

ประสิทธิภาพการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพของจุลินทรีย์



นางสาววรรณ จันทาสี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Efficiency of microorganisms in degrading biodegradable plastics

Miss Waraporn Jantasee



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Environmental Science

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ประสิทธิภาพการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพของ จุลินทรีย์
โดย	นางสาววราภรณ์ จันทาสี
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. ธนาวดี ลีจากภัย

---

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเนตร ชุตินธรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมใจ เพ็งปรีชา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ดร. ธนาวดี ลีจากภัย)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีรศ ศรีสถิตย์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.จินต์ อโณทัย)

วรารณณ์ จันทาสี : ประสิทธิภาพการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพของจุลินทรีย์ (Efficiency of microorganisms in degrading biodegradable plastics) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร. ธนาวัต ลี้จากภัย, 160 หน้า.

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อ ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ชนิด พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตวารีเรต (PHBV) ที่อุณหภูมิ 52 °C และ พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (PBS) ที่อุณหภูมิ 67 °C ด้วยจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบคัดแยกได้จากชุดทดสอบการย่อยสลาย PHBV และ PBS เป็นแบคทีเรียจำนวน 13 ไอโซเลท (PHBV 1 - 13) และ 12 ไอโซเลท (PBS 1 - 12) ตามลำดับ แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมดถูกนำมาใช้ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพในอาหารเหลวเบซอลมีเดียมภายใต้สภาวะออกซิเจนจำกัดระยะเวลาทดสอบ 4 สัปดาห์

จากงานวิจัยพบว่า แบคทีเรียที่ทดสอบย่อยสลายพลาสติกสามารถย่อยสลายแผ่นพลาสติกได้ดีกว่าชุดควบคุม แบคทีเรียที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดสามลำดับคือ PHBV 7 PHBV 5 และ PHBV 4 สำหรับชุดทดสอบ PHBV และ PBS 4 PBS 12 และ PBS 11 สำหรับชุดทดสอบ PBS ส่วนแบคทีเรียที่ย่อยสลายพลาสติก PHBV ได้ดีที่สุดเมื่อบ่มไว้ 4 สัปดาห์ คือ PHBV 11 (35.8%) PHBV 5 (28.7%) และ PHBV 4 (27.3%) ในขณะที่แบคทีเรียที่ย่อย PBS ได้ดีที่สุดเมื่อบ่มไว้ 4 สัปดาห์ คือ PBS 3 (40.2%) PBS 7 (35.4%) และ PBS 5 (33.9%) จากการวิเคราะห์ SEM พบว่าผิวของแผ่นพลาสติกเกิดรอยแตกและรอยตัดมีรอยขรุขระเป็นขุยสอดคล้องกับค่าการย่อยสลาย แบคทีเรียทั้งหมดมีลักษณะของเซลล์รูปร่างเป็นท่อน เมื่อจำแนกแล้วพบว่า PHBV 11 คือ *Lysinibacillus sphaericus* PHBV 5 คือ *Geobacillus toebii* และ PHBV 4 คือ *Geobacillus toebii* ในขณะที่ PBS 3 คือ *Bacillus clausii* PBS 7 คือ *Brevibacillus choshinesis* และ PBS 5 คือ *Geobacillus toebii*



สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5487214120 : MAJOR ENVIRONMENTAL SCIENCE

KEYWORDS: DEGRADATION / POLYHYDROXYBUTYRATE-CO-VALELATE / POLYBUTYLENE SUCCINATE / MICROORGANISM

WARAPORN JANTASEE: Efficiency of microorganisms in degrading biodegradable plastics.  
 ADVISOR: ASST. CHARNWIT KOSITANONT, Ph.D., CO-ADVISOR: THANAWADEE LEEJARKPAI, Ph.D.,  
 160 pp.

The aim of this research was to study the degradation efficiency of biodegradable plastic, Polyhydroxybutyrate-co-valerate (PHBV) and Polybutylene succinate (PBS), by microorganisms. The tests were done at 52°C for PHBV and 67°C for PBS. The microbes were isolated from soil incubated with the plastics, PHBV and PBS, at the specified temperatures. From PHBV incubated soil, 13 bacterial isolates (PHBV 1-13) were obtained while 12 bacterial isolates (PBS 1-12) were found in the PBS incubated soil. All isolated bacteria were used to study the efficiency of decomposition of biodegradable plastic in liquid basal medium under the condition of limited oxygen for 4 weeks.

After incubation for 4 weeks in liquid basal medium under the oxygen limited condition, all isolated bacteria decomposed biodegradable plastic better than the control. For bacteria from PHBV incubated soil, PHBV 7, PHBV 5, and PHBV 4 are the top three for growth rate. While PBS 4, PBS 12 and PBS 11 are the highest growth rate group from PBS incubated soil. But the highest PHBV degrading bacteria are PHBV 11 (35.8%), PHBV 5 (28.7%) and PHBV 4 (27.3%). The highest PBS degrading bacteria are PBS 3 (40.2%), PBS 7 (35.4%) and PBS 5 (33.9%). The SEM analysis showed that the surface of the plastics were cracked, grooved with a rough, flaky conditions. The changed surfaces were consistent with the decomposition degree. All the top degraders are rod shape bacteria. They were identified as *Lysinibacillus sphaericus* (PHBV 11), *Geobacillus toebii* (PHBV 5) (PHBV 4), *Bacillus clausii* (PBS 3), *Brevibacillus choshinensis* (PBS 7) and *Geobacillus toebii* (PBS 5).

Field of Study: Environmental Science

Academic Year: 2014

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วย ความกรุณาและความอนุเคราะห์อย่างยิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และอาจารย์ ดร. ธนาวดี ลีจากภักย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งได้ให้ความรู้ แนวคิด ข้อเสนอแนะรวมทั้งข้อคิดเห็นต่างๆ ของการศึกษา ด้วยดีตลอดมา ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการดำเนินการวิจัย รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ มีความสมบูรณ์ดียิ่งขึ้น ผู้ศึกษาจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.เชรศ ศรีสถิตย์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.จินต์ อดิษฐ์ ที่ให้ความกรุณาเกี่ยวกับข้อแนะนำต่างๆ ในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์และมีคุณค่ามากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และบุคคลในครอบครัวที่คอยช่วยเหลือ สนับสนุน ส่งเสริม การศึกษา ให้อุปการะสนับสนุนการศึกษา ตลอดจนเป็นกำลังใจที่ดีที่สุดเสมอมา

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (National Metal and Materials Technology Center) ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่นำมาใช้ในการทดลอง และสถานที่ในการเตรียมตัวอย่างทดลอง ขอขอบคุณโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์การฆ่าเชื้อแผ่นพลาสติกด้วยก๊าซเอธิลีนออกไซด์ ขอขอบคุณหลักสูตรสหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ในการทำวิทยานิพนธ์ และให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องวิเคราะห์ในการทดลองตลอดจนขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือ แนะนำ และให้กำลังใจตลอดระยะเวลาทำการศึกษา

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ .....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ .....	2
1.3 สมมติฐานการวิจัย .....	2
1.4 กรอบแนวความคิด.....	2
1.5 ขอบเขตการวิจัย .....	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	4
2.1 หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง .....	4
2.1.1 ความหมายและความสำคัญของพลาสติกชีวภาพ.....	4
2.1.2 การแยกประเภทของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพจากแหล่งวัตถุดิบ.....	5
2.1.3 กระบวนการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....	6
2.1.4 สารเติมแต่งพลาสติก ที่อยู่ในขั้นตอนกระบวนการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....	7
2.1.5 ความเป็นพิษของสารเติมแต่งพลาสติก .....	8
2.1.6 กระบวนการย่อยสลายของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....	8
2.1.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....	12

2.1.8 พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่สำคัญ .....	13
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	17
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูล .....	24
3.1 ภาพรวมของวิธีการทำการวิจัย.....	24
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	25
3.3 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย .....	26
3.4 การดำเนินการศึกษา.....	27
3.4.1 การเตรียมพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ .....	27
3.4.2 การเตรียมแบคทีเรีย .....	28
3.4.3 การเตรียมหน่วยทดลอง.....	28
3.5 ขั้นตอนดำเนินการศึกษา .....	29
3.5.1 การคัดแยกแบคทีเรีย.....	29
3.5.2 การทดสอบการย่อยสลายพลาสติก PHBV และ PBS .....	31
3.5.3 การวัดการเจริญของแบคทีเรีย.....	31
3.5.4 การศึกษาการย่อยสลายของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....	31
3.5.5 การวิเคราะห์พื้นผิวและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียและพลาสติก.....	31
3.5.6 การระบุชนิด (identified) แบคทีเรีย .....	32
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล .....	32
3.6.1 การวิเคราะห์แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพได้ดีที่สุด .....	32
3.6.2 การวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย.....	32
3.6.3 การวิเคราะห์ผลการย่อยสลายโดยการวิเคราะห์น้ำหนักที่ลดลง .....	32
3.6.4 การยืนยันผลของการย่อยสลายพลาสติกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM).....	33



3.6.5 การระบุชนิด (identify) แบคทีเรีย.....	34
บทที่ 4 ผลการศึกษาและการอภิปรายผล.....	36
4.1 การตัดแยกแบคทีเรีย.....	36
4.1.1 แบคทีเรียที่ตัดแยกจากดินบ่อฝึงบกขยะผสมกากตะกอน.....	36
4.2 การทดสอบการย่อยสลาย PHBV และ PBS.....	44
4.2.1 การทดสอบย่อย PHBV แบบตะจุดแบคทีเรียลงบนผิวหน้าอาหาร.....	44
4.2.2 การทดสอบย่อย PHBV แบบขีดแบคทีเรียลงบนผิวหน้าอาหาร.....	44
4.2.3 การทดสอบย่อย PBS แบบตะจุดแบคทีเรียลงบนผิวหน้าอาหาร.....	46
4.2.4 การทดสอบย่อย PBS แบบขีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร.....	46
4.3 การทดสอบย่อยสลายพลาสติกแบบใช้ในอาหารเหลว basal medium.....	48
4.3.1 การทดสอบย่อยสลายพลาสติก PHBV แบบใช้ในอาหารเหลว basal medium และการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย.....	48
4.3.2 การทดสอบย่อยสลายพลาสติก PBS แบบใช้ในอาหารเหลว basal medium และการ เจริญเติบโตของแบคทีเรีย.....	49
4.3.3 ลักษณะแผ่นพลาสติก PHBV หลังการบ่มในอาหารเหลว.....	51
4.3.4 ลักษณะแผ่นพลาสติก PBS หลังการบ่มในอาหารเหลว.....	52
4.3.5 ผลการทดสอบการย่อยสลายพลาสติกชนิด PHBV ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า.....	52
4.3.6 ผลการทดสอบการย่อยสลายพลาสติกชนิด PBS ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า.....	53
4.3.7 เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายพลาสติก PHBV (% degradation by weight).....	90
4.3.8 เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย PBS (% degradation by weight).....	91
4.3.9 ผลการวิเคราะห์พลาสติก PHBV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM).....	92

4.3.10 ผลการวิเคราะห์พลาสติก PBS ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM).....	96
4.3.11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแบบคทีเรียที่ย่อยสลาย PHBV ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) .....	100
4.3.12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแบบคทีเรียที่ย่อยสลาย PBS ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) .....	101
4.3.13 ชนิดแบบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายพลาสติก PHBV ได้ดี .....	102
4.3.14 ศึกษาชนิดแบบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายพลาสติก PBS ได้ดี.....	102
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ .....	105
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	105
รายการอ้างอิง .....	109
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ .....	117
ภาคผนวก ข สีย้อมและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	120
ภาคผนวก ง วิธีการขึ้นรูปแผ่นพลาสติก PHBV และ PBS.....	122
ภาคผนวก จ การใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) .....	124
ภาคผนวก ฉ การเจริญของแบบคทีเรียที่ใช้ทดสอบด้วยการวัดค่าความเข้มแสง O.D <sub>600</sub> ทำการวัดค่าทุกวันที่ 1 ,7, 14, 21 และ 28 ตามลำดับ.....	132
ภาคผนวก ช น้ำหนักแผ่นพลาสติก (ก่อน – หลัง) สัปดาห์ที่ 4 .....	142
ภาคผนวก ซ คุณสมบัติเบื้องต้นของแบบคทีเรีย .....	146
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	160

## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 แสดงสมบัติของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....	16
ตารางที่ 3.1 คุณสมบัติของ PHBV และ PBS .....	27
ตารางที่ 3.2 แสดงค่าการวิเคราะห์แบคทีเรียพร้อมทั้งรายงานเปอร์เซ็นต์ความน่าเชื่อถือสำหรับ ค่าของผลการทดสอบ .....	35
ตารางที่ 4. 1 ผลการวิเคราะห์ร้อยละการย่อยสลายของ PHBV (โดยน้ำหนัก).....	90
ตารางที่ 4. 2 ผลการวิเคราะห์ร้อยละการย่อยสลายของ PBS (โดยน้ำหนัก).....	92
ตารางที่ 4.3 ข้อมูลทั่วไปของแบคทีเรียที่ย่อย PHBV.....	103
ตารางที่ 4. 4 ข้อมูลทั่วไปของแบคทีเรียที่ย่อย PBS .....	104

## สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 ตัวอย่างพลาสติกชีวภาพที่เกิดการย่อยสลายได้ .....	2
รูปที่ 1.2 กรอบแนวความคิด .....	3
รูปที่ 2.1 ประเภทพอลิเอสเตอร์ .....	6
รูปที่ 2.2 กระบวนการผลิตพลาสติกชีวภาพ .....	7
รูปที่ 2.3 กระบวนการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....	8
รูปที่ 2.4 การย่อยสลายด้วยสภาวะใช้ออกซิเจน .....	11
รูปที่ 2.5 การย่อยสลายด้วยสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน .....	11
รูปที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของ PHBV .....	14
รูปที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของ PBS .....	15
รูปที่ 3.1 ภาพรวมของวิธีดำเนินงานวิจัย .....	24
รูปที่ 3.2 (a) เครื่องมือขึ้นรูป (compression) (b) ตัวอย่างแผ่นพลาสติกที่ขึ้นรูปได้ .....	27
รูปที่ 3.3 (a) ดินจากบ่อฝังกลบขยะ (b) กากตะกอนจากบ่อบำบัดน้ำเสีย.....	28
รูปที่ 3.4 หน่วยการทดลอง .....	29
รูปที่ 3.5 การขีดเชื้อแบบตัดกัน (คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2013).....	30
รูปที่ 3.6 เครื่อง Scanning Electron Microscope.....	33
รูปที่ 4. 1 ภาพถ่ายแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินบ่อฝังกลบขยะผสมกากตะกอนจากพลาสติกจากชุดการทดสอบ PHBV .....	37
รูปที่ 4. 2 ภาพถ่ายแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินบ่อฝังกลบขยะผสมกากตะกอนจากพลาสติกจากชุดการทดสอบ PBS .....	41
รูปที่ 4.3 ทดสอบการย่อยสลาย PHBV โดยวิธีการแตงแบคทีเรียเป็นจุดบนผิวหน้าอาหาร basal medium ผสมผง PHBV บ่ม 5 วันที่อุณหภูมิ 52 °C ในสภาวะออกซิเจนจำกัด (a) ชุดควบคุม (b) แบคทีเรียที่ทดสอบย่อยบนผิวหน้าอาหาร .....	44

รูปที่ 4. 4 ทดสอบการย่อยสลาย PHBV โดยวิธีการชีดแบคที่เรียบนผิวหน้าอาหาร basal medium .....	45
รูปที่ 4. 5 ทดสอบการย่อยสลาย PBS โดยวิธีการตะแบคที่เรียเป็นจุดบนผิวหน้าอาหาร basal ....	46
รูปที่ 4. 6 ทดสอบการย่อยสลาย PBS โดยวิธีการชีดแบคที่เรียบนผิวหน้าอาหาร basal medium .....	47
รูปที่ 4.7 กราฟแสดงความขุ่น (O.D. <sub>600</sub> ) ของอาหาร basal medium ที่จุ่ม PHBV และใส่แบคทีเรียทั้ง 7 ชนิด.....	49
รูปที่ 4. 8 กราฟแสดงความขุ่น (O.D. <sub>600</sub> ) ของอาหาร basal medium ที่จุ่ม PBS และใส่แบคทีเรียทั้ง 10 ชนิด.....	51
รูปที่ 4. 9 ภาพแสดงชุดทดสอบ PHBV หลังการทดสอบ 1 - 4 สัปดาห์ .....	55
รูปที่ 4. 10 ภาพแสดงชุดทดสอบ PBS หลังการทดสอบ 1 - 4 สัปดาห์.....	60
รูปที่ 4. 11 ภาพถ่าย PHBV หลังการทดสอบ 1 - 4 สัปดาห์ .....	64
รูปที่ 4.12 ภาพถ่าย PBS หลังการทดสอบ 1 - 4 สัปดาห์.....	71
รูปที่ 4. 13 ลักษณะของแผ่นพลาสติก PHBV ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยแบคทีเรียที่คัดเลือก ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ( x 100 เท่า).....	77
รูปที่ 4. 14 ลักษณะของแผ่นพลาสติก PBS ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยแบคทีเรียที่คัดเลือก ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ( x 100 เท่า).....	84
รูปที่ 4.15 ผลการวิเคราะห์พื้นผิวพลาสติก PHBV ด้วย SEM พื้นผิวด้านหน้า (x 5000 เท่า) และพื้นผิวขอบด้านข้าง (x 1000 เท่า) .....	93
รูปที่ 4. 16 ผลการวิเคราะห์พื้นผิวพลาสติก PBS ด้วย SEM พื้นผิวด้านหน้า (x 5000 เท่า) และพื้นผิวขอบด้านข้าง (x 1000 เท่า).....	97
รูปที่ 4. 17 ลักษณะของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่กำลังขยาย 20000X .....	101
รูปที่ 4. 18 ลักษณะของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่กำลังขยาย 20000X .....	101

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันมีการใช้พลาสติกที่เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์จากปิโตรเลียม ซึ่งมีคุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีเหมาะแก่การนำมาใช้งาน อีกทั้งกระบวนการผลิตมีต้นทุนที่ไม่แพงจึงมีการใช้อย่างมากในโลกยุคปัจจุบัน (Cho H. S. et al., 2011) เนื่องจากมีการใช้พลาสติกในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆมีผู้ประมาณว่ามีขยะพลาสติกที่ต้องกำจัดทั่วโลกถึง 150 ล้านตัน/ปี (Kim H. S. et al., 2006) แต่การสลายตัวของพลาสติกต้องใช้เวลาหลายสิบปี ส่งผลให้เกิดของเสียจากพลาสติกสะสมเป็นจำนวนมากทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอย่างมาก (Cadar O. et al., 2012) ด้วยเหตุนี้จึงมีการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพมาใช้ทดแทน พลาสติกสังเคราะห์ (Leejarkpai T. et al., 2004) พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพหลายชนิดได้รับการพัฒนาทั้งด้านสมบัติเชิงกล การทนความร้อน และพื้นผิวที่แข็งแรงแต่ยังคงย่อยสลายได้ง่าย (Cadar O. et al., 2012) และผลิตด้วยกระบวนการที่มีความเป็นพิษน้อย (Way C. et al., 2012)

อย่างไรก็ตามการนำพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพมาใช้จำเป็นต้องมีความรู้เรื่องพลาสติกอย่างครบวงจรตั้งแต่การผลิตไปจนถึงการย่อยสลายหลังจากการใช้งานแล้ว เพื่อป้องกันปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมและปัญหาด้านอื่นที่จะเกิดขึ้นในอนาคต (Rudeekit Y. et al., 2004) ความรู้เรื่องวิธีเร่งกระบวนการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพของแบคทีเรียที่มีในสภาวะตามธรรมชาติ ในดินหรือหลุมฝังกลบที่ต้องไม่ก่อให้เกิดมลพิษหรือปล่อยสารพิษออกมา (Wu C., 2012) จึงเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งในการศึกษานี้จะศึกษาการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพ 2 ชนิดคือ Polyhydroxybutyrate-valerate (PHBV), Polybutylene succinate (PBS) เป็นต้น



รูปที่ 1.1 ตัวอย่างพลาสติกชีวภาพที่เกิดการย่อยสลายได้  
(ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ, 2010)

## 1.2 วัตถุประสงค์

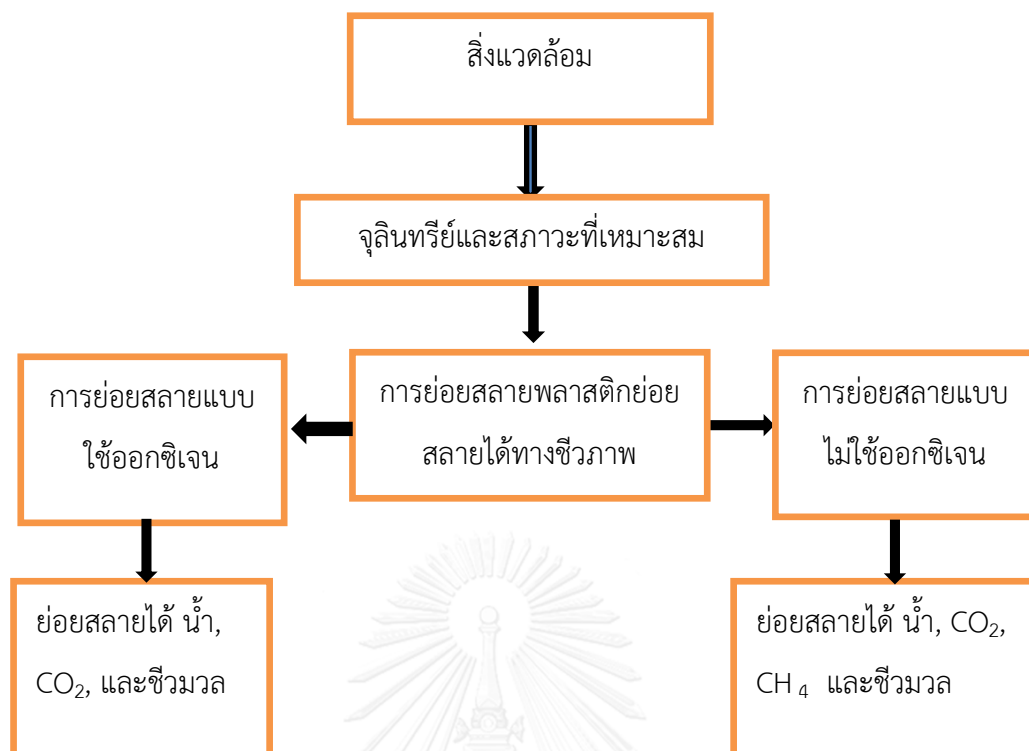
เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพของแบคทีเรีย

## 1.3 สมมติฐานการวิจัย

จุลินทรีย์ที่คัดแยกจากดินบ่อฝังกลบขยะผสมกับกากตะกอนสามารถย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพได้

## 1.4 กรอบแนวความคิด

วัตถุประสงค์หลักในงานวิจัยนี้เพื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพโดยการทำงานของแบคทีเรีย เพราะจากการที่มีการใช้พลาสติกมากมายในปัจจุบันก่อให้เกิดปัญหาต่อสภาพแวดล้อมเป็นอย่างมาก จากการวิจัยจะทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ดังนั้นการที่หันมาใช้พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ น่าจะเป็นหนทางที่จะลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดี



รูปที่ 1.2 กรอบแนวความคิด

### 1.5 ขอบเขตการวิจัย

1. เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ
2. ดินที่ทำการศึกษามาจากบ่อฝังกลบขยะเทศบาลเมือง อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี
3. กากตะกอน (sludge) ที่ใช้ทำการศึกษามาจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้ มาลี จังหวัดนครปฐม

### 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของการทำงานของแบคทีเรียว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ
2. เป็นข้อมูลสำหรับการวิจัยต่อไปเกี่ยวกับระบบย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพต่อไปในอนาคต



## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง 2.1

##### 2.1.1 ความหมายและความสำคัญของพลาสติกชีวภาพ

พลาสติก คือ สารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์พวกไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ประกอบด้วยโมเลกุลซ้ำๆ กันต่อกันเป็นโมเลกุลสายยาวๆ ประกอบด้วยธาตุสำคัญที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจาก คาร์บอน ซิลิคอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน ออกซิเจน และคลอรีน ผ่านกระบวนการ polymerization สกัดจากวัตถุดิบ เช่น น้ำมัน ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน (Seymour, 1989) พลาสติกแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ เทอร์โมพลาสติก และ เทอร์โมเซตติงพลาสติก (Alauddin M. et al., 1995) พลาสติกที่ใช้ในปัจจุบันต้องใช้เวลาหลายสิบปีในการย่อยสลายเกิดการสะสมของพลาสติกที่เป็นขยะจำนวนมากจึงเป็นปัญหาในการกำจัดอีกทั้งยังก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม

พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable plastic) คือ พลาสติกที่ถูกออกแบบมาให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม หรือ กำหนดไว้ โดยเฉพาะ (สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553) ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างจนเกิดการย่อยสลายได้ เป็นสาเหตุทำให้สมบัติต่างๆของพลาสติกลดลงภายในช่วงเวลาหนึ่ง สามารถทำการวัดได้โดยใช้วิธีทดสอบมาตรฐานที่เหมาะสมกับชนิดของพลาสติกและการใช้งาน (ISO 472, 1999) พลาสติกย่อยสลายมีกลไกการย่อยสลายด้วยสิ่งมีชีวิต ซึ่งเมื่อย่อยสลายหมดแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น น้ำ มวลชีวภาพ ก๊าซมีเทน และ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ผลการทดสอบการย่อยสลายสามารถนำมาประยุกต์ในการระบุชนิดและประเภทของพลาสติกย่อยสลายได้ พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพจะมีรูปแบบและสมบัติต่างๆในการใช้งานเช่นเดียวกับพลาสติกโดยทั่วไป แต่จะมีความแตกต่างกันตรงที่เมื่อทิ้งพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพนี้ไปเป็นขยะและอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมคือ มีการทำงานของสิ่งมีชีวิตต่างๆ พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพก็จะสามารถเกิดการย่อยสลายได้ ประเภทของพลาสติกชีวภาพในปัจจุบัน เช่น Polyhydroxyalkanoates (PHAs), Polylactic acid (PLA), Polybutylene succinate (PBS),

Polybutyleneadipate-co-terephthalate (PBAT), Poly hydroxybutyrate-valerate (PHBV) ฯลฯ

## 2.1.2 การแยกประเภทของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพจากแหล่งวัตถุดิบ

สามารถแยกประเภทตามแหล่งวัตถุดิบได้ 2 ประเภทคือ

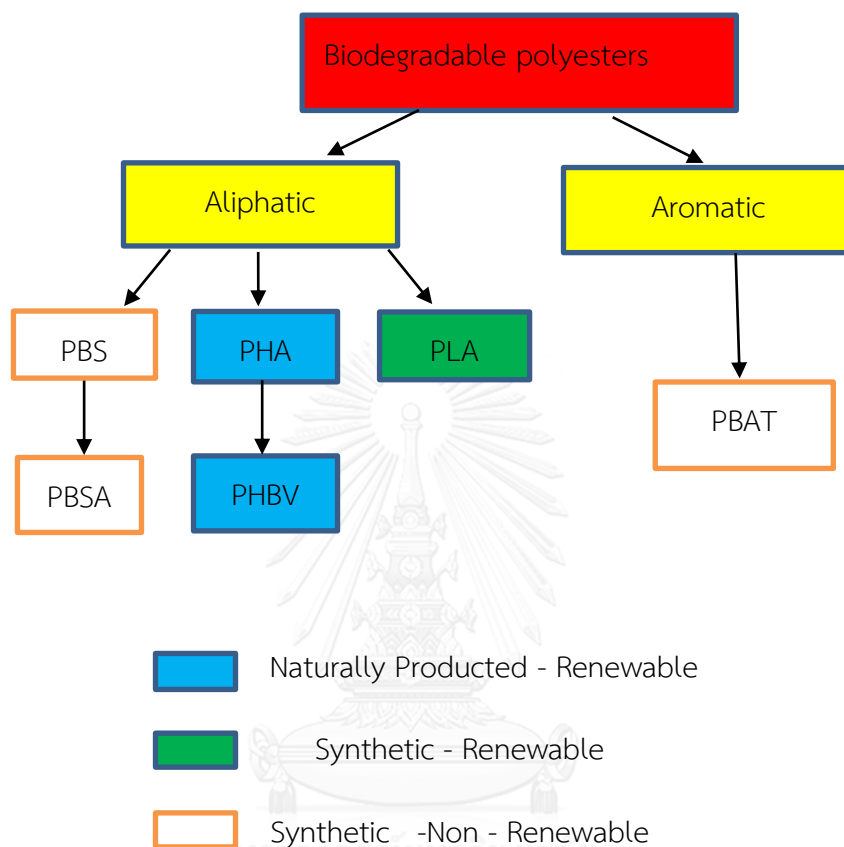
### 1. วัตถุดิบจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

- 1) พอลิเมอร์ที่แยกได้โดยตรงจากพืชและสัตว์
  - พอลิแซคคาไรด์ เช่น แป้ง เซลลูโลส ลิกนิน และไคติน
  - โปรตีน เช่น เคซีน เจลาติน
  - น้ำมันจากพืชและสัตว์
- 2) พอลิเอสเทอร์ผลิตโดยแบคทีเรียหรือพืชที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ เช่น พอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ (Polyhydroxyalkanoates, PHAs)
- 3) พอลิเอสเทอร์สังเคราะห์จากมอนอเมอร์ที่ผลิตจากกระบวนการทางชีวภาพ เช่น พอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid, PLA)

### 2. วัตถุดิบจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมี

- 1) แอลิฟาติก พอลิเอสเทอร์ (aliphatic polyester) เช่น พอลิบิวทิลีน-ซัคซิเนต (Polybutylene succinate, PBS) พอลิไกล์โคลิกแอซิด (polyglycolic acid, PGA) และพอลิคาร์โพรแลกโตน (Poly-ε-caprolactone, PCL)
- 2) แอโรมาติก พอลิเอสเทอร์ (aromatic polyester) เช่น พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต อะดิเปต (Polybutylene succinate adipate, PBSA)
- 3) พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl alcohols, PVOH)
- 4) พอลิโอเลฟินที่ผ่านการเติมแต่งทางเคมี (modified polyolefin) เช่น การเติมสารเติมแต่งที่มีความว่องไวต่ออนุมูลหรือแสงลงในพลาสติก เช่น พอลิเอทิลีน (Polyethylene, PE) หรือ พอลิโพรพิลีน (Polypropylene, PP) เพื่อเป็นการเร่งอัตราการย่อยสลายให้รวดเร็ว

พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่เป็นพอลิเอสเตอร์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทได้คือ 1. Aliphatic 2. Aromatic (Nolan-ITU Pty Ltd., 2000) พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพทั้ง 2 กลุ่มเป็นดังนี้



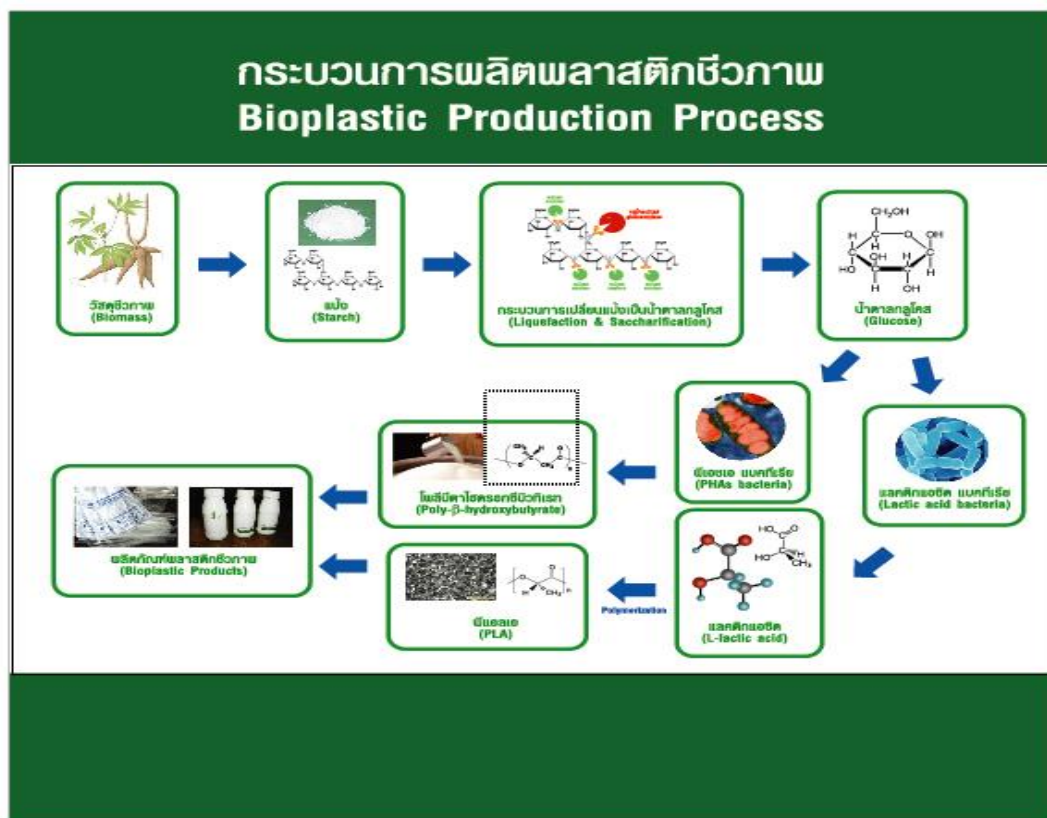
รูปที่ 2.1 ประเภทพอลิเอสเตอร์

(ปกรณ์ โสภาประกาศิต & มัณฑนา โสภาประกาศิต, 2551)

### 2.1.3 กระบวนการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

กระบวนการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพนั้นเริ่มจากการนำวัตถุดิบจากธรรมชาติ คือ มันสำปะหลัง ข้าวโพด ข้าวสาลี มันฝรั่ง มาบดให้ละเอียดทำให้เป็นแป้งและมาผ่านเทคโนโลยี ด้วยกระบวนการแซคคาริฟิเคชันด้วยเอนไซม์เปลี่ยนรูปเป็นกลูโคสเหลว เข้าสู่กระบวนการหมักด้วย แบคทีเรียจะได้ออกมาในรูปของกรด Lactic acid, Succinic acid, PHAs และเข้าสู่กระบวนการพอลิเมอไรเซชันกลายเป็นพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เช่น PLA PBS ถูกนำไปขึ้นรูปด้วย กระบวนการการคอมพาวด์เพื่อปรับสมบัติทางกายภาพและสมบัติทางกลของพลาสติกชีวภาพให้มี คุณสมบัติที่ดีขึ้น โดยการผสมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่นหรือการเติมสารเติมแต่ง

(Additive) ออกมาในรูปผลิตภัณฑ์พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพเช่น ส้อม ช้อน ถุงพลาสติกปลูกต้นไม้ ภาชนะใส่อาหาร ถุงใส่ของ ฯลฯ



รูปที่ 2.2 กระบวนการผลิตพลาสติกชีวภาพ  
(วชิระ และคณะ, 2012)

#### 2.1.4 สารเติมแต่งพลาสติก ที่อยู่ในขั้นตอนกระบวนการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

สารจำพวก สี สารพลาสติกไซเซอร์ สารเพิ่มเสถียรภาพ สารเสริมแรง (reinforcing-agent) สารช่วยผสม (compatibilizer) สารก่อผลึก (nucleating-agent) และ ฟิลเลอร์ โดยสารเหล่านี้ อาจส่งผลให้มีความเป็นพิษขึ้นมาได้ (สุภาณี หิรัญธนกิจจากุล, 2538) การทดสอบการย่อยสลาย พลาสติกมีการนำวัสดุประเภทอื่นมาผสมกับพลาสติกในการทดสอบการย่อยสลาย เพราะว่าการนำ วัสดุอื่นมาผสมกับพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของพลาสติกย่อย

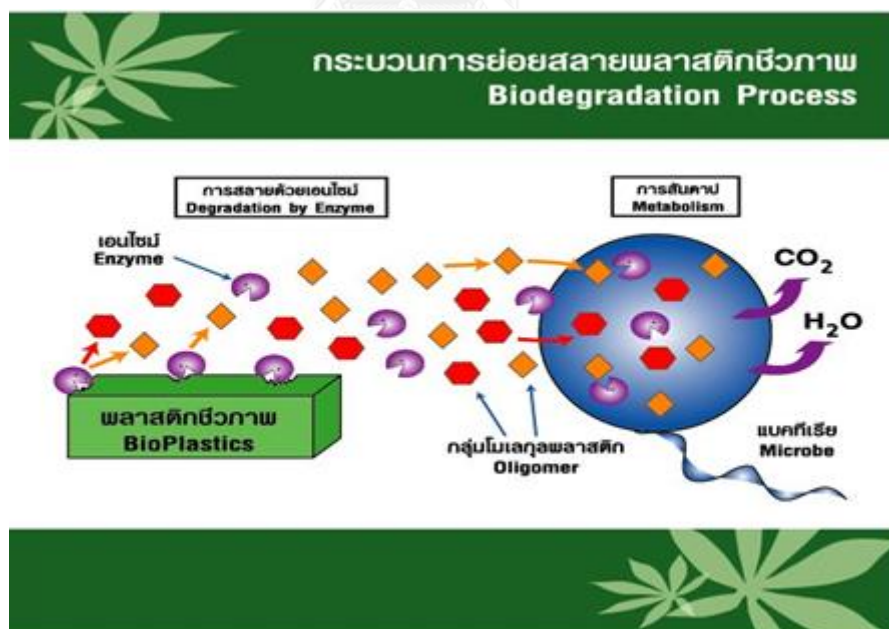
สลายได้ทางชีวภาพนั้น จะส่งผลให้เกิดการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพผสมที่ให้ผลดีกว่าพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพบริสุทธิ์ที่ไม่ได้ผสมวัสดุอะไรลงไป ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของแบคทีเรียให้ดียิ่งขึ้น เป็นการพัฒนาประสิทธิภาพของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพเดิมให้มีประสิทธิภาพของการย่อยสลายทางชีวภาพมากยิ่งขึ้น

### 2.1.5 ความเป็นพิษของสารเติมแต่งพลาสติก

สารมลพิษเหล่านี้ที่ถูกเติมลงไปในกระบวนการผลิตพลาสติกนั้นไม่ค่อยแสดงความเป็นพิษอย่างเฉียบพลัน แต่จะแสดงในลักษณะพิษเรื้อรังเป็นผลให้เกิดอาการตกเลือดในปอด (lung-hemorrhage), ตับโต (hepatomegaly) เป็นพิษต่อเซลล์ในร่างกาย (cytotoxicity) ทำให้เกิดมะเร็ง (carcinogenicity) เกิดการก่อกลายพันธุ์ (mutagenicity) และทารกในครรภ์มีรูปร่างผิดปกติ (teratogenicity) (สุภาณี หิรัญธนกิจจากกุล, 2538)

### 2.1.6 กระบวนการย่อยสลายของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

กระบวนการย่อยสลายของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพเริ่มด้วยกระบวนการสลายด้วยเอนไซม์และสิ่งมีชีวิตผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมได้น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ ชีวมวลและก๊าซมีเทน



รูปที่ 2.3 กระบวนการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

(B & B interpack, 2011)

## (1) ประเภทของการย่อยพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

จะแบ่งประเภทของการย่อยสลายออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

### 1. กระบวนการย่อยสลายทางฟิสิกส์

การย่อยสลายได้ด้วยแสง (Photo degradation) เป็นการย่อยสลายได้ด้วยแสง ซึ่งการย่อยสลายจะเกิดจากการขึ้นตอนการผลิตพลาสติกที่มีการเติมสารเติมแต่งที่มีปฏิกิริยาที่ไวต่อแสงลงในพลาสติกหรือการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ให้มีหมู่ฟังก์ชันหรือพันธะเคมีที่ไม่แข็งแรงพอต่อการแตกหัก ซึ่งจะสามารถเกิดการแตกหักได้โดยง่ายเมื่อได้รับรังสี (UV) เช่น มีหมู่คีโตน (Ketone group) อยู่ในพลาสติก เมื่อสัมผัสกับรังสียูวีจะเกิดการแตกหักของพันธะกลายเป็นอนุมูลอิสระ (Free radical) ขึ้นซึ่งมีความไม่เสถียร เกิดปฏิกิริยากับคาร์บอนในสายโซ่ พอลิเมอร์ทำให้เกิดการขาดจากกันของสายโซ่พอลิเมอร์แต่การย่อยสลายแบบนี้จะไม่สามารถย่อยสลายได้ในสภาวะฝังกลบหรือสภาวะแวดล้อมที่ไม่มีแสง

การย่อยสลายทางกล (Mechanical Degradation) เป็นการให้แรงกระทำแก่แผ่นพลาสติกทำให้ชิ้นส่วนพลาสติกแตกออกเป็นชิ้นๆ

### 2. กระบวนการย่อยสลายทางเคมี

การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative Degradation) เป็นการย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนลงในโมเลกุลของพอลิเมอร์สามารถเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติ ปฏิกิริยาจะเกิดอย่างช้าๆ โดยมีออกซิเจน ความร้อน แสงยูวี หรือแรงทางกลเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการย่อยสลาย โดยจะเกิดเป็นสารประกอบไฮโดรเปอร์-ออกไซด์ (hydroper-oxide, ROOH) ในพลาสติกที่ไม่มีการเติมสารเติมแต่งที่ทำหน้าที่เพิ่มความเสถียร (stabilizing additive) แสง และ ความร้อนจะทำให้ ROOH แตกตัวกลายเป็นอนุมูลอิสระ RO และ OH ที่ไม่เสถียรจะเข้าทำปฏิกิริยาต่อที่พันธะเคมีบนตำแหน่งคาร์บอนในสายโซ่ของพอลิเมอร์ ทำให้เกิดการแตกหักและสูญเสียสมบัติเชิงกลอย่างรวดเร็ว การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลติก (Hydrolytic Degradation) เป็นการย่อยสลายของพอลิเมอร์ที่มีหมู่เอสเทอร์ หรือ เอไมด์ เช่น แป้ง พอลิเอสเทอร์

พอลิแอนไฮดรายด์พอลิคาร์บอเนต และ พอลิยูริเทน ผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ก่อให้เกิดการแตกหักของสายโซ่พอลิเมอร์ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เกิดขึ้นโดยทั่วไป แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ประเภทที่ใช้คะตะลิสต์ (Catalytic hydrolysis) และ ไม่ใช้คะตะลิสต์ (Non-Catalytic Hydrolysis) ซึ่งประเภทแรกยังแบ่งออกได้เป็น 2 แบบคือ แบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายนอกโมเลกุลของพอลิเมอร์เร่งให้เกิดการย่อยสลาย (External Catalytic Degradation) และแบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์เองในการเร่งให้เกิดการย่อยสลาย (Internal catalytic degradation) โดยคะตะลิสต์จากภายนอกมี 2 ชนิด คือ คะตะลิสต์ที่เป็นเอนไซม์ต่างๆ (Enzyme) เช่น Depolymerase lipase esterase และ glycohydrolase ในกรณีนี้จัดเป็นการย่อยสลายทางชีวภาพ และคะตะลิสต์ที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Non-enzyme) เช่น โลหะแอลคาไลด์ (alkaline metal) เบส (base) และกรด (acid) ที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมในธรรมชาติ ในกรณีนี้จัดเป็นการย่อยสลายทางเคมี สำหรับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์นั้นใช้หมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl Group) ของหมู่เอสเทอร์ หรือเอไมด์บริเวณปลายของสายโซ่พอลิเมอร์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

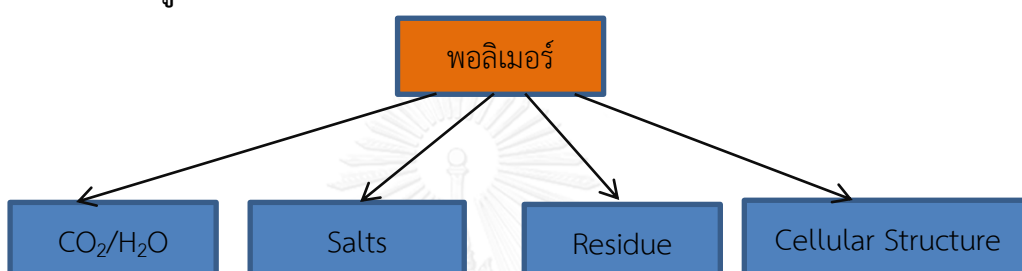
### 3. กระบวนการย่อยสลายย่อยสลายทางชีววิทยา

การย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation) เป็นการย่อยสลายของพอลิเมอร์โดยการทำงานของสิ่งมีชีวิต โดยทั่วไปมี 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกของการย่อยสลายจะเกิดขึ้นภายนอกเซลล์โดยการปลดปล่อยเอนไซม์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งเกิดได้ทั้งแบบใช้ endo - enzyme หรือ เอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกตัวของพันธะภายในสายโซ่พอลิเมอร์อย่างไม่เป็นระเบียบ และแบบ exo - enzyme หรือ เอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกหักของพันธะที่ละหน่วยจากหน่วยซ้ำที่เล็กที่สุดที่อยู่ด้านปลายของสายโซ่พอลิเมอร์ ขั้นตอนที่สองเมื่อพอลิเมอร์แตกตัวจนมีขนาดเล็กพอจะแพร่ผ่านผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์ และเกิดการย่อยสลายได้ผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้าย (ultimate biodegradation) คือ พลังงาน และสารประกอบขนาดเล็กในธรรมชาติ (Mineralization) เช่น แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แก๊สมีเทน น้ำ เกลือแร่ธาตุต่างๆ และมวลชีวภาพ (biomass) (ธนาวัต ลีจากภักย์, 2549)

นอกเหนือจากกระบวนการย่อยสลายพลาสติกทางฟิสิกส์ เคมี ชีววิทยา เรายังสามารถแบ่งการย่อยสลายออกได้อีกตามสภาวะที่ใช้ในการย่อยสลายเป็นการย่อยสลายด้วยสภาวะใช้ออกซิเจน และ การย่อยสลายด้วยสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน

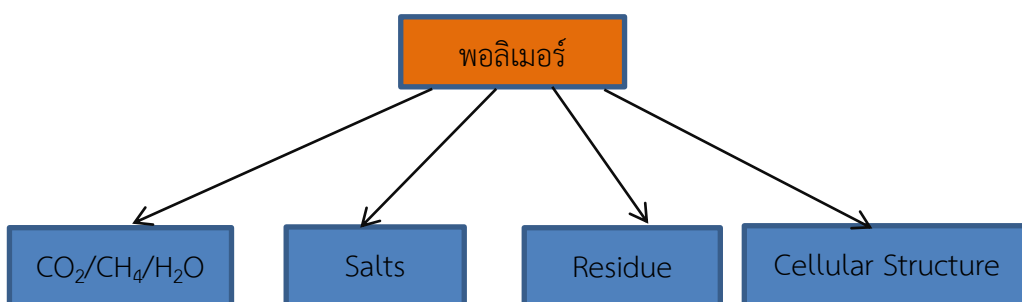
## (2) การย่อยสลายทางชีวภาพแบ่งตามสภาวะการย่อยสลาย

1. การย่อยสลายด้วยสภาวะใช้ออกซิเจน (Bryson J.A., 1995) ใช้การทดสอบการหายใจของแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน (Aerobic) ซึ่งจากการที่แบคทีเรียย่อยพลาสติกชีวภาพที่เป็นพอลิเมอร์จะได้ผลดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 การย่อยสลายด้วยสภาวะใช้ออกซิเจน

2. การย่อยสลายด้วยสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน (Bryson J.A., 1995) ใช้ในการทดสอบแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic) ซึ่งจากการที่แบคทีเรียย่อยพลาสติกชีวภาพที่เป็นพอลิเมอร์จะได้ผลดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 การย่อยสลายด้วยสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน



การทดสอบการย่อยสลายแบบ Aerobic และ Anaerobic มีความเหมือนหรือแตกต่างกันดังนี้

ความเหมือนของการย่อยสลายแบบ Aerobic และ Anaerobic คือการย่อยสลายโดยการทำงานของแบคทีเรียแต่เป็นแบคทีเรียคนละชนิด แต่สิ่งที่แตกต่างกันคือการย่อยสลายแบบ Aerobic จะใช้ออกซิเจนในการย่อยสลาย ซึ่งจากงานวิจัยจะเห็นได้ว่าการเพิ่มปริมาณออกซิเจนและมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนให้มีความเหมาะสมต่อการทำงานของแบคทีเรีย เพราะถ้าปริมาณออกซิเจนไม่เหมาะสมการทำงานของแบคทีเรียจะมีประสิทธิภาพน้อย ส่วนการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนนั้นในระบบจะไม่มีการใช้ออกซิเจนเลย ส่วนมากระบบจะเป็นระบบปิดเพื่อจำลองสภาวะการฝังกลบพลาสติก แบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะนี้จะทำงานได้มีประสิทธิภาพโดยปราศจากออกซิเจน มีการควบคุมระบบไม่ให้มีก๊าซออกซิเจนในระบบ ซึ่งจะเป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียย่อยสลายพลาสติกได้

กระบวนการย่อยสลายพลาสติกนั้นจะเกิดขึ้นได้ต้องมีปัจจัยอื่นๆ นอกเหนือจากกระบวนการย่อยสลายทางฟิสิกส์ เคมี ชีววิทยา มาร่วมด้วยจึงจะเกิดการย่อยสลายที่เหมาะสม

## 2.1.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

### 1. โครงสร้างทางเคมีของพอลิเมอร์

จะต้องมีโครงสร้างของโมเลกุลที่ง่ายต่อการทำงานของเอนไซม์และของแบคทีเรีย ซึ่งโครงสร้างส่วนใหญ่จะต้องมีเฮเทอโรอะตอม (hetero atom) ที่สารประกอบจะมีวงแหวนประกอบด้วยอะตอมต่างชนิดกัน เช่น อะตอมของธาตุออกซิเจน ไนโตรเจน หรือ กำมะถัน อยู่บนโครงสร้างหลักของสายโซ่พอลิเมอร์ หรือมีพันธะอีเทอร์ เอไมด์ หรือ เอสเทอร์ ซึ่งง่ายต่อการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ปฏิกิริยานี้จะทำให้สายโซ่พอลิเมอร์เกิดการแตกหักได้โดยง่าย ส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลมีขนาดเล็กลง จนสามารถละลายได้ดีในน้ำและสามารถแพร่ผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าไปสัมผัสพื้นผิวของพลาสติกส่งผลให้เกิดการย่อยสลายได้

(ธนาวัตี ลีจากภัย, 2549)

## 2. ชนิดของแบคทีเรีย

ในธรรมชาติมีแบคทีเรียหลากหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดก็สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ที่มีความจำเพาะและเหมาะสมต่อการย่อยสลายพลาสติก การย่อยสลายของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพไม่จำเป็นต้องมาจากการทำงานของแบคทีเรียชนิดเดียวกัน (ธนาวดี ลีจากภัย, 2549) แต่สามารถมาจากแบคทีเรียหลากหลายชนิดที่ทำงานร่วมกัน

## 3. สภาพแวดล้อม

การปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ส่งผลต่อการย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เช่น อุณหภูมิ ปริมาณแก๊สออกซิเจน ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความชื้น และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C: N ratio) (ธนาวดี ลีจากภัย, 2549) มีการควบคุมสภาวะของการหมักพลาสติกในห้องปฏิบัติการเพราะว่าสามารถควบคุมสภาวะการหมักในดินและการย่อยสลายในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ง่าย มีการควบคุมความชื้นในการทดสอบ 50 - 70 % และมีการควบคุมอุณหภูมิ ตั้งแต่ 30 - 80 °C ซึ่งเราจะสามารถแบ่งช่วงของอุณหภูมิเป็น 3 ช่วงได้ดังนี้

1. Mesophilic                      10 - 40 °C
2. Thermophilic                    40 - 55 °C
3. Hyperthermophilic            55 - 80 °C

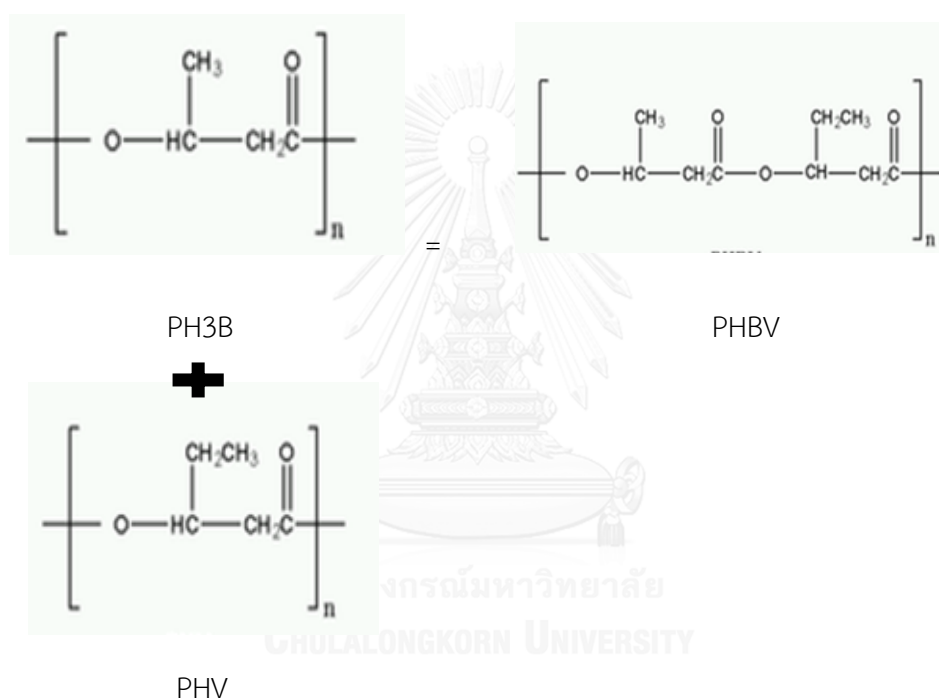
### 2.1.8 พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่สำคัญ

#### 1. Polyhydroxybutyrate - valerate (PHBV)

ผลิตภัณฑ์จาก Polyhydroxybutyrate-valerate (PHBV) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ประเภทพอลิเอสเทอร์ได้จากกระบวนการหมักแป้งหรือน้ำตาลด้วยแบคทีเรียซึ่งโครงสร้างจะมีคุณสมบัติที่ขึ้นอยู่กับ hydroxyvalerate หรือ HV ที่เป็นองค์ประกอบแสดงโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 2.6 มีจุดหลอมเหลวและความทนต่อแรงดึง (tensile strength) น้อย แต่มีความสามารถในการยืดหยุ่น (flexibility) การทนต่อแรงกระแทก (impact strength)

มากกว่า มีความเสถียรในน้ำ น้ำมัน และแอลกอฮอล์ แต่ไม่ทนหรือทนต่อสภาพกรดและด่างได้น้อย ทนทานต่อรังสียูวี แต่มีคุณสมบัติให้ออกซิเจนซึมผ่านได้ดีการนำไปใช้ประโยชน์

PHBV มีคุณสมบัติของพลาสติกคล้ายกับ polypropylene จึงนิยมมาผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์ต่างๆ เช่น ขวดแชมพู ด้านการแพทย์ถูกนำมาประยุกต์ใช้ เช่น ไหมเย็บแผล อุปกรณ์ฝังในร่างกาย ด้านการเกษตรถูกนำมาใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มและปลดปล่อยยาฆ่าแมลง ด้านอิเล็กทรอนิกส์และการสื่อสาร เช่น ชิ้นส่วนประกอบในโทรศัพท์เคลื่อนที่ เป็นต้น



รูปที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของ PHBV

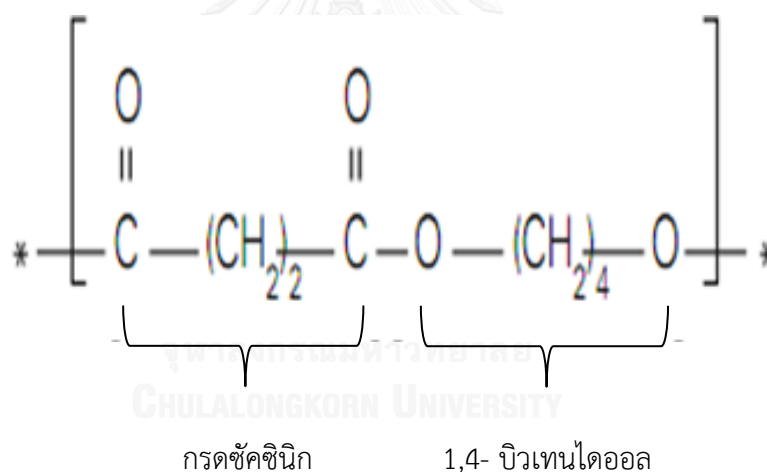
(Wikipedia, 2013)

## 2. Polybutylene succinate (PBS)

PBS เป็นพอลิเอสเทอร์สังเคราะห์ที่มีโครงสร้างเป็นสายโซ่ตรงแสดงในรูปที่ 2.7 สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ซึ่งเตรียมได้จากปฏิกิริยาการควบแน่นของกรดซัคซินิก และ 1,4 - บิวเทนไดออล โดยกรดซัคซินิก และ 1,4 - บิวเทนไดออล เป็นมอนอเมอร์ตั้งต้นที่ใช้ในการผลิต PBS โดยในปัจจุบันมอนอเมอร์ทั้งสองชนิดเตรียมได้จากผลิตภัณฑ์ทางปิโตรเคมี

โดยเริ่มต้นจากก๊าซ บิวเทนถูกเปลี่ยนไปเป็นมาเลอิกแอนไฮไดรด์ จากนั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดซัคซินิก และ 1,4 - บิวเทนไดออลต่อไป อย่างไรก็ตามกรดซัคซินิกยังสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบที่ปลูกทดแทนได้ใหม่จากกระบวนการทางชีวภาพโดยการหมัก และสามารถเป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิต 1,4 - บิวเทนไดออล โดยผ่านการเตรียมเป็นมาเลอิกแอนไฮไดรด์ก่อนจากนั้นมอนอเมอร์ทั้งสองคือ กรดซัคซินิก และ 1,4 - บิวเทนไดออล จะเกิดปฏิกิริยาการควบแน่นแล้วเชื่อมต่อกันเป็นสายโซ่ยาวของ PBS

PBS สามารถนำไปใช้แทนที่ PET และ PP และสามารถนำไปใช้แทนที่พอลิโอเลฟิน โดยเฉพาะ LDPE HDPE และ PLA การนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ เช่น หลอดฉีดยา ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้ง ฟิล์มบรรจุภัณฑ์อาหาร ขวดน้ำ เบาะโฟม ฯลฯ สมบัติของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดอื่นแสดงดังในตารางที่ 2.1



รูปที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของ PBS

(PTT, 2010)

ตารางที่ 2.1 แสดงสมบัติของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

พอลิเมอร์	สมบัติ					
	Tg (°C)	Tm (°C)	Density (g/cc)	Stress at break (MPa)	Elongation at break (%)	Tensile modulu s (GPa)
Polyhydroxy butyrate	4	178	1.25	43	5	4
Polyhydroxy Butyrate -co- valerate	-4 ถึง - 7	130- 160	1.25	20-40	8-25	1-2
Polylactic acid	56- 60	175	1.21	45-60	6-15	2.7-3.0
Poly -ε- caprolactone	-60	60	1.15	30	600-700	0.38
Polyglycolic acid	35	225	1.25	-	-	7.0
Polybutylene Succinate -co- adipate	-45	95	1.2	35-45	350	0.35
Polybutylene Terephthalate -co- adipate	-33	110	1.25	17-22	600	0.08
Low density polyethylene	-130	85- 125	0.92	13-28	900	0.04- 0.08
High density polyethylene	-125	130- 140	0.94	22-27	1200	0.4-1.3
Polypropylene	-20 ถึง - 5	165- 175	0.9	30-40	600	1-2

ในปัจจุบันจะเห็นได้ว่าหลายประเทศเริ่มนำพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพมาใช้แทนพลาสติกที่ผลิตจากปิโตรเคมีแล้ว โดยมีการตื่นตัวทั้งด้านนโยบาย การวิจัย การพัฒนาด้านอุตสาหกรรม และการสร้างผลิตภัณฑ์เพื่อเร่งรัดให้เกิดการทดแทนพลาสติกทั่วไปนั้นเป็นไปอย่างรวดเร็ว และเป็นขั้นตอนรวมทั้งมีทิศทางที่เป็นไปอย่างชัดเจน สำหรับประเทศไทยมีทรัพยากรและวัตถุดิบทางการเกษตรกรรมที่มีศักยภาพในการพัฒนาสู่อุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพได้ เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด อ้อย ฯลฯ นอกจากนี้ประเทศไทยยังมีอุตสาหกรรมที่สามารถรองรับในการพัฒนาพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้ทางชีวภาพ โดยมุ่งเป้าไปที่อุตสาหกรรมพลาสติก โดยผลิตภัณฑ์พลาสติกที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่ ถุง กระจสบพลาสติก และ แผ่นฟิล์ม ถ้าประสบความสำเร็จ ก็จะเป็นการสร้างนวัตกรรมใหม่ที่มีมูลค่าสูงมากในภาคเกษตรกรรมร่วมกับภาคอุตสาหกรรมที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (นาฏอนงค์ ธงศิลา, 2010)

พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastics) จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนาวัสดุสำหรับการใช้งานเพื่ออนุรักษ์สิ่งแวดล้อม ทั้งในด้านวัตถุดิบ กระบวนการผลิต และกระบวนการกำจัด โดยปัจจุบันการผลิตพลาสติกชีวภาพได้มุ่งเน้นไปที่พลาสติกสำหรับบรรจุภัณฑ์ เนื่องจากมีการใช้งานเป็นจำนวนมากและก่อให้เกิดขยะมากที่สุด ซึ่งหากสามารถเปลี่ยนให้บรรจุภัณฑ์เหล่านั้นผลิตจากพลาสติกชีวภาพได้ ก็จะทำให้ปัญหาขยะลดลงได้

## 2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพเข้ามามีบทบาทสำคัญแทนการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติอย่างมากและได้กลายมาเป็นส่วนหนึ่งในชีวิตประจำวัน พลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากการผลิตจากกระบวนการทางปิโตรเคมีย่อยสลายได้ยากและสร้างปัญหาในการจัดการของเสียหรือขยะที่เหลือทิ้ง ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพเช่น การเสื่อมโทรมของดิน น้ำ อากาศ เป็นต้นเหตุสำคัญของการเกิดก๊าซเรือนกระจก ให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นสารก่อมะเร็งเมื่อถูกเผา พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพด้วยแบคทีเรียจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อม (พิชาภักดิ์ สมบูรณ์ทรัพย์, 2553)

### 2.2.1 พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพนั้นมีอยู่ ประเภทหลักคือ 2

1) พลาสติกที่เป็นพอลิเมอร์ของสารอินทรีย์ เช่น Polycaprolactone (PCL), Polylactic acid (PLA), Polybutylene succinate (PBS), Polybutylene succinate – co – adipate (PBSA), PBS nanocomposite, (PBSA - g - AA/RH), Polybutylene - adipate/terephthalate (PBAT), Polyhydroxybutyrate-valerate (PHBV), Polyhydroxyalkanoates (PHA) (Phua Y. J. et al., 2012; Phukon P. et al., 2012; Wang F. et al., 2012; พิชากัด สมยูรทรัพย์, 2553)

2) พลาสติกชนิดใดๆที่ผสมเส้นใยธรรมชาติ เช่น แกลบ, เซลลูโลส (cellulose), แป้ง (starch), เยื่อไม้ เพื่อทำให้มีส่วนที่แบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้ เพื่อให้แตกเป็นชิ้นเล็กๆได้ง่าย (Leejarkpai T. et al., 2011; Muniyasamy S. et al., 2013; Singh S. et al., 2008; Wu C., 2012)

พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพเหล่านี้นิยมในการทดสอบการย่อยสลายเพราะว่าเป็นพลาสติกที่ได้มาจากผลผลิตทางการเกษตรสามารถปลูกทดแทนใหม่ได้ เป็นพลาสติกที่ได้มาจากโมโนเมอร์ หรือ พอลิเมอร์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี และพลาสติกที่ได้มาจากการสังเคราะห์ของแบคทีเรีย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

### 2.2.2 วิธีทดสอบการย่อยสลาย

การศึกษาการย่อยสลายพลาสติกมีผู้รายงานไว้หลายวิธีดังนี้

1) การฝังกลบในภาวะมีออกซิเจนซึ่งใช้กับพลาสติกชนิด PBS (Phua Y. J. et al., 2012) PBAT (Muniyasamy S. et al., 2013) PLA (Cadaru O. et al., 2012; Leejarkpai T. et al., 2011) PLA ชนิด copolymers (lactic acid – ethylene glycol – malonic or succinic acid) (Cadaru O. et al., 2012), Polyethylene (PE), PE/starch และ Microcrystalline (MCE) (Leejarkpai T. et al., 2011)

2) การฝังกลบ PLA ในภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจนโดยผสมกับขยะจากครัวเรือนบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 – 80 °C (Wang F et al., 2012)

3) ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งทดสอบกับ PHAs, PHBV (Phukon P. et al., 2012) PBSA, acrylic acid - grafted (PBSA-g-AA), PBSA-g-AA/RH, PBSA/RH (rice husk) (Wu C., 2012)

4) ศึกษาการย่อยสลายพลาสติกแบบแผ่นฟิล์มของ PCL, PHB และ PBSA ด้วย *Aspergillus sp.* Strain ST - 01 ที่อุณหภูมิ 50 °C (Sanchez, Akio, & Yutaka, 2000)

### 2.2.3 ปัจจัยที่มีการศึกษาว่ามีผลต่อการย่อยสลายพลาสติก

#### 1) อุณหภูมิ

การศึกษากการย่อยสลายพลาสติกจะใช้อุณหภูมิในช่วงที่เหมาะสมกับแบคทีเรียที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophiles) หรืออุณหภูมิสูง (thermophiles) เช่น 30 ± 2 °C (Phukon P. et al., 2012; Wu C., 2012) 37 °C (Phukon P. et al., 2012) 55 °C และอุณหภูมิตามที่กำหนดในมาตรฐาน (ISO 14855-1, 2005) คือ 58 ± 2 °C (Singh S. et al., 2008; Tomita K., Nakajima T., Kikuchi Y., & N., 2004; Yagi H., Ninomiya F., Funabashi M., & Kunioka M., 2009)

#### 2) ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH)

งานวิจัยจะใช้ค่า pH 7.0 ± 0.5 ในการบ่มเชื้อแบคทีเรีย (Leejarkpai T. et al., 2011; Phukon P. et al., 2012; Wu C., 2012)



### 3) ความชื้น

งานวิจัยจะใช้ค่าความชื้นในการบ่มเชื้อแบคทีเรีย  $50 \pm 5\%$  ความชื้นในการฝังกลบพลาสติกชีวภาพ 50% (Cadar O. et al., 2012; Leejarkpai T. et al., 2011; Wu C., 2012) ความชื้นที่เหมาะสมต่อการหมักอยู่ที่ประมาณ 50 - 55 %

#### 2.2.4 แบคทีเรียที่มีรายงานว่าสามารถแยกได้จากการย่อยสลายพลาสติก

มีการนำแบคทีเรียจากการฝังกลบในดิน (Mergaert J., Anderson C., Wouters A., & Swings J., 1994) มาทดสอบเช่น *Escherichia coli* 16S rDNA โดยการนำมาแยกและระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรีย มีการแยกเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อที่ได้คือ *Azospirillum brasilense* (BCRC 12270, *Comamonas* sp. และ *P.lemoigei* ในการทดสอบการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนนั้น เชื้อที่ได้จากการทดลองคือ *Thermotogaceae bacterium*, *Geobacillus* sp., *Clostridium* sp. และมีการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด Polyhydroxyalkanoates (PHA) ด้วยแบคทีเรีย *P. Aeruginosa* (MTCC7815), *P. aeruginosa* (MTCC 7812), *P. aeruginosa* (L43-I), *B. subtilis* (R38-I), *Candida albicans* และ *Fusarium oxysporum* (Molitoris H. P., Moss S. T., De Koning G. J. M., & Jendrossek D., 1996; Phua Y. J. et al., 2012; Phukon P. et al., 2012; Wang F et al., 2012; Wu C., 2012)

#### 2.2.5 งานวิจัยที่มีผู้รายงานการใช้แบคทีเรียในดินและกากตะกอนในการย่อยพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

Jarerat A. et al (1998) ได้ทำการศึกษาการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ โดยการเก็บตัวอย่างดินจากที่ต่างๆ ในประเทศไทยเพื่อทำการศึกษาการแพร่กระจายและหาจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพอลิเอสเทอร์ชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 50 °C และทำตรวจสอบการย่อยสลายโดยการดูจากส่วนใส (clear zone - technique) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด basal medium ที่ภายในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจะประกอบด้วยพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพดังนี้ 1.Polycaprolactone (PCL), 2.Polyethylene succinate (PES) และ 3.Polybutylene succinate/adipate (PBSA) จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย

พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ จากตัวอย่างดินทั้งหมด 8 ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ พบว่ามีปริมาณของการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียที่มีการย่อยสลายในตัวอย่างดินปริมาณสูง พบว่าการแพร่กระจายของแบคทีเรียที่ย่อยพลาสติก PCL , PES และ PBSA ในดิน คิดเป็น 75%, 75% และ 87.5% ตามลำดับ มีสัดส่วนของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยพลาสติก PES ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงกว่า PCL และ PBSA ตามลำดับ

เจอร์รีตัน (2553) ได้นำแบคทีเรียจำพวกราและแอคติโนไมซีสทดสอบย่อยสลายพลาสติกชีวภาพชนิด Polylactic Acid (PLA), Poly(butylenes succinate-co-adipate) (PBSA) ภายในระยะเวลา 1 สัปดาห์โดยใช้ตัวเหนี่ยวนำ (inducer) ในการเพิ่มความสามารถของการย่อยสลายทางชีวภาพ โดยสามารถนำสารที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลาย (degradation products) เช่น monomer และ oligomers ไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ ต่อไป เช่น เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชบางชนิดนำไปใช้ในการหมักก๊าซมีเทนเพื่อเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่หมุนเวียนได้ หรือ นำไป polymerization ให้เป็นพลาสติกชีวภาพขึ้นมาใหม่ได้

Frank C. et al (2011) ได้ทดสอบการย่อยสลายโคพอลิเมอร์ชนิด Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (P3HB-co-3HHx) ด้วยแบคทีเรียในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน โดยการย่อยพลาสติก P3HB-co-3HHx ด้วยสัดส่วนที่แตกต่างกันของ HHx ในภาคตะกอนที่อุณหภูมิ 37 °C ซึ่งผลจากการย่อยสลายพบว่าถ้าพลาสติกมี HHx อยู่มากจะย่อยสลายได้รวดเร็ว และแบคทีเรียในภาคตะกอน (Abou-Zeid D & Dunja A, 2001; Budwill K. et al., 1992) สามารถย่อยสลายพลาสติกได้ดี

Nishida & Tokiwa (1993) ได้ทดสอบการย่อยสลายพลาสติกชนิด PHB และ PCL ด้วยแบคทีเรียที่เก็บมาจากดินตามเมือง Tsukuba ในญี่ปุ่น เช่น บ่อน้ำทิ้ง กองปุ๋ยหมัก ภาคตะกอนจากบ่อบำบัดน้ำเสีย ดินจากป่า ฟาร์ม นาข้าว เป็นต้น นำตัวอย่างดินดังกล่าวมาละลายใน basal medium (pH 7) นำมาเจือจางและเกลี่ยลงบนอาหารแข็งที่ผสมพลาสติกอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C และดูลักษณะการเกิดวงกลมส่วนใส (clear zone) บนจานเพาะเชื้อด้วยระยะเวลา 10 - 30 วัน ผลการย่อยสลาย PHB และ PCL เท่ากับ 0.2 - 11.4% และ 0.8 - 11% (ตามลำดับ) ผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรียจากดินแต่ละแหล่งสามารถย่อยสลายพลาสติกได้ แบคทีเรียที่ย่อยพลาสติกได้จะเห็นวงกลมส่วนใสบนจานเพาะเชื้อ เนื่องจากว่าแบคทีเรียจะทำการปล่อย extracellular enzyme ออกมาย่อยพลาสติกและแพร่กระจายเข้าไปในอาหารเพื่อให้ได้ผลผลิตที่ละลายน้ำ

## 2.2.6 ขนาดชิ้นส่วนพลาสติกที่ใช้ทดสอบ

Wang F et al., (2012) ได้ใช้พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิด Polylactide (PLA) ขนาด 2 x 2 mm หนา 0.1 mm (M - 450Cs, Fellowes, Japan) (Leejarkpai T. et al., 2011) ใช้พลาสติกชีวภาพชนิด Polylactic acid (PLA), Polyethylene (PE) และ microcrystalline cellulose (MCE) ที่มีขนาด 150 x 150 x 0.3 mm ตัดเป็นชิ้นขนาด 20.0 x 20.0 mm

## 2.2.7 การวิเคราะห์ผลจากการทดสอบย่อยสลายพลาสติก

1. การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยเครื่อง Scanning Electron – Microscopy (SEM) (Leejarkpai T. et al., 2011; Phua Y. J. et al., 2012; Phukon P. et al., 2012; Singh S. et al., 2008; Wu C., 2012)
2. การวัดปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> ที่เกิดขึ้น (Leejarkpai T. et al., 2011; Muniyasamy S. et al., 2013; Phua Y. J. et al., 2012)
3. การวัดปริมาณก๊าซมีเทน (Wang F et al., 2012)
4. การวิเคราะห์น้ำหนักแห้งที่หายไป (Mohee R. et al., 2008)
5. การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy (Muniyasamy S. et al., 2013; Phukon P. et al., 2012; Singh S. et al., 2008; Wu C., 2012)
6. การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gel permeation chromatography (GPC) (Phua Y. J. et al., 2012; Phukon P. et al., 2012; Wu C., 2012)
7. การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (Phukon P. et al., 2012; Wu C., 2012)
8. การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fluorescence microscopical (Phukon P. et al., 2012)

## 2.2.8 วิธีการระบุชนิด (identify) แบคทีเรียด้วยวิธี Biochemical test

วิธี Biochemical test เป็นการวินิจฉัยแยกชนิดเชื้อ การทดสอบ Biochemical test (Kiser, 2008) ที่สำคัญได้แก่

- 1) TSI - Oxidase test
- 2) OF sugar positive - negative
- 3) Motility
- 4) Acetamide positive - negative
- 5) Oxidase positive (Kovacs reagent) – negative

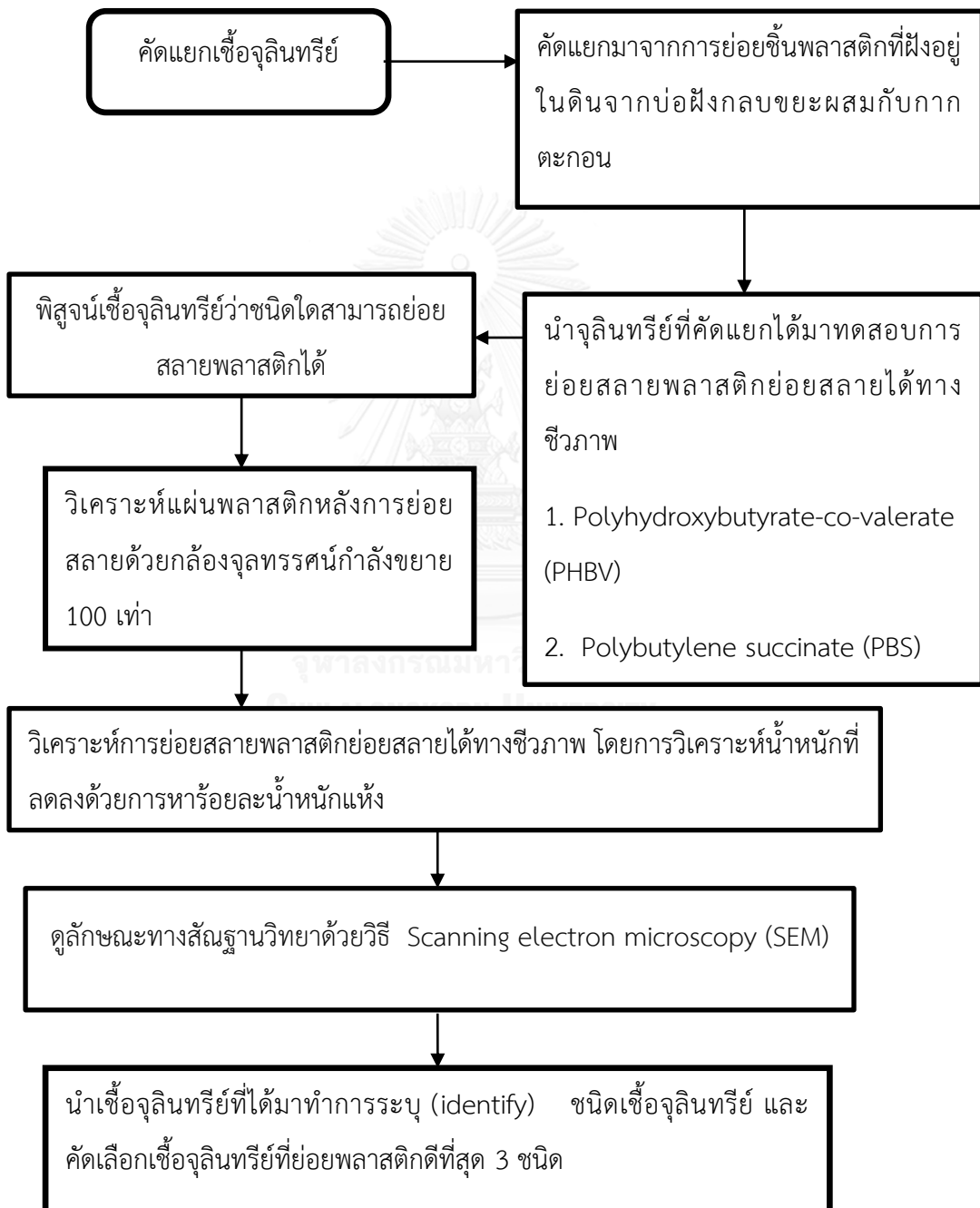
ในการทดลองนี้จะใช้เครื่องมือวิเคราะห์การระบุชนิด (identified) เชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Biochemical test โดยเครื่องจำแนกชนิดแบคทีเรียและทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะอัตโนมัติ (Vitex® 2 compact) วิธีการทดสอบนี้เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียเป็นการทดสอบโดยอาศัยหลักการวัดค่าการเปลี่ยนแปลงสีของสารชีวเคมีที่เกิดขึ้น

### บทที่ 3

## วิธีการดำเนินการวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูล

### 3.1 ภาพรวมของวิธีการทำการวิจัย

ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพของแบคทีเรียดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ภาพรวมของวิธีดำเนินการวิจัย

### 3.2 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- (1) เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น SP - 300 ของบริษัท Optima, Japan.
- (2) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น BA - 350 ของบริษัท EDT direct ION Ltd.
- (3) เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker) รุ่น WB22 ของบริษัท Memmert, Germany.
- (4) เครื่องถ่ายเชื้อแบบ Laminar flow ของบริษัท Asian Chemical & Engineering, Thailand.
- (5) เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง รุ่น BP - 211D ของบริษัท Sartorius, U.S.A.
- (6) เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น ME-20 ของบริษัท Asia, Germany.
- (7) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy.
- (8) กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope)
- (9) ตู้เย็นของบริษัท Sanyo Electric.Co.Ltd., Japan.
- (10) ออโตปิเปต (Autopipette) ขนาด 20 - 2,000 ไมโครลิตร ของบริษัท Appendorf, Canada.
- (11) ออโตปิเปต (Autopipette) ขนาด 1,000 - 10,000 ไมโครลิตร ของบริษัท Appendorf, Canada.
- (12) Parafilm M
- (13) หลอดทดลองขนาด
- (14) กระชกสไลด์
- (15) เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Centrifuge) ความเร็วรอบ
- (16) ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) รุ่น BE 500 ของบริษัท Memmert, Germany.

- (17) ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) ของบริษัท Memment, Germany.
- (18) คิวเวทท์ (Cuvette)
- (19) ตู้อบแห้ง (Dryer) รุ่น UL-80 ของบริษัท Memment, Germany.
- (20) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) รุ่น (JEOL, model JSM 6400, Japan)
- (21) เครื่องจำแนกชนิดแบคทีเรียและทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะอัตโนมัติ (Vitex® 2 compact; รุ่น VK2C 11630)

### 3.3 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- (1) อาหารแข็งนิวเตรียนท์ (Nutrient agar) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- (2) อาหารเหลวนิวเตรียนท์ (Nutrient broth) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- (3) เมทานอล (Methanol) ของบริษัท E.Merck, Germany.
- (4) เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท E.Merck, Germany.
- (5) โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl) ของบริษัท E.Merck, Germany.
- (6) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) ของบริษัท E.Merck, Germany.
- (7) สารละลายคริสตอลไวโอเล็ต (Crystal violet solution)
- (8) สารละลายไอโอดีน (Iodine solution)
- (9) สารละลายซัลฟรานิน (Safranin staining solution)

### 3.4 การดำเนินการศึกษา

#### 3.4.1 การเตรียมพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ใช้ในการทดลองมี 2 ชนิดคือ Polyhydroxybutyrate-co-valerate (PHBV) และ Polybutylene succinate (PBS) แผ่นพลาสติกชีวภาพ PBS เตรียมโดยการนำเม็ดพลาสติก PBS มาขึ้นรูปเป็นแผ่นขนาด 180 x 150 x 0.1 มิลลิเมตร ด้วยวิธีการอัดความร้อน (compression) ที่อุณหภูมิ 180 °C และความดัน 1500 psi เป็นเวลา 29 นาทีดังแสดงในรูปที่ 3.2 (a) หลังจากนั้นนำแผ่นพลาสติกมาตัดเป็นแถบขนาด 20 x 3 มิลลิเมตร มีความหนา 0.1 มิลลิเมตรดังแสดงในรูปที่ 3.2 (b) คุณสมบัติของพลาสติกที่ใช้ทดสอบ (PHBV และ PBS) แสดงไว้ในตารางที่ 3.1



รูปที่ 3. 2 (a) เครื่องมือขึ้นรูป (compression) (b) ตัวอย่างแผ่นพลาสติกที่ขึ้นรูปได้

ตารางที่ 3.1 คุณสมบัติของ PHBV และ PBS

Polymer(โพลีเมอร์)	Component (s) (ส่วนประกอบ)	T <sub>g</sub> <sup>a</sup> (°C)	T <sub>m</sub> <sup>b</sup> (°C)
Polyhydroxybutyrate-valerate (PHBV)	Glucose and propionic	5	153
Polybutylene succinate (PBS)	Succinic acid and 1,4-butanediol	-45 to -10	90 - 120

หมายเหตุ :a = glass transition temperature. b = melting temperature.



### 3.4.2 การเตรียมแบคทีเรีย

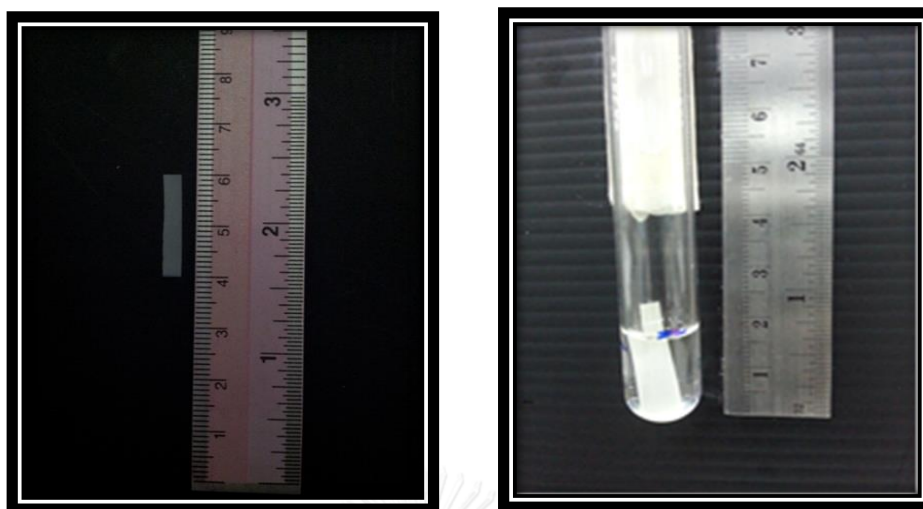
แบคทีเรียแยกได้จากดินบ่อฝังกลบขยะ โครงการกำจัดขยะมูลฝอย เทศบาลเมืองสุพรรณบุรี ดังแสดงในรูป 3.3 (a) จังหวัดสุพรรณบุรีผสมกับกากตะกอนจากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศของโรงงานน้ำผลไม้มาลีสามพราน จำกัด (มหาชน) จังหวัดนครปฐมดังแสดงในรูปที่ 3.3 (b) ที่ใช้ในการศึกษาการย่อยสลายพลาสติกในภาวะออกซิเจนจำกัด (จุฬากานต์ บุญมี, วราภรณ์ จันทาสี และชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ ข้อมูลที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์) โดยทำการแยกเชื้อจากดินที่ใช้ในการย่อยสลายพลาสติก เพื่อนำมาทดสอบการย่อยสลายพลาสติกใน basal medium (Ishigaki T. et al., 2004; Uchida H. et al., 2000)



รูปที่ 3.3 (a) ดินจากบ่อฝังกลบขยะ (b) กากตะกอนจากบ่อบำบัดน้ำเสีย

### 3.4.3 การเตรียมหน่วยทดลอง

ประกอบด้วยหลอดทดลอง ขนาด 10 เซนติเมตรเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร ภายในบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium (pH  $7 \pm 0.5$ ) ลงไปในหลอดทดลองหลอดละ 1.5 มิลลิลิตร (Ishigaki T. et al., 2004; Uchida H. et al., 2000) ใส่แผ่นพลาสติกขนาด  $20 \times 3$  มิลลิเมตรลงในหลอดทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.4 (แผ่นพลาสติกผ่านการฆ่าเชื้อด้วยก๊าซเอธิลีนออกไซด์) ชุดการทดลองควบคุมประกอบด้วยแผ่นพลาสติกในอาหารหมัก (Massardier-Nageotte V. et al., 2006)



รูปที่ 3.4 หน่วยการทดลอง

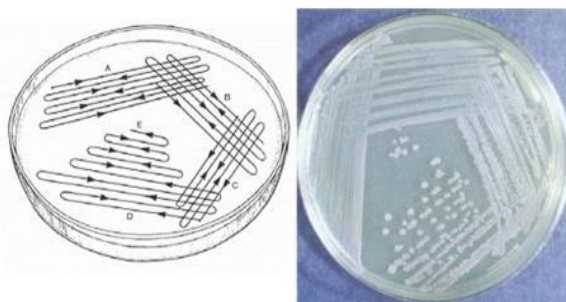
### 3.5 ขั้นตอนดำเนินการศึกษา

#### 3.5.1 การตัดแยกแบคทีเรีย

การตัดแยกเชื้อแบคทีเรียทำโดยการนำตัวอย่างจากชุดการทดลองที่ประกอบด้วยดินจากบ่อฝังกลบขยะผสมกับกากตะกอนที่มีพลาสติก PHBV และ PBS ฝังอยู่ เป็นระยะเวลา 60 วันในสถานะที่มีออกซิเจนจำกัด หลังจากนั้นนำตัวอย่างดินมาอย่างละ 1 กรัมทำการเจือจางด้วยการใส่ดินลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อจนมีระดับความเข้มข้นของจุลินทรีย์ที่เหมาะสม ( $10^{-3}$  -  $10^{-5}$ ) ตัดแยกแบคทีเรียด้วยวิธี Spread plate นำไปกระจายเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการผสมผงพลาสติก PHBV และ PBS อย่างละ 1000 มิลลิกรัม โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คือ basal medium (Ishigaki T. et al., 2004) การทดลองทำอย่างละ 3 ซ้ำ โดยชุดทดสอบ PHBV บ่มที่อุณหภูมิ 52 °C และ ชุดทดสอบ PBS บ่มที่อุณหภูมิ 67 °C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ในสถานะที่มีออกซิเจนจำกัด ทำการตัดแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะของโคโลนีต่างกันด้วยวิธีการ Streak plate โดยดูจากรูปร่างของโคโลนีที่ปรากฏอยู่บนผิวหน้าอาหาร หรือ มีการไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) พลาสติกจนเกิดเป็นวงใส (clear - zone) อยู่บริเวณผิวหน้าอาหาร (Sekiguchi T. et al., 2011)

วิธีการ Streak plate มีขั้นตอนปฏิบัติดังนี้

1. ใช้ลวดเขี่ยเชื้อขึ้นมาแตะที่ผิววุ้นใกล้ๆ ขอบใดขอบหนึ่งของจานเพาะเชื้อ แล้วลากลวดเขี่ยเชื้อเบาๆ โดยใช้ด้านแบนของปลายลวดแตะบนผิววุ้นไปมา 4 - 5 เส้น แต่ละเส้นให้ใกล้กันที่สุดเท่าที่จะทำได้ระวังอย่าให้ลวดเขี่ยเชื้อฝังลงไปในวัน ปิดฝาจาน
2. เผาลวดเขี่ยเชื้อให้แดง แล้วปล่อยให้เย็นในอากาศใกล้กับบริเวณเปลวไฟ ซึ่งเป็นบริเวณที่ Sterile
3. หมุนจานเล็กน้อยให้เหมาะสมและถนัดในการทำ Streak ครั้งที่สอง ให้เปิดฝาจานทำ Streak ในลักษณะที่ให้ลวดเขี่ยเชื้อผ่านเชื้อที่แตะไว้ในครั้งแรก ลากไปมาบนผิววุ้น 5 - 6 เส้น พยายามบังคับมือให้ขีดเส้นใกล้กันที่สุด
4. ทำเช่นเดียวกันในครั้งที่ 3 และที่ 4 โดยต้องเผาลวดเขี่ยเชื้อ แต่ระวังอย่าให้ลวดเขี่ยเชื้อไปแตะเชื้อตามแนวเส้นที่ได้ Streak ไว้ก่อน
5. บ่มเชื้อไว้ในลักษณะคว่ำจานที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิที่กำหนด จนกว่ามีโคโลนีเดี่ยวๆ เจริญใหญ่พอที่จะเขี่ยเชื้อได้สะดวก ซึ่งปกติแล้วใช้เวลา 24 - 48 ชั่วโมง
6. ถ่ายเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวๆ ที่มีลักษณะโคโลนีต่างกันลงในจานเพาะเชื้ออาหารแข็ง Nutrient agar โดยไม่ให้ลวดเขี่ยเชื้อสัมผัสโคโลนีอื่นๆ ที่อยู่ข้างเคียงกัน
7. เขียนรหัสเชื้อกำกับแต่ละหลอดของโคโลนีแต่ละชนิด เช่น เขียนเป็น PHBV 1 และ PBS 1
8. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป สามารถเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ยังไม่ได้ใช้ทำการทดสอบในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C



รูปที่ 3.5 การขีดเชื้อแบบตัดกัน (คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2013)

### 3.5.2 การทดสอบการย่อยสลายพลาสติก PHBV และ PBS

นำแผ่นพลาสติกใสลงในหลอดทดลอง ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร หลังจากนั้นเติมอาหารเหลวชนิด basal medium (Khan S. T. & A., 2001) ลงไปในหลอดทดลองหลอดละ 1.5 มิลลิลิตร นำเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดใส่ลงไปในอาหาร basal medium 1 มิลลิลิตร ปรับค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Spectrophotometer ให้ได้ค่าความขุ่น 0.3 ปรับค่าความขุ่นของเชื้อกับอาหารแล้วนำเชื้อที่ได้ไปใส่หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ที่มีพลาสติกอยู่ภายใน 1 แผ่น จากนั้นปิดด้วยจุกสำลีนำไปบ่ม PHBV ที่อุณหภูมิ 52 °C และ PBS 67 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ในสภาวะออกซิเจนจำกัด (Doi Y. et al., 1999)

### 3.5.3 การวัดการเจริญของแบคทีเรีย

ระหว่างทดสอบการย่อยแผ่นพลาสติก PHBV และ PBS ทำการวัดการเจริญของแบคทีเรีย ด้วยการวัดค่าความค่าความเข้มของแสง (Optical Density: OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ทุกวันที่ 1, 7, 14, 21 และ 28 ตามลำดับ

### 3.5.4 การศึกษาการย่อยสลายของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

ในการย่อยพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ PHBV และ PBS ทำเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (blank control)

- 1) วิเคราะห์การย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ โดยการวิเคราะห์น้ำหนักที่ลดลง

### 3.5.5 การวิเคราะห์พื้นผิวและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียและพลาสติก

- 1) ทำการวิเคราะห์หลังการย่อยสลายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

### 3.5.6 การระบุชนิด (identified) แบคทีเรีย

1) ด้วยวิธี Biochemical test โดยใช้เครื่องจำแนกชนิดแบคทีเรียและทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะอัตโนมัติ (Vitex® 2 compact)

## 3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

### 3.6.1 การวิเคราะห์แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพได้ดีที่สุด

โดยวิเคราะห์จากค่าการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพของเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายได้ผลดีที่สุดจำนวน 3 ชนิด

### 3.6.2 การวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

การทดสอบย่อยแผ่นพลาสติก PHBV และ PBS นั้นจะเก็บผลการเจริญเติบโตของกลุ่มแบคทีเรียด้วยการวัดค่าความเข้มของแสง (Optical Density; OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Shinnozaki Y. et al, 2013) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ทุกวันที่ 1, 7, 14, 21 และ 28 ตามลำดับ

### 3.6.3 การวิเคราะห์ผลการย่อยสลายโดยการวิเคราะห์น้ำหนักที่ลดลง

วิเคราะห์ผลการย่อยสลายของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพโดยนำแผ่นพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ใช้ทดสอบ (PHBV และ PBS) ออกจากชุดทดลอง นำแผ่นพลาสติกไปล้างด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อจนสะอาด และทำให้แผ่นพลาสติกแห้งโดยการนำไปอบที่อุณหภูมิ 44 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บในตู้ดูดความชื้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำแผ่นพลาสติกที่ได้ไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 5 ตำแหน่งจะได้ข้อมูลของน้ำหนักพลาสติกหลังการทดสอบย่อยสลาย

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยการหาร้อยละน้ำหนักแห้ง (Wu C., 2012; Zhao J-H. et al., 2005) ที่เหลือคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\text{Weight loss (W loss)} = \frac{W \text{ initial} - W \text{ final}}{W \text{ initial}} \times 100\%$$

Weight loss	น้ำหนักแห้งที่ลดลง
W initial	เป็นน้ำหนักแห้งเริ่มต้น
W final	เป็นน้ำหนักแห้ง ณ เวลาต่างๆ

### 3.6.4 การยืนยันผลของการย่อยสลายพลาสติกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)

เพื่อดูลักษณะสัณฐานวิทยาและพื้นผิวของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพก่อนและหลังการย่อยสลาย (รูปที่ 3.6) ซึ่งสามารถมองเห็นการเปลี่ยนแปลงของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพหลังการย่อยสลายอย่างชัดเจน (Di Franco C. R. et al., 2004; Phukon P. et al., 2012) และยืนยันผลทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย



รูปที่ 3.6 เครื่อง Scanning Electron Microscope

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างแบบที่เรียในอาหารแข็งสำหรับ SEM มีดังนี้

1. เลือกบริเวณที่ต้องการดูแล้วทำการตัดให้มีขนาดไม่เกิน 5 ตร.มม. และความหนาไม่เกิน 3 มม.
2. นำชิ้นอาหารแข็งที่ตัดแล้วไปอังด้วยไอ ของสารละลาย Osmium tetroxide 2% เป็นเวลา 1-2 ชม.
3. Dehydrate ด้วย ethanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 30%, 50%, 70% และ 95% ความเข้มข้นละ 10 - 15 นาที แล้วตามด้วย 100% เปลี่ยน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
4. หลังจากนั้นทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤตด้วยเครื่อง critical point dryer (Quorum model K850, UK)
5. ติดตัวอย่างบนแท่นวาง (Stub) ด้วยเทปกาวสองหน้าแล้วนำไปฉาบทอง (sputter coater, Balzers model SCD 040, Liechtenstein)
6. วิเคราะห์ด้วยกล้อง SEM (JEOL, model JSM 6400, Japan) เพื่อดูลักษณะสัณฐานวิทยาและพื้นผิวของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพก่อนและหลังการย่อยสลายโดยกล้อง SEM มีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังนี้
  1. Electron gun จะทำหน้าที่ผลิตกลุ่มอิเล็กตรอน
  2. กลุ่มอิเล็กตรอนผ่าน condenser lens กลายเป็นลำอิเล็กตรอน
  3. ลำอิเล็กตรอนจะผ่าน objective lens
  4. ลำอิเล็กตรอนถูกกราดลงบนผิวของชิ้นงานเกิด secondary electron
  5. สัญญาณจาก secondary electron ถูกแปลงไปเป็นสัญญาณปรากฏภาพบนจอร์รับภาพ (CRT) (จักรพันธ์ ถาวรธิดา & นพรัตน์อาภากุล., 2558)

### 3.6.5 การระบุชนิด (identify) แบบที่เรีย

วิเคราะห์ด้วยวิธี Biochemical test ด้วยเครื่องจำแนกชนิดแบบที่เรียและทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะอัตโนมัติ (Vitex® 2 compact) เป็นเครื่องมืออัตโนมัติที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย พร้อมทั้งยังสามารถระบุความว่องไวของเชื้อกับยาต้านจุลชีพได้ทั้งในค่า

MIC (Minimum inhibitory concentration) และ S, I, R เครื่องจะวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของแสงที่ส่องผ่านแต่ละหลุมการทดสอบที่มีสารละลายเชื้อและสารชีวเคมีอยู่ทุกๆ 15 นาที วัดความยาวคลื่นที่ 430 นาโนเมตร หรือ 568 นาโนเมตร ทำเช่นนี้ 3 รอบแล้วจึงหาค่าเฉลี่ยผลการวัดออกมา ซึ่งจะเป็นการวัดแบบ Kinetic ข้อมูลที่ได้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่เครื่องว่าเชื้อที่ทดสอบมีโอกาสเป็นเชื้อชนิดไหนมากที่สุดเมื่อทำการเปรียบเทียบกับรูปแบบในฐานข้อมูล แสดงในตารางที่ 3.2

ขั้นตอนการทดสอบมีดังนี้

1. เติมน้ำเกลือปราศจากเชื้อ 0.45% ใส่หลอดละ 3 มิลลิลิตร
2. เชี่ยวเชื้อจากโคลนที่สงสัยโดยเลือกใช้โคลนนี้เดี่ยวๆ
3. ผสมสารละลายเชื้อให้เข้ากัน
4. ปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้ 1.8 - 2.2 McFarland
5. นำสารละลายเชื้อที่ได้และการ์ดใส่ลงไปในแต่ละช่องของ Cassette เพื่อนำไปเข้าเครื่องทดสอบต่อไป

**ตารางที่ 3. 2** แสดงค่าการวิเคราะห์แบคทีเรียพร้อมทั้งรายงานเปอร์เซ็นต์ความน่าเชื่อถือสำหรับค่าของผลการทดสอบ

Comment	Probability
Excellent ID	96-99
Very good	93-95
Good ID	89-92
Acceptable	85-88
Low discrimination or slashline	มีเชื้อ 2 หรือ 3 ชนิดที่เป็นไปได้ จะต้องใช้การทดสอบอื่นเพิ่มเติมเพื่อแยกชนิด
Non-identified	มีเชื้อ > 3 ที่เป็นไปได้หรือเชื้อที่ทดสอบมีลักษณะที่แตกต่างจากฐานข้อมูลของเครื่องมากจนไม่สามารถแยกชนิดได้



## บทที่ 4

### ผลการศึกษาและการอภิปรายผล

#### 4.1 การคัดแยกแบคทีเรีย

##### 4.1.1 แบคทีเรียที่คัดแยกจากดินบ่อฝึงบกลบขยะผสมกากตะกอน

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิด PHBV ในสถานะที่มีออกซิเจนจำกัด ด้วยวิธีการคัดแยกแบคทีเรียจากชุดการทดลองที่ฝังแผ่นพลาสติกลงในดินบ่อฝึงบกลบขยะโครงการกำจัดขยะมูลฝอย เทศบาลเมืองสุพรรณบุรี จังหวัดสุพรรณบุรีผสมกับกากตะกอนจากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศของโรงงานน้ำผลไม้มาลีสามพราน จำกัด จังหวัดนครปฐม การคัดแยกแบคทีเรียโดยการนำตัวอย่างดินที่ผสมกับกากตะกอนที่มีการฝังแผ่นพลาสติก PHBV ลงไปเป็นเวลา 8.5 สัปดาห์มาคัดแยกแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 3.5.1 โดยบ่มที่ 52 °C นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปย้อมสีแกรมเพื่อดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) ของแบคทีเรียได้ผลดังที่แสดงในรูปที่ 4.1

การคัดแยกแบคทีเรียที่อาจสามารถย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิด PBS วิธีทำเช่นเดียวกันกับพลาสติก PHBV แต่บ่มที่อุณหภูมิ 67 °C ในสถานะที่มีออกซิเจนจำกัด ทำอย่างละ 3 ซ้ำ จำนวน 2 รอบ คัดแยกแบคทีเรียได้ดังแสดงในรูปที่ 4.2

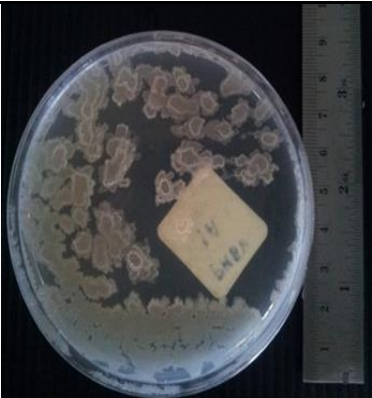
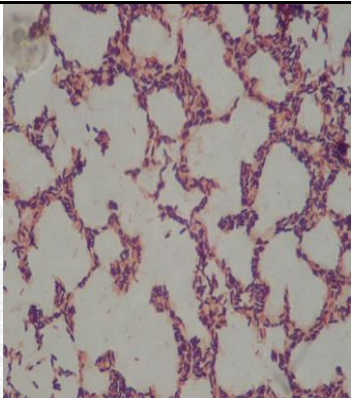

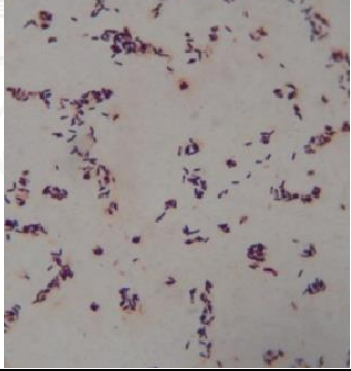
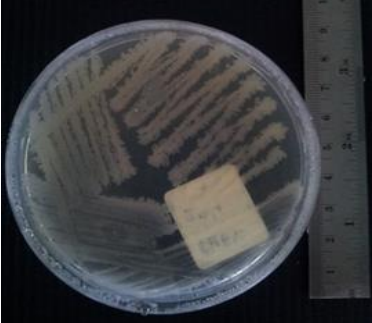

สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 13 ไอโซเลท คือ PHBV (1 - 13) ดังแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่จะมีลักษณะของโคโลนี (Colonial morphology) ไม่แน่นอน ขอบหยักเป็นลอนคลื่น โคโลนีจะแบนราบ บางชนิดมีโคโลนีลักษณะกลม ขอบเรียบ มีความหนูนูนของโคโลนีเล็กน้อย จากการย้อมสีแกรมพบว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน (rod-shaped) ยกเว้นแบคทีเรีย PHBV 6 ที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน

คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพลาสติกชนิด PBS ได้ 12 ไอโซเลท คือ PBS (1 - 12) ดังแสดงในรูปที่ 4.2 จากการย้อมสีแกรมพบว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่จะมีลักษณะโคโลนี (Colonial morphology) กลม สีเหลืองเข้มขอบเรียบ โคโลนีไม่หนูนูนมาก เซลล์แบคทีเรียทั้งหมดมีลักษณะเป็นท่อน (rod-shaped) เป็นแกรมบวก ซึ่งแกรมบวกนั้นมีคุณสมบัติที่ทนความร้อน ทนแรงดัน ทนการ

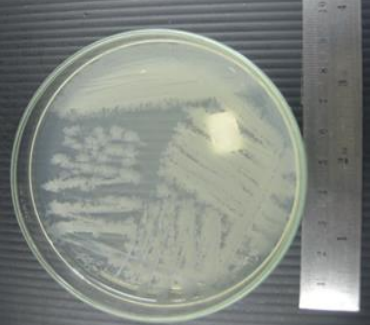

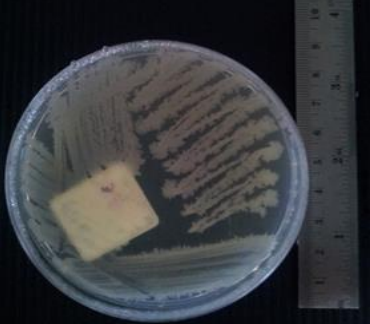

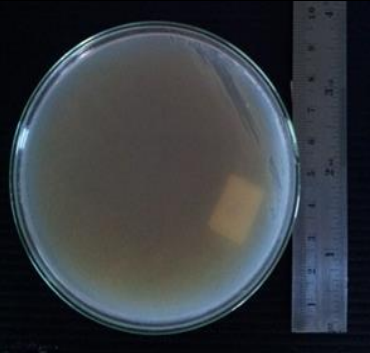
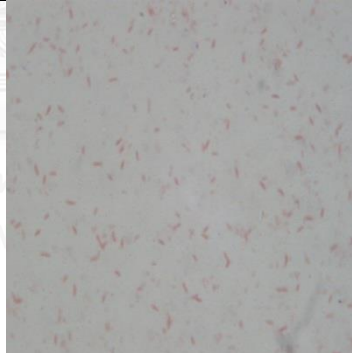
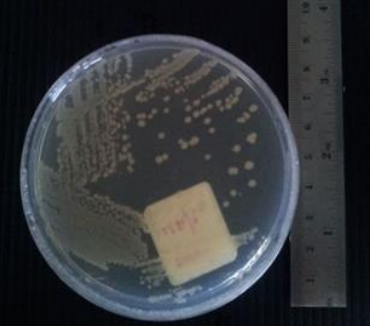

ฉายรังสี (food irradiation) ทนสารเคมี มากกว่าพวกแกรมลบ จึงอาจเป็นสาเหตุที่แยกได้แต่แบคทีเรียแกรมบวก

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จะถูกนำไปทดสอบการย่อยสลายพลาสติก PHBV และ PBS เพื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกที่ดีที่สุด

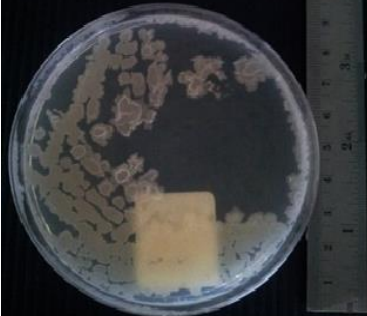

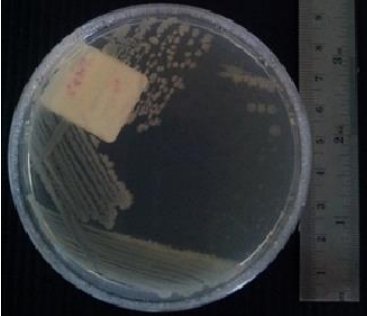
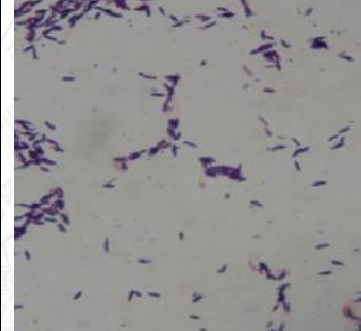
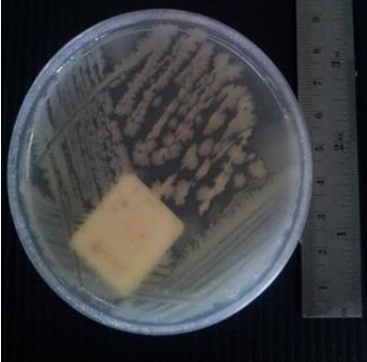
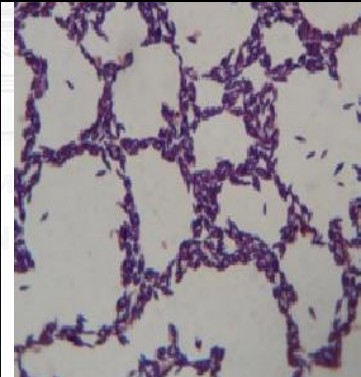
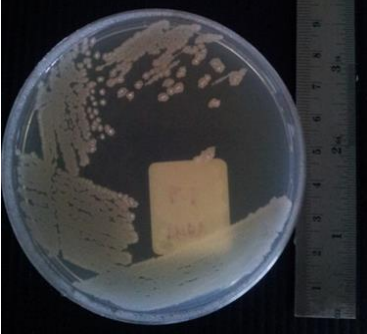
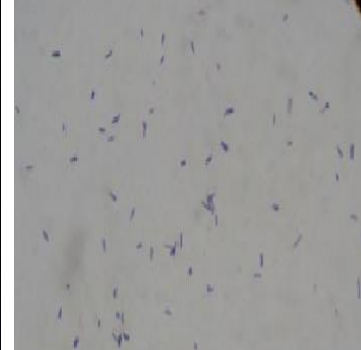
**รูปที่ 4. 1** ภาพถ่ายแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินบ่อฝังกลบขยะผสมกากตะกอนจากพลาสติกจากชุดการทดสอบ PHBV

จุลินทรีย์ ที่แยกได้	รูปร่างโคโลนี	เซลล์ของแบคทีเรีย	ลักษณะ ทั่วไป
PHBV 1			แกรมบวก
PHBV 2			แกรมบวก
PHBV 3			แกรมบวก

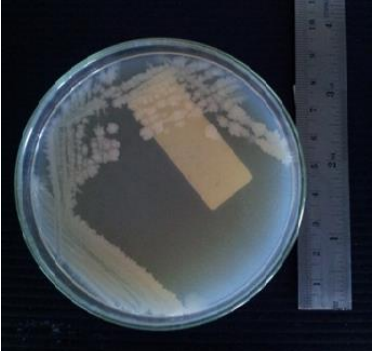
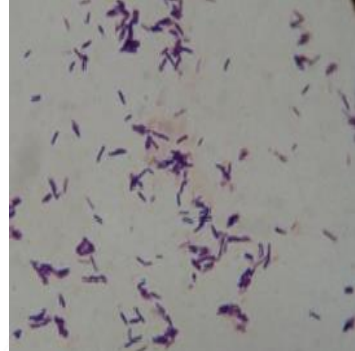
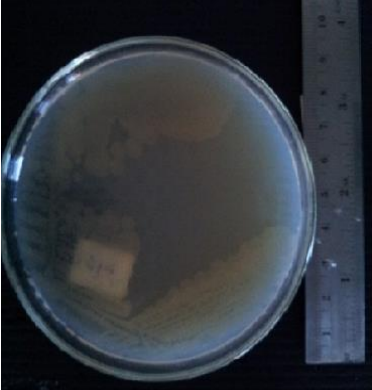
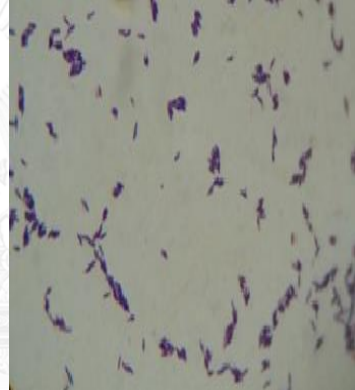
รูปที่ 4.1 (ต่อ)

จุลินทรีย์ ที่แยกได้	รูปร่างโคโลนี	เซลล์ของแบคทีเรีย	ลักษณะ ทั่วไป
PHBV 4			แกรมบวก
PHBV 5			แกรมบวก
PHBV 6			แกรมลบ
PHBV 7			แกรมบวก

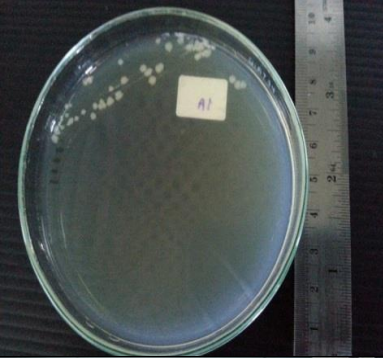
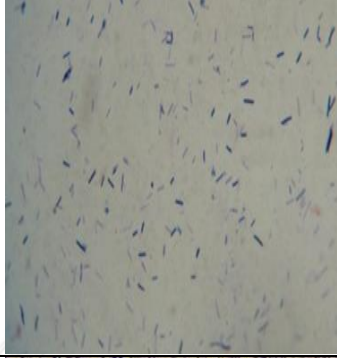
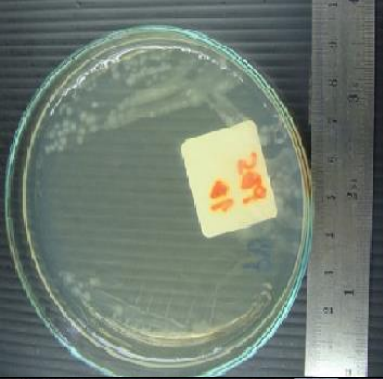
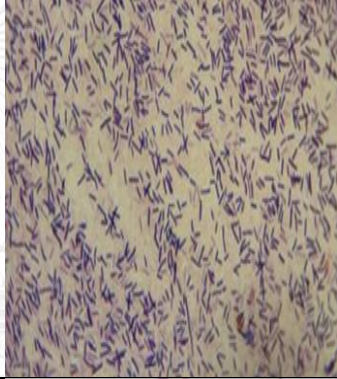
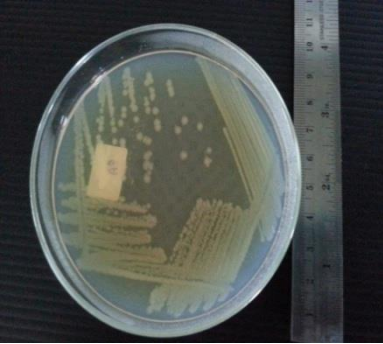
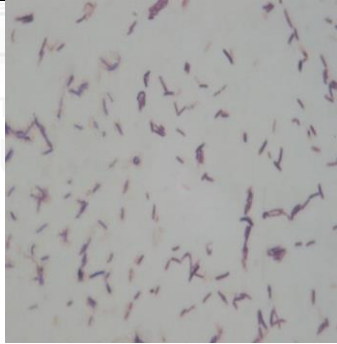
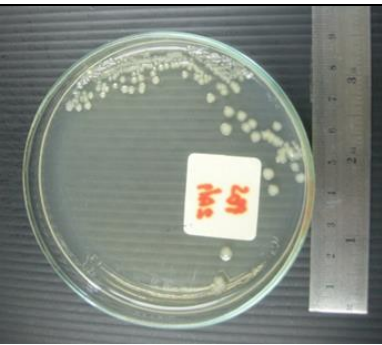

รูปที่ 4.1 (ต่อ)

จุลินทรีย์ ที่แยกได้	รูปร่างโคโลนี	เซลล์ของแบคทีเรีย	ลักษณะ ทั่วไป
PHBV 8			แกรมบวก
PHBV 9			แกรมบวก
PHBV 10			แกรมบวก
PHBV 11			แกรมบวก

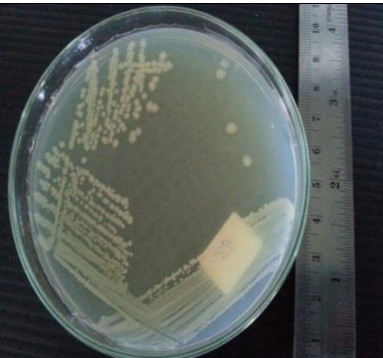
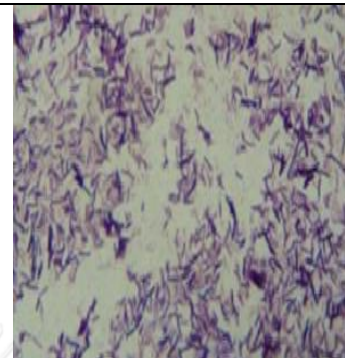
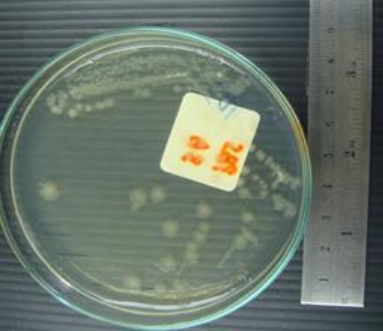
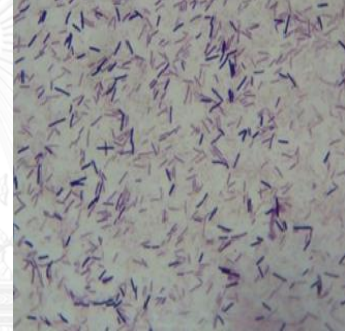
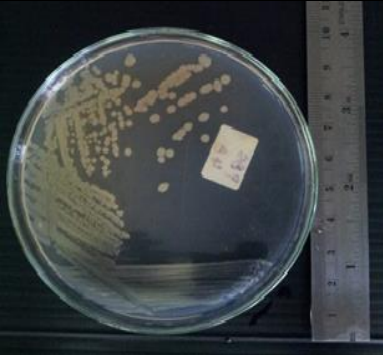
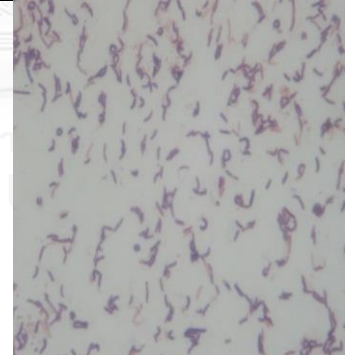
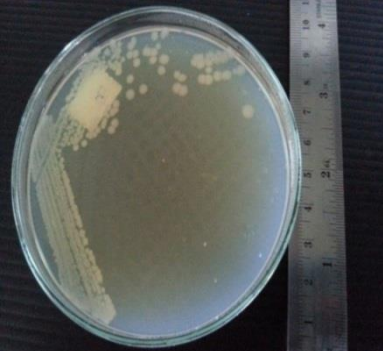
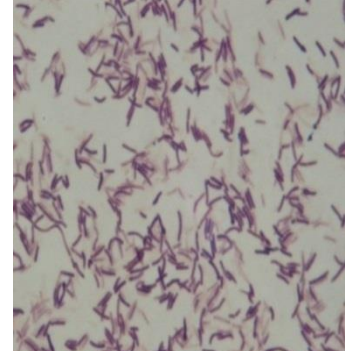
รูปที่ 4.1 (ต่อ)

จุลินทรีย์ ที่แยกได้	รูปร่างโคโลนี	เซลล์ของแบคทีเรีย	ลักษณะ ทั่วไป
PHBV 12			แกรมบวก
PHBV 13			แกรมบวก

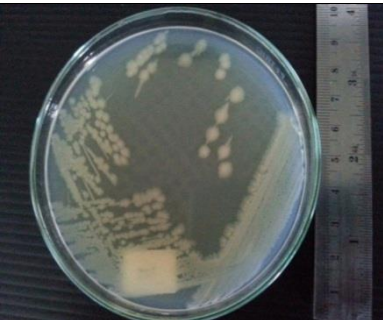
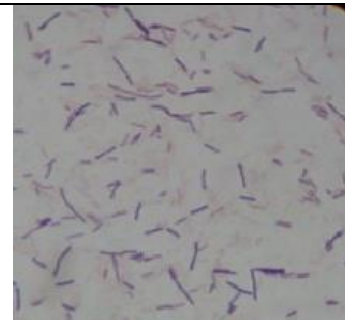
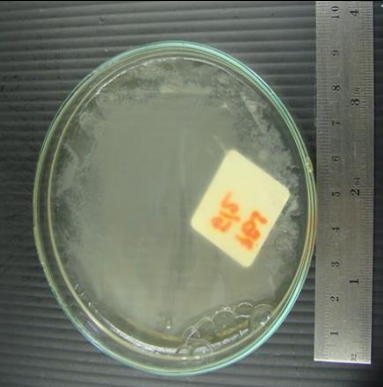
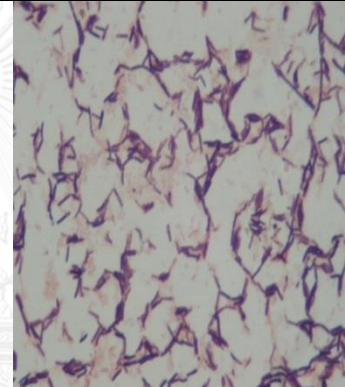
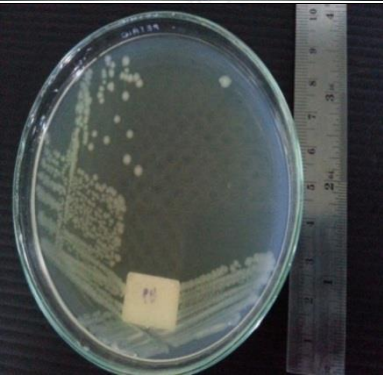
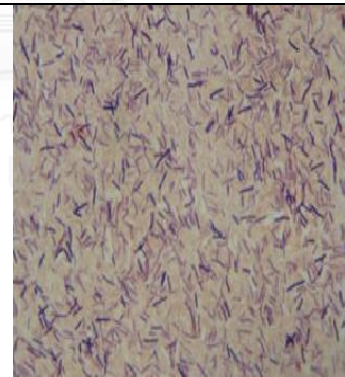

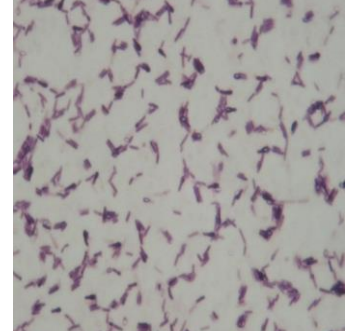
**รูปที่ 4. 2** ภาพถ่ายแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินบ่อฝังกลบขยะผสมกากตะกอนจากพลาสติกจากชุดการทดสอบ PBS

จุดเริ่มต้นที่แยกได้	รูปร่างโคโลนี	เซลล์ของแบคทีเรีย	ลักษณะทั่วไป
PBS 1			แกรม บวก
PBS 2			แกรมบวก
PBS 3			แกรมบวก
PBS 4			แกรมบวก

รูปที่ 4.2 (ต่อ)

จุลินทรีย์ ที่แยกได้	รูปร่างโคโลนี	เซลล์ของแบคทีเรีย	ลักษณะทั่วไป
PBS 5			แกรมบวก
PBS 6			แกรมบวก
PBS 7			แกรมบวก
PBS 8			แกรมบวก

รูปที่ 4.2 (ต่อ)

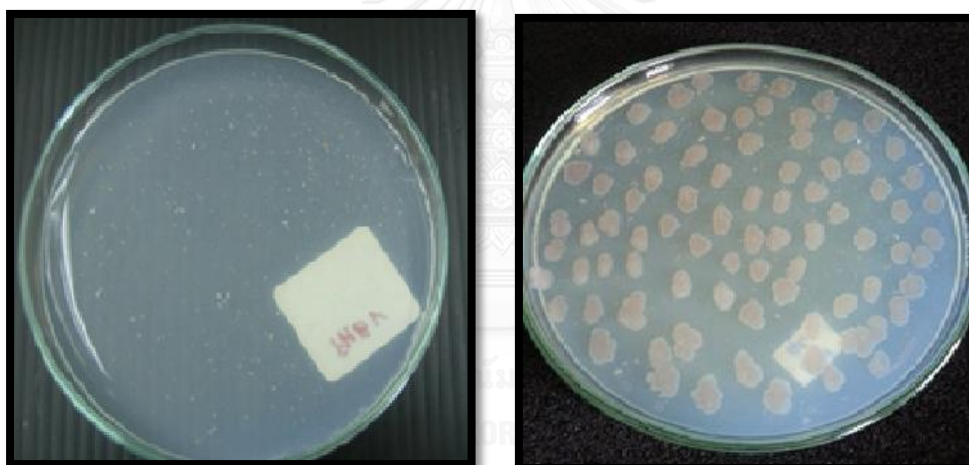
จุลินทรีย์ ที่แยกได้	รูปร่างโคโลนี	เซลล์ของแบคทีเรีย	ลักษณะทั่วไป
PBS 9			แกรมบวก
PBS 10			แกรมบวก
PBS 11			แกรมบวก
PBS 12			แกรมบวก



## 4.2 การทดสอบการย่อยสลาย PHBV และ PBS

### 4.2.1 การทดสอบย่อย PHBV แบบแตะจุดแบคทีเรียลงบนผิวหน้าอาหาร

ใช้ needle นำแบคทีเรียที่แยกได้ มาแตะเป็นจุดบนผิวหน้าอาหาร basal medium ผสมผงพลาสติก PHBV บ่มที่อุณหภูมิ 52 °C เป็นระยะเวลา 5 วันในสภาวะออกซิเจนจำกัด ทำการทดลอง isolate ละ 3 ซ้ำ 2 รอบ พบว่าแบคทีเรียเจริญเติบโตบนผิวหน้าอาหารที่มีการผสมผง PHBV ได้ แต่ไม่พบบริเวณที่เป็นวงใส (clear zone) รอบๆแบคทีเรียที่จะบ่งบอกถึงการย่อยสลายตรงบริเวณผิวหน้าอาหาร (Doi Y. et al., 1999) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะผงพลาสติกที่ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณน้อย กระจายตัวอยู่ห่างๆกันในอาหาร ทำให้แบคทีเรียไม่สัมผัสจุดที่ผงพลาสติกอยู่ดังแสดงในรูปที่ 4.3 หากต้องการให้เห็นวงใสชัดเจน ต้องเพิ่มพื้นที่สัมผัสระหว่างแบคทีเรียกับผงพลาสติกให้มากขึ้น



(a)

(b)

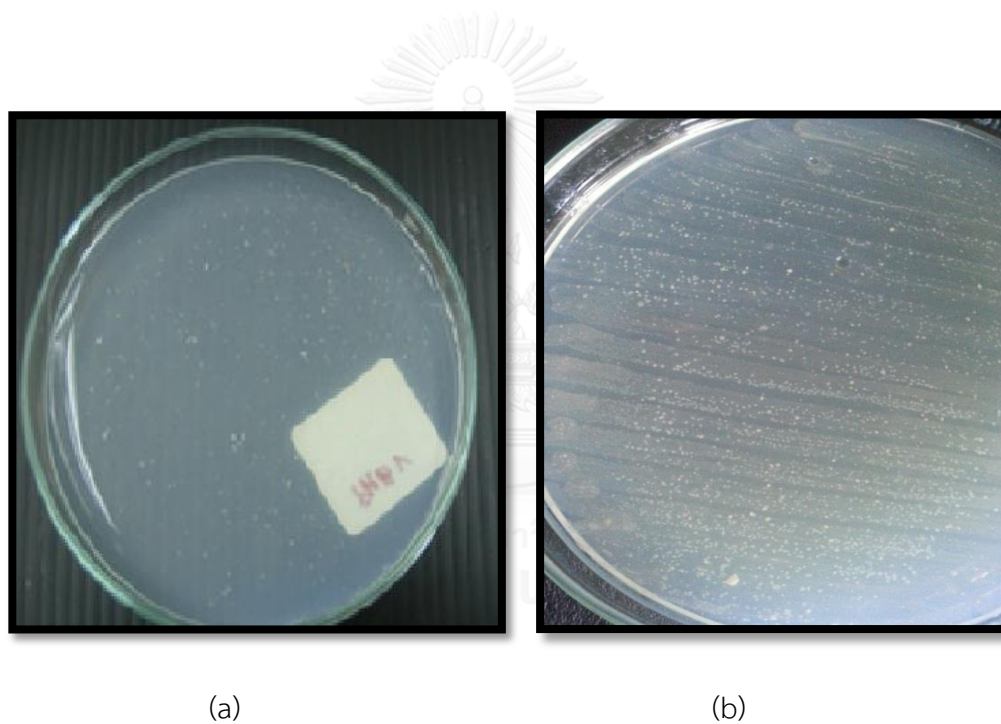
**รูปที่ 4.3** ทดสอบการย่อยสลาย PHBV โดยวิธีการแตะแบคทีเรียเป็นจุดบนผิวหน้าอาหาร basal medium ผสมผง PHBV บ่ม 5 วัน ที่อุณหภูมิ 52 °C ในสภาวะออกซิเจนจำกัด (a) ชุดควบคุม (b) แบคทีเรียที่ทดสอบย่อยบนผิวหน้าอาหาร

### 4.2.2 การทดสอบย่อย PHBV แบบขีดแบคทีเรียลงบนผิวหน้าอาหาร

เพื่อเพิ่มโอกาสให้แบคทีเรียสัมผัสกับผงพลาสติกมากกว่าการแตะเป็นจุด การทดลองนี้ใช้เข็มเขี่ยเชื้อขีดลงไปบนผิวหน้าอาหารเป็นทางยาวจนทั่วบริเวณผิวหน้าอาหาร พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญได้บนผิวหน้าอาหารที่ผสมผง PHBV โคโลนีเจริญเติบโตขึ้นเป็นฝ้าสีขาวตามแนวที่ขีด

เชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร ตอนปลายเส้นเห็นเป็นโคโลนีเดี่ยวแต่ก็ไม่พบวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหารที่แสดงถึงการย่อยสลาย แสดงไว้ในรูปที่ 4.4

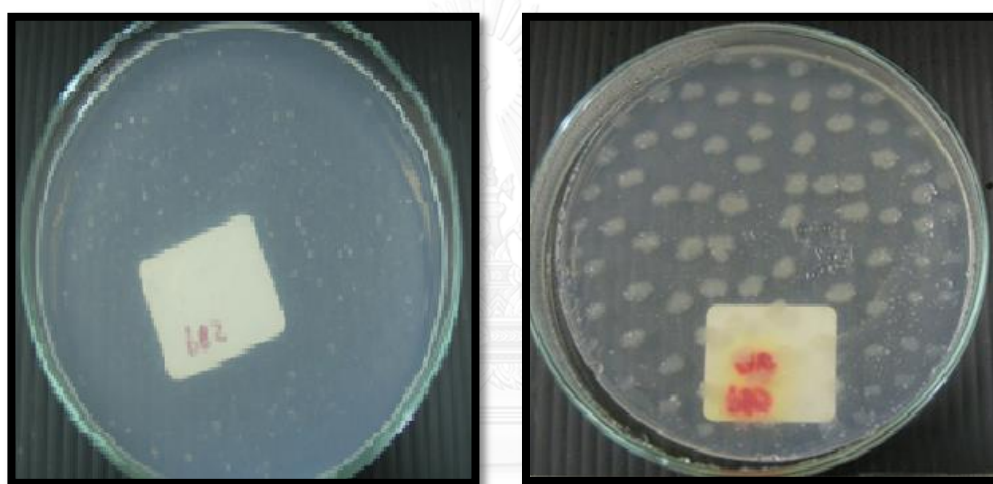
ผลจากการทดสอบแสดงให้เห็นว่าวิธีการทดสอบการย่อยสลายผงพลาสติก PHBV ด้วยวิธีการขีดแบคทีเรียลงบนผิวหน้าอาหารเพื่อเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียให้สัมผัสกับผงพลาสติกมากขึ้น ยังไม่สามารถเห็นการย่อยสลายของพลาสติก PHBV ที่ชัดเจน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่ากลุ่มแบคทีเรียเจริญอยู่บนผิวหน้าอาหารไม่สามารถสัมผัสกับผงพลาสติกที่ผสมอยู่ในอาหารได้อย่างเต็มที่เพราะผงพลาสติกมีขนาดเล็กมากและจมอยู่ภายในเนื้ออาหาร เมื่อป่มเป็นระยะเวลาหลายวันจะพบว่าอาหารหลอมเหลวเนื่องจากอยู่ที่อุณหภูมิสูงนาน จึงต้องมีการปรับเปลี่ยนวิธีการทดสอบใหม่



**รูปที่ 4. 4** ทดสอบการย่อยสลาย PHBV โดยวิธีการขีดแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหาร basal medium ผสมผง PHBV เป็นระยะเวลา 5 วันที่อุณหภูมิ 52 °C ในสภาวะออกซิเจนจำกัด  
(a) ชุดควบคุม (b) แบคทีเรียที่ทดสอบย่อยบนผิวหน้าอาหาร

#### 4.2.3 การทดสอบย่อย PBS แบบแตะจุดแบคทีเรียลงบนผิวหน้าอาหาร

จากผลการทดสอบการย่อยสลายพลาสติก PBS ด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกไว้ โดยใช้ needle แตะแบคทีเรียไว้บนผิวหน้าอาหาร basal medium เป็นระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 67 °C ในสภาวะออกซิเจนจำกัดวิธีทำเช่นเดียวกับข้อ 4.2.1 เมื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายพลาสติก PBS พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกยังไม่สามารถย่อยสลายพลาสติกได้อย่างชัดเจน เนื่องจากยังไม่พบลักษณะวงกลมส่วนใสที่ชัดเจนบริเวณผิวหน้าอาหารของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ แสดงไว้ในรูปที่ 4.5



(a)

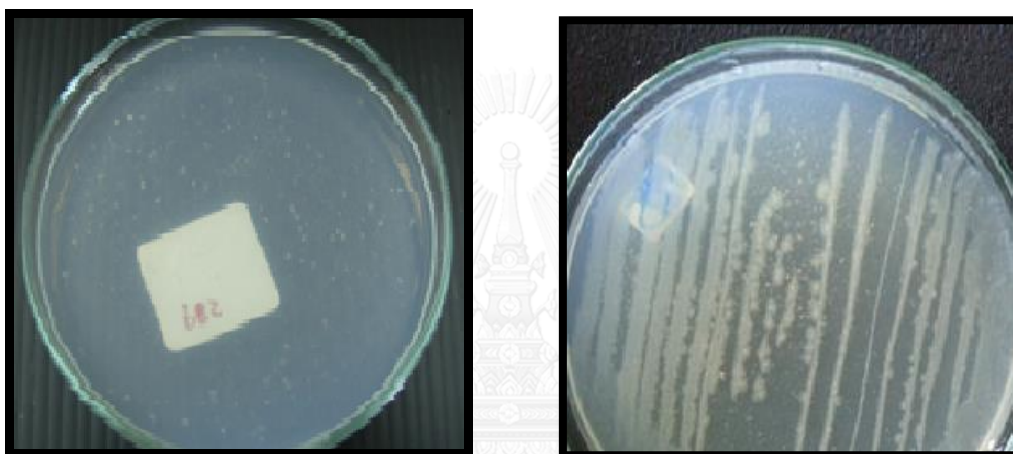
(b)

รูปที่ 4.5 ทดสอบการย่อยสลาย PBS โดยวิธีการแตะแบคทีเรียเป็นจุดบนผิวหน้าอาหาร basal medium ผสมผง PBS เป็นระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 52 °C ในสภาวะออกซิเจนจำกัด (a) ชุดควบคุม (b) แบคทีเรียที่ทดสอบย่อยบนผิวหน้าอาหาร

#### 4.2.4 การทดสอบย่อย PBS แบบขีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร

จากผลการทดสอบการย่อยสลายพลาสติกชนิด PBS ในอาหารแข็ง basal medium ด้วยแบคทีเรีย ทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 67 °C เป็นระยะเวลา 5 วัน ในสภาวะออกซิเจนจำกัดตั้งวิธีข้อ 4.2.2 พบว่าแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบสามารถเจริญเติบโตมากกว่าวันที่ 1 เนื่องจากโคโลนีมีขนาดใหญ่มากขึ้น และกระจายเต็มผิวหน้าอาหารดังแสดงในรูปที่ 4.6 จากการทดสอบความสามารถในการย่อย

สลายพลาสติก PBS แบบขีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารพบว่า PBS 1 และ PBS 2 สามารถเจริญเติบโตได้ไม่ดีจึงไม่เหมาะที่จะนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป แบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกยังไม่สามารถย่อยสลายพลาสติกในระยะเวลา 5 วันได้อย่างชัดเจน เนื่องจากยังไม่พบลักษณะวงกลมส่วนใสที่ชัดเจน บริเวณผิวหน้าอาหารของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ดังนั้นจึงเพิ่มการสัมผัสพื้นที่ผิวอาหารกับแบคทีเรียให้มากขึ้นด้วยวิธีการทดสอบย่อยสลายในอาหารเหลวที่มีแผ่นพลาสติกแช่อยู่ภายใน และเพิ่มระยะเวลาการทดสอบมากขึ้นจากเดิม



(a)

(b)

**รูปที่ 4. 6** ทดสอบการย่อยสลาย PBS โดยวิธีการขีดแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหาร basal medium ผสมผง PBS บ่ม 5 วัน ที่อุณหภูมิ 52 °C ในสถานะออกซิเจนจำกัด (a) ชุดควบคุม (b) แบคทีเรียที่ทดสอบย่อยบนผิวหน้าอาหาร

### 4.3 การทดสอบย่อยสลายพลาสติกแบบใช้ในอาหารเหลว basal medium

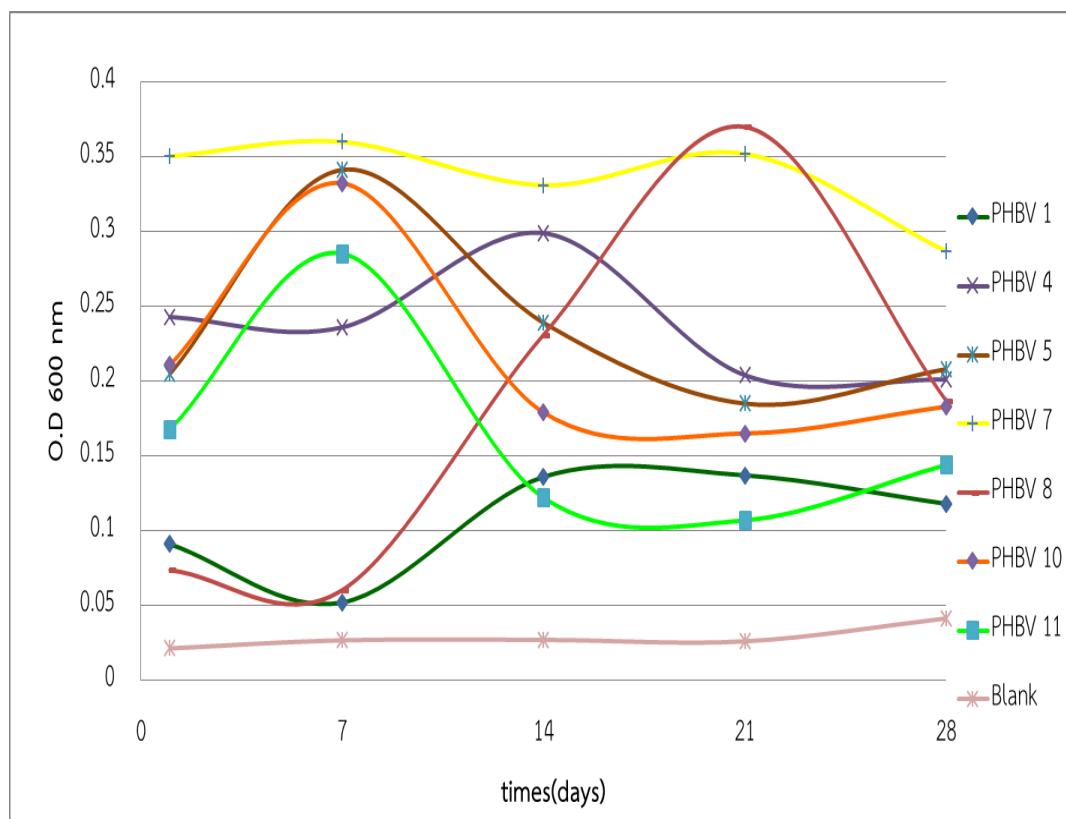
เพิ่มการสัมผัสพื้นที่ผิวอาหารกับแบคทีเรียให้มากขึ้นด้วยวิธีการนำไปทดสอบย่อยสลายในอาหารเหลวที่มีแผ่นพลาสติกแช่อยู่ในเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ภายใต้สภาวะออกซิเจนจำกัด

#### 4.3.1 การทดสอบย่อยสลายพลาสติก PHBV แบบใช้ในอาหารเหลว basal medium และการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

จากการทดสอบการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพชนิด PHBV ด้วยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้แก่ PHBV (1-13) ในอาหารเหลว basal medium ที่อุณหภูมิ 52 °C ระยะเวลาทดสอบการย่อยสลาย 4 สัปดาห์ในสภาวะออกซิเจนจำกัดได้ผลดังแสดงใน **รูปที่ 4.9** พบว่าตลอดเวลาบ่มแผ่นพลาสติกยังคงสภาพเดิม แต่เมื่อทำการเก็บตัวอย่างแผ่นพลาสติกขึ้นจากอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าแผ่นพลาสติกมีลักษณะเปราะบางมากกว่าชุดควบคุมมาก แตกหักง่ายเมื่อเก็บตัวอย่างขึ้นมาจากหลอดทดลอง

จากผลการศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยการนำอาหารเหลวจากชุดการทดสอบของแบคทีเรียทั้ง 7 ชนิด โดยวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร สรุปได้ว่าแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหาร basal medium ที่ใช้ทดสอบที่มีพลาสติก PHBV เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก จาก **รูปที่ 4.7** แบคทีเรียทั้ง 7 ชนิดต่างกันที่ค่าความขุ่นและความชันของเส้นกราฟความขุ่น แบคทีเรียทั้งหมดเจริญเติบโตได้ชัดเจนใน 2 สัปดาห์แรก ความขุ่นของแบคทีเรีย ณ วันที่ 28 พบว่า PHBV 7 > PHBV 5 > PHBV 4 > PHBV 8 > PHBV 10 > PHBV 11 และ PHBV 1 ตามลำดับ ความขุ่นจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ขุ่นมากกว่า 0.2 ณ วันที่ 28 ได้แก่ PHBV 7, PHBV 5 และ PHBV 4 ที่เหลือความขุ่นอยู่ในช่วง 0.05 - 0.2 แสดงว่ากลุ่มที่ขุ่นกว่าสามารถปรับตัวเข้ากับอาหารและสภาวะที่ใช้เลี้ยงได้ดีและน่าจะสามารถย่อยพลาสติกได้ดี

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น แต่การทดสอบการย่อยสลายพลาสติกด้วยวิธีการทดสอบย่อยสลายพลาสติก PHBV แบบใช้ในอาหารเหลว basal medium นี้ยังไม่สามารถเห็นความแตกต่างของแผ่นพลาสติกที่อยู่ภายในหลอดทดลองด้วยตาเปล่า จึงต้องดูลักษณะพื้นผิวแผ่นพลาสติกด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า และชั่งน้ำหนักแผ่นพลาสติกที่ลดลง



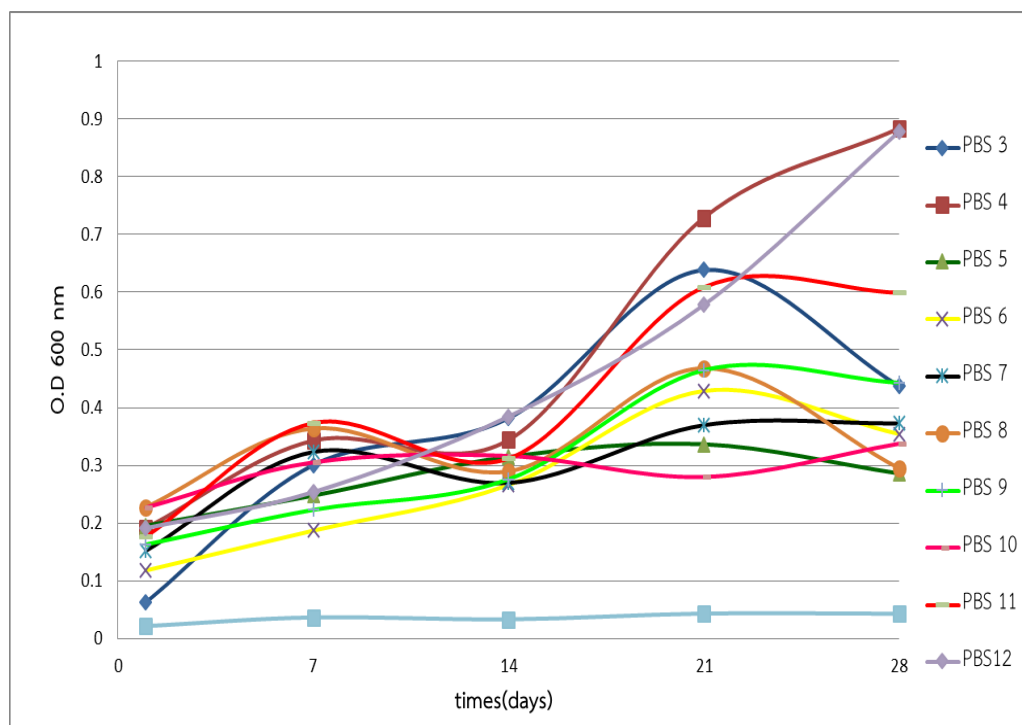
รูปที่ 4.7 กราฟแสดงความขุ่น (O.D.<sub>600</sub>) ของอาหาร basal medium ที่จุ่ม PHBV และใส่แบคทีเรีย ทั้ง 7 ชนิด

#### 4.3.2 การทดสอบย่อยพลาสติก PBS แบบแช่ในอาหารเหลว basal medium และการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

จากการทดสอบการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพชนิด PBS ด้วยแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ได้แก่ PBS (3 - 12) ในอาหารเหลว basal medium ด้วยวิธีเดียวกันกับข้อ 4.3.1 แต่บ่มที่อุณหภูมิ 67 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ในสภาวะออกซิเจนจำกัด ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.10 พบว่าตลอดเวลาที่บ่มแผ่นพลาสติกยังคงดูเหมือนเดิม แต่เมื่อเก็บตัวอย่างพลาสติกขึ้นจากอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าแผ่นพลาสติกมีลักษณะเปราะบางกว่าชุดควบคุมมาก แตกหักง่ายเมื่อเก็บแผ่นตัวอย่างขึ้นมาจากอาหารเหลว

เนื่องจากยังไม่สามารถบ่งบอกได้ถึงการย่อยสลายพลาสติกด้วยตาเปล่าจึงต้องวิเคราะห์ผลหลังการบ่มด้วยการชั่งน้ำหนักแผ่นพลาสติกที่ลดลง

จากผลการศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยการนำอาหารเหลวจากชุดการทดสอบมาศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 7 ชนิดโดยวัดค่าความขุ่นด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร สรุปได้ว่าแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหาร basal medium ที่ใช้ทดสอบที่มีพลาสติก PBS เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก จากรูปที่ 4.8 แบคทีเรียทั้ง 10 ชนิดต่างกันที่ค่าความขุ่นและความชันของเส้นกราฟความขุ่น แบคทีเรียทั้งหมดเจริญเติบโตได้ชัดเจนใน 2 สัปดาห์แรก ความขุ่นของแบคทีเรีย ณ วันที่ 28 พบว่า PBS 4 > PBS 12 > PBS 11 > PBS 9 > PBS 3 > PBS 7 > PBS 6 > PBS 10 > PBS 8 > PBS 5 ตามลำดับ ความขุ่นจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ขุ่นมากกว่า 0.5 ณ วันที่ 28 ได้แก่ PBS 4, PBS 12 และ PBS 11 ที่เหลือ ความขุ่นอยู่ในช่วง 0.1 - 0.4 แสดงว่ากลุ่มที่ขุ่นกว่าปรับตัวเข้ากับอาหารและสภาวะที่ใช้เลี้ยงได้ดีและสามารถย่อยพลาสติกได้ดี



รูปที่ 4. 8 กราฟแสดงความขุ่น (O.D.<sub>600</sub>) ของอาหาร basal medium ที่จุ่ม PBS และใส่แบคทีเรีย ทั้ง 10 ชนิด

#### 4.3.3 ลักษณะแผ่นพลาสติก PHBV หลังการบ่มในอาหารเหลว

พลาสติก PHBV ที่แช่ในอาหารเหลว basal medium มีการเปลี่ยนแปลงในแต่ละสัปดาห์ เมื่อบ่มนานขึ้นพลาสติกที่ถูกเก็บขึ้นมาจะมีความเปราะบางมากขึ้นดังแสดงไว้ดังรูปที่ 4.11

จะสังเกตเห็นความเปราะของแผ่นพลาสติกได้ชัดเจนในสัปดาห์ที่ 4 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าพลาสติก PHBV มีคุณสมบัติที่ทนต่อแรงกระแทกกระเทือน (impact strength) สูงและมีความทนต่ออุณหภูมิสูง (T<sub>m</sub>; 173 - 180 °C) มีรายงานว่าสามารถย่อยสลายได้ในสภาวะฝังกลบภายในระยะเวลา 6 เดือน การทดลองนี้ระยะเวลาสั้นกว่ามากแต่ก็เห็นว่าแผ่นพลาสติกเปราะขึ้นอย่างชัดเจน



#### 4.3.4 ลักษณะแผ่นพลาสติก PBS หลังการบ่มในอาหารเหลว

การทดสอบย่อยพลาสติก PBS แบบแช่ในอาหารเหลว basal medium โดยเก็บแผ่นตัวอย่างพลาสติกในแต่ละสัปดาห์เพื่อดูลักษณะของแผ่นพลาสติก พลาสติกที่เก็บขึ้นมามีความเปราะเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (blank control) แสดงไว้ดังรูปที่ 4.12

สังเกตได้ว่าแผ่นพลาสติก PBS ที่เก็บขึ้นมาเกิดการแตกหักตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าพลาสติก PBS มีคุณสมบัติไม่ทนอุณหภูมิสูงเท่า PHBV และมีโครงสร้างที่เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ง่ายซึ่งส่งผลให้น้ำหนักของพลาสติกลดลงและถูกย่อยสลายง่ายด้วยจุลินทรีย์ (สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553)

#### 4.3.5 ผลการทดสอบการย่อยสลายพลาสติกชนิด PHBV ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

จากผลการทดสอบการย่อยสลายแผ่นพลาสติกชีวภาพชนิด PHBV ขนาด 0.3 x 20 mm ด้วยแบคทีเรียที่คัดเลือกจำนวน 13 ไอโซเลท (PHBV 1 - 13) ในอาหารเหลว basal medium ที่อุณหภูมิ 52 °C ระยะเวลาทดสอบ 4 สัปดาห์ ในสภาวะออกซิเจนจำกัด นำแผ่นพลาสติก PHBV ที่ทดสอบย่อยสลายในแต่ละสัปดาห์มาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 4.13

แบคทีเรียที่ย่อยสลายพลาสติกได้มากที่สุดคือ PHBV 1, PHBV 5, PHBV 6, PHBV 8, PHBV 9, PHBV 11 และ PHBV 12 ส่วนแบคทีเรียชนิดอื่นก็สามารถย่อยพลาสติกได้โดยจะเห็นได้จากการเกิดรอยกร่อนบนพื้นผิวหน้าและเกิดขุยตรงผิวด้านขอบของแผ่นพลาสติก

ส่วนสีของแผ่นพลาสติกมีสีที่เข้มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม เนื่องจากเมื่อแผ่นพลาสติกแช่อยู่ในอาหารเหลวเป็นเวลานานและพลาสติก PHBV มีคุณสมบัติให้ออกซิเจนผ่านได้ดีจึงอาจเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้สีของแผ่นพลาสติกเข้มขึ้น จากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่านี้เป็นการคัดเลือกเบื้องต้น ก่อนจะศึกษาต่อไปโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

การย่อยสลายแผ่นพลาสติกเกิดจากทางด้านขอบของแผ่นชัดเจนกว่าพื้นผิวด้านหน้า คาดว่า เพราะด้านขอบแผ่นพลาสติกเป็นรอยตัดทำให้มีการฉีกขาดของพลาสติก แบบที่เรียกจึงสามารถใช้ เอนไซม์ย่อยพลาสติกตามรอยฉีกขาด

จากผลการวิเคราะห์พลาสติกด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า สามารถคัดเลือกชนิด ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายพลาสติก PHBV เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนการ ย่อยสลายด้วยเครื่อง SEM ต่อไปดังนี้ PHBV 1, PHBV 4, PHBV 5, PHBV 7, PHBV 8, PHBV 10 และ PHBV 11 ตามลำดับ

#### 4.3.6 ผลการทดสอบการย่อยสลายพลาสติกชนิด PBS ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

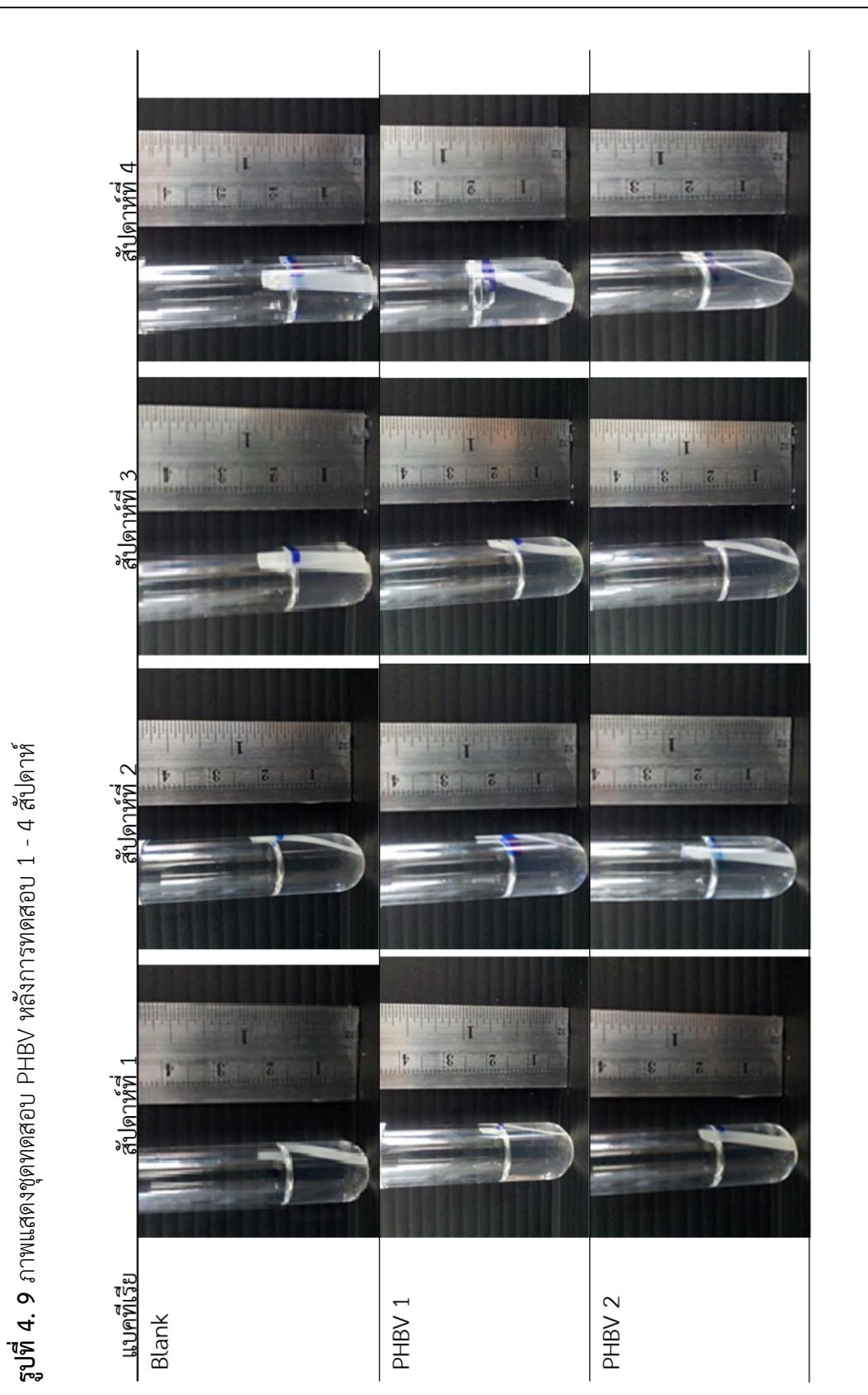
จากผลการย่อยสลายพลาสติกชนิด PBS ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่าพบว่า ผล การทดสอบการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพชนิด PBS ขนาด 0.3 x 20 mm ด้วยแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลท (PBB 3 - 12) ในอาหารเหลว basal medium ที่อุณหภูมิ 67 °C ระยะเวลาทดสอบ 4 สัปดาห์ ในสภาวะออกซิเจนจำกัด ผลการศึกษาพบว่าเมื่อนำแผ่นพลาสติก PBS ที่ทดสอบย่อยสลาย ในแต่ละสัปดาห์มาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 4.14 แผ่นพลาสติก จากที่ใช้กับแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบทุกไอโซเลทเกิดการแตกร้าวเพิ่มมากขึ้นในแต่ละช่วงเวลาเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่า สีของแผ่นพลาสติกมีสีที่เข้มมากขึ้นจากสัปดาห์ที่ 1 - 4 ซึ่ง สาเหตุมาจากการที่แผ่นพลาสติกแช่อยู่ในอาหารเหลวเป็นเวลานาน และแผ่นพลาสติกมีคุณสมบัติดูด ชีมน้ำได้ทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ง่าย จากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่านี้เป็นการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยแผ่นพลาสติกเบื้องต้น ก่อนการวิเคราะห์ด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ต่อไป

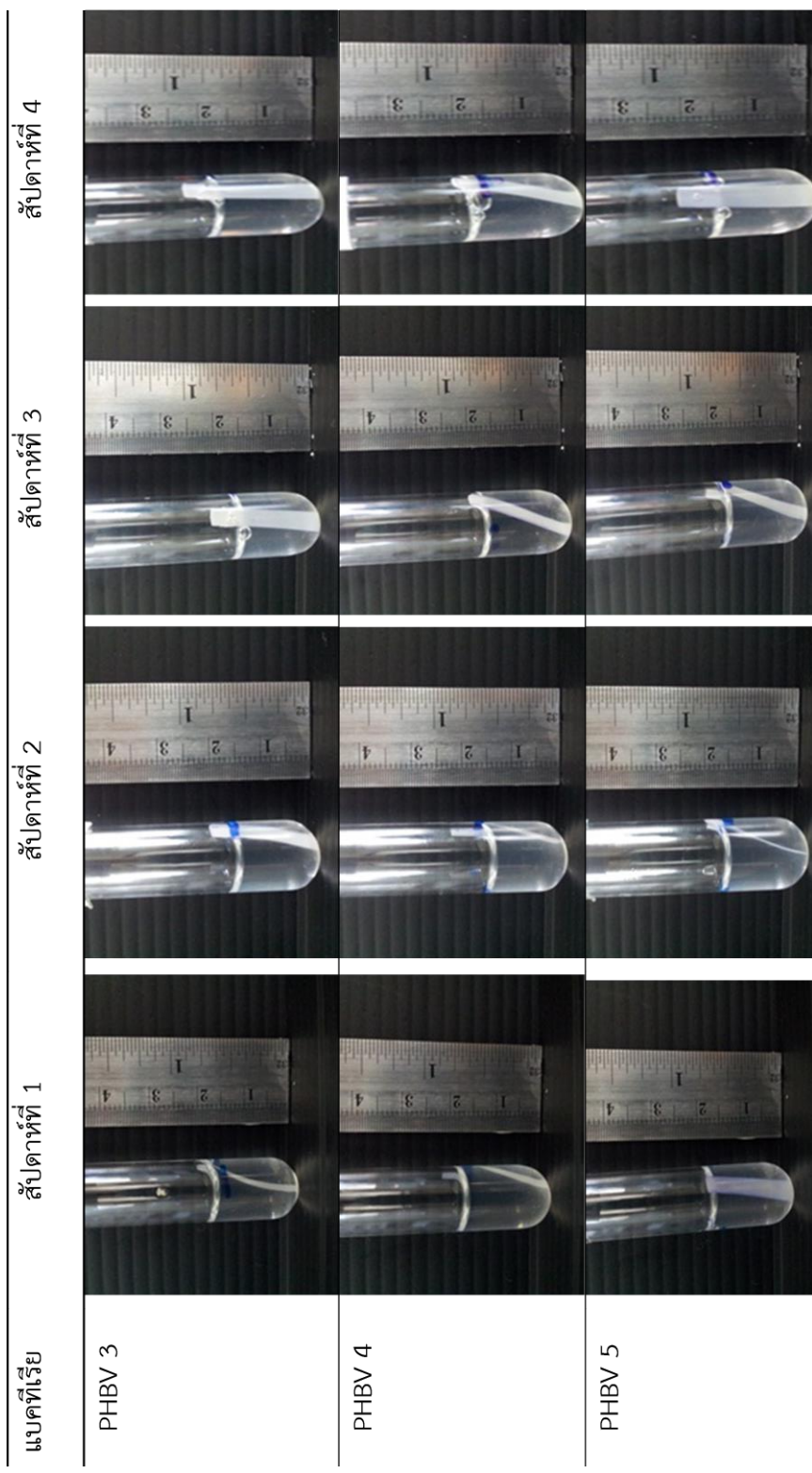
เห็นได้ว่าแผ่นพลาสติกในสัปดาห์ที่ 1 มีร่องรอยการกัดกร่อนพื้นผิวด้านขอบก่อนพื้นผิวด้านหน้า แผ่นพลาสติกจะเริ่มมีร่องรอยการแยกในสัปดาห์ที่ 2

จากผลการวิเคราะห์พลาสติกด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า สามารถคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายพลาสติก PBS เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเครื่อง SEM ต่อไปดังนี้ PBS 3, PBS 4, PBS 5, PBS 6, PBS 7, PBS 8, PBS 9, PBS 10, PBS 11 และ PBS 12

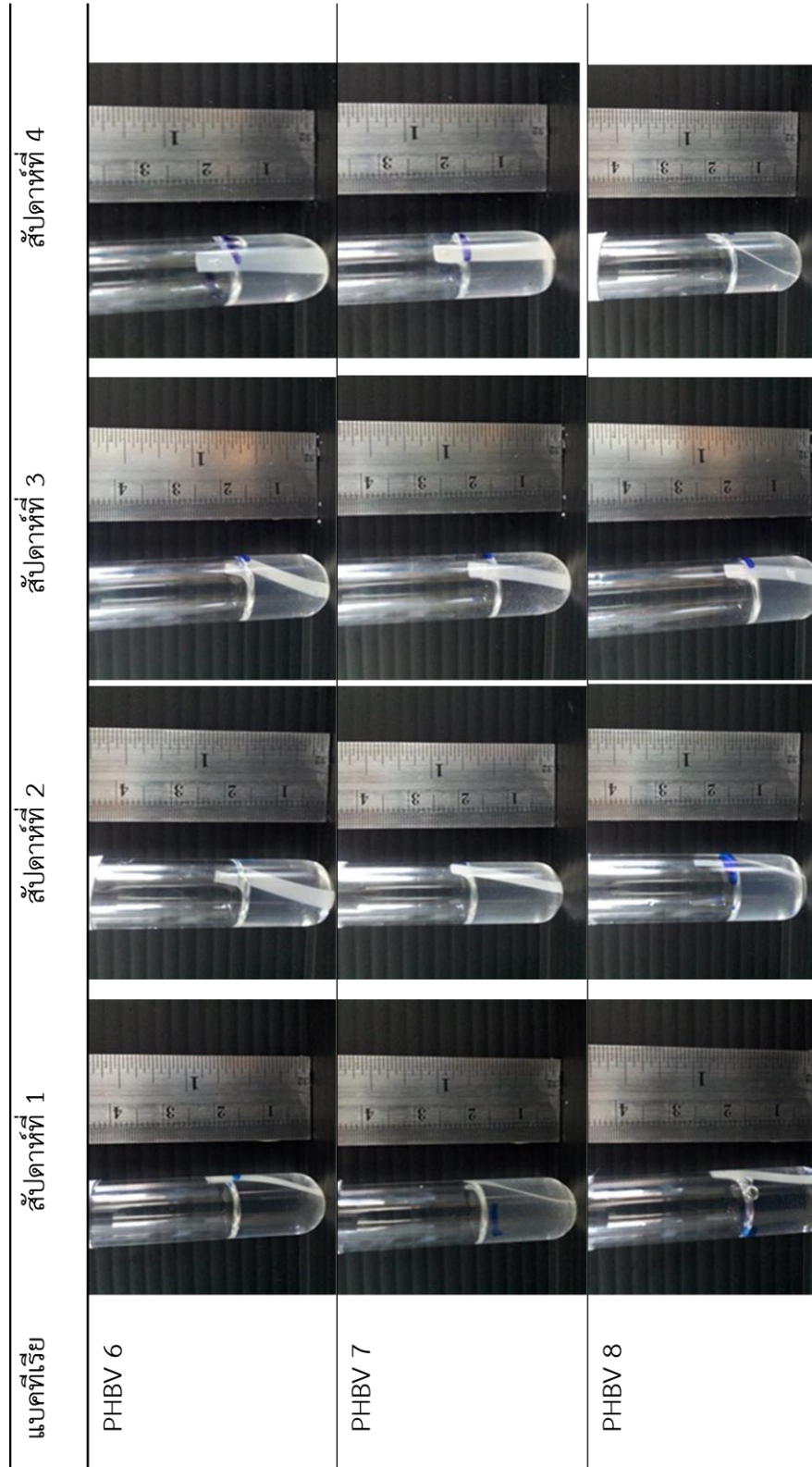


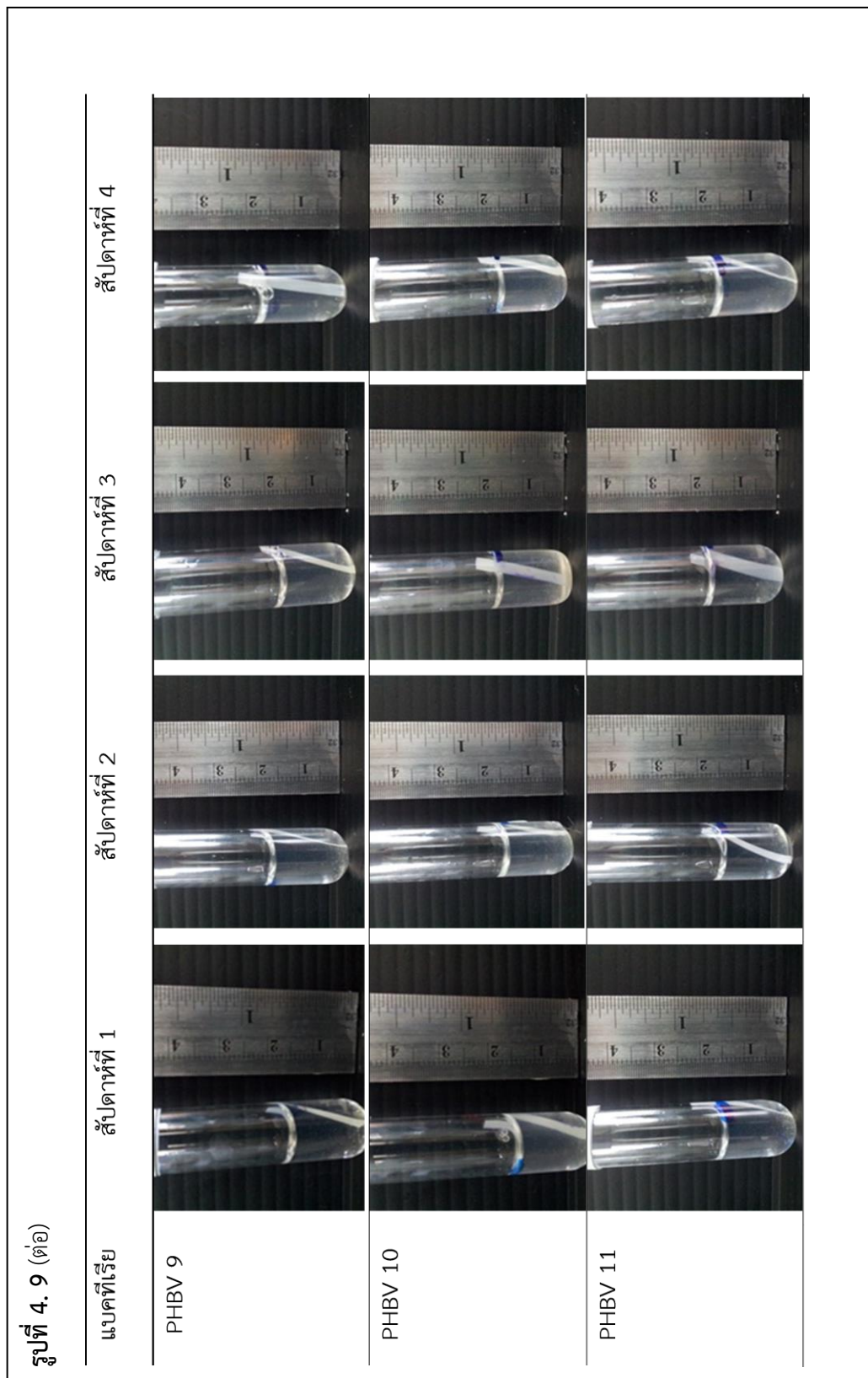


รูปที่ 4. 9 (ต่อ)

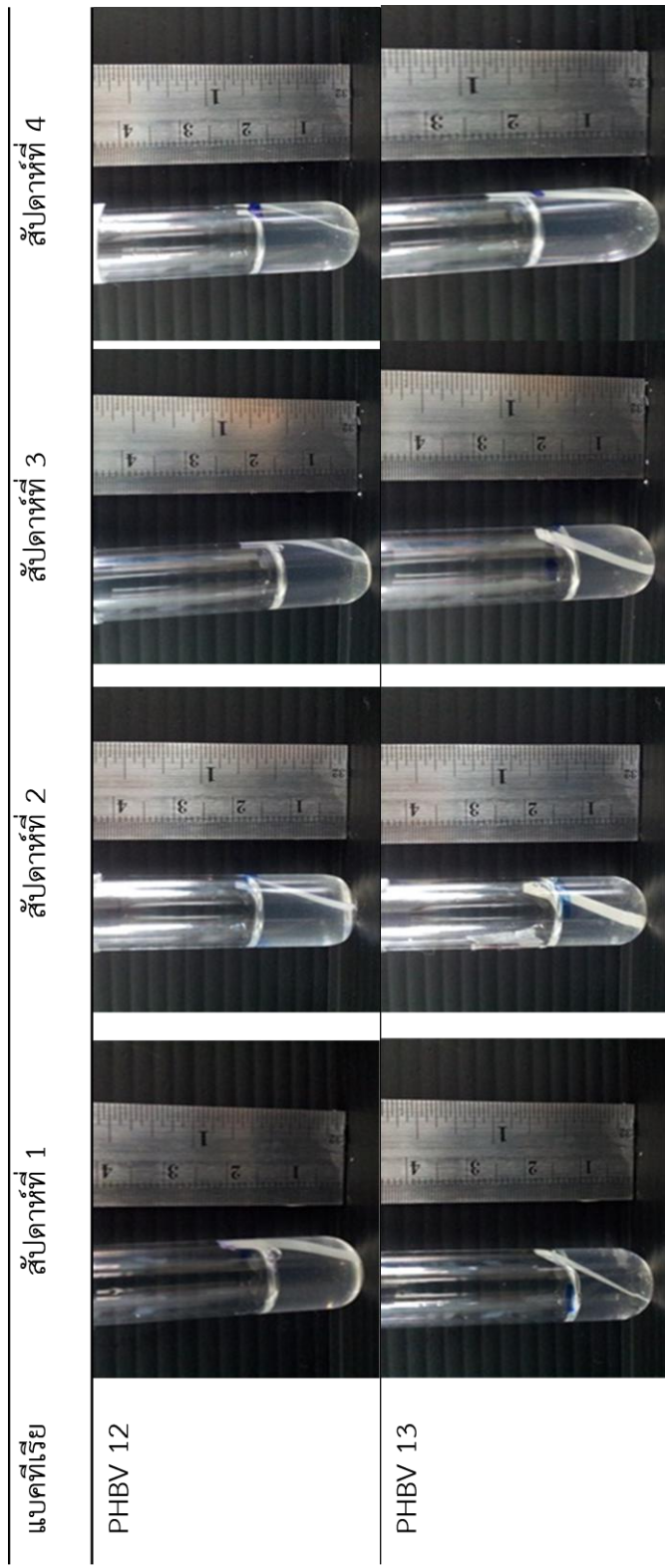


รูปที่ 4.9 (ต่อ)



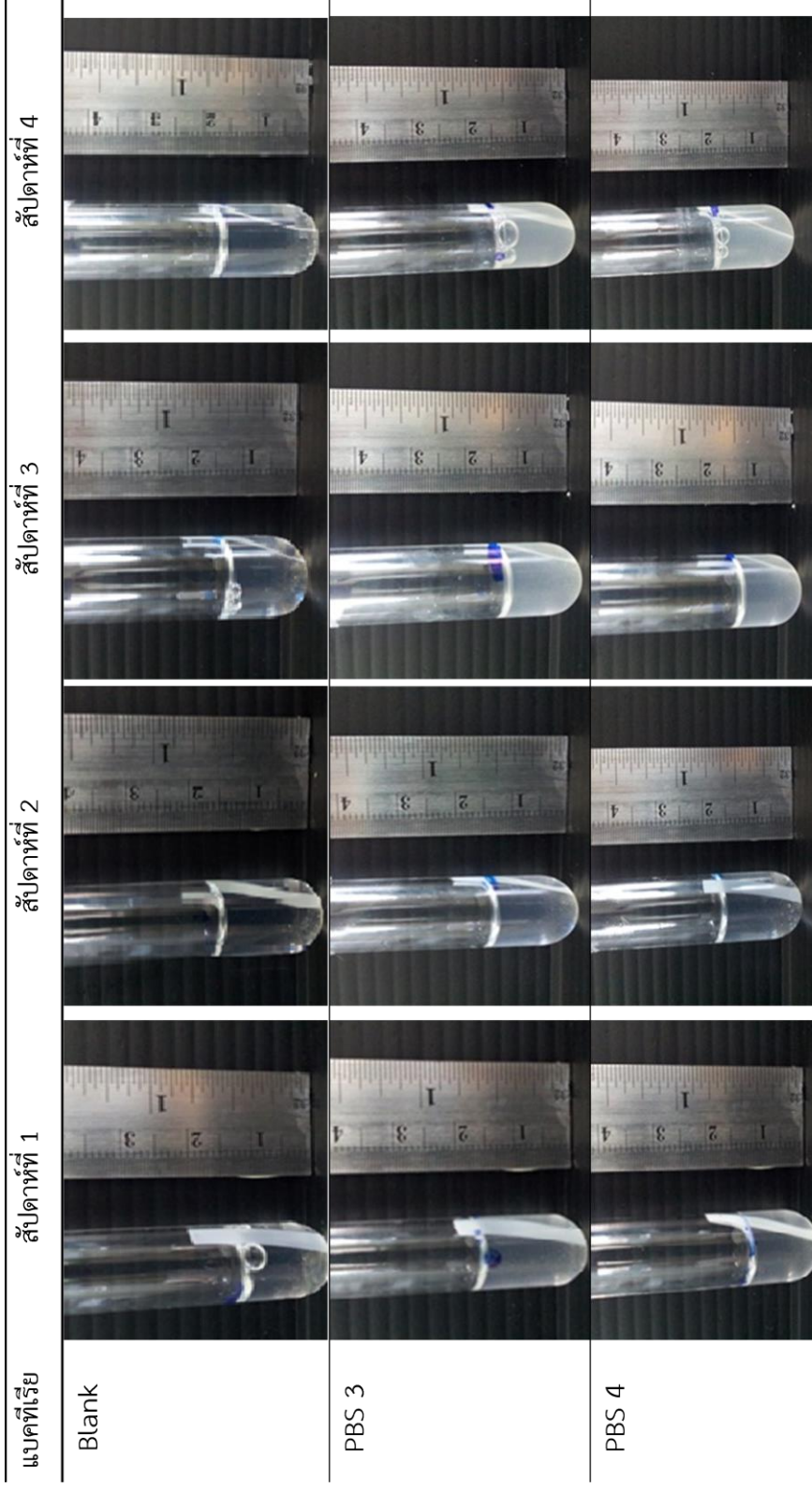


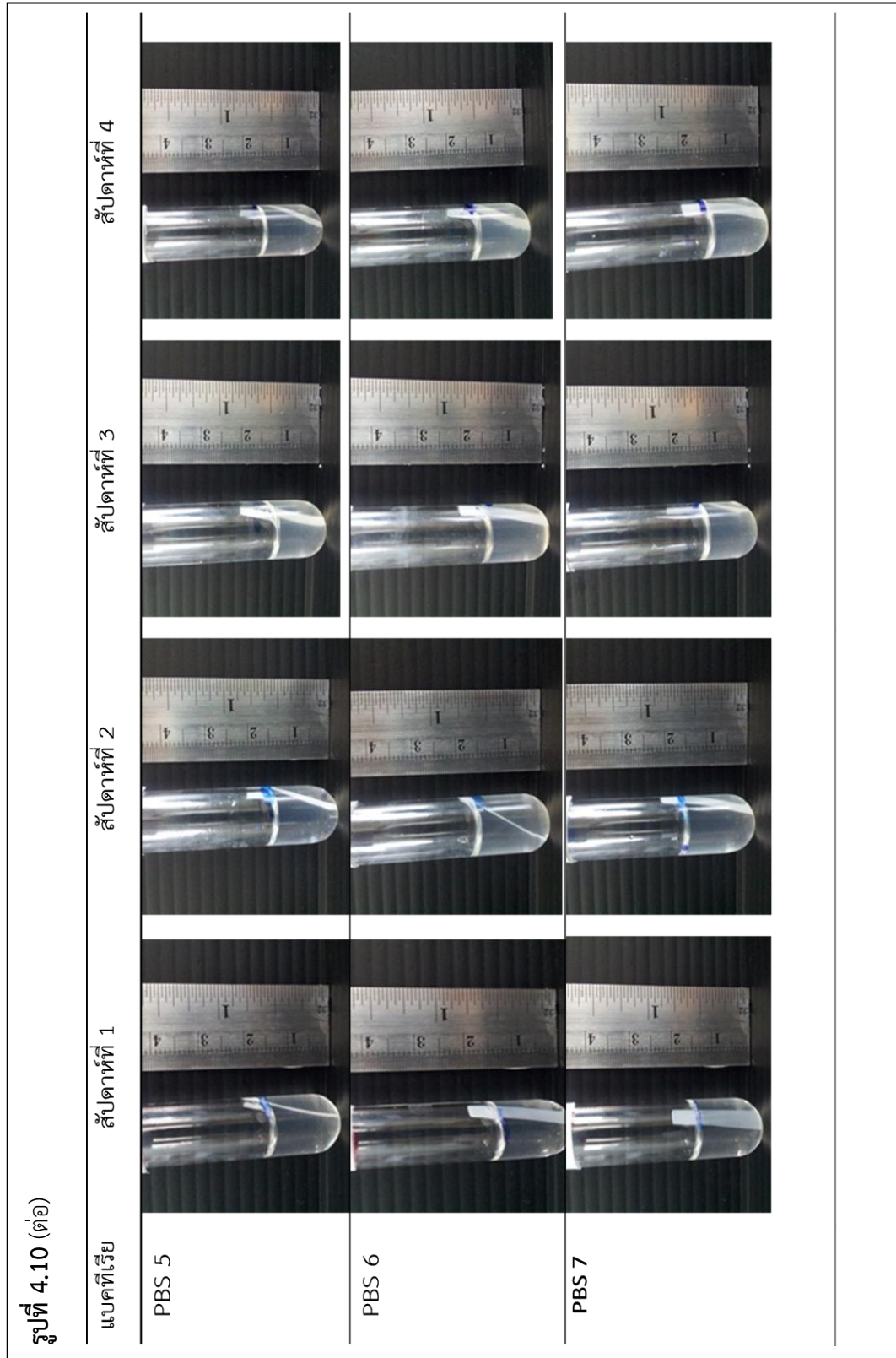
รูปที่ 4. 9 (ต่อ)

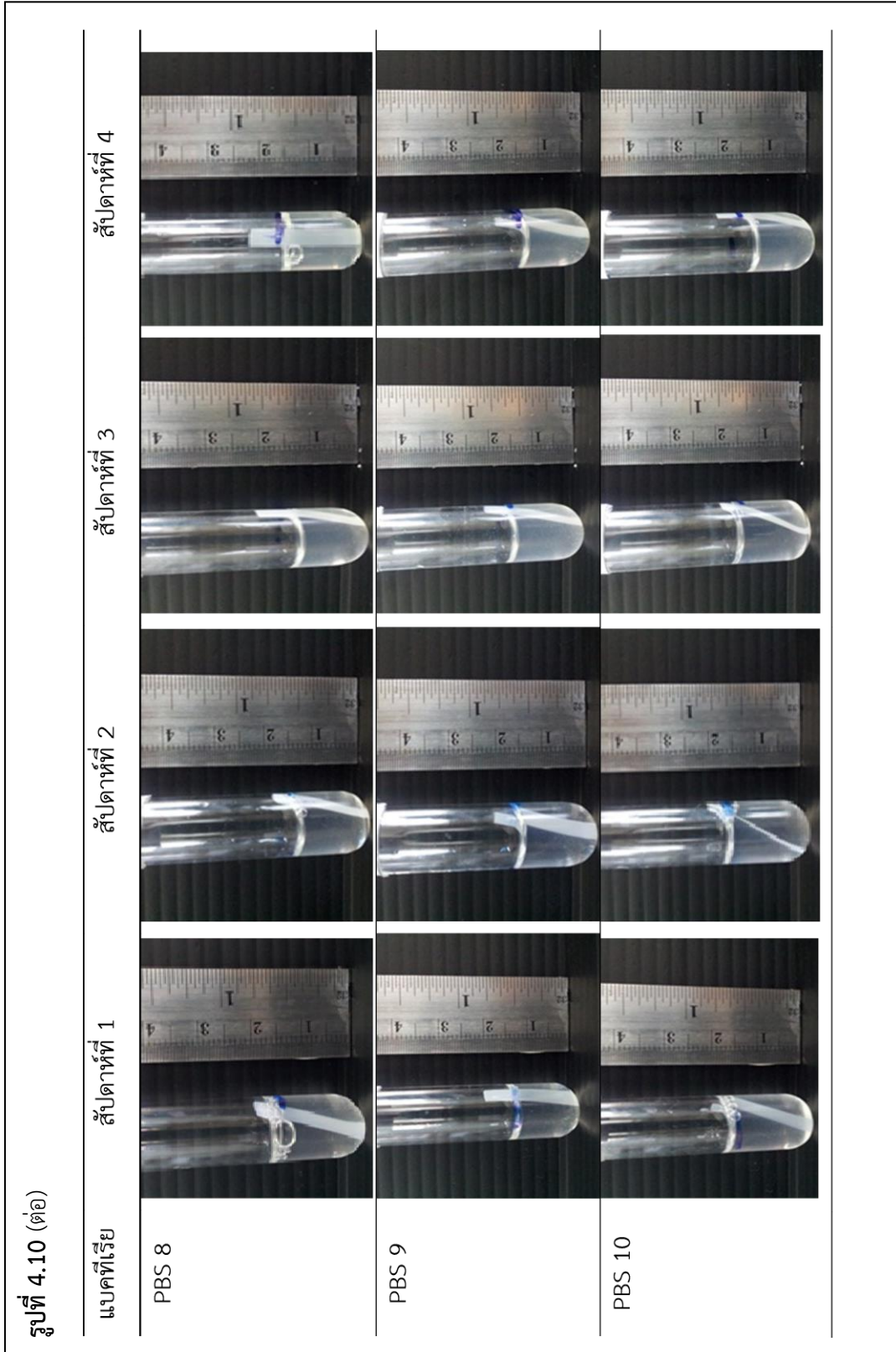




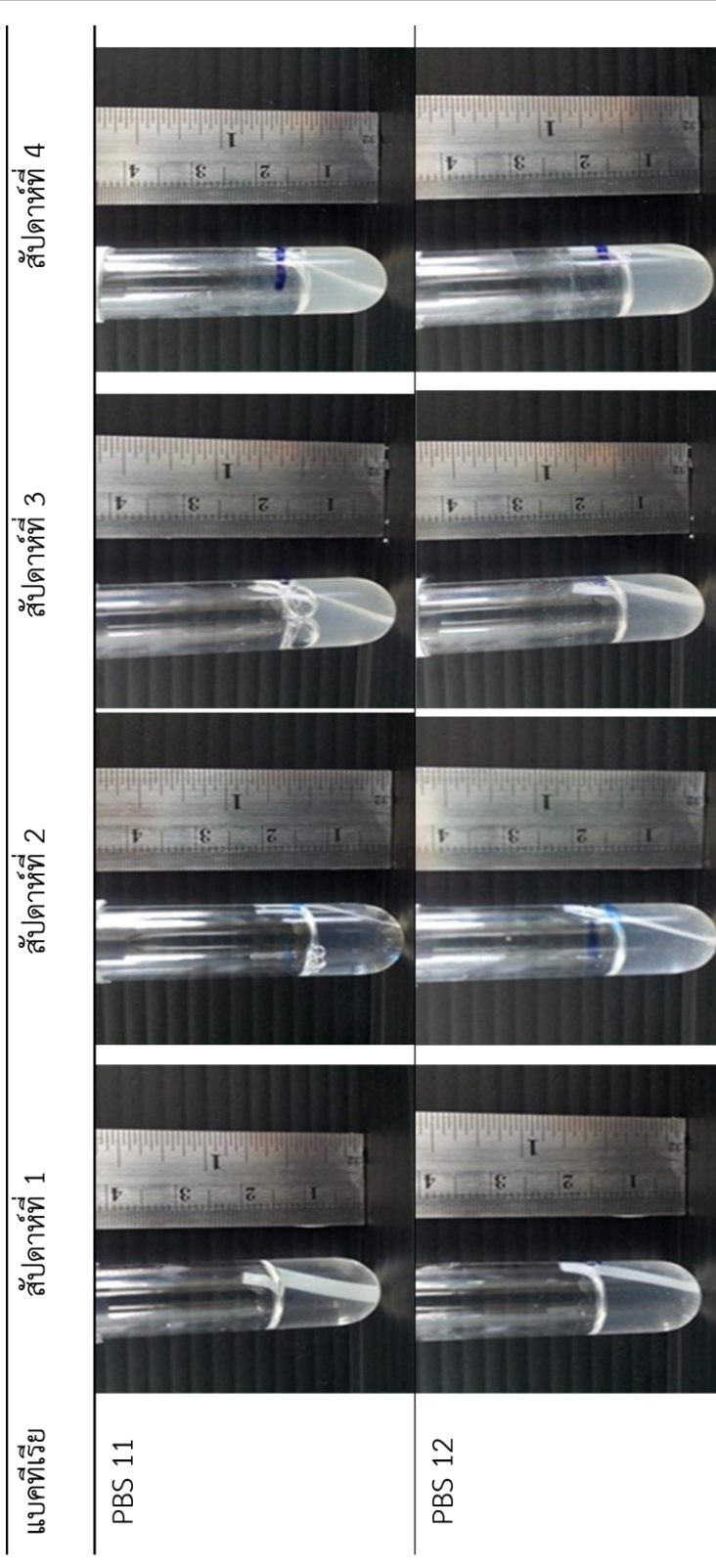
รูปที่ 4. 10 ภาพแสดงชุดทดสอบ PBS หลังการทดสอบ 1 – 4 สัปดาห์



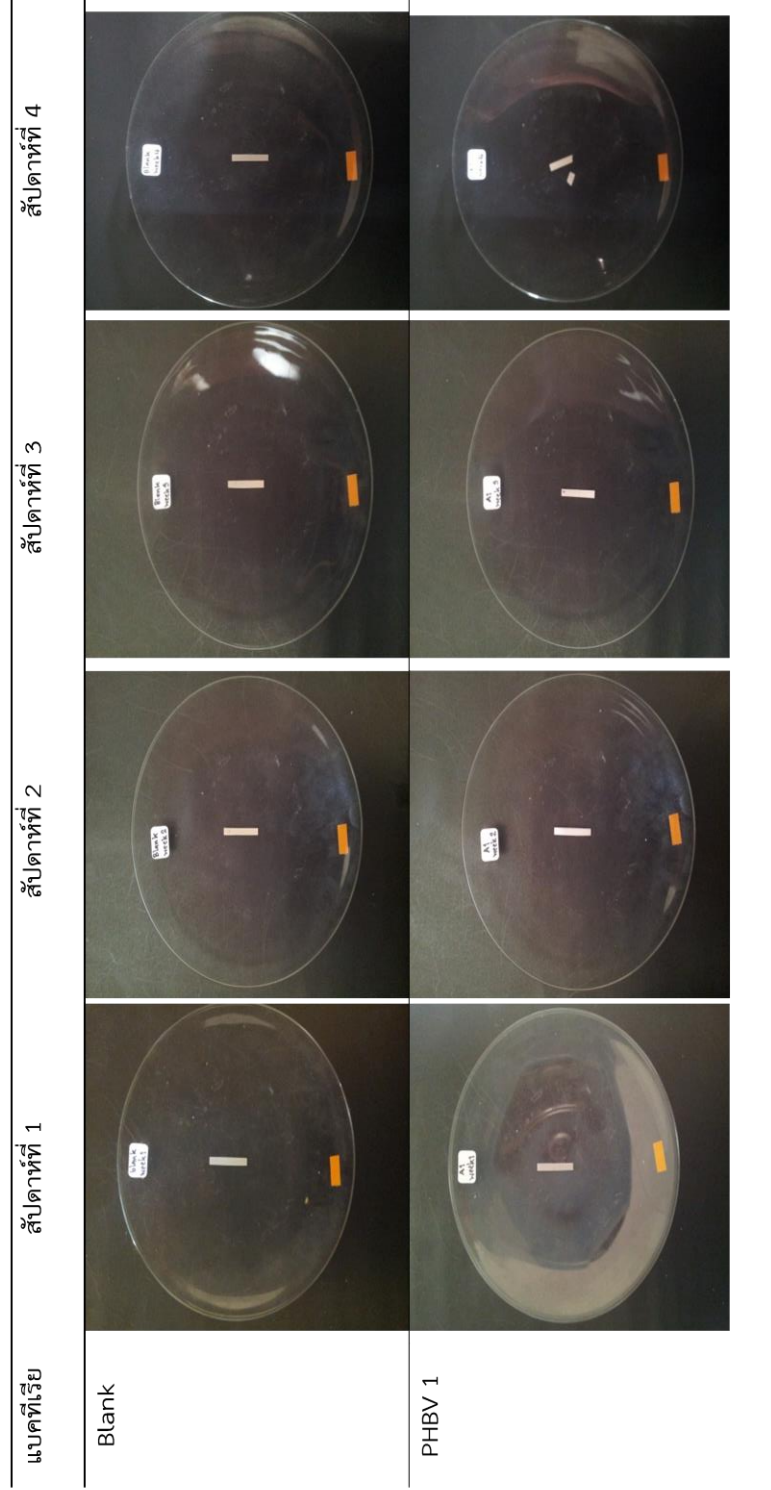


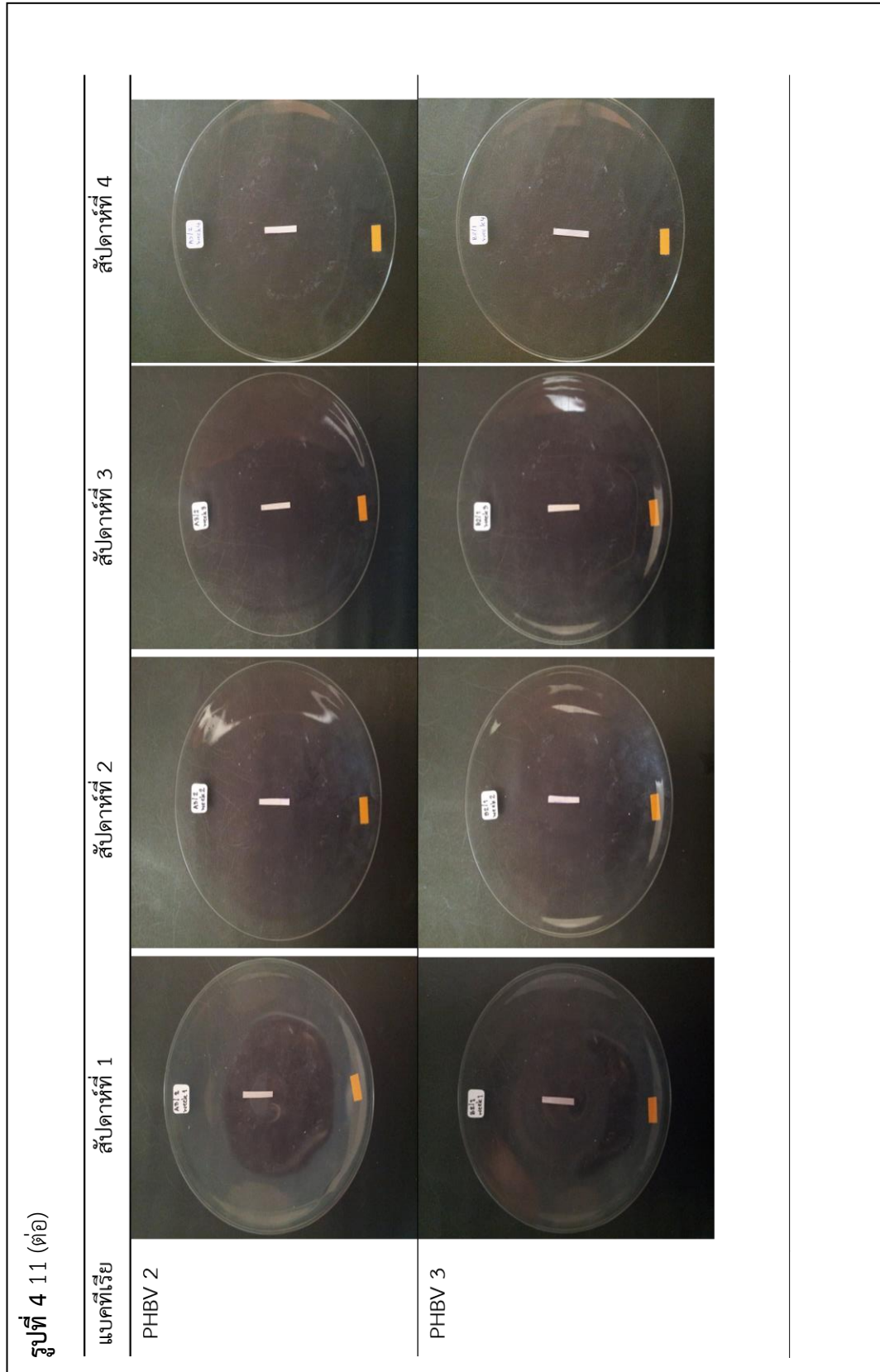


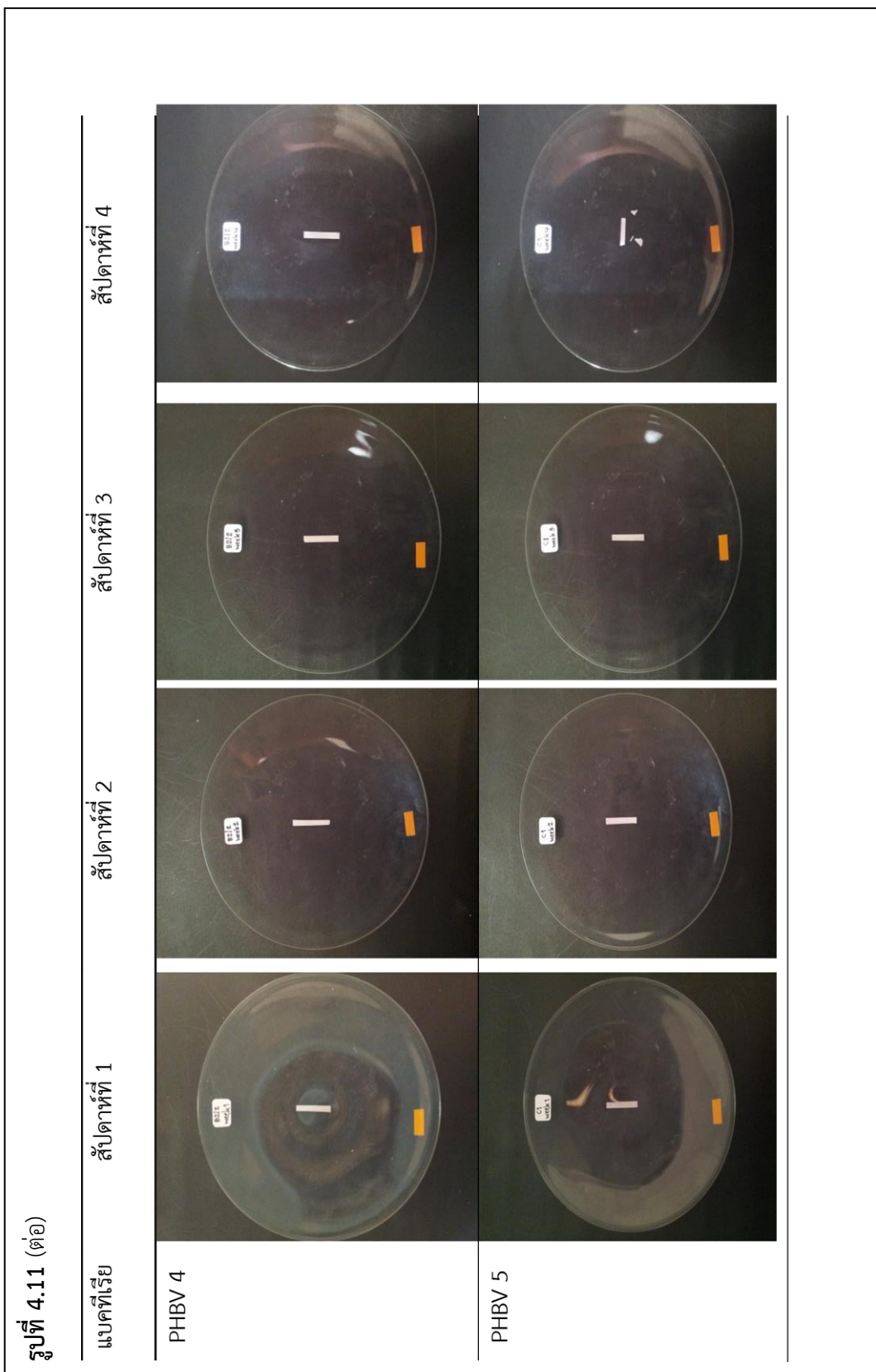
รูปที่ 4.10 (ต่อ)



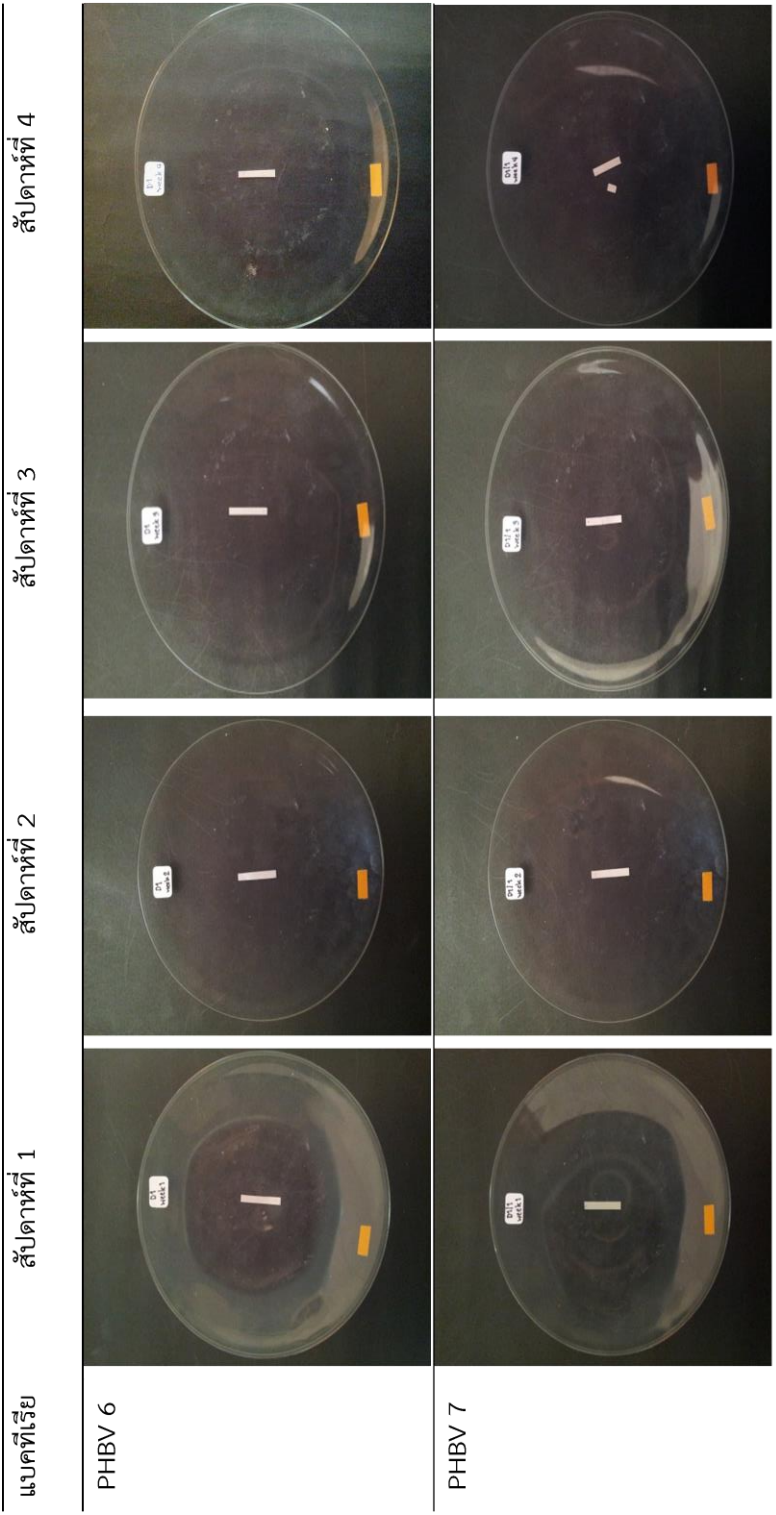
รูปที่ 4.11 ภาพถ่าย PHBV หลังการทดสอบ 1 - 4 สัปดาห์



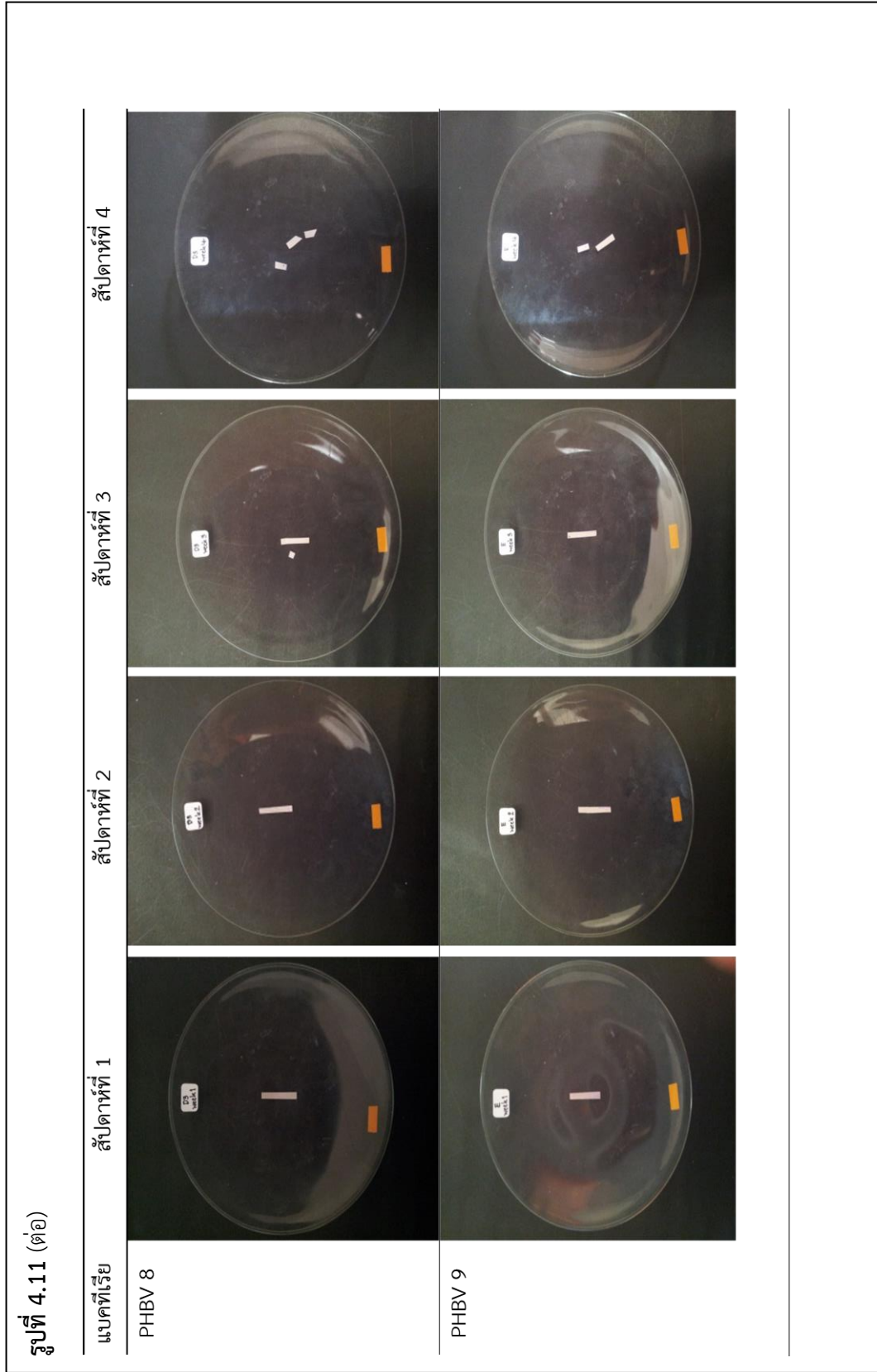


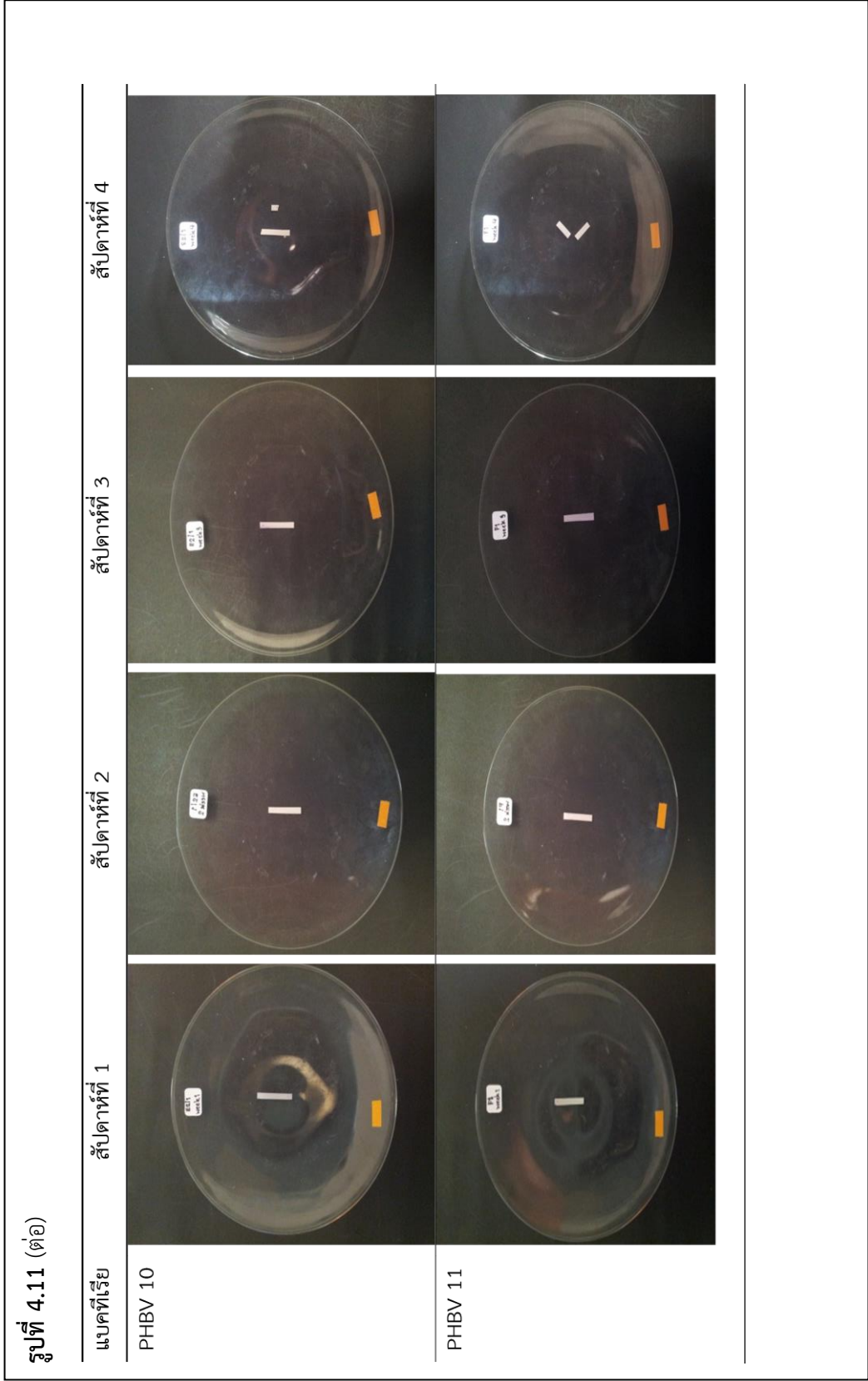


รูปที่ 4.11 (ต่อ)

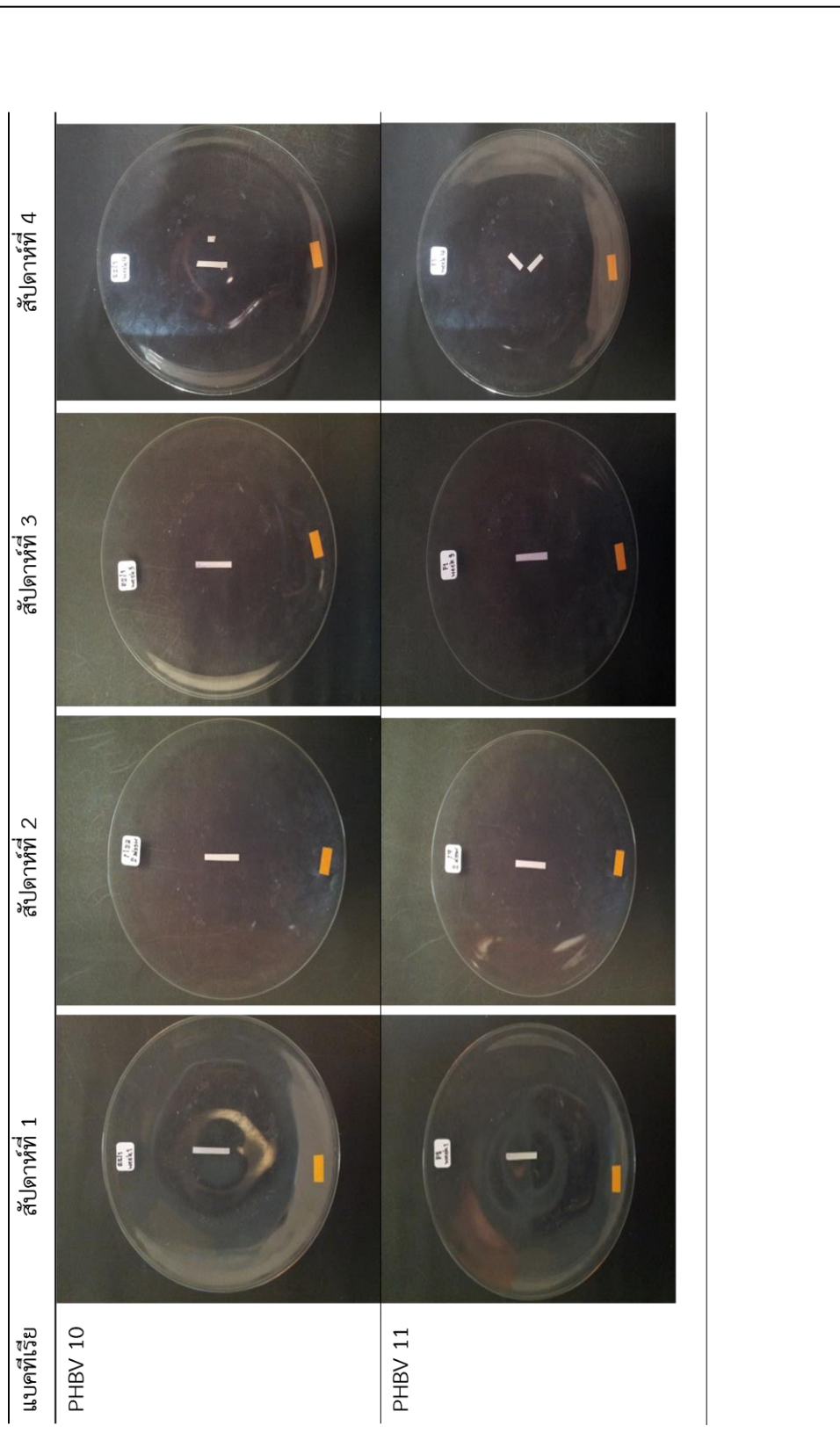


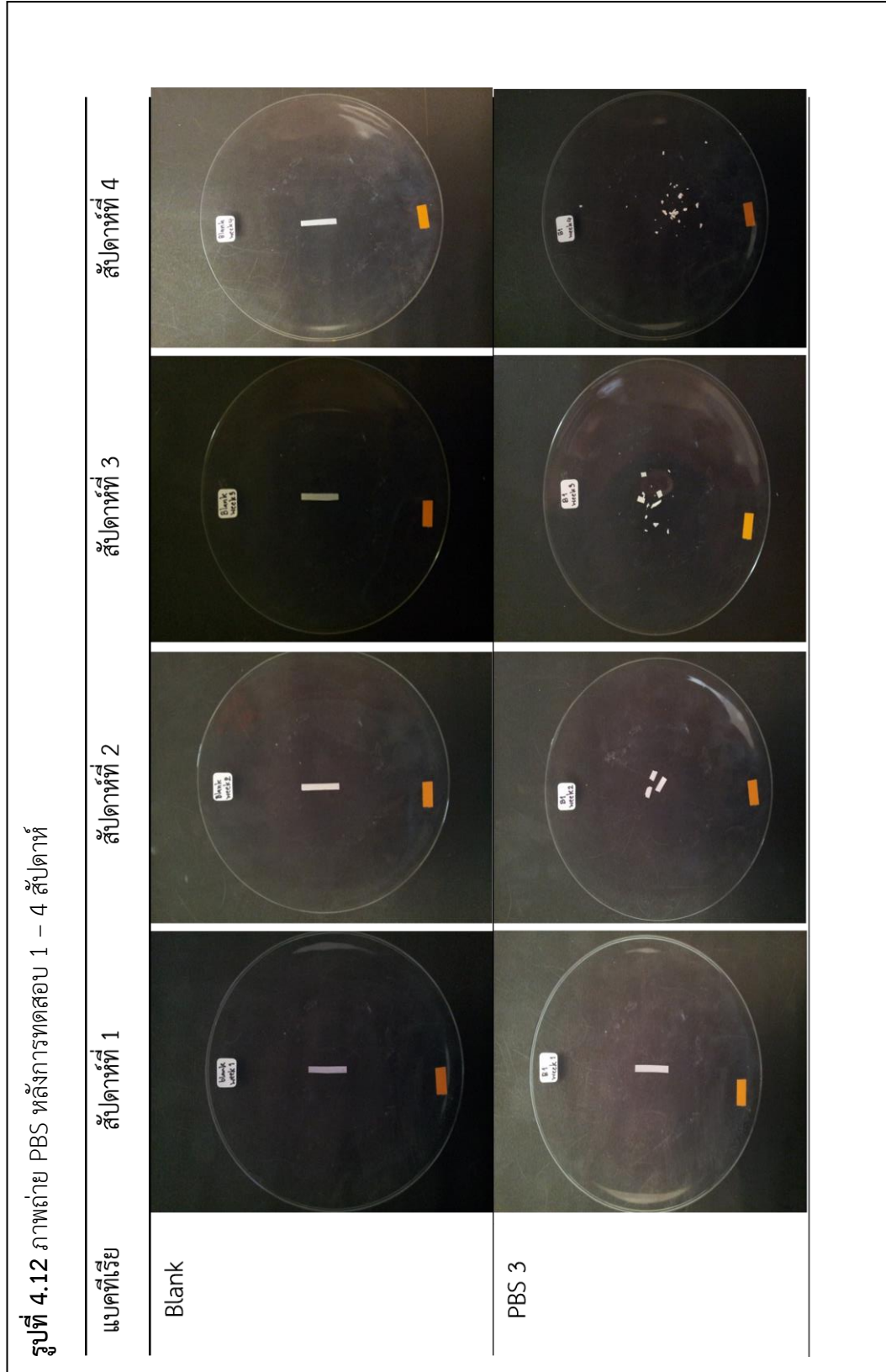


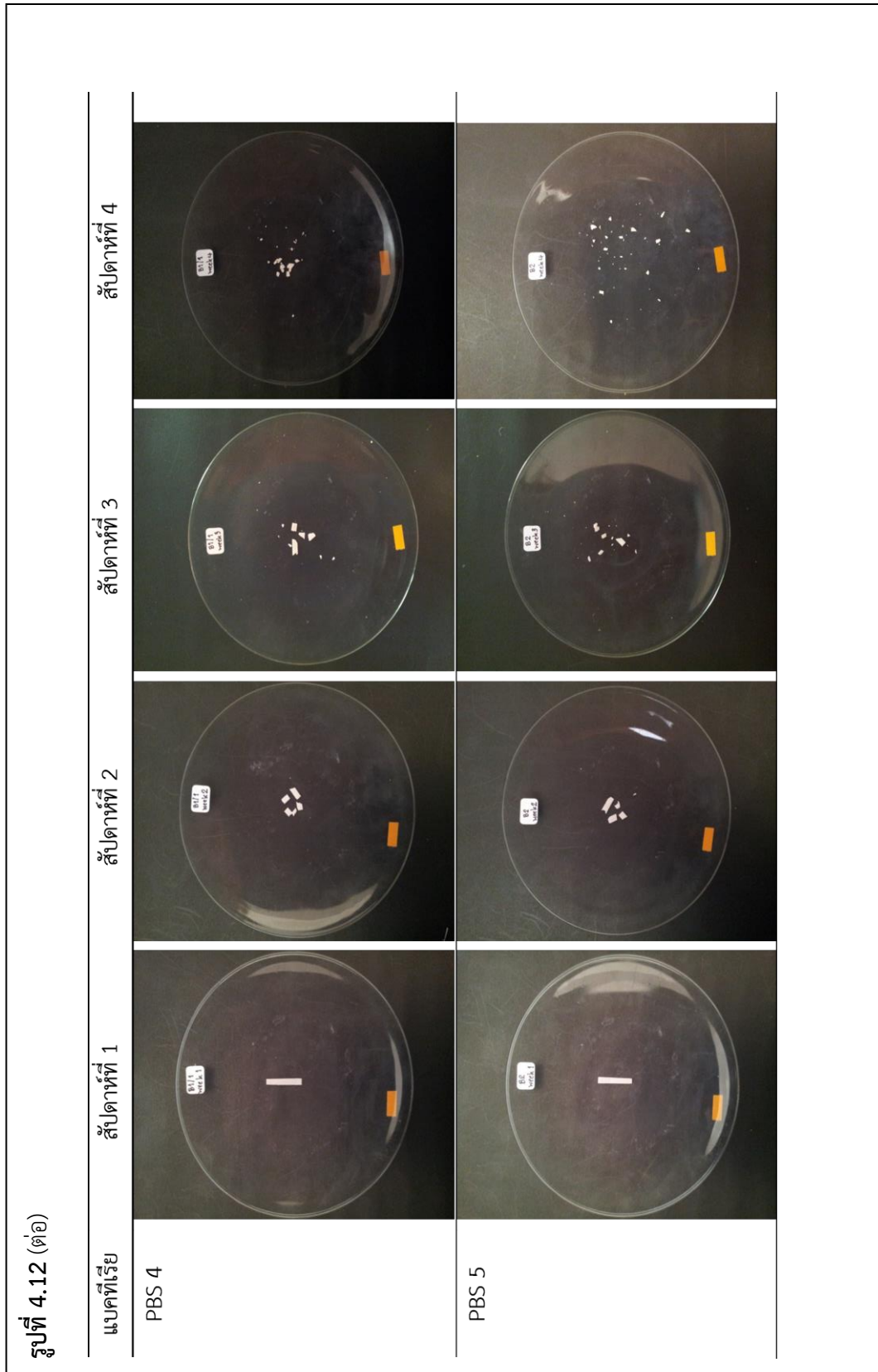


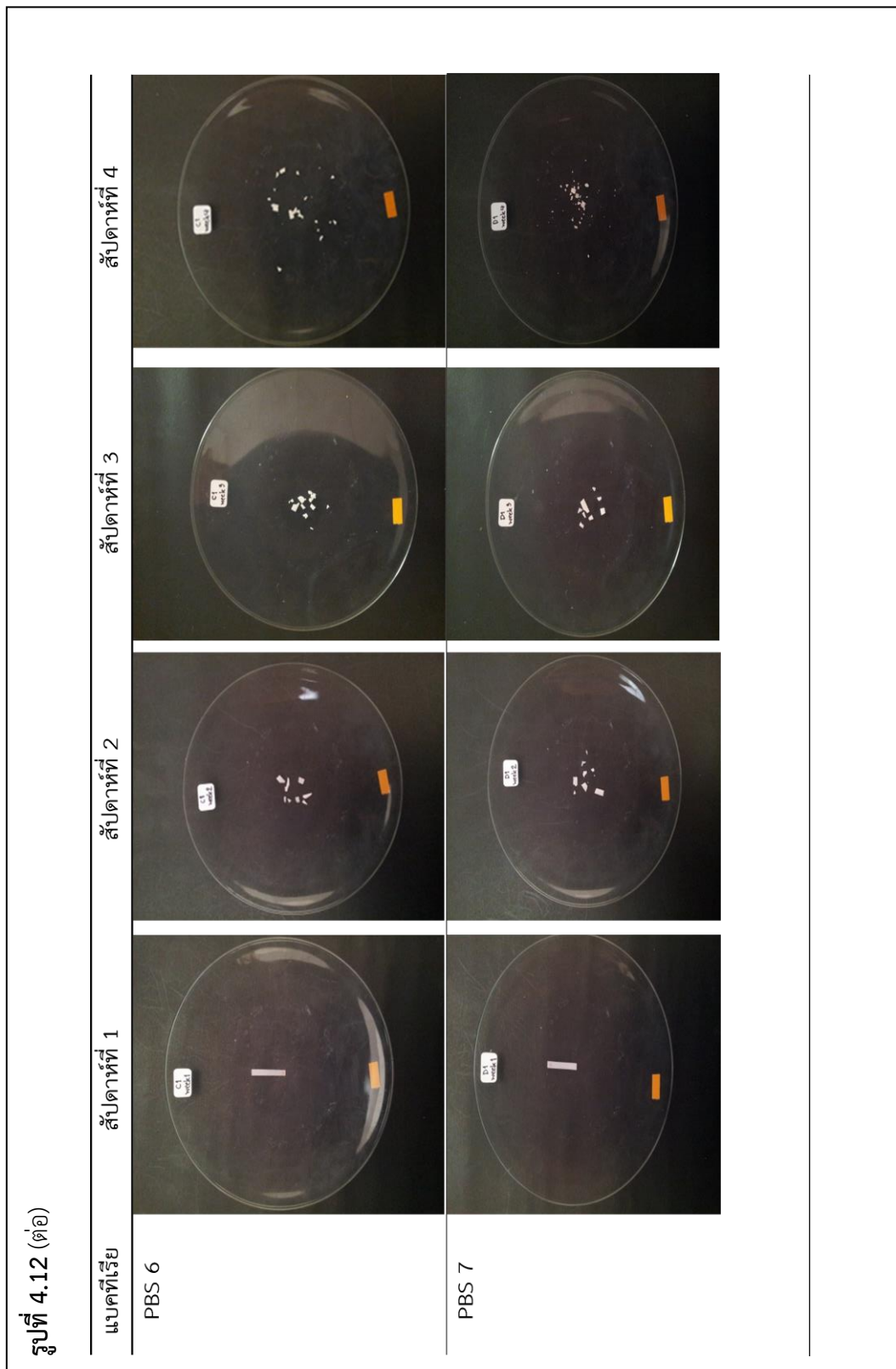


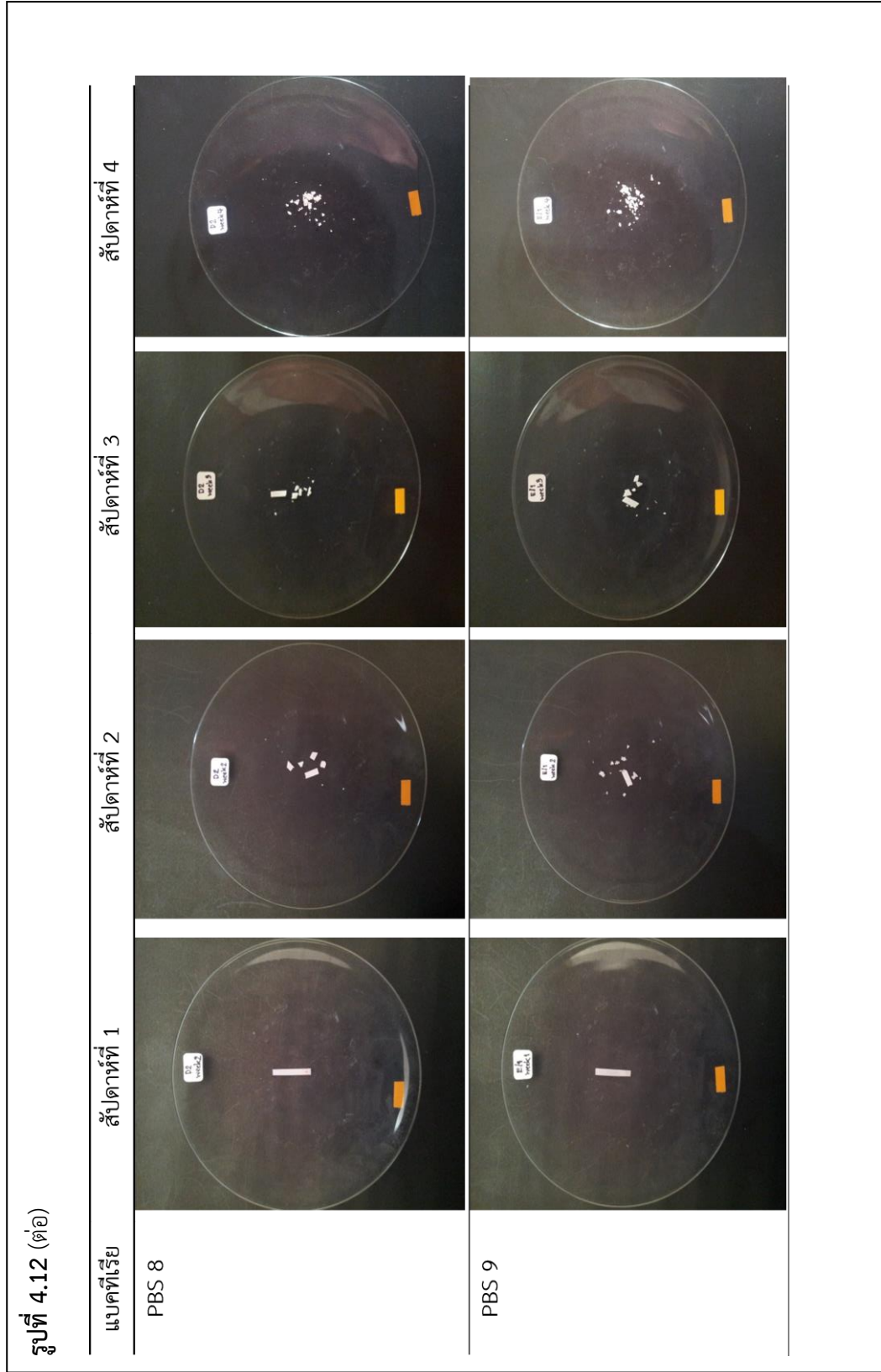
รูปที่ 4.11 (ต่อ)

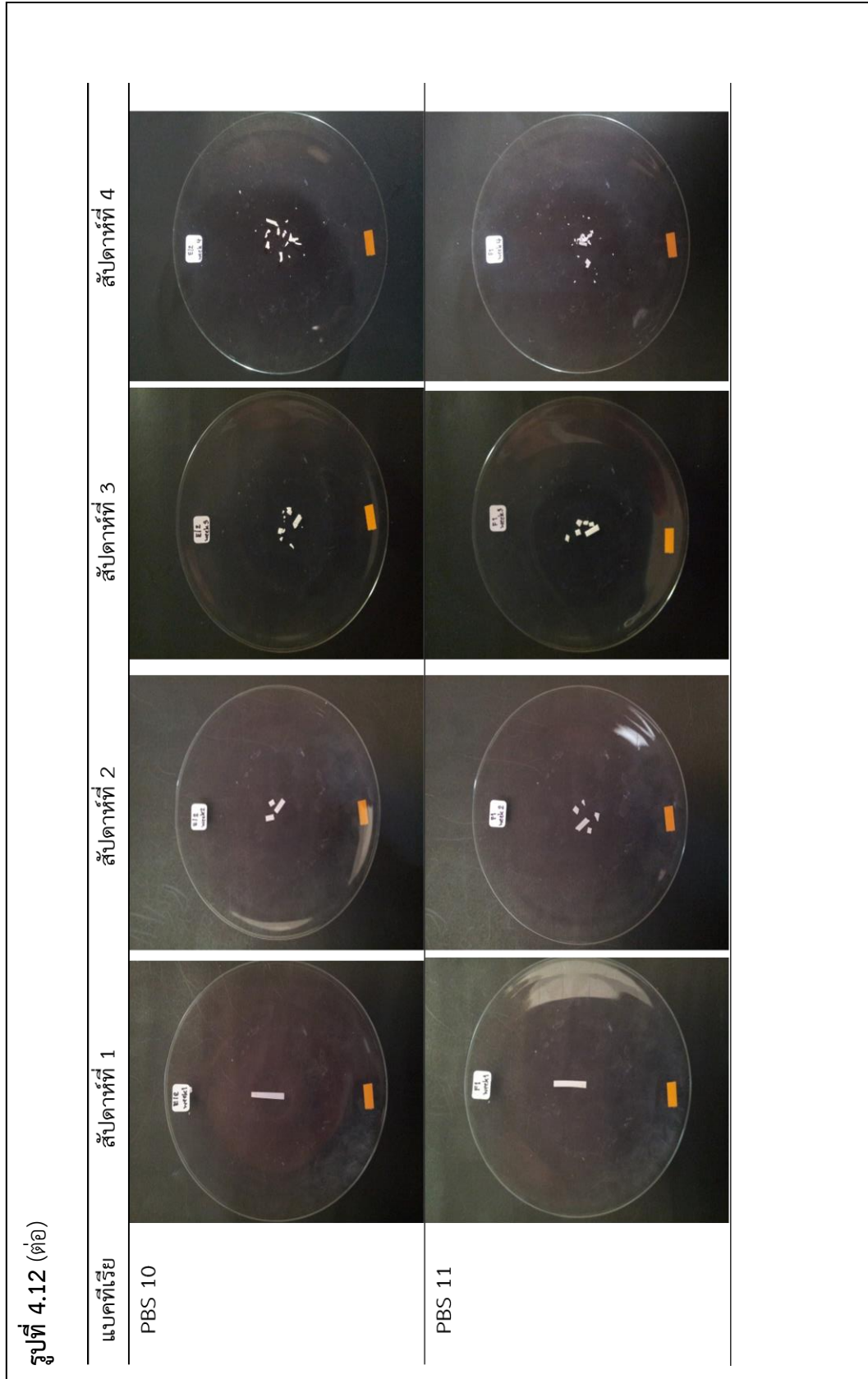






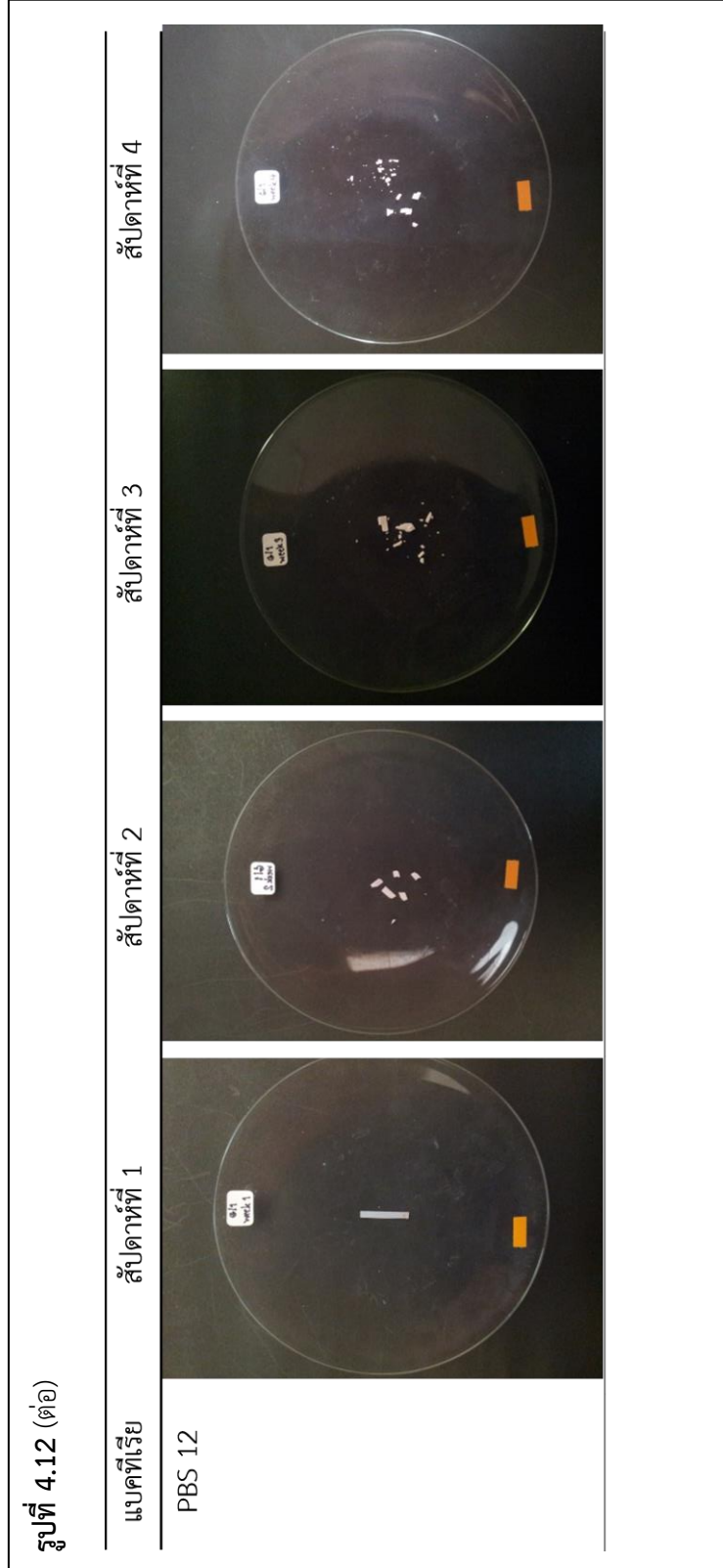


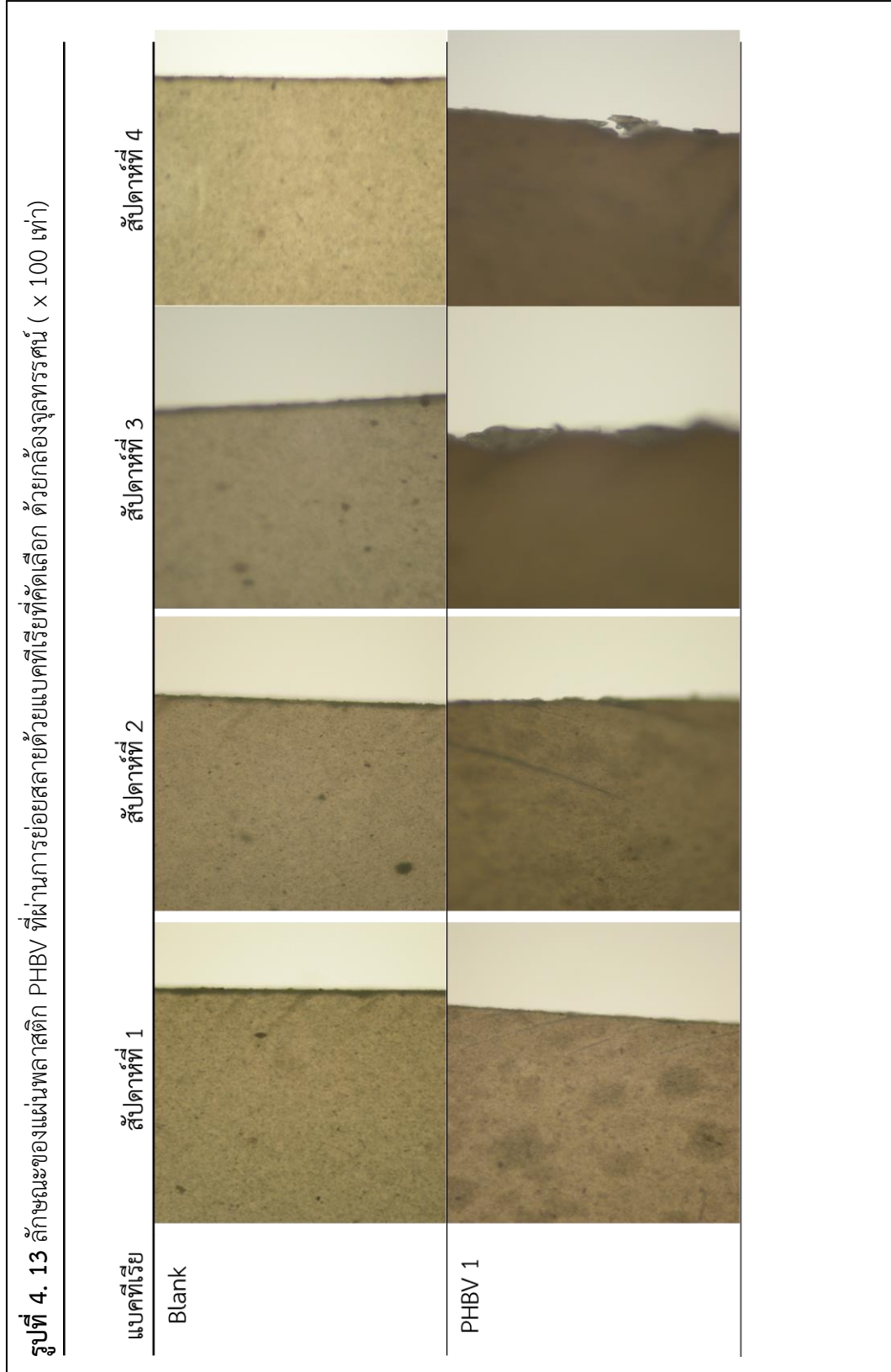


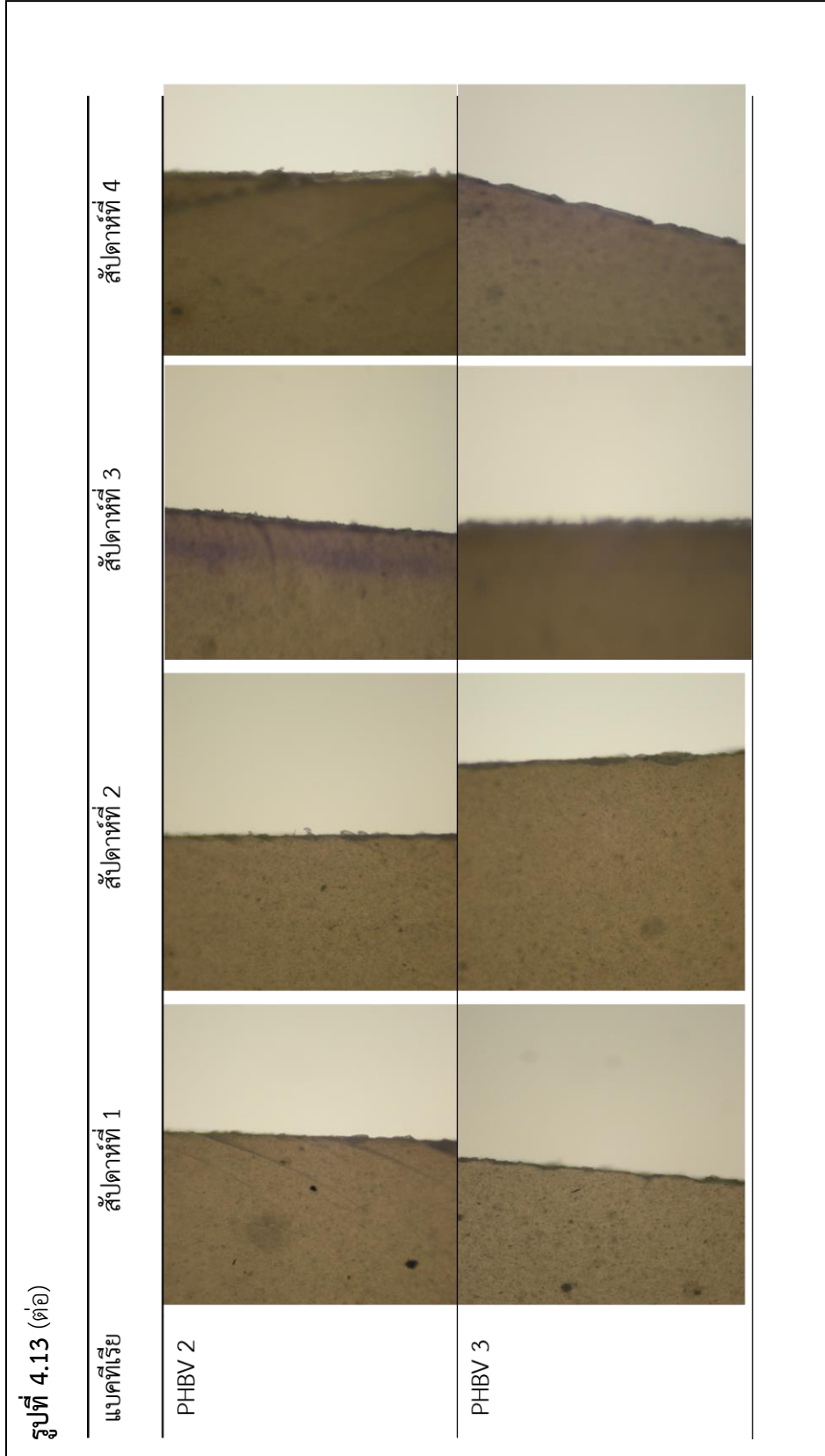






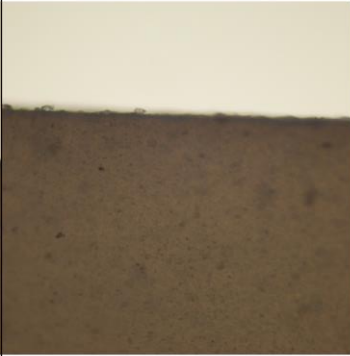


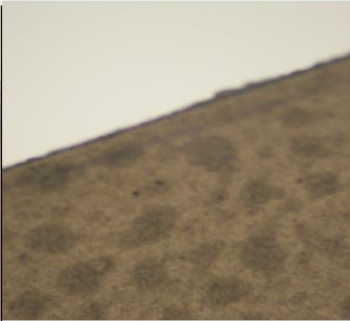


รูปที่ 4.12 (ต่อ)

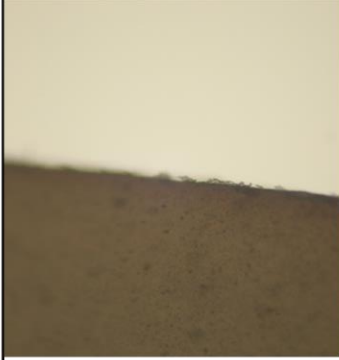


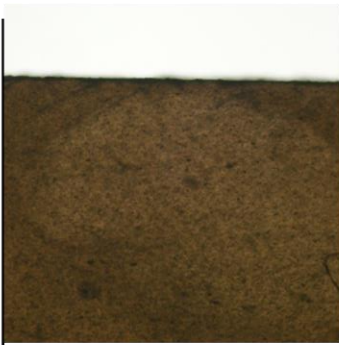


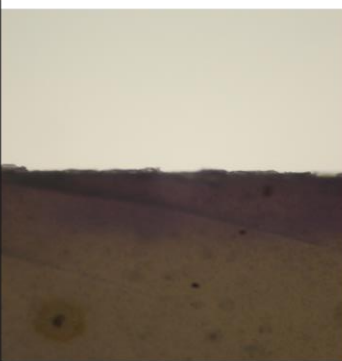





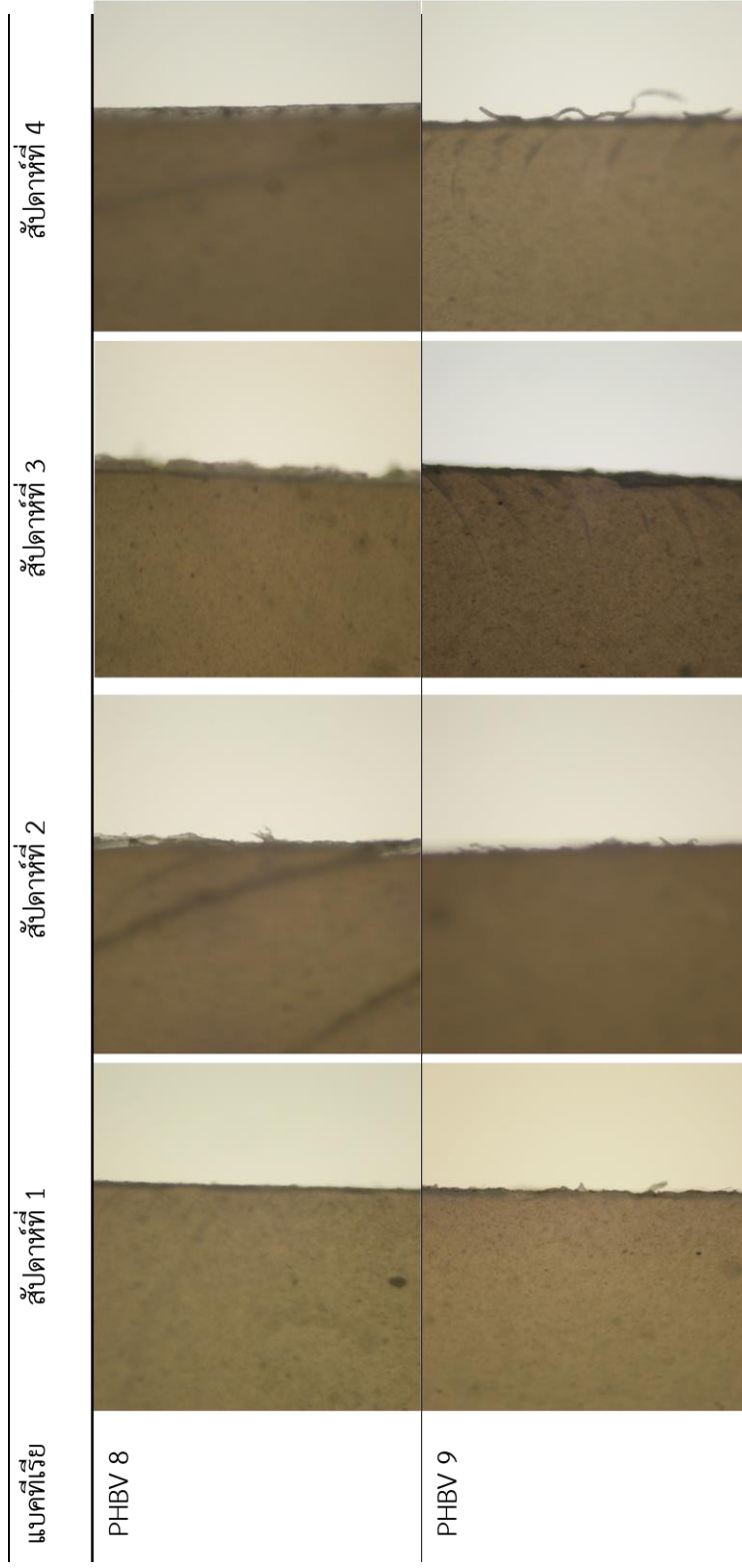


รูปที่ 4.13 (ต่อ)	
แบบที่เรีย	สัปดาห์ที่ 1      สัปดาห์ที่ 2      สัปดาห์ที่ 3      สัปดาห์ที่ 4
PHBV 4	   
PHBV 5	   



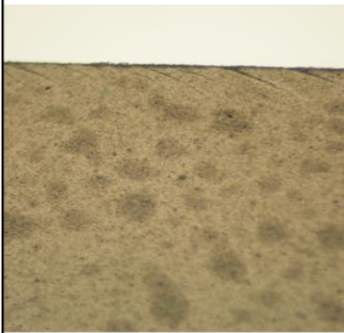

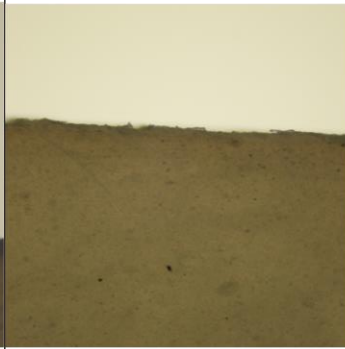

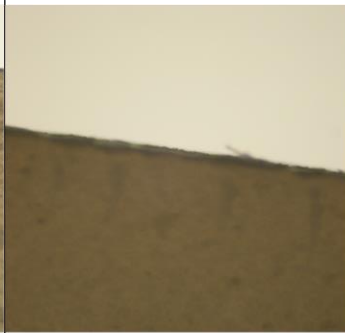

รูปที่ 4.13 (ต่อ)

แบคทีเรีย	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
PHBV 6				
PHBV 7				

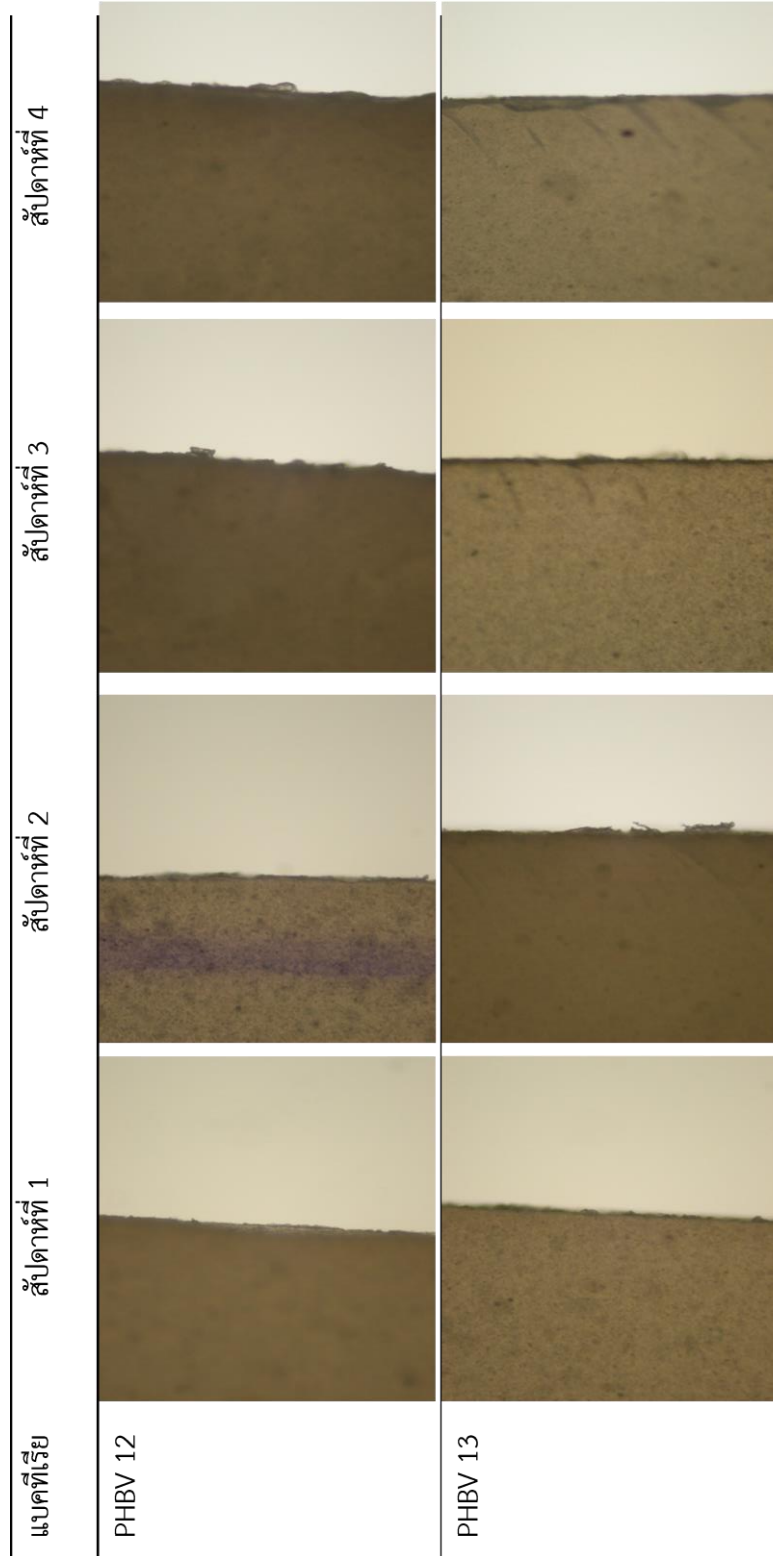
รูปที่ 4.13 (ต่อ)



รูปที่ 4.13 (ต่อ)

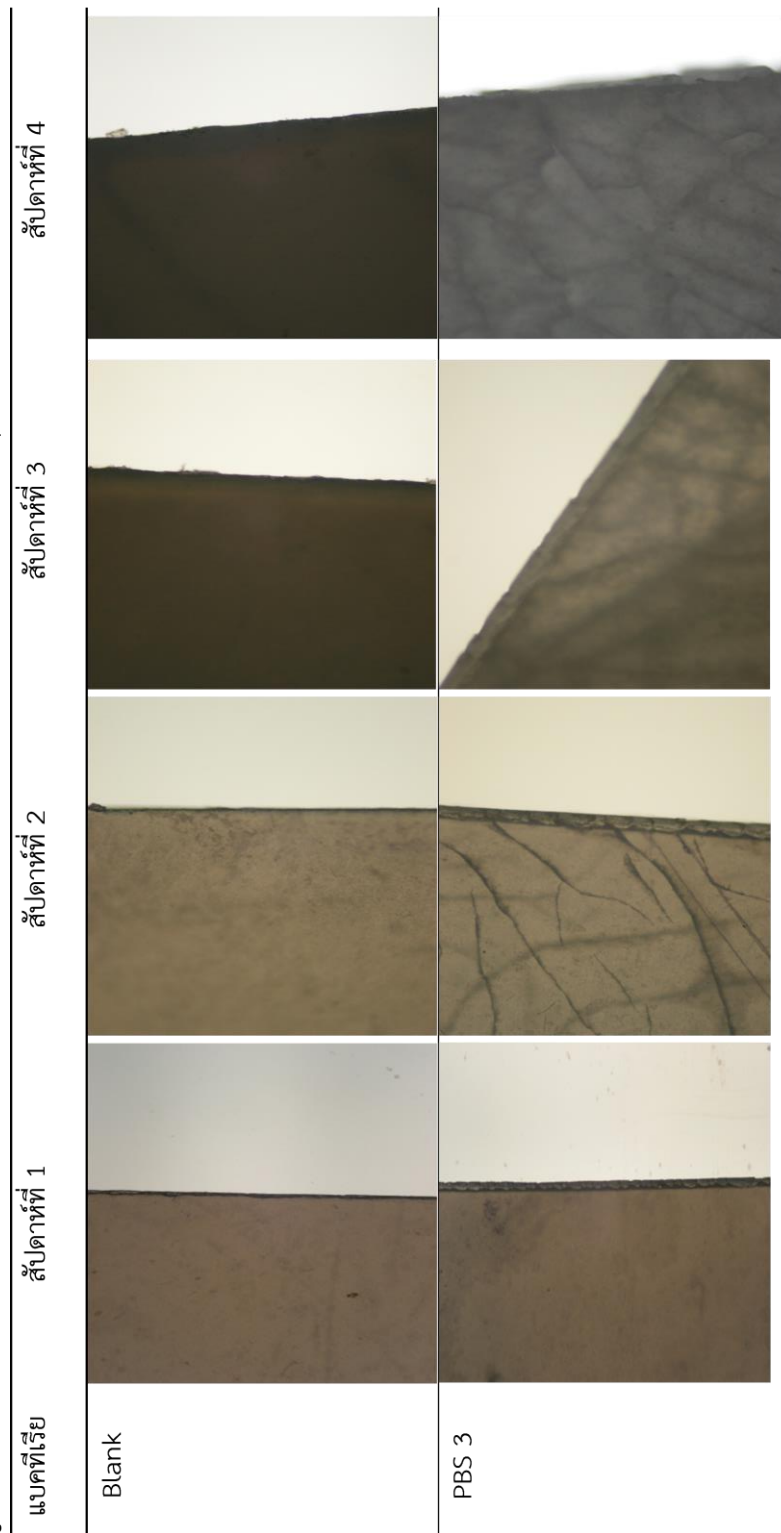
แบบที่เรีย	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
PHBV 10				
PHBV 11				

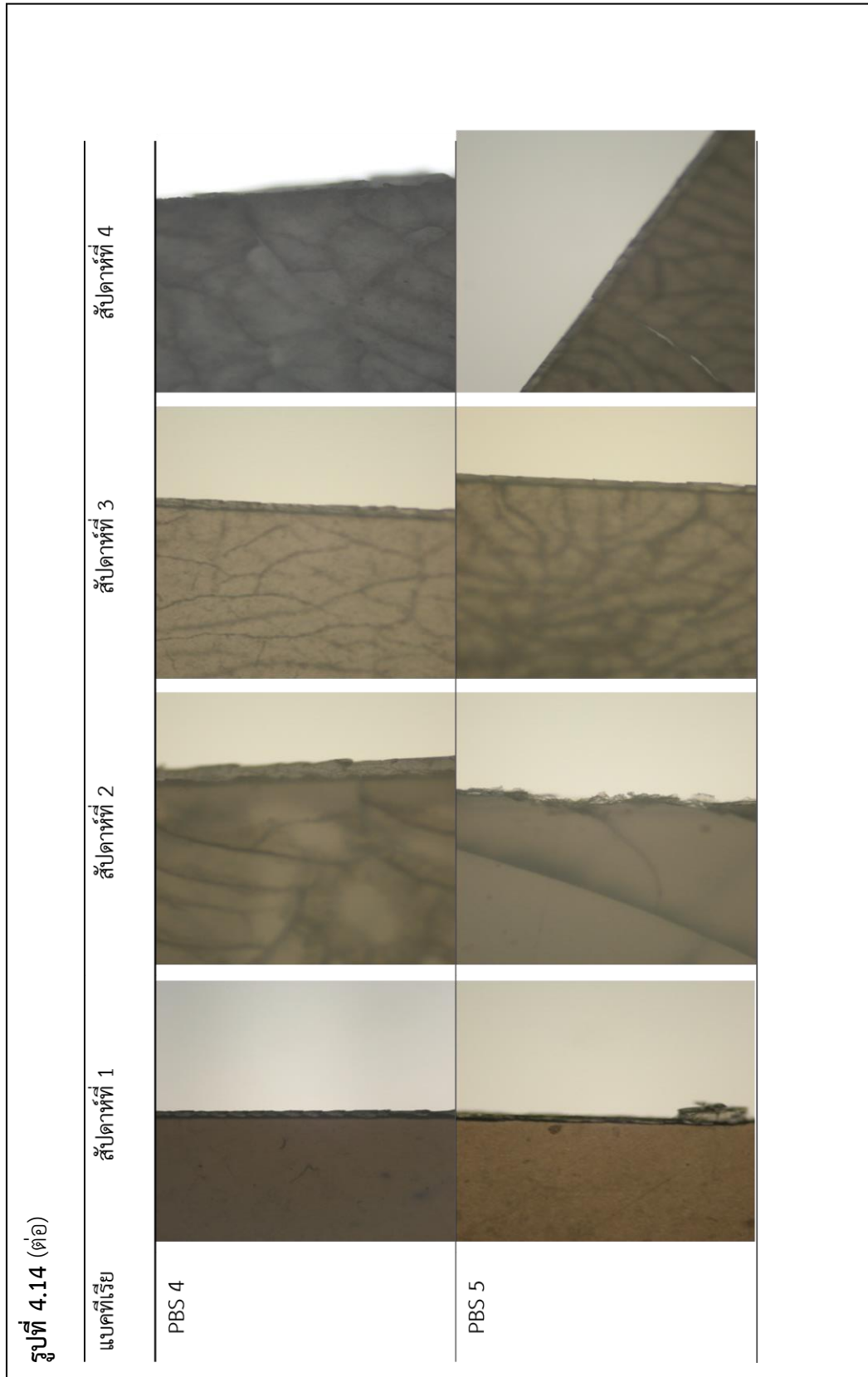
รูปที่ 4.13 (ต่อ)

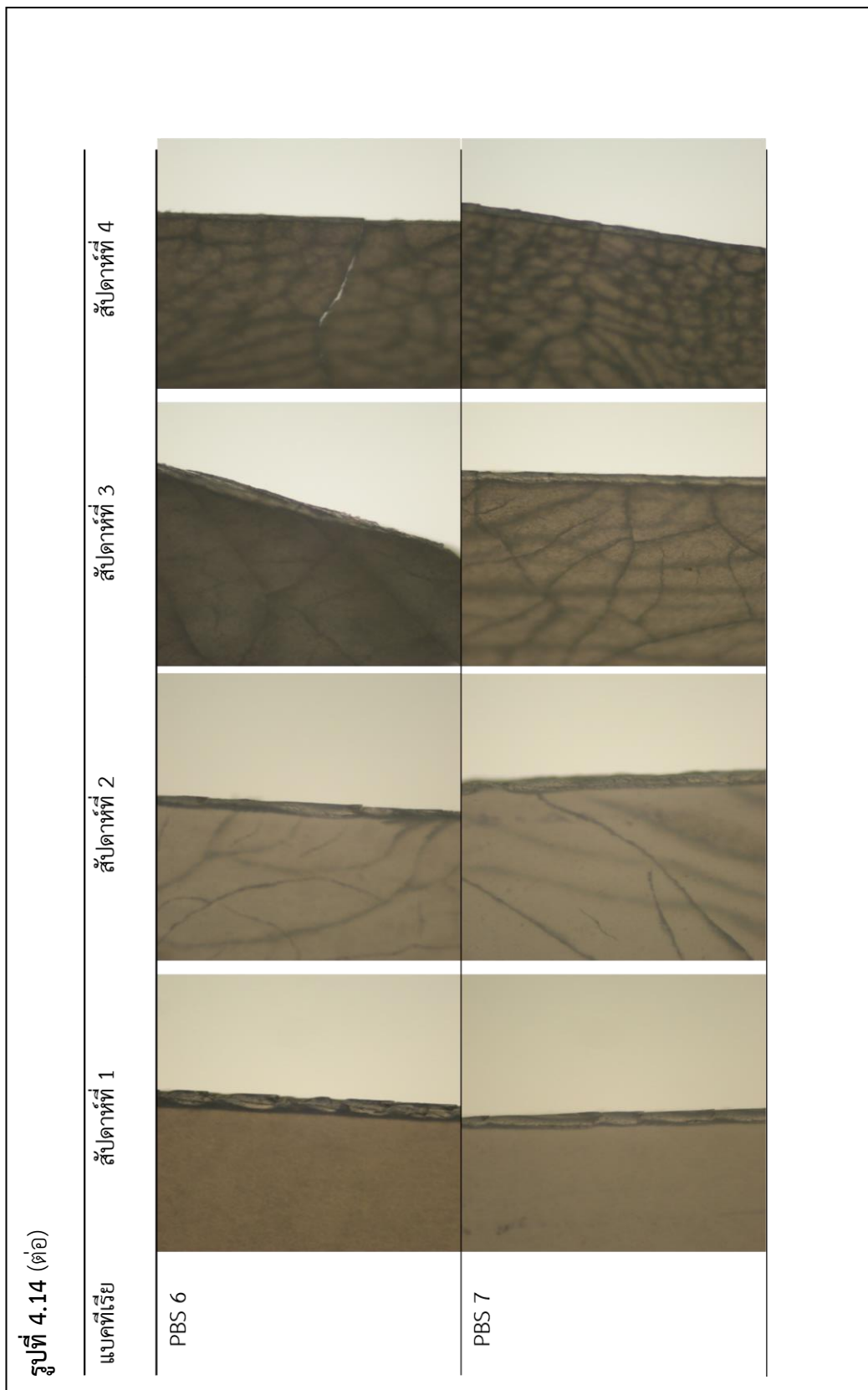


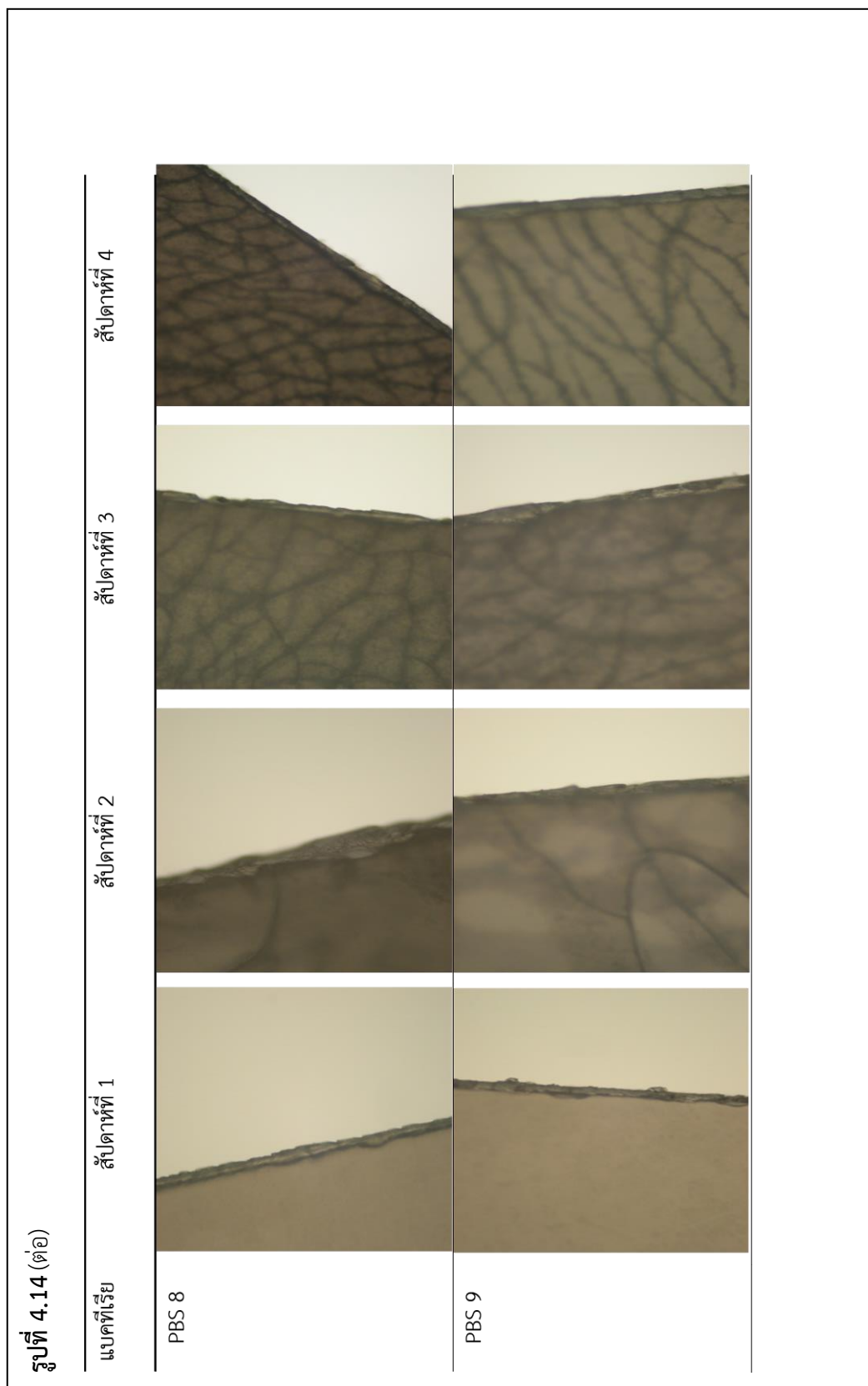


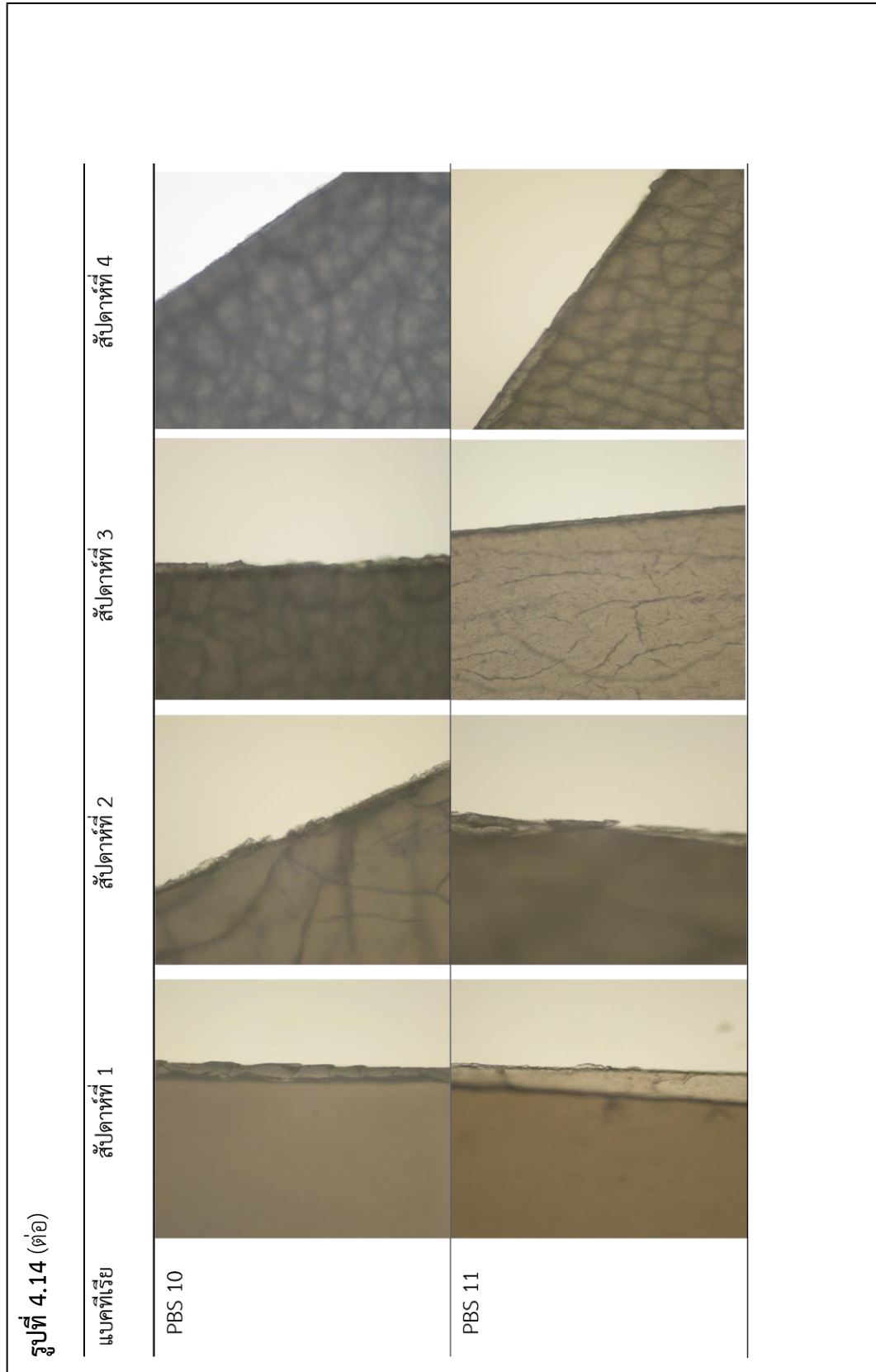
**รูปที่ 4. 14** ลักษณะของแผ่นพลาสติก PBS ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยแบคทีเรียที่คัดเลือก ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ( x 100 เท่า)











รูปที่ 4.14 (ต่อ)

แบคทีเรีย

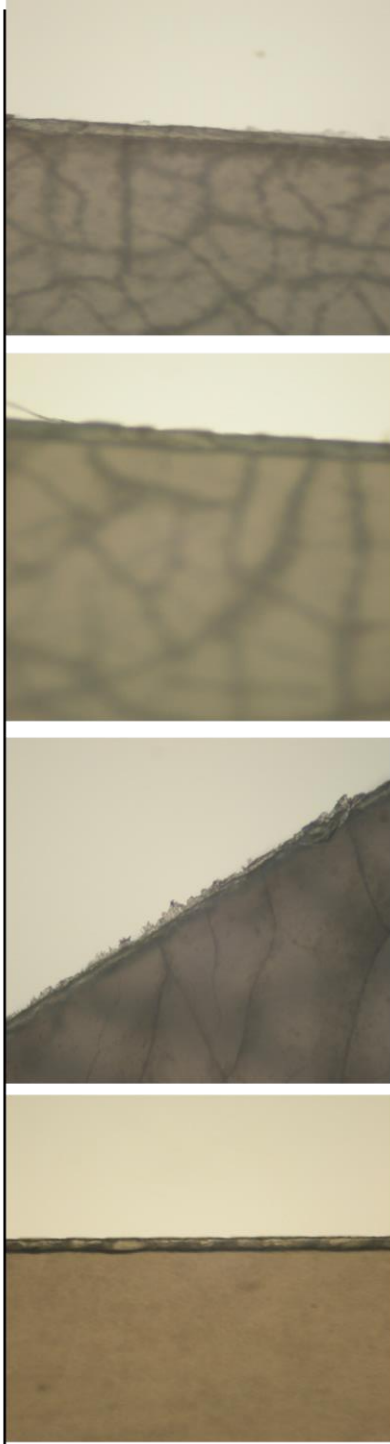
สไลด์ที่ 1

สไลด์ที่ 2

สไลด์ที่ 3

สไลด์ที่ 4

PBS 12



#### 4.3.7 เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายพลาสติก PHBV (% degradation by weight)

หลังการย่อยสลายด้วยระยะเวลา 4 สัปดาห์ คำนวณเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายจากการวิเคราะห์น้ำหนักแห้งของแผ่นพลาสติก PHBV แสดงไว้ในตารางที่ 4.1 พบว่าแบคทีเรียที่ได้ทำการคัดแยกและนำมาทดสอบสามารถย่อยสลายพลาสติกได้ดีจากมากไปน้อยคือ PHBV 11 = 35.77%, PHBV 5 = 28.67%, PHBV 4 = 27.33%, PHBV 1 = 27.20%, PHBV 10 = 20.12%, PHBV 7 = 19.89%, PHBV 8 = 18.83%, PHBV 13 = 2.34%, PHBV 3 = 2.22%, PHBV 12 = 1.10%, PHBV 9 = 1.05%, PHBV 6 = 0.93% และ PHBV 2 = 0.88% ชุดควบคุม = 0.004%

จะเห็นได้ว่าระยะเวลา 4 สัปดาห์ PHBV 11 ย่อย PHBV ได้มากที่สุดคือ 35.77% ในขณะที่พลาสติก PHBV อยู่ในสภาวะฝังกลบเป็นเวลา 6 เดือน จะย่อยสลายได้ 100% (สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553) แบคทีเรียที่ย่อยสลายน้อยไม่เหมาะที่จะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป แผ่นพลาสติกที่ถูกย่อยจะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และนำแบคทีเรียที่ย่อย PHBV ได้มากที่สุด 3 ชนิดได้แก่ PHBV 11 PHBV 5 และ PHBV 4 ไประบุชนิดแบคทีเรีย (identified) ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ร้อยละการย่อยสลายของ PHBV (โดยน้ำหนัก)

แบคทีเรีย	น้ำหนักก่อนย่อย	น้ำหนักหลังย่อย	น้ำหนักที่ลดลง	% การย่อยสลาย
PHBV 1	0.012157	0.00885	0.003307	27.20%
PHBV 2	0.00996	0.009873	0.000087	0.88%
PHBV 3	0.00811	0.00793	0.00018	2.22%
PHBV 4	0.00976	0.007093	0.002667	27.33%
PHBV 5	0.012087	0.008622	0.003465	28.67%
PHBV 6	0.009377	0.00929	0.000087	0.93%
PHBV 7	0.012887	0.010323	0.002564	19.89%
PHBV 8	0.015987	0.012977	0.00301	18.83%
PHBV 9	0.009163	0.009067	0.000096	1.05%
PHBV 10	0.010203	0.00815	0.002053	20.12%
PHBV 11	0.011673	0.007498	0.004175	35.77%
PHBV 12	0.010953	0.010833	0.00012	1.10%

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

แบคทีเรีย	น้ำหนักก่อนย่อย	น้ำหนักหลังย่อย	น้ำหนักที่ลดลง	% การย่อยสลาย
PHBV 13	0.009557	0.009333	0.000224	2.34%
Blank	0.010817	0.010773	0.000044	0.004%

#### 4.3.8 เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย PBS (% degradation by weight)

จากผลการวิเคราะห์น้ำหนักแห้งของแผ่นพลาสติก PBS หลังการย่อยสลายด้วยระยะเวลา 4 สัปดาห์จากตารางที่ 4.2 พบว่าแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพลาสติกได้ดีจากมากไปน้อยคือ PBS 3 = 40.12%, PBS 7 = 35.36%, PBS 5 = 33.91%, PBS 9 = 33.68% , PBS 12 = 32.11%, PBS 10 = 30.44%, PBS 4 = 29.68%, PBS 8 = 24.70%, PBS 11 = 21.64% และ PBS 6 = 18.62% ส่วนชุดควบคุม = 0.05 %

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าชุดควบคุมมีน้ำหนักลดลงมากกว่า PHBV อาจเนื่องมาจากโครงสร้างของพลาสติกเอื้อให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่พันธะเอสเทอร์ ส่งผลให้น้ำหนักของ PBS ลดลง และถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียได้ง่าย ผลจากการวิเคราะห์ร้อยละการย่อยสลายของ PBS (โดยน้ำหนัก) พบว่าแบคทีเรีย PBS 3 ย่อยสลายพลาสติกได้ดีที่สุดในระยะเวลา 4 สัปดาห์ได้ 40.12% ใกล้เคียงกับงานวิจัย สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (2553) ที่ระบุว่าแผ่นฟิล์ม PBS ที่มีความหนา 40 ไมครอน สามารถย่อยสลายได้ถึงร้อยละ 50 ภายในระยะเวลา 1 เดือนในดินที่ใช้เพาะปลูกทั่วไป

จากผลการทดสอบการย่อยสลายพลาสติกพบว่าแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PBS ได้ดีที่สุดคือ PBS 3 = 40.12%, PBS 7 = 35.36%, PBS 5 = 33.91% ตามลำดับ แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดนี้จะถูกนำไประบุชนิดแบคทีเรีย (identified) ในขั้นตอนต่อไป



**ตารางที่ 4. 2** ผลการวิเคราะห์ร้อยละการย่อยสลายของ PBS (โดยน้ำหนัก)

แบคทีเรีย	น้ำหนักก่อน	น้ำหนักหลัง	น้ำหนักที่ลดลง	% การย่อยสลาย
PBS 3	0.011873	0.007103	0.00477	40.12%
PBS 4	0.02178	0.015317	0.006463	29.68%
PBS 5	0.021303	0.01408	0.007223	33.91%
PBS 6	0.01631	0.013273	0.003037	18.62%
PBS 7	0.01091	0.007053	0.003857	35.36%
PBS 8	0.012593	0.00982	0.00311	24.70%
PBS 9	0.017033	0.011297	0.005736	33.68%
PBS 10	0.013063	0.009087	0.003976	30.44%
PBS 11	0.021987	0.015723	0.004757	21.64%
PBS 12	0.013997	0.01142	0.004494	32.11%
Blank	0.01313	0.01246	0.00067	0.05%

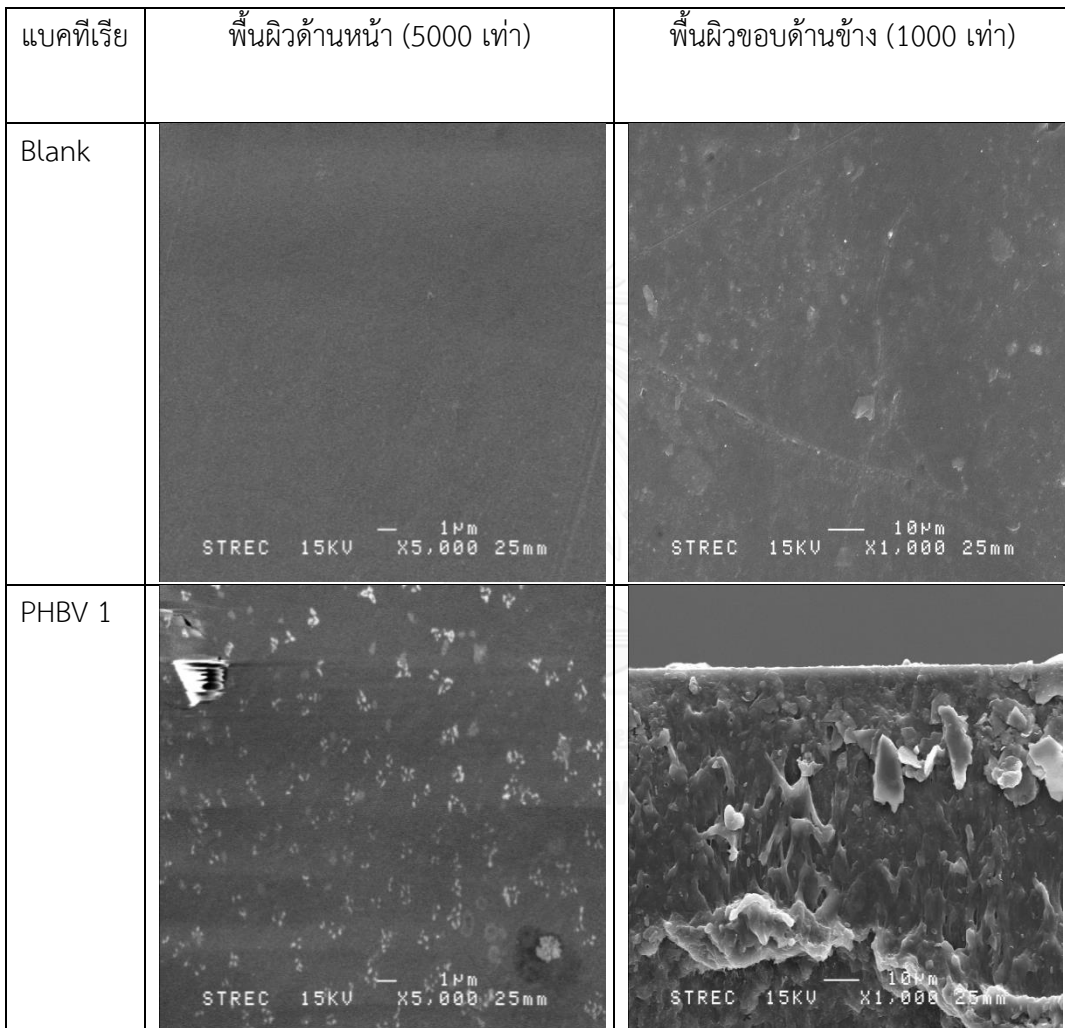
#### 4.3.9 ผลการวิเคราะห์พลาสติก PHBV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)

นำแผ่น PHBV ที่ถูกย่อยด้วยแบคทีเรียสามชนิดที่คัดเลือกข้างต้นด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจนหมดตะกอนดินแล้ว นำไปอบที่อุณหภูมิ 44 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นนำไปเก็บตู้ดูดความชื้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำแผ่นพลาสติกไปตรวจผิวด้านหน้าและด้านข้างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) กำลังขยาย 5000 เท่า และ 1000 เท่า ตามลำดับ ผลแสดงในรูปที่ 4.15

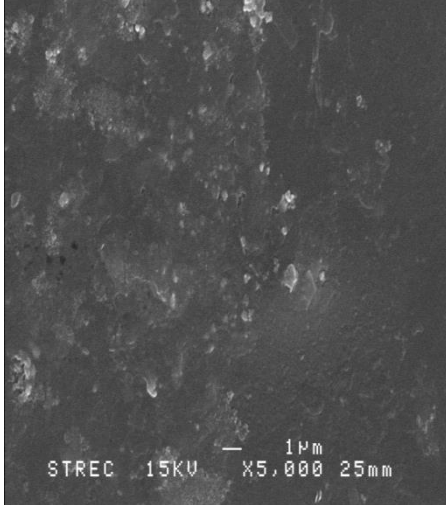
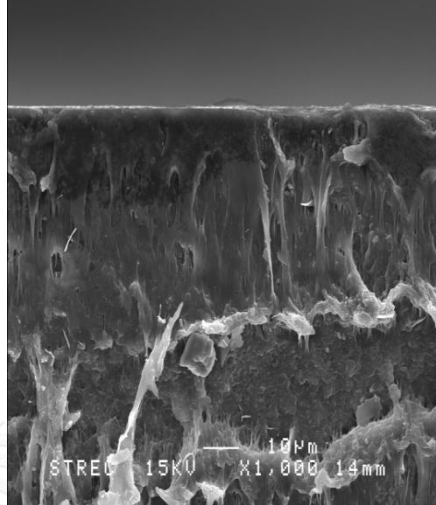
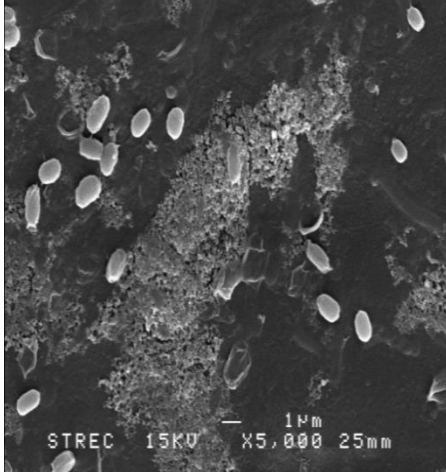
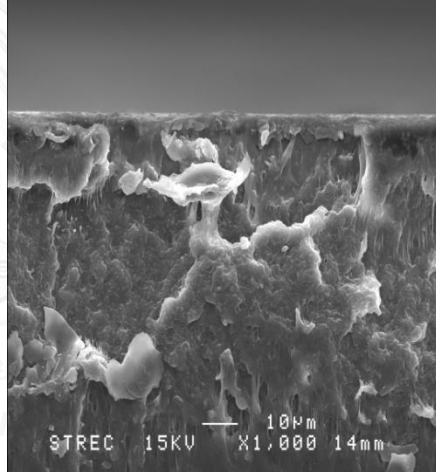
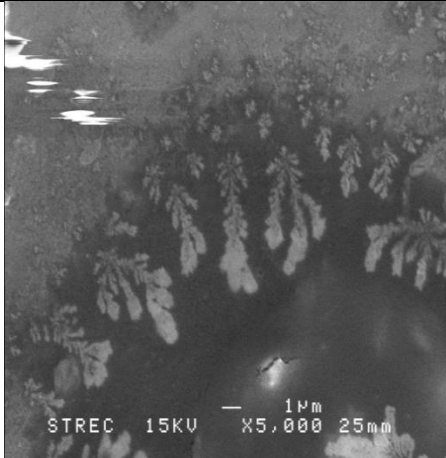
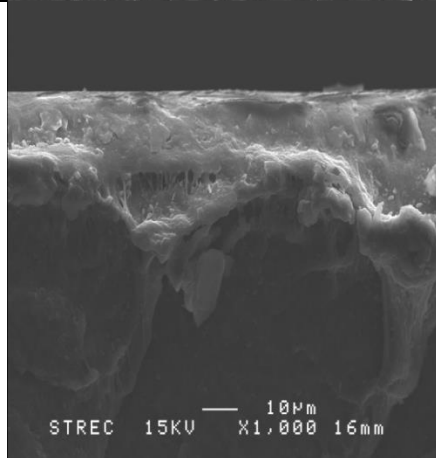
จากผลการวิเคราะห์แผ่นพลาสติกด้วย SEM จะเห็นได้ว่า แบคทีเรีย PHBV 11, PHBV 5, PHBV 4 และ PHBV 1 สามารถย่อยสลายพลาสติก PHBV ได้ดี การย่อยสลายจะสังเกตได้จากลักษณะของพื้นผิวหน้าของพลาสติกเกิดการขรุขระแตกออกเป็นแผ่นเล็กๆ มีลักษณะเป็นเกล็ดแตกกระจายออกและเกิดร่องลึกขึ้นบนแผ่นพลาสติกในขณะที่ชุดควบคุมไม่เกิดร่องลึกบนแผ่นพลาสติก สังเกตเห็นว่าพลาสติกมีแบคทีเรียเกาะติดอยู่บนผิวแผ่นพลาสติก เนื่องจากการยึดเกาะของแบคทีเรียบนพื้นผิวและอยู่ลึกด้านในผิวพลาสติกเป็นเหตุผลที่แบคทีเรียสามารถเจริญได้ในชุดการ

ทดสอบ ในส่วนพื้นผิวด้านขอบจะพบว่าลักษณะของแผ่นพลาสติกชุดควบคุม จะมีขอบหนา เป็นฝ้าสีขาว ขณะที่แผ่นพลาสติกที่ถูกแบคทีเรียย่อยสลายมีขอบบางลงเกิดรอยสีกร่อน ฝ้าสีขาวที่พื้นผิวลดลง พื้นผิวบางลงแสดงให้เห็นว่าสามารถย่อยได้ดี

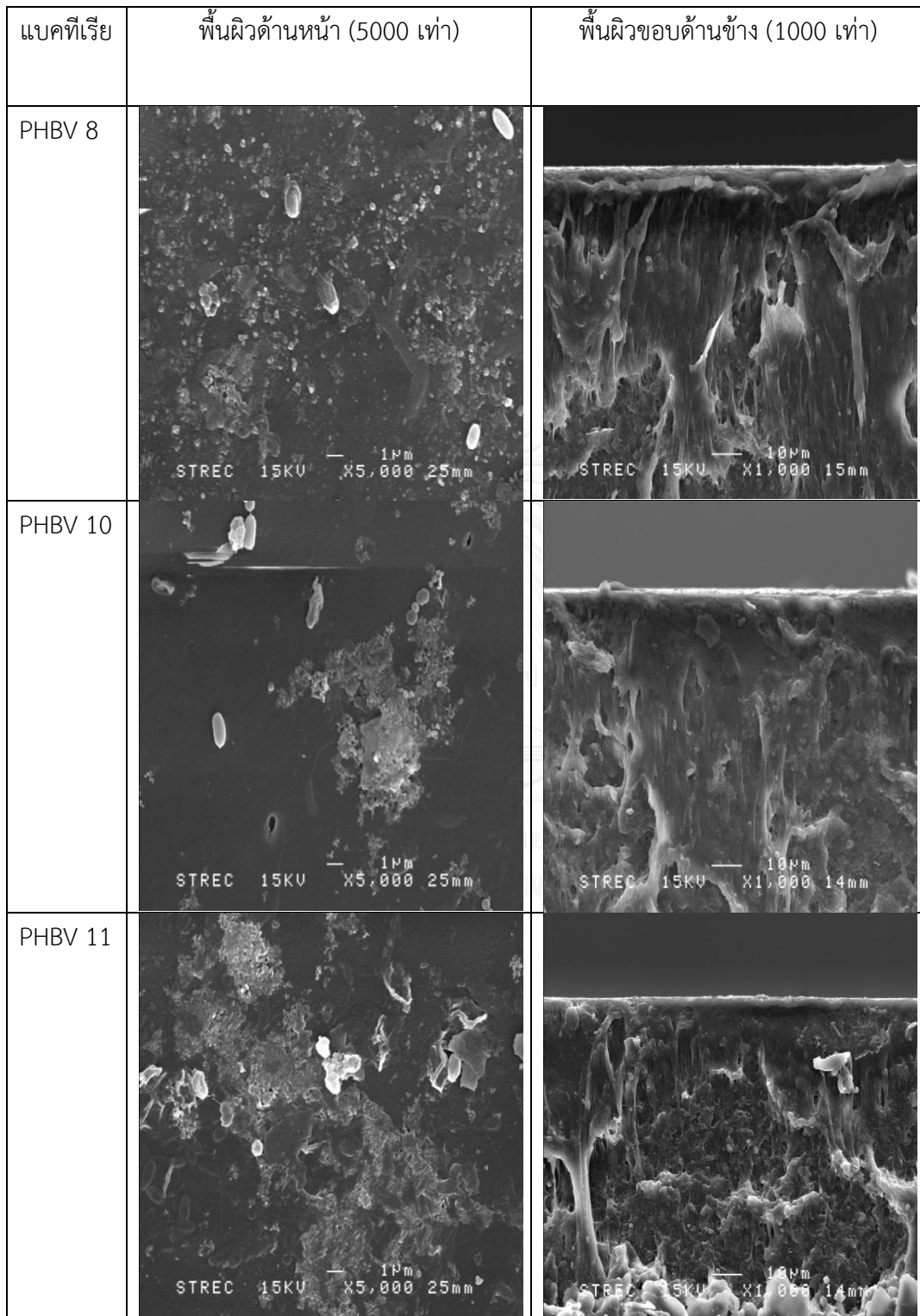
**รูปที่ 4.15** ผลการวิเคราะห์พื้นผิวพลาสติก PHBV ด้วย SEM พื้นผิวด้านหน้า (x 5000 เท่า) และ พื้นผิวขอบด้านข้าง (x 1000 เท่า)



รูปที่ 4.15 (ต่อ)

แบคทีเรีย	พื้นผิวด้านหน้า (5000 เท่า)	พื้นผิวขอบด้านข้าง (1000 เท่า)
PHBV 4		
PHBV 5		
PHBV 7		

รูปที่ 4.15 (ต่อ)



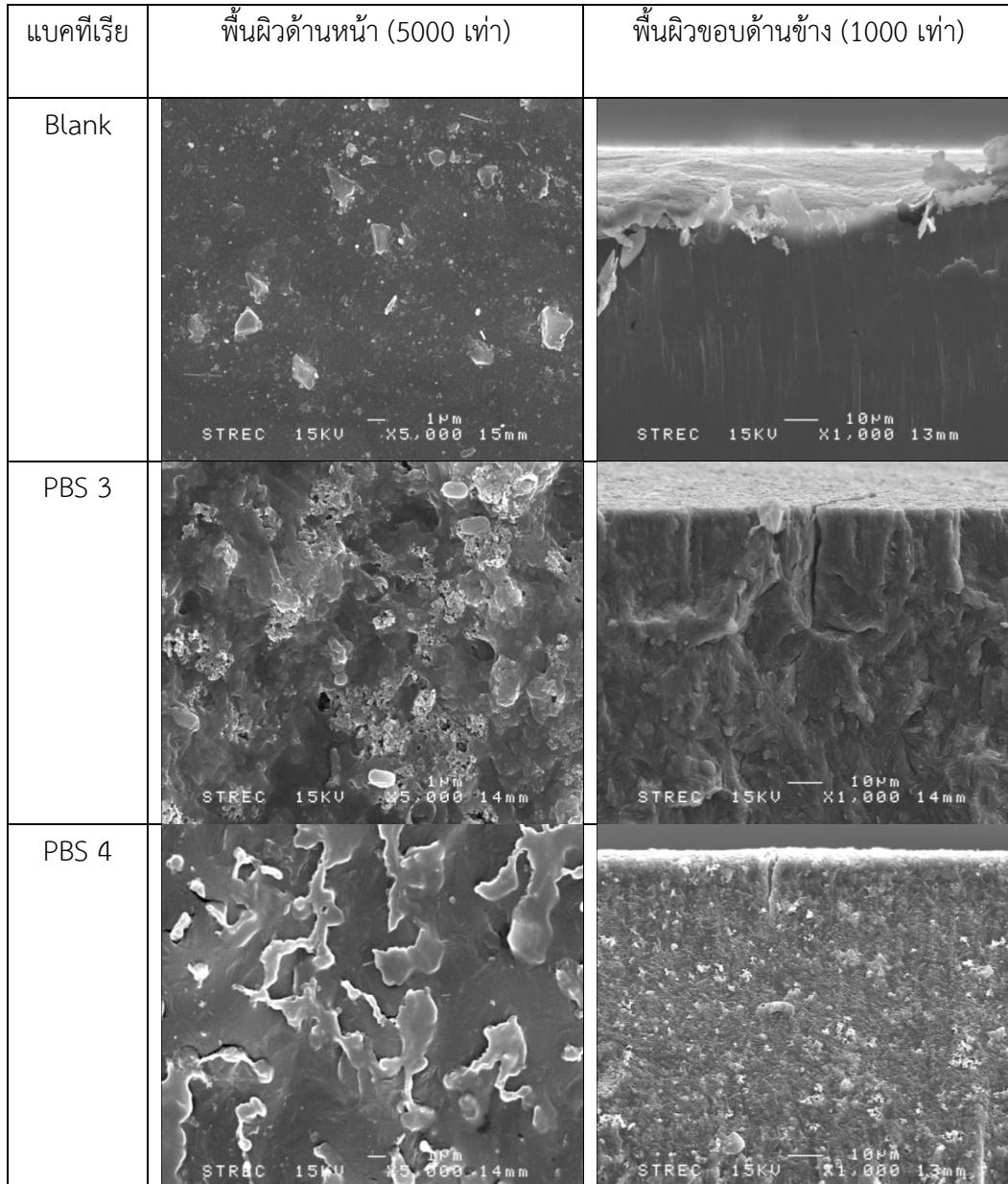
#### 4.3.10 ผลการวิเคราะห์พลาสติก PBS ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)

หลังจากการทดสอบย่อยสลายพลาสติก PBS ด้วยแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเหลว basal medium ภายใต้สภาวะออกซิเจนจำกัด ที่อุณหภูมิ 67 °C เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ นำแผ่นพลาสติกไปล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจนสะอาด แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 44 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บในตู้ดูดความชื้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำแผ่นพลาสติกไปการวิเคราะห์พื้นผิวด้านหน้าและพื้นผิวขอบด้านข้างที่เป็นรอยตัดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 5000 เท่า และ 1000 เท่า ตามลำดับ แสดงผลในรูปที่ 4.16

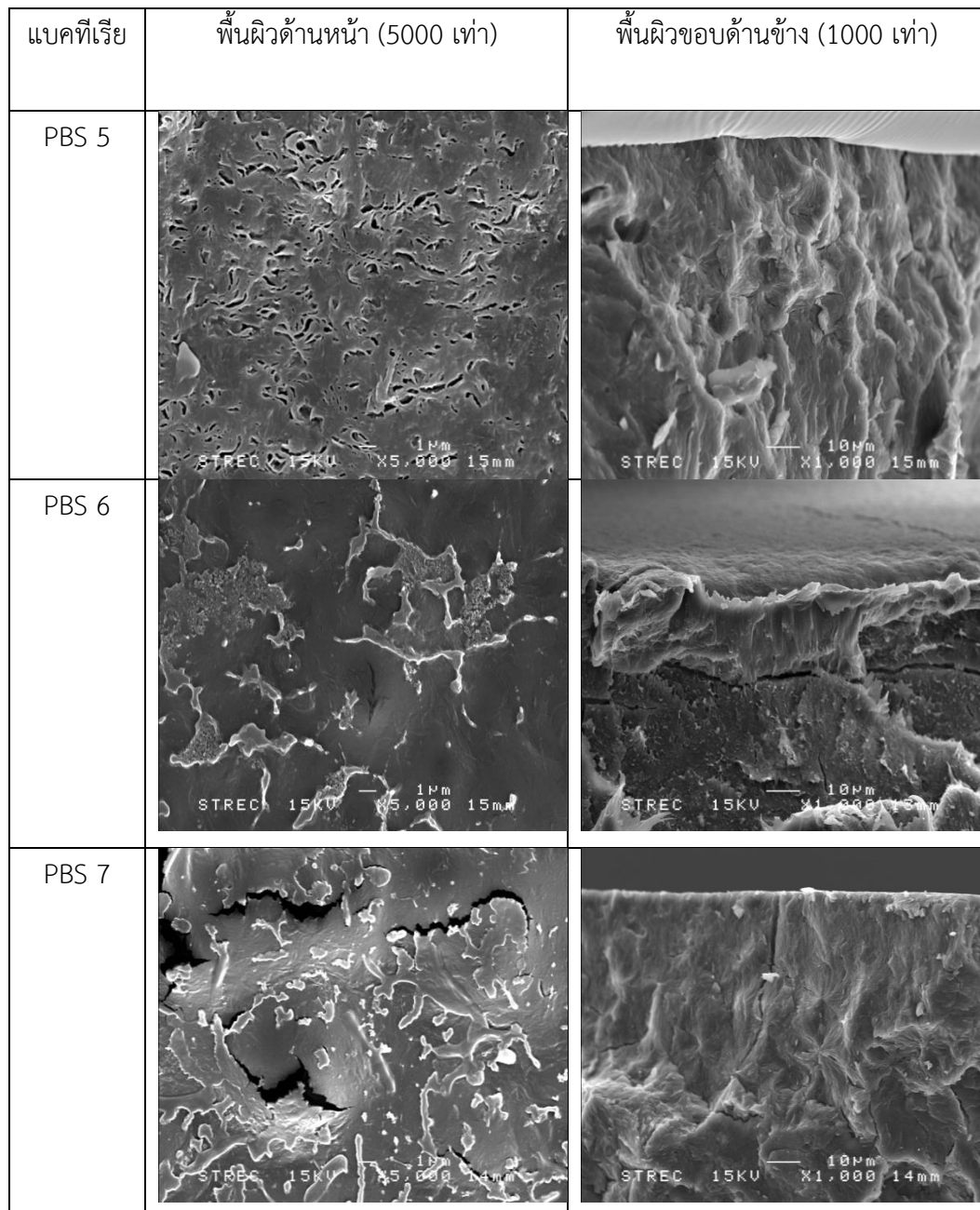
ผลการวิเคราะห์แผ่นพลาสติก PBS ด้วย SEM พบว่าแบคทีเรียสามารถย่อยสลาย PBS ได้ โดยลักษณะของพื้นผิวหน้าเกิดการขรุขระแตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ มีลักษณะเป็นเกล็ดและเกิดร่องลึกขึ้น และพบว่ามีแบคทีเรียติดอยู่บนผิวหน้าของแผ่นพลาสติก ในส่วนพื้นผิวด้านขอบพบว่าลักษณะของแผ่นพลาสติกจากชุดควบคุม ขอบหนาเห็นเป็นผ้าสีขาว บริเวณที่แบคทีเรียย่อยนั้นลักษณะของขอบจะบางลง ผ้าสีขาวจะลดลง พื้นผิวบางลงเมื่อทำการเปรียบเทียบกับชุดควบคุม การที่พบแบคทีเรียติดอยู่บนแผ่นพลาสติก เนื่องจากการยึดเกาะของแบคทีเรียบนพื้นผิวและอยู่ลึกด้านในผิวพลาสติก เป็นเหตุผลที่แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ในชุดการทดสอบ

โดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อย PBS ได้ดีที่สุดคือ PBS 3> PBS 7> PBS 5> PBS 9> PBS 12> PBS 10> PBS 4> PBS 8> PBS 11> PBS 6 ตามลำดับ

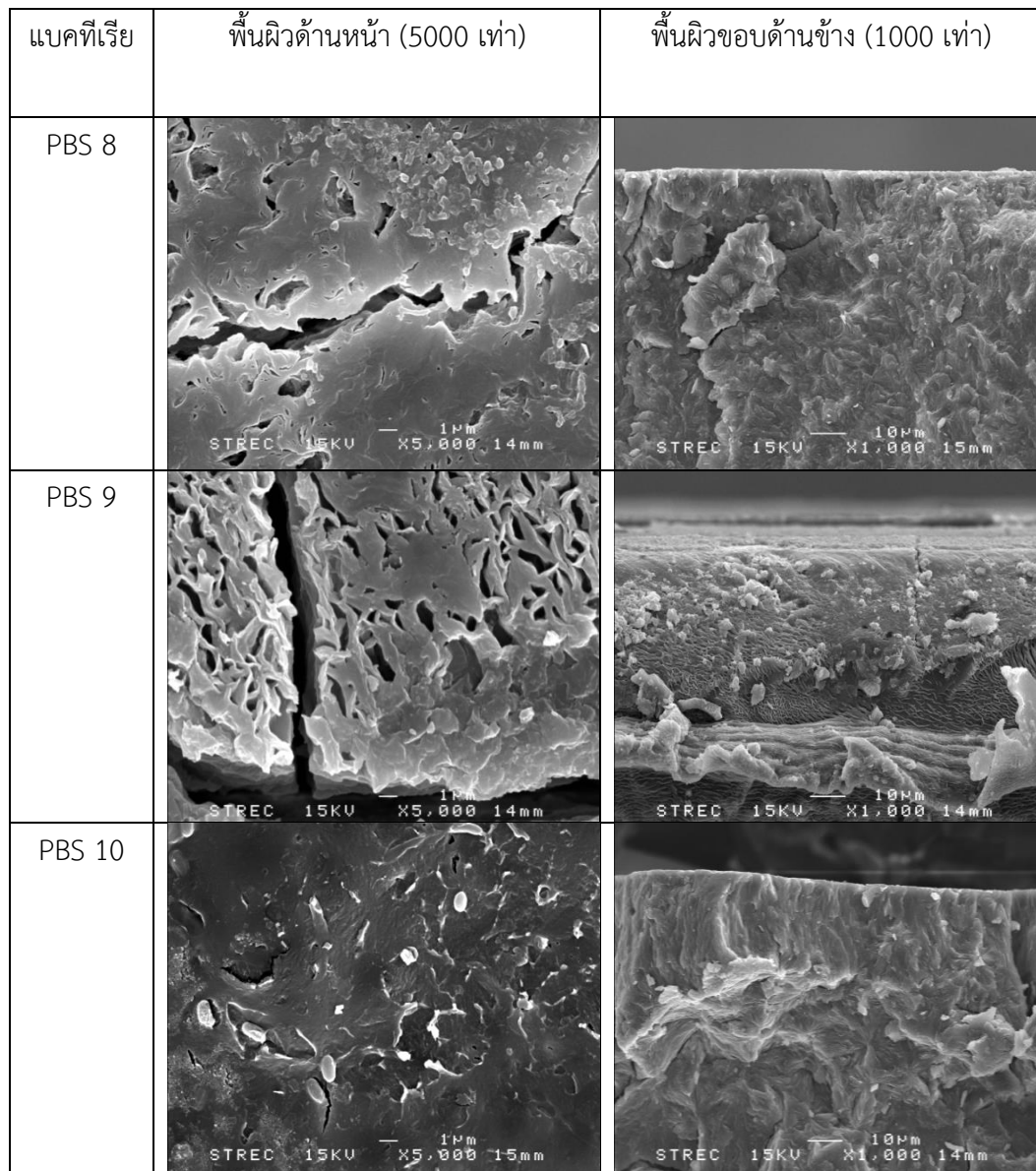
รูปที่ 4. 16 ผลการวิเคราะห์พื้นผิวพลาสติก PBS ด้วย SEM พื้นผิวด้านหน้า (x 5000 เท่า) และพื้นผิวขอบด้านข้าง (x 1000 เท่า)



รูปที่ 4.16 (ต่อ)

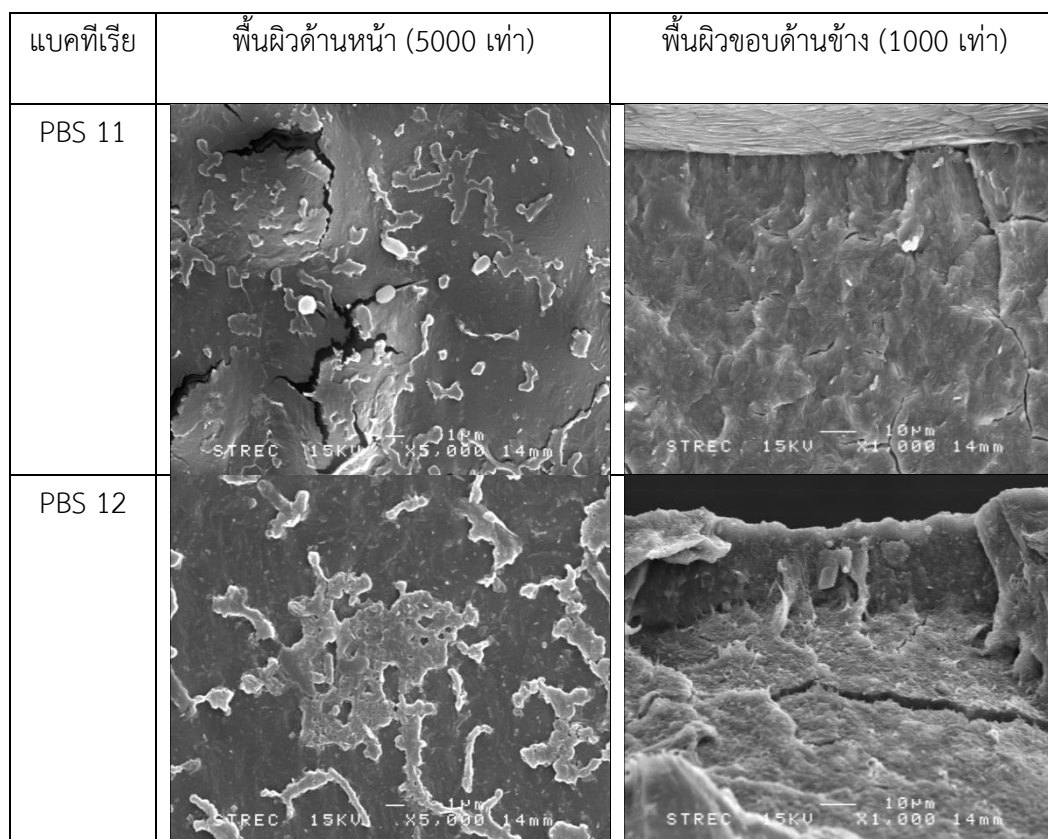


รูปที่ 4.16 (ต่อ)



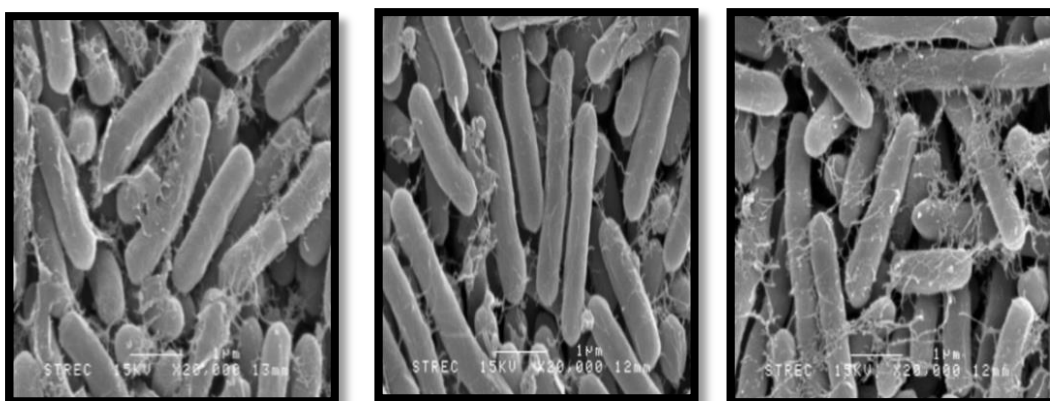


รูปที่ 4.16 (ต่อ)



#### 4.3.11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PHBV ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

จากผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายพลาสติก PHBV (% degradation) แสดงไว้ในตารางที่ 4.1 หลังการย่อยสลายด้วยระยะเวลา 4 สัปดาห์ จะเห็นได้ว่าค่าจากการวิเคราะห์ค่าน้ำหนักที่หายไปของแผ่นพลาสติกจากการย่อยสลายด้วยแบคทีเรียพบว่า แบคทีเรียที่ย่อยสลายพลาสติกได้ดีที่สุดคือ PHBV 11, PHBV 5 และ PHBV 4 และเมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แบคทีเรียจะมีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 4.17 ซึ่งลักษณะของเซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน (rod-shaped) ย้อมติดสีแกรมบวก



(a) PHBV 11

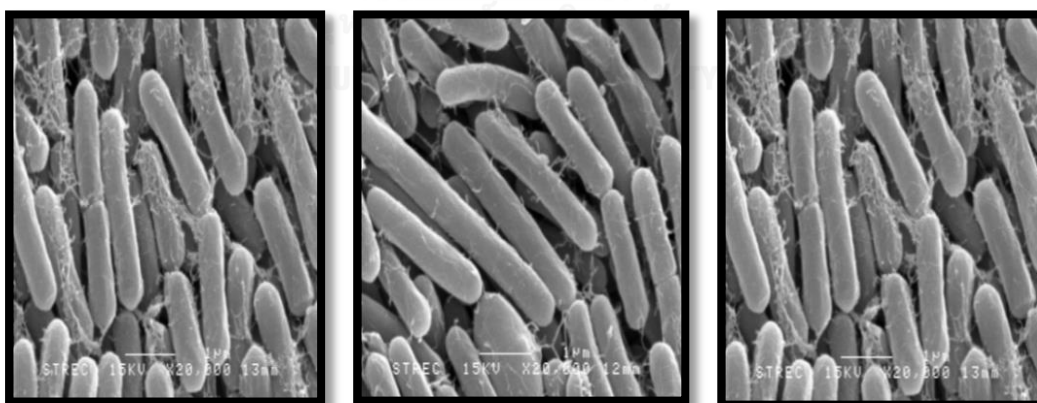
(b) PHBV 5

(c) PHBV 4

**รูปที่ 4. 17** ลักษณะของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่กำลังขยาย 20000X

#### 4.3.12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PBS ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

นำแบคทีเรียที่สามารถย่อยแผ่นพลาสติก PBS ได้ดีที่สุดโดยน้ำหนักในระยะเวลา 4 สัปดาห์ คือ PBS 3 PBS 7 และ PBS 5 ตามลำดับ มาดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่า แบคทีเรียมีลักษณะของเซลล์รูปร่างเป็นท่อน (rod shaped) (รูปที่ 4.18)



(a) PBS 3

(b) PBS 7

(c) PBS 5

**รูปที่ 4. 18** ลักษณะของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่กำลังขยาย 20000X

#### 4.3.13 ชนิดแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายพลาสติก PHBV ได้ดี

นำแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพลาสติก PHBV ได้ดีที่สุด 3 ชนิดคือ PHBV 11, PHBV 5 และ PHBV 4 มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องจำแนกชนิดแบคทีเรียและทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะอัตโนมัติ (Vitex® 2 compact) พบว่า PHBV 11 คือ *Lysinibacillus sphaericus*, PHBV 5 คือ *Geobacillus toebii* และ PHBV 4 คือ *Geobacillus toebii* ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 4.3 แบคทีเรียทั้งหมดมีลักษณะเป็นท่อน

#### 4.3.14 ศึกษาชนิดแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายพลาสติก PBS ได้ดี

นำแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพลาสติก PBS ได้ดีที่สุด 3 ชนิดคือ PBS 3, PBS 7, PBS 5 มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องจำแนกชนิดแบคทีเรียและทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะอัตโนมัติ (Vitex® 2 compact) ผลแสดงว่า PBS 3 คือ *Bacillus Clausii*, PBS 7 คือ *Brevibacillus Choshinesis* และ PBS 5 คือ *Geobacillus toebii* ข้อมูลการจำแนกแสดงในตารางที่ 4.3 สายพันธุ์ *Bacillus Clausii* สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่เป็นเบส (Denizci A., Kazan D., Abeln E. C. A., & Erarslan A, 2004) และยังมีคุณสมบัติเป็น probiotic (Bozdogan B., Galopin S., & Leclercq R, 2004) พบในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก (fermentation) สามารถช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (pathogen) มีการศึกษาแบคทีเรียชนิดนี้เพื่อใช้สำหรับการรักษาแบคทีเรียในช่องปาก (Senesi S., Celandroni F., Tavanti A., & Ghelardi E, 2001)

ตารางที่ 4.3 ข้อมูลทั่วไปของแบคทีเรียที่ย่อย PHBV

ชนิดแบคทีเรีย	Scientific classification		
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	Domain	<i>Bacteria</i>	
	Kingdom	<i>Bacteria</i>	
	Phylum	<i>Firmicutes</i>	
	Class	<i>Bacilli</i>	
	Order	<i>Bacillales</i>	
	Family	<i>Planococcaceae</i>	
	Genus	<i>Lysinibacillus</i>	
	Species	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	
	<i>Geobacillus toebii</i>	Domain	<i>Bacteria</i>
		Kingdom	<i>Bacteria</i>
Phylum:		<i>Firmicutes</i>	
Class		<i>Bacillis</i>	
Order		<i>Bacillales</i>	
Family		<i>Bacillaceae</i>	
Genus		<i>Leptospira</i>	
Species		<i>Geobacillus toebii</i>	

ตารางที่ 4.4 ข้อมูลทั่วไปของแบคทีเรียที่ย่อย PBS

ชนิดแบคทีเรีย	Scientific classification	
<i>Bacillus Clausii</i>	Domain	<i>Bacteria</i>
	Kingdom	<i>Bacteria</i>
	Phylum	<i>Firmicutes</i>
	Class	<i>Bacilli</i>
	Order	<i>Bacillales</i>
	Family	<i>Bacillaceae</i>
	Genus	<i>Bacillus</i>
	Species	<i>B. clausii</i>
	Binomial name	<i>Bacillus clausii</i>
<i>Brevibacillus</i> <i>Choshinesis</i>	Domain	<i>Bacteria</i>
	Kingdom	<i>Bacteria</i>
	Phylum	<i>Firmicutes</i>
	Class	<i>Bacillis</i>
	Order	<i>Bacillales</i>
	Family	<i>Paenibacillaceae</i>
	Genus	<i>Brevibacillus</i>
	Species	<i>Brevibacillus</i> <i>Choshinesis</i>

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิด PHBV และ PBS โดยการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ โดยการคัดเลือกแบคทีเรียดังกล่าวจากชุดการทดลองที่ฝังแผ่นพลาสติกในดินบ่อฝังกลบขยะผสมกากตะกอน งานวิจัยนี้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (basal medium) ที่ผสมผงพลาสติก PHBV และ PBS แบ่งการทดสอบเป็น 3 ขั้นตอนเพื่อหาวิธีที่สามารถเห็นผลการย่อยสลายของพลาสติกโดยแบคทีเรียที่ดีที่สุด 1) แบบตะจุดแบคทีเรียลงบนผิวหน้าอาหาร 2) การทดสอบย่อยแบบขีดยืดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร 3) การทดสอบย่อยพลาสติกแบบแช่ในอาหารเหลว (basal medium) ระยะเวลาของการเก็บตัวอย่างแบ่งเป็น 7, 14, 21 และ 28 วัน ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์ลักษณะของแผ่นพลาสติกที่ถูกย่อยสลายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) และหาเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายของพลาสติกโดยแบคทีเรีย รวมทั้งศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในแต่ละช่วงเวลาที่ใช้ทดสอบ จากนั้นระบุชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ดีที่สุด

การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (basal medium) ที่ผสมผงพลาสติก PHBV และ PBS เพาะเลี้ยงโดยแยกเชื้อบริสุทธิ์ออกมาจำนวน 13 ไอโซเลท (PHBV 1 - 13) และ 12 ไอโซเลท (PBS 1 - 12) ตามลำดับ แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเมื่อนำมาจำแนกสกุลของแบคทีเรียด้วยวิธีทางอนุกรมวิธานแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มีลักษณะเป็นท่อนทั้งหมด พบว่าเป็นแกรมบวกทั้งหมดยกเว้น PHBV 6 ที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ทั้งนี้ในการเลือกวิธีที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียในการทดสอบการย่อยสลายพลาสติก PHBV และ PBS นั้นต้องเลือกวิธีที่สามารถย่อยสลายพลาสติกและการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดี

จากการศึกษาการย่อยสลายผงพลาสติก PHBV และ PBS แบบตะจุดแบคทีเรียลงบนผิวหน้าอาหาร พบว่าแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (PHBV 1-13) และ (PBS 1-12) สามารถเจริญบนผิวหน้าอาหารที่มีการผสมผงพลาสติก PHBV กับ PBS (แหล่งคาร์บอนหลัก) ลงไปได้ดี แต่มีแบคทีเรียบาง

ชนิดที่เจริญบนผิวหน้าอาหารได้ไม่ดีคือ PBS 1 และ PBS 2 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (blank control) ที่ไม่มีการใส่แบคทีเรียลงไปบนผิวหน้าอาหาร ชุดควบคุมจะไม่มีอาการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหาร ซึ่งที่ PBS 1 และ PBS 2 เจริญเติบโตได้ไม่ดีเนื่องจากสภาพแวดล้อมหรืออาหารนั้นไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต กล่าวคือ PBS 1 และ PBS 2 อาจต้องการสารอาหารเฉพาะบางชนิดหรืออาจจะต้องอยู่ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่น (coculture) เท่านั้น เมื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลายพลาสติก PHBV กับ PBS (% การย่อยสลาย) พบว่า ไม่พบบริเวณที่มีลักษณะเกิดวงกลมส่วนใสที่บ่งบอกถึงการย่อยสลายที่ชัดเจนตรงบริเวณผิวหน้าอาหาร จึงไม่สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงจากการย่อยสลายของพลาสติก PHBV และ PBS ด้วยแบคทีเรียอย่างชัดเจน จึงเพิ่มโอกาสให้แบคทีเรียสามารถสัมผัสกับตำแหน่งที่มีผงพลาสติกได้มากสามารถทำได้โดยการเพิ่มพื้นที่สัมผัสระหว่างแบคทีเรียกับผงพลาสติกให้มากขึ้นและเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

จากนั้นนำแบคทีเรียที่คัดแยกทดสอบย่อยสลายผงพลาสติก PHBV กับ PBS แบบซีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารผลการทดลองนี้พบว่า แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้บนผิวหน้าอาหารที่ผสมผง PHBV กับ PBS ลงไป แบคทีเรียที่ทดสอบทั้งหมดสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่ใช้เลี้ยงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตเต็มบนผิวหน้าอาหาร โดยการย่อยสลายที่ทดสอบด้วยแบคทีเรียที่คัดเลือกนั้นยังไม่พบส่วนใสบนผิวหน้าอาหาร ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่ากลุ่มแบคทีเรียยังไม่สามารถสัมผัสกับผงพลาสติกที่ผสมอยู่ในอาหารได้อย่างเต็มที่เพราะผงพลาสติกมีขนาดเล็กมาก และเมื่อทำการทดสอบเป็นระยะเวลาหลายวันจะพบว่าอาหารมีการหลอมเหลว ส่งผลให้ขนาดของอาหารลดลงเรื่อยๆตามระยะเวลาที่เพิ่มมากขึ้นทำให้ต้องมีการปรับเปลี่ยนลักษณะอาหารที่ใช้ทดสอบด้วย

เมื่อเปลี่ยนวิธีการย่อยสลายด้วยแบคทีเรียโดยใช้การทดสอบย่อยพลาสติก PHBV กับ PBS แบบแช่ในอาหารเหลว Basal medium พบว่าสัปดาห์ที่ 1 - 4 แผ่นพลาสติกยังคงสภาพเดิมเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่เมื่อเก็บตัวอย่างแผ่นพลาสติกขึ้นจากอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า พลาสติกมีลักษณะเปราะบางมากกว่าชุดควบคุมมาก แผ่นพลาสติกสามารถแตกหักออกได้โดยง่ายเมื่อถูกกระทบกระเทือน และอาหารมีความขุ่นเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม เนื่องจากแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นในอาหารเหลวที่ใช้ทดสอบและได้ย่อยสลายพลาสติกจนเกิดความเปราะบาง เมื่อพิจารณาด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า จะเห็นได้ว่าแผ่นพลาสติกเกิดการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ผลการย่อยสลายแผ่นพลาสติกนั้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของพลาสติกที่เกิดการสีกกร่อน เกิดรอยแยกของพลาสติกทั้งในส่วนด้านขอบและพื้นผิวของแผ่นพลาสติก

จากการทดสอบย่อยสลายพลาสติกแบบแข็งในอาหารเหลว Basal medium ยังไม่สามารถบ่งบอกถึงการย่อยสลายอย่างชัดเจน ต้องวิเคราะห์การย่อยสลายด้วยวิธีวัดน้ำหนักที่ลดลงหลังการย่อยสลาย

เมื่อวิเคราะห์การย่อยสลายของแผ่นพลาสติก PHBV กับ PBS ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดตรวจพื้นผิวกำลังขยาย 5000 เท่า และผิวด้านข้างที่เป็นรอยตัดด้วยกำลังขยาย 1000 เท่าพบว่า แบคทีเรียสามารถย่อยสลายพลาสติก PHBV และ PBS ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การย่อยสลายสังเกตจากลักษณะของพื้นผิวหน้าของแผ่นพลาสติกเกิดการขรุขระแตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ มีลักษณะเป็นเกล็ดแตกกระจายออกและเกิดร่องลึกขึ้นบนแผ่นพลาสติก เมื่อคิดเฉพาะการย่อยพลาสติกสรุปได้ว่าความสามารถในการย่อย PHBV จากมากไปน้อยของแบคทีเรีย คือ PHBV 11> PHBV 5> PHBV 4> PHBV 1> PHBV 10> PHBV 7 และ PHBV 8 ตามลำดับ ส่วน PBS คือ PBS 3> PBS 7> PBS 5> PBS 9> PBS 12> PBS 10> PBS 4> PBS 8> PBS 11> PBS 6 ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย PHBV กับ PBS (% degradation) พบว่าแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพลาสติก PHBV ได้ดีคือ PHBV 11 = 35.766%, PHBV 5 = 28.667%, PHBV 4 = 27.325% และในส่วนของ PBS คือ PBS 3 = 40.175%, PBS 7 = 35.352%, PBS 5 = 33.906% ตามลำดับ เมื่อพิจารณาความสามารถแบคทีเรียในการย่อยสลายของพลาสติกที่ทดสอบจะเห็นได้ว่า แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบทั้งหมดมีความสามารถในการย่อยสลายไม่เท่ากัน บางชนิดย่อยสลายพลาสติกได้ดีบางชนิดย่อยสลายพลาสติกได้ไม่ดีซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบนั่นเอง ในส่วนการวิเคราะห์การย่อยสลายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกับเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายมีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน เมื่อผลจากการย่อยสลายที่วิเคราะห์ด้วย SEM เห็นผลการย่อยสลายมากเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายก็มากตาม ผลการย่อยสลายที่ได้มีความสอดคล้องกัน

โดยสรุปคือ เมื่อศึกษาชนิดแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายพลาสติก PHBV กับ PBS ด้วยเครื่องจำแนกชนิดแบคทีเรียและทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะอัดโนมิตี (Vitex® 2 compact) คือ PHBV 11 สายพันธุ์ *Lysinibacillus sphaericus*, PHBV 5 สายพันธุ์ *Geobacillus toebii* และ PHBV 4 สายพันธุ์ *Geobacillus toebii* ตามลำดับ ส่วน PBS คือ PBS 3 สายพันธุ์ *Bacillus Clausii*, PBS 7 สายพันธุ์ *Brevibacillus Choshinesis* และ PBS 5 สายพันธุ์ *Geobacillus toebii* ตามลำดับ ดังนั้นในการทดสอบย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพเบื้องต้นในอาหารเหลว



แบคทีเรียเหล่านี้สามารถย่อยสลายพลาสติกได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยสิ่งแวดล้อมมีผลต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพของแบคทีเรีย

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

- 1) ควรมีการเลือกใช้พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดอื่นมาทำการทดสอบ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดเลือกในการย่อยสลายพลาสติก
- 2) ควรมีการคัดเลือกชนิดแบคทีเรียชนิดอื่นที่สามารถย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพอื่นเพิ่มเติม เพื่อประสิทธิภาพการย่อยสลายพลาสติก 100%
- 3) การวิเคราะห์การย่อยสลายพลาสติกชีวภาพด้วยวิธีหาน้ำหนักที่ลดลงเป็นอีกวิธีหนึ่ง ควรจะเพิ่มการวิเคราะห์การย่อยสลายพลาสติกด้วยวิธีอื่นเพิ่มเติม
- 4) การทดสอบการย่อยสลายพลาสติกตามมาตรฐาน ASTM ผลการทดสอบจะมีแนวโน้มตามมาตรฐานที่กำหนด เราจึงควรใช้วิธีในการทดสอบการย่อยสลายพลาสติกด้วยวิธีอื่นเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการย่อยสลายพลาสติกต่อไปในอนาคต

## รายการอ้างอิง

- Abou-Zeid D, & Dunja A. (2001). Anaerobic biodegradation of natural and synthetic polyesters. Dissertation. Germany.
- Alauddin M., Choudkury I. A., Baradie M. A., & Hashmi M. S. J. (1995). Plastics and their Machining: A Review. *Journal of Materials Processing Technology*(54), 40-46.
- B&B interpack. (2011). กระบวนการย่อยสลายพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ. <http://www.bb-interpack.com/index.php?app=nd&id=19>
- Bozdogan B., Galopin S., & Leclercq R. (2004). Characterization of a new erm-related macrolide resistance gene present in probiotic strains of *Bacillus clausii*. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*(70), 280-284.
- Bryson J.A. (1995). *Plastics Materials*. (Vol. 6 edition). Oxford London: Butterworth-Heinemann Ltd. .
- Buchanan R. E., & Gibbons N .E. (1974). *Bergey's manual of Determinative Bacteriology* (Vol. 8). U.S.A: The Williams & Wilkins Company/Baltimore.
- Budwill K., Fedorak P. M., &Page W. J. (1992). *Applied and Environmental Microbiology*(58(4)), 401-1398.
- Cadar O., Paul M., Roman C., Miclean M., & Majdik C. (2012). Biodegradation behavior of poly(lactic acid) and (lactic acid-ethylene glycol-malonic or succinic acid) copolymers under controlled composting conditions in a laboratory test system. *Journal of Polymer Degradation and Stability*(97), 354-357.
- Cho H. S., Moon H. S., Kim M., Nam K., & Kim J. Y. (2011). Biodegradability and biodegradation rate of poly(caprolactone) – starch blend and poly(butylene succinate) biodegradable polymer under aerobic and anaerobic environment. *Journal of Waste Management*(31), 475-480.
- Denizci A., Kazan D., Abeln E. C. A., & Erarlan A. (2004). Newly isolated *Bacillus clausii* GMBAE 42: an alkaline protease producer capable to grow under highly alkaline condition. . *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(2), 320-327.

- Di Franco C. R., Cyras V. P., Busalmen J. P., Ruseckaite R. A., & Vazquez A. (2004). Degradation of polycaprolactone/starch blends and composites with sisal fibre. *Journal of Polymer Degradation and Stability*(86), 95-103.
- Doi Y., Ohura T., Aoyagi Y., T. K.-I., Yoshida Y., & K.-I., K. (1999). Biodegradation of poly(3-hydroxyalkanoic acids) fibers and isolation of poly(3-hydroxybutyric acid)-degrading microorganisms under aquatic environments. *Journal of Polymer /degradation and Stability*(63), 23-29.
- Frank C. W., Morse M-C., Liao Q., & Criddle C. S. (2011). Anaerobic biodegradation of the microbial copolymer poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate): Effects of comonomer content, processing history, and semi-crystalline morphology. *Journal of Polymer*, 52, 547-556.
- Hu X., Fan W., Han B., Liu H., Zheng D., Li Q., et al. (2008). Complete Genome Sequence of the Mosquitocidal Bacterium *Bacillus sphaericus* C3-41 and Comparison with Those of Closely Related *Bacillus* Species. *Journal of Bacteriology*., 190(8), 2892-2902.
- Ishigaki T., Sugano W., Ike M., & M., F. (2000). Enzymatic Degradation of cellulose Acetate Plastic by Novel Degrading Bacterium *Bacillus* sp. S2055. . *Journal of Bioscience and Bioengineering*., 90(4), 400-405.
- Ishigaki T., Sugano W., Nakanishi A., Tateda M., Ike M., & M., F. (2004). The degradability of biodegradable plastics in aerobic and anaerobic waste landfill model reactors. . *Journal of Chemosphere*(54), 225-233.
- ISO 472. (1999). *Plastics- vocabulary*.
- ISO 14855-1. (2005). *Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials under controlled composting conditions* (Vol. Part 1).
- Jarerat A., Kittinapakul K., & Sriroth K. (1998). Preliminary Investigation of Polyester Degrading Microorganisms at High Temperature from Soil Samples in Thailand. *Journal of Department of Biotechnology, Faculty of Agro-industry, Kasetsart University*, 202-206.
- Khan S. T., & A., H. (2001). Isolation and characterization of a new poly(3-hydroxybutyrate)-degrading, denitrifying bacterium from activated sludge. *Journal of FEMS Microbiology Letters*.(205), 253-257.

- Kim H. S., Kim H. J., Lee J. W., & Choi I. G. (2006). Biodegradability of bio-flour filled biodegradable poly(butylene succinate) bio-composites in natural and compost soil. *Journal of Polymer Degradation and Stability*(91), 1117-1127.
- Kiser, M. K. (2008). Biochemical Tests. Retrieved 20 February 2013, from MO USA, <https://users.stlcc.edu/kkiser/biochem.html>
- Leejarkpai T., Suwanmanee U., Rudeekit y., & Mungcharoen T. (2011). Biodegradable kinetics of plastics under controlled composting conditions. *Journal of Waste Management*(31), 1153-1161.
- Massardier - Nageotte V., Pestre C., Cruard-PradetT., & Bayard R. (2006). Aerobic and anaerobic biodegradability of polymer films and physico-chemical characterization. *Journal of Polymer Degradation and Stability*(91), 620-627.
- Mergaert J., Anderson C., Wouters A., & Swings J. (1994). *Journal of Polymers and the Environment*(2(3)), 83-177.
- Mohee R., Unmar G.D., Mudhoo A., & Khadoo P. (2008). Biodegradability of biodegradable/degradable plastic materials under aerobic and anaerobic conditions. . *Journal of Waste Management*(28), 1624–1629.
- Molitoris H. P., Moss S. T., De Koning G. J. M., & Jendrossek D. (1996). *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*(46(5)), 9-570.
- Muniasamy S., Reddy M., Misra M., & Mohanty A. (2013). Biodegradable green composites from bioethanol co-product and poly(butylene adipate-co-terephthalate). *Journal of Industrial Crops and Products*(43), 812-819.
- Nishida, H., & Tokiwa, Y. (1993). Distribution of Poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) and Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Aerobic Degrading Microorganisms in Different Environments. *Journal of Environmental Polymer Degradation*(1), 227-233.
- Nolan-ITU Pty Ltd. (2000). Biodegradable Plastics: Development and Environmental Impacts. from URL: <http://www.environment.gov.au/settlements/publications/waste/degradables/biodegradable/chapter3.html>
- Ojumu, T. V., Yu, J., & Solomom, B. O. (2004). Production of Polyhydroxyalkanoates, a Bacterial Biodegradable Polymers. *African Journal of Biotechnology*(3), 18-24.
- Phua Y. J., Lau N. S., Sudesh K., Chow W. S., & MohdIshak Z. A. (2012). Biodegradability studies of poly(butylene succinate)/organo-

- montmorillonitenanocomposites under controlled compost soil conditions: Effects of clay loading and compatibiliser. *Journal of Polymer Degradation and Stability*(97), 1345-1354.
- Phukon P., Saikia J. P., & Konwar B. K. (2012). Bio-plastic (P-3HB-co-3HV) from *Bacillus circulans* (MTCC 8167) and its biodegradation. *Journal of Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*,, 92, 30-34.
- Poli A., Romano I., Caliendo G., Nicolaus G., Orlando P., Falco A. D., et al. (2006). *Geobacillus toebii* subsp. *decanicus* subsp. nov., a hydrocarbon-degrading, heavy metal resistant bacterium from hot compost. . *Journal of general and applied microbiology*, 52(4), 223–234.
- PTT. (2010). พลาสติกและความปลอดภัย. Retrieved 22 January 2013 <http://polymersplace.com/pdf1-10/pdf10.pdf>
- Rudeekit Y., Leejakpai T., Eauphantasate N., & Kongsuwan K. (2004). Comparative degradation of biodegradable plastics by aerobic microorganism using ASTM D 5338 – 93 (03) and ASTM D 5988 (03) as standard method. *Journal of Phatumtani: National Metals and Materials Technology Center*.
- Sanchez, J., Akio, T., & Yutaka, T. (2000). Degradation of Polycaprolactone at 50 °C by a Thermotolerant *Aspergillus* sp. *Biotechnology Letters*(22), 849-853.
- Sekiguchi T., Saika A., Nomura k., Watanabe T., Watanabe T., Fujimoto Y., et al. (2011). Biodegradation of aliphatic polyesters soaked in deep seawaters and isolation of poly (ε-caprolactone)-degrading bacteria. *Journal of Polymer Degradation and Stability*,, 96, 1397-1403.
- Senesi S., Celandroni F., Tavanti A., & Ghelardi E. (2001). Molecular Characterization and Identification of *Bacillus clausii* Strains Marketed for Use in Oral Bacteriotherapy. *Journal of Applied Environmental Microbiology*,, 67(2), 834–839.
- Seymour, R. B. (1989). Polymer Science Before & After 1899: Notable Developments during the Lifetime of Maurits Dekker. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*(26), 1023-1032.
- Shinnozaki Y., Watanabe T., Nakajima-Kambe T., & Kitamoto H. (2013). Rapid and simple colorimetric assay for detecting the enzymatic degradation of

- biodegradable plastic films. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115(1), 111-114.
- Singh S., Mohanty A. K., Sugie T., Takai Y., & Hamada H. (2008). Renewable resource based biocomposites from natural fiber and polyhydroxybutyrate-co-valerate (PHBV) bioplastic. *Journal of Composites: Part A*(39), 875-886.
- Sung M. H., Kim H., Bae J. W., Rhee S. K., Jeon C.O., Kim K., K. J. J., et al. (2002). *Geobacillus toebii* sp. Nov., a novel thermophilic bacterium isolated from hay compost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6), 5-2251.
- Tomita K., Nakajima T., Kikuchi Y., & N., M. (2004). Degradation of poly (L-lactic acid) by a newly isolated thermophile. *Journal of Polymer Degradation and Stability*(84), 433 – 438.
- Uchida H., Nakajima-Kambe T., Shigeno-Akutsu Y., Nomura N., Tokiw Y., & Nakahara T. (2000). Properties of a bacterium which degrades solid poly(tetramethylene succinate)-co-adipate, a biodegradable plastic. *Journal of FEMS Microbiology Letters*(189), 25-29.
- Wan S., Li G., An T., Guo B., Sun L., Zu L., et al. (2010). Biodegradation of ethanethiol in aqueous medium by a new *Lysinibacillus sphaericus* strain RG – 1 isolated from activated sludge. *Journal of Biodegradation*, 21, 1057-1066.
- Wang F, Hidaka T, Tsuno H, & Tsubota J. (2012). Co-digestion of polylactide and kitchen garbage in hyperthermophilic and thermophilic continuous anaerobic process. *Journal of Bioresource Technology*(112), 67-74.
- Way C., Dean K., Wu D. Y., & Palombo E. (2012). Biodegradation of sequentially surface treated lignocellulose reinforced polylactic acid composites: Carbon dioxide evolution and morphology. *Journal of Polymer Degradation and Stability*(97), 430-438.
- Weber D. J., & Rutala W. A. (1988). *Bacillus* Species. . *The Society for Healthcare Epidemiology of America* ,, 9(8), 368-373.
- Wikipedia. (2013). structure PHBV. <http://en.wikipedia.org/wiki/Polyhydroxybutyrate>

- Wu C. (2012). Characterization and biodegradability of polyester bioplastic-based green renewable composites from agricultural residues. *Journal of Polymer Degradation and Stability*(97), 64-71.
- Yagi H., Ninomiya F., Funabashi M., & Kunioka M. (2009). Anaerobic biodegradation tests of poly (lactic acid) and polycaprolactone using New evaluation system for methane fermentation in anaerobic sludge. *Journal of Polymer Degradation and Stability*.(94), 1397-1404.
- Zhao J-H., Wang X-Q., Zeng J., Yang G., Shi F-H., & Q., Y. (2005). Biodegradation of poly(butylene succinat-co-butylene adipate) by *Aspergillus vvesicolor*. *Journal of Polymer Degradation and Stability*, 90, 175-179.
- คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. (2013). การขีดเชื้อแบบตัดกัน. Retrieved 4 มกราคม 2557 <http://biology.cru.in.th/biology>
- จักรพันธ์ ถาวรจิรา, & นพรัตน์อาภากุล., จ. (2558). Electron Microscope. Microscopic Center, . Retrieved 5 มกราคม 2556 <http://www.microscopic.center.sci.buu.ac.th/images/website/EM.pdf>
- เจียรรัตน์., อ. (2553). การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อเร่งการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพด้วยจุลินทรีย์. . Retrieved 4 มกราคม 2556 [http://prv.nrct.go.th/shopping/home/show\\_product.php?research\\_id=250](http://prv.nrct.go.th/shopping/home/show_product.php?research_id=250)
- ชนาวดี ลีจากภัย. (2549). พลาสติกย่อยสลายได้เพื่อสิ่งแวดล้อม. Retrieved 10 กุมภาพันธ์ 2556, from บริษัทไทยเอฟเฟคท์สตูดิโอ จำกัด
- นางอุณงค์ ธงศิลา. (2010). พลาสติกชีวภาพ (Bioplastic). Retrieved 27 กันยายน 2555 [www.npc-se.co.th](http://www.npc-se.co.th)
- ปกรณ โอภาประกาศิต, & มณฑนา โอภาประกาศิต. (2551). พอลิเมอร์วัสดุเอนกประสงค์. Retrieved 8 ธันวาคม 2555 <http://www.vcharkarn.com/varticle/18774>
- พิชากค์ สมบูรณ์ทรัพย์. (2553). พลาสติกชีวภาพ : นวัตกรรมของผลิตภัณฑ์สีเขียว. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว, 26(2), 177-195.
- วชิระ ยมาภัย, ปราณี่ ชาวกล้า, นัฐกานต์ ไตรอุโฆษ, & วงษ์ธนเจริญ, ว. (2012). กระบวนการผลิตพลาสติกชีวภาพ. [www.enchemcom1po.wordpress.com/bioplastics](http://www.enchemcom1po.wordpress.com/bioplastics)
- ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ. (2010). ความรู้และงานวิจัยไบโอพลาสติกของเอ็มเทค. Retrieved 5 มกราคม 2556

[http://www.mtec.or.th/index.php?option=com\\_content&task=view&id=1314&temid=176](http://www.mtec.or.th/index.php?option=com_content&task=view&id=1314&temid=176)

สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. (2553). พลาสติกย่อยสลายได้. พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ, 2-10.

สุภาณี หิรัญธนกิจจากุล. (2538). ความรู้เกี่ยวกับสิ่งเป็นพิษตอนที่ 10. Retrieved 15 ธันวาคม 2555 [http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc\\_toxic/a\\_tx\\_2\\_001c.asp?info\\_id=146](http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_toxic/a_tx_2_001c.asp?info_id=146)







ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

**ภาคผนวก ก**  
**สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

1. อาหารแข็งนิวเตรียนท์ (Nutrient agar)

เนื้อสกัด	3.0 กรัม
แบคโตเปปโตน	5.0 กรัม
วุ้นผง	20.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15-20 นาที

2. อาหารเหลวนิวเตรียนท์ (Nutrient broth)

เนื้อสกัด	3.0 กรัม
วุ้นผง	20.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15-20 นาที

3. อาหารแข็งเบซอลมีเดียม (Basal medium)

$K_2HPO_4$	1000 มิลลิกรัม
$(NH_4)_2SO_4$	1000 มิลลิกรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	200 มิลลิกรัม
$FeCl_3$	10 มิลลิกรัม
NaCl	50 มิลลิกรัม
$CaCl_2$	50 มิลลิกรัม

Yeast extract (Difco)	250 มิลลิกรัม
TritonX-100	100 มิลลิกรัม
$\text{Na}_2\text{MOO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5 มิลลิกรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.2 กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

นี้่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15-20 นาที

#### 4. อาหารเหลวเบซอลมีเดียม (Basal medium)

$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1000 มิลลิกรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1000 มิลลิกรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200 มิลลิกรัม
$\text{FeCl}_3$	10 มิลลิกรัม
$\text{NaCl}$	50 มิลลิกรัม
$\text{CaCl}_2$	50 มิลลิกรัม
Yeast extract (Difco)	250 มิลลิกรัม
TritonX-100	100 มิลลิกรัม
$\text{Na}_2\text{MOO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5 มิลลิกรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.2 กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 กรัม

น้ำกลั่น

1000 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน  
15-20 นาที



**ภาคผนวก ข**  
**สีย้อมและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง**

1. สารละลายคริสตอลไวโอเลต (Crystal violet solution)

คริสตอลไวโอเลต	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	400	มิลลิลิตร

2. สารละลายสีซัลฟรานิน (Safranin staining solution)

ซาฟรานิน	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

3. สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's iodine solution)

ไอโอดีนคริสตอล	10.0	กรัม
โปแตสเซียมไอโอดेट์ (KI)	0.5	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำกลั่นอย่างช้าๆ แล้วจึงเติมไอโอดีนคริสตอลลงไปและเติมโปแตสเซียมไอโอดेट์เป็นลำดับสุดท้าย

**สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง**

**สารละลายแอลกอฮอล์ 75 % (75% alcohol)**

แอลกอฮอล์บริสุทธิ์	75 มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวม	100 มิลลิลิตร

**สารละลายแอลกอฮอล์ 95 % (95% alcohol)**

แอลกอฮอล์บริสุทธิ์	95 มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวม	100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

วิธีการย้อมสีแกรมแบคทีเรีย (Gram stain)

1. Smear เชื้อ โดยทำการหยดน้ำลงบนแผ่นสไลด์ จากนั้นใช้ลูป (loop) เขี่ยเชื้อจำนวนเล็กน้อย ประมาณ 1 โคลนนี้เกลี่ยเชื้อลงบนแผ่นสไลด์โดยวนลูปไปในทิศทางเดียวกัน เกลี่ยให้เป็นแผ่นฟิล์มบางๆ
2. วางแผ่นสไลด์ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (Air dry) แล้วนำแผ่นสไลด์มาผ่านเปลวไฟ (Heat fix) ประมาณ 2-3 ครั้ง
3. นำแผ่นสไลด์ที่ผ่านการ Heat fix แล้วไปทำการย้อมสีแกรมแบคทีเรีย (Gram stain) โดยการหยดสารละลายคริสตอลไวโอเลต (Crystal violet solution) หรือ Gram's Crystal violet จนทั่วบริเวณรอย smear ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที
4. ล้างสีย้อมออกโดยให้น้ำไหลผ่านแผ่นสไลด์ช้าๆ หลังจากนั้นหยดสารละลายแกรมไอโอดีนจนทั่วบริเวณรอย smear ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที
5. ล้างสารละลายไอโอดีนด้วยน้ำ โดยให้น้ำไหลผ่านแผ่นสไลด์อย่างช้าๆ
6. หยด 95% เอทานอล เป็นเวลา 10-15 วินาทีหรือจนสังเกตได้ว่าสีน้ำเงินของ Gram's Crystal violet หดและจางเป็นสีใส
7. ล้างแผ่นสไลด์โดยให้น้ำไหลผ่านอย่างช้าๆ และย้อมด้วยสารละลายซัลฟานิน (Safranin staining solution) หรือ Gram's Safranin O จนท่วม smear เชื้อทิ้งไว้เป็นเวลา 30 วินาที
8. ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำโดยให้น้ำไหลผ่านอย่างช้าๆ และซับให้แห้งทิ้งไว้จนกว่าแผ่นสไลด์จะแห้งสนิท จากนั้นนำแผ่นสไลด์ไปส่องดูลักษณะและการติดสีของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

## ภาคผนวก ง

## วิธีการขึ้นรูปแผ่นพลาสติก PHBV และ PBS

1. ขั้นตอนการทำ compressing plastic ชนิด PHBV
  - 1.1 เปิดน้ำที่เครื่องเพื่อให้มีการหล่อเย็น
  - 1.2 เปิด main breaker
  - 1.3 กดสวิตช์ on ปรับอุณหภูมิที่ใช้ทดสอบ 185 องศาเซลเซียส
  - 1.4 หน้าจอตรง cooling เลือก insert cooling
  - 1.5 ตรง venting ตั้งใช้ 4 cycle ดังนี้
    - preheating 20 นาที
    - before venting 1.2 วินาที
    - venting 2.5 นาที
    - cooling cycle 5 นาที
    - ความดัน 30 bar/1900 psi
  - 1.6 ใส่เม็ดพลาสติกลงไปบน mole ขนาด 0.1 mm
2. ขั้นตอนการทำ compressing plastic ชนิด PBS
  - 2.1 เปิดน้ำที่เครื่องเพื่อให้มีการหล่อเย็น
  - 2.2 เปิด main breaker
  - 2.3 กดสวิตช์ on ปรับอุณหภูมิที่ใช้ทดสอบ 175 องศาเซลเซียส
  - 2.4 หน้าจอตรง cooling เลือก insert cooling
  - 2.5 ตรง venting ตั้งใช้ 4 cycle ดังนี้
    - preheating 5 นาที
    - before venting 0.1 วินาที

- venting 6 นาที
- cooling cycle 5 นาที
- ความดัน 30 bar/1900 psi

2.6 ใส่เม็ดพลาสติกกลงไปบน mole ขนาด 0.1 mm





## ภาคผนวก จ

## การใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

1. เปิดสวิตช์เครื่อง spectrophotometer โดยควรเปิดเครื่องก่อนการใช้งานไม่น้อยกว่า 15 - 30 นาที
2. ปิดแสงจากภายในหรือภายนอกไม่ให้เกิดกระทบตัวไวแสง โดยการปิดฝาครอบช่องใส่คิวเวทท์ และปิดช่องแสงออก
3. เลือกความยาวคลื่นแสงโดยปรับปุ่มเลือกความยาวคลื่นที่ต้องการวัด
4. ปรับเครื่องเป็น 100%T หรือตั้งค่าการดูดกลืนให้เป็นศูนย์ด้วยปุ่มปรับศูนย์ (ปุ่ม calibrate)
5. เช็ดด้านข้างของ cuvette ให้แห้งสะอาด ใส่สารละลายอ้างอิง (reagent blank) ลงในช่องใส่คิวเวทท์ ปิดฝาช่องใส่คิวเวทท์ให้สนิทอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่แสดงบนหน้าจอแสดงผล
6. หลังเสร็จจากการใช้งาน ทำความสะอาดเครื่องและล้าง cuvette ให้สะอาด ปิดสวิตช์ไฟฟ้า ปล่อยให้เครื่องเย็นก่อนคลุมเครื่องด้วยถุงคลุมเครื่องมือ

## ภาคผนวก จ

## ใบรายงานผลการวิเคราะห์ชนิดแบคทีเรีย (Identification)

Veterinary Diagnostic Laboratory, Chula

bioMerieux Customer:  
System #: 11630

## Laboratory Report

Printed Jan 6, 2015 11:29 CST  
Printed by: LabTechPatient Name: varaporn  
Isolate Group: f1-1

Patient ID: a1

Card Type: BCL Testing Instrument: 000015F249B6 (11630)

Bionumber: 0332100004000000  
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	Card:	BCL	Lot Number:	239335920	Expires:	Feb 24, 2016 12:00 CST
	Completed:	Jan 6, 2015 05:20 CST	Status:	Final	Analysis Time:	14.00 hours
Selected Organism	88% Probability		Lysinibacillus sphaericus			
SRF Organism	Bionumber: 0332100004000000		Confidence: Low discrimination			
Analysis Organisms and Tests to Separate:						
Low Discrimination Organism						
Lysinibacillus sphaericus/Lysinibacillus fusiformis						
Lysinibacillus fusiformis	ANA.GROWTH(10),TETRACYC.R(0),ESCULIN(10),					
Lysinibacillus sphaericus	ANA.GROWTH(10),TETRACYC.R(100),ESCULIN(10),					
Alicyclobacillus acidoterrestris/acidocaldarius						
Alicyclobacillus acidocaldarius	ANA.GROWTH(10),60-63C(100),					
Alicyclobacillus acidoterrestris	60-63C(0),ESCULIN(90),					
Geobacillus toebii	ANA.GROWTH(90),60-63C(100),ESCULIN(10),					
Analysis Messages:						
Contraindicating Typical Biopattern(s)						
Lysinibacillus sphaericus/Lysinibacillus fusiformis	BGLU(3),AlaA(93),ELLM(93),BGAL(12),PVATE(78),					
Alicyclobacillus acidoterrestris/acidocaldarius	BGLU(15),AlaA(96),ELLM(93),BGAL(4),ProA(96),					
Geobacillus toebii	BGLU(1),PyrA(1),BGAL(1),					

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01  
MIC Interpretation Guideline:

Therapeutic Interpretation Guideline:

หมายเหตุ; สัญลักษณ์ F1 คือ PHBV 11

## Veterinary Diagnostic Laboratory, Chula

bioMerieux Customer:  
System #: 11630

## Laboratory Report

Printed Jan 6, 2015 11:29 CST  
Printed by: LabTech

Patient Name: varaporn  
Isolate Group: f1-1

Patient ID: a1

Card Type: BCL Testing Instrument: 000015F249B6 (11630)

Bionumber: 0332100004000000

Organism Quantity:

Biochemical Details																	
1	BXYL	-	3	LysA	-	4	AspA	-	5	LeuA	+	7	PheA	+	8	ProA	-
9	BGAL	+	10	PyrA	+	11	AGAL	-	12	AlaA	-	13	TyrA	+	14	BNAG	-
15	APPA	+	18	CDEX	-	19	dGAL	-	21	GLYG	-	22	INO	-	24	MdG	-
25	ELLM	-	26	MdX	-	27	AMAN	-	29	MTE	-	30	GlyA	-	31	dMAN	-
32	dMNE	-	34	dMLZ	-	36	NAG	-	37	PLE	-	39	IRHA	-	41	BGLU	+
43	BMAN	-	44	PHC	-	45	PVATE	-	46	AGLU	-	47	dTAG	-	48	dTRE	-
50	INU	-	53	dGLU	-	54	dRIB	-	56	PSCNa	-	58	NaCl 6.5%	-	59	KAN	-
60	OLD	-	61	ESC	-	62	TTZ	-	63	POLYB_R	-						

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01

MIC Interpretation Guideline:

ACQ 2011.01.01

Therapeutic Interpretation Guideline:

ACQ 2011.01.01

## Veterinary Diagnostic Laboratory, Chula

bioMerieux Customer:  
System #: 11630

## Laboratory Report

Printed Jan 6, 2015 11:26 CST  
Printed by: LabTech

Patient Name: varaporn  
Isolate Group: c1-1

Patient ID: a1

Card Type: BCL Testing Instrument: 000015F249B6 (11630)

Bionumber: 0000100000000000

Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	Card: BCL	Lot Number: 239335920	Expires: Feb 24, 2016 12:00 CST
	Completed: Jan 6, 2015 05:20 CST	Status: Final	Analysis Time: 14.00 hours
Selected Organism	98% Probability <b>Geobacillus toebii</b>		Confidence: Excellent identification
	Bionumber: 0000100000000000		
SRF Organism			
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern(s) Geobacillus toebii LeuA(80),			

Biochemical Details																	
1	BXYL	-	3	LysA	-	4	AspA	-	5	LeuA	-	7	PheA	-	8	ProA	-
9	BGAL	-	10	PyrA	-	11	AGAL	-	12	AlaA	-	13	TyrA	-	14	BNAG	-
15	APPA	+	18	CDEX	-	19	dGAL	-	21	GLYG	-	22	INO	-	24	MdG	-
25	ELLM	-	26	MdX	-	27	AMAN	-	29	MTE	-	30	GlyA	-	31	dMAN	-
32	dMNE	-	34	dMLZ	-	36	NAG	-	37	PLE	-	39	IRHA	-	41	BGLU	-
43	BMAN	-	44	PHC	-	45	PVATE	-	46	AGLU	-	47	dTAG	-	48	dTRE	-
50	INU	-	53	dGLU	-	54	dRIB	-	56	PSCNa	-	58	NaCl 6.5%	-	59	KAN	-
60	OLD	-	61	ESC	-	62	TTZ	-	63	POLYB_R	-						

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ C1 คือ PHBV 5

## Veterinary Diagnostic Laboratory, Chula

bioMerieux Customer:  
System #: 11630

## Laboratory Report

Printed Jan 6, 2015 11:26 CST  
Printed by: LabTech

Patient Name: varaporn  
Isolate Group: b2/2-1

Patient ID: a1

Card Type: BCL Testing Instrument: 000015F249B6 (11630)

Bionumber: 0000100000000000

Organism Quantity:

<b>Comments:</b>	

<b>Identification Information</b>	<b>Card:</b> BCL	<b>Lot Number:</b> 239335920	<b>Expires:</b> Feb 24, 2016 12:00 CST
	<b>Completed:</b> Jan 6, 2015 05:19 CST	<b>Status:</b> Final	<b>Analysis Time:</b> 14.00 hours
<b>Selected Organism</b>	98% Probability <b>Geobacillus toebii</b>		<b>Confidence:</b> Excellent identification
<b>SRF Organism</b>	Bionumber: 0000100000000000		
<b>Analysis Organisms and Tests to Separate:</b>			
<b>Analysis Messages:</b>			
<b>Contraindicating Typical Biopattern(s)</b>			
Geobacillus toebii LeuA(80),			

Biochemical Details																	
1	BXYL	-	3	LysA	-	4	AspA	-	5	LeuA	-	7	PheA	-	8	ProA	-
9	BGAL	-	10	PyrA	-	11	AGAL	-	12	AlaA	-	13	TyrA	-	14	BNAG	-
15	APPA	+	18	CDEX	-	19	dGAL	-	21	GLYG	-	22	INO	-	24	MdG	-
25	ELLM	-	26	MdX	-	27	AMAN	-	29	MTE	-	30	GlyA	-	31	dMAN	-
32	dMNE	-	34	dMLZ	-	36	NAG	-	37	PLE	-	39	IRHA	-	41	BGLU	-
43	BMAN	-	44	PHC	-	45	PVATE	-	46	AGLU	-	47	dTAG	-	48	dTRE	-
50	INU	-	53	dGLU	-	54	dRIB	-	56	PSCNa	-	58	NaCl 6.5%	-	59	KAN	-
60	OLD	-	61	ESC	-	62	TTZ	-	63	POLYB_R	-			-			-

หมายเหตุ; สัญลักษณ์ B2/1 คือ PHBV 4

## Veterinary Diagnostic Laboratory, Chula

bioMerieux Customer:  
System #: 11630

## Laboratory Report

Printed Sep 1, 2014 10:10 CDT  
Printed by: LabTech

Patient Name: WARAPORN  
Isolate Group: 2A-1

Patient ID: 2A

Card Type: BCL Testing Instrument: 000015F249B6 (11630)

Bionumber: 1372000004000000  
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	Card: BCL	Lot Number: 239315110	Expires: Jul 31, 2015 13:00 CDT
	Completed: Aug 28, 2014 08:31 CDT	Status: Final	Analysis Time: 14.25 hours
Selected Organism	89% Probability <i>Bacillus clausii</i> Bionumber: 1372000004000000 Confidence: Good identification		
SRF Organism			
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern(s) <i>Bacillus clausii</i> AMAN(99),OLD(88),ESC(98),AGLU(79),			

Biochemical Details																	
1	BXYL	+	3	LysA	-	4	AspA	(-)	5	LeuA	+	7	PheA	+	8	ProA	-
9	BGAL	(+)	10	PyrA	+	11	AGAL	+	12	AlaA	-	13	TyrA	+	14	BNAG	-
15	APPA	-	18	CDEX	-	19	dGAL	-	21	GLYG	-	22	INO	-	24	MdG	-
25	ELLM	-	26	MdX	-	27	AMAN	-	29	MTE	-	30	GlyA	-	31	dMAN	-
32	dMNE	-	34	dMLZ	-	36	NAG	-	37	PLE	-	39	IRHA	-	41	BGLU	+
43	BMAN	-	44	PHC	-	45	PVATE	-	46	AGLU	-	47	dTAG	-	48	dTRE	-
50	INU	-	53	dGLU	-	54	dRIB	-	56	PSCNa	-	58	NaCl 6.5%	-	59	KAN	-
60	OLD	-	61	ESC	-	62	TTZ	-	63	POLYB_R	-						

หมายเหตุ; สัญลักษณ์ 2A คือ PBS 3

## Veterinary Diagnostic Laboratory, Chula

bioMerieux Customer:  
System #: 11630

## Laboratory Report

Printed Mar 18, 2015 09:14 CDT  
Printed by: LabTech

Patient Name: pui  
Isolate Group: e 1-1

Patient ID: 05032558

Card Type: BCL Testing Instrument: 000015F249B6 (11630)

Bionumber: 4707101004400461

Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	Card: BCL	Lot Number: 239340320	Expires: Apr 8, 2016 13:00 CDT
	Completed: Mar 18, 2015 01:14 CDT	Status: Final	Analysis Time: 14.25 hours
Selected Organism	90% Probability <b>Brevibacillus choshinensis</b>		Confidence: Good identification
SRF Organism	Bionumber: 4707101004400461		
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern(s) Brevibacillus choshinensis BGLU(24),KAN(12),PyrA(88),TTZ(12),POLYB_R(12),GlyA(76),			

Biochemical Details																	
1	BXYL	-	3	LysA	-	4	AspA	+	5	LeuA	+	7	PheA	+	8	ProA	+
9	BGAL	-	10	PyrA	-	11	AGAL	-	12	AlaA	+	13	TyrA	+	14	BNAG	(+)
15	APPA	+	18	CDEX	-	19	dGAL	-	21	GLYG	-	22	INO	-	24	MdG	-
25	ELLM	+	26	MdX	-	27	AMAN	-	29	MTE	-	30	GlyA	-	31	dMAN	-
32	dMNE	-	34	dMLZ	-	36	NAG	-	37	PLE	-	39	IRHA	-	41	BGLU	+
43	BMAN	-	44	PHC	-	45	PVATE	(+)	46	AGLU	-	47	dTAG	-	48	dTRE	-
50	INU	-	53	dGLU	-	54	dRIB	-	56	PSCNa	-	58	NaCl 6.5%	-	59	KAN	+
60	OLD	-	61	ESC	+	62	TTZ	+	63	POLYB_R	+						

หมายเหตุ; สัญลักษณ์ E1 คือ PBS 7

## Veterinary Diagnostic Laboratory, Chula

bioMerieux Customer:  
System #: 11630

## Laboratory Report

Printed Sep 3, 2014 05:22 CDT  
Autoprint

Patient Name: WARAPORN  
Isolate Group: 4a-1

Patient ID: 1A

Card Type: BCL Testing Instrument: 000015F249B6 (11630)

Bionumber: 4040100000110000  
Organism Quantity:

<b>Comments:</b>	

<b>Identification Information</b>	<b>Card:</b> BCL	<b>Lot Number:</b> 239315110	<b>Expires:</b> Jul 31, 2015 13:00 CDT
	<b>Completed:</b> Sep 3, 2014 05:48 CDT	<b>Status:</b> Final	<b>Analysis Time:</b> 14.25 hours
<b>Selected Organism</b>	94% Probability <b>Geobacillus toebii</b>		<b>Confidence:</b> Very good identification
<b>SRF Organism</b>	Bionumber: 4040100000110000		
<b>Analysis Organisms and Tests to Separate:</b>			
<b>Analysis Messages:</b>			
<b>Contraindicating Typical Biopattern(s)</b>			
Geobacillus toebii LeuA(80), BMAN(1),			

Biochemical Details																	
1	BXYL	-	3	LysA	-	4	AspA	+	5	LeuA	-	7	PheA	-	8	ProA	-
9	BGAL	-	10	PyrA	-	11	AGAL	+	12	AlaA	-	13	TyrA	-	14	BNAG	-
15	APPA	+	18	CDEX	-	19	dGAL	-	21	GLYG	-	22	INO	-	24	MdG	-
25	ELLM	-	26	MdX	-	27	AMAN	-	29	MTE	-	30	GlyA	-	31	dMAN	-
32	dMNE	-	34	dMLZ	-	36	NAG	-	37	PLE	-	39	IRHA	-	41	BGLU	-
43	BMAN	+	44	PHC	-	45	PVATE	-	46	AGLU	+	47	dTAG	-	48	dTRE	-
50	INU	-	53	dGLU	-	54	dRIB	-	56	PSCNa	-	58	NaCl 6.5%	-	59	KAN	-
60	OLD	-	61	ESC	-	62	TTZ	-	63	POLYB_R	-						

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01  
MIC Interpretation Guideline:  
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:  
AES Parameter Last Modified:

Page 1 of 1

หมายเหตุ; สัญลักษณ์ 4A คือ PBS 5



**ภาคผนวก ฉ**  
**การเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบด้วยการวัดค่าความเข้มแสง O.D<sub>600</sub>**  
**ทำการวัดค่าทุกวันๆที่ 1 ,7, 14, 21 และ 28 ตามลำดับ**

ชุดการทดลอง	การเจริญของแบคทีเรีย (วันที่ 1)			
	1	2	3	Mean ± S.D.
PHBV1	0.091	0.095	0.087	0.091 ± 0.004
PHBV2	0.107	0.12	0.115	0.114 ± 0.006
PHBV3	0.207	0.198	0.191	0.198 ± 0.008
PHBV4	0.243	0.256	0.230	0.243 ± 0.013
PHBV5	0.176	0.223	0.215	0.204 ± 0.025
PHBV6	0.192	0.189	0.195	0.192 ± 0.003
PHBV7	0.399	0.332	0.320	0.350 ± 0.042
PHBV8	0.075	0.067	0.079	0.073 ± 0.000
PHBV9	0.110	0.090	0.124	0.108 ± 0.017
PHBV10	0.172	0.153	0.307	0.210 ± 0.083
PHBV11	0.197	0.111	0.195	0.167 ± 0.049
PHBV12	0.250	0.193	0.225	0.222 ± 0.028
PHBV13	0.098	0.072	0.088	0.086 ± 0.013
Blank	0.026	0.017	0.021	0.021 ± 0.004

ชุดการทดลอง	การเจริญของแบคทีเรีย (วันที่ 7)			Mean $\pm$ S.D.
	1	2	3	
PHBV1	0.044	0.052	0.06	0.052 $\pm$ 0.008
PHBV2	0.042	0.042	0.046	0.043 $\pm$ 0.002
PHBV3	0.341	0.336	0.455	0.377 $\pm$ 0.067
PHBV4	0.241	0.244	0.223	0.236 $\pm$ 0.011
PHBV5	0.344	0.348	0.332	0.341 $\pm$ 0.008
PHBV6	0.229	0.227	0.195	0.217 $\pm$ 0.019
PHBV7	0.356	0.337	0.387	0.360 $\pm$ 0.025
PHBV8	0.080	0.049	0.052	0.060 $\pm$ 0.017
PHBV9	0.153	0.059	0.057	0.089 $\pm$ 0.054
PHBV10	0.331	0.327	0.339	0.332 $\pm$ 0.006
PHBV11	0.283	0.295	0.278	0.285 $\pm$ 0.008
PHBV12	0.366	0.358	0.362	0.362 $\pm$ 0.004
PHBV13	0.106	0.092	0.069	0.089 $\pm$ 0.018
Blank	0.025	0.031	0.024	0.026 $\pm$ 0.003

ชุดการทดลอง	การเจริญของแบคทีเรีย (วันที่ 14)			Mean $\pm$ S.D.
	1	2	3	
PHBV1	0.108	0.177	0.123	0.136 $\pm$ 0.036
PHBV2	0.115	0.174	0.134	0.141 $\pm$ 0.030
PHBV3	0.247	0.139	0.239	0.208 $\pm$ 0.060
PHBV4	0.257	0.299	0.342	0.299 $\pm$ 0.042
PHBV5	0.245	0.253	0.221	0.239 $\pm$ 0.016
PHBV6	0.200	0.166	0.162	0.176 $\pm$ 0.020
PHBV7	0.308	0.394	0.292	0.331 $\pm$ 0.054
PHBV8	0.300	0.121	0.274	0.231 $\pm$ 0.096
PHBV9	0.076	0.075	0.124	0.091 $\pm$ 0.028
PHBV10	0.173	0.225	0.141	0.179 $\pm$ 0.042
PHBV11	0.095	0.16	0.112	0.122 $\pm$ 0.033
PHBV12	0.148	0.204	0.203	0.185 $\pm$ 0.032
PHBV13	0.113	0.087	0.150	0.116 $\pm$ 0.031
Blank	0.039	0.022	0.021	0.027 $\pm$ 0.010

ชุดการทดลอง	การเจริญของแบคทีเรีย (วันที่ 21)			Mean $\pm$ S.D.
	1	2	3	
PHBV1	0.11	0.167	0.136	0.137 $\pm$ 0.028
PHBV2	0.099	0.135	0.144	0.126 $\pm$ 0.023
PHBV3	0.198	0.221	0.264	0.227 $\pm$ 0.033
PHBV4	0.176	0.203	0.234	0.204 $\pm$ 0.029
PHBV5	0.169	0.209	0.177	0.185 $\pm$ 0.021
PHBV6	0.219	0.182	0.160	0.187 $\pm$ 0.029
PHBV7	0.369	0.283	0.405	0.352 $\pm$ 0.062
PHBV8	0.254	0.472	0.385	0.370 $\pm$ 0.109
PHBV9	0.181	0.192	0.151	0.174 $\pm$ 0.021
PHBV10	0.172	0.175	0.15	0.165 $\pm$ 0.013
PHBV11	0.128	0.093	0.102	0.107 $\pm$ 0.018
PHBV12	0.197	0.175	0.183	0.185 $\pm$ 0.011
PHBV13	0.139	0.215	0.200	0.184 $\pm$ 0.040
Blank	0.026	0.031	0.021	0.026 $\pm$ 0.005

ชุดการทดลอง	การเจริญของแบคทีเรีย (วันที่ 28)			Mean $\pm$ S.D.
	1	2	3	
PHBV1	0.088	0.107	0.16	0.118 $\pm$ 0.037
PHBV2	0.121	0.192	0.142	0.151 $\pm$ 0.036
PHBV3	0.141	0.312	0.182	0.211 $\pm$ 0.089
PHBV4	0.24	0.173	0.190	0.201 $\pm$ 0.034
PHBV5	0.227	0.229	0.168	0.208 $\pm$ 0.034
PHBV6	0.188	0.133	0.225	0.182 $\pm$ 0.046
PHBV7	0.228	0.277	0.357	0.287 $\pm$ 0.065
PHBV8	0.164	0.126	0.272	0.187 $\pm$ 0.075
PHBV9	0.133	0.125	0.128	0.128 $\pm$ 0.004
PHBV10	0.136	0.25	0.165	0.183 $\pm$ 0.059
PHBV11	0.127	0.105	0.202	0.144 $\pm$ 0.050
PHBV12	0.225	0.175	0.180	0.193 $\pm$ 0.027
PHBV13	0.106	0.114	0.094	0.104 $\pm$ 0.010
Blank	0.062	0.034	0.028	0.041 $\pm$ 0.018

ชุดการทดลอง	การเจริญของแบคทีเรีย (วันที่ 0)			
	1	2	3	Mean $\pm$ S.D.
PBS3	0.061	0.057	0.07	0.062 $\pm$ 0.006
PBS4	0.192	0.187	0.195	0.191 $\pm$ 0.004
PBS5	0.221	0.238	0.128	0.195 $\pm$ 0.059
PBS6	0.120	0.130	0.104	0.118 $\pm$ 0.013
PBS7	0.179	0.121	0.156	0.152 $\pm$ 0.029
PBS8	0.290	0.151	0.242	0.227 $\pm$ 0.070
PBS9	0.130	0.113	0.246	0.163 $\pm$ 0.072
PBS10	0.283	0.184	0.214	0.227 $\pm$ 0.050
PBS11	0.095	0.187	0.248	0.176 $\pm$ 0.077
PBS12	0.221	0.167	0.186	0.191 $\pm$ 0.027
Blank	0.019	0.021	0.025	0.021 $\pm$ 0.003

ชุดการทดลอง	การเจริญของแบคทีเรีย (วันที่ 7)			
	1	2	3	Mean $\pm$ S.D.
PBS3	0.326	0.145	0.431	0.300 $\pm$ 0.144
PBS4	0.312	0.398	0.319	0.343 $\pm$ 0.047
PBS5	0.258	0.22	0.265	0.247 $\pm$ 0.024
PBS6	0.183	0.192	0.186	0.187 $\pm$ 0.004
PBS7	0.314	0.335	0.321	0.323 $\pm$ 0.010
PBS8	0.368	0.365	0.359	0.364 $\pm$ 0.004
PBS9	0.223	0.236	0.210	0.223 $\pm$ 0.013
PBS10	0.309	0.315	0.292	0.305 $\pm$ 0.011
PBS11	0.385	0.357	0.378	0.373 $\pm$ 0.014
PBS12	0.258	0.246	0.257	0.253 $\pm$ 0.006
Blank	0.044	0.041	0.025	0.036 $\pm$ 0.010

ชุดการทดลอง	การเจริญของแบคทีเรีย (วันที่ 14)			Mean $\pm$ S.D.
	1	2	3	
PBS3	0.367	0.454	0.324	0.381 $\pm$ 0.066
PBS4	0.392	0.332	0.308	0.344 $\pm$ 0.043
PBS5	0.221	0.444	0.28	0.315 $\pm$ 0.115
PBS6	0.320	0.210	0.268	0.266 $\pm$ 0.055
PBS7	0.318	0.24	0.251	0.269 $\pm$ 0.042
PBS8	0.233	0.255	0.381	0.289 $\pm$ 0.079
PBS9	0.253	0.202	0.373	0.276 $\pm$ 0.087
PBS10	0.307	0.278	0.364	0.316 $\pm$ 0.043
PBS11	0.273	0.376	0.287	0.312 $\pm$ 0.055
PBS12	0.324	0.331	0.499	0.384 $\pm$ 0.099
Blank	0.028	0.027	0.045	0.033 $\pm$ 0.010



ชุดการทดลอง	การเจริญของแบคทีเรีย (วันที่ 21)			
	1	2	3	Mean $\pm$ S.D.
PBS3	0.646	0.603	0.666	0.638 $\pm$ 0.032
PBS4	0.594	0.827	0.766	0.729 $\pm$ 0.120
PBS5	0.367	0.327	0.316	0.336 $\pm$ 0.026
PBS6	0.428	0.411	0.448	0.429 $\pm$ 0.018
PBS7	0.449	0.297	0.363	0.369 $\pm$ 0.076
PBS8	0.485	0.505	0.415	0.468 $\pm$ 0.047
PBS9	0.427	0.432	0.536	0.465 $\pm$ 0.061
PBS10	0.297	0.274	0.269	0.28 $\pm$ 0.014
PBS11	0.542	0.547	0.737	0.608 $\pm$ 0.111
PBS12	0.596	0.538	0.600	0.578 $\pm$ 0.034
Blank	0.050	0.035	0.045	0.043 $\pm$ 0.007

ชุดการทดลอง	การเจริญของแบคทีเรีย (วันที่ 28)			Mean $\pm$ S.D.
	1	2	3	
PBS3	0.437	0.431	0.444	0.437 $\pm$ 0.006
PBS4	0.937	0.834	0.881	0.884 $\pm$ 0.051
PBS5	0.263	0.208	0.387	0.286 $\pm$ 0.091
PBS6	0.391	0.310	0.362	0.354 $\pm$ 0.041
PBS7	0.342	0.363	0.413	0.372 $\pm$ 0.036
PBS8	0.334	0.265	0.286	0.295 $\pm$ 0.035
PBS9	0.363	0.589	0.377	0.443 $\pm$ 0.126
PBS10	0.351	0.343	0.319	0.337 $\pm$ 0.016
PBS11	0.505	0.535	0.757	0.599 $\pm$ 0.137
PBS12	0.818	0.868	0.949	0.878 $\pm$ 0.066
Blank	0.032	0.041	0.056	0.043 $\pm$ 0.012

ภาคผนวก ข  
 น้ำหนักแผ่นพลาสติก (ก่อน - หลัง) สัปดาห์ที่ 4

พลาสติก PHBV

ชุดการทดลอง	ก่อน	ค่าเฉลี่ย	หลัง	ค่าเฉลี่ย	น้ำหนักที่หายไป
PHBV1	0.01302	0.01215	0.00894	0.00884	0.00331
	0.01134		0.00918		
	0.01211		0.00842		
PHBV2	0.0086	0.00996	0.00853	0.00987	0.00009
	0.01173		0.01159		
	0.00955		0.0095		
PHBV3	0.0094	0.00811	0.00915	0.00793	0.00018
	0.00805		0.00785		
	0.00688		0.00679		
PHBV4	0.0075	0.00976	0.00748	0.00709	0.00267
	0.00755		0.00743		
	0.01423		0.00637		
PHBV5	0.01509	0.01209	0.008232	0.00862	0.00347
	0.01078		0.009052		
	0.01039		0.008582		
PHBV6	0.00816	0.00938	0.00807	0.00929	0.00009
	0.00853		0.00844		
	0.01144		0.01136		
PHBV7	0.0101	0.01289	0.00956	0.01032	0.00256
	0.01098		0.00972		
	0.01758		0.01169		
PHBV8	0.01596	0.01598	0.00986	0.01298	0.00301
	0.01985		0.01792		
	0.01215		0.01115		

น้ำหนักพลาสติก (ก่อน - หลัง) สัปดาห์ที่ 4

พลาสติก PBS

ชุดการทดลอง	ก่อน	ค่าเฉลี่ย	หลัง	ค่าเฉลี่ย	น้ำหนักที่หายไป
PHBV9	0.00923	0.00916	0.00912	0.00907	0.00010
	0.0078		0.00767		
	0.01046		0.01041		
PHBV10	0.00928	0.01020	0.00804	0.00815	0.00205
	0.00945		0.00823		
	0.01188		0.00818		
PHBV11	0.01214	0.01167	0.00781	0.00750	0.00417
	0.01117		0.007023		
	0.01171		0.00766		
PHBV12	0.00916	0.01095	0.00902	0.01083	0.00012
	0.01223		0.01212		
	0.01147		0.01136		
PHBV13	0.00965	0.00955	0.00908	0.00933	0.00022
	0.00927		0.00921		
	0.00975		0.00971		
Blank	0.00985	0.01081	0.00981	0.01077	0.00004
	0.01155		0.01152		
	0.01105		0.01099		

น้ำหนักแผ่นพลาสติก (ก่อน - หลัง) สัปดาห์ที่ 4

พลาสติก PBS

ชุดการทดลอง	ก่อน	ค่าเฉลี่ย	หลัง	ค่าเฉลี่ย	น้ำหนักที่ หายไป
PBS3	0.01057	0.01187	0.00568	0.00710	0.00477
	0.01528		0.00734		
	0.00977		0.00829		
PBS4	0.01985	0.02178	0.01275	0.01532	0.00646
	0.02003		0.0129		
	0.02546		0.0203		
PBS5	0.02237	0.02130	0.0052	0.01408	0.00722
	0.02015		0.01794		
	0.02139		0.0191		
PBS6	0.01501	0.01631	0.01339	0.01327	0.00304
	0.01482		0.01305		
	0.0191		0.01338		
PBS7	0.01389	0.01091	0.00572	0.00705	0.00386
	0.00967		0.00637		
	0.00917		0.00907		
PBS8	0.01585	0.01259	0.01326	0.00982	0.00311
	0.00819		0.00504		
	0.01374		0.01116		

น้ำหนักแผ่นพลาสติก (ก่อน - หลัง) สัปดาห์ที่ 4

พลาสติก PBS

ชุดการทดลอง	ก่อน	ค่าเฉลี่ย	หลัง	ค่าเฉลี่ย	น้ำหนักที่ หายไป
PBS9	0.01269	0.01703	0.00997	0.01129	0.00573
	0.01945		0.01206		
	0.01896		0.01186		
PBS10	0.01543	0.01306	0.0105	0.00908	0.00398
	0.01505		0.01284		
	0.00871		0.00392		
PBS11	0.02072	0.02198	0.00676	0.01572	0.00476
	0.02264		0.02018		
	0.0226		0.02023		
PBS12	0.01203	0.01399	0.01124	0.01142	0.00257
	0.01232		0.01133		
	0.01764		0.01169		
Blank	0.0097	0.01313	0.00954	0.01246	0.00067
	0.01764		0.01616		
	0.01205		0.01168		

**ภาคผนวก ข**  
**คุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรีย**

***Lysinibacillus sphaericus* (ตารางที่ 1)**

เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน มีลักษณะเป็นแกรมบวก สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลล่า มีความยาว 1.5 - 5.0 และมีความกว้างของเซลล์ 0.6 - 1.0 เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง 30 - 45 °C และอุณหภูมิต่ำที่สามารถเจริญได้ 5 - 15 °C เจริญได้ดีในช่วง pH 5.7 - 9.5 สามารถเจริญได้ที่ NaCl 0 - 5% คัดแยกเชื้อนี้ได้จากดิน อาหาร น้ำ (Buchanan R. E. & Gibbons N .E., 1974)

***Geobacillus toebii* (ตารางที่ 2)**

เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน มีลักษณะเป็นแกรมบวก เคลื่อนที่ได้แบบท่อน มีความยาว 2.0 - 3.5  $\mu\text{m}$  และกว้าง 0.5 - 0.9  $\mu\text{m}$  สปอร์มีรูปร่างเป็นวงรี แบคทีเรียสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 -70 °C มีการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 60 °C และ pH ระหว่าง 6.0 - 9.0 และสามารถเจริญได้ดีที่ pH 7.5 ไม่สามารถเจริญได้ที่ azide 0.02% และ NaCl 5% ตามลำดับ สามารถคัดแยกเชื้อนี้ได้จากกระบวนการหมักปุ๋ยหรือ จากดิน (Buchanan R. E. & Gibbons N .E., 1974)

***Bacillus clausii* (ตารางที่ 3)**

มีลักษณะเป็นแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างแบบท่อนมีความยาว 0.5 - 0.7  $\mu\text{m}$  และมีความกว้าง 2.0 - 4.0  $\mu\text{m}$  เจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 - 50 °C และสามารถเจริญได้ดีในช่วง pH 7.0 - 8.0 สามารถเจริญได้ที่ NaCl 2 - 8% สามารถคัดแยกเชื้อนี้ได้จากดินหรือโคลน (Buchanan R. E. & Gibbons N .E., 1974)

***Brevibacillus choshinensis* (ตารางที่ 4)**

เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน มีลักษณะเป็นแกรมบวก เคลื่อนที่ได้แบบท่อน เซลล์มีรูปร่างท่อน มีความยาวมากกว่า 0.5  $\mu\text{m}$  และมีความกว้างมากกว่า 3.0  $\mu\text{m}$  สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 15 °C แต่ไม่เกิน 50 °C เจริญได้ดีในช่วง pH 5.5 - 9.0 ไม่สามารถเจริญได้ที่ NaCl 2% สามารถใช้คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานหลัก คัดแยกเชื้อนี้ได้จากดิน (Buchanan R. E. & Gibbons N .E., 1974)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติเบื้องต้นของ *Lysinibacillus sphaericus*

คุณสมบัติ	ผลการวิเคราะห์
Cell size ( $\mu\text{m}$ ) (length x diameter)	1.5-5.0 x 0.6-1.0
Spore shape and position*	R,T,B
Growth temperature range ( $^{\circ}\text{C}$ ) (optimum)	10-40
pH range (optimum)	6.0-9.5
Growth in 7 % (w/v) NaCl	-
Boron tolerance (mM)	75+
Voges-Proskauer test	-
Nitrate reduction	-
Oxidase	+
L-Arginine dihydrolase	non
L-Lysine and L-ornithine decarboxylase	non
Tryptophan deaminase	- <sup>d</sup>
Hydrolysis of:	
Urea	-
Gelatin	+
Aesculin	-
Acid production from:	
Sucrose	-
D-Xylose	-
N-Acetyl-D-glucosamine	non
Resistance to ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ):	
Chloramphenicol (8)	+W
Erythromycin (1)	+W
Rifampicin (0.25)	+W
Streptomycin (8)	+
Tetracycline (2)	+



ตารางที่ 1 (ต่อ)

คุณสมบัติ	ผลการวิเคราะห์
Oxidation of:	
Pyruvate	+ <sup>b</sup>
$\alpha$ -Hydroxybutyrate	- <sup>b</sup>
$\beta$ -Hydroxybutyrate	- <sup>b</sup>
L-Alanine	+ <sup>b</sup>
Glycyl L-glutamate	+ <sup>b</sup>
Adenosine	+ <sup>b</sup>
2'-Deoxyadenosine	+ <sup>b</sup>
Inosine	+ <sup>b</sup>
AMP	+ <sup>b</sup>
UMP	+ <sup>b</sup>
16S rRNA gene sequence similarity with	+ <sup>b</sup>
strain 10a <sup>T</sup> (%)t	96.9

ตารางที่ 2 คุณสมบัติเบื้องต้นของ *Geobacillus toebii*

คุณสมบัติ	ผลการวิเคราะห์
Motility	+
Spore shape:	
Ellipsoidal	+
Cylindrical	-d
Spore position:	
Subterminal	+
Terminal	+
Sporangia swollen	+
Aerobic growth	+

ตารางที่ 2 (ต่อ)

คุณสมบัติ	ผลการวิเคราะห์
Anaerobic growth	W <sup>d</sup>
Acid from:	-
L-Arabinose	-
Cellobiose	-e
Galactose	-
Glycerol	-d
Glycogen	+
myo-Inositol	-
Lactose	-e
D-Mannitol	d +
Mannose	-
L-Rhamnose	-
Sorbitol	d
Trehalose	+
D-Xylose	-
Utilization of:	
n-Alkanes	+
Acetate	-
Citrate	-
Formate	-
Lactate	
Hydrolysis of:	
Casein	f +
Esculin	-
Gelatin	-e

ตารางที่ 2 (ต่อ)

คุณสมบัติ	ผลการวิเคราะห์
Starch	-e
Urea	-
Nitrate reduction	+
Growth at pH:	
6	+
8	+
8.5	+
Growth in NaCl:	
1%	+
2%	+
3%	+
4%	+
5%	-e
Growth at:	
35 °C	-
40 °C	-e
45 °C	+
70 °C	-e
75 °C	-
Voges-Proskauer	+
ONPG <sup>d</sup>	-
Arginine dihydrolase <sup>d</sup>	-
Methyl red	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

คุณสมบัติ	ผลการวิเคราะห์
Utilization of:	non
Benzoate	non
Butyrate	non
Fumarate	non
Malate	non
Phenylacetate	non
Propionate	non
Pyruvate	non
Succinate	non
Butanol	non
Ethanol	non
Acid from:	
N-Acetylglucosamine	-d
Adomitol <sup>d</sup>	-
Amygdalin <sup>d</sup>	-
D-Arabitol <sup>d</sup>	-
Arbutin <sup>d</sup>	-
Fructose	+ <sup>d</sup>
Gentiobiose	-
D-Glucose	+
Inulin <sup>d</sup>	-
Maltose	+ <sup>d</sup>
D-Melezitose	-d
D-Melibiose	+ <sup>d</sup>
Methyl D-glucoside	-d
Methyl D-mannoside <sup>d</sup>	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

คุณสมบัติ	ผลการวิเคราะห์
Raffinose	W <sup>d</sup>
Ribose	-d
Salicin	-d
L-Sorbose <sup>d</sup>	W
Starch	-d
Sucrose	-d
D-Turanose	-d
Xylitol <sup>d</sup>	-
Phenylalanine deamination	non
Gas From nitrate	+

ตารางที่ 3 คุณสมบัติเบื้องต้นของ *Bacillus clausii*

คุณสมบัติ	ผลการวิเคราะห์
Pigmented colonies:	
Yellow-pink-red	-
Dark brown/black	-
Motility	non
Cell diameter > 0.1µm	-
Spore formation:	+
Ellipsoidal	+
Cylindrical	-
Spherical	-
Borne terminally	-
Swell sporangia	v

ตารางที่ 3 (ต่อ)

คุณสมบัติ	ผลการวิเคราะห์
Parasporal crystals	-
Catalase	non
Aerobic growth	+
Anaerobic growth	non
Voges-Proskauer	non
Acid from:	
L-Arabinose	non
D-Glucose	non
Glycogen	non
D-Manitol	non
D-Mannose	non
Methyl $\beta$ -xyloside	non
Salicin	non
Starch	non
Hydrolysis of:	
Casein	+
Gelatin	+
Starch	+
Utilization from:	
Citrate	non
Propionate	non
Egg yolk reaction	non
Nitrate reduction	+
Growth in NaCl:	
2%	+

ตารางที่ 3 (ต่อ)

คุณสมบัติ	ผลการวิเคราะห์
Growth at pH:	
5	-
6	-
7	+
8	+
9	non
10	-
5%	+
7%	+
10%	d
NaCl required for growth	-
Growth at:	
5 °C	-
10 °C	-
20 °C	+
30 °C	+
40 °C	+
50 °C	+
55 °C	-
65 °C	-
Autotrophic with H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub> or CO	-
Deamination of phenylalanine	-
Allantoin or urate required	-

ตารางที่ 4 คุณสมบัติเบื้องต้นของ *Brevibacillus choshinensis*

คุณสมบัติ	ผลการวิเคราะห์
Gram reaction	+
Anaerobic growth	-
Growth at:	
20 °C	+
50 °C	-
55 °C	-
NaCl tolerance:	
2%	-
3%	-
4%	non
5%	non
Hydrolysis of:	
Casein	-
Gelatin	-
ONPG	-
Starch	-
Urea	-
Nitrate reduction	-
Acid from <sup>f</sup> :	
N-Acetylglucosamine	-
D-Fructose	-
D-Glucose	-
Glycerol	-
Maltose	-
D-Mannitol	-
D-Mannose	+
Ribose	-



ตารางที่ 4 (ต่อ)

คุณสมบัติ	ผลการวิเคราะห์
D-Tagatose	-
D-trehalose	-
D-Turanose	-
Alkali from <sup>f</sup> :	
Cis-Aconitate	-
Trans-Aconitate	-
Aspartate	-
Caprylate	-
Citrate	d
Fumarate	-
D-Galacturonate	-
D-Gluconate	d
D-Glucuronate	-
L-Glutamate	-
DL-Lactate	-
D-Malate	d
L-Malate	+
Malonate	d
Mucate	-
2-Oxoglutarate	+
Propionate	+
Quinate	-
Succinate	-
L-Tartrate	-

ตารางที่ 5 การใช้ประโยชน์สารประกอบคาร์บอน ของ *Brevibacillus choshinensis*

การใช้ประโยชน์	ผลการวิเคราะห์
Adonitol	-
D-Alanine	-
L-Alanine	-
4-Aminobutyrate	-
L-Arabinose	-
L-Arabitol	-
Cellobiose	-
Citrate	d
Ethanolamine	-
D-Fructose	d
Galactose	-
Gentiobiose	-
Gluconate	d
Glucosamine	-
D-Glucose	d
DL-Glycerate	-
Glycerol	-
3-Hydroxybutyrate	-
Inositol	-
2-Ketogluconate	-
5- Ketogluconate	-
Lactose	-
L-Malate	-
Maltitol	-
Maltose	-
Maltotriose	-
Mannitol	d

ตารางที่ 5 (ต่อ)

การใช้ประโยชน์	ผลการวิเคราะห์
Melezitose	-
L-O-Methyl- $\beta$ -D-galactopyranoside	-
L-O-Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside	-
L-O-Methyl- $\beta$ -D-glucopyranoside	-
Mucate	-
2-Oxoglutarate	-
Palatinose	-
Phenylacetate	d
Proline	-
Putrescine	-
Pyruvate	-
Quinate	-
Rhamnose	-
D-Ribose	+
Saccharate	-
L-Serine	-
Sorbitol	-
Succinate	-
Sucrose	-
meso-Tartrate	-
Trehalose	-
Tryptophan	-
L-Tyrosine	-
D-Xylose	-

หมายเหตุ: เครื่องหมาย + หมายถึง > 85% positive

เครื่องหมาย - หมายถึง 0-15% positive

เครื่องหมาย d หมายถึง (16-84% positive)

เครื่องหมาย W หมายถึง weak reaction

เครื่องหมาย d/W หมายถึง but weak when positive

เครื่องหมาย -/w หมายถึง occasional strains are weakly positive

เครื่องหมาย v หมายถึง variation with in strain

เครื่องหมาย non หมายถึง ไม่สามารถระบุได้ หรือไม่มีข้อมูลระบุ



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววราภรณ์ จันทาสี เกิดเมื่อวันที่ 26 กันยายน พ.ศ. 2530 ที่จังหวัดสระบุรี สำเร็จการศึกษา ระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ปีการศึกษา 2552 หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรสหสาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554 ในระหว่างการศึกษาก็ได้เข้าร่วมการเสนอผลงานวิจัย ในการประชุมวิชาการระดับประเทศ โดยได้รับการตีพิมพ์และเผยแพร่ดังนี้

วราภรณ์ จันทาสี ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ และ ธนาวิที ลีจากภัย “การย่อยสลายของพลาสติกชนิด Polybutylene Succinate (PBS) ในอาหารเหลวด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกจากหลุมฝังกลบขยะ” ในเอกสารประกอบการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53 ระหว่างวันที่ 3 - 6 กุมภาพันธ์ 2558 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

