test)

เป็นการทดสอบความเป็นพิษของตัวอย่างน้ำต่อการยับยั้งการใช้ออกซิเจนของแบคทีเรีย เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ให้ได้พลังงานในการดำรงชีวิต (Aerobic respiration) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นทั้งในธรรมชาติและในระบบบำบัดน้ำเสีย แสดงผลการทดสอบด้วยค่า  $EC_{50}$  คือระดับความเข้มข้นของสารพิษที่มีผลยับยั้งการใช้ออกซิเจนในการหายใจของแบคทีเรียลดลง 50 % จากการทดสอบนี้จะทำให้ทราบว่าแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์โดยใช้ออกซิเจนได้รับผลกระทบจากความเป็นพิษมาก-น้อยเพียงใด เพื่อนำผลมาใช้ในการประเมินประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน และผลกระทบต่อแหล่งน้ำที่รองรับน้ำทิ้งจากระบบบำบัด

### 3.4 คุณสมบัติของสาหร่ายที่ใช้ในการลดปริมาณโลหะหนัก

การลดปริมาณโลหะหนักโดยใช้สาหร่ายเป็นตัวดูดซับนั้น สาหร่ายต้องมีคุณสมบัติ ดังนี้ (อรพิน ภูมิภมร และปิยะพันธ์ อัครเวศินธุ์เลิศ 2527)

1. สามารถดูดซับไอออนโลหะจากสารละลาย และทำให้ปล่อยไอออนโลหะกลับออกจากสาหร่ายดูดซับได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพสูง
2. สามารถเพิ่มปริมาณมวลชีวภาพได้ง่าย รวดเร็ว เสียค่าใช้จ่ายน้อย และควรนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลังจากใช้แล้ว
3. การแยกสาหร่ายดูดซับจากสารละลาย ควรทำได้ง่าย รวดเร็ว และเสียค่าใช้จ่ายน้อย
4. กระบวนการที่ใช้ในการทำให้สาหร่ายดูดซับปล่อยไอออนโลหะออกมา ควรทำได้ง่าย รวดเร็ว มีประสิทธิภาพสูง และสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการทำให้สาหร่ายปล่อยไอออนโลหะควรมีราคาถูก และหาได้ง่าย
5. สาหร่ายดูดซับควรมีความสามารถในการดูดซับไอออนโลหะได้หลายชนิด เพราะในน้ำทิ้งจะเป็นสารละลายของโลหะหลายชนิดปะปนกัน

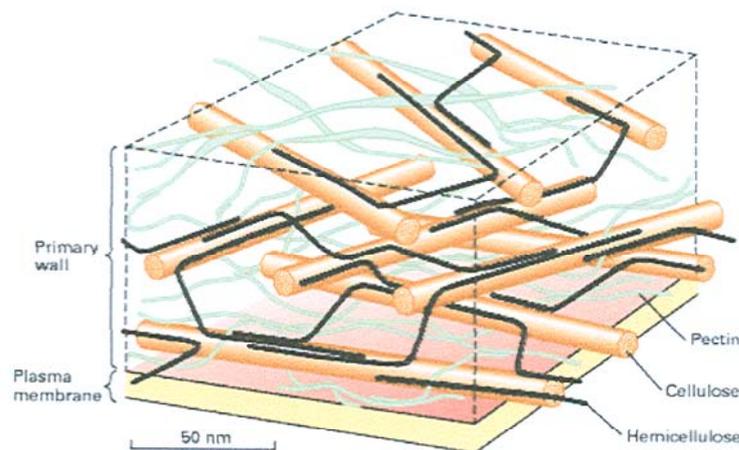
### 3.5 องค์ประกอบทางเคมีของผิวเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และสาหร่ายยูคาริโอต

เซลล์สาหร่ายทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตสามารถจับและปล่อยไอออนโลหะในปริมาณหนึ่ง ๆ อย่างมีนัยสำคัญ สาหร่ายแห้งทำหน้าที่เหมือนกับเป็น ion-exchange resin พิเศษที่ทำหน้าที่จับและปล่อยไอออนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตำแหน่งที่จับกับไอออนโลหะ คือ binding sites บนผนังเซลล์สาหร่ายมี binding sites ที่จับกับประจุบวก ได้แก่ carboxylate, amine, imidazole,

phosphate, sulfhydryl, sulfate, hydroxyl, และ functional groups อื่น ๆ ที่อยู่ในโปรตีนและน้ำตาลของผนังเซลล์ (Brown and Lester 1982; Scott and Palmer 1988) functional groups บางชนิดจับได้ทั้งประจุบวกและประจุลบ เช่น amines และ imidazoles จับกับประจุบวกเมื่อ protonated และอาจมี electrostatic จับกับสารประกอบโลหะประจุลบ ดังนั้นเซลล์สาหร่ายมี binding sites ที่จับกับสารประกอบโลหะได้ทั้งประจุบวก และประจุลบ (polyfunctional binding sites)

สาหร่ายจำแนกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ สาหร่ายโพรคาริโอตหรือสีเขียวแกมน้ำเงิน (prokaryotic cyanobacteria) และสาหร่ายยูคาริโอต (eucaryotic algae) โดยอาศัยองค์ประกอบของผิวเซลล์ รงควัตถุ อาหารสะสม การมีหรือไม่มีแฟลเจลลา และโครงสร้างอื่น ๆ เป็นหลักในการจำแนก

ผนังเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีองค์ประกอบหลักเป็นสาร murein (ประกอบด้วย peptidoglycans หรือ mucopeptidose และกรดอะมิโน) และยังมีเมือก (sheath) หุ้มภายนอก เมือกประกอบไปด้วย matrix ของ pectic acid และ mucopolysaccharide รวมถึงโปรตีนอีกหลายชนิด ชั้น peptidoglycans ประกอบด้วยโพลิเมอร์ของ N-acetylglucosamine และ N-acetylmuramic acid ที่ cross-linked กันด้วยกรดอะมิโน ส่วนสาหร่ายยูคาริโอตส่วนใหญ่มีโครงสร้างผนังเซลล์แตกต่างจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ผนังเซลล์ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ 1) fibrillar component ฟอรัมเป็นโครงร่าง (skeleton) ของผนังเซลล์ 2) amorphous component ฟอรัมเป็น matrix ที่ให้ fibrillar component ฝังอยู่ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 โครงสร้างผนังเซลล์ของสาหร่าย

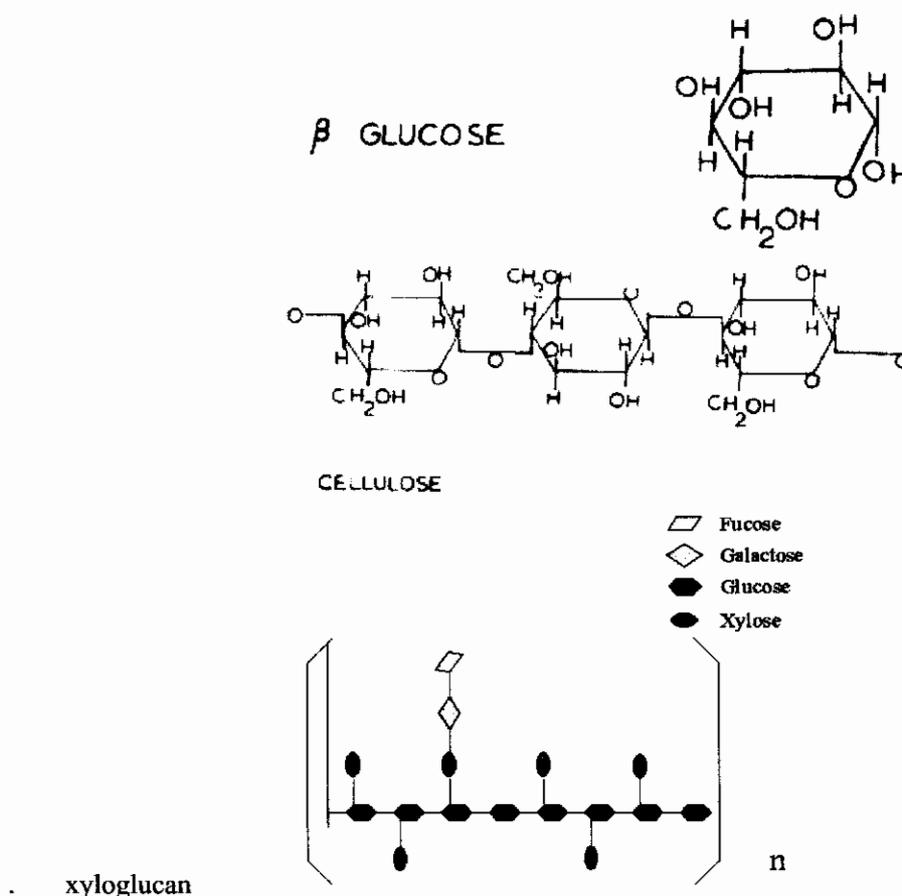
(<http://tainano.com/Molecular%20Biology%20Glossary.files/image035.gif>)

fibrillar component ส่วนใหญ่คือเซลลูโลส (cellulose) แต่ละเซลลูโลสประกอบด้วย cellulose microfibril ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของ 1,4 linked  $\beta$ -D-glucose (ภาพที่ 2) ยกเว้น จีโนส *Porphyra* ในดิวิชัน Rhodophyta ซึ่งไม่มีเซลลูโลส แต่มีแมนโนส (mannose) และไซแลน (xylans) แทน amorphous component ของพืชมีองค์ประกอบเป็น pectin, hemicellulose, lignin และ โปรตีน โดยมี hemicellulose ยึดติดโดยรอบผิวของ cellulose microfibril ทำหน้าที่เป็นกาวให้ cellulose microfibril ยึดติดกัน พืชแต่ละจะกลุ่มมีสัดส่วนของ amorphous component ต่างกัน amorphous component ในสาหร่าย Phaeophyta และ Rhodophyta มีองค์ประกอบเป็นโพลีแซคาไรด์ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการค้าได้ เช่น alginic acid, fucoidin และ galactans (ประกอบด้วย agar, carrageenan, porphyran, furcelleran และ funoran) ของสาหร่าย Chlorophyta ชับช้อนมาก ส่วนใหญ่เป็น hemicellulose (วิไลภรณ์ บุญญกิจจินดา 2550) ซึ่งประกอบด้วย residues ของ D-galactose, L-arabinose, D-Xylose, D-glucuronic acid และ L-rhamnose hemicellulose ต่างจากเซลลูโลสคือไม่พบอยู่ในรูป crystal ในสภาพธรรมชาติ แต่จะพบเป็น crystal หลังจากการสกัด เชื่อว่า golgi apparatus เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ amorphous components hemicellulose จะยึดติดกับผิวของ cellulose microfibril อย่างเหนียวแน่นและยึดกับส่วนอื่น ๆ ของผนังเซลล์ เช่น pectin ด้วย H-bond ดังนั้น โมเลกุลต่าง ๆ ในผนังเซลล์จึงยึดเหนี่ยวกันด้วย covalent bonds, ionic bonds และ H-bonds จนกลายเป็น complex supermolecule ล้อมรอบเซลล์ ตัวอย่าง hemicellulose เช่น xyloglucan, xylan เป็นต้น xyloglucan (ภาพที่ 2) มีกลูโคสเป็นแกน (backbone) โดยมี xylose เป็น side chain และอาจพบ galactose, fucose, arabinose บ้างเล็กน้อย ยึดติดกับ cellulose microfibrils ด้วย H-bond

สาหร่ายยูคาริโอตมีความหลากหลายมากกว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โครงสร้างและรูปแบบ functional group ที่ผนังเซลล์ของสาหร่ายขึ้นอยู่กับ ดิวิชัน สกุล ชนิด และวาไรตี้ของสาหร่าย ซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้สาหร่ายยูคาริโอตมีความสามารถในการจับกับโลหะแตกต่างกัน

ปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพในการกำจัดโลหะในน้ำได้พัฒนาไปมาก มีการนำตัวดูดซับ (absorbent) ทั้งที่มีและไม่มีชีวิตมาใช้ ถ้าเป็นสิ่งมีชีวิตโดยส่วนใหญ่นิยมใช้สาหร่ายสีน้ำตาล สีแดง และสีเขียว นำมาทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หลังจากอบแห้งแล้วจะถูกนำมาบดเป็นผง และร่อนผ่านตะแกรงขนาดต่าง ๆ เพื่อคัดขนาดให้มีขนาดเล็ก สำหรับนำมาดูดซับโลหะหนัก (Gonzalez *et al.* 2007) หรืออบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แล้วนำมาดูดซับโลหะ (Warakamin 2003) การรวมไอออนโลหะหนักด้วยเซลล์สาหร่ายที่ไม่มีชีวิตเกิดขึ้นด้วยกลไกที่แตกต่างออกไป เช่น การจับระหว่างผิวเซลล์และไอออนโลหะหนักด้วยพันธะ covalent หรือ

electrostatic หรือโดยกระบวนการที่ซับซ้อนมากขึ้น เช่น ปฏิกิริยา chemical redox ระหว่างไอออนโลหะและเซลล์สาหร่าย (Tsezos and Volesky 1981)



ภาพที่ 2 โครงสร้าง cellulose,  $\beta$  glucose และ Xyloglucan

([http://www.cepceb.ucr.edu/images/members/raikhel/figure\\_3.gif](http://www.cepceb.ucr.edu/images/members/raikhel/figure_3.gif); Davis *et al.* 2003)

### 3.6 การจับโลหะด้วยสาหร่ายที่มีชีวิต

การใช้สาหร่ายที่มีชีวิตสะสมโลหะนั้นยังมีน้อยกว่าการใช้สาหร่ายที่ไม่มีชีวิต เนื่องจากต้องคำนึงถึงการรอดชีวิตในระบบบำบัดด้วย การจับหรือการสะสมของไอออนโลหะหนักด้วยเซลล์สาหร่ายที่มีชีวิตเกิดขึ้นได้หลายกลไก เช่น การสะสมที่ผิวเซลล์ การทำให้ตกตะกอน หรือการลำเลียงผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ และทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนภายในเซลล์ เป็นต้น (Wood and Wang 1983; Volesky and Holan 1995) กลไกการสะสมโลหะโดยสาหร่ายประกอบด้วย 2

กระบวนการ กระบวนการแรก คือการดูดซับทางชีวภาพ (biosorption) ซึ่งเป็นผลรวมทั้งหมดของ passive interaction ระหว่างผนังเซลล์กับไอออนโลหะ การดูดซับเหล่านี้เกิดจากกระบวนการ adsorption ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนไอออนกับ functional groups ที่ผิวเซลล์ และปฏิกิริยาฟอรัมเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ผิวเซลล์ binding sites สำหรับไอออนโลหะคือ carboxylic, hydroxylic, phosphate และ sulfonate groups ของไขมัน โปรตีน และโพลีแซคคาไรด์ที่อยู่ผิวเซลล์ กระบวนการที่สองเป็นกระบวนการแบบ active เป็นการนำไอออนเข้าสู่ภายในเซลล์ ซึ่งการนำเข้ามีทั้งเพื่อเป็นการป้องกันตัวจากโลหะที่เป็นพิษ หรือ เป็นการสะสมโลหะที่จำเป็นในระดับความเข้มข้นต่ำ เป็นการนำเข้าที่ตรงข้ามกับ concentration gradient กระบวนการนี้อาศัย metal-binding substances พิเศษ เช่น thiones และ metal-precipitating substances เช่น hydrogen peroxide กระบวนการนี้ตรงข้ามกับกระบวนการดูดซับทางชีวภาพ คือ ปฏิกิริยานี้เปลี่ยนกลับไม่ได้ (irreversible) และเกิดขึ้นภายหลังกระบวนการแรก (Schmitt *et al.* 2001) กระบวนการดูดซับเกิดขึ้นภายในไม่กี่นาทีแต่การนำเข้าภายในเซลล์ใช้เวลาเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน (Rakhshae *et al.* 2006)

สรีระของสิ่งมีชีวิต เช่น อายุของเซลล์ ความเหมาะสมของปริมาณธาตุอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง และสภาพแวดล้อมขณะที่มีกระบวนการดูดซับ (เช่น ความเป็นกรด-เบส อุณหภูมิ และการมีไอออนอื่น ๆ ที่ปนอยู่ในสารละลาย) เป็นปัจจัยสำคัญส่งผลต่อประสิทธิภาพของตัวดูดซับที่มีชีวิต ประสิทธิภาพของความเข้มข้นโลหะต่อตัวดูดซับได้รับอิทธิพลจากคุณสมบัติทางเคมีของสารละลายโลหะ

ถ้ามีการสะสมในปริมาณน้อยที่ไม่ส่งผลต่อกิจกรรมภายในเซลล์ เซลล์ยังมีการเติบโตและเพิ่มจำนวน ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการดูดซับโลหะดียิ่งขึ้น แต่ในขณะเดียวกันหากมีการสะสมมากเกินไปจนเป็นพิษต่อเซลล์ การเติบโตของสาหร่ายจะถูกยับยั้ง ความสามารถในการดูดซับของสาหร่ายที่มีชีวิตแต่ละสายพันธุ์ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการจับโลหะด้วยสาหร่ายที่มีชีวิตมีดังนี้

Filip *et al.* (1979) รายงานว่าประสิทธิภาพการลดปริมาณโลหะด้วยสาหร่าย ขึ้นอยู่กับระดับความเป็นพิษของโลหะที่มีผลต่อการรอดชีวิตของสาหร่าย และมวลชีวภาพของสาหร่ายซึ่งได้รับอิทธิพลจากคุณภาพของน้ำที่บำบัดและภูมิภาค

Becker (1983) รายงานว่าปรอท และแคดเมียม จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ nitrogenase ทำให้ประสิทธิภาพการใช้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ยังมีชีวิต ลดปริมาณ โลหะและสารปนเปื้อนในน้ำเสียถูกจำกัด

Dissanayake and Kritsotakis (1984) พบว่าบริเวณชายฝั่งของประเทศศรีลังกา สาหร่ายทะเลที่ยึดเกาะที่พื้นท้องน้ำมีการสะสมทองและ platinum ในระดับค่อนข้างสูง

Rose *et al.* (1998) รายงานประโยชน์ของการใช้สาหร่ายบำบัดน้ำทิ้งที่มีสภาพเป็นกรดจากเหมืองแร่ การกำจัด โลหะซัลไฟด์ และบำบัดน้ำเสียจาก โรงถลุงแร่สังกะสี พบว่าการใช้สาหร่ายที่มีชีวิตเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการใช้แบคทีเรีย

Terry and Stone (2002) รายงานว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus abundans* ที่มีชีวิตสามารถลดปริมาณแคดเมียมและทองแดงอย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าเซลล์ที่ไม่มีชีวิต โดยเซลล์ที่มีชีวิตลดได้ 95-98% ขณะที่เซลล์ที่ไม่มีชีวิตลดได้ 83-89% ตามลำดับ

Warakamin (2003) รายงานว่าระยะเวลาในการดูดซับแคดเมียมของ *Oscillatoria subtilissima* และ *O. jasorvensis* ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P>0.05$ ) แต่ ปริมาณมวลชีวภาพที่ใช้ในการดูดซับและปริมาณความเข้มข้นของแคดเมียมมีผลต่อประสิทธิภาพในการดูดซับโลหะหนักของสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดนี้ สมดุลของการดูดซับเป็นไปตามแบบจำลองของ Langmuir ประสิทธิภาพในการดูดซับสารละลายแคดเมียม 50 มิลลิกรัม/มวลชีวภาพ 0.01 กรัม

Khummongkol *et al.* (2004) ได้พัฒนารูปแบบจำลองสำหรับการสะสมไอออนโลหะหนักด้วยสาหร่ายที่มีชีวิต โดยทำการทดลองระหว่างแคดเมียมและสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* รูปแบบจำลองสันนิษฐานว่ากลไกการสะสมแคดเมียมเกิดจากการดูดซับของไอออนโลหะบนผิวนอกของผนังเซลล์สาหร่าย การดูดซับจะเป็นไปอย่างรวดเร็ว และเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 10 นาทีจะเข้าสู่สมดุล ภายใต้สภาวะที่สาหร่ายมีการเติบโตจะมีการเพิ่มพื้นที่ผิวเนื่องจากมีมวลชีวภาพเพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณแคดเมียมถูกสะสมในสาหร่ายมากกว่าที่ทำนายด้วยการสะสมบนผิวเพียงอย่างเดียว ซึ่งแสดงว่ามีกลไกอื่นในการจับร่วมด้วย,เมื่อผ่านจุดสมดุลจะมีการคายไอออนโลหะจากผนังเซลล์ (desorption) ดังนั้นการหาเวลาการดูดซับสูงสุดจึงเป็นสิ่งจำเป็นต่อการนำมาใช้เพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุด

ข้อจำกัดในการใช้สาหร่ายที่มีชีวิตกำจัดโลหะในน้ำเสีย คือการควบคุมและรักษาให้สาหร่ายเติบโต บางครั้งโลหะอาจมีพิษต่อเซลล์ และการนำไอออนโลหะออกจากเซลล์สาหร่ายที่มีชีวิตโดยไม่กระทบต่อการมีชีวิตนั้นทำได้ยาก เพราะในกระบวนการนำออกต้องมีการปรับค่าความเป็นกรด-เบส หรือเติมสารเคมีพิเศษบางอย่างซึ่งมีผลต่อคุณภาพชีวิตของสาหร่าย ด้วยเหตุนี้จึงมีการใช้เซลล์ที่ไม่มีชีวิตแทน เพื่อลดผลที่จะเกิดจากพิษของโลหะหนักได้

### 3.7 การจับโลหะด้วยสาหร่ายที่ไม่มีชีวิต

การสะสมไอออนโลหะด้วยสาหร่ายที่ไม่มีชีวิตส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ผิวเซลล์ ด้วยหลายกลไก เช่น การจับกับผิวเซลล์ด้วยพันธะ covalent หรือ electrostatic หรือโดยกระบวนการที่ซับซ้อนมากขึ้น เช่น ปฏิกิริยา chemical redox ระหว่างไอออนโลหะและเซลล์สาหร่าย (Tsezos and Volesky 1981) โดยส่วนใหญ่มักพบการรายงานว่าสาหร่ายที่ตายแล้วมีประสิทธิภาพในการดูดซับโลหะได้เป็นอย่างดี (Leusch *et al.* 1995; Holan *et al.* 1993) สาหร่ายที่ใช้มีทั้งสาหร่ายน้ำจืด เช่น *Chlamydomonas reinhardtii* (Xue *et al.* 1988) หรือสาหร่ายทะเล เช่น *Sargassum sp.* (Cruz *et al.* 2004) แต่ทั้งนี้ความสามารถในการดูดซับของเซลล์ที่ไม่มีชีวิตนั้น ขึ้นอยู่กับวิธีการเตรียมตัวอย่างเซลล์แห้ง และปัจจัยของสภาพแวดล้อม รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการจับโลหะด้วยสาหร่ายที่ไม่มีชีวิตมีดังนี้

Ferguson and Bubela (1974) รายงานว่าการเตรียมตัวอย่าง *Chlorella vulgaris*, *Urothix*, และ *Chlamydomonas* โดยการทำให้แห้งแบบ freeze-dried จะมีการสะสมทองแดง ตะกั่ว และสังกะสีในปริมาณมากกว่าวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญ

Nakajima *et al.* (1982) ศึกษาลำดับการจับโลหะของ *Chlorella regularis* ผ่านการทำให้แห้งแบบ freeze-dried พบว่า *Chlorella* สามารถจับกับไอออนโลหะเรียงตามลำดับจากมากไปน้อยดังนี้  $UO_2^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > BA^{2+} = Mn^{2+} = Cd^{2+} > Ni^{2+} = Sr^{2+}$

Darnall *et al.* (1986) และ Greene *et al.* (1987) ศึกษาการดูดซับโลหะของ *Chlorella vulgaris* ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบ freeze-dried และ *Chlorella pyrenoidosa* และ *Spirulina platensis* ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบ spray dried หรือ sun dried พบว่ามีความแตกต่างในการจับกับไอออนโลหะในเชิงปริมาณตามลำดับดังนี้  $Al^{3+}, Be^{2+}, Cu^{2+}, Pb^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Cr^{3+}, Cr^{6+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, UO_2^{2+}, AuCl_4^-, Au(CN)_2^-, AuBr_4^-, Ag^+, Hg^{2+}, PtCl_4^{2-}, SeO_4^{2-}, MoO_4^{2-}$  และ  $Mn^{2+}$

Valdman and Leite (2004) รายงานการใช้กาก *Sargassum sp.* จากอุตสาหกรรมการสกัด alginate ที่นำมาปรับปรุงคุณภาพ และฝังใน polyethyleneimine (PEI) ตามด้วย glutaraldehyde crosslinking พบว่าอันดับการดูดซับโลหะเป็นดังนี้ แคลเซียม > สังกะสี > ทองแดง โดยดูดซับได้ 157.8, 118.5 และ 77.4 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งของแคลเซียม สังกะสี และทองแดง ตามลำดับ

Solisio *et al.* (2008) รายงานว่ามวลชีวภาพแห้งของ *Spirulina platensis* ที่ถูกทำให้เปียกอีกครั้ง (re-hydrated) น้ำหนักน้อยกว่า 2 กรัม/ลิตร สามารถดูดซับแคลเซียมความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตรได้ถึง 98 % ถ้าจะใช้ดูดซับแคลเซียมความเข้มข้นสูงขึ้นและมีประสิทธิภาพเท่าเดิมต้องเพิ่มมวลชีวภาพสาหร่าย เช่น สามารถดูดซับแคลเซียมความเข้มข้น 400 และ 500

มิลลิกรัม/ลิตร ต้องใช้มวลชีวภาพ 2.0 และ 4.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ถ้าความเข้มข้นแคดเมียมเพิ่มมากขึ้นกว่า 500 มิลลิกรัม/ลิตรแต่ไม่เพิ่มมวลชีวภาพ ประสิทธิภาพของระบบลดลง

ประโยชน์ของการใช้สาหร่ายที่ไม่มีชีวิตคือสามารถนำกลับมาใช้ได้ เพราะสามารถนำเอาไอออนออกในสภาพที่จะเป็นพิษต่อเซลล์ที่มีชีวิต

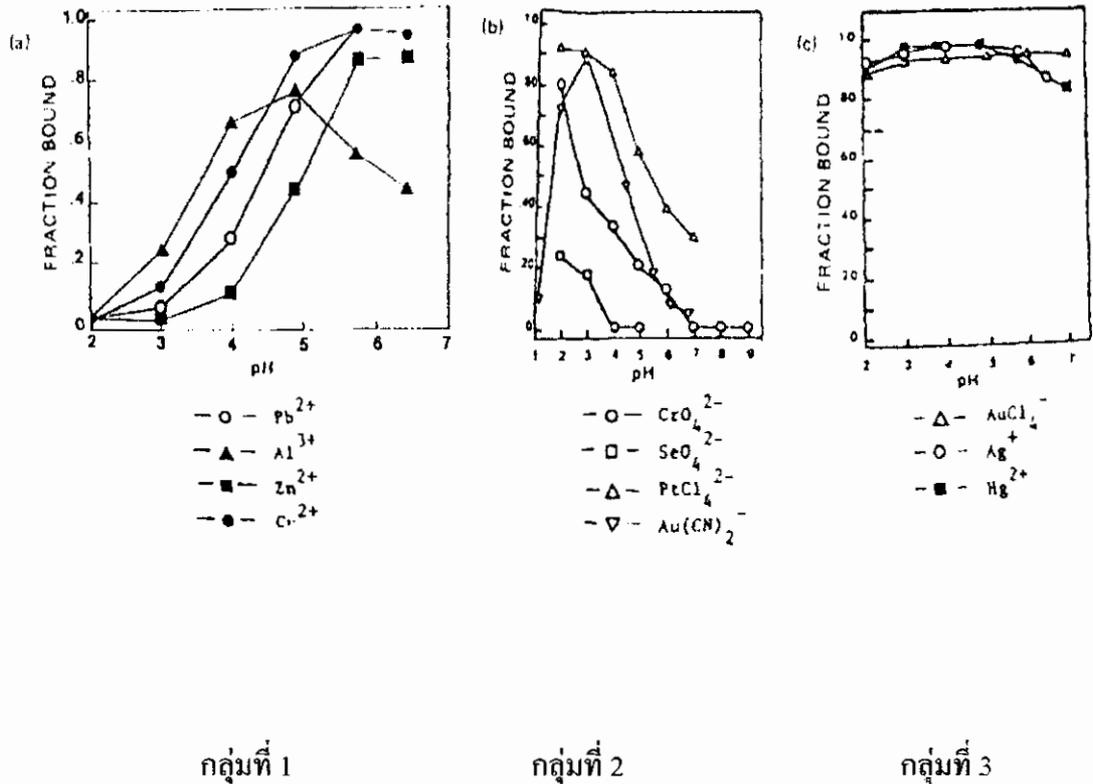
### 3.8 การแบ่งกลุ่มของไอออนที่จับกับสาหร่าย

ความสัมพันธ์ระหว่างการจับไอออนโลหะของ *Chlorella vulgaris* กับความเป็นกรด-เบส แสดงไว้ดังภาพที่ 3 ทำให้แบ่งไอออนออกเป็น 3 กลุ่ม (Darnall *et al.* 1986 และ Greene *et al.* 1987)

กลุ่มที่ 1 เป็นไอออนโลหะซึ่งจับกับ *Chlorella vulgaris* ได้แน่นมากขึ้น เมื่อความเป็นกรด-เบสเพิ่มขึ้นจาก 2 เป็น 5 ประกอบด้วย Cu(II), Ni(II), Zn(II), Co(II), Pb(II), Cr(II), Cd(II), U(VI), Co(II), Be(II), และ Al(III) พฤติกรรมขึ้นอยู่กับความเป็นกรด-เบสนี้ คล้ายคลึงกับการรวมของไอออนโลหะกับ cation-exchange resin ที่มี carboxylate หรือ amine groups ที่ผิว active metal binding site (เช่น carboxylate หรือ amine groups) สามารถรวมกับโปรตอนได้ด้วยเช่นกัน ด้วยเหตุนี้ไอออนโลหะและโปรตอนต้องแข่งขันจับกับบริเวณเดียวกัน

กลุ่มที่ 2 ไอออนโลหะจับกับ *Chlorella vulgaris* ได้แน่นมากที่ความเป็นกรด-เบส 2 มากกว่าที่ความเป็นกรด-เบส 5 ไอออนเหล่านี้ได้แก่ oxoanions,  $\text{MoO}_4^{2-}$ ,  $\text{SeO}_4^{2-}$  และ  $\text{CrO}_4^{2-}$  และ anionic metal complexes อื่น ๆ เช่น  $\text{PtCl}_2^-$  และ  $\text{Au}(\text{CN})_2^-$  การจับได้แน่นขึ้นที่ความเป็นกรด-เบสต่ำ เกิดจากการจับแบบ electrostatic กับ ligand เช่น amines หรือ imidazoles ซึ่งมีประจุเป็นบวก เนื่องจากเกิด protonation ที่ค่าความเป็นกรด-เบสต่ำ อีกทั้งเนื่องจาก isoelectric point ของสาหร่ายหลายชนิดมีค่าอยู่ระหว่าง 3 และ 4 (Crist *et al.* 1981) ประจุทั้งหมดบนผนังเซลล์เปลี่ยนจากประจุลบเป็นประจุบวกได้ง่ายขึ้น เมื่อความเป็นกรด-เบสลดลงต่ำกว่า isoelectric pH

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ Hg (II), Au (III) ในรูป  $\text{AuCl}_4^-$ , Ag (I), Pd (II) และ Au (I) thiomalate กลุ่มนี้จับกับ *C. vulgaris* อย่างเป็นอิสระ ไม่ขึ้นกับค่าความเป็นกรด-เบสช่วง 2-7 ไอออนโลหะกลุ่มนี้เรียกว่า “soft” ไอออนโลหะ soft จับกับ softer ligands ด้วยพันธะโคเวเลนต์ เช่น sulfhydryl และ amine groups การจับกันไม่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ระหว่างไอออน (ionic interaction) และความเป็นกรด-เบส



ภาพที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการจับไอออนโลหะของ *Chlorella vulgaris* กับความเป็นกรด-เบส

### 3.9 ความสามารถในการสะสมโลหะด้วยสาหร่าย

สาหร่ายแต่ละชนิดแสดงลักษณะการจับกับโลหะได้ต่างกันที่ความเป็นกรด-เบสหนึ่ง ๆ เนื่องจากผนังเซลล์สาหร่ายมีองค์ประกอบของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตแตกต่างกัน (ตารางที่ 2) ส่งผลให้ binding site ของสาหร่ายแต่ละชนิดแตกต่างกัน Damall *et al.* (1988) พบว่าที่ความเป็นกรด-เบส 2 นั้น *Eisenia bicyclis* จับกับ aluminum (III) ได้ดีกว่า *Cyanidium caldarium*, *Spirulina platensis* และ *Chlorella pyrenoidosa* *C. caldarium* จับกับทองแดงที่ความเป็นกรด-เบส 2 มากกว่า *E. bicyclis*, *S. platensis* และ *C. pyrenoidosa* เป็นต้น

### 3.10 กลไกการจับไอออนโลหะกับสาหร่าย

กลไกการจับไอออนโลหะกับเซลล์สาหร่ายที่ไม่มีชีวิต ขึ้นอยู่กับชนิดของไอออนโลหะ ชนิดสาหร่าย และสภาพของสารละลาย Crist *et al.* (1981) รายงานว่ากลไกที่สาหร่าย *Vaucheria* sp. จับกับไอออนโลหะประจุบวกเกิดขึ้นโดยกลไก ion-exchange และมีการแทนที่ระหว่าง moles ของ  $H^+$  ด้วย moles ของไอออนโลหะประจุบวกที่ถูกดูดซับ binding sites ของ polysaccharide และ โปรตีน ที่มีบทบาทในการจับคือ amino, carboxyl, sulfate และ imidazoles ที่ค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นมีค่า 4.5 โปรตอนถูกแทนที่ด้วยไอออนโลหะ โดยมีสัดส่วนระหว่าง  $H^+$  และ divalent cation ที่ดูดซับเป็น 1 : 1.2 ( $Cu^{2+}$ ), 0.6 ( $Zn^{2+}$ ), 0.59 ( $Mg^{2+}$ ) และ 0.30 ( $Sr^{2+}$ ) สัดส่วนที่ได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไอออนโลหะและความเป็นกรด-เบสเริ่มต้น

ตารางที่ 2 ปริมาณ โปรตีนและคาร์โบไฮเดรตบนผนังเซลล์สาหร่าย (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)

สาหร่าย	โปรตีน	ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (%)	เอกสารอ้างอิง
<i>E. bicyclis</i>	10-25	60.0	Gotelli and Cleland 1968; Bird and Hass 1931 อ้างตาม Darnall <i>et al.</i> 1988
<i>C. caldarium</i>	50-55	15-17	Bailey and Staehelin 1968 อ้างตาม Darnall <i>et al.</i> 1988

Greene *et al.* (1987) ศึกษาการจับของ  $Cu(II)$ ,  $Pb(II)$ ,  $Zn(II)$ ,  $Ni(II)$ ,  $Cd(II)$  และ  $Cr(II)$  กับ *S. platensis* พบว่าเกิดจากโปรตอนที่เป็นอิสระ Greene ทำการทดลองใส่ไอออนโลหะรวมกันหลายชนิดกับสาหร่าย โดยมีค่ากรด-เบสเริ่มต้นเป็น 5.5 และหลังจากที่สิ้นสุดการทดลองวัดปริมาณของไอออนโลหะที่ถูกดูดซับ และค่าความเป็นกรด-เบสสุดท้าย พบว่าค่าความเป็นกรด-เบสสุดท้ายจะต่ำกว่าค่าเริ่มต้นเสมอ แสดงว่าการจับไอออนโลหะประจุบวกกับสาหร่ายเกิดขึ้นโดยกลไก ion exchange ซึ่งไอออนบางส่วนที่จับกับ metal-binding sites เป็นโปรตอน การดูดซับจะลดลงเมื่อค่าความเป็นกรด-เบสต่ำลง

ถ้าเป็นโลหะประจุลบเชิงซ้อน (metallic -anion complex) และ oxoanion จับกับสาหร่ายด้วยกลไกไฟฟ้าสถิต (electrostatic) สังเกตว่าเป็นกลไก electrostatic ได้จากการจับ โดย

พบว่ามีผลสอดคล้องกับภาพรวมของค่ากรด-เบส คือ การจับจะเพิ่มขึ้นถ้าความเป็นกรด-เบสลดต่ำลง ไอออนโลหะใช้กลไกนี้คือ  $\text{SeO}_4^{2-}$ ,  $\text{MoO}_4^{2-}$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{Au}(\text{CN})_2^-$  และ  $\text{PtCl}_4^{2-}$  การจับของ anionic metal complex อาจเกิดขึ้นเพราะ protonated amines หรือ imidazole มี electrostatic คึงดูด ไอออนโลหะประจุลบ

Watkins *et al.* (1987) ได้ศึกษากลไกการจับระหว่างทองกับ *Chlorella vulgaris* ทองที่ใช้ในการทดลองคือ  $\text{AuCl}_4^-$ ,  $\text{Au}(\text{CN})_2^-$  และ Sodium gold(I) thiomalate พบว่าผลที่ได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับรูปของสารประกอบทองแดง และปริมาณสารประกอบทองตอนเริ่มต้น

### 3.11 ประสิทธิภาพของกลไกการจับไอออนโลหะหนักของสาหร่าย

การจับโลหะหนักเข้าสู่ภายในเซลล์สาหร่ายจะมีประสิทธิภาพได้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ดังนี้

#### 3.11.1 ความเป็นกรด-เบส

ความเป็นกรด-เบสต่ำทำให้  $\text{H}^+$  แข่งกับไอออนโลหะประจุบวกในการจับกับ binding site บนผนังเซลล์ จะทำให้เกิด protonation คือการเติม  $\text{H}^+$  ในอะตอมโมเลกุลหรือไอออนของ binding site ซึ่งเป็นผลจากมี  $\text{H}^+$  สูง ปริมาณประจุลบบน binding site จะลดลง ทำให้เกิดการยับยั้งหรือลดการจับกับไอออนโลหะประจุบวก เช่น แคดเมียม ดังนั้นสาหร่ายจะจับโลหะหนักประจุบวกได้ดีหรือไม่นั้น โลหะหนักจะต้องแตกตัวได้มากในขณะที่มีประจุ  $\text{H}^+$  ในสารละลายน้อย

นอกจากนี้ผิวเซลล์ของจุลินทรีย์โดยส่วนใหญ่เป็นประจุลบเพราะ ionization ของ functional groups จึงจับกับไอออนโลหะประจุบวกได้ แต่เมื่อความเป็นกรด-เบสต่ำกว่า 4 functional groups บางส่วนจะเปลี่ยนเป็นประจุบวกทำให้ไม่สามารถจับกับไอออนโลหะได้ (Yan and Viraraghavan 2003)

ความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรด-เบสต่อการดูดซับไอออนโลหะมีผู้ศึกษากันมาก ผลการศึกษาพบว่า ประสิทธิภาพในการดูดซับโลหะประจุบวกสัมพันธ์กับการเพิ่มค่าความเป็นกรด-เบสในสารละลาย และจะมีการสะสมได้มากน้อยแตกต่างกันตามชนิดของสิ่งมีชีวิต เช่น รา (Tsezos and Volesky 1981) สาหร่าย (Damall *et al* 1986; Kuyacak and Volesky 1989a, b; Holan and Volesky 1994)

นอกจากนี้ความเป็นกรด-เบสยังมีผลต่อรูปของโลหะ (species) เช่น ไอออนของแคดเมียมจะมีรูปแบบต่าง ๆ กันขึ้นอยู่กับความเป็นกรด-เบสของสารละลาย Leyva-Ramos *et al.* (1997) กล่าวว่า ที่ความเป็นกรด-เบสต่ำกว่า 7 แคดเมียมจะอยู่ในรูปแคดเมียมไอออน ( $\text{Cd}^{2+}$ ) เป็น

ส่วนใหญ่ แต่ที่ความเป็นกรด-เบสสูงขึ้น ไอออนของแคดเมียมจะมีการรวมตัวกับโมเลกุลของน้ำเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนชนิดต่าง ๆ เช่น  $\text{Cd}(\text{OH})^+$ ,  $\text{Cd}(\text{OH})_2$  และ  $\text{Cd}(\text{OH})_3^-$

ถ้าค่าความเป็นกรด-เบสสูงกว่าค่า isoelectric point binding site ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูป dissociated form สามารถแลกเปลี่ยน  $\text{H}^+$  กับไอออนโลหะในสารละลายได้ การดูดซับไอออนโลหะที่ผิวเซลล์คำนวณได้จากความหนาแน่นของ functional groups และการเกิด deprotonation ของ active site

Carboxyl groups มีความสามารถในการจับกับไอออนโลหะได้มากที่สุดเพราะเป็น groups ที่ถูก deprotonated ได้ในช่วงความเป็นกรด-เบสกว้าง ดังนั้นความสามารถในการจับกับไอออนโลหะจึงขึ้นอยู่กับความเป็นกรด-เบส ซึ่งมีผลต่อการมีส่วนร่วมของ functional groups ในการจับกับไอออนโลหะ :

pH 2 – 5 – carboxyl group

pH 5 – 9 – carboxyl and phosphate group

pH 9 – 12 – carboxyl, phosphate and hydroxyl (or amine) group

Crist *et al.* (1981) รายงานว่าสาหร่ายมี Zero-point charge หรือ isoelectric point เกิดขึ้นที่ความเป็นกรด-เบส 3 ค่าความเป็นกรด-เบสสูงกว่านี้ ผิวเซลล์ของสาหร่ายมีประจุเป็นลบ

Yan and Viraraghavan (2003) พบว่ารา *Muco rouxii* จับกับแคดเมียมได้มากขึ้นเมื่อความเป็นกรด-เบสมากขึ้น

Gong *et al.* (2005) พบว่าการดูดซับตะกั่วของ *Spirulina maxima* ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-เบส ค่าความเป็นกรด-เบสที่ทำให้เกิดการดูดซับสูงสุดคือ 5.5 เวลาที่การดูดซับสูงสุดคือ 60 นาที และสามารถลดปริมาณตะกั่วลงได้ 84 %ของมวลชีวภาพ สำหรับ *Spirulina (Arthrospira) platensis* ความสามารถในการดูดซับของแคดเมียมเข้าสู่เซลล์ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-เบสเช่นกัน และค่าที่เหมาะสมคือ 7 (Rangsayatorn *et al.* 2002)

Romera *et al.* (2007) ศึกษาความสามารถในการดูดซับแคดเมียม นิกเกิล สังกะสี ทองแดง และตะกั่ว ของสาหร่ายสีเขียว สีน้ำตาล และสีแดงอย่างละ 2 ชนิด (*Codium vermilara*, *Spirogyra insignis*, *Asparagopsis armata*, *Chondrus crispus*, *Fucus spiralis*, *Ascophyllum nodosum*) พบว่าความเป็นกรด-เบส 6 เหมาะสำหรับการดูดซับแคดเมียม นิกเกิล และสังกะสี และความเป็นกรด-เบส 5 สำหรับการดูดซับทองแดง และตะกั่ว ความเข้มข้นของสาหร่ายที่น้อยที่สุดและดีที่สุดคือ 0.5 กรัม/ลิตร การดูดซับสอดคล้องกับ Langmuir model โดยมีค่าการดูดซับได้ดีเรียงลำดับจากมากมาน้อยดังนี้ ตะกั่ว แคดเมียม ทองแดง สังกะสีและนิกเกิล สาหร่ายสีน้ำตาลดูดซับได้น้อยที่สุด และสาหร่าย *F. spiralis* ดูดซับได้ดีที่สุด

### 3.11.2 อุณหภูมิ

กระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์เกิดได้ที่อุณหภูมิไม่สูงมากนัก เนื่องจากองค์ประกอบภายในเซลล์ประกอบด้วยโปรตีนที่สามารถทนความร้อนได้ระดับหนึ่ง หากอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้โปรตีนเสียสภาพ ซึ่งอาจมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการดูดซับโลหะน้อยลงหรือเสียไป นอกจากนี้อุณหภูมียังมีผลต่อปริมาณกรดไขมัน ไม่อิมตัวทั้งหมดซึ่งองค์ประกอบของเซลล์ (McLamon-Riches *et al.* 1998) และค่าออกซิเจนละลายในน้ำ (dissolved oxygen) เมื่ออุณหภูมิสูงจะทำให้ค่าออกซิเจนละลายในน้ำลดลง สาหร่ายจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่ต้องใช้ออกซิเจนในการหายใจ ดังนั้นจึงอาจส่งผลกระทบต่อสังเคราะห์แสง หรือกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ของสาหร่าย ทั้งนี้ความสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิได้มากน้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย

การศึกษาเกี่ยวกับอุณหภูมิต่อการสะสมโลหะยังมีความขัดแย้งกันอยู่ แต่ส่วนใหญ่จะรายงานว่าอุณหภูมิต่อการสะสมโลหะที่ผนังเซลล์หรือที่ผิวเซลล์ แต่จะมีผลต่อการสะสมโลหะที่ผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ซึ่งจะเกิดขึ้นกับเซลล์ที่มีชีวิต และอุณหภูมิที่สะสมได้ดีที่สุดจะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโต ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย

Inthorn *et al.* (1996) รายงานว่าจากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสะสมแคดเมียมของเซลล์มีชีวิตของ *Tolypothrix tenuis* พบว่าอุณหภูมิตั้ง 2-45 องศาเซลเซียสไม่มีผลต่อการสะสมแคดเมียม อาจเป็นเพราะกลไกการสะสมแคดเมียมโดย *T. tenuis* เกิดการสะสมที่ผิวเซลล์เท่านั้น โดยไม่ขึ้นกับกระบวนการเมตาบอลิซึม อุณหภูมิจึงไม่มีผลต่อการสะสมแคดเมียม

Rangsayatorn *et al.* (2002) รายงานว่าความสามารถในการนำแคดเมียมเข้าสู่เซลล์ของสาหร่าย *Spirulina (Arthrospira) platensis* ในช่วงอุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียสไม่ขึ้นกับอุณหภูมิ การดูดซับไอออนโลหะไม่แตกต่างกัน

### 3. 11.3 ระยะเวลาการดูดซับ

การดูดซับโลหะนั้นมีทั้งแบบที่เป็น active และ passive ทั้งนี้แบบ passive เกิดขึ้นได้รวดเร็ว สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในเซลล์ที่มีและไม่มีชีวิต ส่วน active นั้นเกิดขึ้นได้ช้ากว่าและเกิดได้เฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้นระยะเวลาที่มีการดูดซับจะเป็นตัวบ่งบอกวิธีการดูดซับ และด้วยความแตกต่างทางโครงสร้างเซลล์และประจุของโลหะทำให้ความสามารถในการดูดซับ และขจัดโลหะออกของเซลล์แตกต่างกันไป ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาหาจุดสมดุลของปฏิกิริยาในการจับกันระหว่างโลหะกับสาหร่ายแต่ละชนิด ดังเช่นระยะเวลาในการสัมผัสสารละลายตะกั่วและแคดเมียมจนถึงจุดอิ่มตัวของ *Phormidium angustissimum* คือ 30 นาทีแรก ส่วน *Chlorella vulgaris* คือ 15 นาทีสำหรับสารละลายตะกั่ว และ 5 นาทีสำหรับแคดเมียม (สุนิรัตน์ เรื่องสมบูรณ์ 2547) Chu *et al.* (1997) พบว่ากระบวนการดูดซับของ *C. vulgaris* เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ในเวลา 2-3 นาที

Gong (2005) พบว่า *S. maxima* ดูดซับสารละลายตะกั่วจนเกิดสมดุลภายใน 60 นาที สัดส่วนการนำตะกั่วออกจากสารละลายสูงสุดประมาณ 84 %

3. 11.4 ความเข้มข้นของตัวดูดซับ

ปริมาณการนำเข้าโลหะขึ้นอยู่กับน้ำหนักมวลชีวภาพของตัวดูดซับ Hamdy 2004 ทดลองกับสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลและสีแดง พบว่าปริมาณการนำเข้าโลหะขึ้นอยู่กับน้ำหนักมวลชีวภาพของสาหร่าย ยกเว้น *Laurncia obtusa* ที่พบว่าการนำเข้าไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มมวลชีวภาพของสาหร่ายจาก 5 เป็น 50 มิลลิกรัม

3.12 แบบจำลองสมการทางคณิตศาสตร์ของการสะสมโลหะหนักด้วยจุลินทรีย์

Adsorption isotherm เป็นคำที่ใช้บอกถึงคุณสมบัติของพื้นผิว absorbent ว่ามีประสิทธิภาพในการดูดซับมากแค่ไหน งานวิจัยในปัจจุบันมุ่งเน้นในส่วนของหลักการและกระบวนการในการดูดซับ การออกแบบกระบวนการบำบัดเพื่อลดปริมาณโลหะให้มีประสิทธิภาพ ต้องมีการวางแผนรองรับเหตุการณ์ทุกรูปแบบ การออกแบบต้องอาศัยการจำลองบนคอมพิวเตอร์ โดยใช้โมเดลทางคณิตศาสตร์ สมการ isotherm มีหลายสมการ ที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน คือ Langmuir และ Freundlich adsorption isotherms ทั้งสองโมเดลนี้ไม่ซับซ้อน ถ้าโมเดลเหล่านี้ fit กับข้อมูลดีก็ไม่จำเป็นต้องใช้โมเดลอื่นๆที่ซับซ้อน ผู้วิจัยจะนำสมการ Langmuir และ Freundlich มาใช้ตรวจสอบผลการศึกษารั้ครั้งนี้ เพื่อบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการดูดซับแคดเมียมและความเข้มข้นสมดุลของสารละลาย (equilibrium concentration)

Langmuir equation เหมาะกับการดูดซับบนผิวชนิดเดียว (monolayer sorption) บนพื้นผิวที่จำนวน sites แน่นอนและเหมือนกัน (homogenous)

$$X/M \text{ หรือ } q = \frac{q_m K_A C}{(1+ K_A C)} \dots\dots\dots(1)$$

เพื่อสามารถหาค่า  $K_A$  และ  $q_m$  ต้องเปลี่ยนรูปสมการ (1) เป็นสมการเส้นตรง

$$\frac{C}{q} = \frac{C}{q_m} + \frac{1}{K_A q_m} \dots\dots\dots(2)$$

$$\frac{1}{q} = \frac{1}{q_m} + \frac{1}{K_A q_m} \left( \frac{1}{C} \right) \dots\dots\dots(3)$$

โดย

- q = ปริมาณสารที่ถูกดูดซับ/ปริมาณตัวดูดซับ (มิลลิกรัม/กรัม)
- X = ปริมาณสารที่ถูกดูดซับ (มิลลิกรัม)
- M = น้ำหนักตัวดูดซับ (กรัม)
- q<sub>m</sub> = ปริมาณสารที่ถูกดูดซับ/ปริมาณตัวดูดซับ ณ จุดสมดุล (มิลลิกรัม/กรัม)
- K<sub>A</sub> = ค่าคงที่ของการดูดซับ (equilibrium absorption constant)  
(ลิตรของตัวดูดซับ/มิลลิกรัมของสาร)
- C = ความเข้มข้นของสารที่จุดสมดุล (มิลลิกรัม/ลิตร)

**Freundlich isotherm** ใช้ธิบายการดูดซับได้ดี โดยเหมาะกับสมมุติฐานว่าเป็นการดูดซับแบบ multilayer ที่พื้นผิวเป็นแบบ heterogeneous

$$X/M \text{ หรือ } Q = K_f C^{1/n} \dots\dots\dots(4)$$

เพื่อสามารถหาค่า K<sub>f</sub> และ n เปลี่ยนรูปสมการ (4) เป็นสมการเส้นตรง

$$\text{Log}(X/M) = \log K_f - 1/n \log C \dots\dots\dots(5)$$

โดย

- X = ปริมาณสารที่ถูกดูดซับ (มิลลิกรัม)
- M = น้ำหนักตัวดูดซับ (กรัม)
- K<sub>f</sub> และ n = Freundlich constants
- K<sub>f</sub> = indicator of adsorption capacity
- n = indicator of adsorption intensity
- C = ความเข้มข้นสุดท้าย (มิลลิกรัม/ลิตร)

### 3.13 ชีววิทยาของ *Kirchneriella lunaris*

*Kirchneriella lunaris* จัดจำแนกได้ดังนี้

Superkingdom Eukaryotae

Kingdom Plantae

Subkingdom Thallobionta

Division Chlorophyta

Class Chlorophyceae

Order Chlorococcales

Family Oocystaceae

Genus *Kirchneriella*

Species *Kirchneriella lunaris*



ภาพที่ 4 แสดงลักษณะของ *K. lunaris*

จันต *Kirchneriella* (ภาพที่ 4) เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวอยู่เดี่ยว ๆ หรืออยู่รวมเป็นกลุ่มเซลล์ เมื่ออยู่เป็นกลุ่ม กลุ่มเซลล์ประกอบด้วยเซลล์จำนวน 2, 4, 8, 16 หรือ 32 เซลล์ เรียงตัวกันทั้งแบบเป็นหรือไม่เป็นระเบียบ เซลล์มีสีเขียวหรือเขียวอ่อน มีเมือกใสหุ้ม เซลล์โค้งคล้ายรูปพระจันทร์เสี้ยว หรือคล้ายตัวเอส หรือบิดเป็นเกลียว ปลายเซลล์ทั้งสองด้านมน มีเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ประมาณ 3-4 ไมครอน ( $\mu\text{m}$ ) เซลล์ยาวประมาณ 10-14 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลางกลุ่มเซลล์ประมาณ 100-250 ไมครอน (ลัดดา วงศ์รัตน์ 2544) เซลล์ส่วนใหญ่จะหันด้านนูนแตะกับเซลล์ที่อยู่ติดกัน ภายในเซลล์มี 1 คลอโรพลาสต์ ไพรินอยด์อาจมี 1 อันหรือไม่มี มีนิวเคลียสอยู่กึ่งกลางเซลล์

สาหร่ายจิ้งฉง *Kirchneriella* ดำรงชีวิตเป็นแพลงก์ตอน หรืออยู่ติดกับสาหร่ายอื่น ๆ ในน้ำตื้น ในทะเลสาบ หรือในแหล่งน้ำนิ่ง มีจำนวนทั้งหมด 14 ชนิด แต่ในประเทศไทยพบเพียง 2 ชนิด คือ *K. lunaris* และ *K. obesa* (Lewmanomont *et al.* 1995) สาหร่ายจิ้งฉงนี้ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายตั้งแต่ 100 เท่าขึ้นไป ไม่สามารถนำมาใช้บ่งชี้คุณภาพน้ำได้ (ยูวดี พิรพรพิศาล 2548)

### 3.14 สาเหตุที่เลือกศึกษาสาหร่ายสีเขียว *K. lunaris*

ในต่างประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา ประเทศในกลุ่มยุโรป ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ มีการกำหนดสาหร่ายมาตรฐานเพื่อใช้ในการตรวจสอบคุณภาพน้ำโดยยอมรับให้ใช้ *Pseudokirchneriella subcapitata* และ *Selenastrum capricornutum* เป็นสาหร่ายมาตรฐานที่ใช้ทดสอบสารพิษ รวมทั้งโลหะหนักในแหล่งน้ำจืดตาม protocol ของ EEC, ISO, OECD, US EPA, APHA, AWWA and WPCF และอื่น ๆ *K. lunaris* เป็นสาหร่ายที่พบในประเทศไทยมีข้อมูลด้านชีววิทยาน้อย มีโครงสร้างภายนอก ขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกับ *Pseudokirchneriella subcapitata* และ *Selenastrum capricornutum* มาก น่าจะนำมาศึกษาการตอบสนองต่อสารพิษเพื่อประโยชน์ในการใช้เป็นตัวทดสอบสารพิษ อีกทั้งในประเทศไทยยังไม่มีกำหนดชนิดสาหร่ายน้ำจืดมาตรฐาน เพื่อใช้ทดสอบความเป็นพิษของไอออนโลหะในแหล่งน้ำจืด ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นอย่างหนึ่งที่จะต้องมียังมีชีวิตมาตรฐานในการตรวจสอบคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบระดับความเป็นพิษ เพราะถ้าหากปล่อยให้แหล่งน้ำมีสภาพเสื่อมโทรมจากการปนเปื้อนจะส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม สภาพเศรษฐกิจและสังคม ทัศนียภาพ คุณภาพชีวิต และสุขภาพอนามัยของประชาชน รวมทั้งระบบนิเวศของสิ่งมีชีวิต

*K. lunaris* เป็นสาหร่ายขนาดเล็กที่พบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำ มีสัดส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง ทำให้มีการสัมผัสกับสารละลายได้มากกว่าสาหร่ายขนาดใหญ่ สามารถผลิตเมือกหุ้มล้อมรอบเซลล์ คาดว่าน่าจะมีความสามารถในการดูดซับ โลหะหนักมากกว่าสาหร่ายที่ไม่มีเมือก เนื่องจากเมือกนั้นจัดเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ ที่มีคุณสมบัติเป็นแอนไอออน สามารถจับกับไอออนประจุบวกของโลหะหนักชนิดต่าง ๆ ได้ โดยเฉพาะไอออนที่มีประจุ 2 จากที่กล่าวมาแล้วสาหร่ายสามารถดูดซับไอออนของธาตุหรือโลหะต่าง ๆ ผ่านกระบวนการต่าง ๆ หลากหลายกระบวนการ เช่น การสะสมไว้ภายนอก การรวมเป็นสารประกอบ (complexation) การดูดซับไว้ที่ผิวเซลล์ การลำเลียง (transport) ผ่านเซลล์เมมเบรน และ ปฏิกริยา oxidation – reduction เป็นต้น นอกจากนี้

ยังมีรายงานว่าสาหร่ายที่มีชีวิตสามารถดูดซับโลหะได้มากกว่าสาหร่ายแห้ง ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้จึงเลือกสาหร่าย *K. lunaris* ที่มีชีวิตมาทำการศึกษาในงานวิจัยนี้

### 3.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสาหร่าย และโลหะหนัก

Gadd and Griffith (1978) รายงานว่าโลหะหนักทำลายโปรตีนและกระตุ้น hydrolytic activity ของเอนไซม์ protease

Sakaguchi *et al.* (1979) พบว่าการสะสมแคดเมียมด้วย *Chlorella regularis* ขึ้นอยู่กับสภาพผิวเซลล์จูลินทรีย์

Les and Walker (1984) ศึกษาการสะสมแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี โดย *Chroococcus parisi* พบว่าประมาณ 90 % ของการสะสมโลหะหนักเป็นการดูดซับที่ผิวเซลล์

Skowronski (1984b) ศึกษาการสะสมแคดเมียมด้วย *Stichococcus bacillaris* พบว่า 80 % ของการสะสมโลหะหนักเกิดขึ้นที่ผิวเซลล์ ความเข้มข้นของโลหะในสารละลายจะอยู่ในสภาวะสมดุลกับความเข้มข้นของโลหะที่ถูกดูดซับบนผิวเซลล์

Dragos *et al.* (1988) พบว่า *Monoraphidium contortum* และ *K. subcapitata* หลังจากรับในอาหารที่มีสังกะสี 0.75 มิลลิกรัม/ลิตร และแคดเมียม 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 14 วัน จำนวนเซลล์ของ *M. contortum* ที่แขวนลอยลดลง 50 % เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีโลหะทั้ง 2 ชนิดที่มีความเข้มข้นเดียวกันพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างโลหะ 2 ชนิดไม่ได้เป็นแบบ antagonistic และเมื่อทดลองกับ *K. subcapitata* ได้ผลทำนองเดียวกัน

Issa *et al.* (1995) ศึกษาการเติบโตของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีโลหะหนักและแคลเซียม พบว่าการเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมแคลเซียม อัตราการเติบโตจะดีกว่าเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีแคลเซียม

Lombardi *et al.* (1999) พบว่า *K. aperta* สามารถปล่อยสารอินทรีย์ออกมานอกเซลล์ได้ ซึ่งจะฟอร์มเป็นสารประกอบเชิงซ้อนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และ โมเลกุลสูงร่วมกับทองแดง แต่ในการจับกับสารตะกั่วพบว่าสามารถฟอร์มเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับสารอินทรีย์น้ำหนักโมเลกุลสูงเพียงอย่างเดียว และยังพบว่าผนังเซลล์ของ *K. aperta* ถูกหุ้มด้วย mucilaginous capsule ที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งมีองค์ประกอบเป็น manose, rhamnose และ uronic acids

Inthorn *et al.* (2002) รายงานว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorococcum* sp. ดูดซับแคดเมียมออกจากน้ำได้ 94 %, *Fischerella* sp. 91 %, *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* 89 %, *Scenedesmus acutus* 88 % และ *Kirchneriella* sp. 80 %

Lombardi *et al.* (2002) รายงานว่า *K. aperta* Teiling ซึ่งเป็นสาหร่ายที่สามารถสร้างเมือก (mucilaginous capsule) หุ้มภายนอกเซลล์ และปล่อยสารอินทรีย์ออกไปนอกเซลล์ เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารที่มีทองแดง พบว่าเมือกและสารอินทรีย์สามารถจับกับไอออนของทองแดงด้วยกลไกแบบ passive ทำให้ *K. aperta* ทนต่อพิษของทองแดงได้มากขึ้น ดังนั้นความเป็นพิษสัมพันธ์กับไอออนทองแดงอิสระในสารละลาย ไม่ใช่ปริมาณทองแดงละลายทั้งหมด และพบว่า ค่า  $EC_{50}$  ของทองแดงต่อ *K. aperta* ที่เวลา 96 ชั่วโมง มีค่า  $10^{-9.22}M$

Perez-Rama *et al.* (2002) ศึกษาการดูดซับแคดเมียมของ *Tetraselmis suecica* ซึ่งเป็นสาหร่ายทะเลขนาดเล็กที่มีชีวิต ทดสอบกับแคดเมียมที่ความเข้มข้น 0.6, 3, 6, 15, 30 และ 45 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า  $EC_{50}$  มีค่า 7.9 มิลลิกรัมแคดเมียมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน ความสามารถในการดูดซับแคดเมียมพบว่าสัมพันธ์กับความเข้มข้นของโลหะและเวลาการดูดซับ โดยเมื่อความเข้มข้นสูงความสามารถในการดูดซับไว้ที่ผิวเซลล์ก็สูงเช่นเดียวกัน และเกิดขึ้นภายใน 2 วันและหลังจากนั้นการดูดซับจะลดลง กลายเป็นการสะสมภายในเซลล์แทน

Tein (2002) ศึกษาการดูดซับตะกั่ว ทองแดงและแคดเมียม ซึ่งมีประจุ  $2+$  พบว่า *Oscillatoria limnetica*, *Anabaena spiroides*, *Eudorina elegans* และ *Chlorella vulgaris* มีการดูดซับเป็นไปตาม Freundlich model แสดงว่ามี functional binding sites หลายแบบบนผิวเซลล์สาหร่าย สาหร่ายทั้ง 4 ชนิดดูดซับตะกั่วได้ดีที่สุด การดูดซับผันแปรตามความเข้มข้นของไอออนโลหะ เริ่มต้น สัดส่วนของพื้นผิวและน้ำหนักแห้งเป็นเครื่องกำหนดประสิทธิภาพการดูดซับและกลไกในการดูดซับ การแข่งขันของไอออนโลหะต่อ binding sites บนผิวสาหร่ายแตกต่างกัน ตามชนิดของสาหร่ายและไอออนโลหะ

Mosulén *et al.* (2003) ศึกษาความเป็นพิษของโลหะต่อ *Chlamydomonas reinhardtii* พบว่า แคดเมียม หรือ ทองแดงมีพิษต่อการเติบโตของสาหร่ายที่ความเข้มข้น  $300 \mu M$  และสาหร่ายสามารถสะสมแคดเมียมและทองแดงได้  $0.90 \pm 0.02$  และ  $0.64 \pm 0.02$  % ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ทั้งแคดเมียม หรือ ทองแดงยับยั้งอัตราการนำไนเตรตไปใช้ 20 % และเฉพาะทองแดงเท่านั้นที่เพิ่มอัตราการนำซัลเฟตไปใช้ถึง 40 %

Lombardi *et al.* (2005) พบว่า *Scenedesmus acuminatus* สามารถปล่อยทั้งสารอินทรีย์ละลาย และ exopolysaccharides ออกไปนอกเซลล์ สารอินทรีย์ละลายที่ปล่อยออกจาก *Scenedesmus acuminatus* มีทั้งสาร โมเลกุลต่ำและสูง สารอินทรีย์โมเลกุลต่ำสามารถจับกับทองแดงได้แน่นกว่าสารอินทรีย์โมเลกุลสูง และการทำให้เซลล์ตายด้วย freeze-drying จะทำให้โครงสร้างโมเลกุลของ exopolysaccharides เปลี่ยนแปลง แต่ไม่มีผลต่อการจับกับทองแดง

### บทที่ 3

#### อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

##### อุปกรณ์การวิจัย

1. วัสดุ
  - 1.1 บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 50, 100, 250 และ 1000 มิลลิลิตร
  - 1.2 จานแก้ว (petri dish)
  - 1.3 หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร
  - 1.4 กรวยแก้ว (glass funnel)
  - 1.5 ปิเปต (pipette) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
  - 1.6 หลอดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent lamp) ขนาด 60 วัตต์
  - 1.7 ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 25, 50, 100 และ 1000 มิลลิลิตร
  - 1.8 กระจกปิดสไลด์ (cover slide)
  - 1.9 สไลด์นับจำนวนเซลล์ (sedgwich rafter cell) ขนาด 1 มิลลิลิตร
  - 1.10 สไลด์หลุม (concave slide)
  - 1.11 ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 125, 250 และ 1000 มิลลิลิตร
  - 1.12 ถ้วยกระเบื้อง (crucible)
  - 1.13 กระดาษกรองใยแก้ว whatman (glass membrane filter )
2. อุปกรณ์
  - 2.1 ปัมอากาศ (air pump)
  - 2.2 ตัวนับจำนวน (counter)
  - 2.3 เครื่องเขย่า (shaker)
  - 2.4 เครื่องวัดความเข้มของแสง (lux meter)
  - 2.5 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter)

- 2.6 เครื่องชั่งสาร (analytical balance)
- 2.7 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- 2.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- 2.9 ตู้อบ (hot air oven)
- 2.10 ตู้ดูดความชื้น (desiccator)
- 2.11 เตาไฟฟ้า (hot plate)
- 2.12 เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven)
- 2.13 กล้องดิจิทัล (digital camera)
- 2.14 กล้องจุลทรรศน์ แบบเลนส์ประกอบ (compound microscope)
- 2.15 เครื่องวัดแสง (spectrophotometer)
- 2.16 Inductively Coupled Plasma Spectroscopy (ICPS)

### 3. สารเคมี

- 3.1  $\text{NH}_4\text{NO}_3$
- 3.2  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 3.3  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- 3.4  $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 3.5  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 3.6  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 3.7  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 3.8  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 3.9  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 3.10  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 3.11  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 3.12  $\text{CdCl}_2$
- 3.13 Glutaraldehyde
- 3.14  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 3.15  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 3.16 Conc  $\text{HNO}_3$
- 3.17  $\text{H}_2\text{O}_2$

## วิธีการศึกษา

### 1. การเตรียมการทดลอง

#### 1.1 การเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ทำความสะอาดเครื่องแก้วและอุปกรณ์ด้วยผงซักฟอก แล้วนำมาแช่กรดเกลือความเข้มข้น 10 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคด้วยการนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

#### 1.2 การเตรียมสารอาหารเลี้ยง *K. lunaris*

ใช้สารอาหารสูตร Modified Complete Medium (MCM)

สูตรอาหาร *Modified Complete Medium*

$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.30 กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.30 กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.10 กรัม
*Trace element	10.00 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 6.8 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

\*Trace element ประกอบด้วย

$\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	540.00 มิลลิกรัม
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	500.00 มิลลิกรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	26.55 มิลลิกรัม
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.02 มิลลิกรัม
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01 มิลลิกรัม
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.30 มิลลิกรัม
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.050 มิลลิกรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.04 มิลลิกรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร

### 1.3 การเตรียมสาหร่าย

สาหร่ายที่ใช้ในการศึกษาคือ *Kirchneriella lunaris* ซึ่งแยกได้จนปลอดเชื้อ ด้วยวิธี streak plating จากสระแก้วซึ่งเป็นแหล่งน้ำผิวดินขนาดใหญ่ในมหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ เลี้ยง *K. lunaris* ในอาหาร MCM 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร เพื่อทำเป็น stock culture แล้วนำมาวางไว้ในที่มีแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสงประมาณ 1,300 ลักซ์ ช่วงเวลาสว่างและช่วงเวลามืด (L:D) 12:12 ชั่วโมง อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส

### 1.4 การเตรียมสารละลายของแคดเมียม

เตรียม stock solution ของแคดเมียม จาก  $\text{CdCl}_2$  ด้วยน้ำ Mili-Q sterile ที่กรองผ่าน Membrane filter (0.22 Micron) ให้ได้สารละลาย  $\text{CdCl}_2$  ที่มีความเข้มข้นแคดเมียมไอออน 1000 ppm เป็นสารละลาย stock แล้วนำสารละลาย stock ไปเตรียมสารละลายแคดเมียมตามความเข้มข้นที่ใช้ทดลองโดยเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการศึกษาทดลอง

## 2. การศึกษาลักษณะทางโครงสร้างของ *K. lunaris*

2.1 การศึกษาขนาดเซลล์ของ *K. lunaris* ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ (Compound microscope)

หยดอาหารที่มีเซลล์ *K. lunaris* ลงบนกระจกสไลด์ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ ทำการวัดขนาดของเซลล์ด้วย ocular micrometer ที่กำลังขยาย 400 เท่า บันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัล

2.2 การศึกษาโครงสร้างภายนอกของ *K. lunaris* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)

เตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะภายนอกเซลล์ โดยปั่นตกตะกอน *K. lunaris* ด้วยเครื่องปั่นตกตะกอนความเร็ว 3,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 จำนวน 2 ครั้ง

#### 2.2.1 หยดปฏิกิริยาภายในเซลล์ (Fixation)

หยดปฏิกิริยาภายในเซลล์ *K. lunaris* ครั้งแรก (prefix) ด้วย 2.5 % Glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ล้างสารละลาย Glutaraldehyde ออกด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 นาน 5 นาที และปั่นตกด้วยความเร็ว 3,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ทำ 3 ครั้ง

### 2.2.2 การแทนที่น้ำในเซลล์ (Dehydration)

แทนที่น้ำในเซลล์ *K. lunaris* ด้วยแอลกอฮอล์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตามลำดับดังนี้ 10, 30, 50, 70, 90 และ 100 % ตามลำดับ ครั้งละ 15 นาที 2 ครั้ง (ในกรณีที่ทำไม้ทน ให้หยุดปฏิบัติไว้ที่แอลกอฮอล์ 70 %)

### 2.2.3 การทำให้เซลล์แห้ง (Drying)

ทำให้เซลล์ *K. lunaris* แห้ง โดยวิธี Air dry

### 2.2.4 เพิ่มการนำประจุให้กับตัวอย่าง (Evaporation)

เคลือบตัวอย่าง *K. lunaris* ที่ทำให้แห้งแล้วด้วยไอคาร์บอนใน vacuum evaporator เป็นเวลา 20 นาที และเคลือบทองใน Ion coating เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องกราด (SEM)

## 3. การศึกษาอัตราการเติบโต ( $\mu$ , growth rate) และสภาพการเลี้ยง

ใส่ *K. lunaris* ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร MCM ปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร ที่เติมและไม่เติม EDTA เพราะในการทดลองโลหะจะต้องไม่มีการเติม EDTA (AWWA WEF 1998) ให้จำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร จำนวน 4 ขวด วางขวดบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที ได้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ช่วงเวลาสว่างและช่วงเวลามืด 12:12 ชั่วโมง อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส วัดการเติบโตของเซลล์ในวันที่ 3, 5, 7, 10, 12 และ 14 ด้วยการนับเซลล์โดยใช้ Sedgewick-rafter slide ขนาดความจุ 1 มิลลิลิตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ ที่กำลังขยาย 200 เท่า จนกระทั่งจำนวนเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าร้อยละ 5 คำนวณหาอัตราการเติบโต ( $\mu$ , growth rate) ดังสมการ

$$\mu \text{ (day}^{-1}\text{)} = \text{Ln}(N_t - N_0) / T_t - T_0$$

$$\text{Doubling time (day)} = \text{ln}(2) / \mu$$

$$= 0.69 / \mu$$

$$\text{Division per day} = \mu / 0.69$$

$$\text{Generation time (hour)} = \text{Doubling time (day)} \times 24$$

$\mu$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์การเติบโต (ต่อวัน)

$N_t$  คือจำนวนเซลล์ที่เวลา  $t$

$N_0$  คือจำนวนเซลล์เริ่มต้น

$T_1$  คือเวลา  $t$

$T_0$  คือเวลาเริ่มต้น

วัดค่าความเป็นกรด-เบส และอุณหภูมิก่อนการทดลองและทุกครั้งที่ได้รับผลการทดลอง

#### 4. การศึกษาความเข้มข้นของแคดเมียมที่ทำให้ *K. lunaris* มีการเติบโตลดลง 50 % ในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ( $EC_{50}$ )

การศึกษาความเข้มข้นของแคดเมียมที่ทำให้ *K. lunaris* รอดชีวิต 50 % ในเวลา 72 ชั่วโมง ( $EC_{50}$ ) ตามวิธีการของ AWWA WEF (1998) โดยนำเซลล์ *K. lunaris* ระยะ early log phase จาก stock culture ใส่ในขวดชมพูขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MCM ปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร ซึ่งไม่มีการเติม EDTA แต่มีโลหะหนักแคดเมียมไอออนซึ่งเตรียมจาก  $CdCl_2$  ความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ ดังนี้ 0.025, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 มิลลิกรัม/ลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ให้ *K. lunaris* มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร วัดการเติบโตทุก 24 ชั่วโมง ด้วยการนับจำนวนเซลล์เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ช่วงเวลาสว่างและช่วงเวลามืด 12:12 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์โดยใช้ Sedgewick-rafter slide ขนาดความจุ 1 มิลลิลิตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ ที่กำลังขยาย 200 เท่า และวิเคราะห์ความเข้มข้นของแคดเมียมไอออนที่ทำให้ค่าอัตราการเติบโตลดลง 50 % ( $EC_{50}$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ด้วยโปรแกรม Probit analysis ซึ่งจะเป็นการบอกความไวในการตอบสนองต่อแคดเมียมของ *K. lunaris* วัดความเป็นกรด-เบสและอุณหภูมิ ก่อนและสิ้นสุดการทดลอง

#### 5. การศึกษาระยะเวลาเข้าสู่สมดุล (equilibrium time) ของการดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris*

เตรียมอาหาร MCM ปลอดเชื้อ ที่ไม่เติม EDTA ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ที่มีแคดเมียมไอออนความเข้มข้น 1 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ในขวดชมพูขนาด 1 ลิตร ใส่ *K. lunaris* ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร ลงในอาหารที่เตรียมไว้ เลี้ยงที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา เขย่าด้วยเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที ทำ 4 ซ้ำ เก็บตัวอย่างน้ำ 10 มิลลิลิตร ในช่วงเวลาดังนี้ 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 240 นาที 5 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์โดยใช้ Sedgewick-rafter slide ขนาดความจุ 1 มิลลิลิตร ภายใต้กล้อง

จุลทรรศน์แบบหัวกลับ ที่กำลังขยาย 200 เท่า และกรองแยกสาหร่ายออกด้วยกระดาษกรองใยแก้ว GF/C ที่ได้อบและชั่งน้ำหนักไว้แล้ว วิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมไอออนที่เหลือในสารละลายด้วย ICPS นำสาหร่ายที่กรองได้ ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำกระดาษกรองใยแก้ว GF/C ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้เซลล์แห้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ปลดปล่อยให้กระดาษกรอง GF/C เย็นลงในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักกระดาษกรอง GF/C นำค่าที่ได้มาคำนวณหาน้ำหนักแห้งของ *K. lunaris* และค่าการดูดซับแคดเมียมไอออนของ *K. lunaris* ด้วยสมการ (Rangsayatorn *et al.* 2002)

$$\% \text{การดูดซับแคดเมียม (\%)} = (C_i - C_f / C_i) \times 100$$

$C_i$  = ความเข้มข้นแคดเมียมไอออนเริ่มต้น (มิลลิกรัม/ลิตร)

$C_f$  = ความเข้มข้นแคดเมียมไอออนเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (มิลลิกรัม/ลิตร)

$$\text{ค่าการดูดซับแคดเมียม (q)} = (C_i - C_f)V/W$$

q = ค่าการดูดซับแคดเมียมไอออน (มิลลิกรัม/กรัม)

หรือความสามารถในการดูดซับ (adsorption capacity)

$C_i, C_f$  = ความเข้มข้นของแคดเมียมไอออนเริ่มต้นและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (มิลลิกรัม/ลิตร)

V = ปริมาณของสารละลาย (ลิตร)

W = น้ำหนักแห้งของสาหร่าย (กรัม)

พลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับค่าการดูดซับแคดเมียมไอออนและเปอร์เซ็นต์การดูดซับ

#### 6. การศึกษาผลของจำนวนเซลล์ต่อเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris*

เตรียมอาหาร MCM ปลดเชื้อที่ไม่เติม EDTA แต่มีแคดเมียมไอออนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 50 มิลลิตร ในขวดรูปชมพู่ 100 มิลลิตร แต่ละขวดใส่ *K. lunaris* ความหนาแน่นของจำนวนเซลล์เริ่มต้นแตกต่างกันดังนี้  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  และ  $10^8$  เซลล์/มิลลิตร ทำ 3 ข้ำเข้าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 110 รอบ/นาที เลี้ยงที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ จนถึง equilibrium time ของการดูดซับโลหะจากผลการทดลองที่ 5 เมื่อสิ้นสุดการทดลองแยกเซลล์ *K. lunaris* ออกด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองใยแก้ว GF/C วิเคราะห์ปริมาณ

แคดเมียมไอออนที่เหลือในสารละลายด้วย ICPS จำนวนเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียมไอออนจากสมการในข้อ 5 พล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับเปอร์เซ็นต์การดูดซับ

#### 7. การศึกษาผลของความเป็นกรด-เบสต่อค่าการดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris*

เตรียมอาหาร MCM ปลอดเชื้อ ที่ไม่เติม EDTA ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่ปรับค่าความเป็นกรด-เบสแตกต่างกัน 5 ระดับ ดังนี้ 4, 5, 6, 7 และ 8 แต่ละค่าความเป็นกรด-เบส เติมแคดเมียมไอออนให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร แต่ละค่าความเป็นกรด-เบสทำ 3 ซ้ำ ใส่ *K. lunaris* ตามจำนวนเซลล์ที่มีการดูดซับแคดเมียมสูงสุดที่ได้จากการทดลองที่ 6 เลี้ยงที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ให้แสงตลอดเวลาที่ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 110 รอบ/นาที จนถึง equilibrium time ของการดูดซับโลหะจากผลการทดลองที่ 5 เมื่อสิ้นสุดการทดลองแยก *K. lunaris* ออกด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองใยแก้ว GF/C ที่ได้อบและชั่งน้ำหนักไว้แล้ว วิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมไอออนที่เหลือในอาหารด้วย ICPS นำ *K. lunaris* ที่กรองได้ ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำกระดาษกรองใยแก้ว GF/C ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้เซลล์แห้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ปล่อยให้กระดาษกรอง GF/C เย็นลงในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักกระดาษกรอง GF/C นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณแห้งของ *K. lunaris* และค่าการดูดซับแคดเมียมไอออนของ *K. lunaris* ด้วยสมการ (Rangsayatorn *et al.* 2002)

พล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรด-เบสกับค่าการดูดซับแคดเมียมไอออน

#### 8. การศึกษาค่าความสามารถในการดูดซับแคดเมียม (adsorption capacity) หรือค่าการดูดซับ

เตรียมอาหาร MCM ปลอดเชื้อที่ไม่เติม EDTA ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ตามค่าที่มีการดูดซับแคดเมียมสูงสุดที่ได้จากการทดลองที่ 7 เติมแคดเมียมความเข้มข้นในช่วง 1-300 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการทำ preliminary test แบ่งช่วงความเข้มข้นออกเป็น 7 ระดับ ดังนี้ (1, 5, 10, 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร) ใส่ *K. lunaris* ลงในอาหาร MCM ปลอดเชื้อที่ไม่เติม EDTA ใช้จำนวนเซลล์เท่ากับ  $1 \times 10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร โดยแต่ละความเข้มข้นทำการทดลองละ 3 ซ้ำ เลี้ยงที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ให้แสงตลอดเวลา ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 110 รอบ/นาที

เมื่อสิ้นสุดการทดลองแยก *K. lunaris* ออกด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองใยแก้ว GF/C ที่ได้อบและชั่งน้ำหนักไว้แล้ว วิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมไอออนที่เหลือในอาหารด้วย ICPS ล้างกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง สาหร่ายที่กรองได้ส่วนหนึ่งนำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส ให้เซลล์แห้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ปล่อยให้กระดาษกรอง GF/C เย็นลงในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นนำกระดาษกรองที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก คำนวณหาน้ำหนักแห้งของสาหร่ายนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าการดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris* ด้วยสมการ (Rangsayatorn *et al.* 2002) และพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแคดเมียมไอออนกับค่าการดูดซับ

เขียนสมการ isotherm ของ *K. lunaris* และทดสอบว่าสอดคล้องกับสมการของ Langmuir Isotherm หรือ Freundlich

สมการ Langmuir

$$X/M \text{ หรือ } q = \frac{q_m K_A C}{(1 + K_A C)}$$

$q$  = ปริมาณสารที่ถูกดูดซับ/ปริมาณตัวดูดซับ (มิลลิกรัม/กรัม)

$X$  = ปริมาณสารที่ถูกดูดซับ (มิลลิกรัม)

$M$  = น้ำหนักตัวดูดซับ (กรัม)

$q_m$  = ปริมาณสารที่ถูกดูดซับ/ปริมาณตัวดูดซับ ณ จุดสมดุล (มิลลิกรัม/กรัม)

$K_A$  = ค่าคงที่ของการดูดซับ (equilibrium absorption constant) (ลิตรของตัวดูดซับ/มิลลิกรัมของสาร)

$C$  = ความเข้มข้นของสารที่จุดสมดุล (มิลลิกรัม/ลิตร)

สมการ Freundlich

$$X/M \text{ หรือ } Q = K_f C^{1/n}$$

$X$  = ปริมาณสารที่ถูกดูดซับ (มิลลิกรัม)

$M$  = น้ำหนักตัวดูดซับ (กรัม)

$K_f$  และ  $n$  = Freundlich constants

$K_f$	= indicator of adsorption capacity
$n$	= indicator of adsorption intensity
$C$	= ความเข้มข้นสุดท้าย (มิลลิกรัม/ลิตร)

## บทที่ 4

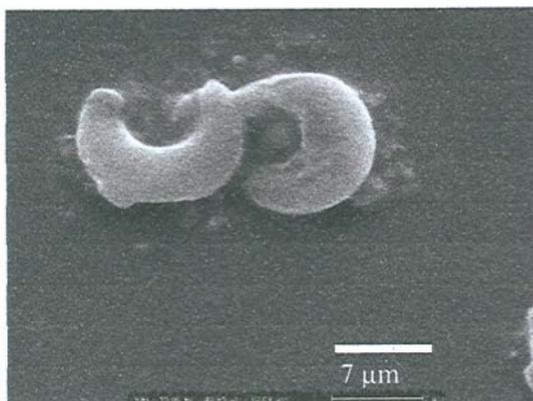
### ผลการทดลอง

#### 1. การศึกษาชีววิทยาของ *Kirchneriella lunaris*

การศึกษาลักษณะทางโครงสร้างของ *K. lunaris* ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ (Compound microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องกราด (Scanning electron microscope) เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างภายนอกของเซลล์ *K. lunaris* พบว่า เซลล์มีเมือกหุ้ม ลักษณะเซลล์โค้งคล้ายรูปพระจันทร์เสี้ยว ปลายเซลล์มนและโค้งเข้าหากัน บางเซลล์จะมีลักษณะบิดเป็นเกลียวเล็กน้อย เซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวจะพบอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวไม่เกาะรวมกลุ่มเป็นโคโลนี มีเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ประมาณ 1.5-2.5 ไมครอน เซลล์ยาวประมาณ 4.5-7.5 ไมครอน (ภาพที่ 5 A) จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องกราด พบว่า ปลายทั้งสองข้างของเซลล์มีความโค้งมนแตกต่างกันเล็กน้อย มีเมือกหุ้มภายนอกเซลล์ (ภาพที่ 5 B และ C) เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารแข็งโคโลนีมีสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 5 ภาพโครงสร้างภายนอกของ *K. lunaris* กลุ่มควบคุมจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ



ภาพที่ 6 ภาพโครงสร้างภายนอกของ *K. lunaris* กลุ่มควบคุมจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องกราด

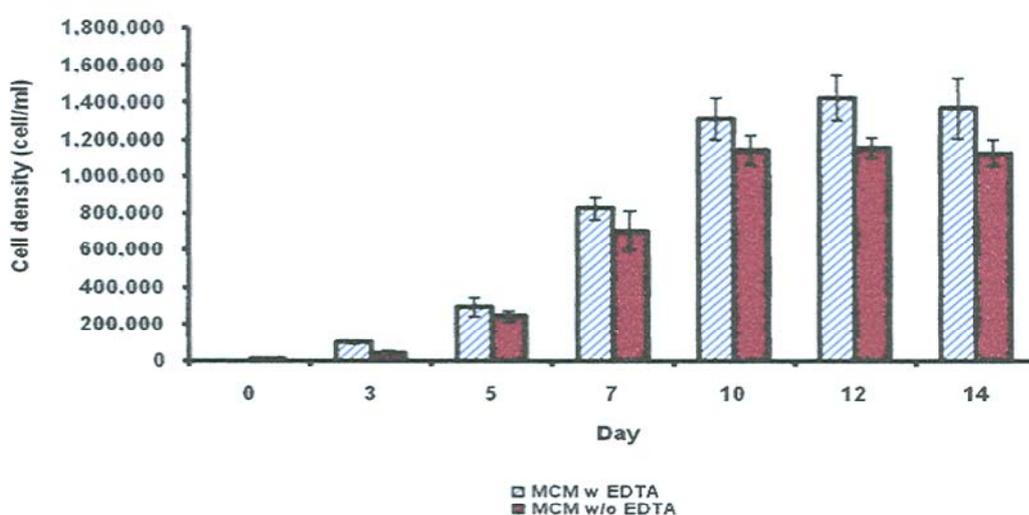


ภาพที่ 7 แสดงลักษณะโคโลนีของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง MCM

## 2. การศึกษาอัตราการเติบโต $\mu$ (growth rate) และสภาพการเลี้ยง

การศึกษอัตราการเติบโตของ *K. lunaris* ในอาหารที่เติมและไม่เติม EDTA เลี้ยงที่ อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ช่วงเวลาสว่างและช่วงเวลามืด 12:12 ชั่วโมง โดยวิธีสูบน้ำับจำนวนเซลล์ จำนวนเซลล์ของกลุ่มที่เติมและไม่เติม EDTA แสดงไว้ในตารางที่ 3 พบว่าเซลล์เริ่มมีการเติบโตเข้าสู่ log phase ในวันที่ 5 ของการทดลอง และเริ่มเข้าสู่ stationary

phase ในวันที่ 10 (ภาพที่ 7) จำนวนเซลล์สูงสุดวันที่ 12 ทั้งในกลุ่มที่เติมและไม่เติม EDTA การเติบโตในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่มที่เติมและไม่เติม EDTA ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ค่าอัตราการเติบโต ( $\mu$ ) ในช่วง log phase (ระหว่างวันที่ 5 ถึงวันที่ 7) ของกลุ่มที่เติมและไม่เติม EDTA เท่ากับ 0.52 และ 0.53 เซลล์/วัน ตามลำดับ คิดเป็นค่า doubling time เท่ากับ 1.33 และ 1.31 วัน หรือ 31.99 และ 31.39 ชั่วโมง ตามลำดับ หลังวันที่ 7 อัตราการเติบโตของทั้งสองกลุ่มมีค่าลดลงตามลำดับเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น



ภาพที่ 8 แสดงการเติบโตของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหาร MCM ที่เติมและไม่เติม EDTA (w = with, w/o = without)

จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Independent-Samples *t* Test พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ของกลุ่มที่มีการเติมและไม่เติม EDTA อย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05 ยกเว้นในวันที่ 3 และวันที่ 12 จำนวนเซลล์กลุ่มที่ไม่เติม EDTA มีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มที่เติม

กลุ่มที่เติมและไม่เติม EDTA มีค่าความเป็นกรด-เบสอยู่ในช่วง 6.82-4.60 และ 6.95-4.76 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ความเป็นกรด-เบสของกลุ่มที่เติม EDTA มีค่าลดลงเมื่อระยะเวลา

---

\* เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ที่มีและไม่มี EDTA 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ช่วงเวลาสว่างและช่วงเวลามืด 12:12 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที

เพิ่มขึ้น สาหร่ายสามารถเติบโตได้ดีในช่วงความเป็นกรด-เบสสูงกว่า 5.27 และเมื่อความเป็นกรด-เบสต่ำกว่า 5.27 พบว่าอัตราการเติบโตลดลง เข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 10 กลุ่มที่ไม่เติม EDTA กรด-เบสมีความแปรปรวน มีค่าต่ำประมาณ 4.7 ในวันที่ 7-10 ของการทดลอง และกลับสูงขึ้นในวันที่ 12-14 (ตารางที่ 3) หลังวันที่ 7 กลุ่มที่ไม่เติม EDTA มีอัตราการเติบโตลดลงและเข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 10 เช่นกัน ต่างกันที่ความเป็นกรด-เบสระหว่างวันที่ 7-10 ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Independent-Samples *t* Test พบว่ามีความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของความเป็นกรด-เบสของกลุ่มที่เติมและไม่เติม EDTA อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบความเป็นกรด-เบสแต่ละช่วงเวลาในแต่ละกลุ่มพบว่าความเป็นกรด-เบสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) และเมื่อวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) พบว่าจำนวนเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่เติมและไม่เติม EDTA มีความสัมพันธ์เชิงลบกับความเป็นกรด-เบสอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

ตารางที่ 3 จำนวนเซลล์ *K. lunaris* และ ความเป็นกรด-เบส เมื่อเลี้ยงในอาหาร MCM ที่เติมและไม่เติม EDTA

วันที่	จำนวนเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)		อัตราการเติบโต (เซลล์/วัน)		ความเป็นกรด-เบส	
	MCM w EDTA	MCM w/o EDTA	MCM w EDTA	MCM w/o EDTA	MCM w EDTA	MCM w/o EDTA
0	$1 \times 10^4$ <sup>a</sup>	$1 \times 10^4$ <sup>a</sup>	-	-	$6.81 \pm 0.03$ <sup>d,C</sup>	$7.20 \pm 0.06$ <sup>c,C</sup>
3	$9.7 \times 10^4 \pm 0.69 \times 10^4$ <sup>a,A</sup>	$4.1 \times 10^4 \pm 1.2 \times 10^4$ <sup>a,A</sup>	0.76	0.47	$6.74 \pm 0.01$ <sup>d,D</sup>	$6.56 \pm 0.01$ <sup>c,D</sup>
5	$29.3 \times 10^4 \pm 5.1 \times 10^4$ <sup>b</sup>	$24.5 \times 10^4 \pm 2.6 \times 10^4$ <sup>b</sup>	0.55	0.89	$6.42 \pm 0.09$ <sup>c,E</sup>	$5.83 \pm 0.08$ <sup>d,E</sup>
7	$80.5 \times 10^4 \pm 2.8 \times 10^4$ <sup>c</sup>	$70.7 \times 10^4 \pm 10.4 \times 10^4$ <sup>c</sup>	0.52	0.53	$5.27 \pm 0.06$ <sup>b,F</sup>	$4.76 \pm 0.02$ <sup>a,F</sup>
10	$131.1 \times 10^4 \pm 11.3 \times 10^4$ <sup>d</sup>	$114.1 \times 10^4 \pm 8.2 \times 10^4$ <sup>d</sup>	0.15	0.16	$4.61 \pm 0.05$ <sup>a,G</sup>	$4.81 \pm 0.05$ <sup>a,G</sup>
12	$142.1 \times 10^4 \pm 12.1 \times 10^4$ <sup>d,B</sup>	$115.7 \times 10^4 \pm 5.4 \times 10^4$ <sup>d,B</sup>	0.04	0.01	$4.60 \pm 0.18$ <sup>a,H</sup>	$5.13 \pm 0.10$ <sup>b,H</sup>
14	$136.5 \times 10^4 \pm 16.2 \times 10^4$ <sup>d</sup>	$112.7 \times 10^4 \pm 7.2 \times 10^4$ <sup>d</sup>	-0.02	-0.01	$4.43 \pm 0.31$ <sup>a,I</sup>	$5.47 \pm 0.14$ <sup>c,I</sup>

\* เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ที่มีและไม่เติม EDTA 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ช่วงเวลาสว่างและช่วงเวลามืด 12:12 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที

หมายเหตุ ตัวอักษรตัวเล็กที่ต่างกันในแนวคอลัมน์ และตัวอักษรตัวใหญ่ที่ต่างกันในแนวแถวแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) w = with, w/o = without

### 3. การศึกษาความเข้มข้นของแคดเมียมที่ทำให้ *K. lunaris* มีการเติบโตลดลง 50 % ในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ความไวของ *K. lunaris* ในการตอบสนองต่อความเป็นพิษของแคดเมียม ศึกษาได้จากการหาค่าความเข้มข้นของแคดเมียมที่ทำให้ *K. lunaris* มีการเติบโตลดลง 50 % ในเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นแคดเมียมน้อยที่สุดที่เริ่มมีผลทำให้สาหร่ายมีการเติบโตลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลา 72 ชั่วโมง คือ 0.025 มิลลิกรัม/ลิตร โดยมีเซลล์ลดลงเหลือเพียง  $2.48 \times 10^4$  เซลล์/ มิลลิลิตร ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีการเติบโตเพิ่มมากขึ้นจาก  $1 \times 10^4$  เป็น  $4.71 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร ในเวลา 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 4) อาหารที่เติมแคดเมียมความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร

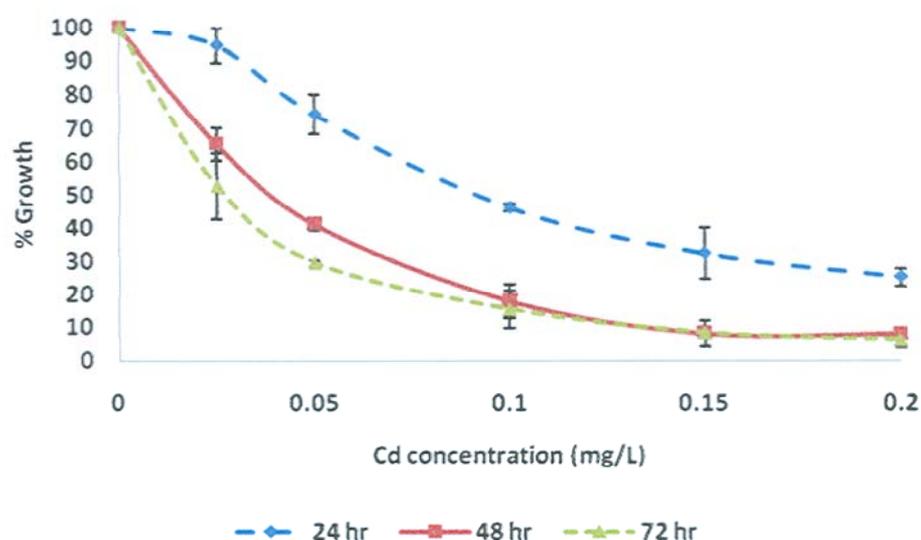
ตารางที่ 4 แสดงจำนวนเซลล์ และเปอร์เซ็นต์การรอดของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในแคดเมียมความเข้มข้น 0.025-0.200 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง\*

ความเข้มข้นแคดเมียม (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนเซลล์/มิลลิลิตร 24 ชั่วโมง	การรอด (%)	จำนวนเซลล์/มิลลิลิตร 48 ชั่วโมง	การรอด (%)	จำนวนเซลล์/มิลลิลิตร 72 ชั่วโมง	การรอด (%)
Control	$1.9 \times 10^4 \pm 1.7 \times 10^3$	100	$3.3 \times 10^4 \pm 3.2 \times 10^3$	100	$4.7 \times 10^4 \pm 6.9 \times 10^3$	100
0.025	$1.8 \times 10^4 \pm 1.0 \times 10^3$	94.63	$2.1 \times 10^4 \pm 1.6 \times 10^3$	65.25	$2.4 \times 10^4 \pm 4.7 \times 10^3$	52.62
0.050	$1.4 \times 10^4 \pm 0.23 \times 10^3$	68.12	$1.3 \times 10^4 \pm 0.6 \times 10^3$	41.01	$1.3 \times 10^4 \pm 0.4 \times 10^3$	29.56
0.100	$0.9 \times 10^4 \pm 0.23 \times 10^3$	45.97	$0.5 \times 10^4 \pm 1.7 \times 10^3$	17.98	$0.7 \times 10^4 \pm 2.7 \times 10^3$	15.42
0.150	$0.6 \times 10^4 \pm 1.5 \times 10^3$	32.21	$0.2 \times 10^4 \pm 1.2 \times 10^3$	8.08	$0.3 \times 10^4 \pm 0.6 \times 10^3$	8.20
0.200	$0.5 \times 10^4 \pm 0.5 \times 10^3$	25.17	$0.2 \times 10^4 \pm 0.4 \times 10^3$	7.88	$0.2 \times 10^4 \pm 1.1 \times 10^3$	6.08

\* เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ที่ไม่มี EDTA 100 มิลลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ช่วงเวลาสว่างและช่วงเวลามืด 12:12 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที

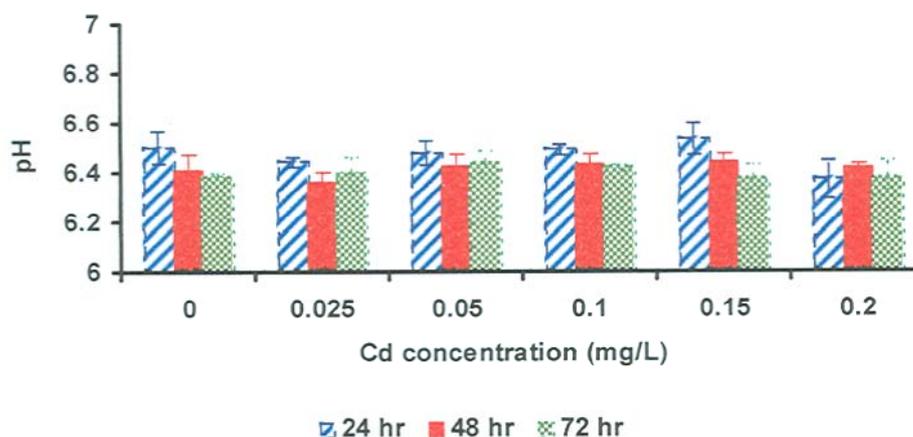
*K. lunaris* มีการเติบโตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เป็น 25.17, 7.88 และ 6.08 %ตามลำดับ (ภาพที่ 8) ยิ่งระยะเวลาได้รับแคดเมียมนานมากขึ้น เปอร์เซ็นต์การเติบโตจะน้อยลง และทำนองเดียวกันปริมาณแคดเมียมมากขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์การเติบโตลดลง ผลการวิเคราะห์ค่า  $EC_{50}$  ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมงของแคดเมียมต่อ *K. lunaris* พบว่ามีค่า 0.117, 0.039 และ 0.010 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ

ค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายที่เติมแคดเมียมความเข้มข้นต่าง ๆ ในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่าอยู่ในช่วง  $6.38 \pm 0.07$  ถึง  $6.44 \pm 0.05$  มีค่าใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 แสดงเปอร์เซ็นต์การเติบโตของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในแคดเมียมความเข้มข้น 0.025-0.200 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง \*

\* เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ที่ไม่มี EDTA 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ช่วงเวลาสว่างและช่วงเวลามืด 12:12 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที



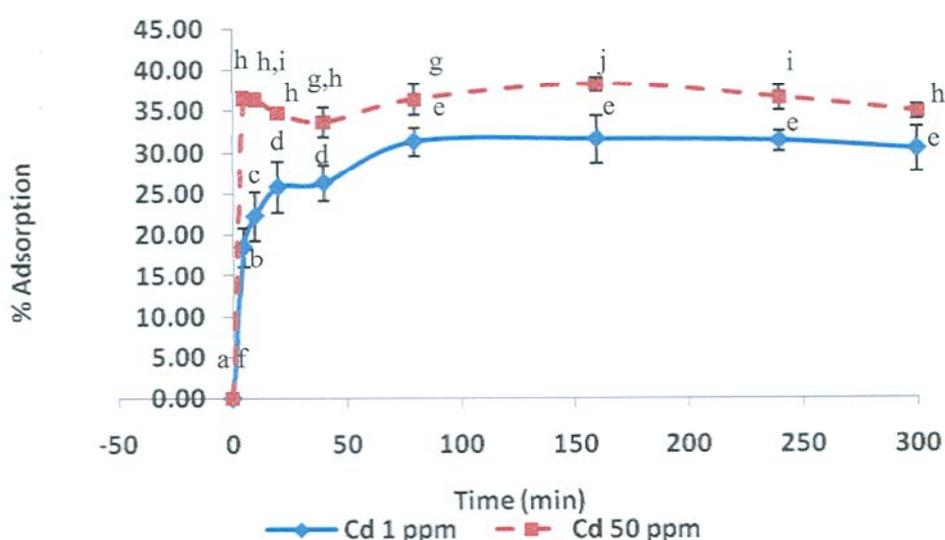
ภาพที่ 10 แสดงค่าความเป็นกรด-เบสของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในแคดเมียมความเข้มข้น 0.025-0.200 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

#### 4. การศึกษาระยะเวลาเข้าสู่สมดุลการดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris*

การศึกษาระยะเวลาการเข้าสู่สมดุลการดูดซับ ใช้แคดเมียมความเข้มข้นเริ่มต้น 1 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ความเป็นกรด-เบสเริ่มต้น 6.8 จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $1 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร ในอาหาร MCM ที่ไม่เติม EDTA ปริมาตร 400 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เก็บตัวอย่างน้ำ 10 มิลลิลิตร เมื่อครบ 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 240 นาที และ 300 นาที หรือ 5 ชั่วโมง กรองแยกน้ำตัวอย่างด้วยกระดาษกรองใยแก้ว นำกระดาษกรองไปอบและชั่งเพื่อหาน้ำหนักแห้ง ส่วนของน้ำไปวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมที่เหลือในสารละลายด้วย Inductively Coupled Plasma Spectroscopy เมื่อนำค่าที่ได้ไปลบกับปริมาณแคดเมียมเริ่มต้นจะเป็นปริมาณแคดเมียมที่ดูดซับไว้ของสาหร่าย นำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การดูดซับ และค่าความสามารถในการดูดซับหรือค่าการดูดซับ นำมาพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลากับเปอร์เซ็นต์การดูดซับเพื่อหาระยะเวลาเข้าสู่สมดุลการดูดซับ และกราฟระหว่างระยะเวลาเวลากับค่าการดูดซับ นับจำนวนเซลล์ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่างน้ำ ผลการศึกษาพบว่า ทั้งกลุ่มความเข้มข้นแคดเมียมเริ่มต้น 1 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร สาหร่ายมีการดูดซับอย่างรวดเร็วในเวลา 5 นาทีแรก โดยกลุ่มความเข้มข้นเริ่มต้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร ดูดซับได้ดีกว่า

กลุ่มทดลองความเข้มข้นเริ่มต้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร หลังจากมีการดูดซับอย่างรวดเร็วใน 5 นาทีแรก มีเปอร์เซ็นต์การดูดซับ 18.50 % คิดเป็น 59 % ของการดูดซับทั้งหมด และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนคงที่ในเวลา 80 นาที หลังจากนั้นการดูดซับค่อนข้างคงที่ไม่มีมีความแตกต่างทางสถิติ (ภาพที่ 10)

และมีค่าสูงสุดในเวลา 160 นาที มีเปอร์เซ็นต์การดูดซับ 31.50 % ส่วนกลุ่มทดลองความเข้มข้นเริ่มต้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร มีการดูดซับอย่างรวดเร็วในเวลา 5 นาทีแรกเช่นกัน มีค่า  $36.55 \pm 0.50$  % คิดเป็น 95 % ของการดูดซับทั้งหมด การดูดซับเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยจนกระทั่งเวลา 80 นาที หลังจากนั้นการดูดซับคงที่ เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย one-way ANOVA พบว่าเปอร์เซ็นต์การดูดซับในเวลา 5 ถึง 80 นาที ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) มีเปอร์เซ็นต์การดูดซับสูงสุดเป็น 38.25 % ที่เวลา 160 นาที

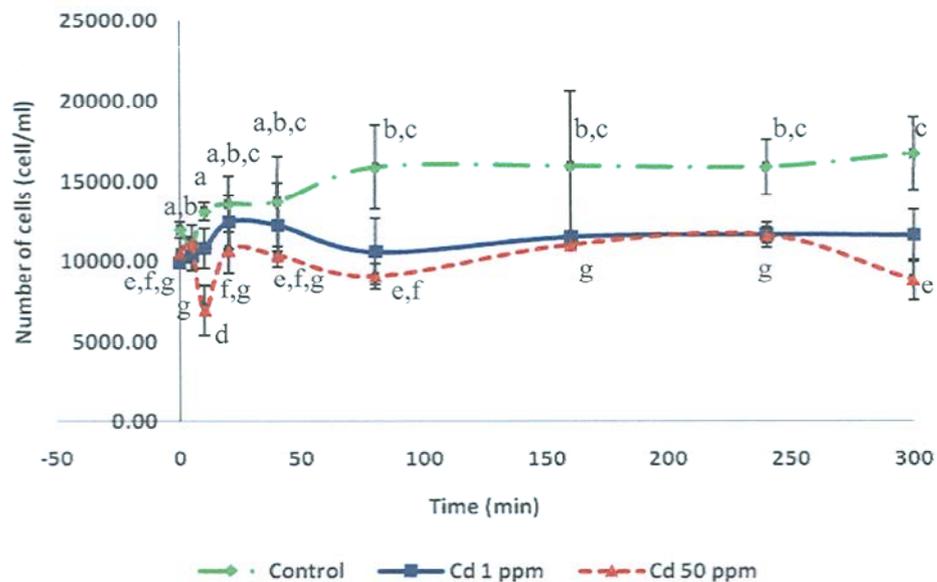


ภาพที่ 11 แสดงเปอร์เซ็นต์การดูดซับของ *K. lunaris* ของกลุ่มทดลองความเข้มข้นแคดเมียมเริ่มต้น 1 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลา 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 240 นาที และ 5 ชั่วโมง \* อักษรที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

จำนวนเซลล์ *K. lunaris* ในกลุ่มทดลองที่เติมแคดเมียมเริ่มต้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวนเซลล์น้อยกว่ากลุ่มควบคุมทุกช่วงเวลา และจากการวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย one-way ANOVA พบว่าระยะเวลาการได้รับแคดเมียมตลอดการทดลอง 300 นาทีไม่มีผลทำให้จำนวนเซลล์เปลี่ยนแปลง ( $p > 0.05$ ) สำหรับกลุ่มทดลองที่เติมแคดเมียมเริ่มต้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าจำนวน

\* เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA 400 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที

เซลล์มีจำนวนแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัดหลังจากได้รับแคดเมียมนาน 10 นาที และมีจำนวนเซลล์น้อยกว่ากลุ่มควบคุมทุกช่วงเวลา โดยมีจำนวนเซลล์หลังได้รับแคดเมียม 300 นาที เหลือเพียง  $8,800 \pm 1,280$  เซลล์/มิลลิลิตร จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย one-way ANOVA พบว่ากลุ่มที่เติมแคดเมียมเริ่มต้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร ระยะเวลาได้รับแคดเมียมมีผลต่อจำนวนเซลล์ ( $p < 0.05$ ) โดยจะมีจำนวนเซลล์ลดลงเมื่อระยะเวลาได้รับแคดเมียมนานขึ้น (ภาพที่ 11)

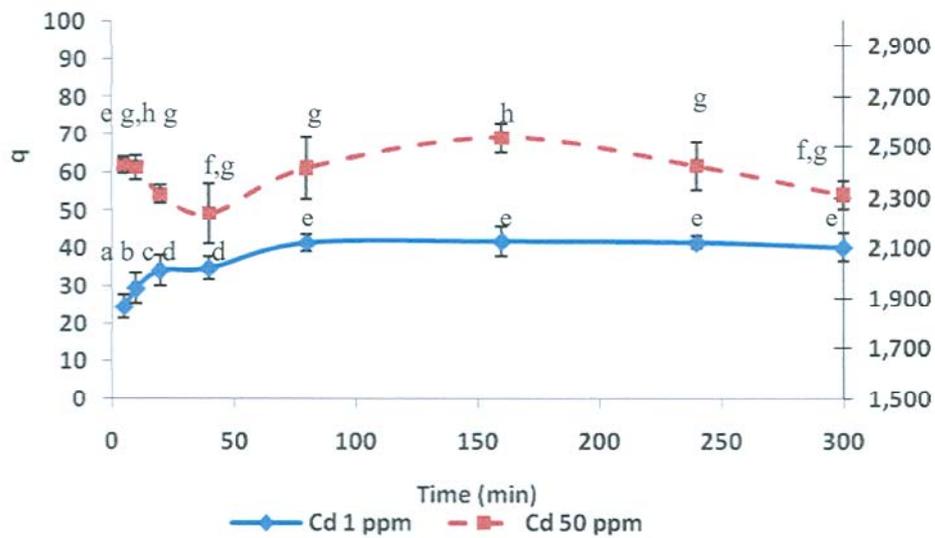


ภาพที่ 12 แสดงการเติบโตของ *K. lunaris* กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับแคดเมียมเริ่มต้น 1 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลา 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 240 นาที และ 5 ชั่วโมง\* อักษรที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

ค่าความสามารถในการดูดซับหรือค่าการดูดซับแคดเมียม (q) ของ *K. lunaris* ของกลุ่มทดลองที่เติมแคดเมียม 1 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร แสดงไว้ในภาพที่ 13 กลุ่มทดลองที่เติมแคดเมียมเริ่มต้น 1 มิลลิกรัม/ลิตรนั้น มีค่าการดูดซับสูงสุดที่  $50.24 \pm 4.60$  มิลลิกรัม/กรัม ที่เวลา 160 นาที กลุ่ม

\* เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA 400 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที

ทดลองที่เติมแคดเมียม 50 มิลลิกรัม/ลิตร มีค่าการดูดซับสูงสุด  $3,042.26 \pm 69.37$  มิลลิกรัม/กรัมที่เวลา 160 นาที (ภาพที่ 12) เมื่อเปรียบเทียบการดูดซับระหว่างกลุ่มความเข้มข้นเริ่มต้นสูงกับความเข้มข้นเริ่มต้นต่ำ พบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) โดยกลุ่มทดลองที่ความเข้มข้นเริ่มต้นสูงจะมีค่าการดูดซับสูงกว่ากลุ่มทดลองที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่ำ ระยะเวลาของการดูดซับสูงสุด สอดคล้องกับระยะเวลาของเปอร์เซ็นต์การดูดซับสูงสุด



ภาพที่ 13 แสดงค่าการดูดซับ ( $q$ ) ของ *K. lunaris* ที่ความเข้มข้นแคดเมียม 1 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลา 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 240 นาที และ 5 ชั่วโมง ค่า  $q$  แกนซ้ายมือเป็นของ 1 มิลลิกรัม/ลิตร แกนขวามือเป็นของ 50 มิลลิกรัม/ลิตร \* อักษรที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

กลุ่มทดลองที่เติมแคดเมียมเริ่มต้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าการดูดซับเข้าสู่สมดุลที่เวลา 80 นาที และคงที่ตลอด 300 นาที เช่นเดียวกับกลุ่มทดลองที่เติมแคดเมียมเริ่มต้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร การดูดซับเข้าสู่สมดุลในเวลา 80 นาที และก่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง (ภาพที่ 12) เช่นเดียวกับการดูดซับค่าเปอร์เซ็นต์การดูดซับ ผู้วิจัยได้เลือกใช้เวลาการดูดซับ 80 นาทีไปทำการศึกษาผลของ

\* เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร อยู่ใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA 400 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที

จำนวนเซลล์เริ่มต้นต่อเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคคเมียมด้วยความเข้มข้นแคคเมียมเริ่มต้น 1 มิลลิกรัม/ลิตรในหัวข้อถัดไป เพราะเป็นเวลาที่มียาค่าการดูดซับเข้าสู่สมดุลแล้ว และเลือกใช้เวลาการดูดซับ 160 นาที ในการทดลองที่ 7 เพราะเป็นเวลาที่กลุ่มที่ได้รับแคคเมียมความเข้มข้นเริ่มต้น 1 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตรอยู่ในสมดุลได้ระยะหนึ่งแล้ว

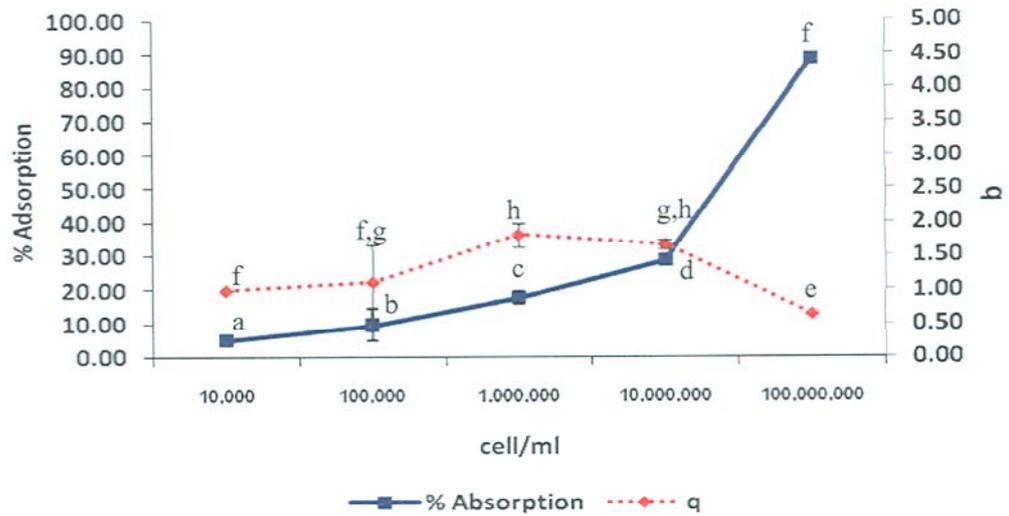
จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติด้วย one-way ANOVA พบว่าระยะเวลาที่สาหร่ายสัมผัสกับแคคเมียมและปริมาณความเข้มข้นเริ่มต้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อค่าการดูดซับและเปอร์เซ็นต์การดูดซับ ( $p < 0.05$ )

##### 5. การศึกษาผลของจำนวนเซลล์เริ่มต้นต่อเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคคเมียมของ *K. lunaris*

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของ *K. lunaris* กับเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคคเมียม ใช้เซลล์เริ่มต้น  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  และ  $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหาร MCM 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ความเป็นกรด-เบส 6.8 เติมแคคเมียมความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เกือบตัวอย่างน้ำ 15 มิลลิลิตร เมื่อครบ 80 นาที ซึ่งเป็นระยะเวลาการดูดซับสูงสุดจากข้อ 4 ผลการศึกษาพบว่าเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคคเมียมเพิ่มมากขึ้นตามความหนาแน่นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น มีค่าเปอร์เซ็นต์การดูดซับอยู่ในช่วง 5.17-88.51 % ความหนาแน่น  $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร สามารถดูดซับได้สูงสุดถึง 88.51 % (ภาพที่ 13 ) เปอร์เซ็นต์การดูดซับไม่เป็นสัดส่วนกับจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในช่วง  $10^7$ - $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร ความเป็นกรด-เบสอยู่ในช่วงแคบ 6.52-6.89

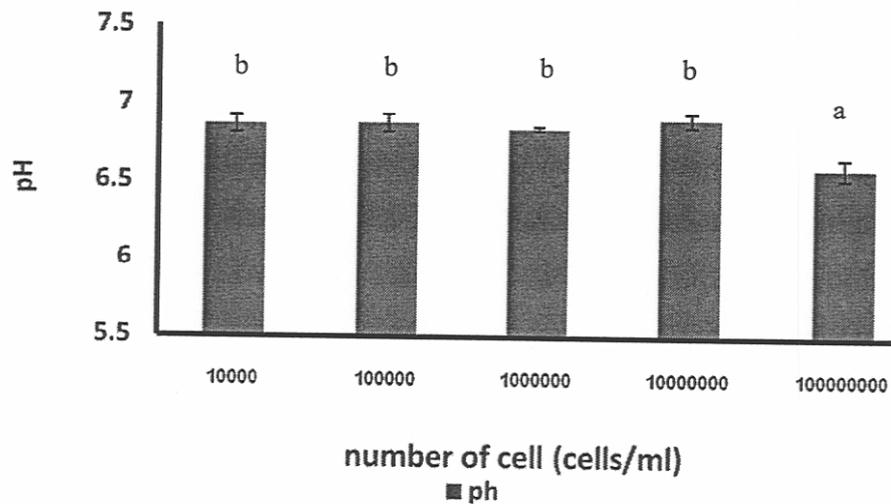
เมื่อวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น เปอร์เซ็นต์การดูดซับ และค่าการดูดซับพบว่ามีสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย one-way ANOVA พบว่าเปอร์เซ็นต์การดูดซับที่ความหนาแน่นของเซลล์ที่  $10^4$  และ  $10^5$  ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อดูจากค่าการดูดซับ (q) พบว่าที่จำนวนเซลล์  $10^4$ ,  $10^5$  และ  $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร ให้ผลไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงเลือกความหนาแน่นเซลล์ที่  $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร แม้ว่าจะพบค่าการดูดซับจะไม่แตกต่างกันกับจำนวนเซลล์ที่  $10^4$  และ  $10^5$  เซลล์/มิลลิลิตร แต่เมื่อดูเปอร์เซ็นต์การดูดซับพบว่าจำนวนเซลล์  $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร มีค่าการดูดซับสูงสุด และเมื่อดูจากค่าความเป็นกรด-เบสพบว่าความเป็นกรด-เบสไม่แตกต่างกัน ยกเว้นที่ความหนาแน่นเซลล์  $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสแตกต่างจากความหนาแน่นเซลล์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

ดังนั้นผู้วิจัยได้เลือกใช้ความหนาแน่น  $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร เป็นจำนวนเซลล์เริ่มต้นในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรด-เบสกับเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียมในการทดลองหัวข้อต่อไป



ภาพที่ 14 แสดงผลของจำนวนเซลล์ต่อเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียม ค่าการดูดซับของ *K. lunaris* ที่เติมแคดเมียมเริ่มต้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร\* อักษรที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

\*เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที เป็นเวลา 80 นาที



ภาพที่ 15 แสดงค่าความเป็นกรด-เบสและจำนวนเซลล์ *K. lunaris* เริ่มต้น  $10^4$ - $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร ในอาหารที่ได้รับแคดเมียม 1 มิลลิกรัม/ลิตร\* อักษรที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

#### 6. การศึกษาผลของความเป็นกรด-เบสต่อค่าการดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris*

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรด-เบสกับเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียม ใช้ค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นระหว่าง 4-7 จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร เวลาในการดูดซับ 80 นาที แคดเมียมความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ผลการศึกษาพบว่าเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียมเพิ่มขึ้นตามความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นที่เพิ่มขึ้น ที่ความเป็นกรด-เบส 4 มีเปอร์เซ็นต์การดูดซับและค่าการดูดซับต่ำสุด มีค่า 37.00 % และ  $7.38 \pm 0.20$  มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ และที่ความเป็นกรด-เบส 6.0 มีเปอร์เซ็นต์การดูดซับและค่าการดูดซับสูงสุด 95.50 % และ  $19.04 \pm 0.24$  มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย one-way ANOVA พบว่าความเป็นกรด-เบสมีผลต่อค่าการดูดซับและเปอร์เซ็นต์การดูดซับ ( $p < 0.05$ )

ตารางที่ 5 แสดงความเป็นกรด-เบสเริ่มต้น และสุดท้าย เปอร์เซ็นต์การดูดซับ และค่าการดูดซับของ *K. lunaris* ในอาหารที่เติมแคลเซียม 1 มิลลิกรัม/ลิตร<sup>\*</sup>

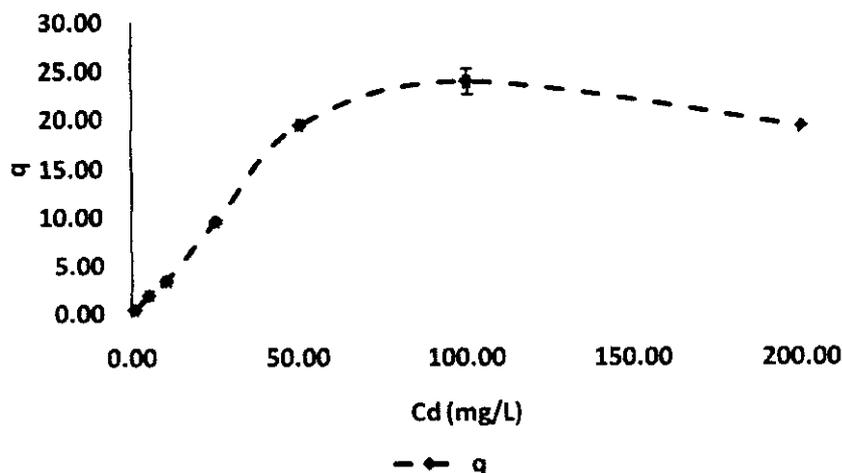
ความเป็นกรด-เบส เริ่มต้น	การดูดซับ (%)	ค่าการดูดซับ (มิลลิกรัม/กรัม)	ความเป็นกรด-เบส สุดท้าย
4	37.00±1.00 <sup>a</sup>	7.38±0.20 <sup>a</sup>	5.17±0.04
5	54.33±0.58 <sup>b</sup>	10.83±0.12 <sup>b</sup>	5.34±0.00
6	95.50±1.22 <sup>c</sup>	19.04±0.24 <sup>d</sup>	6.22±0.01
7	76.33±7.02 <sup>d</sup>	15.22±1.40 <sup>c</sup>	6.53±0.06
8	70.67±5.13 <sup>c</sup>	14.09±1.02 <sup>c</sup>	7.17±0.02

หมายเหตุ อักษรที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

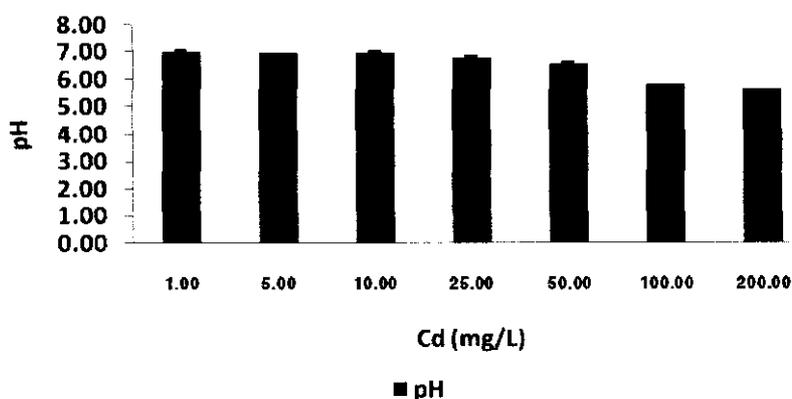
#### 7. การศึกษาผลของปริมาณแคลเซียมเริ่มต้นต่อค่าการดูดซับแคลเซียมของ *K. lunaris*

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแคลเซียมเริ่มต้นต่อค่าการดูดซับแคลเซียมของ *K. lunaris* ใช้แคลเซียมความเข้มข้นระหว่าง 1-200 มิลลิกรัม/ลิตร จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร เวลาในการดูดซับ 160 นาที ความเป็นกรด-เบส 6.0 อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ผลการศึกษาพบว่าปริมาณแคลเซียมเริ่มต้นมีผลต่อค่าการดูดซับแคลเซียม ภายใต้สภาวะที่มีความเป็นกรด-เบส และอุณหภูมิเหมาะสมนี้เมื่อปริมาณแคลเซียมเริ่มต้นสูงขึ้นค่าดูดซับแคลเซียมเพิ่มมากขึ้น ที่ความเข้มข้นแคลเซียมเริ่มต้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าการดูดซับสูงสุด มีค่า 23.95 มิลลิกรัม/กรัม (ภาพที่ 15) และไม่มีค่าสูงเกินกว่านี้เมื่อความเข้มข้นแคลเซียมเริ่มต้นเพิ่มมากขึ้น ความเป็นกรด-เบสมีค่าอยู่ในช่วง 5.61-7.03 จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย one-way ANOVA พบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นที่แตกต่างกันมีผลทำให้ค่าการดูดซับแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

<sup>\*</sup>จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร อยู่ใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที เป็นเวลา 80 นาที



ภาพที่ 16 แสดงค่าการดูดซับ ( $q_{\infty}$ ) เมื่อเลี้ยง *K. lunaris* ในอาหารที่เติมแคดเมียมความเข้มข้นเริ่มต้น 1, 5, 10, 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร

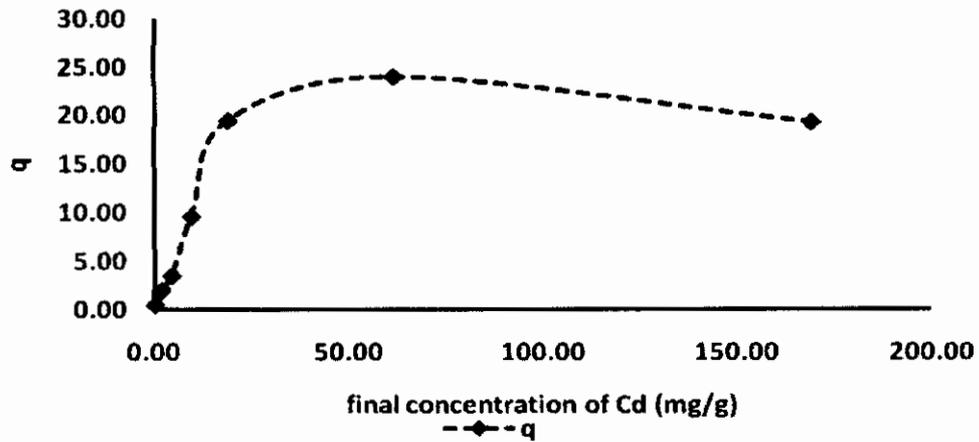


ภาพที่ 17 แสดงค่าความเป็นกรด-เบส เมื่อเลี้ยง *K. lunaris* ในอาหารที่เติมแคดเมียมความเข้มข้นเริ่มต้น 1, 5, 10, 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร

\* เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 6 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที เป็นเวลา 160 นาที

8. การศึกษา Kinetic และ equilibrium

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแคดเมียมสุดท้ายกับค่าการดูดซับ หรือ เรียกว่า biosorption isotherm curve แสดงไว้ในภาพที่ 19



ภาพที่ 18 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแคดเมียมสุดท้ายกับค่าการดูดซับ (q) ของ *K. lunaris*

จากการนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองข้อ 7 มาตรวจสอบว่า fit กับสมการ isotherm ไດบ้าง พบว่าข้อมูล fit กับสมการ Langmuir และ Freundlich โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของการกำหนด ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.998 และ 0.900 ตามลำดับ สามารถแสดงการ fit สมการดังนี้

1. ทดลอง fit สมการ Langmuir

จากสมการของ Langmuir isotherm กำหนดให้การ binding ที่ผิวเซลล์เกิดจาก physical forces (electrostatic หรือ London-vander Waals forces) เกิดขึ้นบนผิวที่เป็น homogenous และทุก site มีความสามารถในการจับ adsorbate เท่ากัน โดยไม่มี interaction ระหว่างไอออนที่ดูดซับ

จากสูตรสมการ Langmuir

$$X/M \text{ หรือ } q = \frac{q_m K_A C}{(1 + K_A C)} \dots\dots\dots(1)$$

เพื่อสามารถหาค่า  $K_A$  และ  $q_m$  ต้องเปลี่ยนรูปสมการ (1) เป็นสมการเส้นตรง

$$\frac{C}{q} = \frac{C}{q_m} + \frac{1}{K_A q_m} \dots\dots\dots(2)$$

$$\frac{1}{q} = \frac{1}{q_m} + \frac{1}{K_A q_m} \left[ \frac{1}{C} \right] \dots\dots\dots(3)$$

โดย

$q$  = ปริมาณสารที่ถูกดูดซับ/ปริมาณตัวดูดซับ (มิลลิกรัม/กรัม)

$X$  = ปริมาณสารที่ถูกดูดซับ (มิลลิกรัม)

$M$  = น้ำหนักตัวดูดซับ (กรัม)

$q_m$  = ปริมาณสารที่ถูกดูดซับ/ปริมาณตัวดูดซับ ณ จุดสมดุล (มิลลิกรัม/กรัม)

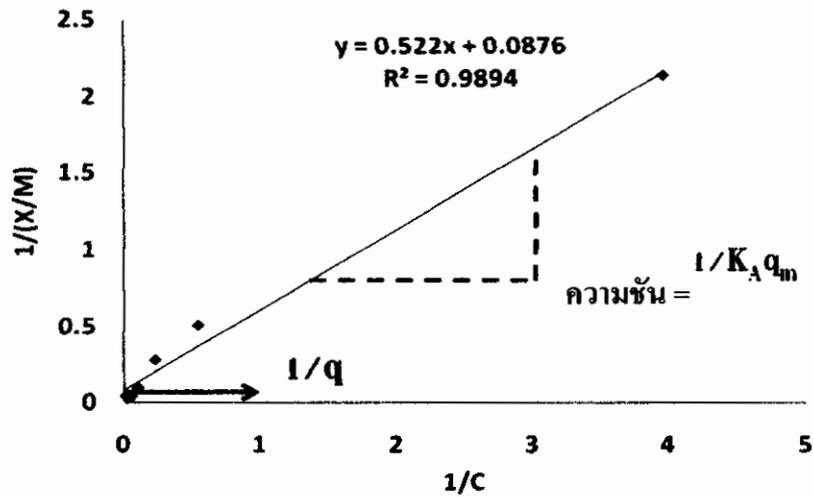
$K_A$  = ค่าคงที่ของการดูดซับ (equilibrium absorption constant) (ลิตรของตัวดูดซับ/มิลลิกรัมของสาร)

$C$  = ความเข้มข้นของสารที่จุดสมดุล (มิลลิกรัม/ลิตร)

ตารางที่ 6 แสดงค่าที่ใช้ในการแก้สมการ Langmuir

ความเข้มข้น แคดเมียม (มิลลิกรัม/ ลิตร)	น้ำหนัก ตัวดูดซับ M (กรัม)	ความเข้มข้น สุดท้าย ค่า C (มิลลิกรัม/ ลิตร)	ปริมาณสาร ที่ถูกดูดซับ ค่า X (มิลลิกรัม/ลิตร)	ค่า q (มิลลิกรัม/กรัม)	1/q	1/C
1.00	0.08	0.25	0.037	0.468	2.133	3.95
5.00	0.08	1.87	0.156	1.956	0.511	0.54
10.00	0.08	4.40	0.280	3.500	0.285	0.23
25.00	0.08	9.67	0.766	9.581	0.104	0.10
50.00	0.08	18.87	1.556	19.456	0.051	0.05
100.00	0.08	61.68	1.916	23.950	0.041	0.02
200.00	0.08	169.23	1.538	19.231	0.051	0.01

สามารถหาค่า  $K_A$  และ  $q_m$  ได้จากการพลอตกราฟเส้นตรง ถ้าพลอตเส้นตรงได้แสดงว่า fit กับ langmuir isotherm จากข้อมูลสามารถเขียนกราฟเป็นเส้นตรงได้ดังภาพที่ 18



ภาพที่ 19 กราฟแสดงสมการ Langmuir ของ *K. lunaris*

$$y = 0.522x + 0.0876$$

จากการพลอตกราฟ  $K_A$  มีค่า 0.167 ลิตร/มิลลิกรัม และ  $q_m$  มีค่า 11.415 มิลลิกรัม/กรัม  $R^2 = 0.989$

2. ทดลอง fit สมการ Freundlich

จากสูตรสมการ Freundlich

$$X/M \text{ หรือ } Q = K_f C^{1/n} \dots\dots\dots(4)$$

เพื่อสามารถหาค่า  $K_f$  และ  $n$  เปลี่ยนรูปสมการ (4) เป็นสมการเส้นตรง

$$\text{Log}(X/M) = \text{log } K_f - 1/n \text{ log } C \dots\dots\dots(5)$$

โดย

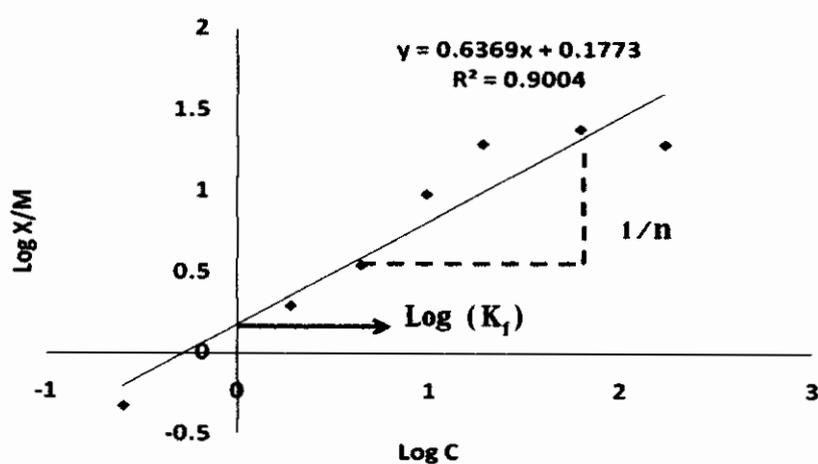
- X = ปริมาณสารที่ถูกดูดซับ (มิลลิกรัม)
- M = น้ำหนักตัวดูดซับ (กรัม)
- $K_f$  และ  $n$  = Freundlich constants
- $K_f$  = indicator of adsorption capacity
- $n$  = indicator of adsorption intensity

C = ความเข้มข้นสุดท้าย (มิลลิกรัม/ลิตร)

ตารางที่ 7 แสดงค่าที่ใช้ในการแก้สมการ Freundlich

ความเข้มข้น แคดเมียม (มิลลิกรัม/ ลิตร)	น้ำหนัก ตัวดูดซับ M (กรัม)	ความเข้มข้น สุดท้าย C (มิลลิกรัม/ ลิตร)	ปริมาณสารที่ถูก ดูดซับ ค่า X (มิลลิกรัม)	ค่า q (มิลลิกรัม ม/กรัม)	log (X/M) หรือ log q	log C
1.00	0.08	0.25	0.037	0.463	-0.334	-0.602
5.00	0.08	1.87	0.156	1.956	0.290	0.271
10.00	0.08	4.40	0.280	3.500	0.544	0.643
25.00	0.08	9.67	0.766	9.581	0.981	0.985
50.00	0.08	18.87	1.556	19.456	1.288	1.275
100.00	0.08	61.68	1.916	23.950	1.379	1.790
200.00	0.08	169.23	1.538	19.231	1.283	2.228

สามารถหาค่า  $K_f$  และ  $n$  ได้จากการพลอตกราฟเส้นตรง จากสมการ 5 เขียนกราฟได้ดังนี้



ภาพที่ 20 กราฟแสดงสมการ Freundlich ของ *K. lunaris*

จากการพลอตกราฟ  $K_f$  มีค่า 1.49  $n$  มีค่า 1.57 และ  $R^2 = 0.900$  (ภาพที่ 21)

ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างการดูดซับและความเข้มข้นของแคดเมียม สามารถเขียนเป็นสมการเส้นตรงได้ และสมการสามารถอธิบายด้วยโมเดลทางคณิตศาสตร์ ทั้งจากสมการ Langmuir และ Freundlich

ค่าคงที่ของการดูดซับจากสมการ Langmuir และ Freundlich แสดงไว้ตามตารางที่ 13 และ 14 ค่า  $R^2$  ของ *K. lunaris* จากสมการ Langmuir มีค่าสูงกว่าค่า  $R^2$  จากสมการ Freundlich แสดงว่า fit กับสมการ Langmuir ได้ดีกว่า

ตารางที่ 8 Langmuir และ Freundlich parameters สำหรับ adsorption isotherms ของ *K. lunaris* เปรียบเทียบกับสารรายชนิดอื่น

Algae	Langmuir			Freundlich			เอกสารอ้างอิง
	$q_m$	$K_A$	$R^2$	$K_f$	N	$R^2$	
<i>K. lunaris</i> (live)	11.41 mg/g	0.17	0.989	1.49	1.57	0.900	This study
<i>Rhizopus arrhizuz</i>	62.19 mg/g	0.0325		6.05	2.00		Özer <i>et al.</i> 1996
<i>Pantoea</i>	58.10 mg/g	0.06	0.971	10.34	0.34	0.763	Ozdemir <i>et al.</i> 2004
Sewage sludge	16.70 mg/g	0.031	0.997	1.26	1.92	0.993	Zhai <i>et al.</i> 2004
Kraft fiber	43.8 mmol/kg	6.73					Duong <i>et al.</i> 2006
<i>Azolla filiculoides</i>	0.99 mmol/g	2.578 l/mM	0.919				Rakhshae <i>et al.</i> 2006
<i>Oscillatoria</i> sp. H1 (immobilized heat-inactivated)	27.50 mg/g	0.05	0.967	2.11	1.47	0.960	Katircioğlu, <i>et al.</i> (2008)
<i>Oscillatoria</i> sp. H1 (dry biomass)	30.10 mg/g	0.03	0.920	2.40	1.52	0.980	
<i>Oscillatoria</i> sp. H1 (immobilized live)	32.20 mg/g	0.05	0.980	2.48	1.58	0.990	

ตารางที่ 9 การเปรียบเทียบค่าการดูดซับแคดเมียม (q) ของ biosorbents หลายชนิด (ดัดแปลงมาจาก Katircloglu *et al.* 2007)

Biosorbent	Adsorption capacity (mg/g)	References
<i>K. lunaris</i>	11.41	This study
<i>Aspergillus niger</i> , active	1.3	Kapoor and Viraraghavan 1998
<i>Durvillaea</i> sp. H1 inactive	2.2	Figueira <i>et al.</i> 2000
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0.90 ±0.02 %ของน้ำหนักแห้ง	Mosulén <i>et al.</i> 2003
<i>Oscillatoria subtilissima</i> , inactive	526.32	Warakamin 2003
<i>Oscillatoria jatorvensis</i> , inactive	555.5	
<i>Bacillus circulans</i>	5.8-6.7	Yilmaz and Ensari 2005
<i>Chlorella sorokiniana</i>	43.0	Yoshida <i>et al.</i> 2006
<i>Aspergillus niger</i> , active	15.50	Liu <i>et al.</i> 2006
Algae <i>Gelidium</i>	18.0	Vilar <i>et al.</i> 2006
<i>Synechococcus</i> sp. H1 free	47.73	Saeed and Iqbal 2006
<i>Synechococcus</i> sp. H1 immobilized	57.76	

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง และอภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### 1. การศึกษาอัตราการเติบโต $\mu$ (growth rate) และสภาพการเลี้ยง

จากผลการศึกษาอัตราการเติบโตของ *K. lunaris* ในอาหารที่เติมและไม่เติม EDTA ช่วง log phase มีค่า 0.52 และ 0.53 เซลล์/วัน ตามลำดับ และพบว่ามีความ doubling time เป็น 1.33 และ 1.31 วัน หรือ 31.99 และ 31.39 ชั่วโมง ตามลำดับ มีค่าสูงกว่า *K. aperta* ซึ่ง Lombardi and Vieira (1999) ทำการศึกษาในอาหาร WC Culture Media ที่อุณหภูมิ 20-22 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 200 Fmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> photon flux ช่วงเวลาสว่างและช่วงเวลามืด 12:12 ชั่วโมง พบว่าค่า doubling time ในระหว่างการเติบโตช่วง log phase เป็น 5.2 ชั่วโมง หรือ 3.58 เซลล์/วัน แสดงว่า *K. lunaris* ในอาหารที่มีและไม่เติม EDTA มีอัตราการเติบโตต่ำกว่า *K. aperta* เกือบ 7 เท่า เพราะหาก doubling time มีค่ามาก แสดงว่าการเติบโตจะช้าลง และเช่นเดียวกัน *K. lunaris* มีอัตราการเติบโตต่ำกว่า *Selenastrum capricornutum* มากกว่า 12 เท่า *S. capricornutum* เป็นสาหร่ายสีเขียวชนิดที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษแบบเรื้อรังตามมาตรฐานของประเทศสหรัฐอเมริกา (USEPA, Environmental Protection Agency) โดย Errecalde *et al.* (1998) ได้เลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ใน Fraquil Artificial Fresh Water Medium ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 50 รอบ/นาที ค่าเฉลี่ยของอัตราการเติบโตช่วง log phase คือ 0.042 เซลล์/ชั่วโมง หรือ 1.008±0.2 เซลล์/วัน ขณะที่ *K. lunaris* มีค่าอัตราการเติบโต 0.52 เซลล์/วัน สรุปได้ว่า *K. lunaris* มีอัตราการเติบโตต่ำกว่า *K. aperta* และ *S. capricornutum* ทั้งในสภาพที่มีและไม่เติม EDTA อาจเป็นเพราะเป็นคนละสายพันธุ์ สภาพการเลี้ยง เช่น ความเข้มแสงและอุณหภูมิแตกต่างกัน อีกทั้งผู้วิจัยเพิ่งแยก *K. lunaris* ออกจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งต่างจากการทดลองของผู้วิจัยอื่น ๆ ที่ใช้สาหร่ายที่ได้จาก stock culture ซึ่งเก็บไว้นานแล้ว สาหร่ายที่แยกได้ใหม่ต้องใช้เวลาปรับตัวต่อสภาพการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการช่วงเวลาหนึ่งแล้วการเติบโตจะค่อยพัฒนาดีขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบความแปรปรวนของการเติบโตของ *K. lunaris* ระหว่างกลุ่มอาหารที่เติมและไม่เติม EDTA เป็นเวลา 14 วัน พบว่าจำนวนเซลล์เฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้นในวันที่ 3 และ วันที่ 12 ซึ่งกลุ่มที่ไม่เติม EDTA จะมีจำนวนเซลล์น้อยกว่า อาจเนื่องจาก

วันที่ 3 ค่าความเป็นกรด-เบสในกลุ่มที่ไม่เติม EDTA เปลี่ยนแปลงมากกว่ากลุ่มที่เติม EDTA ทำให้ อัตราการเติบโตน้อยกว่า คือเพียง 0.47 เซลล์/วัน ขณะที่กลุ่มที่เติม EDTA มีอัตราการเติบโต 0.76 เซลล์/วัน จำนวนเซลล์วันที่ 3 จึงน้อยกว่า และเมื่อเซลล์ปรับตัวได้ก็จะมีการเติบโตใกล้เคียงกับกลุ่มที่ไม่เติม EDTA จนวันที่ 12 ความเป็นกรด-เบสเปลี่ยนแปลงอีกครั้ง จากการทดลองความเป็นกรด-เบสอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การเติบโตลดลง เพราะความเป็นกรด-เบสของอาหารเป็นตัวกำหนดความสามารถในการละลายก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และแร่ธาตุอื่น ๆ นอกจากนี้ยังมีอิทธิพลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของสาหร่าย (สุมนทิพย์ บุนนาค 2529) เช่น ปริมาณอาหาร ของเสีย เป็นต้น ความเป็นกรด-เบสในกลุ่มที่ไม่เติม EDTA จะเปลี่ยนแปลงมากกว่ากลุ่มที่เติม EDTA จึงมีผลต่อการเติบโตของสาหร่ายมากกว่า การเติม EDTA ในอาหารจะช่วยเป็น buffer ทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสเปลี่ยนแปลงไม่มาก แต่เนื่องจาก EDTA เป็นสารคีเลตติ้งที่ตามมาตรฐานการทดลองเกี่ยวกับโลหะหนักของ OECD กำหนดให้ต้องไม่เติม EDTA ลงในอาหาร หากเติมลงในอาหารที่มีโลหะหนักจะไปมีผลลดความเป็นพิษของโลหะหนัก เพราะสารคีเลตติ้งจะแย่งจับกับโลหะหนักแทนสาหร่าย ทำให้ปริมาณไอออนโลหะหนักอิสระที่ลดลงเป็นผลจากสารคีเลตติ้งไม่ใช่สาหร่าย (Strandberg *et al.* 1981 และ Les and Walker 1984) จากภาพโดยรวมของการศึกษาครั้งนี้พบว่า การเติมหรือไม่เติม EDTA ไม่มีผลต่อค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ของสาหร่ายแต่มีผลต่อค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-เบส แสดงว่า *K. lunaris* สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-เบสได้ในระดับหนึ่ง จึงเป็นข้อดีอย่างหนึ่งของสาหร่ายชนิดนี้ และทำให้การทดลองเกี่ยวกับผลของความเป็นกรด-เบสต่อการดูดซับแคดเมียมในครั้งนี้ใช้ค่าระหว่าง 4-8

## 2. การศึกษาความเข้มข้นของแคดเมียมที่ทำให้ *K. lunaris* มีการเติบโตลดลง 50 % ในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ความไวของ *K. lunaris* ในการตอบสนองต่อความเป็นพิษของแคดเมียม ศึกษาจากค่าความเข้มข้นของแคดเมียมที่ทำให้มีการเติบโตลดลง 50 % เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในเวลา 72 ชั่วโมง (72-h EC<sub>50</sub>) พบว่ายิ่งระยะเวลาได้รับแคดเมียมนานมากขึ้น เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจะน้อยลง และทำนองเดียวกันปริมาณแคดเมียมมากขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดน้อยลง

ผลการวิเคราะห์ความไวในการตอบสนองด้วย Probit analysis พบว่าค่า EC<sub>50</sub> ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมงของแคดเมียม มีค่า 0.117, 0.039 และ 0.010 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ *K. lunaris* มีความไวต่อแคดเมียมมากกว่าสาหร่ายชนิดอื่น เช่น ค่า EC<sub>50</sub> ที่ 96 ชั่วโมงของ *Chlorella saccharophila*, *Navicula incerta* และ *Nitzschia closterium* เป็น 0.105 , 3.008 และ 0.476

มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ (Rachlin *et al.* 1982) และของ *Chlorella* sp. ที่ 72 ชั่วโมงเป็น 0.85  $\mu\text{M}$  (Franklin *et al.* 2002) ซึ่งมีค่ามากกว่า  $\text{EC}_{50}$  ที่ 72 ชั่วโมงของ *K. lunaris* แสดงว่า *K. lunaris* มีความไวต่อแคดเมียมมากกว่าสาหร่ายชนิดที่กล่าวมา สาเหตุที่มีความไวมาก อาจเนื่องจาก *K. lunaris* ที่ทดสอบ เป็นสาหร่ายที่เพิ่งแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ มีความไวต่อสารพิษมากกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงไว้เป็น stock culture ในห้องปฏิบัติการเป็นระยะเวลาานาน ๆ ค่า  $\text{EC}_{50}$  ที่ 24 ชั่วโมงมีค่ามากกว่าความเข้มข้นของแคดเมียมที่กรมควบคุมมลพิษยอมให้มีได้มากที่สุดคือน้ำทิ้งคือ 0.03 มิลลิกรัม/ลิตร จึงเป็นสาหร่ายที่ไม่ไวต่อแคดเมียม สามารถทนต่อแคดเมียมได้ในระดับหนึ่ง

ค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายที่เติมแคดเมียมความเข้มข้นระหว่าง 0.000-0.200 มิลลิกรัม/ลิตร มีค่าใกล้เคียงกันแสดงให้เห็นว่าแคดเมียมไม่มีผลต่อค่าความเป็นกรด-เบส โดยมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง  $6.38 \pm 0.07$  ถึง  $6.44 \pm 0.05$  ในเวลา 72 ชั่วโมง

### 3. การศึกษาระยะเวลาเข้าสู่สมดุลการดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris*

ผลการศึกษาระยะเวลาการเข้าสู่สมดุลของการดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris* พบว่าการดูดซับเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ 5 นาทีแรกของการทดลอง สามารถเขียนเป็นกราฟเส้นตรงได้ กลุ่มทดลองที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 1 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร จะเข้าสู่สมดุลในเวลา 80 นาที โดยมีเปอร์เซ็นต์การดูดซับสูงสุดของกลุ่มทดลองความเข้มข้นแคดเมียมเริ่มต้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร เป็น 31.25 และ 38.15 % ตามลำดับ ความเข้มข้นเริ่มต้นมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การดูดซับเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นมากขึ้นเปอร์เซ็นต์การดูดซับมากขึ้น สอดคล้องกับ Yoshida (2006) ที่รายงานว่า การดูดซับแคดเมียมด้วย *Chlorella sorokiniana* ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลา 50 นาทีดูดซับได้ 50 % และที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัม/ลิตรดูดซับได้ 86 % ความเข้มข้นเริ่มต้นน้อยจะดูดซับได้น้อยกว่าที่ความเข้มข้นเริ่มต้นมาก เช่นเดียวกับ Özer *et al.* (1997) ที่รายงานว่าเมื่อความเข้มข้นไอออนโลหะเริ่มต้นเพิ่มขึ้น อัตราการดูดซับเริ่มต้นจะเพิ่มขึ้น แต่ถ้าสูงเกินไป เช่น ความเข้มข้นไอออนโลหะเริ่มต้นสูงเกิน 100 มิลลิกรัม/ลิตรการดูดซับจะไม่เพิ่มขึ้น และ Solisio (2008) รายงานว่าเมื่อความเข้มข้นแคดเมียมเริ่มต้นสูงเกิน 500 มิลลิกรัม/ลิตร การดูดซับแคดเมียมของ *Spirulina platensis* จะลดลง ให้เหตุผลว่ามวลชีวภาพของตัวดูดซับเป็น limiting factor ของการดูดซับแคดเมียม

กลุ่มทดลองที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 50 มิลลิกรัม/ลิตร จะมีการดูดซับอย่างรวดเร็วใน 5 นาทีแรก แสดงว่าเป็นการดูดซับแบบ passive (Lombardi *et al.* 2002) การดูดซับจะลดลงเล็กน้อยหลังจาก 5 นาทีแรก ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของนักวิจัยอื่น ๆ ที่พบว่าเมื่อมีการดูดซับ

แล้วค่าจะคงที่หรือเพิ่มมากขึ้น สาเหตุที่ลดลงอาจเนื่องจากการทดลองกับสาหร่ายที่มีชีวิต *K. lunalis* ที่มีความไวต่อแคดเมียม มากกว่าสาหร่ายที่ใช้ในการทดลองของนักวิจัยอื่น ๆ ( $EC_{50}$  ที่ 24 ชั่วโมง มีค่า 0.117 มิลลิกรัม/ลิตร) ทำให้เซลล์มีการตอบสนองเร็วเพื่อป้องกันตัวเองโดยพบว่าเซลล์จะจับกันเป็นกลุ่มก้อน ทำให้พื้นผิวสัมผัสกับสารละลายลดน้อยลง และจำนวนเซลล์ลดลง ทำให้การดูดซับลดลง แต่เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติพบว่าการดูดซับไม่แตกต่างกันในช่วงแรก (ตารางที่ 6)

กลุ่มทดลองที่ได้รับแคดเมียมเริ่มต้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร เข้าสู่สมดุลในเวลา 80 นาที และการดูดซับจะเพิ่มอีกเล็กน้อยจนสูงที่สุดในเวลา 160 นาที ที่เวลา 80 และ 160 นาทีการดูดซับไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.05 และการดูดซับลดลงเล็กน้อยเมื่อเวลา 240 นาที อธิบายได้ว่าเมื่อแคดเมียมเข้าไปในเซลล์กระบวนการเมทาบอลิซึมภายในเซลล์จะทำหน้าที่ป้องกันพิษ โดยการเก็บสะสมพิษไว้ ทำให้มีพิษน้อยลง หรือบางส่วนจะถูกขับออก จนเมื่อพิษมีปริมาณมาก จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีนและเอนไซม์ต่าง ๆ การสะสมแคดเมียมเกิดขึ้นในคลอโรพลาสต์ (Nagel *et al.* 1996) นอกจากนี้แคดเมียมยังยับยั้งการนำเข้าไปในเตรทซึ่งจะนำไปสร้าง glutamate อันเป็นสารตั้งต้นสำหรับ phytochelatins มีทำหน้าที่ทำลายพิษของแคดเมียม (Mosulén 2003) และแคดเมียมจะเข้าไปแทนที่สังกะสีซึ่งมีความสำคัญในการทำงานของเซลล์ (Solisio *et al.* 2008) ทำให้ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสง ส่งผลให้การสร้างพลังงานลดน้อยลง ดังนั้นเมื่อ 240 นาที การดูดซับจึงลดลงเล็กน้อย

จากการทำ pretest พบว่าสาหร่ายที่มีและไม่มีชีวิต แคดเมียมไม่มีผลต่อการดูดซับ เพราะเมื่อนำไปนับจำนวนเซลล์พบว่าไม่แตกต่างกัน การดูดซับแคดเมียมของสาหร่าย *K. lunaris* ที่มีชีวิตน่าจะเกิดจากกระบวนการดูดซับทั้งแบบ passive และ active (Casiraghi *et al.* 2005) เพราะมีการดูดซับ 2 ชั้น ส่วนใหญ่น่าจะเป็นกระบวนการแบบ passive เพราะกราฟการดูดซับมีลักษณะเป็นเส้นตรงภายในเวลาไม่กี่นาที และดูดซับได้มากกว่า 59 และ 95 % ของการดูดซับทั้งหมดสำหรับความเข้มข้นแคดเมียมเริ่มต้น 1 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ แล้วค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนเข้าสู่สมดุล ซึ่งช่วงที่สองนี้น่าจะเป็นการสะสมแบบ active และเป็นไปอย่างช้า ๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการจับที่ผิวเซลล์และกระบวนการเมทาบอลิซึมในการลำเลียงไอออนผ่านเซลล์เมมเบรนเข้าสู่ไซโทพลาสซึม (Özer *et al.* 1997) จากงานวิจัยของ Rangsayatron *et al.* (2002) ศึกษาการดูดซับแคดเมียมด้วยเซลล์แห้งของสาหร่าย *Spirulina platensis* พบว่ามีการดูดซับได้ 78 % ภายในเวลา 5 นาที ซึ่งได้อธิบายว่าการดูดซับใช้เวลาน้อยนั้นเกิดจากการสะสมแบบ passive เพียงอย่างเดียว และสอดคล้องกับการสะสมแคดเมียมของ *Tolythrix tenuis* และ *Saccharomyces cerevisiae* โดยปริมาณแคดเมียมที่สะสมส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 5 นาทีแรก เป็นการดูดซับแบบ passive เนื่องจากใช้ระยะเวลาสั้นเพียง

ไม่กี่นาทีก่อน (Inthorn *et al.* 1996; Norris and Kelly 1977) เนื่องจาก *K. lunaris* มีเมือกหุ้มภายนอกเซลล์ ซึ่งเมือกเป็นสาร polysaccharide ซึ่งจะทำให้เกิด ion exchange ระหว่างประจุ เมือกมีคุณสมบัติเป็นประจุลบจึงจับได้ค้ำกับประจุบวกของแคดเมียม ต่อมา มีการจับที่ผิวเซลล์ด้วย functional group และมีการนำเข้าสู่ภายในเซลล์ซึ่งต้องใช้พลังงาน จึงค่อยเป็นไปอย่างช้า ๆ

กลุ่มทดลองความเข้มข้นเริ่มต้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร การดูดซับสูงถึง 95 % ในเวลา 5 นาทีแรก หลังจากนั้นไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงมากนัก จนเข้าสู่สมดุลในเวลา 80 นาที แตกต่างจากกลุ่มทดลองที่เติมแคดเมียม 1 มิลลิกรัม/ลิตร อาจเป็นเพราะมีความเข้มข้นเริ่มต้นสูง การดูดซับถึงจุดอิ่มตัวเร็ว ทำให้ไม่พบการสะสมที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อระยะเวลาผ่านไป แคดเมียมเริ่มต้น 50 มิลลิกรัม/ลิตรเมื่อถูกดูดซับเข้าไปในเซลล์อาจมีผลต่อเซลล์จนทำให้หยุด activity ภายในเซลล์ สอดคล้องกับการทดลองของสุนทร ทารพันธ์ (2551) ที่ศึกษา viability ของ *K. lunaris* หลังจากได้รับแคดเมียม 1, 5, 10, 25 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลา 120 นาที แล้วนำไปล้างเอาแคดเมียมออกและเลี้ยงในอาหาร MCM พบว่าถ้าสาหร่ายได้รับแคดเมียม 50 มิลลิกรัม/ลิตร เซลล์จะตายหมดในเวลา 3 วัน แสดงว่าแคดเมียม 50 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ได้รับในเวลา 120 นาที มีผลทำลายเมทาบอลิซึมของเซลล์

ระยะเวลาการเข้าสู่สมดุลการดูดซับของความเข้มข้นเริ่มต้น 1 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ในการทดลองครั้งนี้ไม่แตกต่างกัน คือเข้าสู่สมดุลการดูดซับที่ 80 นาที ต่างจากการทดลองของ Solisio (2008) ที่รายงานว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นแคดเมียมเริ่มต้นให้มากขึ้นพบว่าระยะเวลาการเข้าสู่สมดุลการดูดซับจะนานขึ้น อธิบายว่าการเพิ่มปริมาณแคดเมียมเริ่มต้นจะลดแรงดึงดูดระหว่าง binding sites กับไอออนโลหะ และความเข้มแข็งของแรงยึดเกาะระหว่างไอออน (inter-ionic force) ต่อผิวมวลชีวภาพ ดังนั้นจะขัดขวางการจับ ทำให้เข้าสู่สมดุลช้าลง

ระยะเวลาการเข้าสู่สมดุลการดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris* ในการศึกษานี้ช้ากว่าระยะเวลาการเข้าสู่สมดุลการดูดซับแคดเมียม โครเมียม และทองแดงของ *Pantoea* sp. ที่ใช้เวลาเพียง 15 นาที (Ozdemir *et al.* 2004) ช้ากว่าระยะเวลาการเข้าสู่สมดุลการดูดซับเหล็ก ตะกั่ว และแคดเมียมของ *Rhizopus arrhizus* ที่ใช้เวลา 20 นาที (Özer *et al.* 1997) ช้ากว่าระยะเวลาการเข้าสู่สมดุลการดูดซับตะกั่วของไคอะคอมน้ำกร่อย *Cyclotella cryptica*, ไคอะคอมทะเล *Phaeodactylum tricorutum* และ สาหร่ายสีแดง *Porphyridium purpureum* ที่ใช้เวลา 50 นาที และระยะเวลาการเข้าสู่สมดุลการดูดซับโคบอลต์ของ *Mortierella* SPS403 ที่ใช้เวลา 60 นาที (Pal *et al.* 2006) แต่เร็วกว่าระยะเวลาการดูดซับแคดเมียมของ *Chlorella sorokiniana* ที่ใช้เวลา 48 ชั่วโมง (Yoshida, *et al.* 2006) เร็วกว่าระยะเวลาการเข้าสู่สมดุลการดูดซับตะกั่วของสาหร่ายสีเขียวน้ำจืด *Scenedesmus subspicatus* ซึ่งเกิน 120 นาที (Schmitt *et al.* 2001) และเร็วกว่าระยะเวลาการดูดซับโคบอลต์

ของ *Aspergillus niger* และ *Penicillium canescens* ที่ใช้เวลา 2-4 ชั่วโมง (Kapoor *et al.* 1999; Say *et al.* 2003) ระยะเวลาการเข้าสู่สมดุลจะแตกต่างกันตามชนิดของสิ่งมีชีวิตและชนิดโลหะเนื่องจากคุณสมบัติของผิวเซลล์

#### 4. การศึกษาผลของจำนวนเซลล์เริ่มต้นต่อเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris*

การศึกษาผลของจำนวนเซลล์เริ่มต้นต่อเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris* ณ จุดสมดุล พบว่าจำนวนเซลล์เริ่มต้นน้อยมีเปอร์เซ็นต์การดูดซับได้น้อย เปอร์เซ็นต์การดูดซับเพิ่มขึ้นตามลำดับตามจำนวนเซลล์เริ่มต้นจนเมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตรมีเปอร์เซ็นต์การดูดซับได้สูงสุดถึง 88.51 % แต่กลับมีค่าการดูดซับลดลง อธิบายได้ว่า เมื่อในระบบมีความเข้มข้นของแคดเมียมคงที่แต่มีจำนวนเซลล์หรือตัวดูดซับเพิ่มขึ้น ทำให้ระบบมีพื้นที่ผิวและจำนวน binding sites มากขึ้น เปอร์เซ็นต์การดูดซับจึงมากขึ้น ทำให้ลดแคดเมียมในน้ำได้มากขึ้น แต่ประสิทธิภาพการดูดซับลดลงเมื่อจำนวนเซลล์มาก (Hanif *et al.* 2007) อาจเนื่องจาก binding site อาจถูก interfere ในขณะที่จำนวนเซลล์มากขึ้นพื้นที่ผิวสัมผัสของแต่ละเซลล์ระหว่างสารละลายน้อยลงทำให้ binding site ไม่สามารถจับแคดเมียมได้เต็มที่ ดังนั้นประสิทธิภาพการดูดซับหรือค่าการดูดซับจึงสัมพันธ์เชิงลบกับจำนวนเซลล์ สอดคล้องกับการสะสมสังกะสีของ *Moringa oluifera* Lam (Bhatti *et al.* 2007) ที่พบว่าการดูดซับลดลงเมื่อตัวดูดซับมากขึ้น เช่นเดียวกับการสะสมตะกั่วของ *Spirulina* (Hong and Shan-Shan 2005) การสะสมตะกั่วและทองแดงของ sargo waste (Quek *et al.* 1998) การสะสมสังกะสีของ *Penicillium* sp. PT1 (วิลาวัลย์ สีนุประภา 2541) การดูดซับโลหะหนักของ *Scenedesmus abundans* (Terry and Stone 2002) การดูดซับโครเมียม โคบอลต์ ทองแดง และแคดเมียมของ *Laurencia obtusa* (Hamdy 2004) และ Warakamin (2003) ที่ทดลองใน *Oscillatoria subtilissima* และ *Oscillatoria jasorvensis* พบว่ามวลชีวภาพแห้งที่มีน้ำหนักน้อยที่สุด (0.01 กรัม) มีความสามารถในการดูดซับแคดเมียมได้ดีที่สุดทุกความเข้มข้นของแคดเมียม (2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัม/ลิตร) ในเวลา 24 ชั่วโมง ขัดแย้งกับการดูดซับสังกะสีของสาหร่ายสีเขียว *Ulva fasciata* ที่พบว่าดูดซับเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นตัวดูดซับมากขึ้นที่ความเข้มข้นของสังกะสีต่ำ ๆ (Kumar *et al.* 2006) นอกจากนี้พบว่าที่จำนวนเซลล์  $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร มีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำสุด เมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์  $10^4$ - $10^7$  เซลล์/มิลลิลิตร คือ 6.59 มีค่าเข้าใกล้ 6 ส่งผลความเป็นกรด-เบสเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เปอร์เซ็นต์การดูดซับได้สูงสุด เนื่องจากที่ความเป็นกรด-เบสสูงช่วง 4-6 มีจำนวน hydrogen ions แข่งขันน้อยลง และมี ligands ที่เป็นประจุลบมากขึ้น ส่งผลให้การดูดซับแคดเมียมมากขึ้น (Kumar *et al.* 2006) อาจกล่าวได้ว่าจำนวนเซลล์ไม่ได้มีผลต่อการดูดซับอย่าง

แท้จริงแต่เกี่ยวข้องกับพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างผิวเซลล์และสารละลาย นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับปัจจัยอื่นอีกด้วย เช่น ความเป็นกรด-เบส

##### 5. การศึกษาผลของความเป็นกรด-เบสต่อค่าการดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris*

จากการศึกษาผลของความเป็นกรด-เบสต่อเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียม พบว่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมที่สุดในการดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris* คือ 6 โดยมีเปอร์เซ็นต์การดูดซับ 95.50 % และค่าการดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris* เพิ่มขึ้นเมื่อความเป็นกรด-เบสเพิ่มขึ้นจาก 4 เป็น 6 เนื่องจากการดูดซับสัมพันธ์กับ functional groups ของมวลชีวภาพและเคมีละลาย ที่ความเป็นกรด-เบสน้อยกว่า 4 โลหะจะอยู่ในรูปที่เป็นไอออนอิสระ เมื่อมีการดูดซับเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วระหว่างความเป็นกรด-เบส 4 ถึง 6 (ภาพที่ 16) จึงไม่สามารถอธิบายว่าเกิดจากความเฉพาะเจาะจงของโลหะ (metal speciation) (Quek *et al.* 1998) ดังนั้นการดูดซับจึงน่าจะเป็นไปตามสมมติฐานที่ว่า การดูดซับเกิดจาก functional groups บนผนังเซลล์ และ ionic state ของ functional groups เหล่านั้น (Bhatti *et al.* 2007; Kumar *et al.* 2006) ผนังเซลล์ของตัวดูดซับจะมี functional groups ทั้งที่เป็นกรดอ่อน และ เบสอ่อน จากทฤษฎีของ acid-base equilibrium ที่กล่าวว่าในช่วงความเป็นกรด-เบส 2.5-5 การจับกับโลหะหนักประจุบวกเริ่มจากการ dissociation ของ functional groups ที่เป็นกรดอ่อน โดยเฉพาะ carboxyl groups (-COOH) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญมากที่สุดในการจับกับโลหะของสิ่งมีชีวิต (Kratochvil and Volesky 1998) ionic states ของผนังเซลล์สามารถใช้ อธิบายว่าความเป็นกรด-เบสมีผลต่อการดูดซับว่าได้เช่นกัน เพราะที่ความเป็นกรด-เบสต่ำ hydrogen และ hydronium ions จะแข่งกับโลหะประจุบวกในการจับกับ binding site ของมวลชีวภาพ ทำให้การดูดซับแคดเมียมเกิดขึ้นน้อย ที่ความเป็นกรด-เบสสูงช่วง 4-6 มีจำนวน hydrogen ions แข่งขันน้อยลง และมี ligands ที่เป็นประจุลบมากขึ้น ส่งผลให้การดูดซับแคดเมียมมากขึ้น ที่ช่วงความเป็นกรด-เบส 6-8 ค่าการดูดซับลดลง น่าจะเกิดจากการตกตะกอนของสารละลาย และ polarity ของแคดเมียมไอออนลดลงเมื่อความเป็นกรด-เบสสูงขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการดูดซับลดลง (Kumar *et al.* 2006)

ผลของความเป็นกรด-เบสต่อการดูดซับแคดเมียมมีผู้สนใจศึกษากันมากโดยใช้ตัวดูดซับหลายชนิด ส่วนใหญ่รายงานว่าประสิทธิภาพในการดูดซับเหมาะสมที่สุดของแคดเมียม คือ ที่ความเป็นกรด-เบส 6 ดังรายงานของ Romera *et al.* (2006) พบว่าความเป็นกรด-เบส 6 เหมาะสมต่อการดูดซับแคดเมียม นิกเกิล และสังกะสี และความเป็นกรด-เบส 5 สำหรับการดูดซับทองแดง และตะกั่วของสาหร่ายสีเขียว สีแดง และสีน้ำตาล Ozdemir *et al.* (2004) พบว่า *Pseudomonas*

*aeruginosa* PU21 มีการดูดซับแคดเมียมสูงสุดที่ความเป็นกรด-เบส 6 เช่นเดียวกับ *Sphingomonas paucimobilis* ที่มีการดูดซับแคดเมียมสูงสุดที่ความเป็นกรด-เบส 6 (Tangaromsuk *et al.* 2002) ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Sakaguchi *et al.* (1979) ที่พบว่า *Chlorella regularis* จะมีการสะสมแคดเมียมได้ดีที่สุดที่ความเป็นกรด-เบส 7.0 และ Chu *et al.* (1997) ศึกษาการใช้ *Chlorella vulgaris* ดูดซับแคดเมียมไอออน พบว่าการเข้าสู่สมมูลเกิดขึ้นภายใน 2-3 นาที ความสามารถในการดูดซับเพิ่มขึ้นตามความเป็นกรด-เบสที่เพิ่มขึ้น โดยเชื่อว่าเกี่ยวข้องกับ electrical attraction เนื่องจากเกิด protonation กับ binding site และลดการแข่งขันระหว่างแคดเมียมไอออน ( $Cd^{2+}$ ) กับโปรตรอน ( $H^+$ ) ในการจับกับ binding site และสอดคล้องกับ Fraile *et al.* (2005) ที่ศึกษาใน *Chlorella vulgaris* เช่นกัน พบว่าการชักนำการดูดซับโลหะได้ดีที่ความเป็นกรด-เบสสูง โดยอธิบายว่าเนื่องจากมีการแข่งขันระหว่างแคดไอออนของโลหะและโปรตรอนระหว่างกระบวนการดูดซับ กล่าวคือหากความเป็นกรด-เบสต่ำเกินไปจะทำให้มีประจุของโปรตรอนในสารละลายมาก ทำให้โปรตรอนนี้แย่งกับไอออนโลหะหนัก ในการจับกับผิวเซลล์ของสาหร่าย ทำให้สาหร่ายจับกับไอออนของโลหะหนักได้น้อยลง และสาหร่ายจะดูดซับโลหะหนักได้นั้น โลหะหนักจะต้องแตกตัวได้มากในขณะที่มีประจุ  $H^+$  ในสารละลายน้อย

#### 6. ศึกษาผลของปริมาณแคดเมียมเริ่มต้นต่อค่าการดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris*

การศึกษาผลของปริมาณแคดเมียมเริ่มต้นต่อค่าการดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris* พบว่าการดูดซับเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณแคดเมียมเริ่มต้นมากขึ้น มีค่าการดูดซับสูงสุดที่ความเข้มข้นแคดเมียม 100 มิลลิกรัม/ลิตร คือ มีค่า 23.95 มิลลิกรัม/กรัม ถ้าความเข้มข้นสูงเกินกว่า 100 มิลลิกรัม/ลิตร การดูดซับลดลง สอดคล้องกับการทดลองของ Warakamin (2003) พบว่าปริมาณความเข้มข้นของแคดเมียมที่เพิ่มขึ้น มีผลต่อประสิทธิภาพในการดูดซับโลหะหนักของสาหร่าย และ Özer *et al.* (1996) ศึกษา *Rhizopus arrhizus* ที่ทำให้แห้ง พบว่าจะดูดซับแคดเมียมสูงสุดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร และไม่ดูดซับเพิ่มขึ้นถ้าความเข้มข้นเริ่มต้นมากกว่านี้ ขัดแย้งกับการทดลองของ Bhatii *et al.* 2006 ที่พบว่าเมื่อความเข้มข้นสังกะสีเริ่มต้นสูงขึ้นความสามารถในการดูดซับโลหะของ *Moringa oleifera* Lam. จะลดลง โดยอธิบายว่าที่ความเข้มข้นสังกะสีต่ำสัดส่วนของพื้นที่ผิวการดูดซับต่อปริมาณไอออนโลหะทั้งหมดมีค่าสูง จึงมีความสามารถในการดูดซับโลหะมาก ดังนั้นที่ความเข้มข้นไอออนโลหะต่ำ ประสิทธิภาพในการดูดซับจึงสูง และเมื่อความเข้มข้นไอออนโลหะสูงขึ้น binding sites จะอิ่มตัวเร็ว เพราะปริมาณมวลชีวภาพคงที่ ทำให้ความสามารถในการดูดซับลดลง (Bhatii *et al.* 2006)

## 7. การศึกษา Kinetic และ equilibrium

จากการคำนวณ adsorption isotherm กับสมการ Langmuir และ Freundlich isotherm equation พบว่าข้อมูลสามารถเขียนเป็นกราฟเส้นตรงได้ สมดุลของการดูดซับเป็นไปตามแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของ Langmuir และ Freundlich และ fit ได้ดีกับสมการ Langmuir แสดงให้เห็นว่าการดูดซับแคดเมียมด้วยสาหร่ายเป็นการดูดซับแบบ monolayer โดยจับกับหมู่ function หรือ binding site ที่ผิวเซลล์แบบ homogeneous โดยมีค่าคงที่ของการดูดซับ ( $K_A$ ) เป็น 0.17 ลิตร/มิลลิกรัม และปริมาณสารที่ถูกดูดซับ/ปริมาณตัวดูดซับ ณ จุดสมดุล ( $q_m$ ) มีค่า 11.4 มิลลิกรัม/กรัม อยู่ในเกณฑ์ต่ำกว่า *Oscillatoria lunaris*, *Rhizopus arrhizus*, *Gelidium* และ *Pantoea* ยกเว้น *Bacillus circulans*, *Chlamydomonas reinhardtii* และ *Durvillaea* sp. (ตารางที่ 14) จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการดูดซับแตกต่างกัน เนื่องจากคุณสมบัติของโครงสร้าง functional groups และผิวเซลล์ ความลาดของเส้นตรงมีค่าปานกลาง แสดงว่าประสิทธิภาพการดูดซับของ *K. lunaris* มีความแปรปรวนเมื่อ loading มีการเปลี่ยนแปลง

### สรุปผลการทดลอง

1. อัตราการเติบโตของ *K. lunaris* ในอาหารที่เติมและไม่เติม EDTA เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ที่มีและไม่มี EDTA 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ช่วงเวลาสว่างและช่วงเวลามืด 12:12 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที พบว่าช่วง log phase มีค่า 0.52 และ 0.53 เซลล์/วัน ตามลำดับ และพบว่ามีค่า doubling time เป็น 1.33 และ 1.30 วัน หรือ 31.99 และ 31.20 ชั่วโมง การเติบโตของสาหร่าย *K. lunaris* กลุ่มที่เติมและไม่เติม EDTA ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

2. ความไวของ *K. lunaris* ในการตอบสนองต่อพิษแคดเมียมพบว่ามีค่า  $EC_{50}$  ของแคดเมียมในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงมีค่า 0.117, 0.039 และ 0.010 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ที่ไม่มี EDTA 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ช่วงเวลาสว่างและช่วงเวลามืด 12:12 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที

3. ระยะเวลาการเข้าสู่สมดุลของการดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris* พบว่าเมื่อความเข้มข้นแคดเมียมเริ่มต้นมีค่า 1 มิลลิกรัม/ลิตร และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร จะเข้าสู่สมดุลในเวลา 80 นาที เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA 400 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที

4. ความเข้มข้นแคดเมียมเริ่มต้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์และค่าการดูดซับเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นมากเปอร์เซ็นต์และค่าการดูดซับจะมากขึ้น

5. จำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การดูดซับและค่าการดูดซับ ณ จุดสมดุล พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียมสูงสุดถึง 88.51 % เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร ที่ความเป็นกรด-เบส 6.8 เมื่อเลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที เป็นเวลา 80 นาที

6. ความเป็นกรด-เบสเป็นปัจจัยที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียม พบว่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมที่สุดในการดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris* คือ 6.0 โดยมีเปอร์เซ็นต์การดูดซับ 95.50 % และมีค่าการดูดซับเป็น  $19.04 \pm 0.24$  มิลลิกรัม/กรัม เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ

26±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที เป็นเวลา 80 นาที

7. ค่าการดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris* พบว่ามีค่าสูงสุดที่ความเข้มข้นแคดเมียม 100 มิลลิกรัม/ลิตร คือ มีค่า 23.95 มิลลิกรัม/กรัม จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA 50 มิลลิลิตร ที่มีค่าความเป็นกรด-เบส 6.0 ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที เป็นเวลา 160 นาที

8. สมดุลของการดูดซับเป็นไปตามแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของ Langmuir และ Freundlich และ fit ได้ดีกับสมการ Langmuir มากกว่า Freundlich โดยมีค่าคงที่ของการดูดซับ ( $K_A$ ) เป็น 0.17 ลิตร/มิลลิกรัม และปริมาณสารที่ถูกดูดซับ/ปริมาณตัวดูดซับ ณ จุดสมดุล ( $q_m$ ) มีค่า 11.4 มิลลิกรัม/กรัม แสดงให้เห็นว่าการดูดซับแคดเมียมด้วยสาหร่ายเป็นการดูดซับแบบ monolayer โดยจับกับหมู่ function หรือ binding site ที่ผิวเซลล์แบบ homogeneous

#### ข้อเสนอแนะ

น่าจะการศึกษาเพิ่มเติมในหัวข้อต่อไปนี้

1. เปรียบเทียบความสามารถในการดูดซับระหว่างเมือกกับตัวสาหร่าย
2. ศึกษาการผลของโลหะหนักร่วมกันหลายชนิดต่อการดูดซับของสาหร่าย *K. lunaris*

### บรรณานุกรม

- กองจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. เกณฑ์ระดับคุณภาพน้ำและมาตรฐานคุณภาพน้ำประเทศไทย. กรุงเทพฯ: มิตรนราการพิมพ์, 2540.
- ชุติมา วงศ์สุจิน. “การวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียม โครเมียม ทองแดง เหล็ก ตะกั่ว แมงกานีส ปรอท ซีลีเนียม และสังกะสีในสัตว์ทะเลบางชนิดจากอ่าวไทยโดยวิธีอะตอมมิกแอฟซอร์พชันสเปกโทรโฟโตเมทรี.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2540.
- คาริวรรณ เศรษฐธรรม และวรรณภา อธิชนะ. “การศึกษาชนิดและปริมาณโลหะหนักที่ปล่อยในระบบบำบัดน้ำเสียรวม ในเขตเทศบาลนครขอนแก่น.” รายงานการวิจัยการศึกษานิดและปริมาณโลหะหนักที่ปล่อยทิ้งในระบบบำบัดน้ำเสียรวม ในเขตเทศบาลนครขอนแก่น ภาควิชาวิทยาศาสตร์อนามัยสิ่งแวดล้อม คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2544.
- ปิยมากรณ์ ดวงมนตรี. “การสะสมโลหะหนักในสิ่งมีชีวิตผ่านลำดับชั้นการบริโภคในแหล่งน้ำ.” วิทยานิพนธ์ปริญญาสาธารณสุขศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาอนามัยสิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2545.
- ฝ่ายจัดการสารพิษกองมาตรฐานคุณภาพสิ่งแวดล้อม สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ. แคดเมียม. กรุงเทพฯ: กรมควบคุมมลพิษ, 2541.
- ยุคดี พิรพรพิศาล. สาหร่ายน้ำจืดในภาคเหนือของประเทศไทย. กรุงเทพฯ : โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบาย การจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย, 2548.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. แพลงก์ตอนพืช. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2544.
- วชิรศณา เจริญศักดิ์สวรรค์. “การศึกษาการสะสมของสังกะสีและแคดเมียม โดยสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว *Chlorella* sp.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะพลังงานและวัสดุ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, 2531.
- วิลาวัลย์ สันธิประภา. “ปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมสังกะสีโดย *Penicillium* sp. PT1.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ปีการศึกษา, 2541.
- วิไลภรณ์ บุญญกิจจินดา. “ผนังเซลล์.” เอกสารประกอบการสอนวิชาชีววิทยาของเซลล์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2550

- สุนทรี ทารพันธ์. “ผลของแคดเมียมต่อการรอดชีวิตของสาหร่าย *Kirchneriella lunaris*.” รายงานวิชาการศึกษารายบุคคล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ปีการศึกษา, 2550.
- สุนิรัตน์ เรืองสมบูรณ์, อานาจ ชิด ไชสง, บุญยา บุญนาค, ดวงรัตน์ อินทร และนฤมล วิเชอร์ สารวิทย์. การศึกษาองค์ประกอบ และปริมาณของ capsular polysaccharide ที่สกัดจากไซยาโนแบคทีเรียน้ำจืด *Gloeocapsa* sp. การประชุมวิชาการสาหร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 2, โรงแรมฮอติเคย์การ์เดน จ.เชียงใหม่. 23-25 มีนาคม 2548.
- สุนิรัตน์ เรืองสมบูรณ์. “การกำจัดตะกั่วและแคดเมียมโดยใช้สาหร่ายขนาดเล็ก *Phormidium angustissimum* และ *Chlorella vulgaris*.” วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์. 1 (2547) : 288-296.
- สุนนทิพย์ บุญนาค และ ปิยะดา ชีระกุลพิศุทธิ์. “รายงานการวิจัยเรื่องการเปรียบเทียบความสามารถในการทนต่อความเค็มของออกซิซิลลาทอเรีย (*Oscillatoria* sp.) และ สไปรูลิน่า (*Spirulina* sp.)” คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2529
- อรพิน ภูมิภมร และปิยะพันธ์ อัสวะดิษฐเลิศ. “การกำจัดโลหะหนักออกจากสารละลายโดยจุลินทรีย์.” วิทยาศาสตร์การอาหาร. 16 (2527) : 36-51.
- อุไรวรรณ อินทร์ม่วง, วรางคณา สังสิทธิ์สวัสดิ์ และ บรรยง อินทร์ม่วง. “ปริมาณโลหะหนักตกค้างในตะกอนท้องน้ำของลำน้ำพอง.” รายงานการวิจัย ปริมาณโลหะหนักตกค้างในตะกอนท้องน้ำของลำน้ำพอง, 2543.
- Adhiya, J., Cai, X., Sayre, R.T., and Traina, S. “Binding of aqueous cadmium by the lyophilized biomass of *Chlamydomonas reinhardtii*.” Colloid Surface A. 210 (2002) : 1-11.
- Aksu, Z. “Equilibrium and kinetic modeling of cadmium (II) biosorption by *C. vulgaris* in a batch system: effect of temperature.” Sep. Purif. Technol. 21 (2001) : 285-294.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), and Water Environmental Federation (WEF). Standard Methods for Examination of water and wastewater, 20<sup>th</sup> ed., Baltimore Maryland, USA : United Book. Press, 1998.
- Bailey, R.W., and Staehelin, L.A. “The chemical composition of isolated cell walls of *Cyanidium caldarium*.” J. Gen. Microbiol. 54 (1968) : 269-276.
- Becker, E.W., “Limitations of heavy metal removal from waste water by mean of algae.” Water Res. 17 (1983) : 459-466.
- Bhatti, N.H., Beenish, M., Muhammad, A.H., and Raziya, N. “Removal of Zn (II) ions from aqueous solution using *Moringa oleifera* Lam. (horseradish tree) biomass.” Process Biochemistry. 42 (2007) : 547-553

- Bird, M.G., and Hass, P. "On the nature of the cell wall constituents of *Laminaria* spp. Mannuronic acid." Biochem. J. 25 (1931) : 403-411.
- Brown, M.J., and Lester, J.N. "Role of bacterial extracellular polymers in metal uptake in pure bacterial culture and activated sludge : effect of metal concentration." Water Res. 16 (1982) : 1539-1548.
- Campanella, L., Favero, G., Persi, L., and Tomassetti, M. "Evaluation of radical scavenging properties of several plants, fresh or from a herbalist's, using a superoxide dismutase biosensor." Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis. 24 (2001) : 1055-1064.
- Casiraghi, M.P., Luporini, S., and Silva, E.M. "Uptake of cadmium by *Pseudokirchneriella supcapitata*." Braz. arch. biol. technol. 48 (2005) : 1027-1034.
- Cervantes, C., Campos-Garcia, J., Devars, S., Gutierrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzman, J. C., and Moreno-Sanchez, R. "Interactions of chromium with microorganisms and plants." FEMS Microbiol Rev. 25 (2001) : 335-347.
- Chu, K.H., Hashim, M.A., Phang, S.M., and Samuel, V.B. "Biosorption of cadmium by algal biomass: adsorption and desorption characteristics." Water Science and Technology. 35 (7) (1997) : 115-122.
- Cossich, E.S., Tavares, C.R.G., and Ravagnani, T.M.K. "Biosorption of chromium (III) by *Sargassum* sp. biomass." Electronic journal of Biotechnology [online]. 15 August 2002, vol. 5, no. 2 [cited 29 May 2008]. Available from: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol5/issue2/full/4/index.html>. ISSN 0717-3458.
- Crist, H.R., Oberholser, K., Shank, N., and Nguyen, M. "Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls." Environ. Sci. and Technol. 15 (1981) : 1212-1217.
- Cruz, C.C.V., Costa, A.C., Henriques, C.A., and Luna, A.S. "Kinetic modeling and equilibrium studies during cadmium biosorption by dead *Sargassum* sp. biomass." Bioresource Technol. 91 (2004) : 249-257.
- Cunningham, D.P., and Lundie, L.L. "Precipitation of cadmium by *Clostridium thermoaceticum*." Appl. Environ. Microbiol. 59 (1993) : 7-14.
- Darnall, D.W., Greene, B., and Gardea-Torresdey, J., In: Norris, P. and Kelly, D., Editors, BioHydroMetallurgy, Anthony Rowe Ltd, Chippenham, Wiltshire, Great Britain, 1987.

p. 487.

\_\_\_\_\_, Henzl, M.T., Hosea, J.M., McPherson, R.A., Sneddon, J., and Alexander, M.D.

“Selective recovery of gold and other ions from an algal biomass.” Environ. Sci. Technol. 20 (1986) : 206–208.

Davis, T.A., Volesky, B., and Mucci, A. “A review of the biochemical of heavy metal biosorption by brown algae.” Water Research. 37 (2003) : 4311-4390.

De Fillippis, L.F., and Pallaghy, C.K. “The effect of sub-lethal concentrations of mercury and zinc on *Chlorella*, I. growth characteristics and uptake of metals.” Z. Pflanzenphysiol. 78 (1976a) : 197-207.

\_\_\_\_\_. “The Effect of sub-lethal concentrations of mercury and zinc on *Chlorella*, II. photosynthesis and pigment composition.” Z. Pflanzenphysiol. 79 (1976b) : 323-335.

De Fillippis, L.F., and Pallaghy, C.K. Heavy metals: sources and biological effects. In: Rai, L.C.; Gaur, J.P. and Soeder, C.J. eds. Advances in Limnology Series: Algae and Water Pollution, E. Scheizerbartsche Press, Stuttgart, Germany. 1994. 31-77.

Devi Prasad, P.V., and Devi Prasad, P.S. “Effect of cadmium, lead and nickel on three fresh water green algae.” Water Air and Soil Pollut. 17 (1982) : 263-268.

Dissanayake, C.B., Kritsotakis, K., and Tobschall, H.J. “The abundance of Au, Pt, Pd, and the mode of heavy metal fixation in highly polluted sediments from the Rhine River near Mainz, West Germany.” J. environ. Stud. 22 (1984) : 109-119.

Dragos, N., Bercea, V., Nicoara, A., and Chiorean, A. “Toxic effect of zinc, Cadmium and their mixtures on the growth of two unicellular green algae.” Revue Roumaine de Biologie Serie de Biologie Vegetale. 33 (1988) : 103-110.

Duong, T.D., Nguyen, K.L., and Hoang, M. “Isotherm sorption of  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , and  $Ni^{2+}$  onto high-yield kraft fibers.” J. Colloid and Interface Science. 303 (2006) : 69-74.

Errecalde, O., Seidl, M., and Campbell P.G.C. “Influence of a low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*: an exception to the free-ion model.” Water Research. 32 (1998) : 419-429.

Failla, M.L., Boneelict, C.D., and Weinberg, E.P. “Accumulation and strange of  $Zn^{2+}$  by *Candida utilis*.” J. Gen. Microbiol. 94 (1976) : 23-26.

- Ferguson, J., and Bubela, B. "The concentration of Cu(II), Pb (II) and Zn (II) from aqueous solutions by particulate algal matter." Chem. Geol. 13 (1974) : 163–186.
- Figueira, B., Volesky, S., Ciminelli, T.V., and Roddick, A.F. "Biosorption of metal in brown seaweed biomass." Water Research. 34 (2000) : 196-204.
- Filip, D.S., Peters, T., Adams, V.D., and Middlebrooks, E.J. "Residual heavy metal removal by an algae-intermittent sand filtration system." Water Research. 13 (1979) : 305–313.
- Fleeger, J.W., Carman, K.R., and Nisbet, R.M. "Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems." Sci. Total Environ. 317 (2003) : 207–233.
- Fraile, A., Penche, S., Gonzalez, F., Blazquez, M.L., Munoz, J.A., and Ballester, A. "Biosorption of copper, zinc, cadmium and nickel by *Chlorella vulgaris*." Chemistry in ecology. 21 (2005) : 61-75.
- Franklin, N.M., Stauber, J.L., Lim, R.P., and Petocz, P. "Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater algae (*Chlorella* sp.) : The effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake." Environmental Toxicology and Chemistry. 21 (11) (2002) : 2412-2422.
- Gadd, G.M., and Griffiths, A.J. "Microorganisms and heavy metal toxicity." Microb. Ecol. 4 (1978) : 303-317.
- Gin, K.Y.-H., Tang, Y.-Z., and Aziz, M.A. "Derivation and application of a new model for heavy metal biosorption by algae." Water Research. 36 (2002) : 1313-1323.
- Gipps, J.F., and Cooler, A.W. "Effect of physical and culture conditions on uptake of cadmium by *Chlorella pyrenoidosa*." Aust. J. Mar. Freshwater Res. 31 (1980) : 745-755.
- \_\_\_\_\_. "Effect of some nutrient cation on uptake of cadmium by *Chlorella pyrenoidosa*." Aust. J. Mar. Freshwater Res. 33 (1982) : 979-987.
- Gong, R., Ding, Y., Liu, H., Chen, Q., and Liu, Z. "Lead biosorption and desorption by intact and pretreated *Spirulina maxima* biomass." Chemosphere. 58 (2005) : 125-130.
- Gonzalez, F., Romera, E., Ballester, A., Blazquez, M.L., and Munoz, J.A. "Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae." Bioresource Technology. 98 (2007) : 3344-3353.
- Gotelli, I.B., and Cleland, R. "Differences in the occurrence and distribution of hydroxyproline-proteins among the algae." Am. J. Bot. 55 (1968) : 907-914.

- Greene, B., McPherson, R.A., and Darnall, D.W. Algal sorbents for selective metal ion recovery. In: J. Patterson and R. Pasino, Editors, Metals Speciation, Separation and Recovery, Lewis, Chelsea, MI .1987. pp. 315–338.
- Hamdy, A.A. “Biosorption of heavy metals by marine algae.” Current Microbiology. 41 (2004) : 232-238.
- Hammouda, O., Gaber, A., and Raouf-Abdel, N. “Microalgae and wastewater treatment.” Ecotoxicology and Environmental Safety. 31 (1995) : 205-210.
- Hanif, M.A., Nadeem, R., Bhatii, H.N., Ahmad, N.R., and Ansari, T.M. “Ni (II) biosorption by *Cassia fistula* (Golden Shower) biomass.” J. Harzard Mater. 139 (2007) : 345-355.
- Hart, B.A., and Scaife, B.D. “Toxicity and Bioaccumulation of Cadmium in *Chlorella pyrenoidosa*.” Environ. Res. 14 (1977) : 401-413.
- Hasset, J.M., Jannett, J.C., and Smith, J.E. “Microplate technique for determining accumulation of metals by algae.” Appl Environ Microbiol. 41 (1981) : 1097-1106.
- Holan, Z.R., and Volesky, B. “Biosorption of lead and nickel by biomass of marine algae.” Biotech. Bioeng. 43 (1994) : 1001-1009.
- \_\_\_\_\_, and Prasetyo, I. “Biosorption of cadmium by biomass of marine alga.” Biotechnol. Bioeng. 41 (1993) : 819-825.
- Hong, C., and Shan-shan, P. “Bioremediation potential of *Spirulina* : toxicity and biosorption studies of lead.” Journal Zhejiang University Science. 3 (2005) : 171-174.
- Horikoshi, T., Nakajima, A., and Sakaguchi, T. “Accumulation of uranium by microorganism.” European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 12 (1981) : 90-96.
- \_\_\_\_\_. “Uptake of uranium by *Chlorella vegulris*.” Agric. Biol. Chem. 43 (1979) : 617-623.
- Hosea, M., Greene, B., Mcpherson, R., Henzl, M., Dale, A.M., and Darnall, D.W. “Accumulation of elemental gold on the alga *Chlorella vulgaris*” Inorganica Chimica Acta 123 (1986) : 161-165.
- Hughes, M.N., and Poole, R.K. Metals and Micro-organisms. Champan & Hall, London (1989).
- International Organisation for standardisation (ISO). “Water quality-algal growth inhibition test.” Draft Internation Standard ISO/DIS8692. Geneva, Switzerland. (1987 : 1-5.
- Inthorn, D., Sidtitoon, N., Silapanuntakul, S., and Incharoensakdi, Aran. “Sorption of mercury, cadmium and lead by microalgae.” Science Asia. 28 (2002) : 253-261.

- \_\_\_\_\_, Nagase, H., Isaji, Y., Hirata K., and Miyamoto, K. "Removal of cadmium from aqueous solution by the filamentous cyanobacterium *Tolypothrix tenuis*." Journal of fermentation and Bioengineering. 82 (1996) : 580-584.
- Issa, A. A., Abdel – Basset R., and Adam M. S., "Abolition of heavy metal toxicity on *Kirchneriella lunaris* (Chlorophyta) by calcium." Annals of Botany . 75 (1995) : 189-192.
- Kapoor , A., and Viraraghavan, T. "Biosorption of heavy metals on *Aspergillus niger*. effect of pretreatment." Bioresource Technology. 630 (1998) : 109-113.
- \_\_\_\_\_, and Cullimore, D.R. "Removal of heavy metals using fungus *Aspergillus niger*." Bioresource Technology. 70 (1999) : 95-104.
- Katircioğlu, H., Aslim, B., Türker, A.R., Atici, T., and Beyatli, Y. "Removal of cadmium(II) ion from aqueous system by dry biomass, immobilized live and heat-inactivated *Oscillatoria* sp. H1 isolated from freshwater (Mogan Lake)." Bioresource Technology. 99 (2008) : 4185-4191.
- Khummongkol, D. "Uptake of heavy metals by microorganisms a model approach." Doctor of Philosophy's Thesis, Graduate School, Monash University, 1982.
- \_\_\_\_\_. Canterford, G.S., and Freyer, C. "Accumulation of heavy metals in unicellular algae." Biotechnol. Bioengng. 12 (2004) : 2643–2660.
- Koukal, B., Gueguen, C., Pardos, M., and Dominik J. "Influence of humic substances on the toxic effects of cadmium and zinc to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*." Chemosphere. 53 (2003) : 953-961.
- Kratochvil, D., and Volesky, B. "Advances in biosorption of heavy metals." Trends Biotechnology. 16 (1988) : 291-300.
- Kumar, Y.P., King, P., and Prasad, V.S.R.K. "Removal of copper from aqueous solution using *Ulva fasciata* sp.—Amarine green algae", Journal of Hazardous Materials. B137 (2006) : 367–373.
- Kuyucak , N., and Volesky, B. "Accumulation of gold by algal biosorbent." Biorecovery. 1 (1989a) : 189–204.
- \_\_\_\_\_. "The elution of gold sequestered on a natural biosorbent." Biorecovery. 1 (1989b) : 205–218.

- Les, A., and Walker, R.W. "Toxicity and binding of copper, zinc and cadmium by the blue-green alga, *Chroococcus parvus*." Water Air and Soil Pollution. 23 (1984) : 129-139.
- Leusch, A., Holan, Z.R., and Volesky, B. "Biosorption of heavy metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) by chemically-reinforced biomass of marine algae." Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 62 (1995) : 279-288.
- Lewmanomont, K., Wongrat, L., and Supranwanid, C. Algae in Thailand. Office of Environmental Policy and Planning, Ministry of Natural Resources and Environment, Bangkok, Thailand. 1995. 334.
- Leyva-Ramos, J.R., Rangel-Mendez, J., Mendoza-Barron, L., Fuentes-Rubio, and Guerrero-Coronado, R.M. "Adsorption of cadmium (II) from aqueous solution onto activated carbon." Water Science and Technology. 35 (1997) : 205-211.
- Liu, Y., Fan, T., Zeng, G., Li, X., Tong, Q., Ye, F., Zhou, M., Xu, W., and Huang, Y. "Removal of cadmium and zinc ions from aqueous solution by living *Aspergillus niger*." Trans. Nonferrous Metals Soc. China. 16 (2006) : 681-686.
- Lombardi, A. T., and Vieira, A. A. H. "Lead and copper complexing extracellular ligands release by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales, Chlorophyta)." Phycologia. 38 (1999) : 283-288.
- \_\_\_\_\_, Armando, A.H., and Luiz, S.A. "Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales)." Journal of Phycology. 38 (2002) : 332-337.
- \_\_\_\_\_, Hidalgo, T. M. R., and Vieira, A. A. H. "Copper complexing properties of dissolved organic materials exuded by the freshwater microalgae *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae)." Chemosphere. 6 (4) (2005) : 453-459.
- Matheickal, J.T., Yu, O., and Woodburn, G.M. "Biosorption of cadmium(II) from aqueous solution by pre-treated biomass of marine algae *Durvillaea potatorum*." Water Research. 33 (1999) : 335-343.
- McLarnon-Riches, C.J., Rolph, C.E., Greenway, D. L.A., and Robinson, P.K. "Effect of environmental factors and metals on *Selenastrum capricornutum* lipids." Phytochemistry. 49 (1998) : 1241-1247.

- Meylan, S., Behra, R., and Sigg, L. "Accumulation of copper and zinc in periphyton in response to dynamic variations of metal speciation in freshwater." Environ. Sci. Technol. 37 (2003) : 5204–5212.
- Mohamed, Z. A. "Removal cadmium and manganese by a non toxic strain of the freshwater cyanobacterium *Gloeothece magna*." Water Research. 35 (2001) : 4405-4409.
- Mohammed, M. H., and Markert, B. "Toxicity of heavy metals on *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) de Brebisson in batch cultures." Environ. Sci. and Pollut. Res. 13 (2006) : 98-104 .
- Mosulén, S., Dominguez, M.J., Vigar, J., Vilchez, C., Guiraum, A., and Vega. J.M. "Metal toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*. Effect on sulfate and nitrate assimilation." Biomolecular Engineering. 20 (2003) : 199-203.
- Mowell, J.L., and Gadd, G.M. "Zinc uptake and toxicity in the yeast *Sporobolomyces roseus* and *Saccharomyces cerevisiae*." J. Gen. Microbiol. 129 (1983) : 3421-3425.
- \_\_\_\_\_. "Cadmium uptake by *Aureobasidium pullulans*." J. Gen. Microbiol. 130 (1984) : 279-284.
- Nagel, K., Adelmeier, U., and Voigt, J. "Subcellular distribution of cadmium in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." J Plant Physiol. 149 (1996) : 86–90.
- Nakajima, A., Horikoshi, T., and Sakaguchi, T. "Iron effects of the uptake of uranium by *Chlorella regularis*." Agric. Biol. Chem. 43 (1979a) : 625-629.
- Nakajima, A., Horikoshi, T., and Sakaguchi, T. "Uptake of copper ion by green microalgae." Agric. Biol. Chem. 43 (1979b) : 1455-1460.
- \_\_\_\_\_. "Uptake of manganese ion by *Chlorella regularis*." Agric. Biol. Chem. 43 (1979c) : 1461-1466.
- \_\_\_\_\_. "Studies on the accumulation of heavy-metal elements in biological-systems: 21. Recovery of uranium by immobilized microorganisms." Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16 (1982) : 88–91.
- Norberg A.B., and Engors, S. "Production of extracellular polysaccharide by *Zoogloea ramigera*." Appl. Environ. Microbiol. 44 (1982) : 1231-1237.
- Norris, P.R., and Kelly, D.P. "Accumulation of cadmium and cobalt by *Saccharomyces cerevisiae*." J. Gen. Microbiol. 99 (1977) : 317-324.

- \_\_\_\_\_. "Accumulation of metals by bacteria and yeasts." Dev. Ind. Microbiol. 20 (1979) : 299-308.
- Organisation for Economic cooperation and Development (OECD). "Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test no. 201." OECD Guidelines for testing Chemicals. Paris, France. (2002) : 1-21.
- Ozdemir, G., Ceyhan, N., Ozturk, T., Akirmak, F., and Cosar, T. "Biosorption of chromium(VI), cadmium(II) and copper(II) by *Pantoea* sp. TEM18." Chemical Engineering Journal. 102 (2004) : 249-253.
- Özer, A., Ibrahim Ekiz, H., Özer, D., Kutsal, T., and Çaglar, A. "A staged purification process to remove heavy metal ions from wastewater using *Rhizopus arrhizus*." Process Biochemistry. 32 (1997) : 319-326.
- Pal, A., Ghosh, S., and Paul, A.K. "Biosorption of cobalt by fungi from serpentine soil of Andaman." Bioresource Technology 97 (2006) : 1253-1258.
- Peña-Castro, J.M., Martínez-Jerónimo, F., Esparza-García, F., and Cañizares-Villanueva, R.O. "Heavy metals removal by the microalga *Scenedesmus incrassatulus* in continuous culture." Bioresource Technology. 94 (2004) : 219-222.
- Perez-Rama, M., Abalda Alonso, J., Herrero López, C., and Torres Vaamonde, E. "Cadmium removal by living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica*." Bioresource Technology. 84 (2002) : 265-270.
- Perry, G. D. R., Hayward, J., "The uptake of <sup>65</sup>Zn by *Dunaliella tertiolecta* Butcher." J. mar. boil. Ass. U.K. 53 (1973) : 915-922.
- Quek, S.Y., Al-Duri, B., Wase, D.A.J., and Forster, C.F. "Coir as a biosorbent of copper and lead." Trans IChemE. 76 Part B (1988) : 50-54.
- \_\_\_\_\_, Wase, D.A.J., and Forster, C.F. "The use of sago waste for the sorption of lead and copper." Water SA. 24 (3) (1998) : 251-256.
- Rachlin, J.W., Jensen, T.E., and Warkentine, B. "The growth responses of *Chlorella saccharophila*, *Navicula incerta* and *Nitzschia closterium* to selected concentrations of cadmium." Bull. Torrey Bot. Club. 1982. 109-129.

- Rakshae, R., Khosravi, M., and Ganji, M.T. "Kinetic modeling and thermodynamic study to remove Pb(II), Cd(II), Ni(II) and Zn(II) from aqueous solution using dead and living *Azolla filiculoides*." J. Hazardous Materials. B134 (2006) : 120-129.
- Rangsayatorn, N., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., and Lanza, G.R. "Phytoremediation potential of *Spirulina (Arthrospira) platensis*: biosorption and toxicity studies of cadmium." Environmental Pollution. 119 (2002) : 45-53.
- Romera, E., Gonzalez, F., Ballester, A., Blazquez, M. L., and Munoz, J.A. "Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae." Bioresource Technology. 98 (2007) : 3344-3353.
- \_\_\_\_\_. "Biosorption with Algae: A Statistical Review." J. Crit. Rev. Biotechnol. 26 (2006) : 223-235.
- Rose, A.H. "Transport of Compounds into and out of Micro-Organisms." Chemical Microbiology. Butterworths. 3 rd Edition. 1976. 159-179.
- Rose, P. D., Boshoff G.A., Van Hille, R. P., Wallare, L. C. M., Dunn, K.M., and Duncan, J. R. "An integrated algae sulphate reducing high rate ponding process for the treatment of acid mine drainage wastewater." Biodegradation. 9 (1998) : 247-257.
- Saeed, A., and Iqbal, M. "Immobilization of blue green microalgae on lofa sponge to biosorb cadmium in repeated shake flask batch and continuous flow fixed bed column reactor system." World J. Microb. Biotechnol. 22 (2006) : 775-782.
- Sakaguchi, T., Horikoshi, T., and Nakajima, A. "Uptake of uranium from sea water by microalgae." J. Ferment. Technol. 56 (1978) : 561-565.
- \_\_\_\_\_. "Accumulation of molybdenum by green microalgae." European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 12 (1981) : 84-89.
- Sakaguchi, T., Tusji, T., Nakajima, A., and Horikoshi, T. "Accumulation of cadmium by green microalgae." European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 8 (1979) : 207-215.
- Say, R., Yilmaz, N., and Denizli, A. "Removal of Cr(VI) ions from synthetic solutions by the fungus *Penicillium canescens*." Eur. J. Min. Proc. Environ. Prot. 3 (2003) : 36-41.
- Schmitt, D., Müller, A., Csögör, Z. Frimmel, F.H., and Posten, C. "The adsorption kinetics of metal ions onto different microalgae and siliceous earth." Water Research. 35 (3) (2001) : 779-785.

- Schowaneck, D., Mcavoy, D., Versteeg, D., and Hanstveit, A. "Effects of nutrient trace metal speciation on algal growth in the presence of the chelator [S,S-EDDS]." Aquatic toxicology. 36 (1996) : 253-275.
- Scott, J.A. Sage, G.K., and Palmer, S.J. "Metal immobilization by microbialcapsular coatings." Biorecovery. 1 (1988) : 51-58.
- Sheng, P. X., Ting, Y. P., Chen, J. P., and Hong, L. "Sorption of lead, copper, cadmium, zinc and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms." J. Colloid. Interf. Sci. 275 (2004) : 131-141.
- Shumate II, S.E., Strandberg, G.W., and Parrot Jr, J.R. "Biological removal of metal ions from aqueous process streams." Biotechnol. and Bioeng. Symp. 8 (1978) : 13-20.
- Simmons, P., and Singleton, I. "A method to increase silver biosorption by an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*." Appl. Microbiol. Biotechnol. 45 (1996) : 278-285.
- Singh, S.P., and Yadava, V. "Cadmium induced inhibition of nitrate uptake in *Anacystis nidulans*: Interaction with other divalent cations." J. Gen. Appl. Microbiol. 29 (1983) : 297-304.
- Skowronski, T. "Adsorption of cadmium on green microalgae, *Stichococcus bacillaris*." Chemosphere. 15 (1986a) : 69-76.
- \_\_\_\_\_. "Energy-dependent transport of cadmium by *Stichococcus bacillaris*." Chemosphere. 13 (1984a) : 1378-1384.
- \_\_\_\_\_. "Influence of some physico-chemical factor on cadmium uptake by green alga *Stichococcus bacillaris*." Appl. Microbiol. Biotechnol. 24 (1986b) : 423-425.
- \_\_\_\_\_. "Uptake of cadmium by *Stichococcus bacillaris*." Chemosphere. 13 (1984b) : 1385-1389.
- Solisio, C., Lodi, A., Soletto, D., and Converti, A. "Cadmium biosorption on *Spirulina platensis* biomass." Bioresource Technology. 99 (2008) : 5933-5937.
- Stillwell, E.F., and Holland, J.R. "Effect of nickel on *Cricosphaera carterae*." Sci. Bio. J. 3 (1977) : 401.
- Strandberg, G.W., Shumate II, S. E., and Parrot Jr, F.R. "Microbial cells as biosorbent for heavy metals; accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*." Appl. Environ. Microbiol. 41 (1981) : 237-245.

- Stratton, G.W., and Corke, C.T. "The effect of cadmium ion on the growth, photosynthesis, and nitrogenase activity of *Anabaena inaequalis*." Chemosphere. 8 (1979) : 277-282.
- Tangaromsuk, J., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., and Upatham, E.S. "Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass." Bioresource Technol. 85 (2002) : 103-105.
- Tein, C.J. "Biosorption of metal ions by freshwater algae with different surface characteristics." Process Biochemistry. 38 (2002) : 605-613.
- Terry, A.P., and Stone, W. "Biosorption of cadmium and copper contaminated water by *Scenedesmus abundans*." Chemosphere. 47 (2002) : 249-255.
- Ting, Y.P., Lawson, F., and Prince, L.G. "Uptake of cadmium and zinc by the algae *Chlorella vulgaris*: part 1. individual species." Biotech. Bioeng. 34 (1989) : 990-999.
- Tõnsuaadu, K., Viipsi, K., and Trikkel, A. "EDTA impact on Cd<sup>2+</sup> migration in apatite-water system" J. Hazardous Material. 154 (2008) : 491-497.
- Tsezos, M., and Volesky, B. "Biosorption of uranium and thorium." Biotechnol. Bioeng. 23 (1981) : 583-604.
- Valdman, E., and Leite, S.G.F. "Biosorption of Cd, Zn and Cu by *Sargassum* sp. waste biomass." Bioproc. Eng. 22 (2004) : 171-173.
- Vigneault, B., and Campbell, P.G.C. "Uptake of cadmium by freshwater green algae : Effect of pH and aquatic humic substances." Journal of Phycology. 41 (2005) : 55-61.
- Vilar, Vitor J. P., Botelho, Cidalia M.S., and Boaventura, Rui A.R. "Equilibrium and kinetic modeling of Cd (II) biosorption by algae *Gelidium* and agar extraction algal waste." Water Res. 40 (2006) : 291-302.
- Volesky, B., and Holan, Z. R. "Biosorption of heavy metals." Biotechnol. Prog. 11(1995) : 235-250.
- Warakamin, B. "Biosorption of cadmium by cyanobacteria *Oscillatoria subtilissima* and *Oscillatoria jatorvensis*." Master's Thesis, Department of Environmental Biology, Graduate School, Mahidol University, 2003.
- Watkins II, J.W., Elder, R.C., Greene, B., and Darnall, D.W. "Determination of gold binding in an alga biomass using EXAFS and XANES spectroscopies." Inorg. Chem. 26 (1987) : 1147-1151.

- Wood, J.M., and Wang, H-K. "Microbial resistance to heavy metals." Environ. Sci. Technol. 17 (1983) : 582-590.
- Xue, H.B., Stumm, W., and Sigg, L. "The binding of heavy metal to algae surfaces." Water Res. 22 (1988) : 917-926.
- Yan, G., and Viraraghavan, T. "Heavy metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*." Water Res. 37 (2003) : 4486-4496.
- Yilmaz, E.I., and Ensari, N.Y. "Cadmium biosorption by *Bacillus circulans* strain EB1." World J. Microb. Biotechnol. 21 (2005) : 777-779.
- Yoshida, N., Ikeda, R., and Okuno, T. "Identification and characterization of heavy metal-resistant unicellular alga isolated from soil and its potential for phytoremediation." Bioresource Technology. 97 (2006) 1843-1849.
- Zhai, Y.B., Wei, X.X, Zeng, G.M., Zhang, D.J., and Chu, K.F. "Study of adsorbent derived from sewage sludge for the removal of  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  in aqueous solutions." Sep. Purif. Technol. 38 (2004) : 191-196.

## ภาคผนวก

## ภาคผนวก

ตารางที่ 1 แสดงการเติบโตของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี EDTA \*

วันที่	จำนวนเซลล์ของ <i>K. lunaris</i> เซลล์/มิลลิลิตร				s.d.
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	
3	89,051	101,051	101,051	97,051	6,928.20
5	323,051	233,051	323,051	293,051	51,961.52
7	773,051	815,051	827,051	805,051	28,354.89
10	1,187,051	1,409,051	1,337,051	1,311,051	113,260.76
12	1,283,051	1,511,051	1,469,051	1,421,051	121,342.49
14	1,181,051	1,487,051	1,427,051	1,365,051	162,148.08

ตารางที่ 2 แสดงการเติบโตของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี EDTA \*

วันที่	จำนวนเซลล์ของ <i>K. lunaris</i> เซลล์/มิลลิลิตร				s.d.
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	
3	53,051	29,051	41,051	41,051	12,000.00
5	257,051	263,051	215,051	245,051	26,153.39
7	761,051	773,051	587,051	707,051	104,096.11
10	1,079,051	1,109,051	1,235,051	1,141,051	82,776.81
12	1,097,051	1,169,051	1,205,051	1,157,051	54,990.91
14	1,085,051	1,211,051	1,085,051	1,127,051	72,746.13

\*เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ช่วงเวลาสว่างและช่วงเวลามืด 12:12 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที

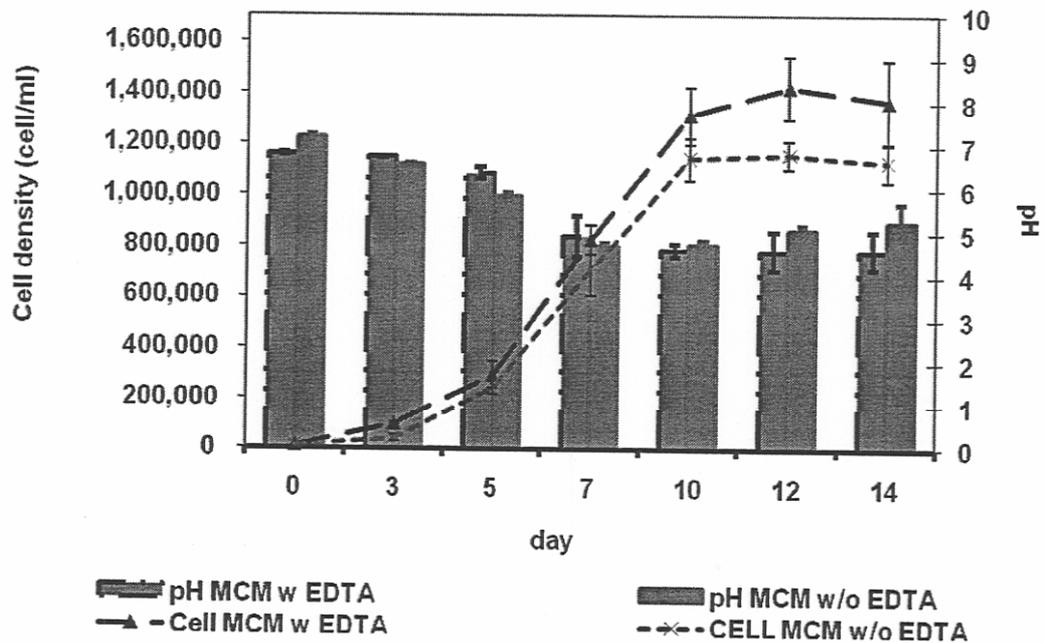
ตารางที่ 3 แสดงค่าความเป็นกรด-เบสของ *K. lunaris* ที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี EDTA \*

วันที่	จำนวนเซลล์ของ <i>K. lunaris</i> เซลล์/มิลลิลิตร				s.d.
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	
3	6.74	6.75	6.74	6.74	0.01
5	6.34	6.41	6.51	6.42	0.09
7	5.34	5.24	5.23	5.27	0.06
10	4.6	4.57	4.66	4.61	0.05
12	4.5	4.49	4.81	4.60	0.18
14	4.67	4.53	4.08	4.43	0.31

ตารางที่ 4 แสดงค่าความเป็นกรด-เบสของ *K. lunaris* ที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี EDTA \*

วันที่	จำนวนเซลล์ของ <i>K. lunaris</i> เซลล์/มิลลิลิตร				s.d.
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	
3	6.55	6.57	6.56	6.56	0.01
5	5.88	5.86	5.74	5.83	0.08
7	4.75	4.78	4.75	4.76	0.02
10	4.81	4.85	4.76	4.81	0.05
12	5.01	5.17	5.2	5.13	0.10
14	5.39	5.63	5.4	5.47	0.14

\*เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ช่วงเวลาสว่างและช่วงเวลามืด 12:12 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที



ภาพที่ 1 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ *K. lunaris* และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบสในอาหาร MCM 100 มิลลิลิตร ใน erlenmeyer flask ที่เติมและไม่ได้เติม EDTA (w = with, w/o = without) \*

ตารางที่ 5 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย *t*-test เพื่อเปรียบเทียบการเติบโตของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมและไม่เติม EDTA ในวันที่ 3, 5, 7, 10, 12 และ 14 ตามลำดับ

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
CELL	Equal variances assumed	.400	.561	7.000	4	.002	56000.0000	8000.0000	33788.44	78211.56
	Equal variances not assumed			7.000	3.200	.005	56000.0000	8000.0000	31417.37	80582.63

\* เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ช่วงเวลาสว่างและช่วงเวลามืด 12:12 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
CELL5	Equal variances assumed	3.125	.152	1.429	4	.226	48000.0000	33585.7112	-45248.9	141248.9
	Equal variances not assumed			1.429	2.952	.250	48000.0000	33585.7112	-59870.0	155870.0

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
CELL7	Equal variances assumed	7.607	.051	1.573	4	.191	98000.0000	62289.6460	-74943.8	270943.8
	Equal variances not assumed			1.573	2.295	.240	98000.0000	62289.6460	-139546	335545.9

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
CELL10	Equal variances assumed	.339	.592	2.099	4	.104	170000.00	80993.8269	-54874.9	394874.9
	Equal variances not assumed			2.099	3.662	.110	170000.00	80993.8269	-63293.4	403293.4

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
CELL12	Equal variances assumed	3.059	.155	3.432	4	.026	264000.00	76915.5381	50448.23	477551.8
	Equal variances not assumed			3.432	2.788	.046	264000.00	76915.5381	8361.3637	519638.6

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
CELL14	Equal variances assumed	3.094	.153	2.320	4	.081	238000.00	102606.04	-46880.0	522880.0
	Equal variances not assumed			2.320	2.774	.110	238000.00	102606.04	-104135	580134.7

ตารางที่ 6 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย *t*-test เพื่อเปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-เบสของ เมื่อเลี้ยง *K. lunalis* ในอาหารที่เติมและไม่เติม EDTA ในวันที่ 3, 5, 7, 10, 12 และ 14 ตามลำดับ

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
PH	12.047	.026	-0.720	4	.511	-.1433	.1990	-0.6959	.4092
Equal variances not assumed			-0.720	2.010	.546	-.1433	.1990	-0.9956	.7089

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
PH3	.400	.561	27.500	4	.000	.1833	6.667E-03	.1648	.2018
Equal variances not assumed			27.500	3.200	.000	.1833	6.667E-03	.1628	.2038

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
PH5	.006	.944	9.002	4	.001	.5933	6.591E-02	.4103	.7763
Equal variances not assumed			9.002	3.943	.001	.5933	6.591E-02	.4093	.7774

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
PH7	7.143	.056	13.967	4	.000	.5100	3.651E-02	.4086	.6114
Equal variances not assumed			13.967	2.322	.003	.5100	3.651E-02	.3720	.6480

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
PH10	.015	.910	-5.298	4	.006	-.1967	3.712E-02	-0.2997	-0.936E-02
Equal variances not assumed			-5.298	3.999	.006	-.1967	3.712E-02	-0.2997	-0.936E-02

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
PH12	Equal variances assumed	2.296	.204	-4.372	4	.012	-.5267	.1205	-.8611	-.1922
	Equal variances not assumed			-4.372	3.147	.020	-.5267	.1205	-.9001	-.1532

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
PH14	Equal variances assumed	2.834	.168	-5.382	4	.006	-1.0467	.1945	-1.5866	-.5067
	Equal variances not assumed			-5.382	2.748	.016	-1.0467	.1945	-1.6990	-.3943

ตารางที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลา (ในวันที่ 3, 5, 7, 10, 12 และ 14) กับจำนวนเซลล์กลุ่มที่เติม EDTA โดยจัดเป็นกลุ่มได้ 4 กลุ่ม

## CEDTA

Duncan <sup>a</sup>

DAY	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
.00	3	10000.00			
3.00	3	97051.00			
5.00	3		293051.0		
7.00	3			805051.0	
10.00	3				1311051
14.00	3				1365051
12.00	3				1421051
Sig.		.259	1.000	1.000	.179

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลา (ในวันที่ 3, 5, 7, 10, 12 และ 14) กับจำนวนเซลล์กลุ่มที่ไม่เติม EDTA โดยจัดเป็นกลุ่มได้ 4 กลุ่ม

#### CNEDTA

Duncan <sup>a</sup>

DAY	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
.00	3	10000.00			
3.00	3	41051.00			
5.00	3		245051.0		
7.00	3			707051.0	
14.00	3				1127051
10.00	3				1141051
12.00	3				1157051
Sig.		.549	1.000	1.000	.583

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 9 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลา (ในวันที่ 3, 5, 7, 10, 12 และ 14) กับความเป็นกรด-เบสในกลุ่มที่เติม EDTA โดยจัดเป็นกลุ่มได้ 4 กลุ่ม

#### PHEDTA

Duncan <sup>a</sup>

DAY	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
14.00	3	4.4267			
12.00	3	4.6000			
10.00	3	4.6100			
7.00	3		5.2700		
5.00	3			6.4200	
3.00	3				6.7433
.00	3				6.8100
Sig.		.155	1.000	1.000	.575

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 10 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลากับความเป็นกรด-เบสในกลุ่มที่ไม่เติม EDTA โดยจัดเป็นกลุ่มได้ 6 กลุ่ม

## PHNEDTA

Duncan<sup>a</sup>

DAY	N	Subset for alpha = .05					
		1	2	3	4	5	6
7.00	3	4.7600					
10.00	3	4.8067					
12.00	3		5.1267				
14.00	3			5.4733			
5.00	3				5.8267		
3.00	3					6.5600	
.00	3						6.9533
Sig.		.707	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 11 แสดงผลการวิเคราะห์ Partial Correlation ระหว่างจำนวนเซลล์และความเป็นกรด-เบสของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีและไม่มี EDTA

## --- PARTIAL CORRELATION COEFFICIENTS ---

Controlling for.. DAY

CEDTA PHEDTA CNEDTA PHNEDTA

CEDTA 1.0000 -.8171 .9156 -.4305

( 0) ( 18) ( 18) ( 18)

P=. P=.000 P=.000 P=.058

PHEDTA -.8171 1.0000 -.8130 .5583

( 18) ( 0) ( 18) ( 18)

P=.000 P=. P=.000 P=.011

CNEDTA .9156 -.8130 1.0000 -.5368

( 18) ( 18) ( 0) ( 18)

P=.000 P=.000 P=. P=.015

PHNEDTA -.4305 .5583 -.5368 1.0000

( 18) ( 18) ( 18) ( 0)

P= .058 P= .011 P= .015 P= .

(Coefficient / (D.F.) / 2-tailed Significance)

". " is printed if a coefficient cannot be computed

ตารางที่ 12 แสดงจำนวนเซลล์เมื่อเลี้ยงในแคดเมียมที่ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 มิลลิกรัม/ลิตรเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นแคดเมียม (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
control	20,200	21,400	18,000	19,866.67
0.025	19,200	17,600	19,600	18,800.00
0.05	14,600	15,000	14,600	14,733.33
0.1	9,000	9,400	9,000	9,133.33
0.15	4,800	7,800	6,600	6,400.00
0.2	5,400	4,400	5,200	5,000.00

ตารางที่ 13 แสดงจำนวนเซลล์เมื่อเลี้ยงในแคดเมียมที่ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 มิลลิกรัม/ลิตรเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นแคดเมียม (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
control	35,800.00	33,800.00	29,400.00	33,000.00
0.025	20,200.00	23,400.00	21,000.00	21,533.33
0.05	14,200.00	13,400.00	13,000.00	13,533.33
0.1	7,800.00	4,400.00	5,600.00	5,933.33
0.15	1,200.00	3,400.00	3,400.00	2,666.67
0.2	2,600.00	2,200.00	3,000.00	2,600.00

\* เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ช่วงเวลาสว่างและช่วงเวลามืด 12:12 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที

ตารางที่ 14 แสดงจำนวนเซลล์เมื่อเลี้ยงในแคดเมียมที่ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 มิลลิกรัม/ลิตรเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้น แคดเมียม (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
control	44,400	42,000	55,000	47,133.33
0.025	20,800	23,600	30,000	24,800.00
0.05	14,200	14,200	13,400	13,933.33
0.1	10,400	5,800	5,600	7,266.67
0.15	4,600	3,600	3,400	3,866.67
0.2	3,400	3,600	1,600	2,866.67

ตารางที่ 15 จำนวนเซลล์ของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในแคดเมียมความเข้มข้นต่าง ๆ ในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ของแคดเมียม (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนเซลล์/มิลลิลิตร		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
control	19,866.67±1,724	33,000.00±3,274	47,133.33±6,917
0.025	18,800.00±1,058	21,533.00±1,665	24,800.00±4,715
0.05	14,733.33±230	13,533.33±611	13,933.33±461
0.1	9,133.33±230.	5,933.33±1,724	7,266.67±2,715
0.15	6,400.00±1,509	2,666.67±1,270	3,866.67±642.91
0.2	5,000.00±529	2,600.00±400	2,866.67±1,101

\* เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ช่วงเวลาสว่างและช่วงเวลามืด 12:12 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที

ตารางที่ 16 แสดงผลการวิเคราะห์ Probit analysis ของการเจริญเติบโตของ *K. lunaris* ที่ 24 ชั่วโมง

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Parameter estimates converged after 6 iterations.

Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
DOSE	-11.21016	.04163	-269.27856
Intercept	1.31820	.00520	253.58586

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 12830.282 DF = 13 P = .000

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Observed and Expected Frequencies

	Number of	Observed	Expected		
DOSE	Subjects	Responses	Responses	Residual	Prob
.03	19866.7	19200.0	16893.673	2306.327	.85035
.03	19866.7	17600.0	16893.673	706.327	.85035
.03	19866.7	19600.0	16893.673	2706.327	.85035
.05	19866.7	14600.0	15410.228	-810.228	.77568
.05	19866.7	15000.0	15410.228	-410.228	.77568
.05	19866.7	14600.0	15410.228	-810.228	.77568
.10	19866.7	9000.0	11486.083	-2486.083	.57816
.10	19866.7	9400.0	11486.083	-2086.083	.57816
.10	19866.7	9000.0	11486.083	-2486.083	.57816
.15	19866.7	4800.0	7115.877	-2315.877	.35818
.15	19866.7	7800.0	7115.877	684.123	.35818
.15	19866.7	6600.0	7115.877	-515.877	.35818

.20	19866.7	5400.0	3532.037	1867.963	.17779
.20	19866.7	4400.0	3532.037	867.963	.17779
.20	19866.7	5200.0	3532.037	1667.963	.17779

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Confidence Limits for Effective DOSE

95% Confidence Limits

Prob	DOSE	Lower	Upper
.01	.32511	.27955	.39997
.02	.30079	.25987	.36771
.03	.28537	.24735	.34728
.04	.27376	.23791	.33193
.05	.26432	.23022	.31946
.06	.25628	.22365	.30887
.07	.24924	.21788	.29959
.08	.24293	.21271	.29129
.09	.23719	.20799	.28376
.10	.23191	.20364	.27683
.15	.21004	.18550	.24827
.20	.19267	.17088	.22577
.25	.17776	.15814	.20668
.30	.16437	.14645	.18977
.35	.15196	.13534	.17438
.40	.14019	.12445	.16013
.45	.12880	.11350	.14675
.50	.11759	.10223	.13409
.55	.10638	.09040	.12197
.60	.09499	.07780	.11025
.65	.08322	.06420	.09870
.70	.07081	.04935	.08706

.75	.05742	.03286	.07495
.80	.04251	.01410	.06188
.85	.02513	-.00815	.04701
.90	.00327	-.03650	.02866
.91	-.00201	-.04339	.02428
.92	-.00775	-.05089	.01952
.93	-.01406	-.05915	.01431
.94	-.02110	-.06840	.00851
.95	-.02914	-.07896	.00191
.96	-.03858	-.09139	-.00582
.97	-.05019	-.10670	-.01529
.98	-.06561	-.12710	-.02785
.99	-.08993	-.15931	-.04757

ตารางที่ 17 แสดงผลการวิเคราะห์ Probit analysis ของการเจริญเติบโตของ *K. lunaris* ที่ 48 ชั่วโมง

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Parameter estimates converged after 8 iterations.

Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

Regression Coeff. Standard Error Coeff./S.E.

DOSE -11.20402 .03703 -302.56279

Intercept Standard Error Intercept/S.E.

.44257 .00371 119.42998

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 15373.142 DF = 13 P = .000

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Observed and Expected Frequencies

	Number of	Observed	Expected		
DOSE	Subjects	Responses	Responses	Residual	Prob
.03	33000.0	20200.0	18629.540	1570.460	.56453
.03	33000.0	23400.0	18629.540	4770.460	.56453
.03	33000.0	21000.0	18629.540	2370.460	.56453
.05	33000.0	14200.0	14954.927	-754.927	.45318
.05	33000.0	13400.0	14954.927	-1554.927	.45318
.05	33000.0	13000.0	14954.927	-1954.927	.45318
.10	33000.0	7800.0	8214.981	-414.981	.24894
.10	33000.0	4400.0	8214.981	-3814.981	.24894
.10	33000.0	5600.0	8214.981	-2614.981	.24894
.15	33000.0	1200.0	3559.108	-2359.108	.10785
.15	33000.0	3400.0	3559.108	-159.108	.10785
.15	33000.0	3400.0	3559.108	-159.108	.10785
.20	33000.0	2600.0	1190.307	1409.693	.03607
.20	33000.0	2200.0	1190.307	1009.693	.03607
.20	33000.0	3000.0	1190.307	1809.693	.03607

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Confidence Limits for Effective DOSE

Prob	DOSE	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	.24714	.21243	.30294
.02	.22281	.19252	.27106
.03	.20737	.17982	.25091
.04	.19576	.17022	.23579
.05	.18631	.16237	.22354
.06	.17827	.15566	.21314
.07	.17122	.14974	.20405
.08	.16491	.14441	.19595

.09	.15917	.13954	.18860
.10	.15388	.13503	.18187
.15	.13201	.11596	.15437
.20	.11462	.10016	.13317
.25	.09970	.08587	.11571
.30	.08631	.07225	.10081
.35	.07389	.05889	.08776
.40	.06211	.04555	.07603
.45	.05072	.03213	.06519
.50	.03950	.01854	.05491
.55	.02829	.00465	.04493
.60	.01689	-.00968	.03501
.65	.00511	-.02467	.02492
.70	-.00730	-.04059	.01443
.75	-.02070	-.05790	.00322
.80	-.03562	-.07727	-.00916
.85	-.05300	-.09994	-.02349
.90	-.07488	-.12858	-.04141
.91	-.08017	-.13551	-.04573
.92	-.08591	-.14305	-.05041
.93	-.09222	-.15133	-.05556
.94	-.09927	-.16060	-.06130
.95	-.10731	-.17117	-.06784
.96	-.11675	-.18360	-.07551
.97	-.12837	-.19889	-.08494
.98	-.14380	-.21923	-.09745
.99	-.16813	-.25132	-.11714

ตารางที่ 18 แสดงผลการวิเคราะห์ Probit analysis ของการเจริญเติบโตของ *K. lunaris* ที่ 72 ชั่วโมง

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Parameter estimates converged after 13 iterations.

Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
DOSE	-9.56264	.03171	-301.60015
Intercept	.10254	.00313	32.76022

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 17867.936 DF = 13 P = .000

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Observed and Expected Frequencies

DOSE	Subjects	Responses	Responses	Residual	Prob
.03	47133.3	20800.0	21007.399	-207.399	.44570
.03	47133.3	23600.0	21007.399	2592.601	.44570
.03	47133.3	30000.0	21007.399	8992.601	.44570
.05	47133.3	14200.0	16666.758	-2466.758	.35361
.05	47133.3	14200.0	16666.768	-2466.768	.35361
.05	47133.3	13400.0	16666.768	-3266.768	.35361
.10	47133.3	10400.0	9267.735	1132.265	.19663
.10	47133.3	5800.0	9267.729	-3467.729	.19663
.10	47133.3	5600.0	9267.735	-3667.735	.19663
.15	47133.3	4600.0	4310.493	289.507	.09145
.15	47133.3	3600.0	4310.493	-710.493	.09145
.15	47133.3	3400.0	4310.490	-910.490	.09145

.20	47133.3	3400.0	1656.668	1743.332	.03515
.20	47133.3	3600.0	1656.668	1943.332	.03515
.20	47133.3	1600.0	1656.668	-56.668	.03515

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Confidence Limits for Effective DOSE

95% Confidence Limits

Prob	DOSE	Lower	Upper
.01	.25400	.21533	.31890
.02	.22549	.19237	.28053
.03	.20740	.17770	.25627
.04	.19380	.16660	.23810
.05	.18273	.15752	.22337
.06	.17331	.14973	.21089
.07	.16505	.14285	.19999
.08	.15766	.13665	.19029
.09	.15093	.13095	.18151
.10	.14474	.12566	.17347
.15	.11911	.10305	.14093
.20	.09873	.08376	.11639
.25	.08126	.06576	.09678
.30	.06556	.04825	.08052
.35	.05102	.03101	.06647
.40	.03722	.01395	.05383
.45	.02386	-.00301	.04206
.50	.01072	-.02001	.03077
.55	-.00242	-.03721	.01970
.60	-.01577	-.05484	.00860
.65	-.02957	-.07318	-.00275
.70	-.04412	-.09260	-.01463

.75	-.05981	-.11364	-.02736
.80	-.07729	-.13714	-.04147
.85	-.09766	-.16459	-.05785
.90	-.12329	-.19922	-.07838
.91	-.12948	-.20759	-.08333
.92	-.13621	-.21669	-.08871
.93	-.14361	-.22669	-.09461
.94	-.15187	-.23788	-.10120
.95	-.16129	-.25064	-.10871
.96	-.17235	-.26563	-.11753
.97	-.18596	-.28407	-.12836
.98	-.20405	-.30860	-.14275
.99	-.23255	-.34729	-.16541

ตารางที่ 19 ค่าการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบสของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในแคคเมียมความเข้มข้น 0.025-0.200 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ) \*

ความเข้มข้น ของแคคเมียม (มิลลิกรัม/ลิตร)	ความเป็นกรด-เบส			
	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
Control	6.80	6.51±0.06 <sup>a</sup>	6.34±0.15	6.38±0.17
0.025	6.80	6.45±0.02	6.36±0.04	6.39±0.07
0.050	6.80	6.48±0.05	6.42±0.05	6.44±0.05
0.100	6.80	6.49±0.02	6.43±0.04	6.42±0.01
0.150	6.80	6.60±0.11 <sup>b</sup>	6.41±0.20	6.38±0.16
0.200	6.80	6.37±0.08 <sup>a,b</sup>	6.42±0.02	6.38±0.07

\* เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ช่วงเวลาสว่างและช่วงเวลามืด 12:12 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที

ตารางที่ 20 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรด-เบสของ *K. lunaris* กับความเข้มข้น  
แคะเมียมต่าง ๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: PH24HR

Tukey HSD

(I) CONCCD	(J) CONCCD	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
.00	.03	7.000E-02	3.896E-02	.492	-5.38E-02	.1938
	.05	2.500E-02	3.896E-02	.986	-9.88E-02	.1488
	.10	1.250E-02	3.896E-02	.999	-.1113	.1363
	.15	-3.000E-02	3.896E-02	.969	-.1538	9.382E-02
	.20	.1325*	3.896E-02	.032	8.675E-03	.2563
.03	.00	-7.000E-02	3.896E-02	.492	-.1938	5.382E-02
	.05	-4.500E-02	3.896E-02	.852	-.1688	7.882E-02
	.10	-5.750E-02	3.896E-02	.683	-.1813	6.632E-02
	.15	-1.000E-01	3.896E-02	.157	-.2238	2.382E-02
	.20	6.250E-02	3.896E-02	.606	-6.13E-02	.1863
.05	.00	-2.500E-02	3.896E-02	.986	-.1488	9.882E-02
	.03	4.500E-02	3.896E-02	.852	-7.88E-02	.1688
	.10	-1.250E-02	3.896E-02	.999	-.1363	.1113
	.15	-5.500E-02	3.896E-02	.720	-.1788	6.882E-02
	.20	.1075	3.896E-02	.111	-1.63E-02	.2313
.10	.00	-1.250E-02	3.896E-02	.999	-.1363	.1113
	.03	5.750E-02	3.896E-02	.683	-6.63E-02	.1813
	.05	1.250E-02	3.896E-02	.999	-.1113	.1363
	.15	-4.250E-02	3.896E-02	.879	-.1663	8.132E-02
	.20	.1200	3.896E-02	.061	-3.82E-03	.2438
.15	.00	3.000E-02	3.896E-02	.969	-9.38E-02	.1538
	.03	1.000E-01	3.896E-02	.157	-2.38E-02	.2238
	.05	5.500E-02	3.896E-02	.720	-6.88E-02	.1788
	.10	4.250E-02	3.896E-02	.879	-8.13E-02	.1663
	.20	.1625*	3.896E-02	.006	3.868E-02	.2863
.20	.00	-.1325*	3.896E-02	.032	-.2563	-8.68E-03
	.03	-6.250E-02	3.896E-02	.606	-.1863	6.132E-02
	.05	-.1075	3.896E-02	.111	-.2313	1.632E-02
	.10	-.1200	3.896E-02	.061	-.2438	3.825E-03
	.15	-.1625*	3.896E-02	.006	-.2863	-3.87E-02

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางที่ 21 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรด-เบสของ *K. lunaris* กับความเข้มข้น  
แกลบเมียมต่าง ๆ ในเวลา 48 ชั่วโมง

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: PH48HR

Tukey HSD

(I) CONCCD	(J) CONCCD	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
.00	.03	4.500E-02	2.957E-02	.656	-4.90E-02	.1390
	.05	-1.500E-02	2.957E-02	.995	-.1090	7.897E-02
	.10	-2.500E-02	2.957E-02	.955	-.1190	6.897E-02
	.15	-3.500E-02	2.957E-02	.839	-.1290	5.897E-02
	.20	-7.500E-03	2.957E-02	1.000	-.1015	8.647E-02
.03	.00	-4.500E-02	2.957E-02	.656	-.1390	4.897E-02
	.05	-6.000E-02	2.957E-02	.365	-.1540	3.397E-02
	.10	-7.000E-02	2.957E-02	.219	-.1640	2.397E-02
	.15	-8.000E-02	2.957E-02	.123	-.1740	1.397E-02
	.20	-5.250E-02	2.957E-02	.504	-.1465	4.147E-02
.05	.00	1.500E-02	2.957E-02	.995	-7.90E-02	.1090
	.03	6.000E-02	2.957E-02	.365	-3.40E-02	.1540
	.10	-1.000E-02	2.957E-02	.999	-.1040	8.397E-02
	.15	-2.000E-02	2.957E-02	.982	-.1140	7.397E-02
	.20	7.500E-03	2.957E-02	1.000	-8.65E-02	.1015
.10	.00	2.500E-02	2.957E-02	.955	-6.90E-02	.1190
	.03	7.000E-02	2.957E-02	.219	-2.40E-02	.1640
	.05	1.000E-02	2.957E-02	.999	-8.40E-02	.1040
	.15	-1.000E-02	2.957E-02	.999	-.1040	8.397E-02
	.20	1.750E-02	2.957E-02	.990	-7.65E-02	.1115
.15	.00	3.500E-02	2.957E-02	.839	-5.90E-02	.1290
	.03	8.000E-02	2.957E-02	.123	-1.40E-02	.1740
	.05	2.000E-02	2.957E-02	.982	-7.40E-02	.1140
	.10	1.000E-02	2.957E-02	.999	-8.40E-02	.1040
	.20	2.750E-02	2.957E-02	.933	-6.65E-02	.1215
.20	.00	7.500E-03	2.957E-02	1.000	-8.65E-02	.1015
	.03	5.250E-02	2.957E-02	.504	-4.15E-02	.1465
	.05	-7.500E-03	2.957E-02	1.000	-.1015	8.647E-02
	.10	-1.750E-02	2.957E-02	.990	-.1115	7.647E-02
	.15	-2.750E-02	2.957E-02	.933	-.1215	6.647E-02

ตารางที่ 22 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรด-เบสของ *K. lunaris* กับความเข้มข้น  
แกลกเมียมต่าง ๆ ในเวลา 72 ชั่วโมง

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: PH72HR

Tukey HSD

(I) CONCCD	(J) CONCCD	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
.00	.03	-1.500E-02	3.554E-02	.998	-.1280	9.795E-02
	.05	-6.000E-02	3.554E-02	.556	-.1730	5.295E-02
	.10	-4.000E-02	3.554E-02	.865	-.1530	7.295E-02
	.15	5.000E-03	3.554E-02	1.000	-.1080	.1180
	.20	7.500E-03	3.554E-02	1.000	-.1055	.1205
.03	.00	1.500E-02	3.554E-02	.998	-9.80E-02	.1280
	.05	-4.500E-02	3.554E-02	.799	-.1580	6.795E-02
	.10	-2.500E-02	3.554E-02	.979	-.1380	8.795E-02
	.15	2.000E-02	3.554E-02	.992	-9.30E-02	.1330
	.20	2.250E-02	3.554E-02	.987	-9.05E-02	.1355
.05	.00	6.000E-02	3.554E-02	.556	-5.30E-02	.1730
	.03	4.500E-02	3.554E-02	.799	-6.80E-02	.1580
	.10	2.000E-02	3.554E-02	.992	-9.30E-02	.1330
	.15	6.500E-02	3.554E-02	.473	-4.80E-02	.1780
	.20	6.750E-02	3.554E-02	.434	-4.55E-02	.1805
.10	.00	4.000E-02	3.554E-02	.865	-7.30E-02	.1530
	.03	2.500E-02	3.554E-02	.979	-8.80E-02	.1380
	.05	-2.000E-02	3.554E-02	.992	-.1330	9.295E-02
	.15	4.500E-02	3.554E-02	.799	-6.80E-02	.1580
	.20	4.750E-02	3.554E-02	.762	-6.55E-02	.1605
.15	.00	-5.000E-03	3.554E-02	1.000	-.1180	.1080
	.03	-2.000E-02	3.554E-02	.992	-.1330	9.295E-02
	.05	-6.500E-02	3.554E-02	.473	-.1780	4.795E-02
	.10	-4.500E-02	3.554E-02	.799	-.1580	6.795E-02
	.20	2.500E-03	3.554E-02	1.000	-.1105	.1155
.20	.00	-7.500E-03	3.554E-02	1.000	-.1205	.1055
	.03	-2.250E-02	3.554E-02	.987	-.1355	9.045E-02
	.05	-6.750E-02	3.554E-02	.434	-.1805	4.545E-02
	.10	-4.750E-02	3.554E-02	.762	-.1605	6.545E-02
	.15	-2.500E-03	3.554E-02	1.000	-.1155	.1105

ตารางที่ 23 แสดงจำนวนเซลล์ของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหาร MCM ในกลุ่มควบคุมที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)				s.d.
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	
0	12,600	11,800	11,600	12,000	529.15
5	9,800	12,000	11,600	11,133	1,171.89
10	13,800	12,800	12,800	13,133	577.35
20	15,200	11,800	13,800	13,600	1,708.80
40	16,600	11,000	13,600	13,733	2,802.38
80	18,800	15,000	13,800	15,867	2,610.24
160	20,600	16,000	11,200	15,933	4,700.35
240	14,600	15,200	17,800	15,867	1,700.98
300	19,200	15,800	15,000	16,667	2,230.10

ตารางที่ 24 แสดงจำนวนเซลล์ของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหาร MCM ที่มีแคดเมียม 1 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)				s.d.
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	
0	9,900	9,800	10,000	9,900.00	100.00
5	10,400	11,200	9,400	10,333.33	901.85
10	11,200	11,800	9,400	10,800.00	1,249.00
20	11,800	14,400	11,200	12,466.67	1,700.98
40	14,600	9,400	12,800	12,266.67	2,640.71
80	11,600	8,200	12,000	10,600.00	2,088.06
160	11,400	11,800	11,400	11,533.33	230.94
240	11,600	12,200	11,200	11,666.67	503.32
300	11,200	10,200	13,400	11,600.00	1,637.07

\*\* เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA 400 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที

ตารางที่ 25 แสดงจำนวนเซลล์ของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหาร MCM ที่มีแคดเมียม 50 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลาต่างๆ

เวลา (นาทีก)	จำนวนเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)				s.d.
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	
0	11,200	11,040	9,440	10,560.00	973.24
5	10,880	10,880	11,680	11,146.67	461.88
10	6,880	8,480	5,440	6,933.33	1,520.70
20	10,240	12,320	9,600	10,720.00	1,422.11
40	10,560	10,560	10,080	10,400.00	277.13
80	8,960	8,320	9,920	9,066.67	805.32
160	10,880	11,200	11,040	11,040.00	160.00
240	10,720	12,160	12,000	11,626.67	789.26
300	10,080	8,800	7,520	8,800.00	1,280.00

ตารางที่ 26 แสดงเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นแคดเมียม 1 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลาต่างๆ

เวลา (นาทีก)	เปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียม					s.d.
	1	2	3	4	ค่าเฉลี่ย	
5	21.00	20.00	17.00	16.00	18.50	2.38
10	21.00	19.00	26.00	23.00	22.25	2.99
20	30.00	26.00	24.00	23.00	25.75	3.10
40	28.00	27.00	27.00	23.00	26.25	2.22
80	32.00	29.00	33.00	31.00	31.25	1.71
160	31.00	35.00	32.00	28.00	31.50	2.89
240	33.00	31.00	30.00	31.00	31.25	1.26
300	29.00	32.00	33.00	27.00	30.25	2.75

\* เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA 400 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที

ตารางที่ 27 แสดงเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียมของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นแคดเมียม 50 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลาต่างๆ

เวลา (นาทีก)	เปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียม					s.d.
	1	2	3	4	ค่าเฉลี่ย	
0	37.00	36.00	35.20	35.40	35.90	0.81
5	33.49	31.90	27.11	25.52	29.51	3.80
10	33.49	30.30	41.47	36.68	35.49	4.76
20	47.85	41.47	38.28	36.68	41.07	4.94
40	44.66	43.06	43.06	36.68	41.87	3.54
80	51.04	46.25	52.63	49.44	49.84	2.72
160	49.44	55.82	51.04	44.66	50.24	4.60
240	52.63	49.44	47.85	49.44	49.84	2.01
300	46.25	51.04	52.63	43.06	48.25	4.39

เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA 400 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที

ตารางที่ 28 แสดงเปอร์เซ็นต์ดูดซับและค่าการดูดซับแคดเมียมของกลุ่มที่ได้รับแคดเมียมเริ่มต้น 1 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลา 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 240 และ 300 นาที \*

เวลา (นาที)	การดูดซับ (%)		ค่าการดูดซับ (q) มิลลิกรัม/กรัม	
	แคดเมียม 1 มิลลิกรัม/ลิตร	แคดเมียม 50 มิลลิกรัม/ลิตร	แคดเมียม 1 มิลลิกรัม/ลิตร	แคดเมียม 50 มิลลิกรัม/ลิตร
0	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
5	18.50±2.38 <sup>b</sup>	36.55±0.50 <sup>c</sup>	29.51±3.80 <sup>b</sup>	2914.67±39.87 <sup>c,d</sup>
10	22.25±2.99 <sup>c</sup>	36.40±0.71 <sup>c,d</sup>	35.49±4.76 <sup>c</sup>	2902.71±56.76 <sup>c</sup>
20	25.75±3.10 <sup>d</sup>	34.80±0.54 <sup>c</sup>	41.07±4.94 <sup>d</sup>	2775.12±43.19 <sup>b,c</sup>
40	26.25±2.22 <sup>d</sup>	33.65±1.80 <sup>b,c</sup>	41.87±3.54 <sup>d</sup>	2683.41±143.47 <sup>b</sup>
80	31.25±1.71 <sup>e</sup>	36.35±1.81 <sup>b</sup>	49.84±2.72 <sup>e</sup>	2898.72±144.06 <sup>c</sup>
160	31.50±2.89 <sup>e</sup>	38.15±0.87 <sup>e</sup>	50.24±4.60 <sup>e</sup>	3042.26±69.37 <sup>d</sup>
240	31.25±1.26 <sup>e</sup>	36.45±1.43 <sup>d</sup>	49.84±2.01 <sup>e</sup>	2906.70±113.81 <sup>c</sup>
300	30.25±2.75 <sup>e</sup>	34.75±0.82 <sup>c</sup>	48.25±4.39 <sup>e</sup>	2771.13±65.60 <sup>b,c</sup>

\* เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA 400 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที

ตารางที่ 29 แสดงจำนวนเซลล์ของกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองที่ได้รับแคดเมียมเริ่มต้น 1 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลา 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 240 และ 300 นาที \*

เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)		
	กลุ่มควบคุม	แคดเมียม 1 มิลลิกรัม/ลิตร	แคดเมียม 50 มิลลิกรัม/ลิตร
0	12,000±529 <sup>a,b</sup>	9,900±100	10,560±973 <sup>b,c,d</sup>
5	11,133±1,17 <sup>a</sup>	10,333±901	11,146±461 <sup>d</sup>
10	13,133±577 <sup>a,b,c</sup>	10,800±1,249	6,933±1,520 <sup>a</sup>
20	13,600±1,708 <sup>a,b,c</sup>	12,466±1,700	10,720±1,422 <sup>c,d</sup>
40	13,733±2,802 <sup>a,b,c</sup>	12,266±2,640	10,400±277 <sup>b,c,d</sup>
80	15,867±2,610 <sup>b,c</sup>	10,600±2,088	9,066±805 <sup>b,c</sup>
160	15,933±4,700 <sup>b,c</sup>	11,533±230	11,040±160 <sup>d</sup>
240	15,867±1,700 <sup>b,c</sup>	11,666±503	11,626±789 <sup>d</sup>
300	16,667±2,230 <sup>c</sup>	11,600±1,637	8,800±1,280 <sup>b</sup>

\* เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA 400 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที

ตารางที่ 30 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลาเก็บเปอร์เซ็นต์การดูดซับที่แคดเมียม 1 มิลลิกรัม โดยจัดเป็นกลุ่มได้ 5 กลุ่ม

TAD1PPM

Duncan<sup>a</sup>

TIME	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
.00	4	.0000				
5.00	4		18.5000			
10.00	4			22.2500		
20.00	4				25.7500	
40.00	4				26.2500	
300.00	4					30.2500
80.00	4					31.2500
240.00	4					31.2500
160.00	4					31.5000
Sig.		1.000	1.000	1.000	.765	.499

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ตารางที่ 31 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลาเก็บค่าการดูดซับที่แคดเมียม 1 มิลลิกรัม โดยจัดเป็นกลุ่มได้ 5 กลุ่ม

TQ1PPM

Duncan<sup>a</sup>

TIME	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
.00	4	.0000				
5.00	4		29.5050			
10.00	4			35.4850		
20.00	4				41.0700	
40.00	4				41.8650	
300.00	4					48.2450
80.00	4					49.8400
240.00	4					49.8400
160.00	4					50.2400
Sig.		1.000	1.000	1.000	.766	.499

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ตารางที่ 32 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลาเก็บเปอร์เซ็นต์การดูดซับที่แคดเมียม 50 มิลลิกรัม โดยจัดเป็นกลุ่มได้ 4 กลุ่ม

## TAD50PPM

Duncan<sup>a</sup>

TIME	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
.00	4	.0000			
40.00	4		33.6500		
300.00	4		34.7500	34.7500	
20.00	4		34.8000	34.8000	
80.00	4			36.3500	
10.00	4			36.4000	
240.00	4			36.4500	
5.00	4			36.5500	36.5500
160.00	4				38.1500
Sig.		1.000	.176	.051	.051

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ตารางที่ 33 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลาเก็บค่าการดูดซับที่แคดเมียม 50 มิลลิกรัม โดยจัดเป็นกลุ่มได้ 4 กลุ่ม

## TQ50PPM

Duncan<sup>a</sup>

TIME	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
.00	4	.0000			
40.00	4		2239.6000		
300.00	4		2312.6675	2312.6675	
20.00	4		2316.1400	2316.1400	
80.00	4			2419.3025	
10.00	4			2422.6300	
240.00	4			2425.9550	
5.00	4			2432.6125	2432.6125
160.00	4				2539.1025
Sig.		1.000	.176	.050	.051

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ตารางที่ 34 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลา (5, 10, 20, 40, 80, 160, 240 และ 300 นาที) กับจำนวนเซลล์ *K. lunaris* ที่เปลี่ยนแปลง ในกลุ่มควบคุม โดยสามารถแบ่งกลุ่มออกเป็น 3 กลุ่ม

## CONTROL

Duncan<sup>a</sup>

TIME	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
5.00	3	11133.33		
.00	3	12000.00	12000.00	
10.00	3	13133.33	13133.33	13133.33
20.00	3	13600.00	13600.00	13600.00
40.00	3	13733.33	13733.33	13733.33
80.00	3		15866.67	15866.67
240.00	3		15866.67	15866.67
160.00	3		15933.33	15933.33
300.00	3			16666.67
Sig.		.237	.086	.121

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 35 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลา (5, 10, 20, 40, 80, 160, 240 และ 300 นาที) กับจำนวนเซลล์ของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในแคดเมียมที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร

## CD1

Duncan<sup>a</sup>

TIME	N	Subset for alpha = .05
		1
.00	3	9900.0000
5.00	3	10333.33
80.00	3	10600.00
10.00	3	10800.00
160.00	3	11533.33
300.00	3	11600.00
240.00	3	11666.67
40.00	3	12266.67
20.00	3	12466.67
Sig.		.080

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 36 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลา (5, 10, 20, 40, 80, 160, 240 และ 300 นาที) กับจำนวนเซลล์ของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในแคดเมียมที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร โดยสามารถแบ่งกลุ่มออกเป็น 4 กลุ่ม

## CD50

Duncan<sup>a</sup>

TIME	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
10.00	3	6933.3333			
300.00	3		8800.0000		
80.00	3		9066.6667	9066.6667	
40.00	3		10400.00	10400.00	10400.00
.00	3		10560.00	10560.00	10560.00
20.00	3			10720.00	10720.00
160.00	3				11040.00
5.00	3				11146.67
240.00	3				11626.67
Sig.		1.000	.055	.070	.186

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 37 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลา (5, 10, 20, 40, 80, 160, 240 และ 300 นาที) กับค่าความสามารถในการดูดซับแคดเมียมเมื่อเลี้ยง *K. lunaris* ในแคดเมียมที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร โดยสามารถแบ่งกลุ่มออกเป็น 4 กลุ่ม

## Q1PPM

Duncan<sup>a</sup>

TIME M	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
300.00	4	11.9600			
5.00	4		29.5050		
10.00	4		35.4850	35.4850	
240.00	4			37.4800	
20.00	4			41.0700	
40.00	4			41.8650	
160.00	4				49.4425
80.00	4				49.8400
Sig.		1.000	.068	.072	.900

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ตารางที่ 38 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลา (5, 10, 20, 40, 80, 160, 240 และ 300 นาที) กับค่าความสามารถในการดูดซับแคดเมียมเมื่อเลี้ยง *K. lunaris* ในแคดเมียมที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร โดยสามารถแบ่งกลุ่มออกเป็น 3 กลุ่ม

## Q50PPM

Duncan<sup>a</sup>

TIME_M	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
40.00	4	2683.4150		
300.00	4	2771.1300	2771.1300	
20.00	4	2775.1200	2775.1200	
80.00	4		2898.7250	2898.7250
10.00	4		2902.7100	2902.7100
240.00	4		2906.7000	2906.7000
5.00	4		2914.6725	2914.6725
160.00	4			3042.2650
Sig.		.202	.066	.062

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ตารางที่ 39 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลา (5, 10, 20, 40, 80, 160, 240 และ 300 นาที) กับเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียมเมื่อเลี้ยง *K. lunaris* ในแคดเมียมที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร โดยสามารถแบ่งกลุ่มออกเป็น 4 กลุ่ม

## AD1PPM

Duncan<sup>a</sup>

TIME_M	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
300.00	4	7.5000			
5.00	4		18.5000		
10.00	4		22.2500	22.2500	
240.00	4			23.5000	
20.00	4			25.7500	
40.00	4			26.2500	
160.00	4				31.0000
80.00	4				31.2500
Sig.		1.000	.067	.072	.899

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ตารางที่ 40 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลา (5, 10, 20, 40, 80, 160, 240 และ 300 นาที) กับเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียมเมื่อเลี้ยง *K. lunaris* ในแคดเมียมที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร โดยสามารถแบ่งกลุ่มออกเป็น 3 กลุ่ม

ADS50PPM

Duncan<sup>a</sup>

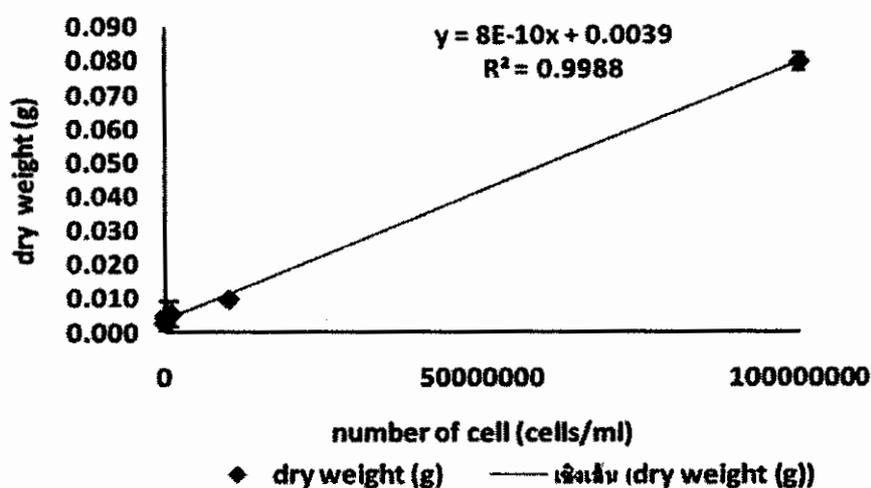
TIME M	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
40.00	4	33.6500		
300.00	4	34.7500	34.7500	
20.00	4	34.8000	34.8000	
80.00	4		36.3500	36.3500
10.00	4		36.4000	36.4000
240.00	4		36.4500	36.4500
5.00	4		36.5500	36.5500
160.00	4			38.1500
Sig.		.202	.066	.062

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ตารางที่ 41 แสดงค่ามาตรฐานระหว่างจำนวนเซลล์และน้ำหนักแห้งของ *K. lunaris*

จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักแห้งของ <i>K. lunaris</i> (กรัม)				
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	s.d.
$10^4$	0.003	0.003	0.004	0.003	0.001
$10^5$	0.003	0.003	0.010	0.005	0.004
$10^6$	0.004	0.003	0.010	0.006	0.004
$10^7$	0.010	0.011	0.010	0.010	0.001
$10^8$	0.078	0.083	0.078	0.080	0.003



ภาพที่ 2 แสดงค่ามาตรฐานระหว่างจำนวนเซลล์และน้ำหนักแห้งของ *K. lunaris*

ตารางที่ 42 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียม 1 มิลลิกรัม/ลิตรเมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นของ *K. lunaris* แตกต่างกัน\*

จำนวนเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียม				
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	s.d.
$10^4$	5.17	5.17	5.17	5.17	0.00
$10^5$	5.17	14.66	9.48	9.77	4.75
$10^6$	16.38	17.24	19.83	17.82	1.79
$10^7$	30.17	27.59	28.45	28.74	1.32
$10^8$	88.79	88.79	87.93	88.51	0.50

\* เมื่อเลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที เป็นเวลา 80 นาที

ตารางที่ 43 แสดงค่าการดูดซับแคดเมียม 1 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อจำนวนเซลล์ของ *K. lunaris* เริ่มต้นแตกต่างกัน \*

จำนวนเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดซับแคดเมียม				
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	s.d.
$10^4$	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
$10^5$	0.59	1.68	1.09	1.12	0.54
$10^6$	1.68	1.76	2.03	1.82	0.18
$10^7$	1.75	1.60	1.65	1.67	0.08
$10^8$	0.65	0.65	0.64	0.65	0.00

ตารางที่ 44 แสดงค่าความเป็นกรด-เบสเมื่อเลี้ยง *K. lunaris* ในแคดเมียม 1 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อจำนวนเซลล์ของ เริ่มต้นแตกต่างกัน \*

จำนวนเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)	ค่าความเป็นกรด-เบส				
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	s.d.
$10^4$	6.91	6.80	6.88	6.86	0.06
$10^5$	6.94	6.84	6.84	6.87	0.06
$10^6$	6.82	6.84	6.84	6.83	0.01
$10^7$	6.91	6.93	6.84	6.89	0.05
$10^8$	6.62	6.51	6.63	6.59	0.07

\* เมื่อเลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที เป็นเวลา 80 นาที

ตารางที่ 45 แสดงผลของจำนวนเซลล์ต่อเปอร์เซ็นต์การดูดซับแคดเมียม ค่าการดูดซับ และความเป็นกรด-เบส ของ *K. lunaris* ที่เติมแคดเมียมเริ่มต้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร \*

ความหนาแน่น (เซลล์/มิลลิลิตร)	การดูดซับ (%)	ค่าการดูดซับ (มิลลิกรัม/กรัม)	ความเป็นกรด-เบส
$10^4$	$5.17 \pm 0.00^a$	$0.60 \pm 0.00^a$	$6.86 \pm 0.06^b$
$10^5$	$9.77 \pm 4.77^b$	$1.12 \pm 0.54^{a,b}$	$6.87 \pm 0.06^b$
$10^6$	$17.82 \pm 1.79^c$	$1.82 \pm 0.28^c$	$6.83 \pm 0.01^b$
$10^7$	$28.74 \pm 1.32^d$	$1.67 \pm 0.08^{b,c}$	$6.89 \pm 0.05^b$
$10^8$	$88.51 \pm 0.50^e$	$0.65 \pm 0.00^a$	$6.59 \pm 0.07^a$

ตารางที่ 46 แสดงความสัมพันธ์ Partial correlation coefficient ระหว่างการศึกษาความหนาแน่นเซลล์และเปอร์เซ็นต์การดูดซับ ค่าการดูดซับและความเป็นกรด-เบสของ *K. lunaris*

--- PARTIAL CORRELATION COEFFICIENTS ---

Controlling for.. CELL\_ML

	ADSORPTI	Q	PH
ADSORPTI	1.0000	-.7588	-.8733
	( 0)	( 12)	( 12)
	P=.	P=.002	P=.000
Q	-.7588	1.0000	.6487
	( 12)	( 0)	( 12)
	P=.002	P=.	P=.012
PH	-.8733	.6487	1.0000
	( 12)	( 12)	( 0)
	P=.000	P=.012	P=.

\* เมื่อเลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที เป็นเวลา 80 นาที

(Coefficient / (D.F.) / 2-tailed Significance)

". ." is printed if a coefficient cannot be computed

ตารางที่ 47 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการศึกษาความหนาแน่นเซลล์และเปอร์เซ็นต์การดูดซับ ของ *K. lunaris*

Multiple Comparisons

Dependent Variable: AD\_CELL

	(I) CELL_ML	(J) CELL_ML	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	4.00	5.00	-4.6000	1.9244	.195	-10.9335	1.7335
		6.00	-12.6467*	1.9244	.000	-18.9802	-6.3131
		7.00	-23.5667*	1.9244	.000	-29.9002	-17.2331
		8.00	-83.3333*	1.9244	.000	-89.6669	-76.9998
	5.00	4.00	4.6000	1.9244	.195	-1.7335	10.9335
		6.00	-8.0467*	1.9244	.013	-14.3802	-1.7131
		7.00	-18.9667*	1.9244	.000	-25.3002	-12.6331
		8.00	-78.7333*	1.9244	.000	-85.0669	-72.3998
	6.00	4.00	12.6467*	1.9244	.000	6.3131	18.9802
		5.00	8.0467*	1.9244	.013	1.7131	14.3802
		7.00	-10.9200*	1.9244	.001	-17.2535	-4.5865
		8.00	-70.6867*	1.9244	.000	-77.0202	-64.3531
	7.00	4.00	23.5667*	1.9244	.000	17.2331	29.9002
		5.00	18.9667*	1.9244	.000	12.6331	25.3002
		6.00	10.9200*	1.9244	.001	4.5865	17.2535
		8.00	-59.7667*	1.9244	.000	-66.1002	-53.4331
8.00	4.00	83.3333*	1.9244	.000	76.9998	89.6669	
	5.00	78.7333*	1.9244	.000	72.3998	85.0669	
	6.00	70.6867*	1.9244	.000	64.3531	77.0202	
	7.00	59.7667*	1.9244	.000	53.4331	66.1002	

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางที่ 48 แสดงความแตกต่างระหว่างการศึกษาความหนาแน่นเซลล์และเปอร์เซ็นต์การดูดซับ ของ *K. lunaris*

AD\_CELL

Duncan <sup>a</sup>

CELL_ML	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
4.00	3	5.1700				
5.00	3		9.7700			
6.00	3			17.8167		
7.00	3				28.7367	
8.00	3					88.5033
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 49 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการศึกษาความหนาแน่นเซลล์และค่าการดูดซับ ของ *K. lunaris*

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Q\_CELL

	(I) CELL_ML	(J) CELL_ML	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	4.00	5.00	-.4533	.2990	.576	-1.4374	.5307
		6.00	-1.1567*	.2990	.020	-2.1407	-.1726
		7.00	-1.0000*	.2990	.046	-1.9841	-1.59E-02
		8.00	2.000E-02	.2990	1.000	-.9641	1.0041
	5.00	4.00	.4533	.2990	.576	-.5307	1.4374
		6.00	-.7033	.2990	.206	-1.6874	.2807
		7.00	-.5467	.2990	.410	-1.5307	.4374
		8.00	.4733	.2990	.538	-.5107	1.4574
	6.00	4.00	1.1567*	.2990	.020	.1726	2.1407
		5.00	.7033	.2990	.206	-.2807	1.6874
		7.00	.1567	.2990	.983	-.8274	1.1407
		8.00	1.1767*	.2990	.018	.1926	2.1607
7.00	4.00	1.0000*	.2990	.046	1.593E-02	1.9841	
	5.00	.5467	.2990	.410	-.4374	1.5307	
	6.00	-.1567	.2990	.983	-1.1407	.8274	
	8.00	1.0200*	.2990	.041	3.593E-02	2.0041	
8.00	4.00	-2.000E-02	.2990	1.000	-1.0041	.9641	
	5.00	-.4733	.2990	.538	-1.4574	.5107	
	6.00	-1.1767*	.2990	.018	-2.1607	-.1926	
	7.00	-1.0200*	.2990	.041	-2.0041	-3.59E-02	

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางที่ 50 แสดงความแตกต่างระหว่างการศึกษาความหนาแน่นเซลล์และค่าการดูดซับ ของ *K. lunaris*

## Q\_CELL

Duncan <sup>a</sup>

CELL_ML	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
8.00	3	.6467		
4.00	3	.6667		
5.00	3	1.1200	1.1200	
7.00	3		1.6667	1.6667
6.00	3			1.8233
Sig.		.161	.097	.612

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 51 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการศึกษาความหนาแน่นเซลล์และค่าความเป็นกรด-เบสของ *K. lunaris*

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: PH\_CELL

	(I) CELL ML	(J) CELL ML	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	4.00	5.00	-1.000E-02	4.222E-02	.999	-.1489	.1289
		6.00	3.000E-02	4.222E-02	.949	-.1089	.1689
		7.00	-3.000E-02	4.222E-02	.949	-.1689	.1089
		8.00	.2767*	4.222E-02	.000	.1377	.4156
	5.00	4.00	1.000E-02	4.222E-02	.999	-.1289	.1489
		6.00	4.000E-02	4.222E-02	.872	-9.89E-02	.1789
		7.00	-2.000E-02	4.222E-02	.988	-.1589	.1189
		8.00	.2867*	4.222E-02	.000	.1477	.4256
	6.00	4.00	-3.000E-02	4.222E-02	.949	-.1689	.1089
		5.00	-4.000E-02	4.222E-02	.872	-.1789	9.894E-02
		7.00	-6.000E-02	4.222E-02	.629	-.1989	7.894E-02
		8.00	.2467*	4.222E-02	.001	.1077	.3856
7.00	4.00	3.000E-02	4.222E-02	.949	-.1089	.1689	
	5.00	2.000E-02	4.222E-02	.988	-.1189	.1589	
	6.00	6.000E-02	4.222E-02	.629	-7.89E-02	.1989	
	8.00	.3067*	4.222E-02	.000	.1677	.4456	
8.00	4.00	-.2767*	4.222E-02	.000	-.4156	-.1377	
	5.00	-.2867*	4.222E-02	.000	-.4256	-.1477	
	6.00	-.2467*	4.222E-02	.001	-.3856	-.1077	
	7.00	-.3067*	4.222E-02	.000	-.4456	-.1677	

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางที่ 52 แสดงความแตกต่างระหว่างการศึกษาความหนาแน่นเซลล์และค่าความเป็นกรด-เบสของ *K. lunaris*

## PH\_CELL

Duncan<sup>a</sup>

CELL ML	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
8.00	3	6.5867	
6.00	3		6.8333
4.00	3		6.8633
5.00	3		6.8733
7.00	3		6.8933
Sig.		1.000	.214

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 53 แสดงค่าการดูดซับของแคดเมียมของ *K. lunaris* ในอาหารที่มีแคดเมียม 1 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อความเป็นกรด-เบสแตกต่างกัน<sup>\*</sup>

ความเป็นกรด-เบส	ค่าการดูดซับของแคดเมียม				
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	s.d.
4	7.18	7.38	7.58	7.38	0.20
5	10.77	10.77	10.96	10.83	0.12
6	19.32	18.92	18.88	19.04	0.24
7	16.55	15.35	13.76	15.22	1.40
8	12.96	14.35	14.95	14.09	1.02

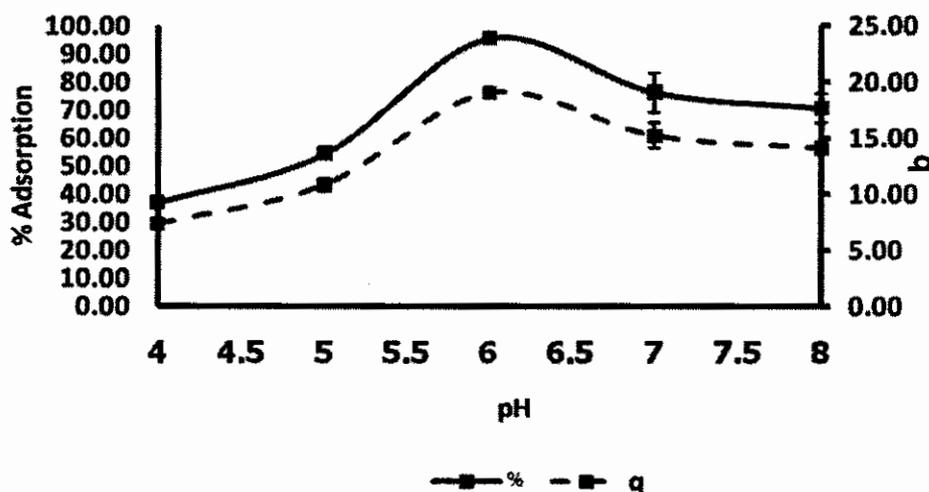
ตารางที่ 54 แสดงเปอร์เซ็นต์การดูดซับของแคดเมียมของ *K. lunaris* ในอาหารที่มีแคดเมียม 1 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อความเป็นกรด-เบสแตกต่างกัน<sup>\*</sup>

ความเป็นกรด-เบส	เปอร์เซ็นต์การดูดซับของแคดเมียม				
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	s.d.
4	36.00	37.00	38.00	37.00	1.00
5	54.00	54.00	55.00	54.33	0.58
6	96.90	94.90	94.70	95.50	1.22
7	83.00	77.00	69.00	76.33	7.02
8	65.00	72.00	75.00	70.67	5.13

<sup>\*</sup> เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที เป็นเวลา 80 นาที

ตารางที่ 55 แสดงค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารหลังจากเลี้ยง *K. lunaris* ในอาหารที่มีแคดเมียม 1 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อความเป็นกรด-เบสแตกต่างกัน

ความเป็นกรด-เบส	ค่าความเป็นกรด-เบส				
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	s.d.
4	5.16	5.22	5.14	5.17	0.04
5	5.34	5.34	5.34	5.34	0.00
6	6.21	6.23	6.21	6.22	0.01
7	6.50	6.60	6.50	6.53	0.06
8	7.16	7.19	7.17	7.17	0.02



ภาพที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์การดูดซับและค่าการดูดซับ (q) ของ *K. lunaris* ในอาหารที่เติมแคดเมียม 1 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ค่าความเป็นกรด-เบสที่เริ่มต้น 4-8

เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที เป็นเวลา 80 นาที

ตารางที่ 56 การแสดงความสัมพันธ์ Partial correlation coefficient ของความเป็นกรด-เบส  
เปอร์เซ็นต์การดูดซับ และค่าการดูดซับของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแคดเมียม 1 มิลลิกรัม/  
ลิตร

--- PARTIAL CORRELATION COEFFICIENTS ---

Controlling for.. PH

	PHSAMPLE	Q	ADSORPT
PHSAMPLE	1.0000	.2182	.2182
	( 0)	( 12)	( 12)
	P= .	P= .454	P= .454
Q	.2182	1.0000	1.0000
	( 12)	( 0)	( 12)
	P= .454	P= .	P= .000
ADSORPT	.2182	1.0000	1.0000
	( 12)	( 12)	( 0)
	P= .454	P= .000	P= .

(Coefficient / (D.F.) / 2-tailed Significance)

". ." is printed if a coefficient cannot be computed

ตารางที่ 57 การแสดงค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเป็นกรด-เบสก่อน และหลังของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแคดเมียม 1 มิลลิกรัม/ลิตร

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: PHSAMPLE

	(I) PH	(J) PH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	4.00	5.00	-.1667*	2.692E-02	.001	-.2552	-.781E-02
		6.00	-1.0433*	2.692E-02	.000	-1.1319	-.9548
		7.00	-1.3600*	2.692E-02	.000	-1.4486	-1.2714
		8.00	-2.0000*	2.692E-02	.000	-2.0886	-1.9114
	5.00	4.00	.1667*	2.692E-02	.001	7.808E-02	.2552
		6.00	-.8767*	2.692E-02	.000	-.9652	-.7881
		7.00	-1.1933*	2.692E-02	.000	-1.2819	-1.1048
		8.00	-1.8333*	2.692E-02	.000	-1.9219	-1.7448
	6.00	4.00	1.0433*	2.692E-02	.000	.9548	1.1319
		5.00	.8767*	2.692E-02	.000	.7881	.9652
		7.00	-.3167*	2.692E-02	.000	-.4052	-.2281
		8.00	-.9567*	2.692E-02	.000	-1.0452	-.8681
	7.00	4.00	1.3600*	2.692E-02	.000	1.2714	1.4486
		5.00	1.1933*	2.692E-02	.000	1.1048	1.2819
		6.00	.3167*	2.692E-02	.000	.2281	.4052
		8.00	-.6400*	2.692E-02	.000	-.7286	-.5514
8.00	4.00	2.0000*	2.692E-02	.000	1.9114	2.0886	
	5.00	1.8333*	2.692E-02	.000	1.7448	1.9219	
	6.00	.9567*	2.692E-02	.000	.8681	1.0452	
	7.00	.6400*	2.692E-02	.000	.5514	.7286	

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางที่ 58 การแสดงค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเป็นกรด-เบสก่อน และหลังของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแคดเมียม 1 มิลลิกรัมต่อลิตรแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม

#### PHSAMPLE

Duncan <sup>a</sup>		Subset for alpha = .05				
PH	N	1	2	3	4	5
4.00	3	5.1733				
5.00	3		5.3400			
6.00	3			6.2167		
7.00	3				6.5333	
8.00	3					7.1733
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 59 การแสดงค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเป็นกรด-เบส และค่าการดูดซับของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแคดเมียม 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: PHQ

Tukey HSD

(I) PH	(J) PH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
4.00	5.00	-2.8867*	.5375	.002	-4.6558	-1.1175
	6.00	-9.7333*	.5375	.000	-11.5025	-7.9642
	7.00	-6.5433*	.5375	.000	-8.3125	-4.7742
	8.00	-5.6033*	.5375	.000	-7.3725	-3.8342
5.00	4.00	2.8867*	.5375	.002	1.1175	4.6558
	6.00	-6.8467*	.5375	.000	-8.6158	-5.0775
	7.00	-3.6567*	.5375	.000	-5.4258	-1.8875
	8.00	-2.7167*	.5375	.004	-4.4858	-.9475
6.00	4.00	9.7333*	.5375	.000	7.9642	11.5025
	5.00	6.8467*	.5375	.000	5.0775	8.6158
	7.00	3.1900*	.5375	.001	1.4209	4.9591
	8.00	4.1300*	.5375	.000	2.3609	5.8991
7.00	4.00	6.5433*	.5375	.000	4.7742	8.3125
	5.00	3.6567*	.5375	.000	1.8875	5.4258
	6.00	-3.1900*	.5375	.001	-4.9591	-1.4209
	8.00	.9400	.5375	.450	-.8291	2.7091
8.00	4.00	5.6033*	.5375	.000	3.8342	7.3725
	5.00	2.7167*	.5375	.004	.9475	4.4858
	6.00	-4.1300*	.5375	.000	-5.8991	-2.3609
	7.00	-.9400	.5375	.450	-2.7091	.8291

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางที่ 60 การแสดงค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเป็นกรด-เบส และค่าการดูดซับของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแคดเมียม 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แบ่งเป็นกลุ่มได้ 4 กลุ่ม

#### PHQ

Duncan <sup>a</sup>

PH	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
4.00	3	6.1567			
5.00	3		9.0433		
8.00	3			11.7600	
7.00	3			12.7000	
6.00	3				15.8900
Sig.		1.000	1.000	.111	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 61 การแสดงค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเป็นกรด-เบส และเปอร์เซ็นต์การดูดซับของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแคดเมียม 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: AD\_PH

	(I) PH	(J) PH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	4.00	5.00	-17.3333*	3.2348	.002	-27.9795	-6.6871
		6.00	-58.5000*	3.2348	.000	-69.1462	-47.8538
		7.00	-39.3333*	3.2348	.000	-49.9795	-28.6871
		8.00	-33.6667*	3.2348	.000	-44.3129	-23.0205
	5.00	4.00	17.3333*	3.2348	.002	6.6871	27.9795
		6.00	-41.1667*	3.2348	.000	-51.8129	-30.5205
		7.00	-22.0000*	3.2348	.000	-32.6462	-11.3538
		8.00	-16.3333*	3.2348	.004	-26.9795	-5.6871
	6.00	4.00	58.5000*	3.2348	.000	47.8538	69.1462
		5.00	41.1667*	3.2348	.000	30.5205	51.8129
		7.00	19.1667*	3.2348	.001	8.5205	29.8129
		8.00	24.8333*	3.2348	.000	14.1871	35.4795
	7.00	4.00	39.3333*	3.2348	.000	28.6871	49.9795
		5.00	22.0000*	3.2348	.000	11.3538	32.6462
		6.00	-19.1667*	3.2348	.001	-29.8129	-8.5205
		8.00	5.6667	3.2348	.448	-4.9795	16.3129
8.00	4.00	33.6667*	3.2348	.000	23.0205	44.3129	
	5.00	16.3333*	3.2348	.004	5.6871	26.9795	
	6.00	-24.8333*	3.2348	.000	-35.4795	-14.1871	
	7.00	-5.6667	3.2348	.448	-16.3129	4.9795	

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางที่ 62 การแสดงค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเป็นกรด-เบส และเปอร์เซ็นต์การดูดซับของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแคดเมียม 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แบ่งเป็นกลุ่มได้ 4 กลุ่ม

## AD\_PH

Duncan<sup>a</sup>

PH	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
4.00	3	37.0000			
5.00	3		54.3333		
8.00	3			70.6667	
7.00	3			76.3333	
6.00	3				95.5000
Sig.		1.000	1.000	.110	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 63 การแสดงค่าการดูดซับของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของแคดเมียมต่างกัน

ความเข้มข้นแคดเมียม (มิลลิกรัม/ลิตร)	ค่าการดูดซับ				
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	s.d.
1	0.45	0.47	0.48	0.47	0.02
5	2.00	1.88	2.00	1.96	0.07
10	3.44	3.44	3.63	3.50	0.11
25	9.50	9.81	9.44	9.58	0.20
50	19.31	19.56	19.50	19.46	0.13
100	23.38	25.73	22.75	23.95	1.57
200	17.13	19.75	20.81	19.23	1.89

ตารางที่ 64 การแสดงค่าความเป็นกรด-เบสของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของแคดเมียมต่างกัน

ความเข้มข้นแคดเมียม (มิลลิกรัม/ลิตร)	ความเป็นกรด-เบส				
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	s.d.
1	7.09	7.00	7.05	7.05	0.05
5	6.94	6.95	6.96	6.95	0.01
10	6.86	6.98	6.94	6.93	0.06
25	6.82	6.82	6.80	6.81	0.01
50	6.61	6.58	6.57	6.59	0.02
100	5.81	5.80	5.79	5.80	0.01
200	5.61	5.59	5.62	5.61	0.02

\* เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $10^8$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA มีค่าความเป็นกรด-เบส 6 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที เป็นเวลา 160 นาที

ตารางที่ 65 แสดงค่าการดูดซับ ( $q$ ) และความเป็นกรด-เบส เมื่อเลี้ยง *K. lunaris* ในอาหารที่เติม แคลเมียมความเข้มข้น 1, 5, 10, 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร<sup>\*</sup>

ความเข้มข้น แคลเมียม (มิลลิกรัม/ลิตร)	ค่าการดูดซับ ( $q_{eq}$ ) (มิลลิกรัม/กรัม)	ความเป็น กรด-เบสสิ้นสุด
1	0.47±0.02 <sup>a</sup>	7.03±0.05
5	1.96±0.07 <sup>a,b</sup>	6.95±0.01
10	3.50±0.11 <sup>b</sup>	6.93±0.06
25	9.58±0.20 <sup>c</sup>	6.81±0.01
50	19.46±0.13 <sup>d</sup>	6.59±0.02
100	23.95±1.57 <sup>e</sup>	5.80±0.01
200	19.23±1.89 <sup>d</sup>	5.61±0.02

ตารางที่ 66 การแสดงความสัมพันธ์ Partial correlation coefficient ของความเป็นกรด-เบส เปรอร์เซ็นต์การดูดซับ และค่าการดูดซับของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแคลเมียมความเข้มข้น ต่างๆ

--- PARTIAL CORRELATION COEFFICIENTS ---

Controlling for.. CD

	Q	ADSORP	PH
Q	1.0000	.2145	-.7017
	( 0)	( 18)	( 18)
	P= .	P= .364	P= .001
ADSORP	.2145	1.0000	.2182

<sup>\*</sup> เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $10^5$  เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงใน erlenmeyer flask ที่มีอาหาร MCM ไม่เติม EDTA มีค่าความเป็นกรด-เบส 6 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที เป็นเวลา 160 นาที

( 18) ( 0) ( 18)

P= .364 P= . P= .355

PH        -.7017    .2182    1.0000

( 18) ( 18) ( 0)

P= .001 P= .355 P= .

(Coefficient / (D.F.) / 2-tailed Significance)

" . " is printed if a coefficient cannot be computed

ตารางที่ 67 การแสดงค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของของค่าการดูดซับของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยง  
ในอาหารที่มีความเข้มข้นของแคดเมียมต่างกัน

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Q\_CD

	(I) CONCCD	(J) CONCCD	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	1.00	5.00	-1.4933	.7640	.480	-4.1021	1.1154
		10.00	-3.0367*	.7640	.018	-5.8454	-.4279
		25.00	-9.1167*	.7640	.000	-11.7254	-6.5079
		50.00	-18.9900*	.7640	.000	-21.5987	-16.3813
		100.00	-23.4867*	.7640	.000	-26.0954	-20.8779
		200.00	-18.7833*	.7640	.000	-21.3721	-16.1548
	5.00	1.00	1.4933	.7640	.480	-1.1154	4.1021
		10.00	-1.5433	.7640	.444	-4.1521	1.0654
		25.00	-7.8233*	.7640	.000	-10.2321	-5.0148
		50.00	-17.4967*	.7640	.000	-20.1054	-14.8879
		100.00	-21.9933*	.7640	.000	-24.6021	-19.3846
		200.00	-17.2700*	.7640	.000	-19.8787	-14.6613
	10.00	1.00	3.0367*	.7640	.018	.4279	5.6454
		5.00	1.5433	.7640	.444	-1.0654	4.1521
		25.00	-8.0800*	.7640	.000	-8.6887	-3.4713
		50.00	-15.9533*	.7640	.000	-18.5621	-13.3446
		100.00	-20.4500*	.7640	.000	-23.0587	-17.8413
		200.00	-15.7267*	.7640	.000	-18.3354	-13.1179
	25.00	1.00	9.1167*	.7640	.000	6.5079	11.7254
		5.00	7.6233*	.7640	.000	5.0148	10.2321
10.00		6.0800*	.7640	.000	3.4713	8.6887	
50.00		-9.8733*	.7640	.000	-12.4821	-7.2646	
100.00		-14.3700*	.7640	.000	-16.9787	-11.7613	
	200.00	-9.6467*	.7640	.000	-12.2554	-7.0379	
50.00	1.00	18.9900*	.7640	.000	16.3813	21.5987	
	5.00	17.4967*	.7640	.000	14.8879	20.1054	
	10.00	15.9533*	.7640	.000	13.3446	18.5621	
	25.00	9.8733*	.7640	.000	7.2646	12.4821	
	100.00	-4.4967*	.7640	.001	-7.1054	-1.8879	
	200.00	2267	.7640	1.000	-2.3821	2.8354	
100.00	1.00	23.4867*	.7640	.000	20.8779	26.0954	
	5.00	21.9933*	.7640	.000	19.3846	24.6021	
	10.00	20.4500*	.7640	.000	17.8413	23.0587	
	25.00	14.3700*	.7640	.000	11.7613	16.9787	
	50.00	4.4967*	.7640	.001	1.8879	7.1054	
	200.00	4.7233*	.7640	.000	2.1148	7.3321	
200.00	1.00	18.7833*	.7640	.000	16.1548	21.3721	
	5.00	17.2700*	.7640	.000	14.6613	19.8787	
	10.00	15.7267*	.7640	.000	13.1179	18.3354	
	25.00	9.6467*	.7640	.000	7.0379	12.2554	
	50.00	-2267	.7640	1.000	-2.8354	2.3821	
	100.00	-4.7233*	.7640	.000	-7.3321	-2.1148	

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางที่ 68 การแสดงค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของของค่าการดูดซับของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของแคะเมียมต่างกัน แบ่งกลุ่มได้ 6 กลุ่ม

## Q\_CD

Duncan<sup>a</sup>

CONCCD	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
1.00	3	.4667				
5.00	3	1.9600	1.9600			
10.00	3		3.5033			
25.00	3			9.5833		
200.00	3				19.2300	
50.00	3				19.4567	
100.00	3					23.9533
Sig.		.071	.063	1.000	.771	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 69 การแสดงค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเป็นกรด-เบสของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของแคะเมียมต่างกัน แบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม

## PH\_CD

Duncan<sup>a</sup>

CONCCD	N	Subset for alpha = .05					
		1	2	3	4	5	6
200.00	3	5.6067					
100.00	3		5.8000				
50.00	3			6.5867			
25.00	3				6.8133		
10.00	3					6.9267	
5.00	3					6.9500	
1.00	3						7.0467
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.374	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 70 การแสดงค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเป็นกรด-เบสของ *K. lunaris* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของแคะเมียมต่างกัน

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: PH\_CD

	(I) CONCCD	(J) CONCCD	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	1.00	5.00	9.667E-02*	2.539E-02	.025	9.983E-03	.1834
		10.00	.1200*	2.539E-02	.005	3.332E-02	.2067
		25.00	.2333*	2.539E-02	.000	.1466	.3200
		50.00	.4600*	2.539E-02	.000	.3733	.5467
		100.00	1.2467*	2.539E-02	.000	1.1600	1.3334
		200.00	1.4400*	2.539E-02	.000	1.3533	1.5267
		5.00	1.00	-9.667E-02*	2.539E-02	.025	-.1834
	10.00	1.00	2.333E-02	2.539E-02	.963	-6.34E-02	.1100
	25.00	1.00	.1367*	2.539E-02	.001	4.998E-02	.2234
	50.00	1.00	.3633*	2.539E-02	.000	.2766	.4500
	100.00	1.00	1.1500*	2.539E-02	.000	1.0633	1.2367
	200.00	1.00	1.3433*	2.539E-02	.000	1.2566	1.4300
	5.00	5.00	-2.333E-02	2.539E-02	.963	-.1100	6.335E-02
	10.00	5.00	.1133*	2.539E-02	.007	2.665E-02	.2000
	25.00	5.00	.3400*	2.539E-02	.000	.2533	.4267
	50.00	5.00	1.1267*	2.539E-02	.000	1.0400	1.2134
	100.00	5.00	1.3200*	2.539E-02	.000	1.2333	1.4067
	1.00	5.00	-.2333*	2.539E-02	.000	-.3200	-.1466
	10.00	5.00	-.1367*	2.539E-02	.001	-.2234	-5.00E-02
	25.00	5.00	-.1133*	2.539E-02	.007	-.2000	-2.66E-02
	50.00	5.00	.2267*	2.539E-02	.000	.1400	.3134
	100.00	5.00	1.0133*	2.539E-02	.000	.9266	1.1000
	200.00	5.00	1.2067*	2.539E-02	.000	1.1200	1.2934
	1.00	10.00	-.4600*	2.539E-02	.000	-.5467	-.3733
	5.00	10.00	-.3633*	2.539E-02	.000	-.4500	-.2766
	10.00	10.00	-.3400*	2.539E-02	.000	-.4267	-.2533
	25.00	10.00	-.2267*	2.539E-02	.000	-.3134	-.1400
	50.00	10.00	.7867*	2.539E-02	.000	.7000	.8734
100.00	10.00	.9800*	2.539E-02	.000	.8933	1.0667	
1.00	25.00	-1.2467*	2.539E-02	.000	-1.3334	-1.1600	
5.00	25.00	-1.1500*	2.539E-02	.000	-1.2367	-1.0633	
10.00	25.00	-1.1267*	2.539E-02	.000	-1.2134	-1.0400	
25.00	25.00	-1.0133*	2.539E-02	.000	-1.1000	-.9266	
50.00	25.00	-.7867*	2.539E-02	.000	-.8734	-.7000	
100.00	25.00	.1933*	2.539E-02	.000	.1066	.2800	
1.00	50.00	-1.4400*	2.539E-02	.000	-1.5267	-1.3533	
5.00	50.00	-1.3433*	2.539E-02	.000	-1.4300	-1.2566	
10.00	50.00	-1.3200*	2.539E-02	.000	-1.4067	-1.2333	
25.00	50.00	-1.2067*	2.539E-02	.000	-1.2934	-1.1200	
50.00	50.00	-.9800*	2.539E-02	.000	-1.0667	-.8933	
100.00	50.00	-.1933*	2.539E-02	.000	-.2800	-.1066	

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาววราภรณ์ พงษ์สวัสดิ์
ที่อยู่	101/18 หมู่ 3 ตำบลกระแซง อำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี 12160
ที่ทำงาน	หน่วยตรวจโรคภูมิแพ้ โรงพยาบาลศิริราช เลขที่ 2 ถนนพราณนิก แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2540	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนคณะราษฎร- บำรุงปทุมธานี
พ.ศ. 2544	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากมหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม
พ.ศ. 2546	ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ประวัติการทำงาน	
พ.ศ. 2545	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ฝ่ายไวรัสโรคเอดส์ กลุ่มงานภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
พ.ศ. 2551	นักวิทยาศาสตร์ หน่วยตรวจโรคภูมิแพ้ โรงพยาบาลศิริราช เลขที่ 2 ถนนพราณนิก แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพมหานคร