สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

การดูดซับตะกั่วโดยเชื้อ *Pseudomonas* spp. ที่แยกจากน้ำทะเลและน้ำกร่อยบริเวณอำเภอเมือง จังหวัดสงขลา

Accumulation of Lead Ions by *Pseudomonas* spp. from Marine and Brackish Water in Muang District, Songkhla Province

อัจฉรา เพิ่ม [1]

Atchara Phoem

Abstract

A number of 68 strains of bacteria were isolated from marine and brackish water in Muang District, Songkhla Province (40 samples). Gram negative bacterial straing producing mucus were selected. Identification of selected strains were *Pseudomonas aeruginosa* (P3), *Pseudomonas aeruginosa* (P14), *P.aeruginosa* (P33), *Pseudomonas aeruginosa* (P37), *Pseudomonas aeruginosa* (P42), *Pseudomonas aeruginosa* (P61), and *Pseudomonas aeruginosa* (P67). In this study, *Pseudomonas aeruginosa* (P3), shows the highest growth in medium C. In compared test experiments it was found that efficiency of adsorbability of bacterial cells produced by different bacteria were similar to the efficiency of adsorbability of polymers and that no significant difference ($p>0.05$). The bacterial cells and polymers of *Pseudomonas aeruginosa* (P3), adsorbed lead (at concentration 4 mg/l) better than other bacterial cells and polymers produced by the other strains. The factor that effect efficiency of adsorbability of bacterial cells produced by *Pseudomonas aeruginosa* (P3) were similar to the efficiency of adsorbability of polymers and that no significant difference ($p>0.05$). The optimize quantity of bacterial cells and polymers were 400 mg. The quantity of leads were adsorbed (at the concentration 8 mg/l). The pH value that caused the best adsorption was 6. The optimize temperature was 30°C and the best duration of contact time was 60 minutes.

Keywords : lead, accumulation, marine, brackish water, *Pseudomonas* spp.

---

[1]โปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

Biology and Applied Biology Program, Faculty of Science and Technology, Songkhla Rajabhat University, Muang, Songkhla 90000 Thailand.

บทคัดย่อ

การแยกแบคทีเรียจากน้ำทะเลและน้ำกร่อยบริเวณ อ.เมือง จ.สงขลา จำนวน 40 ตัวอย่างสามารถแยกแบคทีเรียทั้งหมดได้ 68 สายพันธุ์ นำมาคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถสร้างเมือก เมื่อนำมาจำแนกชนิดพบว่าเป็น *Pseudomonas aeruginosa* (P3) *Pseudomonas aeruginosa* (P14) *Pseudomonas aeruginosa* (P33) *Pseudomonas aeruginosa* (P37) *Pseudomonas aeruginosa* (P42) *Pseudomonas aeruginosa* (P61) และ *Pseudomonas aeruginosa* (P67) นำมาศึกษาการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร C พบว่า *Pseudomonas aeruginosa* (P3) สามารถเจริญได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วโดยใช้ตัวเซลล์และโพลิเมอร์ชีวภาพของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* แต่ละสายพันธุ์ โดยใช้สารละลายตะกั่วที่มีความเข้มข้น 4 mg/l พบว่า การดูดซับตะกั่วโดยใช้ตัวเซลล์สามารถดูดซับได้ไม่แตกต่างจากโพลิเมอร์ชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยตัวเซลล์และโพลิเมอร์ชีวภาพจาก *Pseudomonas aeruginosa* (P3) มีประสิทธิภาพในการดูดซับได้ดีกว่า *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์อื่นๆ จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วโดยใช้ตัวเซลล์และโพลิเมอร์ชีวภาพจาก *Pseudomonas aeruginosa* (P3) ให้ผลที่สอดคล้องกัน และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ปริมาณเชื้อที่เหมาะสมคือ 400 mg ปริมาณตะกั่วที่ดูดซับได้คือ 8 mg/l พีเอชที่ทำให้มีประสิทธิภาพในการดูดซับสูงสุดคือ 6 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30°C และระยะเวลาที่เชื้ออยู่ในสารละลายได้ดีที่สุดคือ 60 นาที

คำสำคัญ : ตะกั่ว, การดูดซับ, น้ำทะเล, น้ำกร่อย, *Pseudomonas* spp.

บทนำ

น้ำทะเลบริเวณ อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา เป็นแหล่งน้ำที่สำคัญสามารถใช้ประโยชน์ในการดำรงชีวิตขั้นพื้นฐาน และกิจกรรมทางเศรษฐกิจ แต่ในปัจจุบันสภาพน้ำทะเลบริเวณนี้ มีปัญหาคุณภาพของแหล่งน้ำเสื่อมโทรม เนื่องมาจากโรงงานอุตสาหกรรม การคมนาคมทางทะเลโดยการใช้แพขนานยนต์ และเรือประมงซึ่งจะมีการขนส่งสินค้า และยานพาหนะข้ามฟาก ทำให้เกิดการปนเปื้อนของคราบน้ำมันซึ่งมีตะกั่ว (lead:Pb) เป็นองค์ประกอบ โดยมีการปนเปื้อนในน้ำทะเลในปริมาณที่มากเกินกว่ามาตรฐาน(ไม่เกิน0.05 mg/l) ที่ได้กำหนดไว้ สารพิษตกค้างจากตะกั่วมีจะมีผลต่อพืชและสัตว์ในน้ำ และส่งผลกระทบต่อมนุษย์ ถ้าหากว่ามนุษย์ได้บริโภคสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเลบริเวณนั้นๆ ก็จะทำให้มีการสะสมของสารตะกั่วในร่างกาย และจะมีผลต่อการสร้างเม็ดเลือดแดงทำให้เกิดโรคโลหิตจาง สามารถทำลายระบบประสาท และอาจทำให้เกิดอาการช็อกและตายในที่สุด (ลัดดา อุดมผล, 2546)

ในการกำจัดตะกั่วสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การกำจัดโดยวิธีทางเคมีโดยการใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) หรือรีดักชัน (reduction) กับสารประกอบที่จะทำการกำจัดทำให้สารประกอบนั้นเปลี่ยนรูปไปเป็นสารประกอบอื่นที่ไม่มีพิษหรือตะกอนได้ ซึ่งจะต้องมีการใช้สารเคมีมากมายอันจะทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม การใช้วิธีทางกายภาพโดยการทำ ion exchange ต้องมีการใช้เรซินซึ่งทั้งสองวิธีข้างต้นต้องเสียค่าใช้จ่ายที่สูงมาก (รัชยาภรณ์ ผลมั่ง และ พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, 2540) ส่วนวิธีทางชีวภาพมีการใช้จุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ และสาหร่าย ในการดูดซับตะกั่วโดยเฉพาะแบคทีเรียสามารถเติบโตได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาอันสั้นมีการเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่องตลอดเวลา จึงสามารถดูดซับตะกั่วได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น อาจมีการดูดซับตะกั่วโดยการสร้างสารโพลิเมอร์ชีวภาพ และการดูดซับโดยใช้ตัวเซลล์ของเชื้อ (Wehrheim,B และ Wettern,M., 1994)

ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงได้ทำการแยกและจำแนกเชื้อ *Pseudomonas* spp. จากน้ำทะเล และน้ำกร่อยบริเวณอำเภอเมือง จังหวัดสงขลา โดยเลือกบริเวณที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนตะกั่วในปริมาณมาก ทดสอบความสามารถในการดูดซับตะกั่ว และเปรียบเทียบปริมาณ *Pseudomonas* spp. ในบริเวณต่างๆ

วิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำทะเลและน้ำกร่อย

เก็บตัวอย่างจากน้ำทะเล และน้ำกร่อยในบริเวณต่างๆของ อ.เมือง จ. สงขลา มีจำนวน 8 แหล่ง คือ ท่าแพขนานยนต์ ร่องน้ำใกล้ยูโนแคล ท่าเรือน้ำลึก (ท่าเรือ union) ประมงเก่า ตลาด ทรัพย์สินใกล้คลองขวาง หลังโรงแรมเลคอิน (Lake inn) ประมงใหม่ และปากคลองสำโรง แล้วทำการวัดความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิของน้ำตัวอย่าง และ spread plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร A สังเกตการเจริญ และบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย ดัดแปลงจาก (ดวงพร คันธโชติ และ พรศิลป์ ศิริพงศ์วุฒิกร, 2529)

2. การตรวจหาแบคทีเรียแกรมลบที่มีความสามารถในการดูดซับตะกั่ว

เลือกระดับความเจือจางที่เหมาะสมมาถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ B คัดเลือกแบคทีเรียแกรมลบที่มีลักษณะเป็นเมือกรอบโคโลนีของเชื้อ ดัดแปลงจาก (Sinha, J., Bae, J.T., Park, J.P., Kim, K.M., Song,C.H. และ Yun, J.W., 2001)

3. การจำแนกแบคทีเรียแกรมลบกลุ่ม *Pseudomonas* spp.

นำเชื้อที่คัดเลือกได้ มาทำการจำแนกชนิดดังนี้ คือ การย้อมสีแกรม การสร้างเอนไซม์คะตาเลส การใช้น้ำตาลแลกโทส การทดสอบการเคลื่อนที่(hanging drop) การย้อมสีแฟลกเจลลา การวัดขนาดของตัว

เซลล์ การเจริญที่อุณหภูมิ 43 45 และ 50°C การย้อมสีสปอร์และทดสอบโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (API 20E) เพื่อจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์

4. ศึกษาการเจริญของเชื้อที่ใช้ในการดูดซับตะกั่ว

การทดลองในขั้นตอนนี้มีการใช้ *P.aeruginosa* เป็นตัวเปรียบเทียบ ทำการเตรียม 2% inoculum (ปรับ O.D.เท่ากับ 0.5) ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร C วัดการเจริญของเชื้อที่ O.D. 660 nm ทุกๆ 3 ชั่วโมง และเขียนกราฟการเจริญ ดัดแปลงจาก (ดวงพร คันธโชติ และ พรศิลป์ ศิริพงศ์วุฒิกร, 2529)

5. การแยกตัวเซลล์และโพลิเมอร์ชีวภาพของเชื้อ *Pseudomonas* spp. ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ดัดแปลงจาก (Sinha, J., Bae, J.T., Park, J.P., Kim, K.M., Song,C.H. และ Yun, J.W., 2001)

5.1 การแยกตัวเซลล์ของเชื้อ *Pseudomonas* spp. ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ

เก็บเกี่ยวเซลล์ 2% inoculum ของ *Pseudomonas* spp. แต่ละสายพันธุ์ที่เจริญในช่วงกลางล็อกเฟสจากข้อ 4 นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น และหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง นำตะกอนมาทำให้แห้ง

5.2 การแยกโพลิเมอร์ชีวภาพของเชื้อ *Pseudomonas* spp. ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากข้อ 5.1 มากรองด้วยกระดาษเซลลูโลสอะซิเตต และเติมเอทานอล 100% ในอัตราส่วน 1:4 ผสม ให้เข้ากันทิ้งค้างคืนไว้ที่ 4 ^{0}C จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่ตกตะกอนมาเติมเอทานอล 100% และหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง นำตะกอนมาทำให้แห้ง

6. การทดสอบความสามารถของตัวเซลล์ และโพลิเมอร์ชีวภาพของเชื้อ *Pseudomonas* spp. ในการดูดซับตะกั่ว ดัดแปลงจาก (Sinha, J., Bae, J.T., Park, J.P., Kim, K.M., Song,C.H. และ Yun, J.W., 2001)

การทดลองในขั้นตอนนี้ใช้ *P.aeruginosa* เป็นตัวเปรียบเทียบ

6.1 การทดสอบความสามารถของตัวเซลล์ในการดูดซับตะกั่ว

นำตัวเซลล์จากข้อ 5.1 หนัก 350 mg มาใส่ในสารละลายที่มีไอออนของตะกั่ว ซึ่งมีความเข้มข้น 4 mg/l นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ทำ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 35 ^{0}C เป็นเวลา 40 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตต นำส่วนที่กรองได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น660 nm คำนวณหาปริมาณตะกั่วที่ถูกดูดซับไว้ต่อน้ำหนักแห้งของตัวเซลล์ *Pseudomonas* spp.

6.2 การทดสอบความสามารถของโพลิเมอร์ชีวภาพในการดูดซับตะกั่ว

นำโพลิเมอร์ชีวภาพที่แยกได้จากข้อ 5.2 มาทดสอบความสามารถในการดูดซับตะกั่ว เช่นเดียวกับข้อ 6.1

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติเกี่ยวกับ ประสิทธิภาพตัวเซลล์และโพลิเมอร์ชีวภาพของเชื้อ *Pseudomonas* spp. ในการดูดซับตะกั่วตามวิธีการของ Duncan 's new multiple range test

7. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซับตะกั่วของเชื้อ *Pseudomonas* spp.

นำเชื้อ *Pseudomonas* spp. ทั้งตัวเซลล์และโพลิเมอร์ชีวภาพจากข้อ 6 ที่มีประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วได้ดีที่สุด มาศึกษาปัจจัยต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับ *P.aeruginosa* ซึ่งใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ ดัดแปลงจาก (Sinha, J., Bae, J.T., Park, J.P., Kim, K.M., Song,C.H. และ Yun, J.W., 2001) และ (รัชยาภรณ์ ผลมั่ง และ พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, 2540) ดังนี้ คือ

7.1 ปริมาณตัวเซลล์และโพลิเมอร์ที่ใช้ในการดูดซับตะกั่วเป็น 400 และ 450 mg

7.2 ปริมาณตะกั่วที่ถูกดูดซับโดยตัวเซลล์และโพลิเมอร์มีความเข้มข้น 8 และ 12 mg/l

7.3 พีเอชของสารละลายต่อการดูดซับตะกั่วโดยตัวเซลล์และโพลิเมอร์เป็น 6 และ 8

7.4 อุณหภูมิที่ตัวเซลล์และโพลิเมอร์ที่ใช้ในการดูดซับตะกั่วเป็น 25 และ 30 °C

7.5 ระยะเวลาที่ตัวเซลล์และโพลิเมอร์ที่ใช้ในการดูดซับตะกั่วนาน 60 และ 80 นาที

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วของเชื้อ *Pseudomonas* spp. โดยใช้ตัวเซลล์ และโพลิเมอร์ชีวภาพตามวิธีการของ Duncan 's new multiple range test

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำทะเลและน้ำกร่อย

เก็บตัวอย่างน้ำบริเวณ อ.เมือง จ.สงขลาจำนวน 8 แหล่ง โดยเก็บตัวอย่างน้ำแหล่งละ 5 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 40 ตัวอย่าง

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำตัวอย่างโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร A (peptone yeast extract agar น้ำทะเลและน้ำกร่อย) พบว่ามีจำนวนสายพันธุ์แบคทีเรียทั้งหมด 68 สายพันธุ์ โดยบริเวณท่าแพขนานยนต์สามารถพบจำนวนสายพันธุ์แบคทีเรียทั้งหมดได้มากที่สุด 16 สายพันธุ์ คิดเป็น 23.5% เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีอุณหภูมิ 30°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม และมีค่าพีเอชเป็น 8.08 ซึ่งมีสภาพเป็นด่างทำให้เหมาะกับการเจริญของแบคทีเรียในน้ำทะเลและน้ำกร่อย (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547)

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีแบคทีเรียพบว่า มีลักษณะที่แตกต่างกัน เช่น สีขาวขุ่นมีเมือก ซึ่งบริเวณที่มีแบคทีเรียเป็นจำนวนมากก็จะมีความแตกต่างของลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีแบคทีเรียเป็นจำนวนมาก

2. การตรวจหาแบคทีเรียแกรมลบที่มีความสามารถในการดูดซับตะกั่ว

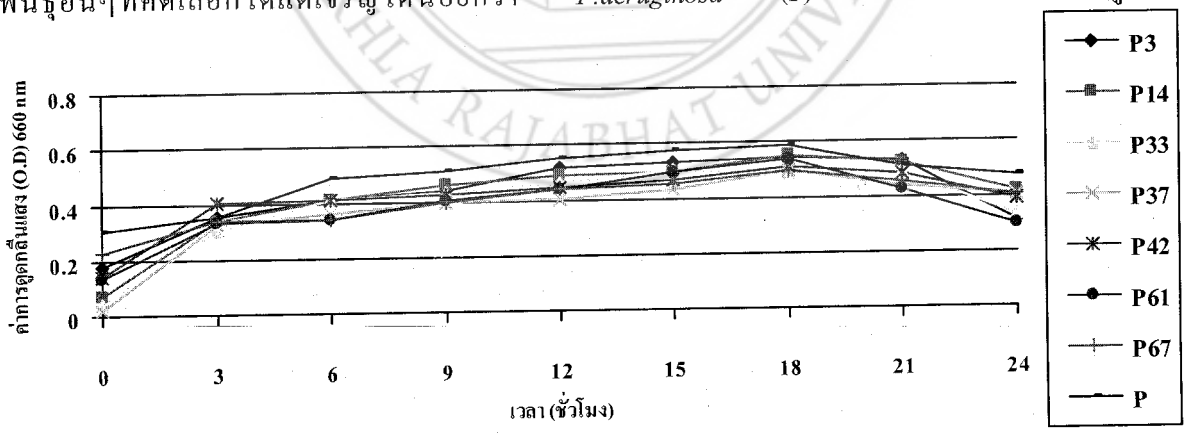
ทำการ plate count technique ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร B (peptone, yeast extract, lead nitrate, agar, crystal violet น้ำทะเลและน้ำกร่อย) คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* spp. ซึ่งมีลักษณะเด่น คือ เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเมือก ซึ่งเป็นสารโพลี่แซ็คคาไรด์ และโพลี่เพปไทด์ (รัชยาภรณ์ ผลมั่ง และ พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, 2540) มีจำนวนสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างเมือกมี 41 สายพันธุ์ โดยบริเวณท่าแพขนานยนต์สามารถพบจำนวนแบคทีเรียแกรมลบที่สร้างเมือกได้มากที่สุดมีจำนวน 9 สายพันธุ์ คิดเป็น 21.9% เนื่องจากบริเวณดังกล่าวมีการปนเปื้อนของตะกั่วในปริมาณมากถึง 0.88 mg/l ซึ่งเกินกว่ามาตรฐานที่กำหนดไว้ (0.05 mg/l) จึงทำให้แบคทีเรียดังกล่าวเพิ่มจำนวนได้มากขึ้น โดยการใช้ตะกั่วเป็นแหล่งอาหาร

3. การจำแนกแบคทีเรียแกรมลบกลุ่ม *Pseudomonas* spp.

นำเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 มาจำแนกชนิดในระดับจีนัสเพื่อยืนยันว่าเป็น *Pseudomonas* spp. ได้ผลดังนี้คือ ย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น เรียงตัวแบบกระจาย มีการสร้างเอนไซม์คะตาเลส ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลกโทส สามารถเคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา โดยที่แฟลกเจลลาอยู่บริเวณขั้ว (polar flagella) ของตัวเชื้อ มีขนาด 0.5-1X1.5-4 μm สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีอุณหภูมิไม่เกิน 43 °C ไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ มีจำนวนทั้งหมด 7 สายพันธุ์คือ P3, P14, P33, P37, P42, P61 และ P67 จากนั้นนำมาจำแนกต่อโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (API 20E) พบว่าเชื้อทั้ง 7 สายพันธุ์เป็น *Pseudomonas aeruginosa*

4. การศึกษาการเจริญของเชื้อที่ใช้ในการดูดซับตะกั่ว

นำ *P. aeruginosa* ทั้ง 7 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 มาศึกษาการเจริญพบว่ามี lag phase ประมาณ 0 ชั่วโมง เจริญเข้าสู่ log phase จนถึงชั่วโมงที่ 12 เจริญเข้าสู่ stationary phase จนถึงชั่วโมงที่ 13-18 และเจริญเข้าสู่ death phase ชั่วโมงที่ 19-24 โดยเฉพาะ *P.aeruginosa* (P3) มีค่า generation time เป็น 1.94 ชั่วโมง และมีค่า specific growth rate เป็น 0.36 ชั่วโมง$^{-1}$ แสดงให้เห็นว่า *P.aeruginosa* (P3) สามารถเจริญได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่นๆที่คัดเลือกได้แต่เจริญได้น้อยกว่า *P.aeruginosa* (P) ซึ่งตัวเปรียบเทียบ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกจากน้ำทะเลและน้ำกร่อยบริเวณ อ.เมือง จ.สงขลา

ตารางที่ 1 ผลการดูดซับตะกั่วโดยใช้ตัวเซลล์ และโพลิเมอร์ชีวภาพของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกจากและน้ำกร่อยบริเวณ อ.เมือง จ.สงขลา

สายพันธุ์ของเชื้อ	ตัวเซลล์			โพลิเมอร์ชีวภาพ		
	ความเข้มข้นของตะกั่วที่เหลือ (mg/l)	ความเข้มข้นตะกั่วที่ถูกดูดซับ (mg/l)	ประสิทธิภาพในการดูดซับ[1]	ความเข้มข้นของตะกั่วที่เหลือ (mg/l)	ความเข้มข้นตะกั่วที่ถูกดูดซับ (mg/l)	ประสิทธิภาพในการดูดซับ[1]
P. aeruginosa (P)	0.9	3.1	0.0086	0.8	3.2	0.0091
P.aeruginosa (P3)	0.6	3.4	0.0097	0.5	3.5	0.0100
P.aeruginosa (P14)	0.7	3.3	0.0094	0.6	3.4	0.0097
P.aeruginosa (P33)	0.75	3.25	0.0093	0.65	3.35	0.0096
P.aeruginosa (P37)	0.75	3.25	0.0093	0.65	3.35	0.0096
P.aeruginosa (P42)	0.8	3.2	0.0091	0.75	3.25	0.0093
P.aeruginosa (P61)	0.95	3.05	0.0087	0.9	3.1	0.0086
P.aeruginosa (P67)	0.9	3.1	0.0086	0.85	3.15	0.0090

หมายเหตุ [1] ประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่ว = $\frac{\text{ความเข้มข้นของตะกั่วที่ถูกดูดซับ (mg/l)}}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวเซลล์หรือโพลิเมอร์ชีวภาพ (mg)}}$

5. การแยกตัวเซลล์และโพลิเมอร์ชีวภาพของเชื้อ *P.aeruginosa* ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตัวเซลล์ และโพลิเมอร์ชีวภาพมาทำให้แห้งจะได้เป็นผงละเอียด

6. การทดสอบความสามารถของตัวเซลล์ และโพลิเมอร์ชีวภาพของเชื้อ *Pseudomonas* spp. ในการดูดซับตะกั่ว

6.1 การทดสอบความสามารถของตัวเซลล์ในการดูดซับตะกั่ว

นำตัวเซลล์ของเชื้อ *P.aeruginosa* ทั้ง 7 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการดูดซับตะกั่วที่ความเข้มข้น 4 mg/l พบว่า *P.aeruginosa* (P3) ที่แยกบริเวณท่าแพขนานยนต์มีความสามารถในการดูดซับตะกั่วได้ดีที่สุด โดยสามารถดูดซับตะกั่วได้ถึง 3.4 mg/l คิดเป็น 85% และมี ประสิทธิภาพในการดูดซับเป็น 0.0097 เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการดูดซับตะกั่วกับ *P.aeruginosa* (P) ซึ่งเป็นตัวเปรียบเทียบพบว่า *P. aeruginosa* (P3) สามารถดูดซับตะกั่วได้ดีกว่า *P.aeruginosa* (P) (ตารางที่ 1)

6.2 การทดสอบความสามารถของโพลิเมอร์ชีวภาพในการดูดซับตะกั่ว

มาทดสอบความสามารถในการดูดซับตะกั่วพบว่าให้ผลเช่นเดียวกับตัวเซลล์ โดยสามารถดูดซับตะกั่วได้ถึง 3.5 mg/l คิดเป็น 87.5% และมีประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วเป็น0.01 (ตารางที่ 1) นำผลการดูดซับตะกั่วโดยใช้ตัวเซลล์ และ โพลิเมอร์ชีวภาพของเชื้อ *P.aeruginosa* แต่ละ สายพันธุ์มาเปรียบเทียบ จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วโดยใช้โพลิเมอร์ชีวภาพจะสูงกว่าตัวเซลล์ เนื่องจากโพลิเมอร์ชีวภาพเป็นสารที่แบคทีเรียสร้างแล้วปล่อยออกมาภายนอกเซลล์มีคุณสมบัติเป็นเมือกประกอบด้วยฟอสโฟไลปิด โพลีเฟปไทด์ และโพลีแซคคาไรด์ (รัชยาภรณ์ ผลมั่ง และ พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, 2540) จึงทำให้ดูดซับตะกั่วได้ดีต่างจากตัวเซลล์ของแบคทีเรีย โดยเฉพาะ *Pseudomonas* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่สามารถพบได้ในน้ำ แต่มีข้อจำกัดที่ว่า *Pseudomonas* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยสารเพปทิโดไกลแคนที่บาง (Sinha, J., Bae, J.T., Park, J.P., Kim, K.M., Song,C.H. และ Yun, J.W., 2001) และการใช้ตัวเซลล์ในสภาพแห้งทำให้ คุณสมบัติ โครงสร้าง ตำแหน่งของการดูดซับหรือความสามารถในการดูดซับเปลี่ยนแปลงไป จึงดูดซับตะกั่วได้น้อยกว่าโพลิเมอร์ชีวภาพ (อรไท สุขเจริญ, 2545)

เมื่อนำผลเกี่ยวกับประสิทธิภาพของตัวเซลล์และโพลิเมอร์ชีวภาพในการดูดซับตะกั่วมาวิเคราะห์ทางสถิติตามวิธีการของ Duncan 's new multiple range test พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

7.ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซับตะกั่วโดย ตัวเซลล์ และโพลิเมอร์ชีวภาพของเชื้อ *P.aeruginosa*

นำ *P.aeruginosa* (P3) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วได้ดีที่สุด มาศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังนี้ คือ

7.1 ปริมาณตัวเซลล์และโพลิเมอร์ชีวภาพที่ใช้ในการดูดซับตะกั่ว

นำตัวเซลล์และโพลิเมอร์ชีวภาพแบบแห้งของ *P.aeruginosa* (P3) มา 400 และ 450 mg ทดสอบความสามารถในการดูดซับตะกั่วความเข้มข้น 4 mg/l พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของตัวเซลล์จะทำให้ประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วลดลงจาก 0.0082 เป็น 0.0074 ตามลำดับ เมื่อเพิ่มปริมาณของ โพลิเมอร์ชีวภาพจะทำให้ประสิทธิภาพในการ ดูดซับตะกั่วลดลงจาก 0.0085 เป็น 0.0074 ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพในการดูดซับดีกว่า *P.aeruginosa* (P) ซึ่งเป็นตัวเปรียบเทียบ

7.2 ปริมาณตะกั่วที่ถูกดูดซับโดยตัวเซลล์และโพลิเมอร์ชีวภาพ

นำตัวเซลล์และโพลิเมอร์ชีวภาพแบบแห้งของ *P.aeruginosa* (P3) มา 350 mg ทดสอบความสามารถในการดูดซับตะกั่วที่ความเข้มข้น 8 และ 12 mg/l พบว่าเมื่อปริมาณตะกั่วเพิ่มขึ้นจะทำให้ ประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วของตัวเซลล์ ลดลงจาก 0.0094 เป็น 0.0088 ตามลำดับ ประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วของโพลิเมอร์ ชีวภาพลดลงจาก 0.0097 เป็น 0.0091 ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพในการดูดซับดีกว่า *P.aeruginosa* (P) ซึ่งเป็นตัวเปรียบเทียบ เนื่องจากตัวเซลล์

ของเชื้อมีความสามารถในการดูดซับตะกั่วได้ดีกว่าช่วงแรกเซลล์จึงเกิดการอิ่มตัว และมีการเพิ่มปริมาณตะกั่วเข้าไปมากขึ้นเซลล์จึงดูดซับตะกั่วได้น้อย (Sinha, J., Bae, J.T., Park, J.P., Kim, K.M., Song,C.H. และ Yun, J.W., 2001)

7.3 พีเอชของสารละลายต่อการดูดซับโดยตัวเซลล์และโพลิเมอร์ชีวภาพ

นำตัวเซลล์และโพลิเมอร์ชีวภาพแบบแห้งของ *P.aeruginosa* (P3) ไปทดสอบความสามารถในการดูดซับตะกั่ว โดยมีการปรับพีเอชเป็น 6 และ 8 พบว่าเมื่อพีเอชของสารละลายเพิ่มขึ้นจะทำให้ ประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วของตัวเซลล์ ลดลงจาก 0.01 เป็น 0.0096 ตามลำดับ ประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วของโพลิเมอร์ ชีวภาพลดลงจาก 0.01 เป็น 0.0097 ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพในการดูดซับได้ดีกว่า *P.aeruginosa* (P) ซึ่งเป็นตัวเปรียบเทียบ เนื่องจากตัวเซลล์ของเชื้อส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ดีในบริเวณที่มีพีเอชเป็น 7-7.5 (Sinha, J., Bae, J.T., Park, J.P., Kim, K.M., Song,C.H. และ Yun, J.W., 2001)

7.4 อุณหภูมิของตัวเซลล์และโพลิเมอร์ชีวภาพที่ใช้ในการดูดซับตะกั่ว

นำตัวเซลล์และโพลิเมอร์ชีวภาพแบบแห้งของ *P.aeruginosa* (P3) ไปทดสอบความสามารถในการดูดซับตะกั่ว บ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 30°C พบว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้ประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วโดยตัวเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 0.0097 เป็น 0.0099 ตามลำดับ ประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วโดยโพลิเมอร์ชีวภาพเพิ่มขึ้นจาก 0.0099 เป็น 0.01 ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพในการดูดซับได้ดีกว่า *P.aeruginosa* (P) ซึ่งเป็นตัว เปรียบเทียบ เนื่องจากอุณหภูมิที่ 30 °C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการเติบโตของเชื้อ (Sinha, J., Bae, J.T., Park, J.P., Kim, K.M., Song,C.H. และ Yun, J.W., 2001)

7.5 ระยะเวลาที่ตัวเซลล์และโพลิเมอร์ชีวภาพใช้ในการดูดซับตะกั่ว

นำตัวเซลล์และโพลิเมอร์ชีวภาพแบบแห้งของ *P.aeruginosa* (P3) ไปทดสอบความสามารถในการดูดซับตะกั่วโดยใช้ระยะเวลา 60 และ 80 นาทีพบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาจะทำให้ประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วโดยตัวเซลล์ลดลงจาก 0.01 เป็น 0.0097 ตามลำดับ ประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วโดยโพลิเมอร์ชีวภาพลดลงจาก 0.01 เป็น 0.0099 ตามลำดับและมีประสิทธิภาพในการดูดซับได้ดีกว่า *P.aeruginosa* (P) ซึ่งเป็นตัวเปรียบเทียบ เนื่องจากเชื้อสามารถดูดซับตะกั่วได้ดีในช่วงแรก เมื่อระยะเวลานานขึ้นเชื้อเกิดการอิ่มตัว ทำให้ ดูดซับตะกั่วได้น้อยลง (Sinha, J., Bae, J.T., Park, J.P., Kim, K.M., Song,C.H. และ Yun, J.W., 2001)

จากการทดลองปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซับตะกั่วของ *P.aeruginosa* (P3) โดยใช้โพลิเมอร์ชีวภาพจะทำให้ประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วได้ดีกว่าตัวเซลล์ นำข้อมูลมาทำการเปรียบเทียบปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วของเชื้อ *P.aeruginosa* (P3) โดยใช้ตัวเซลล์และ โพลิเมอร์ชีวภาพตามวิธีการของ Duncan 's new multiple range test พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

สรุปผลการทดลอง

เมื่อนำตัวอย่างน้ำทะเลและน้ำกร่อยจากบริเวณต่างๆของอ.เมือง จ.สงขลา จำนวน 8 แหล่ง มาแยกเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร A พบว่ามีจำนวน 68 สายพันธุ์ สามารถพบเชื้อได้มากที่สุดในบริเวณท่าแพขนานยนต์ ซึ่งมีจำนวน 16 สายพันธุ์

ทำการคัดเลือกเฉพาะกลุ่มที่สร้างเมือกได้ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร B และจำแนกชนิดในระดับจีนัสได้เป็น *Pseudomonas* spp. มีจำนวน 7 สายพันธุ์ คือ P3 P14 P33 P37 P42 P61 และ P67 เมื่อจำแนกชนิดในระดับสปีชีส์พบว่าทุก สายพันธุ์เป็น *P.aeruginosa*

นำ *P.aeruginosa* แต่ละสายพันธุ์ มาศึกษาการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร C พบว่า *P.aeruginosa* (P3) เจริญได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่นๆมีค่า generation time เป็น 1.94 ชั่วโมง และมีค่า specific growth rate เป็น 0.36 ชั่วโมง$^{-1}$ แต่จะเจริญได้น้อยกว่าสายพันธุ์ *P.aeruginosa* (P) ซึ่งเป็นตัวเปรียบเทียบ

นำ *P.aeruginosa* แต่ละสายพันธุ์มาทดสอบความสามารถในการดูดซับตะกั่วที่มีความเข้มข้น 4 mg/l พบว่า การดูดซับตะกั่วโดยใช้ตัวเซลล์ของเชื้อ *P.aeruginosa* (P3) มีประสิทธิภาพในการดูดซับได้ดีที่สุดโดยมีค่า 0.0097 ส่วนการดูดซับโดยใช้โพลิเมอร์ชีวภาพมีประสิทธิภาพในการดูดซับได้ดีที่สุดโดยมีค่า 0.0100 และมี ประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วสูงกว่า *P.aeruginosa* (P) ซึ่งเป็นตัวเปรียบเทียบ

เมื่อนำผลมาวิเคราะห์ทางสถิติตามวิธีการของ Duncan 's new multiple range test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p>0.05$)

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซับตะกั่วของเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วได้ดีที่สุดคือ *P.aeruginosa* (P3) โดยใช้ตัวเซลล์และโพลิเมอร์ชีวภาพให้ผลที่สอดคล้องกัน พบว่าปริมาณเชื้อที่เหมาะสมคือ 400 mg พีเอชที่ทำให้ประสิทธิภาพในการดูดซับสูงสุดคือ 6 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30°C และระยะเวลาที่เชื้ออยู่ใน สารละลายได้ดีที่สุดคือ 60 นาที

เมื่อนำข้อมูลปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการดูดซับตะกั่วโดยใช้ตัวเซลล์และโพลิเมอร์ชีวภาพมาวิเคราะห์ทางสถิติตามวิธีการของ Duncan 's new multiple range test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ คุณวนัสนันท์ ธัญญพาณิชย์ ศูนย์วิทยาศาสตร์ กองทุนพัฒนาการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

เอกสารอ้างอิง

จันทร์ทิพย์ คงศร และอัจฉรา ธรรมทินนะ. 2546. การแยกแบคทีเรียในทะเล ที่สามารถสร้างโพลิเมอร์ชีวภาพที่มีความสามารถในการดูดซับตะกั่วได้. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ดวงพร คันธโชติ และพรศิลป์ ศิริพงศ์วุฒิกร. 2529. การดูดซับโลหะหนักโดยแบคทีเรียแกรมลบ. ว. คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์. 5(2) : 181-203.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โอ - เดียนสโตร์. 202 หน้า.

ธีรยุทธ สายละมูล และจิตรา ลารีนู. 2545. ปริมาณโลหะหนักบางชนิดในน้ำจากคลองสำโรง ต.เขารูปช้าง อ.เมือง จ.สงขลา. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏสงขลา.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.นครินทรวิโรฒประสานมิตร. สำนักพิมพ์ Noble Print. กรุงเทพฯ.

มานี เตื้อสกุล. 2535. จุลชีววิทยาในน้ำ. วิทยาลัยครูสงขลา จัดพิมพ์ตามโครงการผลิตตำราเพื่อเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระเทพฯรัตนราชสุดา สยามบรมราชกุมารี.

รัชยาภรณ์ ผลมั่ง และพูนสุข ประเสริฐสรรพ์. 2540. การดูดซับโลหะหนักโดยแบคทีเรีย. ว.สงขลานครินทร์ วทท. 19:395-404.

ลัดดา อุดมผล. 2546. ตะกั่ว...พิษร้ายทำลายสุขภาพ. วันอนามัยโลก. 3 หน้า.

ศิริพรต ผลสินธุ์. 2530. ชีวิตกับสิ่งแวดล้อม. ภาควิชาชีววิทยา วิทยาลัยครูบ้านสมเด็จเจ้าพระยา. 252 หน้า.

สุกาญจน์ รัตนเลิศนุสรณ์. 2546. หลักการจัดการสิ่งแวดล้อม. สำนักพิมพ์ สสท. กรุงเทพฯ.

อรไท สุขเจริญ. 2545. การดูดซับไอออนตะกั่วโดยเชื้อจุลินทรีย์. ว. วิจัย มหาวิทยาลัยรามคำแหง. 5:114-133.

http://www.environnet.in.th/evdb/info/coast/coast 13.html.

http:// www.hemmerthed.gistda.or.th

http://www.kanchanapisek.or.th/kpo6/BOOK22/chapter6/t22-6-11.html

Gadd, G.M. and White, C. 1993. Microbial treatment of metal pollution- a workingbiotechnology. TIBTECH. 11(8) : 353-359.

Sinha, J., Bae, J.T., Park, J.P., Kim, K.M., Song,C.H. and Yun, J.W. 2001. Changes in Morphology of *Paecilomyces japonica* and their effect on broth rheology during production of exo-biopolymer. J. Appl.Microbiol. Biotechnol. 56 : 88-92.

Wehrheim,B and Wettern,M. 1994. Biosorption of cadmium, copper and lead by isolated mother cell walls and whole cells of *Chlorella fusca*. J.Appl.Microbiol. Biotechnol. 41 : 725-728.