

บทที่ 1 บทนำ

1. ความเป็นมาของงานวิจัย

ปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษอันเนื่องมาจากการปลดปล่อยสารเคมีต่าง ๆ โลหะหนักและสารที่ย่อยสลายได้ยากในธรรมชาติทำให้เกิดการตกค้างและเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตได้ในที่สุด ตัวอย่างเช่นปลาจะสามารถสะสมปรอทไว้ในตัวจนมีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นของปรอทในแหล่งน้ำที่อาศัยอยู่ได้ถึง 3,000-5,000 เท่า เมื่อมนุษย์นำไปบริโภคก็สามารถสะสมก่อให้เกิดโรคมึนมาตะ ซึ่งพบในประเทศญี่ปุ่นเป็นแห่งแรกได้ เป็นต้น

152 ในธรรมชาติพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสะสมโลหะหนักจากสิ่งแวดล้อม หรือแหล่งน้ำที่อยู่อาศัยได้ถึงแม้จะมีความเข้มข้นของโลหะนั้นในปริมาณไม่สูงมาก กลไกการสะสมโลหะหนักของจุลินทรีย์ทำได้ 3 วิธี คือ

1.1 สะสมภายนอกเซลล์ (Extracellular accumulation)

เป็นการสะสมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งอาจรวม Biosorption แต่โดยมากจะเน้นการรวมตัวกันระหว่างโลหะหนักและสารที่มีประจุที่ขับออกมานอกเซลล์ เช่น โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) และ poly- β -hydroxybutyrate ซึ่งเมื่อรวมตัวกับโลหะหนักแล้วจะตกตะกอนทำให้ความเข้มข้นของโลหะหนักในน้ำลดลง ประจุของสารที่จุลินทรีย์สร้างอาจเกิดจาก uronic acid, hexosamine หรือหมู่ฟอสเฟตต่าง ๆ ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่มี extracellular polysaccharide ได้แก่ *Klebsiella aerogenes* และ *Zoogloea ramigera* เป็นต้น

1.2 สะสมบนผิวเซลล์ (Cell surface accumulation)

เป็นการสะสมที่เกิดขึ้นบนผิวเซลล์ หรือภายในผนังเซลล์ ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันเป็น complex ระหว่างโลหะหนักที่มีประจุบวกกับประจุลบบนผนังเซลล์ ซึ่งมีองค์ประกอบแตกต่างกันออกไปในแต่ละชนิดของแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวกและแกรมลบ ยีสต์ รา หรือ สาหร่าย จากการค้นคว้าพบว่ามีผู้ศึกษา carboxyl group ของ glutamic acid ใน peptidoglycans ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ *Bacillus subtilis* ซึ่งใช้เป็นที่ยึดกับโลหะหนัก ในขณะที่อีกการศึกษาหนึ่งพบว่า teichoic และ teichuronic acids จะจับกับโลหะสะสมอยู่บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ *Bacillus licheniformis* หรือ polyphosphates บนผิวของ *Saccharomyces cerevisiae* ที่จับกับ Uranium ได้ดี โดยทั่วไปแล้ว biosorption ที่เกิดบนผิวเซลล์นี้จะขึ้นกับความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิ ซึ่งจะมีผลต่อปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นบนผิวเซลล์ เพื่อให้เกิดการจับกับโลหะ เช่น Cd^{++} , Sr^{2+} , Zn^{2+} และ Cu^{2+} เป็นต้น

ตัวอย่างของความสามารถในการดูดซับกับความเป็นกรดต่าง เช่น การดูดซับโลหะ Uranium ของ *Saccharomyces cerevisiae* จะมี pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง pH 3.0-4.5 (Strandberg et al, 1981) ส่วน pH ที่เหมาะสมสำหรับ green microalgae *Chlorella regularis* จะอยู่ที่ pH = 7.0 (Horikoshi, et al, 1979) ส่วนอุณหภูมิจะมีผลต่อการดูดซับของจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้น เช่น การดูดซับ Uranium ของ *Chlorella regularis* จะไม่แปรเปลี่ยนไปตามอุณหภูมิ (Horikoshi, et al, 1979 และ Sakaguchi et al, 1979) แต่การดูดซับ Uranium ของยีสต์ *S. cerevisiae* จะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิระหว่าง 20-50°C (Strandberg, et al, 1981) ส่วนความเข้มข้นของโลหะหนักในสารละลายจะช่วยเพิ่มการดูดซับในระดับหนึ่ง ซึ่งไม่เกินขีดความสามารถในการทนโลหะหนักของจุลินทรีย์ ส่วนการดึงโลหะหนักออกจากผิวเซลล์สามารถทำได้ง่ายโดยใช้ EDTA หรือ กรดอ่อน ๆ เพื่อไปเปลี่ยนแปลงประจุบนผิวเซลล์นั่นเอง

1.3 สะสมภายในเซลล์ (Intracellular accumulation)

เป็นการสะสมโดยอาศัยกระบวนการจำเพาะในการนำเข้าสู่ไลโซโซม (Specific active transport systems) หลายชนิดเช่น Cd, Ag, As, Zn, Cu, Cr, Ni, U, Pb ฯลฯ ซึ่งพบได้ในแบคทีเรีย เชื้อรา และสาหร่าย ถึงแม้ว่าไลโซโซมบางตัวจะเป็นพิษกับจุลินทรีย์ แต่จุลินทรีย์ก็ยังคงมีความทนทานต่อการสะสมไลโซโซมเหล่านั้นภายในเซลล์เป็นปริมาณมาก จุลินทรีย์บางชนิดจะควบคุมความทนทานในการสะสมด้วยพลาสมิด (plasmid-link gene) (Chakrabarty, 1976, 1978, Silver, 1981) เช่นที่พบใน *Pseudomonas maltophilia* ในการสะสมโลหะเงินเมื่อโลหะถูกนำเข้าสู่เซลล์แล้วด้วยวิธีการต่าง ๆ จะถูกจับไว้ด้วย metal-binding protein

ดังนั้นด้วยความสามารถในการดูดซับไลโซโซมด้วยวิธีการต่าง ๆ ของจุลินทรีย์ในธรรมชาตินี้เอง จึงเป็นประโยชน์ในการศึกษา และสามารถนำมาใช้ในการดูดซับไลโซโซมออกจากสิ่งแวดล้อม เช่นน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมหนักต่าง ๆ ก่อนปลดปล่อยออกสู่ธรรมชาติ ซึ่งประหยัดกว่าการใช้วิธีทางกายภาพหรือทางเคมี ซึ่งไม่คุ้มทุนเมื่อความเข้มข้นของไลโซโซมในแหล่งนั้น ๆ มีน้อยเกินไป เมื่อจุลินทรีย์ดูดซับไลโซโซมเก็บไว้เป็นจำนวนมากแล้ว ก็สามารถที่จะดึงไลโซโซมออกมารวบรวมแล้วกำจัดโดยวิธีทางเคมีต่อไปได้

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณการสะสมไลโซโซมโดยจุลินทรีย์ต่าง ๆ

ไลโซโซม	เชื้อจุลินทรีย์	ปริมาณที่ดูดซับได้ g metal/g cells dry wt.	อ้างอิง
Ag	Mixed culture	0.32	Charley and Bull (1979)
	<i>Pseudomonas Maltophilia</i>	0.28	Charley and Bull (1979)
	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	0.25	Pooley (1982)
	and <i>T. thiooxidans</i>		
Cp	<i>Proteus vulgaris</i>	0.08	Neyland et al. (1952)
	<i>Zoogloea</i> sp.	0.25	Friedman and Dugan (1968)
Cu	<i>Zoogloea</i> sp.	0.34	Friedman and Dugan (1968)
Ni	<i>Zoogloea</i> sp.	0.13	Friedman and Dugan (1968)
Pb	<i>Citrobacter</i> sp.	0.35	Aiekin et. al. (1979)
U	<i>Rhizopus arrhizus</i>	0.18	Tsezos and Volesky (1982a)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.15	Strandberg et. al. (1981)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.15	Strandberg et. al. (1981)
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.08	Jilek et. al. (1975)
Th	<i>Rhizopus arrhizus</i>	0.17	Tsezos and Volesky (1982b)

เนื่องจากงบประมาณในการทดลองมีจำกัด จึงได้เริ่มทำการทดลองในระดับ small scale ก่อน และจากการที่มีรายงานว่าเชื้อยีสต์หลายชนิดสะสมไลโซโซมไว้ที่ผนังเซลล์ได้ดี สามารถมีตำแหน่งการแลกเปลี่ยนประจุได้เร็ว การ

เชื่อมกันระหว่าง anionic group บนผิวเซลล์ และ cation ของโลหะหนักเกิดขึ้นได้รวดเร็วและผันกลับได้ (Rothstein and Hayes, 1958) และยีสต์สามารถดูดซับโลหะหนักหลายชนิด เช่น Ni^{2+} และ Cu^{2+} ได้ดีกว่าแบคทีเรียหลายชนิด (Norris and Kelley, 1979, Hnang, et al 1988) คณะผู้วิจัยจึงได้เริ่มทดลองใช้เชื้อยีสต์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการซึ่งเป็น *Saccharomyce cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆ มาเพื่อทดสอบความสามารถในการดูดซับโลหะหนัก

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบความสามารถในการดูดซับโลหะหนักของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ต่าง ๆ ในรูปของเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้ว
2. เพื่อศึกษาผลของโลหะหนักต่อการเจริญของยีสต์และความสัมพันธ์ระหว่างความทนทานโลหะหนักกับความสามารถในการดูดซับโลหะหนักนั้น ๆ

3. ขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยจะศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในห้องทดลองเพื่อให้ยีสต์สะสมโลหะหนัก ซึ่งจะได้นำไปประยุกต์ใช้ในการขยายขนาดเพื่อดูดซับโลหะหนักในน้ำต่อไป โดยเลือกทำการดูดซับแคดเมียม โคบอลต์ โครเมียม โปรทแมกานีส และสังกะสี โดย *Saccharomyces cerevisiae* Bergandy, Champ และ *Saccharomyces* sp. ATCC 5094 ในรูปของจุลินทรีย์มีชีวิตและตายแล้ว