สภาวะที่เหมาะสมต่อการออกซิเดชันอาร์ซิไนต์โดย *Bacillus* sp. PNKP-S2

Optimum Condition for Arsenite Oxidation by *Bacillus* sp. PNKP-S2

พิยาดา ไชยสินธิ์ และปราณี พัฒนพิพิธไพศาล*
Piyada Chaisin and Pranee Pattanapipitpaisal
ห้องปฏิบัติการไบโอรีเมดดิเอชัน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
วันที่ส่ง : 9 มิถุนายน 2559 วันที่แก้ไข : 19 ธันวาคม 2559 วันที่ตอบรับ : 22 ธันวาคม 2559

บทคัดย่อ

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียออกซิไดส์อาร์ซิไนต์ *Bacillus* sp. PNKP-S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment and growth medium (EG medium) ที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมอาร์ซิไนต์เริ่มต้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภายใต้สภาวะแวดล้อมต่างๆ เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการออกซิไดส์และลดความเป็นพิษของอาร์ซิไนต์ ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการออกซิไดส์อาร์ซิไนต์คือทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. PNKP-S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EG medium ที่มีความเข้มข้นโพแทสเซียมอาร์ซิไนท์ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและโซเดียมอะซิเตท 15 ไมโครโมลต่อลิตร ที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 หัวเชื้อเริ่มต้น 6 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำให้โพแทสเซียมอาร์ซิไนท์ลดลงเหลือเท่ากับ 0.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการออกซิเดชันเท่ากับ 99.25 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองที่ได้ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PNKP-S2 ในการออกซิไดส์อาร์ซิไนต์เป็นอาร์ซิเนต จึงสามารถเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำไปใช้พัฒนาเพื่อการบำบัดน้ำใต้ดินโดยวิธีทางชีวภาพต่อไป

คำสำคัญ : แบคทีเรียออกซิไดส์อาร์ซิไนต์ การออกซิไนท์อาร์ซิไนต์ การบำบัดอาร์ซินิคโดยวิธีทางชีวภาพ การฟื้นฟูสารมลพิษทางชีวภาพ

Abstract

As (III)-oxidizer, *Bacillus* sp. PNKP-S2 was cultured in enrichment and growth medium (EG medium) containing of 100 µg/ml initial potassium arsenite under various conditions in order to investigate the optimal condition for oxidation and removal of arsenite by this bacterium. The result showed that the optimization of As (III)-oxidation was obtained by cultivation of *Bacillus* sp. PNKP-S2 in EG medium containing potassium arsenite and sodium acetate at 100 µg/ml and 15 µmol/l, respectively, with the initial pH

*ที่อยู่ติดต่อ. E–mail address : *scpranpa@gmail.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

of 6.5 and inoculum size of 6 %. The incubation was performed at 150 rpm of rotary shaker at 35°C for 96 hr resulting in the concentration of potassium arsenite reduced to 0.75 µg/ml or 99.25% of the oxidation rate. This study indicated that *Bacillus* sp. PNKP-S2 could be an alternative strain for bioremediation of groundwater in the near future.

Keywords: arsenite-oxidizing bacteria; arsenic-tolerant bacteria; oxidation of arsenite; bioremediation

1. บทนำ

อาร์ซินิค (As) เป็นอโลหะสำคัญที่ก่อปัญหามลพิษในน้ำใต้ดินและน้ำดื่มทั่วโลก โดยเฉพาะในแถบลุ่มแม่น้ำเบงกอล ประเทศปากีสถานและอินเดียซึ่งเป็นตัวอย่างหนึ่งที่สำคัญเพราะประชากรประมาณ 35 ล้านคนบริโภคน้ำใต้ดินที่มีการปนเปื้อนของอาร์ซินิคที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 50 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 20-30 ปี และพบว่าประชากร 1 ล้านคนป่วยเนื่องจากความเป็นพิษเรื้อรังของอาร์ซินิค นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนของอาร์ซินิคในน้ำใต้ดินในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น เวียดนาม ไทย กัมพูชาและพม่า [1-3] อาร์ซินิคที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพของมนุษย์หลังการสะสมในร่างกายมากกว่า 10-15 ปี [4] ซึ่งความรุนแรงของความเป็นพิษเรื้อรังหรือโรคพิษอาร์ซินิคเรื้อรังหรืออาร์ซินิโคซิส (Arsenicosis) จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับระยะเวลาการได้รับและสะสมสารในร่างกาย อาการของโรคนี้เริ่มตั้งแต่ลักษณะผิวหนังเป็นผื่นแดงและคัน เกิดเม็ดนูนแล้วมีอาการคล้ายโรคหิด ตกสะเก็ด ผิวหนังจะลอกและมีสีคล้ำ ความเป็นพิษเรื้อรังยังมีผลต่อระบบหลอดเลือดหัวใจ ระบบประสาท ปอด ไต และทำให้เกิดมะเร็งผิวหนังและมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ [1] สำหรับประทศไทยนั้น รัฐบาลมีนโยบายส่งเสริมให้ประชาชนทุกพื้นที่มีน้ำดื่มน้ำใช้ของตนเองสนับสนุนให้มีประปาหมู่บ้าน รวมทั้งสนับสนุนให้มีการขุดบ่อน้ำบาดาลทั่วทุกภูมิภาค โดยเน้นเรื่องความสะอาดที่ปราศจากเชื้อโรค แต่เรื่องการปนเปื้อนของโลหะชนิดต่างๆ โดยเฉพาะอาร์ซินิคยังไม่มีการสนับสนุนเป็นปัจจัยหลักในการตรวจวิเคราะห์ และจากการประชุมปัญหาของอาร์ซินิคในบังกลาเทศ เบงกอลตอนใต้และเนปาล ทำให้เกิดความตื่นกลัวและตระหนักถึงปัญหาของอาร์ซินิคในเขตประเทศลุ่มแม่น้ำ บริเวณที่ได้รับสนใจมากที่สุดคือบริเวณลุ่มแม่น้ำโขงในเวียดนามตอนใต้และบริเวณประเทศกัมพูชาที่มีแม่น้ำโขงและแม่น้ำสาขาที่ไหลผ่านและมีการสะสมของตะกอนดินที่น้ำพัดพามา [5] มีรายงานหลายฉบับพบการปนเปื้อนของอาร์ซินิคในน้ำใต้ดินในเขตชุมชนลุ่มแม่น้ำโขงของประเทศจีน กัมพูชาและเวียดนามอยู่ในระดับเกินมาตรฐานกำหนด และประชากรในเขตพื้นที่ดังกล่าวมีความเสี่ยงต่อความเป็นพิษเรื้อรังของอาร์ซินิค [6-12] สำหรับประเทศไทยซึ่งอยู่ในแนวลุ่มแม่น้ำโขงตอนล่างเช่นเดียวกัน โอกาสที่จะได้รับสารปนเปื้อนและตะกอนที่พัดพามากับแม่น้ำโขงจึงเป็นไปได้มาก แต่การปนเปื้อนของอาร์ซินิคในน้ำใต้ดินและการเตรียมพร้อมด้านเทคโนโลยีการบำบัดที่เหมาะสมกับประเทศไทยหรือในเขตชุมชนยังมีรายงานน้อยมาก ดังนั้นองค์กรของรัฐบาลที่เกี่ยวข้องจึงควรตระหนักถึงปัญหาและปัจจัยเสี่ยงต่างๆ ของการปนเปื้อนให้มากขึ้น รวมทั้งพัฒนาแนวทางการบำบัดหรือพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อการบำบัดความเป็นพิษของอาร์ซินิคเพื่อลดปัญหาดังกล่าวที่อาจเกิดขึ้นต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การลดความเป็นพิษของอาร์ซินิคจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของอาร์ซินิคที่อยู่ในรูปของอาร์ซีไนต์ [Arsenite; As(III)] และอาร์ซิเนท [Arsenate; As(V)] เทคนิคหรือกระบวนการทั่วไปที่ใช้คือวิธีการเคมีในการตกตะกอนอาร์ซินิค (arsenic precipitation) หรือการดูดซับอาร์ซินิคบนวัสดุของแข็ง (adsorption on solid phase) เช่น hydrous-iron หรือ manganese oxides, lime treatment, activated alumina, reverse osmosis [13] ion exchange [14] electrodialysis reversal และ nanofiltration [15] อย่างไรก็ตามวิธีการทางเคมีเหล่านี้ใช้ได้ดีในการบำบัด As(V) แต่จะใช้ในการบำบัด As(III) ได้อย่างไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร [16] จึงต้องอาศัยปฏิกิริยาการเปลี่ยน As(III) เป็น As(V) ก่อน ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวต้องใช้สารออกซิไดส์ต่างๆ เช่น chlorine, hypochlorite, ozone permanganate หรือ hydrogen peroxide/Fe^{2+} [13] นอกจากนี้วิธีการเคมียังต้องการอุปกรณ์เครื่องมือที่จำเพาะ ต้องการพารามิเตอร์เพื่อการดำเนินการ เช่น ความดันสูง อุณหภูมิสูง และใช้เทคนิคทางด้าน electrolysis ซึ่งต้องใช้สารเคมี เสียค่าใช้จ่ายสูงและต้องการผู้เชี่ยวชาญเฉพาะ [17] การบำบัดความเป็นพิษของอาร์ซินิคโดยวิธีทางชีวภาพ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะใช้ทดแทนวิธีการทางเคมี โดยอาศัยกิจกรรมของแบคทีเรียในการเกิดปฏิกิริยาการออกซิไดส์ As(III) เป็น As(V) เพื่อลดความเป็นพิษของอาร์ซินิค กระบวนการทางชีวภาพซึ่งมีข้อได้เปรียบกว่าการบำบัดทางเคมี เนื่องจากเป็นระบบที่มีประสิทธิภาพ ราคาถูก ดูแลรักษาง่าย ลดการใช้สารเคมี ไม่มีผลข้างเคียงต่อสิ่งแวดล้อม และไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ รายงานหลายฉบับกล่าวถึงแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดส์ลดความเป็นพิษของอาร์ซิ-ไนต์ ได้แก่ *Alcaligenes faecalis* [18]; *Agrobacterium albertimagni* AOL15 [19]; *Thermus aquaticus* และ *Thermus thermophilus* [20]; *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14 [21]; *Bordetella* sp. SPB-24 และ *Achromobacter* sp. SPB-31 [22]; *Variovorax* sp. MM-1 [23] และ *Bacillus* sp. PNKP-S2 [24] งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการออกซิไดส์อาร์ซีไนต์โดยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PNKP-S2 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของแบคทีเรียและเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาเทคโนโลยีการบำบัดโดยใช้จุลินทรีย์ อันจะเป็นแนวทางในการบำบัดน้ำใต้ดินในเขตชนบทของประเทศไทยต่อไป

2. วิธีการทดลอง

2.1 แบคทีเรีย อาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมหัวเชื้อ

แบคทีเรีย: แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองคือแบคทีเรียออกซิไดส์อาร์ซีไนต์ *Bacillus* sp. PNKP-S2 ซึ่งคัดแยกจากตัวอย่างดินบริเวณบ่อน้ำบาดาลบ้านกุดเป่ง ต. คำน้ำแซบ อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี แบคทีเรียนี้มีความต้านทานต่อความเป็นพิษของอาร์ซีไนต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาร์ซีไนต์เป็นแหล่งพลังงาน [24]

อาหารเลี้ยงเชื้อ: Enrichment and Growth medium (EG medium) ประกอบด้วยสารสกัดจากยีสต์ 0.02 กรัมต่อลิตร $(NH_4)_2SO_4$ 0.8 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 0.4 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.18 กรัมต่อลิตร และ NaCl 0.18 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 หรือตามที่การทดลองกำหนด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมหัวเชื้อ: นำแบคทีเรียออกซิไดส์อาร์ซีไนต์ *Bacillus* sp. PNKP-S2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani broth (LB broth) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าที่ความเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำหัวเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาปรับให้ค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) มีค่าเท่ากับ 0.05 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้น

2.2 ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการออกซิเดชันอาร์ซิไนต์

นำหัวเชื้อตั้งต้นปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ (v/v) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EG medium ที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมอาร์ซิไนต์เท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บสารละลายตัวอย่างตามช่วงเวลาต่างๆ คือ 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง มาวัดความหนาแน่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำสารละลายตัวอย่างมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาวัดปริมาณอาร์ซิไนต์ที่เหลือด้วยวิธี silver diethyldithiocarbamate assay [25] ทำการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย (without cell) เพื่อตรวจสอบการดูดซับและกิจกรรมของ abiotic activity

2.3 พีเอชที่เหมาะสมต่อการออกซิเดชันอาร์ซิไนต์

นำหัวเชื้อตั้งต้นปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ (v/v) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EG medium ซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับต่าง ๆ (4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.5) และมีความเข้มข้นของโพแทสเซียมอาร์ซิไนต์เริ่มต้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างตามช่วงเวลาที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.2 นำสารละลายตัวอย่างมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาวัดปริมาณอาร์ซิไนต์ที่เหลือด้วยวิธี silver diethyldithiocarbamate assay [25]

2.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการออกซิเดชันอาร์ซิไนต์

นำหัวเชื้อตั้งต้นปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EG medium ซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจากข้อ 2.3 และมีความเข้มข้นของโพแทสเซียมอาร์ซิไนต์เริ่มต้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มภายใต้การเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิระดับต่างๆ คือ 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างตามช่วงเวลาที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.2 นำสารละลายตัวอย่างมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาวัดปริมาณอาร์ซิไนต์ที่เหลือด้วยวิธี silver diethyldithiocarbamate assay [25]

2.5 ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการออกซิเดชันอาร์ซิไนต์

นำหัวเชื้อตั้งต้นปริมาตรต่างๆ คือ 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 เปอร์เซ็นต์ (v/v) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EG medium ซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจากข้อ 2.3 และมีความเข้มข้นของโพแทสเซียมอาร์ซิไนต์เริ่มต้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มภายใต้การเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.4 เก็บตัวอย่างตามช่วงเวลาที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.2 นำสารละลายตัวอย่างมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาวัดปริมาณอาร์ซิไนต์ที่เหลือด้วยวิธี silver diethyl dithiocarbamate assay [25]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการออกซิเดชันอาร์ซิไนต์

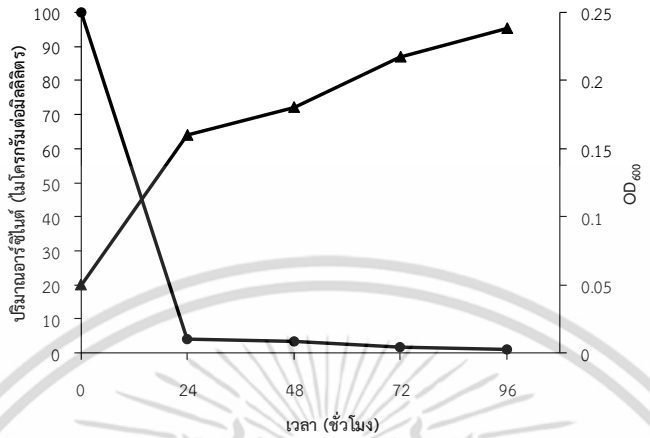
นำหัวเชื้อตั้งต้นปริมาตรที่เหมาะสมจากข้อ 2.5 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EG medium ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ (โซเดียมอะซิเตท โซเดียมซิเตรท เมทานอล ซูโครสและกลูโคส) ที่ระดับความเข้มข้น 15 ไมโครโมลต่อลิตร ซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจากข้อ 2.3 และมีความเข้มข้นของโพแทสเซียมอาร์ซิไนต์เริ่มต้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มภายใต้การเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.4 เก็บตัวอย่างตามช่วงเวลาที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.2 นำสารละลายตัวอย่างมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาวัดปริมาณอาร์ซิไนต์ที่เหลือด้วยวิธี silver diethyldithiocarbamate assay [25] ทำการทดลองควบคุม (control) ที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอน

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการออกซิเดชันอาร์ซิไนต์

เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียออกซิไดส์อาร์ซิไนต์ *Bacillus* sp. PNKP-S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EG medium ที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมอาร์ซิไนต์เริ่มต้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ตามช่วงเวลาต่างๆ ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียมีการเจริญและสามารถออกซิไดส์อาร์ซิไนต์ได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 24 ชั่วโมง คือ มีปริมาณอาร์ซิไนต์เหลือเท่ากับ 4.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 95.95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้นอัตราการเจริญและการออกซิไดส์อาร์ซิไนต์เป็นไปอย่างช้าๆ ดังแสดงในรูปที่ 1 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณอาร์ซิไนต์เหลืออยู่เท่ากับ 1.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 98.79 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 96 ชั่วโมง เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการออกซิไดส์อาร์ซิไนต์โดยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PNKP-S2 แบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อ EG medium แสดงให้เห็นว่าอาร์ซิไนต์ที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ แบคทีเรียสามารถออกซิไดส์อาร์ซิไนต์ได้เกือบสมบูรณ์ในช่วงที่มีการเจริญในระยะ exponential phase สำหรับการทดลองควบคุมที่ไม่มีเซลล์แบคทีเรียพบว่าปริมาณโพแทสเซียมอาร์ซิ-ไนต์มีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อยเท่ากับ 0.5-1.0 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้น่าจะเกิดจาก abiotic activity Gihring และ Banfield [26] รายงานว่า *Thermus* sp. HR13 สามารถออกซิไดส์ inorganic As(III) เป็น As(V) ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนด้วยอัตราการออกซิไดส์ประมาณ 100 เท่าซึ่งสูงกว่าอัตราการออกซิไดส์ในสภาวะที่ไม่มีเซลล์ และไม่มีพลังงานเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการออกซิไดส์ ส่วนในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แบคทีเรีย *Thermus* sp. HR13 สามารถใช้ As(V) ในการเจริญควบคู่ไปกับปฏิกิริยาการออกซิไดส์แลคเตท (lactate oxidation) Yoon และคณะ [27] พบว่าแบคทีเรีย *Alcaligenes* sp. RS-19 มีประสิทธิภาพในการออกซิไดส์อาร์ซิไนต์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในระบบแบตช์ โดยสามารถออกซิไดส์อาร์ซิไนต์ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นอาร์ซิเนทภายในเวลา 40 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

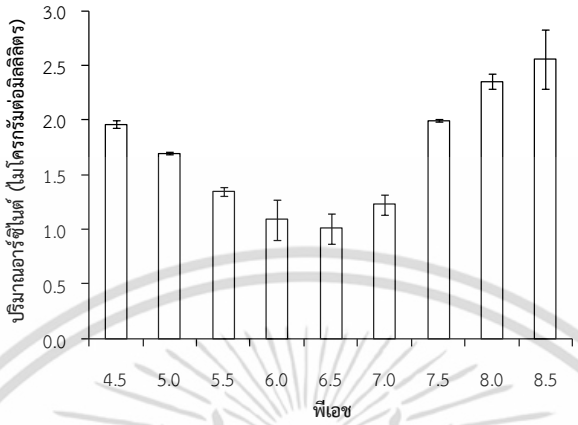


รูปที่ 1. ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการออกซิไดส์อาร์ซิไนต์โดยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PNKP-S2 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยปริมาตรหัวเชื้อเท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EG medium ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 และมีความเข้มข้นของโพแทสเซียมอาร์ซิไนต์เริ่มต้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ปริมาณอาร์ซิไนต์ (●) OD_{600} (▲)

3.2 พีเอชที่เหมาะสมต่อการออกซิเดชันอาร์ซิไนต์

เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียออกซิไดส์อาร์ซิไนต์ *Bacillus* sp. PNKP-S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EG medium ที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมอาร์ซิไนต์เริ่มต้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับต่างๆ บ่มภายใต้การเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียสามารถออกซิไดส์อาร์ซิไนต์ได้ในช่วงพีเอชที่กว้างคือเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นอยู่ระหว่าง 4.5-8.5 อัตราการออกซิเดชันอยู่ในช่วง 97.44-99.00 เปอร์เซ็นต์ แต่การออกซิเดชันจะเกิดได้มากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ซึ่งเป็นสภาวะเป็นกรดเล็กน้อยโดยมีปริมาณอาร์ซิไนต์เหลือเท่ากับ 1.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็น 99.00 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 2 สรุปได้ว่าพีเอชเท่ากับ 6.5 เป็นพีเอชที่เหมาะสมการออกซิไดส์อาร์ซิไนต์โดยแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ มีรายงานว่าแบคทีเรียสยพันธุ์อื่นเช่น แบคทีเรียสายพันธุ์ SPB-24 และ SPB-31 ออกซิไดส์อาร์ซิไนต์ได้ดีที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 6.0 [22] ในขณะที่แบคทีเรียคลีโมลิโทร-ออโตโทรปสายพันธุ์ NT-26 สามารถออกซิไดส์อาร์ซิไนต์ได้ดีที่พีเอชเท่ากับ 5.5 และการออกซิไดส์อาร์ซิไนต์เกิดขึ้นโดยเอนไซม์เพอริพลาสมิคอาร์ซิไนต์ออกซิเดส (periplasmic arsenite oxidase) [28]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

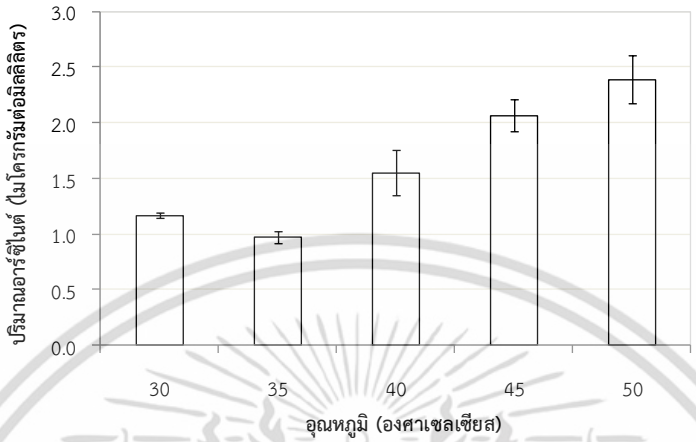


รูปที่ 2. พีเอชที่เหมาะสมในการออกซิไดส์อาร์ซีไนต์โดยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PNKP-S2 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยปริมาตรหัวเชื้อเท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EG medium ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับต่างๆ และมีความเข้มข้นของโพแทสเซียมอาร์ซีไนต์เริ่มต้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

3.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการออกซิเดชันอาร์ซีไนต์

เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียออกซิไดส์อาร์ซีไนต์ *Bacillus* sp. PNKP-S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EG medium ที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมอาร์ซีไนต์เริ่มต้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเท่ากับ 6.5 บ่มภายใต้การเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิระดับต่างๆ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียสามารถออกซิไดส์อาร์ซีไนต์ได้ดีในทุกช่วงอุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงคือ 30-50 องศาเซลเซียส อัตราการออกซิเดชันอยู่ในช่วง 97.61-99.03 เปอร์เซ็นต์ แต่การออกซิเดชันอาร์ซีไนต์จะเกิดมากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณอาร์ซีไนต์เหลือเท่ากับ 0.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็น 99.03 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 3 สรุปได้ว่าอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการออกซิไดส์อาร์ซีไนต์โดยแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียออกซิไดส์อาร์ซีไนต์ *Bordetella* sp. SPB-24 และ *Achromobacter* sp. SPB-31 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal medium ที่มีอาร์ซีไนต์เท่ากับ 5 มิลลิโมลาร์ พบว่าแบคทีเรียสองสายพันธุ์นี้สามารถออกซิไดส์อาร์ซีไนต์ได้ดีที่พีเอชเท่ากับ 6 ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส [22]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

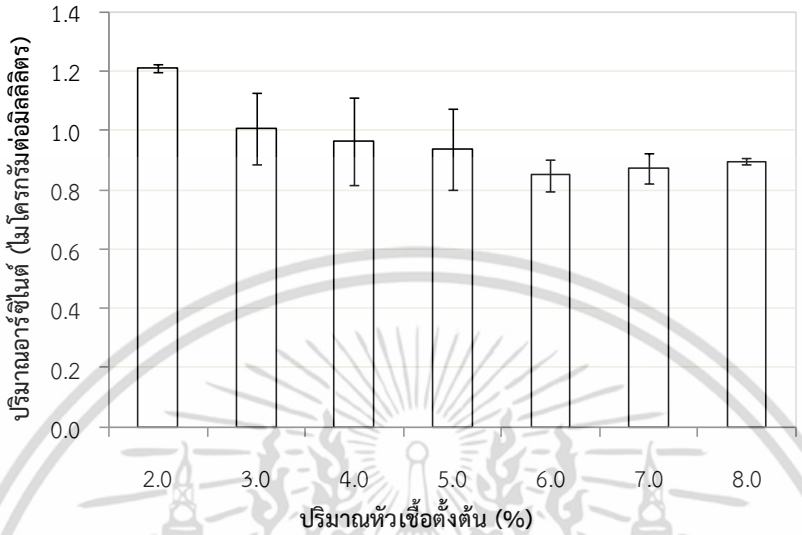


รูปที่ 3. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการออกซิไดส์อาร์ซิไนต์โดยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PNKP-S2 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยปริมาตรหัวเชื้อเท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EG medium ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 และมีความเข้มข้นของโพแทสเซียมอาร์ซีไนต์เริ่มต้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มภายใต้การเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

3.4 ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการออกซิเดชันอาร์ซิไนต์

เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียออกซิไดส์อาร์ซิไนต์ *Bacillus* sp. PNKP-S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EG medium ที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมอาร์ซิไนต์เริ่มต้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเท่ากับ 6.5 บ่มภายใต้การเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียสามารถออกซิไดส์อาร์ซิไนต์ได้ดีขึ้นเมื่อปริมาณหัวเชื้อเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 2.0-8.0 เปอร์เซ็นต์ (v/v) โดยมีอัตราการออกซิเดชันอยู่ในช่วง 98.79-99.15 เปอร์เซ็นต์ แต่การออกซิเดชันอาร์ซิไนต์จะเกิดมากที่สุดเมื่อใช้หัวเชื้อตั้งต้นที่มีปริมาณเท่ากับ 6 เปอร์เซ็นต์ (v/v) โดยมีปริมาณอาร์ซิไนต์เหลือเท่ากับ 0.85 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 99.15 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 4 สรุปได้ว่าปริมาณหัวเชื้อ 6.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อการออกซิไดส์อาร์ซิไนต์โดยแบคทีเรียสายพันธุ์นี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4. ปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมในการออกซิไดส์อาร์ซิไนต์โดยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PNKP-S2 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยปริมาตรหัวเชื้อระดับต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EG medium ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 และมีความเข้มข้นของโพแทสเซียมอาร์ซิไนต์เริ่มต้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

3.5 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการออกซิเดชันอาร์ซิไนต์

เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียออกซิไดส์อาร์ซิไนต์ *Bacillus* sp. PNKP-S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EG medium ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมอาร์ซิไนต์เริ่มต้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียสามารถใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อออกซิไดส์อาร์ซิไนต์ได้หลายชนิดคือ โซเดียมอะซิเตท โซเดียมซิเตรท เมทานอล ซูโครสและกลูโคส ที่ระดับความเข้มข้น 15 ไมโครโมลต่อลิตร โดยมีอัตราการออกซิเดชันอยู่ในช่วง 98.77-99.25 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอน การเติมโซเดียมอะซิเตท และโซเดียมซิเตรท พบว่าอัตราการออกซิเดชันมีค่าใกล้เคียงกัน คือ 99.15, 99.25 และ 99.15 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 5 แสดงให้เห็นว่าการเติมแหล่งคาร์บอนไม่มีผลต่ออัตราการออกซิเดชันอย่างมีนัยสำคัญ สรุปได้ว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PNKP-S2 สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาร์ซิไนต์เป็นแหล่งพลังงาน จัดเป็นแบคทีเรียประเภท chemolithoautrophic As(III) oxidizer ที่ใช้อาร์ซิไนต์เป็นสารให้อิเล็กตรอน [24] มีรายงานหลายฉบับที่กล่าวถึงแบคทีเรีย chemolithoautotrophs ตัวอย่างเช่น *Agrobacterium/ Rhizobium-like* bacteria, NT-25 and NT-26, สามารถเจริญโดยใช้พลังงานจากการออกซิเดชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาร์ซิไนต์เป็นอาร์ซิเนตโดยใช้ออกซิเจนเป็นสารรับอิเล็กตรอน อาร์ซิไนต์เป็นสารให้อิเล็กตรอนและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน [28] ส่วนแบคทีเรีย γ- *Proteobacteria* MLHE1 สามารถออกซิไดส์อาร์ซิไนต์เป็นอาร์ซิเนต โดยใช้ไน-เตรตเป็นสารรับอิเล็กตรอน [29] แบคทีเรีย *Bosea* sp. AR-11 สามารถออกซิไดส์อาร์ซิไนต์เป็นอาร์ซิ-เนตภายใต้สภาวะให้อากาศโดยไม่ต้องเติมสารให้และรับอิเล็กตรอน [30]

รูปที่ 5. แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมการออกซิไดส์อาร์ซิไนต์โดยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PNKP-S2 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยปริมาตรหัวเชื้อ 6 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EG medium ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 และมีความเข้มข้นของโพแทสเซียมอาร์ซิไนต์เริ่มต้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

4. สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PNKP-S2 สามารถออกซิไดส์อาร์ซิไนต์ได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EG medium ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้โซเดียมอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมที่สุดต่อการออกซิไดส์เท่ากับ 6 เปอร์เซ็นต์ (v/v) จากสภาวะดังกล่าวข้างต้นทำให้แบคทีเรียสามารถออกซิไดส์อาร์ซิไนต์ได้สูงที่สุด โดยมีปริมาณอาร์ซิไนต์ที่เหลือเพียง 0.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นประสิทธิภาพการออกซิไดส์ 99.25 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น แบคทีเรีย *Bacillus* sp. PNKP-S2 ถือเป็นแบคทีเรียหนึ่งที่มีศักยภาพต่อการออกซิไดส์อาร์ซิไนต์เป็นอาร์ซิเนต ซึ่งลด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเป็นพิษของอาร์ซินิคให้น้อยลงนั่นเอง จึงสามารถเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำไปใช้พัฒนาเพื่อการบำบัดน้ำใต้ดินโดยวิธีทางชีวภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงบประมาณและมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัย ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่สำหรับทำงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

[1] Berg, M., Giger, W., Con, T.H., Viet, P.H., Trang, P.T.K., and Schertenleib, R. 2006. Extent and severity of arsenic pollution in Vietnam and Cambodia In Managing arsenic in the environment: From soil to human health CSIRO Publishing. Melbourne.

[2] Pattanapipitpaisal P., and Suraruk, P. 2012. Groundwater quality and arsenic contamination in Amphoe Khemmarat, Ubon Ratchathani, Thailand. *Journal of Environmental Science and Engineering*, 1, 133-141.

[3] ปราณี พัฒนพิพิธไพศาลและพิยาดา สุรารักษ์. 2554. การปนเปื้อนอาร์ซินิคและคุณภาพน้ำใต้ดินในอำเภอเขมราฐและอำเภอโขงเจียม จังหวัดอุบลราชธานี. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี,* 13, 48-56. Pattanapipitpaisal P., and Suraruk, P. 2011. Arsenic contamination and groundwater quality in Amphor Khammarat and Amphor Khong Chiam, Ubon Ratchathani Province. *Journal of Science and Technology Ubon Ratchathani University*, 13, 48-56. [in Thai]

[4] Smith, A.H., Lingas, E.O., and Rahman, M. 2000. Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bullutin WHO,* 78, 1093-1103.

[5] Stanger, G, Truong, V.T., Nigoc, L.T.M., and Thanh, T.T. 2005. Arsenic in groundwaters of the Lower Mekong. *Environmental Geochemistry Health*, 27, 341-357.

[6] Feldman, P.R. and Rosenboom, J.W. 2001. Cambodia drinking water quality assessment, WHO in cooperation with Cambodian Ministry of Rural Development and the Ministry of Industry, Mines and Energy, Phnom Penh, Cambodia.

[7] Halperin, A. 2003. Arsenic found in rural Mekong river wells. *Cambodia Daily,* 25 June. Phnom Penh. Cambodia, 11.

[8] Fredericks, D. 2003. *Arsenic contamination of groundwater in Cambodia*. UNICEF. Phnom Penh. Cambodia.

[9] Kyne, P. 2000. Arsenic threat found in groundwater survey. *Phnom Penh Post,* 18-31 August. Phnom Penh. Cambodia, 1-2.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[10] Buschmann, J., Berg, M., Stengel, C., and Sampson, M.L. 2007. Arsenic and manganese contamination of drinking water resources in Cambodia: coincidence of risk areas with relief topograpgy. *Environmental Science and Technology*, 41, 2146-2152.

[11] Berg, M., Stengel, C., Trang, T.K., Viet, P.H., Sampson, M.L., Leng, M., Samreth, S., and Fredericks, D. 2007. Magnitude of arsenic pollution in Mekong and Red River Deltas-Cambodia and Vietnam. *Science of the Total Environment*, 372, 413-425.

[12] Yu, G., Sun, D., and Zheng, Y. 2007. Health effects of exposure to natural arsenic in groundwater and coal in China: Overview of occurrence. *Environmental Health Perspect*, 15, 636-642.

[13] Jekel, M.R. 1994. Removal of arsenic in drinking water treatment. *In*: Nriagu, J.O. (eds) Arsenic in Environment, Part I: Cycling and characterization. Wiley, New York, pp. 119-132.

[14] Clifford, D., Ghurye, G. and Tripp, A. 1999. Development of an anion exchange process for arsenic removal from water. *In*: Abermathy, R. and R. Calderon (eds). Arsenic expose and health effect. Elsevier, Netherlands, pp. 379-387.

[15] United States Environmental Protection Agency. 2001. National Primary Drinking Water Standards. EPA 816-F-01-007.

[16] Zouboulis, A.I. and Katsoyiannis,. I.A. 2005. Recent advances in the bioremediation of arsenic-contaminated groundwaters. *Environment International*, 31, 213-219.

[17] Battaglia-Brunet, F.,C. Dictor, M., Garrido, F., Crouzet, C., Morin, D., Dekeyser, K., Clarens, M., and Baranger, P. 2002. An As(III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in bioreactrs. *Journal Applied Microbiology*, 93, 656-667.

[18] Phillips, S.E., and Taylor, M.L. 1976. Oxidation of arsenite to arsenate by *Alcaligenes faecalis*. *Applied Environmental and Microbiology*, 32, 392-399.

[19] Salmassi, T., Venkateswaren, K., Satomi, M., Nealson, K., Newman, D., and Hering, J. 2002. Oxidation of arsenite by *Agrobacteriumalbertimagni* AOL15, sp. Nov., isolated from hot creek. California. *Geomicrobiology Journal*, 19, 53-66.

[20] Gihring, T.M. and Banfield, J.F. 2001. Arsenite oxidation and arsenate respiration by a new *Thermus* isolate. *FEMS Microbiology Letters*, 204, 335-340.

[21] Hoven, R.N.V. and Santini, J.M. 2004. Arsenite oxidation by the heterotroph *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14: the arsenite oxidase and its physiological electron acceptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1656, 148-155.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[22] Bachate, S.P., Khapare, R.M., and Kodam, K.M. 2012. Oxidation of arseneite by two β-proteobacteria isolated from soil. *Applied Microbiology and Biotechnol*ogy, 93, 2135-2145.

[23] Bahar, M.M., Mallavarapu, M., and Naidu, R. 2012. Arsenic bioremediation potential of a new arsenite-oxidizing bacterium *Stenotrophomonas* sp. MM-7 isolated from soil. *Biodegradation*, 23, 803-812.

[24] Pattanapipitpaisal, P., Yodsing, N., Santhaweesuk, R., and Wamakhan, P. 2015. Arsenite oxidation and arsenite resistance by *Bacillus* sp. PNKP-S2. *Environment Asia*, 8, 9-15.

[25] Greenberg, A.E., Eaton, A.D. and Clesceri, L.S. 1991. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington DC.

[26] Gihring, T.M. and Banfield, J.F. 2001. Arsenite oxidation and arsenate respiration by a new *Thermus* isolate. *FEMS Microbiology Letters*, 204, 335-340.

[27] Yoon, I-H., Chang, J-S., Lee, J-H., and Kim, K-W. 2009. Arsenite oxidation by *Alcaligenes* sp. strain RS-19 isalated from arsenic-contaminated mines in the Republic of Korea. *Environmental Geochemistry Health*, 31, 109-117.

[28] Santini, J.M., Sly, L.I., Schnagl, R.D., and Macy, J.M. 2000. A new chemo-lithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Applied Environmental and Microbiol*ogy, 66, 92-97.

[29] Oremland, R.S., Hoeft, S.E., Santini, J.M., Bano, N., Hollibaugh, R.A., Hollibaugh, J.T. 2002. Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by a facultative, arsenite oxidizing chemoautotroph, strain MLHE-1. *Applied Environmental and Microbiology*, 68(10), 4795-802.

[30] Liao, V.H.C., Chu, Y.J., Su, Y.C., Hsiao, S.Y., Wei, C.C., Liu, C.W., Liao, C.M., Shen, W.C., Chang, F.J. 2011. Arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with arsenic-rich groundwater in Taiwan. *Journal of Contamination Hydrology*, 123(1-2), 20-29.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้