



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการบำบัดน้ำทิ้งที่มีโลหะหนักปนเปื้อนโดยใช้ระบบบำบัดน้ำ
เสียจำลองแบบ Immobilized cell reactor

โดย นายจรรยา สารินทร์

ธันวาคม 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการบำบัดน้ำทิ้งที่มีโลหะหนักปนเปื้อนโดยใช้ระบบบำบัดน้ำ
เสียจำลองแบบ Immobilized cell reactor

โดย นายจรรุญ สารินทร์

คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยทุนสนับสนุนการวิจัยโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศาสตราจารย์ ดร. จงรักษ์ ผลประเสริฐ ซึ่งเป็นนักวิจัยที่ปรึกษา ที่ให้คำปรึกษาแนะนำและให้การสนับสนุนการทำวิจัยมาโดยตลอด ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวรที่อำนวยความสะดวกในการใช้สถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำวิจัยครั้งนี้

จรูญ สารินทร์

Project Code (รหัสโครงการ) MRG 4680092

Project Title : Treatment of wastewater contaminated with heavy metals using
Immobilized cell reactor

(ชื่อโครงการ) การบำบัดน้ำทิ้งที่มีโลหะหนักปนเปื้อนโดยใช้ระบบบำบัดน้ำเสียจำลอง
แบบ Immobilized cell reactor

Investigator : Mr. Charoon Sarin

(ชื่อนักวิจัย) นายจรูญ สารินทร์
คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยนเรศวร

E-mail Address : csarin@hotmail.com

Project Period : 2 years

(ระยะเวลาโครงการ) 2 ปี

Abstract

The aims of this research were to study tolerance bacteria isolated from an aerated lagoon in wastewater treatment plant of Northern Region Industrial Estate, to cadmium, copper and zinc by mean of the Minimal inhibitory concentrations of metal (MICs). Biosorption capacity of these bacteria to heavy metal, cadmium, copper and zinc were also investigated. The result showed there were 1, 15, and 16 isolates of bacteria tolerance to cadmium, copper, and zinc at concentration higher than 1,000 mg/l, respectively. The biosorption capacity of heavy metal tolerance bacteria to cadmium, copper and zinc at 50 mg/l pH 6.0 were 32.11 ± 0.86 , 40.00 ± 0.55 and 28.50 ± 0.96 mg/l, respectively, while the biosorption capacity of free cell and immobilized cell were 62.76 ± 1.25 and 86.71 ± 1.01 for cadmium, 64.67 ± 1.18 and 89.43 ± 1.25 for copper, and 56.20 ± 0.86 and 81.63 ± 1.16 for zinc removal in the batch test. The capacity of cadmium, copper, and zinc removal by the immobilized cell in the reactor test for the first 2 hours were 55%, 95% and 50%, respectively. The heavy metal tolerance bacteria were identified later by physiological and biochemical characteristics for cadmium, copper and zinc species as the genus *Klebsiella terrigena*, *Bordetella* /*Alcaligenes* /*Moraxella* and *Acinetobacter junii*/*Acinetobacter johsonii*, respectively.

Keywords : wastewater, heavy metals, Immobilized cell reactor

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาแบคทีเรียที่ทนและเจริญในสิ่งแวดล้อมที่มีโลหะหนักปนเปื้อนและสามารถลดปริมาณโลหะหนักได้ โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียจากระบบบำบัดน้ำเสียของนิคมอุตสาหกรรม และทดสอบค่าต่ำสุดของโลหะหนักที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MICs) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งที่ผสมโลหะหนัก จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 1, 15 และ 16 ไอโซเลต ตามลำดับ ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ของแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนัก โดยการทดลองแบบ batch test พบว่า ประสิทธิภาพในการกำจัดแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ pH 6.0 คือ 32.11 ± 0.86 , 40.00 ± 0.55 และ 28.50 ± 0.96 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ที่ตรึงในตัวกลาง โดยการทดลองแบบ batch test พบว่า แบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ที่ตรึงในตัวกลาง มีประสิทธิภาพในการกำจัดแคดเมียม เท่ากับ 62.76 ± 1.25 และ 86.71 ± 1.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีประสิทธิภาพในการกำจัดทองแดง เท่ากับ 64.67 ± 1.18 และ 89.43 ± 1.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสามารถกำจัดสังกะสี ได้เท่ากับ 56.20 ± 0.86 และ 81.63 ± 1.16 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลการบำบัดโลหะหนักในน้ำทิ้งโดยใช้ระบบบำบัดจำลองแบบเซลล์ตรึงรูป (immobilized cell reactor) ภายใน 2 ชั่วโมงแรก พบว่า สามารถลดความเข้มข้นของแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ลงได้มากกว่า 55%, 95% และ 50% ตามลำดับ เมื่อนำแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักและมีประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนักสูงสุดมาจำแนกชนิด พบว่า แบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมและมีประสิทธิภาพในการกำจัดแคดเมียมสูงสุดคือสกุล *Klebsiella terrigena*. แบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงและมีประสิทธิภาพในการกำจัดทองแดงสูงสุดอยู่ใน *Bordetella* /*Alcaligenes* /*Moraxella* และแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสีและมีประสิทธิภาพในการกำจัดสังกะสีสูงสุดอยู่ในสกุล *Acinetobacter junii* / *Acinetobacter johsonii*

คำหลัก : น้ำทิ้ง โลหะหนัก ระบบบำบัดน้ำเสียจำลองแบบเซลล์ตรึงรูป

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
โลหะหนัก	4
ความเป็นพิษของโลหะหนัก	7
ระบบบำบัดน้ำเสียของนิคมอุตสาหกรรม	9
จุลินทรีย์ในน้ำเสีย	11
การทนต่อพิษโลหะหนักของแบคทีเรีย	13
การกำจัดโลหะหนักโดยทางชีวภาพ	20
กลไกการกำจัดโลหะหนักโดยแบคทีเรีย	21
ปัจจัยที่มีผลต่อการกำจัดโลหะหนักของแบคทีเรีย	26
การตรึงเซลล์แบคทีเรีย	29
3 วิธีดำเนินงานวิจัย	32
เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	32
สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิจัย	33
วิธีดำเนินการวิจัย	34

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย.....	43
การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักและจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างไม่เสถียร	
ของนิคมอุตสาหกรรม.....	43
การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทนและสามารถเจริญในน้ำเสถียร	
ของนิคมอุตสาหกรรม.....	44
การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของโลหะหนักที่สามารถยับยั้งการเจริญ	
ของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration; MIC).....	47
การศึกษาความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญของแบคทีเรียกับความเข้มข้น	
โลหะหนัก.....	52
การทดสอบความสามารถในการกำจัดโลหะหนักของแบคทีเรียที่แยกได้โดย	
การเลี้ยงแบบ batch test.....	59
การศึกษาผลของพีเอชและความเข้มข้นของโลหะหนักที่มีต่อการกำจัด	
โลหะหนักของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทนต่อโลหะหนัก	60
การทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนักของเซลล์อิสระ (free cell)	
และเซลล์ตรึงรูป (immobilized cell).....	65
ผลการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำทิ้งที่มีโลหะหนักปนเปื้อนโดยใช้	
ระบบบำบัดจำลองแบบ Immobilized cell reactor.....	68
การจำแนกชนิดแบคทีเรีย	70
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	79
สรุปผลการวิจัย	79
อภิปรายผล	81
ข้อเสนอแนะ.....	89
บรรณานุกรม	91

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
ภาคผนวก	98
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	99
ภาคผนวก ข การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย	102
ภาคผนวก ค เซลล์ตรึงรูปในตัวอย่างและไซโตยิมอัลจินตที่ใช้ในการศึกษา ประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนัก	113
ภาคผนวก ง ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม และนิคมอุตสาหกรรม	114
เอกสารแนบหมายเลข 3	117

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันประเทศไทยมีการพัฒนาด้านเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม ทำให้มีการใช้สารเคมีจำนวนมาก รวมถึงโลหะหนัก (heavy metal) ซึ่งเป็นสารมลพิษ (pollutant) มีการนำโลหะหนักหลายชนิดไปใช้ประโยชน์ทั้งด้านเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมโดยเฉพาะแคดเมียมทองแดงและสังกะสี ยกตัวอย่างเช่น แคดเมียมใช้เป็นส่วนประกอบของสารเคมีกำจัดวัชพืช (herbicide) สารเคมีกำจัดเชื้อรา (fungicide) ใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์สี หมึกพิมพ์ สารป้องกันการเกิดสนิมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแบตเตอรี่ และใช้เป็นส่วนประกอบในอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ ทองแดงใช้เป็นส่วนประกอบของสารฆ่าแมลง ใช้เป็นส่วนหนึ่งของอุปกรณ์ไฟฟ้าและอุปกรณ์ให้ความร้อน ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ และผลิตภัณฑ์เซรามิก และสังกะสีใช้เป็นส่วนประกอบของสารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมต ใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ใช้ในอุตสาหกรรมเคลือบโลหะและภาชนะเคลือบสี ใช้ในอุตสาหกรรมยาง และชิ้นส่วนรถยนต์ เป็นต้น จากการใช้ประโยชน์โลหะหนักอย่างกว้างขวางทำให้เกิดปัญหาการแพร่กระจายของโลหะหนักสู่ สิ่งแวดล้อม โดยสาเหตุของการปนเปื้อนโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่เกิดจากการที่เกษตรกรและโรงงานอุตสาหกรรมปล่อยน้ำทิ้งที่มีโลหะหนักปนเปื้อนโดยไม่มีการบำบัดหรือการบำบัดไม่มีประสิทธิภาพดีพอที่จะกำจัดโลหะหนักออกจากน้ำทิ้งได้ทำให้โลหะหนักปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะแหล่งน้ำและพื้นที่ดิน เช่น แม่น้ำ ลำคลอง และพื้นที่เพาะปลูกอื่น ๆ ทำให้โลหะหนักสามารถแพร่กระจายเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารเป็นปัญหาสำคัญในการจัดการและกำจัดทิ้ง

แคดเมียม ทองแดง และสังกะสี เป็นโลหะหนักที่เป็นพิษ แหล่งปนเปื้อนของแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ในสิ่งแวดล้อมเกิดจาก การปนเปื้อนจากธรรมชาติ เช่น การกัดกร่อนของหินที่มีโลหะหนักเป็นองค์ประกอบ และการปนเปื้อนจากการกระทำของมนุษย์ เช่น จากกระบวนการแยกและถลุงแร่โลหะ การใช้สารเคมีทำการเกษตร กระบวนการผลิตและการกำจัดของเสียของโรงงานอุตสาหกรรม และการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิล เป็นต้น การปนเปื้อนของโลหะหนักไม่ว่าจะโดยธรรมชาติหรือจากการกระทำของมนุษย์ล้วนมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและมนุษย์ในระยะยาว โดยมนุษย์สามารถรับพิษโลหะหนักได้โดยตรงและผ่านทางสารสะสมของโลหะหนักในห่วงโซ่อาหาร (Mchale & Mchale, 1994) ทำให้เกิดโรคที่เกิดจากการสะสมของโลหะหนักใน

ร่างกายมนุษย์ เช่น โรคมินามาตะ (minamata) จากปรอท และโรคอิไต-อิไต (itai-itai) จากแคดเมียม (Laws, 1993)

การบำบัดน้ำทิ้งที่มีโลหะหนักปนเปื้อนส่วนมากนิยมใช้วิธีการบำบัดทางเคมีซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว แต่การบำบัดด้วยวิธีนี้มีต้นทุนสูงและอาจทำให้มีสารเคมีตกค้างจากกระบวนการบำบัด จึงได้มีผู้ให้ความสนใจนำกระบวนการทางชีวภาพมาใช้ในการบำบัด โดยการกำจัดโลหะหนักด้วยวิธีการทางชีวภาพเกิดจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ รา และสาหร่ายในบริเวณที่มีการปนเปื้อนโลหะหนัก ซึ่งมีคุณสมบัติสามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่มีโลหะหนักปนเปื้อนและยังสามารถลดปริมาณโลหะหนักในสภาพแวดล้อมให้น้อยลงได้ จุลินทรีย์มีกลไกในการกำจัดโลหะหนักหลายวิธี ได้แก่ การกำจัดโดยผนังเซลล์ การตกตะกอนภายในเซลล์โดยเมตาบอลิท์ที่เซลล์สร้างขึ้น การส่งผ่านเข้าสู่เซลล์โดยการเมตาบอลิซึมและการกำจัดโดยโพลีเมอร์ที่เซลล์สร้างขึ้น เป็นต้น (Brierley, 1990) ปัจจุบันมีการศึกษาการนำ จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ มาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีโลหะหนักปนเปื้อน ซึ่งข้อดีของการใช้จุลินทรีย์กำจัดโลหะหนัก ได้แก่ เป็นวิธีการที่เลียนแบบวิถีธรรมชาติ ไม่มีจุดอึดตัวในการกำจัดเนื่องจากเซลล์มีการเพิ่มจำนวนตลอดเวลา จึงเป็นวิธีที่ประหยัดและสามารถลดปัญหาเรื่องสารเคมีตกค้าง และยังเป็นการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ทนต่อพิษของโลหะหนักโดยวิธีทางธรรมชาติ นอกจากนี้ได้มีการศึกษาการนำจุลินทรีย์ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระ (free cell) และเซลล์ที่ตรึงในตัวกลาง (immobilized cell) มาใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีโลหะหนักปนเปื้อน พบว่าสามารถบำบัดและลดปริมาณโลหะหนักได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่เนื่องจากงานวิจัยส่วนใหญ่ทำในต่างประเทศซึ่งเป็นการใช้จุลินทรีย์ที่คัดแยกจากสภาพแวดล้อมในต่างประเทศ ดังนั้นเพื่อให้ได้จุลินทรีย์ชนิดที่ทนต่อโลหะหนักและสามารถลดปริมาณโลหะหนักในน้ำทิ้งและเป็นจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากสภาพแวดล้อมจริงในประเทศไทย ในการศึกษาวิจัยจึงสนใจที่จะคัดแยกจุลินทรีย์จากระบบบำบัด น้ำเสียของนิคมอุตสาหกรรมเพื่อศึกษาการทนต่อแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี และศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทั้งในรูปของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ตรึงในตัวกลาง ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีโลหะหนักปนเปื้อนในสภาพแวดล้อมจริงต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่เจริญในสิ่งแวดล้อมที่มีโลหะหนักปนเปื้อนและสามารถลดปริมาณโลหะหนักได้

2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักในการกำจัดโลหะหนัก ได้แก่ แคดเมียม ทองแดง และสังกะสี
3. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนักของแบคทีเรียที่ตัดแยกได้ในรูป เซลล์อิสระ (free cell) และเซลล์ที่ตรึงในตัวกลาง (immobilized cell)

ขอบเขตของการวิจัย

1. คัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทนต่อโลหะหนัก 3 ชนิด คือ แคดเมียม ทองแดง และสังกะสี จากระบบบำบัดน้ำเสียของนิคมอุตสาหกรรม
2. ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของโลหะหนักที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยตรวจสอบเป็นค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC)
3. คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทนต่อโลหะหนักและมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณโลหะหนักสูงสุดโดยคัดเลือกจาก
 - 3.1 แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร
 - 3.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนักของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร
4. ศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทนต่อโลหะหนักในการกำจัดโลหะหนักในรูปเซลล์ตรึงรูป (immobilized cell) โดยทำการทดลองแบบ batch test และ bioreactor test
5. จำแนกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทนต่อโลหะหนักโดยการทดสอบทางกายภาพและชีวเคมีร่วมกับชุดทดสอบทางชีวเคมีมาตรฐาน API (Biomerieux)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โลหะหนัก (Heavy Metal)

โลหะหนัก (heavy metal) หมายถึง โลหะธาตุที่มีความถ่วงจำเพาะ ตั้งแต่ 5.0 ขึ้นไป โดยไม่รวมโลหะหนักที่เป็นโลหะอัลคาไล และโลหะอัลคาไลน์เอิร์ท โดยทั่วไปจะเป็นธาตุในตารางธาตุที่มีเลขอะตอมในช่วง 23 – 92 อยู่ในคาบที่ 4 – 7 (ศุภมาศ, 2540) ส่วนใหญ่เป็นแร่ธาตุในกลุ่มทรานสิชัน (transition) และโพสทรานสิชัน (post transition) ซึ่งรวมถึง Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb และ Zn รวมทั้งสารเมทัลลอยด์ (metalloids) เช่น As และ Se (Lester , 1987)

โลหะหนักที่พบในสิ่งแวดล้อมโดยทั่วไปมีแหล่งปนเปื้อนของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมหลายแหล่งแบ่งออกเป็นแหล่งใหญ่ ๆ 2 แหล่ง ได้แก่ (ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา, 2540)

1. การปนเปื้อนจากธรรมชาติ ได้แก่ การปนเปื้อนของโลหะหนักจากปรากฏการณ์ทางธรรมชาติ เช่น จากหินที่มีโลหะหนักเป็นองค์ประกอบซึ่งเกิดการผุพังหรือถูกกัดเซาะ และการระเบิดของภูเขาไฟ เป็นต้น

2. การปนเปื้อนจากการกระทำของมนุษย์ ได้แก่ การปนเปื้อนของโลหะหนักจากกิจกรรมต่าง ๆ ที่มนุษย์ทำขึ้น เช่น การใช้สารเคมีในการเกษตร การทำเหมืองแร่ และน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น

2.1 การปนเปื้อนจากการใช้สารเคมีทางการเกษตร เช่น ปุ๋ย สารฆ่าแมลง สารกำจัดวัชพืช และสารกำจัดรา โดยในปุ๋ยจะมีตะกั่ว แคดเมียม นิกเกิล ปนอยู่ เมื่อนำมาใช้ก็จะสามารถปนเปื้อนในดินหรือสะสมในพืชได้ หรือในสารกำจัดศัตรูพืชชนิดต่าง ๆ จะมีโลหะหนักผสมอยู่ เช่น แคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ซึ่งเมื่อมีการนำไปใช้ในการเกษตรก็สามารถปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม

2.2 การปนเปื้อนจากการทำเหมืองแร่ เช่น การถลุงแร่สังกะสีจะได้แคดเมียม ซึ่งเป็นกากของเสีย หากไม่มีการกำจัดหรือบำบัดให้ถูกวิธีโลหะหนักนี้ก็อาจจะปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมได้ เช่น ปนเปื้อนในดิน แหล่งน้ำ อากาศ เป็นต้น

2.3 การปนเปื้อนจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม เช่น การใช้แคดเมียมในการผลิตสีทาบ้าน สีชุบโลหะเพื่อป้องกันการกัดกร่อน สีย้อม หมึกพิมพ์ ทองแดงใช้เป็นส่วประกอบของสารฆ่าแมลง ใช้เป็นชิ้นส่วนของอุปกรณ์ไฟฟ้าและอุปกรณ์ให้ความร้อน ใช้ในอุตสาหกรรม สิ่งทอและผลิตภัณฑ์เซรามิก และสังกะสีใช้เป็นส่วประกอบของสารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมต ใช้เป็น

ส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง หรือใช้ตะกั่วในอุตสาหกรรมทำแบตเตอรี่ โลหะบัดกรี ฉนวนหุ้มสายเคเบิล เป็นต้น ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการผลิตแล้วโลหะหนักเหล่านี้จะปนเปื้อนมากับน้ำทิ้ง ซึ่งถ้าการบำบัดไม่มีคุณภาพก็จะทำให้โลหะหนักปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมได้

1. แคดเมียม (Cadmium ; Cd)

แคดเมียมเป็นโลหะที่มีอยู่ในน้ำตามธรรมชาติประมาณ 0.1-0.2 ไมโครกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักอะตอมเท่ากับ 112.40 มีจุดหลอมเหลวที่ 321 องศาเซลเซียส และมีจุดเดือดที่ 765 องศาเซลเซียส มีความหนาแน่นเท่ากับ 8.65 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรที่ 20 องศาเซลเซียส (พิมล เรียนพัฒนา และชัยวัฒน์ เจนวาณิชย์, 2539) แคดเมียมมีสมบัติเป็นโลหะอ่อน ตัดได้ง่าย สีขาวและตีแผ่ได้ มีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์คล้ายกับสังกะสีคือทนทานต่อการผุกร่อน สนิแร่แคดเมียม ได้แก่ Grenokit (hexagonal; CdS), Hewleyite (cubic; CdS), Cadmoselite (CdSe), Monteponite (CdO), Otavite (CdCO₃), และ Saukavite หรือ Cadmium metacinaba (Hg,CdS) แคดเมียมในธรรมชาติพบอยู่ร่วมกับสังกะสีและตะกั่วเป็นส่วนใหญ่ แคดเมียมส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากการถลุงสินแร่สังกะสี อัตราส่วนระหว่างแคดเมียมต่อสังกะสีคือ 1 ต่อ 100 ถึง 1 ต่อ 1,000 แต่มีการนำแคดเมียมมาใช้ประโยชน์อย่างมากทั้งด้านการเกษตรกรรมซึ่งใช้เป็นองค์ประกอบของสารเคมีกำจัดวัชพืช (herbicide) สารเคมีกำจัดเชื้อรา (fungicide) ส่วนทางด้านอุตสาหกรรมใช้แคดเมียมเป็นส่วนประกอบในอุตสาหกรรมทำ สีทาบ้าน สีชุบโลหะเพื่อป้องกันการกัดกร่อน สีย้อม เซลลามีค เส้นใยแก้ว หมึกพิมพ์ ใช้เป็นส่วนผสมในการทำพลาสติกโพลีไวนิล คลอไรด์ (PVC) ใช้ในการชุบโลหะด้วยไฟฟ้าและใช้ในวงจรรีเลย์อิเล็กทรอนิกส์ชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้ยังใช้แคดเมียมในอุตสาหกรรมเคลือบต่างๆ (พิมล เรียนพัฒนา และชัยวัฒน์ เจนวาณิชย์, 2539) จากการใช้ประโยชน์แคดเมียมในด้านต่างๆ ทำให้เกิดการแพร่กระจายของแคดเมียมสู่สิ่งแวดล้อมและเกิดการสะสมในระบบนิเวศน์ ซึ่งอาจมีสาเหตุการปนเปื้อนจากธรรมชาติ โรงงานอุตสาหกรรม หรือจากการเกษตรกรรม เมื่อแคดเมียมปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น ในอากาศ ดิน น้ำ สิ่งมีชีวิตต่าง ๆ จะได้รับแคดเมียมและเกิดการสะสมแคดเมียมไปตามลำดับห่วงโซ่อาหาร (biological accumulation and biological magnification) และสุดท้ายจะทำให้เกิดพิษต่อมนุษย์

2. ทองแดง (Copper ; Cu)

ทองแดงเป็นโลหะที่มีน้ำหนักอะตอม 63.54 มีจุดหลอมเหลวที่ 1,083.4 องศาเซลเซียส มีความหนาแน่น 8.9 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรที่ 20 องศาเซลเซียส มีจุดเดือดที่ 2,595 องศาเซลเซียส (พิมล เรียนพัฒนา และชัยวัฒน์ เจนวาณิชย์, 2539) ทองแดงเป็นโลหะหนักที่นำความ

ร้อนและนำไฟฟ้าได้ดี ทองแดงในธรรมชาติจะพบในรูปของแร่ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ เช่นเดียวกับเหล็ก ทองคำ และเงิน โดย 50 เปอร์เซ็นต์ ของทองแดงที่ผลิตได้จะนำมาทำขึ้นส่วนของอุปกรณ์ไฟฟ้า ใช้เป็นส่วนหนึ่งของโลหะผสม นอกจากนี้ยังใช้ในการทำแผ่นเสียง อุปกรณ์ให้ความร้อน สารประกอบเกลือของทองแดงยังใช้เป็นส่วนประกอบของสารฆ่าแมลง และทองแดงยังเป็นส่วนประกอบหนึ่งของปูนขาวและหินปูน อยู่ในขณะมูลฝอยในรูปของท่อ ลวดไฟฟ้า การแพร่กระจายของทองแดงสู่สิ่งแวดล้อมเกิดขึ้นโดยการกัดเซาะพังทลายของเปลือกโลก หิน ดิน การทำเหมืองแร่ และของเสียจากกระบวนการผลิตที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ (ชัยวัฒน์ เจนวานิชย์, 2535) การปนเปื้อนของทองแดงในสิ่งแวดล้อมส่งผลกระทบต่อมนุษย์ และสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นด้วย เช่น จุลินทรีย์เมื่อได้รับทองแดงจะทำให้ชีวมวลของจุลินทรีย์ลดลง เกิดการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์และความหลากหลายในสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ลดลง และทองแดงยังมีผลในการยับยั้งกระบวนการทางชีวภาพในระบบบำบัดน้ำเสีย เช่น ระบบ Activated sludge และ Anaerobic sludge digestion (Baath, 1989)

3. สังกะสี (Zinc ; Zn)

สังกะสีเป็นธาตุที่มีน้ำหนักอะตอม 65.38 มีจุดหลอมเหลว 419.5 องศาเซลเซียส จุดเดือด 907 องศาเซลเซียส ความหนาแน่น 7.133 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ที่ 20 องศาเซลเซียส สังกะสีเป็นโลหะสีขาวแกมเทา มีความแข็งแต่เปราะพอสมควร ในธรรมชาติมักพบสังกะสีอยู่ในรูปของแร่ที่สำคัญ คือ Zinc blende , Caramine ($ZnCO_3$) และ Zincite (ZnO) (พิมล เรียนพัฒนา และชัยวัฒน์ เจนวานิชย์, 2539) มีการนำสังกะสีมาใช้ประโยชน์นานกว่า 2,000 ปี โดยในสมัยอาณาจักรโรมัน ได้นำสังกะสีมาผสมกับทองแดงเพื่อทำเป็นทองเหลือง และในยุคสิ้นสุดศตวรรษที่ 19 ได้มีการนำสังกะสีมาใช้มากขึ้น เช่น ทำโลหะผสมที่ไม่เป็นสนิม เป็นส่วนผสมของเหล็ก ทำวัสดุก่อสร้าง ทำแบตเตอรี่รถยนต์ (Barceloux, 1999) นอกจากนี้ Zinc oxide ยังใช้ในผลิตภัณฑ์ยารักษาโรคผิวหนัง น้ำยาฟอกขาว ใช้เป็นส่วนประกอบของยาบางชนิด เช่น ยารักษาโรคขาดสารอาหาร และยังใช้เป็นส่วนประกอบของสารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตอีกด้วย สังกะสีจะอยู่ในรูปแบบต่างๆ ของเอนไซม์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและอยู่ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของลิปิดและคาร์โบไฮเดรต (Erinder, 1986) การปนเปื้อนสังกะสีในสิ่งแวดล้อมมีแหล่งที่สำคัญคือการถลุงแร่สังกะสีในการทำเหมืองแร่สังกะสี ทำให้สังกะสีเกิดการแพร่กระจาย ไปสู่สิ่งแวดล้อมต่างๆ โดยพบว่าสังกะสีที่อยู่ในรูป Zn^{2+} จะสามารถเคลื่อนย้ายได้ดีในสภาพที่เป็นกรด ดังนั้นการแพร่กระจายของสังกะสีสู่สิ่งแวดล้อมจึงเกิดขึ้นได้ทั้งจากธรรมชาติและจากการกระทำของมนุษย์ ในแหล่งน้ำธรรมชาติความเข้มข้นของสังกะสีจะขึ้นอยู่กับสารประกอบและพันธะเคมีของสังกะสี โดยสังกะสีและออกไซด์ของสังกะสีมี

ความสามารถในการละลายน้ำเล็กน้อย ส่วนสังกะสีคลอไรด์สามารถละลายน้ำได้ดีและไอออนของสังกะสีในน้ำจะถูกดูดซึมโดยดินตะกอน (Logan & Feltz, 1985)

ความเป็นพิษของโลหะหนัก

โลหะหนักในสิ่งแวดล้อมสามารถจำแนกตามลักษณะทางชีวภาพตามระดับความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตได้เป็น 3 กลุ่ม (Madgwick, 1994)

1. โลหะหนักที่มีความเป็นพิษต่ำและพบในปริมาณสูงตามธรรมชาติ เช่น Na, K, Mg, Ca, Fe, Li, Rb และ Sr
2. โลหะหนักที่มีความเป็นพิษสูง แม้จะใช้ในความเข้มข้นต่ำ เช่น Co, Ni, Cu, Zn, Sn, As, Se, Au, Ag, Hg, Pb, Cd และ Be
3. โลหะหนักที่มีความเป็นพิษแต่พบในปริมาณน้อยตามธรรมชาติ เช่น Ti, Hf, Zr, Nb, Ta, Ga, La และ Ru

1. ความเป็นพิษของแคดเมียม

ความเป็นพิษของแคดเมียมต่อมนุษย์มีทั้งผลเฉียบพลันและผลแบบเรื้อรัง โดยแคดเมียมในอาหารจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายโดยผ่านทางลำไส้ ร้อยละ 3-8 ผ่านระบบทางเดินหายใจร้อยละ 13-15 โดยจะไปสะสมที่ไต ร้อยละ 33 สะสมที่ตับ ร้อยละ 13.8 สะสมที่ตับอ่อน และร้อยละ 3.3 สะสมที่เนื้อเยื่อ ใน 1 วันแคดเมียมสามารถสะสมไว้ในร่างกาย 2 ไมโครกรัม บางครั้งอาจสูงถึง 3-4 ไมโครกรัมในผู้ที่สูบบุหรี่จัดหรือผู้ที่อยู่ในบริเวณที่มีแคดเมียมสะสมอยู่ในปริมาณที่สูง ปริมาณ 2 ไมโครกรัมต่อวันนี้จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามอายุ เนื่องจากค่าครึ่งชีวิต (biological half life) ของแคดเมียมนานถึง 16-23 ปี จึงทำให้การสลายตัวใช้เวลานาน แคดเมียมที่ปนมากับอุจจาระจะถูกขับถ่ายออกจากเยื่อหู (mucosal) ในกระเพาะอาหาร ลำไส้ ตับอ่อน น้ำดี และต่อมพาราไธรอยด์ (Parathyroid gland) แคดเมียมปริมาณน้อยๆจะถูกขับถ่ายออกมาทั้งที่ผ่านทางผิวหนังและเส้นผม สำหรับความเป็นพิษเฉียบพลันของแคดเมียม ถ้าได้รับสูงถึง 326 มิลลิกรัมจากอาหาร จะมีอาการปวดหัว ปวดท้องอย่างรุนแรง เสมหะมาก อาเจียน ท้องเดิน ถ้าได้รับในปริมาณ 350 มิลลิกรัมถึง 1 กรัม อาจทำให้เกิดอาการช็อคและตายภายใน 24 ชั่วโมง แคดเมียมที่กระจายอยู่ในอากาศอยู่ในรูปไอของแคดเมียมออกไซด์ถ้าได้รับไอแคดเมียมในปริมาณสูงจะเป็นอันตรายต่อปอดอย่างเฉียบพลันภายใน 2-4 ชั่วโมง จะทำให้เกิดอาการปอดอักเสบ เจ็บหน้าอก และตายได้ (วิสุทธิ เสงศรี, 2537) สำหรับพิษเรื้อรังของแคดเมียมถ้ามีการสะสมแคดเมียมในปริมาณสูงจะทำให้มีผล

โดยตรงต่อการสร้างกระดูก โดยแคดเมียมจะไปลดการสะสมของธาตุแคลเซียมและจะไม่มี การสะสมคอลลาเจนในกระดูก แคดเมียมจะทำให้เอนไซม์ไลซิลออกซิเดส (Lysyl oxidase) หดประสิทธิภาพ จึงทำให้กระดูกผุกร่อนเสียรูป ถ้าร่างกายได้รับแคดเมียม 170-500 ไมโครกรัมต่อวัน เป็นเวลานานจะก่อให้เกิดโรคโลหิตจาง ความดันโลหิตสูง แคดเมียมจะมีผลต่อการทำงานของร่างกายทุกระบบ เช่น ถ้าได้รับแคดเมียมปริมาณ 0.6-1.0 มิลลิกรัมต่อวัน จะทำให้การทำงานของไตผิดปกติส่งผลให้การขับถ่ายโปรตีนออกจากร่างกายมากเกินไป นอกจากนี้ยังทำลายระบบทางเดินอาหาร ระบบประสาทส่วนกลาง โดยเส้นประสาทถูกทำลายทำให้ระบบเมตาบอลิซึมของธาตุเหล็ก สังกะสี และทองแดงทำงานผิดปกติ มีรายงานการพบโรคที่เกิดจากพิษของแคดเมียมเป็นครั้งแรกที่เมืองโทยามะ ประเทศญี่ปุ่น โดยเกิดอาการเริ่มต้นที่ไตล้มเหลว ปวดกระดูก จนถึงกระดูกผิดรูป (deformed bone) อาการของโรคที่พบมากที่สุดคือ รู้สึกเจ็บจากอาการปวดกระดูก โดยเฉพาะกระดูกต้นขา กระดูกสันหลัง และกระดูกซี่โครง โรคนี้เรียกว่าโรคอิไต-อิไต (itai-itai) WHO กำหนดให้มีปริมาณแคดเมียมในน้ำอุปโภคบริโภคได้ไม่เกิน 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร (Lester, 1987) และแคดเมียมที่ร่างกายยอมรับได้เท่ากับ 20-76 ไมโครกรัมต่อวัน (Laws, 1993)

2. ความเป็นพิษของทองแดง

ความเป็นพิษของทองแดงต่อมนุษย์ ทองแดงสามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ 3 ทาง คือ ทางอาหาร ทางการหายใจ และทางผิวหนัง ถ้าร่างกายได้รับทองแดงในปริมาณที่มากเกินไปจะทำให้เกิดโรค Wilson หรือ Hepatolenticular degeneration โดยจะมีอาการสั่นเกร็ง คลุ้มคลั่ง อาจเป็นโรคตับแข็งโดยกระทันหัน และอาจทำให้กระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกายผิดปกติ (โยธิน สุริยพงศ์, 2542) ทองแดงจะดูดซึมได้ดีในลำไส้ ทองแดงที่ดูดซึมเข้าสู่ร่างกายจะอยู่ในกระแสโลหิต ทั้งส่วนที่เป็นเม็ดเลือดและซีรัม และมีการสะสมในตับและเนื้อเยื่อบางชนิด โดยทั่วไปทองแดงอยู่ในสภาพของคิวปริกไฮดรอกไซด์และคิวปรัสไฮดรอกไซด์ ทองแดงสามารถรวมตัวได้ดีกับไลโซไซม์ ไมโตคอนเดรีย และนิวเคลียสของเซลล์ การสะสมของทองแดงในตับจะแตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์ ตับจะขับถ่ายทองแดงออกมาทางน้ำดีและมีการดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตอีกทางลำไส้ กลไกความเป็นพิษของทองแดงยังไม่ทราบแน่ชัดเชื่อกันว่าตับและเนื้อเยื่ออื่น ๆ สามารถเก็บสะสมทองแดงไว้ได้ในปริมาณที่จำกัด ปริมาณทองแดงที่มีอยู่สูงจะมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยเฉพาะในตับทำให้หน้าที่ของตับเสียไป โดยจะมีเนื้อตายเกิดขึ้นในตับทำให้ไม่สามารถที่จะรับหรือขับถ่ายทองแดงได้ จะพบว่าระดับของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของตับสูงขึ้นมากในเลือด เช่น เอนไซม์กลูตาไมกอกอกซาโลอะซิติคแอสติค ทรานส์อะมีเนต เอนไซม์ แลคติกดีไฮโดรจีเนส พลาสมาอะจีเนส และพลาสมาบิลิรูบิน ทำให้ตับเสียหายที่ไปอย่างรวดเร็ว ทองแดงที่สะสมอยู่ที่ตับจะถูกขับ

นอกจากดับเข้าสู่กระแสโลหิต โดยจะเข้าไปรวมตัวกับเม็ดเลือดและมีบางส่วนถูกขับออกมากับปัสสาวะภายใน 24 ชั่วโมง ทองแดงที่รวมตัวกับเม็ดเลือดแดงจะหลุดออกจากกันได้ยาก เกิดอาการผิดปกติที่เรียกว่าฮีโมโกลินโครซีต ความเป็นพิษของทองแดงในมนุษย์มีผลเฉียบพลันโดยจะเกิดอาการหลังจากการดูดซึมเข้าสู่ร่างกายมีผลทำให้ตับและไตถูกทำลาย มีไข้ ระบายเคืองระบบทางเดินหายใจ คลื่นไส้ อาเจียน ผื่นหนังไหม้เกรียม ท้องร่วง และทองแดงยังมีผลทำให้การสร้างระบบสมองส่วนกลางของทารกผิดปกติ (Aaseth & Norseth, 1986)

3. ความเป็นพิษของสังกะสี

ความเป็นพิษของสังกะสีต่อมนุษย์ สังกะสีสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ 2 ทาง คือ ระบบทางเดินอาหารโดยการบริโภคและดื่มน้ำและระบบทางเดินหายใจโดยการหายใจเข้าไป สำหรับการสูดดมสังกะสีจะอยู่ในรูปของ Zinc chloride ($ZnCl_2$) จะสามารถทำให้เป็นโรคปอดหรือหอบหืดได้ และหากสูดดมเข้าไปในปริมาณมากอาจทำให้เป็นโรคผิวหนังโรคได้ สำหรับการรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่มีสังกะสีปนเปื้อนจะไม่มีอันตรายมากหากมีปริมาณไม่มาก แต่หากรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของสังกะสีที่เป็นกัลวานิกส์ (Galvanizi product) ประมาณ 225-450 มิลลิกรัม หรือในรูปของ Zinc sulfate ($ZnSO_4$) อาจเกิดอาการปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง หรืออาจเป็นตะคริวที่ท้องน้อย (ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา, 2534)

ระบบบำบัดน้ำเสียของนิคมอุตสาหกรรม

ตัวอย่างน้ำเสียที่นำมาใช้ในการวิจัยเป็นน้ำเสียที่เก็บจากระบบบำบัดน้ำเสียส่วนกลางของนิคมอุตสาหกรรมภาคเหนือ จังหวัดลำพูน ซึ่งเป็นระบบบำบัดน้ำเสียที่ใช้วิธีการทางชีวภาพโดยมีหลักการ คือ น้ำทิ้งจากโรงงานต่างๆ ภายในนิคมอุตสาหกรรมที่ผ่านกระบวนการบำบัดเบื้องต้นจากโรงงาน หรือน้ำทิ้ง ที่มีคุณลักษณะของน้ำทิ้งไม่เกินค่ามาตรฐานที่ทางนิคมอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทยกำหนดและน้ำทิ้งจากกิจกรรมอื่นๆ จะไหลมารวมกันลงในท่อน้ำทิ้งรวมเพื่อเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำทิ้งส่วนกลาง ซึ่งออกแบบเป็นระบบบ่อบำบัด (Pond หรือ Lagoon System) ซึ่งมีเนื้อที่รวมประมาณ 75 ไร่ ซึ่งปัจจุบันได้ดำเนินการปรับปรุงระบบบำบัดเป็น Aerated Lagoon โดยออกแบบให้สามารถรองรับน้ำทิ้งได้สูงสุดวันละ 12,000 ลบ.ม. และรับอัตราการบรรจุสารอินทรีย์ (Organics Loading Rate) 6,000 กิโลกรัมบีโอดี/วัน ระบบบำบัดน้ำทิ้งส่วนกลางประกอบด้วยบ่อบำบัดซึ่งเป็นบ่อดินจำนวน 7 บ่อ หลักดังนี้

บ่อบำบัดที่ 1 เรียก Aerated Pond มีขนาดพื้นที่บ่อ 9.3 ไร่ (14,800 ตารางเมตร) ลึก 4 เมตร ความจุของบ่อ 59,520 ลบ.ม. ระยะเวลาการกักเก็บน้ำ 4.96 วัน มีการติดตั้งเครื่องเติมอากาศแบบ Jet Aerator ขนาด 20 แรงม้า จำนวน 20 เครื่อง เพื่อทำหน้าที่ให้ออกซิเจนแก่แบคทีเรียในการกำจัดสิ่งสกปรกประเภทสารอินทรีย์ในน้ำทิ้ง

บ่อบำบัดที่ 2 เรียก Aerated Pond มีขนาดพื้นที่บ่อ 3.1 ไร่ (4,800 ตารางเมตร) ลึก 2.5 เมตร ความจุของบ่อ 12,000 ลบ.ม. ระยะเวลาการกักเก็บน้ำ 1 วัน มีการติดตั้งเครื่องเติมอากาศแบบ Jet-Aerator ขนาด 20 แรงม้า จำนวน 8 เครื่อง เพื่อทำหน้าที่ให้ออกซิเจนแก่แบคทีเรียในการกำจัดสิ่งสกปรกประเภทสารอินทรีย์ในน้ำทิ้ง เพื่อลดภาระการทำงานของบ่อ 1 ซึ่งส่งผลทำให้ระบบบำบัดน้ำทิ้งส่วนกลางมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

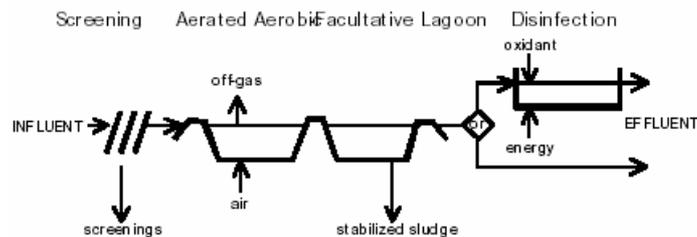
บ่อบำบัดที่ 3 Facultative Pond มีขนาดพื้นที่บ่อ 11.35 ไร่ (19,000 ตารางเมตร) ลึก 2.5 เมตร ความจุของบ่อ 45,000 ลบ.ม. ระยะเวลาการกักเก็บน้ำ 3.75 วัน มีการทำงานของแบคทีเรียทั้งแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจนในการกำจัดสิ่งสกปรกประเภทสารอินทรีย์ที่หลงเหลือจากบ่อ 2 โดยกระบวนการทางธรรมชาติ

บ่อบำบัดที่ 4 Facultative Pond มีขนาดพื้นที่บ่อ 11.35 ไร่ (18,000 ตารางเมตร) ลึก 2.5 เมตร ความจุของบ่อ 45,000 ลบ.ม. ระยะเวลาการกักเก็บน้ำ 3.75 วัน มีการทำงานของแบคทีเรียทั้งแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจนในการกำจัดสิ่งสกปรกประเภทสารอินทรีย์ที่หลงเหลือ จากบ่อ 3 โดยกระบวนการทางธรรมชาติ

บ่อบำบัดที่ 5 และบ่อบำบัดที่ 6 Oxidation Ponds มีขนาดพื้นที่บ่อ 11 ไร่ (17,600 ตารางเมตร) และ 10.4 ไร่ (16,640 ตารางเมตร) ลึกบ่อละ 1.5 เมตร ความจุของบ่อ 26,400 ลบ.ม. และ 24,960 ลบ.ม. ระยะเวลาการกักเก็บน้ำ 2.2 วัน และ 2.08 วัน ตามลำดับ มีการฆ่าเชื้อโรคโดยอาศัยแสงแดด และมีการทำงานของแบคทีเรียแบบใช้ออกซิเจนในการกำจัดสิ่งสกปรกประเภทสารอินทรีย์ โดยออกซิเจนจะได้จากอากาศ และการสังเคราะห์แสงของพืชน้ำบริเวณจุดระบายน้ำจากบ่อที่ 6 เข้าไปยังบ่อที่ 7 มีระบบคลองวนเวียนที่มีการฆ่าเชื้อโรคและ Oxidized สาหร่ายโดยใช้คลอรีนเพื่อลดปริมาณของสาหร่ายที่จะเกิดขึ้น ซึ่งจะมีผลทำให้น้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้วสามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์ได้

บ่อบำบัดที่ 7 detention reservoir พื้นที่บ่อ 18.3 ไร่ (29,280 ตารางเมตร) ความลึก 3.5 เมตร ความจุของบ่อ 102,480 ลบ.ม. ระยะเวลาการกักเก็บน้ำ 8.54 วัน เป็นบ่อพักน้ำฝนและน้ำที่ผ่านกระบวนการบำบัดแล้ว และมีคุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานตามประกาศของกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ก่อนที่จะระบายออกสู่แม่น้ำกวงหรือนำไปใช้ประโยชน์อื่น ๆ เช่น ใช้เป็นน้ำรดต้นไม้

ลักษณะการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสียแบบ Aerated lagoon ดังแสดงใน ภาพ 1 เป็นระบบที่อาศัยการเติมออกซิเจนจากเครื่องเติมอากาศ (Aerator) เพื่อเพิ่มออกซิเจนในน้ำให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับให้จุลินทรีย์นำไปใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ซึ่งจะเร็วกว่าการปล่อยให้จุลินทรีย์ย่อยสลายสารอินทรีย์เองตามธรรมชาติ จึงทำให้ระบบบำบัดน้ำเสียแบบบ่อเติมอากาศสามารถบำบัดน้ำเสียได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถลดปริมาณความสกปรกในน้ำเสียในรูปของบีโอดี (Biochemical Oxygen Demand : BOD) ได้ร้อยละ 80-85



ภาพ 1 แสดงแผนผังระบบบำบัดน้ำเสียแบบบ่อเติมอากาศ (Aerated lagoon)

ที่มา : http://www.ec.gc.ca/.../ww_2002_p2_e.cfm

จุลินทรีย์ที่พบในน้ำเสีย

จุลินทรีย์ที่พบในน้ำเสียมีชนิดและปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของสารและแหล่งกำเนิดของน้ำเสีย น้ำเสียที่มีอินทรีย์สารอยู่มากจะมีจุลินทรีย์เป็นจำนวนมากด้วย โดยทั่วไปจะพบทั้งฟังไจ โปรโตซัว สาหร่าย แบคทีเรีย และ ไวรัส จุลินทรีย์เหล่านี้ได้จากแหล่งต่างๆ เช่น ดิน อากาศ น้ำที่ผ่านการชะล้างสิ่งขับถ่ายของมนุษย์ สัตว์ และน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น

ในน้ำเสียที่ยังไม่ผ่านกระบวนการบำบัดจะมีแบคทีเรียหลายล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่พบมากได้แก่ โคลิฟอร์มแบคทีเรีย *fecal streptococci* , *Clostridium* , *Sarcina* , *Pseudomonas aeruginosa* , *P.fluorescens* , *Aerobacter cloacae* , *Micrococcus* , *Mycobacterium* , *Bacillus subtilis* , *B. cereus*, *Proteus vulgaris* , iron bacteria และ sulfur-bacteria โดย iron bacteria สกุล *Sphaerotilus* เช่น *S. natans* จะเปลี่ยนสารประกอบของเหล็กในรูปสารละลายให้เป็นสารประกอบที่ใช้ห่อหุ้มเซลล์ ส่วนสกุล *Gallionella* จะใช้สารประกอบของเหล็กในการสร้าง stalk เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะกับวัตถุต่าง ๆ ทำให้ธาตุเหล็กในน้ำเสียลดลง นอกจากนี้ iron bacteria ยังสามารถสร้างเมือกได้ดีด้วยทำให้น้ำมีกลิ่นและรสผิดปกติ สำหรับ sulfur bacteria บางชนิด

สร้างกรดและทนต่อกรดได้ดี เช่น *Thiobacillus* จะออกซิไดซ์กำมะถันเป็นกรดซัลฟิวริก ทำให้สภาพพีเอช(pH)ลดลงถึง 1 แต่เชื้อยังเจริญอยู่ได้ ส่วน *Desulfovibrio desulfuricans* จะเปลี่ยนซัลเฟตและสารประกอบกำมะถันให้เป็นไฮโดรเจนซัลไฟด์ บทบาทของ sulfur bacteria ทำให้น้ำเสียเกิดกลิ่นเหม็นเน่าและรสเปรี้ยวและอาจมีสีดำเกิดขึ้นด้วย (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534)

ในน้ำเสียสามารถแบ่งแบคทีเรียออกได้เป็น 4 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

1. แบคทีเรียแอกโรบและใช้ออกซิเจนน้อย (facultative anaerobic) เช่น *Aeromonas*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* และ *Shigella* เป็นต้น
2. แบคทีเรียแอกโรบและต้องการออกซิเจน (aerobic bacteria) เช่น *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* และ *Acinetobacter* เป็นต้น
3. แบคทีเรียแอกโรบและสร้างสปอร์ (spore-forming bacteria) เช่น *Bacillus* sp.
4. แบคทีเรียแอกโรบไม่สร้างสปอร์ (non spore-forming bacteria) เช่น *Arthobacter*, *Corynebacterium* และ *Rhodococcus* (Dott & Kampfer, 1988)

1. แบคทีเรีย (Bacteria)

แบคทีเรีย (bacteria) เป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญที่สุดในระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบชีวภาพ เนื่องจากสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ทั้งชนิดที่ละลายน้ำและชนิดที่ไม่ละลายน้ำ โดยปกติแบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์ชนิดเซลล์เดี่ยวโครงสร้างเซลล์เป็นแบบโปรคาริโอติก (prokaryotic) โดยแบ่งรูปร่างเซลล์ของแบคทีเรียได้เป็น 3 แบบ คือ รูปแท่ง (rod) รูปกลม (coccus) หรือเป็นเกลียว (spiral) (Voet & Voet, 1995) แต่ชนิดที่สำคัญที่สุดได้แก่ชนิดที่มีรูปร่างเป็นแท่ง เคลื่อนไหวได้ ซึ่งอาจจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (cluster) หรือเป็นลูกโซ่ (chain) (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2540)

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก แบคทีเรียชนิดเซลล์เดี่ยวมีขนาดประมาณ 1-10 ไมครอน (Terrance, 1989) ส่วนแบคทีเรียพวก *Chlamydoacteriaceae* มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ บางชนิดอาจมีขนาดใหญ่ถึง 40 ไมครอน แต่โดยทั่วไปแล้วพวก eubacteria มีขนาด 0.2 – 1.5 ไมครอน สำหรับขนาดของแบคทีเรียที่พบโดยทั่วไป เช่น *Staphylococcus aureus* มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 – 1.0 ไมครอน *Micrococcus ureae* มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 – 1.0 ไมครอน *E. coli* มีขนาดยาว 1.0 – 3.0 ไมครอน กว้าง 0.4 – 0.7 ไมครอน และ *Pseudomonas aeruginosa* มีขนาดยาว 1.5 – 6.0 ไมครอน (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534)

สำหรับโครงสร้างภายในของแบคทีเรีย มีกลไกการทำงานภายในเซลล์หลายชนิด เช่น ทรานสคริปชัน (transcription) ทรานสเลชัน (translation) และเอนเนอจีโปรดักชัน (energy production) เป็นต้น แบคทีเรีย เช่น *E. coli* ภายในไซโตรพลาสซึมมีสารพันธุกรรมมีลักษณะเป็น

โครโมโซมเดี่ยว (single chromosomal) กระจายอยู่ทั่วไซโตรพลาสซึมและจะมีไรโบโซมเชื่อมต่อกับพลาสมาเมมเบรน (plasma-membrane) ไรโบโซมที่เป็นโพลีโซมจะอยู่ระหว่างพลาสมาเมมเบรน ซึ่งมีหน้าที่ในการสังเคราะห์โพลีเปปไทด์สำหรับผนังเซลล์และเลเยอร์ (external layers) อื่นๆ โดยจะขึ้นอยู่กับการสะสมภายในเซลล์ เช่น poly- β -hydroxybutyrate, polyphosphate , glycogen เป็นต้น (Krell & Beveridge ,1985) แบคทีเรียบางกลุ่มจะมีเมมเบรน ได้แก่ พลาสมาเมมเบรนห่อหุ้มวิสิเคิล (internal vesicle) ซึ่งจะพบในแบคทีเรียกลุ่ม photosynthetic – bacteria (ทั้งแบบ aerobic และ anaerobic) (Krell & Beveridge ,1985)

ส่วนโครงสร้างภายนอกของแบคทีเรีย แบคทีเรียจะมีโครงสร้างภายนอกหลายแบบโดยจะอยู่บริเวณผิวหน้าของไซโตรพลาสซึม ซึ่งประกอบด้วย แคปซูล (capsules) , สลิมเลเยอร์ (slim - layers) ซีท (sheaths) พิลไล (pili) และแฟลกเจลลา (flagella) เป็นต้น (Terrance , 1989)

การทนต่อพิษโลหะหนักของแบคทีเรีย

แบคทีเรียอยู่ร่วมกับโลหะหนักที่เป็นพิษมาตั้งแต่ยุคแรกของการมีสิ่งมีชีวิตหรือเมื่อประมาณสี่พันล้านปีก่อน (Silver & Tapan , 1988) แบคทีเรียต้องปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมจึงจะมีชีวิตอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลง เช่น การขาดแคลนอาหาร การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง การปรับตัวเพื่อความอยู่รอดของแบคทีเรียก่อให้เกิดวิวัฒนาการในการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมหรือยีนเป็นการกลายพันธุ์ของแบคทีเรีย การกลายพันธุ์ของแบคทีเรียเนื่องจากการได้รับการกระตุ้นจากโลหะหนักทำให้แบคทีเรียสามารถมีชีวิตอยู่ร่วมกับโลหะหนักได้ โดยการควบคุมกลไกการทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียด้วยยีนที่เกิดการกลายพันธุ์ โลหะหนักบางชนิด เช่น ทองแดง สังกะสี โครเมียม นิกเกิล เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นในปริมาณน้อยใช้ประกอบในการสร้างเอนไซม์และการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แต่โลหะหนักส่วนใหญ่เป็นโลหะที่ไม่จำเป็นต่อแบคทีเรีย ไม่มีคุณค่าทางโภชนาการ และมีความเป็นพิษต่อแบคทีเรีย โลหะหนักที่เป็นพิษนี้จะทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบที่สำคัญต่างๆภายในเซลล์ด้วยพันธะโควาเลนต์และพันธะไอออนิก ที่ความเข้มข้นสูงโลหะหนักทั้งที่จำเป็นและไม่จำเป็นมีความเป็นพิษโดยจะทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ เปลี่ยนแปลงความเฉพาต่อเอนไซม์ รบกวนการทำหน้าที่ขององค์ประกอบภายในเซลล์ และทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ แบคทีเรียจึงต้องมีการพัฒนาเพื่อให้ทนต่อโลหะหนัก โดยมีการสร้างกลไกในการต้านทานพิษของโลหะหนักที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม โดยการสร้างยีนที่ทนต่อพิษของโลหะหนักนี้มีลักษณะการทำงานเหมือนกับยีนสำหรับต้านทานยาปฏิชีวนะ โดยยีนนี้จะมีอยู่ใน plasmids และ transposons ของแบคทีเรีย (Silver et al, 1989) แบคทีเรียมีการพัฒนากลไก

หลายวิธีเพื่อทนต่อโลหะหนักที่นำเข้าสู่เซลล์ กลไกนี้ประกอบด้วย การ efflux ไอออนโลหะหนักออกจากเซลล์ การสะสมโลหะหนักที่เข้าไปภายในเซลล์ การทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะหนักภายในเซลล์ และการ reduction ไอออนโลหะหนักให้มีความเป็นพิษน้อยลง (Nies, 1999) นอกจากนี้กลไกการลดการขนส่งไอออนโลหะหนักเข้าสู่เซลล์ก็เป็นกลไกที่สำคัญในการทนต่อโลหะหนัก (Laddaga et al, 1985 ; Nies & Silver, 1989) กลไกการสะสมโลหะหนักของแบคทีเรียมีหลายแบบ เช่น การใช้ระบบการขนส่งธาตุอาหารเข้าสู่เซลล์ (transport system) การจับกับโลหะหนักด้วยโปรตีน (metal binding protein) ซึ่งมีทั้งแบบที่เกิดขึ้นภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ การตกตะกอน (precipitation) การดูดซับไอออนโลหะหนัก (adsorption) และการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนโลหะหนัก (complexation) ซึ่งเกิดขึ้นจากการจับสารเมตาบอไลต์ออกมาจับกับไอออนโลหะหนัก (Gadd, 1988) สำหรับขั้นตอนการขนส่งไอออนโลหะหนักเข้าสู่เซลล์ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน เริ่มจากการจับไอออนโลหะหนักไว้ที่ผนังเซลล์ จากนั้นไอออนโลหะหนักจะถูกส่งผ่านเข้าไปภายในเซลล์โดยใช้พลังงานซึ่งเป็นกระบวนการเดียวกันกับการขนส่งธาตุอาหารเข้าสู่เซลล์ กระบวนการขนส่งไอออนโลหะหนักในแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีกลไกที่ไม่เหมือนกันและมีความเฉพาะเจาะจงกับโลหะหนักที่แตกต่างกัน หลังจากไอออนโลหะหนักถูกส่งเข้าไปภายในเซลล์อาจเข้าไปเป็นส่วนประกอบหนึ่งของเซลล์ เช่น *Klebsiella aerogenes* สามารถสะสมไอออนแคดเมียมและสารประกอบซัลไฟด์อินทรีย์ภายในเซลล์ในสัดส่วนความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกันจึงเป็นผลให้มีการสร้างสารประกอบแคดเมียมซัลไฟด์ขึ้นภายในเซลล์ (Aiking et al, 1982) การตกตะกอนโลหะหนักเป็นการสะสมโลหะหนักโดยแบคทีเรียผลิตหรือปลดปล่อยสารซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะหนักแล้วเกิดเป็นสารประกอบโลหะหนักที่ไม่ละลายน้ำ เช่น *Citrobacter* sp. สามารถสร้างเอนไซม์ฟอสฟาเตสมาย่อยกลีเซอรอล-2-ฟอสเฟต แล้วปลดปล่อย HPO_4^{2-} ซึ่งสามารถตกตะกอนแคดเมียม ตะกั่ว และยูเรเนียมได้ (Brierley, 1990) Mergeay และคณะ (1985) ทดลองหาค่า MIC ของโลหะหนักหลายชนิดใน *E. coli* บนอาหารแข็ง พบว่า โลหะที่มีความเป็นพิษมากที่สุดคือ พรอท ส่วนโลหะที่มีความเป็นพิษน้อยที่สุดคือ แมงกานีส

โลหะหนักในระดับที่มีความเข้มข้นสูงจะอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนภายในเซลล์ (Nies, 1999) ซึ่งทำให้โลหะหนักเป็นพิษ แต่โลหะหนักก็จำเป็นในการสร้างเอนไซม์และใช้ในการเจริญของแบคทีเรียจึงต้องถูกนำเข้าสู่เซลล์ โดยกลไกการนำเข้าไอออนโลหะหนักในแบคทีเรียมีระบบการนำเข้า 2 แบบ คือ

1. การนำเข้าแบบเร็ว และไม่เฉพาะเจาะจงกับสับสเตรท การนำเข้าแบบนี้สามารถนำเข้าโลหะหนักผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์โดยไม่ต้องอาศัยพลังงานจาก ATP

2. การนำเข้าแบบซ้ำ และเฉพาะเจาะจงกับสับสเตรท การนำเข้าแบบนี้อาศัยพลังงานจาก ATP hydrolysis (Nies, 1999)

จากการศึกษาการต้านทานต่อโลหะหนักและยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย โดย Filali และคณะ (2000) ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ทนต่อโลหะหนักและสารปฏิชีวนะในน้ำทิ้งของ โรงงานอุตสาหกรรมประเทศแม็กซิโก จากผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ที่ทนต่อโลหะหนักในน้ำเสียได้ดี คือ *Pseudomonas fluorescens* , *Pseudomonas aeruginosa* , *Klebsiella pneumoniae* , *Proteus mirabilis* และ *Staphylococcus* sp. ซึ่งจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตในโลหะหนักที่มีความเข้มข้นสูง เช่น แคดเมียม (2 mM) พรอท (1.2 mM) และถูกยับยั้งเล็กน้อยในทองแดง เงิน และสังกะสี นอกจากนี้ Mergeay และคณะ (1985) ทดลองหาค่า MIC ของโลหะหนักหลายชนิด ใน *E. coli* บนอาหารแข็ง พบว่า โลหะที่มีความเป็นพิษมากที่สุดคือ พรอท ส่วนโลหะที่มีความเป็นพิษน้อยที่สุดคือ แมงกานีส

การทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียมีกลไกการทำงานพื้นฐาน 5 วิธี คือ

1. โดยการใช้เอนไซม์ออกซิเดส (oxidases) และเอนไซม์รีดักเตส (reductase) ในการเปลี่ยนไอออนจากโลหะที่เป็นพิษมากเป็นโลหะที่มีพิษน้อยหรือมีเอนไซม์อัลคิลเลตติ้ง (alkylating) และเอนไซม์ดีอัลคิลเลตติ้ง ไลเอส (dealkylating lyases) ที่เพิ่มและกำจัดพันธะโควาเลนต์ของสารประกอบที่เป็นโลหะอินทรีย์ สำหรับการรีดักชัน (reduction) และการดีอัลคิลเลชัน (dealkylation) เป็นกลไกหลักในการต้านทานสารประกอบอินทรีย์หรืออนินทรีย์ของพรอท ส่วนอาเซนิคใช้กระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) และโครเมตใช้กระบวนการรีดักชัน (reduction) เป็นกลไกการต้านทานไอออนโลหะหนักของแบคทีเรีย (Silver et al , 1989)

2. โดยการใช้การจับโลหะหนักที่ผนังเซลล์หรือภายในเซลล์โดยใช้สารประกอบที่มีความเฉพาะเจาะจงในการจับ เช่น metallothionein และ metalloptides (Paziradeh et al , 1998)

3. โดยการลดการนำเข้า (reduce uptake) โลหะหนัก วิธีนี้เซลล์ของแบคทีเรียจะขัดขวางการนำเข้าโลหะหนักโดยเปลี่ยนเส้นทางการนำเข้าในเซลล์ที่มีความไวต่อโลหะหนัก (sensitive cell) เช่น การต้านทานอาเซเนต แคดเมียม โครเมต และไอออนของโลหะอื่นบางตัว (Nies & Silver , 1989)

4. ไอออนของโลหะหนักบางตัวจะมีการแพร่เข้าไปภายในไซโตพลาสซึมแบคทีเรียสามารถขับไอออนโลหะหนักออกโดยการปั๊มออกจากเซลล์ด้วยระบบการขนส่ง (transport system) โดยใช้กระบวนการ Highly specific efflux system โดยอาศัยพลังงานจากเยื่อหุ้มเซลล์หรือจาก ATP โดยตรง สำหรับ efflux pump เป็นกลไกสำหรับใช้ต้านทานยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราไซคลิน และสามารถเข้ากับโลหะหนัก เช่น อาเซนิค แคดเมียม และ โครเมต ได้ (Silver , 1996)

5. โดยการเปลี่ยนเป้าหมายภายในเซลล์สำหรับทำปฏิกิริยากับโลหะหนักที่เป็นพิษ กลไกการต้านทานแบบนี้จะไม่เฉพาะเจาะจง ต้องมีการเปลี่ยน thiol – containing - enzyme เมื่อมีการเปลี่ยนชนิดของโลหะหนัก (Silver et al , 1989)

1. การทนต่อแคดเมียมของแบคทีเรีย

ความสามารถในการละลายของแคดเมียม CdS คือ 1.4×10^{-29} แต่ในสังกะสี ZnS ความสามารถในการละลาย คือ 2.91×10^{-25} (Weast, 1984) ดังนั้นแคดเมียมจึงมีความเป็นพิษมากกว่าสังกะสี (Ragan & Mast, 1990) โดยแคดเมียมจะมีผลในการทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์และทำให้เกิด protein denaturation นอกจากนี้แคดเมียมยังไปทำปฏิกิริยากับแคลเซียมและสังกะสีในกระบวนการเมตาบอลิซึม ใน *S. cerevisiae* (Liu et al , 1997) ในแบคทีเรียบางชนิดเช่น *Klebsiella aerogenes* เกิดการสะสมแคดเมียมไอออนและสารประกอบซัลไฟด์อินทรีย์ภายในเซลล์ในสัดส่วนความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกัน ส่งผลให้เกิดการสร้างสารประกอบแคดเมียมซัลไฟด์ขึ้นภายในเซลล์ (Aiking et al , 1984) ซึ่งกลไกการลดพิษแบบนี้เป็นการตกตะกอนแคดเมียมโดยทำให้เป็นสารประกอบซัลไฟด์ที่ไม่ละลายน้ำและเกิดการตกตะกอนที่ ผิวหน้าของแบคทีเรียหรือเกิดการสะสมแคดเมียมภายในเซลล์แบคทีเรีย การทนต่อแคดเมียมใน cyanobacteria จะมี metallothioneins (Olafson et .al, 1979) ซึ่งการเพิ่ม metallothioneins จะช่วยเพิ่มความสามารถในการทนต่อแคดเมียม และการลด metallothioneins จะลดความสามารถในการทนแคดเมียม (Gupta et.al, 1992) ยีน metallothioneins คือ smt A จะถูกควบคุมโดย smt B cyanobacteria จะมี RNA และระบบ P-type ซึ่งสำคัญต่อการทนแคดเมียม (Thelwell et al , 1998) สำหรับในแบคทีเรียแกรมลบแคดเมียมจะถูกนำเข้าสู่เซลล์ด้วยระบบ efflux การทนต่อแคดเมียมเกิดขึ้นจากการขับแคดเมียมออกโดยการ efflux โดยโปรตีน RNA-driven ส่วนในแบคทีเรียแกรมบวกการทนต่อแคดเมียมเกิดจากการ efflux แคดเมียมออกจากเซลล์โดยใช้โปรตีน P-type ATPase ดังแสดงในภาพ 2 การขับแคดเมียมออกจากเซลล์แบคทีเรียมี 3 รูปแบบ คือ ระบบที่เกิดขึ้นบน plasmid โดยการ encode cad ซึ่งมีอยู่ 2 รูปแบบ คือ single cad (cad A) และ two cad (cad A, cad B) ซึ่งจะเกิดใน *S. aureus* (Smith & Novick , 1972) และระบบ czc ใน *A. eutrophus* (Nies, 1992) และระบบที่สามเกิดขึ้นบน chromosomal โดยการ encode smt จากการศึกษาของ Macaskie & Dean (1982) ศึกษาการสะสมแคดเมียมของแบคทีเรียที่คัดแยกจากพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนโลหะหนัก พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Citrobacter* sp. ที่คัดแยกได้จากพื้นที่ที่ปนเปื้อนตะกั่วสามารถสะสมแคดเมียมได้ดี

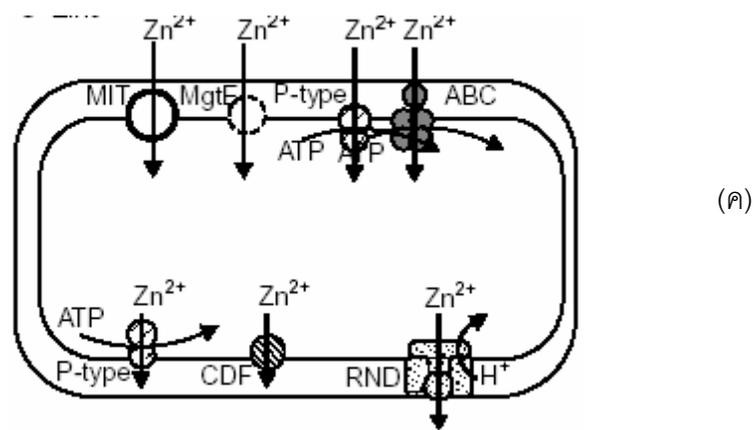
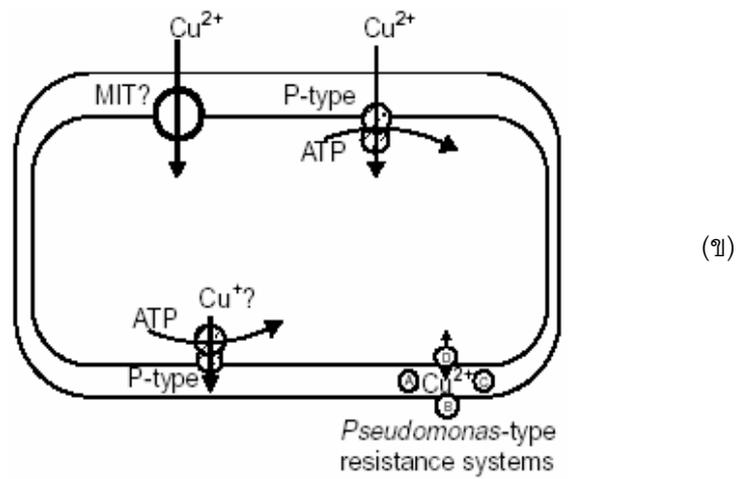
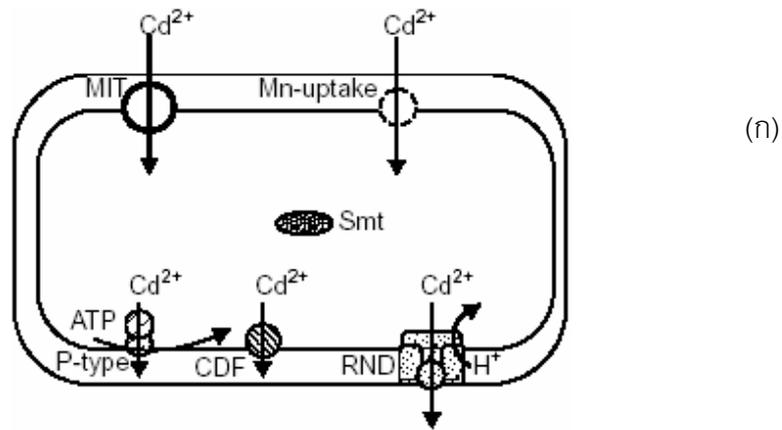
และสามารถทนต่อแคดเมียมได้สูง ส่วนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียม พบว่าเกิดการนำเข้าสู่แคดเมียมได้ต่ำ เนื่องจากแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมโดยใช้กลไกการลดการนำเข้าสู่แคดเมียมสู่เซลล์

2. การทนต่อทองแดงของแบคทีเรีย

ทองแดงเป็นโลหะที่จำเป็นในปริมาณน้อย ใช้สำหรับการสร้างเอนไซม์ในจุลินทรีย์ เช่น cytochrome c oxidase แต่ทองแดงถูกนำมาใช้อย่างมากในการทำเหมือง อุตสาหกรรม และการเกษตร จึงมีทองแดงปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมในปริมาณมาก แบคทีเรียจึงมีการพัฒนากลไกการทนต่อพิษของทองแดง ปกติทองแดงจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลโดยเฉพาะออกซิเจนทำให้ทองแดงเป็นพิษมาก และแบคทีเรียหลายชนิดไวต่อพิษของทองแดง (Gordon et al, 1994) โดยพิษของทองแดงขึ้นอยู่กับการผลิต hydroperoxide และปฏิกิริยาบนเยื่อหุ้มเซลล์ (Suwalsky et al, 1998) แบคทีเรียบางชนิดสามารถต้านทานพิษของทองแดงได้โดยใช้ระบบการสะสม (accumulation) ไอออนทองแดงซึ่งจะอาศัยโปรตีนที่ใช้ในการขนส่ง corA-Mg^{2+} และ P-type ATPase ในการขนส่งทองแดงเข้าสู่เซลล์ ใน *Pseudomonas* sp. การทนต่อทองแดงเกิดจากการสะสม (accumulation) และ compartmentalization ใน periplasm และที่ผนังเซลล์ชั้นในและนอก (inner-outer membrane) โดยเกิดจากการ encode โปรตีน 4 ตัวบน plasmid-bound cop operon (Cooksey, 1994) โปรตีนที่พบใน periplasm คือ cop A และ cop C ส่วนที่ผนังเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) คือ cop B และที่ผนังเซลล์ชั้นใน (inner membrane) คือ cop D สำหรับ cop A จะทำหน้าที่เป็น copper-binding sites ส่วน cop C และ cop D ทำหน้าที่เป็น ตัวเร่งในการนำทองแดงเข้าสู่ cytoplasm โดยโปรตีนทั้ง 4 ตัวจะทำงานร่วมกันในการ compartmentalization ทองแดงออกจากเซลล์ ดังแสดงในภาพ 2 ส่วนใน *E. coli* การทนต่อทองแดงขึ้นอยู่กับกลไกการ efflux ทองแดงออกจากเซลล์ โดยโปรตีนที่ใช้ในการ efflux เกิดขึ้นบน plasmid-bound pco gene ซึ่งจะขึ้นอยู่กับการแสดงออกบน Chromosomal cut gene (Cooksey, 1993) และในแบคทีเรียแกรมบวก *Enterococcus hirae* จะมีโปรตีนลักษณะเหมือนกับของ *Pseudomonas* โดยจะมีโปรตีน 4 ตัว คือ cop A, cop B, cop Z และ cop Y (Bruins et al, 2000) ในการศึกษาของ Lin & Olson (1995) ศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกจากระบบบำบัดน้ำเสีย พบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้ 62% เป็นแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดง และในจำนวนนี้ 49% มียีน cop ทำหน้าที่ในการ efflux และ compartmentalization

3. การทนต่อสังกะสีของแบคทีเรีย

สังกะสีเป็นโลหะอีกชนิดหนึ่งที่มีความจำเป็นในปริมาณน้อย โดยอยู่ในรูปสารประกอบ เช่น Zn-finger ใน DNA และเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างเอนไซม์ (Nies, 1999) แบคทีเรียจะสะสมสังกะสีโดยใช้กลไกการนำเข้าแบบเร็วและไม่เฉพาะเจาะจง และการนำเข้าสังกะสีโดยทั่วไปจะทำคู่กับระบบการนำเข้าแมกนีเซียม โดยไอออนของโลหะทั้งสองชนิดจะถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์ด้วยกลไกที่เหมือนกัน (Nies & Silver, 1995) กลไกการ efflux สังกะสีในแบคทีเรียมี 2 แบบ คือ การ efflux โดยใช้ P-type ATPase โดยจะขนส่งสังกะสีผ่าน cytoplasmic membrane โดยใช้พลังงานจาก ATP hydrolysis (Beard et al, 1997) และแบบการ efflux โดยใช้ RND-driven ซึ่งจะขนส่งสังกะสีผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และใช้พลังงานจาก proton-gradient และไม่ใช้ ATP (Nies, 1999) ดังแสดงในตาราง 2 ในระบบการขนส่งสังกะสีจะมีโปรตีนตัวพา 3 กลุ่ม คือ 1. การขนส่งสังกะสีโดยใช้ corA MIT ซึ่งเป็นการขนส่งสังกะสีร่วมกับแมกนีเซียม ส่วนมากพบใน *S. cerevisiae* และในแบคทีเรียบางชนิด รวมถึง archaea 2. การใช้แรงดันออกซิโมติกโดยใช้โปรตีนตัวพา คือ Mgt-E จะใช้ในเวลา que แบคทีเรียต้องการสังกะสีในกระบวนการเมตาบอลิซึม ส่วนมากพบใน *Providencia stuartii* และในแบคทีเรียแกรมบวกและลบบางชนิด 3. การใช้ MgtA P-type ATPase ในการขนส่งสังกะสีซึ่งจะใช้ร่วมกับการขนส่งแมกนีเซียม พบใน *S. typhimurium* ในการศึกษาของ Ahuja และคณะ (2000) ได้ศึกษากลไกการทนต่อสังกะสีของ cyanobacterium สายพันธุ์ *Oscillatoria angustissima* พบว่า กลไกการ efflux สังกะสีเกิดขึ้นภายหลังจากเกิดการนำเข้าสังกะสีสูงสุด และการต้านทานพิษสังกะสีของแบคทีเรียเกิดจากการลดการนำเข้าสังกะสีสู่เซลล์



ภาพ 2 แสดงกลไกการทนต่อแคดเมียม, ทองแดง และสังกะสี ของแบคทีเรีย

(ก) กลไกการทนต่อแคดเมียมของแบคทีเรีย

(ข) กลไกการทนต่อทองแดงของแบคทีเรีย

(ค) กลไกการทนต่อสังกะสีของแบคทีเรีย

ที่มา : (Nies,1999)

การกำจัดโลหะหนักทางชีวภาพ

โลหะหนักที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาที่สำคัญและส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะมลพิษทางน้ำ มลสารที่พบมากที่สุดที่ปนเปื้อนมากับน้ำเสียคือ โลหะหนัก (Sabhi , 1990) โลหะหนักที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่เป็นโลหะที่ไม่ย่อยสลายด้วยวิธีการทางชีวภาพ และจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์โดยเข้าทางห่วงโซ่อาหาร (Khattar ,1999) การบำบัดโลหะหนักที่ปนเปื้อนในน้ำเสียด้วยวิธีการทางชีวภาพสามารถกำจัดโลหะหนักที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้ (Sandau, 1996) การใช้จุลินทรีย์เป็นตัวกำจัดในการบำบัดน้ำเสียที่มีโลหะหนักปนเปื้อนจึงเป็นวิธีการกำจัดโลหะหนักออกจากน้ำเสียได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีข้อดี เนื่องจากมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อย และต้นทุนต่ำ (Lodi, 1998) มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถกำจัดโลหะหนักออกจากน้ำเสียได้ เช่น ยีสต์ สาหร่าย แบคทีเรีย และพืชน้ำ (Aksu, 1998) ซึ่งข้อดีของการกำจัดโลหะหนักทางชีวภาพประกอบด้วย 1. ราคาถูก 2. มีประสิทธิภาพในการกำจัดสูง 3. ใช้สารเคมีน้อย และเกิดมลพิษน้อย 4. ไม่ต้องการสารอาหารเพิ่ม 5. สามารถสร้างและนำตัวกำจัดกลับมาใช้ได้ใหม่ และ 6 มีความเป็นไปได้ที่จะนำโลหะหนักกลับมาใช้ใหม่

การกำจัดทางชีวภาพ (biosorption) เป็นกระบวนการที่อาศัยหลักการจับกันของโลหะกับวัสดุทางชีวภาพชนิดต่าง ๆ โดยใช้กระบวนการเมตาบอลิซึมหรือกระบวนการทางเคมีในการกำจัด (Fourest & Roux, 1992) ตัวกำจัดทางชีวภาพที่นิยมใช้ ได้แก่ การใช้จุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย สาหร่าย รา และยีสต์ (Volesky, 1986) ในการกำจัดโลหะหนักและธาตุหรือสารประกอบอื่น เช่น สารกัมมันตรังสี (radionuclides) สารประกอบออกาโนเมทัลลิก (organometallic compounds) กึ่งโลหะ (metalloid) และโลหะพาทิคิวเลต (metal particulated) ออกจากสารละลายโดยอาศัยชีวสาร (biological material) (Gadd , 2000) กลไกการสะสมโลหะหนักของจุลินทรีย์เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการกำจัดโลหะหนัก ซึ่งกลไกการสะสมโลหะหนักมีหลายแบบอาจเกี่ยวข้องกับการดูดซับ (adsorption) การตกตะกอน (precipitation) หรือกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ของจุลินทรีย์ทั้งเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ที่ไม่มีชีวิต และส่วนประกอบของเซลล์ เช่น ผนังเซลล์ (cell wall) โดยกระบวนการกำจัดทางชีวภาพสามารถทำให้สารพิษเปลี่ยนเป็นสารที่ไม่เป็นพิษ (detoxification) ซึ่งเมื่อปล่อยของเสียดังกล่าวที่ผ่านกระบวนการออกสู่สิ่งแวดล้อมก็จะไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์สามารถทำหน้าที่เป็นตัวกำจัดที่ดีโดยกระบวนการกำจัดบนพื้นผิวแล้วตามด้วยการสลายตัวของสารอินทรีย์ทำให้สามารถกำจัดโลหะได้มากขึ้น องค์ประกอบของผนังเซลล์เป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีอิทธิพลต่อความจุ (capacity) และความเฉพาะ (selectivity) ของชนิดของโลหะซึ่งมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะแวดล้อม นอกจากนี้โลหะละลายน้ำได้ที่ถูก

กำจัดที่ผนังเซลล์ได้สารพาทิควเลท (particulated) อื่น ๆ ก็สามารถถูกกำจัดโดยจุลินทรีย์ได้เช่นกัน ได้แก่ โลหะซัลไฟด์ ฝุ่นสังกะสี (Zinc dust) และเหล็กออกไซด์ เป็นต้น สำหรับจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต H_2S จะตกตะกอนโลหะให้อยู่ในรูปของสารประกอบโลหะซัลไฟด์ที่ไม่ละลายน้ำอยู่ในและรอบๆ พื้นผิวของเซลล์จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถจับโมเลกุลที่ยึดเหนี่ยวกับเหล็กได้ดี (High-affinity iron-binding molecule) โดยเกี่ยวข้องกับกาเกิดเมตาบอลิซึมของเหล็ก และอาจสามารถยึดเหนี่ยวกับโลหะอื่นๆ ได้ด้วย เช่น Ga Ni Th U และ Cu เป็นต้น จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถเปลี่ยน Ag^+ ให้เป็นโลหะ Ag และเกาะอยู่ที่ภายในหรือรอบๆ พื้นผิวของผนังเซลล์ได้เช่นกัน นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดยังมีกลไกต้านทาน (resistance mechanism) พิษของโลหะโดยการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ไม่เป็นพิษโดยอาศัยเอ็นไซม์ เช่น เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน เมทิลเลชัน หรือดีเมทิลเลชัน เป็นต้น จากการศึกษาของ Canstein และคณะ (1999) ศึกษาการกำจัดปรอทในน้ำเสียที่ผ่านกระบวนการ Chlorakali Electrolysis โดยใช้แบคทีเรียที่ทนต่อปรอทคือ *Pseudomonas putida* Spi 3 ซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปปรอทให้อยู่ในรูป metallic mercury ทำการทดลองโดยใช้แบบจำลองถึงปฏิกรณชีวภาพแบบต่อเนื่อง ผลการทดลองพบว่า สามารถกำจัดปรอทออกจากน้ำเสียที่ผ่านกระบวนการ chlorakali electrolysis ได้ถึง 90 – 98 %

กลไกการกำจัดโลหะหนักโดยแบคทีเรีย

แบคทีเรียมีกลไกการกำจัดโลหะหนักหลายวิธี มีการแบ่งตามหลักเกณฑ์ต่าง ๆ เช่น

1. ขึ้นอยู่กับเมตาบอลิซึมของเซลล์ การกำจัดโลหะหนักโดยแบคทีเรียสามารถเกิดขึ้นจาก 2 กระบวนการใหญ่ ๆ คือ การใช้พลังงาน และไม่ใช้พลังงาน ในกระบวนการที่ใช้พลังงานนั้นแบคทีเรียนำพลังงานมาจากกลไกการเมตาบอลิซึมมาใช้ในการกำจัดโลหะหนัก ส่วนในกระบวนการที่ไม่ใช้พลังงานนั้นเป็นการกำจัดโลหะหนักโดยใช้สมบัติทางเคมีและทางกายภาพของผนังเซลล์แบคทีเรีย หรือเมตาบอลิซึมที่แบคทีเรียสร้างขึ้น (รัชยาภรณ์ ผลมั่ง, 2540)

1.1 การกำจัดโลหะหนักของแบคทีเรียโดยการใช้พลังงาน

1.1.1 การตกตะกอนโดยแบคทีเรีย (precipitation) การตกตะกอนโลหะหนักโดยแบคทีเรียเกิดจากการที่แบคทีเรียผลิตหรือปล่อยสารซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับโลหะหนักแล้วทำให้เกิดสารประกอบโลหะหนักที่ไม่ละลายน้ำ เช่น การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (sulfate reducing bacteria) แล้วทำให้เกิดสารประกอบโลหะซัลไฟด์ แบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้แก่ *Desulfovibrio* และ *Desulfotomaculum* เป็นต้น นอกจากนี้ *Citrobacter* ยังสามารถสร้างเอ็นไซม์ฟอสฟาเตสมาย่อยกลีเซอรอล-2-ฟอสเฟต แล้วปล่อย HPO_4^{2-} ซึ่งสามารถตกตะกอนแคลเซียม ตะกั่ว และยูเรเนียม

ได้ และ *Citrobacter* ที่ถูกตั้งบนโพลีเมอร์ยังสามารถกำจัดยูเรเนียมในรูปของยูเรนิลไนเตรต (uranyl - nitrate) ได้ 90 % ที่พีเอช 6.9 (Brierley, 1990)

1.1.2 การสะสมโลหะหนักภายในเซลล์ (intracellular bioaccumulation) การสะสมโลหะหนักของแบคทีเรีย ประกอบด้วย 2 กระบวนการ คือ เริ่มจากการจับโลหะหนักไว้ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย จากนั้นโลหะหนักจะถูกส่งผ่านเข้าไปภายในเซลล์โดยใช้พลังงาน ซึ่งเป็นกระบวนการเกี่ยวกับการขนส่งแมกนีเซียมและโปแตสเซียมเข้าออกผนังเซลล์ แบคทีเรียผสมกลุ่ม *Pseudomonas maltophilia*, *Staphylococcus aureus* สามารถสะสมโลหะเงินได้ 300 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (Brierley, 1990) และ *Klebsiella aerogenas* สามารถสะสมแคดเมียม และ สารประกอบซัลไฟด์อนินทรีย์ภายในเซลล์ในสัดส่วนความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งมีผลให้มีการสร้างแคดเมียมซัลไฟด์ขึ้นภายในเซลล์ (Aiking et al, 1984)

1.1.3 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน การกำจัดโลหะหนักโดยแบคทีเรียสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน เช่น แบคทีเรียและสปอร์ของ *Bacillus* sp. สามารถออกซิไดซ์แมงกานีสเป็นแมงกานีสออกไซด์ที่ไม่ละลายน้ำ นอกจากนี้ *Bacillus*, *Thiobacillus*, *Micrococcus*, *Rhodospseudomonas* และ *Pseudomonas* สามารถรีดิวซ์เฟอร์ริกอิออน (Fe^{3+}) เป็นเฟอร์รัส (Fe^{2+}) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาการขนถ่ายอิเล็กตรอนของแบคทีเรีย ส่วน *Alteromonas putrefaciens* สามารถเจริญได้โดยการรีดิวซ์แมงกานีสออกไซด์ภายใต้สภาวะที่ไร้อากาศ โดยจะใช้แมงกานีสอิออนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนสุดท้ายในกระบวนการเมตาบอลิซึม (Brierley, 1990)

1.1.4 การเติมหมู่เมทิล (methylation) และการกำจัดหมู่เมทิล (demethylation) การเติมหมู่เมทิลและการกำจัดหมู่เมทิล เป็นกระบวนการที่แบคทีเรียใช้ในการเปลี่ยนรูปโลหะหนักในสภาพแวดล้อม การเติมหมู่เมทิลสามารถเปลี่ยนรูปโลหะหนักบางชนิดที่อยู่ในน้ำและดินไปสู่บรรยากาศได้ ส่วนการกำจัดหมู่เมทิลทำให้เกิดสารประกอบโลหะอนินทรีย์ขึ้นซึ่งเป็นรูปที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นสามารถเปลี่ยนรูปต่อไปได้อีก (Brierley, 1990)

1.2 การกำจัดโลหะหนักของแบคทีเรียโดยไม่ใช้พลังงาน

1.2.1 การจับโลหะหนักโดยสารที่แบคทีเรียปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ การจับโลหะหนักภายนอกเซลล์เกิดขึ้นเมื่อแบคทีเรียผลิตสารสำหรับจับกับโลหะหนักขึ้นภายนอกเซลล์หรือปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งสารนี้อาจมีสมบัติในการจับโลหะ (chelating agent) เช่น ซิเดอโรฟอรัส (siderophores) และโพลีเมอร์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น โดยในการสร้างสารเหล่านี้แบคทีเรียต้องใช้พลังงานในกระบวนการเมตาบอลิซึม แต่ในกระบวนการที่สารเหล่านี้จับกับโลหะหนักไม่ต้องการพลังงานจากแบคทีเรีย แบคทีเรียที่สามารถผลิตซิเดอโรฟอรัส ได้แก่ *Pseudomonas*,

Actinomyces, *Azotobacter* และ *Arthrobacter* ส่วนโพลีเมอร์ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย ประกอบด้วย โพลีแซคคาไรด์ โปรตีน และกรดนิวคลีอิก ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันที่สามารถ จับกับอิออนโลหะหนักและ ตกตะกอนร่วมกันได้ (Brierley, 1990) โพลีเมอร์ที่สร้างขึ้นอาจอยู่ในรูปเมือกที่หลุดแยกจากเซลล์ (slime) หรือเป็นแคปซูล (capsule) ที่ติดแน่นกับผนังเซลล์ก็ได้ (Kasan, 1993) สำหรับ นิวคลีโอโปรตีนของเชื้อ *Polyangium*, *Myxococcus*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* และ *Alcaligenes* สามารถใช้สำหรับตกตะกอนโลหะหนักในการบำบัดน้ำเสียได้ (Bomstein et al, 1972)

1.2.2 การกำจัดโลหะหนักโดยผนังเซลล์ กระบวนการกำจัดโลหะหนักโดย ผนังเซลล์ประกอบด้วย 3 วิธี คือ การแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange) การตกตะกอน (precipitation) และการเกิด complexation โดยผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีคุณสมบัติต่างกัน คือ ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus* มีประสิทธิภาพสูงในการจับกับโลหะหนัก เนื่องจากประกอบด้วยร่างแหของเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ที่หนาและจับกับสารโมเลกุลใหญ่บางชนิด นอกจากนี้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดจะประกอบด้วยกรดไทโคอิก (teichoic-acid) และกรดไทคูโรนิก (teichuronic acid) จึงมีผลให้ประจุของผนังเซลล์เป็นลบ และพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester bond) ของกรดสองชนิดนี้จะให้หมู่คาร์บอกซิลทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนประจุที่ผนังเซลล์ได้ ส่วนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบบมีข้อจำกัดในการจับกับโลหะหนักเนื่องจากผนังเซลล์ประกอบด้วยชั้นเปปติโดไกลแคนที่บาง (Brierley, 1990)

2. ขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่แบคทีเรียกำจัดโลหะหนัก โดยการจัดโลหะหนักของแบคทีเรียสามารถเกิดขึ้นได้ที่บริเวณต่างๆ บนเซลล์แบคทีเรีย ดังนี้

2.1 การสะสมโลหะหนักภายในเซลล์ การสะสมโลหะหนักของจุลินทรีย์ ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน โดยเริ่มจากการจับกับโลหะหนักไว้ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย จากนั้นโลหะหนักจะถูกส่งผ่านเข้าไปภายในเซลล์โดยใช้พลังงาน ซึ่งเป็นกระบวนการเกี่ยวกับการขนส่งแบบแอคทีฟและไปแต่สเซียมเข้าออกสู่เซลล์ จุลินทรีย์กำจัดโลหะหนักเข้าไปสะสมภายในเซลล์โดยมีกลไกการขนส่งสารอยู่ 3 กระบวนการ ได้แก่ การแพร่แบบธรรมดา (diffusion) การแพร่แบบ facilitated diffusion และกระบวนการแอกทีฟทรานสปอร์ต (active transport) เป็นการขนส่งไอออนหรือสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยอาศัยพลังงาน โลหะหนักสามารถสะสมในจุลินทรีย์ได้จากกระบวนการแพร่และกระบวนการแอกทีฟทรานสปอร์ต การสะสมภายในเซลล์เกิดขึ้นได้ยากเพราะต้องขึ้นกับปัจจัยต่างๆ หลายประการ เช่น สภาพแวดล้อม ความจำเพาะของสารที่จะส่งผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ สภาพสรีรวิทยาของอัตราเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ ซึ่งถ้าอยู่ในระดับต่ำเซลล์จะมีพลังงานไม่พอที่จะใช้ในกระบวนการแอกทีฟทรานสปอร์ต เพื่อนำสารเข้าสู่เซลล์

2.2 การสะสมโลหะหนักภายนอกเซลล์ โดยแบคทีเรียจะกำจัดโลหะหนักจากสารละลายไว้ที่ผนังเซลล์ โลหะหนักสามารถสะสมและตกตะกอนได้บริเวณผิวเซลล์ การกำจัดโลหะหนักเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางเคมีและโครงสร้างภายในเซลล์จุลินทรีย์ โดยมีการเชื่อมกันบางส่วน ของโลหะกับบริเวณผิวที่ถูกกำจัด กระบวนการกำจัดที่เกิดที่ผิวเซลล์สามารถเกิดได้ทั้งในชีวมวลที่ไม่มีชีวิต หรือชีวมวลที่มีชีวิต ชีวมวลจุลินทรีย์ที่ตายแล้วในระบบการกำจัดจะมีความสามารถในการกำจัดสารได้มากกว่าชีวมวลที่มีชีวิตอยู่ (Voleskey , 1990) โดยเกี่ยวข้องกับกลไกหลายแบบ เช่น การแลกเปลี่ยนแคทไอออน (ion-exchange) การเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (complexation) และการตกตะกอน (precipitation) กระบวนการเหล่านี้ อาจเกิดขึ้นกระบวนการเดียวหรือหลาย ๆ กระบวนการ ขึ้นอยู่กับชนิดของโลหะ และชนิดของจุลินทรีย์

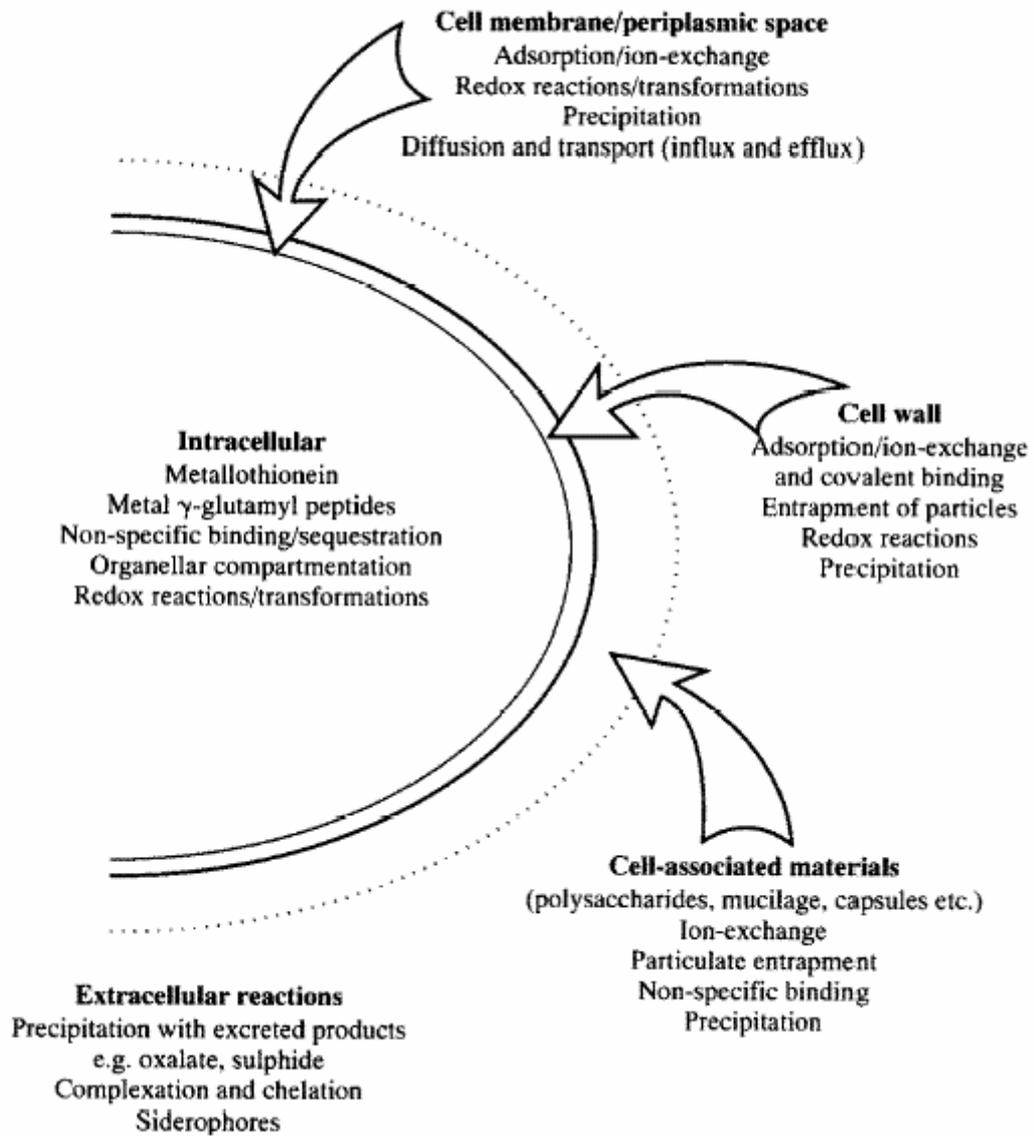
แบคทีเรีย รา และสาหร่ายมีโครงสร้างลักษณะของผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย รา และสาหร่ายประกอบด้วยโมเลกุลขนาดใหญ่ มีความซับซ้อน ผนังเซลล์ของพวกยีสต์และราประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ กาแลคโตซามีน ไคติน โปรตีน และไขมัน ส่วนผนังเซลล์ของพวกสาหร่ายจะประกอบด้วยเซลลูโลสและสารพวกเจลลาติน ส่วนผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วยมิวโคโพลีแซคคาไรด์และเปปติโดไกลแคน โดยจะมีปริมาณมากในแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งส่วนมากจะมีไทโคอิก แอซิด (teichoic acid) ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับเปปติโด-ไกลแคน ส่วนแบคทีเรียแกรมลบจะมีลิโปโพลีแซคคาไรด์ ไขมัน และโปรตีน เป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์ ซึ่งส่วนประกอบเหล่านี้จะเรียงตัวกันอยู่เหนือชั้นเปปติโดไกลแคน ผนังเซลล์แบคทีเรียจะแสดงไอออนลบกับสภาพแวดล้อมโดยรอบเนื่องจากมีหมู่คาร์บอกซิล หมู่ไฮดรอกซิล หมู่ซัลเฟตและหมู่ฟอสเฟต ซึ่งหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้สามารถเกิดแรงกระทำกับพวกที่ไม่มีประจุในผนังเซลล์และทำหน้าที่เป็นลิแกนด์ เพื่อความสมบูรณ์ของจำนวนเลขโคออดิเนชันของไอออนบวกของโลหะ เช่น อะตอมของไนโตรเจนในพันธะเปปไทด์

2.3 การจับโลหะหนักโดยสารที่แบคทีเรียปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ เกิดขึ้นโดยการผลิตสารเมตาบอไลต์ (metabolite) แล้วจับออกนอกเซลล์เพื่อสร้างสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะหนักทำให้ความเข้มข้นของโลหะหนักในสารละลายลดลงได้ ความหลากหลายของโพลีเมอร์ชีวภาพที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมา มีความสามารถในการจับโลหะได้แตกต่างกัน โพลีเมอร์ชีวภาพได้แก่ โพลีแซคคาไรด์ โปรตีน และ โพลีอินอล รวมทั้งโพลีเมอร์อื่นๆ ที่มีความสัมพันธ์กัน โดยโลหะอาจเกิดแรงกระทำแบบไอออนิกกับประจุลบของ โพลีเมอร์ชีวภาพที่อาจจะทำปฏิกิริยากับโลหะ เช่น หมู่ไฮดรอกซิล (-SH) โดยซัลเฟอร์จะเป็นอะตอมผู้ให้ ความสามารถในการละลายของโพลีเมอร์ชีวภาพจะแปรผันตามน้ำหนักโมเลกุลของโพลีเมอร์ ชนิดของโพลีเมอร์และสภาพแวดล้อม โพลีแซคคาไรด์จะประกอบไปด้วย โมโนเมอร์เบตา 1 – 4 กลูโคสซึ่งเรียกว่า โมโนแซคคาไรด์ซึ่งพบได้ทั้งพืช สัตว์ รวมทั้งจุลินทรีย์

มีความแตกต่างกันที่สำคัญของโพลีแซคคาไรด์ที่ถูกสร้างโดยจุลินทรีย์ คือ แบคทีเรียอาจสร้างโพลีเมอร์ออกมาภายนอกอย่างไม่แน่นอนโดยยึดเหนี่ยวกับผนังเซลล์หรืออาจสร้างชั้นเจลลาติน หรือแคปซูลออกมาล้อมผนังเซลล์ก็ได้ ซึ่งโพลีเมอร์ที่มีสภาพเป็นกรดที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมาเหล่านี้จะมีลักษณะเป็นไฮโดรฟิลลิก และมีซ้ำซึ่งสามารถจับกับโลหะได้ดี โดยทั่วไป โพลีเมอร์เหล่านี้จะประกอบด้วยเพนโตส เฮกโซส เฮปโตส น้ำตาลอะมิโน และกรดเฮกซูโรนิก ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ในการผลิตโพลีเมอร์ขึ้นมา และขับออกนอกเซลล์ของจุลินทรีย์ แต่ละชนิดอาจแตกต่างกันทั้งปริมาณ และโครงสร้างโมเลกุลซึ่งขึ้นกับสภาพการเจริญ ในแบคทีเรียบางชนิดการเพิ่มปริมาณโพลีเมอร์จะขึ้นกับการใช้ไปในการจับโลหะด้วย โพลีเมอร์ไม่เพียงแต่จับไอออนของโลหะหนักเท่านั้น แต่ยังสามารถล้อมรอบ (entrap) อนุภาคโลหะที่ไม่ละลายน้ำด้วย (ทินพันธุ์ เนตรแพร, 2545)

จากการศึกษาของ Lodi และคณะ (1998) ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Sphaerotilus natans* ในการกำจัดโลหะหนักชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แคดเมียม สังกะสี ทองแดง เงิน และโครเมียม พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถกำจัดแคดเมียม สังกะสี ทองแดง เงิน ได้ 81-99% ส่วนโครเมียมกำจัดได้เพียง 60% นอกจากนี้ยังมีการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Sphingomonas paucimobilis* กำจัดแคดเมียมออกจากน้ำเสียเทศบาลกรุงเทพฯ พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีแคดเมียมถึง 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถกำจัดแคดเมียมได้ 84 % (Tangaromsuk , 2002) และจากการศึกษาของ Angela และคณะ (1998) ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Brevibacterium* sp. ในการกำจัดแคดเมียม ทองแดง และตะกั่ว จากผลพบว่าประสิทธิภาพการจับกับโลหะหนักคือ $Cu > Pb > Cd$ ค่าที่ได้คือ $0.54 > 0.36 > 0.14$ ตามลำดับ

Celaya และคณะ (2000) ศึกษาการกำจัดสังกะสีโดยใช้ *Thiobacillus ferrooxidans* พบว่าสามารถกำจัดสังกะสีได้ 81.61 มิลลิกรัมต่อลิตร ในเวลา 30 นาที และจากการศึกษาของ Ruiz-Manriquez และคณะ (1998) ศึกษาการกำจัดทองแดงโดยใช้ *Thiobacillus ferrooxidans* พบว่าสามารถกำจัดทองแดงได้ถึง 119 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังมีการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทนต่อสังกะสี *Brevibacterium* sp.stain HZM-1 ในการกำจัดสังกะสี พบว่าสามารถกำจัดสังกะสีได้ 0.64 มิลลิโมลต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (Taniguchi et al , 2000)



ภาพ 3 แสดงตำแหน่งและกลไกการกำจัดโลหะหนักของแบคทีเรีย

ที่มา : Christopher White et al, 1995

ปัจจัยที่มีผลต่อการกำจัดโลหะหนักของแบคทีเรีย

ปัจจัยที่มีผลต่อการกำจัดโลหะหนักมีหลายด้าน เช่น ลักษณะทางเคมีของไอออนโลหะหนัก ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของเซลล์แบคทีเรีย รวมถึงลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของสิ่งแวดล้อมแวดล้อมต่าง ๆ ประกอบด้วย ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ เวลา ชนิดและความเข้มข้นของโลหะ และการแข่งกับไอออนของโลหะหนักชนิดอื่น เป็นต้น

1. พีเอช (pH)

พีเอชมีผลต่อการกำจัดโลหะหนัก โดยในสภาพเป็นกรดการจับกับโลหะจะถูกจำกัดโดยการเพิ่มขึ้นของโปรตอนที่มาแย่งจับกับ anion binding site (McLean & Beveridge, 1990) และการเพิ่มพีเอช จะทำให้ประจุลบบริเวณผิวหน้าของเซลล์แบคทีเรียเพิ่มขึ้นซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดดีขึ้น ในแบคทีเรียพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดโลหะหนักอยู่ที่พีเอช 4-7 (Blackwell et al, 1995) ในสภาวะพีเอชต่ำกว่า 2 ประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนักจะ มีน้อยมากหรือไม่มี การกำจัดเนื่องจากไฮโดรเจนไอออนแตกตัวและแย่งจับกับไอออนลบที่บริเวณผิวหน้าเซลล์ เมื่อเพิ่มพีเอชให้สูงขึ้นการแย่งจับกับไอออนลบที่ผิวหน้าเซลล์ของไฮโดรเจนไอออนจะลดลงและเป็นการเพิ่ม functional groups ในการจับของโลหะหนัก แต่เมื่อเพิ่มค่าพีเอชจนสูงกว่า 7 จะมีผลทำให้โลหะหนักตกตะกอนในรูปของสารประกอบไฮดรอกไซด์หรือออกไซด์

Taniguchi และคณะ (2000) ใช้ *Brevibacterium* sp. สายพันธุ์ HZM-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสีกำจัดสังกะสี พบว่า *Brevibacterium* sp. สายพันธุ์ HZM-1 กำจัดสังกะสีได้ดีที่สุดที่พีเอช 3 – 7 และที่พีเอชน้อยกว่า 2 *Brevibacterium* sp. จะไม่กำจัดสังกะสี

Gourdon และคณะ (1990) พบว่า ที่พีเอช 6-7 แบคทีเรียแกรมบวกสามารถกำจัดแคดเมียมได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ประมาณ 20 % แสดงว่า glycoprotein และ teichoic acid บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกสามารถจับกับไอออนโลหะหนักได้ดี

Cotoras และคณะ (1992) ใช้ *Azotobacter vinelandii* กำจัด Cu^{2+} , Cd^{2+} , UO_2^{2+} และ Zn^{2+} พบว่า ช่วงพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการกำจัด Cu^{2+} , Cd^{2+} , UO_2^{2+} และ Zn^{2+} คือ 5.4 , 6.0 , 6.5 , และ 6.7 ตามลำดับ

2. อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิมีผลต่อการสะสมโลหะหนักของเมตาบอลิก โดยที่อุณหภูมิต่ำ (0-5°C) โลหะหนักจะถูกแยกออกด้วยกระบวนการเมตาบอลิก อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดโลหะหนักอยู่ที่ 25-35°C (Black et al, 1995) ที่อุณหภูมิ 0-5°C จะมีผลกับการกำจัดโลหะหนักของแบคทีเรียที่ต้องอาศัยพลังงาน ส่วนพวกที่ไม่ต้องอาศัยพลังงานอุณหภูมิจะไม่มีผล

จากการศึกษาของ Tangaromsuk และคณะ (2002) ในการกำจัดแคดเมียมโดยใช้ ซีวมวลของ *Sphingomonas paucimobilis* พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดแคดเมียมไม่ได้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ โดย *Sphingomonas paucimobilis* กำจัดแคดเมียมได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 °C แต่ที่อุณหภูมิ 5 – 70°C *Sphingomonas paucimobilis* ก็ยังสามารถกำจัดแคดเมียมได้

Gourdon และคณะ (1990) ศึกษาการกำจัดแคดเมียมโดยใช้แบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ จาก activated sludge พบว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 5 ไป 40°C การกำจัด

แคดเมียมเพิ่มขึ้นแต่เพิ่มขึ้นไม่มาก แสดงให้เห็นว่าที่ 5°C การกำจัดมีผลมาจากการเมตาบอลิซึม โดยที่ไม่มีการผลิตโปรตีนภายนอกเซลล์ แสดงว่าไม่มี bioactivity ที่อุณหภูมินี้ ส่วนที่ 40°C มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีนภายนอกเซลล์ แสดงว่ามีเมตาบอลิซึมเพิ่มขึ้น

3. ระยะเวลาในการกำจัด

จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะใช้ระยะเวลาในการกำจัดโลหะหนักแต่ละชนิดแตกต่างกัน ระยะเวลาในการกำจัดแคดเมียมโดย *Enterobacter aerogenes* ที่ถูกตรึงบน activated carbon สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ช่วง คือ ช่วงแรกเป็นการกำจัดแคดเมียมโดยไม่อาศัยพลังงานซึ่งเป็นช่วงที่สั้นมากและแปรผันตามความเข้มข้นของแคดเมียม โดยถ้าความเข้มข้นของแคดเมียมสูงจะทำให้ระยะเวลาในการกำจัดสั้นลงเนื่องจากแคดเมียมสามารถจับกับผนังเซลล์ได้อย่างรวดเร็วขึ้น ช่วงที่สองเป็นการกำจัดเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยพลังงานและเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ ซึ่งระยะเวลาในการกำจัดแคดเมียมจนเข้าสู่สมดุลจะแปรผันตามความเข้มข้นของสารละลายแคดเมียม คือ ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตรการกำจัดจะเข้าสู่สมดุลภายใน 120 นาที แต่ถ้าแคดเมียมเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร การกำจัดแคดเมียมจะเข้าสู่สมดุลในเวลา 30 นาที (Scott & Karanjkar, 1992) ส่วนใน *Acinetobacter calcoaceticus* สามารถกำจัดแคดเมียมจนเข้าสู่สมดุลได้ภายใน 2-5 นาที และเมื่อปมไวนานกว่านี้ จะเกิดสมดุลครั้งที่สองขึ้นภายใน 50 ชั่วโมง และปริมาณแคดเมียมเมื่อผ่านสมดุลครั้งที่สองจะมากกว่าสมดุลครั้งแรกถึงสองเท่า (Hsu & Chiang, 1991)

4. ชนิดและความเข้มข้นของโลหะหนัก

จากการศึกษาของ Lodi และคณะ (1998) ในการกำจัดโลหะหนักชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Cd, Zn, Cu, Ag และ Cr โดยใช้ *Sphaerotilus natans* พบว่าชนิดของโลหะหนักมีผลต่อการกำจัดของจุลินทรีย์ โดย *Sphaerotilus natans* กำจัดโลหะหนักได้ตามลำดับ ดังนี้ $Ag > Zn > Cd > Cu > Cr$ และจากการศึกษาการกำจัด Cd, Co, Ni และ Se โดย *Bacillus simplex* Zan-044 ที่พีเอช 6.0 พบว่าการจับกันของโลหะเพิ่มขึ้นอย่างเป็นเส้นตรงโดยมีความสัมพันธ์ของจำนวนประจุบวก คือ $Cd > Ni > Co > Sr$ (Valentine et al, 1996)

จากการศึกษาของ Yasemin และคณะ (2002) ศึกษาการกำจัดปรอท และ แคดเมียมจากสารละลาย โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัดระหว่างอัลจิเนต เซลล์ตรึงรูปและชีวมวลที่ไม่มีชีวิตของ *Phanerochaete chrysosporium* พบว่า ประสิทธิภาพในการกำจัดปรอท และแคดเมียมของชีวมวลที่ไม่มีชีวิต > เซลล์ตรึงรูป > แคดเมียม-อัลจิเนต โดยประสิทธิภาพการกำจัดเพิ่มขึ้นในระยะแรกเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโลหะหนักและเมื่อถึงจุดหนึ่งจะคงที่ เนื่องจากเซลล์ไม่เหลือพื้นที่ในการจับโลหะหนัก

Gourdon และคณะ (1990) พบว่าความเข้มข้นของโลหะหนักมีผลต่อการกำจัด โดยการกำจัดแคดเมียมที่ความเข้มข้นสูงจะมีผลต่อการหายใจของแบคทีเรียใน activated sludge โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคดเมียมจาก 0 เป็น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร การหายใจของแบคทีเรียจะลดลงไป 65 %

5. การแข่งขันกับไอออนโลหะชนิดอื่น

ไอออนของโลหะหนักชนิดอื่นที่เติมเข้าไปทั้งประจุบวกและประจุลบ มีความสำคัญต่อการกำจัดโลหะหนัก เช่น โลหะอัลคาไลต์ (alkali metal) หรือ โลหะอัลคาไลต์เอิร์ท (alkali-earth metal) เช่น Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} มีผลต่อการกำจัดโลหะหนักของจุลินทรีย์ โดยจะไปแย่งจับกับตำแหน่งยึดเหนี่ยวบนผนังเซลล์จุลินทรีย์ การกำจัดโลหะหนักจะลดลงเมื่อเพิ่มการแข่งขันระหว่างโลหะที่มีประจุเหมือนกันในการจับกับ binding site (Black et al , 1995)

Taniguchi และคณะ (2000) ใช้ *Brevibacterium* sp. สายพันธุ์ HZM-1 ในการกำจัดสังกะสี พบว่า Na^+ , K^+ ไม่มีผลต่อการกำจัดสังกะสี แต่ในทางตรงกันข้าม Mg^{2+} , Ca^{2+} มีผลทำให้การกำจัดสังกะสีของ *Brevibacterium* sp. สายพันธุ์ HZM-1 ลดลง

6. ความเข้มข้นของตัวกำจัด

ความเข้มข้นของตัวกำจัดก็มีผลต่อการกำจัดโลหะหนักของจุลินทรีย์ได้เช่นกันจากการศึกษาของ Tangaromsuk และคณะ (2002) กำจัดแคดเมียมโดยใช้ *Sphingomonas paucimobilis* พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวกำจัดจะมีผลทำให้การกำจัดแคดเมียมเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของตัวกำจัดทำให้เพิ่มพื้นที่ในการจับโลหะหนักได้มากขึ้น แต่เมื่อถึงจุดจุดหนึ่งประสิทธิภาพการกำจัดจะลดลงเนื่องจากเซลล์จับตัวกันเป็นกลุ่มทำให้แอกทิฟไซต์ลดลง

การตรึงเซลล์แบคทีเรีย

การตรึงเซลล์ (cell immobilization) หมายถึง การทำให้เซลล์ถูกกักขังหรือยึดไว้ให้อยู่กับวัสดุตัวกลาง วิธีการตรึงเซลล์นั้นอาจแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ประเภทใช้สารช่วยตรึง และประเภทที่ไม่ใช้สาร ช่วยตรึง เซลล์ที่ถูกตรึงอาจจะมีชีวิตหรือตายหลังจากผ่านการตรึง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีการและสารเคมีที่เกี่ยวข้องในการตรึง (ภาวิณี คณาสวัสดิ์ และคณะ , 2537) แบคทีเรียที่ถูกตรึงจะให้ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำที่ปนเปื้อนโลหะหนักได้สูงกว่าแบคทีเรียอิสระ เนื่องจากสามารถควบคุมขนาดของอนุภาคกำจัด (biosorbent) ได้ และเพิ่มประสิทธิภาพในการนำกลับมาใช้ใหม่ สามารถแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากน้ำเสียได้สะดวกขึ้น และลดปัญหาการอุดตันในระบบบำบัดน้ำเสียได้ (Gadd, 1992)

การตรึงเซลล์โดยทั่วไปมีลักษณะที่แตกต่างกัน 6 รูปแบบ คือ Flocculation , Adsorption to surface , Covalent bonding , Cross- linking of cells , Encapsulation in polymer gel และ Entrapment in matrix (Cassidy et al , 1996) การตรึงเซลล์แบบทำให้เซลล์มีชีวิตที่นิยมใช้มากคือการดักจับไว้ในวัสดุ (entrapment) ซึ่งวัสดุที่นิยมนำมาใช้เป็นตัวกลางในการตรึงเซลล์ มี 2 ชนิด คือ โพลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติ (Natural polymers) และโพลิเมอร์สังเคราะห์ (synthetic polymers) สำหรับโพลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติส่วนมากสกัดมาจากโพลีแซคคาไรด์ของสาหร่าย เช่น อาการ์ (agar), อกาโรสเจล (agarose gel), อัลจิเนต (alginate) และคาราจีแนน (carageenan) ส่วนโพลิเมอร์สังเคราะห์ ได้แก่ โพลีอะคริลามิด (polyacrylamide) โพลียูรีเทน (polyurethane) (Kolet ,1981)

การตรึงเซลล์มีหลายวิธีเทคนิคสำคัญของการตรึงเซลล์สำหรับการกำจัดประกอบด้วย การกำจัดบนวัสดุเฉื่อย (adsorption on inert support), การจับบนวัสดุกำจัด (entrapment in polymeric matrix) การตรึงเซลล์ด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bonds to vector compounds) การจับเชื่อม (cross-linking)

1. การกำจัดบนวัสดุเฉื่อย (adsorption on inert support) วัสดุที่จะนำมาใช้ต้องนำไปทำให้ปราศจากเชื้อ ฉีดหัวเชื้อลงไปแล้วปล่อยให้เจริญระยะหนึ่ง หลังจากนั้นจะเกิดฟิล์มของจุลินทรีย์ที่บนผิวหน้าของวัสดุ เทคนิคนี้ถูกนำไปใช้โดย Zhou & Kiff (1991) โดยนำชีวมวลของ *Rhizopus arrhizus* มาตรึงในวัสดุที่เป็นตาข่าย

2. การจับบนวัสดุกำจัด (entrapment in polymeric matrix) โพลิเมอร์ที่ใช้ คือ Ca-alginate, polyacrylamide, polysulfone และ polyethylenimine การตรึงเซลล์โดยใช้ Ca-alginate และ polyacrylamide จะอยู่ในรูปเจล ส่วนการตรึงเซลล์ใน polysulfone และ polyethylenimine อยู่ในรูปที่แข็งกว่า

3. การตรึงเซลล์ด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bonds to vector compounds) ตัวพาที่นิยมใช้คือซิลิกา เจล และวัสดุที่มีลักษณะเป็นเจล เทคนิคนี้ส่วนใหญ่จะใช้ตรึงสาหร่าย (Holan et al , 1993 ., Mah & Holcombe , 1992)

4. การจับเชื่อม (cross-linking) เทคนิคการจับเชื่อมนี้นำมาใช้กับการตรึงสาหร่าย (Holan et al, 1993) ตัวเชื่อมที่นิยมได้แก่ formaldehyde, glutaric dialdehyde, divinylsulfone และ formaldehyde-urea mixture

การศึกษากายของ Thakur และKumar (1999) ศึกษาการใช้เซลล์ตรึงรูปของ *Dunaliella salina* บำบัดไนเตรต, แอมโมเนียม และฟอสฟอรัส โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ หลังจากทำการเพาะเชื้อเป็นเวลา 25 วัน เซลล์ตรึงรูป *Dunaliella salina* เจริญเติบโตได้ดีกว่าเซลล์อิสระ

ร้อยละ 71 ผลการทดลองการกำจัดไนเตรต พบว่าเซลล์ตรึงรูปและเซลล์อิสระสามารถกำจัดได้ร้อยละ 62 และ 44 ตามลำดับ สำหรับการกำจัดแอมโมเนียม เซลล์ตรึงรูปและเซลล์อิสระ สามารถกำจัดได้ร้อยละ 42.2 และ 25 ตามลำดับ การกำจัดฟอสฟอรัสเซลล์ตรึงรูปและเซลล์อิสระ สามารถกำจัดได้ร้อยละ 64.7 และ 34.7 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการกำจัดและบำบัดของเซลล์ตรึงรูปดีกว่าเซลล์อิสระ สำหรับการกำจัดไอออนสารอื่นโดยใช้เซลล์ตรึงรูป

Sawayama และคณะ (1998) ศึกษาการกำจัด ไนเตรต และฟอสฟอรัสไอออนจากน้ำ โดยใช้ *Thermophilic cyanobacterium* ชนิด *Phormidium laminosum* โดยการตรึงรูปบน cullulose hollow fiber ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่เป็นท่อ ทำการศึกษาโดยให้อาหารต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน พบว่า ความเข้มข้นของ NO_3^- และ NO_3^- ลดลงจาก 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 3.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

นอกจากนี้ Feng และคณะ (1997) ศึกษาการใช้ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ M.285 ตรึงรูปบน diatomaceous earth bead ในการกำจัด 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol (TCP) จากน้ำเสียอุตสาหกรรม โดยทดลองเป็น batch test เปรียบเทียบกับ immobilized cell ผลแสดงว่า immobilized *Pseudomonas* Sp. สายพันธุ์ M.285 กำจัด TCP ได้รวดเร็ว และ TCP ถูกกำจัดออกจากน้ำเสียได้ 80 – 100 % และถ้าเพิ่มอาหาร เช่น glucose และ yeast extract จะทำให้ TCP ถูกย่อยสลายได้อย่างช้า ๆ

ข้อดีของการใช้เซลล์ตรึงรูป (immobilized cell) ในการกำจัดโลหะหนัก

1. เซลล์ตรึงรูปมีความคงทน หรือมีเสถียรภาพมากกว่าเซลล์อิสระ
2. สามารถป้องกันเซลล์จากแบคทีริโอฟาจ (bacteriophage) โปรโตซัว หรือสารพิษได้
3. เซลล์ตรึงรูปสามารถทนต่ออัตราการไหลสูง หรือทนต่อการปนเปื้อนได้โดยการสัมผัส กับ สารพิษที่มีความเข้มข้นสูง

4. สามารถใช้เซลล์ตรึงรูปในการบำบัดน้ำเสียได้ในระยะเวลานาน

5. สามารถดำเนินระบบบำบัดได้ด้วยการใช้ชีวมวลที่มีความหนาแน่นสูง

6. ประหยัด เนื่องจากสามารถนำเซลล์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ได้ (David et al, 1997)

ข้อเสียของการใช้เซลล์ตรึงรูป (Immobilized cell) ในการกำจัดโลหะหนัก

1. ก๊าซ และสารละลายแพร่ผ่านได้ยาก

2. ปริมาณออกซิเจนลดลง

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

การวิจัยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียรวมของนิคมอุตสาหกรรม (วิธีการเก็บน้ำเสียแสดงในภาคผนวก ก) มาทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพ ลักษณะทางเคมี และลักษณะทางชีววิทยา และนำตัวอย่างน้ำเสียมาทำการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก 3 ชนิด ได้แก่ แคดเมียม ทองแดง และสังกะสี โดยใช้เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer โดยใช้วิธีการย่อยตัวอย่างน้ำเสียด้วยกรดเปอร์คลอริกและกรดไนตริก (วิธีการย่อยและวิเคราะห์ ตัวอย่างน้ำเสียแสดงในภาคผนวก ก) และตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในห้องปฏิบัติการ

ส่วนที่ 2 แยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำเสีย เพื่อให้ได้แบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนัก ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ แคดเมียม ทองแดง และสังกะสี โดยการหาความเข้มข้นต่ำสุดของโลหะหนักที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Minimal Inhibitory Concentration ; MIC)

ส่วนที่ 3 นำเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักแต่ละชนิดมาศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดโดยเปรียบเทียบระหว่างเซลล์อิสระ (free cell) กับ เซลล์ตรึงรูป (Immobilized cell)

ส่วนที่ 4 จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนักแต่ละชนิด สูงสุด โดยทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมี ร่วมกับการใช้ชุดทดสอบชีวเคมีมาตรฐาน API (Biomerieux)

เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. Atomic Absorption Spectrophotometry บริษัท GBC รุ่น Avanta PM
2. Spectrophotometer บริษัท HACH รุ่น DR /4,000 U
3. เครื่องเขย่าแบบหมุนวน บริษัท NESLAB รุ่น EX – 600
4. pH meter บริษัท Mettler Toledo รุ่น MPC 227
5. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง บริษัท Mettler Toledo รุ่น AG 104
6. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ บริษัท Tomy รุ่น SS- 325
7. ตู้เขี่ยเชื้อ บริษัท Fuster รุ่น Bio-72 M
8. ตู้ป่นเชื้อควบคุมอุณหภูมิ บริษัท Memmert รุ่น BE 600

9. ตู้อบอุณหภูมิสูง บริษัท Sheldon รุ่น SL 1350 FX
10. เครื่องนับจำนวนโคโลนี
11. กล้องจุลทรรศน์
12. ชุดเครื่องกรองแบคทีเรีย
13. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ทดลองต่างๆ เช่น บีกเกอร์ ปิเปต หลอดทดลอง
14. อุปกรณ์สำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เช่น จานเพาะเชื้อ เข็มเขี่ย
15. ชุดทดสอบมาตรฐาน API 20 E บริษัท Biomerieux Vitek
16. ชุดทดสอบมาตรฐาน API 20 NE บริษัท Biomerieux Vitek
17. กระดาษกรอง ขนาด 45 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Whatman
18. ขวดพลาสติก 1 ลิตร สำหรับเก็บน้ำตัวอย่าง

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

1. สารละลายมาตรฐานสังกะสี ($ZnSO_4$)
2. สารละลายมาตรฐานแคดเมียม ($CdCl_2$)
3. สารละลายมาตรฐานทองแดง ($CuSO_4$)
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) ยี่ห้อ Merck
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) ยี่ห้อ Merck
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) ยี่ห้อ Merck
7. ชุดทดสอบทางชีวเคมีมาตรฐาน API 20 E บริษัท Biomerieux Vitek
8. ชุดทดสอบมาตรฐาน API 20 NE บริษัท Biomerieux Vitek
9. Alginic acid(Merck)
10. แคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$) (Ajax Chemicals)
11. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) (Fisher chemical)
12. ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (Ajax Chemicals)
13. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Merck)
14. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (Merck)
15. กรดไนตริก (HNO_3) (Merck)
16. กรดเปอร์คลอริก ($HClO_4$) (Merck)
17. ชุดทดสอบทางชีวเคมีมาตรฐาน API 20E และ API 20NE (Biomerieux)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างน้ำเสียเพื่อวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก

1.1 การเก็บตัวอย่างน้ำเสียเพื่อวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก Cadmium (Cd), Copper (Cu), Zinc (Zn) จากบ่อบำบัดน้ำเสียที่ 1 ของระบบบำบัดน้ำเสียรวมนิคมอุตสาหกรรม

1.1.1 นำขวดพลาสติก (Polyethylene) ขนาดบรรจุ 1 ลิตร ทำความสะอาดตามขั้นตอนดังนี้ ล้างขวดเก็บตัวอย่างด้วยสารซักฟอก ล้างสารซักฟอกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นล้างด้วยกรดไนตริก (HNO_3) ความเข้มข้น (1:1) ล้างด้วยน้ำกลั่น และล้างด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น (1:1) และล้างครั้งสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้ง

1.1.2 นำถึงน้ำเก็บน้ำเสียจากบ่อบำบัดและใช้ขวดพลาสติกมีฝาปิดแบบเกลียวเก็บจากถังเก็บน้ำ

1.1.3 ทำการเก็บรักษาสภาพน้ำทิ้ง โดยเติม conc. HNO_3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หรือทำให้น้ำตัวอย่างมีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 2 เพื่อป้องกันการดูดซับของโลหะบนผิวภาชนะที่ใช้เก็บตัวอย่างน้ำเสีย

1.2 การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

1.2.1 เติมน้ำตัวอย่างที่ทำกรเก็บโดยไม่ได้ทำการคงสภาพน้ำด้วยกรดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมน้ำในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร

1.2.2 ทำการ calibration เครื่องวัดด้วยสารละลายมาตรฐาน pH 4, 7 และ 10

1.2.3 วัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัด pH meter โดยการจุ่มหัววัดลงในน้ำตัวอย่างเครื่องอ่านค่าจนคงที่ แล้วบันทึกผล

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก

การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักทั้งหมดของ แคดเมียม (Cd) ทองแดง (Cu) และสังกะสี (Zn) โดยวิธีย่อยตัวอย่างน้ำเสียด้วยกรดเปอร์คลอริก-กรดไนตริก (HClO_4 - HNO_3) (คณะกรรมการวิชาการสาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม, 2545)

1.3.1 นำน้ำตัวอย่างจากการเก็บตัวอย่างน้ำ ตัวอย่างละ 100 มิลลิลิตร จำนวนทั้งหมด 4 ขวด จากนั้นผสมให้เข้ากันตวงตัวอย่างน้ำที่ผสมแล้วมา 100 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับตัวอย่างน้ำให้เป็นกรดโดยให้ค่าความเป็นกรด-ด่างน้อยกว่า 2

1.3.2 เติม conc. HNO_3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมลูกแก้ว 2-3 ลูก

1.3.3 นำไประเหยบนเตาร้อนจนเหลือปริมาณ 15-20 มิลลิลิตรทิ้งให้เย็น

1.3.4 เติม 10 มิลลิลิตร ของ conc. HNO_3 ปริมาตร และ conc. HClO_4 ปริมาตร ผสม(4:1)

1.3.5 นำไประเหยต่อบนเตาจนเกิดควันสีขาวของ HClO_4 ต้มจนกระทั่งสารละลายใส ถ้าไม่ใสเติม conc. HNO_3 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต้มต่อจนใส

1.3.6 ทิ้งให้เย็น และเจือจางจนได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วต้มให้เดือดเพื่อไล่คลอรีน กรองสารละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรนำไปวัดด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS)

2. การเก็บตัวอย่างน้ำเสียเพื่อวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

1. เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อเติมอากาศที่ 1 ของระบบบำบัดน้ำเสียรวมนิคมอุตสาหกรรม โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.1 นำถังใส่น้ำตักน้ำเสียจากบ่อบำบัดและใช้ขวดพลาสติกมีฝาปิดแบบเกลียวเก็บน้ำจากถังเก็บลงในขวดพลาสติกโดยไม่ใส่น้ำเต็มขวดเพื่อให้มีอากาศสำหรับจุลินทรีย์ในน้ำ

1.2 เก็บขวดตัวอย่างน้ำลงในกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งเพื่อรักษาสภาพตัวอย่างน้ำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการวิเคราะห์ทันทีเพื่อหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Totals - bacteria) และคัดแยกแบคทีเรีย

2. การนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และคัดแยกแบคทีเรีย (Dilution Spread Plate)

2.1 นำตัวอย่างน้ำเสียมาทำเป็นเซลล์แขวนลอย (suspension) ในสารละลาย 0.85% NaCl โดยทำการเจือจาง (dilution) ที่ 10^{-1} - 10^{-4} นำ suspension แต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดบนจานอาหารที่มีอาหาร nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ข) และใช้แท่งแก้วที่ปราศจากเชื้อเกลี่ย (Spread) ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำเสีย CFU ต่อ มิลลิลิตร (colony forming unit/mL)

2.2 คัดแยกแบคทีเรียจากน้ำเสียโดยนำตัวอย่างน้ำเสียมาทำเป็นเซลล์แขวนลอย (suspension) ในสารละลาย 0.85% NaCl ทำการเจือจาง (dilution) ที่ 10^{-1} - 10^{-4} โดยนำ suspension แต่ละความเจือจาง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อผสมโลหะหนัก ได้แก่ แคดเมียม, ทองแดง, และสังกะสี ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ข) และใช้แท่งแก้วที่ปราศจากเชื้อเกลี่ย (Spread) ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนัก และนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ทนต่อโลหะหนัก และคัดเลือกแบคทีเรียจากเชื้อที่เจริญบนอาหารผสมโลหะหนักที่มีจำนวนโคโลนีขึ้นระหว่าง 30-300 โคโลนี คัดเลือกโคโลนีที่สมบูรณ์เพื่อนำไปแยกเชื้อบริสุทธิ์

3. การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย (streak plate method)

3.1 คัดเลือกแบคทีเรียจากเชื้อที่เจริญบนอาหารผสมโลหะหนัก และใช้ห้วงเชี่ยเชื้อตักเชื้อจากจานเพาะเชื้อมาแตะที่ผิวจานอาหารเลี้ยงเชื้อลากห้วงเชี่ยเชื้อบนผิวอาหารจานไปมา

3.2 เมาห้วงเชี่ยเชื้อให้แดงทิ้งให้เย็นในอากาศลากลดเชี่ยเชื้อ ครั้งที่ 2 โดยลากลดเชี่ยเชื้อผ่านเชื้อที่แตะไว้ครั้งแรกลากไปมาบนผิววุ้น ทำเช่นเดียวกันในครั้งที่ 3 และที่ 4

3.3 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อเจริญได้เป็นโคโลนีเดี่ยว (24- 48 ชั่วโมง) ทำซ้ำจนกว่าจะได้โคโลนีที่มีขนาดเท่ากันและลักษณะเหมือนกัน

3.4 ถ่ายเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวที่ได้ลงบนหลอดอาหารเอียง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บแบคทีเรียที่ได้ไปทดลองขั้นต่อไป

3.5 เก็บรักษาแบคทีเรียด้วยวิธี subculture คือ ทำการเปลี่ยนถ่ายเชื้อลงบนหลอดอาหารเอียงใหม่โดยถ่ายเชื้อทุกๆ 1 เดือน และเก็บรักษาแบคทีเรียในตู้ทำความเย็น

4. การคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทนและสามารถเจริญในน้ำเสียที่มีโลหะหนักปนเปื้อน

1. เตรียม stock solution ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ของโลหะหนัก 3 ชนิด คือ แคดเมียม ($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$) สังกะสี ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) และทองแดง ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (ภาคผนวก ก)

2. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) ที่มีสารละลายแคดเมียมผสมที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ข.) ปรับ pH เป็น 6.0 ด้วย NaOH 1.0 N หรือ HCl 1.0 N นำไปทำให้ปราศจากเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ทิ้งไว้จนอุณหภูมิถึงประมาณ 40 องศาเซลเซียส เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ

3. เตรียมชุดเจือจางของตัวอย่างน้ำเสียที่เก็บจากระบบบำบัดน้ำเสียรวมของนิคมอุตสาหกรรม โดยนำตัวอย่างน้ำเสียมาทำเป็นสารแขวนลอย (suspension) ในสารละลาย 0.85% NaCl ทำการเจือจางด้วยวิธี Dilution plate count ที่ความเจือจาง 10^{-1} - 10^{-6}

4. นำชุดเจือจางของตัวอย่างน้ำเสียจากข้อ 3.3 ที่ความเจือจาง 10^{-2} - 10^{-6} (ความเจือจางที่ 10^{-1} เข้มข้นมากเกินไป ไม่สามารถนับจำนวนโคโลนีได้) มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.2 ความเจือจางละ 3 จาน และจานควบคุมซึ่งเป็นอาหาร Tryptic soy agar (TSA) ที่ไม่มีสารละลายแคดเมียมผสม ทำที่ความเจือจาง 10^{-2} - 10^{-6} ความเจือจางละ 3 จาน เช่นเดียวกัน

5. บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนเกิดเป็นโคโลนีเดี่ยว นับจำนวนโคโลนีเดี่ยวที่ขึ้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อของชุดตัวอย่างและชุดควบคุม

6. นำเชื้อที่มีโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันถ่ายลงในอาหารเอียง (NA- slant) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง เก็บเชื้อที่ได้ไว้ในตู้เย็นเพื่อนำไปทดลองต่อไป

7. สำหรับสังกะสีและทองแดง ทำเช่นเดียวกับแคดเมียมตั้งแต่ข้อ 1 - 6

5. การหาความเข้มข้นต่ำสุดของโลหะหนักที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration ; MIC)

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) ที่มีสารละลายแคดเมียมผสมที่ความเข้มข้น 0 – 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก)

2. นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้อ 3. มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) โดยใช้วิธี Steak plate technique บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ 180 รอบ/นาที ทิ้งไว้ข้ามคืน

3. นำเชื้อที่เจริญใน Nutrient broth (NB) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 4.1 โดยใช้วิธี drop plate technique โดยหยดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบ่งออกเป็น 9 ช่องๆ ละ 1 ไอโซเลต บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อบนจานอาหารด้วยตาเปล่า ความเข้มข้นโลหะหนักที่แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของโลหะหนักที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

4. ตรวจสอบการเจริญของเชื้อเพื่อหาค่า MIC

5. สำหรับสังกะสีและทองแดง ทำเช่นเดียวกับแคดเมียมตั้งแต่ข้อ 1- 4

6. การศึกษาความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญของแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

1. คัดเลือกแบคทีเรียที่มีอัตราการเจริญสูงสุดจำนวน 3 ไอโซเลต โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่ทนและสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายแคดเมียมผสมตั้งแต่ 700 มิลลิกรัม/ลิตร มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) ที่มีสารละลายแคดเมียมผสมที่ความเข้มข้น 0 , 25 , 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 180 รอบต่อนาที บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อวัดอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยวัดจากค่า optical density (OD 600 นาโนเมตร) ด้วย Spectrophotometer เปรียบเทียบอัตราการเจริญกับเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีโลหะหนักผสม (ชุดควบคุม) โดยคิดเป็นร้อยละจากชุดควบคุม

2. ศึกษารูปแบบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่มีอัตราการเจริญสูงสุด 3 ไอโซเลต ในรูปของ Growth curve โดยนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) ที่มีสารละลายแคดเมียมที่ความเข้มข้น 0, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร วัดอัตราการเจริญจากค่า optical density (OD 600 นาโนเมตร) ด้วย Spectrophotometer

3. นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) ที่มีสารละลายแคดเมียมที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร ปรับ pH เป็น 6.0 ด้วย NaOH 1.0 N หรือ HCl 1.0 N บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำ 3 ซ้ำ

4. เก็บเซลล์โดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

5. นำสารละลายส่วนใส (supernatant) ไปย่อยด้วยกรดเปอร์คลอริก-ไนตริก และวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียม โดยใช้ Atomic Absorption Spectrophotometry

6. เลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแคดเมียมสูงสุด 1 ไอโซเลต

7. สำหรับสังกะสีและทองแดง คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ทนและสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายทองแดงและสังกะสีผสมตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำเช่นเดียวกับแคดเมียม ตั้งแต่ข้อ 1 - 6

7. การศึกษาผลของพีเอช และความเข้มข้นของโลหะหนักที่มีผลต่อการกำจัดโลหะหนักของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทนต่อโลหะหนัก

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) ที่มีสารละลายแคดเมียมผสมที่มีความเข้มข้น 25, 50, 75, 100 มิลลิกรัม/ลิตร ปรับพีเอชเป็น 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 โดยใช้ NaOH 1.0 N ปรับค่าพีเอชเมื่อต้องการให้เป็นเบส และใช้ HCl 1.0 N ปรับค่าพีเอชเมื่อต้องการให้เป็นกรด

2. นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 1 บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำ 3 ซ้ำ

3. เก็บเซลล์โดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

4. นำสารละลายส่วนใส (supernatant) ไปย่อยด้วยกรดเปอร์คลอริก-ไนตริก และวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียม โดยใช้ Atomic Absorption Spectrophotometer

5. สำหรับสังกะสีและทองแดง ทำเช่นเดียวกับแคดเมียม ตั้งแต่ข้อ 1 - 4

8. การศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนักโดยเปรียบเทียบระหว่างเซลล์อิสระ (free cell) กับเซลล์ตรึงรูป (Immobilized cell)

1. ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ตรึงรูป (Immobilized cell)

1.1 เตรียม alginate solution 2 % โดยชั่ง alginate 2 กรัม ใส่ลงใน flask เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 เตรียม 0.1 M CaCl_2 โดยชั่ง CaCl_2 14.7025 กรัม ใส่ลงใน flask เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.3 นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 5 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) เวลาตามข้อ 5.2 (ช่วง early stationary phase ที่ให้จำนวนเซลล์ (CFU/ml) เท่ากัน)

1.4 ผสม alginate solution 2 % กับ เซลล์ที่ได้จากข้อ 5.1.3 ในอัตราส่วน 1:1

1.5 เตรียมเซลล์ที่ถูกตรึงด้วย alginate ในรูปของ Na-alginate bead โดยหยด cell - alginate acid suspended ลงในสารละลาย CaCl_2 ให้ได้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ alginate bead 0.30 เซนติเมตร คนสารละลายเบาๆ ด้วย magnetic stirrer ทิ้งไว้ 30 นาทีให้เม็ดเซลล์ตรึงแข็งตัว ล้างเม็ดเซลล์ตรึงที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ก่อนนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

2. ขั้นตอนการเตรียมเชื้อแบคทีเรียในรูปเซลล์อิสระ

2.1 นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 5 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) เวลาตามที่ได้จากรูปแบบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในข้อ 5.2 ที่ช่วง early stationary phase ที่ให้จำนวนเซลล์ (CFU/ml) เท่ากัน ทำ 3 ซ้ำ

3. นำเชื้อที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระ (free cell) และเซลล์ที่ถูกตรึงในรูปของ alginate - cell bead (immobilized cell) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (NB) ที่มีสารละลายแคดเมียมตามความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 6 (ความเข้มข้นแคดเมียมที่แบคทีเรียกำจัดดีที่สุด) พิเศษตามที่ได้จากข้อ 4 (เพื่อชื้อที่แบคทีเรียกำจัดแคดเมียมดีที่สุด) เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 180 รอบ/นาที

4. เก็บเซลล์โดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ที่ระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

5. นำสารละลายส่วนใส (supernatant) ไปย่อยด้วยกรดเปอร์คลอริก-ไนตริก และวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียม โดยใช้ Atomic Absorption Spectrophotometer

6. สำหรับสังกะสีและทองแดง ทำเช่นเดียวกับแคดเมียม ตั้งแต่ข้อ 1 – 5

9. การศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำทิ้งที่มีโลหะหนักปนเปื้อนโดยใช้ระบบบำบัดจำลองแบบ Immobilized cell reactor

การศึกษาประสิทธิภาพของการบำบัดโลหะหนักในน้ำทิ้งทำโดยใช้ immobilized cell ในระบบบำบัดจำลองแบบ immobilized cell reactor ซึ่งมีขนาดความจุประมาณ 1 ลิตร โดยอุปกรณ์ reactor ทำจากแก้วเป็นรูปทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.0 เซนติเมตร ยาว 50 เซนติเมตร โดยมีช่องน้ำเสียเข้าจากด้านล่างแบบ fluidized bed reactor โดยใช้ peristaltic pump ด้วยอัตรา 2 ลิตร/ชั่วโมง และมี circulate pump ทำหน้าที่หมุนเวียนน้ำในระบบเพื่อรักษาอัตราการไหลของน้ำที่

ผ่านการบำบัดแล้วออกจากระบบ น้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วจะล้นออกด้านบนผ่านสายยางสู่ถังเก็บน้ำดี (ภาพ 4) เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักต่างๆ โดยใช้ Atomic Absorption Spectrophotometer



ภาพ 4 แสดงระบบบำบัดจำลองแบบ immobilized cell reactor

10. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนัก

1. ตรวจสอบเอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

1.1 ตรวจสอบเอกลักษณ์ทางกายภาพของแบคทีเรีย ได้แก่ การติดสีย้อมแกรมแบคทีเรีย (Gram stain reaction) การเคลื่อนที่ (motility) เพื่อศึกษารูปร่างและจัดแบ่งกลุ่ม

1.2 ตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้น ได้แก่ ทดสอบ Oxidation/ Fermentation (OF) basal medium (1% glucose) เพื่อวิเคราะห์การใช้กลูโคส Oxidation/ Fermentation ,การทดสอบ เอนไซม์ oxidase ,และการทดสอบเอนไซม์ catalase

2. การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมีมาตรฐาน API-20E (Biomerieux) และ API-20NE (Biomerieux) เลือกชุดทดสอบที่เหมาะสม โดยทดสอบการติดสี ย้อมแกรม การเคลื่อนที่ ทดสอบเอนไซม์ oxidase และทดสอบ OF-test

2.1 ชุดทดสอบ API-20E

2.1.1 เชื้อเชื้อลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร nutrient agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดียวที่ได้ไปทำ suspension ในสารละลาย 0.85% NaCl ปรับความขุ่นที่ได้จากการเติมเชื้อลงในสารละลายจนเทียบความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard ทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

2.1.2 เตรียมชุดทดสอบ API ซึ่งมี cupule ของการทดสอบทางชีวเคมี จำนวน 20 การทดสอบ จากนั้นนำ 0.85% NaCl suspension ที่เตรียมไว้เติมเติมลงใน cupule ของการทดสอบ [CIT], [VP], [GEL] เติม 0.85% NaCl suspension จนเต็ม ส่วนที่เหลือเติมให้พอดี cupule ยกเว้น cupule ของการทดสอบ ADH, LDC, ODC, H₂S, URE เติม mineral oil ที่ฆ่าเชื้อแล้วจนสูงจาก cupule จากนั้นจึงปิดฝาชุดทดสอบ และเก็บไว้ในกล่องพลาสติกที่รองที่ก้นกล่องด้วยกระดาษทิชชูพรมน้ำพอหมาดๆ เพื่อกันไม่ให้เชื้อที่ทดสอบระเหยจนแห้งจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.1.3 อ่านผลการทดสอบ หลังจากบ่มที่เวลา 24 ชั่วโมงหากผลที่ได้ให้ผลเป็นบวกมากกว่า 3 การทดสอบสามารถอ่านผลได้ หากผลที่เป็นบวกลดกว่า 3 การทดสอบรวมทั้งการทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคส ให้บ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง

2.1.4 นำผลการทดสอบทั้งหมดที่ได้นำไปจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยบันทึกลงโปรแกรม API-20E Version 4.0 หรือจำแนกตามข้อมูล Analytical Profile Index

2.2 ชุดทดสอบ API-20NE

2.2.1 เชื้อเชื้อลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดียวที่ได้ทำ suspension ในสารละลาย 0.85% NaCl ที่ฆ่าเชื้อปรับความขุ่นที่ได้จากการเติมเชื้อลงในสารละลายจนเทียบความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard

2.2.2 นำ 0.85% NaCl suspension ที่เตรียมไว้ปริมาณ 200 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดอาหาร AUX medium

2.2.3 นำ suspension ที่เตรียมไว้ไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย

2.2.4 นำ 0.85% NaCl suspension ของเชื้อเต็มลงใน cupule ให้พอดี ขอบล่างของ cupule เพื่อทดสอบ NO_3 , TRP, GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG สำหรับ GLU, ADH, URE เติมน้ำมัน mineral oil ที่ฆ่าเชื้อลงใน cupule

2.2.5 นำ AUX medium suspension ของเชื้อเต็มจนเต็มพอดีกับขอบบนของ cupule เพื่อทดสอบ assimilation ได้แก่ [GLU], [ARA], [MNE], [MAN], [NAG], [GNT], [CAP], [ADI], [MLT], [CIT], [PAC]

2.2.6 ทดสอบการผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (OX) โดยทำการทดสอบเพิ่มเติม นอกเหนือจากชุดทดสอบ

2.2.7 อ่านผลการทดสอบตามตารางที่ 4 หลังจากบ่มเชื้อที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยดู ความขุ่นที่เกิดจากการทดสอบ assimilation ให้ผลเป็นบวกเมื่อเกิดความขุ่น และให้ผลเป็นลบเมื่อ ไม่เกิดความขุ่น และอ่านผลการทดสอบทางชีวเคมี (Conventional test) โดยดูการเกิดกิจกรรม ของแบคทีเรียกับสับสเตรตที่ใช้ในแต่ละการทดสอบ ได้แก่ NO_3 , TRP, GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG

2.2.8 นำผลการทดสอบทั้งหมดที่ได้ไปตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียโดยบันทึกลงใน โปรแกรม API-20NE Version 6.0 หรือจำแนกตามข้อมูล Analytical Profile Index

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนักของเซลล์อิสระ (free cell) และเซลล์ตรึงรูป (Immobilized cell) ให้ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean, x)
2. ปริมาณโลหะหนักที่ลดลงในการกำจัดด้วยเซลล์อิสระ (free cell) และเซลล์ตรึงรูป (immobilized cell) ในอัตราส่วนร้อยละ (percentage)
3. วิเคราะห์ข้อมูลปริมาณโลหะหนักที่ลดลงในการกำจัดด้วยเซลล์อิสระ (free cell) และ เซลล์ตรึงรูป (immobilized cell) โดยใช้ Analysis of variance (ANOVA) โดยวิธีของ Duncan's Multiple Range Test

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักและจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างน้ำเสียของ
นิคมอุตสาหกรรม

จากการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก 3 ชนิด ได้แก่ แคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ในตัวอย่างน้ำทิ้งที่เก็บจากบ่อบำบัดน้ำเสียรวมของนิคมอุตสาหกรรม โดยวิธีการย่อยสลายด้วยกรดเปอร์คลอริก-กรดไนตริก แล้วทำการวัดปริมาณโลหะหนักในน้ำทิ้งโดยใช้เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer พบว่า มีปริมาณทองแดง และสังกะสี เท่ากับ 0.409 และ 0.962 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนแคดเมียมตรวจไม่พบ และตัวอย่างน้ำมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 แสดงปริมาณโลหะหนักที่ตรวจวัดได้จากตัวอย่างน้ำทิ้งที่เก็บจากบ่อบำบัดน้ำเสียของนิคมอุตสาหกรรม

ชนิดโลหะหนัก	ปริมาณโลหะหนัก (mg/l)
แคดเมียม	ND*
ทองแดง	0.409
สังกะสี	0.962

หมายเหตุ : * หมายถึง ตรวจไม่พบ

จากการศึกษาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างน้ำเสียโดยวิธี Total plate count พบว่าในตัวอย่างน้ำเสียมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด เท่ากับ 2.00×10^5 CFUต่อมิลลิลิตร และเมื่อศึกษาจำนวนแบคทีเรียที่สามารถเจริญในอาหารที่มีโลหะหนักที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีโลหะหนักที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแคดเมียม , ทองแดง และ สังกะสี เท่ากับ 2.33×10^4 , 3.00×10^4 และ 8.33×10^4 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยคิดเป็นร้อยละ 11.65% , 15.00% และ 41.65 % ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 แสดงจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิดโลหะหนัก	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml)		ร้อยละ (%)
	Control	โลหะหนัก 100 mg/l	
แคดเมียม	2.00×10^5	2.33×10^4	11.65
ทองแดง	2.00×10^5	3.00×10^4	15.00
สังกะสี	2.00×10^5	8.33×10^4	41.65

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทนและสามารถเจริญในน้ำเสียของนิคมอุตสาหกรรม

จากการคัดแยกแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักในน้ำเสียของนิคมอุตสาหกรรมโดยการนำตัวอย่างน้ำเสียไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโลหะหนักผสมที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวิธี spread plate บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด คือ แคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ที่คัดแยกได้มีทั้งหมด 102 ไอโซเลต โดยแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียม ทองแดง และสังกะสีมีจำนวน 39, 21 และ 42 ไอโซเลต ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 แสดงจำนวนไอโซเลตแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีโลหะหนักที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร

ชนิดโลหะหนัก	จำนวนไอโซเลต
แคดเมียม	39
ทองแดง	21
สังกะสี	42
รวม	102

เมื่อศึกษาจำนวนแบคทีเรียที่สามารถเจริญในอาหารที่มีโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 100 , 200 , 300 , 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า จำนวนแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของโลหะหนักสูงขึ้นจะมีจำนวนน้อยลงจากจำนวนแบคทีเรียโดยรวมทั้งหมด โดย

แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารที่มีแคดเมียมความเข้มข้น 100 , 200 , 300 , 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 2.33×10^4 , 1.45×10^4 , 3.33×10^3 , 2.00×10^3 และ 1.88×10^3 CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หรือคิดเป็นร้อยละ 11.65 % , 7.25% , 1.67% , 1.00% และ 0.94% ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ดังแสดงในตาราง 4

แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารที่มีทองแดงความเข้มข้น 100 , 200 , 300 , 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 3.00×10^4 , 2.33×10^4 , 9.00×10^3 , 7.50×10^3 และ 2.33×10^3 CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยคิดเป็นร้อยละ 15.00 % , 11.65 % , 4.50% , 3.75% และ 1.17% ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ดังแสดงในตาราง 5

แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารที่มีสังกะสีความเข้มข้น 100 , 200 , 300 , 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 8.33×10^4 , 1.84×10^4 , 6.67×10^3 , 5.30×10^3 และ 3.30×10^3 CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยคิดเป็นร้อยละ 41.65% , 9.20% , 3.34% , 2.65% และ 1.65% ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ดังแสดงในตาราง 6

ตาราง 4 แสดงจำนวนแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแคดเมียมที่ความเข้มข้น 100-500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชนิดโลหะหนัก	ความเข้มข้น โลหะหนัก(mg/l)	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml)		ร้อยละ(%)
		control	โลหะหนัก	
แคดเมียม	100	2.00×10^5	2.33×10^4	11.65
	200	2.00×10^5	1.45×10^4	7.25
	300	2.00×10^5	3.33×10^3	1.67
	400	2.00×10^5	2.00×10^3	1.00
	500	2.00×10^5	1.88×10^3	0.94

ตาราง 5 แสดงจำนวนแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีทองแดงที่ความเข้มข้น
100-500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชนิดโลหะหนัก	ความเข้มข้นโลหะหนัก(mg/l)	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml)		ร้อยละ (%)
		control	โลหะหนัก	
ทองแดง	100	2.00×10^5	3.00×10^4	15.00
	200	2.00×10^5	2.33×10^4	11.65
	300	2.00×10^5	9.00×10^3	4.50
	400	2.00×10^5	7.50×10^3	3.75
	500	2.00×10^5	2.33×10^3	1.17

ตาราง 6 แสดงจำนวนแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสังกะสีที่ความเข้มข้น
100-500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชนิดโลหะหนัก	ความเข้มข้นโลหะหนัก(mg/l)	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml)		ร้อยละ (%)
		control	โลหะหนัก	
สังกะสี	100	2.00×10^5	8.33×10^4	41.65
	200	2.00×10^5	1.84×10^4	9.20
	300	2.00×10^5	6.67×10^3	3.34
	400	2.00×10^5	5.30×10^3	2.65
	500	2.00×10^5	3.30×10^3	1.65

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของโลหะหนักที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration ; MIC)

จากการคัดแยกแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนัก พบว่ามีแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักทั้งหมด 102 ไอโซเลต เมื่อนำแบคทีเรียที่ได้มาศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของโลหะหนักที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยนำแบคทีเรียไปทดสอบความทนต่อโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้น 200 – 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลจากการคัดแยกแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียม มีจำนวน 39 ไอโซเลต เมื่อนำไปทดสอบความทนต่อแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 200 – 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมที่ระดับ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 1 ไอโซเลต คือ Cd-11 ที่ระดับความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 1 ไอโซเลต คือ Cd-13 ที่ระดับความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 3 ไอโซเลต คือ Cd-17 , Cd- 22 และ Cd -23 ที่ระดับความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 5 ไอโซเลต คือ Cd-1 , Cd-14 , Cd-30 , Cd-37 และ Cd-38 ที่ระดับความเข้มข้น 600 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 14 ไอโซเลต คือ Cd-3 , Cd-5 , Cd-6 , Cd-9, Cd-15, Cd-16 , Cd-18 , Cd-19 , Cd-20 , Cd-21 , Cd-25 ,Cd-26 , Cd-27 และ Cd-28, ที่ระดับความเข้มข้น 700 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 12 ไอโซเลต คือ Cd-2 , Cd-4 , Cd-7 , Cd-8 , Cd-10 , Cd-12 , Cd-24 , Cd-29 , Cd-31 , Cd-32 , Cd-33 และ Cd-36 ที่ระดับความเข้มข้น 800 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 1 ไอโซเลต คือ Cd-34 ที่ระดับความเข้มข้น 900 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 1 ไอโซเลต คือ Cd-39 และที่มากกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 1 ไอโซเลต คือ Cd-35 จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถทนต่อแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้นสูง แต่จะทนได้น้อยลงเมื่อความเข้มข้นแคดเมียมสูงกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียที่สามารถทนต่อแคดเมียมส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 600-700 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในตาราง 7

ผลจากการคัดแยกแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดง มีจำนวน 21 ไอโซเลต เมื่อนำไปทดสอบความทนต่อทองแดงที่ระดับความเข้มข้น 200 – 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงที่ระดับความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 3 ไอโซเลต คือ Cu-22 , Cu-23 , Cu-24 , ที่ระดับความเข้มข้น 700 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 1 ไอโซเลต คือ Cu-20 , ที่ระดับความเข้มข้น 900 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 1 ไอโซเลต คือ Cu-5 , ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 1 ไอโซเลต คือ Cu-21 และที่ระดับมากกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 15 ไอโซเลต คือ Cu-1, Cu-2,Cu-3, Cu-4, Cu-6, Cu-7, Cu-8, Cu-9, Cu-10, Cu-11, Cu-12, Cu-16, Cu-17, Cu-18 และ Cu-19 จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสามารถ

ทนต่อทองแดงในระดับความเข้มข้นสูงได้และที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียยังสามารถทนต่อทองแดงได้ ดังแสดงในตาราง 8

ผลจากการคัดแยกแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสี มีจำนวน 42 ไอโซเลต เมื่อนำไปทดสอบความทนต่อสังกะสีที่ระดับความเข้มข้น 200 – 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสีที่ระดับ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 6 ไอโซเลต คือ Zn-1, Zn-2, Zn-5, Zn-8, Zn-13, Zn-39 ที่ระดับความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 2 ไอโซเลต คือ Zn-19, Zn-24 ที่ระดับความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 2 ไอโซเลต คือ Zn-7, Zn -10 ที่ระดับความเข้มข้น 600 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 2 ไอโซเลต คือ Zn-31, Zn-42 ที่ระดับ 700 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 3 ไอโซเลต คือ Zn-3, Zn-4, Zn-12 ที่ระดับความเข้มข้น 800 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 8 ไอโซเลต คือ Zn-9, Zn-15, Zn-17, Zn-20, Zn-23, Zn-26, Zn-27, Zn-28 ที่ระดับความเข้มข้น 900 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 2 ไอโซเลต คือ Zn-37, Zn-38 ที่ระดับ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 1 ไอโซเลต คือ Zn-33 และที่ระดับมากกว่า 1, 000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 16 ไอโซเลต คือ Zn-6, Zn-11, Zn-14, Zn-16, Zn-18, Zn-21, Zn-22, Zn-25, Zn-29, Zn-30, Zn-32, Zn-34, Zn-35, Zn-36 , Zn-40 และ Zn-41 จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสามารถทนต่อสังกะสีระดับความเข้มข้นสูงได้เช่นเดียวกับแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดง ดังแสดงในตาราง 9

จากการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของโลหะหนักที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนทั้งหมด 32 ไอโซเลต โดยแบ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถทนต่อแคดเมียมที่ระดับสูงกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ Cd-35 แบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงได้ที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 15 ไอโซเลต ได้แก่ Cu-1, Cu-2, Cu-3, Cu-4, Cu-6, Cu-7, Cu-8, Cu-9, Cu-10, Cu-11, Cu-12, Cu-16, Cu-17, Cu-18 และ Cu-19 และแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสีได้ที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 16 ไอโซเลต ได้แก่ Zn-6, Zn-11, Zn-14, Zn-16, Zn-18, Zn-21, Zn-22, Zn-25, Zn-29, Zn-30, Zn-32, Zn-34, Zn-35, Zn-36, Zn-40 และ Zn-41 ดังแสดงในภาพ 5

แบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จะนำไปศึกษาความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญของแบคทีเรียกับความเข้มข้นโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้น 0, 25 , 50 , 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ยกเว้นแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียม ใช้ที่ทนตั้งแต่ 700 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป)

ตาราง 7 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียมที่แบคทีเรียสามารถเจริญได้ (MIC)

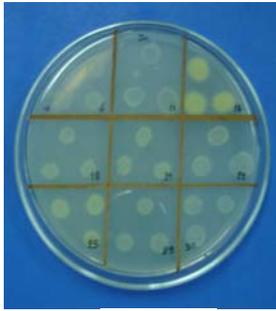
ไอโซเลต	จำนวน ไอโซเลต	MIC (Mg/l)
Cd-11	1	200
Cd-13	1	300
Cd-17, Cd-22, Cd-23	3	400
Cd-1, Cd-14, Cd-30, Cd-37, Cd-38	5	500
Cd-3, Cd-5, Cd-6, Cd-9, Cd-15, Cd-16, Cd-18, Cd-19, Cd-20, Cd-21, Cd-25, Cd-26, Cd-27, Cd-28	14	600
Cd-2, Cd-4, Cd-7, Cd-8, Cd-10, Cd-12, Cd-24, Cd-29, Cd-31, Cd-32, Cd-33, Cd-36	12	700
Cd-34	1	800
Cd-39	1	900
Cd-35	1	>1000

ตาราง 8 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของทองแดงที่แบคทีเรียสามารถเจริญได้ (MIC)

ไอโซเลต	จำนวน ไอโซเลต	MIC (Mg/l)
Cu-13, Cu-14, Cu-15	3	200
Cu-20	1	700
Cu-5	1	900
Cu-21	1	1000
Cu-1, Cu-2, Cu-3, Cu-4, Cu-6, Cu-7, Cu-8, Cu-9, Cu-10, Cu-11, Cu-12, Cu-16, Cu-17, Cu-18, Cu-19	15	>1000

ตาราง 9 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสังกะสีที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ (MIC)

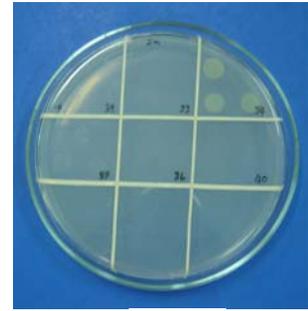
ไอโซเลต	จำนวน ไอโซเลต	MIC (Mg/l)
Zn-1, Zn-2, Zn-5, Zn-8, Zn-13, Zn-39	6	200
Zn-19, Zn-24	2	300
Zn-7, Zn-10	2	400
Zn-31, Zn-42	2	600
Zn-3, Zn-4, Zn-12	3	700
Zn-9, Zn-15, Zn-17, Zn-20, Zn-23, Zn-26, Zn-27, Zn-28	8	800
Zn-37, Zn-38	2	900
Zn-33	1	1000
Zn-6, Zn-11, Zn-14, Zn-16, Zn-18, Zn-21, Zn-22, Zn-25, Zn-29, Zn-30, Zn-32, Zn-34, Zn-35, Zn-36, Zn-40, Zn-41	16	>1000



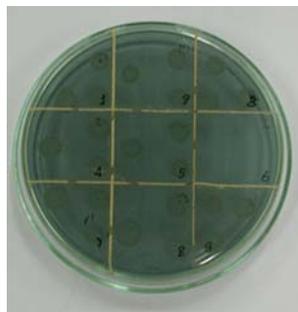
(ก)



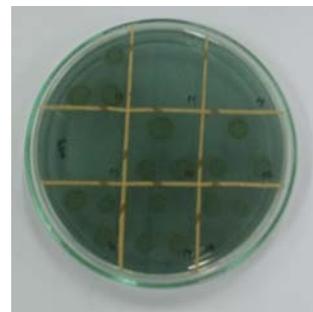
(ข)



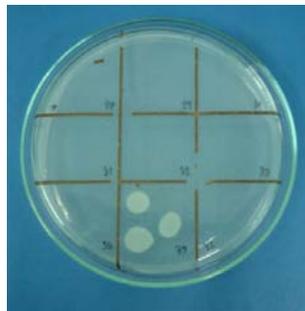
(ค)



(ง)



(จ)



(ฉ)

ภาพ 5 แสดงการทดสอบความทนต่อโลหะหนักที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร
ของแบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำทิ้งนิคมอุตสาหกรรมภาคเหนือ

(ก) – (ค) แบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสีความเข้มข้นตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ง) – (จ) แบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงความเข้มข้นตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ฉ) แบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมความเข้มข้นตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

การศึกษาความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญของแบคทีเรียกับความเข้มข้นโลหะหนัก

จากผลการศึกษาความทนโลหะหนักของแบคทีเรีย พบว่า แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นแคดเมียมตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 1 ไอโซเลต แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นทองแดงตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 15 ไอโซเลต และแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นสังกะสีตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 16 ไอโซเลต นำแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงและสังกะสีตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมตั้งแต่ 700 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 15 ไอโซเลต (เนื่องจากที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมมีไอโซเลตเดียว) นำมาศึกษาอัตราการเจริญของแบคทีเรียโดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นโลหะหนัก 0 , 25 , 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อคัดเลือกหาแบคทีเรียที่มีอัตราการเจริญดีที่สุดไปทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนัก โลหะหนักละ 3 ไอโซเลต

ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมตั้งแต่ 700 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญที่ระดับความเข้มข้นแคดเมียม 25 , 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (เทียบกับอัตราการเจริญที่ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร) คือ Cd-2 เลี้ยงที่ระดับความเข้มข้น 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญเป็น 77.24 % , 42.63 % และ 19.96 % ตามลำดับ Cd-4 มีอัตราการเจริญเป็น 34.50 % , 21.56 % และ 13.24 % ตามลำดับ Cd-7 มีอัตราการเจริญเป็น 59.51 % , 43.36 % และ 9.29 % ตามลำดับ Cd-8 มีอัตราการเจริญเป็น 73.48 % , 49.84 % และ 35.81 % ตามลำดับ Cd-10 มีอัตราการเจริญเป็น 81.67 % , 15.33 % และ 12.17 % ตามลำดับ Cd-12 มีอัตราการเจริญเป็น 87.01 % , 70.23 % และ 28.19 % ตามลำดับ Cd-24 มีอัตราการเจริญเป็น 83.86 % , 64.70 % และ 24.77 % ตามลำดับ Cd-29 มีอัตราการเจริญเป็น 88.43 % , 53.96 % และ 34.02 % ตามลำดับ Cd-31 มีอัตราการเจริญเป็น 78.57 % , 63.57 % และ 28.57 % ตามลำดับ Cd-32 มีอัตราการเจริญเป็น 57.43 % , 42.27 % และ 22.17 % ตามลำดับ Cd-33 มีอัตราการเจริญเป็น 91.23 % , 81.31 % และ 50.89 % ตามลำดับ Cd-34 มีอัตราการเจริญเป็น 57.75 % , 12.33 % และ 6.77 % ตามลำดับ Cd-35 มีอัตราการเจริญเป็น 89.09 % , 75.72 % และ 45.02 % ตามลำดับ Cd-36 มีอัตราการเจริญเป็น 93.13 % , 83.83 % และ 48.33 % ตามลำดับ และ Cd-39 มีอัตราการเจริญเป็น 79.39 % , 57.33 % และ 31.95 % ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมตั้งแต่ 700 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้ง 15 ไอโซเลต มีความสามารถในการเจริญในอาหารที่ผสมแคดเมียมได้แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียไอโซเลต Cd-33 มีความสามารถในการเจริญในอาหารที่ผสมแคดเมียมได้สูงที่สุด โดยที่แคดเมียมความเข้มข้น 100

มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเจริญได้ 50.89 % รองลงมา คือ Cd-36 และ Cd-35 โดยมีอัตราการเจริญที่แคดเมียม 100 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็น 48.33 % และ 45.02 % ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 10

แบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญที่ระดับความเข้มข้นทองแดง 25 , 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (เทียบกับอัตราการเจริญที่ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร) คือ Cu-1 เลี้ยงที่ระดับความเข้มข้น 25 , 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญเป็น 96.01 % , 97.81 % และ 94.21 % ตามลำดับ Cu-2 มีอัตราการเจริญเป็น 92.66 % , 95.85 % และ 81.27 % ตามลำดับ Cu-3 มีอัตราการเจริญเป็น 93.48 % , 94.73 % และ 89.32 % ตามลำดับ Cu-4 มีอัตราการเจริญเป็น 92.15 % , 94.91 % และ 83.18 % ตามลำดับ Cu-6 มีอัตราการเจริญเป็น 86.70 % , 89.47 % และ 77.30 % ตามลำดับ Cu-7 มีอัตราการเจริญเป็น 92.02 % , 93.46 % และ 70.48 % ตามลำดับ Cu-8 มีอัตราการเจริญเป็น 93.76 % , 95.19 % และ 82.87 % ตามลำดับ Cu-9 มีอัตราการเจริญเป็น 91.50 % , 92.96 % และ 71.59 % ตามลำดับ Cu-10 มีอัตราการเจริญเป็น 88.62 % , 90.27 % และ 79.77 % ตามลำดับ Cu-11 มีอัตราการเจริญเป็น 86.20 % , 91.13 % และ 67.47 % ตามลำดับ Cu-12 มีอัตราการเจริญเป็น 88.81 % , 90.37 % และ 80.19 % ตามลำดับ Cu-16 มีอัตราการเจริญเป็น 89.21 % , 91.88 % และ 72.17 % ตามลำดับ Cu-17 มีอัตราการเจริญเป็น 93.01 % , 93.44 % และ 94.74 % ตามลำดับ Cu-18 มีอัตราการเจริญเป็น 92.40 % , 94.14 % และ 68.77 % ตามลำดับ และ Cu-19 มีอัตราการเจริญเป็น 90.50 % , 92.31 % และ 72.42 % ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่ผสมทองแดง โดยแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้สูงสุด คือ Cu-17 โดยสามารถเจริญในอาหารที่ผสมทองแดง 100 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 94.74 % รองลงมาคือ Cu-1 และ Cu-3 โดยสามารถเจริญในอาหารที่ผสมทองแดง 100 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 94.21 % และ 89.32 % ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 11

แบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสีตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญที่ระดับความเข้มข้นสังกะสี 25 , 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (เทียบกับอัตราการเจริญที่ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร) คือ Zn-6 เลี้ยงที่ระดับความเข้มข้น 25 , 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญเป็น 81.41 % , 78.24 % และ 70.39 % ตามลำดับ Zn-11 มีอัตราการเจริญเป็น 86.68 % , 82.03 % และ 66.49 % ตามลำดับ Zn-14 มีอัตราการเจริญเป็น 88.86 % , 85.05 % และ 73.41 % ตามลำดับ Zn-16 มีอัตราการเจริญเป็น 93.78 % , 84.83 % และ 82.63 % ตามลำดับ Zn-18 มีอัตราการเจริญเป็น 92.55 % , 90.52 % และ 86.65 % ตามลำดับ Zn-21 มีอัตราการเจริญเป็น

90.27 %, 84.96 % และ 54.77 % ตามลำดับ Zn-22 มีอัตราการเจริญเป็น 94.71 %, 81.86 % และ 47.77 % ตามลำดับ Zn-25 มีอัตราการเจริญเป็น 89.09 %, 84.08 % และ 81.88 % ตามลำดับ Zn-29 มีอัตราการเจริญเป็น 90.65 %, 81.21 % และ 78.59 % ตามลำดับ Zn-30 มีอัตราการเจริญเป็น 89.21 %, 79.67 % และ 69.67 % ตามลำดับ Zn-32 มีอัตราการเจริญเป็น 95.60 %, 93.66 % และ 90.03 % ตามลำดับ Zn-34 มีอัตราการเจริญเป็น 93.22 %, 83.79 % และ 74.73 % ตามลำดับ Zn-35 มีอัตราการเจริญเป็น 93.23 %, 90.79 % และ 89.42 % ตามลำดับ Zn-36 มีอัตราการเจริญเป็น 92.01 %, 84.72 % และ 79.67 % ตามลำดับ Zn-40 มีอัตราการเจริญเป็น 88.28 %, 78.54 % และ 63.02 % ตามลำดับ และ Zn-41 มีอัตราการเจริญเป็น 90.52 %, 79.89 % และ 71.48 % ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสีตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้ง 16 ไอโซเลต มีความสามารถในการเจริญในอาหารที่ผสมสังกะสีได้ดี โดยแบคทีเรียไอโซเลต Zn-32 มีความสามารถในการเจริญในอาหารที่ผสมสังกะสีได้สูงที่สุด โดยสามารถเจริญในอาหารที่ผสมสังกะสี 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 90.03 % รองลงมาคือ Zn-35 และ Zn-18 โดยมีอัตราการเจริญที่แคดเมียม 100 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็น 89.42 และ 86.52 % ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 12

ตาราง 10 แสดงความสัมพันธ์การเจริญของแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 0 , 25 , 50 ,100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าการดูดกลืนแสง OD 600 ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ไอโซเลต	ค่า O.D ที่ระดับความเข้มข้น (mg/l)							
	0	(%)	25	(%)	50	(%)	100	(%)
Cd-2	1.072	100	0.828	77.24	0.457	42.63	0.214	19.96
Cd-4	0.974	100	0.336	34.50	0.210	21.56	0.129	13.24
Cd-7	0.904	100	0.538	59.51	0.392	43.36	0.084	9.29
Cd-8	1.290	100	0.948	73.48	0.643	49.84	0.462	35.81
Cd-10	1.233	100	1.007	81.67	0.189	15.33	0.150	12.17
Cd-12	1.394	100	1.213	87.01	0.979	70.23	0.393	28.19
Cd-24	1.320	100	1.107	83.86	0.854	64.70	0.327	24.77
Cd-29	1.314	100	1.162	88.43	0.709	53.96	0.447	34.02
Cd-31	1.120	100	0.880	78.57	0.712	63.57	0.320	28.57
Cd-32	1.015	100	0.583	57.43	0.429	42.27	0.225	22.17
Cd-33	1.562	100	1.425	91.23	1.270	81.31	0.795	50.89
Cd-34	1.006	100	0.581	57.75	0.124	12.33	0.068	6.77
Cd-35	1.466	100	1.306	89.09	1.110	75.72	0.660	45.02
Cd-36	1.558	100	1.451	93.13	1.306	83.83	0.753	48.33
Cd-39	1.446	100	1.148	79.39	0.829	57.33	0.462	31.95

ตาราง 11 แสดงความสัมพันธ์การเจริญของแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงที่ระดับความเข้มข้น 0 , 25 , 50 , 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าการดูดกลืนแสง OD 600 nm ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ไอโซเลต	ค่า O.D ที่ระดับความเข้มข้น (mg/l)							
	0	(%)	25	(%)	50	(%)	100	(%)
Cu-1	1.277	100	1.226	96.01	1.249	97.81	1.203	94.21
Cu-2	1.036	100	0.960	92.66	0.993	95.85	0.842	81.27
Cu-3	1.349	100	1.261	93.48	1.278	94.73	1.205	89.32
Cu-4	1.159	100	1.068	92.15	1.100	94.91	0.964	83.18
Cu-6	1.339	100	1.161	86.70	1.198	89.47	1.035	77.30
Cu-7	1.040	100	0.957	92.02	0.972	93.46	0.733	70.48
Cu-8	1.185	100	1.111	93.76	1.128	95.19	0.982	82.87
Cu-9	1.165	100	1.066	91.50	1.083	92.96	0.834	71.59
Cu-10	1.142	100	1.012	88.62	1.031	90.27	0.911	79.77
Cu-11	1.116	100	0.962	86.20	1.017	91.13	0.753	67.47
Cu-12	1.287	100	1.143	88.81	1.163	90.37	1.032	80.19
Cu-16	1.158	100	1.033	89.21	1.064	91.88	0.845	72.97
Cu-17	1.159	100	1.078	93.01	1.083	93.44	1.098	94.74
Cu-18	1.092	100	1.009	92.40	1.028	94.14	0.751	68.77
Cu-19	1.021	100	1.001	90.50	1.021	92.31	0.809	72.42

ตาราง 12 แสดงความสัมพันธ์การเจริญของแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสีที่ระดับความเข้มข้น 0 , 25 , 50 , 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าการดูดกลืนแสง OD 600 nm ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ไอโซเลต	ค่า O.D ที่ระดับความเข้มข้น (mg/l)							
	0	(%)	25	(%)	50	(%)	100	(%)
Zn-6	1.324	100	1.078	81.41	1.036	78.24	0.932	70.39
Zn-11	1.134	100	0.983	86.68	0.937	82.63	0.754	66.49
Zn-14	1.418	100	1.260	88.86	1.206	85.05	1.041	73.41
Zn-16	1.094	100	1.026	93.78	0.928	84.83	0.904	82.63
Zn-18	1.288	100	1.192	92.55	1.166	90.52	1.116	86.65
Zn-21	1.130	100	1.020	90.27	0.960	84.96	0.619	54.77
Zn-22	1.097	100	1.039	94.71	0.898	81.86	0.524	47.77
Zn-25	1.137	100	1.013	89.09	0.956	84.08	0.931	81.88
Zn-29	1.112	100	1.008	90.65	0.903	81.21	0.874	78.59
Zn-30	1.121	100	1.000	89.21	0.893	79.67	0.781	69.67
Zn-32	1.183	100	1.131	95.60	1.108	93.66	1.065	90.03
Zn-34	1.092	100	1.018	93.22	0.915	83.79	0.816	74.73
Zn-35	1.314	100	1.225	93.23	1.193	90.79	1.175	89.42
Zn-36	1.289	100	1.186	92.01	1.092	84.72	1.027	79.67
Zn-40	1.263	100	1.115	88.28	0.992	78.54	0.796	63.02
Zn-41	1.308	100	1.184	90.52	1.045	79.89	0.935	71.48

จากการศึกษาอัตราการเจริญของแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่จะนำมาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนัก โดยคัดเลือกจากแบคทีเรียที่มีอัตราการเจริญสูงสุด โลหะหนักละ 3 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียม และสามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่ผสมแคดเมียม คือ Cd-33, Cd-35 และ Cd-36 สำหรับแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงและสามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่ผสมทองแดง คือ Cu-1, Cu-3 และ Cu-17 และแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสีและสามารถเจริญได้ในอาหารที่ผสมสังกะสีได้สูงสุด คือ Zn-18, Zn-32 และ Zn-35

เมื่อได้แบคทีเรียที่ทนและสามารถเจริญได้ในอาหารที่ผสมโลหะหนัก โลหะหนักละ 3 ไอโซเลต แล้วนำแบคทีเรียที่ได้มาศึกษาอัตราการเจริญในอาหารที่ผสมโลหะหนักที่ความเข้มข้น 0, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในรูปแบบของ growth curve โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ optimal density (OD 600 นาโนเมตร) ผลจากการศึกษาอัตราการเจริญในรูปแบบ growth curve ของแบคทีเรียพบว่า แบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมและสามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่ผสมแคดเมียม คือ Cd-33, Cd-35 และ Cd-36 มีรูปแบบการเจริญที่คล้ายคลึงกัน โดยแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารที่มีแคดเมียมความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีรูปแบบการเจริญไม่แตกต่างกับแบคทีเรียที่เจริญในอาหารที่ไม่มีแคดเมียมผสม แต่ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียจะเจริญได้ช้าลง

แบคทีเรียที่ทนและสามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่ผสมทองแดง 3 ไอโซเลต คือ Cu-1, Cu-3 และ Cu-17 มีรูปแบบการเจริญที่เหมือนกัน แต่จะแตกต่างจากรูปแบบการเจริญของแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียม โดยแบคทีเรียที่เจริญในอาหารที่มีทองแดง 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มีรูปแบบการเจริญที่ไม่แตกต่างกับแบคทีเรียที่เจริญในอาหารที่ไม่มีทองแดง โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นทองแดงแบคทีเรียยังสามารถเจริญได้ดี

แบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสีและสามารถเจริญในอาหารที่ผสมสังกะสีได้สูงสุด คือ Zn-18, Zn-32 และ Zn-35 มีรูปแบบการเจริญที่เหมือนกับแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดง คือ แบคทีเรียที่เจริญในอาหารที่มีสังกะสี 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มีรูปแบบการเจริญที่ไม่แตกต่างกับแบคทีเรียที่เจริญในอาหารที่ไม่มีสังกะสี แต่เมื่อความเข้มข้นสังกะสีเพิ่มขึ้นการเจริญของแบคทีเรียจะช้าลงเล็กน้อย

การทดสอบความสามารถในการกำจัดโลหะหนักของแบคทีเรียที่แยกได้โดยการเลี้ยงแบบ batch test

เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โลหะหนักละ 3 ไอโซเลตไปทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับโลหะหนักโดยการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่มีแคดเมียม ทองแดง และสังกะสีที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 6.0 โดยวิธี batch cultural เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำสารละลายที่ผ่านการกรองไปวิเคราะห์หาปริมาณของโลหะหนักที่เหลืออยู่โดยใช้เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียม 3 ไอโซเลต คือ Cd-33 , Cd-35 และ Cd-36 สามารถกำจัดแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 6.0 ได้เท่ากับ 32.11 ± 0.86 , 19.26 ± 1.33 และ 26.36 ± 0.81 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง ตามลำดับ สำหรับแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดง 3 ไอโซเลต คือ Cu-1 , Cu-3 และ Cu-17 สามารถกำจัดทองแดงที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 6.0 ได้เท่ากับ 40.00 ± 0.55 , 26.67 ± 0.38 และ 23.91 ± 0.64 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสี 3 ไอโซเลต คือ Zn 18 , Zn 32 และ Zn35 สามารถกำจัดสังกะสีที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 6.0 ได้เท่ากับ 17.59 ± 0.89 , 28.50 ± 0.96 และ 19.23 ± 1.15 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 13

ตาราง 13 แสดงร้อยละการกำจัดโลหะหนักของแบคทีเรีย

ไอโซเลต	การกำจัด (%)	ชีวมวลแห้งของเซลล์ (กรัม)	การกำจัด (มิลลิกรัม/กรัมชีวมวลแห้ง)
Cd-33	61	0.19	32.11 ± 0.86
Cd-35	52	0.27	19.26 ± 1.33
Cd-36	58	0.22	26.36 ± 0.81
Cu-1	56	0.14	40.00 ± 0.55
Cu-3	56	0.21	26.67 ± 0.38
Cu-17	55	0.23	23.91 ± 0.64
Zn-18	51	0.29	17.59 ± 0.89
Zn-32	57	0.20	28.50 ± 0.96
Zn-35	50	0.26	19.23 ± 1.15

จากการทดลอง พบว่า แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแคดเมียมที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 6.0 ได้สูงสุด คือ Cd-33 โดยกำจัดแคดเมียมได้ 32.11 ± 0.86 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง รองลงมาคือ Cd-36 และ Cd-35 ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดทองแดงได้สูงสุดคือ Cu-1 โดยกำจัดได้ 40.00 ± 0.55 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง รองลงมาคือ Cu-3 และ Cu-17 และแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสังกะสีได้สูงสุดคือ Zn-32 โดยกำจัดได้ 28.50 ± 0.96 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง รองลงมาคือ Zn-35 และ Zn-18

จากการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนักโดยการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่มีแคดเมียม ทองแดง และสังกะสีที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 6.0 โดยวิธี batch cultural นำแบคทีเรียที่กำจัดโลหะหนักได้สูงสุดโลหะหนักละ 1 ไอโซเลตไปศึกษาผลของพีเอชและความเข้มข้นที่มีต่อการกำจัดโลหะหนักของแบคทีเรีย และนำไปทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนักในรูปของเซลล์อิสระ (free cell) และเซลล์ตรึงรูป (immobilized cell) และนำแบคทีเรียที่ได้ไปจำแนกสายพันธุ์ต่อไป

การศึกษาผลของพีเอชและความเข้มข้นของโลหะหนักที่มีต่อการกำจัดโลหะหนักของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทนต่อโลหะหนัก

ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาสำหรับการกำจัดโลหะหนักโดยแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนัก คือ พีเอชและความเข้มข้นของโลหะหนัก โดยใช้พีเอชที่ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 และความเข้มข้นโลหะหนักที่ 25, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า Cd-33 ซึ่งเป็นแบคทีเรีย ที่ทนต่อแคดเมียมและมีเปอร์เซ็นต์การกำจัดสูงสุด สามารถกำจัดแคดเมียมที่พีเอช 3.0 ความเข้มข้น 25, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้เท่ากับ 1.28 ± 0.98 , 3.92 ± 1.06 , 1.80 ± 1.15 และ 4.33 ± 0.8 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง ที่พีเอช 4.0 ได้เท่ากับ 1.89 ± 0.79 , 4.38 ± 0.68 , 9.34 ± 0.92 และ 14.03 ± 1.05 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง ที่พีเอช 5.0 ได้ เท่ากับ 3.75 ± 0.57 , 10.79 ± 0.64 , 16.36 ± 1.06 และ 19.45 ± 1.02 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง ที่พีเอช 6.0 ได้เท่ากับ 6.07 ± 0.87 , 25.11 ± 0.91 , 24.97 ± 0.84 และ 24.05 ± 1.09 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง และที่พีเอช 7.0 ได้เท่ากับ 1.02 ± 1.18 , 1.81 ± 1.08 , 2.62 ± 0.99 และ 3.01 ± 0.82 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 14

แบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงและมีเปอร์เซ็นต์การกำจัดทองแดงสูงสุด คือ Cu-1 สามารถกำจัดทองแดงที่พีเอช 3.0 ความเข้มข้น 25, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้เท่ากับ 1.40 ± 0.68 , 3.80 ± 0.96 , 6.35 ± 0.74 และ 13.22 ± 1.06 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง ที่พีเอช 4.0 ได้เท่ากับ

2.17 ± 1.14, 5.23 ± 0.96, 13.67 ± 0.65 และ 22.29 ± 0.54 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง ที่พีเอช 5.0 ได้เท่ากับ 7.48 ± 1.16, 17.56 ± 0.89, 31.23 ± 0.63 และ 52.84 ± 0.78 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง ที่พีเอช 6.0 ได้เท่ากับ 6.39 ± 0.98, 16.27 ± 1.11, 21.99 ± 0.62 และ 44.99 ± 0.74 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง และที่พีเอช 7.0 ได้เท่ากับ 0.91 ± 0.86, 1.18 ± 1.08, 3.92 ± 0.92 และ 8.21 ± 0.68 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 15

แบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสีและมีเปอร์เซ็นต์การกำจัดสังกะสีสูงสุด คือ Zn-32 สามารถกำจัดสังกะสีที่พีเอช 3.0 ความเข้มข้น 25, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้เท่ากับ 0.83 ± 0.63, 1.42 ± 0.84, 4.23 ± 1.12 และ 7.31 ± 0.96 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง ที่พีเอช 4.0 ได้เท่ากับ 2.60 ± 0.67, 6.89 ± 0.58, 10.14 ± 0.94 และ 15.47 ± 1.08 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง ที่พีเอช 5.0 ได้เท่ากับ 4.58 ± 0.62, 9.70 ± 0.84, 19.05 ± 1.13 และ 38.33 ± 0.67 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง ที่พีเอช 6.0 ได้เท่ากับ 7.02 ± 0.94, 18.21 ± 1.10, 26.76 ± 0.62 และ 26.76 ± 0.62 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง ที่พีเอช 7.0 ได้เท่ากับ 0.91 ± 0.81, 2.13 ± 1.04, 7.77 ± 0.93 และ 15.21 ± 0.76 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 16

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมและสังกะสีสามารถกำจัดแคดเมียมและสังกะสีได้ดีที่สุดที่พีเอช 6.0 สำหรับแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดง พีเอชที่เหมาะสมในการกำจัดคือ 5.0 และความเข้มข้นแคดเมียมที่แบคทีเรียสามารถกำจัดได้ดีที่สุดคือ ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนความเข้มข้นทองแดงและสังกะสีที่แบคทีเรียกำจัดได้ดีที่สุดคือ ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตาราง 14 แสดงผลของการกำจัดแคดเมียมของแบคทีเรียไฮโซเลต Cd-33

ความเข้มข้น โลหะหนัก(mg/l)	น้ำหนักชีวมวลแห้ง (g)	การกำจัด (mg/g biomass)
pH 3.0 / 25	0.20	1.28 ± 0.98
50	0.20	3.92 ± 1.06
75	0.18	1.80 ± 1.15
100	0.14	4.33 ± 0.83
pH 4.0 / 25	0.20	1.89 ± 0.79
50	0.22	4.38 ± 0.68
75	0.20	9.34 ± 0.92
100	0.16	14.03 ± 1.05
pH 5.0 / 25	0.24	3.75 ± 0.57
50	0.22	10.79 ± 0.64
75	0.20	16.36 ± 1.06
100	0.18	19.45 ± 1.02
pH 6.0 / 25	0.20	6.07 ± 0.87
50	0.18	25.11 ± 0.91
75	0.18	24.97 ± 0.84
100	0.17	24.05 ± 1.09
PH 7.0 / 25	0.23	1.02 ± 1.18
50	0.21	1.81 ± 1.08
75	0.20	2.62 ± 0.99
100	0.17	3.01 ± 0.82

ตาราง 15 แสดงผลของการกำจัดทองแดงของแบคทีเรีย ไอโซเลต Cu-1

ความเข้มข้นโลหะหนัก (mg/l)	น.น ชีวมวลแห้ง (g)	การกำจัด (mg/g biomass)
pH 3.0 / 25	0.20	1.40 ± 0.68
50	0.18	3.80 ± 0.96
75	0.22	6.35 ± 0.74
100	0.17	13.22 ± 1.06
pH 4.0 / 25	0.20	2.17 ± 1.14
50	0.20	5.23 ± 0.96
75	0.18	13.67 ± 0.65
100	0.19	22.29 ± 0.54
pH 5.0 / 25	0.18	7.48 ± 1.16
50	0.20	17.56 ± 0.89
75	0.18	31.23 ± 0.63
100	0.18	52.84 ± 0.78
pH 6.0 / 25	0.18	6.39 ± 0.98
50	0.20	16.27 ± 1.11
75	0.23	21.99 ± 0.62
100	0.19	44.99 ± 0.74
pH 7.0 / 25	0.20	0.91 ± 0.86
50	0.21	1.18 ± 1.08
75	0.18	3.92 ± 0.92
100	0.17	8.21 ± 0.68

ตาราง 16 แสดงผลของการกำจัดสังกะสีของแบคทีเรีย ไอโซเลต Zn-32

ความเข้มข้น โลหะหนัก (mg/l)	น.น ชีวมวลแห้ง (g)	การกำจัด (mg/g biomass)
pH 3.0 / 25	0.18	0.83 ± 0.63
50	0.22	1.42 ± 0.84
75	0.20	4.23 ± 1.12
100	0.18	7.31 ± 0.96
pH 4.0 / 25	0.20	2.60 ± 0.67
50	0.19	6.89 ± 0.58
75	0.19	10.14 ± 0.94
100	0.17	15.47 ± 1.08
pH 5.0 / 25	0.20	4.58 ± 0.62
50	0.22	9.70 ± 0.84
75	0.20	19.05 ± 1.13
100	0.18	38.33 ± 0.67
pH 6.0 / 25	0.21	7.02 ± 0.94
50	0.20	18.21 ± 1.10
75	0.20	26.76 ± 0.62
100	0.18	46.56 ± 0.59
pH 7.0 / 25	0.20	0.91 ± 0.81
50	0.23	2.13 ± 1.04
75	0.20	7.77 ± 0.93
100	0.19	15.21 ± 0.76

การทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนักของเซลล์อิสระ (free cell) และ เซลล์ตรึงรูป (immobilized cell)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนักของเซลล์อิสระ (free cell) และเซลล์ ตรึงรูป (immobilized cell) ของแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนัก เปรียบเทียบกับโซเดียมอัลจิเนตที่เวลาการกำจัด 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียม (Cd-33) มีประสิทธิภาพในการกำจัดในรูปเซลล์อิสระดีที่สุดในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง เท่ากับ 62.76 ± 1.25 % แต่ประสิทธิภาพในการกำจัดจะเริ่มคงที่ตั้งแต่ที่เวลา 6 ชั่วโมง ส่วนเซลล์ตรึงรูปมีประสิทธิภาพในการกำจัดดีที่สุดในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง เท่ากับ 86.71 ± 1.09 % แต่ประสิทธิภาพการกำจัดจะเริ่มคงที่ตั้งแต่ที่เวลา 4 ชั่วโมง และสำหรับการกำจัดด้วยโซเดียมอัลจิเนต จะเริ่มคงที่ตั้งแต่ 2 ชั่วโมง โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัดสูงสุดที่เวลา 4 ชั่วโมง ได้เท่ากับ 72.62 ± 0.99 % ดังแสดงในตาราง 17

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนักของเซลล์อิสระ (free cell) และเซลล์ ตรึงรูป (immobilized cell) ของแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดง พบว่าแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดง (Cu-1) มีประสิทธิภาพในการกำจัดในรูปเซลล์อิสระดีที่สุดที่เวลา 12 ชั่วโมง ประสิทธิภาพการกำจัด เท่ากับ 64.67 ± 1.18 % และประสิทธิภาพการกำจัดจะเริ่มคงที่เวลา 6 ชั่วโมง ส่วนเซลล์ตรึงรูปมี ประสิทธิภาพในการกำจัดดีที่สุดในช่วงเวลา 8 ชั่วโมง เท่ากับ 89.43 ± 1.25 % และประสิทธิภาพ การกำจัดจะเริ่มคงที่ที่เวลา 4 ชั่วโมง และในการกำจัดด้วยโซเดียมอัลจิเนตจะเริ่มคงที่ตั้งแต่เวลา 2 ชั่วโมง โดยมีประสิทธิภาพการกำจัดดีที่สุดที่เวลา 4 ชั่วโมง เท่ากับ 79.12 ± 1.26 % ดังแสดงใน ตาราง 18

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนักของเซลล์อิสระ (free cell) และเซลล์ ตรึงรูป (immobilized cell) ของแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสี พบว่า แบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสี (Zn-32) มี ประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนักดีที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 56.20 ± 0.86 % และ ประสิทธิภาพการกำจัดจะเริ่มคงที่ที่เวลา 8 ชั่วโมง ส่วนเซลล์ตรึงรูปมีประสิทธิภาพในการกำจัด ดีที่สุดในช่วงเวลา 4 ชั่วโมง เท่ากับ 75.85 ± 0.83 และประสิทธิภาพการกำจัดจะเริ่มคงที่ ที่ เวลา 2 ชั่วโมง ดังแสดงในตาราง 19

จากผลการทดลอง พบว่า ประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนักของเซลล์อิสระ เซลล์ตรึงรูป และ โซเดียมอัลจิเนต ในช่วงเวลาเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความ เชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$) ในทุกช่วงเวลาโดยประสิทธิภาพในการกำจัดด้วยโซเดียมอัลจิเนตจะเกิด เร็วที่สุด รองลงมาคือ เซลล์ตรึงรูป และเซลล์อิสระ ตามลำดับ

ตาราง 17 แสดงผลการกำจัดแคดเมียมโดยเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงรูป

เวลา (ชั่วโมง)	เซลล์อิสระ* (% การกำจัด)	เซลล์ตรึงรูป* (% การกำจัด)	ไซโตไคนมัลลิจิเนต* (% การกำจัด)
2	12.45 ^c ± 1.21	42.15 ^b ± 1.26	68.98 ^a ± 1.15
4	39.65 ^c ± 1.06	77.79 ^a ± 1.09	72.62 ^b ± 0.99
6	51.96 ^c ± 1.65	78.34 ^a ± 0.98	70.24 ^b ± 0.87
8	54.32 ^c ± 1.49	80.71 ^a ± 0.87	70.79 ^b ± 1.13
10	52.74 ^c ± 0.98	78.53 ^a ± 1.23	62.64 ^b ± 1.25
12	54.08 ^c ± 0.87	80.67 ^a ± 1.51	66.03 ^b ± 1.06
24	58.63 ^c ± 1.06	82.18 ^a ± 1.06	64.68 ^b ± 1.24
36	60.19 ^b ± 1.23	84.62 ^a ± 1.12	56.71 ^c ± 0.94
48	62.76 ^b ± 1.25	86.71 ^a ± 1.01	54.14 ^c ± 0.78

หมายเหตุ *One-way ANOVA ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ข้อมูลในแถวเดียวกันที่มีอักษรภาษาอังกฤษกำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$) โดยวิธีของ Duncan's Multiple Test

ตาราง 18 แสดงผลการกำจัดทองแดงโดยเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงรูป

เวลา (ชั่วโมง)	เซลล์อิสระ* (% การกำจัด)	เซลล์ตรึงรูป* (% การกำจัด)	ไซโตยิมอัลจีเนต* (% การกำจัด)
2	23.78 ^C ±1.15	47.45 ^b ±1.07	69.96 ^a ±1.17
4	42.84 ^C ±1.32	83.15 ^a ±1.29	79.12 ^b ±1.26
6	51.25 ^C ±1.04	87.54 ^a ±1.08	77.34 ^b ±0.94
8	59.63 ^C ±0.96	89.43 ^a ±1.25	74.46 ^b ±0.89
10	56.45 ^C ±1.07	88.46 ^a ±1.01	71.73 ^b ±1.15
12	64.67 ^C ±1.18	85.97 ^a ±0.83	64.75 ^b ±1.24
24	58.32 ^C ±1.24	80.55 ^a ±0.79	70.88 ^b ±0.83
36	56.91 ^C ±0.92	82.78 ^a ±1.04	68.53 ^b ±0.96
48	58.76 ^C ±1.03	84.46 ^a ±0.85	64.67 ^b ±1.12

หมายเหตุ *One-way ANOVA ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ข้อมูลในแถวเดียวกันที่มีอักษรภาษาอังกฤษกำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$) โดยวิธีของ Duncan's Multiple Test

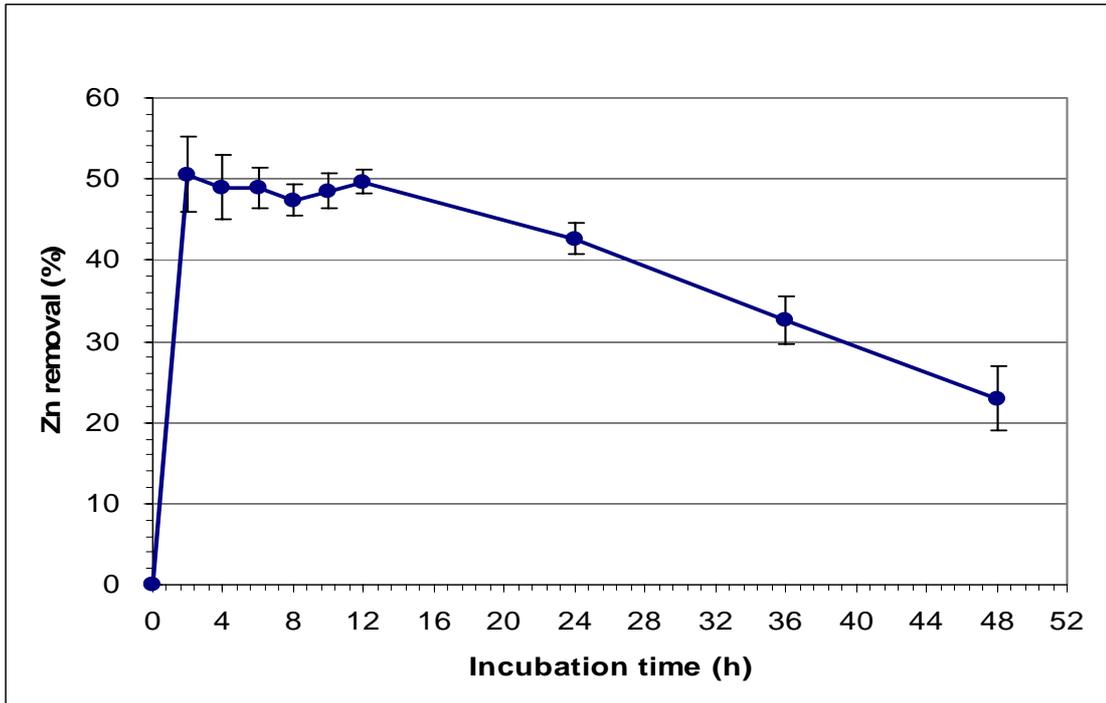
ตาราง 19 แสดงผลการกำจัดสังกะสีโดยเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงรูป

เวลา (ชั่วโมง)	เซลล์อิสระ* (% การกำจัด)	เซลล์ตรึงรูป* (% การกำจัด)	ไซโตียมอัลจิเนต* (% การกำจัด)
2	10.34 ^c ± 0.86	35.81 ^b ± 0.84	60.28 ^a ± 0.65
4	28.66 ^c ± 0.67	70.26 ^a ± 0.97	75.85 ^b ± 0.83
6	32.13 ^c ± 1.14	73.42 ^a ± 1.18	75.61 ^b ± 0.19
8	41.64 ^c ± 1.23	79.89 ^a ± 1.26	72.10 ^b ± 1.02
10	42.46 ^c ± 1.08	81.24 ^a ± 1.31	70.73 ^b ± 1.18
12	44.20 ^c ± 0.95	80.12 ^a ± 0.76	72.96 ^b ± 0.93
24	56.20 ^c ± 0.86	78.06 ^a ± 0.91	69.45 ^b ± 0.84
36	54.13 ^c ± 1.06	79.64 ^a ± 1.06	65.15 ^b ± 1.08
48	50.75 ^c ± 1.17	81.63 ^a ± 1.16	62.52 ^b ± 1.16

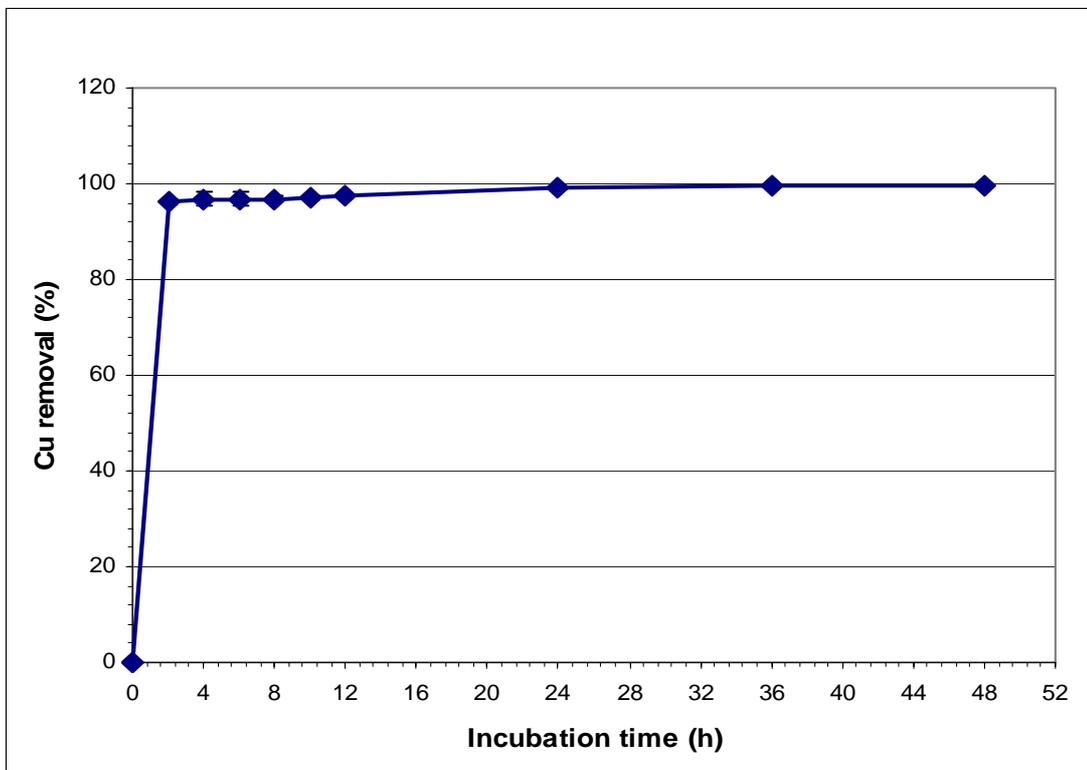
หมายเหตุ *One-way ANOVA ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ข้อมูลในแถวเดียวกันที่มีอักษรภาษาอังกฤษกำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$) โดยวิธีของ Duncan's Multiple Test

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำทิ้งที่มีโลหะหนักปนเปื้อนโดยใช้ระบบบำบัดจำลองแบบ Immobilized cell reactor

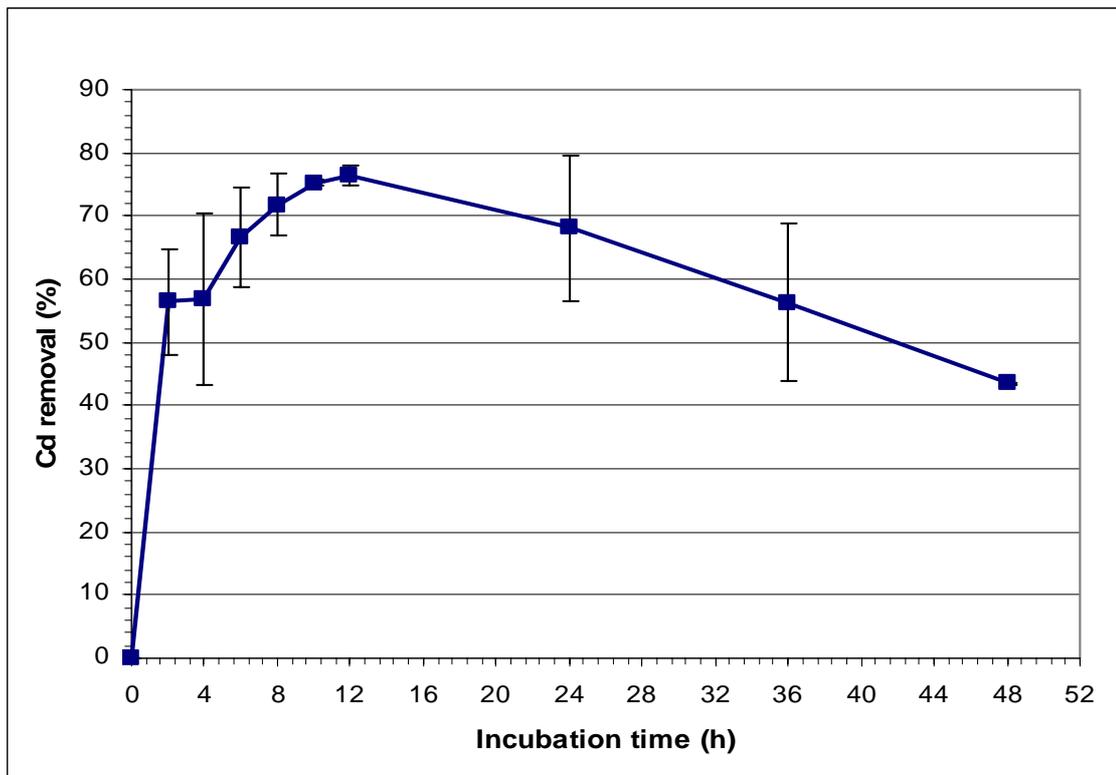
จากการศึกษาประสิทธิภาพของการบำบัดโลหะหนักในน้ำทิ้งโดยใช้ระบบบำบัดจำลองแบบ immobilized cell reactor โดยใช้ immobilized cell พบว่า สามารถลดความเข้มข้นของสังกะสีลง 50 % ภายในเวลา 2 ชั่วโมงแรก (ภาพ 6) และประสิทธิภาพการบำบัดจะคงที่ในระดับ 50% อยู่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 จนถึง 12 ชั่วโมงจึงมีประสิทธิภาพในการบำบัดลดลงจนถึงระดับประมาณ 25% ที่ชั่วโมงที่ 48 ในขณะที่ประสิทธิภาพการบำบัดของแดงพบว่าสามารถลดความเข้มข้นของทองแดงลงได้ถึง 95 % ภายในเวลา 2 ชั่วโมงแรกและประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นจนถึง 100% ที่ชั่วโมงที่ 24 และยังคงประสิทธิภาพการบำบัดที่ระดับ 100% ทั้งที่เวลา 36 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ (ภาพ 7) สำหรับประสิทธิภาพในการบำบัดแคดเมียมพบว่าสามารถลดแคดเมียมได้มากกว่า 55% ตั้งแต่ 2 ชั่วโมงและมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นจนถึง 85 % ที่ชั่วโมงที่ 12 และประสิทธิภาพลดลงเป็น 45% เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง



ภาพ 6 ผลการบำบัดน้ำทิ้งที่มีสังกะสี (Zn) ปนเปื้อนโดยใช้เซลล์ตรึงรูปใน reactor



ภาพ 7 ผลการบำบัดน้ำทิ้งที่มีทองแดง (Cu) ปนเปื้อนโดยใช้เซลล์ตรึงรูปใน reactor



ภาพ 8 ผลการบำบัดน้ำทิ้งที่มีแคดเมียม (Cd) ปนเปื้อนโดยใช้เซลล์ตรึงรูปใน reactor

การจำแนกชนิดแบคทีเรีย

จากการศึกษาความทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียตามผลการศึกษาที่แสดงในข้อที่ 3 แบคทีเรียที่สามารถทนต่อแคดเมียมที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 700 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวน 15 ไอโซเลต แบคทีเรียที่สามารถทนต่อทองแดงที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวน 15 ไอโซเลต และแบคทีเรียที่สามารถทนต่อสังกะสีที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร จำนวน 16 ไอโซเลต นำแบคทีเรียที่ได้ไปศึกษาเพื่อจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียโดยการพิสูจน์เอกลักษณ์ ขั้นต้นโดยนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ การทดสอบ Oxidation/Fermentation (OF) basal medium (1% glucose), การทดสอบการผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase), การทดสอบการผลิตเอนไซม์คาตาเลส (catalase), การทดสอบการเคลื่อนที่ (mobility) และการย้อมสีแกรมแบคทีเรีย

ผลจากการแยกชนิดของแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักที่คัดแยกจากระบบบำบัดน้ำเสียของนิคมอุตสาหกรรมโดยการย้อมสีแกรม พบว่า แบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมตั้งแต่ 700 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative) เซลล์มีลักษณะเป็นแท่ง (rod) ดังแสดงในตาราง 20 ส่วนแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียม คือ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative) เซลล์มีลักษณะเป็นแท่ง (rod) มีส่วนน้อยที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) และมีลักษณะกลม (cocci) ดังแสดงในตาราง 21 และแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสีตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมและทองแดง คือ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative) เซลล์มีลักษณะเป็นแท่ง (rod) มีส่วนน้อยที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) และมีลักษณะกลม (cocci) ดังแสดงในตาราง 22

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่สามารถทนและมีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดโลหะหนัก 3 ชนิดคือ แคดเมียม ทองแดง และสังกะสี จากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด โดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ร่วมกับการใช้ชุดทดสอบ คุณสมบัติทางชีวเคมีมาตรฐาน API 20E และ API 20 NE (Biomerieux) พบว่า แบคทีเรียที่ทนและมีประสิทธิภาพในการกำจัดแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี สูงสุด คือ Cd-33 , Cu-1, Zn-32 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Klebsiella terrigena*, *Bordetella/Alcaligenes/Moraxella Acinetobacter junii/ Acinetobacter johsonii* ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 23, 24, 25

ตาราง 20 แสดงผลการแยกชนิดแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมโดยการย้อมสีแกรม

ไอโซเลต	รูปร่างเซลล์	ผลการย้อมสีแกรม
Cd-2	แท่ง	ลบ
Cd-4	แท่ง	ลบ
Cd-7	แท่ง	ลบ
Cd-8	แท่ง	ลบ
Cd-10	แท่ง	ลบ
Cd-12	แท่ง	ลบ
Cd-24	กลม	บวก
Cd-29	แท่ง	ลบ
Cd-31	แท่ง	ลบ
Cd-32	แท่ง	ลบ
Cd-33	แท่ง	ลบ
Cd-34	แท่ง	ลบ
Cd-35	แท่ง	ลบ
Cd-36	แท่ง	ลบ
Cd-39	กลม	บวก

ตาราง 21 แสดงผลการแยกชนิดแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงโดยการย้อมสีแกรม

ไอโซเลต	รูปร่างเซลล์	ผลการย้อมสีแกรม
Cu-1	แท่ง	ลบ
Cu-2	แท่ง	ลบ
Cu-3	แท่ง	ลบ
Cu-4	แท่ง	ลบ
Cu-6	แท่ง	ลบ
Cu-7	กลม	บวก
Cu-8	แท่ง	ลบ
Cu-9	แท่ง	ลบ
Cu-10	แท่ง	ลบ
Cu-11	กลม	ลบ
Cu-12	กลม	บวก
Cu-16	แท่ง	ลบ
Cu-17	แท่ง	ลบ
Cu-18	แท่ง	ลบ
Cu-19	แท่ง	ลบ

ตาราง 22 แสดงผลการแยกชนิดแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสีโดยการย้อมสีแกรม

ไอโซเลต	รูปร่างเซลล์	ผลการย้อมสีแกรม
Zn-6	กลม	บวก
Zn-11	แท่ง	ลบ
Zn-14	แท่ง	ลบ
Zn-16	แท่ง	ลบ
Zn-18	แท่ง	ลบ
Zn-21	แท่ง	ลบ
Zn-22	แท่ง	ลบ
Zn-25	แท่ง	ลบ
Zn-29	กลม	บวก
Zn-30	แท่ง	ลบ
Zn-32	แท่ง	ลบ
Zn-34	แท่ง	ลบ
Zn-35	แท่ง	ลบ
Zn-36	แท่ง	ลบ
Zn-40	แท่ง	ลบ
Zn-41	แท่ง	ลบ

ตาราง 23 แสดงผลการจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลต Cd-33 ด้วย API-20E

Characteristics	Reaction
Gram reaction	-
2-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside	+
L-Arginine	-
L-Lysine	+
L-Ornithine	-
Trisodium Citrate	+
Sodium thiosulfate	-
Urea	+
L-Tryptophane	-
L-Trptophane (Indole production)	-
Sodium pyruvate	+
Gelatin	-
D-glucose	+
D-mannitol	+
Inositol	+
Sorbitol	+
L-rhamnose	+
D-sucrose	+
D-melibiose	+
Amygdalin	-
L-arabinose	-
Cytochrome oxidase	-
Potassium nitrate	+(NO) ₂

ตาราง 23 (ต่อ)

Characteristics	Reaction
motility	-
Growth (MacConkey medium)	+
Oxidative/Fermentative	F
Identification	<i>Klebsiella terrigena</i>
% Identification	93.0%

หมายเหตุ : F หมายถึง Oxidative/Fermentative metabolism; + หมายถึง positive;
- หมายถึง negative

ตาราง 24 แสดงผลการจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลต Cu-1 ด้วย API-20NE

Characteristics	Reaction
Gram reaction	-
Potassium nitrate	+(NO) ₂
L-Tryptophane (Indole production)	-
D-glucose	-
L-Arginine	-
Urea	-
Esculin ferric citrate	-
Gelatin	-
4-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	-
D-glucose	+
L-arabinose	+
D-mannose	+
D-mannitol	+
N-acetyl-glucosamine	+
D-maltose	+

ตาราง 24 (ต่อ)

Characteristics	Reaction
Potassium gluconate	+
Capric acid	+
Adicic acid	-
Malic acid	+
Trisodium Citrate	+
Phenylacetic acid	-
Cytochrome oxidose	-
Identification	<i>Bordetella/Alcaligenes/ Moraxella</i>
% Identification	91.9%

หมายเหตุ : + หมายถึง positive; - หมายถึง negative

ตาราง 25 แสดงผลการจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลต Zn-32 ด้วย API-20NE

Characteristics	Reaction
Gram reaction	-
Potassium nitrate	+(NO) ₂
L-Tryptophane (Indole production)	-
D-glucose	+
L-Arginine	-
Urea	-
Esculin ferric citrate	+
Gelatin	-
4-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	+
D-glucose	+
L-arabinose	+

ตาราง 25 (ต่อ)

Characteristics	Reaction
D-mannose	+
D-mannitol	+
N-acetyl-glucosamine	+
D-maltose	+
Potassium gluconate	+
Capric acid	+
Adicic acid	-
Malic acid	+
Trisodium Citrate	+
Phenylacetic acid	+
Cytochrome oxidose	-
Identification	<i>Acinetobacter junii</i> / <i>Acinetobacter johsonii</i>
% Identification	91.9%

หมายเหตุ : + หมายถึง positive; - หมายถึง negative

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาเรื่องการกำจัดแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ในสารละลายโลหะหนักโดยใช้แบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนัก มีข้อสรุปของการทำวิจัยดังนี้

1. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก 3 ชนิดในน้ำเสีย คือ แคดเมียม ทองแดง และสังกะสี โดยใช้เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer พบว่า ในน้ำเสียมีปริมาณทองแดง และสังกะสี เท่ากับ 0.409 และ 0.962 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนแคดเมียมตรวจไม่พบ ซึ่งค่าที่ได้ไม่เกินค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม (ภาคผนวก ง) และในน้ำเสียนี้อาจมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ประมาณ 2.00×10^5 CFU/มิลลิลิตร

2. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำเสีย พบว่า มีแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมที่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 1 ไอโซเลต แบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงที่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 15 ไอโซเลต และแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสีที่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 16 ไอโซเลต โดยแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมส่วนใหญ่มีค่า MIC ต่ำกว่าแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงและแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสี โดยค่า MIC จะอยู่ที่ช่วง 500-700 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงและสังกะสีส่วนใหญ่มีค่า MIC อยู่ในช่วง สูงกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้เนื่องจากแคดเมียมมีความเป็นพิษสูงกว่าทองแดงและสังกะสี

3. แบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียม มีอัตราการเจริญในอาหารที่ผสมแคดเมียมต่ำกว่าแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงและสังกะสี โดยที่ความเข้มข้นแคดเมียม 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียสามารถเจริญได้สูงสุดประมาณ 50 % ส่วนแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงและสังกะสี สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีทองแดงและสังกะสีผสมที่ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยอัตราการเจริญของแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงไม่แตกต่างกับอัตราการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นชุดควบคุม ส่วนแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสี สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีสังกะสีผสมไม่แตกต่างจากแบคทีเรียที่เป็นชุดควบคุม แต่อัตราการเจริญจะต่ำกว่าแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดง

4. แบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียม และมีประสิทธิภาพในการกำจัดแคดเมียมสูงสุด คือ ไอโซเลต Cd-33 โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัดแคดเมียมที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่พีเอช 6.0 เท่ากับ 32.11 ± 0.86 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดง และมีประสิทธิภาพใน

การกำจัดทองแดงสูงสุดคือ Cu-1 โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัด เท่ากับ 40.00 ± 0.55 มิลลิกรัมต่อลิตร และแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสีและมีประสิทธิภาพในการกำจัดสังกะสีสูงสุด คือ Zn-32 โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัด เท่ากับ 28.50 ± 0.96 มิลลิกรัมต่อลิตร

5. การศึกษาผลของพีเอช และความเข้มข้นโลหะหนักที่มีต่อประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนักพบว่า แบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียม มีประสิทธิภาพในการกำจัดสูงสุดที่พีเอช 6.0 ที่ความเข้มข้นแคดเมียม 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยกำจัดได้ 25.11 ± 0.91 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดง มีประสิทธิภาพในการกำจัดทองแดงได้สูงสุดที่พีเอช 5.0 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยกำจัดได้ 52.84 ± 0.78 มิลลิกรัมต่อลิตร และแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสี มีประสิทธิภาพในการกำจัดสังกะสีสูงสุดที่พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยกำจัดได้ 46.56 ± 0.59 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลของพีเอชและความเข้มข้นโลหะหนักในงานวิจัยนี้จะสอดคล้องกับงานวิจัยอื่น คือ เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนักของแบคทีเรียก็เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกันกับผลของความเข้มข้นโลหะหนักที่เพิ่มขึ้นประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนักจะเพิ่มขึ้น

6. การทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนักของแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักในรูปของเซลล์อิสระ (free cell) เซลล์ตรึงรูป (immobilized cell) โดยเทียบกับไซโตมอล์เจเนต พบว่า เซลล์ตรึงรูปของแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมสามารถกำจัดแคดเมียมได้ดีที่สุด คือ $89.43 \pm 1.25\%$ รองลงมาคือไซโตมอล์เจเนต และเซลล์อิสระ กำจัดได้ $72.62 \pm 0.99\%$ และ $62.76 \pm 1.25\%$ ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงสามารถกำจัดทองแดงได้ดีที่สุดในรูปเซลล์ตรึงรูป โดยกำจัดได้ $89.43 \pm 1.25\%$ รองลงมา คือ ไซโตมอล์เจเนต และเซลล์อิสระ กำจัดได้ $79.12 \pm 1.26\%$ และ $64.67 \pm 1.18\%$ ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสีสามารถกำจัดสังกะสีได้ดีที่สุดในรูปเซลล์ตรึงรูป โดยกำจัดได้ $81.63 \pm 1.16\%$ รองลงมา คือ ไซโตมอล์เจเนต และเซลล์อิสระ กำจัดได้ $75.85 \pm 0.83\%$ และ $56.20 \pm 0.86\%$ ตามลำดับ โดยเซลล์ตรึงรูปและไซโตมอล์เจเนตจะใช้เวลาในการกำจัดสั้นกว่าเซลล์อิสระ โดยไซโตมอล์เจเนตจะใช้เวลาในการกำจัดจนถึงจุดสมดุล ประมาณ 2 ชั่วโมง ส่วนเซลล์ตรึงรูปจะใช้เวลาประมาณ 4-8 ชั่วโมงและเซลล์อิสระจะใช้เวลาในการกำจัดจนถึงจุดสมดุลประมาณ 24 ชั่วโมง

7. การกำจัดโลหะหนักโดยระบบบำบัดน้ำเสียจำลองแบบ Immobilized cell Reactor

จากการศึกษาประสิทธิภาพของการบำบัดโลหะหนักในน้ำทิ้งโดยใช้ระบบบำบัดจำลองแบบ immobilized cell reactor โดยใช้ immobilized cell พบว่า สามารถลดความเข้มข้นของสังกะสีลง

50 % ภายในเวลา 2 ชั่วโมงแรก ในขณะที่ประสิทธิภาพการบำบัดทองแดงได้ถึง 95 % ภายในเวลา 2 ชั่วโมงแรก และมีประสิทธิภาพในการบำบัดแคดเมียมได้มากกว่า 55% ภายใน 2 ชั่วโมง

8. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเสียของนิคมอุตสาหกรรม โดยทำการทดสอบเบื้องต้นทางชีวเคมีและทดสอบด้วยชุดทดสอบชีวเคมีมาตรฐาน API 20 E, 20 NE (Biomerieux) พบว่า แบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมและมีประสิทธิภาพในการกำจัดแคดเมียมสูงสุด คือ *Klebsiella terrigena* ส่วนแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงและสามารถกำจัดทองแดงได้ดีที่สุด คือ *Bordetella/Alcaligenes/ Moraxella* และแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสี และมีประสิทธิภาพในการกำจัดสังกะสีสูงสุด คือ *Acinetobacter junii/ Acinetobacter johsonii*.

อภิปรายผลการวิจัย

1. ผลการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักและจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

1.1 จากผลการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักทั้งหมดในตัวอย่างน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียรวมของนิคมอุตสาหกรรม โดยวิเคราะห์โลหะหนัก 3 ชนิด คือ แคดเมียม ทองแดง และสังกะสี พบว่าแคดเมียมตรวจไม่พบ ส่วนทองแดงและสังกะสีมีปริมาณ เท่ากับ 0.409 และ 0.962 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในตัวอย่างน้ำเสียมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม (ภาคผนวก ง) พบว่าปริมาณแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี มีปริมาณต่ำกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนดให้น้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดต้องมีปริมาณโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด คือ แคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer มีปริมาณไม่เกิน 0.03 , 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่าง ตามเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม และนิคมอุตสาหกรรม กำหนดให้อยู่ในช่วง 5.5-9.0 ซึ่งตัวอย่างน้ำเสียมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วงเกณฑ์มาตรฐาน คือ 7.0 สาเหตุที่ในน้ำเสียมีโลหะหนักปริมาณต่ำเนื่องจากน้ำเสียที่เก็บมาทำการทดลองเป็นน้ำเสียที่อยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียรวมของนิคมอุตสาหกรรม ซึ่งต้องผ่านการบำบัดขั้นต้น (Pretreatment) จากโรงงานต่าง ๆ ในนิคมอุตสาหกรรมตามเกณฑ์มาตรฐานของนิคมอุตสาหกรรม เพื่อกำจัดโลหะหนักที่ปนเปื้อนในน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดก่อนเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียรวมของนิคมอุตสาหกรรม ซึ่งเป็นแบบบ่อเติมอากาศ (aerated lagoon) ดังแสดงในภาพที่ 1 จึงทำให้มีปริมาณแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ในปริมาณน้อยและอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจาก

โรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม (ประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและ
สิ่งแวดล้อม : ฉบับที่ 3 , พ.ศ. 2539)

1.2 จากผลการศึกษาน้ำจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียรวมของนิคมอุตสาหกรรม พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด เท่ากับ 2.00×10^5 CFUต่อมิลลิลิตร และเมื่อศึกษาจำนวนแบคทีเรียที่สามารถเจริญในอาหารที่มีโลหะหนักที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีจำนวนแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีโลหะหนักที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแคดเมียม , ทองแดง และ สังกะสี เท่ากับ 2.33×10^4 , 3.00×10^4 และ 8.33×10^4 CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยคิดเป็นร้อยละ 11.65% , 15.00% และ 41.65 % ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ตามลำดับ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ากระบวนการบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีทางชีวภาพอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารอินทรีย์และกำจัดธาตุอาหาร เช่น ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ในน้ำเสีย (Metcalf et al., 1991) ซึ่งแบคทีเรียจะมีการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมโดยสร้างระบบการต้านทานโลหะหนักแบบเฉพาะเจาะจงขึ้น (Yilmaz, 2003) ซึ่งสอดคล้องกับ Verma et al.(2001) ศึกษาแบคทีเรียจากน้ำเสียของโรงงานฟอกหนังสัตว์ พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม coliform ที่ทนต่อโครเมตสามารถทนต่อแคดเมียมได้ถึง 87%ของจำนวนไอโซเลตทั้งหมดที่คัดแยกได้ แต่ไอโซเลตที่ทนต่อโครเมตมีจำนวนน้อยที่สามารถทนต่อทองแดง และจากการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในน้ำเสียตรวจไม่พบ ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม heterotrop ทั้งหมดที่คัดแยกได้สามารถทนต่อโครเมตและทองแดงได้ และสอดคล้องกับBanjerdikij et al.(1997) ศึกษาการทนต่อพิษของแคดเมียมจากการสัมผัสกับแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้นต่ำในการฆ่าเชื้อ *Xanthomonas campestris* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในดินและเป็นเชื้อก่อโรคในพืช พบว่า การกำจัดเชื้อด้วยความเข้มข้นของแคดเมียมต่ำทำให้เกิดการพัฒนาการต้านทานต่อความเข้มข้นของแคดเมียมที่ใช้กำจัดเชื้อ และเกิดการ cross resistance กับสังกะสี ซึ่งในการทนต่อแคดเมียมและสังกะสีที่เพิ่มขึ้นเกิดจากกลไกการ efflux ไอออนโลหะ นอกจากนี้ Silver & Walderhaug (1992) รายงานว่าในระบบนิเวศน์ที่มีโลหะหนักปนเปื้อน การต้านทานต่อโลหะหนักของแบคทีเรียอาจพัฒนามาจากกลไกการทนต่อโลหะหนักที่ไม่จำเพาะเจาะจง โดยจะเกี่ยวข้องกับสารพันธุกรรมบนพลาสมิด ดี เอ็น เอ และโครโมโซม และอาจเกิดจากพันธุกรรมหรือการถ่ายทอดยีนต้านทานโลหะหนักซึ่งอยู่บนพลาสมิด หรือ R-factors (resistance factors) ระหว่างประชากรแบคทีเรียในแหล่งน้ำ

2. การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของโลหะหนักที่แบคทีเรียเจริญได้

จากการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของโลหะหนักที่แบคทีเรียเจริญได้ (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) โดยนำแบคทีเรียไปทดสอบความทนต่อโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้น 100 – 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลจากการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของโลหะหนักที่สามารถยับยั้งการเจริญของ เชื้อแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนทั้งหมด 32 ไอโซเลต โดยแบ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถทนต่อแคดเมียมที่ระดับสูงกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 1 ไอโซเลต แบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงได้ที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 15 ไอโซเลต และแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสีได้ที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 16 ไอโซเลต

จากผลการศึกษาความทนต่อโลหะหนัก แคดเมียม ทองแดง และสังกะสี พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถทนต่อแคดเมียม ทองแดง และสังกะสีได้ที่ระดับความเข้มข้นที่สูง โดยแบคทีเรียทนต่อแคดเมียมที่คัดแยกได้มีจำนวนมากในช่วง 600 – 700 มิลลิกรัมต่อลิตร (2.7-3.8mM) และแบคทีเรียทนต่อทองแดงมีจำนวนมากที่ระดับความเข้มข้นทองแดงสูงกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (6.3 mM) นอกจากนี้แบคทีเรียที่สามารถทนต่อสังกะสีที่คัดแยกได้มีจำนวนมากที่ทนต่อสังกะสีได้สูงกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (6.2 mM) จากผลแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถทนต่อโลหะหนักได้สูง สอดคล้องกับการศึกษาของ Filali et al. (2000) ได้คัดแยกแบคทีเรียจากน้ำเสียของเมืองในเขตอุตสาหกรรม พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้มี 5 สายพันธุ์ ประกอบด้วยสายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* และ *Staphylococcus sp.* โดย *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* และ *Staphylococcus sp.* สามารถทนต่อแคดเมียมที่ MIC เท่ากับ 2,000 μM ส่วน *Klebsiella pneumoniae* สามารถทนต่อแคดเมียมที่ MIC เท่ากับ 4,000 μM และสามารถทนต่อทองแดง เท่ากับ 6,000 μM นอกจากนี้ *Klebsiella pneumoniae* และ *Proteus mirabilis* ยังสามารถทนต่อสังกะสีได้ถึง 2,000 μM และสอดคล้องกับ Zeroual et al (2001) ที่คัดแยกแบคทีเรียจากน้ำเสียในเขตอุตสาหกรรมโดย คัดเลือกแบคทีเรียจากน้ำเสียที่ปนเปื้อนปรอท โดยพบว่า *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas putida*, *Enterobacter agglomerans* และ *Proteus mirabilis* สามารถทนต่อปรอทได้สูง และ *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans* และ *Proteus mirabilis* สามารถทนต่อแคดเมียมโดยมีค่า MIC เท่ากับ 1,000 μM และ *Pseudomonas putida* สามารถทนต่อแคดเมียมโดยมีค่า MIC เท่ากับ 4,000 μM และแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด สามารถทนต่อทองแดงและสังกะสีโดยมีค่า MIC 8,000 μM

นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียชนิดอื่นที่คัดแยกได้สามารถทนต่อโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้นสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานอื่นที่ทำการศึกษาก่อนหน้านี้ ในการศึกษาไม่ได้ศึกษาถึงกลไกการทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียแต่จากการศึกษาของ Silver & Walderhaug (1992) พบว่าแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักส่วนใหญ่มีเอ็นที่ควบคุมการทนต่อโลหะหนักบนพลาสมิด ดีเอ็นเอ หรือโครโมโซม นอกจากนี้ Nies(1999) รายงานว่าการทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียประกอบด้วยกลไกต่างๆ เช่น ระบบการ efflux โลหะหนักออกนอกเซลล์ การสะสมโลหะหนัก(accumulation) ภายในและภายนอกเซลล์ การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนขึ้นภายในเซลล์ การลดความเป็นพิษ นอกจากนี้กลไกการลดการขนส่งไอออนโลหะหนักเข้าสู่เซลล์ก็เป็นกลไกที่สำคัญในการทนต่อโลหะหนัก (Laddaga et al,1985 ; Nies & Silver, 1989) สอดคล้องกับ Ahuja et al.(2001) ศึกษากลไกการทนต่อสังกะสีของ cyanobacterium สายพันธุ์ *Oscillatoria angustissima* พบว่ากลไกการ efflux สังกะสีเกิดขึ้นหลังจากการส่งผ่านสังกะสี เข้าไปภายในเซลล์ได้สูงสุด ซึ่งการป้องกันพิษจากสังกะสีของเซลล์นี้เป็นผลจากการลดการส่งผ่าน (reduced uptake) สังกะสีเข้าภายในเซลล์ และสอดคล้องกับ Cooksey et al.(1993) รายงานว่าเชื้อก่อโรคพืช *Pseudomonas syringae* ด้านทานทองแดงด้วยระบบการสะสม (accumulation) และ compartmentalization ซึ่งเกิดขึ้นใน periplasm และเซลล์เมมเบรนชั้นนอกของแบคทีเรีย โดยทองแดงเข้าไปจับกับโปรตีนบน plasmid – borne cop operon และสะสมใน periplasm ของเซลล์และผนังเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ส่วนในเชื้อ *E.coli* K-12 มีเอ็น zntA ซึ่งเอ็นนี้ควบคุมการขับสังกะสีและแคดไอออนอื่นโดยใช้พลังงาน ATP ออกจากเซลล์เมมเบรน (Beard et al, 1997)

3. ผลของความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญของแบคทีเรียกับความเข้มข้นโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้น 0 , 25 , 50 , 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญของแบคทีเรียกับความเข้มข้นโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50, 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโลหะหนักความเข้มข้นสูงได้ โดย แบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมที่สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีแคดเมียมผสม คือ Cd-33, Cd-35 และ Cd 36 โดยที่ความเข้มข้น 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมสามารถเจริญได้ดี เท่ากับแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีแคดเมียม(ชุดควบคุม) แต่ที่ความเข้มข้นแคดเมียม 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียสามารถเจริญได้เพียง 50 % ของแบคทีเรียชุดควบคุม ส่วนแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงที่สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีทองแดงผสม คือ Cu-1, Cu-3 และ Cu-17 โดยแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีทองแดง 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ไม่ต่างจากแบคทีเรียชุด

ควบคุม และแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสีที่สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีสังกะสีผสม คือ Zn-18 , Zn-32 และ Zn-35 โดยแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสีสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีสังกะสี 25 , 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ใกล้เคียงกับแบคทีเรียชุดควบคุม จากผลแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโลหะหนักผสมอยู่ แต่ที่โลหะหนักความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมจะเจริญได้น้อยกว่าแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงและสังกะสี เนื่องจากระดับความเป็นพิษที่ต่างกันของโลหะหนัก สอดคล้องกับ Hassen et al (1998) ศึกษาการทนต่อโลหะหนักชนิดต่างๆ ของแบคทีเรียโดยใช้อาหารแข็งและอาหารเหลว พบว่า แบคทีเรียจะทนต่อโลหะหนักแต่ละชนิดได้ไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับระดับความเป็นพิษ โดยเรียงระดับความเป็นพิษของโลหะหนักไว้ คือ Hg >Co> Cd> Cu ~ Cr> Zn ตามลำดับ และการทดสอบการทนต่อโลหะหนักในอาหารเหลวจะไวต่อโลหะหนักมากกว่าการทดสอบในอาหารแข็ง 10-1,000 เท่าโลหะหนักบางชนิดเป็นโลหะที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย (Ji & silver , 1995) แต่โดยทั่วไปโลหะหนักจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยขัดขวางหมู่ฟังก์ชันที่จำเป็นสำหรับแบคทีเรียหรือโดยการเข้าแทนที่โลหะที่จำเป็น (Hassen et al 1998) และสอดคล้องกับ Roane & Paper (2000) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ต่างกันจะทนต่อแคดเมียมโดยใช้กลไกที่แตกต่างกัน โดยพบว่าแคดเมียมจะมีความสามารถในการละลายลดลงในระหว่างช่วงการเจริญของ *Bacillus* strain H9 และ *Pseudomonas* strain H1 นอกจากนี้ Haq et al (1999) พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเสีย คือ *Enterobacter cloacae* และ *Klebsiella* spp. สามารถทนต่อ Cd , Pb และ Cr ได้ที่ระดับความเข้มข้นสูงในระหว่างที่แบคทีเรียเจริญในอาหาร และสามารถกำจัดแคดเมียมในระหว่างการเจริญได้ถึง 85 % ดังนั้นการกำจัดโลหะหนักให้มีประสิทธิภาพต้องอาศัยช่วงเวลาที่เหมาะสมที่เชื้อเจริญ *E. cloacae* และ *Klebsiella* strain1 มีประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนักสูงในช่วง late log phase ส่วน *Klebsiella* strain2 มีประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนักในช่วง early log phase (Anushree ,2004) และจากการศึกษาของ Yilmaz (2003) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus circularis* สามารถทนและกำจัดโลหะหนักคือ Mn, Zn, Cu, Ni และ Co ได้ในระหว่างการเจริญ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Baldry & Dean (1980) พบว่า การกำจัดทองแดงใน *E.coli* จะเกิดขึ้นในช่วง late logarithmic phase ตรงข้ามกับการศึกษาของ Chang et al (1997) ที่พบว่า การกำจัดทองแดงไม่ได้มีผลมาจากช่วงการเจริญของแบคทีเรีย

4. ผลของพีเอชและความเข้มข้นโลหะหนักที่มีต่อการกำจัดโลหะหนัก

จากการศึกษาผลของพีเอชและความเข้มข้นของโลหะหนักที่มีผลต่อการกำจัดโลหะหนักของแบคทีเรีย โดยศึกษาที่พีเอช 3.0-6.0 และความเข้มข้นของโลหะหนักที่ 0-100 มิลลิกรัมต่อ

ลิตร พบว่า แบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียม สามารถกำจัดแคดเมียมได้ดีที่สุดที่พีเอช 6.0 ความเข้มข้นแคดเมียม 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยกำจัดได้ 25.11 ± 0.91 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดง สามารถกำจัดทองแดงได้สูงสุดที่พีเอช 5.0 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยกำจัดได้ 52.84 ± 0.78 มิลลิกรัมต่อลิตร และแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสี มีประสิทธิภาพในการกำจัดสังกะสีสูงสุดที่พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยกำจัดได้ 46.56 ± 0.59 มิลลิกรัมต่อลิตร

การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาผลของพีเอชและความเข้มข้นโลหะหนักร่วมกันในการกำจัดโลหะหนัก แต่เพื่อให้เห็นแนวโน้มของผลที่เกิดขึ้นอย่างชัดเจนจึงจะแยกผลของพีเอชและความเข้มข้นของโลหะหนัก โดยจากการศึกษา พบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการกำจัดแคดเมียมได้ดีที่สุดคือ พีเอช 6.0 รองลงมาคือ 5.0 , 4.0 , 3.0 และ 7.0 ตามลำดับส่วนพีเอชที่เหมาะสมในการกำจัดทองแดงคือ พีเอช 5.0 รองลงมาคือ 6.0 , 4.0 , 3.0 และ 7.0 ตามลำดับและพีเอชที่เหมาะสมต่อการกำจัดสังกะสี คือ พีเอช 6.0 รองลงมาคือ 5.0 , 4.0 , 7.0 และ 3.0 ตามลำดับจากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นประสิทธิภาพในการกำจัดก็เพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากที่พีเอชต่ำที่ผิวหน้าเซลล์เป็นประจุบวกมากทำให้ลดการจับกันของหมู่ฟังก์ชันกับโลหะที่ผนังเซลล์แต่เมื่อพีเอชเพิ่มผิวหน้าเซลล์จะเป็นประจุลบมากขึ้นทำให้เพิ่มพื้นที่ในการจับกันของหมู่ฟังก์ชันกับโลหะ (Chen et al, 2005) หรืออาจเกิดจากพีเอชในสารละลายเพิ่มขึ้นจะทำให้การแย่งจับของ H^+ และ H_3O^+ ในสารละลายลดลง (Puranik et al., 1995; Chang et al., 1997) ซึ่งสอดคล้องกับ Liu et al (2004) รายงานว่า การนำเข้าโลหะหนักของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับพีเอชเนื่องจากหมู่ฟังก์ชันที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียจะเป็นตัวกำจัดโลหะ เช่น คาร์บอกซิล ฟอสเฟต และเอมีน ซึ่งจะ deprotonate ที่พีเอชสูง โดยที่พีเอชสูงหมู่ฟังก์ชันจะจับกับโลหะได้มากโดยที่ไม่มีโปรตอนมาแย่งจับ นอกจากนี้ McLean & Beveridge (1990) รายงานว่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการกำจัดโลหะหนักของแบคทีเรีย เนื่องจากที่สภาพเป็นกรดการจับกับโลหะหนักจะถูกจำกัดโดยการเพิ่มขึ้นของโปรตอนที่มาแย่งจับกับ binding site ซึ่งมีประจุลบ และเมื่อเพิ่มพีเอชจะทำให้ประจุลบบริเวณผิวหน้าของเซลล์เพิ่มขึ้น ทำให้สามารถจับกับโลหะหนักได้มากขึ้น และการศึกษาของ Gourdon et al (1990) พบว่า ที่ พีเอช 6-7 แบคทีเรียแกรมบวกสามารถกำจัดแคดเมียมได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ประมาณ 20 % แสดงว่า glycoprotein และ teichoic acid บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกสามารถตอบสนองต่อโลหะหนักได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

สำหรับผลของความเข้มข้นโลหะหนักที่มีผลต่อการกำจัดโลหะหนัก พบว่า ความเข้มข้นของแคดเมียมที่เหมาะสมต่อการกำจัดของแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียม คือ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ 25, 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นทองแดงที่เหมาะสมต่อ

การกำจัดของแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดง คือ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ 75, 50 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และความเข้มข้นของสังกะสีที่เหมาะสมต่อการกำจัดของแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสี คือ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ 75, 50 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของโลหะหนักก็มีผลต่อการกำจัด โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโลหะหนัก ประสิทธิภาพการกำจัดก็เพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโลหะหนัก จะช่วยเพิ่มการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโลหะกับแบคทีเรีย (Ozturk et al ,2004) และจากการศึกษาของ Gourdon et al (1990) รายงานว่า ความเข้มข้นของโลหะหนักมีผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดของแคดเมียม โดยแคดเมียมที่ความเข้มข้นสูงจะมีผลต่อกระบวนการหายใจของแบคทีเรีย ความเข้มข้นของแคดเมียมเพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร กิจกรรมการหายใจของแบคทีเรียจะลดลง 65 %

5. ประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนักของแบคทีเรีย

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนักของแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนัก โดยศึกษาในรูปของเซลล์อิสระ (free cell) เซลล์ตรึงรูป (immobilized cell) โดยเปรียบเทียบกับไซโตียมอัลจิเนต พบว่า เซลล์ตรึงรูปของแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมสามารถกำจัดแคดเมียมได้ดีที่สุด คือ $89.43 \pm 1.25\%$ รองลงมาคือ ไซโตียมอัลจิเนต และเซลล์อิสระ โดยกำจัดได้ $72.62 \pm 0.99\%$ และ $62.76 \pm 1.25\%$ ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงสามารถกำจัดทองแดงได้ดีที่สุดในรูปเซลล์ตรึงรูป โดยกำจัดได้ $89.43 \pm 1.25\%$ รองลงมา คือ ไซโตียมอัลจิเนต และเซลล์อิสระ กำจัดได้ $79.12 \pm 1.26\%$ และ $64.67 \pm 1.18\%$ ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสีสามารถกำจัดสังกะสีได้ดีที่สุดในรูปเซลล์ตรึงรูป โดยกำจัดได้ $81.63 \pm 1.16\%$ รองลงมา คือ ไซโตียมอัลจิเนต และเซลล์อิสระ กำจัดได้ $75.85 \pm 0.83\%$ และ $56.20 \pm 0.86\%$ ตามลำดับ และเมื่อเทียบประสิทธิภาพการกำจัดในช่วงเวลาเดียวกัน พบว่า การกำจัดโลหะหนักของเซลล์อิสระจะใช้เวลานานในการกำจัดจนถึงจุดที่มีประสิทธิภาพการกำจัดสูงสุด โดยใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง แต่สำหรับเซลล์ตรึงรูปและไซโตียมอัลจิเนตจะใช้เวลา ในการกำจัดโลหะหนักสั้นมาก โดยเซลล์ตรึงรูปจะใช้เวลาประมาณ 4-8 ชั่วโมง ส่วนไซโตียมอัลจิเนตจะใช้เวลา 2 ชั่วโมงในการกำจัดจนถึงจุดสูงสุด จากการศึกษาของ Chen et al (2005) ศึกษาการกำจัดทองแดงและสังกะสี โดยใช้แบคทีเรีย *Pseudomonas putida* CZ1 พบว่าการกำจัด โลหะหนักของเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิต จะมี 2 ระยะ ระยะแรกเป็นการกำจัดอย่างรวดเร็วโดยจะใช้เวลาประมาณ 10-30 นาที และระยะที่สองเป็นการกำจัดแบบช้า แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่มีชีวิตจะไม่ใช้การกำจัดที่ผิวหน้าเซลล์เพียงอย่างเดียว แต่ในการกำจัดในระยะที่สองแบคทีเรียจะอาศัยกระบวนการเมตาบอลิซึมในการนำเข้าสู่โลหะหนัก จากการศึกษาของ Yilmaz (2003) พบว่า เซลล์ที่มีชีวิตของ *Bacillus*

circulans CZ1 สามารถกำจัดกำจัดโลหะหนัก Mn ได้ 90% , Zn ได้ 68%, Cu ได้ 65%, Ni ได้ 45% และ Co ได้ 40% ตามลำดับ และในการกำจัดโลหะหนักโดยใช้เซลล์ตรึงรูปในงานวิจัยนี้ได้ใช้วัสดุในการตรึงรูปเป็นโพลีเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติ คือ โซเดียมอัลจิเนต ซึ่งตัวโซเดียมอัลจิเนตมีข้อดีในการใช้เป็นวัสดุตรึงรูป คือเป็น biodegradation และมี hydrophilicity สูง นอกจากนี้ยังมี carboxylic groups และเป็นวัสดุจากธรรมชาติ ส่วนข้อเสียมีอย่างเดียว คือ เซลล์ที่ตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนตจะมี mass transfer ซึ่งเกิดจาก polymeric matrix และเมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุกำจัดอื่น พบว่าโซเดียมอัลจิเนตมีข้อได้เปรียบที่มี carboxylic groups ซึ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนักได้ Kacar et al(2002) ได้ศึกษาการตรึงเซลล์ *Phanerochaete chysosporium* ด้วยโซเดียมอัลจิเนตในการกำจัดปรอทและแคดเมียม โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัดระหว่างอัลจิเนตกับเซลล์ที่ตรึงรูปด้วยอัลจิเนตพบว่า ประสิทธิภาพการกำจัดอยู่ระหว่าง 30-500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้เวลาในการกำจัดเพียง 60 นาที โดยเซลล์ที่ตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนตจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดดีกว่าการกำจัดโดยโซเดียมอัลจิเนต จากงานวิจัยต่างๆ ที่มีแสดงให้เห็นว่าการกำจัดโลหะหนักด้วยเซลล์อิสระหรือเซลล์ตรึงรูป หรือใช้โซเดียมอัลจิเนตก็สามารถกำจัดโลหะหนักได้ดี โดยการทำกำจัดด้วยเซลล์ตรึงรูปจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดดีที่สุดในรองลงมาคือ โซเดียมอัลจิเนต และเซลล์อิสระตามลำดับ

6. การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

การคัดแยกแบคทีเรียจากระบบบำบัดน้ำเสียของนิคมอุตสาหกรรม แบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถทนต่อโลหะหนัก 3 ชนิด คือ แคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ได้สูง โดยแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงและสังกะสีมีค่า MIC สูงกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมส่วนใหญ่มีค่า MIC อยู่ในช่วง 500-700 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับงานวิจัยนี้ได้คัดแยกแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักโดยการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ และทางชีวเคมีเบื้องต้น และจากการศึกษาแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram- negative) และมีรูปร่างเป็นแท่ง (rod) มีส่วนน้อยที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram -positive) และมีรูปร่างกลม (cocci) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hassen et al (1998) ที่ศึกษาความทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียพบว่า แบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักมีทั้งที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ และสอดคล้องกับ Zeroual et al (2001) ที่พบว่าแบคทีเรียที่สามารถทนต่อโลหะหนักเป็นแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ นอกจากนี้ Foster et al (1983) พบว่า แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ สามารถทนต่อโลหะหนักได้เหมือนกัน ส่วน Mahler et al (1986) พบว่า แบคทีเรียที่ทน

ต่อแคดเมียมและปรอท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ชนิดที่สร้างสปอร์ (aerobic spore-formers) และแบคทีเรียชนิดนี้สามารถทนต่อยาปฏิชีวนะได้ และ Duxbary et al (1981) รายงานว่า แบคทีเรียแกรมลบที่พบในดินส่วนใหญ่สามารถทนต่อโลหะหนักได้สูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ดังนั้นจากการศึกษานี้และงานวิจัยอื่นแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบสามารถทนและกำจัดโลหะหนักได้

จากการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนัก โดยใช้แบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (ยกเว้นแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมใช้ที่ทนต่อแคดเมียมตั้งแต่ 700 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่า แบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมและมีประสิทธิภาพในการกำจัดสูงสุด คือ ไอโซเลต Cd-33 แบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงและสามารถกำจัดทองแดงได้ดีที่สุดคือ ไอโซเลต Cu-1 และแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสีและสามารถกำจัดสังกะสีได้ดีที่สุด คือ ไอโซเลต Zn-32 นำแบคทีเรียที่ทนโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด มาจำแนกชนิดโดยการตรวจสอบคุณลักษณะทางชีวเคมี และใช้ชุดทดสอบชีวเคมีมาตรฐาน API 20E และ API 20NE (Biomeriux) พบว่า แบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียม เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะเป็นแท่ง เมื่อนำไปทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น พบว่าให้ผล oxidase test เป็นลบ catalase test เป็นบวก ไม่เกิดการ Oxidation/Fermentation และไม่เคลื่อนที่ และเมื่อนำไปทดสอบด้วยชุดทดสอบมาตรฐาน API 20NE พบว่าเป็นแบคทีเรียชนิด *Bordetella/Alcaligenes/ Moraxella* และแบคทีเรียที่ทนต่อสังกะสี มีลักษณะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และมีรูปร่างเป็นแท่ง เมื่อนำไปทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น พบว่าให้ผล oxidase test เป็นลบ catalase test เป็นบวก ไม่เกิดการ Oxidation/Fermentation และไม่เคลื่อนที่ และเมื่อนำไปทดสอบด้วยชุดทดสอบมาตรฐาน API 20E พบว่าเป็นแบคทีเรียชนิด *Acinetobacter junii/ Acinetobacter johsonii* สอดคล้องกับ Tangaromsuk et al (2002) ทำการศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียจากระบบบำบัดน้ำเสียกลางของกรุงเทพมหานคร พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ชนิด *Sphingomonas paucimobilis*. สามารถทนต่อแคดเมียมได้สูงกว่า 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และแบคทีเรียชนิดนี้สามารถกำจัดแคดเมียมได้ถึง 84 % นอกจากนี้ Yilmaz (2003) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียในดินพบว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus circulans* EB1 สามารถทนและกำจัดโลหะหนักได้สูง

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนัก ควรมีการทำแบบจำลองไอโซเทอมเพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนักสูงสุด ณ จุดสมดุล

2. ในการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนักโดยใช้แบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักในรูปเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงรูปในตัวกลาง ผลการทดลองพบว่า เซลล์ตรึงรูปในตัวกลางมีประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนักสูงสุด ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเซลล์ตรึงรูปในตัวกลางไปใช้ในการศึกษาวิจัยต่อไป

3. ในงานวิจัยนี้ทำการทดลองประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนักโดยใช้แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียของนิคมอุตสาหกรรม โดยทำแบบ batch test และ reactor test ซึ่งผลที่ได้พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนักได้ดี ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำแบคทีเรียที่ได้นี้ไปใช้บำบัดโลหะหนักในสภาพแวดล้อมจริงจึงมีความน่าสนใจที่จะนำ แบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปทดลองในระบบบำบัดจริงเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของการนำไปใช้ต่อไป

บรรณานุกรม

- เกรียงศักดิ์ อุดมสินโรจน์. (2543). วิศวกรรมกรรมการกำจัดน้ำเสีย เล่ม 4. กรุงเทพฯ: สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยรังสิต, 665 น.
- ชัยวัฒน์ เจนวาณิชย์. (2525). สารานุกรมธาตุ. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- ทินพันธุ์ เนตรแพ. (2545). การดูดซับแคดเมียมและตะกั่วทางชีวภาพโดย *Aspergillus oryzae*. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- ธงชัย พรรณสวัสดิ์. (2540). คู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย. (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: สมาคมวิศวกรสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บัญญัติ สุขศรีงาม. (2534). จุลชีววิทยาทั่วไป. (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. ราชกิจจานุเบกษา. 113 (13ง). 13 กุมภาพันธ์ 2539.
- พิมล เรียนพัฒนา และ ชัยวัฒน์ เจนวาณิชย์. (2539). เคมีสภาวะแวดล้อม. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- ภาวิณี คณาสวัสดิ์, สุรี พุทธระกุล และ สิทธิโชค แสงไสดา. (2537). การศึกษาวิธีการตรึงเซลล์เทอร์โมฟิลิคแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนเอส. เชียงใหม่ : ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- มันลิน ตันทูลเวศม์. (2543). คู่มือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ. กรุงเทพฯ: ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รัชยาภรณ์ ผลมั่ง และ พูนสุข ประเสริฐสรรพ. (2540). การดูดซับโลหะหนักด้วยแบคทีเรีย. วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 19(3).395-402
- โยธิน สุริยพงศ์. (2542). มลพิษสิ่งแวดล้อม. นครราชสีมา: สถาบันราชภัฏนครราชสีมา.
- วิสุทธิ เหวงศรี. (2537). สารแคดเมียม. วารสารข่าวสารวัตภูมิพิษ. 21(1), 1-3.
- ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา. (2540). ภาวะมลพิษของดินจากการใช้สารเคมี. (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- หิรัญญา เพชรมั่ง. (2537). การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักบางชนิดในน้ำที่ทะเลน้อย. สงขลา: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (ภาคใต้).

- Aaseth, J., & Norseth, T. (1986). Handbook on the Toxicology of Metal. Elsevier, 2, 233 – 257.
- Ahuja, H. et al. (2001). Reduced Uptake as a Mechanism of Zinc Tolerance in *Oscillatoria anguisissima*. Current Microbiology, 43, 305-310.
- Aiking, H. et al. (1982). Adaptaion to cadmium by *Klebsiella aerogenes* growing in continuous culture proceeds mainly via formation of cadmium sulfate. Appl Environ Microbiol, 44, 938-944.
- Aiking, H. et al. (1984). Inorganic phosphate accumulation and cadmium detoxification in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture. Appl Environ Microbiol, 47, 374-377.
- Aksu, Z., Egretli, G., & Kutsal, T. (1998). A comparative study of copper biosorption on Ca-alginate, agarose and immobilized *C. vulgaris* in a packed – bed column. Process Biochemistry, 33, 393–400.
- Aksu, Z. et al. (1992). The biosorption of copper (II) by *C.vulgaris* and *Z.ramigera*. Environ Technol, 13, 579-586.
- Angela Vecchio., Carlo Finoli., & Damiano Di Simine. (1998). Heavy metal biosorption by bacterial cells. J. Anal Chem, 361, 338–342.
- Baath, E. (1989). Effect of heavy metals in soil on microbial processes and populations. Water Air Soil Polutt, 47, 335-379.
- Barceloux, D.G. (1999). Zinc. J. Toxicol Clin Toxicol, 37, 279–292.
- Beard, S.J. et al. (1997). Zinc(II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: Evidence that the *zntA* gene encodes a cation transport ATPase. Molecular Microbiology, 25, 883-891.
- Blackwell, K.J., Singleton, I. & Tobin, J.M. (1995). Metal cation uptake by yeast : a review. Appl. Microbiol. Biotechnol, 43, 579-584.
- Brierley, C.L. (1990). Metal immobilization using bacteria. In Microbial Mineral Recovery. New York: MCGraw-Hill.
- Bomstein, R.A. et al. (1972). Waste treatment with microbial nucleoprotein flocculating Agent, 3, 684-706.
- Canstein, van. H. et al. (1999). Removal of Mercury from Chloralkali Electrolysis

- Wastewater by a Mercury- Resistant *Pseudomonas putida* Strain. Applied and environmental microbiology, 65, 5279–5284.
- Cassidy, M.B., Lee, H., & Trevors, J.T. (1996). Environmental application of immobilized microbial cells. Journal of industrial, 16, 79–101.
- Celaya, R.J., Noriega, J.A., & Yeomans, J.H. (2000). Biosorption of Zn by *Thiobacillus Ferrooxidans*. Bioprocess engineering, 22, 539–542.
- Cooksey, D.A. (1994). Molecular mechanism for copper resistance and accumulation in bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 14, 381-386.
- Cooksey, D.A. (1993). Copper uptake and resistance in bacteria. Molecular Microbiology, 7, 1-5.
- Corale. L. Brierley., Jame. A. Brierley. & Michael. S. Davidson. (1989). Metal Ions And Bacteria. New York. : noplac.
- Cotoras, D. et al. (1992). Biosorption of metal ions by *Azotobacter vinelandii*. World J. Microbiol. Biotechnol,8,319-323.
- David. B. Knaeble., Keith. E. Stormo., & Ronald. L. Crawford. (1997). Bioremediation Protocols. Noplac.
- Dott, W., & Kampfer, P. (1988). Biochemical methods for automated bacterial Identification and testing metabolic activities in water and wastewater. Proceedongs of the International Conference on Water and Wastewater Microbiology (Feb.8-11). CA: Newport Beach.
- Feng, Y., Racke, D.K., & Bollag, M.J. (1997). Use of immobilized bacteria to treat industrial wastewater containing a chlorinated pyridinol. Appl Microbiol Biotechnol, 23, 73–77.
- Filali, K.B. et al. (2000). Waste water bacterial isolates resistant to heavy metal and Antibiotic. Current microbiology,41, 151–156.
- Gadd, G.M. (2000). Bioremediation potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. Current Opinion in Biotechnology, 11, 271–279.
- Gadd, G.M. (1988). Accumulation of metals by microorganism and algae. Biotechnology, 66, 401-433.

- Gadd, G.M. (1992). Microbial control of heavy metal pollution. In Microbial Control of Pollution. Society for general Microbiology Symposium 48. Noplace: The University of Cardiff.
- Gordon, A.S., Howell, L.D. & Harwood, V. (1994). Response of diverse heterotrophic bacteria to elevated copper concentrations. Can J. Microbiol, 40, 408-411.
- Gourdon, R. et al. (1990). Comparison of cadmium biosorption by Gram-positive and Gram-negative bacteria from activated sludge. Biotechnol.Lett, 12 (11), 839-842.
- Gourdon, R. et al. (1990). Mechanism of cadmium uptake by activated sludge. Appl. Microbiol, 34, 274-278.
- Gupta, A. et al. (1992). Amplification and rearrangement of a prokaryotic metallothionein locus *smt* in *Synechococcus* PCC-6301 selected for tolerance to cadmium. Proc. R. Soc. Lond Ser B Biol Sci, 248, 273-281.
- Holan, Z.R. et al. (1993). Biosorption of cadmium by biomass of marine algae. Biotechnol. Bioeng, 41, 819-825.
- Hsu, J.P. & Chiang, T.Y. (1991). Removal of cadmium ions in wastewater through biosorption, 7, 571-572.
- Kasan, H.C. (1993). The role of waste activated sludge and bacteria in metal-ion removal from solution. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 23 (1), 79 -117.
- Khattar, J.I.S., Sarma, T.A., & Singh D.P. (1999). Removal of chromium ions by agar immobilized cells of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* in continuous flow bioreactor. enzyme and microbial technology, 25, 564-568.
- Kolet, F.B. (1981). Microbial carrier – strategy for selection. Proc. Biochem, 5, 2-9.
- Krell, P.J. & Beveridge, T.J. (1985). The structure of bacteria and molecular biology of viruses. Cytology and cell Physiology.Int. Rev. Cytol. Suppl.17. New York: Academic,
- Laddaga, R.A., Bessen, R. & Silver, S. (1985). Cadmium tolerance mutant of *Bacillus subtilis* 168 with reduced cadmium transport. J Bacteriol, 162, 1106-1110.
- Laws, E.A. (1993). Metals in aquatic pollution :An introductory text. U.S.A.: John Wiley & Sons.

- Lester, E.A. (1987). Heavy metals in wastewater and sludge treatment process (Vol.1-2). Florida: CRC Press.
- Lin, C. & Olson, B.H. (1995). Occurrence of cop-like resistance genes among bacteria isolated from a water distribution system. Can J Microbiol, 41, 642-646.
- Lodi, A., Solisio, C., & Converti, A. (1998). Cadmium Zinc Copper Silver and Chromium removal from wastewaters by *Sphaerotilus natans*. Bioprocess Engineering, 19,197 – 203.
- Macaskie, L.E. & Dean, A.C.R. (1982). Cadmium Accumulation By Micro-organisms. Environ.Technol.Let, 3, 49-56.
- Madgwick, J.C. (1994). Biological sorption and uptake of toxic metal ion from waste waters. Biotechnol, 4 (5), 357-379.
- Mahan, C.A. & Holcombe, J.A. (1992). Immobilisation of algae cells on silica gel and their characterization for trace metal preconcentration. Anal. Chem, 64,1933-1939.
- Mchale, A.P. & Mchale, S. (1994). Microbial biosorption of metals : potential in the treatment of metal pollution. Biotech Adv, 12, 647-652.
- Mergeay, M. et al. (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. J Bacteriol, 162, 328-334.
- Nies, D.H. (1992). CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of cobalt, zinc, and cadmium resistance(czc) in *Alcaligenes eutrophus*. J.Bacteriol, 174, 8102-8110.
- Nies, D.H. (1999). Microbial heavy metal resistance. Appl Microbiol Biotechnol, 51, 730-750.
- Nies, D.H. & Silver, S. (1989). Plasmid determined inducible efflux is responsible for Resistance to cadmium ,zinc and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. J Bacteriol, 171, 896-900.
- Nies, D.H. & Silver, S. (1995). Lon efflux system involved in bacterial metal resistances. J Industrial Microbiol, 14, 186-199.
- Olafson, R.W., Abel, K. & Sim, R.G. (1979). Procarytic metallothionein : Preliminary Characterization of a blue green alge heavy-metal binding protein. Biochem.

- Biophys Res Commun, 89, 36.
- Pattanapitpaisal, N.L., Brown., & Macaskie, L.E. (2001). Chromate reduction by *Microbacterium liquefaciens* immobilised in polyvinyl alcohol. Biotechnology Letters, 23, 61–65.
- Pazirandeh, M., Well, B.M. & Ryan, R.L. (1998). Development of bacterium-based heavy metal biosorbents : entranced uptake of cadmium and mercury by *Escherichia coli* expressing a metal binding motif. Appl Environ microbiol, 64(10), 4068-4072.
- Peter, K., Robinson., & Simon, C. (1994). Removal of aqueous mercury and phosphate by Gel-entrapped *Chlorella* in packed-bed reactors. Enzyme Microb, 16, 802–807.
- Ragan, H.A. & Mast, T.J. (1990). Cadmium inhalation and male reproductive toxicity. Rev Environ Contam Toxicol, 114, 1-22.
- Ruiz – Manriquez, A. et al. (1997). Biosorption of Cu by *Thiobacillus ferrooxidans*. Bioprocess Engineering, 18, 113–118.
- Scott, J.A. & Karanjikar, A.M. (1992). Repeated cadmium biosorption by regenerated *Enterobacter aerogenes* biofilm attached to activated carbon. Biotechnol.Lett, 8, 737-740
- Silver, S. (1996). Bacterial heavy metal resistance: New surprises. Ann Rev Microbiol, 50, 753-789.
- Silver, S. & Walderhaug, M. (1992). Gene regulation of plasmid-andchromosomal-determined inorganic ion transport in bacteria. Microbiol Rev. 56, 195-228.
- Silver, S. & Tapan K. Misra. (1988). Metal Ions And Bacteria. New York.: noplac.
- Suwalsky, M. et al. (1998). Cu^{2+} ions interact with cell membrane. J. Inorg Biochem, 70, 233-238.
- Sze, K.F., Lu, Y.S., & Wong, P.K. (1996). Removal and recovery of copper ion (Cu^{2+}) from electroplating effluent by a bioreactor containing magnetite-immobilized cells of *Pseudomonas putida* 5x. resources conservation and recycling, 18, 175-193.
- Tangaromsuk, J. et al. (2002). Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis*

- Biomass. Bioresource Technology, 85, 103–105.
- Taniguchi, J. (2000). Zinc biosorption by a zinc-resistant bacterium, *Brevibacterium* sp. Strain HZM-1. Appl. Microbiol. Biotechnol., 54, 581–588.
- Thelwell, C., Robinson, N.J. & Turner-Cavet, J.S. (1998). An SmtB-like repressor from *Synechocystis* PCC 6803 regulates a zinc exporter. Proc Natl Acad Sci USA, 95, 10728-10733.
- Terrance, J. Beveridge. (1989). Metal Ions And Bacteria. New York : noplac.
- Thakur, A., & Kumar, H.D. (1999). Nitrate ammonium and phosphate uptake by the immobilized cells of *Dunaliella salina*. Bull. Environ. Contam. Toxicol, 62, 70-76.
- Valentine, N.B. et al. (1996). Biosorption of cadmium, cobalt, nickel, and strontium by a *Bcaillus simplex* strain isolated from the vadose zone. J.Ind.Microbiol, 16, 189-196.
- Voet, D. & Voet, J.G. (1995). Biochemistry. (2nd ed.). New York: John Wiley & Sons.
- Volesky, B. (1990). Removal and recovery of heavy metals by biosorption. Biosorption of heavy metal, 14, 139-172.
- Weast, R.C. (1984). CRC handbook of chemistry and physics, 64 edn. CRC, Boca Raton, Fla. Noplac.
- Yasemin Kacar. et al. (2002). Biosorption of Hg and Cd from aqueous solutions comparisin of biosorptive capacity of alginate and immobilized live and heat inactivateg *Phanerochaete chrysosporium*. Process Biochemistry, 37, 601–610.
- Zhou, J.L. & Kiff, R.J. (1991). The uptake of copper from aqueous solution by immobilized fungal biomass. J. Chern Technol.Biotechnol, 52, 317-330.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานแคดเมียมความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ซึ่ง $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 2.0315 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 200 มิลลิลิตร
เติมกรดไนตริกเข้มข้น 1.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร

2. สารละลายมาตรฐานทองแดงความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ซึ่ง $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 3.9319 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 200 มิลลิลิตร
เติมกรดไนตริกเข้มข้น 1.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร

3. สารละลายมาตรฐานสังกะสีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ซึ่ง $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.3966 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 200 มิลลิลิตร
เติมกรดไนตริกเข้มข้น 1.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร

4. NaOH 1 N

เตรียมสารละลาย 100 มิลลิลิตร โดย ซึ่ง NaOH 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร จนละลายเข้ากันนำไปปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100
มิลลิลิตร

5. HCl 1 N

ปิเปต HCl เข้มข้น ปริมาตร 8.3 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้า
กันนำไปปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient agar

ส่วนประกอบ

- Meat extract	3.0	กรัม
- Peptone from meat	5.0	กรัม
- Agar	15.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ที่อัตราส่วน 20 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร คนจนละลายหมด ปรับ pH 6.8 ± 2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Nutrient broth

ส่วนประกอบ

- Meat extract	3.0	กรัม
- Peptone from meat	5.0	กรัม
- Agar	15.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ที่อัตราส่วน 20 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร คนจนละลายหมด ปรับ pH 6.8 ± 2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Tryptic Soy Agar

ส่วนประกอบ

- Peptone from casein	15.0	กรัม
- Peptone from soy meal	5.0	กรัม
- Sodium chloride	5.0	กรัม
- Agar	15.0	กรัม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar ที่อัตราส่วน 40 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนจนละลายหมด ปรับ pH 7.3 ± 0.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. เตรียมอาหารผสมโลหะหนัก (Cd, Cu,Zn) (Filali et al.,2000)

อาหารผสมโลหะหนักประกอบด้วย

- อาหาร Trypticase Soy Agar (TSA)
- สารละลาย $CdCl_2$ 1,000 มิลลิลิตร/ลิตร
- สารละลาย $CuSO_4$ 1,000 มิลลิลิตร/ลิตร
- สารละลาย $ZnSO_4$ 1,000 มิลลิลิตร/ลิตร

วิธีการเตรียม

การเตรียมอาหารผสมโลหะหนักที่ความเข้มข้น 100 – 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยชั่งอาหาร Trypticase Soy Agar (TSA) 10 กรัม เติมสารละลายโลหะหนักความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 และ 250 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของโลหะหนักในอาหาร 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร คนจนละลายและผสมเข้ากันปรับค่า pH 6.5 ด้วย NaOH 1 N และ HCl 1 N นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

หลักการ, วิธีการทดสอบชุดทดสอบมาตรฐาน API, ภาพแสดงการทดสอบทางกายภาพ และภาพแสดงผลการทดสอบ API

1. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

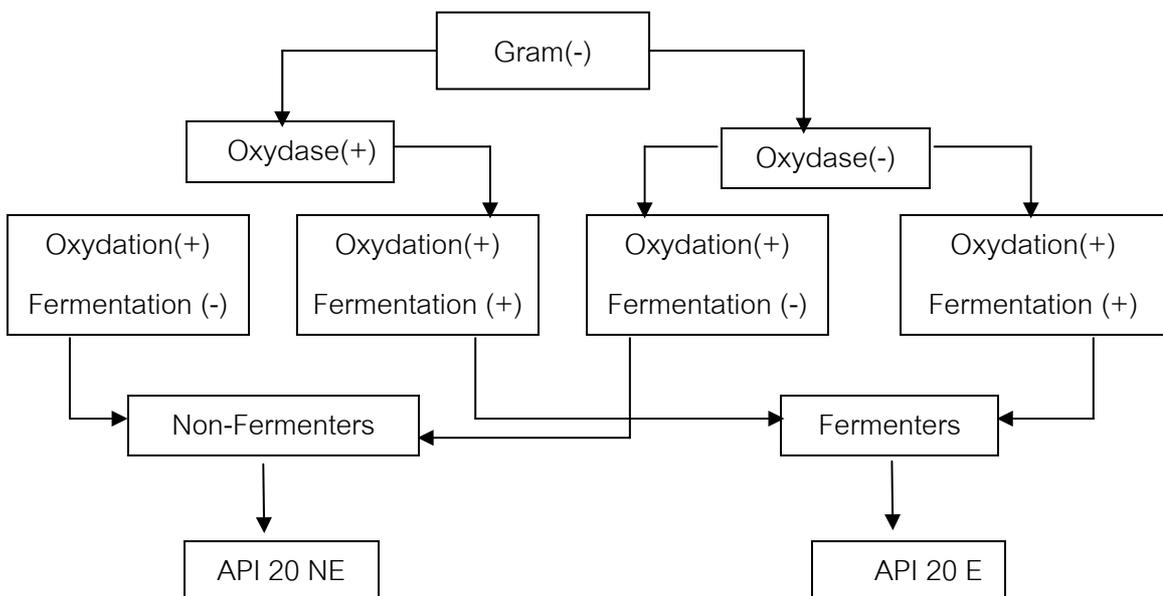
1.1 ตรวจสอบเอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

1.1.1 ตรวจสอบเอกลักษณ์ทางกายภาพของแบคทีเรีย ได้แก่ การติดสีย้อมแกรมแบคทีเรีย (Gram stain reaction) เพื่อศึกษารูปร่าง การเรียงตัวแบคทีเรีย และการเคลื่อนที่

1.1.2 ตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้น ได้แก่ ทดสอบ Oxidation/Fermentation (OF) basal medium (1% glucose) เพื่อวิเคราะห์การใช้กลูโคส Oxidation/Fermentation, การทดสอบเอนไซม์ oxidase, และการทดสอบเอนไซม์ catalase

1.2 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมีมาตรฐาน API-20E (Biomerieux) และ API-20NE (Biomerieux) เลือกชุดทดสอบที่เหมาะสม โดยทดสอบการติดสีย้อมแกรม การเคลื่อนที่ ทดสอบเอนไซม์ oxidase และทดสอบ OF-test

2. หลักการทดสอบชุดทดสอบทางชีวเคมีมาตรฐาน API และวิธีการทดสอบ



ภาพ 6 แสดงแผนผังการเลือกใช้ชุดทดสอบทางชีวเคมีมาตรฐาน API

สำหรับแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ, รูปแท่ง

ที่มา : Biomerieux Vitek.,Inc.

1. หลักการการจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 20 NE

ชุดทดสอบ API 20 – NE เป็นระบบการจำแนกชนิดแบคทีเรีย non-fastidious, non-enteric ของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบรูปเซลล์แท่ง (Gram-negative rods) เช่น *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas* และอื่นๆ การทดสอบประกอบด้วย การทดสอบทางชีวเคมีทั่ว ๆ ไปจำนวน 8 ชนิด และการตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอน โดยทดสอบการย่อยสลายแหล่งคาร์บอนจำนวน 12 ชนิด ในชุดทดสอบประกอบด้วย cupule ที่มีสับสเตรตบรรจุอยู่ภายใน ทำการทดสอบโดยการเติม suspension ของแบคทีเรีย ตรวจสอบโดยดูการเปลี่ยนสีที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียกับสับสเตรตภายใน cupule และดูการเจริญของแบคทีเรียในแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ตรวจสอบผลการทดสอบสามารถอ่านผลได้ 2 อย่าง คือ เทียบกับข้อมูล Analytical Profile Index หรือเทียบโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ API-20NE Version 6.0

2. หลักการจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 20 E

ชุดทดสอบ API 20 E เป็นระบบการจำแนกชนิดแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง โดยจำแนกแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* และ non-fastidious อื่น ๆ โดยในชุดทดสอบประกอบด้วย การทดสอบทางชีวเคมีจำนวน 21 ชนิด cupule ในชุดทดสอบบรรจุสับสเตรตสำหรับการทดสอบแต่ละชนิด ทำการทดสอบโดยเติมแบคทีเรียที่ทำ suspension ขึ้นมาใหม่ และในระหว่างบ่มเชื้อจะเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึมได้สารเมตาบอไลต์ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของสับสเตรตในแต่ละชนิดของการทดสอบ และตรวจเทียบผล โดยเทียบผลกับข้อมูล Analytical Profile Index หรือเทียบโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ API-20E Version 4.0

ตาราง 26 แสดงการทดสอบทางชีวเคมีของชุดทดสอบ API-20E

Tests	Substrate	Reaction/Enzymens
PNPG	PNPG	\square -galactosidase
<u>ADH</u>	arginine	Arginine dehydrolase
<u>LDC</u>	lysine	Lysine decarboxylase
<u>ODC</u>	ornithine	Ornithine decarboxylase
<u>[CIT]</u>	citrate	Citrate utilization
<u>H₂S</u>	Sodium thiosulfate	H ₂ S production
URE	urea	Urease
TDA	tryptophane	Deaminase
IND	tryptophane	Indole production
<u>[VP]</u>	Sodium pyruvate	Acetoin production
<u>[GEL]</u>	Charcoal gelatin	Gelatinase
GLU	glucose	Fermentation / Oxidation
MAN	Mannitol	Fermentation / Oxidation
INO	inositol	Fermentation / Oxidation
SOR	sorbitol	Fermentation / Oxidation
RHA	rhamnose	Fermentation / Oxidation
SAC	sucrose	Fermentation / Oxidation
MEL	melibiose	Fermentation / Oxidation
AMY	amygdalin	Fermentation / Oxidation
ARA	arabinose	Fermentation / Oxidation
NO ₃	Potassium nitrate	NO ₂ production / reduction to N ₂ gas
OF-O / OF-f	-	Oxidative / Fermentative
OX	-	Cytochrome oxidase
McC	-	Grown
MOB	-	Motility

ที่มา : Biomerieux Vitek.,Inc

ตาราง 27 แสดงการอ่านผลการทดสอบด้วยชุดทดสอบมาตรฐาน API-20E

<i>Tests</i>	Results	
	Negative	Positive
ONPG	colorless	yellow
<u>ADH</u>	yellow	red / orange
<u>LDC</u>	yellow	red / orange
<u>ODC</u>	yellow	red / orange
<u>[CIT]</u>	pale green / yellow	blue green / blue
<u>H₂S</u>	colorless / grayish	black deposit / thin line
<u>URE</u>	yellow	red / orange
TDA	yellow	reddish brown
IND	colorless / Pale green / yellow	Pink
<u>[VP]</u>	colorless	Pink / red
<u>[GEL]</u>	no diffusion	Diffusion of black pigment
GLU	blue / blue green	Yellow / grayish yellow
MAN	blue / blue green	yellow
INO	blue / blue green	yellow
SOR	blue / blue green	yellow
RHA	blue / blue green	yellow
SAC	blue / blue green	yellow
MEL	blue / blue green	yellow
AMY	blue / blue green	yellow
ARA	blue / blue green	yellow
Nitrate reduction GLU tube	NIT 1 + NIT2/ 2-5 min	
	yellow	red

ที่มา : Biomerieux Vitek.,Inc

ตาราง 27 (ต่อ)

Tests	Results	
	Negative	Positive
OF-F	green	yellow
OF-F	Green	yellow
OX	Colorless / yellow	purple
McC	absence	presence

ที่มา : Biomerieux Vitek.,Inc

ตาราง 28 แสดงการทดสอบทางชีวเคมีของชุดทดสอบ API-20NE

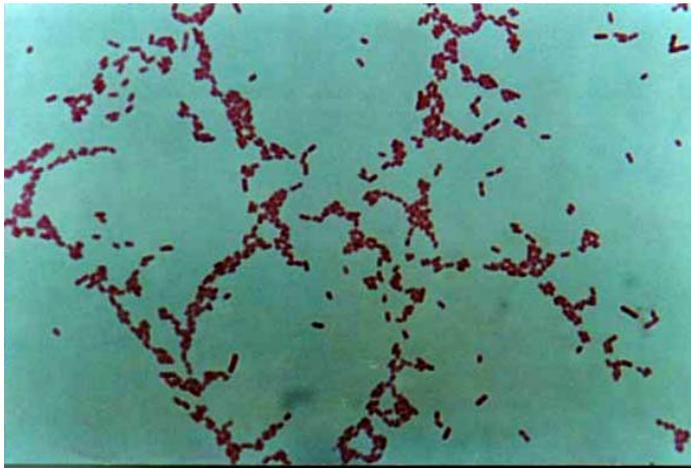
Tests	Substrate	Reaction/Enzymes
NO ₃	Potassium nitrate	Reduction of nitrates to nitrites
		Reduction of nitrates to nitrogen
TRP	tryptophane	Indole production
<u>GLU</u>	glucose	Fermentation Glucose
ADH	arginine	Arginine dehydrolase
<u>URE</u>	urea	Urease
ESC	esculin	Hydrolysis (α -glucosidase)
GEL	gelatine (with India ink)	Hydrolysis (protease)
PNPG	p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside	α -galactosidase
[<u>GLU</u>]	glucose	Assimilation
[<u>ARA</u>]	arabinose	Assimilation
[<u>MNE</u>]	mannose	Assimilation
[<u>MAN</u>]	mannitol	Assimilation
[<u>NAG</u>]	N-acetyl-glucosamine	Assimilation
[<u>MAL</u>]	maltose	Assimilation
[<u>GNT</u>]	potassium gluconate	Assimilation
[<u>CAP</u>]	capric acid	Assimilation
[<u>ADI</u>]	adipic acid	Assimilation
[<u>MLT</u>]	malic acid	Assimilation
[<u>CIT</u>]	trisodium citrate	Assimilation
[<u>PAC</u>]	phenylacetic acid	Assimilation
OX	-	Cytochrome oxidase

ที่มา : Biomerieux Vitek.,Inc

ตาราง 29 แสดงการอ่านผลการทดสอบด้วยชุดทดสอบมาตรฐาน API-20NE

Tests	Results	
	Negative	Positive
NO ₃	NIT 1 +NIT2 / 2-5	
	yellow	red
	Zn / 5 min	
	orange / red	yellow
TRP	colorless / pale green / yellow	pink
<u>GLU</u>	blue to green	yellow
<u>ADH</u>	yellow	orange / pink /red
<u>URE</u>	yellow	orange / pink /red
ESC	yellow	grey / brown / black
GEL	no pigment diffusion	diffusion of black pigment
PNPG	colorless	yellow
[<u>GLU</u>]	transparent	opaque
[<u>ARA</u>]	transparent	opaque
[<u>MNE</u>]	transparent	opaque
[<u>MAN</u>]	transparent	opaque
[<u>NAG</u>]	transparent	opaque
[<u>MAL</u>]	transparent	opaque
[<u>GNI</u>]	transparent	opaque
[<u>CAP</u>]	transparent	opaque
[<u>ADI</u>]	transparent	opaque
[<u>MLT</u>]	transparent	opaque
[<u>CIT</u>]	transparent	opaque
[<u>PAC</u>]	transparent	opaque
OX	colorless / yellow	purple

ที่มา : Biomerieux Vitek.,Inc.



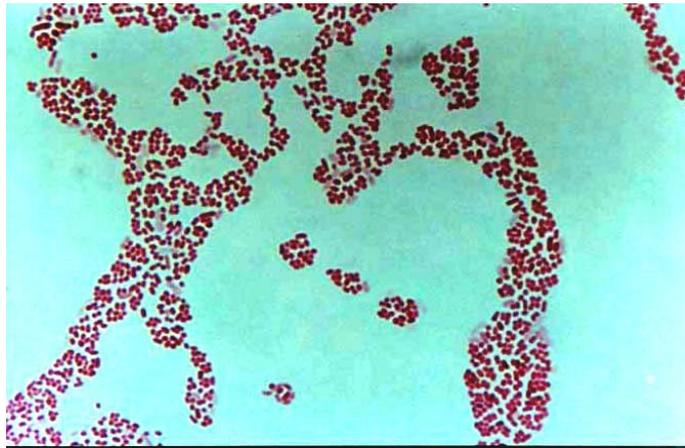
ภาพ 7 แสดงผลการยับยั้งการเคลื่อนที่ของไอโซเลต Cd-33 (รูปร่างแท่ง แกรมลบ)



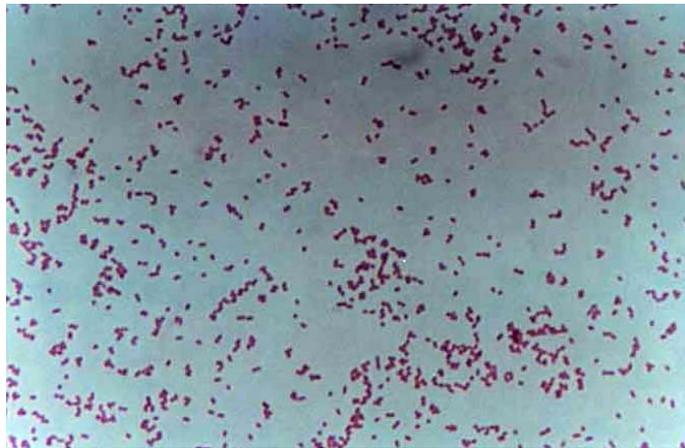
ภาพ 8 แสดงผลการยับยั้งการเคลื่อนที่ของไอโซเลต Cd-35 (รูปร่างแท่ง แกรมลบ)



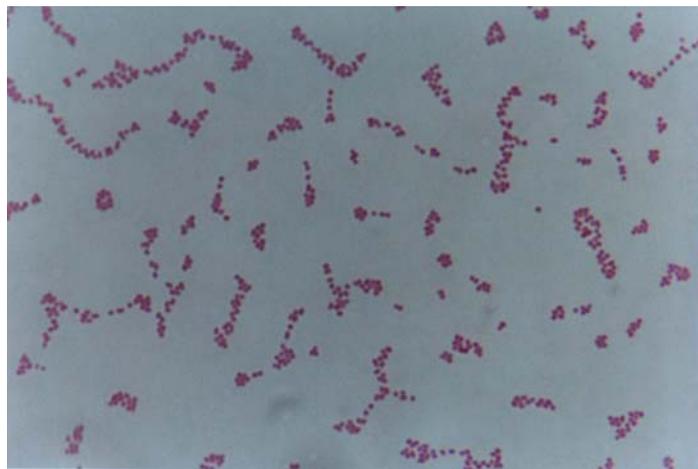
ภาพ 9 แสดงผลการยับยั้งการเคลื่อนที่ของไอโซเลต Cd-36 (รูปร่างแท่ง แกรมลบ)



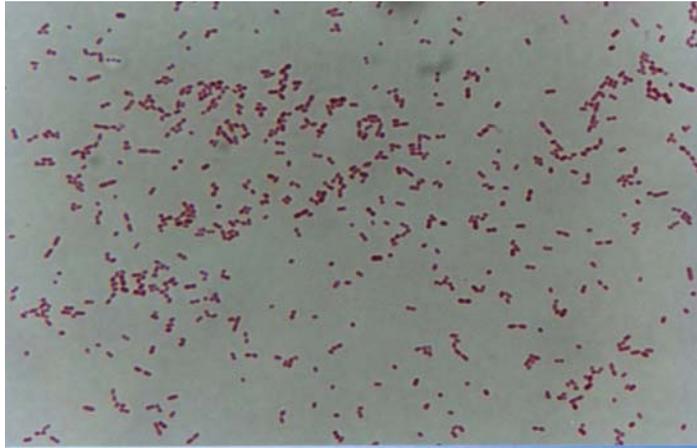
ภาพ 10 แสดงผลการย้อมสีแกรมของไอโซเลต Cu-1 (รูปร่างแท่ง แกรมลบ)



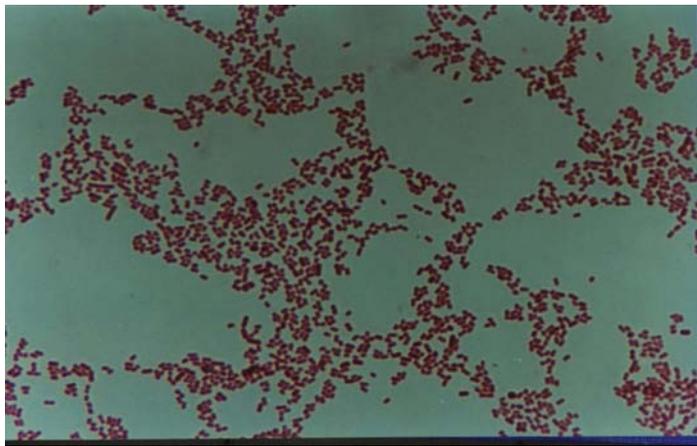
ภาพ 11 แสดงผลการย้อมสีแกรมของไอโซเลต Cu-3 (รูปร่างแท่ง แกรมลบ)



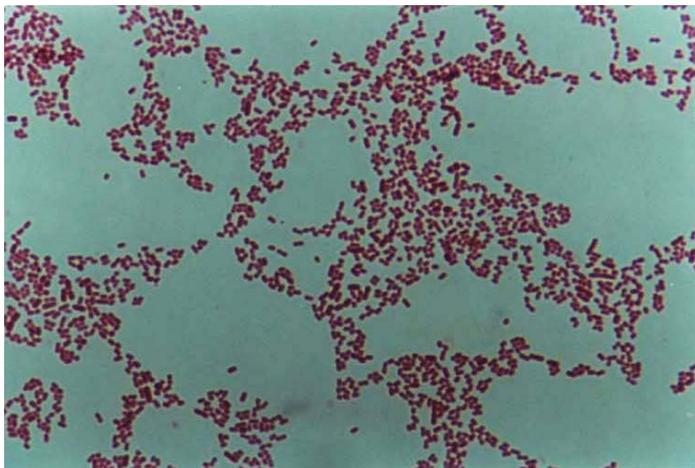
ภาพ 12 แสดงผลการย้อมสีแกรมของไอโซเลต Cu-17 (รูปร่างแท่ง - แกรมลบ)



ภาพ 13 แสดงผลการย้อมสีแกรมของไอโซเลต Zn-18 (รูปร่างแท่ง แกรมลบ)



ภาพ 14 แสดงผลการย้อมสีแกรมของไอโซเลต Zn-32 (รูปร่างแท่ง แกรมลบ)



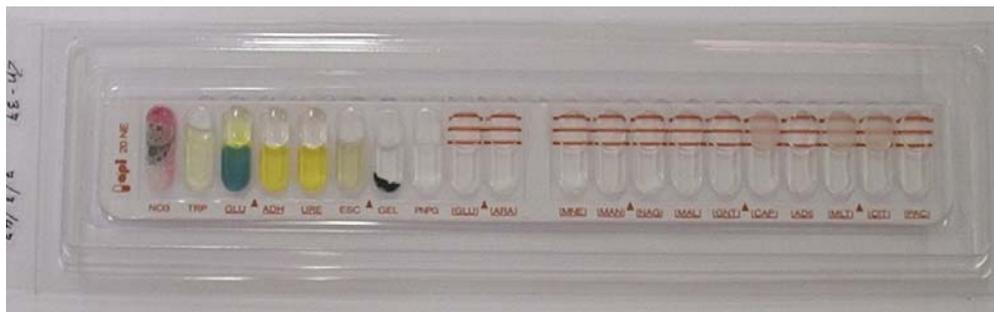
ภาพ 15 แสดงผลการย้อมสีแกรมของไอโซเลต Zn-35 (รูปร่างแท่ง แกรมลบ)



ภาพ 16 แสดงผลการทดสอบด้านชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบมาตรฐาน API ของไอโซเลต Cd-33



ภาพ 17 แสดงผลการทดสอบด้านชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบมาตรฐาน API ของไอโซเลต Cu-1



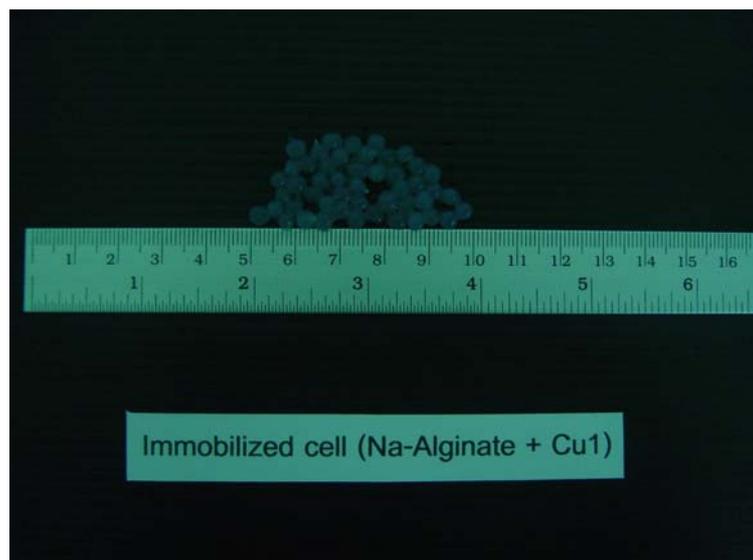
ภาพ 18 แสดงผลการทดสอบด้านชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบมาตรฐาน API ของไอโซเลต Zn-32

ภาคผนวก ค

ภาพแสดงเซลล์ที่ตรึงรูปในตัวกลางและโซเดียมอัลจิเนต
ที่ใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนัก



ภาพ 19 แสดงเซลล์ที่ตรึงรูปในตัวกลางสำหรับใช้ศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนัก



ภาพ 20 แสดงลักษณะของโซเดียมอัลจิเนตสำหรับใช้ศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนัก

ภาคผนวก ง

ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม

ตาราง 30 แสดงค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม

ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม		
ดัชนีคุณภาพน้ำ	ค่ามาตรฐาน	วิธีวิเคราะห์
1. ค่าความเป็นกรดและด่าง (pH value)	5.5-9.0	pH Meter
2. ค่าทีดีเอส (TDS หรือ Total Dissolved Solids)	1. ไม่เกิน 3,000 มก./ล. หรืออาจแตกต่างกันแล้วแต่ประเภทของแหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือประเภทของโรงงานอุตสาหกรรม ที่คณะกรรมการควบคุมมลพิษเห็นสมควรแต่ไม่เกิน 5,000 มก./ล. 2. น้ำทิ้งที่จะระบายลงแหล่งน้ำกร่อยที่มีค่าความเค็ม (Salinity) เกิน 2,000 มก./ล. หรือลงสู่ทะเลค่าทีดีเอส ที่มีอยู่ในแหล่งน้ำกร่อยหรือน้ำทะเลได้ไม่เกิน 5,000 มก./ล.	ระเหยที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. สารแขวนลอย (Suspended Solids)	ไม่เกิน 50 มก./ล. หรือแล้วแต่ประเภทของแหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือประเภทของโรงงานอุตสาหกรรม หรือประเภทของระบบบำบัดน้ำเสียตามที่คณะกรรมการควบคุมมลพิษเห็นสมควรแต่ไม่เกิน 150 มก./ล.	กรองผ่านกระดาษกรองใยแก้ว (Glass Fiber Filter Disc)
4. อุณหภูมิ (Temperature)	ไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส	เครื่องวัดอุณหภูมิ วัดขณะทำการเก็บตัวอย่างน้ำ
5. สีหรือกลิ่น	ไม่เป็นที่พึงรังเกียจ	ไม่ได้กำหนด
6. ซัลไฟด์ (Sulfide as H ₂ S)	ไม่เกิน 1.0 มก./ล.	Titrate
7. ไซยาไนด์ (Cyanide as HCN)	ไม่เกิน 0.2 มก./ล.	กลั่นและตามด้วยวิธี Phridine Barbituric Acid

ตาราง 30 (ต่อ)

ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม		
ดัชนีคุณภาพน้ำ	ดัชนีคุณภาพน้ำ	ดัชนีคุณภาพน้ำ
8. น้ำมันและไขมัน (Fat, Oil and Grease)	ไม่เกิน 5.0 มก./ล. หรืออาจแตกต่างกันแล้วแต่ลักษณะของแหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือ ประเภทของโรงงานอุตสาหกรรมตามที่คณะกรรมการควบคุมมลพิษเห็นสมควรแต่ไม่เกิน 15 มก./ล.	สกัดด้วยตัวทำละลายแล้วแยกหาน้ำหนักของน้ำมันและไขมัน
9. ฟอรัมาดีไฮด์ (Formaldehyde)	ไม่เกิน 1.0 มก./ล.	Spectrophotometry
10. สารประกอบฟีนอล (Phenols)	ไม่เกิน 1.0 มก./ล.	กลั่นและตามด้วยวิธี 4-Aminoantipyrine
11. คลอรีนอิสระ (Free Chlorine)	ไม่เกิน 1.0 มก./ล.	Iodometric Method
12. สารที่ใช้ป้องกันหรือกำจัดศัตรูพืชหรือสัตว์ (Pesticide)	ต้องตรวจไม่พบตามวิธีที่ตรวจสอบที่กำหนด	Gas-Chromatography
13. ค่าบีโอดี (5 วันที่ อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส)(Biochemical Oxygen Demand : BOD)	ไม่เกิน 20 มก./ล. หรืออาจแตกต่างกันแล้วแต่ลักษณะของแหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือ ประเภทของโรงงานอุตสาหกรรมตามที่คณะกรรมการควบคุมมลพิษเห็นสมควรแต่ไม่เกิน 60 มก./ล.	Azide Modification ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน
14. ค่าทีเคเอ็น (TKN หรือ Total Kjeldahl Nitrogen)	ไม่เกิน 100 มก./ล. หรืออาจแตกต่างกันแล้วแต่ลักษณะของแหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือ ประเภทของโรงงานอุตสาหกรรมตามที่คณะกรรมการควบคุมมลพิษเห็นสมควรแต่ไม่เกิน 200 มก./ล.	Kjeldahl
15. ค่าซีโอดี (Chemical Oxygen Demand : COD)	ไม่เกิน 120 มก./ล. หรืออาจแตกต่างกันแล้วแต่ลักษณะของแหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือ ประเภทของโรงงานอุตสาหกรรมตามที่คณะกรรมการควบคุมมลพิษเห็นสมควรแต่ไม่เกิน 400 มก./ล.	Potassium Dichromate Digestion
16. โลหะหนัก (Heavy Metal)		

ตาราง 30 (ต่อ)

ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม		
ดัชนีคุณภาพน้ำ	ดัชนีคุณภาพน้ำ	ดัชนีคุณภาพน้ำ
1. สังกะสี(Zn)	ไม่เกิน 5.0 มก./ล.	Atomic Absorption
2.โครเมียมชนิดเฮกซะวาเลนต์ เส้นท์ (Hexavalent Chromium)	ไม่เกิน 0.25 มก./ล.	Spectro Photometry ชนิด Direct Aspiration
3. โครเมียมชนิดไตรวาเลนต์ เส้นท์ (Trivalent Chromium)	ไม่เกิน 0.75 มก./ล.	หรือวิธี Plasma Emission
4. ทองแดง (Cu)	ไม่เกิน 2.0 มก./ล.	Spectroscopy ชนิด
5. แคดเมียม (Cd)	ไม่เกิน 0.03 มก./ล.	Inductively Coupled
6. แบเรียม (Ba)	ไม่เกิน 1.0 มก./ล.	Plasma : ICP
7. ตะกั่ว (Pb)	ไม่เกิน 0.2 มก./ล.	
8. นิกเกิล (Ni)	ไม่เกิน 1.0 มก./ล.	
9. แมงกานีส (Mn)	ไม่เกิน 5.0 มก./ล.	
10. อาร์เซนิก (As)	ไม่เกิน 0.25 มก./ล.	Atomic Absorption
11. เซเลเนียม (Se)	ไม่เกิน 0.02 มก./ล.	Spectro Photometry ชนิด Direct Aspiration หรือวิธี Plasma Emission Spectroscopy ชนิด Inductively Coupled Plasma : ICP
12.ปรอท (Hg)	ไม่เกิน 0.005 มก./ล.	Atomic Absorption Cold Vapour Technique

ที่มา : ประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2539)

เรื่อง กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรม และ
นิคมอุตสาหกรรม ลงวันที่ 3 มกราคม 2539 ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 113 ตอนที่ 13 ง
ลงวันที่ 13 กุมภาพันธ์ 2539

เอกสารแนบหมายเลข 3

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

มีการนำผลงานวิจัยไปใช้ในการพัฒนาการเรียนการสอน ในรายวิชาจุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม และสร้างนักวิจัยระดับปริญญาโท ในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร