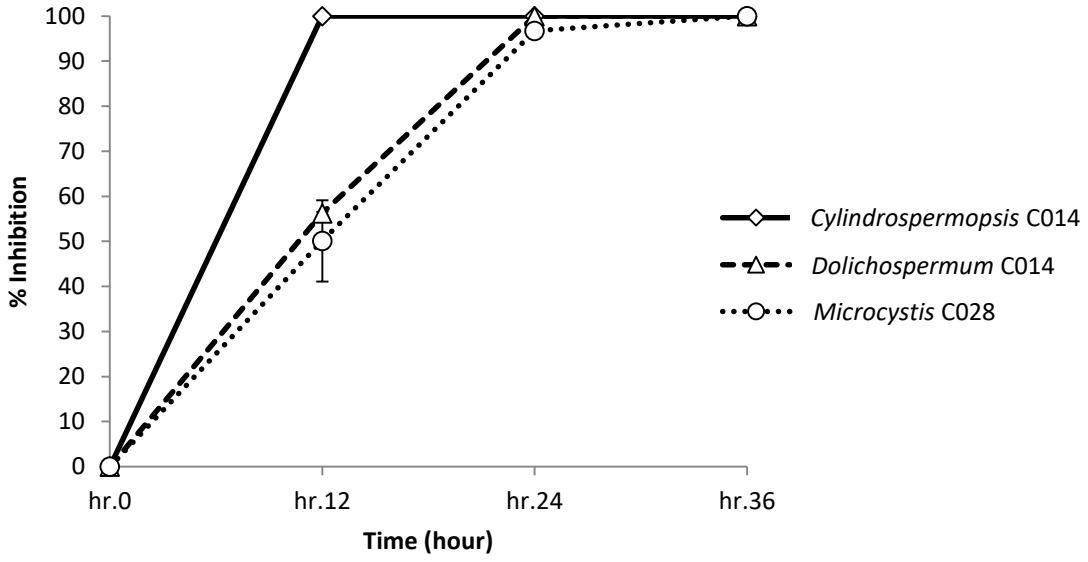
บทที่ 4

ผลการวิจัย

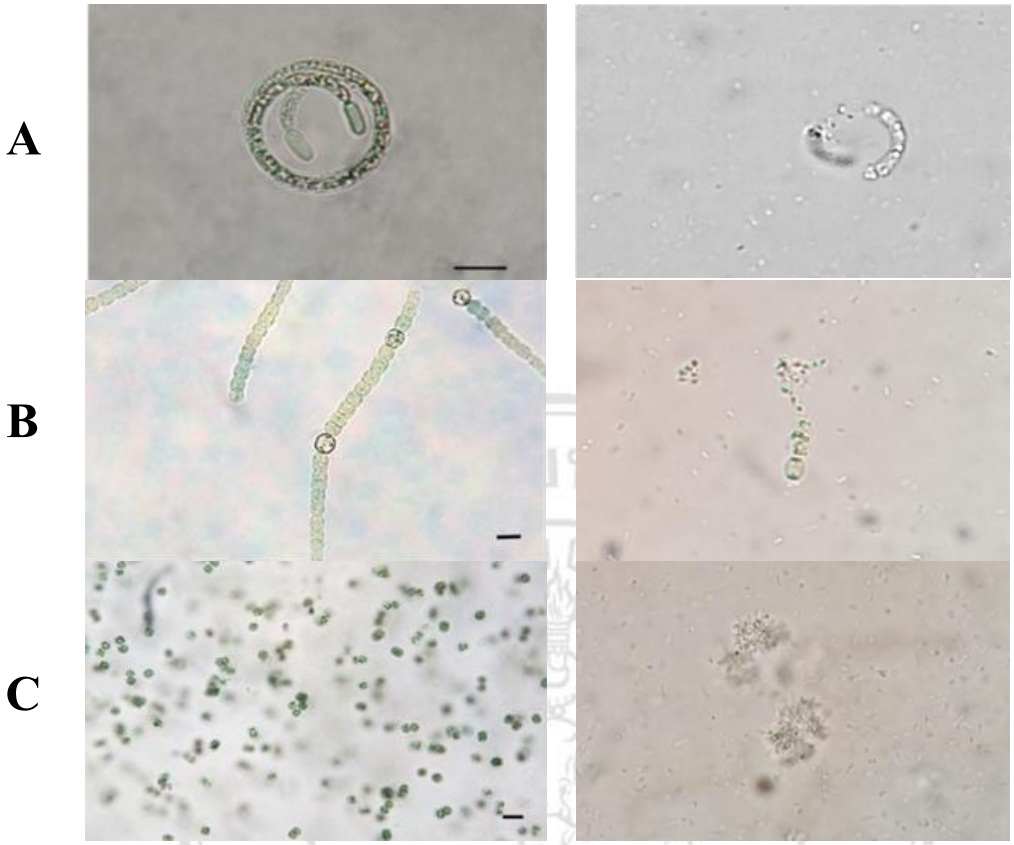
4.1 การควบคุมไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นพิษด้วย *Bacillus* sp. AK3

4.1.1 การควบคุม *Cylindrospermopsis* sp. C013, *Dolichospermum* sp. C014 และ *Microcystis* sp. C028 ด้วย *Bacillus* sp. AK3

จากการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* sp. AK3 ในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรีย *Cylindrospermopsis* sp. C013, *Dolichospermum* sp. C014 และ *Microcystis* sp. C028 ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10.4×10^4, 6.4×10^4 และ 18.6×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่า *Bacillus* sp. AK3 ควบคุมไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 สกุล ได้ 100% ภายใน 12, 24 และ 36 ชั่วโมง ตามลำดับ และย่อยสลายเซลล์ของไซยาแบคทีเรียทั้ง 3 สกุลได้ (ภาพที่ 13 และ 14)



ภาพที่ 13 ร้อยละการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 สกุล ด้วย *Bacillus* sp. AK3



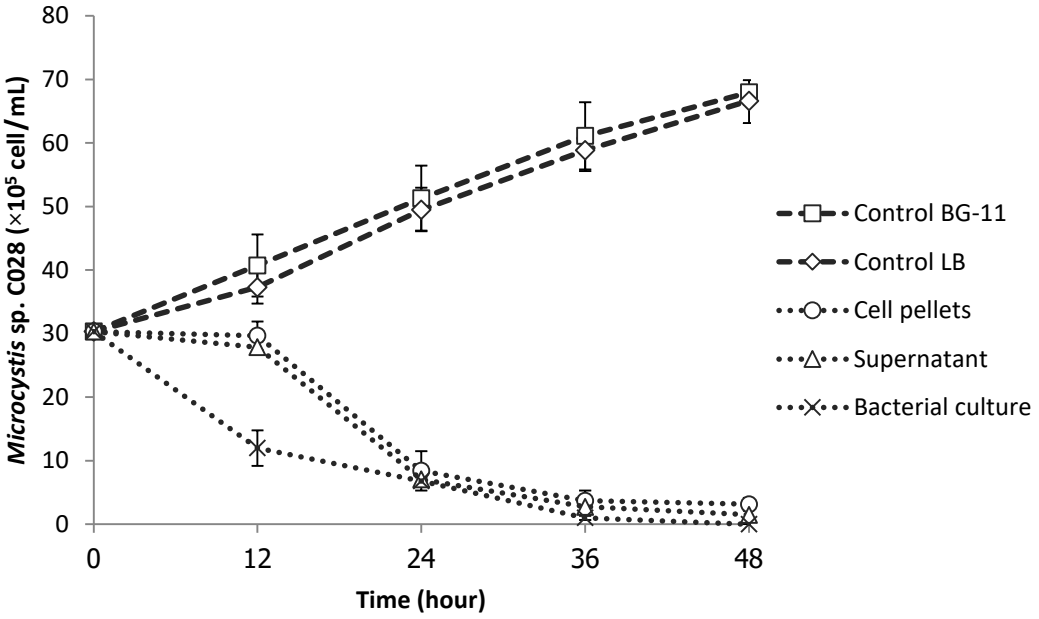
ก) ก่อนการทดลอง **ข) หลังการทดลอง**

ภาพที่ 14 เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 สกุล **ก)** เซลล์ในสภาพปกติก่อนการทดสอบด้วยแบคทีเรีย และ **ข)** เซลล์ที่ถูกย่อยสลายโดย *Bacillus* sp. AK3 **A)** *Cylindrospermopsis* sp. C013, **B)** *Dolichospermum* sp. C014 และ **C)** *Microcystis* sp. C028 (scale bar = 10 ไมโครเมตร)

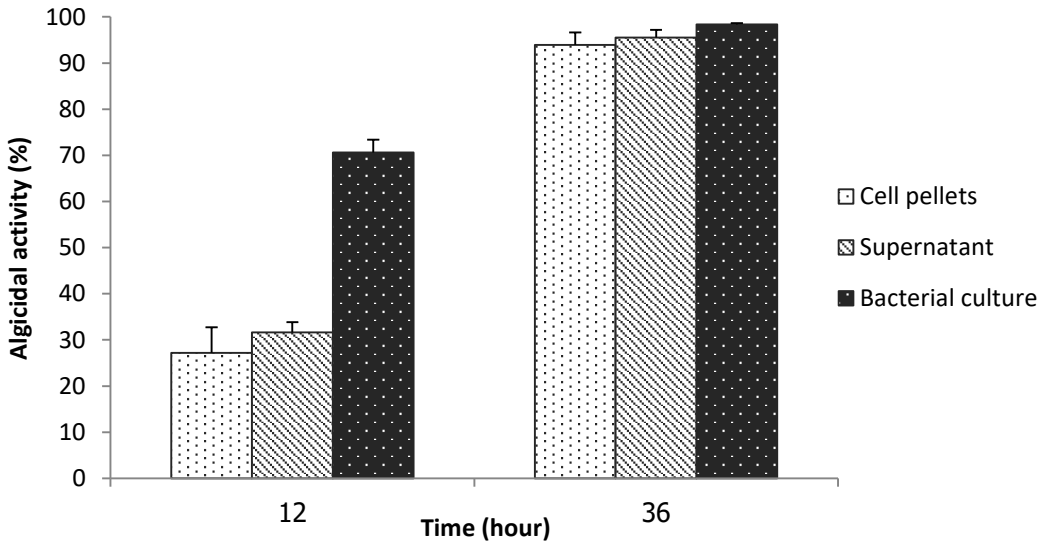
4.1.2 กลไกการทำงานของ *Bacillus* sp. AK3 ในการควบคุม *Microcystis* sp. C028

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. AK3 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำส่วนของเหลว (supernatant) และตะกอนเซลล์ (cell pellets) ของแบคทีเรียมาทดสอบความสามารถในการควบคุม *Microcystis* sp. C028 พบว่า ทั้งส่วนของเหลว และตะกอนเซลล์ของ *Bacillus* sp. AK3 สามารถควบคุม *Microcystis* sp. C028 ได้ 97 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 15 และ 16) ขณะที่ ชุดควบคุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB ลงไป พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียมีการเจริญลดลงเล็กน้อย แต่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีเพียงไซยาโนแบคทีเรียในอาหาร BG-11 พบว่า มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ (p>0.05) (ภาคผนวก ง ตารางที่ 17)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 15 ผลของส่วนของเหลว (supernatant) และตะกอนเซลล์ (cell pellets) ของ *Bacillus* sp. AK3 ต่อการเจริญของ *Microcystis* sp. C028

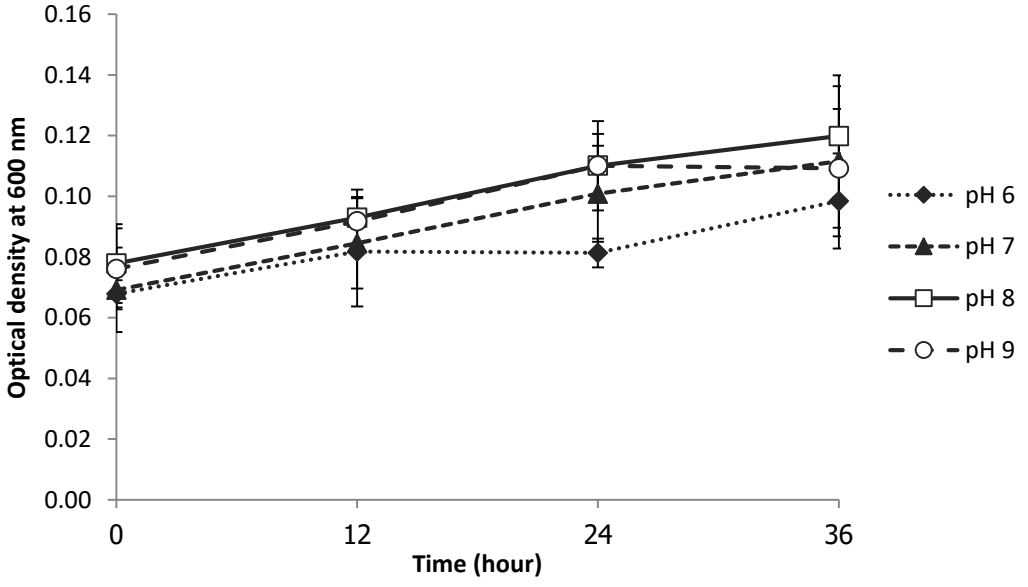


ภาพที่ 16 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ *Microcystis* sp. C028 โดยส่วนของเหลว (supernatant) และตะกอนเซลล์ (cell pellets) ของ *Bacillus* sp. AK3

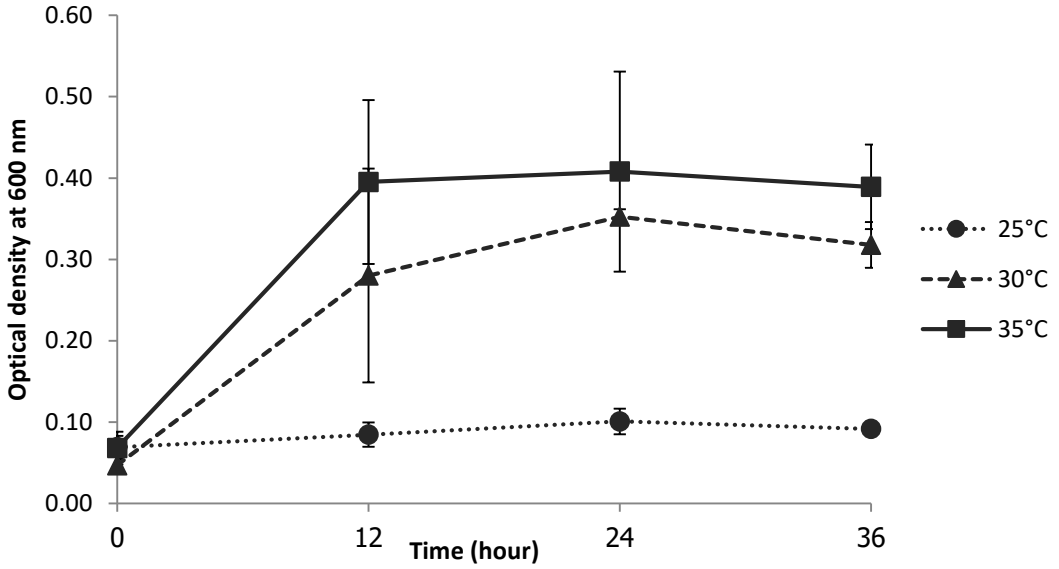
4.1.3 ผลของ pH และอุณหภูมิ ต่อประสิทธิภาพในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียของ *Bacillus* sp. AK3

จากการทดสอบผลของ pH และอุณหภูมิ ต่อประสิทธิภาพของ *Bacillus* sp. AK3 ในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรีย พบว่า pH และอุณหภูมิ มีผลต่อประสิทธิภาพในการควบคุม *Cylindrospermopsis* sp. C013 ในชั่วโมงที่ 4-8 เท่านั้น และในชั่วโมงที่ 12 พบว่า pH และอุณหภูมิ ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการควบคุม เนื่องจาก ในชั่วโมงที่ 12 *Bacillus* sp. AK3 สามารถควบคุม *Cylindrospermopsis* sp. C013 ได้ 100% ในทุก pH และอุณหภูมิ (ตารางที่ 5) ในส่วนของการควบคุม *Dolichospermum* sp. C014 พบว่า pH มีผลต่อประสิทธิภาพในการควบคุมในชั่วโมงที่ 8-24 และอุณหภูมิ มีผลต่อการควบคุมในชั่วโมงที่ 8-16 เท่านั้น และพบว่า pH และอุณหภูมิ ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการควบคุม ในชั่วโมงที่ 32 และ 24 เป็นต้นไป ตามลำดับ เนื่องจาก ในชั่วโมงดังกล่าว *Bacillus* sp. AK3 สามารถควบคุม *Dolichospermum* sp. C014 ได้ 100% (ตารางที่ 6) ขณะที่ การควบคุม *Microcystis* sp. C028 พบว่า pH ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการควบคุมตลอดระยะเวลาการทดลอง ขณะที่อุณหภูมิ มีผลต่อประสิทธิภาพในการควบคุมในชั่วโมงที่ 12-24 (ตารางที่ 7)

นอกจากนี้ พบว่า pH และอุณหภูมิ มีผลต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. AK3 ในอาหาร BG-11 โดย *Bacillus* sp. AK3 เจริญเติบโตได้ดีที่สุดในสภาวะที่มี pH เท่ากับ 8 และ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) กับสภาวะอื่น ๆ (ภาพที่ 17 และ 18)



ภาพที่ 17 ผลของ pH ต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. AK3 ในอาหาร BG-11



ภาพที่ 18 ผลของอุณหภูมิ ต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. AK3 ในอาหาร BG-11

ตารางที่ 5 ผลของ pH และอุณหภูมิ ต่อประสิทธิภาพในการควบคุม *Cylindrospermopsis* sp. C013 ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. AK3

ชุดทดลอง		% ยับยั้งการเจริญของ *Cylindrospermopsis* sp. C013			
		ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 4	ชั่วโมงที่ 8	ชั่วโมงที่ 12
ความเป็นกรด-ด่าง	pH 6	0.00	62.97±1.62 $^{A, a}$	99.46±0.12 $^{A, b}$	100.00 $^{A, b}$
	pH 7	0.00	47.25±4.94 $^{B, a}$	99.85±0.05 $^{B, b}$	100.00 $^{A, b}$
	pH 8	0.00	36.93±3.34 $^{C, a}$	99.48±0.24 $^{AB, b}$	100.00 $^{A, b}$
	pH 9	0.00	42.25±3.92 $^{BC, a}$	99.42±0.12 $^{A, b}$	100.00 $^{A, b}$
อุณหภูมิ	25°C	0.00	47.27±4.94 $^{A, a}$	99.85±0.05 $^{A, b}$	100.00 $^{A, b}$
	30°C	0.00	87.87±4.52 $^{B, a}$	100.00 $^{B, b}$	100.00 $^{A, b}$
	35°C	0.00	88.03±7.56 $^{B, a}$	100.00 $^{B, b}$	100.00 $^{A, b}$

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% กำหนดให้ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ แสดงความแตกต่างในแต่ละคอลัมน์ และตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก แสดงความแตกต่างในแต่ละแถว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 6 ผลของ pH และอุณหภูมิ ต่อประสิทธิภาพในการควบคุม *Dolichospermum* sp. C014 ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. AK3

ชุดทดลอง		% ยับยั้งการเจริญของ ***Dolichospermum* sp. C014**				
		ชั่วโมงที่ 0	**ชั่วโมงที่ 8**	**ชั่วโมงที่ 16**	**ชั่วโมงที่ 24**	**ชั่วโมงที่ 32**
ความเป็นกรด-ด่าง	**pH 6**	0.00	$83.86\pm0.54^{A, a}$	$98.81\pm0.30^{A, b}$	$100.00^{A, c}$	$100.00^{A, c}$
	pH 7	0.00	$42.06\pm4.03^{B, a}$	$74.63\pm7.42^{B, b}$	$99.35\pm0.08^{B, c}$	$100.00^{A, c}$
	pH 8	0.00	$38.15\pm1.28^{B, a}$	$75.27\pm1.78^{B, b}$	$99.37\pm0.34^{B, c}$	$100.00^{A, c}$
	pH 9	0.00	$25.81\pm4.91^{C, a}$	$57.95\pm1.42^{C, b}$	$80.60\pm7.67^{C, c}$	$100.00^{A, d}$
อุณหภูมิ	**25°C**	0.00	$42.06\pm4.03^{A, a}$	$74.63\pm7.42^{A, b}$	$100.00^{A, c}$	-
	30°C	0.00	$63.41\pm2.39^{B, a}$	$89.76\pm3.49^{B, b}$	$100.00^{A, c}$	-
	35°C	0.00	$63.56\pm3.64^{B, a}$	$90.32\pm2.56^{B, b}$	$100.00^{A, c}$	-

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% กำหนดให้ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ แสดงความแตกต่างในแต่ละคอลัมน์ และตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก แสดงความแตกต่างในแต่ละแถว

ตารางที่ 7 ผลของ pH และอุณหภูมิ ต่อประสิทธิภาพในการควบคุม *Microcystis* sp. C028 ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. AK3

ชุดทดลอง		% ยับยั้งการเจริญของ ***Microcystis* sp. C028**			
		ชั่วโมงที่ 0	**ชั่วโมงที่ 12**	**ชั่วโมงที่ 24**	**ชั่วโมงที่ 36**
ความเป็นกรด-ด่าง	**pH 6**	0.00	$50.67\pm13.24^{A, a}$	$96.76\pm1.55^{A, b}$	$100.00^{A, b}$
	pH 7	0.00	$50.11\pm9.02^{A, a}$	$96.72\pm0.52^{A, b}$	$100.00^{A, b}$
	pH 8	0.00	$43.45\pm3.32^{A, a}$	$96.16\pm1.71^{A, b}$	$100.00^{A, b}$
	pH 9	0.00	$50.20\pm7.56^{A, a}$	$97.35\pm0.65^{A, b}$	$100.00^{A, b}$
อุณหภูมิ	**25°C**	0.00	$50.11\pm9.02^{A, a}$	$96.72\pm0.52^{A, b}$	$100.00^{A, b}$
	30°C	0.00	$43.78\pm9.60^{A, a}$	$96.59\pm1.76^{A, b}$	$100.00^{A, b}$
	35°C	0.00	$93.97\pm1.33^{B, a}$	$100.00^{B, b}$	$100.00^{A, b}$

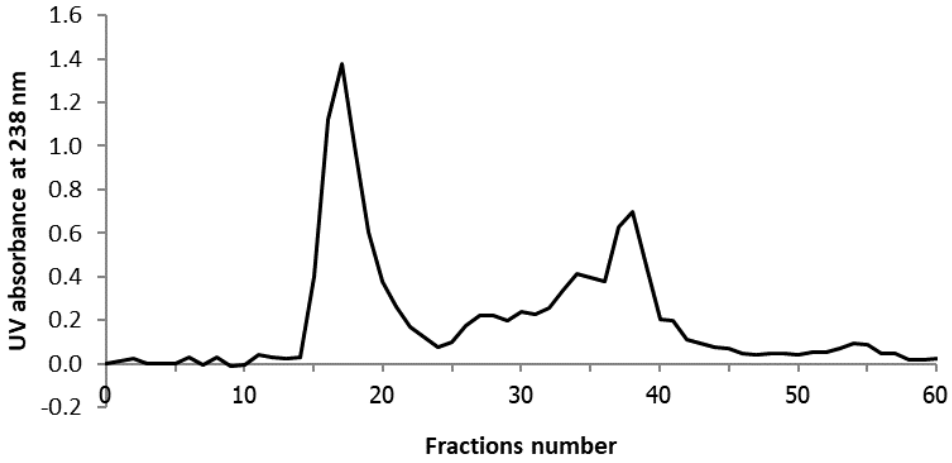
หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% กำหนดให้ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ แสดงความแตกต่างในแต่ละคอลัมน์ และตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก แสดงความแตกต่างในแต่ละแถว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไมโครซิสตินของ *Bacillus* sp. AK3

4.2.1 การสกัด และทำไมโครซิสตินให้บริสุทธิ์

จากการสกัดไมโครซิสตินจากเซลล์แห้งของ *Microcystis* spp. ที่เจริญอย่างรวดเร็วในบริเวณคูเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ด้วยเมทานอล 75% และนำไปทำบริสุทธิ์ด้วย ion-exchange chromatography เก็บ fractions จำนวน 100 หลอด และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 238 นาโนเมตร พบว่า ช่วง fractions ที่ 16-18 และ 37-39 สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตรได้ดี (ภาพที่ 19) ซึ่งคาดว่าช่วง fractions ดังกล่าวจะเป็นไมโครซิสติน จากนั้น จึงนำสารในช่วง fractions ที่ 16-18 และ 37-39 ไปวิเคราะห์ชนิดของไมโครซิสติน ด้วย HPLC เทียบกับสารมาตรฐานไมโครซิสติน

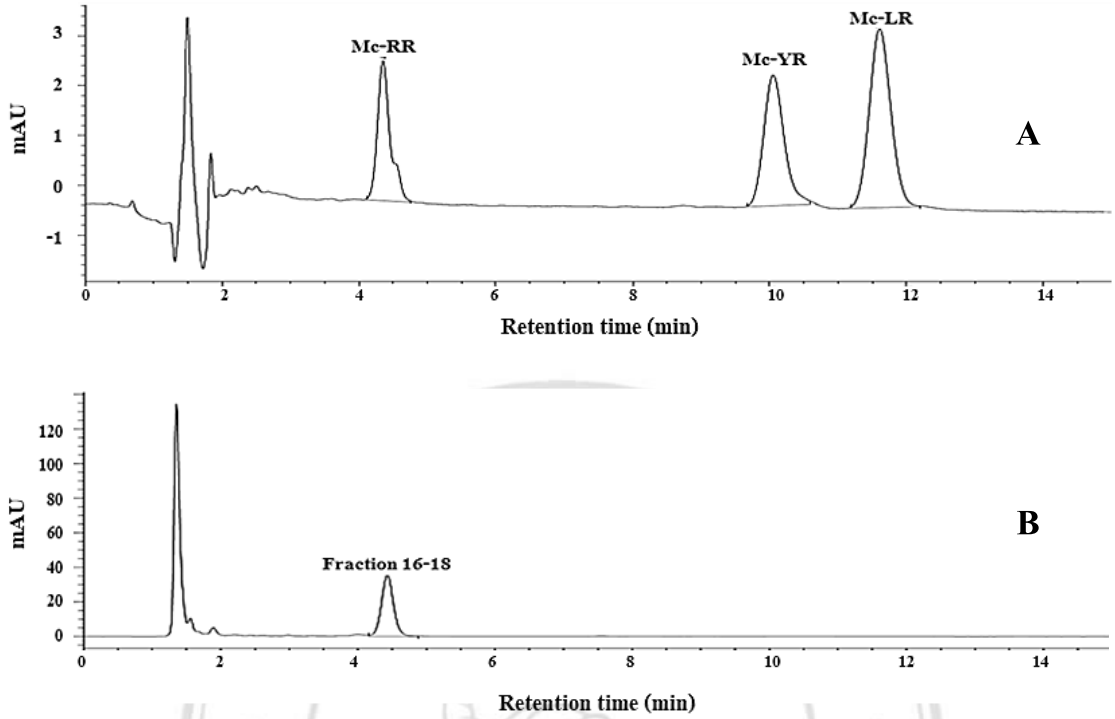


ภาพที่ 19 ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง UV ที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร ของสารที่แยกได้จาก ion - exchange chromatography

4.2.2 การวิเคราะห์ชนิดของ microcystins ด้วย HPLC

เมื่อนำสารที่ได้จากข้อ 4.2.1 มาวิเคราะห์ชนิดของไมโครซิสตินด้วย HPLC เทียบกับสารมาตรฐานไมโครซิสตินชนิด RR, YR และ LR ซึ่งมี retention time เท่ากับ 4.35, 10.05 และ 11.60 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 20A) พบว่า สารในช่วง fraction ที่ 16-18 มี retention time ตรงกับสารมาตรฐาน Microcystin-RR (ภาพ 20B) ในส่วนของสารในช่วง fraction ที่ 37-39 ไม่สามารถตรวจพบได้ ดังนั้น จึงนำสารในช่วง fraction ที่ 16-18 มาทำการทดลองต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

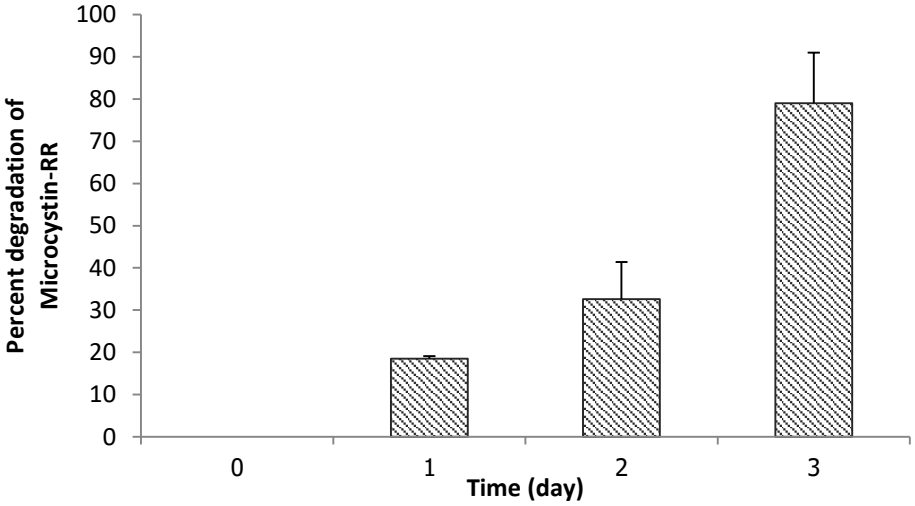


ภาพ 20 โครมาโทแกรม (Chromatogram) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC **A)** สารมาตรฐาน microcystin ชนิด RR, YR และ LR ที่ความเข้มข้น 5 µg/L **B)** สารที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ fraction ที่ 16-18

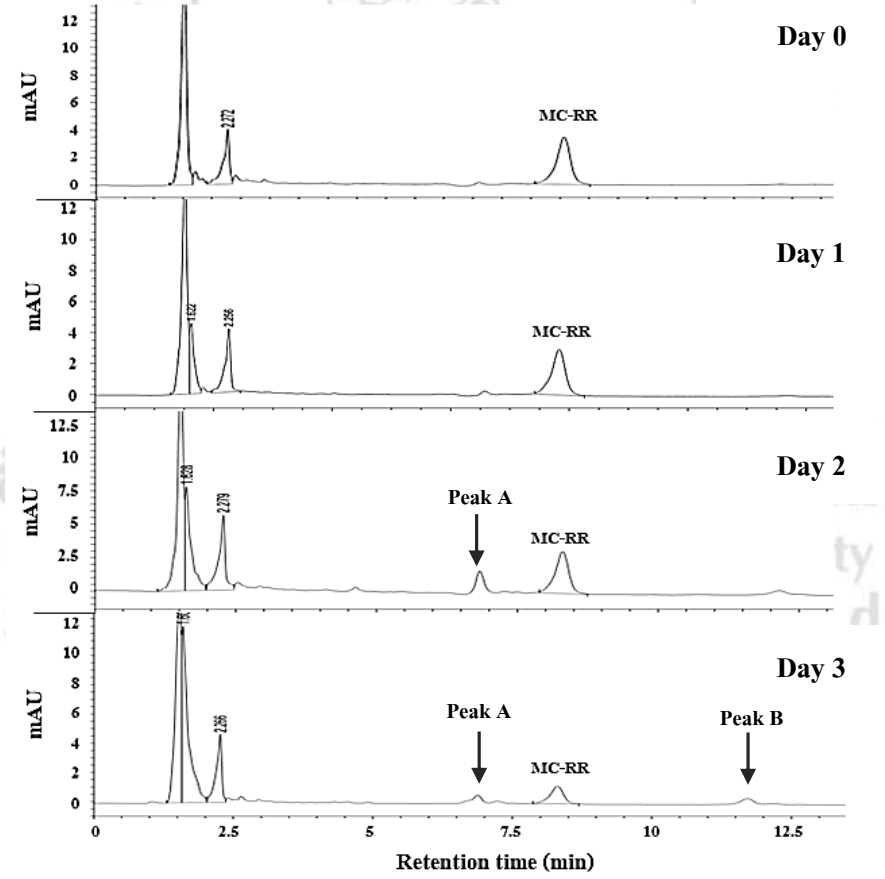
4.2.3 การทดสอบความสามารถของ *Bacillus* sp. AK3 ในการย่อยสลายไมโครซิสติน

จากการทดสอบความสามารถของ *Bacillus* sp. AK3 ในการย่อยสลาย microcystin-RR ที่ความเข้มข้น 15 µg/L พบว่า *Bacillus* sp. AK3 สามารถย่อยสลาย microcystin-RR ได้ 79.01±11.93% ภายใน 3 วัน (ภาพที่ 21) และจากการตรวจสอบการย่อยสลาย microcystin-RR ด้วย HPLC (ภาพที่ 22) พบว่า พื้นที่ใต้ peak ของ microcystin-RR ลดลงอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการทดลอง นอกจากนี้ ในวันที่ 2 ของการทดลอง พบ peak A เกิดขึ้นที่ retention time เท่ากับ 6.80 นาที และในวันที่ 3 ของการทดลอง พบ peak B เกิดขึ้นที่ retention time เท่ากับ 11.75 นาที ซึ่งคาดว่า peak A และ peak B อาจเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหลังจากการย่อยสลาย microcystin-RR โดย *Bacillus* sp. AK3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



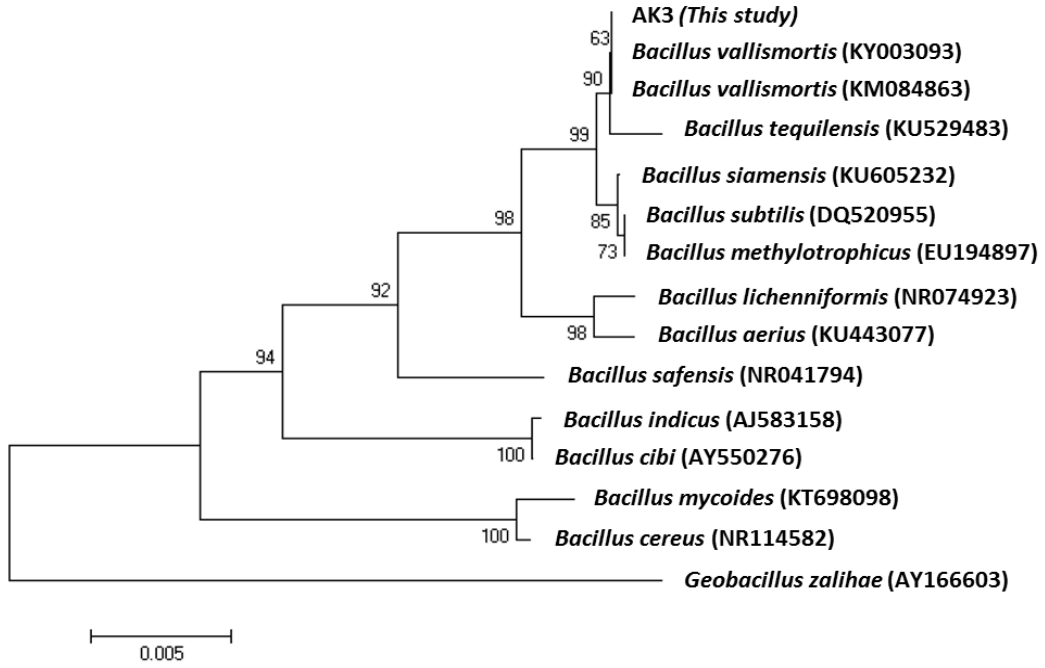
ภาพที่ 21 ร้อยละการย่อยสลายของ microcystin-RR โดย *Bacillus* sp. AK3



ภาพที่ 22 โครมาโทแกรม (chromatogram) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC แสดงการย่อยสลายของ microcystin-RR โดย *Bacillus* sp. AK3 และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (บริเวณศรชี้)

4.3 การจัดจำแนกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. AK3

จากการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. AK3 ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA โดยใช้ไพร์เมอร์ 27F และ 1492R พบว่า *Bacillus* sp. AK3 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Bacillus vallismortis* และ *Bacillus subtilis* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% similarity) เท่ากับ 100% และเมื่อวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่า มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *Bacillus vallismortis* (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 phylogenetic tree ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. AK3 จากการจัดจำแนกด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

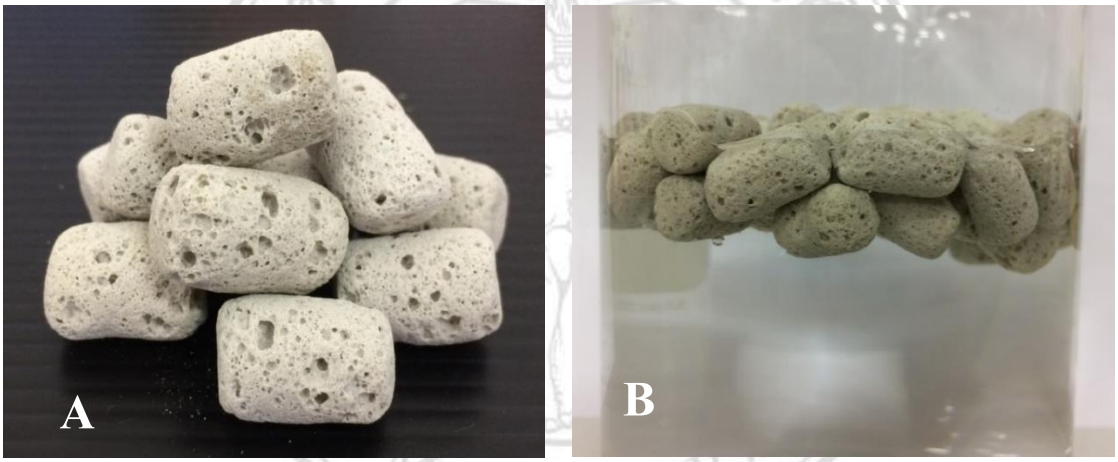
4.4 การศึกษาการตรึงแบคทีเรียบนวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ

4.4.1 ลักษณะของวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ

จากการผลิตวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำในห้องปฏิบัติการ เพื่อนำมาเป็นวัสดุสำหรับตรึงแบคทีเรีย พบว่า ลักษณะของแก้วพรุน แสดงดังตารางที่ 8 และภาพที่ 24A และมีลักษณะการลอยน้ำดังภาพ 24B ซึ่งการลอยน้ำของวัสดุเกิดจากรูพรุนปิดภายในวัสดุ ที่เกิดจากการแตกตัวของสารก่อฟองเกิดเป็นแก๊สซึ่งจะขยายตัว และดันแก้วหลอมทำให้เกิดรูพรุนภายในวัสดุขึ้น

ตารางที่ 8 ลักษณะของวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำที่ผลิตได้ในห้องปฏิบัติการ

ลักษณะ	แก้วพรุนแบบลอยน้ำ
รูปร่าง	ทรงกระบอก
ขนาด (เส้นผ่านศูนย์กลาง และความยาว (cm)	1.12 ± 0.039 และ 1.76 ± 0.074
น้ำหนัก (g/piece)	0.857 ± 0.055
พื้นที่ผิว (m^2/g)	12.5 ± 4.95
ความหนาแน่น (g/cm^3)	0.40
ขนาดรูพรุน (cm)	0.27 ± 0.11

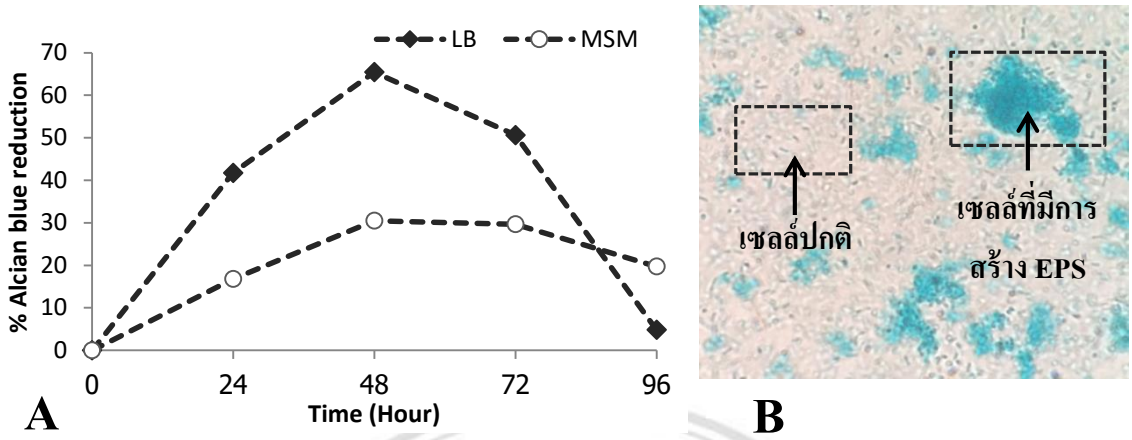


ภาพที่ 24 วัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำที่ผลิตได้ในห้องปฏิบัติการ **A)** ลักษณะรูปร่างของแก้วพรุนแบบลอยน้ำ และ **B)** ลักษณะการลอยน้ำของวัสดุแก้วพรุน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4.2 การสร้าง exopolysaccharide (EPS) ของ *Bacillus* sp.AK3

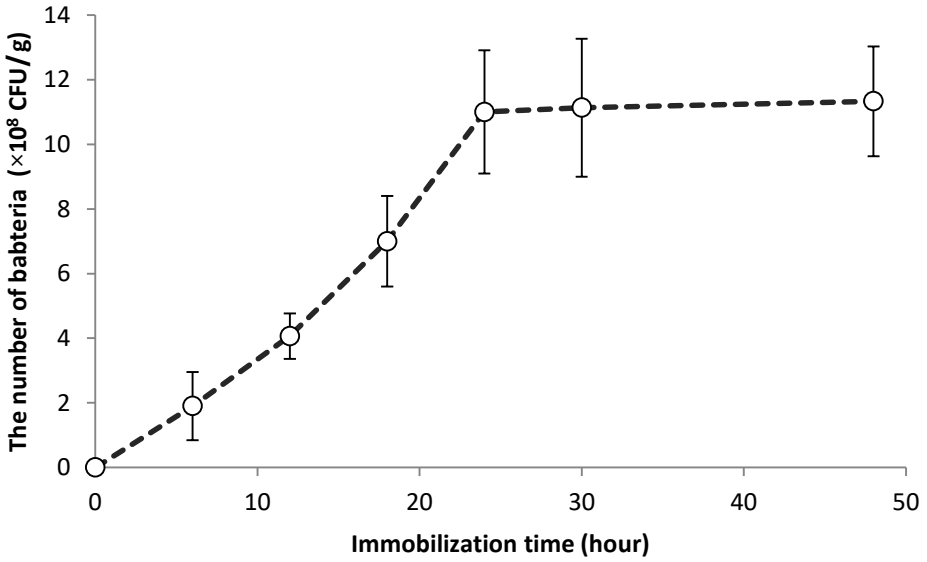
จากการทดสอบความสามารถในการสร้าง EPS ของ *Bacillus* sp. AK3 ซึ่งจะทำหน้าที่ช่วยในกระบวนการตรึงเซลล์แบบ absorption ทำให้แบคทีเรียยึดติดกับวัสดุตรึงได้ดี พบว่า *Bacillus* sp. AK3 มีการสร้าง EPS ได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ในชั่วโมงที่ 48 (ภาพ 25A) โดยการวัดปริมาณการสร้าง EPS ของแบคทีเรีย จะวัดได้จากการลดลงของสี alcian blue ซึ่งจะย้อมติดกับ EPS และก่อให้เกิดการตกตะกอน (ภาพ 25B)



ภาพที่ 25 การสร้าง exopolysaccharide (EPS) ของ *Bacillus* sp. AK3 **A)** ร้อยละการลดลงของสี alcian blue ใช้ในการวัดปริมาณการสร้าง EPS ของแบคทีเรีย **B)** ภาพของ EPS ที่ย้อมติดสีของ alcian blue เทียบกับเซลล์ปกติของแบคทีเรีย

4.4.3 การตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ

จากการแปรผันระยะเวลาการตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุแก้วพรุน พบว่า การยึดเกาะของแบคทีเรียบนวัสดุ มีความคงที่ เมื่อเวลาในการตรึงผ่านไป 24 ชั่วโมง โดยมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ยึดติดอยู่กับวัสดุประมาณ 11×10^{8} CFU/g ของวัสดุ (ภาพที่ 26)

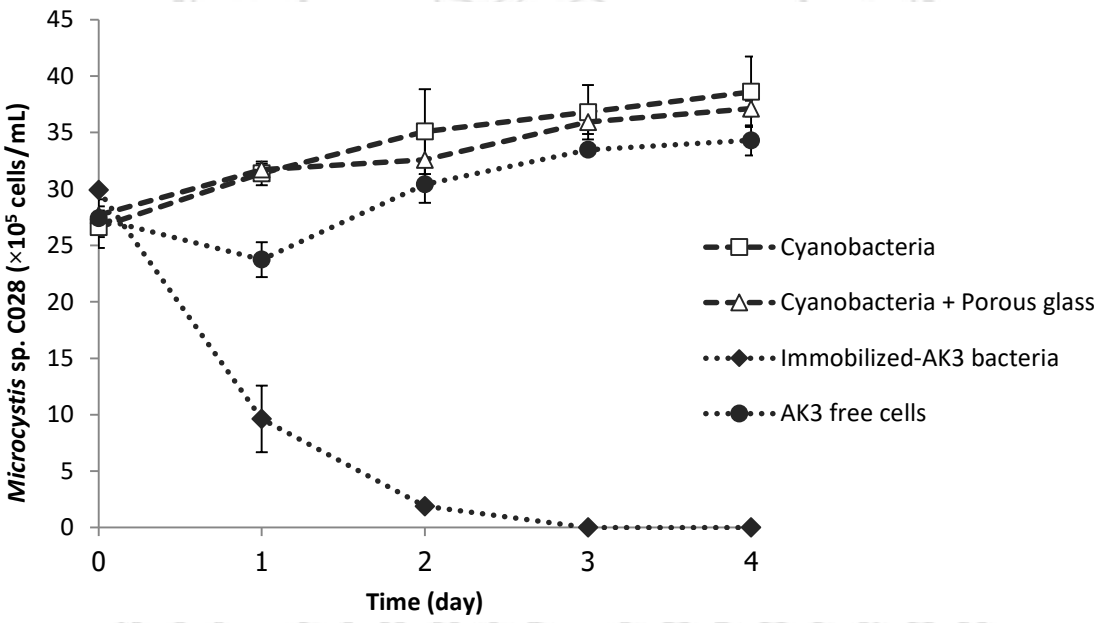


ภาพที่ 26 ผลของระยะเวลาในการตรึงเซลล์ ต่อจำนวนของแบคทีเรียที่ยึดเกาะบนวัสดุ (CFU/g)

4.5 การควบคุมไซยาโนแบคทีเรียด้วยแบคทีเรียเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึงบนวัสดุแก้วพรุน

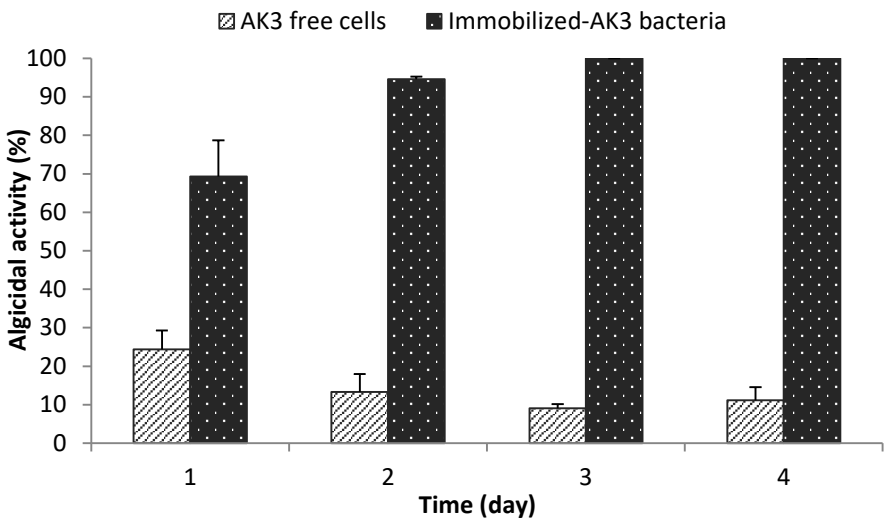
4.5.1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึงบนวัสดุแก้วพรุนในการควบคุม *Microcystis* sp. C028

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุม *Microcystis* sp. C028 ระหว่างแบคทีเรียเซลล์อิสระ (free cells) และแบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุ (immobilized bacteria) โดยกำหนดให้มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากันที่ 11×10^8 CFU / g หรือ mL พบว่า แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพรุนสามารถควบคุม *Microcystis* sp. C028 ได้ 100% ภายใน 3 วัน ขณะที่แบคทีเรียเซลล์อิสระ ควบคุมได้เพียง 11.15 % ในวันที่ 4 ของการทดลอง (ภาพที่ 27 และ 28) ดังนั้น จึงเลือกแบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุมาทดลองต่อไป สำหรับการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่มีเพียงไซยาโนแบคทีเรียกับวัสดุแก้วพรุน พบว่า มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ (p>0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีเพียงไซยาโนแบคทีเรียเจริญอยู่ในอาหาร BG-11 (ภาคผนวก ง ตารางที่ 20)



ภาพที่ 27 จำนวนเซลล์ของ *Microcystis* sp. C028 เมื่อควบคุมด้วยแบคทีเรียเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึงบนวัสดุแก้วพรุน

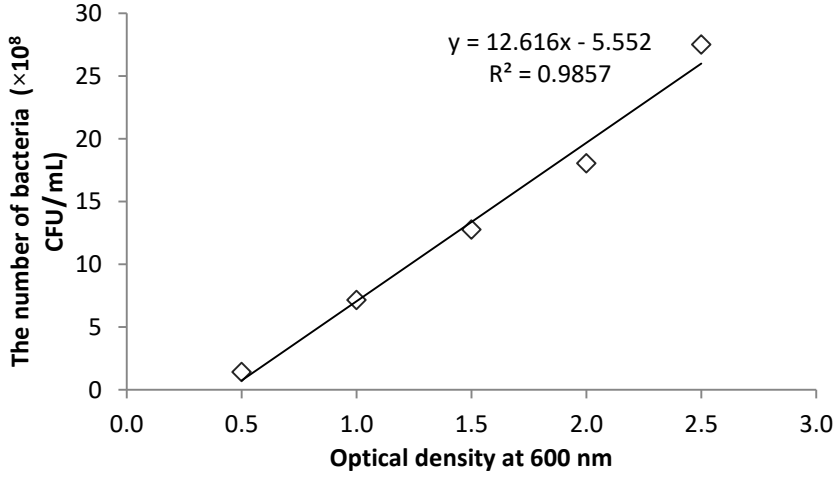
All rights reserved



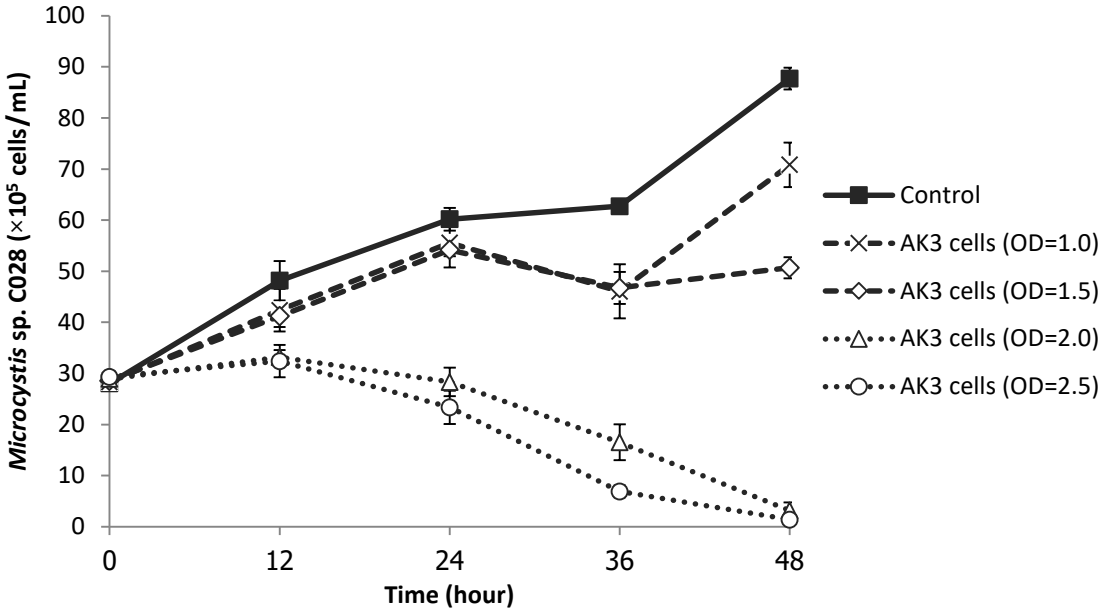
ภาพที่ 28 ร้อยละการยับยั้งการเจริญของ *Microcystis* sp. C028 เมื่อควบคุมด้วยแบคทีเรียเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงบนวัสดุแก้วพรุน

4.5.2 ผลของความเข้มข้นของแบคทีเรียเซลล์อิสระต่อประสิทธิภาพในการควบคุม *Microcystis* sp. C028

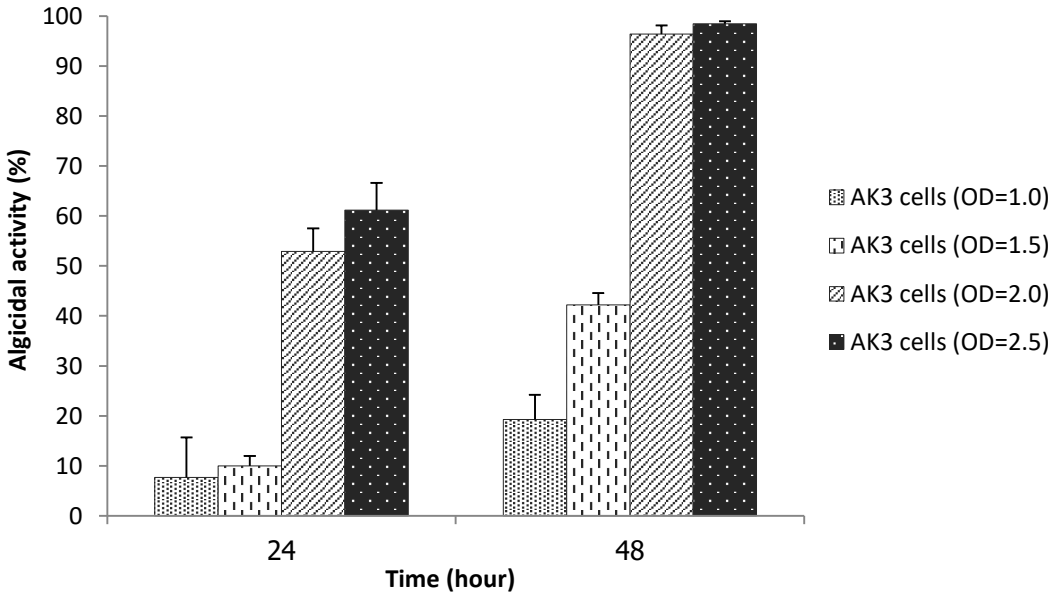
จากการทดลองหาความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของแบคทีเรียแบบเซลล์อิสระ ที่สามารถควบคุม *Microcystis* sp. C028 ได้ดี พบว่า ที่ความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียในช่วงที่มีค่า OD_{600} = 2.0 หรือประมาณ 19.68×10^{8} CFU/mL (คำนวณจากภาพที่ 29) ขึ้นไป สามารถควบคุม *Microcystis* sp. C028 ได้ดี โดยควบคุมได้มากกว่า 96 % ภายใน 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 30 และ 31)



ภาพที่ 29 กราฟมาตรฐานระหว่างจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus* sp. AK3 กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร



ภาพที่ 30 จำนวนเซลล์ของ *Microcystis* sp. C028 เมื่อควบคุมด้วยแบคทีเรียเซลล์อิสระในความเข้มข้นของเซลล์ที่แตกต่างกัน

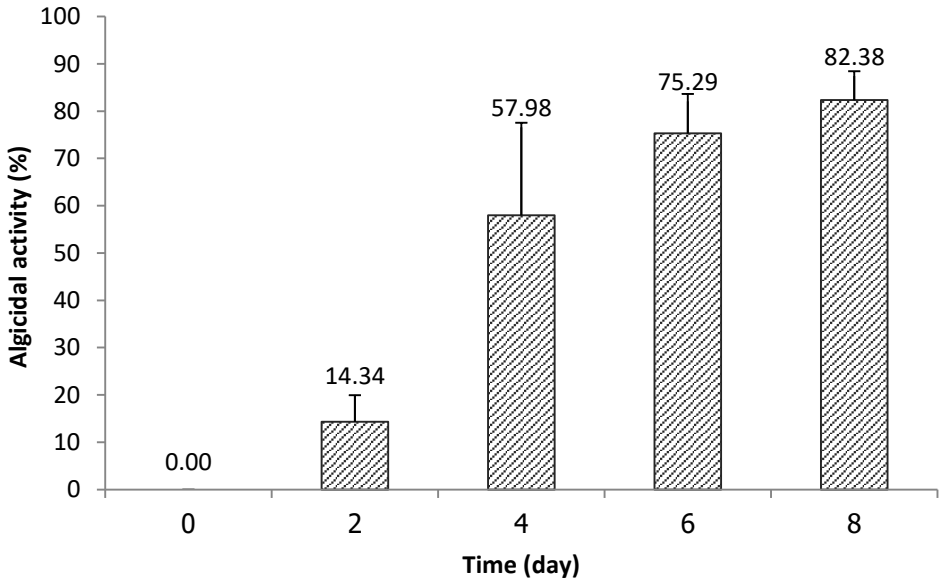


ภาพที่ 31 ร้อยละการยับยั้งการเจริญของ *Microcystis* sp. C028 โดยแบคทีเรียเซลล์อิสระในความเข้มข้นของเซลล์ที่แตกต่างกัน

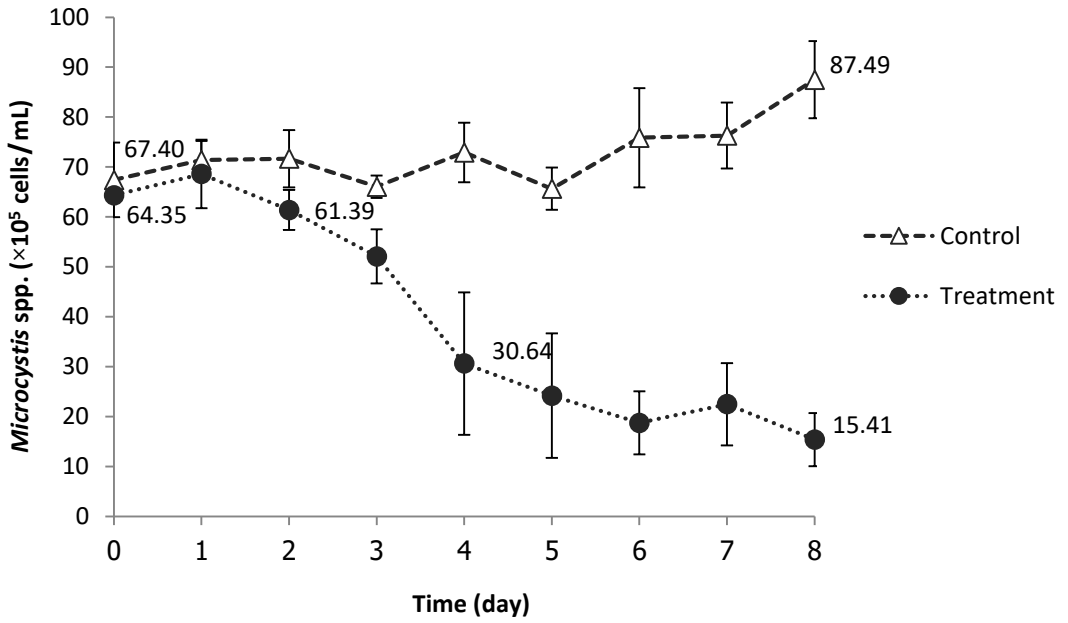
4.6 การใช้แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ ในการควบคุม *Microcystis* spp. และย่อยสลายไมโครซิสตินจากธรรมชาติ ในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร

4.6.1 ประสิทธิภาพของ *Bacillus* sp. AK3 ที่ตรึงบนวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ ในการควบคุม *Microcystis* spp.

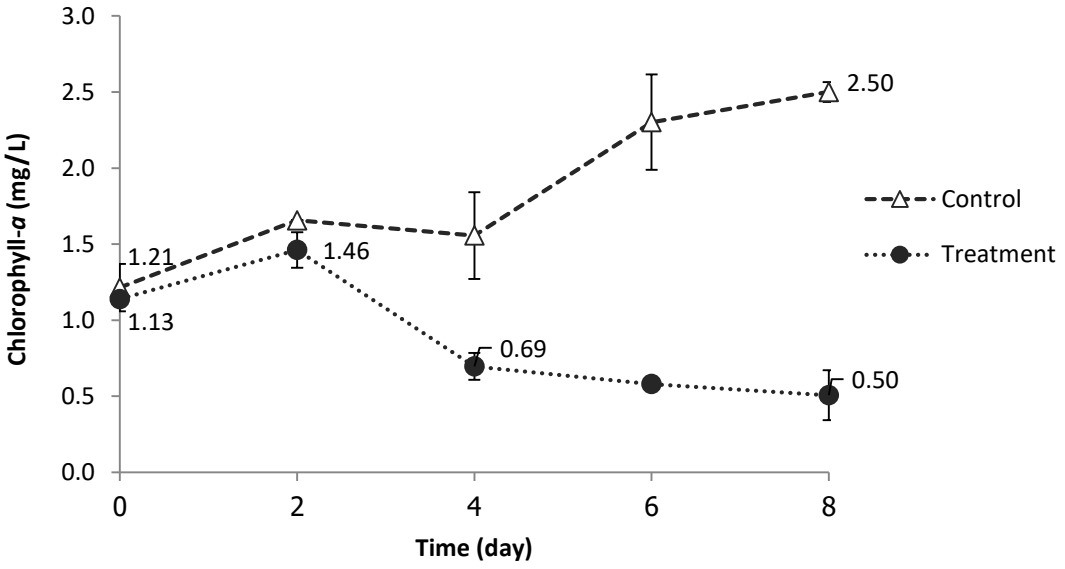
จากการใช้ *Bacillus* sp. AK3 ที่ตรึงบนวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ ในการควบคุม *Microcystis* spp. จากธรรมชาติ ในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร พบว่า *Bacillus* sp. AK3 ที่ตรึงบนวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ สามารถควบคุม *Microcystis* spp. ได้ 82.38% ภายในระยะเวลา 8 วัน (ภาพที่ 32) โดยจำนวนเซลล์ของ *Microcystis* spp. ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 2-4 ของการทดลอง จาก 61.39×10^5 cells/mL ในวันที่ 2 ของการทดลอง เป็น 30.64×10^5 cells/mL ในวันที่ 4 ของการทดลอง จากนั้น จำนวนเซลล์จึงเริ่มมีแนวโน้มคงที่หลังจากวันที่ 5 ของการทดลอง เป็นต้นไป จนสิ้นสุดการทดลอง (ภาพที่ 33 และภาคผนวก ง ตารางที่ 24) นอกจากนี้ พบว่า ปริมาณ chlorophyll-*a* ของ *Microcystis* spp. ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 2-4 ของการทดลอง เช่นเดียวกัน โดยลดลงจาก 1.46 mg/L ในวันที่ 2 ของการทดลอง เป็น 0.69 mg/L ในวันที่ 4 ของการทดลอง จากนั้นจึงมีแนวโน้มคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่า ปริมาณ chlorophyll-*a* ของ *Microcystis* spp. ลดลงกว่า 80 % ภายในระยะเวลา 8 วัน (ภาพที่ 34 และภาคผนวก ง ตารางที่ 25)



ภาพที่ 32 ร้อยละการยับยั้งการเจริญของ *Microcystis* spp. โดยแบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ ในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร



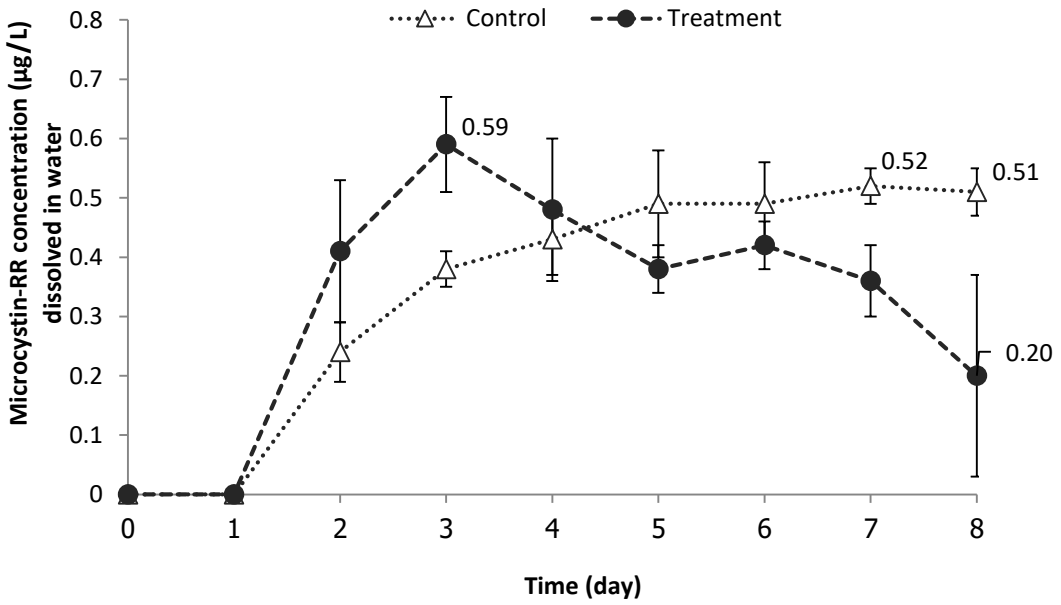
ภาพที่ 33 จำนวนเซลล์ของ *Microcystis* spp. เมื่อควบคุมด้วยแบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ ในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร



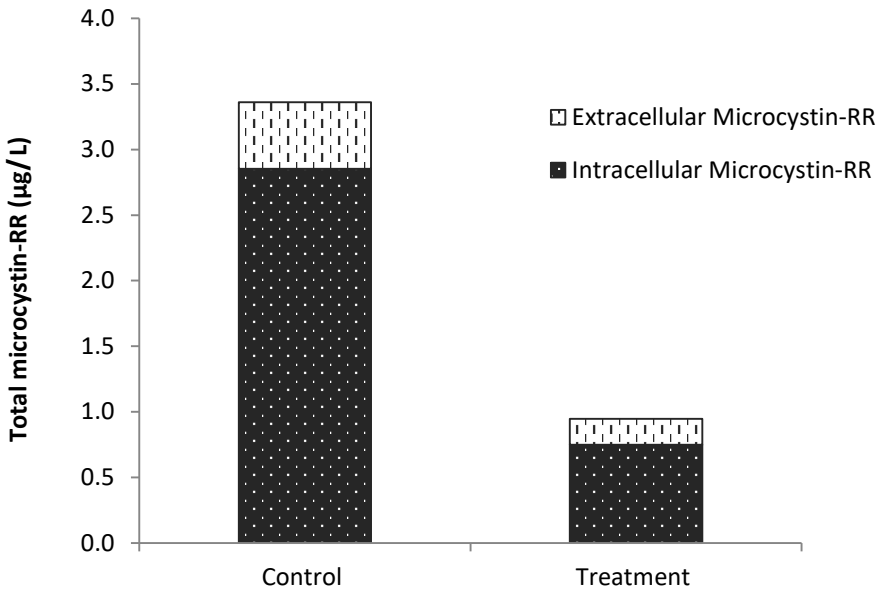
ภาพที่ 34 ปริมาณ chlorophyll-*a* ของ *Microcystis* spp. เมื่อควบคุมด้วยแบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ ในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร

4.6.2 ประสิทธิภาพของ *Bacillus* sp. AK3 ที่ตรึงบนวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ ในการย่อยสลายไมโครซิสติน

ในชุดทดลองที่ใช้ *Bacillus* sp. AK3 ที่ตรึงบนวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ พบว่า ปริมาณ microcystin-RR ที่ละลายในน้ำ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยมีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 0.59 µg/L หลังจากนั้นพบว่า microcystin-RR ที่ละลายในน้ำ ลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยในวันที่ 8 ของการทดลอง พบว่ามี microcystin-RR คงเหลือในน้ำเท่ากับ 0.20 µg/L (ภาพที่ 35) ในส่วนของชุดควบคุมที่มีเพียง *Microcystis* spp. จากธรรมชาติ พบว่า ปริมาณ microcystin-RR ที่ละลายในน้ำ ค่อย ๆ เพิ่มขึ้น โดยมีความเข้มข้นสูงสุดที่ 0.52 µg/L ในวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งปริมาณ microcystin-RR ที่ละลายในน้ำ ไม่มีแนวโน้มลดลง ตลอดจนสิ้นสุดการทดลอง (ภาพที่ 35) และจากการวัดปริมาณ microcystin-RR รวมทั้งหมด ในวันที่ 8 ของการทดลอง พบว่า ชุดควบคุมมีปริมาณ microcystin-RR รวมทั้งหมดเท่ากับ 3.36 µg/L โดยปริมาณ microcystin-RR ส่วนใหญ่พบอยู่ภายในเซลล์ และในชุดทดลองที่มีการใช้แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ พบว่า มีปริมาณ total microcystin-RR เท่ากับ 0.95 µg/L เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าสามารถลดปริมาณ microcystin-RR ได้ถึง 72% (ภาพที่ 36)



ภาพที่ 35 ปริมาณ microcystin-RR ในน้ำ ภายในระยะเวลา 8 วัน

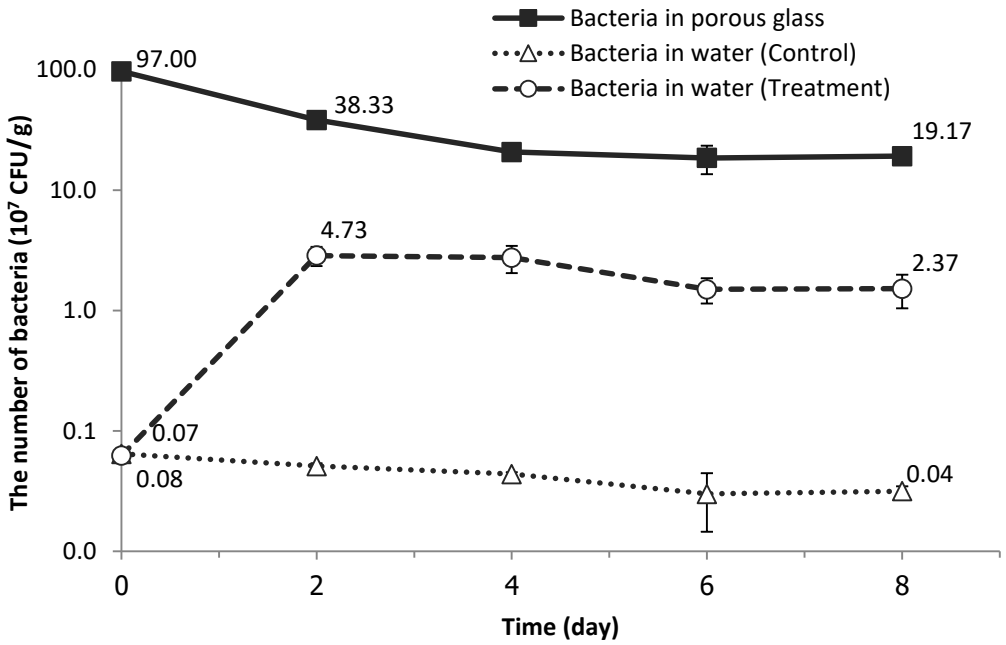


ภาพที่ 36 ปริมาณ microcystin-RR รวมทั้งหมด จากภายในเซลล์ (intracellular) และภายนอกเซลล์ (extracellular) ในวันที่ 8 ของการทดลอง

4.6.3 การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียภายในน้ำ และภายในวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียภายในน้ำ และภายในวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ ในระยะเวลา 8 วัน พบว่า ในชุดควบคุม จำนวนแบคทีเรียในน้ำมีแนวโน้มลดลง จาก 0.08×10^7 CFU/mL ในวันที่ 0 ของการทดลอง เป็น 0.04×10^7 CFU/mL ในวันที่ 8 ของการทดลอง ในขณะที่ ชุดทดลองที่มีการใช้แบคทีเรียตรึงบนวัสดุแก้วพรุน พบว่า จำนวนแบคทีเรียภายในน้ำโดยเฉลี่ย เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 ของการทดลอง โดยเพิ่มขึ้นจาก $0.07\times10^7\pm0.01$ CFU/mL ในวันที่ 0 ของการทดลอง เป็น $4.73\times10^7\pm0.92$ CFU/mL ในวันที่ 2 ของการทดลอง จากนั้น จึงมีการลดลงในวันที่ 6 ของการทดลอง และมีแนวโน้มคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง สำหรับจำนวนแบคทีเรียภายในวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ พบว่า แบคทีเรียมีจำนวนโดยเฉลี่ย ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 ของการทดลอง โดยลดลงจาก $97.00\times10^7\pm9.17$ CFU/g ในวันที่ 0 ของการทดลอง เป็น $38.33\times10^7\pm4.16$ CFU/g ในวันที่ 2 ของการทดลอง และเริ่มมีแนวโน้มคงที่ภายในวันที่ 4 ของการทดลอง จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งในช่วงคงที่นี้มีจำนวนแบคทีเรียเฉลี่ยเท่ากับ $19.50\times10^7\pm1.13$ CFU/g (ภาพที่ 37)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

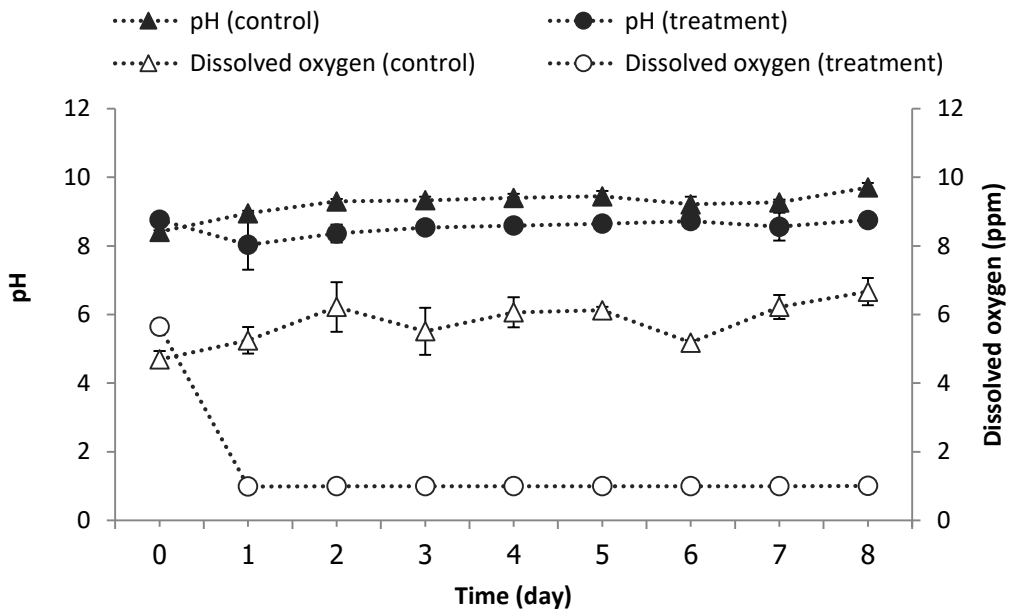


ภาพที่ 37 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียภายในน้ำ และภายในวัสดุแก้วพรุน ในการควบคุม *Microcystis* spp. และย่อยสลายไมโครซิสติน โดยแบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ

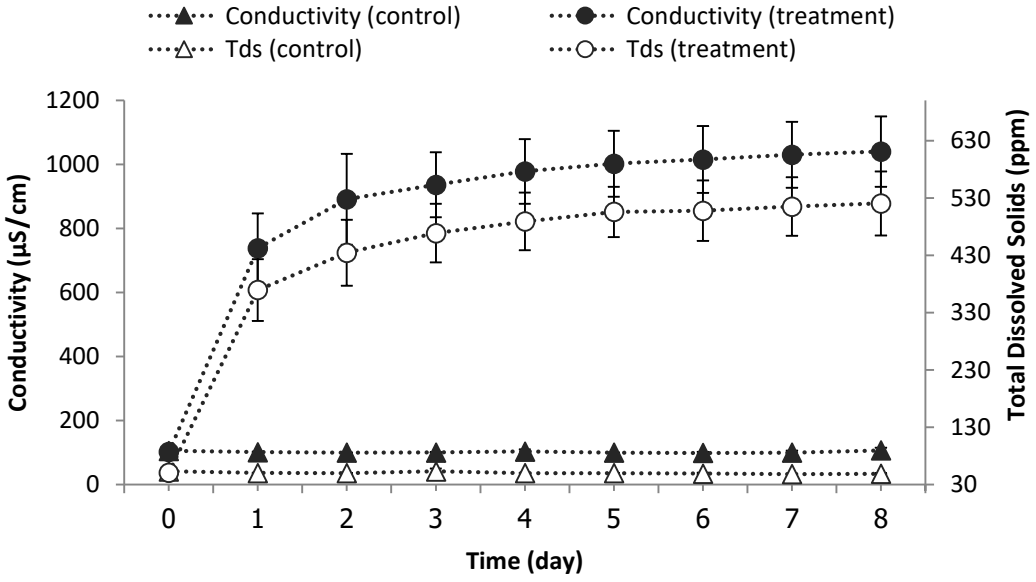
4.6.4 การเปลี่ยนแปลงของปัจจัยทางเคมี และกายภาพบางประการ

จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยทางเคมี และกายภาพบางประการ ภายในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร ตลอดระยะเวลา 8 วันของการทดลอง เพื่อนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง ชุดควบคุม และชุดทดลอง พบว่า ค่า pH โดยเฉลี่ยของน้ำในชุดควบคุม มีค่า 9.22±0.36 และชุดทดลองมีค่า 8.55±0.23 ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ในส่วนของค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (dissolved oxygen) โดยเฉลี่ย พบว่า ในชุดควบคุมมีค่า 5.77±0.63 ppm และชุดทดลองมีค่า 1.52±1.54 ppm ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) เช่นกัน (ภาพที่ 38) สำหรับค่าการนำไฟฟ้า (conductivity) โดยเฉลี่ยของน้ำในชุดควบคุมมีค่า 101.67±2.80 µS/cm และชุดทดลองมีค่า 859.48±299.30 µS/cm ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) และปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายในน้ำ (total dissolved solids) โดยเฉลี่ยในชุดควบคุมมีค่า 50.33±1.63 ppm และชุดทดลองมีค่า 429.00±149.77 ppm ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) เช่นกัน (ภาพที่ 39) ในส่วนของค่าความเข้มแสง (light intensity) และอุณหภูมิของน้ำโดยเฉลี่ยของชุดควบคุม และชุดทดลอง มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ (p>0.05) (ภาพที่ 40) โดยค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยทางเคมี และกายภาพบางประการ ภายในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร ในระยะเวลา 8 วัน แสดงดังตารางที่ 9

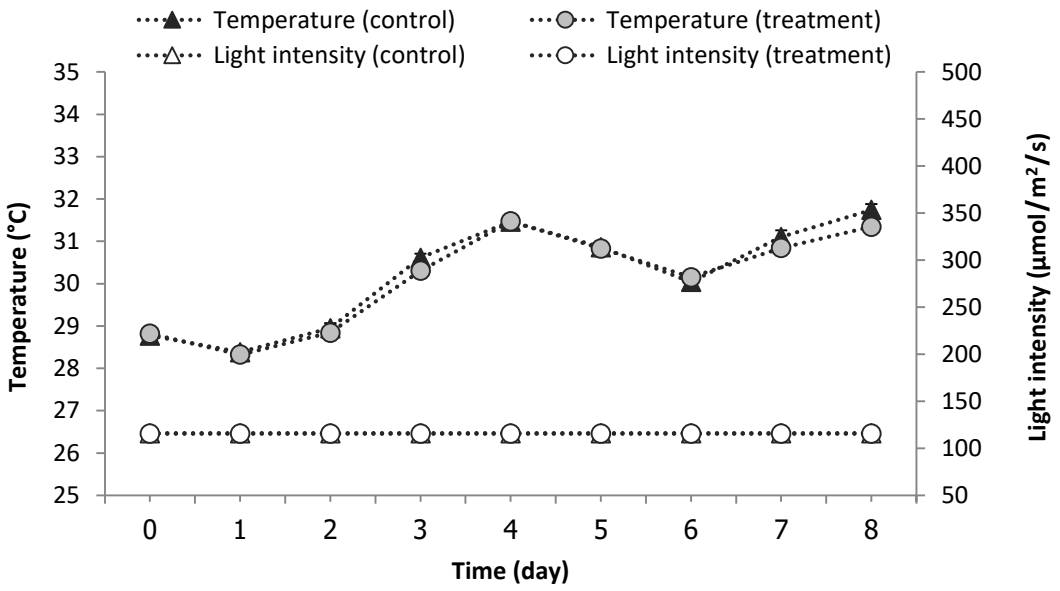
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 38 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (dissolved oxygen) ภายในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร



ภาพที่ 39 ค่าการนำไฟฟ้า (conductivity) และปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายในน้ำ (total dissolved solids) ภายในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร



ภาพที่ 40 ค่าความเข้มแสง (light intensity) และอุณหภูมิของน้ำ ภายในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร

ตารางที่ 9 การเปลี่ยนแปลงโดยเฉลี่ยของปัจจัยทางชีวภาพ เคมี และกายภาพบางประการ ภายในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร ในระยะเวลา 8 วัน

Factors	Control	Immobilized-AK3 bacteria
***Microcystis* spp. ($\times10^5$ cells/mL)**	72.75 ± 6.76^{A}	39.77 ± 21.54^{B}
Chlorophyll-*a* (µg/L)	1.84 ± 0.53^{A}	0.877 ± 0.40^{B}
Total microcystin-RR (µg/L)	3.36 ± 0.24^{A}	0.95 ± 0.25^{B}
Bacteria in water ($\times10^7$CFU/mL)	0.05 ± 0.01^{A}	2.81 ± 1.91^{B}
Water temperature (°C)	30.21 ± 1.24^{A}	30.10 ± 1.16^{A}
pH	9.22 ± 0.36^{A}	8.55 ± 0.23^{B}
Dissolved oxygen (ppm)	5.77 ± 0.63^{A}	1.52 ± 1.54^{B}
Conductivity (µS/cm)	101.67 ± 2.80^{A}	859.48 ± 299.30^{B}
Total dissolved solids (ppm)	50.33 ± 1.63^{A}	429.00 ± 149.77^{B}
Light intensity (µmol/m^2/s)	116 ± 4.70^{A}	116 ± 2.93^{A}

หมายเหตุ : ข้อมูลในตารางแสดงค่าเฉลี่ย (mean) และ ± SD ในระยะเวลาทั้งหมด 8 วัน โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันในระหว่างแถว แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้วิธีการทดสอบ T-test

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved