



การคัดแยกแบคทีเรียทนโลหะหนักในดินตะกอนจากเหมืองดีบุกร้างและการนำไปใช้เพื่อบำบัด
โลหะหนัก

ISOLATION OF HEAVY METALS RESISTANT BACTERIAL IN SEDIMENT FROM
ABANDONED TIN MINES AND ITS USE FOR HEAVY METALS REMOVAL

ขวัญจันทร์ ทามาศ

บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2561

การตัดแยกแบคทีเรียทนโลหะหนักในดินตะกอนจากเหมืองดีบุกร้างและการนำไปใช้
เพื่อบำบัดโลหะหนัก



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมและการจัดการทรัพยากร
คณะวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ISOLATION OF HEAVY METALS RESISTANT BACTERIAL IN SEDIMENT
FROM ABANDONED TIN MINES AND ITS USE FOR HEAVY METALS
REMOVAL



A Thesis Submitted in partial Fulfillment of Requirements
for MASTER OF SCIENCE (Environmental Technology & Resources Management)
Faculty of Environmental Culture and Ecotourism Srinakharinwirot University

2018

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การคัดแยกแบคทีเรียทนโลหะหนักในดินตะกอนจากเหมืองดีบุกร้างและการนำไปใช้เพื่อบำบัดโลหะหนัก

ของ

ขวัญจันทร์ ทามาศ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมและการจัดการทรัพยากร
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทนายท ศรียาภัย) (ดร.มนตรี ยะสว่างษ์)

..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชานันท์ ศรียาภัย) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัญจน์ ศิลป์ประสิทธิ์)

ชื่อเรื่อง	การคัดแยกแบคทีเรียทนโลหะหนักในดินตะกอนจากเหมืองดีบุก ร้างและการนำไปใช้เพื่อบำบัดโลหะหนัก
ผู้วิจัย	ขวัญจันทร์ ทามาศ
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทายาท ศรียามัย

ตะกอนดินจากเหมืองดีบุกร้างในจังหวัดระนองพบการปนเปื้อนไอออนของโลหะหนัก ได้แก่ ปรอท ตะกั่ว และทองแดง เหมืองร้างในตำบลบางรีนพบว่ามีปริมาณปรอท (0.171 ppm) และทองแดง (12.32 ppm) ซึ่งสูงกว่าตะกอนดินจากแหล่งเหมืองอื่นๆ อย่างไรก็ตามพบการปนเปื้อนตะกั่วสูงที่สุด (45.69 ppm) จากตะกอนดินในเหมืองร้างตำบลหาดส้มแป้น เมื่อทำการเพาะเลี้ยงและนับจำนวนโคโลนีเพื่อประเมินว่ามีเชื้อแบคทีเรียที่บ่งชี้การปนเปื้อนทนโลหะหนักในตะกอนดิน พบว่าดินจากเหมืองในตำบลบางรีนมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อตะกั่วมากที่สุด จำนวน 1.2×10^6 CFU/g และ 7.5×10^5 CFU/g ในระดับความเข้มข้นตะกั่วที่ 1 มิลลิโมลาร์ และ 5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และดินจากแหล่งนี้ยังพบจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อปรอทมากที่สุด จำนวน 2.0×10^3 CFU/g และ 8.0×10^2 CFU/g ตามลำดับ ในระดับความเข้มข้นปรอทที่ 0.1 มิลลิโมลาร์ และ 0.2 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ในการศึกษานี้ได้คัดเลือกเชื้อ *Bacillus* sp. SWU24, *Cupriavidus* sp. SWU27 และ *Pseudomonas* sp. SWU3 เป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงในการทนโลหะหนักพร้อมกันทั้ง 3 ชนิด จากการทดสอบพบว่าการใช้เซลล์มีชีวิตของสายพันธุ์ *Pseudomonas* sp. SWU3 สามารถบำบัดปรอทและตะกั่วในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ $81.9 \pm 1.7\%$ และ $94.9 \pm 0.6\%$ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการใช้เซลล์ของเชื้อ *Cupriavidus* sp. SWU27 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการบำบัดปรอทและตะกั่วได้สูงสุดที่ $65.8 \pm 2.5\%$ และ 404.4 ± 27.4 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนั้นในการศึกษานี้เชื้อ *Cupriavidus* sp. strain SWU27 จึงมีประสิทธิภาพมากที่สุดสำหรับนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการบำบัดตะกั่วและปรอทในสิ่งแวดล้อม

คำสำคัญ : โลหะหนัก; เหมืองดีบุกร้าง; แบคทีเรียทนโลหะหนัก

Title	ISOLATION OF HEAVY METALS RESISTANT BACTERIAL IN SEDIMENT FROM ABANDONED TIN MINES AND ITS USE FOR HEAVY METALS REMOVAL
Author	KWANJUN TAMACH
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2018
Thesis Advisor	Assistant Professor Thayat Sriyapai

The soil sediment samples from abandoned tin mines in Ranong province contaminated of heavy metal ions such as mercury, lead and copper. The abandoned mines in Tambon Bang-Rin found mercury (0.171 ppm), copper (12.32 ppm) and tin (3.15 ppm), which was higher than the sediment soils from other mines. However, lead contamination was found in the sediment as high as 45.69 ppm from Tambon Hat Som Paen. Cultivation and counting of grown colonies in order to assess bacterial-heavy metal resistant as bioindicator in soil sediments, the results found that bacterial colonies isolated from the mine in Tambon Bang-Rin were resistant to lead at 1 mM and 5 mM of 1.2×10^6 CFU/g and 7.5×10^5 CFU/g, respectively, and were resistant to mercury at 0.1 mM and 0.2 mM of 2.0×10^3 CFU/g and 8.0×10^2 CFU/g, respectively. In this study, *Bacillus* sp. SWU24, *Cupriavidus* sp. SWU27 and *Pseudomonas* sp. SWU3, a species with a high potential for resistance to three kinds of heavy metals were collected. The living cells of *Pseudomonas* sp. SWU3 can remove mercury and lead in medium at $81.9 \pm 1.7\%$ and $94.9 \pm 0.6\%$ respectively. However, biomass of *Cupriavidus* sp. strain SWU7 can remove lead and mercury at 65.8 ± 2.5 and 404.4 ± 27.4 mg/g of cell dry weight, respectively. Therefore, in this study, the *Cupriavidus* sp. strain SWU27 was the most effective for apply to treat mercury and lead in environmental.

Keyword : heavy metals; abandoned tin mines; heavy metal-resistant bacteria

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ได้ด้วยความกรุณาความช่วยเหลือ การเอาใจใส่ดูแล การให้คำปรึกษา การอบรมสั่งสอน รวมทั้งกำลังใจอย่างดียิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทายาท ศรียามัย ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชามัค ศรียามัย และรองศาสตราจารย์ ดร. อรินทร์ งามนิยม ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้สละเวลาอันมีค่าให้ความรู้ ให้คำปรึกษาแนะแนวทางในการจัดทำปริญญาานิพนธ์ทุก ๆ ขั้นตอน และกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัญจน์ ศิลป์ประสิทธิ์ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำ แนวทางการแก้ไขและปรับปรุงข้อบกพร่องต่าง ๆ ทุกประการในการทำปริญญาานิพนธ์นี้จนสำเร็จด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงยิ่งไว้ ณ ที่นี้

กราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.มนตรี ยะสาวงษ์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกจากสถาบันบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์ ซึ่งให้เกียรติมาเป็นประธานคณะกรรมการสอบปากเปล่า ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทายาท ศรียามัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชามัค ศรียามัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัญจน์ ศิลป์ประสิทธิ์ ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำในการปรับปรุงปริญญาานิพนธ์จนสมบูรณ์อย่างยิ่ง และประสาทวิชาความรู้แก่ผู้วิจัยจนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบพระคุณผู้บริหาร อาจารย์ และเจ้าหน้าที่ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน ภาควิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมและการจัดการทรัพยากร คณะวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำเสมอมา ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิชามัค ศรียามัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ห้องวิจัยทางจุลชีวะวิทยา (ห้อง 19-1101) ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และทุกคนในครอบครัว เพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ที่เป็นกำลังใจและมีส่วนช่วยในการทำปริญญาานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงและทำให้ประสบความสำเร็จในการศึกษานี้

ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอณาเอาผลประโยชน์อันเกิดจากปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่จุลินทรีย์ทุกชนิด ที่ได้สละชีวิตเพื่อการทำปริญญาานิพนธ์ของข้าพเจ้า

ขวัญจันทร์ ทามาศ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
ความสำคัญของการวิจัย	3
ขอบเขตของการศึกษา	3
ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
1. กิจกรรมที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนโลหะหนัก	5
2. การปนเปื้อนและการสะสมโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม.....	7
2.1 การปนเปื้อนโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม	7
2.2 การสะสมโลหะหนัก	9
3. ประเภทของโลหะหนัก.....	10
3.1 ตะกั่ว (Lead : Pb)	10
3.2 ทองแดง (Copper : Cu).....	13
3.3 ปรอท (Mercury : Hg).....	15

4. แบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนัก.....	17
5. กลไกการทำงานของแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนัก	20
5.1 การขัดขวางการนำเข้าโลหะหนัก.....	20
5.2 การขนส่งไอออนโลหะหนัก	20
5.3 การจับโลหะหนักที่ผนังเซลล์.....	20
5.4 การสะสมโลหะหนักภายในเซลล์.....	21
5.5 การลดไอออนโลหะหนัก	21
6. การกำจัดโลหะหนักทางชีวภาพ	22
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	25
อุปกรณ์และสารเคมี.....	25
1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	25
2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	26
วิธีดำเนินการวิจัย.....	28
1. การตรวจนับและการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียทนโลหะหนักในตะกอนดิน.....	28
1.1 การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในตะกอนดินจากเหมืองดีบุกร้าง	28
1.2 การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในดิน.....	28
1.3 การศึกษาความสัมพันธ์อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในแต่ละความเข้มข้น ของโลหะหนัก	28
1.4 การหาความเข้มข้นของโลหะหนักที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย Minimal inhibitory concentration (MIC).....	29
2. จำแนกสายพันธุ์และทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียทนโลหะหนัก	29
2.1 การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่ทนโลหะหนัก	29
2.2 การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่ทนโลหะหนัก	31
2.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่ทนโลหะหนัก	31

3. ศึกษาศักยภาพในการบำบัดโลหะหนักในอาหารเหลวด้วยเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิต	32
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	33
1. การตรวจนับและการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียทนโลหะหนักในตะกอนดิน	33
1.1 ปริมาณโลหะหนักจากตัวอย่างดินและตะกอนดินจากเหมืองดีบุกร้างในจังหวัดระนอง	33
1.2 การตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่บ่งชี้การต้านทานโลหะหนัก	36
1.3 การแยกเชื้อแบคทีเรียต้านทานโลหะหนักจากเหมืองร้างในจังหวัดระนอง	37
1.4 การทดสอบความเข้มข้นของโลหะหนักที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย..	40
2. การจัดจำแนกสายพันธุ์และทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียทนโลหะหนัก	43
2.1 การจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียทนโลหะหนัก	43
2.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้	45
3. การทดสอบการบำบัดโลหะหนักของเชื้อแบคทีเรีย	48
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผล.....	59
บรรณานุกรม	64
ภาคผนวก.....	71
ภาคผนวก ก	72
ภาคผนวก ข	74
ประวัติผู้เขียน.....	85

สารบัญตาราง

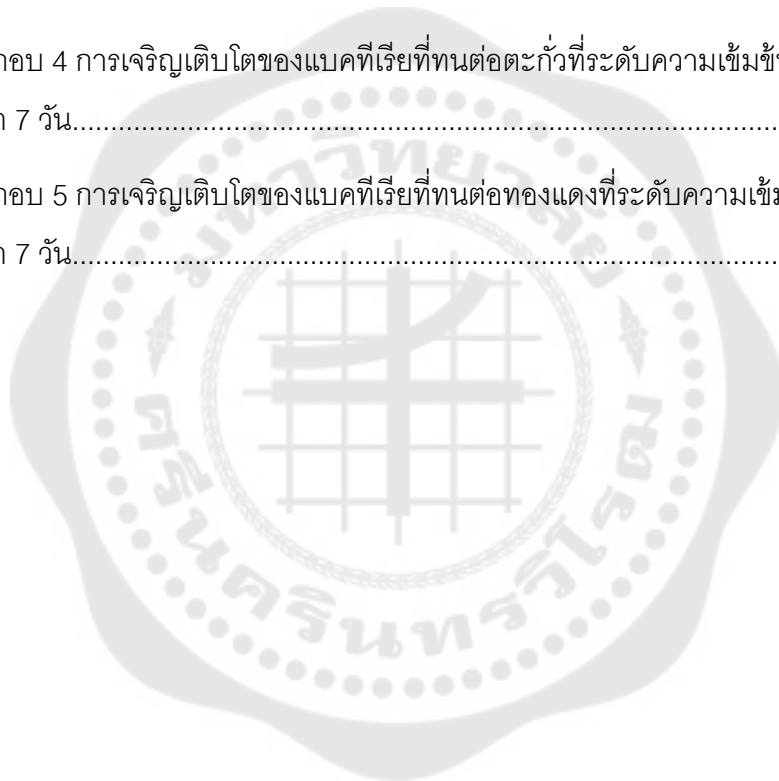
	หน้า
ตาราง 1 การใช้ประโยชน์จากตะกั่ว	12
ตาราง 2 รูปแบบทางเคมีและความเป็นพิษของสารปรอท.....	16
ตาราง 3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	25
ตาราง 4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	26
ตาราง 5 ปริมาณโลหะหนักจากตัวอย่างดินและตะกอนดินจากเหมืองดีบุกร้างในจังหวัดระนอง	34
ตาราง 6 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ต้านทานโลหะหนักจากเหมืองร้างแหล่งต่าง ๆ ในจังหวัดระนอง	37
ตาราง 7 จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการต้านทานโลหะหนักที่แยกได้จากเหมืองตำบล บางรี้น (N=27)	38
ตาราง 8 จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการต้านทานโลหะหนักที่แยกได้จากเหมืองตำบล หาดส้มแป้น (N=14)	38
ตาราง 9 จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการต้านทานโลหะหนักที่แยกได้จากเหมืองตำบล บางนอน (N=4)	39
ตาราง 10 จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการต้านทานโลหะหนักที่แยกได้จากเหมืองตำบล หงาว (N=6).....	39
ตาราง 11 ความเข้มข้นในการต้านทานโลหะหนักของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเหมืองร้าง ใน จังหวัดระนอง	41
ตาราง 12 การวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่ทนโลหะหนักด้วยเทคนิค 16S rDNA sequencing.....	44
ตาราง 13 การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียทนโลหะหนัก.....	47
ตาราง 14 ศักยภาพในการบำบัดโลหะหนักในอาหารเหลือร่วมกับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ...	51

ตาราง 15 ศักยภาพในการบำบัดโลหะหนักในอาหารเหลือด้วยเซลล์ของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> sp. SWU3.....	52
ตาราง 16 ศักยภาพในการบำบัดโลหะหนักในอาหารเหลือด้วยเซลล์ของเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. SWU24	54
ตาราง 17 ศักยภาพในการบำบัดโลหะหนักในอาหารเหลือด้วยเซลล์ของเชื้อ <i>Cupriavidus</i> sp. SWU27.....	55
ตาราง 18 ศักยภาพในการบำบัดโลหะหนักในอาหารเหลือและการดูดซับโลหะหนักภายในเซลล์ แบคทีเรีย.....	57



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 กลไกทางชีวภาพของแบคทีเรียในการบำบัดโลหะหนัก.....	21
ภาพประกอบ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเพื่อใช้บำบัดโลหะหนัก	46
ภาพประกอบ 3 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทนต่อปรอทที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็น ระยะเวลา 7 วัน.....	48
ภาพประกอบ 4 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทนต่อตะกั่วที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็น ระยะเวลา 7 วัน.....	49
ภาพประกอบ 5 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็น ระยะเวลา 7 วัน.....	49



บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ปัจจุบันประเทศไทยกำลังมีความเจริญเติบโตทางด้านเศรษฐกิจและสังคมเป็นอย่างมาก ทั้งการพัฒนาทางด้านอุตสาหกรรมและการเกษตร เนื่องจากการผลักดันเทคโนโลยีและผลผลิตต่าง ๆ ทั้งการอุปโภคและบริโภค เพื่อตอบสนองความต้องการของมนุษย์ รวมไปถึงการขยายตัวของประชากร การขยายตัวของชุมชนเมือง การพัฒนาด้านเศรษฐกิจและสังคม เป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดความต้องการในการผลิตสินค้าเพิ่มมากขึ้น หนึ่งในนั้นคือความต้องการสินค้าแร่เพื่อเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิต ทั้งทางด้านเกษตรและอุตสาหกรรม ดังนั้นอุตสาหกรรมการทำเหมืองแร่จึงมีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศในทางอุตสาหกรรมต่อเนื่องหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมการก่อสร้าง อุตสาหกรรมแก้วและกระจก อุตสาหกรรมเซรามิกซ์ อุตสาหกรรมปูนซีเมนต์ และการผลิตไฟฟ้า เป็นต้น ทำให้เกิดการใช้โลหะหนักและสารเคมีในปริมาณมาก ซึ่งเป็นสารที่เป็นมลพิษ (pollutant) โลหะหนักและสารเคมีหลายชนิดถูกนำมาใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะ ตะกั่ว ทองแดง และปรอท ยกตัวอย่าง เช่น เป็นวัตถุดิบสำคัญในอุตสาหกรรมโลหะบัดกรี อุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์ อุตสาหกรรมแบตเตอรี่ หม้อน้ำรถยนต์ เครื่องใช้ไฟฟ้า แผงวงจรไฟฟ้า ส่วนประกอบของคอมพิวเตอร์ อุตสาหกรรมเครื่องประดับ อุตสาหกรรมยานยนต์ อุตสาหกรรมการผลิตกระป๋องบรรจุภัณฑ์ อุตสาหกรรมเครื่องทำความเย็น และอุตสาหกรรมผลิตเครื่องใช้ในครัวเรือน เป็นต้น จากการใช้โลหะหนักอย่างกว้างขวางส่งผลทำให้เกิดปัญหาการแพร่กระจายโลหะหนักสู่สิ่งแวดล้อม จากรายงานของ (Ramachandra, Sudarshan, Mahesh, & Vinay, 2018, p. 1204-1210) กล่าวว่าโลหะหนักเป็นหนึ่งในสารเคมีที่มีความเป็นพิษมากที่สุดและยังสะสมในดิน ทำให้เกิดปัญหาระดับโลก ซึ่งโลหะหนักเหล่านี้เคลื่อนที่ผ่านวัฏจักรของสารเคมีและเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร ทำให้เกิดการสะสมทางชีวภาพ เป็นอันตรายต่อสัตว์และมนุษย์ โดยโลหะหนักเหล่านี้หากมีการสะสมในดินและแพร่สู่สิ่งแวดล้อม จะไม่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ

ดังนั้นการบำบัดโลหะหนักจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการแก้ปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม สามารถทำได้ 3 วิธี ได้แก่ วิธีการทางกายภาพ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ กระบวนการในการบำบัดโลหะหนักขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น เทคโนโลยีของการบำบัด ความเข้มข้นของโลหะหนัก ความเป็นกรด - ด่างของตะกอนดิน และกลไกของการบำบัด เทคนิคในปัจจุบันที่นิยมใช้ คือ วิธีการกายภาพ เช่น วิธีการกรอง (filtration)

การแยกกรองด้วยไฟฟ้า (electrodialysis) วิธีออสโมซิสย้อนกลับ (reverse osmosis) การแลกเปลี่ยนประจุ (ion - exchange) การตกตะกอนด้วยวิธีการทางเคมี (chemical precipitation) เช่น การใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นตัวออกซิไดซ์ที่แรงสามารถกำจัดตะกั่ว และทองแดงที่ปนเปื้อนโลหะหนักในดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ วิธีทางเคมีและทางกายภาพ มีข้อเสีย เนื่องจากไม่สามารถบำบัดโลหะหนักได้อย่างสมบูรณ์ เพราะทั้ง 2 วิธีต้องใช้ตัวทำปฏิกิริยาและใช้พลังงานสูงยากต่อการนำไปบำบัดต่อ จึงมีการใช้วิธีทางชีวภาพเป็นอีกหนึ่งทางเลือกคือการใช้แบคทีเรียเพื่อบำบัดโลหะหนัก เป็นกระบวนการบำบัดโลหะหนักที่ไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย แบคทีเรียสามารถคัดแยกได้ตามแหล่งธรรมชาติและมีความสามารถในการจับโลหะหนักด้วยกลไกต่าง ๆ ซึ่งเป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับการดูดซับ เช่น กลไกเมแทบอลิซึมของเซลล์ จำแนกเป็นกลไกที่เกิดขึ้นและไม่เกิดขึ้นจากกระบวนการสร้างและสลาย หรือกลไกการสะสมโลหะหนักภายในเซลล์ การตกตะกอนนอกเซลล์ การตกตะกอนบนผิวหน้าเซลล์ ไอออนของโลหะหนักที่ถูกดูดซับจะถูกส่งผ่านเข้าไปสู่เยื่อเมมเบรน ซึ่งเหมือนกับการทำงานของกลไกการรับ-ส่งไอออนของโพแทสเซียม โซเดียม และแมกนีเซียม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางเคมีเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาด้วยแบคทีเรีย เช่น การออกซิไดซ์ การรีดิวซ์ การเติม และการเปลี่ยนแปลงของหมู่เมทิล จึงมีหลายงานวิจัยที่รายงานเกี่ยวกับการคัดแยกแบคทีเรียที่ทนโลหะหนักและมีความสามารถในการบำบัดโลหะหนักได้ดี อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้นที่สามารถบำบัดโลหะหนักได้ ทั้งยังมีรายงานไม่มากนักเกี่ยวกับการบำบัดโลหะหนักด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยการใช้แบคทีเรียและศึกษาคุณสมบัติในการบำบัดโลหะหนัก

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการศึกษาแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติและศักยภาพในการบำบัดโลหะหนัก โดยการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียทำให้บริสุทธิ์ ศึกษาคุณสมบัติและประสิทธิภาพการทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เพื่อใช้แบคทีเรียในการบำบัดโลหะหนักได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งคาดว่างานวิจัยในครั้งนี้จะมีประโยชน์สามารถประยุกต์ใช้เพื่อการบำบัดโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1. เพื่อคัดแยกแบคทีเรียทนโลหะหนักจากเหมืองดีบุกร้าง
2. เพื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักปรอท ตะกั่ว และทองแดง
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติและประสิทธิภาพในการกำจัดปรอท ตะกั่ว และทองแดง

ด้วยเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิต (living cell)

ความสำคัญของการวิจัย

จากงานวิจัยนี้ได้องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับแบคทีเรียที่มีความสามารถในการบำบัดโลหะหนัก โดยการใช้แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเหมืองแร่ดีบุกร้าง ตำบลบางรีน ตำบลหาดส้มแป้น ตำบลบางนอน และตำบลหวาง ในจังหวัดระนอง โดยใช้เทคนิคการคัดแยก คัดเลือก ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ทดสอบการบำบัดโลหะหนัก ปัจจุบันการศึกษากการใช้เชื้อแบคทีเรียเพื่อบำบัดโลหะหนักยังมีน้อย ซึ่งงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาการบำบัดโลหะหนักและการใช้แบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ในการบำบัดโลหะหนักต่อไป นอกจากนี้ยังใช้เป็นข้อมูลให้แก่ผู้ที่สนใจศึกษาและหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง นำไปพัฒนาองค์ความรู้ใหม่ ๆ หรือใช้เป็นข้อมูลในการแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมต่อไป

ขอบเขตของการศึกษา

การศึกษาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนต่อโลหะหนัก เริ่มจากการ วิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักจากตะกอนดินเหมืองร้างในจังหวัดระนอง ประเทศไทย ทั้งหมด 4 แหล่ง ได้แก่ เหมืองร้างในตำบลบางรีน เหมืองร้างในตำบลหาดส้มแป้น เหมืองร้างในตำบลบางนอน และเหมืองร้างในตำบลหวาง การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตะกอนดินบนอาหารแข็ง Tryptic soy agar (TSA) ที่มีโลหะหนักปรอท ตะกั่ว และทองแดง ผสมอยู่ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และหาความเข้มข้นของโลหะหนักที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย จากนั้นทำการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่ทนโลหะหนัก คัดเลือกแบคทีเรียที่ได้จากการจำแนกสายพันธุ์มาทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย เมื่อได้เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติดีในการทนโลหะหนัก ทำการศึกษาศักยภาพในการบำบัดโลหะหนักปรอท ตะกั่ว และทองแดง ในอาหารเหลวด้วยด้วยเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิต (living cell)

ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

จากงานวิจัยนี้จะทำให้ได้แบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการบำบัดโลหะหนักปรอท ตะกั่ว และทองแดง ที่คัดแยกได้จากตะกอนดินเหมืองร้างในจังหวัดระนอง ประเทศไทย แบคทีเรียที่คัดเลือกได้มีประสิทธิภาพในการบำบัดโลหะหนักจากแหล่งธรรมชาติ ซึ่งสามารถคัดแยกและคัดเลือกได้ง่าย ทำให้เป็นทางเลือกอีกทางในการบำบัดโลหะหนักด้วยวิธีทางชีวภาพ เนื่องจากประหยัดค่าใช้จ่าย นอกจากนี้ยังสามารถนำผลการศึกษาที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดโลหะหนักจากการปนเปื้อนในแหล่งอื่น ๆ ได้ต่อไป



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. กิจกรรมที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนโลหะหนัก

ดินไม่ใช่แค่เป็นปัจจัยที่สิ่งมีชีวิตบนบกอาศัยเท่านั้น แต่ยังมีบทบาทที่สำคัญด้านวัฏจักรและการเปลี่ยนแปลงพลังงานในระบบนิเวศ เมื่อระบบทางด้านอุตสาหกรรมและการพัฒนาเมืองเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดมลภาวะทางดิน กลายเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมที่ร้ายแรงจากปริมาณความเข้มข้นของโลหะหนักที่เพิ่มขึ้น โลหะหนักเป็นอันตรายอย่างยิ่ง เนื่องจากมีความเป็นพิษสูงไม่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ เมื่อเกิดกระบวนการทางกายภาพและทางเคมี (การชะล้างและการออกซิเดชัน) ส่งผลทำให้เกิดการสะสมโลหะหนักในดินและเกิดการแพร่ลงสู่แหล่งน้ำ เมื่อนำน้ำไปใช้กับพืชผลการเกษตรจะส่งผลต่อสุขภาพของประชาชน โดยผ่านทางกรรไกรใช้น้ำประปาและห่วงโซ่อาหาร มลพิษทางโลหะหนักยังไม่ได้รับการควบคุมอย่างมีประสิทธิภาพเพราะกิจกรรมของมนุษย์มีเพิ่มมากขึ้นในทุก ๆ วัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่กำลังพัฒนา ดังนั้นทั่วโลกจึงมีความกังวลกับการปล่อยโลหะหนักและการปนเปื้อนของโลหะหนักไปสู่สิ่งแวดล้อม (Yan, Liu, Zhong, Guo, & Wu, 2018, p. 338) ดินเกิดการปนเปื้อนจากการสะสมโลหะหนักและสารกึ่งโลหะหนักที่ถูกปล่อยมลพิษจากพื้นที่อุตสาหกรรมที่ขยายตัวอย่างรวดเร็ว เช่น กิจกรรมการทำเหมืองแร่ การกำจัดของเสียที่มีโลหะสูง การผลิตน้ำมันเบนซินที่เติมสารตะกั่วและสี การใช้ที่ดินในการทำปุ๋ย มูลสัตว์ กากตะกอนน้ำเสีย สารกำจัดศัตรูพืช การชลประทานน้ำเสีย การตกค้างจากการเผาไหม้ถ่านหิน การรั่วไหลของปิโตรเลียมเคมี และการสะสมโลหะหนักในชั้นบรรยากาศ ทำให้เกิดการปนเปื้อนโลหะหนักประเภทสารอนินทรีย์ที่เป็นอันตราย เช่น ตะกั่ว (Pb), โครเมียม (Cr), สารหนู (As), สังกะสี (Zn), แคดเมียม (Cd), ทองแดง (Cu), ปรอท (Hg) และนิกเกิล (Ni) (Wuana & Okieimen, 2011, p. 20)

ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการปนเปื้อนโลหะหนักจากกิจกรรมต่าง ๆ ทั้งที่เกิดขึ้นเองทางธรรมชาติและกิจกรรมของมนุษย์ ส่วนใหญ่ได้ศึกษาเกี่ยวกับปริมาณโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเพื่อนำไปสู่การหาวิธีการป้องกันและแก้ไขปัญหาในการกำจัดโลหะหนัก นำไปสู่การศึกษางานวิจัยต่าง ๆ ดังนี้

งานวิจัยการแพร่กระจายโลหะหนักในพื้นที่นาข้าวรอบบ่อฝังกบขยะ ศึกษาปริมาณโลหะหนักในน้ำ ดิน และต้นข้าว ในพื้นที่ที่ใกล้เคียงบ่อฝังกบขยะ ตำบลวังน้ำคู้ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก โดยทำการวิเคราะห์โลหะหนักในต้นข้าว น้ำ และดิน ได้แก่ ทองแดง (Cu), สังกะสี (Zn), แคดเมียม (Cd), โครเมียม (Cr), ตะกั่ว (Pb) และแมงกานีส (Mn) ผลการศึกษาพบว่าปริมาณโลหะ

หนักที่พบในดินมีปริมาณของโลหะหนัก ได้แก่ ปริมาณทองแดง 8.6-24.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และ 7.7-24.6 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ ปริมาณสังกะสี (Zn) 51.3-86.7 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม และ 51.5-87.5 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม ตามลำดับ ปริมาณของแคดเมียม (Cd) 10.3-11.2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และ 9.8-11.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และปริมาณแมงกานีส 8.1-47.5 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม และ 12.8-45.7 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ โลหะหนักที่พบในน้ำ ได้แก่ ปริมาณทองแดง (Cu) 0.0-0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาณสังกะสี (Zn) 0.2-0.4 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาณแคดเมียม (Cd) 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร และปริมาณแมงกานีส (Mn) 0.2-0.4 มิลลิกรัม/ลิตร นอกจากนี้ยังพบ การปนเปื้อนโลหะหนักในต้นข้าว ได้แก่ ปริมาณทองแดง (Cu) 0.3-5.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ปริมาณสังกะสี (Zn) 34.9-56.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ปริมาณแคดเมียม (Cd) 10.2-11.2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และปริมาณแมงกานีส (Mn) 8.8-49.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (วาสนา แนนบาง และ วิจิตรา เมาเตจา, 2557, น. 100)

งานวิจัยการหาพื้นที่เสี่ยงจากโลหะหนักในน้ำบาดาลจากกิจกรรมเหมืองแร่ ด้วยระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ ศึกษาหาพื้นที่เสี่ยงในการปนเปื้อนสารโลหะหนักจากเหมืองแร่ทองคำ และสร้างแนวทางการป้องกันจากผลกระทบที่เกิดขึ้น ในพื้นที่อำเภอทับคล้อ จังหวัดพิจิตร และพื้นที่อำเภอวังโป่ง จังหวัดเพชรบูรณ์ ด้วยระบบสารสนเทศทางภูมิศาสตร์ จากข้อมูลความสูงของพื้นที่ในการใช้น้ำบาดาลและปริมาณโลหะหนักที่กระจายในพื้นที่การทำเหมืองแร่ทองคำ ผลการวิจัยพบว่ามี การปนเปื้อนสารโลหะหนักที่มีความเป็นพิษมีหลายชนิด ได้แก่ สารหนู ปรอท ตะกั่ว ซีลีเนียม และแคดเมียม โลหะหนักเหล่านี้อาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของคนในพื้นที่ที่อาศัยอยู่ใกล้เคียงแหล่งเหมืองแร่ โดยความเสี่ยงที่ได้รับจากสารโลหะหนักจะมีความสัมพันธ์กับระดับความสูงของพื้นที่ในการใช้น้ำบาดาลของคนในชุมชน แหล่งน้ำบาดาลที่มีการปนเปื้อนโลหะหนักจะมีระดับความเสี่ยงที่เป็นอันตรายคิดเป็นร้อยละ 4.09 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของสารโลหะหนักจะลดระดับความรุนแรงลงตามลักษณะทางกายภาพของพื้นที่ ทั้งยังพบว่าแหล่งกำเนิดมลพิษมีพื้นที่เสี่ยงอันตรายมากถึงร้อยละ 9.67 เปอร์เซ็นต์ พื้นที่เสี่ยงปานกลางร้อยละ 23.90 เปอร์เซ็นต์ พื้นที่ความเสี่ยงน้อยร้อยละ 44.90 เปอร์เซ็นต์ และพื้นที่ปลอดภัยจากความเสี่ยงของการปนเปื้อนสารโลหะหนักคิดเป็นร้อยละ 17.44 เปอร์เซ็นต์ (กษิติช จุงพันธ์ และคนอื่น ๆ, 2558)

งานวิจัยการปนเปื้อนของโลหะหนัก อะลูมิเนียม สารหนู ตะกั่ว โคบอลต์ แมงกานีส นิกเกิล ดีบุก สังกะสีและเหล็ก ในตะกอนดินท้องน้ำคลองบางใหญ่ และพื้นที่รับน้ำทิ้งคลองบางใหญ่ จังหวัดภูเก็ต ศึกษาการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารโลหะหนักในดินตะกอนและพื้นที่รองรับน้ำทิ้ง พบว่าการปนเปื้อนปริมาณสารโลหะหนักจากคลองบางใหญ่มีความเข้มข้นมากกว่า

พื้นที่รองรับน้ำทิ้ง โดยพบความเข้มข้นของสารโลหะหนักอะลูมิเนียมและเหล็กมีปริมาณสูงที่สุดในช่วง 28,945-99,961 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และ 6,427-55,568 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ รองลงมาคือ ดีบุกและตะกั่ว มีความเข้มข้นในช่วง 471-15,174 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และ 17-113 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ และยังพบการปนเปื้อนของสารโลหะหนักแมงกานีสมีความเข้มข้นในช่วง 371-1,773 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ส่วนโลหะหนักชนิดอื่น ๆ ไม่พบการปนเปื้อนในธรรมชาติ ความเข้มข้นของสารโลหะหนักที่พบการปนเปื้อนเกิดจากการพัดพาดินตะกอนของน้ำและชีวมวลใต้ท้องน้ำ และดินตะกอนจากการทำเหมืองแร่มาสะสมในพื้นที่ต่าง ๆ ของคลอง (ธงชัย สุธีรศักดิ์ และ ไตรภพ ผ่องสุวรรณ, 2551, น. 779)

จากการศึกษาข้างต้นพบว่า การปนเปื้อนของสารโลหะหนักแต่ละชนิดเกิดจากหลายปัจจัย ขึ้นอยู่กับพื้นที่ที่ได้รับปริมาณความเข้มข้นของสารโลหะหนัก และการแพร่กระจายของสารพิษจากกิจกรรมต่าง ๆ จะมีผลต่อการปนเปื้อนและการสะสมโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม

2. การปนเปื้อนและการสะสมโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม

โลหะหนักเป็นธาตุที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 53 ขึ้นไป ความหนาแน่นมากกว่า 6 g/cm^3 และมีเลขอะตอมมากกว่า 20 การปนเปื้อนของสารโลหะหนักที่เพิ่มมากขึ้นทำให้ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เกิดจากการทำเหมืองแร่ การถลุงเหล็ก กิจกรรมของอุตสาหกรรม วิศวกรรมโลหะกรรม การกำจัดของเสีย การใช้โลหะหนักในการกัดกร่อน การเกษตรกรรม และการสำรวจปิโตรเลียม เป็นต้น รวมไปถึงการปล่อยน้ำทิ้งที่มีการปนเปื้อนโลหะหนัก เช่น แคดเมียม (Cd) ดีบุก (Pb) และสารหนู (As) ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศ ทำให้เกิดอันตรายต่อพืช สัตว์ สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำ และมนุษย์ (Saad A. et al., 2015, p. 158-165)

2.1 การปนเปื้อนโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม

การปนเปื้อนโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมมีหลายปัจจัย สามารถปนเปื้อนได้ด้วยวิธีทางธรรมชาติและเกิดจากกิจกรรมต่าง ๆ จากมนุษย์ ดังนี้

2.1.1 การปนเปื้อนด้วยวิธีทางธรรมชาติเช่น เกิดจากปรากฏการณ์ทางธรรมชาติ ได้แก่ การระเบิดของภูเขาไฟ การผุกร่อนของหิน และการกัดเซาะและชะล้างหน้าดิน เป็นต้น

2.1.2 การปนเปื้อนที่เกิดจากการกระทำของมนุษย์ เช่น เกิดจากการทำกิจกรรมต่าง ๆ ของมนุษย์ ที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนโลหะหนัก ได้แก่ การปล่อยน้ำเสียจากโรงงาน อุตสาหกรรม การใช้สารเคมีในการทำเกษตร และการทำอุตสาหกรรมเหมืองแร่ เป็นต้น

2.1.2.1 การปนเปื้อนจากน้ำทิ้งที่ปล่อยออกจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น การใช้โลหะหนักเป็นส่วนประกอบของอุปกรณ์ไฟฟ้า อุปกรณ์การให้ความร้อน หมึกพิมพ์ สีย้อม สีชุบโลหะ เพื่อป้องกันการกัดกร่อน การผสมสีทาบ้าน การใช้โลหะหนักเป็นส่วนประกอบของยาฆ่าหญ้า

ยาฆ่าแมลง สารกำจัดวัชพืช สิ่งทอ และผลิตภัณฑ์เซรามิกซ์ รวมถึงส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง การทำแบตเตอรี่ โลหะบัดกรี เป็นต้น เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการผลิตมีการปล่อยน้ำทิ้งออกจากโรงงานอุตสาหกรรมไปสู่สิ่งแวดล้อม โดยที่ไม่ได้รับการบำบัดที่ไม่มีประสิทธิภาพ ทำให้โลหะหนักมีการรั่วไหลปนเปื้อนออกสู่สิ่งแวดล้อม

2.1.2.2 การปนเปื้อนจากสารเคมีที่ใช้ในการเกษตร เช่น การใช้สารปรอทในการกำจัดเชื้อราสาเหตุของโรคพืช และปรอทยังเป็นส่วนประกอบของยาฆ่าแมลง เช่น เมอร์คิวริสคลอไรด์ ใช้ในการป้องกันแมลงที่รบกวนต่อรากพืช โดยวิธีการโรยหรือพ่นยาฆ่าแมลงลงบนแปลงปลูกพืช เมื่ออุตสาหกรรมมีการใช้สารปรอทกันอย่างแพร่หลาย ส่งผลให้เกิดการกระจายสารพิษสู่สิ่งแวดล้อม จากการชะล้างจากฝนหรือการกลายเป็นไอ ทำให้เป็นมลพิษทางอากาศและไหลลงสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติ และสารโลหะหนักจะถูกดูดซับไว้ในตะกอนดินใต้ท้องน้ำและบริเวณโดยรอบ รวมถึงแบคทีเรียที่มีกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ให้เป็นสารอินทรีย์ในรูปเมทิลเมอร์คิวรี เมื่อปลาและสิ่งมีชีวิตในน้ำและบนบกได้รับสารปรอทเข้าไป ส่งผลอันตรายต่อมนุษย์ในรูปแบบห่วงโซ่อาหาร (อรรรรณ กิจจาปัญญา, 2547, น. 4)

2.1.2.3 การปนเปื้อนจากอุตสาหกรรมการทำเหมืองแร่ เช่น การถลุงแร่เหล็ก การระเบิดภูเขา การขุดเจาะเพื่อให้ได้สินแร่ เมื่อมีการใช้ประโยชน์เสร็จสิ้นจะปล่อยเหมืองแร่ทิ้งร้างทำให้เกิดกากของเสีย เมื่อไม่มีการบำบัดหลังการผลิตที่ถูกวิธีทำให้เกิดการปนเปื้อนไปสู่สิ่งแวดล้อม (จรรยา สารินทร์, 2551, น. 2) ได้แก่ การปนเปื้อนในแหล่งน้ำ และการปนเปื้อนในดินตะกอน ทำให้ส่งผลอันตรายต่อระบบนิเวศบนบกและระบบนิเวศในน้ำ หากอยู่ในช่วงที่มีปริมาณน้ำฝนที่ตกในปริมาณมาก โลหะหนักที่อยู่ในตะกอนดินและในน้ำสามารถกระจายออกสู่สิ่งแวดล้อมในพื้นที่ใกล้เคียงเป็นวงกว้าง เช่น พื้นที่ทำการเกษตรกรรมของชาวลัว ชาวดอน (Soraia et al., 2015, p. 14)

ในปี พ.ศ. 2555 ศึกษาการปนเปื้อนสารโลหะหนัก พบว่าตะกอนดินในประเทศไทยที่มีการปนเปื้อนสารโลหะหนักในปริมาณที่สูง ส่วนใหญ่มักเกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ โดยเฉพาะกิจกรรมจากการทำเหมืองแร่ เช่น กรณีของการปนเปื้อนของตะกั่ว ในพืช ผัก สัตว์น้ำ และดินตะกอน บริเวณเขาป่องาม อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อประชาชนที่อยู่ในพื้นที่ใกล้เคียง ตะกั่วมีความเป็นพิษที่ไวต่อระบบประสาท และยังพบว่าเด็กที่ได้รับสารโลหะหนักตะกั่วสะสมในฟันและในเลือดปริมาณสูง ส่งผลให้มีสติปัญญาที่ต่ำ (วรชาติ วิศวะพัฒน์, 2555, น. 378)

ในปี พ.ศ. 2560 ศึกษาการปนเปื้อนโลหะหนักที่เป็นปัญหาสำคัญ ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยเก็บตัวอย่างตะกอนดิน น้ำ และปลาในลำแม่น้ำมูล ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณ สังกะสี ทองแดง แคดเมียม และตะกั่ว และคำนวณหาค่าการสะสมโลหะหนัก (bioconcentration factor, BCF) พบว่ามีการปนเปื้อนของโลหะหนัก ได้แก่ สังกะสี ทองแดง แคดเมียม และตะกั่ว ในตะกอนปริมาณเท่ากับ 12.78-115.30, 8.12-25.63, 8.79-9.08 และ 47.38-111.82 mg/kg ตามลำดับ และในน้ำมีปริมาณเท่ากับ 13.39-16.35, 8.00-8.36, 4.35-6.59 และ 27.38-31.80 mg/L ตามลำดับ (ธวัชชัย ธาณี เพ็ญแข ธรรมเสมาณภาพ และ อรุณรัตน์ ฉวีราช, 2560, น. 19)

2.2 การสะสมโลหะหนัก

โลหะหนักสามารถสะสมในตะกอนดินปริมาณที่สูงกว่าในแหล่งน้ำ เกิดจากการมีกระบวนการทาง ฟิสิกส์ เคมี และชีวภาพ เข้ามาเกี่ยวข้อง ในดินตะกอนมีองค์ประกอบที่มีผลต่อการสะสมของโลหะหนัก เช่น ตะกั่ว ทองแดง และปรอท รวมไปถึงองค์ประกอบของสารอินทรีย์ต่าง ๆ ซึ่งโลหะในธรรมชาติไม่สามารถสลายตัวได้เองตามธรรมชาติ ทำให้โลหะหนักที่สะสมในตะกอนดินเมื่อมีการละลายน้ำ จะกลับเข้าสู่ระบบนิเวศทำให้เกิดการปนเปื้อนของมลพิษในสิ่งแวดล้อม และความเข้มข้นของโลหะหนักในดินมีค่ามากกว่าในน้ำประมาณ 3 ถึง 5 เท่า ดินที่มีความละเอียดจะมีความสามารถในการดูดซับสารอินทรีย์ได้มาก เช่น ดินตะกอนละเอียด (silt) จะพบปริมาณสารอินทรีย์มากกว่าทรายที่เป็นตะกอนดินแบบหยาบ (sand) ประมาณ 2 เท่า และดินโคลน (clay silt) มีปริมาณการดูดซับสารอินทรีย์มากกว่าทรายถึง 4 เท่า (สุนทรีย์ ขุนทอง และ สุนันท์ ปิศาจวรรณกุล, 2551) นอกจากนี้ยังพบว่า การทำเหมืองแร่โลหะหนัก เช่น การทำเหมืองแร่ทองแดง (Cu) และเหมืองแร่ดีบุก (Pb) ซึ่งเป็นแร่โลหะหลักในการใช้ทำผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ (Madzin, Shai-in, & Kusin, 2015, p. 232-237) ซึ่งเป็นโลหะซัลไฟด์ เช่น แร่กาลีน่า (galena) และซาลโคไพไรต์ (CuS) นั้นมักจะเกี่ยวข้องกับแร่ธาตุต่างๆ ที่มีอยู่ในดินและตะกอนดิน

ส่วนใหญ่แล้วทองแดงจะถูกแบ่งออกเป็น โคเวลไลต์(CuS), แร่คาลโคไซต์ (Cu₂S) และ แร่ทองแดง (Cu) นอกจากนี้ทองแดงยังมีแนวโน้มที่จะสะสมอยู่ในตะกอนดินในปริมาณสูง เนื่องจากมีอนุภาคเป็นอินทรีย์วัตถุซึ่งส่วนใหญ่แล้วเกิดขึ้นได้จากหลายแหล่งโดยเฉพาะจากหน้าผิวดินชั้นบนของการทำเหมืองแร่ (Shamshuddin, Othman, Karam, Abd, & Ariffin, 2016) ส่งผลทำให้มีการสะสมของโลหะหนักดีบุกและทองแดงในปริมาณมาก เนื่องจากโลหะหนักดังกล่าวมีความสามารถดูดซับได้ดีบนผิวดิน (Madzin et al., 2015, p. 232-237)

การศึกษาการปนเปื้อนของโลหะหนักในน้ำและตะกอนดินบริเวณชายฝั่งทะเลของอ่าวไทยตอนบนในประเทศไทย พบว่าในเดือนเมษายน สิงหาคมและธันวาคม พ.ศ. 2550 นำตัวอย่างน้ำและตะกอนดินที่เก็บได้จากทั้งหมด 13 สถานี ไปวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักแต่ละชนิด ด้วยเครื่อง ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometers) พบว่ามีปริมาณทองแดงสะสมในน้ำมากที่สุด รองลงมา คือ สังกะสี ตะกั่ว และแคดเมียม มีปริมาณโลหะหนักเท่ากับ 0.08, 0.06, 0.05 และ 0.01 ppm ตามลำดับ โดยโลหะหนักสังกะสีจะพบมากในบริเวณอ่าวไทยตอนบน อ่าวศรีราชา ปากแม่น้ำบางปะกง ปากแม่น้ำเพชรบุรี และปากแม่น้ำเจ้าพระยา ตามลำดับ มีปริมาณโลหะหนักที่พบเฉลี่ยเท่ากับ 0.07 ppm ซึ่งแหล่งที่พบเป็นบริเวณแหล่งอุตสาหกรรมและชุมชนเมืองจำนวนมาก โลหะหนักตะกั่วพบมากบริเวณหาดพัทยาที่เป็นแหล่งชุมชนและสถานที่ท่องเที่ยว มีปริมาณโลหะหนักที่พบเฉลี่ยเท่ากับ 0.07 ppm โลหะหนักแคดเมียมพบมากที่บริเวณแหล่งอุตสาหกรรม ชุมชนเมือง รวมถึงแหล่งสถานที่ท่องเที่ยว มีปริมาณโลหะหนักที่พบเฉลี่ยเท่ากับ 0.01 ppm และโลหะหนักทองแดงพบมากที่บริเวณแหล่งอุตสาหกรรมและจุดที่เป็นชุมชนเมือง มีปริมาณโลหะหนักที่พบเฉลี่ยเท่ากับ 0.19 ppm ซึ่งโลหะหนักที่ตรวจวัดได้ทั้ง 4 ชนิด มีค่าเกินมาตรฐานมีค่าเกินมาตรฐานคุณภาพน้ำชายฝั่งทะเล ส่วนปริมาณโลหะหนักที่พบในตะกอนดินคือสังกะสี ตะกั่ว ทองแดง และแคดเมียม ปริมาณที่พบมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 64.07, 28.19, 16.21 และ 2.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (สารโรจน์ เริ่มดำรง สวัสดิ์ แก้วเรียส และ เกริก วงศ์สอนธรรม, 2552, น. 361)

3. ประเภทของโลหะหนัก

3.1 ตะกั่ว (Lead : Pb)

ตะกั่วมีลักษณะเป็นสีเงินเหลวสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ เป็นโลหะหนักที่พบในเปลือกโลกปริมาณน้อยมาก แม้ว่าตะกั่วจะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในสิ่งแวดล้อมยังเกิดได้จากกิจกรรมต่าง ๆ ของมนุษย์ เช่น การเผาไหม้เชื้อเพลิง การทำเหมืองแร่ และขั้นตอนการผลิตที่ปลดปล่อยปริมาณโลหะหนักตะกั่วที่มีความเข้มข้นสูง การใช้สารตะกั่วในโรงงานอุตสาหกรรม การเกษตรกรรม และการขับเคลื่อนประเทศเพื่อการพัฒนาในด้านต่าง ๆ ปัจจุบันใช้ในการผลิต

แบตเตอรี่ กระสุนปืน ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่ใช้ส่วนผสมโลหะหนัก และอุปกรณ์เพื่อป้องกันรังสีเอกซ์ มีการใช้ตะกั่วประมาณ 1.52 ล้านตัน สำหรับการประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรม ในปี ค.ศ. 2004 ประเทศสหรัฐอเมริกาใช้ปริมาณกรดตะกั่วเพื่อผลิตแบตเตอรี่คิดเป็น 83% และการใช้เพื่อผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เช่น การผลิตกระสุนปืน คิดเป็น 3.5% การใช้ออกไซด์ของตะกั่วสำหรับการผลิตสี แก้ว กระจกวัตถุ สารเคมี คิดเป็น 2.6% และแผ่นตะกั่ว 1.7% (Tchounwou, Yedjou, Patlolla, & Sutton, 2012, p. 133-164) หากไม่มีการจัดการของเสียที่มีประสิทธิภาพจากการผลิตทำให้ตะกั่วรั่วไหลออกสู่สิ่งแวดล้อม เมื่อตะกั่วอยู่ในสิ่งแวดล้อมจะสลายตัวไปอยู่ในรูปของสารประกอบ เช่น แร่ไพไรต์ หรือจากการดูดซึมสู่ผิวดิน เช่น เหล็ก และแมงกานีสออกไซด์ (Sobolev & Begonia, 2008, p. 456) ส่วนมากตะกั่วจะอยู่ในรูป Pb^{2+} มากกว่า Pb^{4+} และมีความเหมือนกับกลุ่มโลหะ แอลคาไลน์เอิร์ท (alkaline earth) จึงสามารถเข้าไปแทนที่ธาตุ K, Ba, Sr และ Ca ได้ (สิทธิชัย อินทร์ปนาม, 2558, น. 55)

3.1.1 อันตรายจากตะกั่ว เมื่อได้รับปริมาณตะกั่วจะส่งผลให้การทำงานของอวัยวะต่าง ๆ เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ตะกั่วมีผลต่อเม็ดเลือดแดงจะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกง่ายกลายเป็นโรคโลหิตจางและมีผลต่อการทำงานของไต นอกจากนี้ยังมีผลต่อสมองและการติดต่อของเซลล์ประสาท รวมถึงการสืบพันธุ์ หากระบบหัวใจและหลอดเลือดได้รับสารตะกั่วจะเกิดการสูบฉีดเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจผิดปกติ ส่งผลให้หลอดเลือดกล้ามเนื้อเรียบได้รับผลกระทบทำให้ตะกั่วจับกับเซลล์แทนที่แคลเซียม เมื่อได้รับปริมาณตะกั่วมากกว่า 60 $\mu\text{g}/\text{dL}$ อาจทำให้เกิดความผิดปกติต่อไตและตับ แม้แต่ระดับตะกั่วที่ต่ำประมาณ 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$ ก็สามารถทำให้เกิดความผิดปกติได้เช่นกัน เมื่อได้รับตะกั่วการทำงานของไตจะอักเสบเฉียบพลันและเกิดการเรื้อรังรุนแรง ทำให้การทำงานของกลไกท่อในไตบกพร่อง เยื่อบุเสื่อม ส่งผลต่อโปรตีนในปัสสาวะทำให้เกิดการหลังกรดอะมิโน ฟอสเฟต และกลูโคส ที่ไม่เป็นไปตามมาตรฐาน ทำให้ไตเกิดความผิดปกติ เมื่อมีการสัมผัสโลหะหนักในปริมาณสูงจะมีผลต่อระบบประสาท ทำให้เกิดภาวะสมองเสื่อมบางส่วน เช่น เกิดอาการภาพหลอน ความหงุดหงิดง่าย ชั่วความสนใจต่ำ ผิวมองคล้ำ การสูญเสียความทรงจำ การสั้นของกล้ามเนื้อ และอาการปวดศีรษะ หากได้รับปริมาณมากจนเกินไปเสี่ยงต่อการเป็นอัมพาต เพ้อ โคม่า และชัก (Assi, Hezmee, Haron, Sabri, & Rajion, 2016, p. 660-671)

3.1.2 การใช้ประโยชน์ของโลหะตะกั่ว ตะกั่วเป็นโลหะที่มีจุดหลอมเหลว สามารถตีขึ้นรูปและรีดได้ เป็นโลหะผสม (alloys) ได้หลายชนิด นำมาใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมจะแตกต่างกันออกไปตามสารประกอบตะกั่ว ดังแสดงในตาราง 1 ("ตะกั่ว (Lead : Pb) ประโยชน์และพิษตะกั่ว," 2561 (เอกสารจากเว็บไซต์))

ตาราง 1 การใช้ประโยชน์จากตะกั่ว

สารประกอบตะกั่ว	ประเภทของอุตสาหกรรม
1. โลหะตะกั่ว ซึ่งผลิตจากสินแร่ตะกั่วได้แก่ - กาลีน่า (galena, PbS) - แองเจิลไซต์ (anglesite, PbSO ₄) - เซอร์ไซต์ (cerrussite, PbCO ₃)	ทำ grid หัวขั้วสะพานไฟของหม้อแบตเตอรี่ หัวกระสุนปืน หล่อตัวพิมพ์ หุ้มสายเคเบิล สายไฟฟ้า และสายโทรศัพท์ อุปกรณ์ป้องกันรังสีจากเครื่องเอกซเรย์
2. สารประกอบอนินทรีย์ของตะกั่ว (inorganic lead compound) - เลดออกไซด์ (PbO) - เลดไนเตรต (Pb(NO ₃) ₂) - เลดอะซิเตต (Pb(CH ₃ COO) ₂) - เลดคาร์บอเนต (PbCO ₃) - เลดซัลเฟต (PbSO ₄) - และเลดโครเมต (PbCrO ₄)	การผลิตสี แบตเตอรี่ และการผลิตยาง การผลิตยาง และพลาสติก การผลิตเครื่องสำอาง ครีม ไล่ผม การผลิตสี หัวกระสุน
3. สารประกอบอินทรีย์ของตะกั่ว (organic lead compound) - เลดสเตียเรต (Pb(C ₁₈ H ₃₅ O ₂) ₂) - เลดเตตราเอทิลเลด (Pb(C ₂ H ₅) ₄) - เลดเตตราเมทิลเลด (Pb(CH ₃) ₄)	การผลิตแลคเกอร์ น้ำมันหล่อลื่น และสี ใช้ผสมในน้ำมันเบนซิน เพื่อเพิ่มค่าออกเทนให้สูงขึ้น ช่วยป้องกันการกระตุกของเครื่องยนต์ แต่ปัจจุบันผู้ผลิตเลิกใช้แล้ว

ที่มา : <https://www.siamchemi.com/%E0%B8%95%E0%B8%B0%E0%B8%81%E0%B8%B1%E0%B9%88%E0%B8%A7/>

3.2 ทองแดง (Copper : Cu)

ทองแดงสามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ หลอมเหลวได้ง่าย ทั้งยังมีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าและให้ความร้อนได้ดี จึงมีการนำทองแดงมาใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น ด้านอุตสาหกรรมและด้านการเกษตร ได้แก่ การผลิตลวด สารกำจัดศัตรูพืช สีย้อมผ้า ขึ้นส่วนอิเล็กทรอนิกส์ การตกแต่ง และการทำเครื่องประดับ เป็นต้น (วาสนา แนมบาง และ วิจิตรา เมมาเตจา, 2557, น. 100) นอกจากนี้ยังมีการทำอุตสาหกรรมเหมืองแร่ทองคำ ทำให้มีปริมาณทองแดงสูงเพิ่มขึ้น เมื่อทองแดงถูกปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมจะไปจับกับอนุภาคของสารอินทรีย์ดิน แร่ดินเหนียว และหินที่ผุกร่อน นำไปสู่การสะสมในดิน ทองแดงมีสองสถานะคือสถานะที่เป็นออกซิไดซ์ Cu (II) และสถานะที่เป็นการรีดิวซ์ Cu (I) ซึ่งมีผลเป็นอันตราย เพราะมีการเปลี่ยนแปลงระหว่าง Cu (II) กับ Cu (I) อาจนำไปสู่การสร้างซูเปอร์ออกไซด์และไฮดรอกซิล (Fashola, Ngole-Jeme, & Babalola, 2016, p. 1047) จากกิจกรรมต่าง ๆ ดังที่กล่าวมานั้นทำให้เกิดการแพร่กระจายทองแดงไปสู่สิ่งแวดล้อมได้อย่างกว้างขวาง

3.2.1 อันตรายจากทองแดง การรับทองแดงเข้าสู่ร่างกายมีหลายทาง ได้แก่ จากการดื่มน้ำ การหายใจ การสัมผัส และการบริโภคอาหารประจำวัน ร่างกายของสิ่งมีชีวิตต้องการทองแดงในปริมาณที่เหมาะสมในส่วนของกล้ามเนื้อและกระดูก แต่หากได้รับในปริมาณมากเกินไปจะทำให้เกิดความเป็นพิษ มีผลทำให้เกิดอาการท้องเสีย การทำงานของหัวใจผิดปกติ คลื่นไส้ อาเจียน กดระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เกิดการอักเสบภายในกล้ามเนื้อและช่องท้อง ทั้งยังส่งผลให้เกิดความผิดปกติทางจิต และหากได้รับเป็นระยะเวลาที่ยาวนานจะทำให้ตับทำงานผิดปกติ จนไม่สามารถขับทองแดงออกจากร่างกายได้ ทำให้มีอาการสั่นเทาตลอดเวลา น้ำมูกไหล และกล้ามเนื้อเกร็ง (วาสนา แนมบาง และ วิจิตรา เมมาเตจา, 2557, น. 100) นอกจากนี้ยังพบว่าทองแดงเป็นส่วนประกอบของโปรตีนและเอนไซม์ ที่เกี่ยวข้องกับกลไกพื้นฐาน เช่น การสร้างพลังงาน การขนส่งออกซิเจน การสร้างเซลล์เม็ดเลือด กระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ และการถ่ายโอนสัญญาณ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต่อสิ่งมีชีวิต (Manto, 2014, p. 327-345)

3.2.2 การใช้ประโยชน์ของโลหะทองแดง คุณสมบัติของทองแดงมีลักษณะเด่นหลายประการโดยเฉพาะมีความสามารถในการนำความร้อนได้ดี ใช้ในการนำไฟฟ้า ด้านงานการกัดกร่อนได้ดี นำไปขึ้นรูปผลิตภัณฑ์ได้ง่าย และสามารถนำไปผสมกับโลหะอื่น ๆ ดังนั้นทางด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ จึงนิยมนำทองแดงไปใช้ประโยชน์ เช่น อุตสาหกรรมการก่อสร้าง อุตสาหกรรมไฟฟ้า อุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์ อุตสาหกรรมการเกษตร อุตสาหกรรมการขนส่ง อุตสาหกรรมทองเหลือง และอุตสาหกรรมเครื่องจักรกล เป็นต้น

3.2.2.1 อุตสาหกรรมกรรมการก่อสร้าง เนื่องจากทองแดงมีคุณสมบัติในการทนต่อการกัดกร่อน จึงนิยามถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมก่อสร้างโดยเฉพาะในส่วนหนึ่งของโครงสร้างที่ต้องการความคงทน เช่น ระบบปรับอากาศ หลังคา ท่อส่งน้ำระบบการให้ความร้อน และข้อต่อต่าง ๆ ในส่วนของการก่อสร้างอื่น ๆ นอกจากนี้ทองแดงยังถูกนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของสะพาน หรือใช้ในการสร้างอนุสาวรีย์ เป็นต้น

3.2.2.2 อุตสาหกรรมไฟฟ้าและอิเล็กทรอนิกส์ ทองแดงเป็นโลหะที่สามารถนำไฟฟ้าได้ดี จึงนิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมไฟฟ้าและอิเล็กทรอนิกส์ เช่น เครื่องกำเนิดไฟฟ้า ไดนาโม มอเตอร์ เคเบิล เครื่องเป่า พัดลม ระบบควบคุมในโรงงานเครื่องมือตรวจสอบอุปกรณ์ไฟฟ้า เครื่องโทรคมนาคม และอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ต่าง ๆ จากการขยายตัวของประชากรและความเจริญทางด้านเศรษฐกิจ ส่งผลให้อุตสาหกรรมนี้มีแนวโน้มที่เจริญเติบโตขึ้น เนื่องจากการขยายตัวของที่อยู่อาศัยและความเจริญทางด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ จึงเพิ่มความต้องการของมนุษย์ด้านการใช้เครื่องใช้ไฟฟ้าและสื่อไฟฟ้า รวมทั้งการพัฒนาด้านเทคโนโลยีต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น

3.2.2.3 อุตสาหกรรมการเกษตร ทองแดงนับว่าเป็นแร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสัตว์และพืช ซึ่งดินมีความสำคัญต่อการเพาะปลูก และดินที่ดีจะต้องมีคุณภาพเหมาะสมต่อการเพาะปลูก เพื่อเป็นอาหารให้แก่สัตว์ จึงต้องมีทองแดงเป็นส่วนประกอบไม่น้อยกว่า 5 ส่วนในล้านส่วน นอกจากนี้สารประกอบคอปเปอร์ซัลเฟตเป็นรูปแบบหนึ่งของทองแดงยังช่วยยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียในการเก็บรักษาผลผลิตทางการเกษตรได้ และยังป้องกันการติดเชื้อโรคในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ เช่น โรคเท้าเปื่อยของแกะ เป็นต้น

3.2.2.4 อุตสาหกรรมขนส่งทองแดง ทองแดงใช้ประโยชน์ด้านการขนส่ง เช่น การขนส่งท่าเรือ การขนส่งทางท่อ การขนส่งทางรางและรถยนต์ เป็นต้น

การขนส่งท่าเรือ ทองแดงเป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่ใช้ห่อหุ้มส่วนต่าง ๆ ของเรือ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการป้องกันการกัดกร่อนและยังใช้เป็นส่วนผสมของสีที่เคลือบตัวเรือ เพื่อป้องกันการเกาะของสิ่งมีชีวิตในทะเล ทำให้ลดการทำ ความสะอาดเรือ และเพิ่มความเร็วเรือ เป็นการช่วยให้ประหยัดเชื้อเพลิงเพิ่มมากขึ้น

การขนส่งทางท่อ ในการขนส่งน้ำมันจากแหล่งผลิตและการขนส่งก๊าซธรรมชาติ ทองแดงเป็นอัลลอยที่มีส่วนผสมของนิกเกิลสามารถถูกนำมาใช้ทำท่อส่ง เนื่องจากมีความแข็งแรงและทนทานต่อแรงดันทั้งภายนอกและภายในของท่อ รวมทั้งสามารถลดการกัดกร่อนจากน้ำทะเล เมื่อท่อถูกสร้างผ่านทะเลและแนวของมหาสมุทร

รถยนต์ ทองแดงเป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่ใช้ในห้องเครื่องรถยนต์ สายไฟที่ต่อเชื่อมในห้องโดยสาร ใช้เป็นส่วนประกอบของมอเตอร์สตาร์ท นอกจากนี้ยังมีอัลลอยของทองแดงประเภทต่าง ๆ ที่ถูกนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนประกอบเล็ก ๆ ของส่วนประกอบรถยนต์ เนื่องจากต้นทุนของอัลลอยถูกกว่าเหล็ก

3.2.2.5 อุตสาหกรรมการผลิตทองเหลือง อุตสาหกรรมการผลิตทองเหลืองเป็นการใช้ทองแดงปริมาณ 61 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป สำหรับการผลิตเครื่องใช้ต่าง ๆ และการผลิตภาชนะต่าง ๆ นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในการทำเหรียญกษาปณ์ โลหะรูปพรรณ และนำมาทำข้อต่อข้อต่อ โดยใช้ปริมาณทองแดงประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์

3.2.2.6 อุตสาหกรรมเครื่องจักรกล อุตสาหกรรมทางด้านเครื่องจักรกลใช้ทองแดงเป็นส่วนประกอบต่าง ๆ ในเครื่องจักร เช่น ไบพัด ไบจักร ลูกปืน เฟือง เป็นต้น เครื่องจักรทางการเกษตร เครื่องใช้ภายในบ้าน เนื่องจากทองแดงขึ้นรูปง่าย มีความสามารถในการทนการกัดกร่อนของน้ำทะเล และสามารถถ่ายเทความร้อนได้สูง จึงนิยมนำไปใช้ทำวาล์วท่อ ข้อต่อในโรงกลั่น อุปกรณ์แลกเปลี่ยนความร้อน และเครื่องมือกลอื่น ๆ (กรมทรัพยากรธรณี, 2559)

3.3ปรอท (Mercury : Hg)

ปรอทเป็นของเหลวไม่ติดกับวัตถุ มีความสามารถในการละลายน้ำได้ต่ำ และสามารถระเหยได้ที่อุณหภูมิห้อง มีเลขอะตอม 200.59 มีจุดเดือด 256.6 องศาเซลเซียส และมีจุดหลอมเหลว -38.9 องศาเซลเซียส มีค่าความดันไอเท่ากับ 0.16 Pa (0.0012 มิลลิเมตรปรอท) เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิจะส่งผลต่อแรงดันไอของปรอทที่สูงขึ้น เมื่อได้รับปรอทในปริมาณมากจะเกิดความเป็นพิษ ซึ่งความเป็นพิษขึ้นอยู่กับรูปแบบทางเคมีของปรอท (จิรวัดณ์ ขวัญแก้ว, 2549) ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 รูปแบบทางเคมีและความเป็นพิษของสารปรอท

รูปแบบ	ความเป็นพิษ
Hg	โลหะปรอทค่อนข้างเฉื่อย (inert) และไม่เป็นพิษ แต่หากได้รับการสูดดมไอปรอทจะทำให้เกิดความเป็นพิษที่ร้ายแรง
Hg ₂ ²⁺	ประจุเมอร์คิวรัสไม่ละลายน้ำ อยู่ในรูปสารประกอบคลอไรด์ มีความเป็นพิษต่ำ เช่น เมอร์คิวรัสคลอไรด์ (HgCl ₂)
Hg ²⁺	ประจุเมอร์คิวริกมีความเป็นพิษแต่ไม่เคลื่อนย้ายข้ามเนื้อเยื่อ สามารถสะสมและทำอันตรายต่อไต เช่น เมอร์คิวริกคลอไรด์ (HgCl ₂)
RHg ⁺	สารปรอทอินทรีย์เชิงเดี่ยวมีความเป็นพิษสูง โดยเฉพาะเมทิลเมอร์คิวรี (CH ₃ Hg) สามารถทำลายระบบประสาทส่วนกลางและสมองอย่างถาวร สะสมได้ในเนื้อเยื่อไขมัน
R ₂ Hg	สารปรอทอินทรีย์เชิงคู่มีความเป็นพิษต่ำ แต่สามารถเปลี่ยนรูปเป็น RHg ⁺ ได้ในตัวกลางที่เป็นกรด
HgS	สารประกอบปรอทซัลไฟด์ไม่ละลายน้ำและไม่เป็นพิษ พบได้ตามธรรมชาติ ในดินในรูปของแร่ซินนาบาร์

ที่มา: จิรวัดณ์ ขวัญแก้ว (2549) วิทยานิพนธ์ การจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3.3.1 อันตรายจากปรอท ปรอทที่มีความเป็นพิษทั้งต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม แต่ความเป็นพิษของปรอทจะมีผลกระทบต่อสุขภาพที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับรูปแบบทางเคมีของปรอท ได้แก่ โลหะ อินทรีย์ และอินทรีย์ การเข้าสู่ร่างกาย เช่น การสูดดมและการกลืนกิน ปริมาณที่ได้รับ (ความเข้มข้นต่ำอาจมีผลกระทบ) ความเสี่ยง (แบบเฉียบพลันและเรื้อรัง) ช่วงระยะเวลา (การสัมผัสในวัยเด็กอันตรายที่สุด) ปรอทสามารถสะสมทางชีวภาพในสิ่งแวดล้อมได้สูงและส่งผลกระทบต่อความเป็นพิษ รวมทั้งความเป็นพิษต่อการทำงานของไต ความเสียหายต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด ส่งผลกระทบต่อระบบไร้ท่อและภูมิคุ้มกันบกพร่อง อาการพิษจากปรอทเกิดจากการสัมผัสในรูปแบบต่าง ๆ ของปรอทที่มีความแตกต่างกันไป เช่น อาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง อัมพาติ การสูญเสียความทรงจำ โรคทางไต เช่น โรคมีนามาตะ เป็นผลที่เกิดจากการสัมผัสปรอทในรูปของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ (WHO Regional Office for Europe, 2016) นอกจากนี้ยังพบอีกว่าปรอทเข้าไปทำลายสมอง ระบบประสาท และมีผลต่อทารกที่อยู่

ในครรภ์มารดา สารปรอทจะผ่านทางรกเข้าสู่สมองเด็ก ทำให้เด็กได้รับผลเกิดการพิการทางสมอง ตั้งแต่ยังเด็ก และมีโอกาสเกิดอาการปัญญาอ่อนในที่สุด และเมื่อเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิต ส่งผลต่อระบบการทำงานของไต ปัสสาวะเป็นเลือด และเสียชีวิตในที่สุด (ศูนย์ข้อมูลพิษวิทยา, 2561)

3.3.2 การใช้ประโยชน์ของโลหะปรอท ปรอทสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น ทางด้านการทหาร ด้านอุตสาหกรรมสาขาต่าง ๆ ด้านการเกษตร ด้านวิทยาศาสตร์ และด้านการแพทย์ สามารถสรุปได้ดังนี้

3.3.2.1 ประโยชน์ทางด้านการทหาร ปรอทเป็นองค์ประกอบที่ใช้ในการทำระเบิด ซึ่งประเทศไทยนำปรอทมาใช้ในด้านต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก ในรูปของปรอทอินทรีย์และปรอทอินทรีย์ เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของหลายประเภท

3.3.2.2 ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม ปรอทเป็นส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ผลิตเครื่องมือทางด้านอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมทอผ้า อุตสาหกรรมไฟฟ้า อุตสาหกรรมชุบโลหะ อุตสาหกรรมผลิตน้ำยาซักแห้ง อุตสาหกรรมผลิตคลอรีน อุตสาหกรรมผลิตโซดาไฟ อุตสาหกรรมทำขนเฟอร์ และอุตสาหกรรมการผลิตสีทาบ้าน เป็นต้น

3.3.2.3 ประโยชน์ทางด้านการเกษตร ปรอทเป็นองค์ประกอบของสารเคมีกำจัดเชื้อราในพืช และเป็นสารเคมีกำจัดแมลง มีความสามารถในการกำจัดเชื้อราในพืชและเป็นสารป้องกันกำจัดแมลงได้ดี

3.3.2.4 ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ ปรอทเป็นส่วนผสมของยารักษาโรคหลายชนิด เป็นองค์ประกอบในเครื่องมือแพทย์ และใช้ในการอุดฟันทางด้านทันตกรรม

3.3.2.5 ประโยชน์ทางด้านเครื่องมือวิทยาศาสตร์ การใช้ปรอทในการผลิตเครื่องมือวิทยาศาสตร์ เช่น บารอมิเตอร์ และเทอร์โมมิเตอร์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้เป็นตัวเร่งในการทำปฏิกิริยาของกระบวนการทางเคมีต่าง ๆ ได้อีกด้วย (กรมควบคุมมลพิษ, 2541)

4. แบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนัก

แบคทีเรียมีความสามารถในการทนต่อโลหะหนัก เนื่องจากมีกลไกต่าง ๆ ที่สามารถต้านทานต่อโลหะหนักได้ รวมไปถึงกระบวนการขัดขวางการซึมผ่านของโลหะหนักเข้าสู่เซลล์ และมีกระบวนการขับออกภายนอกเซลล์ โดยการลำเลียงสารแบบใช้พลังงาน มีกระบวนการทำงานสำหรับด้านยาปฏิชีวนะ การสร้างเอนไซม์เพื่อลดความเป็นพิษของโลหะหนัก กลไกการกำจัดสารพิษและการทำให้พิษของโลหะหนักลดลงจากการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ต้องอาศัยกระบวนการของสิ่งมีชีวิตที่สามารถอยู่รอดในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนโลหะหนักในระดับความเข้มข้นที่สูง และสามารถสะสมโลหะหนักไว้ทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์เพื่อทำให้เกิด

สารประกอบเชิงซ้อน โดยมีผลทำให้พิษของโลหะหนักน้อยลง บ่อยครั้งพบว่าแบคทีเรียบางกลุ่มสามารถทนต่อโลหะหนักได้ ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก เช่น จีโนส *Bacillus*, *Arthrobacter* และ *Corynebacterium* รวมไปถึงแบคทีเรียแกรมบวก เช่น จีโนส *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Ralstonia* และ *Burkholderia* (Saad A. et al., 2015, p. 158-165)

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการอยู่รอดได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนโลหะหนักในความเข้มข้นสูง จะต้องมีการปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดกับการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม เมื่อเซลล์แบคทีเรียสัมผัสกับโลหะหนักที่มีความเข้มข้น จะทำปฏิกิริยาภายในเซลล์ประกอบด้วยสารต่าง ๆ และกลายเป็นสารประกอบที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของแบคทีเรีย โลหะหนักที่เป็นพิษจะทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบภายในเซลล์ของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียมีการสร้างกลไกในการต่อต้านสารพิษ โดยใช้กระบวนการดูดซับโลหะหนักด้วยกลไกการนำเข้าสู่ไอออนโลหะหนัก ในแบคทีเรียที่มีระบบในการนำเข้าสู่เซลล์ 2 ระบบ ได้แก่

1. การนำเข้าสู่แบบเร็ว โดยไม่จำเป็นต้องจำเพาะเจาะจงกับซับสเตรท สามารถนำโลหะหนักเข้าสู่เซลล์โดยผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่ไม่ต้องอาศัยการใช้พลังงาน ATP
2. การนำเข้าสู่แบบช้า จำเป็นที่จะต้องมีความจำเพาะกับซับสเตรท และยังคงอาศัยพลังงานจาก ATP hydrolysis

แบคทีเรียมีความสามารถในการดูดซับโลหะหนักได้หลายวิธี เช่น การจับโลหะหนักด้วยการใช้โปรตีน มีความสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย อาศัยระบบเดียวกับการขนส่งธาตุอาหารเข้าสู่เซลล์ การตกตะกอน การดูดซับไอออนโลหะหนัก และการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนโลหะหนัก โดยมีเพียงเชื้อแบคทีเรียบางชนิดที่มีศักยภาพในการปรับตัวเพื่ออยู่รอด เช่น *Pseudomonas syringae* สามารถสร้างโปรตีนเพื่อจับกับไอออนของโลหะหนักเพื่อป้องกันสารโลหะหนักของแดงโดยมีการทำงานของโปรตีน 4 ชนิด ได้แก่ CopA, CopB, CopC และ CopD (Khosro, Nadiya, Fataneh, Golnaz, & Jamileh, 2013, p. 60-63) นอกจากนี้แบคทีเรียยังมีกลไกการทำงานพื้นฐานเพื่อทนต่อโลหะหนักที่นำเข้าสู่เซลล์ได้หลายวิธี ซึ่งกลไกนี้ประกอบด้วย การทำงานเชื่อมโยงกันระหว่างโครงสร้างการทำงานของโปรตีนหลายชนิดที่สะสมโลหะหนักเข้าไปภายในเซลล์และการขับไอออนโลหะหนักออกนอกเซลล์โดยตรง เพื่อลดความเป็นพิษภายในเซลล์แบคทีเรีย การใช้ระบบการขนส่งธาตุอาหารเข้าสู่ภายในเซลล์ การป้องกันความเป็นพิษของไอออนโลหะหนักเข้าสู่เซลล์ด้วยการจับกับโปรตีนที่ผนังเซลล์ การจับกับไอออนโลหะหนักภายในเซลล์โดยมีความจำเพาะเจาะจง และแบคทีเรียสามารถขับไอออนโลหะหนักออกจากเซลล์โดยอาศัยกระบวนการ efflux pump ซึ่งเป็นกลไก

เกี่ยวกับการทำงานของกระบวนการต้านยาปฏิชีวนะ (Jared A., Chih-Chia, & Edward W., 2015, p. 1720-1736)

การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักจากแหล่งน้ำเสียที่มาจากกระบวนการผลิตของโรงงานอุตสาหกรรมและพื้นที่รอบ ๆ เมือง Madurai ทางตอนใต้ประเทศอินเดีย โดยทำการคัดเลือก คัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติได้ทั้งหมด 300 ไอโซเลท แต่มีเพียง 4 ไอโซเลท ที่มีความสามารถทนต่อโลหะหนักและทนต่อยาปฏิชีวนะ จึงนำมาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมี การบ่งชี้ยีน 16S rDNA และการวิเคราะห์ทางวิวัฒนาการของเชื้อแบคทีเรีย สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้เป็น *Proteus vulgaris* (BC1), *Pseudomonas aeruginosa* (BC2), *Acinetobacter radioresistens* (BC3) และ *Pseudomonas aeruginosa* (BC5) เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ pH 7 จากนั้นคัดเลือกไอโซเลทที่ทนต่อโลหะหนักแคดเมียม (Cd), นิกเกิล (Ni), ตะกั่ว (Pb), สารหนู (As), โครเมียม (Cr) และปรอท (Hg) ผลการทดลองหาค่า MIC พบว่าไอโซเลทที่แยกจากน้ำเสียมีความสามารถในการทน Cd, Cr, Ni, Pb, As และ Hg ในอาหารแข็งมากที่สุด โดยมีค่าความต้านทานที่ Cd (4-7 มิลลิโมลาร์), Cr (0.7 มิลลิโมลาร์), Ni (6.75-8.5 มิลลิโมลาร์), Pb (6 มิลลิโมลาร์), As (6.5-15 มิลลิโมลาร์) และ Hg (0.75 มิลลิโมลาร์) ตามลำดับ (Edward Raja, Selvam, & Kiyoshi, 2009, p. 205-211)

การศึกษากการดูดซับโลหะหนักโดยใช้เซลล์แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus subtilis* โดยทดสอบการดูดซับทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ จากโลหะหนักในน้ำเสียที่เกิดจากฝีมือของมนุษย์และกิจกรรมทางด้านอุตสาหกรรม โดยคัดเลือกแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบที่มีคุณสมบัติในการกำจัดโลหะหนักและทำให้น้ำปราศจากสิ่งเจือปนโดยใช้ชีวมวลของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* ที่มีความเข้มข้นของชีวมวลเท่ากับ 2, 0.5 และ 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมเท่ากับ pH 5 ปมที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เก็บผลทุก ๆ 40 และ 60 นาที จากการศึกษาพบว่า *Pseudomonas aeruginosa* มีการดูดซับปรอท 90.4 เปอร์เซ็นต์ และ *Bacillus subtilis* สามารถดูดซับปรอทได้ 99.3 เปอร์เซ็นต์ และ 78.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Tarangni, 2009, p. 77)

5. กลไกการทำงานของแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนัก

แบคทีเรียได้มีวิวัฒนาการที่ทนทานต่อความเข้มข้นของโลหะหนักระดับสูง ในบริเวณที่มีการสะสมแร่ ป่่องน้ำร้อน และตำแหน่งใกล้ภูเขาไฟที่ยังคุกรุ่นอยู่ การปรับตัวดังกล่าวส่งผลให้เกิดการพัฒนา กลไกการป้องกันองค์ประกอบของเซลล์ที่ไวต่อไอออนโลหะหนัก ความทนทานต่อโลหะหนักของแบคทีเรียอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น การขนส่งไอออนโลหะหนักเข้าสู่เซลล์ การกลายของยีนเพื่อให้ทนต่อโลหะหนัก (โครโมโซม, พลาสมิด หรือทรานสโพซอน) กระบวนการเมแทบอลิซึมในการสร้างและสลายโลหะหนัก แบคทีเรียมีกลไกพื้นฐาน 5 วิธีที่สามารถทนทานและมีกลไกป้องกันตัวเพื่อให้อยู่รอดดังนี้

การขัดขวางการนำเข้าโลหะหนัก

การขนส่งไอออนโลหะหนักโดยกระบวนการ efflux

การจับโลหะหนักที่ผนังเซลล์

การสะสมโลหะหนักภายในเซลล์

การลดไอออนโลหะหนัก (Ianieva, 2009, p. 54-65)

5.1 การขัดขวางการนำเข้าโลหะหนัก

วิธีนี้เซลล์แบคทีเรียจะเปลี่ยนเส้นทางการนำเข้าในเซลล์ที่มีความไวต่อโลหะหนัก โดยการลดการนำเข้าของไอออนโลหะหนัก (Pranisha, Muhammad, & Wan, 2016, p. 42)

5.2 การขนส่งไอออนโลหะหนัก

โดยกระบวนการ efflux ของแบคทีเรียที่ต้านทานโลหะหนัก จะใช้วิธีการปั๊มออกจากเซลล์ด้วยระบบขนส่ง (transport) โดยใช้กระบวนการ efflux แบคทีเรียเหล่านี้จะทำการขนส่งไอออนโลหะหนัก โดยอาศัยปัจจัยทางพันธุกรรม (Ianieva, 2009, p. 54-65)

5.3 การจับโลหะหนักที่ผนังเซลล์

จะใช้วิธีการสังเคราะห์ Homopolysaccharides ภายนอกเซลล์ เมื่อมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ monosaccharides จะทำงานร่วมกับสารตั้งต้นและส่งไปยัง polysaccharide ซึ่ง polysaccharide เป็นสารประกอบที่มีความเฉพาะเจาะจงในการจับโลหะหนัก เช่น Dextran, levan และ mutan (Muibat, Veronica, & Olubukola, 2016; Pranisha et al., 2016)

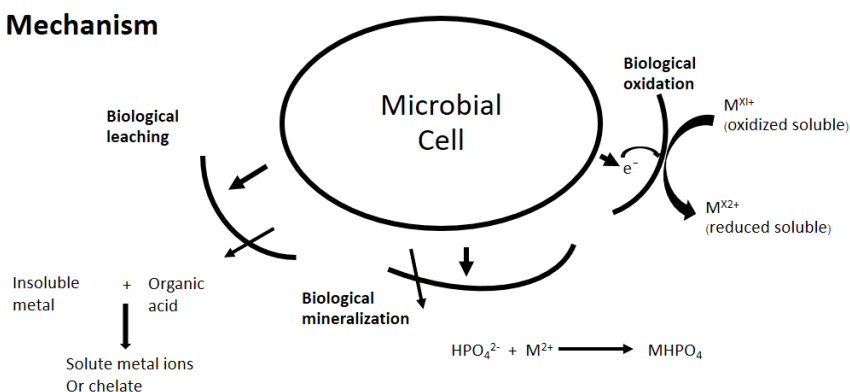
5.4 การสะสมโลหะหนักภายในเซลล์

เกิดจากกระบวนการทางชีวภาพ โดยอาศัยกระบวนการเมแทบอลิซึม การกำจัดโลหะหนักขึ้นอยู่กับกรดซัลฟิวริกทางชีวภาพ สามารถแบ่งออกเป็น กระบวนการสะสมภายนอกเซลล์ การตกตะกอนและการสะสมภายในเซลล์ ซึ่งการป้องกันความเป็นพิษของจุลินทรีย์จากโลหะหนัก จะถูกขนส่งผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการสะสมโลหะหนักภายในเซลล์โดยชีวมวลที่ตายแล้ว เกิดปฏิกิริยาทางเคมี และทางกายภาพระหว่างการทำงานของโลหะหนักและหมู่คาร์บอกซิล อิมิดาโซล ซัลไฟด์ไฮไดรล กรดอะมิโน ฟอสเฟต ซัลเฟต ไธโออีเทอร์ ฟีนอล คาร์บอนิล เอไมด์ และไฮดรอกซิล (Muibat et al., 2016, p. 1047)

5.5 การลดไอออนโลหะหนัก

เป็นการลดความเป็นพิษของไอออนโลหะหนัก โดยการถ่ายโอนทางเคมีระหว่างไอออนโลหะหนักและการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาทางเคมี เช่น แบคทีเรียในกลุ่มซัลเฟต สามารถเปลี่ยนซัลเฟตให้เป็นซัลไฟด์ และรวมกับองค์ประกอบของโลหะหนักเพื่อตกตะกอน กระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ สามารถผลิตสารคัดหลั่ง เช่น กรดอินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ สามารถละลายไอออนโลหะหนักและอนุภาคดินที่มีโลหะหนักได้ ดังแสดงในภาพ 1

Biomining Remediation Mechanism



ภาพประกอบ 1 กลไกทางชีวภาพของแบคทีเรียในการบำบัดโลหะหนัก

ที่มา: Jin, Luan, Ning, and Wang (2018) Applied Sciences

6. การกำจัดโลหะหนักทางชีวภาพ

ปัจจุบันมีกระบวนการใหม่ ๆ ในการใช้เทคโนโลยีจุลินทรีย์ เช่น การสะสมทางชีวภาพและการดูดซึมทางชีวภาพ ได้รับการตรวจสอบแล้วว่าเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีที่มีค่าใช้จ่ายที่ถูกและมีประสิทธิภาพ เพื่อลดปริมาณน้ำเสียในกระบวนการผลิตจากอุตสาหกรรม และเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้ว จุลินทรีย์มีความหลากหลายและมีศักยภาพในการบำบัดโลหะหนัก เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ สาหร่าย โปรโตซัว และเชื้อรา ได้พัฒนาความสามารถในการป้องกันตัวเองจากความเป็นพิษของโลหะหนักโดยอาศัยกลไกต่าง ๆ เช่น การดูดซับ ออกซิเดชัน การดูดซึม เมทาเรชัน และรีดักชัน มีรายงานว่าแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้นที่มีเมแทบอลิซึมที่สามารถทนและกำจัดสารพิษของโลหะหนัก ทั้งยังคงผลิตสารเคมีที่เล็ดจับกับโลหะหนักและลดความเป็นพิษของโลหะหนักได้ แบคทีเรียจำนวนมากได้รับการรายงานที่สามารถลดหรือทำให้สารพิษที่เป็นพิษกลายเป็นสารที่มีพิษน้อยลง โดยเฉพาะกลุ่มของแอคติโนมัยซิสแบคทีเรียที่มีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยา ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกมีเมแทบอลิซึมที่มีความสามารถสูง จึงเหมาะที่จะใช้ในการบำบัดทางชีวภาพ เนื่องจากมีเมแทบอลิซึมที่หลากหลาย โดยเฉพาะสามารถเจริญเติบโตได้ในพื้นที่ที่ทนต่อข้อขัดแย้ง จึงเหมาะสมที่จะเป็นตัวแทนในการบำบัดทางชีวภาพของสารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์ (Soraia et al., 2015, p. 14)

การกำจัดโลหะหนักทางชีวภาพ (biosorption) เป็นการใช้กระบวนการที่อาศัยหลักการใช้วัสดุชีวภาพชนิดต่าง ๆ มาจับกับโลหะหนัก ด้วยกระบวนการทางเคมีหรือกระบวนการทางเมแทบอลิซึมเพื่อใช้ในการกำจัดสารโลหะหนัก และตัวกำจัดของเสียทางชีวภาพที่นิยมใช้และมีประสิทธิภาพ โดยการใช้จุลินทรีย์ในการกำจัด เช่น แบคทีเรีย สาหร่าย เชื้อรา และยีสต์ เพื่อการกำจัดโลหะหนักและธาตุหรือสารประกอบอื่น ๆ เช่น สารกัมมันตรังสี สารประกอบ organometallic สารกึ่งโลหะ และโลหะพาทิคิวเรต (Gadd, 2000, p. 271-279) การใช้แบคทีเรียเพื่อเป็นตัวจับให้โลหะหนักตกตะกอนหรือเปลี่ยนแปลงการออกซิเดชันของโลหะหนักต่าง ๆ ผ่านการรีดักชัน การสะสม การใช้เซลล์ตรึง และ การใช้เซลล์ที่มีชีวิตของแบคทีเรียได้รับการศึกษาจากหลายประเทศแล้วว่า เป็นวิธีการบำบัดทางชีวภาพที่มีการใช้กระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์เข้ามาเกี่ยวข้องโดยการลดความเป็นพิษของสารปนเปื้อนให้กลายเป็นสารที่ไม่มีพิษข้อดีของเทคโนโลยีการกำจัดสารโลหะหนักทางชีวภาพคือ

1. ประหยัดค่าใช้จ่าย
2. เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสูง
3. สามารถใช้ได้กับพื้นที่ที่มีขนาดใหญ่
4. สามารถสร้างและนำตัวกำจัดกลับมาใช้ใหม่ได้ (Kang & So, 2016, p. 304-312)

โลหะหนักเป็นกลุ่มของสารเคมีอนินทรีย์ที่อันตราย และพบการปนเปื้อนมากที่สุด ได้แก่ ตะกั่ว (Pb), โครเมียม (Cr), สารหนู (As), สังกะสี (Zn), แคดเมียม (Cd), ทองแดง (Cu), ปรอท (Hg) และนิกเกิล (Ni) เป็นต้น ซึ่งโลหะหนักเหล่านี้ถูกสะสมในดินและปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม โดยเกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ เมื่อปนเปื้อนกับสารอินทรีย์จะถูกออกซิไดซ์เป็น คาร์บอน (IV) ออกไซด์ โดยกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ โลหะหนักส่วนใหญ่ไม่สามารถย่อยสลายจากกระบวนการทางจุลินทรีย์และกระบวนการทางเคมี เนื่องจากมีความเข้มข้นสูงและสะสมในดินเป็นระยะเวลานาน อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบทางเคมีและการดูดซับจะสามารถลดความเป็นพิษของโลหะหนัก (Wuana & Okieimen, 2011, p. 1-20) แบคทีเรียที่ใช้ศึกษาศักยภาพในการกำจัดโลหะหนัก เช่น Cr, Cd, Ni, Pb และ Zn ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus sphaericus* เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวมีลักษณะที่จำเพาะเจาะจงกับลักษณะทางพันธุกรรมของยีนที่อยู่ในโครโมโซมและพลาสมิด โลหะบางชนิด เช่น Co, Cu และ Ni มีความสำคัญต่อแบคทีเรียบางชนิดที่ต้องใช้เป็นสารอาหาร โดยการทำงานของการใช้โลหะหนักจะผ่านกระบวนการ influx และ efflux ซึ่งเป็นกระบวนการที่เป็นกลไกทางชีวภาพในระดับโมเลกุลของแบคทีเรีย โดยทำงานร่วมกับโปรตีนที่ถูกยึดด้วยเยื่อหุ้มเซลล์, ระบบการขนส่งผ่านเยื่อหุ้ม, ATPases, P-type ATPases และระบบป้องกันอนุภาคโปรตอน (Isha & Ajay S., 2016, p. 1-18) นอกจากนี้ยังมีชีวมวลที่ไม่มีชีวิตของแบคทีเรีย ยังถูกนำมาใช้เพื่อการจัดโลหะหนักโดยการดูดซับทางชีวภาพร่วมกับเชื้อ *Bacillus* sp. เพื่อกำจัดโลหะหนัก Pb และ Cu (Tunali, Cabuk, & Akar, 2006, p. 203-211) เมื่อได้รับการสัมผัสจากโลหะหนักที่เป็นพิษทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์พัฒนากลไกการต้านทานและเกิดสภาวะสมดุลระหว่างโลหะและไอออน (Chatziefthimiou, Melitza, Wang, Vetriani, & Barkay, 2007, p. 469-479) ทำให้เกิดการสะสมโลหะหนักและไอออนของโลหะหนักลดลงโดยกระบวนการ influx และ efflux (Chatziefthimiou et al., 2007; Wagner-Dobler, 2003) นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์ได้พัฒนากลไกระดับเซลล์สำหรับการลดความเป็นพิษของสารปรอท Hg^{2+} กลายเป็นสารที่ไม่เป็นพิษ Hg^0 โดยใช้เอนไซม์ mercuric reductase (Wagner-Dobler, 2003, p. 124-133) การศึกษาแบคทีเรียที่ทนต่อปรอทโดยการคัดเลือกได้จากเหมืองทองคำ ในหมู่บ้านปังกอร์ หมู่บ้านโบกอร์ ประเทศอินโดนีเซีย โดยการเก็บตัวอย่างดิน

มาจากเหมืองแร่ทองคำ และทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรีย *Brevundimonas* sp. HgP1 และ *Brevundimonas* sp. HgP2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani และทำการทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในอาหาร LB medium ที่ผสมโลหะหนัก HgCl_2 ในระดับความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 ppm บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีแบคทีเรีย และทดสอบการสะสมของปรอทในอาหาร LB medium โดยใช้ความเข้มข้นของ HgCl_2 ในปริมาณ 50 และ 100 ppm เขย่าด้วยความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากผลการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียสามารถสะสม Hg^{2+} สูงสุด 1.09 และ 2.7 มิลลิกรัม/กรัมแห้งของน้ำหนักเซลล์ และสามารถกำจัดโลหะหนัก Hg^{2+} ได้ถึง 64.08 และ 57.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Irawati, Patricia, Yenny, & Abyatar, 2012, p. 197-200)



บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง 3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	ยี่ห้อ
1. กล้องจุลทรรศน์	Labomed
2. เครื่องกวนสารให้ความร้อน	EGO
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง	Ohaus corporation
4. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	Bioer
5. เครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจล	MS major scienc
6. เครื่องผสม	Genie 2
7. เครื่องหมุนเหวี่ยง	Hermle
8. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ	Scilogex
9. เครื่องรันเจล	Mupid
10. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง	Unic
11. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด - ด่าง	Fisher scientific
12. เครื่องอัลตราโซนิเคเตอร์	Labquip
13. ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส	Sanden intercool
14. ตู้แช่ - 20 องศาเซลเซียส	Haier
15. ตู้บ่มเชื้อ	Memmert
16. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า	Wisd
17. ตู้ปลอดเชื้อ	Biobase
18. ตู้อบลมร้อน	Fisher scientific
19. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ	Dihan

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ตาราง 4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	ยี่ห้อ
1. Acetic acid	Merck
2. Acetone alcohol 95%	Commercial
3. Agarose	Bio basic
4. API 20 NE	Biomerieux
5. Calcium chloloride (CaCl_2)	Ajax finechem
6. Copper (II) sulfate (CuSO_4)	Ajax finechem
7. Crystal violet	Biotech
8. 6X DNA loading dye	Thermofisher
9. Double distilled water (ddH_2O)	Merck
10. Ethidium bromide	Bio rad
11. 50X TAE buffer	Thermofisher
12. THE buffer pH 8	Thermofisher
13. Hydrochloric acid	Lab scan
14. Iodine solution	Gammaco
15. Iron (II) sulfat (MgSO_4)	Ajax finechem
16. Isopropanol	Lab scan
17. Lead (II) chloride (PbCl_2)	Ajax finechem
18. Lysozyme	Sigma
19. Magnesium chloride	Ajax finechem
20. Mercury (II) chloride (HgCl_2)	Ajax finechem
21. Nucleospin extract kit	Rabbit
22. Nitric acid	JT
23. Perchloric acid	Acros
24. Resolving gel buffer	Bio rad

ตาราง 4 (ต่อ)

สารเคมี	ยี่ห้อ
25. Safranin O	Gammaco
26. Sodium chloride (NaCl)	Ajax finechem
27. Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Merck
28. Solution III	Merck
29. TES Buffer pH 8	Alfa aesar
30. Tryptic soy agar	Oxoid
31. Tryptic soy broth	Oxoid



วิธีดำเนินการวิจัย

1. การตรวจนับและการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียทนโลหะหนักในตะกอนดิน

1.1 การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในตะกอนดินจากเหมืองดีบุกร้าง

การวิเคราะห์โลหะหนักจากตะกอนดินเหมืองร้างในจังหวัดระนอง โดยเก็บตัวอย่างดินและตะกอนดินจากพื้นที่เหมืองร้างในจังหวัดระนองทั้งหมด 4 แห่ง ได้แก่ เหมืองร้างในตำบลบางรีน เหมืองร้างในตำบลหาดส้มแป้น เหมืองร้างในตำบลบางนอน และเหมืองร้างในตำบลหงาว โดยเก็บตัวอย่างจากผิวหน้าดินและตะกอนดิน ด้วยวิธีการการสุ่มเก็บตัวอย่างดินและตะกอนดินในหลาย ๆ จุดแบบสุ่ม นำตัวอย่างดินมาผสมให้เข้ากัน ให้ได้ตัวแทนตะกอนดินทั้งหมดแหล่งละ 300 กรัม เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักในดินด้วยเทคนิค Atomic absorption spectrophotometer (AAS)

1.2 การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในดิน

การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างตะกอนดิน ที่เก็บจากพื้นที่เหมืองร้างทั้งหมด 4 แห่ง ทำได้โดยชั่งตัวอย่างตะกอนดินแหล่งละ 1 กรัม มาเจือจาง 10 เท่า ด้วย 0.85 % NaCl จนได้ความเจือจางที่เหมาะสม $10^{-1} - 10^{-8}$ จากนั้นดูดสารละลายตะกอนดินด้วยไมโครไปเปตแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็ง Tryptic soy Agar (TSA) ที่มีโลหะหนัก Pb^{2+} ($Pb(NO_3)_2$), Cu^{2+} ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) และ Hg^{2+} ($HgCl_2$) ที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 0.5 – 15, 0.5 – 10 และ 0.1 – 5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับโคโลนีที่ทนโลหะหนักแต่ละชนิดบนจานเพาะเชื้อ รายงานผลเป็นหน่วย (CFU/mL) เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็ง Tryptic soy Agar (TSA) ที่ไม่มีโลหะหนักผสมอยู่ (ชุดควบคุม)

1.3 การศึกษาความสัมพันธ์อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในแต่ละความเข้มข้นของโลหะหนัก

นำไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียที่ทนโลหะหนักได้สูงที่สุดทั้งหมด 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท SWU3 ไอโซเลท SWU24 และไอโซเลท SWU27 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของ Pb^{2+} ($Pb(NO_3)_2$), Cu^{2+} ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) และ Hg^{2+} ($HgCl_2$) ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายระหว่าง 0 – 300, 0 – 100 และ 0 – 10 ppm ตามลำดับ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เก็บผลการทดลองในทุก ๆ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวัดค่า Optical density (OD 600 นาโนเมตร) ด้วยเครื่องวัดค่า

การดูดกลืนแสง (spectrophotometer) เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) ที่ไม่มีโลหะหนักผสมอยู่ (ชุดควบคุม)

1.4 การหาความเข้มข้นของโลหะหนักที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย Minimal inhibitory concentration (MIC)

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้อ 1.2 เพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารแข็ง Tryptic soy agar (TSA) ด้วยวิธีการ spot เชื้อ ที่มีส่วนผสมของโลหะหนัก Pb^{2+} ($Pb(NO_3)_2$), Cu^{2+} ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) และ Hg^{2+} ($HgCl_2$) ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายระหว่าง 1 – 15, 0.5 – 5 และ 0.1 – 2.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) บันทึกไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อความเข้มข้นของโลหะหนักแต่ละชนิด

2. จำแนกสายพันธุ์และทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียทนโลหะหนัก

2.1 การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่ทนโลหะหนัก

คัดแยกไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนโลหะหนักได้สูงที่สุด มาจำแนกสายพันธุ์ โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) เพื่อเก็บเซลล์แบคทีเรีย ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที เก็บเฉพาะเซลล์เพื่อนำไปทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยการล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและปั่นเหวี่ยงตกตะกอนอีกครั้ง ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอเริ่มจากการเติมสารละลาย TES buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อละลายเซลล์ บั่นผสมให้เซลล์ละลายและเติมเอนไซม์ไลโซไซม์ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้สารละลายผสมกันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เอนไซม์ทำการย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรียเติมสารละลาย $MgCl_2$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้สารละลายผสมกัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใสขึ้นบน เก็บตะกอนเซลล์ จากนั้นเติมสารละลาย THE buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เซลล์ละลายในสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมสารละลาย sodium dodecyl sulfate (SDS) ที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายผสมกัน นำไปบ่มในอ่างให้ความร้อนที่อุณหภูมิ

65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือจนกว่าจะเห็นสารละลายใส เติมสารละลาย solution III ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูเฉพาะสารละลายส่วนใสด้านบน ที่มีดีเอ็นเอของแบคทีเรียละลายอยู่ในหลอดใหม่ จากนั้นเติมสารละลาย isopropanol เย็น ปริมาตร 2 เท่า ของสารละลายที่ดูใสหลอดใหม่ ตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอตกตะกอน ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้ง ตั้งหลอดดีเอ็นเอให้แห้งเพื่อระเหยสารละลาย isopropanol โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาข้ามคืน เมื่อดีเอ็นเอแห้งสมบูรณ์เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอ จากนั้นทำการตรวจสอบสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการทำให้เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis)

การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการทำให้เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เริ่มจากการเตรียม เจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร (ผงอะกาโรส 1 กรัม ผสมกับ 0.5X Tris-acetate-EDTA:TAE buffer 100 มิลลิลิตร) หลอมละลายเจลด้วยความร้อนไมโครเวฟ ผสมสารละลาย เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเทเจลลงบน gel apparatus รอจนเจลแข็งตัว ยกถาดเจลแช่ลงใน chamber ที่มี 0.5X TAE buffer ท่วมแผ่นเจล จากนั้นดูสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด ดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X Loading dye แล้วหยอดลงในช่องบนแผ่นเจลแต่ละช่อง และอีกหนึ่งช่องหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน lambda hind III marker ต่อชุดอุปกรณ์ให้สมบูรณ์ จากนั้นเปิดระบบให้ไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ระยะเวลาประมาณ 35 นาที ตรวจสอบ แถบแบนที่ถูกแยกตามขนาดด้วยกระแสไฟฟ้า โดยการนำแผ่นเจลไปย้อมด้วยสารละลาย เอธิเดียมโบรไมด์ 5-10 นาที นำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการศึกษาขั้นต่อไป

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของแบคทีเรียบริเวณ 16S rDNA โดยการนำดีเอ็นเอ ที่สกัดได้มาเป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่จะถูกออกแบบให้มีความจำเพาะต่อยีนบริเวณ 16S rDNA (Lane, 1991, p. 115-175) โดยใช้สภาวะในการเพิ่มจำนวนคือ denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 30 รอบ และ final extension 1 รอบ ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำผลผลิตของ PCR (PCR product) มาวิเคราะห์ขนาด ของแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นดีเอ็นเอที่ต้องการจะถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์

และถูกนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank database ด้วยโปรแกรม BLAST เพื่อจัดจำแนกจีโนสของเชื้อที่ทนต่อโลหะหนัก

2.2 การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่ทนโลหะหนัก

เตรียมเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท SWU3 ไอโซเลท SWU24 และ ไอโซเลท SWU27 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นศึกษาโดยใช้ชุดทดสอบ API 20 NE (BioMérieux) ประเทศฝรั่งเศส ทำการเชื่อมเชื้อโคโลนีเดี่ยว ที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง ลงในหลอดน้ำเกลือ NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 แมคฟาร์แลนด์ (McFarland standard) คุดเชื้อ 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดอาหาร API AUX Medium ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูเชื้อใส่ลงในหลุมบนเพลททดสอบทั้ง 20 หลุม เติม Mineral oil หลุมที่ขีดเส้นใต้ บ่มเพลทที่ 30 องศาเซลเซียส ดูผลภายใน 24-48 ชั่วโมง

2.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่ทนโลหะหนัก

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ทนโลหะหนักได้สูงที่สุดทั้งหมด 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท SWU3 ไอโซเลท SWU24 และไอโซเลท SWU27 ในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทำการย้อมแกรม (Gram stain) ด้วยการใช้วิธี Smear technique เริ่มจากใช้หวงเขี่ยเชื้อตรงเชื้อแบคทีเรียลงบนแผ่นสไลด์โดยไม่ต้องผสมน้ำ วางสไลด์ทิ้งไว้ให้รอย smear แห้ง นำมา heat fix โดยถือสไลด์ผ่านเปลวไฟ หยดสี crystal violet ให้ทั่วรอย smear ทิ้งไว้ 1 นาที เทสีที่เหลือทิ้ง และล้างด้วยน้ำกลั่นโดยการฉีดเบา ๆ จากขวดฉีดน้ำกลั่น หยดสี Gram's iodine ให้ทั่วรอย smear ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นล้างด้วย acetone alcohol โดยหยดให้ไหลผ่านรอย smear เป็นระยะเวลา 15 - 20 วินาที หยดสี safranin O ให้ทั่วรอย smear ทิ้งไว้ 20 - 30 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลการทดลองโดยการสังเกตการติดสี โดยเชื้อแบคทีเรียที่ย้อมติดสีม่วงจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) ส่วนเชื้อที่ย้อมติดสีแดงจัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) และสังเกตรูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย

3. ศึกษาศักยภาพในการบำบัดโลหะหนักในอาหารเหลวด้วยเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิต

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท SWU3 ไอโซเลท SWU24 และไอโซเลท SWU27 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง บั่นเก็บเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียด้วยความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของ Pb^{2+} ($Pb(NO_3)_2$), Cu^{2+} ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) และ Hg^{2+} ($HgCl_2$) ในปริมาณที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย จากข้อ 1.4 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ทำการเก็บเซลล์ด้วยการกรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาด 0.45 ไมครอน และเก็บผลการทดลองทุก ๆ เวลา 1, 5, 15, 30, 60, 180, 360 และ 720 นาที เพื่อนำส่วนใส (supernatant) ของสารละลายไปย่อยด้วยกรด perchloric – nitric และวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักด้วยเทคนิค Atomic absorption spectrophotometer (AAS) นำผลการทดลองมาเปรียบเทียบผลการบำบัดกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ระยะเวลาการเก็บผลการทดลองเดียวกัน (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) และตะกอนเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่ได้ในแต่ละช่วงนำมาอบเพื่อวัดน้ำหนักแห้ง และสกัดโลหะหนักออกจากเซลล์แบคทีเรีย เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักภายในเซลล์ของแบคทีเรียด้วยเทคนิค Atomic absorption spectrophotometer (AAS) ในชุดควบคุมจะผสมโลหะหนักในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) แต่จะไม่เติมเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย และเก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียด้วย glycerol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การตรวจนับและการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียทนโลหะหนักในตะกอนดิน

1.1 ปริมาณโลหะหนักจากตัวอย่างดินและตะกอนดินจากเหมืองดีบุกร้างในจังหวัดระนอง

การเก็บตัวอย่างดินและตะกอนดินจากพื้นที่เหมืองร้างในจังหวัดระนองทั้งหมด 4 แห่ง ได้แก่ เหมืองร้างในตำบลบางรีน เหมืองร้างในตำบลหาดส้มแป้น เหมืองร้างในตำบลบางนอน และเหมืองร้างในตำบลหงาว โดยเก็บตัวอย่างดินจากผิวดินและหน้าดิน ผสมให้เข้ากันให้ได้ตัวแทนตะกอนดินทั้งหมด และนำตัวอย่างตะกอนดินแห้งละ 300 กรัม เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักในดินด้วยเทคนิค Atomic absorption spectrophotometer ตามวิธีมาตรฐาน AOAC (2012) ผลการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักจากตัวแทนตะกอนดินจากเหมืองดีบุกร้างในจังหวัดระนอง ทั้งหมด 4 แห่ง พบว่ามีการปนเปื้อนโลหะหนักที่ไม่เกินค่ามาตรฐานคุณภาพดินที่ใช้ประโยชน์เพื่อการอยู่อาศัยและเกษตรกรรม โดยกำหนดให้ตะกั่วไม่เกิน 400 ppm และปรอทไม่เกิน 23 ppm ตามประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 25 พ.ศ. 2547 เรื่องกำหนดมาตรฐานคุณภาพดิน (กรมควบคุมมลพิษ, 2547) และมีการปนเปื้อนปริมาณโลหะหนัก ได้แก่ Cu^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} และ Sn^{2+} แสดงผลในตาราง 5 ในทุกตัวอย่างตะกอนดินของทุก ๆ เหมืองร้างที่ทำการเก็บตัวอย่าง ตะกอนเหมืองร้างในตำบลบางรีนพบว่ามีปริมาณ Cu^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} และ Sn^{2+} มีปริมาณเท่ากับ 12.32, 33.78, 0.171, และ 3.15 ppm ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยที่ได้สูงกว่าตะกอนดินจากแหล่งอื่น ๆ ในขณะที่พบการปนเปื้อนโลหะหนักจากเหมืองร้างในตำบลหาดส้มแป้น มีปริมาณเท่ากับ 3.12, 45.69, 0.009 และ 0.54 ppm ตามลำดับ และพบการปนเปื้อนโลหะหนักจากเหมืองร้างในตำบลบางนอน มีปริมาณเท่ากับ 3.86, 23.60, 0.010 และ 0.76 ppm ตามลำดับ นอกจากนี้พบการปนเปื้อนโลหะหนักจากตะกอนดินจากเหมืองร้างในตำบลหงาว มีปริมาณเท่ากับ 2.27, 10.05, 0.009 และ 1.34 ppm ตามลำดับ อย่างไรก็ตามไม่พบการปนเปื้อนแคดเมียมในทุก ๆ ตัวอย่างตะกอนดิน ดังนั้นตัวอย่างตะกอนดินในทุก ๆ แห่ง จะนำมาตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มีการเติมโลหะหนัก เพื่อแสดงการเปลี่ยนแปลงของจำนวนประชากรแบคทีเรียที่บ่งชี้การปนเปื้อนโลหะหนักในตะกอนดิน และศึกษาการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียต้านทานโลหะหนักต่อไป

ตาราง 5 ปริมาณโลหะหนักจากตัวอย่างดินและตะกอนดินจากเหมืองดีบุกร้างในจังหวัดระนอง

Test Item	Method	MDL	Result	Unit
เหมืองร้างในตำบลบางวัน				
Cadmium (Cd ²⁺)	AOAC (2012)	0.05	Not Detected	ppm
	968.08			
Copper (Cu ²⁺)	AOAC (2012)	0.02	12.32	ppm
	968.08			
Lead (Pb ²⁺)	AOAC (2012)	0.14	33.78	ppm
	968.08			
Mercury (Hg ²⁺)	AOAC (2012)	0.001	0.171	ppm
	974.14			
Tin (Sn ²⁺)	AOAC (2012)	0.2	3.15	ppm
	968.08			
เหมืองร้างในตำบลหาดส้มแป้น				
Cadmium (Cd ²⁺)	AOAC (2012)	0.05	Not Detected	ppm
	968.08			
Copper (Cu ²⁺)	AOAC (2012)	0.02	3.12	ppm
	968.08			
Lead (Pb ²⁺)	AOAC (2012)	0.14	45.69	ppm
	968.08			
Mercury (Hg ²⁺)	AOAC (2012)	0.001	0.009	ppm
	974.14			
Tin (Sn ²⁺)	AOAC (2012)	0.2	0.54	ppm
	968.08			
เหมืองร้างในตำบลบางนอน				
Cadmium (Cd ²⁺)	AOAC (2012)	0.05	Not Detected	ppm
	968.08			

ตาราง 5 (ต่อ)

Test Item	Method	MDL	Result	Unit
Copper (Cu ²⁺)	AOAC (2012) 968.08	0.02	3.86	ppm
Lead (Pb ²⁺)	AOAC (2012) 968.08	0.14	23.60	ppm
Mercury (Hg ²⁺)	AOAC (2012) 974.14	0.001	0.010	ppm
Tin (Sn ²⁺)	AOAC (2012) 968.08	0.2	0.76	ppm
เหมืองร้างตำบลหงาว				
Cadmium (Cd ²⁺)	AOAC (2012) 968.08	0.05	Not Detected	ppm
Copper (Cu ²⁺)	AOAC (2012) 968.08	0.02	2.27	ppm
Lead (Pb ²⁺)	AOAC (2012) 968.08	0.14	10.05	ppm
Mercury (Hg ²⁺)	AOAC (2012) 974.14	0.001	0.009	ppm
Tin (Sn ²⁺)	AOAC (2012) 968.08	0.2	1.34	ppm

MDL คือ Method detection limit

1.2 การตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่บ่งชี้การต้านทานโลหะหนัก

จากการตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างตะกอนดินที่เก็บในพื้นที่เหมืองร้างทั้ง 4 แหล่ง โดยใช้ตัวอย่างตะกอนดินแหล่งละ 1 กรัม มาทำการเจือจาง 10 เท่า ด้วย 0.85 % NaCl จนได้ความเจือจางที่เหมาะสม $10^{-1} - 10^{-8}$ จากนั้นนำดูดสารละลายในแต่ละความเจือจางด้วยไมโครไปเปตปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็ง Tryptic soy agar (TSA) ที่มีส่วนผสมของโลหะหนัก ตะกั่ว (Pb^{2+}), ทองแดง (Cu^{2+}) และปรอท (Hg^{2+}) ผสมอยู่ ที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 0.5 – 15, 0.5 – 10 และ 0.1 – 5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 – 48 ชั่วโมง จากการเติมโลหะหนักในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ผลการวิเคราะห์โลหะหนักในเหมืองดีบุกร้างทั้ง 4 ตำบล ดังแสดงในตาราง 6 พบการปนเปื้อนโลหะหนัก 4 ชนิด ได้แก่ Cu^{2+} , Hg^{2+} , Sn^{2+} และ Pb^{2+} อย่างไรก็ตามไม่พบการปนเปื้อน Cd^{2+} ผลการทดสอบพบว่าดินตะกอนจากเหมืองในตำบลบางวันมีจำนวนแบคทีเรียที่ทนต่อ Pb^{2+} มากที่สุดจำนวน 1.2×10^6 CFU/g และ 7.5×10^5 CFU/g ในระดับความเข้มข้น Pb^{2+} ที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และดินจากแหล่งนี้ยังพบจำนวนแบคทีเรียที่ทนต่อ Hg^{2+} มากที่สุดจำนวน 2.0×10^3 CFU/g และ 8.0×10^2 CFU/g ในระดับความเข้มข้น Hg^{2+} ที่ 0.1 และ 0.2 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อ Cu^{2+} สูงถึง 2.0×10^4 CFU/g ในระดับความเข้มข้น Cu^{2+} ที่ 3 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ดินจากเหมืองร้างในตำบลบางนอน ตำบลหงาว และ ตำบลหาดส้มแป้น มีจำนวนแบคทีเรียที่ทนต่อ Pb^{2+} ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ในปริมาณที่แตกต่างกันคือ 5.0×10^4 CFU/g, 6.8×10^3 CFU/g และ 1.0×10^3 CFU/g ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ดินเหมืองร้างจากทั้ง 4 ตำบล ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อผสม Cd^{2+} ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 1 มิลลิโมลาร์

ตาราง 6 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ต้านทานโลหะหนักจากเหมืองร้างแหล่งต่าง ๆ ในจังหวัดระนอง

ที่ตั้ง เหมือง	จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่พบ (CFU/g)							
	ไม่เติม โลหะ หนัก	Pb ²⁺		Cu ²⁺		Hg ²⁺		Cd ²⁺
		1 mM	5 mM	1 mM	3 mM	0.1mM	0.2mM	1mM
ตำบล บางรีน	5.0x10 ⁸	1.2x10 ⁶	7.5x10 ⁵	2.6x10 ⁴	2.0x10 ⁴	2.0x10 ³	8.0x10 ²	0
ตำบล หาดส้ม แบน	2.0x10 ⁹	8.5x10 ³	1.0x10 ³	1.6x10 ²	2.4x10 ¹	0	0	0
ตำบล บางนอน	3.2x10 ⁸	2.6x10 ⁵	5.0x10 ⁴	3.0x10 ³	3.0x10 ²	2.5x10 ¹	0	0
ตำบล หวาง	2.1x10 ⁸	2.7x10 ⁴	6.8x10 ³	3.2x10 ⁴	4.0x10 ²	3.0x10 ¹	0	0

ผลการทดลองได้จากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 2 ซ้ำ

หมายเหตุ: 1 mM ของ Pb²⁺ (Pb(NO₃)₂) คิดเป็น 331.2 ppm, 0.1 mM ของ Hg²⁺ (HgCl₂) คิดเป็น 27.5 ppm และ 1 mM ของ Cu²⁺ (CuSO₄·5H₂O) คิดเป็น 249.7 ppm

1.3 การแยกเชื้อแบคทีเรียต้านทานโลหะหนักจากเหมืองร้างในจังหวัดระนอง

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร Tryptic soy agar (TSA) ที่ผสมโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด คือ ตะกั่ว (Pb²⁺), ทองแดง (Cu²⁺) และปรอท (Hg²⁺) ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน จนได้เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ เพื่อนำมาทดสอบศักยภาพการเจริญเติบโตในโลหะหนักในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันดังแสดงในตาราง 7-10 โดยสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ในโลหะหนักในจำนวนที่แตกต่างกัน จำนวน 27, 14, 4 และ 6 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากเหมืองในตำบลบางรีน ตำบลหาดส้มแบน ตำบลบางนอน และตำบลหวาง ตามลำดับ ในจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้นั้นพบว่า มีเชื้อแบคทีเรียเพียง 14 ไอโซเลท (52%) และ 6 ไอโซเลท (22%) ที่แยกจากเหมืองในตำบลบางรีนสามารถทนอยู่ใน Pb²⁺ ได้มากที่สุดถึง 10 มิลลิโมลาร์ และ 15 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของ Hg²⁺ ที่สูงที่สุดคือ 1 มิลลิโมลาร์

พบว่ามียาจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตอยู่ได้จำนวน 4,1 และ 1 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากเหมืองในตำบลบางวัน ตำบลหาดส้มแป้น ตำบลบางนอน ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้เจริญเติบโตใน Cu^{2+} ได้มากที่สุดเพียง 5 มิลลิโมลาร์ จำนวน 4, 5, 1 และ 1 ไอโซเลท จากดินในตำบลบางวัน ตำบลหาดส้มแป้น ตำบลบางนอน และตำบลหวาง ตามลำดับ

ตาราง 7 จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการต้านทานโลหะหนักที่แยกได้จากเหมืองตำบลบางวัน (N=27)

โลหะหนัก	Cumulative (%) strains resistant of the following metal ion concentration (mM)									
	0.1	0.5	0.75	1	2.5	5	7.5	10	15	
Pb^{2+}	ND	ND	ND	27(100)	26(96)	26(96)	24(89)	14(52)	6(22)	
Hg^{2+}	11(41)	6(22)	5(18)	4(15)	0	ND	ND	ND	ND	
Cu^{2+}	ND	14(52)	14(52)	14(52)	7(26)	4(15)	0	0	ND	

ND คือ ไม่ได้ทำการทดลอง

N คือ จำนวนเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท

หมายเหตุ: 1 mM ของ Pb^{2+} ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) คิดเป็น 331.2 ppm, 0.1 mM ของ Hg^{2+} (HgCl_2) คิดเป็น 27.5 ppm และ 1 mM ของ Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) คิดเป็น 249.7 ppm

ตาราง 8 จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการต้านทานโลหะหนักที่แยกได้จากเหมืองตำบลหาดส้มแป้น (N=14)

โลหะหนัก	Cumulative (%) strains resistant of the following metal ion concentration (mM)									
	0.1	0.5	0.75	1	2.5	5	7.5	10	15	
Pb^{2+}	ND	ND	ND	12(85)	12(85)	12(85)	10(71)	6(43)	0	
Hg^{2+}	5(45)	1(9)	1(9)	1(9)	0	ND	ND	ND	ND	
Cu^{2+}	ND	10(91)	10(91)	9(82)	7(64)	5(45)	0	0	ND	

ND คือ ไม่ได้ทำการทดลอง

N คือ จำนวนเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท

หมายเหตุ: 1 mM ของ Pb^{2+} ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) คิดเป็น 331.2 ppm, 0.1 mM ของ Hg^{2+} (HgCl_2) คิดเป็น 27.5 ppm และ 1 mM ของ Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) คิดเป็น 249.7 ppm

ตาราง 9 จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการต้านทานโลหะหนักที่แยกได้จากเหมืองตำบลบางนอน (N=4)

โลหะหนัก	Cumulative (%) strains resistant of the following metal ion concentration (mM)									
	0.1	0.5	0.75	1	2.5	5	7.5	10	15	
Pb ²⁺	ND	ND	ND	4(100)	4(100)	4(100)	4(100)	3(75)	0	
Hg ²⁺	2(50)	1(25)	1(25)	1(25)	0	ND	ND	ND	ND	
Cu ²⁺	ND	4(100)	4(100)	4(100)	4(100)	1(25)	0	0	ND	

ND คือ ไม่ได้ทำการทดลอง

N คือ จำนวนเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท

หมายเหตุ: 1 mM ของ Pb²⁺ (Pb(NO₃)₂) คิดเป็น 331.2 ppm, 0.1 mM ของ Hg²⁺ (HgCl₂) คิดเป็น 27.5 ppm และ 1 mM ของ Cu²⁺ (CuSO₄·5H₂O) คิดเป็น 249.7 ppm

ตาราง 10 จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการต้านทานโลหะหนักที่แยกได้จากเหมืองตำบลหวาง (N=6)

โลหะหนัก	Cumulative (%) strains resistant of the following metal ion concentration (mM)									
	0.1	0.5	0.75	1	2.5	5	7.5	10	15	
Pb ²⁺	ND	ND	ND	5(83)	5(83)	5(83)	4(67)	4(67)	0	
Hg ²⁺	2(33)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	
Cu ²⁺	ND	1(17)	1(17)	1(17)	1(17)	1(17)	0	0	ND	

ND คือ ไม่ได้ทำการทดลอง

N คือ จำนวนเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท

หมายเหตุ: 1 mM ของ Pb²⁺ (Pb(NO₃)₂) คิดเป็น 331.2 ppm, 0.1 mM ของ Hg²⁺ (HgCl₂) คิดเป็น 27.5 ppm และ 1 mM ของ Cu²⁺ (CuSO₄·5H₂O) คิดเป็น 249.7 ppm

1.4 การทดสอบความเข้มข้นของโลหะหนักที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตได้ดี มาทำการเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารแข็ง Tryptic soy agar (TSA) ด้วยวิธีการ spot เชื้อ ที่มีส่วนผสมของโลหะหนัก ตะกั่ว (Pb^{2+}), ทองแดง (Cu^{2+}) และปรอท (Hg^{2+}) ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายระหว่าง 1 – 15, 0.5 – 5 และ 0.1 – 2.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถทนโลหะหนักได้ในระดับของความเข้มข้นโลหะหนักที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตาราง 11 แต่มีเพียง 13 ไอโซเลท ได้แก่ SWU3, SWU4, SWU14, SWU18, SWU22, SWU24, SWU27, SWU28, SWU40, SWU42, SWU54, SWU56 และ SWU57 ที่ทนต่อโลหะหนัก Cu^{2+} , Hg^{2+} และ Pb^{2+} ที่ความเข้มข้นสูงได้

ตาราง 11 ความเข้มข้นในการต้านทานโลหะหนักของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเหมืองร้าง
ในจังหวัดระนอง

ลำดับ	ความเข้มข้นในการต้านทานโลหะหนัก (mM)				
	รหัสเชื้อ	แหล่งตะกอนดิน	Pb ²⁺	Hg ²⁺	Cu ²⁺
1	SWU1	ต่ำบบางริ้น	7.5	0	1
2	SWU4	ต่ำบบางริ้น	2.5	0.1	1
3	SWU5	ต่ำบบางริ้น	7.5	0	1
4	SWU6	ต่ำบบางริ้น	7.5	0	1
5	SWU7	ต่ำบบางริ้น	15	0	0
6	SWU8	ต่ำบบางริ้น	2.5	0	0
7	SWU11	ต่ำบบางริ้น	7.5	0	0
8	SWU12	ต่ำบบางริ้น	7.5	0	0
9	SWU13	ต่ำบบางริ้น	15	0	0
10	SWU18	ต่ำบบางริ้น	10	0.1	2.5
11	SWU19	ต่ำบบางริ้น	0	0.1	0
12	SWU20*	ต่ำบบางริ้น	10	0.5	0
13	SWU21	ต่ำบบางริ้น	10	0	1
14	SWU24*	ต่ำบบางริ้น	10	1	2.5
15	SWU27	ต่ำบบางริ้น	10	0.75	2.5
16	SWU28*	ต่ำบบางริ้น	10	1	5
17	SWU30*	ต่ำบบางริ้น	10	1	0
18	SWU44	ต่ำบบางริ้น	10	0	1
19	SWU47*	ต่ำบบางริ้น	15	0	0
20	SWU48*	ต่ำบบางริ้น	15	0	0
21	SWU49	ต่ำบบางริ้น	15	0	1
22	SWU50	ต่ำบบางริ้น	15	0	5

ตาราง 11 (ต่อ)

ลำดับ	ความเข้มข้นในการต้านทานโลหะหนัก (mM)				
	รหัสชื่อ	แหล่งตะกอนดิน	Pb ²⁺	Hg ²⁺	Cu ²⁺
23	SWU51	ตำบลบางกรีน	7.5	0	0
24	SWU52*	ตำบลบางกรีน	7.5	1	0
25	SWU53	ตำบลบางกรีน	7.5	0	0
26	SWU54*	ตำบลบางกรีน	7.5	0.1	5
27	SWU56*	ตำบลบางกรีน	7.5	0.1	5
28	SWU2	ตำบลหาดส้มแป้น	7.5	0	0.5
29	SWU3*	ตำบลหาดส้มแป้น	10	1	5
30	SWU37	ตำบลหาดส้มแป้น	10	0	0
31	SWU41	ตำบลหาดส้มแป้น	10	0	1
32	SWU57*	ตำบลหาดส้มแป้น	7.5	0.1	2.5
33	SWU58*	ตำบลหาดส้มแป้น	10	0	5
34	SWU59*	ตำบลหาดส้มแป้น	7.5	0	5
35	SWU60	ตำบลหาดส้มแป้น	0	0.1	5
36	SWU22	ตำบลหาดส้มแป้น	5	0.1	2.5
37	SWU23	ตำบลหาดส้มแป้น	0	0.1	0
38	SWU34	ตำบลหาดส้มแป้น	7.5	0	1
39	SWU35	ตำบลหาดส้มแป้น	10	0	0
40	SWU45*	ตำบลหาดส้มแป้น	10	0	5
41	SWU46	ตำบลหาดส้มแป้น	5	0	0.5
42	SWU14	ตำบลบางนอน	7.5	0.1	1
43	SWU16	ตำบลบางนอน	10	0	1
44	SWU42*	ตำบลบางนอน	10	0.1	5

ตาราง 11 (ต่อ)

ลำดับ	ความเข้มข้นในการต้านทานโลหะหนัก (mM)				
	รหัสเชื้อ	แหล่งตะกอนดิน	Pb ²⁺	Hg ²⁺	Cu ²⁺
45	SWU43	ตำบลบางนอน	10	0	1
46	SWU15	ตำบลหวาง	0	0.1	0
47	SWU31	ตำบลหวาง	5	0	0
48	SWU36	ตำบลหวาง	10	0	0
49	SWU38	ตำบลหวาง	10	0	0
50	SWU39	ตำบลหวาง	10	0	0
51	SWU40*	ตำบลหวาง	10	1	5

*คือ เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค 16S rDNA sequencing

2. การจัดจำแนกสายพันธุ์และทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียทนโลหะหนัก

2.1 การจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียทนโลหะหนัก

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนโลหะหนักได้สูงที่สุดมาจัดจำแนกสายพันธุ์ สามารถจัดจำแนกเป็นกลุ่มจีโนมของ *Bacillus*, *Cupriavidus*, *Enterobacter* และ *Pseudomonas* เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล GeneBank Database พบว่ามีความเหมือนระหว่าง 99-100% โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการทนโลหะหนักได้ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Bacillus* sp. SWU24, *Cupriavidus* sp. SWU27 และ *Pseudomonas* sp. SWU3 สามารถทน Pb²⁺ ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, Hg²⁺ ที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 0.75 มิลลิโมลาร์ และ Cu²⁺ ที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 2.5 มิลลิโมลาร์ ดังแสดงในตาราง 12 อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่ได้นำเชื้อ *Enterobacter* sp. SWU42 มาใช้ทดสอบเพื่อการบำบัดโลหะหนักในการทดลองขั้นตอนต่อไปเนื่องจากเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในพืช

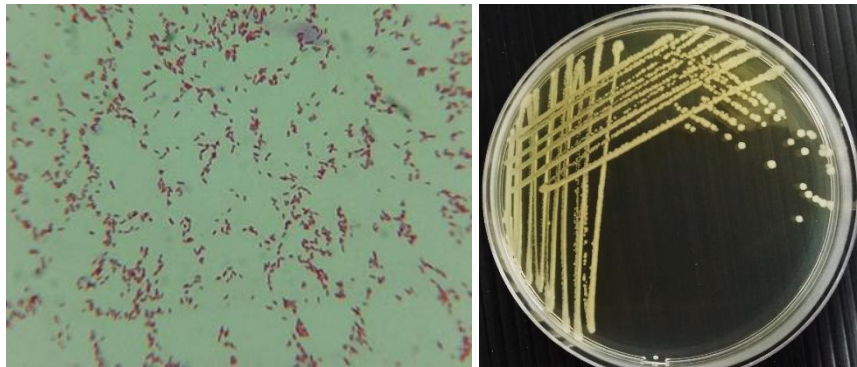
ตาราง 12 การวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่ทนโลหะหนักด้วยเทคนิค 16S rDNA sequencing

Strain code	Most similar GenBank sequences	% sequence similarity	Heavy metal resistant (mM)		
			Pb ²⁺	Hg ²⁺	Cu ²⁺
ตำบลบางรีน					
SWU20	<i>Bacillus drentensis</i>	100	10	0.5	0
SWU24	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	10	1	2.5
SWU27	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	100	10	0.75	2.5
SWU28	<i>Bacillus drentensis</i>	100	10	1	0
SWU30	<i>Enterobacter ludwigii</i>	100	7.5	1	0
SWU52	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	100	7.5	0.1	5
SWU54	<i>Pseudomonas parafulva</i>	100	7.5	0.1	5
SWU56	<i>Pseudomonas putida</i>	100	7.5	0.1	5
ตำบลหาดส้มแป้น					
SWU3	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	100	10	1	5
SWU45	<i>Pseudomonas putida</i>	100	10	0	5
SWU57	<i>Pseudomonas parafulva</i>	100	7.5	0.1	2.5
SWU58	<i>Pseudomonas putida</i>	100	10	0	5
SWU59	<i>Pseudomonas putida</i>	100	7.5	0	5
ตำบลบางนอน					
SWU42	<i>Enterobacter cloacae</i>	99	10	1	5
ตำบลหวาง					
SWU40	<i>Enterobacter ludwigii</i>	99	10	0.1	5

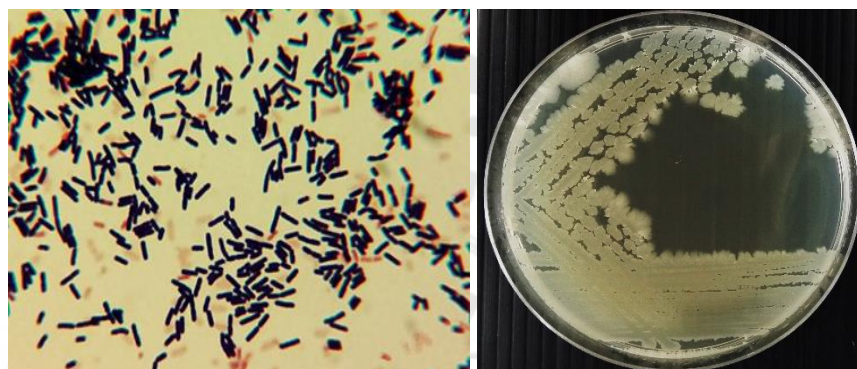
2.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

แบคทีเรีย 3 ไอโซเลต คือ SWU3, SWU24 และ SWU27 ถูกเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทดสอบลักษณะทางชีวภาพโดยชุดทดสอบ API 20NE และศึกษาการยับยั้งการเติบโตของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่าไอโซเลต SWU3 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน ลักษณะโคโลนีมีสีขาวขุ่น ผิวมันวาว ไอโซเลต SWU24 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน ลักษณะโคโลนีมีสีขาวขุ่น ผิวมันวาว และไอโซเลต SWU27 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน ลักษณะโคโลนีมีสีขาวขุ่น ผิวด้าน ดังแสดงในภาพประกอบ 2 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต พบว่าเป็นแบคทีเรียที่ย่อยเอ็นไซม์ N-acetyl-glucosamine, Gluconate และ Malate ได้ แสดงไว้ในตาราง 13





Pseudomonas sp. SWU3



Bacillus sp. SWU24



Cupriavidus sp. SWU27

ภาพประกอบ 2 ลักษณะพื้นฐานวิทยาเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเพื่อใช้นำบำบัดโลหะหนัก

ตาราง 13 การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่เรียกชื่อโดยย่อ

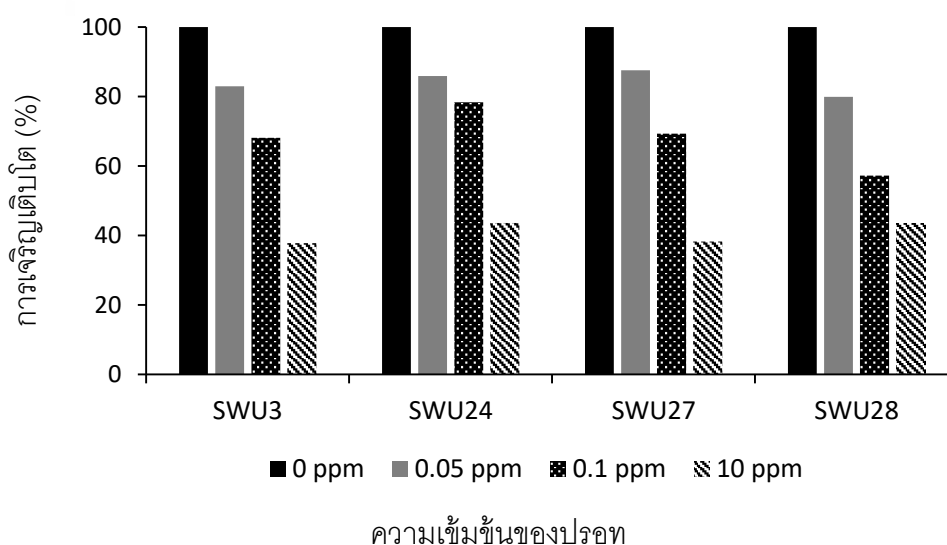
ปฏิกิริยา	ไอโซเลต		
	SWU3	SWU24	SWU27
Gram stain	-	+	-
Shape	rod	rod	rod
Reduction of potassium nitrate	+	+	-
Indole production from tryptophan	+	-	-
Glucose fermentation	+	+	-
Arginine hydrolysis	+	+	-
Urea hydrolysis	+	+	-
Aesculin hydrolysis	-	+	-
Gelatin hydrolysis	-	+	-
p-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside hydrolysis	-	+	-
Glucose assimilation	+	+	-
Arabinose assimilation	-	+	-
Mannose assimilation	+	+	-
Mannitol assimilation	+	+	-
N-acetyl-glucosamine assimilation	+	+	+
Maltose assimilation	-	+	-
Gluconate assimilation	+	+	+
Caprate assimilation	-	-	-
Adipate assimilation	-	-	-
Malate assimilation	+	+	+
Citrate assimilation	+	-	-
Phenyl-acetate assimilation	+	-	-

(-) Negative

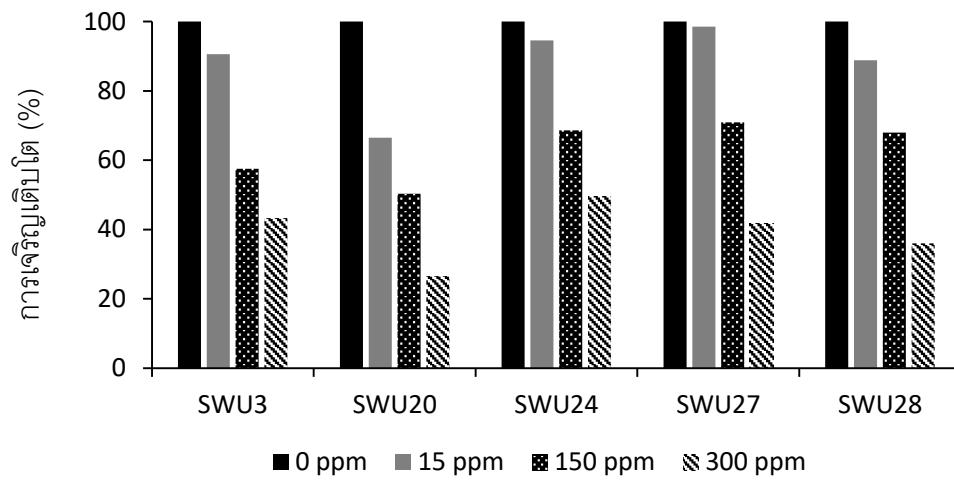
(+) Positive

3. การทดสอบการบำบัดโลหะหนักของเชื้อแบคทีเรีย

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการทนโลหะหนัก Cu^{2+} , Hg^{2+} และ Pb^{2+} สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีโลหะหนักที่มีปริมาณที่แตกต่างกัน ผลการทดลองพบว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ SWU24, SWU27 และ SWU3 สามารถเจริญเติบโตในโลหะหนักทั้ง 3 ชนิดได้ดีกว่าเชื้อไอโซเลทอื่น ๆ เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตดังแสดงในภาพประกอบที่ 3-5 พบว่าเชื้อไอโซเลท SWU24 สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ Hg^{2+} ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 ppm, 0.1 ppm และ 10 ppm มีอัตราการเจริญเป็น 85.9%, 78.4% และ 43.6% ตามลำดับ และยังสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม Pb^{2+} ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm, 150 ppm และ 300 ppm มีอัตราการเจริญเป็น 94.6%, 68.6% และ 49.7% ตามลำดับ ในขณะที่ ไอโซเลท SWU3 สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม Cu^{2+} ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm, 150 ppm และ 300 ppm มีอัตราการเจริญเป็น 69.3%, 54.0% และ 34.4% ตามลำดับ



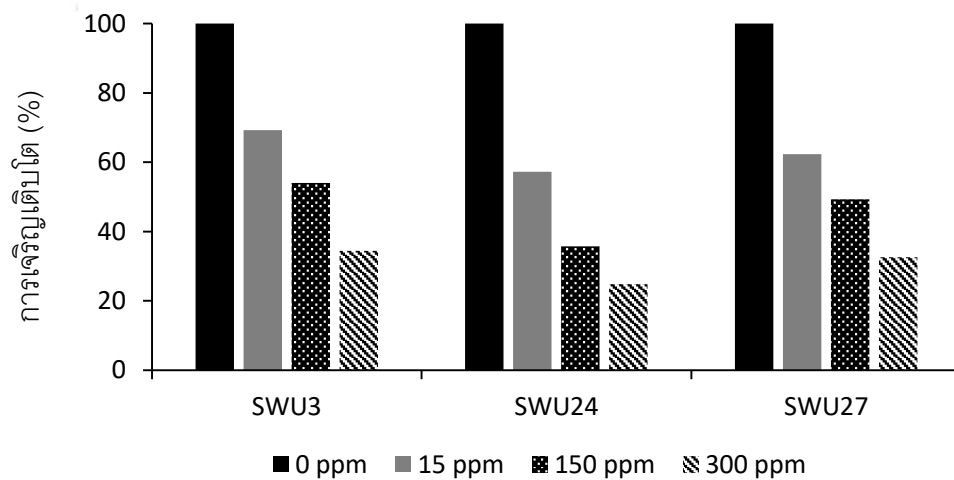
ภาพประกอบ 3 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทนต่อปรอทที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน



ความเข้มข้นของตะกั่ว

ภาพประกอบ 4 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทนต่อตะกั่วที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

เป็นระยะเวลา 7 วัน



ความเข้มข้นของทองแดง

ภาพประกอบ 5 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทนต่อทองแดงที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

เป็นระยะเวลา 7 วัน

จากการศึกษาแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทที่ทำการคัดเลือกจากอัตราการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มาศึกษาขั้นตอนการบำบัดโลหะหนักออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมความเข้มข้นของ Hg^{2+} , Pb^{2+} และ Cu^{2+} ที่ระดับความเข้มข้น 4.76 ppm, 438.6 ppm และ 475.7 ppm ตามลำดับ โดยจะเติมเชื้อแบบ batch culture จากนั้นเพราะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน และเก็บตัวอย่างทุก ๆ ระยะเวลา 7 วัน เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักที่เหลือด้วยเครื่อง Atomic absorption Spectrophotometer (AAS) ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 14 พบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทมีศักยภาพกำจัด Hg^{2+} ได้ตั้งแต่การเติมปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ 10% ลงในอาหารที่ผสม Hg^{2+} ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปั่นเก็บเซลล์ทันที จากผลแสดงให้เห็นว่าสามารถกำจัด Hg^{2+} ได้ตั้งแต่ 25-46.7% ในส่วนการกำจัด Pb^{2+} และ Cu^{2+} สามารถกำจัดได้มากขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อพร้อมกับอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 7-28 วัน จากการทดสอบพบว่า ไอโซเลท SWU24 มีศักยภาพกำจัดโลหะหนัก ได้แก่ Hg^{2+} และ Cu^{2+} ได้สูงที่สุด คิดเป็น 91.6% และ 66.1% ตามลำดับ ไอโซเลท SWU27 สามารถกำจัดโลหะหนัก ได้แก่ Hg^{2+} และ Cu^{2+} ได้สูงที่สุด คิดเป็น 65.7% และ 55.8% ตามลำดับ และ SWU3 สามารถกำจัดโลหะหนัก ได้แก่ Hg^{2+} และ Cu^{2+} ได้สูงที่สุด คิดเป็น 73.4% และ 38.7% ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลท SWU27 สามารถกำจัด Pb^{2+} ได้สูงที่สุดถึง 68.0% รองลงมา คือ ไอโซเลท SWU24 และ SWU3 มีความสามารถกำจัด Pb^{2+} ได้ 64.1% และ 41.9% ตามลำดับ

ตาราง 14 ศักยภาพในการบำบัดโลหะหนักในอาหารเหลือร่วมกับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

ระยะเวลาบ่ม (วัน)	การกำจัดโลหะหนัก (เปอร์เซ็นต์)			
	ชุดควบคุม	SWU3	SWU24	SWU27
การกำจัดปรอท (Hg^{2+}) ความเข้มข้นเริ่มต้น 4.76 ppm				
0	4.76(100)	2.50 (46.7)	3.4 (25.0)	3.00 (36.9)
7	4.78 (100.5)	1.87 (60.8)	0.5 (90.2)	2.00 (57.9)
14	4.80 (100.9)	1.57 (67.1)	0.45 (91.2)	1.87 (60.7)
21	4.91 (103.2)	1.43 (69.9)	0.45 (91.6)	1.68 (64.6)
28	4.74 (99.6)	1.27 (73.4)	0.4 (91.6)	1.63 (65.7)
การกำจัดตะกั่ว (Pb^{2+}) ความเข้มข้นเริ่มต้น 438.6 ppm				
0	438.66 (100)	438.67 (1.9)	438.67 (2.5)	438.67 (2.0)
7	438.66 (100.3)	430.33 (27.5)	427.67 (40.0)	430.00 (42.7)
14	440.00 (99.7)	318.00 (33.5)	263.33 (48.9)	251.33 (46.1)
21	438.66 (100.1)	291.67 (36.4)	224.00 (56.2)	236.67 (61.5)
28	439.00 (99.8)	279.00 (41.9)	192.33 (64.1)	169.00 (68.0)
การกำจัดทองแดง (Cu^{2+}) ความเข้มข้นเริ่มต้น 475.7 ppm				
0	475.67 (100)	471.33 (0.9)	475.67 (2.7)	475.67 (1.8)
7	478.00 (100.5)	358.67 (24.6)	463.00 (43.9)	467.33 (46.7)
14	480.00 (100.9)	317.00 (33.4)	266.67 (56.7)	253.67 (49.8)
21	490.67 (103.2)	310.67 (34.7)	206.00 (58.4)	238.67 (51.5)
28	474.00 (99.6)	291.67 (38.7)	198.00 (66.1)	230.67 (55.8)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนักด้วยเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อแบคทีเรียพบว่าเมื่อบ่มเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท SWU3 เป็นเวลา 60 นาที, 30 นาที และ 15 นาที จะสามารถกำจัด Hg^{2+} , Pb^{2+} และ Cu^{2+} เมื่อเทียบในหน่วยมิลลิกรัมของโลหะหนักต่อกรัมเซลล์แห้ง ได้สูงสุดถึง 32.4 ± 1.2 mg/g cell, 313.6 ± 0.5 mg/g cell และ 39.2 ± 1.8 mg/g cell ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 15

เมื่อบ่มเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท SWU24 เป็นเวลา 30 นาที, 60 นาที และ 720 นาที จะสามารถกำจัด Hg^{2+} , Pb^{2+} และ Cu^{2+} เมื่อเทียบในหน่วยมิลลิกรัมของโลหะหนักต่อกรัมเซลล์แห้ง ได้สูงสุดถึง 29.2 ± 1.6 mg/g cell, 150.6 ± 2.1 mg/g cell และ 34.1 ± 2.6 mg/g cell ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 16

และเมื่อบ่มเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท SWU27 เป็นเวลา 360 นาที, 60 นาที และ 720 นาที จะสามารถกำจัด Hg^{2+} , Pb^{2+} และ Cu^{2+} เมื่อเทียบในหน่วยมิลลิกรัมของโลหะหนักต่อกรัมเซลล์แห้ง ได้สูงสุดถึง 65.8 ± 2.6 mg/g cell, 404.4 ± 27.4 mg/g cell และ 29.1 ± 2.7 mg/g cell ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 17

ตาราง 15 ศักยภาพในการบำบัดโลหะหนักในอาหารเหลวด้วยเซลล์ของเชื้อ *Pseudomonas* sp. SWU3

ระยะเวลาบ่ม (นาที)	การกำจัดโลหะหนัก (เปอร์เซ็นต์)	ชีวมวลแห้งของ เซลล์ (กรัม)	การกำจัดโลหะหนัก (มิลลิกรัม/กรัมชีวมวลแห้ง)
การกำจัดปรอท (Hg^{2+}) ความเข้มข้นเริ่มต้นเฉลี่ย 7 ppm			
1	41.4 ± 2.9	0.20	14.2 ± 0.5
5	45.7 ± 4.9	0.22	14.6 ± 2.0
15	49.0 ± 3.0	0.19	18.2 ± 1.5
30	70.5 ± 4.4	0.22	22.5 ± 1.4
60	81.9 ± 1.7	0.18	32.4 ± 1.2
180	55.2 ± 2.2	0.15	25.8 ± 0.8
360	64.8 ± 2.2	0.17	27.5 ± 1.5

ตาราง 15 (ต่อ)

ระยะเวลาบ่ม (นาทีก)	การกำจัดโลหะหนัก (เปอร์เซ็นต์)	ชีวมวลแห้งของ เซลล์ (กรัม)	การกำจัดโลหะหนัก (มิลลิกรัม/กรัมชีวมวลแห้ง)
การกำจัดปรอท (Hg^{2+}) ความเข้มข้นเริ่มต้นเฉลี่ย 7 ppm			
720	60.9±1.7	0.20	20.9±0.7
การกำจัดตะกั่ว (Pb^{2+}) ความเข้มข้นเริ่มต้นเฉลี่ย 40 ppm			
1	92.2±2.1	0.17	210.2±3.2
5	86.7±2.1	0.14	249.3±2.7
15	94.4±0.2	0.12	311.9±1.3
30	94.9±0.6	0.12	313.6±0.5
60	94.4±0.5	0.14	277.3±0.4
180	82.5±1.9	0.12	272.8±1.7
360	72.3±4.1	0.12	238.9±7.6
720	84.2±1.7	0.15	218.0±1.4
การกำจัดทองแดง (Cu^{2+}) ความเข้มข้นเริ่มต้นเฉลี่ย 35 ppm			
1	14.2±1.6	0.19	26.7±3.0
5	17.4±1.6	0.21	29.1±2.7
15	19.1±0.9	0.17	39.2±1.8
30	15.0±0.7	0.18	29.6±1.4
60	17.6±1.4	0.2	31.6±2.4
180	16.8±0.3	0.17	33.7±0.7
360	15.0±1.7	0.16	31.7±3.6
720	16.7±1.9	0.18	32.4±3.7

ตาราง 16 ศักยภาพในการบำบัดโลหะหนักในอาหารเหลวด้วยเซลล์ของเชื้อ *Bacillus* sp. SWU24

ระยะเวลาบ่ม (นาทีก)	การกำจัดโลหะหนัก (เปอร์เซ็นต์)	ชีวมวลแห้งของ เซลล์ (กรัม)	การกำจัดโลหะหนัก (มิลลิกรัม/กรัมชีวมวลแห้ง)
การกำจัดปรอท (Hg^{2+}) ความเข้มข้นเริ่มต้นเฉลี่ย 7 ppm			
1	26.2±0.8	0.13	13.9±0.9
5	35.2±2.2	0.13	19.1±0.4
15	37.5±2.5	0.13	19.4±2.1
30	53.8±1.6	0.13	29.2±1.6
60	47.1±2.5	0.12	28.2±1.5
180	41.4±5.2	0.15	19.3±3.1
360	48.6±3.8	0.14	25.2±2.7
720	44.8±4.6	0.14	23.2±3.1
การกำจัดตะกั่ว (Pb^{2+}) ความเข้มข้นเริ่มต้นเฉลี่ย 40 ppm			
1	33.4±6.8	0.16	75.7±5.7
5	50.9±5.0	0.26	75.3±1.4
15	92.5±1.4	0.24	150.6±2.1
30	53.3±6.5	0.20	100.2±6.8
60	44.7±12.1	0.19	88.5±18.6
180	36.5±11.0	0.23	59.9±9.2
360	42.8±2.3	0.23	68.2±5.2
720	45.1±1.1	0.22	78.2±10.1
การกำจัดทองแดง (Cu^{2+}) ความเข้มข้นเริ่มต้นเฉลี่ย 35 ppm			
1	13.5±0.8	0.19	24.9±1.4
5	14.8±2.0	0.18	28.6±4.0
15	17.1±0.3	0.20	30.3±0.5
30	13.6±0.7	0.17	28.9±1.5
60	15.9±1.1	0.17	32.6±2.4

ตาราง 16 (ต่อ)

ระยะเวลาบ่ม (นาทีก)	การกำจัดโลหะหนัก (เปอร์เซ็นต์)	ชีวมวลแห้งของ เซลล์ (กรัม)	การกำจัดโลหะหนัก (มิลลิกรัม/กรัมชีวมวลแห้ง)
การกำจัดทองแดง (Cu^{2+}) ความเข้มข้นเริ่มต้นเฉลี่ย 35 ppm			
180	14.1±0.6	0.17	29.9±1.3
360	10.7±3.3	0.17	22.2±7.0
720	17.2±1.3	0.18	34.1±2.6

ตาราง 17 ศักยภาพในการบำบัดโลหะหนักในอาหารเหลวด้วยเซลล์ของเชื้อ *Cupriavidus* sp. SWU27

ระยะเวลาบ่ม (นาทีก)	การกำจัดโลหะหนัก (เปอร์เซ็นต์)	ชีวมวลแห้งของ เซลล์ (กรัม)	การกำจัดโลหะหนัก (มิลลิกรัม/กรัมชีวมวลแห้ง)
การกำจัดปรอท (Hg^{2+}) ความเข้มข้นเริ่มต้นเฉลี่ย 10.2 ppm			
1	27.5±2.9	0.12	23.3±2.5
5	27.8±3.7	0.12	24.2±3.2
15	29.1±4.0	0.12	24.7±3.4
30	39.9±7.5	0.11	36.6±6.9
60	75.5±2.9	0.11	65.8±2.6
180	34.6±1.1	0.12	30.2±1.0
360	17.3±3.0	0.13	14.0±2.4
720	21.2±0.6	0.12	18.1±0.5
การกำจัดตะกั่ว (Pb^{2+}) ความเข้มข้นเริ่มต้นเฉลี่ย 120 ppm			
1	41.1±1.4	0.22	227.5±9.5
5	61.5±0.8	0.22	340.4±4.3
15	60.6±0.5	0.18	402.8±2.0
30	60.6±4.0	0.18	402.4±27.2
60	60.9±4.0	0.18	404.4±27.4

ตาราง 17 (ต่อ)

ระยะเวลาป่ม (นาทึ)	การกำจัดโลหะหนัก (เปอร์เซ็นต์)	ชีวมวลแห้งของ เซลล์ (กรัม)	การกำจัดโลหะหนัก (มิลลิกรัม/กรัมชีวมวลแห้ง)
การกำจัดตะกั่ว (Pb^{2+}) ความเข้มข้นเริ่มต้นเฉลี่ย 120 ppm			
180	58.6±1.0	0.18	389.6±5.6
360	60.8±2.2	0.18	403.9±15.6
720	65.3±8.8	0.23	342.4±47.2
การกำจัดทองแดง (Cu^{2+}) ความเข้มข้นเริ่มต้นเฉลี่ย 35 ppm			
1	13.9±1.2	0.18	27.0±2.3
5	14.3±2.7	0.20	25.3±4.8
15	11.6±2.3	0.20	19.6±3.9
30	10.6±0.9	0.19	19.6±1.6
60	12.4±2.2	0.18	24.1±4.2
180	12.8±2.4	0.23	19.3±3.6
360	11.0±0.4	0.17	23.2±0.9
720	19.4±1.8	0.23	29.1±2.7

ตาราง 18 ศักยภาพในการบำบัดโลหะหนักในอาหารเหลือและการดูดซับโลหะหนักภายในเซลล์แบคทีเรีย

ไอโซเลท	การกำจัดโลหะหนัก (เปอร์เซ็นต์)	ชีวมวลแห้งของเซลล์ (กรัม)	การกำจัดโลหะหนัก (มิลลิกรัม/กรัมชีวมวลแห้ง)	ปริมาณการดูดซับโลหะหนักภายในเซลล์ (เปอร์เซ็นต์)	การดูดซับโลหะหนัก (มิลลิกรัม/กรัมชีวมวลแห้ง)
การกำจัดปรอท (Hg^{2+})					
SWU3	81.9±1.7	0.18	32.4±1.2	31.4±1.8	10.2±0.6
SWU24	53.8±1.6	0.13	29.2±1.6	36.7±2.3	19.9±1.6
SWU27	75.5±2.9	0.11	65.8±2.5	34.3±2.9	29.9±3.7
การกำจัดตะกั่ว (Pb^{2+})					
SWU3	94.9±0.6	0.12	313.6±0.5	73.1±3.5	243.6±12.8
SWU24	92.5±1.4	0.24	154.9±2.1	39.5±8.7	138.3±22.0
SWU27	60.9±4.0	0.18	404.4±27.4	46.0±1.3	305.7±8.7
การกำจัดทองแดง (Cu^{2+})					
SWU3	19.1±0.9	0.17	39.2±1.8	2.6±0.6	5.8±0.6
SWU24	17.2±1.3	0.18	34.1±2.6	2.2±0.2	4.6±0.4
SWU27	19.4±1.8	0.23	29.1±2.7	4.4±0.8	8.5±1.7

ผลการกำจัดโลหะหนักด้วยการใช้เซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิต ดังแสดงในตาราง 18 พบว่า ไอโซเลท SWU3 ให้ประสิทธิภาพสูงที่สุดในการบำบัด Hg^{2+} และ Pb^{2+} ได้สูงที่สุดถึง $81.9 \pm 1.7\%$ และ $94.9 \pm 0.6\%$ ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณของโลหะหนักที่หายไป จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เข้าไปสะสมภายในเซลล์หรือผนังเซลล์ของแบคทีเรีย พบว่ามีปริมาณของ Hg^{2+} ถูกดูดซับด้วยเซลล์ $31.4 \pm 1.8\%$ หรือ เซลล์สะสม Hg^{2+} ได้ 10.2 ± 0.6 mg/g cell และปริมาณ Pb^{2+} ที่ถูกดูดซับด้วยเซลล์ $73.1 \pm 3.5\%$ หรือ เซลล์สะสม Pb^{2+} ได้ 243.6 ± 12.8 mg/g cell

ไอโซเลท SWU24 สามารถบำบัด Hg^{2+} และ Pb^{2+} ได้ $53.8 \pm 1.6\%$ และ $92.5 \pm 1.4\%$ ตามลำดับ และพบประสิทธิภาพในการดูดซับ Hg^{2+} และ Pb^{2+} ได้ดีที่สุดด้วยเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิต พบว่ามีปริมาณของ Hg^{2+} ที่ถูกดูดซับด้วยเซลล์ $36.7 \pm 2.3\%$ หรือ เซลล์สะสม Hg^{2+} ได้ 19.9 ± 1.6 mg/g cell และปริมาณ Pb^{2+} ที่ถูกดูดซับด้วยเซลล์ $39.5 \pm 8.7\%$ หรือ เซลล์สะสม Pb^{2+} ได้ 138.3 ± 22.0 mg/g cell

ไอโซเลท SWU27 สามารถบำบัด Hg^{2+} และ Pb^{2+} ได้ $75.5 \pm 2.9\%$ และ $60.9 \pm 4.0\%$ ตามลำดับ และพบประสิทธิภาพในการดูดซับ Hg^{2+} และ Pb^{2+} ได้ดีที่สุดด้วยเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิต พบว่ามีปริมาณของ Hg^{2+} ที่ถูกดูดซับด้วยเซลล์ $34.3 \pm 2.9\%$ หรือ เซลล์สะสม Hg^{2+} ได้ 29.9 ± 3.7 mg/g cell และปริมาณ Pb^{2+} ที่ถูกดูดซับด้วยเซลล์ $46.0 \pm 1.3\%$ หรือ เซลล์สะสม Pb^{2+} ได้ 305.7 ± 8.7 mg/g cell

อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้การใช้เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ให้ประสิทธิภาพต่ำในการกำจัด Cu^{2+} ออกจากอาหารเหลว โดยสามารถบำบัด Cu^{2+} ได้ในช่วง $17.2 \pm 1.3 - 19.4 \pm 1.8\%$ และถูกดูดซับไว้ด้วยเซลล์เพียง $2.2 \pm 0.2 - 4.4 \pm 0.8\%$ หรือแค่เพียง $4.6 \pm 0.4 - 8.5 \pm 1.7$ mg/g cell ดังนั้นในการศึกษานี้เชื้อแบคทีเรีย *Cupriavidus* sp. SWU27 จึงเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการบำบัด Hg^{2+} และ Pb^{2+} ด้วยเซลล์ที่มีชีวิต รองลงมาคือ *Pseudomonas* sp. SWU3 และ *Bacillus* sp. SWU24

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

ตัวอย่างดินจากเหมืองดีบุกร้างจังหวัดระนองทั้งหมด 4 แห่ง มีการปนเปื้อนโลหะหนักที่ไม่เกินค่ามาตรฐานคุณภาพดินที่ใช้ประโยชน์เพื่อการอยู่อาศัยและเกษตรกรรม ตามประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 25 พ.ศ. 2547 เรื่องกำหนดมาตรฐานคุณภาพดิน (กรมควบคุมมลพิษ, 2547) อย่างไรก็ตามยังพบการปนเปื้อนปริมาณโลหะหนัก ตะกั่ว ทองแดง และปรอท ของตะกอนดินในทุก ๆ แห่ง นั้นหมายความว่าโลหะหนักยังคงตกค้างในตะกอนดินจากพื้นที่เหมืองร้างที่ทำการเก็บตัวอย่าง ซึ่งการปนเปื้อนโลหะหนักเกิดจากกิจกรรมการทำเหมืองแร่ดีบุกในอดีต ทำให้มีการสะสมโลหะหนักในตะกอนดินและปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมได้ (ธงชัย สุธีรศักดิ์ และ ไตรภพ ผ่องสุวรรณ, 2551, น. 765-779) อย่างไรก็ตามระดับความเข้มข้นของโลหะหนัก ได้แก่ ตะกั่ว ทองแดง และปรอท ในตะกอนดินบริเวณที่เก็บตัวอย่างมีปริมาณที่ไม่อยู่ในระดับที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของสัตว์หน้าดินตามธรรมชาติได้ (สุชาติ สว่างอารีย์รักษ์ และคนอื่นๆ, 2555)

จากผลการตัดแยกแบคทีเรียต้านทานโลหะหนักทั้งหมดในตะกอนดินจากเหมืองร้างจังหวัดระนอง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโลหะหนัก Pb^{2+} , Cu^{2+} และ Hg^{2+} ผสมอยู่ในระดับความเข้มข้นระหว่าง 0.5-15, 0.5-10 และ 0.1-5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารที่แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียจากตะกอนดินในตำบลบางวันทนโลหะหนัก Pb^{2+} ได้มากที่สุด ที่ความเข้มข้นของ Pb^{2+} 10 มิลลิโมลาร์ และ 15 มิลลิโมลาร์ จำนวน 14 และ 6 ไอโซเลท ทั้งยังพบว่าสามารถทน Hg^{2+} ได้สูงสุดที่ 1 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ยังพบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตใน Cu^{2+} ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ จำนวน 4, 5, 1 และ 1 ไอโซเลท จากดินตะกอนในตำบลบางวัน ตำบลหาดส้มแป้น และตำบลบางนอน ตามลำดับ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการต้านทานโลหะหนักได้จากสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีความเข้มข้นของโลหะหนักผสมอยู่ (Marzan, Hossain, Mina, Akter, & Chowdhury, 2017, p. 65-74) ซึ่งเกิดกระบวนการทางชีวภาพภายในเซลล์แบคทีเรียทำให้ความเป็นพิษของโลหะหนักลดต่ำลง (Glick, 2010, p. 367-374)

จากการศึกษาค่าความเข้มข้นของโลหะหนักที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal inhibitory concentration, MIC) โดยนำเชื้อแบคทีเรียไปทดสอบความสามารถในการทนต่อโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้นของ Pb^{2+} , Cu^{2+} และ Hg^{2+} ที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 1-15, 0.5-5 และ 0.1-2.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่ามีเพียง 13

ไอโซเลท ได้แก่ SWU3, SWU4, SWU14, SWU18, SWU22, SWU24, SWU27, SWU28, SWU40, SWU42, SWU54, SWU56 และ SWU57 ที่ทนต่อความเข้มข้นของ Pb^{2+} , Cu^{2+} และ Hg^{2+} ได้ในระดับความเข้มข้นสูง สอดคล้องกับการประเมินระดับความทนทานต่อโลหะหนัก (MIC) ของ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกได้จากท่อระบายน้ำอุตสาหกรรมในประเทศไนจีเรีย โดยทดสอบความสามารถในการทนต่อโลหะหนัก โคบอลต์ ($CoCl_2$), แคดเมียม ($CdCl_2$), ทองแดง ($CuSO_4$), ปรอท ($HgCl_2$), นิกเกิล ($NiCl_2$), โพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$), ตะกั่ว ($PbCl_2$) และสังกะสี ($ZnSO_4$) ที่ความเข้มข้น 1, 2, 5, 10, 20, 30 และ 50 มิลลิโมลาร์ พบว่าสายพันธุ์ส่วนใหญ่ถูกยับยั้งหรือไม่สามารถทนต่อโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และแบคทีเรียทนโลหะหนักที่คัดแยกได้มีความสามารถทนต่อความเข้มข้นของโลหะหนักได้ถึง 10 มิลลิโมลาร์ (Haroun, Kamaluddeen, Alhaji, Magaji, & Oaikhen, 2017, p. 1-4)

ในการศึกษานี้มีแบคทีเรีย 14 ไอโซเลท มีความสามารถในการทนโลหะหนัก ถูกนำมาจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยยีน 16S rDNA พบว่ามีความใกล้เคียงในกลุ่มจีโนม *Bacillus*, *Cupriavidus*, *Enterobacter* และ *Pseudomonas* โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการทนโลหะหนักได้สูงมีเพียง 3 ไอโซเลท และมีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียใน 3 จีโนม ได้แก่ *Pseudomonas*, *Bacillus* และ *Cupriavidus* โดยไอโซเลท SWU3 มีความใกล้เคียงกับ *Pseudomonas* sp. ไอโซเลท SWU24 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus* sp. และไอโซเลท SWU27 มีความใกล้เคียงกับ *Cupriavidus* sp. ซึ่งทุกไอโซเลทมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 100% จากการรายงานก่อนหน้านี้นี้พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมและลักษณะของแบคทีเรียเอนโดไฟต์มีความสามารถในการทนต่อโลหะหนักทองแดงที่คัดแยกจากเหมืองร้าง โดยการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อทองแดงอยู่ในกลุ่มของ *Firmicutes*, *Actinobacteria* และ *Proteobacteria* (Sun et al., 2010, p. 501-509) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่ทนโลหะหนักโดยการวิเคราะห์ยีน 16S rDNA พบเชื้อแบคทีเรีย 6 ไอโซเลท ได้แก่ JJ1, JJ2, JJ10, JJ11, JJ15 และ JJ18 จากผลการวิเคราะห์พบว่าไอโซเลท JJ1 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Pseudomonas* ไอโซเลท JJ2 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Cupriavidus* ไอโซเลท JJ11 และ JJ15 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus* และไอโซเลท JJ10 และ JJ18 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Acinetobacter* ซึ่งแบคทีเรียมีความสามารถทนต่อโลหะหนัก $Pb^{2+} > Zn^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+}$ และมีความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นของ Cd^{2+} Pb^{2+} Zn^{2+} และ Cu^{2+} ที่ระดับความเข้มข้นที่ 200 mg/l, 1600 mg/l, 600 mg/l และ 265 mg/l ตามลำดับ (Jiang, Pan, Xiao, Yang, & Zhang, 2017, p. 5) แบคทีเรียแกรมลบมีกลไกการต้านทานไอออน

ของ Hg^{2+} โดยอาศัยการขนส่ง Hg^{2+} เข้าสู่ periplasm ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและจับกับ cysteine ทำให้จับกับโปรตีน MerP ไอออนจะถูกส่งไปยังเยื่อหุ้มชั้นในและจะถูกส่งต่อไปยัง cytosol โดยวิธีการจับกับโปรตีน MerT และ MerC จากนั้นภายในชั้น cytoplasm ไอออนของ Hg^{2+} จะถูกลดความเป็นพิษลงโดยโปรตีน MerA กลายเป็น Hg^0 (Hobman & Crossman, 2014, p. 471-497) สำหรับระบบภายในเซลล์แบคทีเรียที่ต้านทานต่อ Cu^{2+} สามารถพบได้ในโครโมโซมที่เรียกว่า Cop system ประกอบด้วย CopABCDRS ซึ่งพบใน *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* PT23 เป็นไอโซเลทที่แยกจากพืชที่สัมผัสกับ Cu^{2+} ในระดับสูง และ *Cupriavidus metallidurans* CH34 ที่แยกได้จากตะกอนของแอ่งสังกะสีในเบลเยียม นอกจากนี้ยังพบใน *Xanthomonas axonopodis* pv. *Vesicatoria* E3C5 และ *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Monchy, 2006; Staehlin, Gibbons, Rokas, O'Halloran, & Slot, 2016; Zimmermann, 2012) และยังพบยีน *PbrA* ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านทานโลหะหนัก Pb^{2+} ในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (Adekanmbi, Adelowo, Okoh, & Fagade, 2019, p. 266-273)

ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักในการศึกษานี้โดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีเบื้องต้น พบว่าส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-Negative) และมีรูปร่างท่อน (Rod) ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Pseudomonas*, *Enterobacter* และ *Cupriavidus* สำหรับแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-Positive) และมีรูปร่างท่อน (Rod) ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* สอดคล้องกับการศึกษาความทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนัก มีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ (Lima de Silva et al., 2012, p. 1620-1631) ดังนั้นการศึกษานี้และงานวิจัยอื่นแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบสามารถทนและกำจัดโลหะหนักได้ สอดคล้องกับการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ *Bacillus* ซึ่งมีความสามารถเจริญเติบโตได้ดีในโลหะหนัก Cd^{2+} , Hg^{2+} และ Cu^{2+} (Srikakolapu, 2014, p. 315-318) นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ZGKDZ ที่สามารถผลิตสาร siderophore และทนต่อโลหะหนักได้ (Zhang et al., 2012, p. 33) และยังพบเชื้อ *Cupriavidus metallidurans* ที่สามารถเจริญเติบโตในที่ที่มีความเข้มข้นของโลหะหนักสูงและมีความสามารถในการดูดซับโลหะหนักได้ค่อนข้างสูงในสภาวะใช้อากาศ แบคทีเรียกลุ่มนี้อาจมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการบำบัดโลหะหนักในน้ำและดินได้ (Zhao et al., 2012, p. 274-286)

ผลการศึกษาคือความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียกับความเข้มข้นโลหะหนัก พบว่าแบคทีเรียมีความสามารถทนต่อโลหะหนักทั้ง 3 ไอโซเลท คือ SWU3, SWU24 และ SWU27 สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีโลหะหนักในสภาวะที่มีความเข้มข้นสูง โดยไอโซเลท SWU3, SWU24 และ SWU27 เจริญเติบโตได้ในอาหารที่ผสม Hg^{2+} ในระดับความเข้มข้น 0.05 ppm, 0.1 ppm และ 10 ppm และยังสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่ผสม Pb^{2+} ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm, 150 ppm, และ 300 ppm และเจริญเติบโตได้ในอาหารที่ผสม Cu^{2+} ในระดับความเข้มข้น 15 ppm, 150 ppm และ 300 ppm โดยอัตราการเจริญเติบโตจะแตกต่างกันตามภาพประกอบที่ 3-5 จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักมีความสามารถในการเจริญเติบโตในสภาวะที่มีโลหะหนักผสมอยู่ แต่แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตในโลหะหนัก Hg^{2+} ได้ในระดับความเข้มข้น 0-10 ppm เท่านั้น แตกต่างจาก Pb^{2+} และ Cu^{2+} ที่สามารถเจริญได้ในความเข้มข้น 15-300 ppm ความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อในโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันเนื่องจากโลหะหนักแต่ละชนิดมีระดับความเป็นพิษที่ต่างกัน สอดคล้องกับการศึกษาการทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียแกรมลบ จากตัวอย่างดินและน้ำจาก Kongsfjord อาร์กติก โดยทดสอบในอาหารแข็งและวิธีการเจือจางในหลอดทดลองที่มีความเข้มข้นของโลหะหนักผสมอยู่ พบว่าแบคทีเรียทนต่อโลหะหนักแต่ละชนิดได้ไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับระดับความเป็นพิษ โดยเรียงระดับความเป็นพิษของโลหะหนักได้ดังนี้ $Hg^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Pb^{2+} > Se^{2+}$ (Sainjan, Rahiman, Saramma, & Abdulla, 2015, p. 429-435) แต่โดยทั่วไปความเป็นพิษของโลหะหนักสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยการทำลายโครงสร้างของโปรตีนและขัดขวางหรือทำลายการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ (Ayangbenro & Babalola, 2017, p. 94) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาความทนทานต่อโลหะหนักและยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียจากน้ำเสียโรงงานฟอกหนังใน รัฐ Chennai ประเทศอินเดีย พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แตกต่างกันจะทนต่อโลหะหนักโดยใช้กลไกที่ต่างกัน โดยพบว่าสายพันธุ์ *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* และ *Alcaligenes* sp. สามารถเจริญเติบโตใน Pb^{2+} (50-90%), Cu^{2+} (30-85%), Zn^{2+} (50-80%), Cr^{2+} (30-70%) และ Hg^{2+} (30-80%) ตามลำดับ (Tamil Selvi et al., 2012, p. 34-41)

จากการศึกษาศักยภาพในการบำบัดโลหะหนักและการดูดซับโลหะหนักของแบคทีเรียที่ทนโลหะหนัก โดยศึกษาในรูปของเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิต พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ SWU3, SWU24 และ SWU27 ให้ประสิทธิภาพในการบำบัดและดูดซับปริมาณโลหะหนักแต่ละชนิดที่ต่างกัน โดยแบคทีเรีย *Cupriavidus* sp. SWU27 ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการ

บำบัด Hg^{2+} และ Pb^{2+} ด้วยเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งสามารถบำบัด Hg^{2+} และ Pb^{2+} ได้ $75.5 \pm 2.9\%$ และ $60.9 \pm 4.0\%$ ตามลำดับ และประสิทธิภาพการดูดซับ Hg^{2+} และ Pb^{2+} ได้ดีที่สุดที่ $34.3 \pm 2.9\%$ และ $46.0 \pm 1.3\%$ ตามลำดับ ผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาประสิทธิภาพในการทนและสะสมโลหะหนัก Cd^{2+} , Cu^{2+} และ Zn^{2+} ของเชื้อ *Cupriavidus necator* พบว่าสายพันธุ์ UFLA01-659 มีความสามารถในการทนต่อโลหะหนักได้สูง โดยทนต่อโลหะหนัก Cd^{2+} , Cu^{2+} และ Zn^{2+} ที่ระดับความเข้มข้น 5.0, 4.5 และ 14.66 mmol/l ตามลำดับ และสามารถกำจัดโลหะหนัก Cd^{2+} , Cu^{2+} และ Zn^{2+} ได้ถึง 9.0, 4.6 และ 3.2 mg/l ตามลำดับ การที่สายพันธุ์ UFLA01-659 ประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนักได้สูงเกี่ยวข้องกับการผลิตเซลล์ชีวมวลและมีการผลิตสาร exopolysaccharides จึงสามารถดูดซับโลหะหนักได้ดี อย่างไรก็ตามสายพันธุ์นี้ยังสามารถดูดซับโลหะหนักไว้ที่ผนังเซลล์และเมมเบรน ซึ่งเป็นกลไกที่ซับซ้อนภายในเซลล์ในการดูดซับโลหะทองแดงและสังกะสี (Vicentin et al., 2018, p. 42) สอดคล้องกับการศึกษาความเป็นพิษของสารประกอบทองแดงและทองคำใน *Cupriavidus metallidurans* พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถลดความเป็นพิษของทองแดงได้ ด้วยกลไกการทำงานของโปรตีน CopA system ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย (Wiesemann et al., 2017, p. 01679-01617) จากการศึกษาการกำจัดทองแดงและสังกะสีโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Cupriavidus putida* CZ1 พบว่าสามารถกำจัดทองแดงและสังกะสีได้ถึง 87.2% และ 99.8% ตามลำดับ และยังพบการดูดซับทองแดงและสังกะสีได้ถึง 24.4 และ 26.0 mg/l ตามลำดับ (Chen et al., 2006, p. 308-316) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนักของเชื้อ *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. พบว่า *Bacillus* sp. กำจัดโลหะหนักในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยกำจัด Cu^{2+} และ Pb^{2+} ได้ถึง 84.0% และ 99.5% ตามลำดับ ในส่วนของ *Pseudomonas* sp. สามารถกำจัด Cu^{2+} และ Pb^{2+} ได้ถึง 70.4% และ 97.8% ตามลำดับ (Tawfik, 2015) จากผลการศึกษาและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. และ *Cupriavidus* sp. มีประสิทธิภาพในการกำจัดและดูดซับโลหะหนักได้

บรรณานุกรม

- Adekanmbi, A. O., Adelowo, O. O., Okoh, A. I., & Fagade, O. E. (2019). *Metal-resistance encoding gene-fingerprints in some bacteria isolated from wastewaters of selected printerries in Ibadan, South-western Nigeria*: Journal of Taibah University for Science.
- Assi, M. A., Hezmee, M. N., Haron, A. W., Sabri, M. Y., & Rajion, M. A. (2016). *The detrimental effects of lead on human and animal health*: Vet World.
- Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. (2017). *A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents*: International journal of environmental research and public health.
- Chatziefthimiou, A. D., Melitza, C.-M., Wang, Y., Vetrani, C., & Barkay, T. (2007). *The isolation and initial characterization of mercury resistant chemolithotrophic thermophilic bacteria from mercury rich geothermal springs*: Extremophiles.
- Chen, X., Shi, J., Chen, Y., Xu, X., Xu, S., & Wang, Y. (2006). *Tolerance and biosorption of copper and zinc by Pseudomonas putida CZ1 isolated from metal-polluted soil*: Canadian Journal of Microbiology.
- Edward Raja, C., Selvam, G. S., & Kiyoshi, O. (2009). *Isolation, Identification and Charaterization of Heavy Metal Resistant Bacteria form Sewage*: International Joint Symposium on Geodisaster Prevention and Geoenvironment in Asia.
- Fashola, M. O., Ngole-Jeme, V. M., & Babalola, O. O. (2016). *Heavy Metal Pollution from Gold Mines: Environmental Effects and Bacterial Strategies for Resistance*: International journal of environmental research and public health.
- Gadd, G. M. (2000). *Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization*: Current Opinion in Biotechnology.
- Glick, B. R. (2010). *Using soil bacteria to facillitate phytoremediation*: Biotechnology Advances.
- Haroun, A., Kamaluddeen, K., Alhaji, L., Magaji, Y., & Oaikhena, E. (2017). *Evaluation of Heavy Metal Tolerance Level (MIC) and Bioremediation Potentials of Pseudomonas*

- aeruginosa* Isolated from Makera-Kakuri Industrial Drain in Kaduna, Nigeria: European Journal of Experimental Biology.
- Hobman, J. L., & Crossman, L. C. (2014). *Bacterial antimicrobial metal ion resistance*: Journal of Medical Microbiology.
- Ianieva, O. (2009). *Mechanisms of bacteria resistance to heavy metals*: Mikrobiologichnyi Zhurnal.
- Irawati, W., Patricia, S., Yenny, B., & Abyatar, H. (2012). *A Study on Mercury-Resistant Bacteria Isolated from a Gold Mine in Pongkor Village, Bogor, Indonesia*: HAYATI Journal of Biosciences.
- Isha, V., & Ajay S., K. (2016). *Heavy metal removal through bacterial biomass isolated from various contaminated sites*: International Journal of Environmental Sciences.
- Jared A., D., Chih-Chia, S., & Edward W., Y. (2015). *Heavy metal transport by the CusCFBA efflux system*: Protein Society.
- Jiang, J., Pan, C., Xiao, A., Yang, X., & Zhang, G. (2017). *Isolation, identification, and environmental adaptability of heavy-metal-resistant bacteria from ramie rhizosphere soil around mine refinery*: Springer Berlin Heidelberg.
- Jin, Y., Luan, Y., Ning, Y., & Wang, L. (2018). *Effects and Mechanisms of Microbial Remediation of Heavy Metals in Soil: A Critical Review*: Applied Sciences.
- Kang, C.-H., & So, J.-S. (2016). *Heavy metal and antibiotic resistance of ureolytic bacteria and their immobilization of heavy metals*: Ecological Engineering.
- Khosro, I., Nadiya, J., Fataneh, P., Golnaz, R., & Jamileh, F. (2013). *Heavy metals resistance by bacterial strains*: Scholars Research Library.
- Lane, D. J. (1991). *16S/23S rRNA Sequencing*. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds., *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*, John Wiley and Sons.
- Lima de Silva, A. A., de Carvalho, M. A. R., de Souza, S. A. L., Dias, P. M. T., da Silva Filho, R. G., de Meirelles Saramago, C. S., . . . Hofer, E. (2012). *Heavy metal tolerance (Cr, Ag AND Hg) in bacteria isolated from sewage*: Brazilian Journal of Microbiology.

- Madzin, Z., Shai-in, M. F., & Kusin, F. M. (2015). *Comparing Heavy Metal Mobility in Active and Abandoned Mining Sites at Bestari Jaya, Selangor*: Procedia Environmental Sciences.
- Manto, M. (2014). *Abnormal Copper Homeostasis: Mechanisms and Roles in Neurodegeneration: Toxics*.
- Marzan, L. W., Hossain, M., Mina, S. A., Akter, Y., & Chowdhury, A. M. M. A. (2017). *Isolation and biochemical characterization of heavy-metal resistant bacteria from tannery effluent in Chittagong city, Bangladesh: Bioremediation viewpoint*: The Egyptian Journal of Aquatic Research.
- Monchy, S., et al. (2006). *Transcriptomic and proteomic analyses of the pMOL30-encoded copper resistance in Cupriavidus metallidurans strain CH34*.
- Muibat, O. F., Veronica, M. N.-J., & Olubukola, O. B. (2016). *Heavy Metal Pollution from Gold Mines: Environmental Effects and Bacterial Strategies for Resistance*: International Journal of Environmental Research and Public Health.
- Pranisha, P., Muhammad, A. A., & Wan, S. A. (2016). *Microbial Stress Response to Heavy Metal in the Environment*: RSC Advances.
- Ramachandra, T. V., Sudarshan, P. B., Mahesh, M. K., & Vinay, S. (2018). *Spatial patterns of heavy metal accumulation in sediments and macrophytes of Bellandur wetland, Bangalore* Journal of Environmental Management.
- Saad A., M., Bahgat M., R., Gamal M., E.-S., Mohamed H., E.-S., Islam A., E., & Mohamed H., K. (2015). *Characterization of heavy metal and antibiotic-resistant bacteria isolated from polluted localities in Egypt*: Egyptian Pharmaceutical Journal.
- Sainjan, N., Rahiman, M., Saramma, A. V., & Abdulla, M. H. (2015). *Heavy Metal Resistance in Gram negative Bacteria Isolated from Kongsfjord, Arctic*. Canadian Journal of Microbiology.
- Shamshuddin, J., Othman, R., Karam, D., Abd, S. M., & Ariffin, M. R. (2016). *Bauxite Mining in Pengerang*.
- Sobolev, D., & Begonia, M. F. T. (2008). *Effects of heavy metal contamination upon soil microbes: lead-induced changes in general and denitrifying microbial communities*

as evidenced by molecular markers: International journal of environmental research and public health.

- Soraia, E. B., Mohamed, B., Mustapha, B., Lahcen, H., Abdelhay, E. G., & Boujamaa, I. (2015). *Resistance to and Accumulation of Heavy Metals by Actinobacteria Isolated from Abandoned Mining Areas*: Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal.
- Srikakolapu, M. C. S. (2014). *Heavy metal tolerance of Bacillus spp*: Progressive Research 8 (Special).
- Staeclin, B., Gibbons, J., Rokas, A., O'Halloran, T., & Slot, J. (2016). *Evolution of a Heavy Metal Homeostasis/Resistance Island Reflects Increasing Copper Stress in Enterobacteria*: Genome Biology and Evolution.
- Sun, L.-N., Zhang, Y.-F., He, L.-Y., Chen, Z.-J., Wang, Q.-Y., Qian, M., & Sheng, X.-F. (2010). *Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland*: Bioresource Technology.
- Tamil Selvi, A., Anjugam, E., Archana Devi, R., Madhan, B., Kannappan, S., & Chandrasekaran, B. (2012). *Isolation and Characterization of Bacteria from Tannery Effluent Treatment Plant and Their Tolerance to Heavy Metals and Antibiotics*: Society of Applied Sciences.
- Tarangni, K. (2009). *Biosorption of Heavy Metals using Individual and Mixed cultures of Pseudomonas aeruginosa and Bacillus subtilis*: Department of Chemical Engineering National Institute of Technology.
- Tawfik, A. (2015). *Removal of heavy metals using bacterial bio-flocculants of Bacillus sp. and Pseudomonas sp*: Journal of Environmental Engineering and Landscape Management
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). *Heavy metal toxicity and the environment*: NIH Public Access.
- Tunali, A. S., Cabuk, A., & Akar, T. (2006). *Removal of Lead and Copper Ions from Aqueous Solutions by Bacterial Strain Isolated from Soil*: Chemical Engineering Journal.

- Vicentin, R., Santos, J., Regina Gontijo Labory, C., Monique da Costa, A., Moreira, F., & Alves, E. (2018). *Tolerance to and Accumulation of Cadmium, Copper, and Zinc by Cupriavidus necator*: Revista Brasileira de Ciencia do Solo.
- Wagner-Dobler, I. (2003). *Pilot plant for bioremediation of mercury-containing industrial wastewater*: Applied Microbiology and Biotechnology.
- WHO Regional Office for Europe. (2016). *Risks from mercury for human health and the environment*. Retrived from http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0018/334701/Risks-mercury-HHE-report-Armenia.pdf
- Wiesemann, N., Bütof, L., Herzberg, M., Hause, G., Berthold, L., Etschmann, B., Nies, D. H. (2017). *Synergistic Toxicity of Copper and Gold Compounds in Cupriavidus metallidurans*: Applied and Environmental Microbiology.
- Wuana, R. A., & Okieimen, F. E. (2011). *Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation*: ISRN Ecology.
- Yan, X., Liu, M., Zhong, J., Guo, J., & Wu, W. (2018). *How Human Activities Affect Heavy Metal Contamination of Soil and Sediment in a Long-Term Reclaimed Area of the Liaohe River Delta, North China*. Sustainability.
- Zhang, Y., Wang, J., Chai, T., Zhang, Q., Liu, J., Li, X., Su, Z. (2012). *Mechanism of heavy-metal tolerance in Pseudomonas aeruginosa ZGKD2*: Indexed for Medline.
- Zhao, X.-Q., Wang, R.-C., Lu, X., Lu, J.-J., Li, J., & Hu, H. (2012). *Tolerance and Biosorption of Heavy Metals by Cupriavidus metallidurans strain XXKD-1 Isolated from a Subsurface Laneway in the Qixiashan Pb-Zn Sulfide Minery in Eastern China*: Geomicrobiology.
- Zimmermann, M., et al. (2012). *PcoE - A metal sponge expressed to the periplasm of copper resistance Escherichia coli. Implication of its function role in copper resistance*: Journal of Inorganic Biochemistry.
- กรมควบคุมมลพิษ. (2541). ปรอท. สืบค้นจาก <http://infofile.pcd.go.th/haz/44-Mercury.pdf?CFID=1657758&CFTOKEN=52564605>

- กรมควบคุมมลพิษ. (2547). กำหนดมาตรฐานคุณภาพดิน (ประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 25).
- กรมทรัพยากรธรณี. (2559). คุณภาพการวิเคราะห์แร่ทองแดง (รายงานวิชาการฉบับที่ กวท 2).
- กษิทธิษ จูงพันธ์ และคนอื่น ๆ. (2558). การหาพื้นที่เสี่ยงจากโลหะหนักต่อน้ำบาดาลจากกิจกรรมเหมืองแร่ ด้วยระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์. การประชุมวิชาการนิสิตนักศึกษาภูมิศาสตร์และภูมิสารสนเทศศาสตร์แห่งประเทศไทย.
- จรรยา สารินทร์. (2551). การบำบัดน้ำทิ้งที่มีโลหะหนักปนเปื้อนโดยใช้ระบบบำบัดน้ำเสียจำลองแบบ *Immobilized cell reactor*. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- จิรวัดณ์ ขวัญแก้ว. (2549). การปนเปื้อนของปรอทในดินรอบทะเลสาบสงขลา. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ตะกั่ว (Lead : Pb) ประโยชน์ และพิษตะกั่ว. (2561). สืบค้นจาก <https://www.siamchemi.com/%E0%B8%95%E0%B8%B0%E0%B8%81%E0%B8%B1%E0%B9%88%E0%B8%A7/>
- ธงชัย สุธีรศักดิ์ และ ไตรภพ ผ่องสุวรรณ. (2551). การปนเปื้อนของโลหะหนัก *Al As Cu Cr Mn Ni Pb Sn Zn* และ *Fe* ในดินตะกอนที่องน้ำคลองบางใหญ่ จังหวัดภูเก็ต. กรุงเทพฯ ฯ: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- ธวัชชัย ธานี เพ็ญแข ธรรมเสมานุภาพ และ อรุณรัตน์ ธีวราช. (2560). การสะสมโลหะหนักในน้ำ ดิน ตะกอน และปลาในลำน้ำมูล. ขอนแก่น: วรสารการจัดการสิ่งแวดล้อม.
- วรชาติ วิศวะพัฒน์. (2555). เทคโนโลยีการบำบัดดินปนเปื้อนโลหะหนักด้วยวัสดุฟอสเฟต. ขอนแก่น: แก่นเกษตร.
- วาสนา นามบาง และ วิจิตรา เมตตา. (2557). การแพร่กระจายโลหะหนักในพื้นที่น้ำขำวรอบบ่อฝังกลบขยะชุมชน. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- ศูนย์ข้อมูลพิษวิทยา. (2561). อันตรายจากปรอท. สืบค้นจาก http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_toxic/a_tx_1_001c.asp?info_id=79
- สาโรจน์ เริ่มดำรง สาวิตรี แก้วเรียส และ เกริก วงศ์สอนธรรม. (2552). การปนเปื้อนของโลหะหนักในน้ำและตะกอนดินบริเวณชายฝั่งทะเลของอ่าวไทยตอนบน. กรุงเทพฯ: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สิทธิชัย อินทร์ปนาม. (2558). รูปของโลหะหนักตามความเข้มข้นของโลหะหนักในดินที่สกัดด้วยวิธี *sequential extraction*. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร.

สุชาติ สว่างอารีรักษ์ และคนอื่นๆ. (2555). ผลกระทบของมหาอุทกภัยต่อทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งบริเวณอ่าวไทยตอนบน (การประชุมวิชาการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ครั้งที่ 4).

สุนทรี ชุนทอง และ สุนันท์ กิจจาวรวัฒนกุล. (2551). การศึกษาธาตุอาหารและโลหะหนักในตะกอนดินป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี. กรุงเทพฯ: สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ.

อรวรรณ กิจจาปัญญา. (2547). การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก. ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ.





ภาคผนวก



การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ทนโลหะหนัก

1. Tryptic soy agar (TSA)

Pancreatic digest of casein	15	กรัม
Enzymatic digest of soybean meal	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7 นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

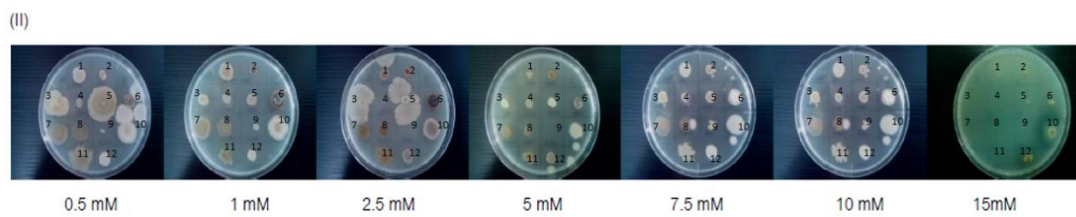
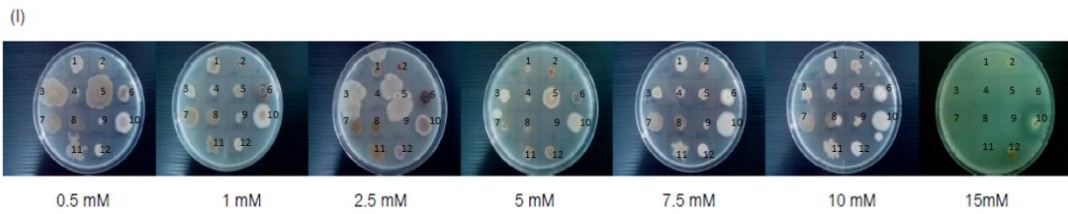
2. Tryptic soy broth (TSB)

Tryptone	17	กรัม
Soytone	3	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Dipotassium phosphate	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

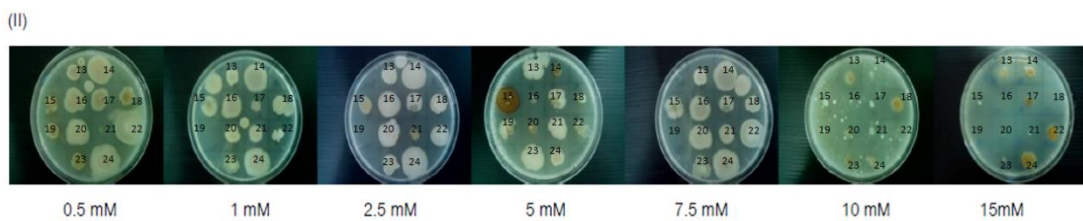
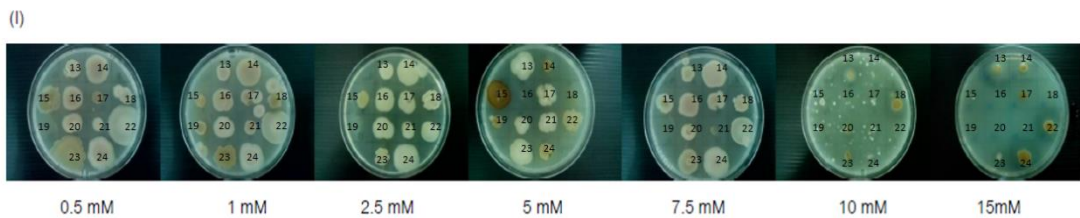
ปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7 นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



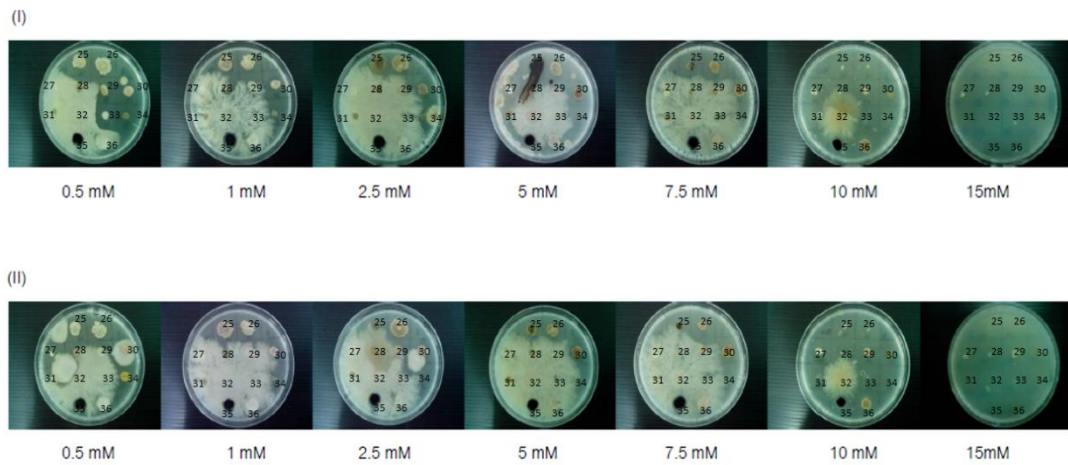
ภาพประกอบการแยกเชื้อจุลินทรีย์ด้านทานโลหะหนักจากเหมืองแร่ในจังหวัดระนอง



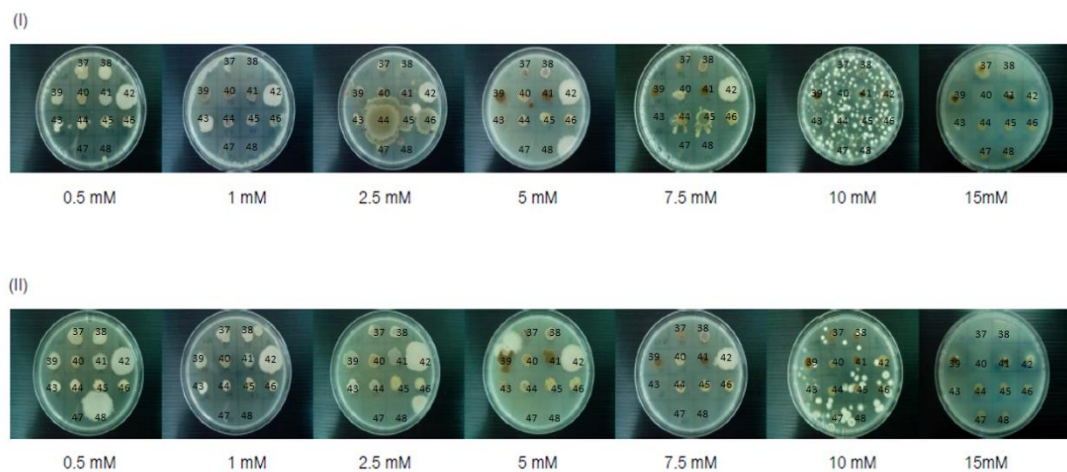
ภาพประกอบ 6 การต้านทาน Pb^{2+} ($Pb(NO_3)_2$) ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันของไอโซเลท SWU1-SWU12



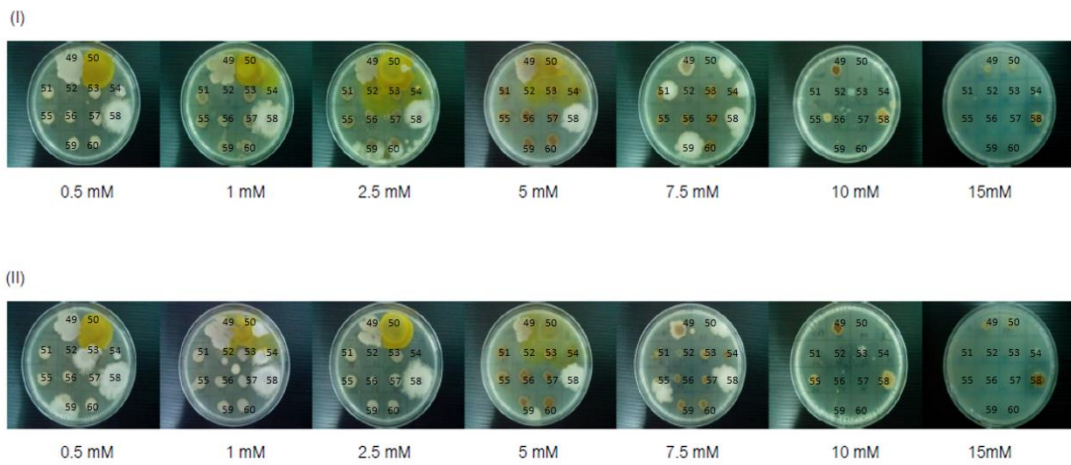
ภาพประกอบ 7 การต้านทาน Pb^{2+} ($Pb(NO_3)_2$) ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันของไอโซเลท SWU13-SWU24



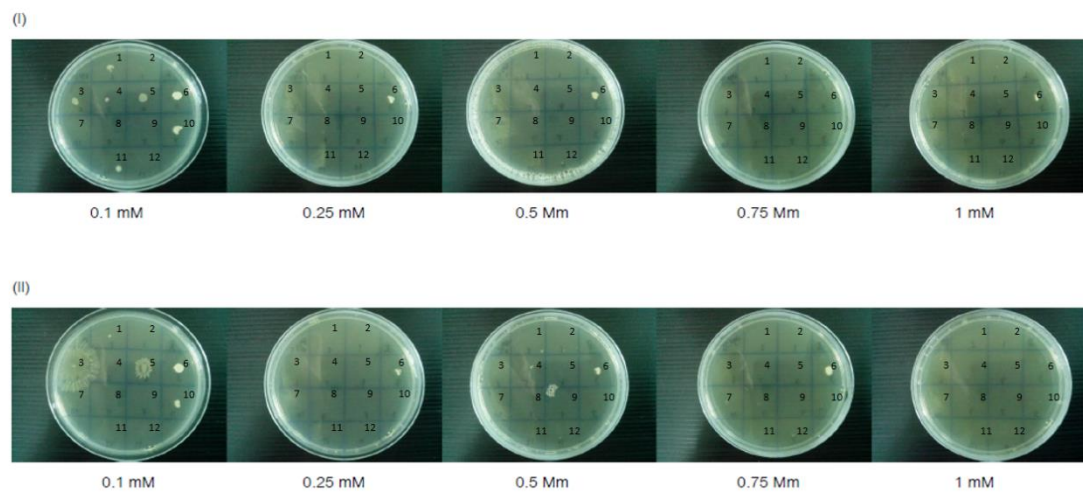
ภาพประกอบ 8 การต้านทาน Pb^{2+} ($Pb(NO_3)_2$) ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันของไอโซเลท SWU25-SWU36



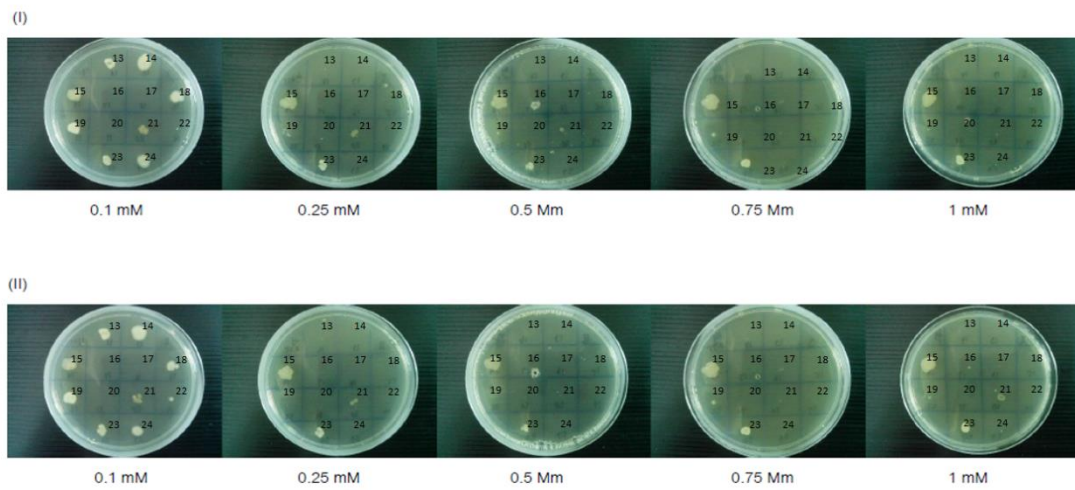
ภาพประกอบ 9 การต้านทาน Pb^{2+} ($Pb(NO_3)_2$) ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันของไอโซเลท SWU37-SWU48



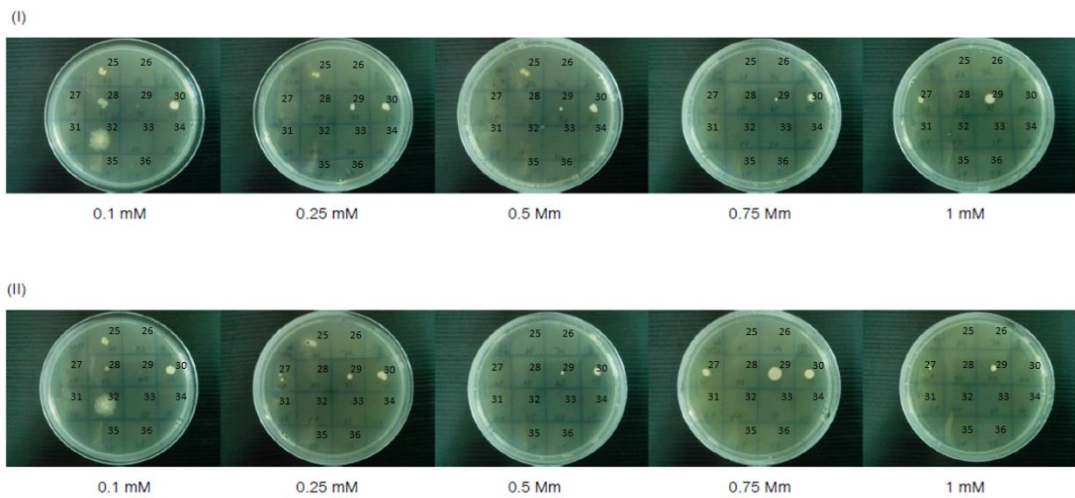
ภาพประกอบ 10 การต้านทาน Pb^{2+} ($Pb(NO_3)_2$) ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันของไอโซเลต
SWU49-SWU60



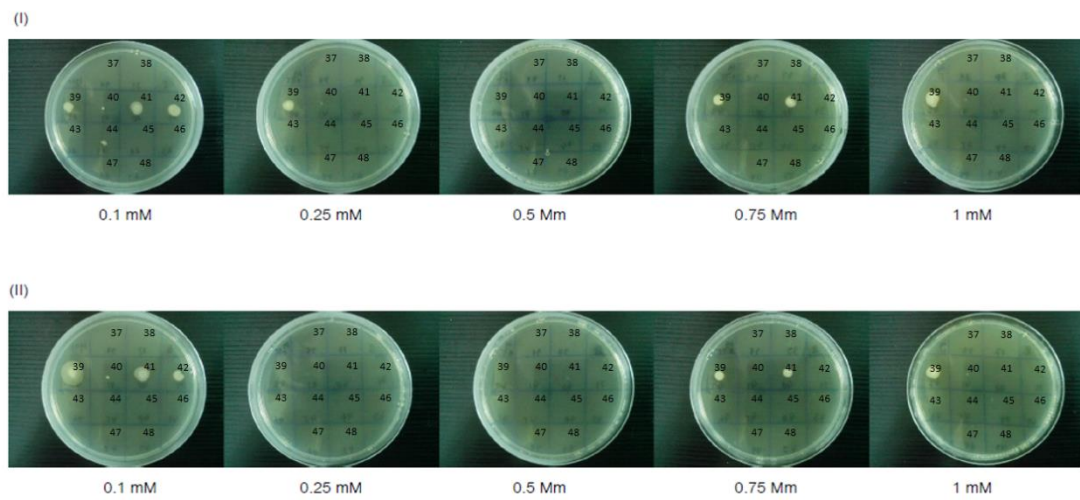
ภาพประกอบ 11 การต้านทาน Hg^{2+} ($HgCl_2$) ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน SWU1-SWU12



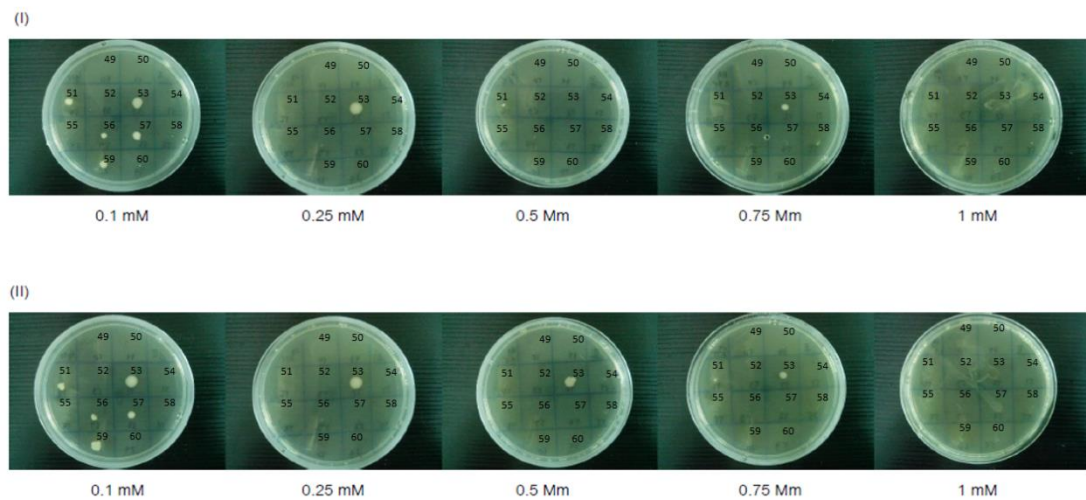
ภาพประกอบ 12 การต้านทาน Hg^{2+} ($HgCl_2$) ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน SWU13-SWU24



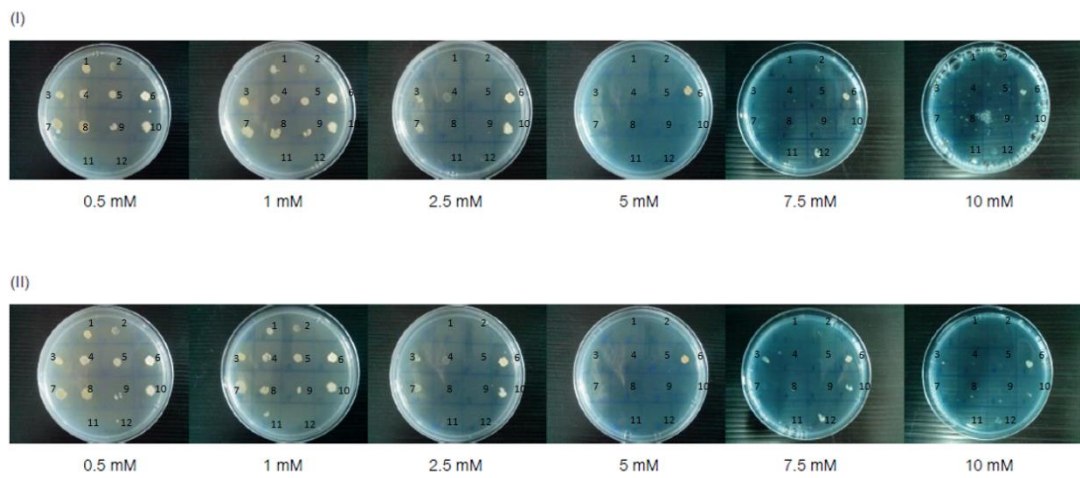
ภาพประกอบ 13 การต้านทาน Hg^{2+} ($HgCl_2$) ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน SWU25-SWU36



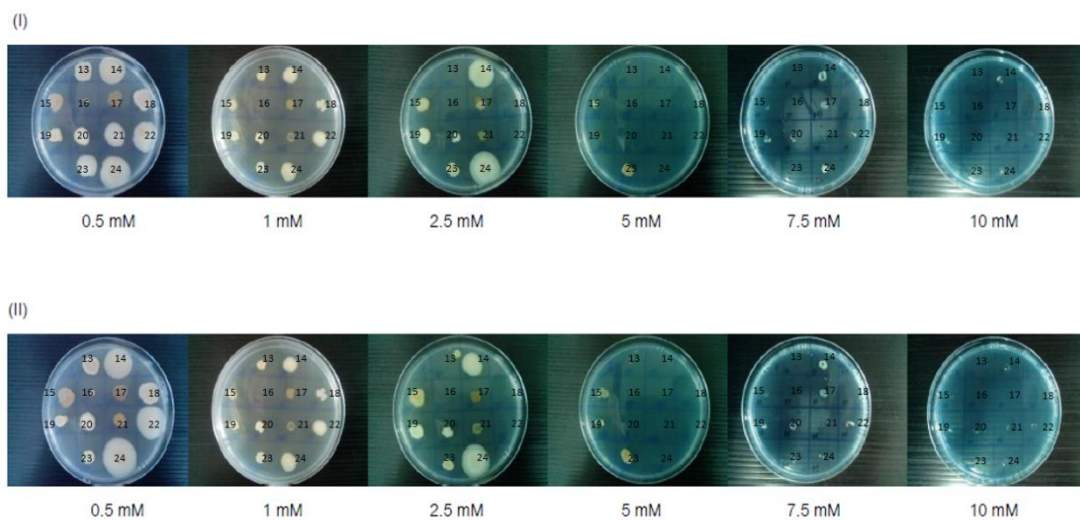
ภาพประกอบ 14 การต้านทาน Hg^{2+} ($HgCl_2$) ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน SWU37-SWU48



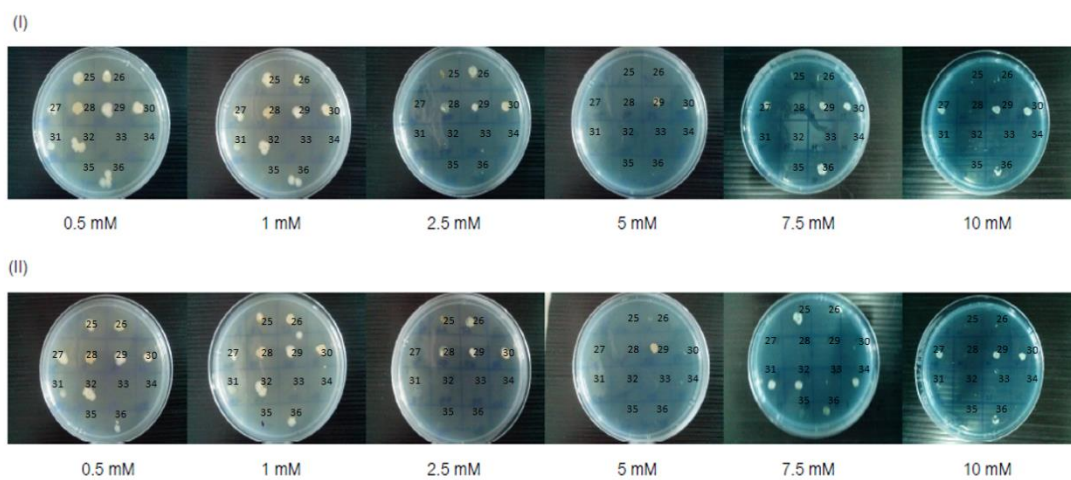
ภาพประกอบ 15 การต้านทาน Hg^{2+} ($HgCl_2$) ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน SWU49-SWU60



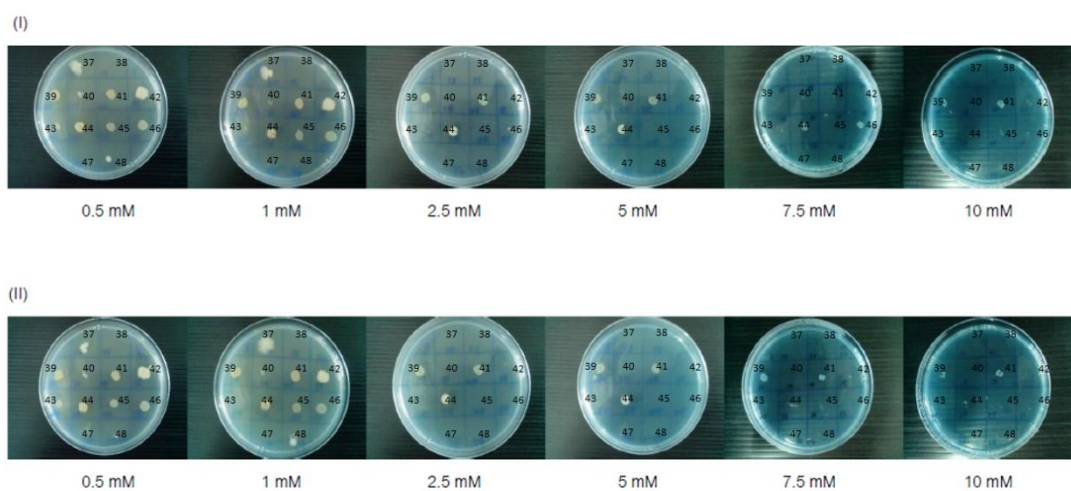
ภาพประกอบ 16 การต้านทาน Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ
ไอโซเลท SWU1-SWU12



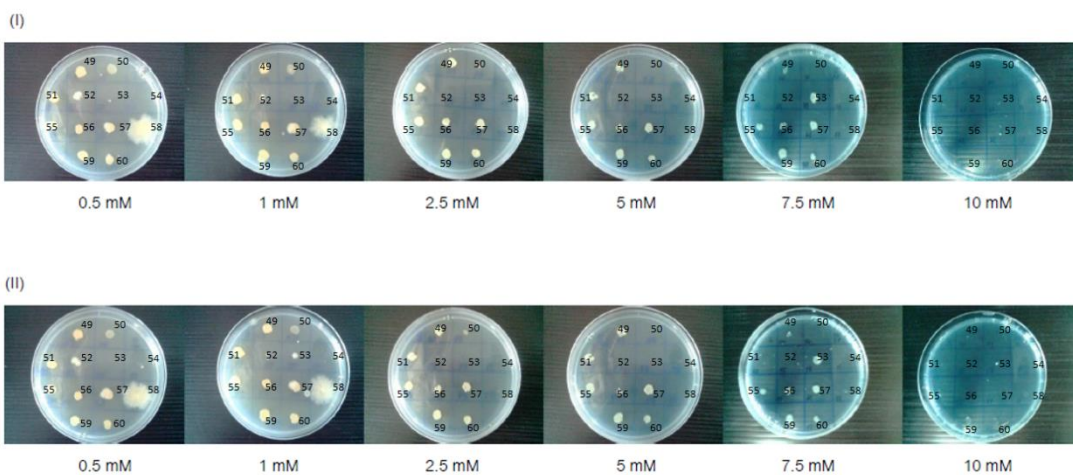
ภาพประกอบ 17 การต้านทาน Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ
ไอโซเลท SWU13-SWU24



ภาพประกอบ 18 การต้านทาน Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ
ไอโซเลท SWU25-SWU36



ภาพประกอบ 19 การต้านทาน Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ
ไอโซเลท SWU37-SWU48



ภาพประกอบ 20 การต้านทาน Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ
ไอโซเลต SWU49-SWU60

ภาพประกอบผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียด้านทานโลหะหนัก



ภาพประกอบ 21 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ Api 20NE



ภาพประกอบ 21 (ต่อ) การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ Api 20NE



