

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

5.1 การควบคุมไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นพิษด้วย *Bacillus* sp. AK3

5.1.1 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 พบว่า *Bacillus* sp. AK3 สามารถควบคุมไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 สกุลดังกล่าว ได้ 100% ภายใน 12, 24 และ 36 ชั่วโมง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 สกุลนั้น มีความแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 สกุล โดย *Cylindrospermopsis* sp. C013 มีขนาดของเซลล์ (กว้าง×ยาว) โดยเฉลี่ย $3.3\pm0.4\times5.0\pm0.3$ ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดเล็กกว่า *Dolichospermum* sp. C014 ที่มีขนาดของเซลล์ (กว้าง×ยาว) โดยเฉลี่ย $6.3\pm0.4\times7.4\pm0.8$ ไมโครเมตร จึงทำให้ *Cylindrospermopsis* sp. C013 ถูกย่อยสลายได้รวดเร็วกว่า *Dolichospermum* sp. C014 ซึ่งมีเซลล์ขนาดใหญ่กว่า ในขณะที่ *Microcystis* sp. C028 มีเซลล์ขนาดเล็กโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 3.8 ± 0.4 ไมโครเมตร แต่เซลล์มีเมือกหุ้มรวมกันเป็นโคโลนีขนาดเล็ก ๆ ซึ่งมีรายงานว่าเมือกหุ้มดังกล่าว มีส่วนในการปกป้องเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียจากการโจมตีของแบคทีเรีย ไวรัส และปกป้องเซลล์จากสภาวะแวดล้อมทางลบได้ (Yang and Kong, 2012; Bi *et al.*, 2017) ด้วยเหตุนี้ จึงทำให้ใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายเซลล์ของ *Microcystis* sp. C028 นานกว่าไซยาโนแบคทีเรียอีก 2 สกุล

โดยปกติแบคทีเรียที่สามารถควบคุมการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียได้นั้น มักพบว่าถูกคัดแยกมาจากแหล่งน้ำที่มีประวัติการเจริญอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรีย เช่นงานวิจัยของ Ren *et al.* (2009) และ Li *et al.* (2015) ที่ได้คัดแยกแบคทีเรียจากทะเลสาบในประเทศจีน ซึ่งมีประวัติการเจริญอย่างรวดเร็วของ *M. aeruginosa* พบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* strain R219 และ *Bacillus* sp. strain Lzh-5 ตามลำดับ สามารถควบคุมการเจริญของ *M. aeruginosa* ได้ดี เช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ ได้ใช้แบคทีเรีย *Bacillus* sp. AK3 ที่ได้จากงานของ ดนุพล (2558) ซึ่งคัดแยกมาจากอ่างแก้ว

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่มีประวัติการเจริญของ *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Dolichospermum planctonicum* และ *Microcystis aeruginosa* (อรวรรณ, 2553; พงศกร, 2556; รักชนก, 2556) พบว่าแบคทีเรียดังกล่าว สามารถควบคุมไซยาโนแบคทีเรีย *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum* และ *Microcystis* ได้ดี

จากรายงานของ Manage *et al.* (2001) พบว่า ช่วงที่มีการเจริญอย่างรวดเร็วของ *M. aeruginosa* ในแหล่งน้ำของประเทศญี่ปุ่น จำนวนประชากรของแบคทีเรียหลายชนิดที่มีความสามารถในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรีย เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และภายหลังจากที่ประชากรของ *M. aeruginosa* ลดลง ประชากรของแบคทีเรียดังกล่าวก็ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน แสดงให้เห็นว่า ประชากรแบคทีเรียในแหล่งน้ำ อาจมีส่วนสำคัญในการควบคุมประชากรของไซยาโนแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะย่อยสลายเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย และใช้สารอาหารที่สะสมอยู่ในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย เช่น ไนโตรเจน และคาร์บอน ในการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวน (Ma *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016) จากรายงานข้างต้น อาจเป็นไปได้ที่ *Bacillus* sp. AK3 ที่ดำรงชีวิตอยู่ในแหล่งน้ำ จะมีการเพิ่มจำนวนในระหว่างที่มีการเจริญอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียในอ่างแก้วมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ งานวิจัยของ ดนุพล (2558) จึงสามารถคัดแยกแบคทีเรียชนิดนี้จากแหล่งน้ำดังกล่าวได้ โดยทั่วไป แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* สามารถพบได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย เช่น แหล่งน้ำ ดิน หิน ฝุ่น รวมไปถึง ภายในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งการมี endospore อยู่ภายในเซลล์ของ *Bacillus* นั้น ช่วยให้มีการแพร่กระจายได้ง่าย และมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมสูง ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบของ *Bacillus* ที่ทำให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย (Nicholson *et al.*, 2000; Nicholson, 2002; Hong *et al.*, 2009)

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ *Bacillus* sp. AK3 ในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 สกุล กับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ (ตารางที่ 10) พบว่า *Bacillus* sp. AK3 สามารถควบคุมไซยาโนแบคทีเรียได้หลายสกุล ภายใต้วงเวลาที่รวดเร็ว จึงเป็นข้อดีในการนำไปใช้ควบคุมไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำธรรมชาติ เนื่องจากในธรรมชาติมักพบการเจริญอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียหลาย ๆ สกุลร่วมกัน (Somdee *et al.*, 2013; Pongswat and Suphan, 2015) นอกจากนี้ ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 สกุลที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum* และ *Microcystis* เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่พบได้บ่อยในแหล่งน้ำทั่วประเทศไทย (Pekkoh, 2008; Prasertsin and Peerapornpisal, 2015) ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ในการนำ *Bacillus* sp. AK3 ไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำต่าง ๆ ของประเทศไทยได้

ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ *Bacillus* sp. AK3 ในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรีย กับ รายงานวิจัยก่อนหน้า

แบคทีเรีย	สกุลของ ไซยาโนแบคทีเรีย	เซลล์เริ่มต้น (cells/mL)	% ยับยั้ง	ระยะ เวลาควบคุม	ที่มา
<i>Bacillus vallismortis</i> AK3	<i>Cylindrospermopsis</i> <i>Dolichospermum</i> <i>Microcystis</i>	10.4×10^4 6.4×10^4 18.6×10^4	100% 100% 100%	12 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง 36 ชั่วโมง	งานวิจัยนี้
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Microcystis</i>	n/a	85%	2 วัน	Ahn <i>et al.</i> (2003)
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Anabaena</i>	n/a	96%	7 วัน	Shunyu <i>et al.</i> (2006)
<i>Lysobacter brunescens</i>	<i>Cylindrospermopsis</i>	20.6×10^4	95%	7 วัน	Flaherty <i>et al.</i> (2007)
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Microcystis</i> <i>Anabaena</i>	1.0×10^5 1.0×10^5	91% 6%	10 วัน 10 วัน	Kang <i>et al.</i> (2012a)
<i>Aeromonas</i> sp. FM	<i>Microcystis</i> <i>Anabaena</i>	7.5×10^5 n/a	85% 100%	7 วัน 6 วัน	Liu <i>et al.</i> (2012)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Microcystis</i>	1.0×10^6	99%	6 วัน	Yu <i>et al.</i> (2014)
<i>Bacillus</i> sp. Lzh-5	<i>Microcystis</i>	1.0×10^7	91%	6 วัน	Li <i>et al.</i> (2015)

หมายเหตุ : n/a = ไม่มีข้อมูล

5.1.2 กลไกการทำงานของ *Bacillus* sp. AK3 ในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรีย

โดยทั่วไป แบคทีเรียจะมีกลไกในการควบคุมการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียได้ 2 รูปแบบ คือ การควบคุมทางตรง โดยแบคทีเรียจะใช้ เมือก ไกลโคไลกซ์ หรือ ฟิไล เพื่อช่วยเกาะติดกับเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียโดยตรง และกระตุ้นให้เซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียเกิดการแตกสลายได้ (Costerton and Irvin, 1981; Salomon and Imai, 2006; Shunyu *et al.*, 2006) และการควบคุมทางอ้อม โดยการปล่อยสารที่มีฤทธิ์ทำให้เซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียแตกสลายได้โดยไม่มีการสัมผัสกันโดยตรง ซึ่งสารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างจากแบคทีเรียนั้นมีหลายกลุ่ม เช่น peptide, amino acid, alkaloid, phenolic compounds และ biosurfactants (Ahn *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015; Yi *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2016) โดยแบคทีเรีย

ส่วนใหญ่ที่ถูกคัดแยกเพื่อนำมาใช้ควบคุมไซยาโนแบคทีเรีย มักจะมีกลไกการทำงานแบบการควบคุมทางอ้อม (Roth *et al.*, 2008) อย่างไรก็ตาม การปล่อยสารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าไซยาโนแบคทีเรียให้กระจายอย่างอิสระในแหล่งน้ำนั้น อาจมีประสิทธิภาพไม่มากพอที่จะฆ่าไซยาโนแบคทีเรียที่แขวนลอยอยู่ในแหล่งน้ำขนาดใหญ่ได้ (Mayali and Azam, 2004) จึงทำให้การนำแบคทีเรียไปใช้ในแหล่งน้ำธรรมชาตินั้นยังมีข้อจำกัดอยู่

จากการนำส่วนของเหลว (supernatant) และตะกอนเซลล์ (cell pellets) ของ *Bacillus* sp. AK3 มาทดสอบความสามารถในการควบคุม *Microcystis* sp. C028 พบว่า ทั้ง 2 ส่วนดังกล่าว สามารถควบคุม *Microcystis* sp. C028 ได้ 97 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ภายใน 48 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *Bacillus* sp. AK3 สามารถควบคุมไซยาโนแบคทีเรียได้ทั้งทางตรง และทางอ้อม สอดคล้องกับงานวิจัยของ Shunyu *et al.* (2006) ที่พบว่า *Bacillus cereus* สามารถสร้างเมือกช่วยให้แบคทีเรียยึดติดกับเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย และย่อยสลายเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียได้ Ahn *et al.* (2003) พบว่า Surfactin ที่สร้างมาจาก *Bacillus subtilis* มีฤทธิ์ในการควบคุมการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* และ *Anabaena affinis* ได้ และ Li *et al.* (2015) พบว่า *Bacillus* sp. Lzh-5 สามารถสร้างและปลดปล่อยสารประกอบจำพวก cyclic dipeptide 2 ชนิด ได้แก่ cyclo (Gly-Pro) และ cyclo (Pro-Val) ซึ่งมีฤทธิ์ในการฆ่าไซยาโนแบคทีเรียได้ ดังนั้น การที่ *Bacillus* sp. AK3 มีรูปแบบในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียทั้งทางตรง และทางอ้อม อาจทำให้สามารถนำแบคทีเรียดังกล่าวไปใช้ควบคุมไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำธรรมชาติได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ผลจากงานวิจัยนี้เป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้นเท่านั้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกระบวนการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียในทางตรง และจัดจำแนกสารที่ *Bacillus* sp. AK3 สร้างขึ้น และปลดปล่อยออกมาเพื่อควบคุมไซยาโนแบคทีเรียในทางอ้อม ต่อไป

5.1.3 ผลของ pH และอุณหภูมิ ต่อประสิทธิภาพในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียของ *Bacillus* sp. AK3

ไซยาโนแบคทีเรียสามารถเจริญอย่างรวดเร็วได้ในสภาวะที่มีปัจจัยต่าง ๆ เหมาะสม เช่น pH และอุณหภูมิ โดย *Cynlindrospermopsis raciborskii* มักจะเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 25-32°C และ pH 5-9 (Recknagel *et al.*, 2014; Antunes *et al.*, 2015) *Dolichospermum* spp. (*Anabaena*) เจริญได้ดีที่ 25°C และ pH 9.5 (Chaudhary *et al.*, 2013; Lurling *et al.*, 2013) ในขณะที่ *Microcystis aeruginosa* เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-32°C และ pH 8.2-8.9 (Liu *et al.*, 2011; Lurling *et al.*, 2013) จะเห็นได้ว่า ไซยาโนแบคทีเรียสามารถเจริญได้ที่ค่า pH และอุณหภูมิที่หลากหลาย ดังนั้น ปัจจัยด้าน pH และอุณหภูมิ จึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในกระบวนการควบคุมไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียในสภาวะที่มี pH และอุณหภูมิต่างกันจึงเป็นสิ่งจำเป็น

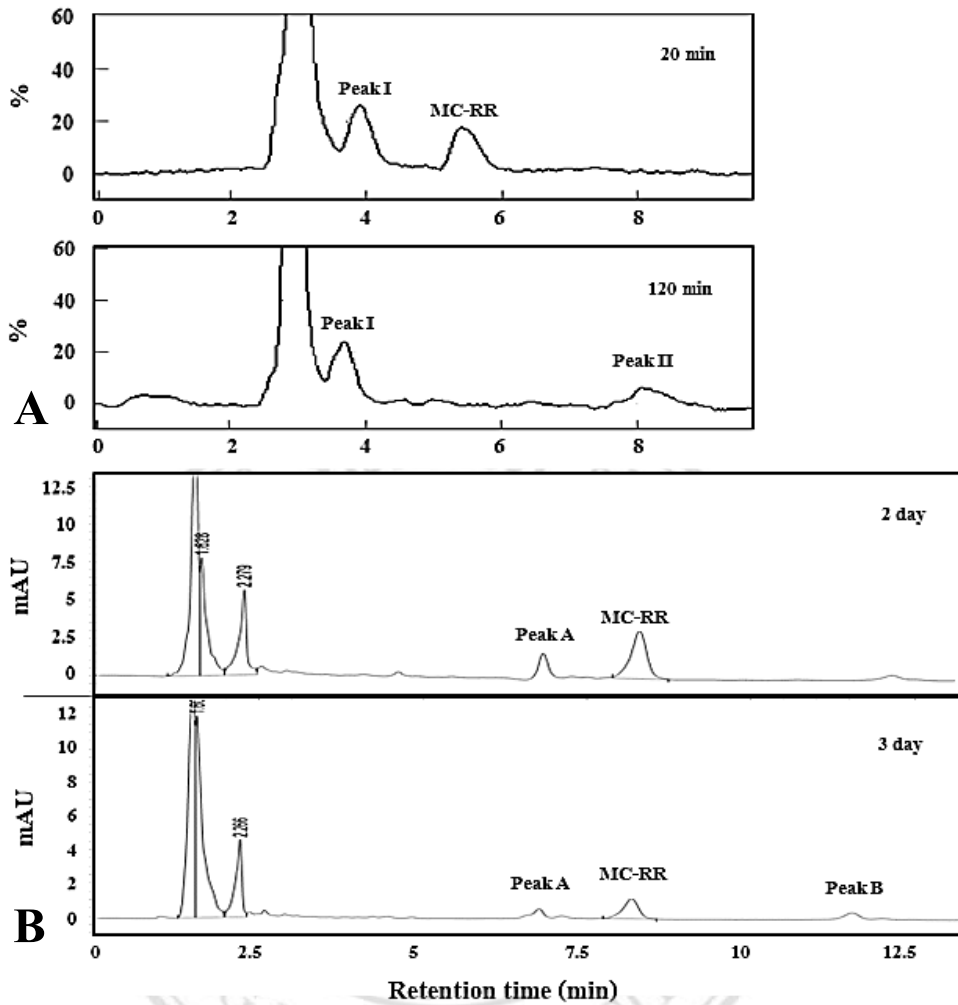
จากการศึกษาผลของ pH และอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus* sp. AK3 พบว่า *Bacillus* sp. AK3 เจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ pH เท่ากับ 8 และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปพบว่าแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มักเจริญได้ดีในช่วง pH 6-7 และอุณหภูมิ 28-40 องศาเซลเซียส (Roberts *et al.*, 1996; Younis *et al.*, 2010; Aqel *et al.*, 2012; Kuo, *et al.*, 2015) นอกจากนี้ Gaur and Tiwari (2015) พบว่า *Bacillus vallismortis* สามารถเจริญได้ในช่วง pH 4-11 และอุณหภูมิ 10-85 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองข้างต้น จะเห็นได้ว่า pH และอุณหภูมิ มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus* sp. AK3 ดังนั้น จึงน่าจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียด้วย อย่างไรก็ตามพบว่า pH และอุณหภูมิ ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการควบคุม *Cylindrospermopsis* sp. C013, *Dolichospermum* sp. C014 และ *Microcystis* sp. C028 เนื่องจาก พบว่าในทุก ๆ ชุดการทดลองที่มี pH ในช่วง 6-9 และอุณหภูมิในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส แบคทีเรีย *Bacillus* sp. AK3 สามารถควบคุมไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 สกุล ได้ 100 % ภายใน 36 ชั่วโมง อาจเนื่องมาจาก *Bacillus* sp. AK3 มีกลไกในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียทั้งทางตรงโดยใช้เซลล์ และทางอ้อมโดยการปล่อยสารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าไซยาโนแบคทีเรีย ดังนั้น อาจเป็นไปได้ที่สารมีฤทธิ์ดังกล่าว เป็นสารที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH ในช่วง 6-9 และอุณหภูมิในช่วง 25-35 องศาเซลเซียสได้ จึงทำให้ ประสิทธิภาพในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียของ *Bacillus* sp. AK3 ในสถานะที่มีการแปรผัน pH และอุณหภูมินั้น ไม่มีความแตกต่างกัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhao *et al.* (2014) ที่พบว่า *Bacillus* sp. B1 สามารถสร้าง และปลดปล่อยสาร L-histidine, O-tyrosine, N-acetylhistamine และ urocanic acid ที่มีความคงทนต่อ pH ในช่วง 1-11 และอุณหภูมิในช่วง 20-120 องศาเซลเซียสได้ และสารดังกล่าวยังสามารถควบคุม *Phaeocystis globosa* ได้ดี เช่นเดียวกับ Zhang *et al.* (2014) ที่พบว่า *Streptomyces alboflavus* สามารถสร้าง และปลดปล่อยสารที่มีความคงทนต่อ pH ในช่วง 3-11 และอุณหภูมิในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส และสารดังกล่าวยังสามารถควบคุม *Phaeocystis globosa* ได้ดีเช่นกัน ดังนั้น การที่ *Bacillus* sp. AK3 มีประสิทธิภาพในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียได้ดี แม้จะอยู่ในสถานะที่มี pH และอุณหภูมิที่แตกต่างกันนั้น จึงเป็นข้อดี และมีความเป็นไปได้ที่จะนำแบคทีเรีย *Bacillus* sp. AK3 ไปใช้ควบคุมการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีความแตกต่างกันของปัจจัยด้าน pH และอุณหภูมิได้ อย่างไรก็ตาม ในธรรมชาติมักมีปัจจัยอื่น ๆ เช่น ปริมาณสารอาหาร และปริมาณออกซิเจนในน้ำ ที่อาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียได้ ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของปัจจัยดังกล่าว

5.2 การย่อยสลายไมโครซิสตินด้วย *Bacillus* sp. AK3

มีงานวิจัยจำนวนมากที่ใช้แบคทีเรียในการควบคุมการเจริญอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรีย และย่อยสลายไมโครซิสติน (ตารางที่ 10 และ 11) อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยจำนวนน้อยที่ศึกษาแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยว (single species) ที่มีคุณสมบัติในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรีย พร้อมทั้งย่อยสลายไมโครซิสตินไปด้วยได้ อาจเนื่องมาจาก ขาดวิธีการคัดแยกแบคทีเรียที่เหมาะสม (Li *et al.* 2016) ดังนั้น จึงเป็นความท้าทายในการคัดแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติดังกล่าวจากธรรมชาติ งานวิจัยนี้ ได้ใช้ *Bacillus* sp. AK3 ที่คัดแยกจาก อ่างแก้ว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งพบว่ามีความสามารถในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียได้ดี ดังนั้น จึงได้นำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไมโครซิสติน

จากการทดสอบความสามารถของ *Bacillus* sp. AK3 ในการย่อยสลาย microcystin-RR พบว่า *Bacillus* sp. AK3 สามารถย่อยสลาย microcystin-RR ความเข้มข้น 15 µg/L ได้ 79.01±11.93 % ภายใน 3 วัน จากการตรวจสอบการย่อยสลาย microcystin-RR ด้วย HPLC (ภาพที่ 41B) พบว่า ในวันที่ 2 ของการทดลอง พื้นที่ใต้ peak ของ microcystin-RR มีการลดลง และพบว่ามี peak A เกิดขึ้นที่ retention time เท่ากับ 6.80 นาที และในวันที่ 3 ของการทดลอง พบการลดลงของพื้นที่ใต้ peak A และพบ peak B เกิดขึ้นที่ retention time เท่ากับ 11.75 นาที ซึ่งคาดว่าทั้ง peak A และ peak B ที่เกิดขึ้น เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโครงสร้างของ microcystin-RR คล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Zhang *et al.* (2010) ที่ได้ศึกษากลไกการย่อยสลาย microcystin-RR โดยใช้เอนไซม์ที่สกัดจากแบคทีเรีย *Sphingopyxis* sp. USTB-05 จากการตรวจสอบการย่อยสลาย microcystin-RR ด้วย HPLC (ภาพที่ 41A) พบว่า หลังจากเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับ microcystin-RR จนถึงนาทีที่ 20 พื้นที่ใต้ peak ของ microcystin-RR มีการลดลง และพบ peak I เกิดขึ้น และเมื่อเวลาผ่านไป 120 นาที พบว่า peak ของ microcystin-RR หายไป และพบ peak II เกิดขึ้น ซึ่งอธิบายโดยสรุปได้ว่า แบคทีเรีย *Sphingopyxis* sp. USTB-05 สามารถย่อยสลาย microcystin-RR โดยใช้เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยา hydrolysis และทำให้วงแหวนเปิดออกที่ตำแหน่ง Adda-Arg bond เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ของ microcystin-RR ที่เป็นเส้นตรง (peak I) มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 1055.9 ดาลตัน หลังจากนั้น จะเกิดปฏิกิริยา dehydration เกิดเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (peak II) ที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 1020.8 ดาลตัน ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไมโครซิสตินได้ จะใช้สารพิษเหล่านี้ เป็นแหล่งของ ไนโตรเจน และคาร์บอนในการเจริญ (Harada, 1996; Li *et al.*, 2016) จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ *Bacillus* sp. AK3 ในการย่อยสลายไมโครซิสตินกับรายงานวิจัยก่อนหน้า (ตารางที่ 11) พบว่า *Bacillus* sp. AK3 สามารถย่อยสลาย microcystin-RR ได้ดี



ภาพที่ 41 โครมาโทแกรม (chromatogram) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC แสดงการย่อยสลายของ microcystin-RR **A**) การย่อยสลาย microcystin-RR ด้วยเอนไซม์ที่สกัดจาก *Sphingopyxis* sp. USTB-05 (ที่มา : Zhang *et al.*, 2010) **B**) การย่อยสลาย microcystin-RR โดย *Bacillus* sp. AK3

ตารางที่ 11 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ *Bacillus* sp. AK3 ในการย่อยสลายไมโครซิสติน กับ รายงานวิจัยก่อนหน้า

แบคทีเรีย	ชนิดของ ไมโครซิสติน	ความเข้มข้น เริ่มต้น	% การ ย่อยสลาย	ระยะเวลา ที่ใช้	อ้างอิง
<i>Bacillus vallismortis</i> AK3	Microcystin-RR	15.0 (µg/L)	79%	3 วัน	งานวิจัยนี้
<i>Sphingomonas</i> sp.	Microcystin-RR	200 (µg/L)	100%	36 ชั่วโมง	Valeria <i>et al.</i> (2006)
<i>Bacillus flexus</i>	Microcystin-RR	10.0 (µg/mL)	100%	4 วัน	Alamri (2012)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Microcystins	38.4 (µg/L)	91%	30 วัน	Kang <i>et al.</i> (2012a)
<i>Bacillus nanhaiensis</i>	Microcystin-LR	15.0 (mg/L)	80%	9 วัน	Zhang <i>et al.</i> (2015)
<i>Bacillus</i> sp.	Microcystin-LR	9.2 (µg/L)	72%	12 วัน	Kansole and Lin (2016)
<i>Acinetobacter</i> sp.	Microcystin-LR	6.0 (µg/L)	100%	5 วัน	Li <i>et al.</i> (2016)
<i>Rhizobium</i> sp.	Microcystin-LR	8.3 (mg/L)	100%	10 ชั่วโมง	Zhu <i>et al.</i> (2016)

5.3 การจัดจำแนกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. AK3

จากการจัดจำแนก *Bacillus* sp. AK3 ด้วยวิธี 16s rRNA sequence พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *Bacillus vallismortis* ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่พบว่าแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มีความสามารถในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียได้ดี เช่น Ahn *et al.* (2003), Shunyu *et al.* (2006), Yu *et al.* (2014) และ Li *et al.* (2015) และสามารถย่อยสลายไมโครซิสตินได้ดี เช่น Alamri (2012), Zhang *et al.* (2015) และ Kansole and Lin (2016) งานวิจัยนี้เป็นการรายงานครั้งแรก ที่พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus vallismortis* มีความสามารถในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรีย และย่อยสลายไมโครซิสตินได้ รายงานการวิจัยก่อนหน้า พบว่า *B. vallismortis* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ และย่อยสลายสารพิษได้ เช่น Zhao *et al.* (2010) พบว่า *B. vallismortis* ZZ185 สามารถสร้างสาร Bacillomycin D (n-C14) และ Bacillomycin D (iso-C15) ที่มีฤทธิ์ในการควบคุมเชื้อราก่อโรคพืช *Fusarium graminearum*, *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Cryphonectria parasitica* และ *Phytophthora capsici* ได้นอกจากนี้ สารดังกล่าวยังมีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH ในช่วง 1-8 และอุณหภูมิในช่วง 25-80 องศาเซลเซียสอีกด้วย และ Ling *et al.* (2011) พบว่า *B. vallismortis* JY3A สามารถย่อยสลายสารพิษไพรีน (pyrene) ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 150 ppm ได้ 90.5% ภายใน 15 วัน

5.4 การตรึงแบคทีเรียลงบนวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำ

การนำแบคทีเรียไปใช้ในแหล่งน้ำธรรมชาติมักพบปัญหาบางประการ เช่น แบคทีเรียอาจได้รับผลกระทบในทางลบจากปัจจัยต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อม แบคทีเรียปรับตัวได้ไม่ดี เกิดการเจือจางของเซลล์ ส่งผลให้ประสิทธิภาพของแบคทีเรียลดลง (Li and Pan, 2015 ; Sun *et al.*, 2015) นอกจากนี้พบว่า งานวิจัยส่วนใหญ่ ทำการทดลองโดยใช้แบคทีเรียเซลล์อิสระในการควบคุมสาหร่ายในแบคทีเรียชนิดเดี่ยว (single species) ในห้องทดลอง เมื่อนำไปใช้ในสิ่งแวดล้อมจริงที่มีความซับซ้อนของระบบนิเวศน์จึงยังมีข้อจำกัดอยู่ (Kang *et al.*, 2007)

การตรึงเซลล์แบคทีเรียเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยจัดปัญหาเหล่านี้ได้ โดยสามารถปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ลดปัญหาการเจือจางของเซลล์ ทำให้มีความหนาแน่นของเซลล์สูง และเพิ่มประสิทธิภาพของแบคทีเรียได้ (Kang *et al.*, 2012b; Bayat *et al.*, 2015) โดยวิธีการตรึงเซลล์แบบดูดซับ (adsorption) เป็นวิธีการที่นิยมใช้ในงานด้านสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะกระบวนการบำบัดน้ำเสีย และสารพิษ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ไม่ต้องใช้สารเคมี ราคาถูก และเซลล์แบคทีเรียสามารถสัมผัสกับสารอาหารภายนอกได้โดยตรง (Karimimiae-Hamedani *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2013; Bayat *et al.*, 2015) อย่างไรก็ตาม จากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า วัสดุส่วนใหญ่ที่ใช้ในการตรึงแบคทีเรีย เป็นวัสดุที่ไม่สามารถลอยน้ำได้ และในหลาย ๆ งานวิจัยได้ใช้วัสดุอินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ซึ่งเมื่อนำไปใช้ในแหล่งน้ำ อาจเพิ่มปริมาณสารอาหารให้กับแหล่งน้ำได้ นอกจากนี้ยังไม่คงทน และไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ โดยคุณสมบัติของวัสดุตรึงที่ดีหากจะนำไปใช้ในสิ่งแวดล้อม วัสดุควรจะไม่เป็นพิษ ไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ไม่เกิดการสลายตัวทางชีวภาพ มีความคงตัวสูง สามารถตรึงเซลล์ได้มาก มีอายุการใช้งานยาวนาน ราคาถูก ใช้งานง่าย และนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Bayat *et al.*, 2015)

งานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้วัสดุแก้วพูน โดยดัดแปลงจากงานวิจัยของ Shongkittikul *et al.* (2011) เพื่อนำมาตรึงเซลล์แบคทีเรียสำหรับนำไปใช้ควบคุมการเจริญของสาหร่ายในแบคทีเรีย และย่อยสลายไมโครซิสติน โดยวัสดุดังกล่าวมีความพรุนสูง มีพื้นที่ผิวมาก สามารถลอยน้ำได้ เป็นวัสดุที่คงทน ไม่มีการยุบตัวในน้ำ สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และเตรียมได้ง่าย (วิทยา, 2555) จากการตรึงเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีการ absorption โดยอาศัยแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุล และ exopolysaccharides (EPS) ที่สร้างจากแบคทีเรียซึ่งช่วยในการดูดซับเซลล์แบคทีเรียให้ติดกับวัสดุตรึงได้ พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* sp. AK3 สามารถสร้าง EPS ได้ปริมาณมากที่สุดในชั่วโมงที่ 48 จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth ดังนั้น หลังจากเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้ว จึงนำแบคทีเรียมาตรึงเซลล์ลงบนวัสดุแก้วพูน พบว่า การยึดเกาะของแบคทีเรียบนวัสดุ มีความคงที่เมื่อระยะเวลาในการตรึงผ่านไป 24 ชั่วโมง โดยมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ยึดติดอยู่กับวัสดุเท่ากับ 11×10^8

CFU/g ของวัสดุ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ (ตารางที่ 12) พบว่า วัสดุแก้วพูนสามารถตรึงเซลล์แบคทีเรียได้ดี

ตารางที่ 12 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรึงเซลล์แบคทีเรียของวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำ กับ วัสดุตรึงเซลล์แบคทีเรียชนิดอื่น ๆ จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้

วัสดุที่ใช้	จำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงบนวัสดุ	อ้างอิง
Floating porous glass	11×10^8 CFU/g	งานวิจัยนี้
Ceramic	2.90×10^9 CFU/g	Kariminiaae-Hamedani <i>et al.</i> (2003)
Biodegradable plastic	1.50×10^5 cells/mL	Nakamura <i>et al.</i> (2003)
Polyurethane	2.98×10^9 cells/cm ³	Kang <i>et al.</i> (2007)
Cellulose sponge	4.08×10^9 cells/cm ³	
Bentonite	58.23×10^8 CFU/g	Hrenovic <i>et al.</i> (2009)
Zeolite from Turkey	74.91×10^8 CFU/g	
Zeolite from Serbia	6.14×10^8 CFU/g	
Activated carbon polyvinyl alcohol sponge	2.05×10^6 cells/cm ³	Jung <i>et al.</i> (2013)
Coir, Bulrush, Banana stem, Water hyacinth stem	$1.46-6.90 \times 10^8$ CFU/g	Laocharoen <i>et al.</i> (2013)

5.5 การควบคุมไซยาโนแบคทีเรียด้วยแบคทีเรียเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึงบนวัสดุแก้วพูน

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุม *Microcystis* sp. C028 ระหว่างแบคทีเรียเซลล์อิสระ (free cells) และเซลล์ที่ถูกตรึงบนวัสดุแก้วพูน (immobilized bacteria) โดยกำหนดให้มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากันที่ 11×10^8 CFU / (g หรือ mL) พบว่า แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูนสามารถควบคุม *Microcystis* sp. C028 ได้ 100% ภายใน 3 วัน ขณะที่แบคทีเรียเซลล์อิสระควบคุมได้เพียง 11% ในวันที่ 4 ของการทดลอง แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูน มีประสิทธิภาพในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียได้ดีกว่าเซลล์อิสระ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kang *et al.* (2007) ที่ได้ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* แบบเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงบนวัสดุ cellulose sponge ในการควบคุมไดอะตอม *Stephanodiscus hantzschii* ในแม่น้ำ Nakdong ประเทศเกาหลีใต้ พบว่าแบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุ สามารถควบคุมไดอะตอมได้ดีกว่าเซลล์อิสระ และงานวิจัยของ Su *et al.* (2017) พบว่าแบคทีเรียที่ตรึงใน Sodium alginate + Fe₃O₄ สามารถควบคุม *M. aeruginosa* ได้ดีกว่าแบคทีเรียแบบเซลล์อิสระเช่นกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก แบคทีเรียเซลล์อิสระ เมื่อถูกเติมลงในแหล่งน้ำแล้ว เซลล์ของแบคทีเรียสามารถกระจายไปยังชั้นน้ำได้อย่าง

อิสระ ซึ่งอาจก่อให้เกิดการเจือจางของเซลล์แบคทีเรีย และส่งผลต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรียได้ (Li and Pan, 2015) ในส่วนของชุดควบคุมที่มีเพียงไซยาโนแบคทีเรียกับวัสดุแก้วพูน พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียมีการเจริญเป็นปกติ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีเพียงไซยาโนแบคทีเรียเจริญอยู่ในอาหาร BG-11 แสดงให้เห็นว่า วัสดุแก้วพูนไม่ส่งผลต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของแบคทีเรียแบบเซลล์อิสระต่อประสิทธิภาพในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรีย โดยกำหนดให้มีแบคทีเรียเซลล์อิสระในช่วงความเข้มข้นที่มีค่า OD_{600} เท่ากับ 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 พบว่า ความเข้มข้นของแบคทีเรียเซลล์อิสระที่มีค่า $OD_{600} = 2.0$ หรือประมาณ 19.68×10^8 CFU/mL ขึ้นไป สามารถควบคุม *Microcystis* sp. C028 ได้ดี ในขณะที่ แบคทีเรียเซลล์อิสระที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าค่าดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพในการควบคุม *Microcystis* sp. C028 ได้ต่ำกว่า และเมื่อเปรียบเทียบแบคทีเรียเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูนในการควบคุม *Microcystis* sp. C028 พบว่า ภายในวันที่ 2 ของการทดลอง แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูนสามารถควบคุม *Microcystis* sp. C028 ได้ 95% โดยใช้ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 11×10^8 CFU/g ขณะที่แบคทีเรียแบบเซลล์อิสระจะต้องใช้ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นถึง 19.68×10^8 CFU/mL จึงจะสามารถควบคุม *Microcystis* sp. C028 ได้ 95% แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียจะมีประสิทธิภาพในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียได้ดี เมื่อความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียอยู่ในช่วงที่เหมาะสม ซึ่งการตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุแก้วพูน สามารถรักษาความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียให้อยู่ในช่วงที่สามารถควบคุมไซยาโนแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5.6 การใช้แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำ ในการควบคุม *Microcystis* spp. และย่อยสลายไมโครซิสตินจากธรรมชาติ ในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร

โดยทั่วไปในแหล่งน้ำธรรมชาติ การเจริญอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียสกุลที่สร้างสารพิษ เช่น *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum* และ *Microcystis* เซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียเหล่านี้ จะลอยอยู่บริเวณผิวน้ำ เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียดังกล่าวสามารถสร้าง gas vesicle ซึ่งช่วยในการลอยตัวของเซลล์ได้ (Porat *et al.*, 2001) ซึ่งจะทำให้บริเวณผิวน้ำมีสารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียในปริมาณสูง ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตได้ (WHO, 2003) งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีการนำแบคทีเรีย *Bacillus* sp. AK3 ไปใช้ควบคุมไซยาโนแบคทีเรีย และย่อยสลายสารพิษในแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยการตรึงแบคทีเรียบนวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำ และนำไปทดสอบประสิทธิภาพดังกล่าวโดยใช้ตัวอย่าง *Microcystis* spp. ที่เจริญอย่างรวดเร็วจากอ่างแก้ว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งแบคทีเรียที่ตรึงอยู่บนวัสดุลอยน้ำ จะสัมผัสกับเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญอยู่บริเวณผิวน้ำ และเกิดปฏิกิริยาในการย่อยสลายเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียทั้งทางตรง และทางอ้อมได้อย่างสะดวก

นอกจากนี้ ยังทำให้เซลล์ได้สัมผัส และย่อยสลายสารพิษที่ถูกปล่อยออกมาหลังจากที่เซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียแตกสลายได้สะดวกยิ่งขึ้น

6.1 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำ ในการควบคุม *Microcystis* spp. และย่อยสลายไมโครซิสติน

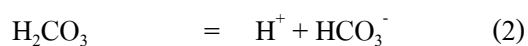
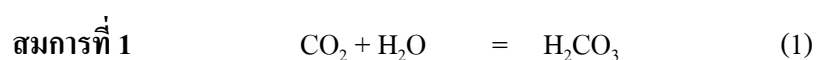
จากการใช้แบคทีเรีย *Bacillus* sp. AK3 ที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูน ในการควบคุม *Microcystis* spp. จากธรรมชาติ พบว่า แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูน สามารถควบคุม *Microcystis* spp. ได้ 82% ภายใน 8 วัน และปริมาณ chlorophyll-*a* ของ *Microcystis* spp. ลดลงกว่า 80 % ภายใน 8 วัน จะเห็นได้ว่า ในช่วงวันที่ 2-4 ของการทดลอง *Microcystis* spp. มีจำนวนเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็ว ในขณะเดียวกัน ความเข้มข้นของ microcystin-RR ที่ละลายในน้ำก็เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 0.59 µg/L ในวันที่ 3 ของการทดลอง แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูนมีกิจกรรมในการย่อยสลายเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียสูงในช่วงวันที่ 2-4 ของการทดลอง และปลดปล่อย microcystin-RR ที่สะสมอยู่ในเซลล์ออกมาละลายในน้ำเป็นปริมาณมากในช่วงดังกล่าวเช่นกัน อย่างไรก็ตาม หลังจากวันที่ 3 เป็นต้นไป microcystin-RR ที่ละลายในน้ำมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่ชุดควบคุมพบว่า ปริมาณ microcystin-RR ที่ละลายในน้ำเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการทดลอง และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณ microcystin-RR รวมทั้งหมดระหว่างชุดทดลอง กับชุดควบคุม พบว่า ในชุดทดลองที่ใช้ *Bacillus* sp. AK3 ที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูน สามารถลดปริมาณ microcystin-RR รวมทั้งหมดได้ถึง 72% ภายใน 8 วัน แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูน สามารถย่อยสลายเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย และ microcystin-RR ได้ งานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่ใช้แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุลอยน้ำในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรีย และย่อยสลาย microcystin-RR ได้อย่างมีประสิทธิภาพ คล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Mohamed *et al.* (2014) ที่ใช้เชื้อรา *Trichoderma citrinoviride* เพื่อควบคุม *Microcystis aeruginosa* และย่อยสลาย microcystin พบว่า *Trichoderma citrinoviride* สามารถย่อยสลายเซลล์ของ *Microcystis aeruginosa* ได้ 100% ภายในวันที่ 2 ของการทดลอง ในขณะเดียวกัน ปริมาณ microcystin ที่ถูกปลดปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียแตกสลาย มีความเข้มข้นสูงที่สุดถึง 2.7 µg/mL ในวันที่ 2 ของการทดลอง หลังจากนั้น เชื้อราดังกล่าวสามารถย่อยสลาย microcystin ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ 100% ภายในวันที่ 5 ของการทดลอง

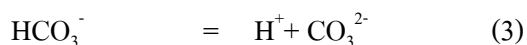
6.2 การเปลี่ยนแปลงของปัจจัยทางชีวภาพ เคมี และกายภาพบางประการ

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนของแบคทีเรียในน้ำ และบนวัสดุแก้วพูน ในระยะเวลา 8 วัน พบว่า ในชุดควบคุมมีจำนวนแบคทีเรียในน้ำลดลง จาก 0.08×10^7 CFU/mL ในวันที่ 0 ของการทดลอง เป็น 0.04×10^7 CFU/mL ในวันที่ 8 ของการทดลอง ขณะที่ ชุดทดลองที่มีการใช้

แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูน พบว่า จำนวนแบคทีเรียภายในน้ำเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก $0.07 \times 10^7 \pm 0.01$ CFU/mL ในวันที่ 0 ของการทดลอง เป็น $4.73 \times 10^7 \pm 0.92$ CFU/mL ในวันที่ 2 ของการทดลอง ในทางกลับกัน แบคทีเรียบนวัสดุแก้วพูนมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วจาก $97.00 \pm 9.17 \times 10^7$ CFU/g ในวันที่ 0 ของการทดลอง เป็น $38.33 \pm 4.16 \times 10^7$ CFU/g ในวันที่ 2 ของการทดลอง แสดงให้เห็นว่า จำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นในน้ำนั้น มาจากเซลล์แบคทีเรียที่ถูกตรึงบนวัสดุ เนื่องมาจากการตรึงแบคทีเรียแบบดูดซับ (adsorption) ในงานวิจัยนี้ อาศัยแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลอย่างอ่อน ๆ และ exopolysaccharides ที่สร้างจากแบคทีเรียในการช่วยดูดซับเซลล์แบคทีเรียให้ติดกับวัสดุตรึง ดังนั้น เซลล์แบคทีเรียที่ถูกตรึงด้วยวิธีนี้จึงมีโอกาสหลุดออกได้ง่าย (Bayat *et al.*, 2015) อย่างไรก็ตาม จำนวนของแบคทีเรียที่ถูกตรึงบนวัสดุแก้วพูนเริ่มมีแนวโน้มคงที่ ภายในวันที่ 4 ของการทดลอง จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยในช่วงคงที่นี้มีจำนวนแบคทีเรียเฉลี่ยเท่ากับ $19.50 \times 10^7 \pm 1.13$ CFU/g แสดงให้เห็นว่า วัสดุแก้วพูนสามารถรักษาความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียที่ถูกตรึงบนวัสดุไว้ได้จำนวนหนึ่ง ซึ่งเพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยาในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรีย และย่อยสลายไมโครซิสตินได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jung *et al.* (2013) ที่ตรึง *Pseudomonas fluorescens* บน activated carbon polyvinyl alcohol sponge เพื่อนำไปควบคุมการเจริญอย่างรวดเร็วของไดอะตอม *Stephanodiscus hantzschii* ในแหล่งน้ำธรรมชาติ พบว่า แบคทีเรียที่ตรึงอยู่กับวัสดุ มีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วภายในวันที่ 2 ของการทดลอง หลังจากนั้นจึงมีการเพิ่มจำนวนขึ้นจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง และพบว่าสามารถควบคุมไดอะตอมดังกล่าวได้ 72% ภายในระยะเวลา 6 วัน

จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยทางเคมี และกายภาพบางประการภายในคอลัมน์แก้ว ตลอดระยะเวลา 8 วันของการทดลอง พบว่า ค่า pH โดยเฉลี่ยของน้ำในชุดควบคุม มีค่า 9.22 ± 0.36 และชุดทดลองมีค่า 8.55 ± 0.23 ในส่วนของค่า dissolved oxygen โดยเฉลี่ยของน้ำในชุดควบคุม มีค่า 5.77 ± 0.63 ppm และชุดทดลองมีค่า 1.52 ± 1.54 ppm จะเห็นได้ว่า ในชุดทดลองที่มีการใช้แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูนมีค่า pH และค่า dissolved oxygen ของน้ำโดยเฉลี่ยลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียที่อยู่บนวัสดุแก้วพูน และภายในน้ำ จะใช้ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำ ในกระบวนการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวน จึงทำให้ค่า dissolved oxygen ของน้ำลดลง นอกจากนี้ ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ที่เกิดจากการหายใจของแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้น (Cai *et al.*, 2011) และเมื่อคาร์บอนไดออกไซด์ละลายในน้ำ จะรวมตัวเกิดเป็นกรดคาร์บอนิก (carbonic acid ; H_2CO_3) และสามารถแตกตัวไปเป็น ไบคาร์บอเนต (bicarbonate ; HCO_3^-) และไอออนของคาร์บอเนต (carbonate ions ; CO_3^{2-}) ได้ ดังสมการที่ 1 (Yan *et al.*, 2008)





จากสมการจะเห็นได้ว่า เมื่อ CO_2 ละลายในน้ำ และเกิดการแตกตัวเป็นไบคาร์บอเนต และไฮดรอกไซด์ของคาร์บอเนต จะปลดปล่อยไฮโดรเจนไอออน (H^+) ออกมา ทำให้น้ำมีความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนมาก จึงส่งผลให้ค่า pH ของน้ำลดลงนั่นเอง ในทางกลับกัน ชุดควบคุมที่มีไซยาโนแบคทีเรียเจริญอยู่จำนวนมาก ส่งผลให้มีอัตราการสังเคราะห์แสงสูงขึ้น ดังนั้น ปริมาณออกซิเจนที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์แสงจึงเพิ่มขึ้น ส่งผลให้น้ำมีค่า dissolved oxygen เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ไซยาโนแบคทีเรียจะใช้ CO_2 ในกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยไซยาโนแบคทีเรียจะนำ CO_2 และ HCO_3^- เข้าเซลล์ได้โดยผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ และเก็บสะสมอยู่ในเซลล์ในรูปของ HCO_3^- เป็นหลัก จากนั้น HCO_3^- จะถูกเปลี่ยนกลับมาเป็น CO_2 และถูกตรึงโดย RuBisCO ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งในกระบวนการเปลี่ยน HCO_3^- กลับมาเป็น CO_2 นั้น แสดงดังสมการที่ 2 (Chi *et al.*, 2011)



จากสมการจะเห็นได้ว่า ไฮโดรเจนไอออน (H^+) จะถูกใช้ในกระบวนการเปลี่ยน HCO_3^- ไปเป็น CO_2 ดังนั้น เซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียจึงต้องมีการดูดซึม H^+ จากสิ่งแวดล้อม ทำให้อัตราความเข้มข้นลดลง ส่งผลให้ pH ในน้ำเพิ่มขึ้นนั่นเอง

สำหรับค่า conductivity โดยเฉลี่ยของน้ำ ในชุดควบคุมมีค่า $101.67 \pm 2.80 \mu\text{S}/\text{cm}$ และชุดทดลองมีค่า $859.48 \pm 299.30 \mu\text{S}/\text{cm}$ และค่า total dissolved solids โดยเฉลี่ยของน้ำ ในชุดควบคุมมีค่า $50.33 \pm 1.63 \text{ ppm}$ และชุดทดลองมีค่า $429.00 \pm 149.77 \text{ ppm}$ จะเห็นได้ว่า ในชุดทดลองที่มีการใช้แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูนค่า conductivity และ total dissolved solid ของน้ำมีการเพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจาก องค์ประกอบหลักของวัสดุแก้วพูน ประกอบไปด้วยออกไซด์ของโลหะที่มีประจุบวกสูง เช่น SiO_2 , Na_2O , K_2O และ CaO (ภาคผนวก จ) ซึ่ง Na_2O , K_2O และ CaO สามารถละลายน้ำได้ (วิทยา, 2555) จึงอาจทำให้ค่า conductivity และ total dissolved solid ของน้ำเพิ่มขึ้นได้ ซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงปริมาณการละลายของธาตุดังกล่าว และผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นเมื่อนำไปใช้ในแหล่งน้ำธรรมชาติ อย่างไรก็ตาม ค่า conductivity และ total dissolved solid ของน้ำโดยเฉลี่ยในชุดทดลองที่มีการใช้แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูน มีค่าอยู่ในระดับปกติของแหล่งน้ำจืดทั่วไป ซึ่งไม่มีผลอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต (Sorensen *et al.*, 1977; Weber-Scannell and Duffy, 2007; WHO, 2008) ส่วนค่าความเข้มแสง และอุณหภูมิของน้ำโดยเฉลี่ยของชุดควบคุม และชุดทดลอง มีความแตกต่างอย่างไม่นัยสำคัญ