# บทที่ 5

# สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ผ่านการเก็บรักษาไว้เป็นเวลานานประกอบกับการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวหลายๆ ครั้งต่อเนื่องกัน ซึ่งอาจจะมีผลต่อความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้ ดังนั้นก่อนการใช้งานจึงได้ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายเปรียบเทียบกับงานวิจัยของจิรทีปฆ์ แสนรัก (2547) ที่รายงานว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถย่อยสลายไพรีนที่มีความเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล.ได้หมดภายใน 14 วัน นอกจากนี้ยังสามารถลดปริมาณของอะซีแนพธีน ฟีแนนทรีนฟลูออรีนและฟลูออแรนทีนได้ โดยผลการศึกษา (รูปที่ 4.1) พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีการเจริญสูงสุดในวันที่ 1 และหลังจากนั้นการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ลดลงอย่างต่อเนื่อง และยังคงมีความสามารถในการย่อยสลายฟีแนนทรีนและไพรีนได้เป็นอย่างดี เนื่องจากในงานวิจัยนี้ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นน้อยกว่าเป็นจำนวนสองเท่าจึงพบว่าการย่อยสลายฟีแนนทรีนและไพรีนจึงเกิดเร็วกว่า โดยลดลงอย่างรวดเร็วจนไม่สามารถตรวจวัดได้ในวันที่ 1 และ 3 วัน ของการทดลอง ตามลำดับ ทั้งนี้สามารถกล่าวได้ว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 นั้นใช้ไพรีนและฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพื่อการเจริญได้ ซึ่งเมื่อพิจารณาจากชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อยังคงมีปริมาณสารประกอบ PAHs เหลืออยู่ในปริมาณมาก ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้นี้จึงมีสอดคล้องกับงานวิจัยของ Turnbull และคณะ (2001) ที่กล่าวว่า การถ่ายเชื้อ *Arthrobacter globiformis* ลงในอาหาร Minimal salts medium (MSM) ซ้ำหลายๆครั้ง จะไม่ส่งผลต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายสารกลุ่มยาฆ่าแมลงชนิดต่างๆ จึงทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายยังคงมีความเสถียรสูง

การเติมกลุ่มแบคทีเรียลงในแหล่งปนเปื้อนโดยตรงจะทำให้กลุ่มแบคทีเรียตายหรือสูญเสียความสามารถในการย่อยสลายสารปนเปื้อนดังกล่าวได้ เนื่องจากภาวะความเครียดอาทิ เช่น สารอาหาร อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณสารพิษ การแข่งขันกับเชื้อประจำถิ่น เป็นต้น (Van Veen และคณะ, 1996) วิธีหนึ่งที่จะเพิ่มการอยู่รอดคือการใช้วัสดุพาหะ Pattanasupong และคณะ (2004b) ใช้ใยบวบหรือ loofa sponge *(Luffa cylindrica)* เป็นวัสดุตรึงกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากแหล่งน้ำในนาข้าว เพื่อใช้งานบำบัดยาฆ่าแมลงจะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายยาฆ่าแมลงปนเปื้อนในนาข้าวเพิ่มสูงขึ้น แต่ข้อเสียของการใช้วัสดุทางการเกษตรเป็นเวลานานในระบบบำบัดที่เป็นน้ำ จะเกิดการเปื่อยยุ่ยและสลายไปในที่สุด จึงมี

แนวทางเลือกวัสดุที่มีความเหมาะสมมากกว่าวัสดุทางการเกษตร โดยพิจารณาด้านราคา คุณภาพ ขั้นตอนการดำเนินการ

อัลจิเนตจัดเป็นวัสดุชนิดอินทรีย์พอลิเมอร์ที่มีราคาถูก ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ตรึงทำได้ง่าย สามารถนำมาใช้ซ้ำและใช้อย่างต่อเนื่องได้ (Rahman และคณะ, 2006) ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้วิธีการตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนตเพื่อให้การเจริญและการอยู่รอดกับกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ได้ดีที่สุด สำหรับใช้ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน

อัลจิเนตที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นอัลจิเนตของบริษัท Fluka ที่ผลิตมาจากสาหร่ายสีน้ำตาลในที่มีชื่อว่า *Laminaria hyperborea* (ชนิดแบลดหรือสตริป) มีองค์ประกอบของกรดกลูรูโรนิกสูงกว่ากรดแมนูโรนิก มีค่าสัดส่วน 0.63 ต่อ 0.37 จึงจัดอยู่ในกลุ่มที่มีความแข็งแรงเชิงโครงสร้างที่ระบุว่า กรดกลูรูโรนิกมีความสามารถในการจับกับประจุไอออนได้ดีกว่ากรดแมนูโรนิก จึงเหมาะแก่การนำมาใช้ตรึงเซลล์ (Rehm, 2009)

ผลการศึกษาโดยแปรผันปัจจัยของความเข้มข้นสารละลายโซเดียมอัลจิเนต และความเข้มข้นสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ และปริมาณเซลล์ตั้งต้นที่ใช้ตรึง เริ่มด้วยปัจจัยความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ โดยได้แปรผันค่าเท่ากับ 0.05 , 0.1 และ 0.2 โมลาร์ เมื่อขึ้นรูปเจลจะพบว่ามีจำนวนเม็ดอัลจิเนตที่ไม่แตกต่างกันคือประมาณ 27-31 เม็ดอัลจิเนตต่อกรัม นอกจากนี้งานวิจัยก่อนหน้ายังแสดงให้เห็นว่า การตรึงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยมีปัจจัยของภาวะการตรึงเซลล์ที่แตกต่างๆ กัน ได้แก่ ความเข้มข้นสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมอัลจิเนต และปริมาณเซลล์เริ่มต้น จะมีอิทธิพลต่อจำนวนเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มอยู่ในเม็ดอัลจิเนตรวมทั้งความแข็งแรงของเม็ดอัลจิเนต (Mandal และคณะ, 2005 ; Lee และ Heo, 2000 ; Konsoula and Liakopoulou-Kyriakides, 2006)

ในชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เท่ากับ 0.1 และ 0.2 โมลาร์ โดยมีการเจริญสูงสุดใกล้เคียงกันอยู่ที่ประมาณ 8.78 และ 8.91 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนตในวันที่ 3 และวันที่ 7 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ การเจริญจะไม่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรึงที่ทำให้การอยู่รอดและการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ดีที่สุดคือ 0.1 และ 0.2 โมลาร์ และจากการศึกษาความเสถียรโดยเก็บกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตรึงไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสใน 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ โดยภาวะที่ตรึงใช้ความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เท่ากับ 0.2 โมลาร์ เมื่อเก็บไว้ 1 เดือนจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีค่าลดลงไปประมาณ 1 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต ซึ่งน่าจะเป็นผลจากปริมาณแคลเซียมไอออนที่มีจำนวนมาก เมื่อเกิดการจำลองเม็ดอัลจิเนตกับสารละลายโซเดียมอัลจิเนตจึงเกิดระนาบแนวขวางมากกว่าการใช้ปริมาณ

แคลเซียมไอออนต่ำ ทำให้โครงสร้างเม็ดอัลจิเนตมีช่องรูพรุนจำนวนมากตามไปด้วย (Morch , 2008) จากสาเหตุดังกล่าวข้างต้นจึงอาจทำให้แบคทีเรียบางส่วนหลุดออกมาได้ง่ายในระหว่างการเก็บ จำนวนกลุ่มแบคทีเรียจึงลดจำนวนลงไป ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากการมีชีวิตรอดของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จะพบว่า ความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 โมลาร์ จะเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสำหรับการตรึงกลุ่มแบคทีเรียมากกว่าความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 โมลาร์

ในการศึกษาปัจจัยการเตรียมเซลล์ตรึงด้วยสารละลายโซเดียมอัลจิเนตพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 2% น้ำหนักต่อปริมาตร มีผลทำให้จำนวนเซลล์หลังตรึงลดลงไปประมาณ 1 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต โดยก่อนตรึงมีจำนวนเซลล์ประมาณ 8.38 log CFU ต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากตรึงเสร็จสมบูรณ์มีจำนวนเซลล์ประมาณ 7.31 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต ผลที่ได้นี้สามารถอธิบายได้ว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นอัลจิเนตที่มีค่าต่ำ เม็ดอัลจิเนตที่ถูกก่อรูปขึ้นจะมีสมบัติในการยอมให้สารต่างๆแพร่ผ่านเข้า-ออกได้ดี เนื่องจากโครงสร้างมีขนาดและจำนวนช่องว่างมากกว่าที่ความเข้มข้นอัลจิเนตที่มีค่าสูง โดยเมื่อเกิดการจำลองเม็ดอัลจิเนตสมบูรณ์จะพบว่ากลุ่มแบคทีเรียมีจำนวนน้อยกว่าจำนวนเริ่มต้น โดยอาจจะเกิดจาก กลุ่มแบคทีเรียบางส่วนหลุดออกมาระหว่างขั้นตอนการจำลอง (Morch, 2008) รูปร่างของเม็ดอัลจิเนตมีสภาพไม่สมบูรณ์ คือไม่เป็นทรงกลม ผิวไม่เรียบเสมอกัน ผลการทดลองที่ได้นี้มีความสอดคล้องกับรายงานของ Chen และ Huang (1988) ที่ทดลองตรึงเซลล์ *Trichosporon cutaneum* โดยใช้ความเข้มข้นอัลจิเนตเท่ากับ 2% 3% และ 4 % น้ำหนักต่อปริมาตร เปรียบเทียบความแข็งแรงเชิงกลพบว่าที่ความเข้มข้นอัลจิเนต 2 % น้ำหนักต่อปริมาตร จะมีความแข็งแรงเชิงกลต่ำกว่าความเข้มข้น 3% และ 4 % น้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ

การศึกษาปัจจัยของปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ในการตรึงพบว่า เมื่อใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นก่อนตรึงจาก 8.40 log CFU ต่อมิลลิลิตร เป็น 10.64 log CFU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อตรึงเสร็จสมบูรณ์มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 8.28 และ 10.37 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต ให้ผลความคงตัวไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าอยู่ในช่วง 8.28-8.91 และ 10.04-10.37 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต ตลอด14 ของการทดลอง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee และ Heo (2000) ศึกษาการตรึงเซลล์ *ifidobacterium longum* สายพันธุ์ KCTC 3128 and HLC 3742 ในอัลจิเนต โดยแปรปัจจัยของปริมาณเซลล์ตั้งต้นให้มีค่าเท่ากับ $10^8$ $10^9$ และ $10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่าปริมาณเซลล์ตั้งต้นไม่มีผลต่ออัตราการตายของเซลล์ที่มีชีวิตในเม็ดอัลจิเนต แต่ในงานวิจัยไม่ได้ทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน เนื่องจากมีรายงานวิจัยของ Rahman และคณะ (2008) ที่กล่าวว่าการใช้ปริมาณเซลล์ตรึงที่มีค่าสูง เปรียบเทียบกับการใช้ปริมาณเซลล์ต่ำกว่าประมาณสองเท่า มีค่า 3.7 x $10^{10}$ CFUต่อกรัม และ 1.8 x $10^{10}$ CFUต่อกรัม พบว่า

ประสิทธิภาพการย่อยสลายของเซลล์ตรึงที่มีจำนวนเซลล์น้อยจะให้มีประสิทธิภาพสูงกว่าเซลล์ตรึงที่มีจำนวนเซลล์สูง โดยให้เหตุผลว่าจากการที่จำนวนเซลล์มากจึงเกิดภาวะแย่งชิงอาหาร นอกจากนี้อัตราการแพร่ออกซิเจนเข้าไปในเม็ดอัลจิเนตก็ถูกจำกัดไว้ด้วย

เนื่องจากสมบัติของอัลจิเนตที่ใช้มีความเหมาะสมสำหรับใช้ในงานตรึงเซลล์จุลินทรีย์ ดังนั้นก่อนใช้งานเพื่อบำบัดจึงได้มีการทดสอบความสามารถในการดูดซับปริมาณฟีแนนทรีนและไพรีนของเม็ดอัลจิเนตที่ไม่มีแบคทีเรียตรึง การวิเคราะห์ผลสกัดส่วนอาหารเหลว CFMM ผลการทดลองพบว่าฟีแนนทรีนและไพรีนมีสัดส่วนในอาหารเหลวต่อเม็ดอัลจิเนตมีค่าประมาณ 80 % ต่อ 20 % ของปริมาณฟีแนนทรีน และ 70 % ต่อ 30 % ของปริมาณไพรีน ซึ่งสอดคล้องกับขนาดโมเลกุลของสารประกอบ PAHs ได้แก่ ไพรีนและฟีแนนทรีนมีขนาดประมาณ 186 และ 169.5 อังสตรอมตามลำดับ (Yang และคณะ, 2006) สัมพันธ์กับลักษณะโครงสร้างรูพรุนของอัลจิเนต ที่มีจำนวนมากกระจัดกระจาย ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เท่ากัน ตั้งแต่ 50-1500 อังสตรอม (Rehm, 2009) โดยจัดอยู่ในกลุ่มมีโซพอร์ (meso pores) หรือ ทรานซิชันนัลพอร์ รัศมีของรูพรุนมากกว่าหรือเท่ากับ 15-1000 อังสตรอม ถึงกลุ่มแมคโครพอร์ (macro pores) รัศมีของรูพรุนมากกว่าหรือเท่ากับ 1000-2000 อังสตรอม ตามการจำแนกชนิดของรูพรุนตามรัศมี (Dubinin ,1966) ซึ่งขนาดของสารประกอบ PAHs อยู่ในระดับที่สามารถเข้าไปในโครงสร้างอัลจิเนตได้ แต่กลับพบว่ามีการดูดซับปริมาณน้อย อาจจะมีสาเหตุมาจากสารประกอบ PAHs มีสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic property) ในขณะที่อัลจิเนตมีสมบัติตรงกันข้ามกัน คือชอบน้ำ (hydrophilic property) จึงเป็นอุปสรรคต่อการจะเข้าไปในภายในโครงสร้างอัลจิเนตได้ (Rehm, 2009) แต่ทั้งนี้ทั้งนั้นปริมาณความเข้มข้นสารประกอบ PAHs ที่ใช้คือ 0.05 กรัมต่อลิตร ถือว่าเป็นความเข้มข้นที่ต่ำ จึงทำให้โอกาสการแพร่ผ่านเข้าในเม็ดอัลจิเนตจึงน้อยตามไปด้วย จากค่าปริมาณไพรีนที่ถูกดูดซับอยู่ในเม็ดอัลจิเนตมากกว่าฟีแนนทรีนอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ อาจจะมีสาเหตุจากค่าการละลายน้ำของไพรีนและฟีแนนทรีน มีค่าเท่ากับ 0.132 และ 1.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงทำให้โอกาสที่ฟีแนนทรีนจะอยู่ในส่วนน้ำจึงมากกว่าที่จะเข้าไปในเม็ดอัลจิเนต ในขณะที่ไพรีนมีค่าการละลายน้ำต่ำจึงมีโอกาสสัมผัสกับเม็ดอัลจิเนตสูงเมื่อเทียบกับโอกาสสัมผัสของฟีแนนทรีน

ในการทดลองเพิ่มความเข้มข้นไพรีน/ฟีแนนทรีนเป็น 10 และ 20 เท่า คือ ความเข้มข้น 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์อิสระใช้เวลาย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน เร็วกว่าเซลล์ตรึงเล็กน้อย และประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงกว่าทั้งสองความเข้มข้น เมื่อพิจารณาจำนวนเซลล์กลับพบว่าที่ความเข้มข้นไพรีน/ฟีแนนทรีนชนิดละ 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร เซลล์อิสระจะมีการเจริญสูงสุดในวันที่ 1 และมีแนวโน้มลดลงจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง (รูปที่ 4.15-4.18) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sikkema และคณะ, 1995 ความเข้มข้นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

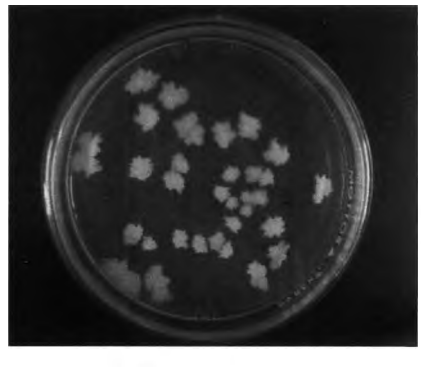
ปริมาณสูง สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยจะมีความเป็นพิษต่อแบคทีเรีย เมื่อสารกลุ่มนี้เกิดอันตรกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์จะมีผลต่อโครงสร้างและการหน้าที่เกิดการสะสมสาร ทำให้สูญเสียความหนาแน่นของโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ โปรตอนและไอออนต่างๆมีการแพร่ผ่านได้มากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังมีผลต่อไขมันและโปรตีนที่ฝังตัวอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Sikkema และคณะ, 1995) รบกวนกระบวนเมตาบอไลต์ การกระจายค่าความเป็นกรดด่างและค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า จากกระบวนการต่างๆ ที่เกิดขึ้นมักจะทำให้เกิดการไหลออกขององค์ประกอบในเซลล์ (cell lysis) จนทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Sequra และคณะ, 1999) ในขณะที่มีการตรึงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ด้วยอัลจิเนตนั้น มีการเจริญทั้งในและนอกเม็ดอัลจิเนตเป็นอย่างดีที่ความเข้มข้นไพรีนและฟีแนนทรีนสูง เนื่องจากวัสดุพาหะที่เป็นตัวห่อหุ้มเซลล์ จะทำหน้าที่เสมือนเกราะป้องกันเซลล์จากสารพิษภายนอก (Blandino และคณะ, 1999) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tallur และคณะ (2009) ศึกษาการย่อยสลายพาราครีซอล โดยใช้แบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ PHN 1 ตรึงบนวัสดุหลายชนิดได้แก่ พอลิยูริเทนโฟม พอลิอะคริเอไมล์ อัลจิเนต และอการ์ ผลการทดลองพบว่า อัตราการย่อยพาราครีซอลของแบคทีเรียตรึงบนวัสดุทุกชนิดมีค่าสูงกว่าเซลล์อิสระ

การนำกลุ่มแบคทีเรียตรึงใช้ภาวะการตรึงที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 4 % น้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ทดสอบการย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีนพบว่ามีจำนวนเซลล์ในเม็ดอัลจิเนตคงที่ระหว่าง 8.17-9.08 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนต ตั้งแต่เดือนแรกจนถึงเดือนที่ 3 และสามารถพบการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM –V3 ได้ในอาหารเหลว CFMM จากผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับรายงานวิจัยที่กล่าวว่า เซลล์แบคทีเรียที่ถูกตรึงอยู่บนหรือใกล้กับพื้นผิวด้านนอกจะสามารถหลุดออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเซลล์ที่หลุดออกมานี้จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วมากกว่าเซลล์แบคทีเรียที่ถูกตรึงอยู่ในเม็ดอัลจิเนต และที่ในวิธีการเลี้ยงแบบใช้ออกซิเจนพบว่าอัตราการหลุดออกนอกวัสดุตรึงพอลิเมอร์มีสาเหตุจากสมบัติทางกายภาพของวัสดุตรึง เช่น โครงสร้างเชิงกลที่จะเป็นตัวบอกความแข็งแรง ขนาดรูพรุน สายพันธุ์ของแบคทีเรีย ปริมาณเซลล์เริ่มต้น และภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อ (Tanaka และคณะ, 1989)

การศึกษาการนำกลุ่มแบคทีเรียตรึงกลับมาใช้งานซ้ำพบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีน ได้เป็นอย่างดี โดยไพรีนลดลงอย่างรวดเร็วในรอบการใช้งานครั้งที่ 2 เมื่อเทียบกับการใช้งานครั้งแรกที่การย่อยสลายใช้เวลานานมากกว่า สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kerrar และคณะ (2007) ทำการทดลองตรึงแบคทีเรีย *Rhodococcus erythropolis* สายพันธุ์ B4 ด้วยวิธี Cross-linking ที่เตรียมมาจาก poly (vinylpyrrolidone) hydrogel เพื่อนำมาใช้ย่อย

สลายแนพทาลีน และ แอนทราซีน ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียที่ผ่านการตรึงแล้วนำกลับมาใช้ใหม่อีกครั้งมีอัตราการย่อยสลายสารทั้ง 2 ชนิด สูงมากกว่าการนำมาใช้ครั้งแรก อัตราการย่อยสลายในการนำมาใช้ครั้งแรกที่ความเข้มข้น 0.1% ของแนพทาลีน และแอนทราซีน มีค่า 70.97 % และ 69.7 % ในเวลา 10 วัน ตามลำดับ ในขณะเดียวกันพบว่าอัตราการย่อยสลายแนพทาลีนและแอนทราซีน เมื่อนำมาใช้เป็นครั้งที่สองมีค่า 82.23 % และ 77.72 % ตามลำดับ ภายในเวลา 2 วัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการนำกลับมาใช้ซ้ำนั้นจะมีอัตราการย่อยสลายที่ดีกว่า เนื่องจากเชื้อสามารถที่จะดึงเอาซับสเทรตมาใช้ได้ง่ายมากขึ้น หากต้องการเห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนในแต่ละรอบการใช้งานควรเก็บตัวอย่างวิเคราะห์เป็นหน่วยชั่วโมง เนื่องจากกลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนรีนหมดอย่างรวดเร็ว

การบำบัดน้ำเสียห้องปฏิบัติการ พบว่ากลุ่มแบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 1 ของการทดลอง ปริมาณฟีแนนทรีนเหลืออยู่ 49.09 เปอร์เซ็นต์ ไพรีนเหลืออยู่ 74.59 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นการลดลงของไพรีนและฟีแนนทรีนที่เกิดขึ้นอาจมีสาเหตุจากแบคทีเรียที่มีอยู่เดิมในน้ำเสียห้องปฏิบัติการ หรือจากการดูดซับโดยเม็ดอัลจิเนต เนื่องจากหลังจากวันที่ 1 ของการทดลองจะไม่สามารถตรวจพบกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนอาหารแข็ง LB แต่กลับพบลักษณะโคโลนีอื่นแทน ดังแสดงในรูปที่ 5.1 ในขณะที่เซลล์อิสระปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนจะลดลงเหมือนกับเซลล์ตรึง ฟีแนนทรีนเหลืออยู่ 90.70 เปอร์เซ็นต์ ไพรีนเหลืออยู่ 78.17 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 1 ของการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.21 ในขณะที่ชุดควบคุมเมื่อผ่านไป 10 วัน พบว่าปริมาณฟีแนนทรีนและไพรีนเหลืออยู่ถึง 78.61 และ 78.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งน่าจะเกิดจากกระบวนการทางกายภาพ เช่น เกิดปฏิกิริยาของแสง การเขย่า เป็นต้น (Lehto และคณะ, 2003)



พ.ย. 2552
เลขทะเบียน 7251
วันเดือนปี 25 ก.ย. 2560

**รูปที่ 5.1 ลักษณะโคโลนีในตัวอย่างน้ำเสียห้องปฏิบัติการทดสอบบนจานอาหาร LB**

จากการทดลอง พบว่า วันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดก่อนเติมลงในน้ำเสียห้องปฏิบัติการ ของกลุ่มแบคทีเรียตรึงในอัลจิเนต (ชุดการทดลองที่ 1) และ

กลุ่มแบคทีเรียเตรียมสด (ชุดการทดลองที่ 2) มีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 8.24 log CFU ต่อมิลลิลิตร และ 8.32 log CFU ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อใช้เติมลงในน้ำเสียห้องปฏิบัติการในวันที่ศูนย์พบว่ามีค่าเท่ากับ 8.03 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจิเนตและ 7.68 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ถึงแม้การนำจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs มาตรึงก่อนที่จะใช้จริงในน้ำเสียห้องปฏิบัติการ จะช่วยป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์หลุดออกนอกเม็ดตรึงก่อนที่เซลล์จะมีการปรับตัวให้เคยชินกับภาวะและรอดชีวิตอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์ในน้ำเสียห้องปฏิบัติการได้ อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้องกับการบำบัด เช่น ลักษณะสมบัติและชนิดสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของน้ำเสียที่ใช้บำบัด ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ในเม็ดอัลจิเนต ชนิดของจุลินทรีย์ในเม็ดอัลจิเนต เป็นต้น ที่จะเป็นตัวกำหนดผลสำเร็จในการใช้กลุ่มแบคทีเรียตรึง (Cassidy, 1996)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วย Scanning Electron Microscopy (SEM) ของเม็ดอัลจิเนตที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 10 วัน พบว่าโครงสร้างภายนอกและภายในเม็ดอัลจิเนตเปลี่ยนไปจากเดิมดังรูปที่ 4.24 และ 4.25 เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนบำบัด ภายหลังจากบำบัดแล้วลักษณะโครงสร้างภายนอกของเม็ดอัลจิเนตพบว่ามีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนจำนวนมาก กระจายอยู่ทั่วไป และโครงสร้างภายในเม็ดอัลจิเนตมีรูพรุนจำนวนมากกว่าเดิม ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้แบคทีเรียบางส่วนในเม็ดอัลจิเนตหลุดออกมาภายนอกได้ โดยอาจเกิดจากในน้ำเสียห้องปฏิบัติการมีส่วนประกอบของสารหลายชนิดที่ไม่อาจจำแนกได้ ทั้งเศษเซลล์ สารพิษที่มีธาตุคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลัก ตัวทำละลาย สารในกลุ่ม calcium chelating agent ได้แก่ แมกนีเซียมไอออน โปแตสเซียมไอออน หรือมีฟอสเฟต EDTA ซึ่งมีผลต่อสมบัติทางกายภาพของเจล โดยจะสามารถทำลายโครงสร้างอัลจิเนตได้ การทำงานของสารกลุ่มนี้จะทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนกลไกการจับของแคลเซียมไอออน (Chen และ Huang, 1988)

โดยสรุปการตรึงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ด้วยอัลจิเนตนั้น เป็นการปกป้องเซลล์จากไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นสูงได้ดี ทำให้มีการรอดชีวิตสูงรวมทั้งสามารถนำไปใช้งานซ้ำอย่างต่อเนื่องโดยยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายอย่างน้อย 4 รอบ

**ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยต่อไป**

1 เนื่องจากในการตรึงกลุ่มแบคทีเรียของงานวิจัยนี้ใช้เฉพาะอัลจิเนต จึงน่าจะทดลองเปลี่ยนวัสดุตรึงชนิดอื่นหรือผสมอัลจิเนตกับสารชนิดต่างๆ เช่น พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ ซิลิกา ไคโตซาน เป็นต้น เพื่อทำให้อัลจิเนตมีความแข็งแรงมากขึ้นและเกิดประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนสูงสุด

2. จากผลการบำบัดน้ำเสียห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีองค์ประกอบของตัวทำละลายจำนวนมากจนมีผลทำให้การเติมกลุ่มแบคทีเรียลงไปใช้บำบัดไม่เกิดผลดีเท่าที่ควร ดังนั้นในการทดลองต่อไปควรแยกน้ำเสียเฉพาะที่ทราบว่ามีส่วนประกอบใดบ้าง โดยทั่วไปแล้วการกำจัดของเสียอันตรายจะแยกประเภทเป็นปกติ และใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายสารนั้นและทำการตรึงเซลล์ด้วยภาวะที่เหมาะสมที่ทราบจากงานวิจัยนี้