บทที่ 4

ผลการทดลอง

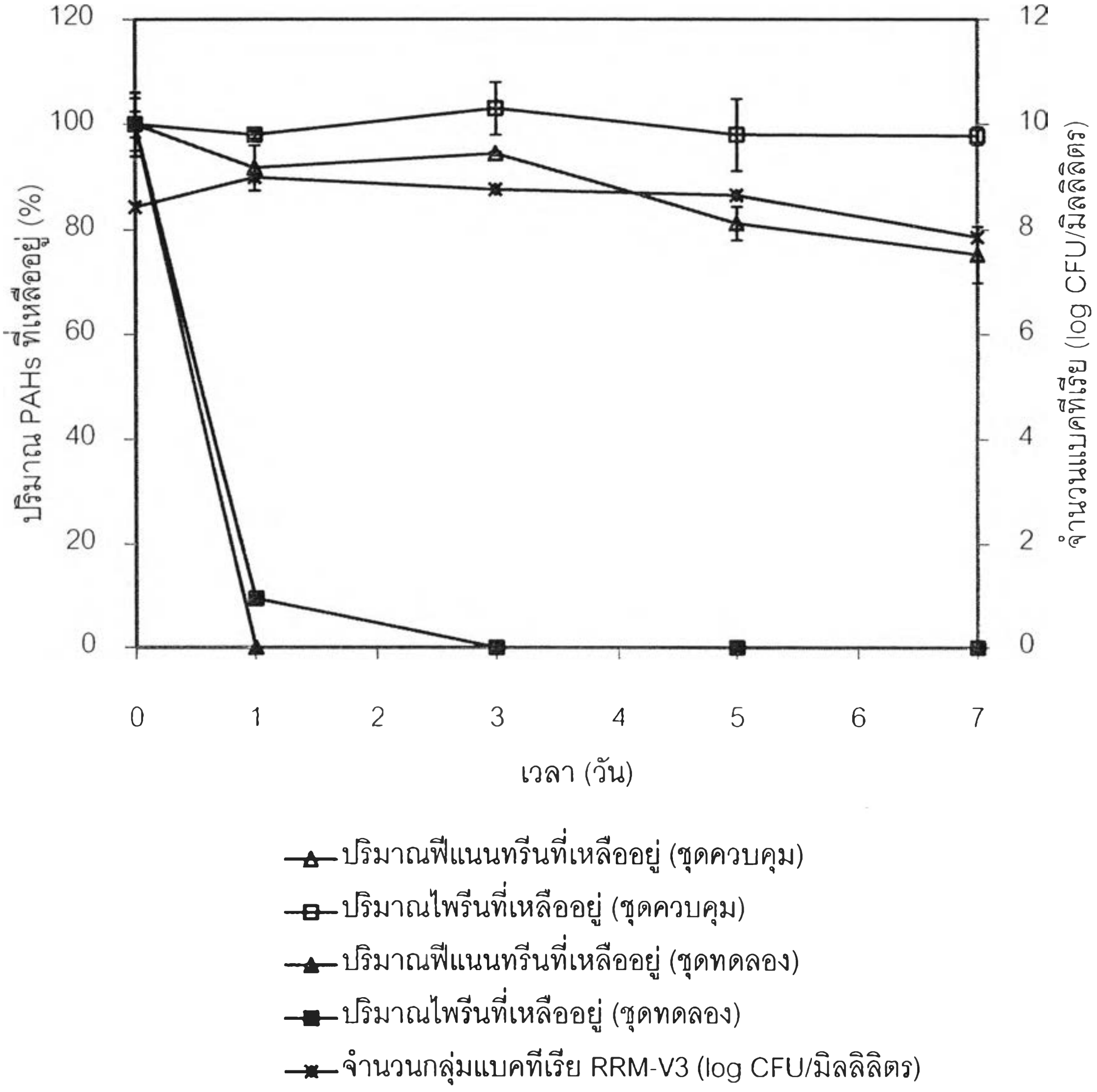
4.1 ความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเหลว CFMM

งานวิจัยของจิรฑีปฑ์ แสนรัก (2547) ศึกษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่คัดแยกมาจากใบจามจุรี รายงานว่ามีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไพรีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ได้หมดภายในระยะเวลา 14 วัน และยังสามารถย่อยสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆได้ ได้แก่ อะซีแนพธีน ฟลูออรีน ฟีแนนทรีนและฟลูออแรนทีน เนื่องมาจากการเก็บกลุ่มแบคทีเรียนี้เป็นเวลานานร่วมกับการเลี้ยงเชื้อโดยการถ่ายลงในอาหารเหลวหลายๆ ครั้ง จึงอาจจะมีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลาย (Parekh และคณะ, 1995) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องการทดสอบความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนโดยเติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จำนวน 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชุดควบคุมคือ อาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีนและฟีแนนทรีนแต่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 นับจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในชุดทดลองและชุดควบคุมโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับวันที่ 0

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนและไพรีนพบว่า กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนและไพรีนได้จนไม่สามารถตรวจสอบได้ภายในเวลา 1 วันและ 3 วันของการทดลองตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมจะเหลือ ไพรีน 97.80 เปอร์เซ็นต์ และฟีแนนทรีน 75.26 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 4.1 การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 พบว่า วันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 8.43 log CFU ต่อมิลลิลิตร และเพิ่มจำนวนมากที่สุดในวันที่ 1 คือมีค่าเท่ากับ 8.99 log CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นจะค่อยๆลดจำนวนลงตามลำดับ พบว่าในวันที่ 7 ของการเก็บตัวอย่างกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จะมีจำนวนลดลงไปประมาณ 1 log CFU ต่อมิลลิลิตรเมื่อเทียบกับวันที่เจริญสูงสุด จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีจำนวนเท่ากับ 7.86 log CFU ต่อมิลลิลิตร

จะเห็นได้ว่าผลของการเจริญและการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 นั้นมีมีความสอดคล้องกันนั่นคือ กลุ่มแบคทีเรียRRM-V3 มีการเจริญสูงสุดในวันที่ 1 มีค่า 8.99 log CFU ต่อมิลลิลิตร และลดลงอย่างต่อเนื่อง และพบว่าปริมาณฟีแนนทรีนและไพรีน

ลดลงอย่างรวดเร็วโดยถูกย่อยสลายจนไม่สามารถตรวจวัดได้ตั้งแต่วันที่ 1 และวันที่ 3 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้



รูปที่ 4.1 **การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเหลว** CFMM **โดยกลุ่มแบคทีเรีย** RRM-V3

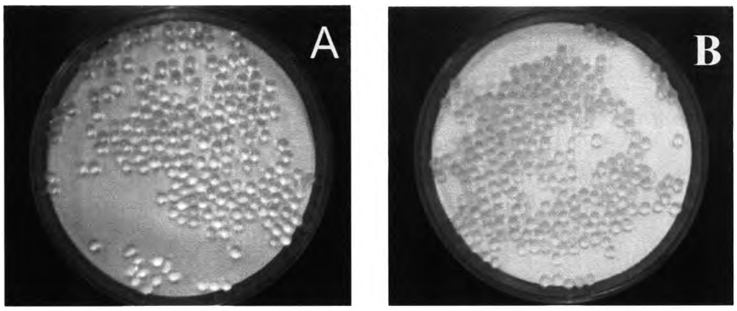
ดังนั้นการทดลองขั้นนี้แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถย่อยฟีแนนทรีนและไพรีนเพื่อใช้ในการเจริญได้ โดยยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้

เป็นอย่างดี จนหมดในระยะเวลา 1 และ 3 วัน ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงนำกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มาใช้ในการตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนตต่อไป

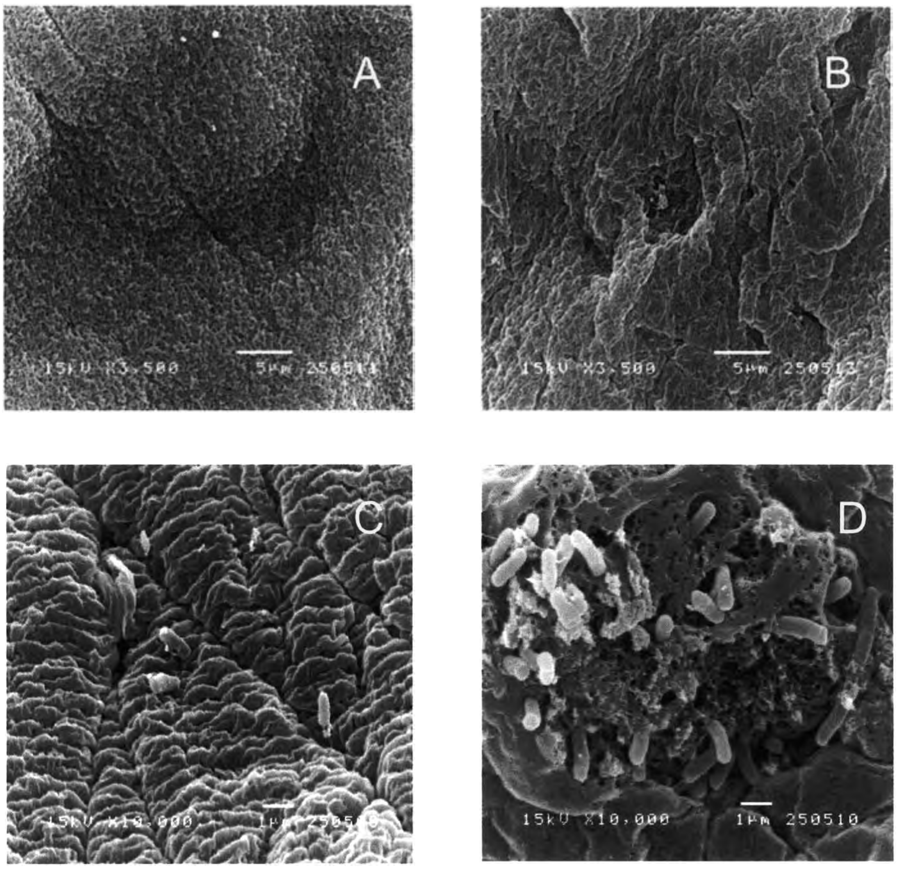
4.2 การตรึงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ด้วยอัลจิเนต

วิธีการตรึงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ด้วยอัลจิเนตที่ใช้ในงานวิจัยนี้เบื้องต้นใช้ภาวะการตรึงเซลล์โดยดัดแปลงจากวิธีของ Li และคณะ (2008) โดยใช้สารละลายโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 4 % น้ำหนักต่อปริมาตรและความเข้มข้นสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 0.1 โมลาร์ หนึ่งหยดเม็ดอัลจิเนตมีปริมาตรประมาณ 35 ไมโครลิตร ประกอบด้วยการตรึงแบบที่ผสมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 8.48 log CFU ต่อมิลลิลิตร และไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 หลังจากขึ้นรูปเจลเสร็จสมบูรณ์แล้วจะได้เม็ดอัลจิเนตมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4 มิลลิเมตร สังเกตด้วยตาเปล่าพบว่าลักษณะเม็ดอัลจิเนตที่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีลักษณะกลม มันวาว ผิวเรียบเสมอกันทั้งเม็ด ไม่มีสี ดังแสดงในรูปที่ 4.2A เมื่อนำไปศึกษาลักษณะทางกายภาพโดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope ดำเนินการโดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างภายนอกและภายในของเม็ดอัลจิเนตมีรูพรุนขนาดเล็กจำนวนมาก (รูปที่ 4.3A และ 4.3B) ในขณะที่ลักษณะเม็ดอัลจิเนตที่มีกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตรึง จะมีสีเหลืองอ่อน รูปร่างกลม ผิวเรียบเสมอกันทั้งเม็ด ดังแสดงในรูปที่ 4.2b จากการตรวจหาแบคทีเรียพบว่ามีจำนวน 8.38 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต เมื่อนำไปศึกษาลักษณะทางกายภาพพบว่ามีกลุ่มแบคทีเรียอยู่ภายในโครงสร้างอัลจิเนตจำนวนมากกว่าผิวภายนอกอัลจิเนต จึงเป็นการยืนยันว่าวิธีการตรึงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอัลจิเนตสามารถใช้ตรึงได้จริง โดยจะเห็นได้ว่าอัลจิเนตจะมีช่องว่างหรือโพรงที่มีขนาดใหญ่กว่าขนาดของแบคทีเรีย จึงทำให้กลุ่มแบคทีเรียสามารถถูกตรึงอยู่ภายในโครงสร้างของอัลจิเนตได้ ดังรูปที่ 4.3C และ 4.3D

นอกจากนี้ได้ศึกษาการคงอยู่ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในเม็ดอัลจิเนตทดลองในอาหารเหลว CFMM เป็นเวลา 14 วัน นับจำนวนเซลล์ทั้งหมดภายในเม็ดอัลจิเนต ผลการทดลองพบว่าจำนวนเซลล์เริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 8.28 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต และคงที่ประมาณ 8.42-8.91 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต ตลอดระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.2 ลักษณะของเม็ดอัลจิเนตที่ไม่มีกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 (A) และเม็ดอัลจิเนตที่มีกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 (B)


A
15kV X3,500
5µm 250511
B
15kV X3,500
5µm 250513
C
15kV X10,000
1µm
D
15kV X10,000
1µm 250510

รูปที่ 4.3 ลักษณะภายนอกของอัลจิเนต (A) และโครงสร้างภายในอัลจิเนต (B) ไม่มีแบคทีเรียตรึง (กำลังขยาย 3,500 เท่า) และโครงสร้างภายนอกของอัลจิเนต (C) และโครงสร้างภายในของอัลจิเนต (D) มีแบคทีเรียตรึง (กำลังขยาย 10,000 เท่า)

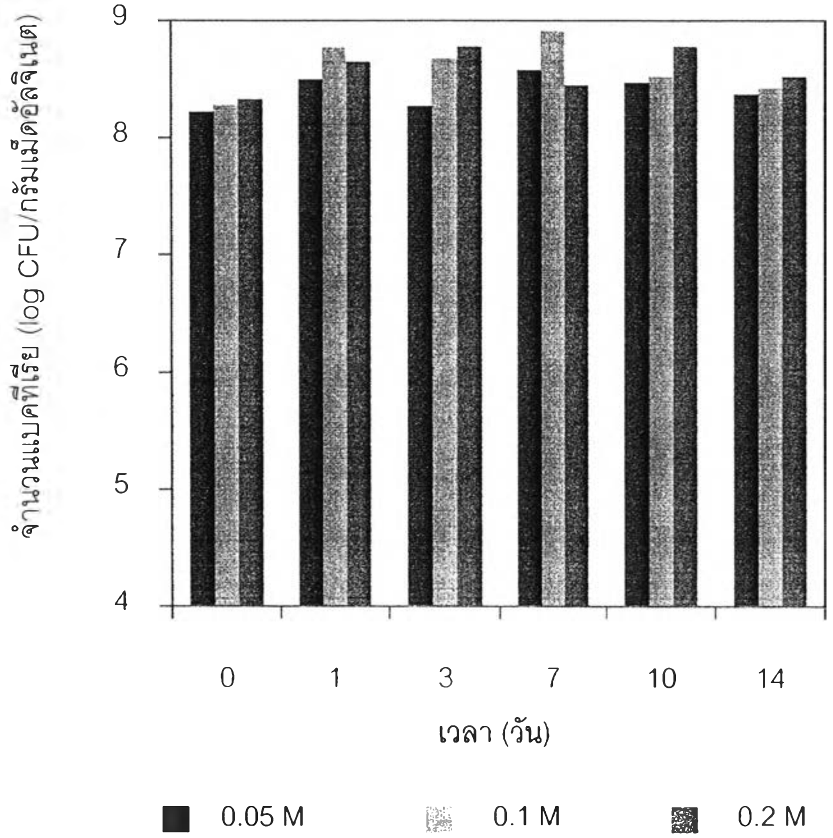
มีรายงานการวิจัยได้เสนอว่าเซลล์ตรึงแอลเนตที่ก่อรูปขึ้นจะมีสมบัติแตกต่างกันไปเช่น ขนาด รูปร่าง ประสิทธิภาพการจำลองเจล ซึ่งขึ้นกับปัจจัยความเข้มข้นของพอลิเมอร์ ความเข้มข้นแคลเซียมไอออนและปริมาณเซลล์ที่ใช้ (Blandino และคณะ 1999 , Zhang และ He, 2009) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงแปรผันปัจจัยของความเข้มข้นสารละลายโซเดียมอัลจิเนต และความเข้มข้นสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ และปริมาณเซลล์ตั้งต้นที่ใช้ตรึง ทั้งนี้จะพิจารณาในด้านการคงอยู่ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในเม็ดอัลจิเนต และประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและฟีแนน-ทรีนเป็นหลัก

4.3 การแปรผันปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นรูปเจล

4.3.1 ความเข้มข้นสารละลายแคลเซียมคลอไรด์

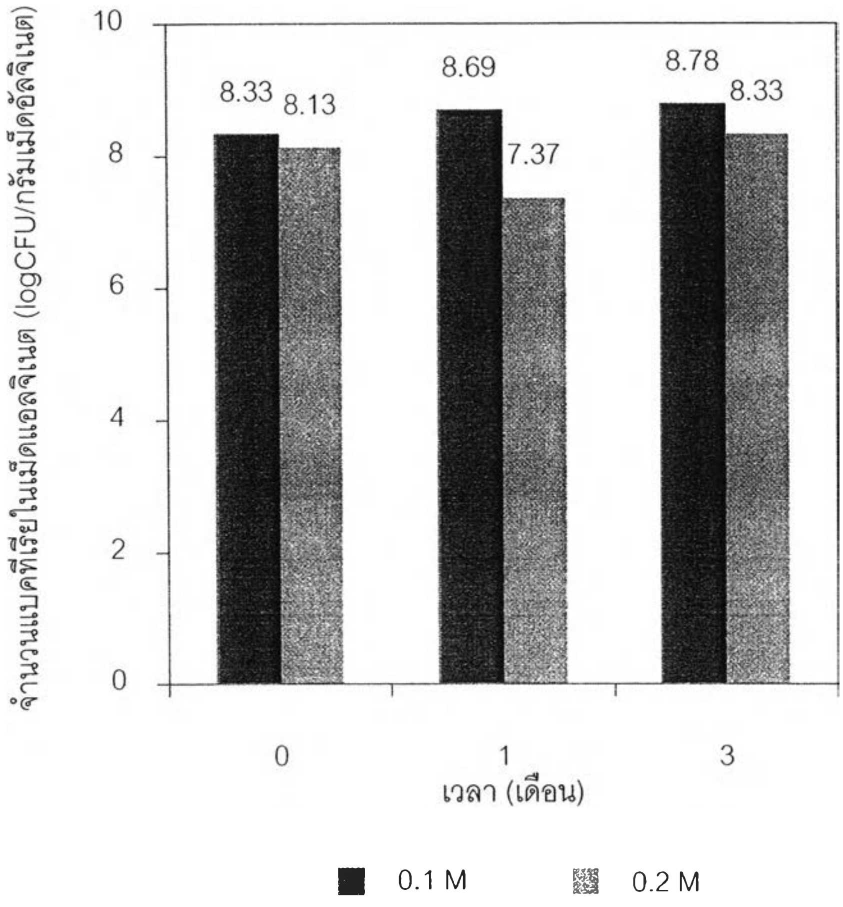
ในขั้นตอนแรก กำหนดให้ค่าความเข้มข้นสารละลายโซเดียมอัลจิเนตคงที่เท่ากับ 4 % น้ำหนักต่อปริมาตร และแปรปัจจัยค่าความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็น 0.05 0.1 และ 0.2 โมลาร์ ศึกษาลักษณะเม็ดอัลจิเนต การคงอยู่ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในเม็ดอัลจิเนต เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 3, 7, 10 และ 14 และการอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรียในเม็ดอัลจิเนตหลังการเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสใน 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ เป็นระยะเวลา 0, 1 และ 3 เดือน โดยการวิเคราะห์การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในเม็ดอัลจิเนตด้วยวิธี viable plate count ตามวิธีในข้อ 3.9.2

ผลการศึกษาพบว่า ลักษณะภายนอกของเม็ดอัลจิเนตเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 0.05 0.1 และ 0.2 โมลาร์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ทั้งรูปร่างและขนาด จำนวนเม็ดอัลจิเนตต่อกรัมอยู่ในช่วง 27-29 , 27-30 และ 29-31เม็ด ตามลำดับ ผลการศึกษาจำนวนแบคทีเรีย พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เท่ากับ 0.05 , 0.1 และ 0.2 โมลาร์ มีค่าจำนวนเซลล์เริ่มต้นใกล้เคียงกันประมาณ 8.22 , 8.28 และ 8.33 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเป็น 8.37 , 8.42 และ 8.52 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในเม็ดอัลจิเนตช่วงระยะเวลา 14 วัน ในภาวะการเตรียมที่ความเข้มข้นสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 0.05 โมลาร์ มีจำนวนแบคทีเรียต่ำกว่าความเข้มข้นสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 0.1 และ 0.2 โมลาร์ ซึ่งทั้งสองความเข้มข้นมีจำนวนเซลล์สูงสุดอยู่ที่ประมาณ 8.78 และ 8.91 log CFU ต่อกรัมบีดในวันที่ 3 และวันที่ 7 ของการทดลอง (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4.4 จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในเม็ดอัลจิเนต เมื่อใช้ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ที่ 0.05 , 0.1 และ 0.2 โมลาร์ ในการขึ้นรูปเม็ดอัลจิเนต

จากรูปที่ 4.5 แสดงผลของจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 หลังจากเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสใน 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ เก็บตัวอย่างวิเคราะห์การเจริญทั้งในเม็ดอัลจิเนตและในอาหารเหลวตามวิธีในข้อ 3.9.1 เป็นระยะเวลา 0, 1 และ 3 เดือน โดยทดสอบเซลล์ตรึงซึ่งเตรียมที่ภาวะความเข้มข้นสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเท่ากับ 4 % น้ำหนักต่อปริมาตร และใช้ค่าความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เท่ากับ 0.1 และ 0.2 โมลาร์ พบว่า จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีค่าเริ่มต้นใกล้เคียงกันประมาณ 8.33 และ 8.13 log CFU ต่อกรัมเม็ดแอลจเนต ตามลำดับ หลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 1 เดือน จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีค่าลดลงไปประมาณ 1 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต ที่ความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์



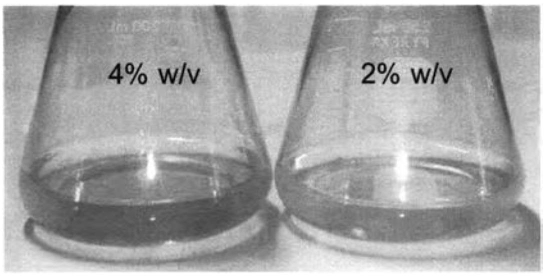
รูปที่ 4.5 จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในเม็ดอัลจิเนต หลังการเก็บที่เวลา 0 , 1 และ 3 เดือน

จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 0.1 และ 0.2 โมลาร์ จะมีการคงอยู่ของกลุ่มแบคทีเรียในเม็ดอัลจิเนตทดลองบ่มในอาหารเหลว CFMM ระยะเวลา 14 วันใกล้เคียงกัน แต่หากพิจารณาจากการมีชีวิตรอดของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จะพบว่า ความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 โมลาร์ จะเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสำหรับการตรึงกลุ่มแบคทีเรียมากกว่าความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 โมลาร์ เนื่องจากจำนวนแบคทีเรียค่อนข้างคงที่ไม่ลดจำนวนลงไปหลังผ่านการเก็บ ในการศึกษาขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ความเข้มข้นสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 0.1 โมลาร์ สำหรับการศึกษาปัจจัยของความเข้มข้นสารละลายโซเดียมอัลจิเนตต่อไป

4.3.2 ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมอัลจิเนต

ในงานวิจัยนี้เลือกทดสอบความเข้มข้นสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเท่ากับ 2 % และ 4% น้ำหนักต่อปริมาตร เนื่องจากเป็นค่าความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงที่มีการใช้งานตรึงเซลล์โดยทั่วไป คือ 1 – 8 % น้ำหนักต่อปริมาตร (Cassidy และคณะ, 1996) ลักษณะของโซเดียมอัลจิเนตก่อนใช้งานตรึงกลุ่มแบคทีเรียมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลืองอ่อน ดังแสดงในรูปที่ 4.6 เมื่อนำมาเตรียมเป็นสารละลาย จะสังเกตเห็นว่าสารละลายจะมีความข้นหนืด โดยที่ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเท่ากับ 2 % น้ำหนักต่อปริมาตร มีความหนืดน้อยกว่าและสีของสารละลายอ่อนกว่าสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 4% น้ำหนักต่อปริมาตร ดังแสดงในรูปที่ 4.7

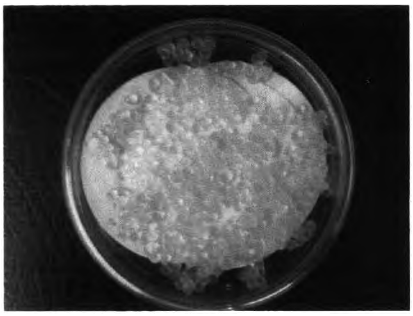
รูปที่ 4.6 ลักษณะของผงโซเดียมอัลจิเนต



รูปที่ 4.7 ลักษณะสารละลายโซเดียมอัลจิเนต

นำกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มาตรวจสอบการคงอยู่ของกลุ่มแบคทีเรียในเม็ดอัลจิเนตของเซลล์ตรึงในอาหารเหลว CFMM ตามวิธีในข้อ 3.4.1 โดยการวิเคราะห์การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในเม็ดอัลจิเนต เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 3, 7, 10 และ 14 โดยใช้ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเท่ากับ 2% และ 4% น้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 โมลาร์ ซึ่งอ้างอิงผลการทดลองที่ให้การคงอยู่ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในเม็ดอัลจิเนตดีที่สุด

ในการจำลองเม็ดอัลจิเนตด้วยสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเท่ากับ 2% น้ำหนักต่อปริมาตร พบว่า จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ก่อนการจำลองเม็ดอัลจิเนตมีค่าเริ่มต้นประมาณ 8.38 log CFU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อจำลองเม็ดอัลจิเนตสมบูรณ์แล้วนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในเม็ดอัลจิเนต พบว่ามีจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีค่าเท่ากับ 7.31 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต ส่วนชุดทดลองที่จำลองเม็ดอัลจิเนตด้วยสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเท่ากับ 4% น้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ก่อนการจำลองเม็ดอัลจิเนตมีค่าเริ่มต้นประมาณ 8.44 log CFU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อจำลองเม็ดอัลจิเนตสมบูรณ์แล้วนับจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จะมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณเซลล์เริ่มต้นก่อนการจำลองมีค่า 8.24 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต ซึ่งถือว่าลดลงน้อยมาก เมื่อดูลักษณะภายนอกของเม็ดอัลจิเนตเปรียบเทียบกัน พบว่ามีความแตกต่างกัน ที่ความเข้มข้น 4% น้ำหนักต่อปริมาตร เม็ดอัลจิเนตมีลักษณะกลม ผิวเรียบเสมอกันทั้งเม็ด มีสีเหลืองอ่อน ขณะที่ความเข้มข้น 2% น้ำหนักต่อปริมาตร เม็ดอัลจิเนตจะมีรูปร่างกึ่งกลม มีสีเหลืองอ่อนกว่า ผิวเรียบไม่เสมอกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.8 โดยที่ความเข้มข้น 4% น้ำหนักต่อปริมาตรจะสามารถตรึงแบคทีเรียได้จำนวนมากกว่า จึงสรุปว่าภาวะสำหรับการจำลองเม็ดอัลจิเนตโดยใช้ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเท่ากับ 4% น้ำหนักต่อปริมาตร ให้ผลที่ดีมากกว่าการใช้สารละลายโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 2% น้ำหนักต่อปริมาตร



รูปที่ 4.8 ลักษณะของเม็ดอัลจิเนตที่มีกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เมื่อใช้ความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนต 2% น้ำหนักต่อปริมาตร

4.3.3 จำนวนเซลล์ที่ใช้ตรึง

นอกจากนี้ยังศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของปริมาณเซลล์ตรึง กำหนดค่าปริมาณเซลล์เริ่มต้นให้มากกว่าเดิม แปรผันจำนวนเริ่มต้นที่ใช้ในการตรึงเป็น 8 และ 10 log CFUต่อมิลลิลิตร ตรึงเซลล์โดยใช้ภาวะการตรึงที่ทดสอบเบื้องต้นแล้วเหมาะสำหรับตรึงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 คือที่ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 4 % น้ำหนักต่อปริมาตร และความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เท่ากับ 0.1 โมลาร์

ผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้เซลล์เริ่มต้น 8.40 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อตรึงสมบูรณ์แล้วมีจำนวนเซลล์ประมาณ 8.28 log CFU/กรัมเม็ดอัลจิเนต ลักษณะของเม็ดอัลจิเนตที่จำลองได้แสดงในรูปที่ 4.2B และเมื่อใช้เซลล์เริ่มต้น 10.64 log CFUต่อมิลลิลิตร เมื่อตรึงสมบูรณ์แล้วมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10.37 log CFU/กรัมเม็ดอัลจิเนต ลักษณะภายนอกของเม็ดอัลจิเนตจะมีสีดำเข้ม รูปร่างกลม ผิวเรียบลื่น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4 มิลลิเมตร ดังรูปที่ 4.9 จากนั้นจึงนำไปทดสอบการคงอยู่ของกลุ่มแบคทีเรียในเม็ดอัลจิเนตตามวิธีในข้อ 3.4.1 โดยการวิเคราะห์การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในเม็ดอัลจิเนต เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 3, 7, 10 และ 14 ผลการศึกษาพบว่า ตลอดการทดลองจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีจำนวนค่อนข้างคงที่อยู่ในช่วง 10.04-10.37 log CFU/กรัมเม็ดอัลจิเนต(ตารางที่ 4.1) เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะเห็นว่าลักษณะเม็ดอัลจิเนตภายหลังจาก 14 วัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ทั้งรูปร่าง สี ขนาด

รูปที่ 4.9 ลักษณะของเม็ดอัลจิเนตที่มีกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ความเข้มข้นประมาณ 10 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต

ตารางที่ 4.1 จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เวลาต่างๆ เมื่อใช้กลุ่มแบคทีเรียเริ่มต้นจำนวน 8 และ 10 log CFU ต่อมิลลิลิตร

วันที่บ่ม	จำนวนแบคทีเรีย log CFU/กรัมเม็ดอัลจิเนต	
	จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น 8 log CFU ต่อมิลลิลิตร	จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น 10 log CFU ต่อมิลลิลิตร
0	8.28	10.37
1	8.77	10.04
3	8.68	10.22
7	8.91	10.29
10	8.52	10.34
14	8.42	10.21

อย่างไรก็ตามวิธีการเตรียมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ปริมาณเซลล์เริ่มต้นมีค่าประมาณ 10 log CFU/มิลลิลิตร มีข้อจำกัดคือ จำเป็นจะต้องเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเหลว CFMM ปริมาณมาก ทำให้เกิดการสิ้นเปลืองอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นมีค่าประมาณ 8 log CFU/มิลลิลิตร ซึ่งให้ผลของการคงอยู่ของกลุ่มแบคทีเรียในเม็ดอัลจิเนตไม่แตกต่างกันนำไปใช้ในการทดลองต่อไป โดยใช้ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 4 % น้ำหนักต่อปริมาตร และความเข้มข้นสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์

4.4 การย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ตรึงในอัลจิเนต แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุด ดังต่อไปนี้

ชุดควบคุม ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อเติมไพรีนและฟีแนนทรีน เพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพต่อการลดลงของไพรีน/ฟีแนนทรีน

ชุดทดลองที่ 1 ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสดจำนวน 8 log CFU/มล. และไพรีนและฟีแนนทรีน เพื่อศึกษาการลดลงของไพรีนและฟีแนนทรีนโดยกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมสด

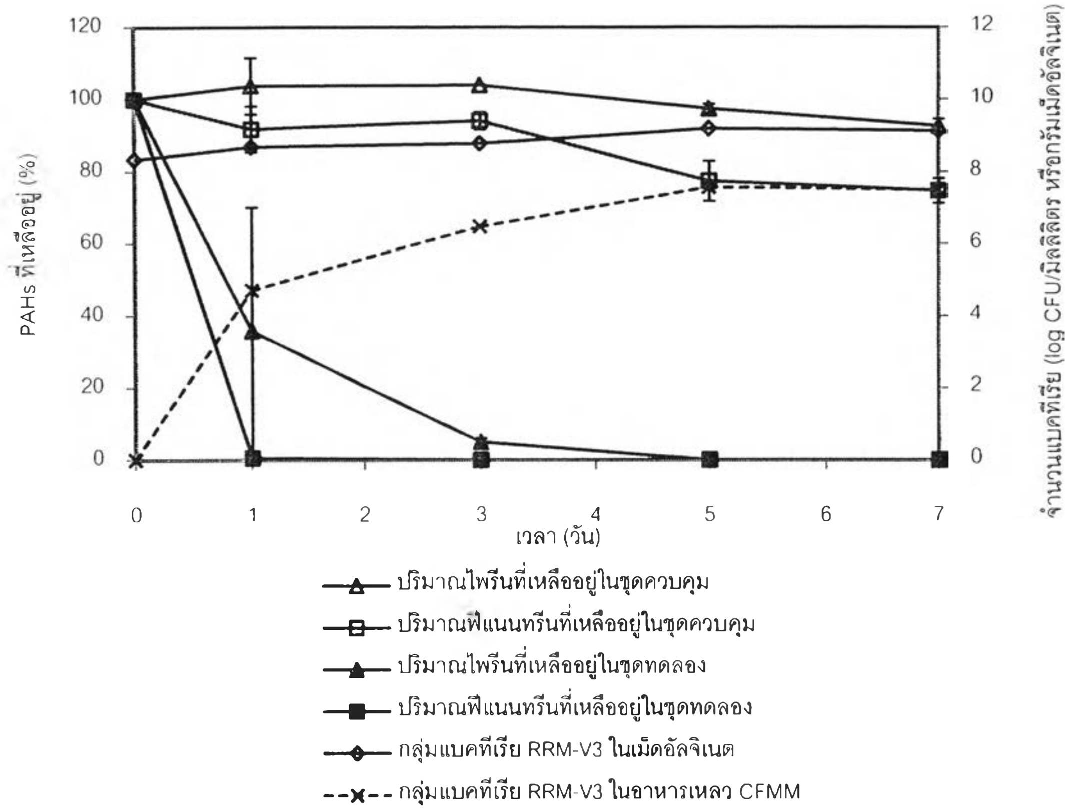
ชุดทดลองที่ 2 ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ อัลจิเนตที่มีแบคทีเรียตรึง 1 กรัมซึ่งมีแบคทีเรียประมาณ 8 log CFU/กรัมของเม็ดอัลจิเนต และไพรีนและฟีแนนทรีน

ในการตรึงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ดำเนินการโดยใช้ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 4 % น้ำหนักต่อปริมาตร และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ เนื่องจากเป็นค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับตรึงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

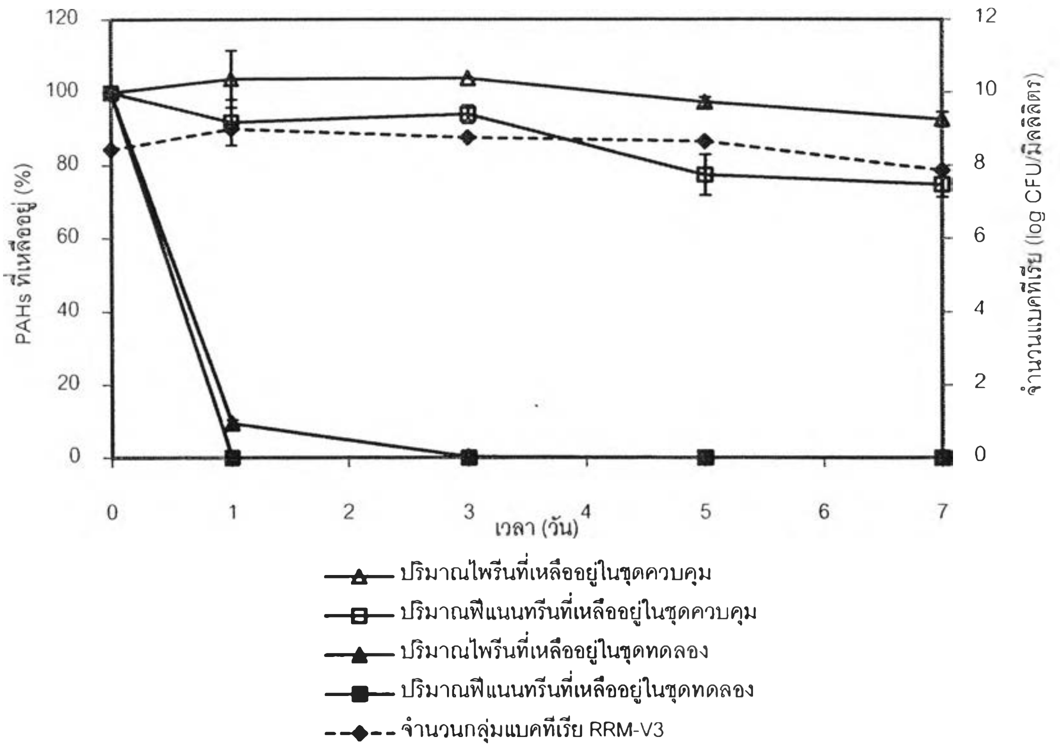
ทุกชุดการทดลองทำในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นชนิดละ 0.05 กรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียและปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่

ผลการย่อยสลายฟีแนนทรีนของชุดทดลองที่ 1 พบว่าลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบได้ในตั้งแต่วันที่ 1 แต่ในชุดทดลองที่ 2 ตรวจพบปริมาณฟีแนนทรีนเท่ากับ 0.56 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 1 ของการทดลองและจะหมดไปในวันที่ 3 ในขณะที่ปริมาณไพรีนของชุดทดลองที่ 1 และชุดทดลองที่ 2 พบว่าไพรีนเหลืออยู่ 0.29 เปอร์เซ็นต์ และ 5.03 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 ของการทดลองและลดลงจนไม่สามารถตรวจวัดได้ในวันที่ 5 ดังแสดงในรูปที่ 4.10 และ 4.11

ผลการนับจำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่ 1 พบว่าวันที่ 0 ของการทดลองมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 8.43 log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน การเจริญจะมีค่าสูงสุดเท่ากับ 8.99 log CFU ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นมีแนวโน้มลดลง ส่วนชุดทดลองที่ 2 พบว่าวันที่ 0 ของการทดลองมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 8.33 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต และมีการเจริญต่อเนื่องจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 5 ของการทดลองมีค่าเท่ากับ 9.18 log CFU ต่อกรัม นอกจากนี้ค่าการเจริญในอาหารเหลว CFMM พบว่ามีค่าเริ่มต้น 0 log CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 1 จนสิ้นสุดการทดลอง โดยจำนวนกลุ่มแบคทีเรียอยู่ในช่วง 4.72-7.49 log CFU ต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 การย่อยไพรีน/ฟีแนนทรีนที่ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เซลล์ตรึง



รูปที่ 4.11 การย่อยไพรีน/ฟีแนนทรีนที่ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เซลล์อิสระ

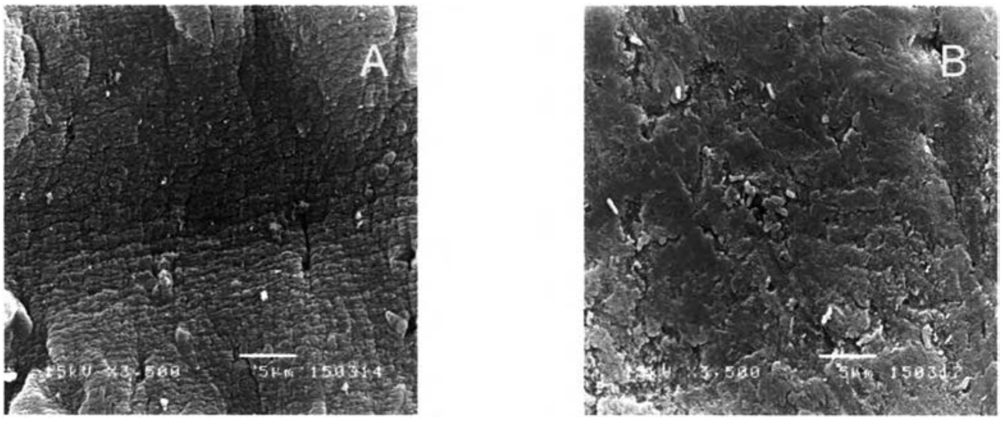
ทั้งนี้มีการศึกษาผลของอัลจิเนตต่อการดูดซับไพรีนและฟีแนนทรีน ชุดการทดลองประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เม็ดอัลจิเนตที่ไม่มีแบคทีเรียตรึงจำนวน 1 กรัมและไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นเริ่มต้นชนิดละ 0.05 กรัมต่อลิตร ทำ 3 ซ้ำ สกัดส่วนของอาหารเหลวโดยแยกเม็ดอัลจิเนตออกและวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ PAHs ที่เหลืออยู่ตามวิธีในข้อ 3.8.2 นำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้เทียบเป็นความเข้มข้นโดยใช้กราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค.)

ผลการทดลองพบว่าสารประกอบ PAHs แต่ละชนิดในส่วนของอาหารเหลว CFMM ปริมาณฟีแนนทรีนมีสัดส่วนที่มากกว่าไพรีนเล็กน้อย โดยมีค่าอยู่ในช่วง 72.59±1.39 เปอร์เซ็นต์ ถึง 84.67 ±11.74 เปอร์เซ็นต์ และไพรีนมีค่าอยู่ในช่วง 65.30 ±1.45 เปอร์เซ็นต์ ถึง 69.60 ±7.52 เปอร์เซ็นต์ จากตารางที่ 4.2 จะสังเกตเห็นว่าเมื่อเทียบฟีแนนทรีนในส่วนอาหารเหลวกับส่วนที่หายไปอยู่ในเม็ดอัลจิเนตจะมีค่าประมาณ 80:20 เปอร์เซ็นต์ และไพรีนมีค่าประมาณ 70:30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

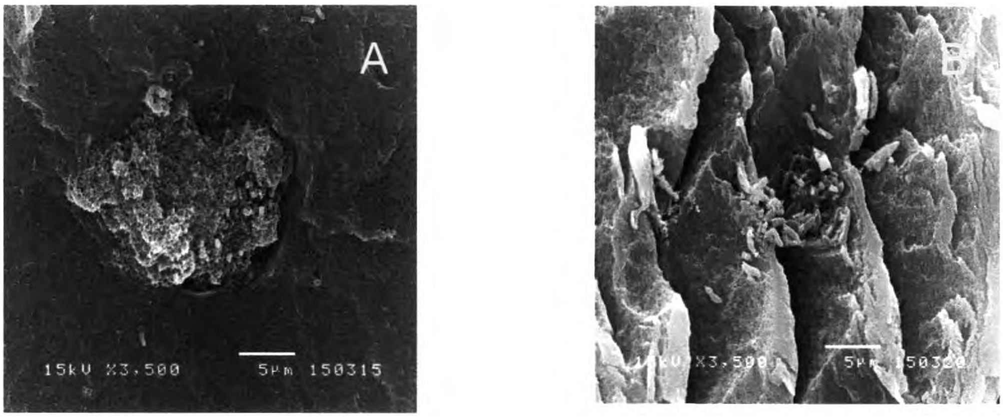
เวลา (วัน)	ปริมาณฟีแนนทรีน		ปริมาณไพรีน	
	มิลลิกรัมต่อลิตร	เปอร์เซ็นต์	มิลลิกรัมต่อลิตร	เปอร์เซ็นต์
0	54.98 ±1.85	100 ±0	64.04 ±1.90	100 ±0
1	39.91 ±0.76	72.59 ±1.39	41.82 ±0.93	65.30 ±1.45
3	43.54 ±3.25	79.19 ±5.91	44.57 ±4.81	69.60 ±7.52
5	40.87 ±2.53	74.34 ±4.60	42.57 ±0.42	66.47 ±0.65
7	46.55 ±6.46	84.67 ±11.74	42.38 ±0.79	66.18 ±1.23

ตารางที่ 4.2 ปริมาณไพรีน/ฟีแนนทรีนในส่วนของอาหารเหลว CFMM ที่เติมเม็ดอัลจิเนต

เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วย Scanning Electron Microscopy (SEM) ของเม็ดอัลจิเนตที่ใช้ในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเหลว CFMM แล้วเป็นเวลา 5 วัน เปรียบเทียบกับเม็ดอัลจิเนตก่อนการนำมาย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน พบว่าเม็ดอัลจิเนตที่ผ่านการใช้งานแล้วจะมีจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เพิ่มมากขึ้น ทั้งบริเวณผิวด้านนอกและผิวด้านใน ดังรูปที่ 4.12 และ 4.13



รูปที่ 4.12 **ลักษณะโครงสร้างผิวภายนอกของอัลจิเนต** (A) **ก่อนใช้งาน และ** (B) **ผ่านการใช้งานแล้วเป็นเวลา** 5 **วัน** (**กำลังขยาย** 3,500 **เท่า**)



รูปที่ 4.13 **ลักษณะโครงสร้างภายในอัลจิเนต** (A) **ก่อนใช้งาน และ** (B) **ผ่านการใช้งานแล้วเป็นเวลา** 5 **วัน** (**กำลังขยาย** 3,500 **เท่า**)

จากผลการย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีนที่ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรด้วยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตรึงและเซลล์อิสระ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จึงทดลองเพิ่มความเข้มข้นอีก 10 และ 20 เท่า มีค่า 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร เพื่อเปรียบเทียบผลการย่อยสลายว่าให้ผลเหมือนหรือต่างกันอย่างไร

4.4.1 ความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นชนิดละ 0.5 กรัมต่อลิตร โดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตรึงและเซลล์อิสระในอาหารเหลว CFMM แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุด ดังต่อไปนี้

ชุดควบคุม ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อเติมไพรีนและฟีแนนทรีน เพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพต่อการลดลงของไพรีน/ฟีแนนทรีน

ชุดทดลองที่ 1 ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสด จำนวน 8 logCFU/มล. และไพรีนและฟีแนนทรีน เพื่อศึกษาการลดลงของไพรีนและฟีแนนทรีนโดยกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมสด

ชุดทดลองที่ 2 ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ อัลจิเนตที่มีแบคทีเรียตรึง 1 กรัมซึ่งมีแบคทีเรียประมาณ 8 logCFU/กรัมของเม็ดอัลจิเนต และไพรีนและฟีแนนทรีน

ในการตรึงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ดำเนินการโดยใช้ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 4 % น้ำหนักต่อปริมาตร และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ เนื่องจากเป็นค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับตรึงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

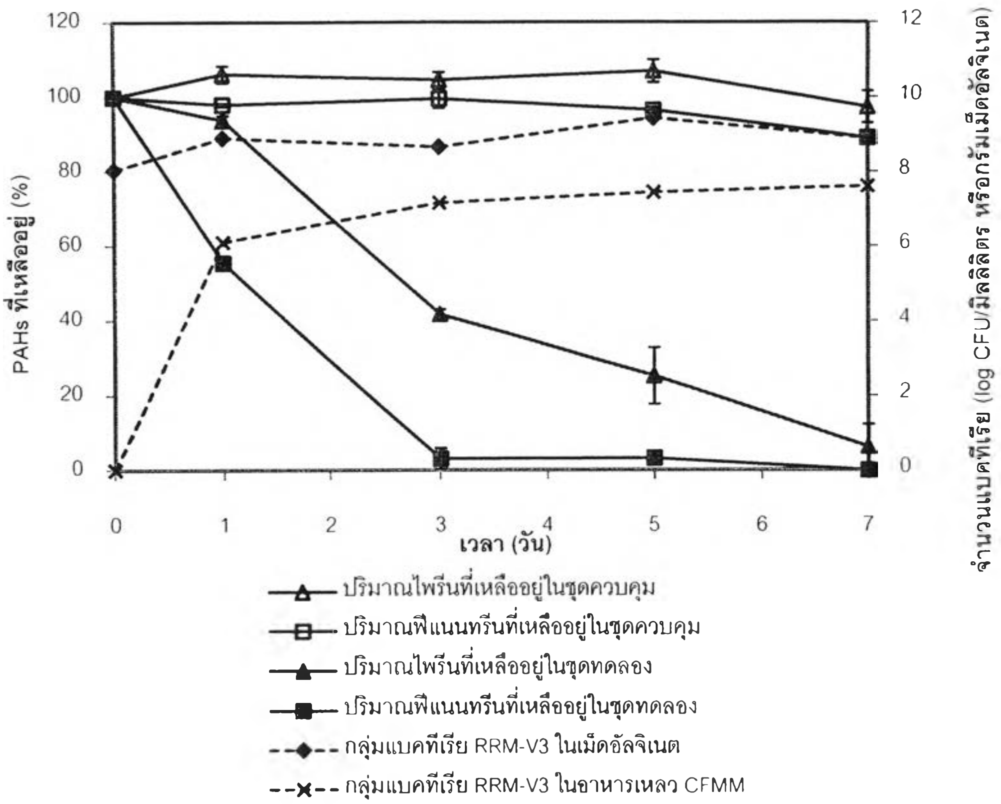
ทุกชุดการทดลองทำในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นชนิดละ 0.5 กรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียและปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่

ผลการทดลองที่ความเข้มข้นฟีแนนทรีน/ไพรีน อย่างละ 0.5 กรัมต่อลิตรพบว่า ในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตรึงในอัลจิเนต มีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 8.03 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนตและมีการเจริญต่อเนื่องจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 5 ของการทดลอง มีค่าประมาณ 9.43 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต ในขณะที่ผลการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียตรึงในอาหารเหลว CFMM พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด มีค่าเริ่มต้นเป็น 0 log CFU ต่อมิลลิลิตร และจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมีค่าสูงสุด 7.61 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ของการทดลอง ในขณะที่กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 อิสระมีจำนวนสูงสุด 9.37 log CFU ต่อมิลลิลิตรตั้งแต่วันที่ 1 จากนั้นจำนวนเซลล์จะลดลงอย่างต่อเนื่องจนมีค่า 7.92 log CFU ต่อมิลลิลิตรในวันสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 4.14 และ 4.15)

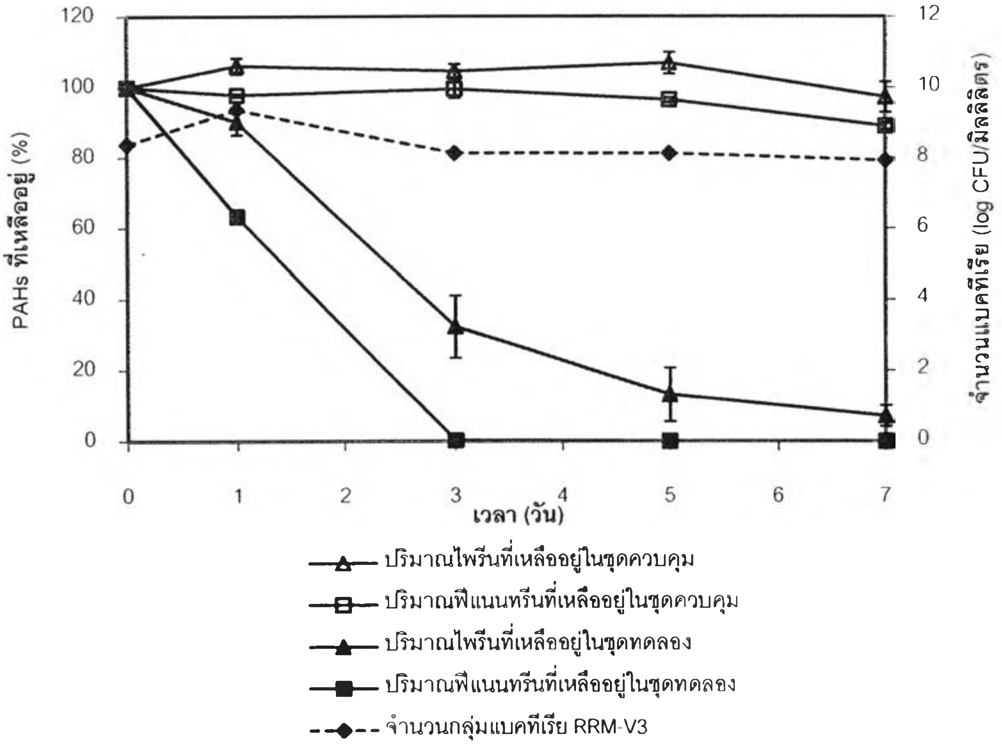
ผลการย่อยสลายฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในชุดการทดลองที่ตรึงด้วยอัลจิเนต พบว่า ปริมาณฟีแนนทรีนลดลงอย่างรวดเร็วจาก 100 เปอร์เซ็นต์ จนเหลือ 55.36 , 3.04 และ 3.07 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 1 , 3 และ 5 ตามลำดับ และจะหมดในวันที่ 7 ของการทดลอง ส่วนชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เตรียมสด พบว่ามีการลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 1

เป็นต้นไปโดยในวันที่ 1 เหลือฟีแนนทรีนอยู่ 63.29 เปอร์เซ็นต์ และหมดในวันที่ 3 ของการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.14 และ 4.15

ผลการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในชุดการทดลองที่ตรึงด้วยอัลจิเนต พบว่า ปริมาณไพรีนลดลงอย่างค่อยเป็นค่อยไป จนเหลือ 6.28 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7 ของการทดลอง ส่วนชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เตรียมสด พบว่ามีการลดลงในทำนองเดียวกันเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 7 จะมีไพรีนเหลืออยู่ 7.26 เปอร์เซ็นต์ โดยจะเห็นว่ามีความสามารถย่อยสลายได้ทัดเทียมกันเพียงแต่จะใช้เวลาในการย่อยสลายจนหมดนานมากขึ้น ในขณะที่ชุดควบคุมซึ่งประกอบด้วยอาหารเหลว CFMM มีฟีแนนทรีนและไพรีน แต่ไม่เติมเชื้อ พบว่า ฟีแนนทรีนและไพรีนสลายตัวได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งน่าจะเกิดจากกระบวนการทางกายภาพ เช่น เกิดจากปฏิกิริยาของแสง หรือการระเหยไป ทั้งนี้ปริมาณไพรีนจะเหลืออยู่ถึง 90.08 เปอร์เซ็นต์ และฟีแนนทรีนจะเหลือ 91.70 เปอร์เซ็นต์ ที่วันที่ 7 ของการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.14 และ 4.15



รูปที่ 4.14 การย่อยไพรีน/ฟีแนนทรีนที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตรโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เซลล์ตรึง



รูปที่ 4.15 การย่อยไพรีน/ฟีแนนทรีนที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตรโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เซลล์อิสระ

4.4.2 ความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นชนิดละ 1 กรัมต่อลิตร โดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตรึงและเซลล์อิสระในอาหารเหลว CFMM

ทดสอบเปรียบเทียบความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตรึงในอัลจิเนตและกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 อิสระ ในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนโดยเติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตั้งต้นให้เท่ากันจำนวน 10^8 CFU/กรัมเม็ดอัลจิเนตหรือมิลลิลิตร จำนวน 1 กรัมเม็ดอัลจิเนต หรือ 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 1 กรัมต่อลิตร ชุดควบคุมคือ อาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีนหรือฟีแนนทรีนแต่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เขย่าและเก็บตัวอย่างวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน นับจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตามวิธีในข้อ 3.9.1 และวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ตามวิธีข้อ 3.9.2

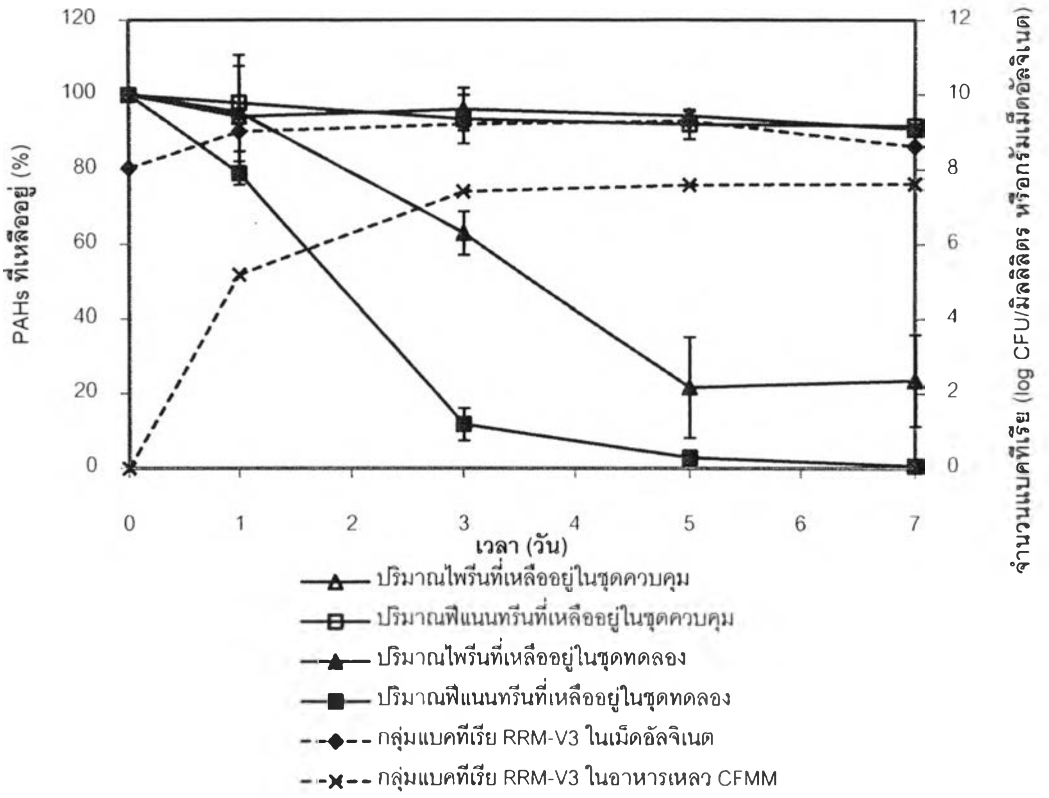
ผลการทดลองที่ความเข้มข้นฟีแนนทรีน/ไพรีน อย่างละ 1 กรัมต่อลิตรพบว่า วันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตรึงในอัลจิเนต มีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 8.03 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนตและมีการเจริญต่อเนื่องจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 5 ของการทดลอง มีค่าประมาณ 9.29 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต ในขณะที่ผลการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียตรึงในอาหารเหลว CFMM พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด มีค่าเริ่มต้นเป็น 0 log CFU ต่อมิลลิลิตร และจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 ต่อเนื่องถึงวันที่ 3 มีค่าจำนวนเซลล์ประมาณ 5.18 และ 7.4 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับและการเจริญจะเริ่มคงที่ตั้งแต่วันที่ 3 ถึงสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 7 ในขณะที่กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 อิสระมีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 8.38 log CFU ต่อมิลลิลิตร มีการเจริญสูงสุดในวันที่ 1 ของการทดลองคือ 10.14 log CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นจำนวนเซลล์มีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ จนมีค่าเป็น 8.15 log CFU ต่อมิลลิลิตรในวันสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 4.16 และ 4.17)

ผลการย่อยสลายฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในชุดการทดลองที่ตรึงด้วยอัลจิเนต พบว่า ปริมาณฟีแนนทรีนลดลงอย่างช้าๆ จนหมดไปในวันที่ 7 ของการทดลอง ส่วนชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เตรียมสด พบว่าปริมาณฟีแนนทรีนลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 1 เป็นต้นไปโดยในวันที่ 1 และ วันที่ 3 เหลือฟีแนนทรีนอยู่ 75.81เปอร์เซ็นต์และ 7.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและหมดในวันที่ 5 ของการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.16 และ 4.17

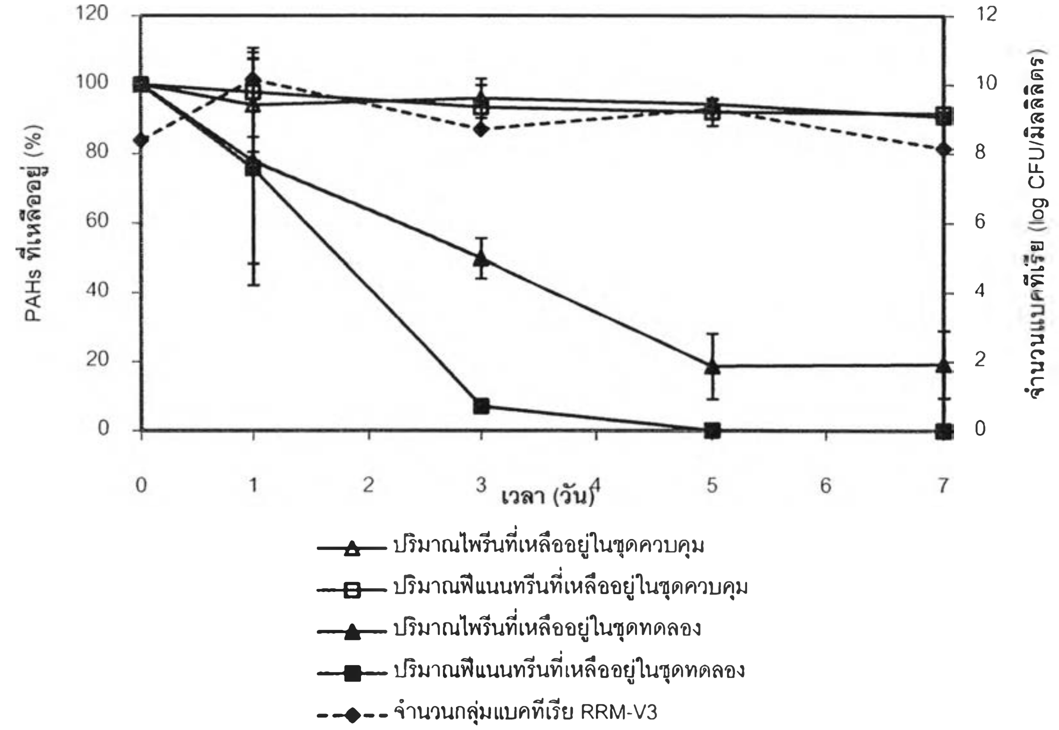
ผลการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในชุดการทดลองที่ตรึงด้วยอัลจิเนต พบว่า ปริมาณไพรีนลดลงอย่างค่อยเป็นค่อยไป จนเหลือ 23.53 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7 ของการทดลอง ส่วนชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เตรียมสด พบว่ามีการลดลงในทำนอง

เดียวกันเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 7 จะมีไพรีนเหลืออยู่ 19.32 เปอร์เซ็นต์ โดยจะเห็นว่ามีความสามารถย่อยสลายได้ทัดเทียมกันเพียงแต่จะใช้เวลาในการย่อยสลายจนหมดนานมากขึ้น ในขณะที่ชุดควบคุมซึ่งประกอบด้วยอาหารเหลว CFMM มีฟีแนนทรีนและไพรีน แต่ไม่เติมเชื้อ พบว่า ฟีแนนทรีนและไพรีนถูกย่อยสลายได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งน่าจะเกิดจากกระบวนการทางกายภาพ เช่น เกิดจากปฏิกิริยาของแสง หรือการระเหยไป ทั้งนี้ปริมาณไพรีนจะเหลืออยู่ถึง 90.08 เปอร์เซ็นต์ และฟีแนนทรีนจะเหลือ 91.70 เปอร์เซ็นต์ ที่วันที่ 7 ของการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.16 และ 4.17

จะเห็นได้ว่าผลของการเจริญและการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีความสอดคล้องกันนั่นคือ ในช่วง วันที่ 0 ถึงวันที่ 7 กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีจำนวนเพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณฟีแนนทรีนลดลงอย่างรวดเร็วหมดภายใน 7 วัน และปริมาณไพรีนลดลงอย่างค่อยเป็นค่อยไปจนเกือบหมด (ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร) และเหลืออยู่ในปริมาณน้อย(ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร) แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ และจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึงสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของไพรีน/ฟีแนนทรีนที่ใช้เวลามากกว่าเซลล์อิสระ โดยเซลล์อิสระมีการเจริญอย่างรวดเร็วมีค่าสูงสุดในวันที่ 1 แต่เมื่อเวลาผ่านไปจำนวนกลุ่มแบคทีเรียกลับลดลงอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้เซลล์อิสระยังคงมีชีวิตรอดหลังจากผ่านไป 7 วันอาจเนื่องจากความเข้มข้นของสารที่ใช้ไม่สูงพอที่จะทำลายเซลล์ได้



รูปที่ 4.16 การย่อยไพรีน/ฟีแนนทรีนที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เซลล์ตรึง



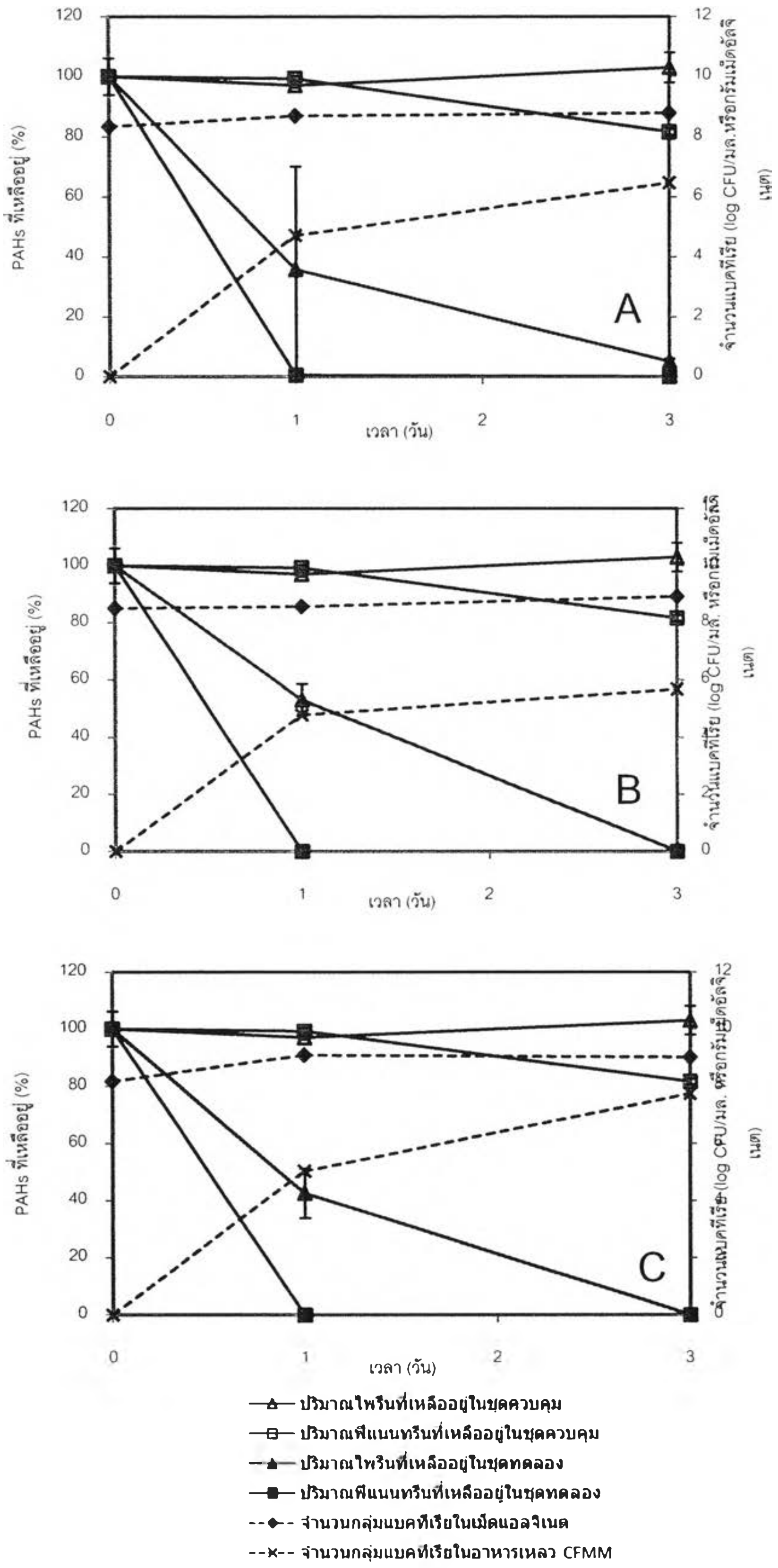
รูปที่ 4.17 การย่อยไพรีน/ฟีแนนทรีนที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เซลล์อิสระ

4.5 ความสามารถย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีนโดยกลุ่มแบคทีเรียที่เก็บที่เวลาต่าง ๆ (Stability)

นำเม็ดอัลจิเนตที่มีกลุ่มแบคทีเรียตรึงซึ่งใช้ภาวการณ์เตรียมที่ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเท่ากับ 4% น้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสใน 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ เป็นระยะเวลา 0, 1 และ 3 เดือน เมื่อครบกำหนดนำมาทดสอบการย่อยสลายในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน/ฟีแนนทรีนความเข้มข้นชนิดละ 0.05 กรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งในและนอกเม็ดอัลจิเนตด้วยวิธี viable plate count ตามวิธีในข้อ 3.9.1 และวิเคราะห์ปริมาณไพรีน/ฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ตามวิธีในข้อ 3.9.2

ผลการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีน โดยวิเคราะห์ปริมาณไพรีน/ฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในชุดทดลองและชุดควบคุมโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับวันที่ 0 พบว่า กลุ่มแบคทีเรียตรึงหลังจากเตรียมใหม่ (เดือนที่ 0) สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนหมดอย่างรวดเร็วภายใน 3 วัน เช่นเดียวกับกลุ่มแบคทีเรียตรึงที่เก็บ 1 และ 3 เดือน สำหรับการย่อยสลายไพรีนนั้นจะใช้เวลามากกว่าฟีแนนทรีน โดยกลุ่มแบคทีเรียตรึงที่เตรียมใหม่ (เดือนที่ 0) ย่อยสลายไพรีนได้เกือบหมดและหมดในระยะเวลา 3 วัน หลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 1 และ 3เดือน ดังแสดงในรูปที่ 4.18

กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในเม็ดอัลจิเนตมีค่าอยู่ในช่วง 8.33-8.78 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต และ 8.50-8.92 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต และ 8.17-9.08 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต ในเดือนที่ 0 , 1 และ 3 ตามลำดับ ในขณะที่การเจริญของกลุ่มแบคทีเรียในอาหารเหลวในวันที่ 0 มีค่าเป็น 0 log CFU ต่อมิลลิลิตร และจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง ในวันที่ 3 จำนวนกลุ่มแบคทีเรียมีค่าสูงสุดเท่ากับ 6.47 , 5.69 และ 7.75 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในเดือนที่ 0 , 1 และ 3 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.18



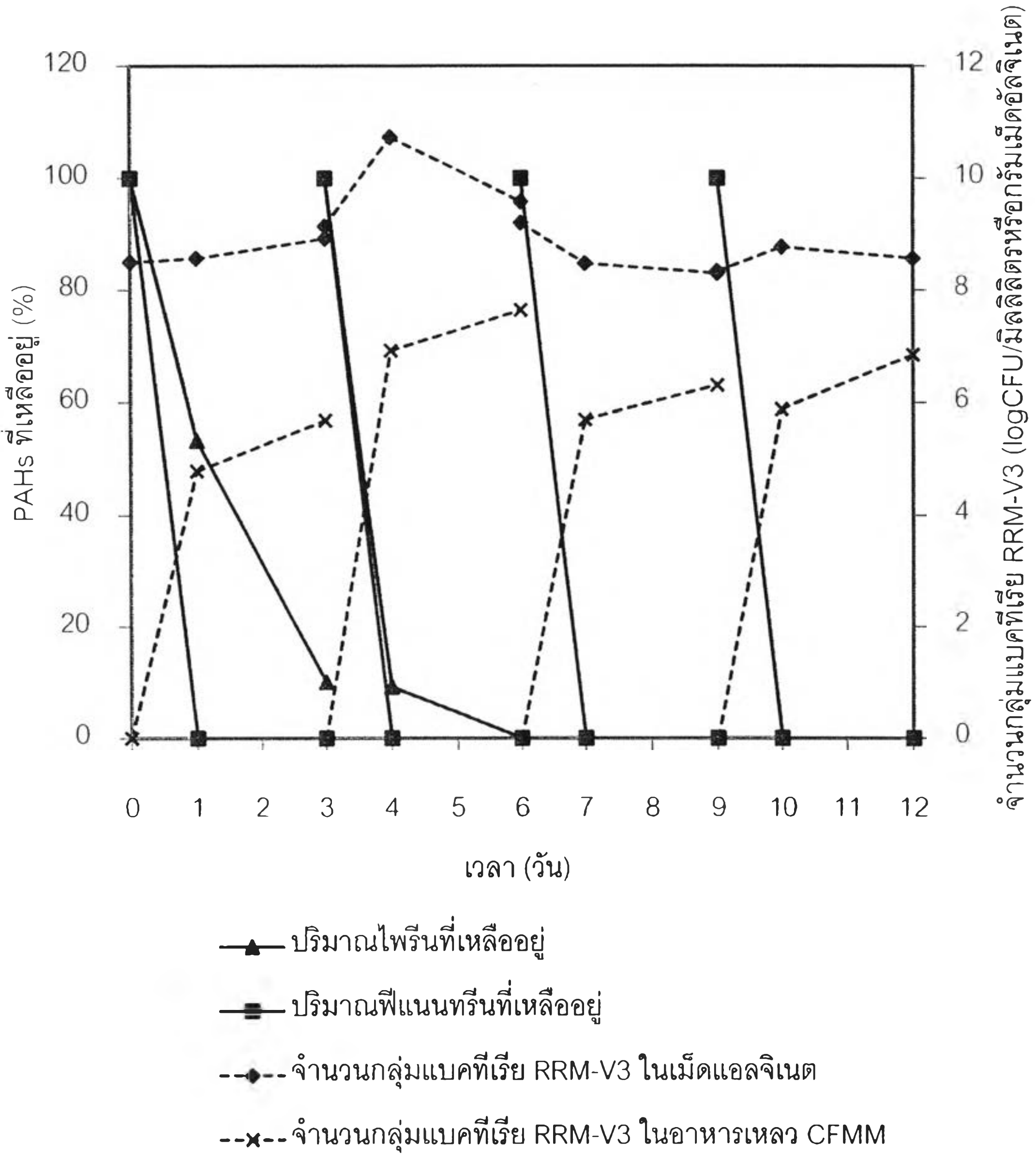
รูปที่ 4.18 ปริมาณไพรีน/ฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตรึงที่เก็บเป็นเวลา 0 เดือน (A) 1 เดือน (B) และ 3 เดือน (C)

4.6 การใช้กลุ่มแบคทีเรียตรึงซ้ำ

ภายหลังจากการทดสอบการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเหลว CFMM แล้ว พบว่ากลุ่มแบคทีเรียตรึงมีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้เป็นอย่างดี อีกทั้งจำนวนกลุ่มแบคทีเรียไม่ได้ลดจำนวนลงไปเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ดังนั้นจึงศึกษาการนำกลับมาใช้งานซ้ำของเม็ดอัลจิเนตที่ผ่านการใช้งานแล้ว โดยหวังว่าจะยังคงประสิทธิภาพเหมือนเดิมไม่เปลี่ยนแปลงและสามารถใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่องได้ ในการทดลองจะนำเม็ดอัลจิเนตใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว CFMM 5 มิลลิลิตร พร้อมกับเติมไพรีน/ฟีแนนทรีนความเข้มข้นชนิดละ 0.05 กรัมต่อลิตร (ความเข้มข้นเท่ากับเมื่อเริ่มต้นการทดลอง) เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวันที่ 1 และ 3 หาจำนวนของแบคทีเรียในอัลจิเนตตามวิธีในข้อ 3.9.1และปริมาณไพรีน/ฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ ตามวิธีในข้อ 3.9.2 การใช้งานซ้ำทำโดยการแยกเอาเม็ดอัลจิเนตออกจากชุดการทดลองที่ผ่านการใช้งานแล้ว

ผลการทดลอง จำนวนเซลล์เริ่มต้นในการใช้งานครั้งที่ 1 มีค่า 8.50 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนตและมีการเจริญต่อเนื่องจนวันที่ 3 มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 8.92 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนตเมื่อแยกเอาเม็ดอัลจิเนตออกและเติมลงในการทดลองชุดใหม่ที่มีไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นชนิดละ 0.05 กรัมต่อลิตร นับเป็นวันที่ 0 ของการใช้งานครั้งที่ 2 พบว่าในวันที่ 1 จะมีจำนวนเซลล์สูงสุดคือ 10.73 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต เมื่อใช้งานต่อๆไป พบว่าการเจริญจะลดลงตามลำดับและค่อนข้างคงที่ในการใช้งานครั้งที่ 4 เวลารวม 12 วัน ในส่วนของจำนวนเซลล์ในอาหารเหลวนั้น เมื่อเริ่มต้นวันที่ 0 ของการใช้งานแต่ละครั้ง จะมีจำนวนเซลล์ 0 log CFU ต่อมิลลิลิตรและจะเพิ่มขึ้นเป็น 4.79 , 6.92 5.71 และ 5.89 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการใช้งานครั้งที่ 1 , 2 , 3 และ 4 ตามลำดับ

การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรียตรึง พบว่าเมื่อผ่านการใช้งานซ้ำหลายครั้ง ความสามารถในการย่อยไพรีนและฟีแนนทรีนจะดีมากขึ้น โดยฟีแนนทรีนนั้นจะหมดไปในวันที่ 1 ของทุกครั้งที่ใช้งานซ้ำ ในขณะที่ปริมาณไพรีนของการใช้งานครั้งที่ 1 จะยังคงเหลืออยู่ 10.07 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 ของการทดลอง ในการใช้งานครั้งที่ 2 ไพรีนจะหมดไปในวันที่ 3 ของการทดลอง ส่วนการใช้งานครั้งที่ 3 และ 4 ไพรีนจะลดลงอย่างรวดเร็วไม่สามารถตรวจวัดได้ตั้งแต่วันที่ 1 ของการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.19



รูปที่ 4.19 การย่อยไพรีน/ฟีแนนทรีนความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตรึงที่ใช้ซ้ำ

4.7 การบำบัดในน้ำเสียจากห้องปฏิบัติการ

การตรวจวัดระดับไพรีนและฟีแนนทรีนในน้ำเสียจากห้องปฏิบัติการเบื้องต้นพบว่าเกินเกณฑ์ที่สากลกำหนดไว้ (RCRA. 2008) ที่กำหนดให้น้ำเสียของแหล่งที่เกี่ยวข้องกับสารปิโตรเลียมควรมีค่าเฉลี่ยฟีแนนทรีนไม่เกิน 0.026 มิลลิกรัมต่อลิตร และไพรีนไม่เกิน 0.042 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงบำบัดน้ำเสียจากห้องปฏิบัติการ การวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนในส่วนของน้ำแยกตะกอนออกทำตามวิธีในข้อ 3.9.2 เทียบกับสารมาตรฐาน ลักษณะทางกายภาพ-เคมีของน้ำเสียห้องปฏิบัติการที่ใช้แสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางกายภาพ – เคมีของน้ำเสียห้องปฏิบัติการ

ลักษณะน้ำเสียห้องปฏิบัติการ	ผลการศึกษา
ลักษณะทางกายภาพ	สีเหลือง กลิ่นฉุน มีความหนืดเล็กน้อย อุณหภูมิประมาณ 30 ° ซ ตะกอนขนาดเล็ก
ลักษณะทางเคมี	ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ปริมาณฟีแนนทรีน เท่ากับ 13.61 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณไพรีน เท่ากับ 13.96 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทำการทดลองโดยแยกส่วนน้ำและตะกอนออกจากกัน นำส่วนน้ำมาใช้ในการทดลองโดยใช้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยแบ่งการทดลองออกเป็นชุดดังนี้

ชุดควบคุม ประกอบด้วย น้ำเสียจากห้องปฏิบัติการที่มีสารปฏิชีวนะนิสเตติน เพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพต่อการลดลงของสารที่อยู่ในน้ำเสียจากห้องปฏิบัติการ

ชุดทดลองที่ 1 ประกอบด้วย น้ำเสียจากห้องปฏิบัติการที่มีสารปฏิชีวนะนิสเตติน และกลุ่มแบคทีเรียตรึงในอัลจิเนตจำนวน 1 กรัม ซึ่งมีเซลล์ประมาณ 10^8 CFU/กรัมเม็ดอัลจิเนต

ชุดทดลองที่ 2 ประกอบด้วย น้ำเสียจากห้องปฏิบัติการ ที่มีสารปฏิชีวนะนิสเตติน และกลุ่มแบคทีเรียเตรียมสดมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^8 CFU/ มิลลิลิตร

ทุกการทดลองทำสามซ้ำ นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในวันที่ 0 , 1, 3, 5, 7, 14, 21 วัน วิเคราะห์จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ตรึงอยู่ในอัลจิเนตตามวิธีในข้อ 3.9.1 และวิเคราะห์ปริมาณไพรีน/ฟีแนนท

รีนที่หลงเหลืออยู่ตามวิธีในข้อ 3.9.2 รวมทั้งศึกษาเซลล์แบคทีเรียตรึงในเม็ดอัลจิเนตก่อนและหลังบำบัดโดยใช้เทคนิค Scanning Electron Microscopy (SEM) ตามวิธีในข้อ 3.7

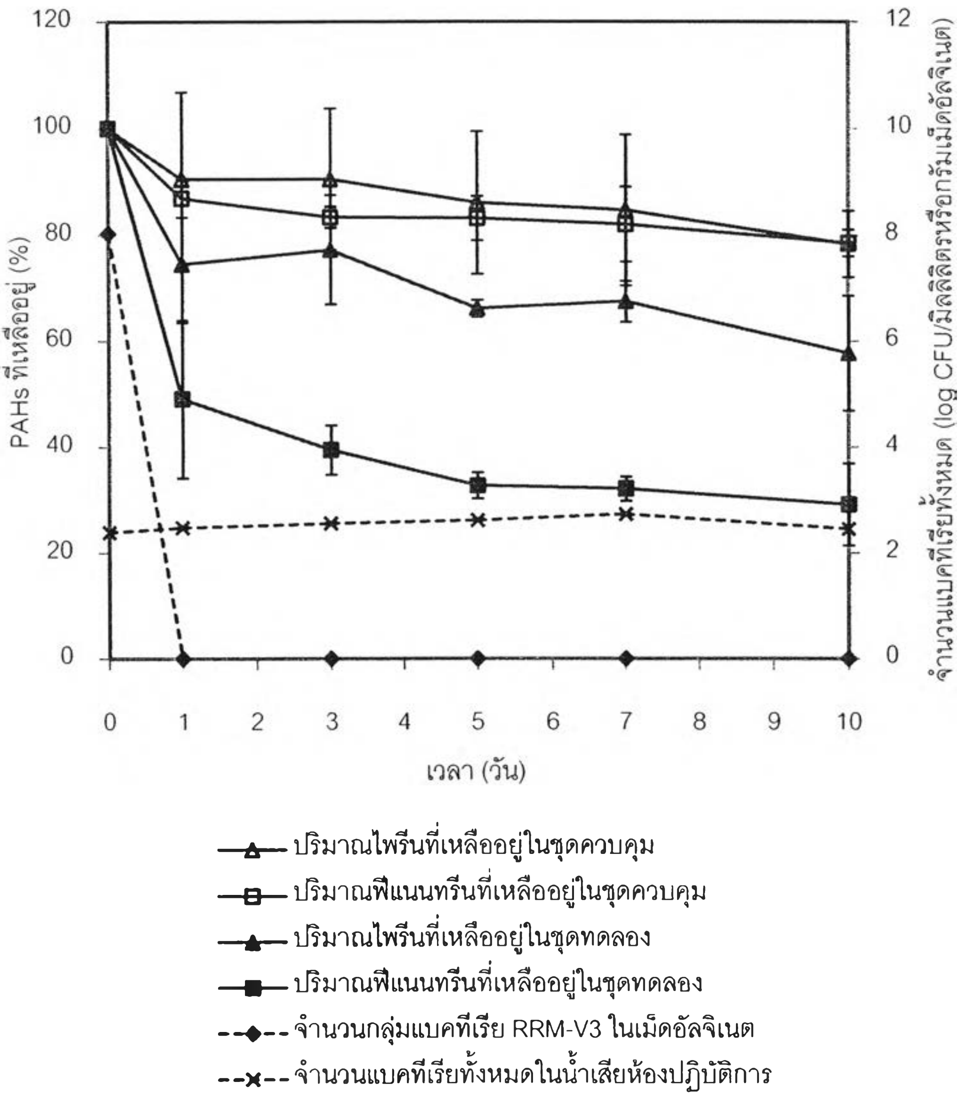
จากการทดลอง พบว่า วันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดก่อนเติมลงในน้ำเสียห้องปฏิบัติการ ของกลุ่มแบคทีเรียตรึงในอัลจิเนต (ชุดการทดลองที่ 1) และกลุ่มแบคทีเรียเตรียมสด (ชุดการทดลองที่ 2) มีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 8.24 log CFU ต่อมิลลิลิตร และ 8.32 log CFU ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อใช้เติมลงในน้ำเสียห้องปฏิบัติการแล้วในวันที่ศูนย์พบว่ามีค่าเท่ากับ 8.03 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนตและ 7.68 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ที่เวลาต่างๆ พบว่ากลุ่มแบคทีเรียในชุดทดลองที่ 1และ 2 ให้ผลในลักษณะเดียวกัน คือตั้งแต่วันที่ 1 ของการทดลอง กลุ่มแบคทีเรียที่เติมลงในชุดการทดลองไม่ว่าจะเป็นกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตรึงและกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 อิสระจะลดจำนวนลงจนหมดเหลือเพียงแบคทีเรียในน้ำเสียเท่านั้นซึ่งจะมีแนวโน้มการเจริญที่คงที่ตั้งแต่ในวันที่ 0 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 2.4 log CFU ต่อมิลลิลิตร และการเจริญจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนมีการเจริญสูงสุดในวันที่ 7 ของการทดลอง มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 2.74 log CFU ต่อมิลลิลิตร และในชุดการทดลองที่ 2 จำนวนกลุ่มแบคทีเรียทั้งหมดซึ่งไม่รวมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 10 ของการทดลองจะมีค่าอยู่ในช่วงประมาณ 2.59-2.68 log CFU ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.20 และ 4.21)

ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่มีในน้ำเสียห้องปฏิบัติการนี้ใช้วิธีการคำนวณปริมาณที่เหลืออยู่โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับวันที่ 0 ซึ่งคิดเป็นปริมาณเริ่มต้นที่ 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าชุดการทดลองที่ 1 คือบำบัดด้วยกลุ่มแบคทีเรียตรึงด้วยอัลจิเนต ปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 57.75 เปอร์เซ็นต์ และฟีแนนทรีนเหลืออยู่ 29.21เปอร์เซ็นต์ ในวันที่10 ของการทดลอง ส่วนชุดการทดลองที่ 2 คือบำบัดด้วยกลุ่มแบคทีเรียเตรียมสด ปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 59.86 เปอร์เซ็นต์ และฟีแนนทรีนเหลืออยู่ 79.18 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่10 ของการทดลอง ในขณะที่ชุดควบคุมฟีแนนทรีนจะเหลืออยู่ถึง 78.61 เปอร์เซ็นต์ และไพรีนจะเหลือ 78.39 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจจะเป็นผลจากกระบวนการทางกายภาพ เช่น เกิดปฏิกิริยาจากแสง

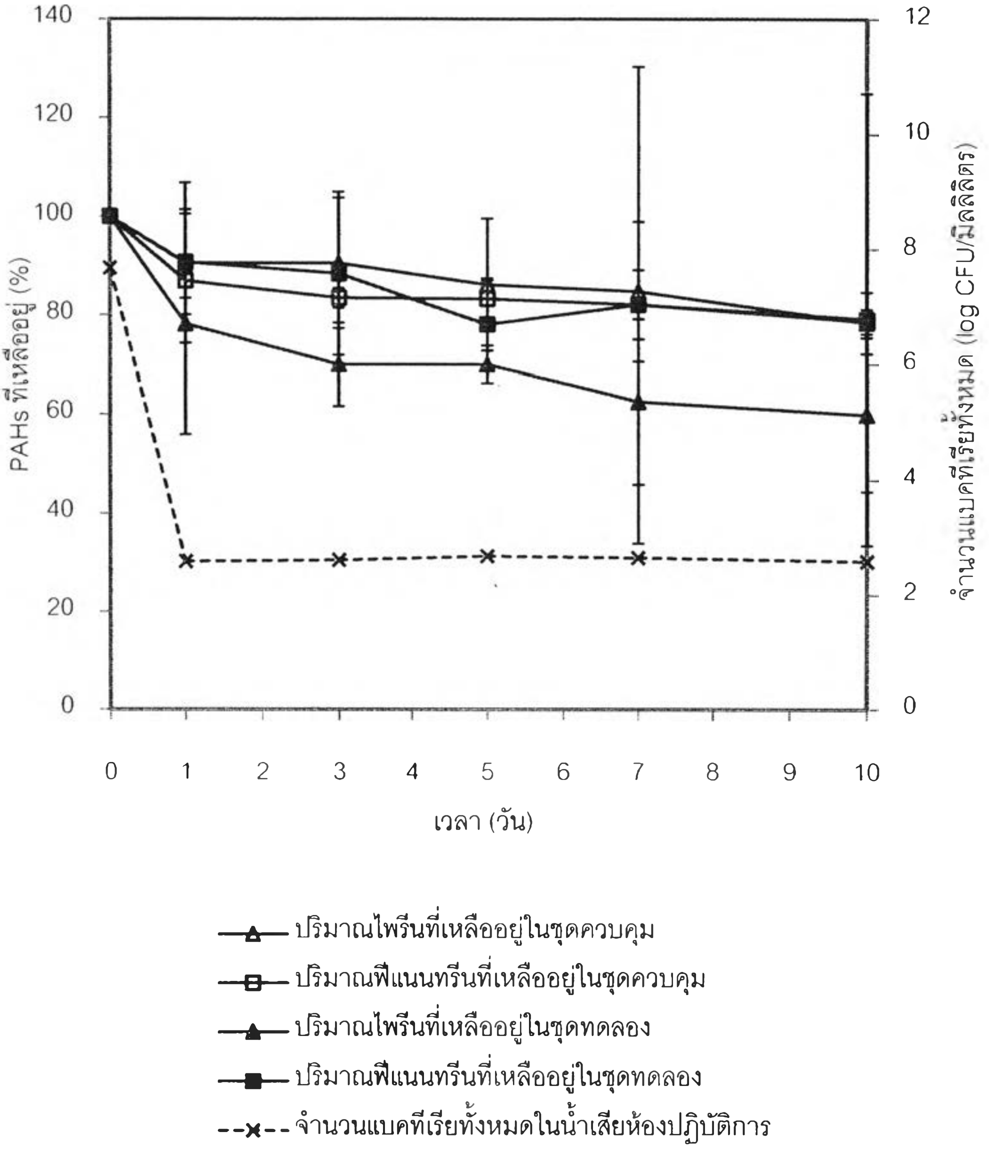
จะเห็นได้ว่าผลของการเจริญและการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสดกับแบคทีเรียตรึง มีความสอดคล้องกันนั่นคือ การบำบัดด้วยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสด ในช่วงวันที่ 0 ถึงวันที่1 กลุ่มแบคทีเรียทั้งหมดและกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีจำนวนลดลงไปอย่างมากจนเหลือประมาณ 5-6 log CFU ต่อมิลลิลิตร ทำให้การลดลงของปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนน้อยมากเมื่อเทียบกับชุดทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรียตรึง

การบำบัดด้วยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตรึงด้วยอัลจิเนต ในช่วงวันที่ 0 ถึงวันที่ 7 กลุ่มแบคทีเรียทั้งหมดและกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีแนวโน้มสูงขึ้นเล็กน้อย จึงทำให้การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนมีประสิทธิภาพมากกว่า จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการบำบัดน้ำเสียในห้องปฏิบัติการของกลุ่มแบคทีเรียตรึงด้วยอัลจิเนตให้ผลดีมากกว่าการใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสด (รูปที่ 4.20 และ 4.21)

เมื่อศึกษาลักษณะของเม็ดอัลจิเนตหลังจากบำบัดน้ำเสียห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 10 วัน พบว่าเม็ดอัลจิเนตมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่ขึ้นเล็กน้อยจาก 4 มิลลิเมตรเป็น 5 มิลลิเมตร เม็ดอัลจิเนตมีสีใสและนิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบเม็ดอัลจิเนตก่อนบำบัดน้ำเสียห้องปฏิบัติการ

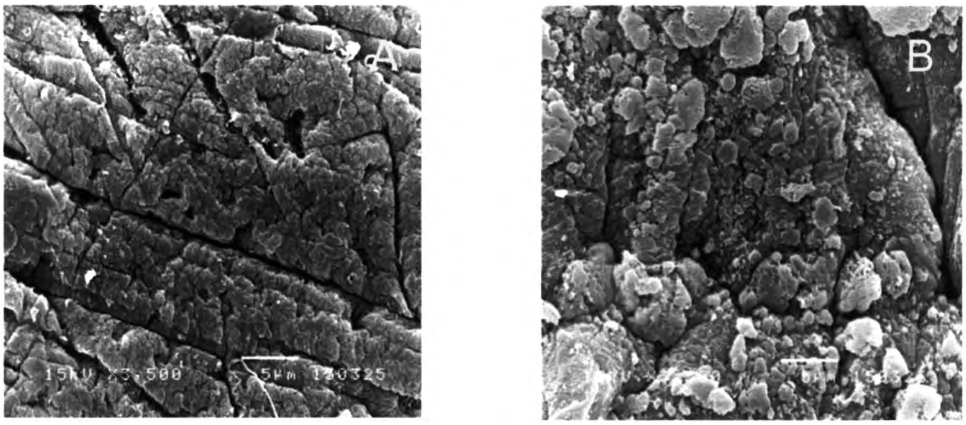


รูปที่ 4.20 ปริมาณไพรีน/ฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำเสียห้องปฏิบัติการที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตรึงด้วยอัลจิเนต (ชุดทดลองที่ 1)

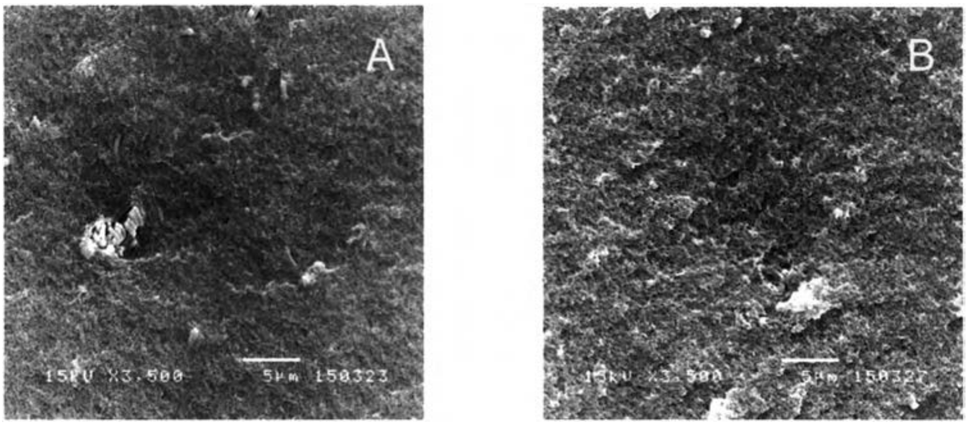


รูปที่ 4.21 ปริมาณไพรีน/ฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำเสียห้องปฏิบัติการที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เตรียมสด (ชุดทดลองที่ 2)

เมื่อศึกษาลักษณะของเม็ดอัลจิเนตด้วย Scanning Electron Microscopy (SEM) ของเม็ดอัลจิเนตที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 10 วัน พบว่าโครงสร้างภายนอกและภายในเปลี่ยนไปจากเดิมดังรูปที่ 4.22 และ 4.23 เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนใช้ ภายหลังจากบำบัดแล้วลักษณะโครงสร้างภายนอกของเม็ดอัลจิเนตพบว่ามีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนจำนวนมากกระจายอยู่ทั่วไป และโครงสร้างภายในมีรูพรุนจำนวนมากกว่าเดิม ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้แบคทีเรียบางส่วนในเม็ดอัลจิเนตหลุดออกมาภายนอกได้


A
B
15kV X3,500 5µm 150325

รูปที่ 4.22 ลักษณะโครงสร้างภายนอกอัลจิเนต ก่อนใช้บำบัดน้ำเสียห้องปฏิบัติการ (A) และ วันที่ 3 หลังการบำบัด (B) (กำลังขยาย 3,500 เท่า)


A
B
15kV X3,500 5µm 150323
15kV X3,500 5µm 150327

รูปที่ 4.23 ลักษณะโครงสร้างภายในอัลจิเนต ก่อนใช้บำบัดน้ำเสียห้องปฏิบัติการ (A) และ วันที่ 3 หลังการบำบัด (B) (กำลังขยาย 3,500 เท่า)