บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

ผลจากการศึกษาการทนต่อพิษตะกั่วของเชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ RS91 แสดงให้เห็นถึงระดับความสามารถในการทนต่อปริมาณตะกั่วรวมและตะกั่วละลายที่สูงกว่างานวิจัยของ Roane ในปี ค.ศ.1999 ถึง 30.1 และ 66.7 เท่า ตามลำดับ โดยการศึกษาครั้งนี้เชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 สามารถที่จะทนต่อสภาวะที่มีปริมาณตะกั่วรวมจากการคำนวณได้ถึง 4,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณตะกั่วละลายจากการวิเคราะห์ 1,382 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากคุณสมบัติเด่นในการทนต่อตะกั่วของเชื้อด้วยกลไกการสะสมตะกั่วภายในเซลล์ ทำให้เชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการที่จะศึกษาถึงระดับความสามารถในการสะสมตะกั่วภายในเซลล์ในขั้นต่อไป โดยผลจากการทดสอบการสะสมตะกั่วภายในเซลล์แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติในการสะสมตะกั่วไว้ภายในเซลล์ของเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 อย่างชัดเจน โดยเมื่อทดสอบเปรียบเทียบกับเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α พบว่าเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 มีการสะสมตะกั่วไว้ภายในเซลล์สูงกว่าเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่อัตราความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ทำให้เชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 มีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะนำไปทดสอบการสะสมตะกั่วภายในเซลล์กับดินตะกอนลำห้วยคลิตี้ในขั้นต่อไป โดยสภาวะที่เหมาะสมซึ่งสามารถวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วภายในเซลล์ได้สูงที่สุดถึงร้อยละ 94.44 คือ ที่ระดับความเข้มข้นตะกั่วเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ระดับ pH 5 โดยสภาวะนี้ถูกนำไปใช้ในการทดสอบการสะสมตะกั่วภายในเซลล์กับดินตะกอนลำห้วยคลิตี้ จุดเก็บตัวอย่าง NU 5 และ NU 4.3 ผลที่ได้พบว่าเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 สามารถสะสมตะกั่วภายในเซลล์ได้ร้อยละ 77.78 และ 28.83 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับวิธีทางเคมีโดยใช้การสกัดแบบลำดับซึ่งสามารถวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในรูปแบบ available form จุดเก็บตัวอย่าง NU 5 ได้สูงกว่า จุดเก็บตัวอย่าง NU 4.3 อีกทั้งผลการสะสมตะกั่วภายในเซลล์ที่ได้ยังมีความใกล้เคียงกันกับปริมาณตะกั่วในรูปแบบ available form โดยเฉพาะจุดเก็บตัวอย่าง NU 5 ซึ่งเป็นจุดที่พบว่ามีปริมาณ

อภิปรายผล

จากผลการทดสอบระดับความสามารถในการทนต่อพิษตะกั่วของเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 แสดงให้เห็นว่าเชื้อสามารถทนต่อพิษตะกั่วได้สูงกว่างานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Roane ในปี ค.ศ.1999 ที่ได้แยกเชื้อ *B. megaterium* จากดินบริเวณที่เคยทำเหมืองแร่มาก่อน ซึ่งเป็นดินที่พบว่ามีการปนเปื้อนของสารตะกั่ว แล้วนำมาทดสอบระดับความสามารถในการทนต่อพิษตะกั่วถึง 30.1 เท่าในการวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วรวม และ 66.7 เท่าในการวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วละลาย โดยตะกั่วละลายนั้นสามารถที่จะซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้อีกทั้งยังเป็นตะกั่วในรูปแบบที่สามารถรับเข้าสู่สิ่งมีชีวิตได้ง่าย (Available form) การที่เชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 สามารถทนต่อตะกั่วละลายได้สูงจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะนำมาศึกษาถึงกลไกในการทนต่อตะกั่วในขั้นตอนต่อไป นอกจากนี้งานวิจัยของ Roane ยังได้ศึกษาถึงกลไกการทนต่อตะกั่วของเชื้อ *B. megaterium* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy; TEM) พบว่าเชื้อ *B. megaterium* มีการสะสมตะกั่วภายในเซลล์ โดย Roane ได้อธิบายว่ากลไกนี้ไม่ใช่กลไกที่สามารถพบได้ทั่วไปในการทนต่อพิษตะกั่ว โดยระยะแรกเมื่อมีตะกั่วอยู่ในสภาวะแวดล้อมเชื้อจะใช้กลไก ATP-dependent efflux pumps ซึ่งเป็นกลไกทั่วไปในการขับสารพิษออกจากเซลล์ แต่หากมีสารพิษเข้าสู่เซลล์มากจนถึงระดับที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ก็จะเกิดการสะสมภายในเซลล์และจากภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าภายในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลสีดำซึ่งมีตะกั่วสะสมอยู่ภายใน อีกทั้งจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Roane และ Kellogg ในปี ค.ศ.1996 ยังพบว่าเชื้อ *B. megaterium* ที่แยกได้นั้นไม่มีพลาสมิด ซึ่งโดยส่วนมากกลไกการทนต่อโลหะมักถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บนพลาสมิด (Silver and Walderhaug, 1992) แต่บางกลไกที่ควบคุมโดยยีนบนพลาสมิดนั้นก็สามารถแสดงออกได้โดยยีนที่อยู่บนโครโมโซมเช่นกัน ตัวอย่างเช่น การทนต่อปรอทของเชื้อ *Bacillus* เป็นต้น (Silver and Phung, 1996) Roane และ Kellogg จึงสรุปว่ากลไกการทนต่อตะกั่วด้วยวิธีการสะสมภายในเซลล์ของเชื้อ *B. megaterium* นี้อาจควบคุมโดยยีนที่อยู่บนโครโมโซม ซึ่งจะทำให้ลักษณะนี้เป็นลักษณะที่จำเพาะของเชื้อ *B. megaterium* ทุกสายพันธุ์ในการจัดการกับตะกั่วเมื่อมีปริมาณสูงจนเป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยผลการศึกษาของงานวิจัยดังกล่าวทำให้ในงานวิจัยนี้ต้องการที่จะแสดงให้เห็นถึงกลไกการสะสมตะกั่วไว้ภายในเซลล์ของเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 โดยแสดงผลในด้านของข้อมูลเชิงปริมาณถึงการสะสมตะกั่วในส่วนต่างๆ ของเซลล์ เพื่อเป็นแนวทางในการประเมินถึงปริมาณตะกั่วในรูปแบบที่สามารถนำเข้าสู่สิ่งมีชีวิตได้ง่าย (Available form) ที่มีอยู่ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนตะกั่วต่อไป

จากการที่วิเคราะห์ปริมาณตะกั่วละลายด้วยเครื่อง AAS ที่ระดับความเข้มข้นจากการคำนวณตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไปนั้น พบว่า ปริมาณตะกั่วละลายที่วิเคราะห์ได้มีค่าต่ำกว่าปริมาณตะกั่วที่ได้จากการคำนวณอยู่มาก แม้กระทั่งปริมาณตะกั่วรวมก็พบว่าวิเคราะห์ได้ต่ำกว่าปริมาณตะกั่วที่ได้จากการคำนวณด้วยโดยคิดเป็นประมาณร้อยละ 77 ของปริมาณตะกั่วที่ได้จากการคำนวณ เนื่องจากเมื่อผสมสารละลายตะกั่วกับอาหารเลี้ยงเชื้อตะกั่วจะจับกับองค์ประกอบต่างๆ ของอาหารเกิดโครงสร้างของตะกั่วฟอสเฟต ตะกั่วซัลเฟต หรือเกลือของตะกั่วชนิดอื่นๆ รวมทั้ง ตะกั่วไฮดรอกไซด์ เกิดขึ้น ซึ่งอนุภาคเหล่านี้ จะตกตะกอนและลดปริมาณตะกั่วละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อลงไปจำนวนมาก นอกจากนี้ปริมาณตะกั่ว ยังสามารถสูญหายไปกับการดูดซับของภาชนะที่ใช้ในการทดลองโดยเฉพาะวัสดุที่เป็นแก้ว เนื่องจากพื้นผิวที่เป็นซิลิเกตมีประจุเป็นลบ (Ramamoorthy and Kushner, 1975) จึงมีแรงประจุดูดซับประจุบวกของตะกั่วไว้ ทำให้ปริมาณตะกั่วรวมที่วิเคราะห์ได้จึงต่ำกว่าปริมาณตะกั่วจากการคำนวณ ดังนั้นการเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อรวมถึงวัสดุที่ใช้ในการทดลองจึงเป็นสิ่งสำคัญในการทดสอบต่างๆเกี่ยวกับโลหะหนักเพื่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนไปจากปริมาณตะกั่วที่คำนวณไว้น้อยที่สุด โดยจากการค้นคว้าข้อมูลงานวิจัยพบว่าอาหารเหลว Luria-Bertani Medium (LB medium) เป็นอาหารประเภท minimal medium คือมีสารอาหารน้อยและเมื่อผสมกับตะกั่วไนเตรทแล้วไม่เกิดการตกตะกอนและยังพบว่าปริมาณตะกั่วละลายที่คงเหลือมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณตะกั่วที่คำนวณ (Godwin and Mayer, 2006)

จากการทดสอบการสะสมตะกั่วภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ได้มีการนำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α มาร่วมทดสอบด้วยเพื่อให้เห็นถึงคุณสมบัติที่แตกต่างกันของบริเวณที่มีการสะสมตะกั่วพบว่า เชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติการสะสมตะกั่วไว้ภายในเซลล์ที่ชัดเจนกว่า *E. coli* สายพันธุ์ DH5α นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละการสะสมตะกั่วภายในเซลล์ของเชื้อทั้งสองชนิดก็ยังพบว่าเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS 91 มีร้อยละการสะสมตะกั่วไว้ภายในเซลล์สูงกว่าเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ DH5α อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากข้อมูลเชิงปริมาณที่กล่าวมานี้ทำให้มีความน่าเชื่อถือว่าเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 มีคุณสมบัติในการสะสมตะกั่วไว้ภายในเซลล์ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลเชิงคุณภาพจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Roane แม้จะพบว่ามีปริมาณของร้อยละการสะสมตะกั่วภายในเซลล์ของเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ DH5α เนื่องจากมีงานวิจัยที่พบว่าในการทดสอบการทนต่อตะกั่วของเชื้อ *E.coli* ที่ระดับความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เชื้อมีการสะสมตะกั่วในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์นี้ถึงร้อยละ 95 (Kumar and Upreti, 1999) เนื่องจากบริเวณ outer membrane เป็นชั้นที่มีโมเลกุลของ

Lipopolysaccharide ซึ่งมีประจุเป็นลบอยู่ปริมาณมาก (Das, et al., 2007) จึงทำให้อาจจะยังเหลือตะกั่วอยู่หลังจากผ่านขั้นตอนการล้างครั้งที่สองทำให้เมื่อวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วที่สะสมในเซลล์จึงพบมีตะกั่ว แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 ซึ่งมีคุณสมบัติการสะสมตะกั่วไว้ภายในเซลล์ก็จะเห็นว่าในทุกสภาวะเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 สามารถวิเคราะห์ร้อยละการสะสมตะกั่วไว้ภายในเซลล์ได้สูงกว่า *E.coli* สายพันธุ์ DH5α

จากการทดสอบการสะสมตะกั่วภายในเซลล์เมื่อได้ทำการปรับสภาวะปริมาณตะกั่วเริ่มต้นและระดับ pH เพื่อที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมในการสะสมตะกั่วภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเมื่อพิจารณาปัจจัยระดับความเข้มข้นตะกั่วเริ่มต้นที่ระดับ pH 5 จะเห็นความแตกต่างของปัจจัยระดับความเข้มข้นตะกั่วเริ่มต้นเด่นชัดที่สุดโดยเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 มีความแตกต่างกันของร้อยละการสะสมตะกั่วภายในเซลล์ในแต่ละระดับความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ขณะที่เชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ DH5α ไม่มีความแตกต่างกันของร้อยละการสะสมตะกั่วภายในเซลล์ในแต่ละระดับความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สาเหตุอาจเนื่องมาจากเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 นั้นมีคุณสมบัติในการสะสมตะกั่วไว้ภายในเซลล์รวมทั้งสามารถทนต่อปริมาณตะกั่วละลายได้สูงถึงระดับ 1,382 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงสามารถที่จะนำตะกั่วเข้าสู่เซลล์ได้โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ขณะที่เชื้อ *E. coli* ไม่มีกลไกดังกล่าวจึงต้องป้องกันไม่ให้ตะกั่วที่มีความเข้มข้นสูงเข้าสู่เซลล์ด้วยกลไก ATPase efflux pump เนื่องจากอาจเกิดอันตรายต่อเซลล์จนทำให้ไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าที่ระดับความเข้มข้นตะกั่วเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 ถูกยับยั้งการเจริญ สาเหตุอาจเกี่ยวข้องกับการซึมผ่านเข้าสู่เซลล์มากจนเกินไปของตะกั่วที่มีความเข้มข้นสูงอีกทั้งที่สภาพ pH 5 ซึ่งมีความเป็นกรดตะกั่วจะมีความสามารถในการกระจายตัวได้ดีขึ้นจึงทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์และถูกยับยั้งการเจริญในที่สุด ดังนั้นปัจจัยระดับความเข้มข้นตะกั่วเริ่มต้นจึงเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการสะสมตะกั่วภายในเซลล์เพราะหากปริมาณตะกั่วเริ่มต้นเพิ่มขึ้นจนเป็นพิษต่อเซลล์จำนวนเซลล์ที่เจริญก็จะลดลงทำให้การสะสมตะกั่วภายในเซลล์ก็จะลดลงไปด้วย ส่วนการพิจารณาปัจจัย pH พบว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับ pH ในช่วง pH 5 ถึง 8 ทำให้เกิดความแตกต่างกันของร้อยละการสะสมตะกั่วภายในเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 เมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นตะกั่วเริ่มต้นที่ 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยความสัมพันธ์ของปัจจัย pH กับ

การสะสมตะกั่วภายในเซลล์นั้นพบว่าที่ระดับความเข้มข้นตะกั่วเริ่มต้นที่ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร การสะสมตะกั่วภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อ pH เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Congeevaram, et al. ปี ค.ศ.2007 ซึ่งอธิบายว่าเมื่อ pH เพิ่มขึ้นอนุภาคของไฮโดรเนียมไอออนจะลดลงทำให้อนุภาคประจุบวกที่จะเกิดการแข่งขันกับไอออนตะกั่วในการเข้าจับกับเซลล์แบคทีเรียมีน้อยลงตะกั่วจึงสามารถจับกับผิวเซลล์และถูกนำเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายขึ้น แต่เมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรกลับพบว่าปริมาณการสะสมตะกั่วในเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อ pH ลดลงซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Moraghan และ Mascani ปี ค.ศ.1991 และ Morel ปี ค.ศ.1997 ซึ่งอธิบายว่าปริมาณของ bioavailability lead หรือปริมาณตะกั่วที่สามารถถูกดูดซึมได้โดยสิ่งมีชีวิตจะลดลงเมื่อระดับ pH มีค่าเพิ่มขึ้นเนื่องจากเกิดการตกตะกอนในสิ่งแวดล้อมและเมื่อ pH มีค่าลดลงปริมาณ bioavailability lead ก็จะเพิ่มขึ้น เนื่องจากตะกั่วที่ยึดเกาะกับอนุภาคต่างๆ จะละลายออกมาได้มากขึ้น จากผลการทดลองของงานวิจัยนี้จะเห็นว่าผลของปัจจัย pH ต่อการสะสมตะกั่วภายในเซลล์นั้นไม่แน่นอนอาจเกิดจากช่วงของ pH ซึ่งไม่ทำให้เกิดความแตกต่างกันอย่างชัดเจนของสภาวะกรดด่าง การกำหนดช่วง pH ที่ใช้ในการทดสอบที่กว้างขึ้นอาจจะทำให้เห็นความแตกต่างของปัจจัย pH ต่อการสะสมตะกั่วภายในเซลล์ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

ข้อมูลของน้ำหนักแห้ง pH หลังบ่ม และค่า Log ของจำนวนเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปสามารถที่จะช่วยอธิบายถึงผลของการเปลี่ยนแปลงด้านปัจจัยระดับความเข้มข้นตะกั่วเริ่มต้นและระดับ pH ได้ ตัวอย่างเช่น ที่ระดับความเข้มข้นตะกั่วเริ่มต้นที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้จำนวนเซลล์หลังบ่มของเชื้อแบคทีเรียลดลงโดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้นตะกั่วเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องข้อมูลของการวิเคราะห์ทางสถิติถึงผลของปัจจัยระดับความเข้มข้นตะกั่วเริ่มต้นต่อการสะสมตะกั่วภายในเซลล์ หรือผลของปัจจัย pH พบว่าเกือบทุกสภาวะที่ทำการทดลองจะวัด pH หลังบ่มได้อยู่ในช่วง 7.5 ถึง 8.5 ซึ่งสอดคล้องกับกลไกการปรับตัวของเชื้อเนื่องมาจากเมื่อเชื้ออยู่ในสภาวะที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนัก เชื้อจะสามารถจัดการกับโลหะหนักได้ทั้งทางตรง คือ เปลี่ยนแปลงค่า pH เพื่อให้เกิดการตกตะกอนลดการเข้าสู่เซลล์ของตะกั่ว หรือใช้กลไก bioaccumulation เพื่อนำโลหะหนักเหล่านั้นเข้าไปสะสมไว้ภายในเซลล์ และทางอ้อม คือ ใช้กลไก biosorption ดูดซับโลหะหนักไว้ที่ผิวเซลล์ (Al-Shahwani, et al., 1984)

จากสภาวะที่เหมาะสมต่อการสะสมตะกั่วไว้ภายในเซลล์คือที่ระดับความเข้มข้นตะกั่วเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระดับ pH 5 เป็นสภาวะที่พบว่ามีร้อยละการสะสมตะกั่วไว้ภายในเซลล์สูงที่สุด เมื่อนำมาใช้ในการทดสอบการสะสมตะกั่วจากดินตะกอนท้องน้ำลำห้วยคลิตี้ จุดเก็บตัวอย่าง NU 5 และ NU 4.3 พบว่าเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 มีร้อยละการสะสมตะกั่ว

ภายในเซลล์ที่จุดเก็บตัวอย่าง NU 5 สูงกว่าจุดเก็บตัวอย่าง NU 4.3 ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่วในรูปแบบ Available form ด้วยวิธีสกัดแบบลำดับก่อนหน้านี้จากคณะวิจัยโครงการฟื้นฟูลำห้วยคลิตี้ (อภิชญา พัดพิน, 2552) ที่พบว่าจุดเก็บตัวอย่าง NU 5 นั้นเป็นจุดเก็บตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณของตะกั่วในรูปแบบ Available form ได้สูงที่สุด ส่วนจุดเก็บตัวอย่าง NU 4.3 เป็นจุดเก็บตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณของตะกั่วในรูปแบบ Available form ได้ต่ำที่สุด และแม้ว่าจากการเตรียมสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อผสมตะกั่วที่ได้จากดินตะกอนจุดเก็บตัวอย่าง NU 5 จะสามารถวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วรวมได้ต่ำกว่าจุดเก็บตัวอย่าง NU 4.3 แต่ผลการทดสอบในขั้นตอนนี้สะท้อนให้เห็นอย่างชัดเจนว่าปริมาณตะกั่วรวมไม่สามารถบ่งบอกได้ถึงปริมาณของตะกั่วที่แท้จริงที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต จากการที่ผลวิเคราะห์ค่าการสะสมของตะกั่วภายในเซลล์จากการศึกษานี้กับผลการวิเคราะห์ปริมาณของตะกั่วในรูปแบบ Available form จากการศึกษาก่อนหน้านี้มีความสอดคล้องกันรวมทั้งเมื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้ออกมาใกล้เคียงกัน จึงเป็นผลการศึกษาที่น่าสนใจต่อการที่จะพัฒนาเชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 ให้เป็นตัวแทนของการวิเคราะห์ปริมาณของตะกั่วในรูปแบบ Available form ด้วยวิธีทางชีวภาพต่อไปได้เนื่องจากปริมาณของตะกั่วที่สามารถเข้าไปสะสมในเซลล์ได้นั้นก็ต้องเป็นตะกั่วในรูปแบบที่สิ่งมีชีวิตสามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายเช่นกัน ส่วนการทดสอบที่ระดับ pH 7.5 นั้นพบว่าร้อยละของการสะสมตะกั่วภายในเซลล์ของเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 ลดลงอย่างมาก สาเหตุอาจมาจากระดับ pH ที่เพิ่มขึ้นทำให้ตะกั่วในรูปแบบ Available form ที่เกาะอยู่กับอนุภาคต่างของดินหลุดออกมาน้อยลงจึงทำให้การสะสมตะกั่วภายในเซลล์ลดลงไปด้วยนั่นเอง

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมโลหะหนักนั้น การเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมมีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารมาก (complete medium) เมื่อผสมกับตะกั่วแล้วจะทำให้เกิดตะกอนจำนวนมากเกิดความคลาดเคลื่อนกับปริมาณตะกั่วจากที่คำนวณไว้ ในงานวิจัยนี้ได้แก้ปัญหาโดยการเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารน้อย (minimal medium) เช่น LB medium แล้วคำนวณความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ก็จะทำให้การเจริญของเชื้อที่ได้ไม่แตกต่างจากการเลี้ยงอาหารที่เป็น complete medium มากนัก อีกทั้งยังไม่เกิดตะกอนของสารประกอบเชิงตะกั่วอีกด้วย