การประยุกต์ใช้คุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะในการตรวจสอบผลกระทบของการปนเปื้อนโลหะหนักต่อความหลากหลายของจุลินทรีย์จากน้ำทิ้งชุมชนและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Application of Antibiotic Resistance to Monitoring the Heavy Metals Contamination Impacts to Microbial Diversity from Domestic and Aquaculture Wastewaters

ลัดดาวรรณ จันทโหม

Laddawan Chantahom

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยทักษิณ

2549

Presented in partial fulfillment of the requirements for the Master of Science degree in Biology at Thaksin University

2006

ISBN 974 - 451 – 749 – 8

ใบรับรองวิทยานิพนธ์
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยทักษิณ

ชื่อวิทยานิพนธ์: การประยุกต์ใช้คุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะในการตรวจสอบผลกระทบของการปนเปื้อนโลหะหนักต่อความหลากหลายของจุลินทรีย์จากน้ำทิ้งชุมชนและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ชื่อ-ชื่อสกุลผู้ทำวิทยานิพนธ์: นางสาวลัดดาวรรณ จันทโหม

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล อินทระสังขา)

.... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หิริหัทยา เพชรมั่ง)

.... กรรมการ
(อาจารย์นพดล ศุกระกาญจน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล อินทระสังขา)

.... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หิริหัทยา เพชรมั่ง)

.... กรรมการ
(อาจารย์นพดล ศุกระกาญจน์)

.... กรรมการเพิ่มเติม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุดสาคร พุกงาม)

.... กรรมการเพิ่มเติม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แจ่มจันทร์ เพชรศิริ)

มหาวิทยาลัยทักษิณอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยทักษิณ

…………………………………………………..
(รองศาสตราจารย์ประดิษฐ์ มีสุข)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
สำเร็จการศึกษา เมื่อวันที่ .... เดือน .... พ.ศ 2549

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยทักษิณ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการปนเปื้อนของโลหะหนักโดยใช้คุณสมบัติการต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ทางเคมี โดยเก็บตัวอย่างน้ำจาก 4 แหล่ง คือ แหล่งชุมชน โรงพยาบาล การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และขุมเหมืองแร่ดีบุก ในช่วงเดือนกันยายน 2548 และเดือนเมษายน 2549 โดยทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก และศึกษาแนวทางเบื้องต้นในการบำบัดโลหะหนักของแบคทีเรียที่แยกได้ ผลการวิจัยพบว่าจากจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 652 ไอโซเลต สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Streptomycin, Kanamycin และโลหะหนักเหล็ก สังกะสี และทองแดงสูงอยู่ในช่วงร้อยละ 8.2-100 และต้านทานยาปฏิชีวนะ Tetracycline, Chloramphenicol และโลหะหนักปรอทอยู่ในช่วงร้อยละ 0-99 ลักษณะการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักมีความสัมพันธ์ในแหล่งที่มีโอกาสปนเปื้อนมลพิษสูง เช่น แหล่งชุมชน และโรงพยาบาล กล่าวคือ แหล่งที่มีโลหะหนักสูงจะพบการต้านทานยาปฏิชีวนะสูงเช่นกัน สอดคล้องกับข้อมูลการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักโดยวิธี Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) นอกจากนี้พบการต้านทานยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิด อยู่ในช่วงร้อยละ 1-75.5 และโลหะหนักอยู่ในช่วงร้อยละ 1-98 จากการทดสอบความสัมพันธ์ของการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก พบว่าร้อยละของการต้านทานต่อ Streptomycinกับสังกะสี Streptomycin กับทองแดง Tetracyclineกับปรอท Chloramphenicolกับสังกะสี และ Chloramphenicolกับทองแดง มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และพบว่าแบคทีเรียจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนโลหะหนักสามารถบำบัดทองแดงได้ดีร้อยละ 29.1- 72.7 เหล็ก และสังกะสี ร้อยละ 0-25.8 และสามารถใช้เป็นแนวทางเบื้องต้นในการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการบำบัดโลหะหนักได้

Abstract

The objective of the study aims to isolate various bacteria to use as an indicator for the contamination of heavy metals by using antibiotic resistance characteristics in conjunction with the chemical analysis method and its application for the bioremediation of heavy metals in various contaminated areas. Water samples were collected from 4 sites of domestic wastewater, hospital wastewater, aquaculture and old tin mine during September 2005 and April 2006. Among 652 bacterial isolated from domestic wastewater, hospital wastewater, aquaculture ponds and old tin mine, they were found high resistance of Streptomycin, Kanamycin, Fe, Zn and Cu (8.2-100%), but low resistance of Tetracycline, Chloramphenicol and Hg (0-75.5%). The high antibiotics resistance (domestic and hospital wastewaters) was found in a positive relationship with the heavy metals contamination when analysed by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry method (ICP-OES). It was also found the multiple resistances were found in antibiotics ranged 1-75.5% and heavy metals ranged from 1-98%. The percentage of antibiotic resistance were significantly correlated with metals resistance, namely Streptomycin and Zn, Streptomycin and Cu, Tetracycline and Hg, Chloramphenicol and Zn, and Chloramphenicol and Cu ($P<0.05$). Bacteria isolated from heavy metal contaminated sites were found to be able to remove Cu, Fe and Zn at 29.1- 72.7%, 0-25.8%, and 0%, respectively. Therefore, this method can be used to select some useful bacteria for treating heavy metals contamination in the environment.

ประกาศคุณูปการ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT T_648002

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบรูณ์ลงได้ด้วยความกรุณาของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล อินทระสังขา ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หิริหัทยา เพชรมั่ง และอาจารย์นพดล ศุกระกาญจน์ กรรมการที่ปรึกษา ที่ช่วยเหลือให้คำปรึกษาแนะแนวทางในการศึกษาค้นคว้าและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสิ้นสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์สุดสาคร พุกงาม และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แจ่มจันทร์ เพชรศิริ กรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์เพิ่มเติมที่ให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขเพิ่มเติมเพื่อความสมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์ และขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมภพ อินทสุวรรณ ที่ตรวจทานแก้ไขต้นฉบับเพื่อความสมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณพี่ๆ และเพื่อนๆ ได้แก่ คุณมาณี แก้วชนิด คุณกรวิกา ศรีวัฒนวรัญญู คุณขวัญตา ตันติกำธน คุณดอกรัก ชัยสาร คุณเวลาวี ไชยพันธุ์ คุณเกยูร คำคง คุณดาริกา วสุนธรากุล วีณา จิรัตฐิวรุตม์กุล กิตติชนม์ อุเทนะพันธุ์ นาถนเรศ อาคาสุวรรณ และคุณวิทยา ไชยแก้ว ตลอดจนนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจและแลกเปลี่ยนความคิดเห็นในการทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่สนับสนุนทุนสำหรับการจัดทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณผู้ที่สำคัญยิ่งต่อชีวิต คุณพ่อจรูญ คุณแม่สำรวย จันทโหม บิดามารดาผู้ให้กำเนิด อบรมเลี้ยงดู ให้การศึกษา อดทนและสละทุกสิ่งทุกอย่างเพื่อการศึกษาครั้งนี้ และญาติพี่น้องทุกๆ คนที่ช่วยเหลือและให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ลัดดาวรรณ จันทโหม

ตุลาคม 2549

สารบัญ

บทที่ หน้า

1 บทนำ 1
ภูมิหลัง 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 2
ขอบเขตการวิจัย 2

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
โลหะหนัก 4
ยาปฏิชีวนะ 12
การต้านทานร่วมของยาปฏิชีวนะและโลหะหนักในแบคทีเรีย 18
กลไกการเคลื่อนย้ายสารพันธุกรรมของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม 20
ความสัมพันธ์ของกลไกการเปลี่ยนรูปโลหะหนักกับการจัดการ 21
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 22

3 วิธีดำเนินการวิจัย 32
อุปกรณ์และเครื่องมือ 32
วัสดุ 33
วิธีการศึกษา 33

4 ผลการวิจัย 45
ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก 45
การคัดเลือกจุดเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำทิ้งต่างๆ 48
การศึกษาคุณภาพน้ำ การต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักจากการเก็บ
ตัวอย่างในช่วงฤดูฝนและฤดูร้อน 53
ความสัมพันธ์ของการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก 62
ความสามารถในการบำบัดโลหะหนักของแบคทีเรีย 62
การตรวจสอบกลุ่มหรือจีนัสของแบคทีเรีย 66

5 อภิปรายผล สรุปผลและข้อเสนอแนะ 68

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

อภิปรายผล 68

สรุปผล 71

ข้อเสนอแนะ 72

บรรณานุกรม 73

ภาคผนวก 84

ประวัติย่อผู้วิจัย 87

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 แสดงความเข้มข้นของโลหะหนักที่พบในน้ำทิ้งจาก โรงพยาบาล น้ำเสีย น้ำผิวดิน โรงงานอุตสาหกรรม 6
2 แสดงกลไกในการลดความเป็นพิษโลหะหนักของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม.......... 11
3 แสดงกลไกการออกฤทธิ์และความสามารถในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ของยาปฏิชีวนะ 13
4 แสดงชนิดยาปฏิชีวนะ โครงสร้างทางเคมีและการออกฤทธิ์........................... 14
5 แสดงตัวอย่างกลไกการต้านทานทั้งโลหะหนักและยาปฏิชีวนะของสิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอต 19
6 แสดงตัวอย่างรายงานการศึกษาการต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่แยกจากแหล่งต่างๆ 23
7 แสดงตัวอย่างรายงานการศึกษาการต้านทานโลหะหนักของแบคทีเรียที่แยกจากแหล่งต่างๆ 25
8 แสดงตัวอย่างรายงานการศึกษาความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของแบคทีเรียที่แยกจากแหล่งต่างๆ 27
9 สรุปการใช้จุลินทรีย์ที่ต้านทานโลหะหนักในการบำบัดโลหะหนัก 30
10 การเปรียบเทียบปริมาณของแบคทีเรียเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมดที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ 47
11 แสดงคุณภาพน้ำของน้ำทิ้งจากแหล่งชุมชน โรงพยาบาล ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและขุมเหมืองแร่ 55
12 แสดงปริมาณโลหะหนักของน้ำทิ้งจากแหล่งชุมชน โรงพยาบาล ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและขุมเหมืองแร่ 55
13 จำนวนแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมดในตัวอย่างน้ำทิ้งจากแหล่งชุมชน โรงพยาบาล การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและขุมเหมืองแร่ 57
14 แสดงร้อยละการต้านทานยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Antibiotic diffusion assay ของแบคทีเรียคัดเลือกจากแหล่งชุมชน โรงพยาบาล การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและขุมเหมืองแร่ 58

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
15	แสดงสัดส่วนเป็นร้อยละการต้านทานโลหะหนัก ที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของแบคทีเรียคัดเลือก ……………….……………….	61
16	แสดงรูปร่างโคโลนี สี การติดสีแกรม และสมบัติบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือกสำหรับบำบัดโลหะหนัก เหล็ก ………………………………………	65
17	แสดงบริเวณยับยั้ง (Antibiotic diffusion zones) มาตรฐานของยาปฏิชีวนะสำหรับแบคทีเรียก่อโรคในคน …………………………………………………	85
18	แสดงมาตรฐานโลหะหนักในคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน............................	86

สารบัญภาพประกอบ

ภาพที่ หน้า

1 แสดงแผนที่และภาพถ่ายคลองสำโรง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา จุดเก็บตัวอย่างแหล่งชุมชน 5 จุด 35
2 แสดงแผนผังระบบบำบัดน้ำเสียของโรงพยาบาลแบบตะกอนเร่งชนิด Extended aeration activated sludge system 36
3 แสดงภาพถ่ายจุดเก็บตัวอย่างระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง 37
4 แสดงภาพถ่ายจุดเก็บตัวอย่างการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาว หมู่ที่ 5 ตำบลปากแตระ อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา 38
5 แสดงแผนผังจุดเก็บตัวอย่างน้ำจากฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของบ่อปูพื้นพลาสติกและบ่อดินในการเลี้ยงกุ้งบ่อละ 3 จุด 39
6 แสดงภาพถ่ายจุดเก็บตัวอย่างขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า ณ หมู่ที่ 2 ตำบลหินตก อำเภอร่อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราช 39
7 แสดงปริมาณแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมดในดินและน้ำจากจุดเก็บตัวอย่างแหล่งชุมชนของคลองสำโรง อำเภอเมือง 50
8 แสดงปริมาณแบคทีเรียต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 50
9 แสดงภาพถ่ายลักษณะการต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียด้วยวิธี Antibiotic diffusion assay บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 59
10 แสดงร้อยละการต้านทานยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Antibiotic diffusion assay ของแบคทีเรียคัดเลือกจากแหล่งชุมชน 60
11 แสดงร้อยละการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักมากกว่า 1 ชนิด (Multiple resistance) ที่ระดับความเข้มข้น 100 มก./ล. 63
12 แสดงความสามารถในการบำบัดโลหะหนัก เหล็ก สังกะสี และทองแดง ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร 66
13 แสดงภาพถ่ายการย้อมสีเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียที่แยกจากน้ำทิ้งและสามารถต้านทานโลหะหนัก 67

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ปัจจุบันประเทศไทยมีความเจริญทางด้านอุตสาหกรรมและเกษตรกรรมอย่างรวดเร็วทำให้ประสบปัญหาภาวะมลพิษสิ่งแวดล้อมอย่างรุนแรงมากยิ่งขึ้น ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของของเสียอันตราย (Hazardous waste) ในปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ (วิมล. 1998) โดยเฉพาะปัญหาภาวะมลพิษทางน้ำจากการปนเปื้อนของโลหะหนักและยาปฏิชีวนะ โดยที่โลหะหนักมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมสูงรวมถึงการบำบัดและย่อยสลายโลหะหนักโดยกระบวนการทางชีวภาพทำได้ยาก (Kamal et al. 2003) การตรวจสอบปริมาณโลหะหนักและสารปฏิชีวนะในธรรมชาติทำได้หลายวิธีแต่วิธีที่ประหยัดและมีประสิทธิภาพสูงคือ การใช้แบคทีเรียบางชนิดเป็นตัวบ่งชี้ซึ่งมีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบยีนต่างๆ ของแบคทีเรียที่ต้านยาปฏิชีวนะ พบว่าความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะมีความสัมพันธ์กับสารพันธุกรรมส่วนที่อยู่นอกโครโมโซมที่เรียกว่า Extrachromosomal DNA หรือ พลาสมิด (Plasmid) (Williams and Silver. 2002; Pathak and Gopal. 2005; McArthur and Tuckfield. 2000; Groves and Young. 1975; Wright. 2005) และสามารถเคลื่อนย้ายไปสู่แบคทีเรียชนิดอื่นๆ ทำให้มีการถ่ายทอดความสามารถต้านทานได้ทั้งยาปฏิชีวนะและโลหะหนักไปยังแบคทีเรียผู้รับนั้นได้ (Schwartz et al. 2002) รวมถึงส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในระบบนิเวศเช่นกัน

ลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลามีพื้นที่ครอบคลุม 3 จังหวัดภาคใต้คือ สงขลา พัทลุง และนครศรีธรรมราช และเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมาก เนื่องจากมีทรัพยากรธรรมชาติอุดมสมบูรณ์ ก่อให้เกิดการขยายตัวของชุมชนรวมถึงกิจกรรมทางการเกษตร การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและอุตสาหกรรม ส่งผลให้เกิดภาวะมลพิษทางน้ำและดินในบริเวณดังกล่าว และมีการปนเปื้อนของสารอันตรายลงสู่ทะเลสาบในปริมาณสูง เกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมในน้ำและดิน มีผลต่ออัตราการเจริญและเป็นสภาวะที่กดดันจุลินทรีย์ในน้ำ ทำให้เกิดการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงอย่างกะทันหันทางสรีรวิทยาและพันธุกรรมของแบคทีเรีย (Moat et al. 2002) เป็นเหตุให้แบคทีเรียบางชนิดสามารถปรับตัวและเจริญได้ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนโลหะหนักและยาปฏิชีวนะ ดังนั้นเพื่อให้สอดคล้องกับนโยบายของรัฐบาลและเป็นการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตบริเวณลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลา จึงควรมีการศึกษาแหล่งที่มาของสารอันตรายที่ถูกปล่อยลงสู่แหล่งน้ำโดยการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถต้านทานต่อสารเคมีอันตรายเป็นตัวตรวจวัดการปนเปื้อนมลพิษดังกล่าวและนำความรู้ที่ได้มาแก้ไขปัญหาและวางแผนการบำบัดจากแหล่งที่มาอย่างเหมาะสมต่อไป

การศึกษาครั้งนี้จะศึกษาความหลากหลายและปริมาณของแบคทีเรียที่ต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก เพื่อนำมาใช้เป็นดัชนีตรวจวัดการปนเปื้อนสารเคมีอันตราย ตลอดจนใช้เป็นแนวทางในการนำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบการบำบัดโลหะหนัก รวมทั้งการวิเคราะห์คุณภาพน้ำและปริมาณโลหะหนักโดยวิธีทางเคมี

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณสารเคมีอันตรายโดยเฉพาะโลหะหนักต่อการต้านยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียในน้ำเสียจาก 4 แหล่ง คือ ชุมชน โรงพยาบาล การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในจังหวัดสงขลา และขุมเหมืองแร่เก่า ในจังหวัดนครศรีธรรมราช
2. เพื่อใช้คุณสมบัติในการต้านยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณการปนเปื้อนของสารเคมีอันตราย เช่น โลหะหนัก สารเคมีปราบศัตรูพืช ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ชุมชน และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจากแหล่งน้ำอื่นๆ ต่อไป
3. เพื่อศึกษาแนวทางเบื้องต้นในการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการบำบัดโลหะหนัก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แนวทางการป้องกัน และจัดการที่เหมาะสมในการลดผลกระทบที่เกิดจากแบคทีเรียที่ต้านทานยาปฏิชีวนะและสารเคมีอันตรายที่ส่งผลต่อระบบนิเวศและคุณภาพชีวิตของประชาชน

ขอบเขตการศึกษา

1. เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งต่างๆ 4 แหล่ง คือ
   1.1 แหล่งชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรม บริเวณคลองสำโรง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา
   1.2 โรงพยาบาลสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา
   1.3 ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (ฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งขาว อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา)
   1.4 ขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า หมู่ที่ 2 ตำบลหินตก อำเภอร่อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราช
2. ศึกษาคุณสมบัติในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Streptomycin, Kanamycin, Tetracycline และ Chloramphenicol และการต้านทานต่อโลหะหนัก 4 ชนิด ได้แก่ เหล็ก (Fe^{2+}) สังกะสี (Zn^{2+}) ทองแดง (Cu^{2+}) และปรอท (Hg^{2+})

3. ทำการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก 4 ชนิด ได้แก่ Fe^{2+} Zn^{2+} Cu^{2+} และHg^{2+} และคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพบางประการของน้ำจากแหล่งเก็บตัวอย่างทั้งสี่แห่ง รวมทั้งศึกษาความสามารถของแบคทีเรียที่แยกได้ ในการบำบัดโลหะหนักดังกล่าว

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัญหาภาวะมลพิษทางสิ่งแวดล้อมจากการปนเปื้อนของสารพิษตกค้างเป็นปัญหาสำคัญที่ต้องมีการแก้ไขอย่างเร่งด่วน ผลกระทบจากการขยายตัวทางเศรษฐกิจและชุมชนก่อให้เกิดการปนเปื้อนของสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะใหญ่ๆ คือ การปนเปื้อนแบบจำกัด (Point contamination) หมายถึงเป็นการปนเปื้อนของสารพิษในพื้นที่หรือปริมาณที่จำกัดแต่มีความเข้มข้นของสารพิษสูง เช่น สารพิษที่ปลดปล่อยจากโรงงานบำบัดสารพิษ และการปนเปื้อนแบบกระจาย (Dispersed or Non-point contamination) หมายถึงการปนเปื้อนของสารพิษตามแหล่งธรรมชาติเป็นบริเวณกว้างแต่มีความเข้มข้นของสารพิษต่ำ เช่น การปนเปื้อนของยาปราบวัชพืชในแหล่งเกษตรกรรม เป็นต้น (วิมล. 1998) เมื่อมีการปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อมย่อมมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตทั้งทางตรงและทางอ้อม ในธรรมชาติจุลินทรีย์ทั่วไปสามารถปรับตัวให้ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและสารเคมีอันตรายได้ โดยเมื่อจุลินทรีย์ได้รับอาหารเสริม ค่าความเป็นกรดด่าง ออกซิเจน และความเข้มข้นของสารอาหารที่เปลี่ยนแปลงไปจะกระตุ้นให้จุลินทรีย์ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงกะทันหันในสิ่งแวดล้อม (Moat et al. 2002) จึงเกิดกระบวนการคัดเลือกตามธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ที่ปรับตัวไม่ได้ก็จะตายไป ส่วนที่สามารถปรับตัวได้ก็จะเจริญต่อไป ทำให้มีการสูญเสียจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการย่อยสารอินทรีย์ไปและเป็นการลดความหลากหลายของจุลินทรีย์

ในระดับประเทศรัฐบาลไทยได้มีมาตรการป้องกันและขจัดมลพิษสิ่งแวดล้อมภายใต้นโยบายและแผนการส่งเสริมและรักษาสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ. 2540-2559 และในระดับท้องถิ่นมีการจัดทำแผนการพัฒนาลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลา (สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2546) เพื่อลดการใช้สารเคมีที่ก่อให้เกิดภาวะมลพิษและตรวจสอบปริมาณสารตกค้างในสิ่งแวดล้อมต่างๆ ที่มีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตและระบบนิเวศได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้เกี่ยวข้องกับกิจกรรมทางเศรษฐกิจที่สำคัญและเป็นแหล่งที่มาของโลหะหนักและยาปฏิชีวนะที่เกิดจากการไม่มีการบำบัดหรือมีการบำบัดไม่ถูกวิธีปล่อยลงสู่แหล่งน้ำมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์และความเสื่อมโทรมต่อแหล่งน้ำตามธรรมชาติที่รองรับน้ำทิ้งส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศจึงจำเป็นต้องหาวิธีจัดการของเสียเหล่านี้ซึ่งมีปริมาณที่สูงขึ้นในแต่ละปี

2.1 โลหะหนัก

โลหะคือธาตุที่มีคุณสมบัติสามารถตีขึ้นรูปเป็นรูปร่าง ไม่เปราะ นำไฟฟ้าและนำความร้อนได้ ในธรรมชาติโลหะและอโลหะส่วนใหญ่อยู่ในรูปต่างกัน เช่น อยู่ในสภาพไอออนบวก และในรูปเกลือ

หรือในรูปของผลึกแร่ (He et al. 2005) โลหะหนักมีลักษณะที่แตกต่างจากโลหะทั่วไปคือความหนาแน่นมากกว่า 5 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร มีน้ำหนักอะตอมมากกว่าเหล็ก มีความเป็นพิษสูงต่อสิ่งมีชีวิต (Nies. 1999)

2.1.1 แหล่งที่มาของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม

แหล่งกำเนิดที่สำคัญของโลหะหนักในดินและน้ำ เกิดจาก 2 สาเหตุ คือ จากการกระทำของธรรมชาติ เช่น การสลายตัวของหินและแร่ (Nies. 1999) และการกระทำของมนุษย์ คือ การทำเหมืองแร่ ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของสารโลหะหนักหลายประเภท เช่น สารหนู แคดเมียม ปรอท และตะกั่ว อุตสาหกรรมที่มีการปล่อยของเสียที่ปนเปื้อนของสารหนู แคดเมียม โครเมียม ทองแดง ปรอท นิเกิล และสังกะสี ได้แก่ โรงงานทำไม้ โรงงานแบตเตอรี่ และโรงงานถลุงเหล็ก เป็นต้น ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาจพบโลหะและโลหะหนักได้ถึง 30 ชนิด โดยที่พบมากมักอยู่ในรูปของไอออนบวก และอาจอยู่ในรูปของสารอินทรีย์อื่นๆ โดยพบว่ามีโลหะบางชนิด เช่น เหล็ก ทองแดง และทองจะมีการเคลื่อนย้ายหรือสูญหายไปจากธรรมชาติน้อยมาก (He, Yanga and Stoffella. 2005; Nies. 2003) มักพบการปนเปื้อนของสารหนู โครเมียมและปรอทในปริมาณที่สูงในดินเป็นผลจากอุตสาหกรรมทำไม้ (Turpeinen, Kairesalo and Haggblom. 2004) จากการเกษตรมีการปนเปื้อนของสารหนู แคดเมียม ทองแดง ปรอท ซีลีเนียม และสังกะสี ส่วนในระบบบำบัดน้ำเสียก็พบมีปนเปื้อนของสารหนู แคดเมียม โครเมียม ทองแดง ปรอท ตะกั่ว และสังกะสี นอกจากนี้ยังพบอีกว่าในกระบวนการทางนิวเคลียร์ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของ แคดเมียม ทองแดง ปรอท และยูเรเนียมในดินและน้ำ โดยสาเหตุหลักในการปนเปื้อนของโลหะหนักในปัจจุบันพบว่าเกิดจากโรงงานอุตสาหกรรมและชุมชนเป็นหลัก (ตารางที่ 1)

โลหะหนักส่วนใหญ่เป็นธาตุทรานซิชันที่มีอิเล็กตรอนวงนอกไม่เต็ม (d orbital) การขาดอิเล็กตรอนทำให้โลหะหนักมีประจุบวก ทำให้ไม่มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอน ดังนั้นโลหะหนักจึงมีหน้าที่สำคัญในการในการเป็นธาตุ Trace elements ในกระบวนปฏิกิริยาทางชีวเคมี ระดับความเข้มข้นสูงไอออนของโลหะหนักจะมีความเป็นพิษสูงต่อเซลล์ เช่น Hg^{2+}, Cd^{2+} และ As^{+} (Nies. 1999; Nies. 2003; Silver and Phung. 1996) โลหะหนักเหล่านี้เข้าไปจับแทนที่ตำแหน่งจับของโลหะที่จำเป็น เนื่องจากโลหะหนักจับได้ดีกับตำแหน่ง Thiol-containing groups และออกซิเจนได้ดีกว่าโลหะที่จำเป็น ธาตุโลหะบางชนิดเป็นธาตุที่จำเป็นมีความสำคัญต่อการทำงานของระบบต่างๆ ในสิ่งมีชีวิต เช่น แมกนีเซียม โพแทสเซียม โคบอลต์ แคลเซียม นิเกิล เหล็ก สังกะสี และทองแดง (Bruins, Kapil and Oehme. 2000) ในสิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอตใช้โครเมียม แมงกานีส เหล็ก โคบอลต์ ทองแดง สารหนู และซีลีเนียมเป็นตัวให้และรับอิเล็กตรอนในกระบวนการสร้างพลังงานของเซลล์ โลหะหนักเมื่อได้รับในปริมาณที่มากเกินไปจะส่งผลตกค้างและเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณของโลหะหนักที่พบในน้ำทิ้งจากชุมชน โรงงานอุตสาหกรรม เหมืองแร่ และน้ำผิวดิน

ชนิดโลหะหนัก	โรงงานอุตสาหกรรมและชุมชน	เหมืองแร่	น้ำผิวดิน	อ้างอิง
แคดเมียม	0.01-1 mM	0.01-1 mM	nd	Stepanauskas et al. 2006
ปรอท	0-5 mg/L	nd	0-0.1 mg/L	Barkay. 1987
สารหนู	10 mM	nd	nd	Yamamura et al. 2003
ทองแดง	0.1-16.8 µg/cm^{-2}/year	nd	nd	Cheevaporn et al. 1995
สังกะสี	0.1-16.8 µg/cm^{-2}/year	nd	nd	Cheevaporn et al. 1995

หมายเหตุ : nd คือ ไม่มีข้อมูล

2.1.2 ความสัมพันธ์ระหว่างโลหะหนักกับสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อม

แม้ว่าโลหะบางชนิดเป็นธาตุที่จำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิต แต่ถ้าหากได้รับในปริมาณความเข้มข้นสูงจะเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตได้ จากรายงานวิจัยพบว่าแบคทีเรียที่อาศัยในสภาพแวดล้อมที่การปนเปื้อนโลหะหนักสามารถต้านทานโลหะหนักได้ เนื่องจากมีการปรับตัวให้ทนต่อสารเคมีอันตรายที่ปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อมที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี ในสภาพพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนโลหะหนักจะมีความหลากหลายของชนิดของแบคทีเรียต่ำกว่าบริเวณอื่น (Moffett et al. 2002; Teitzel and Parsek. 2003) นอกจากส่งผลต่อความหลากหลายทางชีวภาพแล้ว โลหะหนักบางชนิดยังสามารถสะสมในสิ่งมีชีวิตที่อาศัยบริเวณที่ปนเปื้อนได้ดี เช่น สารหนู ปัญหาการปนเปื้อนสารหนูมีสาเหตุมาจากการทำเหมืองแร่ดีบุก โดยเฉพาะในอำเภอร่อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราช ซึ่งเคยเป็นที่ตั้งของเหมืองแร่ดีบุกหลายแห่งและบางแห่งยังมีการดำเนินการอยู่ จึงมีสารหนูปนเปื้อนลงสู่แม่น้ำปากพนังและออกสู่อ่าวปากพนัง ซึ่งเป็นแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง มีรายงานปริมาณการตกค้างของสารหนูในกุ้ง 0.1-

12.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และหอยแมลงภู่ 0.3-25.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Boonchalermkit and Fukuda. 2545) โลหะหนักที่ตกค้างในสัตว์นอกจากจะมีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศแล้วยังสะสมในร่างกายของสิ่งมีชีวิตและประชาชนที่บริโภคสัตว์น้ำในบริเวณดังกล่าวเป็นอาหารอีกด้วย

สำหรับจุลินทรีย์โดยปกติมีความต้องการโลหะหนักในการเจริญเติบโตและกลไกทางเมแทบอลิซึม แต่จุลินทรีย์บางชนิดมีกลไกในการลดอันตรายของโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้นสูงจากสิ่งแวดล้อมได้ เช่น *Pseudomonas aeroginosa*, *Thiobacillus ferrooxidants*, *Escherichia coli, Staphylococcus* sp. *และ Bacillus* sp. (Bruins, Kapil and Oehme. 2000) เนื่องจากมีการปรับตัวให้สามารถทนต่อสารเคมีอันตรายที่ปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อมที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นได้จากการปนเปื้อนของโลหะหนักในน้ำและดิน นอกจากนี้โลหะหนักสามารถถ่ายทอดไปยังกระบวนการทางชีวภาพ และถ่ายทอดไปสู่ห่วงโซ่อาหารไปยังสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในน้ำและดิน โลหะหนักที่พบปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมรายละเอียดลักษณะทั่วๆ ไปของโลหะหนักที่สำคัญมีดังต่อไปนี้

1) เหล็ก (Fe)

เหล็กเป็นธาตุที่อยู่ในหมู่ 8 คาบที่ 4 ของตารางธาตุ มีมวลอะตอม 55.847 เลขอะตอม 26 จุดหลอมเหลว 1,535 องศาเซลเซียส จุดเดือด 2,750 องศาเซลเซียส เลขออกซิเดชัน 0, +2 และ +3 มีคุณสมบัตินำความร้อน มีสถานะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง เหล็กเป็นธาตุโลหะหนักชนิดเดียวที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตมากที่สุด รูปแบบของสารประกอบเหล็ก ได้แก่ Dicyclopentadienyl iron $C_5H_5)2Fe$, Ferbem $[(CH_3)2NCS_2]3Fe$, Ferrovanadium dust (FeV), Iron Oxide (Fe_2O_3), Iron Oxide (FeO) , Iron Pentacarbonyl $(FeCO)_5$ และ Potassium Ferrocyanide ($4Fe(CN)_6.3H_2O$) เหล็กที่พบในธรรมชาติมักอยู่ในรูปเหล็กออกไซด์ ($Fe_2O_3.xH_2O$) ซึ่งการผุกร่อนของเหล็กที่พบบ่อยในชีวิตประจำวันได้แก่ เหล็กเป็นสนิม (Fe_2O_3) เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างเหล็กกับสิ่งแวดล้อม การที่อะตอมของเหล็กที่ถูกออกซิไดส์แล้วรวมตัวกับออกซิเจนในอากาศเกิดเป็นออกไซด์ของเหล็ก โดยเหล็ก (Fe^0) สูญเสียอิเล็กตรอน 2 ตัว เปลี่ยนเป็น Fe^{2+} ดังสมการที่ 1

$$Fe^0 + 2H_2O \text{ -------------- } Fe^{2+} + 2OH^- + H_2 \quad ...... (1)$$

ในสิ่งมีชีวิตพวก Eukaryote เช่น *Saccharomyces cerevisiae* มีเหล็กเป็นองค์ประกอบในโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม การเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนเข้าสู่เซลล์โดย Fe^{3+} และการแสดงออกของยีน (Gerbel and Lill. 2002; Nies. 1999) แม้จะยังไม่ทราบ

อาการพิษสะสมของเหล็กที่ชัดเจนในคน แต่หลายประเทศมักนิยมกำหนดค่ามาตรฐานไว้เช่นเดียวกับโลหะอื่น ๆ เพื่อเป็นการป้องกันไว้ก่อน

2) ทองแดง (Cu)

ทองแดงเป็นธาตุที่อยู่ในหมู่ IB คาบที่ 4 ของตารางธาตุ มีมวลอะตอม 63.57 เลขอะตอม 29 ความถ่วงจำเพาะ 8.94 (ที่ 20 องศาเซลเซียส) จุดหลอมเหลว 1,083 องศาเซลเซียส จุดเดือด 2,310 องศาเซลเซียส เลขออกซิเดชัน +1 และ +2 มีคุณสมบัติอ่อน ดัดง่าย นำความร้อนและไฟฟ้าได้ดี เป็นพวกโลหะอ่อนนำไฟฟ้า พบในแหล่งน้ำธรรมชาติจะอยู่ในรูปสารประกอบออกไซด์ (Nies. 1999) ในน้ำธรรมชาติ โดยทั่วไปมักมาจากการผุกร่อนของผลิตภัณฑ์ที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ เช่น ทองแดงจากน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรม ทองแดงที่พบในธรรมชาติจะอยู่ในรูปของแร่ต่างๆ ได้แก่ คอปเปอร์ซัลไฟด์ (Cu_2S) คอปเปอร์ออกไซด์ (Cu_2O) และคอปเปอร์คาร์บอเนตไฮดรอกไซด์ ($CuCO_3.Cu(OH)_2$) แหล่งที่พบการปนเปื้อนทองแดง ได้แก่ โรงงานทำแบตเตอรี่ และโรงงานชุบโลหะ (Cooksey. 1994)

เมื่อร่างกายมนุษย์ได้รับทองแดงในปริมาณสูงจะทำให้เลือดแข็งตัวเร็ว โรคที่เกิดจากการได้รับทองแดงมากเกินไป เรียกว่า Wilson's disease มีอาการกล้ามเนื้อเกร็ง ความดันต่ำ หมดสติ และ Menkes syndrome (Silver and Phung. 1996) แบคทีเรียมีวิวัฒนาการในการต้านทานโลหะหนักเพิ่มขึ้นจากการพัฒนายีนที่มีความสามารถในการเปลี่ยนรูปทองแดงให้อยู่ในรูปที่ไม่เป็นอันตรายได้ เช่น *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas campestris* และ *Enterococcus hirae* (Nies. 1999) และแบคทีเรีย *T. ferrooxidants* สามารถเปลี่ยนรูปทองแดง (Cu_2S) เปลี่ยนรูปเป็น Cu^{2+} ในรูปที่สามารถบำบัดง่ายและลดอันตรายโดยการเกิดปฏิกิริยาได้ 3 แบบ คือ ดังสมการที่ 2-4

$$Cu_2S + 1/2O_2 + 2H^+ \longrightarrow CuS + Cu^{2+} + H_2O \quad \text{........ (2)}$$

$$CuS + 2O_2 \longrightarrow Cu^{2+} + SO_4^{2-} \quad \text{........... (3)}$$

$$CuS + 8\,Fe^{3+} + 8H_2O \longrightarrow Cu^{2+} + 8\,Fe^{2+} + SO_4^{2-} + 8H^+ \quad \text{...... (4)}$$

3) ปรอท (Hg)

ปรอทเป็นธาตุที่อยู่ในหมู่ 12 คาบที่ 6 ของตารางธาตุ มีมวลอะตอม 200.59 เลขอะตอม 80 จุดหลอมเหลว -37 องศาเซลเซียส จุดเดือด 357 องศาเซลเซียส เลขออกซิเดชัน Hg^0, Hg^+ และ Hg^{2+} มีคุณสมบัตินำความร้อน ปรอทเป็นโลหะหนักที่เป็นของเหลวในสภาพธรรมชาติ โดยจะอยู่ในรูปสารประกอบโดยจับกับธาตุหรือสารประกอบอื่นๆ เช่น Acetylene, Ammonia, Chlorine

dioxide, Azides, Calcium, Sodium carbide, Lithium, Rubidium, Copper (Nies. 1999) ในธรรมชาติสามารถพบปรอทได้ในรูปของปรอท (Hg^{+}) หรือเกลือของปรอท (Mercurous salts) เช่น Hg^{+}, Hg^{2+}, $HgCl_2$ ซึ่งสามารถละลายได้น้ำ ปรอทในรูปของสารประกอบ Organometallic มีการใช้ทั่วไปในโรงงานอุตสาหกรรมและทางการเกษตร ในธรรมชาติพบว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณและรูปของปรอทในธรรมชาติมี 2 วัฏจักร คือการเปลี่ยนรูปของปรอทที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมบนโลกสู่ชั้นบรรยากาศ และการเปลี่ยนรูปปรอทโดยอิทธิพลของแบคทีเรียในกระบวนการ Methylation ของสารประกอบอนินทรีย์ปรอทและกระบวนการ Demethylation ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปปรอทในสิ่งแวดล้อม แบคทีเรียบางชนิดสามารถต้านทานต่อโลหะหนักโดยมีการเคลื่อนย้ายโลหะหนักโดยกระบวนการทางเคมีเปลี่ยนรูปปรอทจาก Hg^{2+} เป็น Hg^{0} เกิดขึ้นโดยแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *P. aeruginosa* ที่มียีนในการต้านทานต่อปรอท (*mer*) บนพลาสมิด ซึ่งมีกลไกการย่อยสลายปรอท (Nascimento and Chartone-souza. 2003; Brunke et al. 2002) ดังสมการที่ 5-6

$$H_2S + Hg^{2+} \longrightarrow HgS \quad \ldots\ldots\ldots \quad (5)$$

$$CH_3Hg^{+} \longrightarrow CH_4 + Hg^{0} \quad \ldots\ldots\ldots \quad (6)$$

ความเข้มข้นของ Hg^{2+} และ CH_3Hg^{+} มีความเป็นพิษต่ำต่อสิ่งมีชีวิตสูง ในจุลินทรีย์ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมและกลไกในการเปลี่ยนรูปปรอทให้อยู่ในรูปไม่เป็นพิษได้ (Madigan, Martinko and Parker. 2003) การปนเปื้อนของปรอทมาจากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งปรอทก่อให้เกิดอันตรายผ่านทางห่วงโซ่อาหารในแหล่งน้ำ ในมนุษย์หากได้รับปรอทปริมาณสูงทำให้เกิดโรคมินามาตะ

4) สังกะสี (Zn)

สังกะสีเป็นธาตุที่อยู่ในหมู่ 12 คาบที่ 4 ของตารางธาตุ มีมวลอะตอม 65.39 เลขอะตอม 30 จุดหลอมเหลว 419.73 องศาเซลเซียส จุดเดือด 907 องศาเซลเซียส เลขออกซิเดชัน 2+ มีคุณสมบัตินำความร้อน สังกะสีสามารถพบได้ในรูปของสารประกอบ Sphalerite (ZnS), Calamine, Franklinite, Smithsonite ($ZnCO_3$), Willemite และ Zincite (ZnO) สังกะสีใช้ในอุตสาหกรรมการเคลือบเหล็กป้องกันสนิม โลหะบัดกรี เป็นองค์ประกอบในเครื่องสำอางและสารสีต่างๆ เป็นต้น ความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตคือสังกะสีไปยับยั้งระบบการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนในการหายใจ (Nies. 1999) แบคทีเรียบางชนิดสามารถลดความเป็นพิษของสังกะสีในสิ่งแวดล้อมได้ โดยมีผนังเซลล์ที่ป้องกันอันตรายจากสังกะสีตลอดจนมียีนที่ต้านทานสังกะสี เช่น แบคทีเรียแกรมลบบางชนิดและ

Staphyloococcus aureus เมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของสังกะสีสูง (Choudhury and Srivastava. 2001; Spain. 2003; Nies. 1999)

นอกจากนี้ยังมีโลหะหนักอื่นๆ เช่น สารหนู แมงกานีส โครเมียม และนิเกิล เป็นต้น สามารถพบได้ในน้ำเสียที่ปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรม และชุมชน ซึ่งมีผลต่อระบบนิเวศของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมโดยส่งผลทางตรงคือปริมาณจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายหรือการเปลี่ยนแปลงทางอ้อมคือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์

2.1.3 ความสามารถและกลไกการต้านทานโลหะหนักในจุลินทรีย์

การคัดเลือกโดยธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมที่มีโลหะหนัก ทำให้เกิดการพัฒนาระบบการต้านทานต่อพิษของโลหะหนัก ระบบนี้มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับ โครโมโซม พลาสมิด และส่วนของดีเอ็นเอที่สามารถเคลื่อนย้ายได้ (Transposon) (Bruins et al. 2000; Silver. 1996; Whright, Stepanauskas and McArthur. 2004) และมีความสามารถในการเคลื่อนย้ายได้ง่ายในกรณีที่มีความใกล้เคียงกันของสายพันธุ์ บ่อยครั้งที่พบว่าการต้านทานโลหะหนักหลายชนิดมีความสัมพันธ์บนพลาสมิดเดียวกัน (Malik. 2004) และพบว่ามีความแตกต่างระหว่างยีนที่ต้านทานโลหะหนักที่อยู่บนโครโมโซมและพลาสมิด คือระบบการต้านทานโลหะมักอยู่บนโครโมโซมและมีองค์ประกอบมากกว่าระบบพลาสมิด โดยยีนบนพลาสมิดมักมีกลไกในการขับไอออน ขณะที่พลาสมิดสามารถเคลื่อนย้ายได้รวดเร็วกว่าโครโมโซมไปยังจุลินทรีย์อื่นๆ จากการศึกษาในแบคทีเรียพวก *E. coli* และ *S. aureus* ที่ต้านทานต่อสารหนู เมื่อเปรียบเทียบส่วนของยีนบนพลาสมิดของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด พบว่าทั้ง *E. coli* ที่ต้านสารหนูมียีนบนโอเปอรอน 5 ยีน ขณะที่ *S. aureus* มียีนที่ต้านทานสารหนูบนโอเปอรอน 3 ยีน ซึ่งทั้ง 3 ยีนมีความเกี่ยวข้องกับยีนใน *E. coli* (Silver. 1996) ชนิดของโปรตีนก็มีความสำคัญในการเคลื่อนย้ายโลหะหนัก โดยพบว่าโลหะต่างชนิดกันส่วนใหญ่จะมีโปรตีนที่เป็นตัวเคลื่อนย้ายแตกต่างกันออกไป และจุลินทรีย์บางชนิดสามารถเกิดได้มากกว่าหนึ่งกลไกในการลดความเป็นพิษของโลหะหนัก ซึ่งสามารถแบ่งได้ 5 กลไก ดังตารางที่ 2

2.1.4 การศึกษาการต้านทานโลหะหนักของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม

โดยทั่วไปการทดสอบการต้านทานโลหะหนักยังไม่มีวิธีการที่แน่นอน ที่สามารถใช้เป็นวิธีการมาตรฐานในปัจจุบัน แต่ความสามารถในการต้านทานโลหะหนักสามารถทำได้โดยอ้อมคือการวัดจากความสัมพันธ์ของการต้านทานของสิ่งมีชีวิต ชนิดและระดับความเข้มข้นต่างๆของโลหะหนัก ซึ่งการทดสอบนิยมทำในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเช่น แบคทีเรีย การศึกษาการต้านทานโลหะหนัก มี 3 วิธี ได้แก่

1) Agar dilution method วิธีนี้คล้ายคลึงกับวิธีการทดสอบการทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียโดยการเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็งที่มีการผสมยาปฏิชีวนะ แต่

การศึกษาการต้านโลหะหนักมีวิธีการศึกษาโดย Nieto, Ventosa and Ruiz-Berraquero (1989) ผลการต้านทานโลหะหนักโดยบันทึกค่าความเข้มข้นสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้

ตารางที่ 2 แสดงกลไกในการลดความเป็นพิษโลหะหนักของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม (ดัดแปลงจาก: Bruins et al. 2000; Nies. 1999; Silver. 1992; Choudhury and Srivastava, 2001)

กลไก	โลหะหนัก	จุลินทรีย์
1) การจับโลหะหนักบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ - สารเคลือบเซลล์ที่เรียกว่า Polysaccharide เพื่อให้สามารถดูดซับไอออนโลหะและปกป้องเซลล์	ทองแดง แคดเมียม	*E. coli* , *P. Putida*, *Pseudomonas sp.*, *S. aureus*, *Klebsiella*, *Arthrobacter viscosus*
2) การกำจัดโลหะหนักโดยการใช้พลังงานและไม่ใช้พลังงาน ขับโลหะออกจากเซลล์ (Efflux) - โดยมีโปรตีนจำเพาะบริเวณเยื่อเลือกผ่านของเซลล์ช่วยในการเคลื่อนย้ายโลหะหนักเข้าออกจากเซลล์	สารหนู	*E. coli*, *S. aureus*
3) การตกตะกอนโลหะหนักภายในเซลล์ - สร้างสาร Metallothionein และโปรตีนที่มีปริมาณ Cysteine สูง	แคดเมียม ทองแดง สังกะสี	*Synechococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Mycobacterium scrofulaceum*
4) การแยกโลหะออกจากเซลล์โดยการจับกับโปรตีนภายนอกเซลล์ - ใช้ฟอสเฟตในการจับกับโลหะหนัก - จับเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Hydrogen sulfide อยู่นอกเซลล์	แคดเมียม ทองแดง	*S. cerevisiae*, *Citrobacter* sp.
5) กลไกการลดความเป็นพิษของโลหะด้วยเอนไซม์ - ยีนที่ต้านทานปรอท (*mer*) สร้างเอนไซม์ที่มีหน้าที่สลายปรอท	ปรอท	*S. aureus*, *Bacillus* spp., *E.coli*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescene*

2) Continuous culture การเลี้ยงระบบปิดสำหรับการทดสอบความสามารถในการเจริญที่แตกต่างกันของสิ่งมีชีวิตในอาหารที่มีโลหะและไม่มีโลหะ สิ่งมีชีวิตที่สามารถเจริญได้ในตัวกลางที่ใกล้เคียงกับสภาพแวดล้อมในธรรมชาติ เช่น สิ่งมีชีวิตในน้ำ ใช้สารอาหารในการเลี้ยงระบบปิดที่เหมาะสมกับสิ่งมีชีวิตที่ศึกษาและใส่โลหะลงไป ผลของโลหะที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันสามารถวัดได้โดยสังเกตจากการตอบสนองของการเจริญเติบโต ทั้งที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดและสูงสุด ผลการทดลองแสดงออกในรูปของปริมาณ ชนิดสิ่งมีชีวิต ในการทดลองนี้สามารถใช้สำหรับคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้านทานโลหะจากกลุ่มสิ่งมีชีวิตทั่วๆ ไป

3) Agar diffusion method การทดลองวิธีนี้สามารถทดสอบการต้านทานโลหะในแบคทีเรียพวกที่ใช้สารอินทรีย์ในการดำรงชีวิต ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียโดยใช้แผ่นกระดาษกรองตัดเป็นวงกลมชุบด้วยสารละลายของยาปฏิชีวนะนำไปวางบนอาหารแข็งที่มีการเกลี่ยด้วยแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ และผลการทดลองแสดงออกในรูปของการสร้างวงใสของการยับยั้งแบคทีเรียรอบแผ่นกระดาษกรอง การทดสอบกับโลหะได้ทำการดัดแปลงโดย Groves and Young (1975) พบว่าให้ผลการเกิดวงใสของการยับยั้งแบคทีเรียรอบๆ กระดาษกรองเช่นกัน หากวงใสที่เกิดมีขนาดใหญ่แสดงว่าแบคทีเรียมีการต้านทานโลหะได้ดี

2.2 ยาปฏิชีวนะ

ในชีวิตประจำวันมนุษย์มีการใช้สารเคมีจำนวนมากเพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้งในบ้าน ห้องทดลอง การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหรือตลอดจนโรงงานอุตสาหกรรม ฟาร์มเลี้ยงสัตว์การเกษตรกรรมและโรงพยาบาล เป็นต้น ส่งผลให้สารเคมีหลายชนิดโดยเฉพาะยาปฏิชีวนะตกค้างอยู่ในน้ำทิ้งต่าง ๆ ทำให้แบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในน้ำและดินบางชนิดตาย แต่บางชนิดสามารถปรับตัวและต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ จึงต้องใช้ยาปฏิชีวนะตัวอื่นที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าเดิมและลักษณะการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกันไป

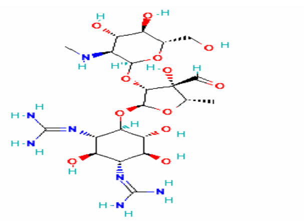
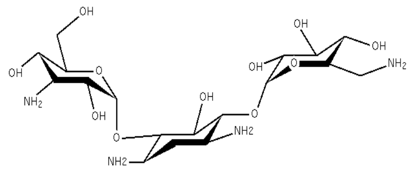
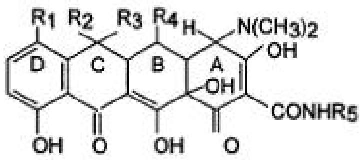
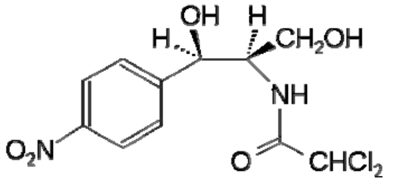
2.2.1 **ยาปฏิชีวนะ** (Antimicrobial substances) หมายถึงกลุ่มยาที่มีผลระงับการเจริญของเชื้อทั้ง แบคทีเรีย รา ไวรัส และโปรโตซัว ซึ่งใช้เพื่อต้านเชื้อภายนอกร่างกายหรือวัตถุสิ่งของ เช่น ยาฆ่าเชื้อ หรือใช้เพื่อรักษาโรคติดเชื้อในร่างกาย หรือใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโต (Growth promoter) โดยเติมลงในอาหารสัตว์ ซึ่งแบ่งเป็น 2 ประเภท คือยาปฏิชีวนะเป็นยาที่ประกอบด้วยสารเคมีที่มีจุดกำเนิดจากสิ่งมีชีวิต เช่น ยาปฏิชีวนะ Streptomycin, Chloramphenicol และยาปฏิชีวนะสังเคราะห์ (Synthetic antimicrobial chemotherapeutic agents) เป็นยาที่ประกอบด้วยสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้น ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในปัจจุบันแต่ละชนิดมีผลต่อการยับยั้งแตกต่างกัน ซึ่งมีกลไกการยับยั้งได้ 5 แบบ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงกลไกการออกฤทธิ์และความสามารถในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ของ ยาปฏิชีวนะ (ดัดแปลงจาก Madigan, Martinko and Parker. 2003; Tenover. 2006)

กลไกการออกฤทธิ์	กลุ่มของยาปฏิชีวนะ
1) ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์	B-Lactams: Penicillins, Cephalosporins, Monobactams
2) ออกฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์	Polymycin, Gramicidins, Daptomycin
3) ยับยั้งการสร้างโปรตีน	จับกับ 50S ribosomal subunit: Chloramphenicol, Clindamycin, Linezolid
	จับกับ 50S ribosomal subunit: Tetracyclines, Aminoglycosides
	จับกับ Bacterial isoeucyl-tRNA synthetase: mupirocin
4) ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก	ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA: Fluoroquinolones ยับยั้งการสังเคราะห์ RNA : Rifampin
5) ยับยั้งระบบเอนไซม์และกระบวนการทางเมตาบอลิซึม	Sulfanilamide, folic acid analogues

ยาปฏิชีวนะมีหลายชนิดมีความรุนแรงและความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์แตกต่างกัน ดังนั้นการใช้ยาปฏิชีวนะในแต่ละแหล่งจึงมีความแตกต่างกัน บริเวณชุมชนจะมีการใช้ยาปฏิชีวนะ Streptomycin และ Tetracycline การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีการใช้ยาปฏิชีวนะเช่น Chloramphenical และ Oxytetracycline โรงพยาบาลมีการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น Vancomycin, Streptomycin และ Kanamycin เป็นต้น ยาปฏิชีวนะที่สำคัญ 4 ชนิด ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงชนิดยาปฏิชีวนะ โครงสร้างทางเคมีและการออกฤทธิ์

ยาปฏิชีวนะ	โครงสร้างทางเคมี	การออกฤทธิ์
Streptomycin สูตรเคมี $C_{21}H_{39}N_{7}O_{12}$ น้ำหนักโมเลกุล 581.574 กรัมต่อโมล		Broad spectrum
Kanamycin สูตรเคมี $C_{18}H_{36}N_{4}O_{11}$ น้ำหนักโมเลกุล 484.499 กรัมต่อโมล		Broad spectrum
Tetracycline สูตรเคมี $C_{22}H_{24}N_{2}O_{8}$ น้ำหนักโมเลกุล 444.435 กรัมต่อโมล		Broad spectrum
Chloramphenical สูตรเคมี $C_{11}H_{12}N_{2}O_{5}Cl_{2}$ น้ำหนักโมเลกุล 323.132 กรัมต่อโมล		Broad spectrum

2.2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างยาปฏิชีวนะกับจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม

ยาปฏิชีวนะและแบคทีเรียที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำเสีย แหล่งน้ำผิวดิน น้ำใต้ดิน ตะกอนดินและดิน ยาปฏิชีวนะมีการชะล้างลงสู่สิ่งแวดล้อมได้หลังจากที่มีการใช้ใน สถานพยาบาล แหล่งชุมชน การปศุสัตว์ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และแหล่งอื่นๆ ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียที่ต้านทานยาปฏิชีวนะ (Ku¨mmerer, 2004) แหล่งที่มีปริมาณการปล่อยยาปฏิชีวนะปริมาณสูงลงสู่สิ่งแวดล้อม ได้แก่

1) น้ำทิ้งชุมชนและโรงพยาบาล

แหล่งชุมชนเป็นที่ตั้งของ บ้านเรือน ร้านค้า โรงพยาบาล โรงเรียน ตลาดและโรงงานอุตสาหกรรมอื่นๆ ซึ่งพบการต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียและยาปฏิชีวนะถูกปล่อยออกสู่

สิ่งแวดล้อมเพิ่มขึ้นเพราะมีการใช้ยาและสารเคมี ยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นแบคทีเรียที่ต้านทานยาปฏิชีวนะสูง ได้แก่ *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Aeromonas* sp., *Enterobacteriaceae*, *Acenitobacter* spp. และ *E. coli* เป็นต้น ซึ่งบางชนิดเป็นแบคทีเรียก่อโรคในคนและสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ เช่น Tetracycline, Co-trimoxazole, Amoxicillin, Oxytetracycline, Chloramphenicol, Sulfamethoxazole, Ciprofloxacin, Gentamicin , Vancomycin, Penicillin G, Trimethoprim, Lincomycin, Ofloxacin และ Vancomycin เป็นต้น (Goni-urriza et al. 2000; Beović. 2006) ในโรงงานอุตสาหกรรมนอกเหนือจากปัญหาการปนเปื้อนสารเคมีอันตรายประเภทโลหะหนักแล้ว ยังมีปัญหาการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะลงสู่แหล่งน้ำด้วยเช่นกัน ความสามารถในการต้านทานของแบคทีเรียของสารเคมีอันตรายทั้ง 2 อย่างมีความสัมพันธ์กัน (Pathak and Gopal. 2005; McArthur and Tuckfield. 2000; Groves. and Young: 1975) กล่าวคือแบคทีเรียโคลิฟอร์มบริเวณที่สามารถต้านทานโลหะหนัก เช่น นิเกิลและโครเมียมและสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะเช่น การต้านทานยาปฏิชีวนะ Gentamycine, Polymixin-B, Chloramphenicol, Kanamycin, Tetracycline, Bacitracin และ Streptomycin ได้เช่นกัน (Verma et al. 2000; McArthur and Tuckfield. 2000) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มความสัมพันธ์ของการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของแบคทีเรียจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนยาปฏิชีวนะและโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม รายละเอียดความสัมพันธ์การต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะต่างๆ ของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมจะกล่าวต่อไป

2) การเกษตรกรรมและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

การใช้ยาปฏิชีวนะในการเกษตรกรรมมีปริมาณสูงในการเลี้ยงสัตว์ เช่น หมู ไก่ และวัว เนื่องจากปัจจุบันมีรายงานการเกิดโรคในสัตว์และการแพร่ระบาดเพิ่มสูงขึ้น ทำให้เกษตรกรต้องใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาและป้องกันโรค ผลกระทบตามมาคือมีการปล่อยน้ำเสียที่มียาปฏิชีวนะและแบคทีเรียที่ต้านทานยาปฏิชีวนะลงแหล่งน้ำเพิ่มสูงขึ้น ในแหล่งที่มีการเลี้ยงสัตว์สามารถพบการต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย เช่น *Enterococcus faecium, E. casseliflavus* ซึ่งมีความต้านทานต่อ Vancomycin ได้ดีในฟาร์มเลี้ยงไก่สูงสุด ส่วนในหมูและวัว พบรองลงมา (Bustamante et al. 2003) ตลอดจนยังมีการตกค้างของยาปฏิชีวนะ เช่น Lincomycin ที่ระดับ 0.7- 6.6 ไมโครกรัมต่อลิตร (Brown et al. 2005) ในน้ำทิ้งอีกด้วย

การใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ กุ้งขาว เลี้ยงปลาโดยเฉพาะกุ้งกุลาดำเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจของไทยในภาคใต้ การเลี้ยงกุ้งมีการให้อาหาร ยาปฏิชีวนะในปริมาณที่สูงและตกค้างในบ่อ ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีการใช้ยาและสารเคมีที่ใช้กันมากในกลุ่ม ได้แก่ Tetracycline, Chloramphenicol กลุ่มยาควิโนโลน และ Sulfanamides เป็นต้น (Tendencia and Pena. 2001: Karunasagar et al. 1994; McEwen and Fedorka-Cray. 2002)

ตลอดจนสารเคมีอื่นๆ เพื่อรักษาโรคระบาดจากแบคทีเรีย เช่น โรคเรืองแสง และโรคตายเดือน แบคทีเรียที่พบการต้านทานยาปฏิชีวนะได้แก่ *Vibrio* spp., *V. harveyi*, *V. splendidus*, *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* sp. (Tendencia and Pena. 2001; Baticodos et al. 1990; Karunasagar et al. 1994) ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ เช่น Erythromycin, Kanamycin, Penicillin G และ Streptomycin เป็นต้น ส่งผลให้เกิดปัญหาต่างๆ เช่น ปัญหายาปฏิชีวนะตกค้าง การดื้อต่อยาปฏิชีวนะและปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมมีผลต่อระบบนิเวศของจุลินทรีย์ในบ่อและบริเวณใกล้เคียง เนื่องจากในบ่อจะมีสารอินทรีย์ในปริมาณสูง สภาพแวดล้อมเหมาะสมในการเจริญเติบโตและแพร่ขยายพันธุ์ด้วยเช่นกัน ความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค จึงเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Kerry et al. 1994)

2.2.3 กลไกการต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม

ปัจจุบันยาปฏิชีวนะที่สามารถใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียได้มีน้อยกว่าจำนวนยาปฏิชีวนะที่มีใช้ทั้งหมด เนื่องจากการปัญหาการต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเป็นปัญหาที่สำคัญและน่าสนใจ ซึ่งมีผลต่อคุณภาพชีวิตของประชากร การต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียค้นพบครั้งแรกในราวปี ค.ศ. 1930 จากการต้านทาน Sulfanamides และ Penicillin ของแบคทีเรีย *S. aureus* และต่อมาในปี ค.ศ. 1940 พบการต้านทาน Penicillin ของ *Neisseria influenzae* การต้านทาน β-lactamase ของ *Haemophilus influenzae* ในปี ค.ศ. 1970s และการต้านทาน Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และการต้านทานยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิด (Multi-drug resistant: (MDA)) ของ *Mycobacterium tuberculosis* ในปี ค.ศ. 1970s และ 1980s ต่อมาในปี 1980s และ 1990s การขยายตัวของการผลิตสัตว์เพื่อบริโภคมีปริมาณสูงขึ้น เช่น การทำปศุสัตว์ และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เป็นต้น ทำให้มีปริมาณแบคทีเรียแกรมลบพวกอาศัยอยู่ในทางเดินอาหาร (Enteric bacteria) เช่น *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *V. cholerae*, *P. aeruginosa* สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะได้สูงขึ้น (Alanis. 2005; Marquez. 2005) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงความสามารถของแบคทีเรียในการต้านทานยาปฏิชีวนะนั้นมีการศึกษาออกมาแพร่หลายในปัจจุบันโดยสามารถแบ่งได้เป็นกลไก 3 กลไกหลักๆ ได้แก่

1) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของยาปฏิชีวนะ

การเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูปที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ โดยการเปลี่ยนรูปโครงสร้างทางเคมีของยาปฏิชีวนะ กลไกนี้มีโอกาสเกิดขึ้นเมื่อแบคทีเรียได้ผลิตเอนไซม์ออกมา 1 หรือมากกว่า 1 ชนิด ซึ่งจะไปทำให้ยาปฏิชีวนะเสื่อมสภาพทางเคมีหรือเปลี่ยนแปลงรูปเป็นกลไกที่พบทั่วไปในการต้านทานยาปฏิชีวนะ เอนไซม์แต่ละชนิดมีผลเฉพาะต่อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดเช่นกัน เช่น ยาปฏิชีวนะกลุ่ม β-lactamam แบคทีเรียที่ต้านทานได้จะผลิตเอนไซม์ β-lactamases และ

Staphylococcus spp. สามารถสร้างเอนไซม์ Erythromycin ribosomal methylase ทำให้สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Erythromycin ได้ (Tenover. 2006) ในแบคทีเรีย *P. aeruginosa* สามารถสร้างเอนไซม์ยับยั้งการทำงานของยาปฏิชีวนะ Streptomycin, Kanamycin และ Neomycin ได้เช่นกัน

2) กลไกการเปลี่ยนรูปยาปฏิชีวนะ

การเปลี่ยนรูปยาปฏิชีวนะโดยการเปลี่ยนรูปโมเลกุลยาปฏิชีวนะให้มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยมีการจับกับสารภายในเซลล์ มีโอกาสเกิดขึ้นในเซลล์ของแบคทีเรียที่ตัวรับยาปฏิชีวนะ ซึ่งจะทำหน้าที่ไปจับกับยาปฏิชีวนะก่อนที่ยาปฏิชีวนะจะไปจับกับตำแหน่งเป้าหมายในการออกฤทธิ์ ทำให้ ยาปฏิชีวนะดังกล่าวไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ เช่น กลไกการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Penicillin ที่มีการสร้างโปรตีนจำเพาะ เรียกว่า Penicillin-binding proteins (PBPs) ในแบคทีเรียพวก *Pneumococci* (Alanis. 2005) และมีการตกตะกอนภายในเซลล์หรือมีกลไกการขับออกจากเซลล์มาร่วมด้วย (Marquez. 2005)

3) กลไกการขับยาปฏิชีวนะออกจากเซลล์

วิวัฒนาการการต้านทานยาปฏิชีวนะที่แสดงภายในเซลล์และเกิดขึ้นเมื่อแบคทีเรียแกรมบวกหรือแกรมลบได้รับการกระตุ้นจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารเคมีอันตรายในสิ่งแวดล้อม โดยการพัฒนากลไกการขนส่งสารผ่านเข้าออกภายในเซลล์ โดยการขับยาปฏิชีวนะออกนอกเซลล์ จนกระทั่งความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะภายในเซลล์ต่ำไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ หมายความว่ากลไกการขับสารออกจากเซลล์มีการทำงานที่แข็งแรงกว่า กลไกการนำสารเข้าสู่เซลล์จึงมีประสิทธิภาพสูง ในแบคทีเรียแกรมบวกเกิดขึ้นได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบเนื่องจากความซับซ้อนของเยื่อหุ้มเซลล์แตกต่างกัน กลไกชนิดนี้พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1970s ของยาปฏิชีวนะ Tetracycline แต่ปัจจุบันพบว่ามียาปฏิชีวนะอีกหลายชนิดที่มีกลไกดังกล่าวด้วยเช่นกัน เช่น Fluoroquinolones ในแบคทีเรียพวก *S. aureus* (Marquez. 2005; Alanis. 2005)

2.2.4 การต้านทานยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิดของแบคทีเรีย (Multiple antibiotic resistance: MAR)

ปัจจุบันปัญหาการต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเป็นประเด็นที่ได้รับความสนใจและมีการศึกษาอย่างแพร่หลายถึงอันตราย กลไกการต้านทาน ชนิดการต้านทานตลอดจนปัญหาการต้านทานยาที่มีความหลายหลากหลายมากกว่า 1 ชนิดของแบคทีเรีย โดยเฉพาะปัญหาการต้านทานยาปฏิชีวนะในโรงพยาบาล สถานพยาบาลขนาดใหญ่ และชุมชน ซึ่งเป็นแหล่งรวมของแบคทีเรียก่อโรคต่างๆ จากการใช้ยาปฏิชีวนะกันอย่างแพร่หลาย ทั้งในการบริโภคของคน อาหารสัตว์ทำให้แบคทีเรียที่เป็นพาหะของโรคต่างๆสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะได้ ในอนาคตสถานการณ์การต้านทานจะรุนแรงขึ้น เพราะแบคทีเรียเหล่านี้สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะได้มากกว่า 1 ชนิด เมื่อ

แบคทีเรียสัมผัสกับยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกัน และมีเป้าหมายการทำลายของยาปฏิชีวนะคล้ายคลึงกัน หรือแตกต่างกัน การต้านทานยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิด แสดงให้เห็นชัดเจนในกระบวนการต้านทานยาปฏิชีวนะที่มีกลไกการต้านทานแบบขับออกจากเซลล์ ในแบคทีเรีย เช่น *Listeria monocytogenes, P. aeruginosa* หรือการต้านทาน Methicillin ของแบคทีเรีย *S. aureus* (Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) ในโรงพยาบาลที่ต้องใช้ Vancomycin (Beović. 2006) ในแบคทีเรียชนิด *Acinetobacter* sp. ซึ่งใช้เป็นตัวตรวจสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะจากน้ำเสียโรงพยาบาลมีการต้านทานยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิด (Multiple-antibiotic resistance: MAR) ในปริมาณที่สูงเพิ่มขึ้นทุกปี (Guardabassi et al. 1998) จากปัญหาดังกล่าวนำไปสู่การสังเคราะห์ผลิตยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ ที่มีกลไกการทำงานของยาปฏิชีวนะที่แตกต่างออกไป เช่น Daptomycin, Ketolides, Telithromycin, Cethromycin และ Tigecycline เพื่อควบคุมการติดเชื้อและการต้านทานของแบคทีเรียก่อโรคต่างๆ ยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ส่วนใหญ่มาจากการสังเคราะห์ย่อมมีอันตรายในการใช้รักษาและราคาที่สูงขึ้นเช่นกัน (Hancock. 2005)

นอกจากการปนเปื้อนของสารเคมีอันตรายและยาปฏิชีวนะในน้ำแล้ว การปนเปื้อนยังเกิดขึ้นในดินจากขยะอันตรายต่างๆ รวมไปถึงการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์บก เช่น หมูและไก่ที่มีผลตกค้างในดินสูงและมีโอกาสลงสู่แหล่งน้ำได้โดยการชะล้างของน้ำฝน จึงควรมีการศึกษาการต้านยาปฏิชีวนะและสารเคมีอันตรายของแบคทีเรียทั้งในน้ำและดินควบคู่กัน ตลอดจนการประยุกต์ใช้เทคนิคที่ทันสมัยมาใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียต่อไป

2.3 การต้านทานร่วมของยาปฏิชีวนะและโลหะหนักในแบคทีเรีย

การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมมีปริมาณสัมพันธ์กับชนิดและระดับความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่ปนเปื้อนเช่นกัน ในพวกโปรคาริโอตมีกระบวนการต้านทานทั้งยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก (Co-selection process) 2 แบบ คือ Co-resistance และ Cross resistance โดย Co-resistance มีโอกาสเกิดขึ้นเมื่อยีนที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานอยู่ในตำแหน่งเดียวกัน เช่น พลาสมิด Transposon หรือ Integron (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ตัวอย่างกลไกการต้านทานทั้งโลหะหนักและยาปฏิชีวนะของสิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอต (Austin, Kristinsson and Anderson. 1999)

กลไกการต้านทาน	โลหะ	ยาปฏิชีวนะ
1) กลไกเคลื่อนย้ายผ่านเยื่อหุ้มเซลล์	As, Cu, Zn, Mn, Co, Ag	Ciprofloxacin Tetracycline Chloramphenicol β-Lactams
2) กลไกการเปลี่ยนรูป	As, Hg	β-Lactams Chloramphenicol
3) กลไกการขับออกจากเซลล์	Cu, Co, Zn, Cd, Ni, As	Tetracycline β-Lactams Chloramphenicol
4) กลไกการลดความเป็นอันตราย	Hg, Zn, Cu	Ciprofloxacin β-Lactams Trimethoprim Rifampicin
5) กลไกการตกตะกอนภายในเซลล์	Zn, Cd, Cu	Coumermycin A

มีการศึกษาพบว่ายีนในการต้านทานโลหะและยาปฏิชีวนะมีการเชื่อมโยงกันบนพลาสมิด ในปี ค.ศ.1960s การศึกษาการต้านทานโลหะและยาปฏิชีวนะโดยวิธีการถ่ายโอนยีน (Transformation) การรักษาโรคโดยการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่ผู้ป่วย (Plasmid curing) และการศึกษาลำดับเบสของพลาสมิด (Plasmid sequencing) เช่น การต้านทานปรอทกับยาปฏิชีวนะ โดยการจับคู่กันระหว่างแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae และผู้รับ คือแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมบางชนิด เช่น การต้านทานตะกั่วกับยาปฏิชีวนะในแบคทีเรียพวก *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium* และ *Enterobacter* การต้านทานแคดเมียมและ Streptomycin ในแบคทีเรีย *Salmonella* sp. การต้านทานปรอทและ Tetracycline ของแบคทีเรียที่ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้จากน้ำทะเล การต้านทานโลหะหนักตะกั่ว โคบอลต์ นิเกิล ทองแดงและ Penicillin ในแบคทีเรีย *Klebslella pneumoniae* การต้านทาน Vanadium และต้านทานยาปฏิชีวนะได้มากกว่า 1 ชนิด ใน

แบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* และการต้านทานแคดเมียมและการต้านทาน Erythromycin ในแบคทีเรีย *Stenotrophomonas maltophilia* (Stepanananuskas et al. 2005; Baker-Austin et al. 2006)

Cross-resistance เป็นกลไกที่ 2 ของการ Co-selection โดยสารพันธุกรรมเดียวกันมีผลตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก ซึ่งมีโอกาสเกิดขึ้นกับการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่มีกลไกและการออกฤทธิ์คล้ายคลึงกันหรือมีเป้าหมายการออกฤทธิ์เดียวกัน เช่น การต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียมากกว่า 1 ชนิด ของแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* และสามารถขับโลหะหนักออกจากเซลล์ควบคู่กับยาปฏิชีวนะได้ (Baker-Austin et al. 2006) การต้านทานทั้งยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของแบคทีเรียนั้นขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมของแหล่งที่อยู่อาศัย (Exposure condition) ตลอดจนความจำเพาะต่อผู้ถูกอาศัยเช่นกัน (Host susceptibility) (Calomiris, Armstrong and Seidler. 1984)

2.4 กลไกการเคลื่อนย้ายสารพันธุกรรมของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม

การพัฒนากลไกการต้านทานยาเกิดขึ้นโดยการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของแบคทีเรียโดยทั่วไปอยู่บนส่วนของดีเอ็นเอและสามารถเคลื่อนย้ายได้ง่าย เรียกการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมในการต้านทานยาปฏิชีวนะและการเคลื่อนย้ายสารพันธุกรรมไปยังสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ว่า “Horizontal evolution” ซึ่งมีโอกาสเกิดขึ้นได้ระหว่างสิ่งมีชีวิตสปีชีส์เดียวกันหรือต่างสปีชีส์หรือสกุล เช่น กลไกการเคลื่อนย้ายสารพันธุกรรมระหว่างแบคทีเรียเป็นรู้จักมานานกว่า 50 ปี สามารถแบ่งได้เป็น 3 กระบวนการ ได้แก่

1) Conjugation เป็นกระบวนการที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติมาจากแบคทีเรียที่เป็นพาหะของโรคใน คน สัตว์ หรือ ปลาและมีความสำคัญที่สุดในการเคลื่อนย้ายสารพันธุกรรมที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะในแบคทีเรีย เช่น แบคทีเรียพวก *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในคนสามารถเคลื่อนย้ายสารพันธุกรรม (R plasmids) ด้วยวิธีนี้ (Kruse and Sorum. 1994) ไปยังแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลาคือ *Aeromonas salmonicida* กลไกนี้เกิดขึ้นโดยมีพลาสมิดเป็นตัวกลางที่มีสารพันธุกรรมโดยส่งผ่านทางส่วนที่เรียกว่า Pilus ของแบคทีเรียที่สามารถเชื่อมต่อกันระหว่างแบคทีเรียกับแบคทีเรียมีลักษณะเป็นท่อขนาดเล็กใช้สำหรับส่งผ่านสารพันธุกรรมระหว่างเซลล์ 2 เซลล์ เช่น การเกิด Conjugation ในแบคทีเรียแกรมบวกโดยทั่วไปเริ่มต้นจากการผลิต Sex pheromones ก่อให้เกิดการจับคู่ (Mating pair) ของแบคทีเรียผู้ให้และรับสารพันธุกรรม (Tenover. 2006; Alanis. 2005)

2) Transformation เป็นการเคลื่อนย้ายสารพันธุกรรมของแบคทีเรีย เกิดขึ้นเมื่อดีเอ็นเออิสระ เคลื่อนย้ายเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์ โดยดีเอ็นเออิสระ (Naked DNA) เหล่านี้มาจากแบคทีเรียที่ตายหรือเซลล์แตก ทำให้สารพันธุกรรมกระจายในสิ่งแวดล้อมและมีโอกาสเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียตัวรับ

สารพันธุกรรมผ่านทางผนังเซลล์เข้าสู่ไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) และเข้าไปรวมกับดีเอ็นเอของเซลล์ผู้รับ (Alanis. 2005)

3) Transduction กลไกที่ 3 ของการเคลื่อนย้ายสารพันธุกรรมมีโอกาสเกิดขึ้นโดยใช้ตัวพา (Vector) ขบวนการนี้ต้องอาศัย Bacteriophage คือ ไวรัสที่เข้าไปอาศัย (Infect) อยู่ในเป็นตัวนำพาชิ้นส่วนของดีเอนเอของแบคทีเรียอีกตัวหนึ่งไปยังแบคทีเรียเซลล์อื่น หลังจากนั้นจะเกิด Recombination ระหว่างดีเอนเอของแบคทีเรีย 2 ชนิด หรืออาจถูก ขัดขวางหรือคัดทิ้งโดยกลไกของแบคทีเรีย ที่เรียกว่า Abortive Transduction และขณะเดียวกันดีเอนเอของ Phage ก็จะแทรกเข้าไปในดีเอนเอของแบคทีเรีย ทำให้ได้สายพันธุ์ใหม่ขึ้นมา จนกระทั่งเซลล์แบคทีเรียตายและจะออกจากเซลล์เพื่อไปยังเซลล์อื่นๆต่อไป (Alanis. 2005) ซึ่งกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายสารพันธุกรรมต่อการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักนั้น กลไกการ Conjugation มีความสำคัญและมีรายงานการค้นพบมากที่สุด

2.5 ความสัมพันธ์ของกลไกการเปลี่ยนรูปโลหะหนักกับการจัดการสิ่งแวดล้อม

ความสามารถในการต้านทานโลหะหนักของจุลินทรีย์มีพื้นฐานมาจากความสามารถทางพันธุกรรม ปัจจุบันจุลินทรีย์มีการต้านทานโลหะหนักในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นในสิ่งแวดล้อม การพัฒนาเทคนิคที่จะนำคุณสมบัติการต้านทานโลหะหนักมาใช้จึงได้เกิดขึ้นโดยการเรียนรู้เกี่ยวกับกลไกการต้านทานโลหะหนักและนำมาประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ได้ ดังนี้

2.5.1 การบำบัดโลหะหนัก

การลดสารประกอบที่เป็นมลพิษ เช่น สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำเสียและในดินทำได้หลายวิธี ได้แก่ การบำบัดน้ำเสียทางเคมี การบำบัดน้ำเสียทางกายภาพและการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ การบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีความปลอดภัยสูงต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำเสียที่มีองค์ประกอบของน้ำเปลี่ยนไปจากเดิม ทำให้แบคทีเรียสามารถเจริญได้แตกต่างทั้งชนิดและปริมาณ การประยุกต์ใช้แบคทีเรียเพื่อบำบัดโลหะหนัก เรียกว่า Bioremediation มาจากรากศัพท์ของคำว่า Bio (แปลว่าชีวิต) และ Remediate (แปลว่าการแก้ปัญหา) ซึ่งหมายถึง การจัดการของเสียโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพหรือการฟื้นชีวสภาพ ถือว่าเป็นการใช้สิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรีย โปรโตซัว รา และพืช เป็นต้น เพื่อเปลี่ยนแปลงรูปสารมลพิษในสิ่งแวดล้อมในดิน น้ำ และขยะ

โดยทั่วไปการบำบัดโลหะหนักแบบ Bioremediation แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ วิธี *Ex-situ* bioremediation คือการนำดินและน้ำที่มีการปนเปื้อนโลหะที่ต้องการบำบัดออกจากพื้นที่ที่มีการ

ปนเปื้อน และนำไปบำบัดในสถานที่ที่เหมาะสม วิธีนี้หากตัวอย่างดินและน้ำมีปริมาณมากมีข้อเสียคือค่าใช้จ่ายในการขนส่ง และวิธี *In-situ* bioremediation เป็นวิธีมีการบำบัดโลหะหนักในแหล่งที่ปนเปื้อนโดยตรง วิธีเหมาะสำหรับการบำบัดในแหล่งที่มีการปนเปื้อนเป็นบริเวณกว้างแต่มีข้อเสียคือต้องใช้เวลานานและมีกระบวนการจัดการที่ยุ่งยาก และค่าใช้จ่ายสูงเช่นกัน (Madigan, Martinko and Parker. 2003) อย่างไรก็ตามการนำไปประยุกต์ใช้อยู่กับประเภทของระบบบำบัดน้ำเสียที่ใช้รวมถึงสารประกอบในน้ำเสียด้วยเช่นกัน

การบำบัดโลหะหนักโดยจุลินทรีย์ที่มีกลไกการต้านทานโลหะหนัก โดยจุลินทรีย์สามารถเคลื่อนโลหะหนักออกจากน้ำเสียโดยการใช้เซลล์ในการเกิดกลไกดังที่ได้กล่าวข้างต้น การใช้เซลล์แบคทีเรียในการบำบัดโลหะหนักมีได้ 2 แบบ คือ การใช้เซลล์ที่มีชีวิตและการใช้เซลล์ที่ตาย จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการบำบัดโลหะหนักได้แก่ รา แบคทีเรีย และยีสต์ (Bitton, 1994) ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้มาจากการอาศัยหลักการคัดเลือกสิ่งมีชีวิตที่มีคุณสมบัติการต้านทาน (Resistance) หรือทนทาน (Tolerance) ต่อโลหะหนักที่ต้องการบำบัดอยู่แล้วจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนโลหะหนัก ทำให้แบคทีเรียสามารถเจริญและบำบัดโลหะหนักได้ (Zouboulis, Loukidou and Matis. 2004)

2.5.2 การใช้แบคทีเรียเป็นตัวตรวจวัดการปนเปื้อนของสารเคมีอันตราย

การปนเปื้อนของสารเคมีอันตรายส่งผลต่อแบคทีเรียที่ต้องมีการปรับตัวให้สามารถดำรงชีวิตในสภาพที่ไม่เหมาะ เช่น การสร้างเมือกห่อหุ้มเซลล์ การสะสมสารเคมีอันตรายภายในเซลล์ การเปลี่ยนรูปสารเคมีอันตรายให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์หรือลดความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยลง (Madigan, Martinko and Parker. 2003) ตลอดจนนำลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา ทางยีน และคุณสมบัติอื่นๆ ของแบคทีเรียมาเป็นดัชนีวัดปริมาณการปนเปื้อนของสารเคมีอันตรายในสิ่งแวดล้อม เช่น ปรอท และสารหนู (Bontidean et al. 2004; Turpeinen, Kairesalo and Haggblom. 2004) และจากความเจริญทางด้านเทคนิคทางชีวโมเลกุลและการตัดแต่งพันธุกรรมปัจจุบันมีการตัดแต่งยีน เช่น การใช้แบคทีเรียเรืองแสงพวก *Photorhadbus luminescens* หรือการใส่ยีนที่สามารถต้านทานโลหะหนัก เพื่อติดตามและตรวจสอบ (Biosensor) การปนเปื้อนของโลหะหนัก เช่น การใส่ยีน *mer*R จาก Transposon *Tn*21 ที่ทำให้สามารถต้านทานปรอทแก่ *E. coli* เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนปรอทในน้ำและดิน (Hansen and Sorsensen. 2000; Purohit. 2003)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การตื่นตัวทางด้านการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมและปัญหาคุณภาพชีวิตของประชาชน ส่งผลให้มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อมทางด้านยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่มีปริมาณและความหลากหลายของแหล่งที่ศึกษา ชนิดของแบคทีเรีย ยาปฏิชีวนะ และโลหะหนักมากขึ้น

2.6.1 การศึกษาการต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม

การศึกษาการต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียมีวิธีการศึกษา 2 วิธี คือการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการผสมยาปฏิชีวนะและการใช้เทคนิค Antibiotic diffusion assay ซึ่งวิธี Antibiotic diffusion assay เป็นที่นิยมมากกว่า เนื่องจากสามารถตรวจสอบผลการต้านทานได้ละเอียดและมีความถูกต้องแม่นยำมากกว่าการวัดการต้านทานยาปฏิชีวนะจากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะ การเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาปฏิชีวนะเหมาะกับงานวิจัยที่ต้องการศึกษาภาพรวมของการต้านทานยาปฏิชีวนะในแหล่งต่างๆ หลังจากนั้นจึงใช้วิธี Antibiotic diffusion assay และแบคทีเรียที่นำมาทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะจะใช้ใน 2 ลักษณะ คือแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมด กรณีต้องการศึกษาภาพรวมการต้านทานยาปฏิชีวนะทั้งหมด และหากคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่ก่อโรคหรือเป็นตัวตรวจวัดการปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลต่างๆ เช่น *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. และ *E. coli* เป็นต้น ในการศึกษาการต้านทานยาปฏิชีวนะมีรายงานการวิจัยแหล่งเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ สถานพยาบาล ชุมชน โรงงานอุตสาหกรรม ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ฟาร์มเลี้ยงสัตว์และในสิ่งแวดล้อม ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงตัวอย่างรายงานการศึกษาการต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่แยกจากแหล่งต่างๆ

แหล่ง	ชนิดจุลินทรีย์	ยาปฏิชีวนะ	อ้างอิง
สถานพยาบาล	*Acinetobacter* sp.	Vancomycin	Guardabassi et al. 1998
	S. aureus	Vancomycin	Beović. 2006
	Aeromonas sp.	Oxytetracycline	Rhodes et al. 2000
	Acinetobacter spp., *Pseudomonas* spp., *S. aureus*	Vancomycin	Ku¨mmerer. 2004
แหล่งชุมชน	*Enterococci, Staphylococci, Enterobacteriaceac*	Vancomycin	Schwartz et al. 2002
โรงงานอุตสาหกรรม	Heterotrophic bacteria	Streptomycin, Kanamycin	McArthur and Tuckfield. 2000

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	Heterotrophic bacteria	Oxitetracycline Oxolinic acid	Spangaard et al. 1993
	Heterotrophic bacteria	Erytromycin, Nitrofurazone , Oxytetracycline, Chloramphenicol, Tetracycline	Hameed and Balasubramanian. 1999 Hameed et al. 2002
	V. harveyi, *V. splendidus*	Erythromycin, Kanamycin, Penicillin G, Streptomycin	Baticodos et al. 1990 Karunasagar et al. 1994
	Bacillus sp., *Vibrio* sp.	Norfloxacin, Oxolinic Acid, Trimethoprim Sulfamethoxazole	Le, Munekage and Kato, 2005
ฟาร์มเลี้ยงสัตว์	*Enterococcus faecium*, *E. casseliflavus*	Vancomycin	Bustamante et al. 2003
ระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน	Heterotrophic bacteria	Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin, Tetracycline Streptomycin	Baya et al. 1986

2.6.2 การศึกษาการต้านทานโลหะหนักของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม

การต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่มีการศึกษาในแหล่งเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน โดยมีวิธีคือการทดสอบการต้านทานโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งที่ผสมโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ทำการทดสอบโดยการใช้แผ่นกระดาษกรองชุบด้วยโลหะหนักที่ความเข้มข้นต่างๆ (Benyehuda et al. 2003) เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากการทดสอบยาปฏิชีวนะ แบบ Antibiotic diffusion assay ซึ่งไม่นิยมใช้ เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่มีมาตรฐานของวงใสจากการต้านทานที่เกิดขึ้น เป็นที่น่าสังเกตว่าจากรายงานการศึกษาประมาณปี ค.ศ. 1987-1999 และปัจจุบันตั้งแต่ปี ค.ศ 2000 เป็นต้นไป ความเข้มข้นโลหะหนักที่ใช้สูงขึ้น เนื่องมาจากการปนเปื้อนโลหะหนักที่มีสูงขึ้นใน

สิ่งแวดล้อมนั่นเอง โดยมีรายงานการวิจัยแหล่งเก็บจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ ชุมชน โรงงานอุตสาหกรรม การเกษตรกรรม เหมืองแร่และในสิ่งแวดล้อม ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงตัวอย่างรายงานการศึกษาการต้านทานโลหะหนักของแบคทีเรียที่แยกจากแหล่งต่างๆ

แหล่ง	ชนิดจุลินทรีย์	โลหะหนัก	อ้างอิง
ตะกอนเลน	แบคทีเรียแกรมลบ	ปรอท	Reyes, Frischer and Sobecky. 1999
ตะกอนดินแม่น้ำ	*Arthrobacter* spp	ปรอท ตะกั่ว โครเมียม	Benyehuda et al. 2003
น้ำทะเล ตะกอนเลน	*Pseudomonas* sp. *Alcaligenes* sp., *Brevibacterium* sp. *Bacillus* sp.	ปรอท	De and Ramaiah. 2006
น้ำเสีย	Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes	โครเมียม	Branco et al. 2005
สิ่งแวดล้อมทั่วไป	*Bacillus* sp.	ปรอท	Narita et al. 2004
	P. aeruginosa	ทองแดง สังกะสี	Teitzel and Parsek. 2003
น้ำเค็มและน้ำจืด	*Bacillus* sp. Heterotrophic bacteria	ปรอท	Barkay. 1987
อุตสาหกรรม	*Bacillus* sp.	สารหนู	Yamamura et al. 2003
	Heterotrophic bacteria	โครเมียม	Branco et al. 2005
ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	*Bacillus* spp., *E. coli*, *Salmonella sercina*, *Staphylococcus* spp. *Streptococcus* spp	ปรอท	Sadhukhan, Gu and Wong. 1997

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ขุมเหมืองแร่	Heterotrophic bacteria	สังกะสี ทองแดง แคดเมียม เงิน	Piotrowska-Seget et al. 2004
การเพาะปลูกพืช	Heterotrophic bacteria	สังกะสี	Moffett et al. 2002
น้ำดื่ม	*B. cereus*, *E.coli*	แมงกานีส สารหนู	Kanwal et al. 2004

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลมาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมในแบคทีเรียที่สามารถต้านทานต่อโลหะหนักและยาปฏิชีวนะ ทำให้ทราบได้ว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะหรือโลหะหนักหรือไม่ และสามารถยืนยันความสัมพันธ์ของการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักได้เป็นอย่างดี ในรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงยีน ตำแหน่งของยีนและพลาสมิด แต่เทคนิคทางชีวโมเลกุลมีข้อจำกัดในเรื่องงบประมาณและเทคนิคของผู้ปฏิบัติ กรณีที่มีปริมาณตัวอย่างไอโซเลตเชื้อจำนวนมาก จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาโดยวิธีเบื้องต้นคือการเลี้ยงในอาหารที่มีโลหะหนักหรือในกรณีของยาปฏิชีวนะควรทดสอบด้วย Antibiotic diffusion assay ก่อนเมื่อได้ไอโซเลตที่น่าสนใจ จึงทำการทดสอบด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

2.6.3 การศึกษาการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม

ความสามารถในการต้านทานต่อโลหะหนักมีผลต่อความสามารถในกระบวนการต้านยาปฏิชีวนะ เนื่องจากการผ่าเหล่าของยีนหรือการเคลื่อนย้ายยีนที่ต้านยาปฏิชีวนะไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในสิ่งแวดล้อม โดยยีนที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันมีการส่งผ่านยีนโดยกระบวนการ Conjugation ทำให้เกิดการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 2 ชนิด (Spain, 2003) โดยการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม ลักษณะทางสรีรวิทยา และนิเวศวิทยาของสิ่งมีชีวิตในสภาพสิ่งแวดล้อมเป็นพิษได้ (Verma et al. 2000) ความสัมพันธ์ระหว่างการต้านยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของแบคทีเรีย มีรายงานการศึกษาการศึกษาโดย Timony และคณะ (1978) ได้ทำการศึกษาคัดแยกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่สามารถต้านยาปฏิชีวนะและโลหะหนักมีปริมาณสูงในตะกอนดินจาก New York Bight ที่มีปรอทปนเปื้อนสูง (20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าประชากรของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. จะมีสูงกว่าบริเวณที่มีปริมาณโลหะหนักต่ำ ซึ่งแบคทีเรียพวก *Bacillus* sp. สายพันธุ์นี้สามารถต้านทานได้ทั้งยาปฏิชีวนะ Ampicillin และโลหะหนักปรอท สังกะสีและแคดเมียม จากคุณสมบัติดังกล่าวแสดงว่ายีนสำหรับต้านทานปรอทมีความสัมพันธ์ต่อการต้านทานยาปฏิชีวนะ สอดคล้องกับการศึกษาของ Novick และ Roth (1968) รายงานว่าพลาสมิด (Penicillinase plasmids) ของ *S. aureus* ทำให้

ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Erythromycin และโลหะหนัก ปรอท สังกะสี ตะกั่วและแคดเมียม สอดคล้องกับการศึกษาของ Calomiris, Armstrong และ Seidler (1984) รายงานว่าแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกที่แยกจากระบบการผลิตน้ำดื่มสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Kanamycin, Chloramphenicol, Streptomycin, Tetracycline และโลหะหนัก ทองแดง สังกะสีและตะกั่ว และแบคทีเรียสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักได้มากกว่า 1 ชนิด โดยความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Kanamycin มีความสัมพันธ์กับการต้านทานทองแดง สังกะสีและปรอทเช่นกัน

จากรายงานการวิจัยของ Timony และคณะ (1978) Novick และ Roth (1968) และ Calomiris, Armstrong และ Seidler (1984) ซึ่งเป็นช่วงแรกของการศึกษาความสัมพันธ์การต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก ต่อมามีการศึกษาอย่างกว้างขวางมากในปัจจุบันและมีการพัฒนาเทคนิคอื่นๆเข้ามาศึกษาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ เช่น การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล เพื่อศึกษาการปรากฏของพลาสมิดในแบคทีเรียที่ต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก ทำให้สามารถอธิบายและยืนยันความสัมพันธ์ของทั้ง 2 อย่างได้ดียิ่งขึ้น ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงตัวอย่างรายงานการศึกษาความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของแบคทีเรียที่แยกจากแหล่งต่างๆ

แหล่ง	ชนิดจุลินทรีย์	ยาปฏิชีวนะ	โลหะหนัก	ยีน	อ้างอิง
ตะกอนดิน	*Bacillus* sp.	Ampicillin	ปรอท	nd	Timony et al. 1978
	Coliform	Gentamycin, Polymixin-B, Chloramphenicol, Kanamycin, Tetracycline, Bacitracin, Streptomycin	โครเมียม ปรอท	*mer* *ccz* *cnr*	Verma et al. 2000
	โปรโตซัว *Leishmania major*	nd	สังกะสี แคดเมียม	ยีน *P*-glycoproteins	Callahan and Beverley. 1991

ตารางที่ 8 (ต่อ)

น้ำดื่ม	Heterotrophic bacteria	Kanamycin Chloramphenicol Streptomycin Tetracycline	ทองแดง ตะกั่ว ปรอท	nd	Calomiris, Armstrong and Seidler. 1984
น้ำเสีย	โคลิฟอร์มแบคทีเรีย	Kanamycin Chloramphenicol Gentamycin Tetracycline Ampicillin	ปรอท ทองแดง ตะกั่ว สังกะสี	Plasmids ขนาด 3.8-50 kbp	Lasar et al. 2002
Estuary	แบคทีเรียที่ต้านทานโลหะหนัก	Kanamycin Chloramphenicol Gentamycin Tetracycline Ampicillin Streptomycin	โคบอลต์ ปรอท โมลิบดินัม	nd	Allen, Austin and Colwell. 1977
น้ำจืด โรงงานอุตสาหกรรม	Bacterioplankton	Ampicillin Streptomycin Tetracycline	นิเกิล แคดเมียม ปรอท ตะกั่ว	nd	Stepanauskas et al. 2005
	Bacterioplankton	Ampicillin Tetracycline	แคดเมียม นิเกิล	nd	Stepanauskas et al. 2006
สัตว์น้ำ	Bacterioplankton	Colistin Ampicillin Tetracyline Streptomycin	ทองแดง เงิน แมงกานีส แคดเมียม โครเมียม	nd	Pathak and Gopal. 2005
	Salmonella abortusequi *E.coli*	Ampicillin	สารหนู โครเมียม แคดเมียม ปรอท	พลาสมิด	Ghosh, Mahapatra and Banerjee et al. 1997

ตารางที่ 8 (ต่อ)

น้ำจืด	*Aeromonas* spp.	Carbenicillin Erythromycin Streptomycin Cephradine	แคดเมียม	nd	Miranda and Zemelman. 2001

2.6.4 งานวิจัยด้านการบำบัดโลหะ

การบำบัดโลหะหนักในปัจจุบันนิยมใช้วิธีการทางชีวภาพมากขึ้นโดยทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากแหล่งที่มีการปนเปื้อนโลหะหนัก เช่น โรงงานอุตสาหกรรม ชุมชน และขุมเหมืองแร่ ชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการบำบัดโลหะหนักที่นิยมใช้ในการบำบัดโลหะหนักคือ *Bacillus* sp. เนื่องจากเป็นแบคทีเรียแกรมบวกสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี เช่น อุณหภูมิ สารเคมี และสามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ *S. cerevisiae*, *Pseudomonas* sp. *Rhizopus arrhizus* และ *Aspergillus niger* (Dursun, Cuci, and Ekiz. 2003) เนื่องจากจุลินทรีย์ดังกล่าวมีความสามารถในการต้านทานโลหะหนักที่มีปริมาณสูงกว่าปกติได้ดี ในรูปของเซลล์ที่มีชีวิตหรือเซลล์ที่ไม่มีชีวิต โดยเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตสามารถบำบัดโลหะหนักได้ดีกว่าเซลล์ที่ไม่มีชีวิต จากความสามารถดังกล่าวนำมาสู่การใช้ประโยชน์ในการบำบัดโลหะหนัก ในรูปแบบต่างๆ เช่น การเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีโลหะหนัก แบบ Sequencing batch reactor (SBR) (Sirianuntapiboon and Hongsrisuwan. 2006) และการทดลองการบำบัดในคอลัมน์ดิน เป็นต้น มีรายงานการวิจัยการทดสอบการบำบัดในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย (ตารางที่ 9) เนื่องจากการตระหนักถึงปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนัก ซึ่งส่งผลต่อชีวิตความเป็นอยู่ของประชาชน

2.6.5 การใช้แบคทีเรียเป็นตัวตรวจวัดการปนเปื้อนของสารเคมีอันตราย

ในอดีตการตรวจสอบการปนเปื้อนสารเคมีอันตรายต่างๆ เช่น โลหะหนัก สามารถทำได้โดยการตรวจวัดด้วยวิธีทางเคมี คือการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก เช่น เครื่อง Atomic Absorption Spectrometer (AAS) ที่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ ยุ่งยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง แต่ปัจจุบันจากความสามารถในการต้านทานโลหะที่สามารถแสดงออกมาในรูปของการเจริญเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีโลหะหนัก หรือการทดสอบโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม เช่น การสร้างพลาสมิด ทำให้สามารถใช้แบคทีเรียเป็นตัวตรวจสอบการปนเปื้อนได้เช่นกัน

ตารางที่ 9 สรุปการใช้จุลินทรีย์ที่ต้านทานโลหะหนักในการบำบัดโลหะหนัก

แหล่ง	จุลินทรีย์	ชนิดโลหะหนัก	อ้างอิง
โรงงานอุตสาหกรรม	Zooglea ramigera, Trichoderma viride, *Chlorella vulgaris, Aspergillus niger*	ทองแดง ปรอท	Bitton. 1994
	Pecicillium spinulosum	สังกะสี แคดเมียม	Bitton. 1994
โรงงานแปรรูปไม้	*B. licheniformis*	ทองแดง สารหนู	Clausen. 2000
ดิน	*Bacillus sp.* ATS-2	ตะกั่ว	Cabuk et al. 2005
	B. circulans EB1	ทองแดง สังกะสี	Yilmaz. 2003
น้ำเสีย	*P. aeruginosa* (PU21*)* ,*P. putida*	ปรอท	Malik. 2004, Canstein et al. 1999
	S. cerevisiae	ทองแดง	Malik. 2004
ห้องปฏิบัติการ	*E. coli*	ปรอท	Bae et al. 2003
	E. coli, P. aeruginosa, B. subtilis, B. cereus	ทองแดง แคดเมียม เงิน	Mullen et al. 1989
	B.subtilis WD 90, *B. subtilis* SM 29, *Enterobacter agglomerans* SM 38	นิเกิล แคดเมียม	Kaewchai and Prasertsan. 2002
	Bacillus sp.	สังกะสี ทองแดง	Costa and Duta. 2001
	S. cerevisiae	สังกะสี	ผกาวดี และ กรรณิการ์. 2542

Bontidean และคณะ (2004) ศึกษาการปนเปื้อนของปรอทโดยการใช้แบคทีเรียและโปรตีนที่จับโลหะหนักในแบคทีเรียและถั่วเป็นตัวตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของปรอทในดินเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์โดยใช้ Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) พบว่าเซลล์แบคทีเรียและลำดับโปรตีนตอบสนองต่อปริมาณปรอทในดินได้ดีกว่าถั่ว

Turpeinen, Kairesalo และ Haggblom (2004) ศึกษาการใช้แบคทีเรียเป็นตัวตรวจวัดระดับความเข้มข้นของโลหะหนักและผลกระทบที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรีย โดยใช้เทคนิค t-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphisms) ในการวิเคราะห์ยีนส่วน 16S rRNA และ Phospholipid fatty acid (PLFA) พบว่าการใช้ PLFA สามารถจำแนกแบคทีเรียที่ต้านทานสารหนู ได้แก่ *Acinetobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Sallmonella* และ *Serratia* ส่วนวิธี t-RFLP ไม่สามารถอธิบายชุมชนของแบคทีเรียเพราะโดยทั่วไปมักปรากฏแบคทีเรียที่มีลักษณะเด่นชนิดใหม่ๆในแหล่งที่มีการปนเปื้อน

ในการศึกษาครั้งนี้ต้องการศึกษาการต้านต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิก ในน้ำทิ้งจากชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรม โรงพยาบาล และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ที่ปล่อยลงสู่ทะเลสาบสงขลาในพื้นที่จังหวัดสงขลาและขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า จังหวัดนครศรีธรรมราช โดยใช้แบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกเป็นตัวตรวจวัดปริมาณการปนเปื้อนโลหะหนักและยาปฏิชีวนะ เพื่อเป็นการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบคุณภาพน้ำในแหล่งต่าง ๆ อีกทั้งยังทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถสูงในการต้านทานต่อโลหะหนัก เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการบำบัดโลหะหนักในน้ำเสีย เป็นวิธีการกำจัดสารเคมีอันตรายโดยวิธีทางชีวภาพ ซึ่งได้รับความสนใจในปัจจุบัน เนื่องจากมีความปลอดภัยสูง ตลอดจนการวิเคราะห์คุณภาพน้ำและปริมาณโลหะหนัก เพื่อนำข้อมูลเปรียบเทียบคุณภาพการใช้แบคทีเรียเป็นตัวตรวจวัดกับวิธีการวิเคราะห์ทางเคมี ประโยชน์ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ คือจะทราบถึงแหล่งที่มาของสารปนเปื้อนโลหะหนักและยาปฏิชีวนะ เพื่อเป็นแนวทางการป้องกันและลดผลกระทบโดยแก้ปัญหาจากแหล่งที่มาของสารปนเปื้อนโดยตรง และเป็นการนำแบคทีเรียมาใช้ในการบำบัดโลหะหนักต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1.1 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี

3.1.1.1 อุปกรณ์ตรวจวัด Multi Parameter Probe รุ่น 600 QS ร่วมกับเครื่อง Multi Parameter Display System รุ่น 650 MDS (YSI, USA)

3.1.1.2 ขวดเก็บตัวอย่างพลาสติกความจุ 2 ลิตร

3.1.1.3 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)

3.1.1.4 เทอร์โมมิเตอร์

3.1.1.5 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง ความขุ่น ความเค็ม และค่าการนำไฟฟ้า (Sartorius, PP50, Germany)

3.1.2 การศึกษาทางจุลชีววิทยา

3.1.2.1 Ultrasonicator (Kubota, Insonator 201M, Japan)

3.1.2.2 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (Optima, WB-710M, USA)

3.1.2.3 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (WTB binder, Germany)

3.1.2.4 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus BX51, Japan)พร้อมกล้องถ่ายภาพแบบ CCD (Olympus DP70, Japan)

3.1.2.6 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) (Faster, BHA48, Italy)

3.1.2.7 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (LaboMed, Spectro 22, USA)

3.1.2.8 เครื่องเขย่า (Shaker) (IKA-VIBRAX-VXR, Germany)

3.1.2.9 แผ่นสไลด์ แผ่นกระจกปิดสไลด์

3.1.2.10 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (OHAUS, ARB120, USA)

3.1.2.11 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO, AB304-S, Switzerland)

3.1.2.12 เครื่องมือวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (Vernia caliper)

3.1.2.13 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) (Jouan, B4i, Germany)

3.2 วัสดุ

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA)

ประกอบด้วย Peptone 17 กรัม Soya peptone or Phytone 3 กรัม K_2HPO_4 2.5 กรัม NaCl 5 กรัม D-Glucose 2.5 กรัม วุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร

3.2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller – Hinton Agar (MHA)

ประกอบด้วย Beef Extract 2 กรัม Acid Hydrolysate of Casein 17.5 กรัม Starch 1.5 กรัม วุ้น 17 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร

3.2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสารละลายเปปโตนร้อยละ 1

ประกอบด้วย Peptone 10 กรัม (Merck, Germany) และน้ำกลั่น 1 ลิตร

3.2.2 แผ่นดิสก์ยาปฏิชีวนะมาตรฐาน 4 ชนิด คือ ได้แก่ Streptomycin 10 μg, Kanamycin 30 μg, Tetracycline 30 μg และ Chloramphenicol 30 μg (OXOID, England)

3.2.3 สารเคมี

3.2.3.1 กรดไนตริกเข้มข้นร้อยละ 65

3.2.3.2 สารประกอบโลหะหนัก ได้แก่ $CuSO_4.7H_2O$, $FeSO_47H_2O$, $ZnSO_4.7H_2O$ และ $HgCl_2$ (Merck, Germany)

3.2.3.3 สารละลายโลหะหนักมาตรฐาน ได้แก่ Fe^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} และ Hg^{2+} ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (Merck, Germany)

3.2.3.4 สารเคมีสำหรับการย้อมสีแบบแกรมและเอนโดสปอร์ ได้แก่ Crystal violet, Safanin O, Gram iodine และ Malachite green

3.3 วิธีการศึกษา

3.3.1 การเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมี

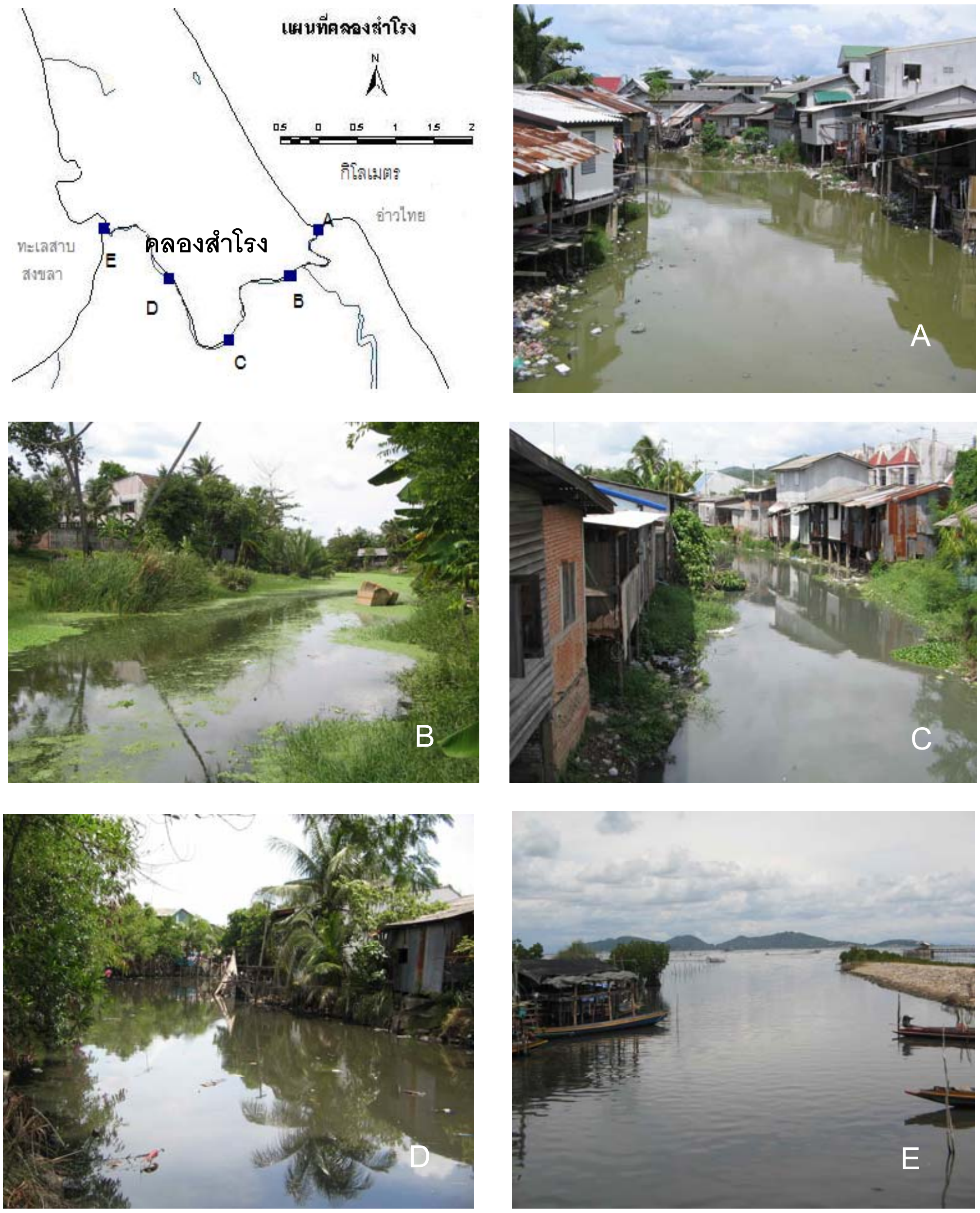
3.3.1.1 รายละเอียดจุดเก็บตัวอย่างจาก 4 แหล่ง คือ

1) แหล่งชุมชน เก็บตัวอย่าง ณ คลองสำโรง เป็นคลองแบ่งเขตแดนของเทศบาลนครสงขลากับองค์การบริหารส่วนตำบล (อบต.) เขารูปช้าง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา เป็นคลองที่เชื่อมทะเลสาบสงขลากับอ่าวไทย มีบ้านเรือนประมาณ 700 หลังคาเรือนและโรงงานอุตสาหกรรมประมาณ 10 โรง ทำการเก็บตัวอย่างดินและน้ำแหล่งชุมชนจากคลองสำโรง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา บริเวณที่เก็บตัวอย่าง 5 จุด คือ ชุมชนเก้าเส้ง คลองบริเวณแยกสำโรง โรงงานคิงฟิชเชอร์ โฮลดิ้ง จำกัด ชุมชนริมคลองสำโรงและทางออกสู่ทะเลสาบสงขลา (ภาพที่ 1)

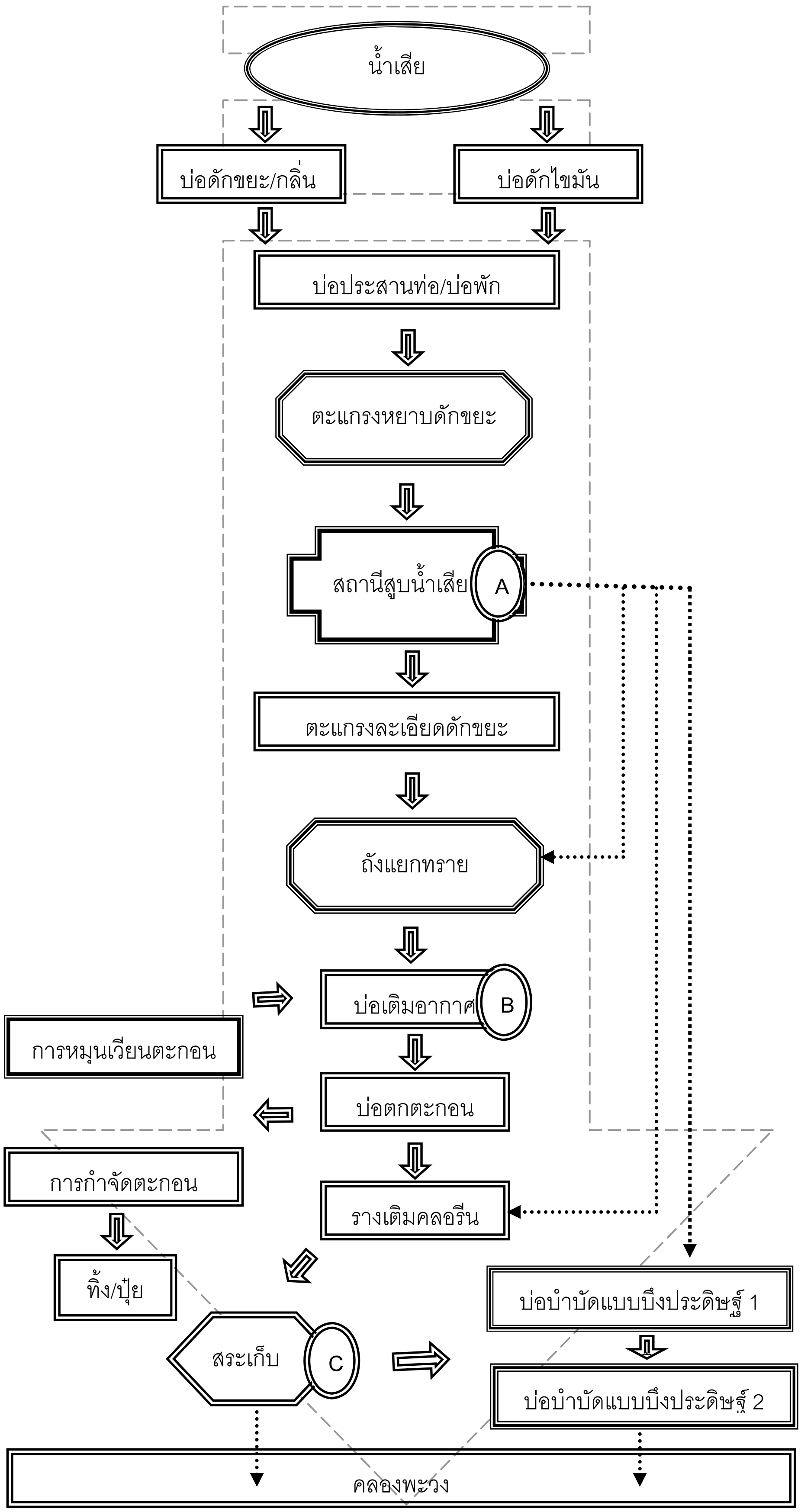
2) โรงพยาบาล เก็บตัวอย่าง ณ โรงพยาบาลสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา ระบบบำบัดน้ำเสียของโรงพยาบาลเป็นแบบตะกอนเร่งชนิด Extended aeration activated sludge system ซึ่งเป็นระบบบำบัดน้ำเสียที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดสูง โดยน้ำเสียมาจาก 3 แหล่งกำเนิด คือ น้ำเสียจากส่วนของอาคารของโรงพยาบาล น้ำเสียจากอาหารบ้านพัก และน้ำเสียจากอาคารศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยระบบบำบัดมีความสามารถในการบำบัดน้ำเสียได้สูงประมาณ 1,200 ลูกบาศก์เมตรต่อวัน โครงสร้างระบบบำบัดน้ำเสียเริ่มต้นด้วยการรวบรวมน้ำเสียจากส่วนต่างๆ ท่อที่ออกมาจากครัวจะปล่อยให้ไหลเข้าถังดักไขมัน เพื่อแยกเอาไขมันและน้ำมันออก น้ำเสียจากท่อทั้งหมดจะไหลผ่านสถานีสูบน้ำเสีย เพื่อยกระดับน้ำเสียขึ้น แล้วไหลผ่าน Aerated grit chamber และ Pre-aeration tank เพื่อแยกทรายออกจากน้ำเสียและกำจัดสารอินทรีย์และสารแขวนลอยออก เข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียแบบชีวภาพประกอบด้วยถังเติมอากาศ (Aeration tank) และถังตกตะกอน (Clarifier) หลังจากนั้นจะไหลล้นเข้าถังเติมคลอรีนเพื่อกำจัดเชื้อโรค ต่อจากนั้นจะปล่อยลงสู่บ่อเก็บน้ำเพื่อให้คลอรีนสลายตัว และไหลลงสู่คลองสาธารณะต่อไป (ภาพที่ 2) ในการศึกษาครั้งนี้แบ่งการเก็บตัวอย่างเก็บทั้งหมด 3 จุด ย่อยคือ น้ำทิ้งดิบที่ยังไม่ผ่านการบำบัด น้ำทิ้งในถังเติมอากาศ และน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดและใส่คลอรีน (ภาพที่ 3)

3) ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เก็บตัวอย่าง ณ โชคศิริฟาร์ม หมู่ที่ 5 ตำบลปากแตระ อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา มีเนื้อที่ทั้งหมดประมาณ 30 ไร่ โดยมีการเพาะเลี้ยงกุ้งแบบความหนาแน่นสูง (Super intensive) อัตราความหนาแน่นของกุ้งขาว 1.8 - 2.0 ล้านตัวต่อบ่อ (บ่อขนาด 3 ไร่) มีการเพาะเลี้ยงกุ้งในบ่อ 2 แบบ คือ บ่อดิน และบ่อปูพื้นด้วยพลาสติกสีดำ การใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงใช้ในช่วง 1-2 แรกของการเลี้ยง ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ Norfloxacin และ Oxytetracyclin ซึ่งโดยเฉพาะยาปฏิชีวนะ Norfloxacin และ Oxytetracyclin มีการใช้ในการป้องกันและรักษาโรคเรืองแสงในกุ้งระยะ 1 เดือนแรกของการเลี้ยง และหลังจากนั้นไม่มีการใช้ยาปฏิชีวนะอีก แบ่งจุดเก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง 4 จุด คือ บ่อดินในช่วงเตรียมบ่อก่อนการเลี้ยง บ่อดินที่มีการเลี้ยงกุ้งขาว อายุ 100 วัน บ่อปูพื้นที่มีการเลี้ยงกุ้งขาว อายุ 100 วัน และบ่อพักน้ำก่อนปล่อยเข้าสู่บ่อกุ้ง (ภาพที่ 4) โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำบ่อละ 3 จุด คือ กลางบ่อ 1 จุด มุมบ่อ 2 จุดในแนวเส้นทแยงมุมเดียวกัน (ภาพที่ 5)



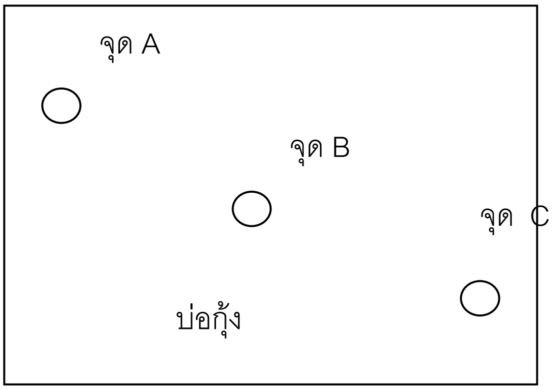
ภาพที่ 1 แสดงแผนที่และภาพถ่ายคลองสำโรง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา จุดเก็บตัวอย่างแหล่งชุมชน 5 จุด คือ ชุมชนเก้าเส้ง (A) คลองบริเวณแยกสำโรง (B) ชุมชนริมคลองสำโรง (C) โรงงานคิงฟิชเชอร์ โฮลดิ้ง (D) และทางออกสู่ทะเลสาบสงขลา (E)



ภาพที่ 2 แสดงแผนผังระบบบำบัดน้ำเสียของโรงพยาบาลแบบตะกอนเร่งชนิด Extended aeration activated sludge system ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ น้ำทิ้งดิบที่ยังไม่ผ่านการบำบัด (A) น้ำทิ้งในถังเติมอากาศ (B) และน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัด (C)

ภาพที่ 3 แสดงภาพถ่ายจุดเก็บตัวอย่างระบบบำบัดน้ำเสียของโรงพยาบาลสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา แบบตะกอนเร่งชนิด Extended aeration ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ น้ำทิ้งดิบที่ยังไม่ผ่านการบำบัด (A) น้ำทิ้งในถังเติมอากาศ (B) และน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัด (C)

ภาพที่ 4 แสดงภาพถ่ายจุดเก็บตัวอย่างฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาว หมู่ที่ 5 ตำบลปากแตระ อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา ประกอบด้วยจุดเก็บตัวอย่างบ่อปูพื้นด้วยพลาสติก (A) บ่อดิน (B) และบ่อพักน้ำก่อนเลี้ยง (C)



ภาพที่ 5 แสดงแผนผังจุดเก็บตัวอย่างน้ำจากฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของบ่อปูพื้นพลาสติกและบ่อดิน ในการเลี้ยงกุ้งบ่อละ 3 จุด คือ มุมบ่อจุดที่ 1 (A) กลางบ่อจุดที่ 2 (B) และมุมบ่อจุดที่ 3 (C) ในแนวเส้นทแยงมุมเดียวกันของบ่อ

4) ขุมเหมืองแร่เก่า เก็บตัวอย่าง ณ ขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า หมู่ที่ 2 ตำบลหินตก อำเภอร่อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราช (ภาพที่ 6)

ภาพที่ 6 แสดงภาพถ่ายจุดเก็บตัวอย่างขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า ณ หมู่ที่ 2 ตำบลหินตก อำเภอร่อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราช

3.3.1.2 วิธีการเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก 4 แหล่ง คือ แหล่งชุมชน ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โรงพยาบาล และขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า โดยสุ่มเก็บน้ำที่ระดับความลึกประมาณ 30 เซนติเมตร (Sub-surface) ประมาณ 250 มิลลิลิตร ตัวอย่างน้ำที่เก็บใส่ภาชนะที่มีฝาปิด และผ่านการฆ่าเชื้อ สำหรับตัวอย่างที่ต้องวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักให้เติมด้วย HNO_3 เพื่อช่วยละลายโลหะป้องกันการตกผลึก ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้น้อยกว่า 2 และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ ติดฉลากบอกรายละเอียดให้ชัดเจนถึงสถานที่เก็บ วัน เวลา สภาพของน้ำ ชื่อผู้เก็บ และวิธีการเก็บรักษา

3.3.1.3 วิเคราะห์คุณภาพน้ำ

วิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ สี กลิ่น และ วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี ได้แก่ ปริมาณโลหะหนัก คือ เหล็ก สังกะสี และทองแดง ด้วยวิธี Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) โดย Optical Emission Spectrometer (Optima 4300 DV) Perkins Elmer Instruments ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับปรอทไม่ได้วิเคราะห์ เนื่องจากพบว่าตัวอย่างที่ทำการเก็บมาแล้วมีปริมาณการปนเปื้อนในระดับต่ำจนไม่สามารถวิเคราะห์ได้ ส่วนค่าความเป็นกรดด่าง และความเค็มโดยเครื่อง Multi-parameter display system รุ่น 650 MDS ร่วมกับอุปกรณ์ตรวจวัด Multi-parameter probe รุ่น 600 QS สามารถทำการวัดคุณภาพน้ำในภาคสนามได้ทันที มีความถูกต้องและแม่นยำสูง

3.3.2 การศึกษาทางด้านจุลชีววิทยา

เก็บตัวอย่างน้ำเพื่อทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมในการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก ตามวิธีข้อ 3.3.2.1 คัดเลือกจุดเก็บตัวอย่างและศึกษาการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักในช่วงฤดูกาลแตกต่างกัน คือ ช่วงฤดูฝนและฤดูร้อน นำไปตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมดและสุ่มตัวอย่างแบคทีเรีย ตามวิธีการข้อ 3.3.2.2 เพื่อทดสอบความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะวิธี Antibiotic diffusion assay และการต้านทานโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามวิธีการข้อ 3.3.2.3 และ การเตรียมเซลล์แบคทีเรียและการทดสอบความสามารถในการเจริญในสารละลายเปปโตน ร้อยละ 1 ตามวิธีการข้อ 3.3.2.4 การทดสอบการดูดซับโลหะหนักโดยเซลล์แบคทีเรียที่ต้านทานโลหะหนัก ตามวิธีการข้อ 3.3.2.5 การทดสอบชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในบำบัดโลหะมีวิธีย่อย 2 แบบ คือ ย้อมสีแบบแกรม และย้อมเอนโดสปอร์ ตามวิธีการข้อ 3.3.2.6 ตามลำดับ

3.3.2.1 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก

การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 0, 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร นำตัวอย่างน้ำเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TSA โดยวิธี Pour plate ในอาหารที่มียาปฏิชีวนะ จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ Streptomycin และ Kanamycin ที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร สังเกตและนับจำนวนโคโลนีที่เจริญได้ และทดสอบการต้านทานโลหะหนัก คือ สังกะสีและทองแดง นำตัวอย่างน้ำเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TSA โดยวิธี Pour plate ในอาหารที่มีโลหะหนักในรูปของไอออน ได้แก่ Fe^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} และ Hg^{2+} ที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร สังเกตและนับจำนวนโคโลนีที่เจริญได้

3.3.2.2 การศึกษาเบื้องต้นของการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก

การคัดเลือกจุดเก็บตัวอย่าง นำตัวอย่างน้ำเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TSA โดยวิธี Pour plate ในอาหารที่มียาปฏิชีวนะ จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ Streptomycin, Kanamycin, Tetracycline และ Chloramphenicol ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ของยาปฏิชีวนะที่ได้จากผลการศึกษาข้อ 3.2.1) สังเกตและนับจำนวนโคโลนีที่เจริญได้ และทดสอบการต้านทานโลหะหนัก นำตัวอย่างน้ำเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TSA โดยวิธี Pour plate ในอาหารที่มีโลหะหนักในรูปของไอออน ได้แก่ Fe^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} และ Hg^{2+} ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ของโลหะหนักที่ได้จากผลการศึกษาข้อ 3.2.1) สังเกตและนับจำนวนโคโลนีที่เจริญได้

การนับจำนวนและคัดเลือกจุลินทรีย์ตัวแทนเพื่อทำการทดสอบความสามารถในหาการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก โดยนำตัวอย่างน้ำจากแหล่งชุมชน ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โรงพยาบาล และขุมเหมืองแร่ดีบุก ที่มีการทดสอบปริมาณจุลินทรีย์ที่สามารถต้านทานโลหะหนักและยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TSA โดยวิธี Pour plate ตรวจนับจำนวนโคโลนีทั้งหมด และสุ่มโคโลนีด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ทำการย้อมสีแกรมและแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เก็บเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเอียงสูตร TSA เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

3.3.2.3 การทดสอบความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะวิธี Antibiotic diffusion assay และการต้านทานโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะ จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ Streptomycin, Kanamycin, Tetracycline และ Chloramphenicol บนอาหารแข็งโดยวิธี Antibiotic diffusion assay ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Tendercia และ Leobert (2001) นำแบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.2.1

เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tryptic Soy Both (TSB) และนำมาเกลี่ยให้ทั่วบนอาหาร MHA และวางแผ่นดิสก์ยาปฏิชีวนะมาตรฐาน 4 ชนิด ได้แก่ Streptomycin 10 μg, Kanamycin 30 μg, Tetracycline 30 μg และ Chloramphenicol 30 μg (OXOID, England) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งด้วยเวอร์เนีย (Vernier) และนำมาเทียบกับค่าความสามารถในการต้านทานกับตารางมาตรฐาน (ภาคผนวก ก)

การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อโลหะหนักในรูปของไอออน ได้แก่ Fe^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} และ Hg^{2+} ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ดัดแปลงจากวิธีของ Verma และคณะ (2000) นำแบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.2.2 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวสูตร TSB และนำมาเลี้ยงบนอาหารแบบแข็งสูตร TSA ที่มีโลหะหนักแต่ละชนิดผสมอยู่ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ตรวจสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.2.4 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียและการทดสอบความสามารถในการเจริญในสารละลายเปปโตน ร้อยละ 1

จากผลคัดเลือกแบคทีเรียซึ่งมีความสามารถในการต้านทานโลหะหนักที่ 100 มิลลิกรัมต่อลิตรและนำมาสู่การเตรียมเซลล์แบคทีเรีย เพื่อทดสอบความสามารถในการเจริญในสารละลายเปปโตน ร้อยละ 1 และคัดเลือกไอโซเลตที่เจริญได้ดีจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไป เนื่องจากการทดสอบการบำบัดโลหะหนักต้องใช้สารละลายเปปโตน ร้อยละ 1 เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงปริมาณโลหะหนักในอาหารเลี้ยงแบบเหลว ดังนี้

1) การเตรียมเซลล์แบคทีเรีย

นำแบคทีเรียคัดเลือกได้จากความสามารถในการต้านทานโลหะหนักที่ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มาจำนวน 1 ลูป แกว่งลงใน 100 มิลลิลิตรของ TSB เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำการหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บเซลล์แบคทีเรีย และล้างเซลล์ด้วยร้อยละ 0.85 NaCl 2 ครั้ง ปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่ระดับความขุ่น 0.5 ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเก็บได้ 3-7 วัน

2) การทดสอบความสามารถในการเจริญในสารละลายเปปโตน ร้อยละ 1

นำสารละลายเซลล์ที่เตรียมได้มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายเปปโตนร้อยละ 1 ที่มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 7 และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธีการวัดค่า

ความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ระยะเวลา 0, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง

3.3.2.5 การทดสอบการบำบัดโลหะหนัก

ดัดแปลงจากวิธีการของ Kaewchai และ Prasertsan (2002) มีวิธีการดังนี้ นำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.3.2.4 และเตรียมเซลล์ที่ระดับความขุ่น 0.5 ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปริมาตร 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.4) ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุสารละลายเปปโตนร้อยละ 1 และสารละลายมาตรฐานโลหะหนักในรูปของไอออน ได้แก่ เหล็ก (Fe^{2+}), สังกะสี (Zn^{2+}), ทองแดง (Cu^{2+}) และปรอท (Hg^{+}) ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (การเตรียมสารละลายเปปโตนร้อยละ 1 ผสมโลหะหนักสามารถฆ่าเชื้อด้วยการเข้าหม้อนึ่งความดันไอได้ โดยที่โลหะหนักไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส เพื่อแยกสารละลายออกจากเซลล์แบคทีเรีย และนำสารละลายส่วนใสประมาณ 50 มิลลิลิตร เติมด้วยกรดไนตริกเข้มข้นร้อยละ 65 ปริมาณ 2-5 มิลลิลิตรต่อลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก ด้วยวิธี Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) โดย Optical Emission Spectrometer (Optima 4300 DV) Perkin Elmer Instruments และคำนวณร้อยละการเคลื่อนย้ายโลหะหนัก โดยเปรียบเทียบจากปริมาณความเข้มข้นของโลหะตั้งต้นกับปริมาณความเข้มข้นที่เปลี่ยนไปในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.2.6 การทดสอบชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในบำบัดโลหะหนักเบื้องต้นด้วยวิธีการย้อมสีแบบแกรมและการย้อมเอนโดสปอร์

นำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการบำบัดโลหะหนักที่ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จากข้อ 3.3.2.5 ทั้งหมดมาทดสอบชนิดของแบคทีเรียเบื้องต้น คือ ขั้นตอนแรกการย้อมสีแบบแกรม และขั้นตอนที่ 2 การย้อมสีเอนโดสปอร์

1) การย้อมสีแบบแกรม (Gram stain)

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.2.5 บนอาหารแข็งสูตร TSA อีกครั้ง บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้เกลี่ยลงบนสไลด์ ทำการย้อมสีแบบแกรมโดยใช้วิธีมาตรฐานของ APHA (1992) เพื่อการติดสีแกรมบวกหรือแกรมลบและลักษณะรูปร่าง

2) การย้อมสีเอนโดสปอร์

นำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกได้จากการทดสอบด้วยเทคนิคการย้อมแกรม มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนโดสปอร์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติเด่นของแบคทีเรียชนิด *Bacillus* spp. ที่สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ นำเชื้อที่ได้เกลี่ยลงบนสไลด์ และนำสไลด์ผ่านการตรึงเซลล์ด้วยเปลวไฟ 2-3 ครั้ง ทำการย้อมสีเอนโดนสปอร์โดยใช้วิธีการมาตรฐานของ APHA (1992)

3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การเปรียบเทียบร้อยละในการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักทางสถิติแบบ T-test แบบ Paired Samples Test โดยจับคู่ความสัมพันธ์ร้อยละในการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของแบคทีเรียในแหล่งเก็บตัวอย่างทั้ง 4 แหล่ง คือ แหล่งชุมชน โรงพยาบาล ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การประยุกต์ใช้คุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะในการตรวจสอบผลกระทบของการปนเปื้อนโลหะหนักต่อความหลากหลายของจุลินทรีย์ เริ่มต้นจากการศึกษาคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีบางประการ และการศึกษาทางจุลชีววิทยา คือ ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการต้านทานยาปฏิชีวนะ (Streptomycin และ Kanamycin) และต้านทานต่อโลหะหนัก (สังกะสี และทองแดง) ต่อมาได้ทำการศึกษาความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะจำนวน 4 ชนิด คือ Streptomycin, Kanamycin, Tetracycline และ Chloramphenicol และโลหะหนัก จำนวน 4 ชนิด คือ เหล็ก สังกะสี ทองแดง และปรอท และศึกษาความสามารถในการบำบัดโลหะหนัก จากแหล่งเก็บตัวอย่าง 4 แหล่ง คือ 1) ชุมชน 2) โรงพยาบาล 3) ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และ 4) ขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า เก็บตัวอย่าง 3 ครั้ง คือ ครั้งที่ 1 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักและเป็นการสำรวจจุดเก็บตัวอย่างเบื้องต้น เพื่อคัดเลือกหาจุดเก็บตัวอย่างย่อยที่เหมาะสมในแต่ละแหล่ง (ช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2547 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2548) ครั้งที่ 2 เก็บตัวอย่างในช่วงฤดูฝน (เดือนกันยายนถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2548) ครั้งที่ 3 เก็บตัวอย่างในช่วงฤดูร้อน (เดือนเมษายน พ.ศ. 2549) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างและหาความสัมพันธ์ในการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักระหว่างช่วงฤดูฝนกับช่วงฤดูร้อน ปรากฏผลการศึกษาดังนี้

4.1 ผลการศึกษาเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก

การทดสอบเบื้องต้นของความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะสองชนิด คือ Streptomycin และ Kanamycin และโลหะหนักสองชนิด คือ สังกะสี และทองแดง ที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยได้เลือกชนิดและความเข้มข้นของทั้งยาปฏิชีวนะและโลหะหนักโดยคำนึงถึงโอกาสและปริมาณการปนเปื้อนในแหล่งที่มีชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรมด้วยเช่นกัน ทำการคัดเลือกแหล่งเก็บตัวอย่างที่รองรับน้ำเสียจากแหล่งต่างๆ ทั้งจากชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรม คือ คลองสำโรง เขตเทศบาลนครสงขลา (ภาพที่ 1) วัตถุประสงค์สำคัญของการศึกษาขั้นแรกนี้เพื่อจะทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมเพียงค่าเดียวของยาปฏิชีวนะและโลหะหนักดังกล่าว เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

ผลการศึกษาพบว่าการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของแบคทีเรียจากน้ำทิ้ง จากการทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Streptomycin และ Kanamycin ที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแบคทีเรียสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะมีปริมาณสูงกว่าการทดสอบในอาหารสูตร TSA ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ โดยบริเวณจุดเก็บตัวอย่างชุมชนเก้าเส้ง มีปริมาณแบคทีเรียที่ต้านยาปฏิชีวนะ Streptomycin และ Kanamycin ที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ $2.5x10^5$, $3.0x10^5$-$3.5x10^5$, $2.5x10^5$-$3.2x10^5$, $2.5x10^5$ -$3.0x10^5$ และ $2.0x10^5$ -$2.8x10^5$ CFU/ml ตามลำดับ รองลงมาคือ โรงงานคิงฟิชเชอร์ โฮลดิ้ง และทางออกสู่ทะเลสาบ พบว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะ Streptomycin และ Kanamycin ที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ $1.3x10^5$-$1.4x10^5$, $1.5x10^5$-$2.5x10^5$, $1.5x10^5$-$2x10^5$, $1.5x10^5$-$2.2x10^5$ และ $1.2x10^5$-$2x10^5$ CFU/ml ตามลำดับ รองลงมาคือชุมชนริมคลองสำโรงและแยกสำโรงมีปริมาณการต้านทาน ยาปฏิชีวนะ Streptomycin และ Kanamycin ที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร อยู่ในช่วง $2x10^4$-$9x10^4$, $1.0x10^4$-$6x10^4$, $7x10^3$-$6x10^4$, 0-$5x10^4$ และ 0-$4x10^4$ CFU/ml ตามลำดับ

จากการทดสอบการต้านทานต่อโลหะหนักสังกะสี และทองแดง ที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าโดยจุดเก็บตัวอย่างที่มีชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรม คือ โรงงานคิงฟิชเชอร์ โฮลดิ้งและทางออกสูทะเสสาบ แบคทีเรียสามารถต้านทานต่อสังกะสีและทองแดงที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ $1.3x10^5$-$1.4x10^5$, $1x10^5$-$2.7x10^5$, $9x10^4$-$1.8x10^3$, $1.2x10^5$-$2.2x10^5$ และ $7.0x10^4$-$1.30x10^3$ CFU/ml ตามลำดับ จุดเก็บตัวอย่างชุมชนเก้าเส้ง แยกสำโรงและชุมชนริมคลองสำโรง ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียที่ต้านทานต่อทองแดงและสังกะสี ที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ $2.0x10^4$-$2.5x10^5$, $8x10^3$-$2x10^5$, $7x10^4$-$1.7x10^5$, $4x10^4$-$1x10^5$ และ $4x10^4$-$1.4x10^5$ CFU/ml ตามลำดับ

แบคทีเรียสามารถต้านทานต่อโลหะหนักและยาปฏิชีวนะมีปริมาณสูงกว่าการทดสอบในอาหารสูตร TSA ที่ไม่ใส่โลหะหนักอย่างชัดเจน ซึ่งเมื่อคำนวณค่าปริมาณของแบคทีเรียเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมดที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่และไม่ใส่ยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยคิดเป็นค่าร้อยละของปริมาณที่พบ ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณของแบคทีเรียเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมดที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่และไม่ใส่ยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยคิดเป็นค่าร้อยละของปริมาณที่พบจากจุดเก็บตัวอย่างแหล่งชุมชนของคลองสำโรง

สารเคมีอันตราย	จุดเก็บตัวอย่าง	Control (CFU/ml)	ร้อยละของปริมาณแบคทีเรียที่ต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักเปรียบเทียบกับ Control ความเข้มข้น (mg/L)			
			25	50	100	200
Streptomycin	1) ชุมชนเก้าเส้ง	$2.5x10^5$	>100	100	>100	80
	2) บริเวณแยกสำโรง	$2.0x10^4$	50	35	25	15
	3) โรงงานคิงฟิชเชอร์	$1.3x10^5$	>100	>100	>100	>100
	4) ชุมชนริมคลองสำโรง	$9.0x10^4$	66.7	33.3	83.3	44.4
	5) ทางออกสู่ทะเลสาบ	$1.4x10^5$	>100	>100	>100	>100
Kanamycin	1) ชุมชนเก้าเส้ง	$2.5x10^5$	>100	>100	>100	>100
	2) บริเวณแยกสำโรง	$2.0x10^4$	50	35	0	0
	3) โรงงานคิงฟิชเชอร์	$1.3x10^5$	>100	>100	>100	>100
	4) ชุมชนริมคลองสำโรง	$9.0x10^4$	44.4	66.7	35.6	7.8
	5) ทางออกสู่ทะเลสาบ	$1.4x10^5$	>100	>100	>100	88.9
สังกะสี	1) ชุมชนเก้าเส้ง	$2.5x10^5$	3.2	68	32	24
	2) บริเวณแยกสำโรง	$2.0x10^4$	>100	>100	nd	>100
	3) โรงงานคิงฟิชเชอร์	$1.3x10^5$	>100	>100	96	nd
	4) ชุมชนริมคลองสำโรง	$9.0x10^4$	44.44	>100	66.7	44.4
	5) ทางออกสู่ทะเลสาบ	$1.4x10^5$	>100	66.7	>100	51.9
ทองแดง	1) ชุมชนเก้าเส้ง	$2.5x10^5$	32	52	40	24
	2) บริเวณแยกสำโรง	$2.0x10^4$	>100	nd	>100	>100
	3) โรงงานคิงฟิชเชอร์	$1.3x10^5$	40	96	>100	>100
	4) ชุมชนริมคลองสำโรง	$9.0x10^4$	>100	>100	44.44	>100
	5) ทางออกสู่ทะเลสาบ	$1.4x10^5$	>100	>100	>100	96.3

หมายเหตุ : nd คือ ไม่มีข้อมูล

4.2 ผลการศึกษาเบื้องต้นของการคัดเลือกจุดเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำทิ้งต่าง ๆ

การทดสอบความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะ โลหะหนักและการทดสอบความสามารถในการบำบัดโลหะหนักของแบคทีเรียนั้น จำเป็นต้องศึกษาในแหล่งตัวอย่างที่หลากหลายโดยในการศึกษาครั้งนี้แบ่งเป็น 4 แหล่ง คือ แหล่งชุมชน โรงพยาบาล ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า โดยในบางแหล่งเก็บตัวอย่างมีจุดเก็บตัวอย่างย่อย จำเป็นต้องคัดเลือกจุดเก็บตัวอย่างที่มีการแสดงออกของการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่แท้จริง เพื่อนำไปศึกษาการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักในช่วงฤดูที่แตกต่างกันต่อไป จุดเก็บตัวอย่างที่คัดเลือกจุดเก็บตัวอย่างย่อย ได้แก่ แหล่งชุมชน (ประกอบด้วย 5 จุดย่อย คือ 1. ชุมชนเก้าเส้ง 2. คลองบริเวณแยกสำโรง 3. ชุมชนริมคลองสำโรง 4. โรงงานคิงฟิชเชอร์ โฮลดิ้ง จำกัด และ 5. ทางออกสู่ทะเลสาบสงขลา) เป็นแหล่งที่ตั้งของบ้านเรือนประชาชน และมีโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งกระจายตลอดคลองสำโรง ซึ่งเป็นแหล่งเก็บตัวอย่างที่มีโอกาสในการปนเปื้อนทั้งยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก (ภาพที่ 1) โรงพยาบาล (ประกอบด้วย 3 จุดย่อยคือ 1. น้ำทิ้งดิบที่ยังไม่ผ่านการบำบัด 2. น้ำทิ้งในถังเติมอากาศของระบบบำบัดน้ำเสียของโรงพยาบาล และ 3. น้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดและใส่คลอรีน ก่อนปล่อยออกสู่บึงประดิษฐ์) (ภาพที่ 3) เป็นแหล่งเก็บตัวอย่างที่มีโอกาสปนเปื้อนยาปฏิชีวนะสูงและโลหะหนักจากกิจกรรมของมนุษย์ด้วยเช่นกัน และฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (ประกอบด้วย 4 จุดย่อย คือ 1) บ่อดินในช่วงเตรียมบ่อก่อนการเลี้ยง 2) บ่อดินที่มีการเลี้ยงกุ้งขาว อายุ 100 วัน 3) บ่อปูพื้นที่มีการเลี้ยงกุ้งขาว อายุ 100 วัน และ 4) บ่อพักน้ำก่อนปล่อยเข้าสู่บ่อกุ้ง เป็นแหล่งเก็บตัวอย่างที่มีโอกาสปนเปื้อนยาปฏิชีวนะสูง (ภาพที่ 5) ผลการศึกษามีดังนี้

4.2.1 แหล่งชุมชน

คลองสำโรง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา บริเวณที่เก็บตัวอย่าง 5 จุด คือ ชุมชนเก้าเส้ง คลองบริเวณแยกสำโรง โรงงานคิงฟิชเชอร์ โฮลดิ้ง จำกัด ชุมชนริมคลองสำโรงและทางออกสู่ทะเลสาบสงขลา (ภาพที่ 1) โดยศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของน้ำ ปริมาณแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมดในตัวอย่างดินและน้ำ และคัดเลือกจุดเก็บตัวอย่างย่อย จากจุดเก็บตัวอย่างที่มีแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกที่สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการศึกษาดังนี้

4.2.1.1 คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีบางประการ

คุณสมบัติทางกายภาพ พบว่า อุณหภูมิมีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 29.5-30 องศาเซลเซียส ความขุ่นของน้ำทั้ง 5 จุดเก็บตัวอย่างมีค่าแตกต่างกันโดยบริเวณแหล่งชุมชนหนาแน่นและมีโรงงานอุตสาหกรรมตั้งอยู่มีความขุ่น (Total dissolved solids) ของน้ำสูง คือ โรงงานคิงฟิชเชอร์

โฮลดิ้ง จำกัด 1,710 มิลลิกรัมต่อลิตร และทางออกสู่ทะเลสาบสงขลา 1.1 มิลลิกรัมต่อลิตร บริเวณที่มีชุมชนหนาแน่น คือ ชุมชนเก้าเส้ง ชุมชนริมคลองสำโรงและคลองบริเวณแยกสำโรงมีชุมชนไม่หนาแน่น มีความขุ่นรองลงมาคือ 823, 795 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ลักษณะทางกายภาพอื่นๆ เช่น กลิ่น สีและสิ่งแวดล้อม พบว่าแหล่งเก็บตัวอย่างบริเวณทางออกสู่ทะเลสาบสงขลาน้ำมีการเน่าเสียสูงสุดในช่วงการเก็บตัวอย่างดังกล่าว มีปริมาณขยะสูง กลิ่นเหม็น น้ำมีสีดำ รองลงมา คือ บริเวณโรงงานคิงฟิชเชอร์ โฮลดิ้ง จำกัด ชุมชนเก้าเส้ง ชุมชนริมคลองสำโรง และคลองบริเวณแยกสำโรง

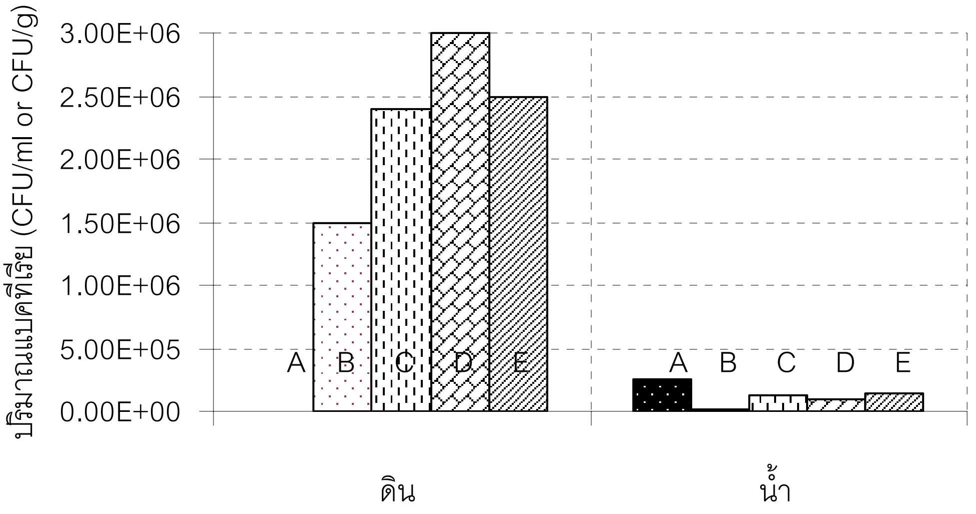
คุณสมบัติทางเคมีพบว่าค่าความเป็นกรดด่างของน้ำมีค่าอยู่ในช่วง 6.3-6.9 ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วงเป็นกลาง น้ำมีความเค็มต่ำคือมีค่าความเค็มของน้ำอยู่ในช่วง 0-1.7 พีพีที

4.2.1.2 การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

การศึกษาปริมาณแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกในตัวอย่างดินและน้ำจากแหล่งชุมชนเก็บตัวอย่าง 5 จุด พบว่าตัวอย่างดินมีปริมาณแบคทีเรียพวกเฮเทอโทรฟิกสูงทั้งหมดอยู่ในช่วง$1.5x10^6$ -3.0 x 10^6 CFU/g ในน้ำแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกแต่ละจุดมีปริมาณอยู่ในช่วง $2.0x10^4$-$2.5x10^5$ CFU/ml บริเวณเก้าเส้งมีปริมาณสูงสุด ดังภาพที่ 7 พบว่าตัวอย่างน้ำจากจุดเก็บตัวอย่างบริเวณชุมชนเก้าเส้งมีแบคทีเรียที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักในปริมาณที่สูงจากปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด $2.5x10^5$ CFU/ml มีการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Streptomycin และ Kanamycin คือ $2.5x10^5$และ $3.0x10^5$ CFU/ml ตามลำดับ และการต้านทานต่อโลหะหนักสังกะสีและทองแดง คือ $8.0x10^4$ และ $1.0x10^5$ CFU/ml ตามลำดับ

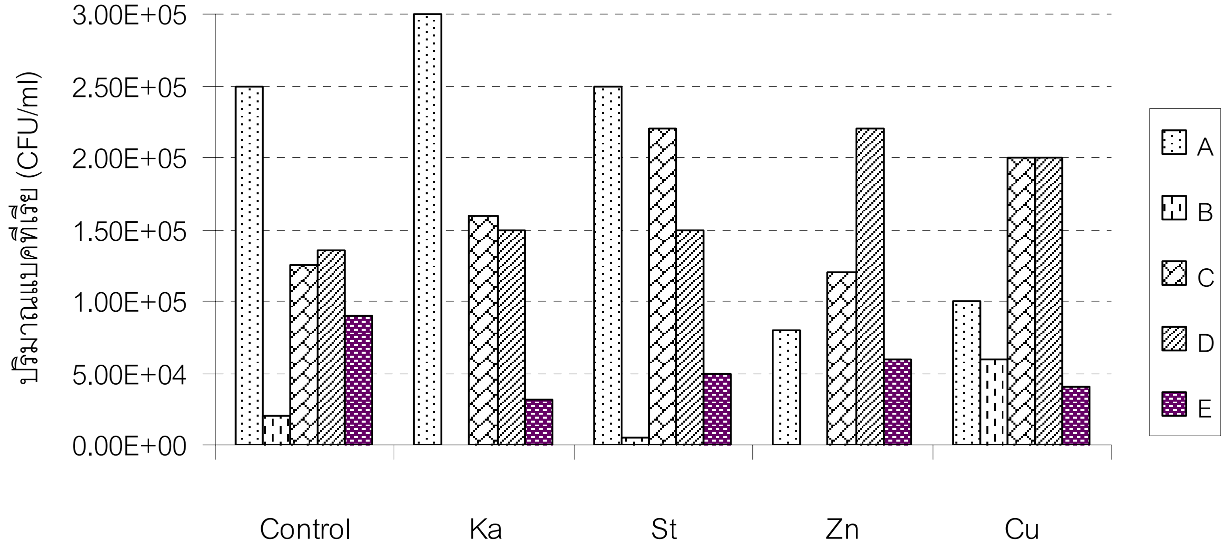
รองลงมาคือน้ำจากจุดเก็บตัวอย่างโรงงานคิงฟิชเชอร์ โฮลดิ้ง จำกัดมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด $1.0x10^5$ CFU/ml และทางออกสู่ทะเลสาบสงขลา มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด $1.2x10^5$ CFU/ml มีการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Streptomycin และ Kanamycin และการต้านทานต่อโลหะหนักสังกะสีและทองแดง คือ $1.2x10^5$ และ $2.2x10^5$ CFU/ml ตามลำดับ

รองลงมาคือน้ำจากจุดเก็บตัวอย่างชุมชนริมคลองสำโรง และจุดเก็บตัวอย่างคลองบริเวณแยกสำโรงมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $2.0x10^4$ และ $9.0x10^4$ CFU/ml ตามลำดับ มีการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Streptomycin และ Kanamycin คือ $5.0x10^4$ และ 0 CFU/ml ตามลำดับ และการต้านทานต่อโลหะหนักสังกะสีและทองแดง คือ ไม่มีข้อมูล และ $6.0x10^4$ CFU/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 7 แสดงปริมาณแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมดในดินและน้ำจากจุดเก็บตัวอย่างแหล่งชุมชนคลองสำโรง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 5 จุด คือ ชุมชนเก้าเส้ง (A) คลองบริเวณแยกสำโรง (B) ชุมชนริมคลองสำโรง (C) โรงงานคิงฟิชเชอร์ โฮลดิ้ง จำกัด (D) และทางออกสู่ทะเลสาบสงขลา (E)

<u>หมายเหตุ</u> : ตัวอย่างดินจุด A ไม่มีข้อมูล



ภาพที่ 8 แสดงปริมาณแบคทีเรียต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากน้ำจุดเก็บตัวอย่างแหล่งชุมชนของคลองสำโรง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา จำนวน 5 จุดเก็บตัวอย่าง คือ ชุมชนเก้าเส้ง (A) คลองบริเวณแยกสำโรง (B) ชุมชนริมคลองสำโรง (C) โรงงานคิงฟิชเชอร์ โฮลดิ้ง จำกัด (D) และทางออกสู่ทะเลสาบสงขลา (E)

4.2.2 โรงพยาบาล

โรงพยาบาลแห่งหนึ่งใน อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา โดยเก็บตัวอย่างทั้งหมด 3 จุดย่อยคือ น้ำทิ้งดิบที่ยังไม่ผ่านการบำบัด น้ำทิ้งในถังเติมอากาศ และน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดและใส่คลอรีน โดยศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของน้ำ ปริมาณแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมดในตัวอย่างดินและน้ำ และคัดเลือกจุดเก็บตัวอย่างย่อย จากจุดเก็บตัวอย่างที่มีแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกที่สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการศึกษาดังนี้

4.2.2.1 คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีบางประการ

คุณสมบัติทางกายภาพ พบว่าอุณหภูมิของน้ำอยู่ในช่วง 30.2-31.0 องศาเซลเซียส และค่าการนำไฟฟ้าเป็น 0.5-0.8 มิลลิซีเมนต่อเซนติเมตร (mS/cm) ลักษณะทางกายภาพอื่นๆ เช่น สี กลิ่น และสภาพแวดล้อมบริเวณดังกล่าว พบว่าลักษณะของน้ำทิ้งดิบที่ยังไม่ผ่านการบำบัดมีปริมาณขยะ ไขมันและอื่นๆ ปนอยู่ในปริมาณสูงและน้ำมีสีดำและขุ่น ความสกปรกสูงเมื่อเทียบกับน้ำในถังเติมอากาศ และน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดใส่คลอรีน ส่วนในถังบำบัดน้ำจะมีตะกอนแบคทีเรียในถังบำบัดสูง และน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดใส่คลอรีน ใส ไม่มีกลิ่นของคลอรีน

คุณสมบัติทางเคมีของตัวอย่างน้ำทั้ง 3 จุดเก็บตัวอย่างมีค่าไม่แตกต่างกันคือค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 6.6-7.1 และค่าความเค็มของน้ำอยู่ในช่วง 0.3-0.4 พีพีที

4.2.2.2 การศึกษาการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

พบว่าตัวอย่างน้ำจากถังน้ำทิ้งดิบที่ยังไม่ผ่านการบำบัดมีปริมาณแบคทีเรียพวกเฮทาโทรฟิกทั้งหมดสูงสุด 1.0×10^{9} CFU/ml รองลงมาคือ น้ำทิ้งในถังเติมอากาศ 1.2×10^{5} CFU/ml และบ่อน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดมีปริมาณแบคทีเรียต่ำสุด 5.9×10^{3} CFU/ml

ผลการศึกษาเบื้องต้นของการคัดเลือกจุดเก็บตัวอย่างที่มีการแสดงออกของการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่แท้จริงจากโรงพยาบาล พบว่าตัวอย่างน้ำจากจุดเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งในถังเติมอากาศเป็นจุดเก็บตัวอย่างย่อยที่เหมาะสมสำหรับการนำไปศึกษาต่อ เนื่องจากพบว่าแบคทีเรียที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักในปริมาณที่สูงจากปริมาณแบคทีเรียพวกเฮทาโทรฟิกทั้งหมด 1.2×10^{5} CFU/ml มีการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Streptomycin, Kanamycin, Tetracycline และ Chloramphenicol คือ 3.3×10^{4}, 1.2×10^{4}, 2.6×10^{2} และ 4.5×10^{2} CFU/ml ตามลำดับ และการต้านทานต่อโลหะหนัก เหล็ก สังกะสีและทองแดง อยู่ในช่วง 7.6×10^{4}-8.4×10^{4} CFU/ml และปรอท 5.9×10^{2} CFU/ml ตามลำดับ รองลงมาคือถังน้ำทิ้งดิบที่ยังไม่ผ่านการบำบัดและบ่อน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดและใส่คลอรีน รอปล่อยออกสู่บึงประดิษฐ์ ดังนี้ถังน้ำทิ้งดิบที่ยังไม่ผ่านการบำบัดมีการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Streptomycin, Kanamycin, Tetracycline และ

Chloramphenicol อยู่ในช่วง $1.6x10^3$ -$7.2x10^5$ CFU/ml ตามลำดับ และการต้านทานต่อโลหะหนักเหล็กสังกะสีและทองแดง อยู่ในช่วง $5.9x10^2$- $8.8x10^4$ CFU/ml และไม่พบการต้านทานปรอท

4.2.3 **ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ**

เก็บตัวอย่างน้ำจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาว อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา จากบ่อดินในช่วงเตรียมบ่อก่อนการเลี้ยง บ่อดินที่มีการเลี้ยงกุ้งขาว อายุ 100 วัน บ่อปูพื้นที่มีการเลี้ยงกุ้งขาว อายุ 100 วัน และบ่อพักน้ำ โดยศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของน้ำ ปริมาณแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมดในตัวอย่างดินและน้ำ และคัดเลือกจุดเก็บตัวอย่างย่อย จากจุดเก็บตัวอย่างที่มีแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกที่สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการศึกษาดังนี้

4.2.3.1 **คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีบางประการ**

คุณสมบัติทางกายภาพ พบว่าอุณหภูมิของน้ำอยู่ในช่วง 29-30 องศาเซลเซียส ส่วนสีของน้ำมีความแตกต่างกัน คือ บ่อพักน้ำและบ่อดินในช่วงเตรียมบ่อก่อนการเลี้ยง น้ำจะใสไม่มีสี ซึ่งการเจริญของสาหร่ายและแพลงก์ตอนพืชน้อย ส่วนในบ่อดินที่มีการเลี้ยงกุ้งขาว อายุ 100 วัน บ่อ ปูพื้นบ่อที่ 1 ที่มีการเลี้ยงกุ้งขาว อายุ 100 วัน น้ำมีสีเขียวและสีน้ำตาลของบ่อปูพื้นบ่อที่ 2 เนื่องจากมีการเจริญและการตายของแพลงก์ตอนพืช ไม่มีกลิ่น สภาพแวดล้อมอื่นๆ ในแต่ละจุดเก็บตัวอย่างไม่แตกต่างกันเนื่องจากตั้งอยู่ในพื้นที่เดียวกัน

คุณสมบัติทางเคมี พบว่าค่าความเป็นกรดด่างของน้ำอยู่ในช่วง 7.0-8.2 โดยบ่อที่ยังไม่ผ่านการเลี้ยงกุ้งจะมีค่าความเป็นกรดด่างสูงกว่าบ่อที่มีการเลี้ยงกุ้ง โดยเฉพาะบ่อปูพื้นจะมีค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่าบ่อดิน และค่าความเค็มของน้ำอยู่ในช่วงประมาณ 30 - 32.5 พีพีที ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำของแต่ละบ่อมีค่าใกล้เคียงกันคืออยู่ในช่วง 5.8-11.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าการนำไฟฟ้าอยู่ในช่วง 11.8- 12.6 มิลลิซีเมนต่อเซนติเมตร

4.2.3.2 **การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร**

พบว่าตัวอย่างน้ำจากจุดเก็บตัวอย่างบ่อปูพื้นที่มีการเลี้ยงกุ้งขาว อายุ 100 วัน เป็นจุดเก็บตัวอย่างย่อยที่เหมาะสมสำหรับการนำไปศึกษาต่อ เนื่องจากพบแบคทีเรียที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักในปริมาณที่สูงจากปริมาณแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมด เท่ากับ $1.3x10^4$ CFU/ml มีการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Streptomycin และ Kanamycin คือ $2.0x10^2$, 96 CFU/ml ตามลำดับ และการต้านทานต่อโลหะหนักเหล็ก สังกะสีและทองแดง คือ $3.8x10^3$, $3.0x10^4$ และ$1.6x10^2$ ตามลำดับ และไม่พบการต้านทานยาปฏิชีวนะ Tetracycline, Chloramphenicol และโลหะหนักปรอท

รองลงมาคือจุดเก็บตัวอย่างบ่อดินในช่วงเตรียมบ่อก่อนการเลี้ยงกุ้งพบว่า แบคทีเรียที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักจากปริมาณแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมดจากจุดเก็บตัวอย่างในบ่อ เท่ากับ 4.3×10^4 CFU/ml มีการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Streptomycin และ Kanamycin คือ 7.2×10^2 และ 21 CFU/ml ตามลำดับ และการต้านทานต่อโลหะหนักสังกะสีและทองแดง คือ 3.6×10^4, 2.1×10^4 และ 1.4×10^2 CFU/ml ตามลำดับ และไม่มีการต้านทานยาปฏิชีวนะ Tetracycline, Chloramphenicol และโลหะหนักปรอท บ่อพักน้ำก่อนปล่อยเข้าสู่บ่อกุ้งและบ่อดินที่มีการเลี้ยงกุ้งขาว อายุ 100 วัน พบว่าแบคทีเรียที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักในปริมาณที่ต่ำจากปริมาณแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมด เท่ากับ 3.0×10^3 และ 1.2×10^4 CFU/ml ตามลำดับ และมีการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Streptomycin และ Kanamycin คือ 12 - 6.0 $\times 10^2$ CFU/ml ตามลำดับ และการต้านทานต่อโลหะหนักเหล็ก สังกะสีและทองแดง อยู่ในช่วง 22.5 - 1.5×10^3 CFU/ml ตามลำดับ และไม่พบการต้านทานยาปฏิชีวนะ Tetracycline, Chloramphenicol และโลหะหนักปรอท

4.3 ผลการศึกษาคุณภาพน้ำ การต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักจากการเก็บตัวอย่างในช่วงฤดูฝนและฤดูร้อน

จากข้อมูลการสำรวจคัดเลือกจุดเก็บตัวอย่างน้ำ 4 จุด คือ แหล่งชุมชน โรงพยาบาล ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และเพิ่มการเก็บตัวอย่างจากขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า สามารถคัดเลือกจุดเก็บตัวอย่างจากจุดหลัก 3 จุด ได้แก่ 1) แหล่งชุมชน คือ ชุมชนเก้าเส้ง 2) โรงพยาบาล คือน้ำทิ้งในถังเติมอากาศ และ 3) ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คือ บ่อปูพื้นที่มีการเลี้ยงกุ้งขาว อายุ 100 วัน นำไปสู่การเก็บตัวอย่าง 2 ฤดูกาล คือ เก็บตัวอย่างในช่วงฤดูฝน เดือนกันยายน –พฤศจิกายน 2548 และเก็บตัวอย่างในช่วงฤดูร้อน เดือนเมษายน 2549 เพื่อศึกษาคุณภาพน้ำทางด้านกายภาพ เคมีบางประการ และศึกษาทางด้านจุลชีววิทยา คือ ปริมาณแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมด ความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก เนื่องจากช่วงฤดูที่แตกต่างกันของ ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ปริมาณน้ำฝน ปริมาณของเสียที่ปล่อยออกมา อาจมีผลต่อปริมาณการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมดังกล่าวได้หรือไม่ ผลการศึกษาดังนี้

4.3.1 คุณภาพน้ำทางด้านกายภาพและเคมีบางประการในช่วงฤดูฝนและช่วงฤดูร้อน

ช่วงฤดูฝนคุณสมบัติทางกายภาพ พบว่าแหล่งชุมชนอุณหภูมิของน้ำอยู่ในช่วง 27.8-30 องศาเซลเซียส ในช่วงฤดูฝนน้ำมีอุณหภูมิต่ำกว่าฤดูร้อนเล็กน้อย ลักษณะทางกายภาพอื่นๆ เช่น

กลิ่น สี และสิ่งแวดล้อม พบว่าแหล่งเก็บตัวอย่างบริเวณชุมชนฤดูฝนคุณภาพน้ำทางกายภาพค่อนข้างดีกว่าช่วงฤดูร้อน ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอุณหภูมิของน้ำช่วงฤดูฝนและฤดูร้อนไม่แตกต่างกัน ช่วงฤดูฝนน้ำในบ่อปูพื้นมีการเจริญของสาหร่ายและแพลงก์ตอนพืชน้อยกว่าช่วงฤดูร้อน สังเกตจากสีของน้ำที่ต่างกัน โรงพยาบาลพบว่าอุณหภูมิของน้ำอยู่ในช่วง 27.8- 32 องศาเซลเซียส ลักษณะทางกายภาพของน้ำไม่แตกต่างกันในช่วงฤดูฝนและฤดูร้อนโดยมีตะกอนจุลินทรีย์ปนอยู่ในตัวอย่างน้ำซึ่งเป็นตะกอนจุลินทรีย์จากภายในถังบำบัดด้วยเช่นกัน และตัวอย่างน้ำจากขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่าอุณหภูมิของน้ำ 31 องศาเซลเซียส ลักษณะน้ำใสไม่มีสีและกลิ่น (ตารางที่ 11)

คุณสมบัติทางเคมีของน้ำในฤดูฝนและฤดูร้อน พบว่าแหล่งชุมชน โรงพยาบาลและฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำอยู่ในช่วง 4.9-7.01 ค่าการนำไฟฟ้าอยู่ในช่วง 0.5-12.6 ไมโครซีเมนต์ต่อลิตร ค่าความเค็มของฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำคือ 30.9-31.6 พีพีที และแหล่งชุมชนรวมทั้งโรงพยาบาลอยู่ในช่วง 0.2-0.9 พีพีที และขุมเหมืองแร่เก็บตัวอย่างช่วงฤดูร้อน ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำ 8.0 ค่าความเค็ม 0.1 พีพีที และค่าการนำไฟฟ้า 0.1 มิลลิซีเมนต่อเซนติเมตร (ตารางที่ 11)

การปนเปื้อนโลหะหนักในน้ำแหล่งชุมชนช่วงฤดูต่างกันมีปริมาณต่างกัน พบว่ามีการปนเปื้อนโลหะหนัก เหล็ก สังกะสีและทองแดงอยู่ในช่วง 180-1,270, 220-390 และ 0.5-70 ไมโครกรัมต่อลิตร ส่วนปรอททั้งฤดูฝนและฤดูร้อนมีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถวิเคราะห์ได้ ปริมาณโลหะหนักเหล็กที่มีสูงสุดคือน้ำทิ้งโรงพยาบาลในช่วงฤดูฝนจะมีปริมาณสูงสุด 230 ไมโครกรัมต่อลิตร รองลงมาคือชุมชน 1,270 ไมโครกรัมต่อลิตร ในช่วงฤดูร้อนปริมาณเหล็กทุกจุดเก็บตัวอย่างอยู่ในช่วง 180-910 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าบางจุดเกินมาตรฐานน้ำทิ้งของ ปริมาณโลหะหนักสังกะสีมีปริมาณสูงสุดในน้ำทิ้งจากโรงพยาบาลช่วงฤดูฝน 390 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือแหล่งชุมชนในช่วงฤดูฝน 220 ไมโครกรัมต่อลิตร และฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและขุมเหมืองแร่มีปริมาณต่ำสุดอยู่ในช่วง <0.5-40 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาณโลหะหนักทองแดงที่มีปริมาณสูงสุดคือน้ำทิ้งโรงพยาบาลในช่วงฤดูฝนจะมีปริมาณสูงสุด 70 ไมโครกรัมต่อลิตร จุดเก็บตัวอย่างอื่นๆ ทั้ง 2 ฤดู มีปริมาณทองแดงอยู่ในช่วง <0.5-10 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนปรอทมีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถวิเคราะห์ได้ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 11 แสดงคุณภาพน้ำของน้ำทิ้งจากแหล่งชุมชน โรงพยาบาล ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่าในช่วงฤดูฝนและฤดูร้อน

จุดเก็บตัวอย่าง	คุณภาพน้ำ							
	อุณหภูมิ (°C)		ความเป็นกรดด่าง		ความเค็ม (ppt)		ค่าการนำไฟฟ้า (mS/cm)	
	ฤดูฝน	ฤดูร้อน	ฤดูฝน	ฤดูร้อน	ฤดูฝน	ฤดูร้อน	ฤดูฝน	ฤดูร้อน
ชุมชน	30	29	6.4	9.2	0.8	1	1.4	1.9
โรงพยาบาล	27.8	32	7	4.9	0.3	0.2	0.5	0.5
เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	29	28	6.6	7.5	30.9	31.6	12.6	11.8
ขุมเหมืองแร่	nd	31	nd	8	nd	0.1	nd	0.1

<u>หมายเหตุ</u> : nd คือ ไม่มีข้อมูล

ตารางที่ 12 แสดงปริมาณโลหะหนักของน้ำทิ้งจากแหล่งชุมชน โรงพยาบาล ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และขุมเหมืองแร่ในช่วงฤดูฝนและฤดูร้อน

จุดเก็บตัวอย่าง	ปริมาณโลหะหนัก (ไมโครกรัมต่อลิตร)					
	เหล็ก		สังกะสี		ทองแดง	
	ฤดูฝน	ฤดูร้อน	ฤดูฝน	ฤดูร้อน	ฤดูฝน	ฤดูร้อน
ชุมชน	1270	290	220	3	0.5	<0.5*
โรงพยาบาล	2300	180	390	150	70	10
เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	180	290	<0.5*	<0.5*	<0.5*	<0.5*
ขุมเหมืองแร่	nd	910	nd	40	nd	<0.5*

<u>หมายเหตุ</u> : nd คือ ไม่มีข้อมูล , *ขีดต่ำสุดในการตรวจวัด เหล็ก = 0.3 ไมโครกรัมต่อลิตร สังกะสี = 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร และ ทองแดง = 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร

4.3.2 ปริมาณแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมดและสุ่มตัวอย่างไอโซเลตแบคทีเรีย

จากการเก็บตัวอย่างน้ำมาศึกษาปริมาณแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมด 2 ช่วงฤดูกาล พบว่าจากแหล่งชุมชนทั้ง 2 ช่วงฤดูกาลพบว่ามีปริมาณแบคทีเรียเฮเทอโรโทรฟิกที่แตกต่างกันโดยปริมาณแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 2.5×10^{5} -2.6×10^{7} CFU/ml ส่วนจากโรงพยาบาลมีปริมาณแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมดแตกต่างกันคือช่วงฤดูร้อนมีปริมาณแบคทีเรียเฮเทอโรโทรฟิก 2.5×10^{14} CFU/ml และช่วงฤดูฝน 3.0×10^{4} CFU/ml ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของบ่อปูพื้นด้วยพลาสติกมีปริมาณแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันทั้ง 2 ช่วงฤดู คือ1.2×10^{4} -3.0×10^{4} CFU/ml ในขณะที่แบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมดจากขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่าพบมีปริมาณต่ำกว่าแหล่งอื่นๆ คือ 2.4×10^{2} CFU/ml (ตารางที่ 13)

การสุ่มตัวอย่างไอโซเลตแบคมีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกที่สามารถเจริญได้บนอาหาร TSA โดยคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน เช่น สี ลักษณะขอบ การโปร่งแสงและทึบแสงของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่พบ เป็นต้น จากการศึกษาโดยในช่วงฤดูฝนทำการสุ่มคัดเลือกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 300 ไอโซเลตจาก 3 จุดเก็บตัวอย่าง ส่วนช่วงฤดูร้อนทำการสุ่มคัดเลือกแบคทีเรียได้ 352 ไอโซเลต ซึ่งทำการสุ่มแบคทีเรียจากจานเพาะเชื้อที่มีปริมาณโคโลนีแบคทีเรียระหว่าง 30-300 ไอโซเลต พบว่าการสุ่มเลือกจุดเก็บตัวอย่างละ 100 ไอโซเลต ในช่วงฤดูฝนสามารถเก็บตัวอย่าง ไอโซเลตได้ตามต้องการคือ ทั้งหมด 300 ไอโซเลตจาก 3 จุดเก็บตัวอย่าง ส่วนในช่วงฤดูร้อนทำการเลี้ยงเชื้อและสุ่มเก็บโคโลนีแบคทีเรียเช่นเดิมจำนวนทั้งหมด 400 ไอโซเลต จาก 4 จุดเก็บตัวอย่าง แต่ปริมาณไอโซเลตที่เจริญได้บนอาหารหลังจากสุ่มคัดเลือกสามารถเจริญได้น้อยกว่าปริมาณที่ต้องการ ในจุดเก็บตัวอย่างฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ 61 ไอโซเลต และขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า 88 ไอโซเลต จากการทดลองครั้งนี้ไม่ทำการคัดเลือกใหม่ เนื่องจากการคัดเลือกแบคทีเรียควรเลี้ยงในอาหารทันทีหลังจากเก็บตัวอย่าง ดังนั้นตัวอย่างน้ำที่เก็บมามีระยะเวลาไม่เหมาะสม จึงใช้จำนวนไอโซเลตเท่าที่คัดเลือกได้และไม่มีผลต่อการศึกษา เนื่องจากผลการศึกษาจะต้องหาค่าร้อยละของปริมาณแบคทีเรียที่พบการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักอีกครั้ง ในฤดูร้อนเพิ่มจุดเก็บตัวอย่างขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่าเป็นแหล่งเก็บตัวอย่างควบคุมที่มีการปนเปื้อนโลหะหนักไม่มีการปนเปื้อนยาปฏิชีวนะและทำการเก็บตัวอย่างเพียง 1 ครั้ง เนื่องจากขุมเหมืองแร่ไม่ได้ถูกรบกวนจากปัจจัยภายนอกมากนัก ทำให้ความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักมีการเปลี่ยนแปลงน้อย ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงจำนวนแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมดในตัวอย่างน้ำทิ้งจากแหล่งชุมชน โรงพยาบาล ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์และขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่าในช่วงฤดูฝนและฤดูร้อน

จุดเก็บตัวอย่าง	ฤดูกาล	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml)	จำนวนไอโซเลตที่สุ่มคัดเลือก
แหล่งชุมชน	ช่วงฤดูฝน	2.5×10^{5}	100
	ช่วงฤดูร้อน	2.6×10^{7}	102
โรงพยาบาล	ช่วงฤดูฝน	1.2×10^{5}	100
	ช่วงฤดูร้อน	2.5×10^{14}	101
ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	ช่วงฤดูฝน	3.0×10^{4}	100
	ช่วงฤดูร้อน	1.2×10^{4}	61
ขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า	ช่วงฤดูฝน	nd	nd
	ช่วงฤดูร้อน	2.4×10^{2}	88

หมายเหตุ : nd คือ ไม่ได้ทำการเก็บตัวอย่าง

4.3.3 การศึกษาการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักในช่วงฤดูฝนและฤดูร้อน

จากการคัดเลือกจุดเก็บตัวอย่างและทำการสุ่มตัวอย่างแบคทีเรียจากแต่ละจุดเก็บตัวอย่างในฤดูร้อนและฤดูฝน ทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Antibiotic diffusion assay และการทดสอบการต้านทานโลหะหนัก เหล็ก สังกะสี ทองแดงและปรอท ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 9) และหาความสัมพันธ์การต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักในฤดูที่แตกต่างกัน ผลการศึกษามีดังนี้

4.3.3.1 การศึกษาการต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียวิธี Antibiotic diffusion assay **ในช่วงฤดูฝนและฤดูร้อน**

พบว่าแหล่งชุมชนการต้านทานยาปฏิชีวนะในช่วงฤดูร้อนมีร้อยละของปริมาณแบคทีเรียที่มีการต้านทานยาปฏิชีวนะ 4 ชนิด คือ Streptomycin, Tetracycline และ Chloramphenicol แตกต่างกัน คือมีร้อยละของปริมาณแบคทีเรียที่มีการต้านทานยาปฏิชีวนะ Streptomycin, Tetracycline และ Chloramphenicol สูงกว่าฤดูฝน ร้อยละ 79.4, 98 และ 99 ตามลำดับ ขณะที่การต้านทานต่อ Kanamycin คือ ร้อยละ 4.9 ขณะที่ในช่วงฤดูฝนมีปริมาณร้อยละของปริมาณแบคทีเรียที่มีการต้านทานยาปฏิชีวนะต่ำกว่าฤดูร้อนในยาปฏิชีวนะ โรงพยาบาลฤดูฝนมีปริมาณร้อยละของปริมาณแบคทีเรียที่มีการต้านทาน Streptomycin และ Kanamycin ร้อยละ 57

และ 40 เป็นต้น สูงกว่าฤดูร้อน ส่วนการต้านทาน Tetracycline และ Chloramphenicol มีค่าใกล้เคียงกัน คือ อยู่ในช่วงร้อยละ 20-30 และ 22-36 ตามลำดับ ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำการต้านทานต่อ Streptomycin มีร้อยละของปริมาณแบคทีเรียที่มีการต้านทานสูงและค่าใกล้เคียงกันทั้ง 2 ฤดู อยู่ในช่วงร้อยละ 41-59 การต้านทานต่อ Kanamycin และTetracycline รองลงมาคืออยู่ในช่วงร้อยละ 2-28 ตามลำดับ ส่วนการต้านทาน Chloramphenicol ในช่วงฤดูร้อนมีการต้านทาน (ร้อยละ 55.7) สูงกว่าช่วงฤดูฝน (ร้อยละ 14) และจากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่าฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำบ่อปูพื้นมีร้อยละการต้านทานต่อ ยาปฏิชีวะสูงกว่าบ่อดินและบ่อกักเลนหลังเลี้ยงกุ้งอย่างชัดเจน (ไม่ได้แสดงข้อมูล) พบว่าบ่อดินหลังเลี้ยงและบ่อกักเลนมีปริมาณต่ำร้อยละของปริมาณแบคทีเรียที่มีการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 4 ชนิดของ Streptomycin, Kanamycin, Tetracycline และ Chloramphenicol คือ อยู่ในช่วงร้อยละ 10 -24.1, 0-2, 0-4 และ 4-20.7 ตามลำดับ และสุดท้ายขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่าเป็นแหล่งเก็บตัวอย่างที่มีแบคทีเรียต้านทานยาปฏิชีวนะทั้ง 4 ชนิดของ Streptomycin, Kanamycin, Tetracycline และ Chloramphenicol คือ ร้อยละ 12.5, 4.6, 0 และ 10.3 ตามลำดับ (ตารางที่ 14) (ภาพที่ 10)

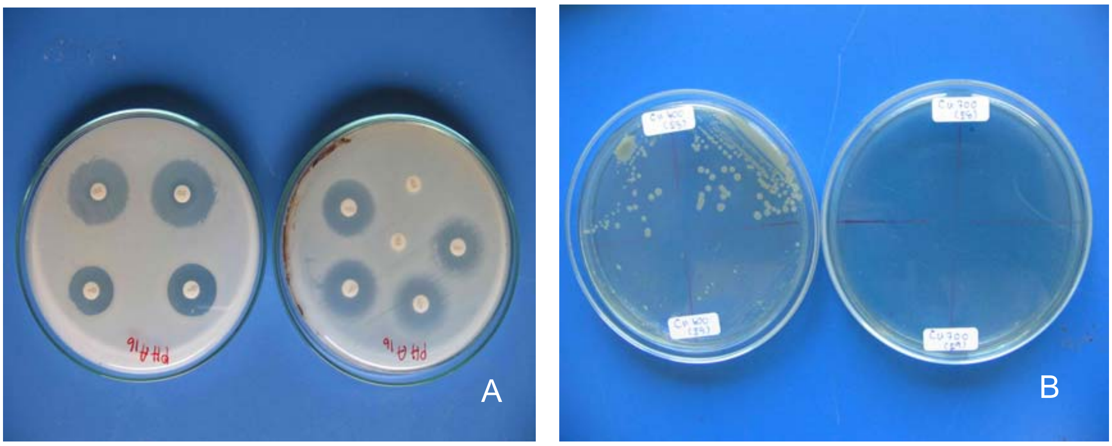
ตารางที่ 14 แสดงร้อยละการต้านทานยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Antibiotic diffusion assay ของแบคทีเรียคัดเลือกจากแหล่งชุมชน โรงพยาบาล ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่าเมื่อเทียบกับปริมาณแบคทีเรียที่สุ่มทั้งหมดในช่วงฤดูฝนและฤดูร้อน

ยาปฏิชีวนะ	ร้อยละของการต้านทานยาปฏิชีวนะ (ไอโซเลต)						
	ชุมชน		โรงพยาบาล		ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ		ขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า
	ฤดูฝน (n=100)	ฤดูร้อน (n=102)	ฤดูฝน (n=100)	ฤดูร้อน (n=101)	ฤดูฝน (n=100)	ฤดูร้อน (n =61)	ฤดูร้อน (n=88)
St	32	79.4	57	14	41	59	12.5
Ka	30	4.9	40	17	28	11.5	4.6
Te	29	98	20	22	2	13.1	0
Ch	15	99	30	36	14	55.7	10.2

<u>หมายเหตุ</u> : n คือ จำนวนไอโซเลตที่สุ่ม

St คือ Streptomycin, Ka คือ Kanamycin, Te คือ Tetracycline และ

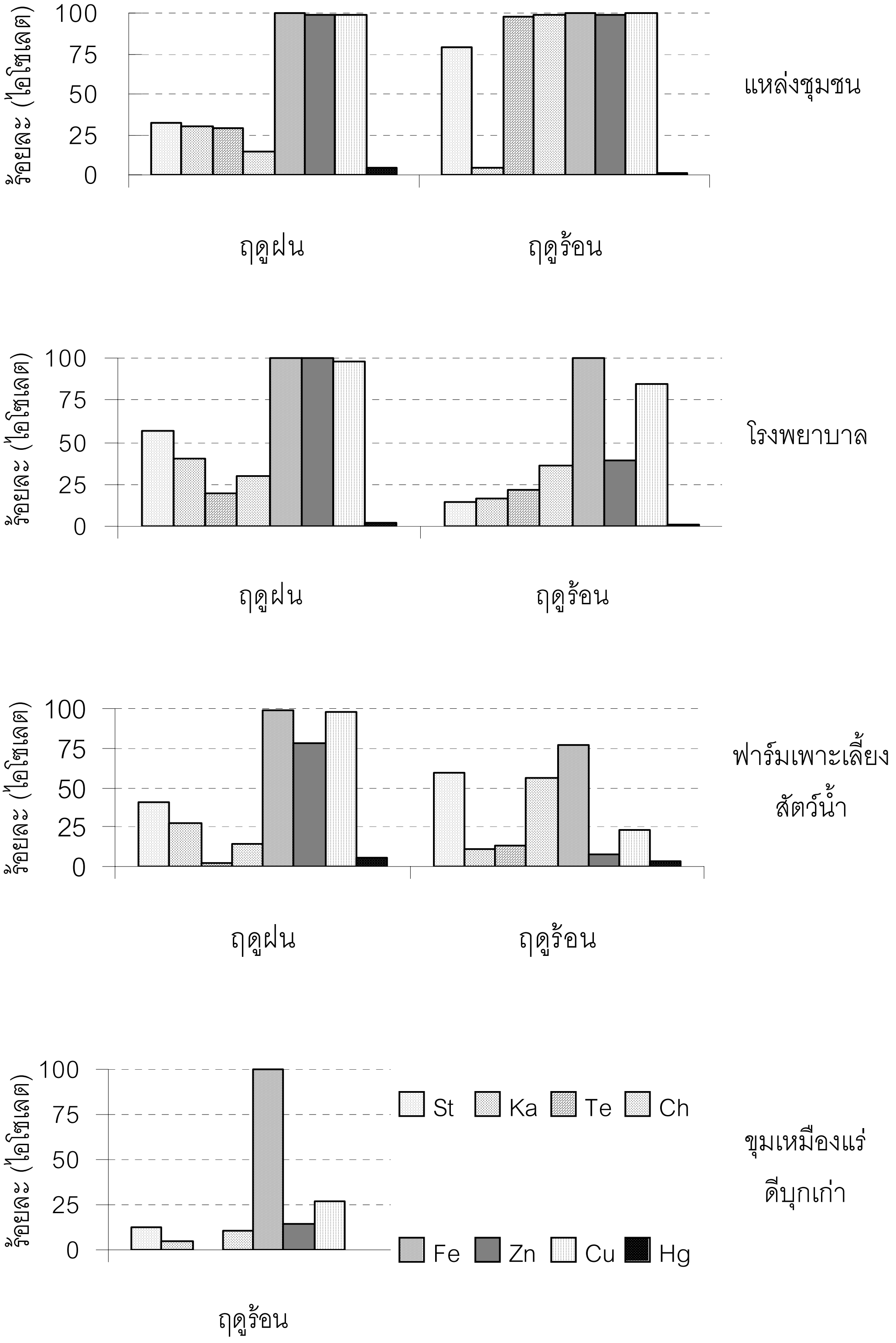
Ch คือ Chloramphenicol



ภาพที่ 9 แสดงภาพถ่ายลักษณะการต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียด้วยวิธี Antibiotic diffusion assay บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MHA (A) และการต้านทานโลหะหนัก ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร บนอาหารสูตร TSA (B)

4.3.3.2 **การศึกษาการต้านทานโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้น** 100 **มิลลิกรัมต่อลิตร ในช่วงฤดูฝนและฤดูร้อน**

ผลจากสุ่มจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 300 ไอโซเลตจากการเก็บตัวอย่าง ในช่วงฤดูฝน และจำนวน 457 ไอโซเลตจากการเก็บตัวอย่างในช่วงฤดูร้อน พบว่าแต่ละจุดเก็บตัวอย่างในแต่ละช่วงฤดูมีปริมาณแบคทีเรียที่ต้านทานต่อโลหะหนักในรูปของไอออน 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แตกต่างกันในช่วงฤดูฝนในจุดเก็บตัวอย่างน้ำจากชุมชน โรงพยาบาล และฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีปริมาณแบคทีเรียที่ต้านทานต่อเหล็ก สังกะสีและทองแดง ในช่วงร้อยละ 78-100 ในช่วงฤดูร้อนจุดเก็บตัวอย่างโรงพยาบาลและฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีปริมาณการต้านทานต่อสังกะสีและทองแดงลดลง ในช่วงร้อยละ 8.2-100 (ตารางที่ 15) และจากการศึกษาเพิ่มเติมฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำบ่อปูพื้นมีร้อยละการต้านทานต่อโลหะหนักสูงกว่าบ่อดินและบ่อกักเลนหลังเลี้ยงกุ้งอย่างชัดเจน พบว่าบ่อดินหลังเลี้ยงและบ่อกักเลนมีปริมาณการต้านทานช่วงเหล็กในช่วงร้อยละ 96-100 การต้านทานต่อสังกะสี ทองแดงและปรอทต่ำอยู่ในช่วงร้อยละ 0-12 (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ส่วนแบคทีเรียที่แยกจากขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า พบว่ามีความสามารถในการต้านทานเหล็ก สังกะสี ทองแดงและปรอทได้ร้อยละ 100, 14.8, 27.3 และ 0 ตามลำดับ (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 แสดงร้อยละการต้านทานยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Antibiotic diffusion assay ของแบคทีเรียคัดเลือกจากแหล่งชุมชน โรงพยาบาล ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่าเมื่อเทียบกับปริมาณแบคทีเรียที่สุ่มทั้งหมดในช่วงฤดูฝนและฤดูร้อน

ตารางที่ 15 แสดงร้อยละของปริมาณการต้านทานโลหะหนัก ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแบคทีเรียคัดเลือกจากแหล่งชุมชน โรงพยาบาล ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า เมื่อเทียบกับจำนวนแบคทีเรียที่สุ่มทั้งหมดในช่วงฤดูฝนและฤดูร้อน

ชนิดโลหะหนัก	ร้อยละของการต้านทานโลหะหนัก (ไอโซเลต)						
	ชุมชน		โรงพยาบาล		ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ		ขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า
	ฤดูฝน (n=100)	ฤดูร้อน (n=102)	ฤดูฝน (n=100)	ฤดูร้อน (n=101)	ฤดูฝน (n=100)	ฤดูร้อน (n =61)	ฤดูร้อน (n=88)
เหล็ก	100	100	100	100	99	77.1	100
สังกะสี	99	99	100	39.6	78	8.2	14.8
ทองแดง	99	100	98	84.2	98	23	27.3
ปรอท	4	0.98	2	1	5	3.3	0

<u>หมายเหตุ</u> : n คือ จำนวนไอโซเลต

4.3.3.3 การต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของปริมาณแบคทีเรียที่มีได้มากกว่า 1 ชนิด (Multiple resistance)

พบว่าในฤดูฝนแหล่งชุมชนแบคทีเรียมีการต้านทานยาปฏิชีวนะได้มากกว่า 1 ชนิด คือ สามารถต้านทานได้ 4, 3 และ 2 ชนิด ได้ร้อยละ 7, 5 และ 18 ตามลำดับ ส่วนในฤดูร้อนแบคทีเรียสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิดได้ดี พบว่าสามารถต้านทานได้ 3 ชนิด มีค่าสูงสุดร้อยละ 75.49 โรงพยาบาลแบคทีเรียในฤดูฝนและฤดูฝนร้อนมีร้อยละการต้านทานยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิดใกล้เคียงกันคือมีร้อยละการไม่ต้านทานอยู่ในช่วงร้อยละ 40-43.6 สามารถต้านทานได้ มากกว่า 1 ชนิด อยู่ในช่วงร้อยละ 2–37.6 ตามลำดับ ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในฤดูฝนและฤดูร้อนมีร้อยละการต้านทานยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิดใกล้เคียงกันคือ ในช่วงฤดูฝนมีร้อยละการไม่ต้านทานสูงกว่าฤดูร้อน และขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่ามีปริมาณการต้านทานยาปฏิชีวนะสามารถต้านทานได้ มากกว่า 1 ชนิด อยู่ในช่วงร้อยละ 0-79.5 ดังภาพที่ 10

การต้านทานโลหะหนักได้มากกว่า 1 ชนิด (Multiple metal resistance) ของแบคทีเรียที่แยกจากแหล่งต่างๆ มีความสามารถในการต้านทานโลหะหนักมากกว่า 1 ชนิด พบว่าในช่วงฤดูฝนและฤดูร้อนแหล่งชุมชนแบคทีเรียมีการต้านทานยาปฏิชีวนะได้มากกว่า 3 ชนิดสูง คือ อยู่ในช่วงร้อยละ 95-98 ซึ่งสามารถต้านทานต่อโลหะหนัก เหล็ก สังกะสี และทองแดง โรงพยาบาลในช่วง

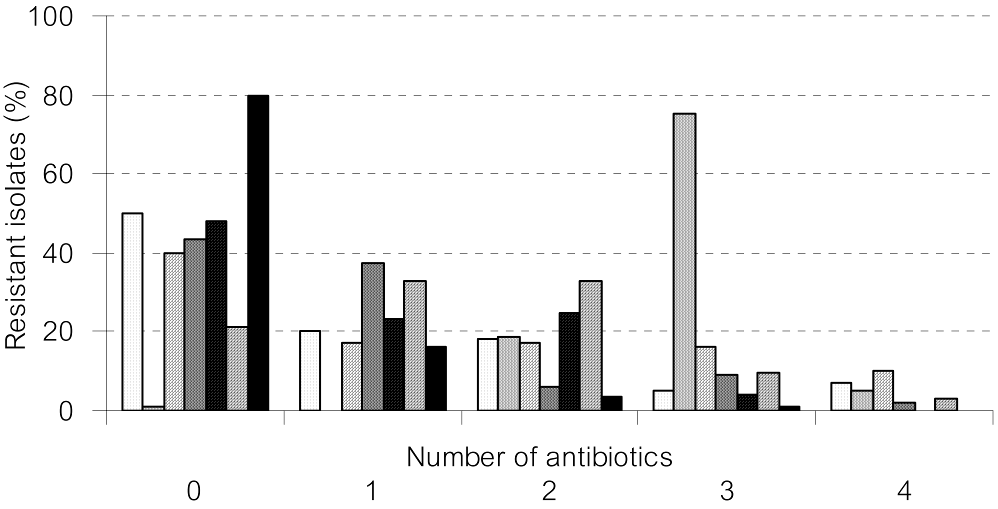
ฤดูฝนมีร้อยละการต้านทาน 3 ชนิดสูงร้อยละ 93 แต่การต้านทานในฤดูร้อนมีการต้านทาน 2 และ 3 ชนิด ร้อยละ 45.6 และ 39.6 ตามลำดับ ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำการเก็บตัวอย่างช่วงฤดูฝนมีร้อยละการต้านทานโลหะหนัก 3 ชนิด ร้อยละ 73 สูงกว่า การเก็บตัวอย่างในช่วงฤดูร้อนคือ สามารถต้านทานได้ 4, 3, 2, 1 และ 0 ชนิด ได้อยู่ในช่วงร้อยละ 0, 8.2, 13.1, 52.5 และ 24.6 ตามลำดับ ขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่าพบว่ามีร้อยละการต้านทานโลหะหนักได้ 3, 2 และ 1 ชนิด ได้อยู่ในช่วงร้อยละ 5.7, 29.6 และ 64.8 ตามลำดับ ดังภาพที่ 11

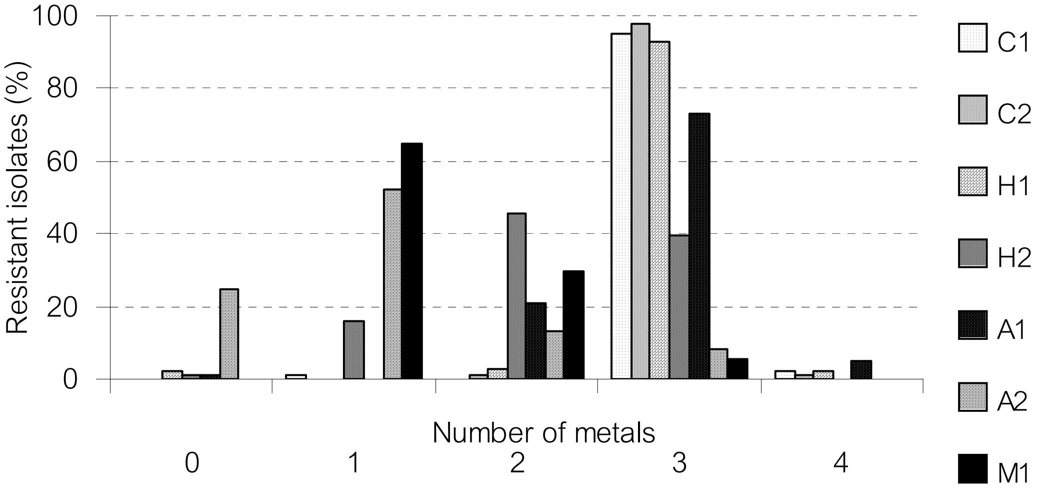
4.4 ผลการศึกษาความสัมพันธ์การต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก

การวิเคราะห์ทางสถิติ แบบ T-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยการทดสอบความความสัมพันธ์ของการต้านทานยาปฏิชีวนะกับโลหะหนักสามารถจับคู่ความสัมพันธ์ระหว่ายาปฏิชีวนะ (ตารางที่ 14) และโลหะหนัก (ตารางที่ 15) แบบ Paired samples test ทั้งหมด 16 คู่ คือ Streptomycinกับเหล็ก Streptomycinกับสังกะสี Streptomycinกับทองแดง Streptomycinกับปรอท Kanamycinกับเหล็ก Kanamycinกับสังกะสี Kanamycinกับทองแดง Kanamycinกับปรอท Tetracyclineกับเหล็ก Tetracyclineกับสังกะสี Tetracyclineกับทองแดง Tetracyclineกับปรอท Chloramphenicolกับเหล็ก Chloramphenicolกับสังกะสี Chloramphenicolกับทองแดง และ Chloramphenicolกับปรอท พบว่าร้อยละการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของแบคทีเรียระหว่าง Streptomycinกับสังกะสี Streptomycinกับทองแดง Tetracyclineกับปรอท Chloramphenicolกับสังกะสี และChloramphenicolกับทองแดง มีค่าเฉลี่ยของร้อยละการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ทั้งในช่วงฤดูฝนและฤดูร้อนจาก 4 แหล่งเก็บตัวอย่าง คือแหล่งชุมชน โรงพยาบาล ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า

4.5 ผลการศึกษาความสามารถในการบำบัดโลหะหนักของแบคทีเรีย

คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความต้านทานโลหะหนักและใช้ประโยชน์ในการศึกษาความสามารถในการบำบัดโลหะหนัก โดยมีขั้นตอน ดังนี้ ขั้นตอนแรกเป็นการคัดเลือกแบคทีเรียเบื้องต้นจากความสามารถในการต้านทานโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบการเจริญในสารละลายเปปโตนร้อยละ 1 และขั้นตอนที่ 3 นำไอโซเลตเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกทดสอบการบำบัดโลหะหนักในสารละลายเปปโตนร้อยละ 1 ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ขั้นตอนที่ 4 การตรวจสอบกลุ่มหรือจีนัสของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สนใจที่มีความสามารถสูงในการบำบัดโลหะหนักด้วยการจำแนกชนิดแบคทีเรียเบื้องต้นด้วย การย้อมสีแบบแกรมและการย้อมสีเอนโดสปอร์ ผลการศึกษาดังนี้





ภาพที่ 11 แสดงร้อยละการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักมากกว่า 1 ชนิด (Multiple resistance) ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรของแบคทีเรียคัดเลือกจากแหล่งชุมชน โรงพยาบาล ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในช่วงฤดูฝนและฤดูร้อน และขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า ในช่วงฤดูร้อน

<u>หมายเหตุ</u> : n คือ จำนวนไอโซเลต

C คือ ชุมชน, H คือ โรงพยาบาล, A คือ ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ,

M คือ ขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า, 1 คือ ช่วงฤดูฝน และ 2 คือ ช่วงฤดูร้อน

4.5.1 ความสามารถในการต้านทานโลหะหนัก

จากการเก็บตัวอย่างน้ำในช่วงฤดูร้อนและช่วงฤดูฝนและสุ่มแบคทีเรียได้ทั้งหมด 652 ไอโซเลต นำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการการเจริญบนอาหาร TSA ที่มีโลหะหนัก เหล็ก สังกะสี ทองแดง และปรอท ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแบคทีเรียสามารถต้านทาน เหล็กและสังกะสีได้สูง ทองแดงรองลงมาและปรอทต่ำสุด แบคทีเรียที่ต้านทาน เหล็ก สังกะสี ทองแดง และปรอท สุ่มมาทั้งหมดจำนวน 28 ไอโซเลต ได้แก่ LH21(2), LH99(2), LH81(2), LH6(2), .LH91(2), LH46(2), LH103(2), LS70(1), LS64(1), LS75(1), LS21(1), LR62(1), LR101(1), LR48(1), LR 102(1), LR100(1), LA 91(2), LA101(2), LA109(2), LA57(2), LA98(2), LA123(2), LH46(1), LH18(1), LH9(1), LH10(1), LH47(1) และ LH54(1) และพบว่าความสามารถในการต้านทานโลหะหนักได้เพียง 3 ชนิด คือ เหล็ก สังกะสีและทองแดง นอกจากนี้รูปร่างของเซลล์และสีของโคโลนีที่ได้แตกต่างกัน โดยมีทั้งโคโลนีแบบนูน (Convex) แบน (Slight) และขรุขระ (Crateriform) เป็นต้น ส่วนสีของโคโลนีนั้น ได้แก่ สีขาวขุ่น ขาวใส สีเหลืองอ่อน สีเขียว สีแดง สีม่วงเข้มและสีส้ม เป็นต้น

4.5.2 ผลการทดสอบการเจริญในสารละลายเปปโตนร้อยละ 1

แบคทีเรียที่แยกทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TSB สูตรที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียทั่วไปและใช้ในขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อ แต่ในการทดสอบการบำบัดโลหะหนักเบื้องต้น (ไม่ได้แสดงข้อมูลผลการทดลองในที่นี้) โดยการใช้โลหะหนักผสมอาหารเลี้ยงสูตร TSB พบว่าความเข้มข้นของโลหะหนักลดลง จากข้อมูลการศึกษาของ ขวัญตา ตันติกำธน (2549) พบว่าการใช้สารละลายเปปโตนร้อยละ 1 ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบการบำบัดโลหะหนักความเข้มข้นโลหะหนักไม่มีการเปลี่ยนแปลงและแบคทีเรียสามารถเจริญได้ จึงใช้สารละลายเปปโตนร้อยละ 1 ในการทดสอบการบำบัดโลหะหนักครั้งนี้ พบว่าแบคทีเรียทั้งหมด 28 ไอโซเลตสามารถเจริญได้แตกต่างกัน จากการวัดอัตราการเจริญที่ระยะเวลา 0, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร สามารถคัดเลือกแบคทีเรียได้ 4 ไอโซเลตคือ ไอโซเลต LS75(1) และ LS26(1) ซึ่งเป็นแบคทีเรียจากการเก็บตัวอย่างคลองสำโรงช่วงฤดูฝน LR102(1) จากการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า และ LH10(1) จากการเก็บตัวอย่างจากโรงพยาบาลในช่วงฤดูฝน และใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* เป็นเชื้อบริสุทธิ์สำหรับเปรียบเทียบ (ตารางที่ 16) สามารถเจริญได้ดีในสารละลายเปปโตนร้อยละ 1 โดยแบคทีเรียที่ 4 ไอโซเลต มีค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเปปโตนร้อยละ 1 ที่ระยะเวลา 0, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง ดังนี้ ไอโซเลต LS75(1) ไอโซเลต LS26(1) ไอโซเลต LR102(1) และไอโซเลต LH10(1)

ตารางที่ 16 แสดงรูปร่างโคโลนี สี การติดสีแกรม และสมบัติบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือกสำหรับบำบัดโลหะหนัก เหล็ก ทองแดง และสังกะสี

รหัสเชื้อ	รูปร่างโคโลนี	สีโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม	ต้านทานโลหะหนัก 100 µg/L				การสร้างเอนโดสปอร์
					Fe	Zn	Cu	Hg	
B.subtilis	โคโลนีแบนขอบเรียบไม่โปร่งแสง	สีขาวขุ่น	ท่อน	+	+	+	+	-	+
LS75(1)	โคโลนีแบนขอบเรียบไม่โปร่งแสง	สีขาวขุ่น	ท่อน	+	+	+	+	-	+
LS21(1)	โคโลนีแบนขอบเรียบไม่โปร่งแสง	สีขาวขุ่น	ท่อน	+	+	+	+	-	+
LR102(1)	โคโลนีแบนขอบเรียบไม่โปร่งแสง	สีขาวขุ่น	ท่อน	+	+	+	+	-	+
LH10(1)	โคโลนีแบนขอบเรียบไม่โปร่งแสง	สีขาวขุ่น	ท่อน	+	+	+	+	-	+

<u>หมายเหตุ</u> : + คือ Positive, - คือ Negative

4.5.3 **การทดสอบการบำบัดโลหะหนัก**

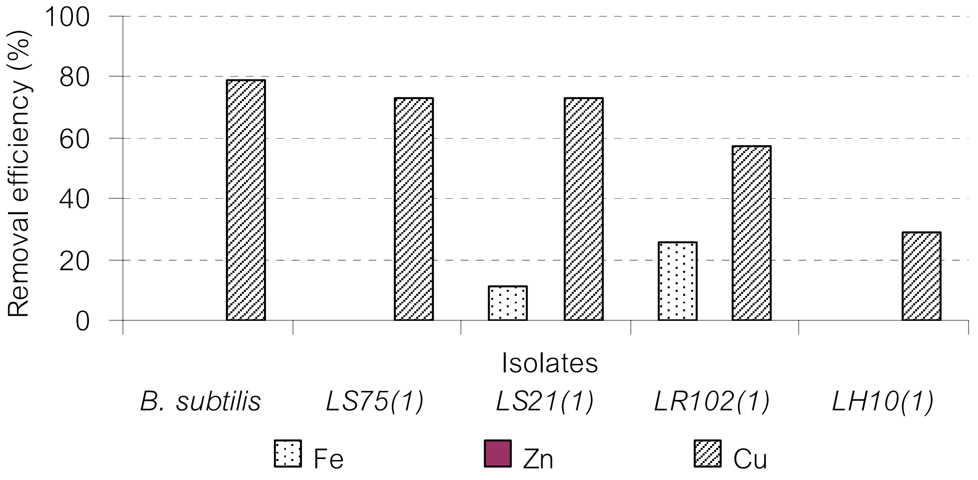
แบคทีเรียไอโซเลตที่ผ่านการคัดเลือก 4 ไอโซเลต คือ LS75(1), LS21(1), LR102(1) และ LH10(1) จากการผลการศึกษาข้อ 4.5.2 (ตารางที่ 16) ที่แยกจากแหล่งเก็บตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนโลหะหนัก โดยใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* เป็นเชื้อบริสุทธิ์สำหรับเปรียบเทียบความสามารถในการลดปริมาณโลหะหนักในการทดลองครั้งนี้ และเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้งหมดสามารถเจริญได้ดีในสารละลายเปปโตนร้อยละ 1 ผลการทดลองการบำบัดโลหะหนัก เหล็ก สังกะสีและทองแดง ที่ระดับ

ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต LS21(1) และ LR102(1) มีความสามารถในการลดปริมาณเหล็กได้ ร้อยละ 11.4 และ 25.8 ตามลำดับ แบคทีเรียไอโซเลต LS75(1) และ LH10(1) ไม่สามารถลดปริมาณเหล็ก และแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลตไม่สามารถในการบำบัดสังกะสีได้เช่นกัน และการบำบัดทองแดงแบคทีเรียไอโซเลต LS75(1), LS21(1), LR102(1) และ LH10(1) สามารถบำบัดได้ร้อยละ 72.7, 72.7, 57 และ 29.1 ตามลำดับ (ภาพที่ 12) ซึ่งแบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นตัวควบคุม คือแบคทีเรีย *B. subtilis* มีความสามารถในการบำบัดโลหะหนักทองแดงได้สูงร้อยละ 78.7 และไม่สามารถบำบัดเหล็กและสังกะสี

4.6 การตรวจสอบกลุ่มหรือจีนัสของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการบำบัดโลหะหนัก

4.6.1 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบแกรม

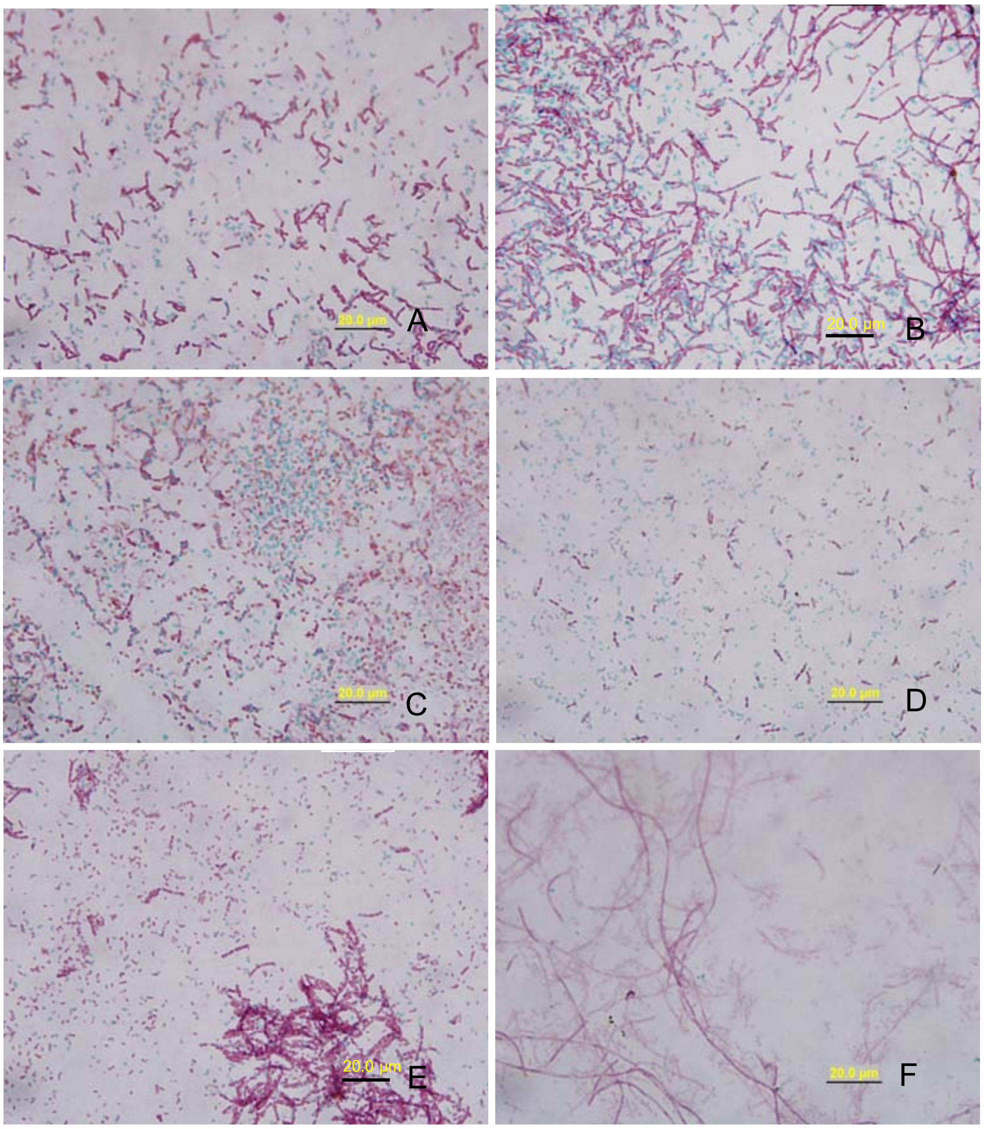
พบว่าจากการตรวจสอบกลุ่มหรือจีนัสของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สนใจของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต คือ LS75(1), LS21(1), LR102(1) และ LH10(1) ที่มีความสามารถบำบัดโลหะหนักได้ดี เป็นแบคทีเรียแกรมบวกคือเซลล์มีการติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลตและมีรูปร่างเป็นท่อนยาว



ภาพที่ 12 แสดงความสามารถในการบำบัดโลหะหนัก เหล็ก สังกะสี และทองแดงที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต คือ LS75(1), LS21(1), LR102(1), LH10(1) และแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่นำมาใช้เป็นตัวควบคุม (Control)

4.6.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิคการย้อมสีเอนโดสปอร์

ในกระบวนการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั่วไป มีขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการสร้างสปอร์ (Spore formation) พบว่าจากการตรวจสอบกลุ่มหรือจีนัสของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สนใจของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต คือ LS75(1), LS21(1), LR102(1) และ LH10(1) ที่มีความสามารถบำบัดโลหะหนักได้ดี เซลล์แบคทีเรียติดสีเขียวของ Malachite green (ภาพที่ 13) แสดงว่าเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้



ภาพที่ 13 แสดงภาพถ่ายการย้อมสีเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียที่แยกจากน้ำทิ้งและสามารถต้านทานโลหะหนัก ประกอบด้วย *B. subtilis* ตัวควบคุม (A) ไอโซเลต LS75(1) (B) ไอโซเลต LS70(1) (C) ไอโซเลต LR12(D) ไอโซเลต LH46(1)(E) และ ไอโซเลต LS21(1) (F)

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผล

ผลจากการขยายตัวของชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรม นำมาสู่การปล่อยน้ำเสียที่ขาดการบำบัดที่เหมาะสมลงสู่แหล่งน้ำ ทำให้เกิดการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก เป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมและความหลากหลายทางชีวภาพในระบบนิเวศ จึงได้ทำการศึกษาผลกระทบของการปนเปื้อนโลหะหนักต่อความหลากหลายของจุลินทรีย์ โดยเน้นการประยุกต์ใช้คุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะ โดยทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก คัดเลือกจุดเก็บตัวอย่าง ศึกษาการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักในช่วงฤดูฝนและฤดูร้อน จากแหล่งเก็บตัวอย่าง 4 แหล่ง คือ 1) ชุมชน 2) โรงพยาบาล 3) ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และ 4) ขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า นำไปตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมดและทำการสุ่มตัวอย่างแบคทีเรียหาร้อยละการต้านทานยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Streptomycin, Kanamycin, Tetracycline และ Chloramphenicol ด้วยวิธี Antibiotic diffusion assay การต้านทานโลหะหนัก ได้แก่ เหล็ก สังกะสี ทองแดงและปรอท ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TSA ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และศึกษาแนวทางการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถบำบัดโลหะหนักได้

จากผลการศึกษาครั้งนี้เริ่มจากการเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรม โดยเลือกคลองสำโรง พบว่าระดับความเข้มข้นยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักในแหล่งอื่นๆ ต่อไป สอดคล้องกับการศึกษาของ McArthur และ Tuckfield (2000) และ Pathak และ Gopal (2005) รายงานว่าสามารถคัดเลือกจุดเก็บตัวอย่างจากแหล่งชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรมโดยใช้ระดับความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นคัดเลือกจุดเก็บตัวอย่างที่มีจุดเก็บตัวอย่างมากกว่า 1 จุด โดยแหล่งชุมชน จุดย่อย คือ ชุมชนเก้าเส้ง โรงพยาบาล จุดย่อยคือ น้ำทิ้งในถังบำบัด และฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จุดย่อย คือ บ่อปูพื้นพลาสติกที่มีการเลี้ยงกุ้งขาว อายุ 100 วัน และจากการคัดเลือกจุดเก็บตัวอย่างย่อย พบว่าแบคทีเรียจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนสูงเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร TSA ที่ใส่ยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มีปริมาณสูงกว่าการทดสอบในอาหารสูตร TSA ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะหรือ โลหะหนัก คาดว่าแบคทีเรียสามารถปรับตัวหรือได้รับการถ่ายทอดยีนที่ต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก ทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะและโลหะหนักสูง (Timoney et al. 1978) ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงช่วงเวลาและปริมาณการปนเปื้อนที่แตกต่างกันมีผลต่อการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของแบคทีเรีย

ดังนั้นจึงนำไปสู่การศึกษาในช่วงฤดูที่แตกต่างกัน พบว่าการต้านทานยาปฏิชีวนะในช่วงฤดูฝนและฤดูร้อนของแบคทีเรียทั้ง 4 แหล่ง มีปริมาณร้อยละของการต้านทานยาปฏิชีวนะ Streptomycin, Kanamycin, Tetracycline และ Chloramphenicol อยู่ในช่วงร้อยละ 0-99 และร้อยละการต้านทานโลหะหนัก เหล็ก สังกะสี ทองแดงและปรอท อยู่ในช่วงร้อยละ 0-100 ปัจจัยของคุณภาพน้ำทางกายภาพ ทางเคมีและระยะเวลาการสลายตัวของยาปฏิชีวนะในช่วงฤดูกาลต่างกันมีผลต่อความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักเช่นกัน (Pathak et al. 1993) โดยเฉพาะแหล่งที่มีการปนเปื้อนแบบกระจาย เช่น แหล่งชุมชน และโรงงานอุตสาหกรรม แบคทีเรียสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักสูงและหลากหลายชนิดมากกว่าแหล่งอื่นๆ (Wiggins et al. 1999) ซึ่งร้อยละการต้านทานโลหะหนักมีปริมาณสอดคล้องกับข้อมูลการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักทางเคมีโดยวิธี Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) (Miranda and Zemelman. 2001) ความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ สามารถเรียงลำดับความสามารถในการต้านทานได้มากไปหาน้อยยาปฏิชีวนะ คือ Streptomycin>Kanamycin>Tetracycline>Chloramphenicol และโลหะหนัก คือ เหล็ก>สังกะสี>ทองแดง>ปรอท ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์และความรุนแรงที่แตกต่างกันของยาปฏิชีวนะและโลหะหนักมีผลต่อการต้านทานที่แตกต่างกันของแบคทีเรีย (Hassen et al. 1998; Madigan, Martinko and Parker. 2003)

จากข้อมูลร้อยละการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักในช่วงฤดูฝนและฤดูร้อนสามารถจับคู่ความสัมพันธ์ระหว่างยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของแบคทีเรียได้ดังนี้ Streptomycinกับสังกะสี Streptomycinกับทองแดง Tetracyclineกับปรอท Chloramphenicolกับสังกะสี และ Chloramphenicolกับทองแดง มีความสัมพันธ์กันโดยเมื่อปริมาณการต้านทานยาปฏิชีวนะสูงการต้านทานโลหะหนักสูงด้วยเช่นกัน (Pathak and Gopal. 2005; Groves. and Young: 1975; McArthur and Tuckfield. 2000; Calomiris, Armstrong and Seidler. 1984) ดังนั้นในแหล่งชุมชน โรงงานอุตสาหกรรมและโรงพยาบาลที่มีการปนเปื้อนทั้งยาปฏิชีวนะและโลหะหนักสูงมีแนวโน้มสามารถใช้คุณสมบัติการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Streptomycin, Tetracycline และ Chloramphenicol ของแบคทีเรียในการตรวจสอบการปนเปื้อนโลหะหนัก สังกะสี ทองแดง และปรอทเบื้องต้น อย่างไรก็ตามแหล่งที่ปนเปื้อนยาปฏิชีวนะและโลหะหนักในระดับความเข้มข้นต่ำ เช่น ในกระบวนการผลิตน้ำดื่ม ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า การใช้ความสัมพันธ์ของการต้านทานยาปฏิชีวนะในการตรวจสอบปริมาณโลหะหนักที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้อาจแสดงผลความสัมพันธ์ระหว่างการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักไม่ชัดเจน เนื่องจากความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักเป็นผลจากแบคทีเรียได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อมที่มี

ยาปฏิชีวนะและโลหะหนัก จึงจะปรากฏความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะหรือโลหะหนัก (Timoney et al. 1978; Baker-Austin et al. 2006) จากข้อจำกัดด้านชนิดของยาปฏิชีวนะและโลหะหนักจำเป็นต้องศึกษายาปฏิชีวนะและโลหะหนักอื่นๆ เพื่อให้สามารถตรวจสอบโลหะหนักได้หลากหลายชนิดมากยิ่งขึ้น และจำเป็นต้องศึกษาในสภาพแวดล้อมอื่นๆ เพิ่มเติมเพื่อให้สามารถนำความสัมพันธ์ที่ได้ประยุกต์ใช้ในสภาพจริงได้ต่อไป

นอกจากนี้ผลพลอยได้จากการทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักจากจุดเก็บตัวอย่างทั้ง 4 จุด ผู้วิจัยพบปรากฏการณ์การต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักได้มากกว่า 1 ชนิด (Multiple resistance) ของแบคทีเรีย โดยพบว่าแบคทีเรียสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิด อยู่ในช่วงร้อยละ 1-75.5และต้านทานโลหะหนักมากกว่า 1 ชนิด อยู่ในช่วงร้อยละ 1-98 โดยปริมาณยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่ปนเปื้อนสูงจากแหล่งชุมชน โรงงานอุตสาหกรรม และโรงพยาบาล แบคทีเรียต้านทานโลหะหนักและยาปฏิชีวนะได้ 3-4 ชนิด สูงกว่าฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่าอย่างชัดเจน การต้านทานยาปฏิชีวนะหรือโลหะหนักมากกว่า 1 ชนิด มีโอกาสเกิดขึ้นเมื่อยีนที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานอยู่ในตำแหน่งเดียวกันหรือสารพันธุกรรมเดียวกัน ซึ่งมีโอกาสเกิดขึ้นในการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่มีกลไกการออกฤทธิ์คล้ายคลึงกันหรือมีเป้าหมายการออกฤทธิ์เดียวกัน (Allen, Austin and Colwell. 1977; Calomiris, Armstrong and Seidler. 1984)

ผลจากการศึกษาแนวทางเบื้องต้นในการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการบำบัดโลหะหนักเหล็ก สังกะสี ทองแดง และปรอท ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแบคทีเรียที่สามารถต้านทานโลหะหนักได้ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีในสารละลายเปปโตนร้อยละ 1 และสามารถคัดเลือกแบคทีเรีย ได้ 4 ไอโซเลตคือ LS75(1) LS26(1) LR102(1) และ LH10(1) โดยแบคทีเรียสามารถบำบัดทองแดงได้ดีที่สุด รองลงมาคือเหล็ก และไม่สามารถบำบัดสังกะสีและปรอทได้ ผลการบำบัดทั้งหมดอยู่ในช่วง 29.1-72.7 ซึ่งแบคทีเรียไอโซเลต LS75(1) และ LS26(1) ที่ผ่านการคัดเลือกจากแหล่งชุมชนสามารถบำบัดโลหะหนักได้ดีกว่าแบคทีเรียที่แยกจากโรงพยาบาลและขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า คาดว่าการปนเปื้อนของโลหะหนักสูงในแหล่งชุมชนน่าจะมีอิทธิพลต่อคุณสมบัติการต้านทานและการเปลี่ยนรูปโลหะหนักทำให้การบำบัดโลหะหนักได้ดีเช่นกัน (Yilemaz. 2003; Costa and Duta. 2001; Williams and Silver, 2002) อย่างไรก็ตามหากมีการศึกษาต่ออาจปรับความเข้มข้นของโลหะหนักให้มีความเข้มข้นมากหรือน้อยกว่าการทดลองครั้งนี้แบคทีเรียเหล่านี้อาจสามารถบำบัดโลหะหนักได้สูงขึ้น ในสภาพธรรมชาติการปนเปื้อนโลหะหนักมีระดับความเข้มข้นแตกต่างกันและมีโลหะหนักมากกว่า 1 ชนิด ดังนั้นคาดว่ามีโอกาสเป็นไปได้ในการทดสอบการบำบัดโดยใช้แบคทีเรียมากกว่า 1 ไอโซเลต เลี้ยงร่วมกันเพื่อเพิ่ม

ประสิทธิภาพการบำบัด ตลอดจนการปรับชนิดอาหารที่แตกต่างออกไป เพื่อเป็นการประหยัดงบประมาณในกรณีที่นำไปใช้ในการทดลองสเกลใหญ่ เช่น กากน้ำตาล (Quan et al. 2005)

ผลการตรวจสอบกลุ่มหรือจีนัสของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถสูงในการบำบัดโลหะหนัก พบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต เมื่อย้อมสีแบบแกรมติดสีน้ำเงินของคริสตัลไวโอเลตและเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาพบลักษณะรูปร่างเป็นท่อน แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกและพบว่าสามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ ดังนั้นจึงคาดว่าแบคทีเรียที่ศึกษาเป็น *Bacillus* spp. จากความสามารถบำบัดโลหะหนักได้ดี เนื่องจากแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มักเป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นในแหล่งที่ปนเปื้อนโลหะหนักและสามารถการบำบัดโลหะหนักได้ดี (Kaewchai and Presertsan. 2002; Yilmaz. 2003) จึงได้ทดสอบเพื่อยืนยันผลการทดลองอีกครั้งโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล คือเทคนิค Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) ซึ่งเป็นเทคนิคการตรวจสอบชนิดแบคทีเรียที่มีพัฒนาและวิจัยอย่างต่อเนื่องอยู่แล้วในกลุ่มวิจัยของ นุกูล อินทระสังขา จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พบว่าเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ดีเอ็นเอโพรบ EUB338b, EUB338-IIb EUB338-IIIb และ LGC354b กับแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต คือ LS75(1) LS26(1) LR102(1) และ LH10(1) พบการติดดีเอ็นเอโพรบ EUBmixed มองเห็นเซลล์เป็นสีเขียวจากสี Fluorescein ซึ่งแสดงว่าเป็นแบคทีเรียที่แท้จริง (Eubacteria) และติดดีเอ็นเอโพรบ LGC มองเห็นเซลล์เป็นสีแดงจากสี Cy3 จึงคาดว่าน่าจะเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. เนื่องจากดีเอ็นเอโพรบ LGC ออกแบบให้ครอบคลุมแบคทีเรียในคลาส Bacillales ซึ่งมีจีนัส *Bacillus* รวมอยู่ด้วย ซึ่งจะเห็นว่าการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการตรวจสอบชนิดของเชื้อที่ทำได้รวดเร็วและเป็นการยืนยันผลการทดลองการย้อมสีแบบแกรมและการย้อมสีเอนโดสปอร์อีกครั้ง จากผลการทดลองทั้งหมดนี้สามารถใช้เทคนิคและวิธีการศึกษาคัดเลือกแบคทีเรีย เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียและการทดสอบการบำบัดในโลหะหนักชนิดอื่นต่อไป

5.2 สรุป

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณสารเคมีอันตรายโดยเฉพาะโลหะหนัก เหล็ก สังกะสี ทองแดง และปรอทต่อการต้านยาปฏิชีวนะ Streptomycin, Kanamycin, Tetracycline และ Chloramphenicol ของแบคทีเรียในน้ำเสียจาก 4 แหล่ง คือ แหล่งชุมชน โรงพยาบาล ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในจังหวัดสงขลา และขุมเหมืองแร่ดีบุกเก่า ในจังหวัดนครศรีธรรมราช แหล่งที่มีปริมาณโลหะหนักสูงจากการวิเคราะห์ทางเคมีพบการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของแบคทีเรียสูงเช่นกัน และการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักในช่วงฤดูฝนและฤดูร้อน พบว่าร้อยละของการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของแบคทีเรียระหว่าง Streptomycinกับ

สังกะสี Streptomycinกับทองแดง Tetracyclineกับปรอท Chloramphenicolกับสังกะสี และ Chloramphenicolกับทองแดง มีความสัมพันธ์กัน จึงมีแนวโน้มใช้ความต้านทานต่อ Streptomycin, Tetracycline และ Chloramphenicol ของแบคทีเรียเป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนโลหะหนักโดยเฉพาะ สังกะสี ทองแดง และปรอทได้ ในแหล่งเก็บตัวอย่างที่ปนเปื้อนยาปฏิชีวนะและโลหะหนักสูง เช่น ชุมชน โรงงานอุตสาหกรรม และโรงพยาบาล

นอกจากนั้นสามารถใช้เป็นความรู้พื้นฐานสำหรับการประยุกต์ใช้คุณสมบัติการต้านทาน ยาปฏิชีวนะในการตรวจสอบการปนเปื้อนโลหะหนัก และผลกระทบของโลหะหนักต่อความหลากหลาย ของจุลินทรีย์ในแหล่งอื่นๆ ต่อไป เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกัน และจัดการที่เหมาะสมในการลด ผลกระทบที่เกิดจากแบคทีเรียที่ต้านยาปฏิชีวนะและสารเคมีอันตรายที่ส่งผลต่อระบบนิเวศและ คุณภาพชีวิตของประชาชน ตลอดจนสามารถดัดแปลงวิธีคัดเลือกแบคทีเรียจากแหล่งปนเปื้อนโลหะ หนัก และการทดสอบความสามารถในการเจริญในสารละลายเปปโตนร้อยละ 1 พบว่าแบคทีเรียที่แยก ได้จากแหล่งที่มีการปนเปื้อนโลหะหนักสามารถบำบัดโลหะหนักทองแดงและเหล็กได้ และคาดว่าเป็น แบคทีเรียจีนัส *Bacillus* spp. เนื่องจากเซลล์ติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต รูปร่างเป็นท่อนยาวและ สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ ซึ่งการศึกษาดังกล่าวเป็นเพียงแนวทางเบื้องต้นในการคัดเลือกแบคทีเรีย ที่มีคุณสมบัติในการบำบัดโลหะหนักและมีแนวโน้มสามารถใช้เป็นวิธีการในการคัดเลือกแบคทีเรียใน แหล่งอื่นๆ ได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ควรนำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักในบริเวณ อื่นๆ เช่น โรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล แหล่งชุมชนหนาแน่น และบ่อฝังกลบขยะ
2. ควรมีการศึกษาการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่จำเพาะกับชนิดของ แบคทีเรีย เช่น *Bacillus* spp, *E. coli* และ *Staphylococcus* spp. เป็นต้น ในแหล่งเก็บตัวอย่างเดิม
3. ควรมีการศึกษาการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักชนิดอื่นๆ เช่น Ampicillin, Vancomycin, Oxolinic acid สารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม เป็นต้น
4. ควรมีการนำแบคทีเรียที่สามารถบำบัดโลหะหนักได้ดีไปศึกษาต่อเพื่อพัฒนาเป็นเชื้อ สำหรับประยุกต์ใช้สภาพแวดล้อมต่อไป
5. ควรทำการศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในแหล่งที่ ได้รับผลกระทบต่อการปนเปื้อนโลหะหนัก เช่น โรงงานอุตสาหกรรม กับแหล่งที่ไม่ได้รับการปนเปื้อน

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม และสมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย. (2545). ตำราระบบบำบัดมลพิษน้ำ. กรุงเทพฯ: สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย.

ขวัญตา ตันติกำธน. (2549). การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการบำบัดโลหะหนักจากขุมเหมืองแร่เก่า อำเภอร่อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราช. ภาคนิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สงขลา: มหาวิทยาลัยทักษิณ

ผกาวดี นารอง และกรรณิกา รัตนพงศ์เลขา. (2542). ประสิทธิภาพของการดูดซับโลหะหนักโดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* ร่วมกับกาบมะพร้าวในระบบเครื่องกรองไร้อากาศแบบไหลขึ้น. วิศวกรรมสาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 4: 2542.

วิมล ชอบชื่นชม. (1998). การย่อยสลายสารตกค้างด้วยจุลชีพ. Thai Environmental Engineering. 12(3): 42-45.

สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. (2546). โครงการจัดทำแผนแม่บทการพัฒนาลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลา รายงานความก้าวหน้า เล่มที่ 3 สรุปรายงานสถานการณ์ลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลาและแนวทางการวางแผนแม่บท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ สถาบันราชภัฏสงขลา. เอกสารอัดสำเนา.

Alanis, A., J. (2005). Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? Archives of Medical Research. 36: 697-705.

Allen, D., Austin, B. and Colwell, R. (1977). Antibiotic Resistance Patterns of Metal-Tolerant Bacteria Isolated from an Estuary. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 12(4): 545-547.

APHA. (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington, DC: American Public Health Association.

Austin, D., Kristinsson, K., and Anderson, R. (1999). The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences. 96: 1152-1156

Bae, W., Wu, C., Kostal, J., Mulchandani, A. and Chen, W. (2003). Enhanced Mercury Biosorption by Bacterial Cells with Surface-Displayed *Mer*R. Applied and Environmental Microbiology. 69(6): 3176-3180.

Baker-Austin, C., Wright, M., S., Stepanauskas, R. and McArthur, J., V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. TRENDS in Microbiology. 14(4): 176-182.

Barkay, T. (1987). Adaptation of Aquatic Microbial Communities to Hg^{2+} Stress. Applied and Environmental Microbiology. 53(12): 2725-2732.

Baticodos, M., C., L., Lavilla-Patogo, C., R., Cruz-Lacicerda, E., R., de la Pena and Sunaz, N., A. (1990). Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harvey*i and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. Disease of Aquatic Organisms. 9: 133-139.

Baya, A., M., Brayton, P., R., Brown, V., L., Grimes, D., J., Russek-cohen, E. and Colwell, R. (1986). Coincident Plasmids and Antimicrobial Resistance in marine Bacteria Isolated from Polluted and Unpolluted Atlantic Ocean Samples. Applied and Environmental Microbiology. 51(6): 1285-1292.

Benyehuda, G., Coombs, J., Ward, P., L., Balkwill, D. and Barkay, T. (2003). Metal resistance among aerobic chemoheterotrophic bacteria from the deep terrestrial subsurface. Canadian Journal of Microbiology. 49: 151-156.

Beovi□, B. (2006). The issue of antimicrobial resistance in human medicine. International Journal of Food Microbiology. 11: 237-240.

Bitton, G. (1994). Wastewater Microbiology. New York: Willey-Liss.

Bontidean, I., Mortari, A., Leth, S., Karlson, U., Larsen, M., Vangronsveld, J., Corbisier, P. and Csoregi E. (2004). Biosensors for detection of mercury in contaminated soils. Environmental Pollution. 131(2): 255-262.

Boonchalermkit , S., Wongsanoon, J. and Fukuda, M. (2545). การศึกษาการปนเปื้อนของสารหนูในอ่าวปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช ประเทศไทย. รายงานการวิจัย พ.ศ. 2537-2543 ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมด้านสิ่งแวดล้อม. กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม.

Branco, R., Chung, A., Verissimo, A. and Morais, P. (2005). Impact of Chromium-contaminated wastewaters on the microbial community of a river. FEMS Microbiology Ecology. 54: 35-46.

Brown, K., D., Kulis, J., Thomson, B., Timothy, H., Chapman, D. and Mawhinney, B. (2005). Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. Science of the Total Environment. 366(2-3): 772-783.

Bruins, M., Kapil, S. and Oehme, F. (2000). Microbial resistane to metal in the environment. Ecotoxicology and Environmental Safety. 45: 198-207.

Brunke, M., Deckwer, W., Frischmuth, A., Horn, J., Lunsdorf, H., Rhode, M., Rohricht, M., Timmis, K. and Weppen, P. (2002). Microbial retentions of mercury from waste streams in a laboratory column containing *mer*A gene bacteria. FEMS Microbiology Review. 11(1-3): 145-152.

Bustamante, W., Alpizar, A., Hernandez, S., Pacheco, A., Vargas, N., Herrera, M., Vasgas, A., Caballero, M. and Garcia, F. (2003). Predominance of *van*A Genotype among Vancomycin-Resistant *Enterococcus* Isolates from Poultry and Swine in Costa Rica. Applied and Environmental Microbiology. 69(12): 7414-7419.

Cabuk, A., Akar, T., Tunali, S. and Tabak, O. (2005). Biosorption characteristics of *Bacillus* sp. ATS-2 immobilized in silica gel for remove of Pb(II). Journal of Hazardous Materials. 136(2): 317-323.

Calomiris, J., Armstrong, J. and Seidler, R. (1984). Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of bacteria isolated from drinking water. Applied and Environmental Microbiology. 47(6): 1238-1242.

Callanhan, H. and Beverley, S. (1991). Heavy metal resistance: a new role for *P*-glycoproteins in *Leishmania*. Journal of Biology Chemistry. 266(28): 18427-1843.

Canstein, H., Timmism, K., Deckwer, W. and Wagner-Dobler I. (1999). Removal of Mercury from Chloralkali Electrolysis Wastewater by a Mercury-Resistant *Pseudomonas putida* Strain. Applied and Environmental Microbiology. 65(12): 5279-5284.

Carolina, C., Criado, A., Marta, Dı´az, B., Norman, A. and Garcı´, A. (2006). Riboflavin as a Sensitiser in the Photodegradation of Tetracyclines. Kinetics, mechanism and microbiological implications dyes and pigments. 72: 178-184.

Cheevaporn, V., Jacinto, G. and Sandiego-McGlone, M. (1995). Heavy Metal Fluxes in Bang Pakong River Estuary, Thailand: Sedimentary vs Diffusive Fluxes. Marine Pollution Bulletin. 31: 290-294.

Choudhury, R. and Srivastava, S. (2001). Zinc resistance mechanisms in bacteria. Current Science. 81(7): 768-775.

Clausen, C., A. (2000). Isolating metal-tolerant bacteria capable of removing copper, chromium, and arsenic from treated wood. Waste Management and Research. 18: 264-268.

Cooksey, D., A. (1994). Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. FEMS Microbial Review. 14(4): 381-386.

Costa, A., C. and Duta, F. (2001). Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*. Brazillian Journal of Microbiology, 32: 1-5.

De, J. and Ramaiah, N. (2006). Characterization of marine bacteria highly resistant to mercury exhibiting multiple resistances to toxic chemicals. Ecological Indicators. 23: 54-60.

Dursun, U., O., Cuci, Y., and Ekiz, H. (2003). A comparative investigation on the bioaccumulation of heavy metal ions by growing *Rhizopus arrhizus* and *Aspergillusniger*. Biochemical Engineering. 15: 87-92.

Gerbel, J. and Lill R. (2002). Biogenesis of iron–sulfur proteins in eukaryotes: components, mechanism and pathology. Mitochondrion. 2: 71-86.

Ghosh, S., Mahapatra, N., M. and Banerjee, P., C. (1997). Metal resistance in *Acidocella* Strains and Plasmid-Mediated Transfer of This Characteristic to *Acidiphilium multivorum* and *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. 63(11): 4523-4527.

Goni-urriza, M., Capdepuy, M., Arpin, C., Raymond, N., Caumette, P. and Quentin, C. (2000). Impact of an Urban Effluent on antibiotic Resistance of Riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. Applied and Environmental Microbiology. 66(1): 125-132.

Groves, D., and Young, F. (1975). Epidemiology of Antibiotic and Heavy metal Resistance in Resistance Patterns in *Staphylococci* Isolated from Populat to be Exposed to Heavy Metals. Antimicrob Agents Chemother. 7(5): 614-621.

Guardabassi, L., Petersen, A., Olsen, J. and Dalsgaard, A. (1998). Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. Isolated from Sewers Receiving Waste Effluent from a hospital and a Pharmaceutical Plant. Applied and Environmental Microbiology. 64(9): 3499-3502.

Hameed, S. and Balasubramanian, G. (1999). Antibiotic resistance in bacteria isolated from *Artemia nauplii* and efficacy of formaldehyde to control bacterial load. Aquaculture. 183:195-200.

Hameed, S., Rahaman, K., H., Alagan, A. and Yoganandhan, K. (2002). Antibiotic resistance in bacteria isolated from hatchery-reared larvae and post-larvae of *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture. 217: 39-48.

Hancock, R. (2005). Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. Review the Lancet Infectious Diseases. 5(4): 209-218.

Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M. and Boudabous. (1998). Resistance of environmental bacteria to heavy metals. Bioresource Technology. 64: 7-15.

Hansen, L. and Sorensen, S. 2000. Versatile biosensor vectors for diction and quantification of mercury. FEMS Microbiology Letters. 193: 123-127

He, L., Z., Yanga, E., X. and Stoffella, J., P. (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 19: 125–140.

Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K. and Kratz, K. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. The Science of the Total Environment. 225: 109-118.

Kaewchai, S. and Presertsan, P. (2002). Bioasorbtion of heavy metal by therotolerant polymer production bacterial cells and the bioflocculant. Songkhlanakarin Journal of Science Technology. 24(3): 421-430.

Kanwal, R., Ahmed, T., Tahir, S. and Rauf, N. (2004). Resistance of *Bacillus cereus* and *E. coli* Towards Lead, Copper, Iron, Manganese and Arsenic. Pakistan Journal of Biological Sciences. 7(1): 6-9.

Karunasagar, I., Pai, R., Malathai, G., R. and Kunasagar, I. (1994). Mass motality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-restanct *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture. 128:203-209.

Kerry, J., Hiney, M., Coyne, R., Nicgabhainn, S., Gilruy, D., Cazabon, D. and Smith, P. (1994). Fish feed as a source of oxytetracycline-resistant bacteria in the sediments under fish farms. Aquaculture. 131:101-113.

Kruse, H. and Sorum, H. (1994). Transfer of Multiple Drug Resistance Plasmids between Bacteria of Diverse Origins in Natural Microenvirongments. Applied and Environmental Microbiology. 60(11): 4015-4021.

Ku¨mmerer, K. (2004). Resistance in the environment. Antimicrobial Chemotherapy . 54: 311–320.

Lasar, V., Cernat, R., Balotescu, C., Cotar, A., Coipan, E. and Cojocaru, C. (2002). Correlation between multiple antibiotic resistance and heavy-metal tolerance among some *E.coli* strains isolated from polluted waters. Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol. 47(3-4): 155-160.

Le, T., Munekage, Y. and Kato, S. (2005). Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farm in mangrove areas. Science of the Total Environment. 349(1-3): 95-105

Madigan, M., Martinko, J. and Parker, J. (2003). Brock Biology of Microorganisms. 10th ed. New Jersey. Pearson Education, Inc.

Malik, A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. Environment International. 30: 261-278.

Marquez, B. (2005). Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. Biochimie. 87: 1137–1147.

McArthur, V. and Tuckfield, R. (2000). Spatial patterns in antibiotic resistance among stream bacteria: effects in industrail pollution. Applied and Environmental Microbiology. 66:3722-3726.

McEwen, S., and Fedorka-Cray, J. (2002). Antimicrobial Use and Resistance in Animals. Clinical Infectious Diseases. 34(3): 93-106.

Miranda, C., D. and Zemelman, R. (2001). Antibiotic resistant bacteria in fish from Concepcion Bay, Chile. Marine Pollution Bulletine. 42: 1096–1102.

Moat, G., Foster, J., Micheal, W. and Specter, P. (2002). Microbial Physiology (4th). New York : Wiley-Liss Inc.

Moffett, F., Nicholson, A., Uwakwe, C., Chambers, B., Harris, J. and Hill, T. (2002). Zinc contamination decreases the bacterial diversity of agricutural soil. FEMS Microbiology Ecology. 43: 13-19.

Mullen, M., Wolf, D., Ferris, F., Beveridge, T., Flemming, C. and Bailey, G. (1989). Bacterial Sorption of Heavy metals. Applied and Environmental Microbiology. 55(12): 3143-3149.

Narita, M., Matsui, K., Huang, C., Kawabata, Z. and Endo, G. (2004). Dissemination of Tn*MERII*-like mercury resistance transposons among *Bacillus* isolated from worldwide environmental samples. FEMS Microbiology Ecology. 45; 223-229.

Nascimento, M., A. and Chartone-Souza, E. (2003). Operon *mer*: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. Genetics and Molecular Research. 2(1): 92-101.

Nies, D., H. (1999). Microbial heavy metal resistance. Applied and Environmental Microbiology. 51: 730-750.

Nies, D., H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews. 27: 313-339.

Nieto, J., Ventosa, A. and Ruiz-Berraquero, F. (1987). Susceptibility of halobacteria to heavy metals. Applied and Environmental Microbiology. 53: 1199-1202.

Novick, R., P. and Roth, C. (1968). Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*, Janoul Bacteriol. 95: 1335-1342.

Pathak, S. and Gopal, K. (2005). Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish. Environmental Research. 98: 100–103.

Piotrowska-Seget, Z., Cycon, M. and Kozdroj, J. (2005). Metal-toleant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. Applied Soil Ecology. 28(3): 237-246.

Purohit, H. 2003. Biosensors as molecular tools for use in bioremediation. Journal of Cleaner Production. 11: 293-301.

Quan, Z., Jin, Y., Yin, C., Lee, J. and Lee, S. (2005). Hydrolyzed molasses as an external carbon source in biological nitrogen removal. Bioresource Technology, 96(15): 1690-1695.

Reyes, N., S., Frischer, M., E. and Sobecky, P., A. (1999). Characterization of mercury resistance mechanisms in marine sediment microbial communities. FEMS Microbiology Ecology. 30: 273-28.

Rhodes, G., Huys, G., Swings, J., Mcgann, P., Hiney, M., Smith, P. and Pickup, R., (2000). Distribution of Oxytetracycline Resistance Plasmids between *Aeromonads* in Hospital and Aquaculture Environments: Implication of *Tn*1721 in Dissemination of the Tetracycline Resistance Determinant *Tet* A. Applied and Environmental Microbiology, 66(9): 3883-3890.

Sadhukhan, L., C., Gu, X., and Wong, J., C. (1997). Comparison of bioleaching of heavy metal from sewage sludge using iron and sulfur-oxidizing bacteria. Advances in Environmental Research. 7: 603-607.

Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B. and Obst, U. (2002). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. FEMS Microbiology Ecology. 43: 325-335.

Silver, S. (1996). Bacterial resistances to toxic meatal ions- a review. Gene. 179: 9-19.

Silver, S. and Phung, L., T. (1996). Bacterial heavy metal resistance: New surprises. Annual Reviews Microbiology. 50: 753-789.

Sirianuntapiboon, S. and Hongsrisuwan, T. (2006). Removal of Zn^{2+} and Cu^{2+} by a sequencing batch reactor (SBR) system. Bioresource Technology. 98(4): 808-818.

Spain, A. (2003). Implications of Microbial Heavy Metal Tolerance in the Environment. Review in Undergraduate Research. 2: 1-6.

Spanggaard, B., Jorgensen, F., Gram, L. and Huss, H. (1993). Antibiotic resistance in bacteria isolated from three freshwater fish farms and an unpolluted stream in Denmark. Aquaculture. 115: 195-207.

Stepanauskas, R., Glenn, T., Jagoe, C., Tuckfield, R., Lindell, A. and McArthur. (2005). Evevated Microbial Tolerance to Metals and Antibiotics in Metal-Contaminated Industrial Environments. Environmental Science Technology. 39: 3671-3678.

Stepanauskas, R., Glenn, T., Jagoe, C., Tuckfield, R., Lindell, A., Catherine, K. and McArthur, J., V. (2006). Co-selection for microbial resistance to metals and antibiotics in freshwater microcosms. Environmental Microbiology. 8(9): 1510-1514.

Teitzel, G., M. and Parsek, R., M. (2003). Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology. 69(4): 2313-2330.

Tendercia, E. and Leobert, D. (2001). Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. Aquaculture. 195(2001): 193-204.

Tendencia, E., A. and Pena, L., D. (2001). Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. Aquaculture. 195: 193-204.

Tenover, F., C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Supplement I. 34(5): 53-60.

Timony, J., F., port, J., Giles, J. and Spanier, J. (1978). Heavy-Metal and Antibiotic Resistance in the Bacterial Floral of Sediment of New York Bight. Applied and Environmental Microbiology. 36(3):465-472.

Turpeinen, R., Kairesalo, T. and Haggblom, M. (2004). Microbial community structure and activity in arsenic, chromium and copper-contaminated soils. FEMS Microbiology Ecology. 47(1): 39-50.

Verma, T., Srinath, T., Gadpayle, R., U., Ramteke, P., W., Hans, R., K. and Garg, S., K. (2000). Chromate tolerant bacteria isolated from tannery effluent. Bioresource Technology. 78(2001):31-35.

Wiggins, B., A., Andrews, R., W., Conway, R., A., Dobratz, C., L., Dougherty, D., P., Eppard, J., R., Knupp, S., R., Limjoco, M., C., Sonsino, J., Torrijos, R. and Zimmerman, M., E. (1999). Use of antibiotic resistance analysis to identify nonpoint sources of faecal pollution. Applied and Environmental Microbiology. 65: 3427–3432.

Williams, J. and Silver, S. (2002). Bacterial resistance and detoxification of heavy metal. Enzyme and Microbial Technology. 6(12): 530-537.

Whright, M., Stepanauskas, R. and McArthur, J. (2004). The role of macroinvertebrates in the transfer and transport of antibiotic resistant bacteria in heavy metal contaminated streams. Microbiology Ecology. NABS Annual meeting.

Wright, G. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. Advanced Drug Delivery Reviews. 57: 1451– 1470.

Yamamura, S., Ike, M. and Fujita, M. (2003). Dissimilatory Arsenate Reduction by a Facultative Anaerobe, *Bacillus* sp. Strain SF-1. Journal of Bioscience and Bioengineering. 96(5): 454-460.

Yilmaz, E., I. (2003). Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1. Research in Microbiology. 154: 409-415.

Yoo, M., H., Huh, M., D., Kim, E., Lee, H. and Jeong, H., D. (2002). Characterization of chloramphenicol acetyltransferase gene by multiplex polymerase chain reaction in multidrug-resistant strains isolated from aquatic environments. Aquaculture. 217:11-21.

Zouboulis, A., I., Loukidou, M., X. and Matis, K., A. (2004). Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. Process Biochemistry. 39: 909-916.

.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 17 แสดงบริเวณยับยั้ง (Antibiotic diffusion zones) มาตรฐานของยาปฏิชีวนะสำหรับแบคทีเรียก่อโรคในคน (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) (Madigan, Martinko and Parker. 2003)

Antimicrobial agent	Concentration ug	Resistant (R)	Intermediate (I)	Susceptible (S)
Chloramphenicol	30	<12	13-17	>18
Streptomycin	10	<11	12-14	>15
Tetracycline	30	<14	15-18	>19
Kanamycin	30	<13	14-17	>18
Vancomycin	30	<9	10-11	>12
Ampicillin	30	<12	12-13	>13
Oxytetracycline	30	<15	15-18	>18
Erythromycin	15	<13	14-22	>23
Gentamicin	10	<12	13-14	>15

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 18 แสดงมาตรฐานโลหะหนักของคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน (กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม และสมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, 2545)

Parameter	Unit	Standard value
Arsenic (As)	mg/l	0.01
Cadmium	mg/l	0.005
Chromium (Cr-Hexavalent)	mg/l	0.05
Copper (Cu)	mg/l	0.1
Cyanide	mg/l	0.005
Lead (Pb)	mg/l	0.05
Manganese (Mn)	mg/l	1.0
Nickel (Ni)	mg/l	0.1
Total mercury (Hg)	mg/l	0.002
Zinc (Zn)	mg/l	1.0

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ลัดดาวรรณ ชื่อสกุล จันทโหม

เกิดวันที่ 12 เดือน เมษายน พุทธศักราช 2523

ที่อยู่ปัจจุบัน 160/1 หมู่ 3 ตำบลพะวง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90110

สถานที่ทำงานปัจจุบัน -

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2546 วท.บ. (เกษตรศาสตร์) จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

พ.ศ. 2549 วท.ม. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยทักษิณ

ผลงานทางวิชาการ

ลัดดาวรรณ จันทโหม นพดล ศุกระกาญจน์ หิริหัทยา เพชรมั่ง และนุกูล อินทระสังขา. (2549). การประยุกต์ใช้คุณสมบัติการต้านทานยาปฏิชีวนะในการตรวจสอบผลกระทบของการปนเปื้อนโลหะหนักต่อความหลากหลายของแบคทีเรียในน้ำเสียจากชุมชนและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. ใน การประชุมทางวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 5. ณ โรงแรมสยามซิตี้ กรุงเทพ 8-10 มีนาคม 2549.

ลัดดาวรรณ จันทโหม นพดล ศุกระกาญจน์ หิริหัทยา เพชรมั่ง และนุกูล อินทระสังขา. (2548). การประยุกต์ใช้คุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะในการตรวจสอบผลกระทบของการปนเปื้อนโลหะหนักต่อความหลากหลายของจุลินทรีย์จากน้ำทิ้งชุมชนและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. บทคัดย่อโครงการวิจัยและวิทยานิพนธ์ 2548 ใน การประชุมวิชาการประจำปี โครงการ BRT ครั้งที่ 9. ณ โรงแรมโซฟิเทล ราชาออคิด จังหวัดขอนแก่น ระหว่างวันที่ 10-13 ตุลาคม 2548

ลัดดาวรรณ จันทโหม นพดล ศุกระกาญจน์ หิริหัทยา เพชรมั่ง และนุกูล อินทระสังขา. (2549). การประยุกต์ใช้คุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะในการตรวจสอบผลกระทบของการปนเปื้อนโลหะหนักต่อความหลากหลายของจุลินทรีย์จากน้ำทิ้งชุมชนและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. บทคัดย่อโครงการวิจัยและวิทยานิพนธ์ 2549 ใน การประชุมวิชาการประจำปี โครงการ BRT ครั้งที่ 10. ณ มาริไทม์ ปาร์ค แอนด์ รีสอร์ท จังหวัดกระบี่ ระหว่างวันที่ 8-11 ตุลาคม 2549