โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายพลาสติก
ชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรต

Screening of Poly(ethylene terephthalate)/PET degrading bacteria

ชื่อนิสิต นางสาวณัฐนรี แตงเอี่ยม **เลขประจำตัว** 5832316823

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงงาน	Screening of Poly (ethylene terepthalate) / PET degrading bacteria
โดย	นางสาวณัฐนรี แตงเอี่ยม รหัสนิสิต 5832316823
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัศวลาภสกุล
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

.... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

.... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัศวลาภสกุล)

.... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี)

.... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาดิถี-สิริศรัทธา)

.... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. สริสา ณ ป้อมเพ็ชร์)

ชื่อโครงการ	การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายพลาสติก ชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรต
นิสิตเสนอโครงการ	นางสาวณัฐนรี แตงเอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล
ภาควิชา	จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

พลาสติกเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้แทนวัสดุธรรมชาติ และใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ทั่วโลก พลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรตพบเห็นได้มากในชีวิตประจำวัน เช่น ขวดบรรจุน้ำดื่ม ขวดบรรจุน้ำอัดลม ในแต่ละปีมีอัตราการผลิตและใช้พลาสติกชนิดนี้สูงมาก หลังจากการใช้พลาสติกเหล่านี้ถูกทิ้งและสะสมในสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันมีการค้นพบแบคทีเรีย *Ideonella sakaiensis* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ PETase เพื่อย่อยสลายพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรต เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตได้ โครงงานนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรตได้ จากผลการทดลองสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 8 ไอโซเลทและนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA และเมื่อนำไอโซเลทดังกล่าวมาเลี้ยงร่วมกับพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรตเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำพลาสติกดังกล่าวไปวิเคราะห์โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) พบว่ามีเพียง 3 ไอโซเลท คือ S3, S4 และ S7 ที่สามารถสังเกตเห็นผิวของพลาสติกดังกล่าวมีร่องรอยการถูกย่อยสลายเมื่อเทียบกับชุดพลาสติกควบคุม ซึ่งแบคทีเรีย 3 ไอโซเลทนั้น พบว่า S3 และ S4 มีความใกล้เคียงกับ *Pseudogulbenkiania* sp. NS25 และ S7 มีความใกล้เคียงกับ *Nocardioides panaciterrae*

TITLE Screening of Poly (ethylene terephthalate) / PET degrading bacteria

INVESTIGATION Ms. Natnaree Tangeiam

ADVISOR Associate Professor Wanchai Assavalapsakul, Ph.D.

DEPARTMENT Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

ABSTRACT

Plastics are organic compounds that are synthesized to replace natural materials and widely used in various industries around the world. Poly (ethylene terephthalate) / PET can be seen in everyday life such as bottles and carbonated bottles. The rate of production and use of this type of plastic is rising every year. They will be disgarded and accumulated in environment after use. There is a discovery of *Ideonella sakaiensis* bacteria that can produce PET hydrolase (PETase) to degrade PET as a carbon source for growth. The aim of this project is to isolate the PET degrading bacteria. The results showed that eight isolated bacteria could be found and then analyzed by 16S rDNA sequencing. The isolate bacteria were cultivated with poly(ethylene terephthalate) for 7 days and then the incubated plastic was analyzed by using Scanning Electron Microscope (SEM). As the degrading appearance, only 3 isolates which are S3, S4 and S7 could degrade the surface of the plastic compared to the plastic control. The three isolated bacteria could be identified as *Pseudogulbenkiania* sp. NS25 for S3 and S4 and *Nocardioides panaciterrae* for S7.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิทยาศาสตร์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล ผู้ให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางการดำเนินงาน การใช้ชีวิตประจำวัน และแก้ไขปัญหาต่าง ๆ เสมอมา ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูงค่ะ

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และพี่ ๆ เจ้าหน้าที่ในภาควิชาทุกท่าน ที่ให้ความรู้ ความช่วยเหลือต่าง ๆ ตลอดมา

ขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ฝ่ายวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้เงินสนับสนุนโครงการวิจัยชิ้นนี้

ขอขอบคุณพี่ ๆ ห้อง 2014 พี่รพี สินเนืองนอง และพี่จารุวรรณ วรวิทยธาดา ที่คอยให้กำลังใจ ให้คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางต่าง ๆ และให้คำปรึกษาที่ดีเสมอมา ทั้งเรื่องงาน และการใช้ชีวิต

ขอบคุณกนิษฐ์ ขุมเพ็ชร์ และ ชลัญญา ภูมิภาค ผู้เป็นทั้งเพื่อนสนิทและเพื่อนในแลป ผู้ที่คอยให้กำลังใจ คอยรับฟังปัญหาต่าง ๆ และช่วยเหลือกันมาตลอด

ขอบคุณเพื่อน ๆ ชั้น 20 ที่คอยให้กำลังใจซึ่งกันและกันเสมอ อยู่เป็นเพื่อน และแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ด้วยกัน

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่เป็นที่คอยรับฟังและเป็นที่ปรึกษาปัญหาต่าง ๆ และคอยเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ณัฐนรี แตงเอี่ยม
ผู้ดำเนินโครงการ

สารบัญ

เนื้อหา	**หน้า**
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูปภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	6
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	11
บทที่ 4 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	16
ข้อเสนอแนะ	36
เอกสารอ้างอิง	37
ภาคผนวก ก	39
ภาคผนวก ข	48

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่		หน้า
1	สัญลักษณ์ที่แสดงถึงพลาสติกแต่ละชนิด ตามตัวเลขที่สามารถนำมารีไซเคิลได้	2
2	ลักษณะโครงสร้างโครงสร้างผลึกพอลิเมอร์แบบผสม	3
3	ความต้องการพลาสติกประเภทต่าง ๆ ในสหภาพยุโรปในปี 2011	3
4	การย่อยสลายพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรตโดยเอนไซม์ PETase	5

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์	12
2	องค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเลส (Polymerase chain reaction, PCR)	12
3	สภาวะการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเลส (Polymerase chain reaction, PCR)	13
4	ผลของการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล	16
5	แสดงการเจริญของแบคทีเรียเมื่อบ่มร่วมกับพลาสติก	18
6	แสดงการเจริญของแบคทีเรียเมื่อไม่ได้บ่มร่วมกับพลาสติก	19
7	แสดงการเจริญของแบคทีเรียเมื่อบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน	20
8	การเปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับ พลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S3 (ครั้งที่ 1)	22
9	การเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S3 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วม กับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S3 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก (ครั้งที่ 1)	23
10	การเปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับ พลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S3 (ครั้งที่ 2)	24
11	การเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S3 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วม กับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S3 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก (ครั้งที่ 2)	25
12	การเปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับ พลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S3 (ครั้งที่ 3)	26
13	การเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S3 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วม กับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S3 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก (ครั้งที่ 3)	27
14	การเปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับ พลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S4 (ครั้งที่ 1)	28
15	การเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S4 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วม กับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S4 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก (ครั้งที่ 1)	29
16	การเปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับ พลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S4 (ครั้งที่ 2)	30
17	การเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S4 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วม กับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S4 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก (ครั้งที่ 2)	31
18	การเปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับ พลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S7 (ครั้งที่ 1)	32
19	การเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S7 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วม กับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S7 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก (ครั้งที่ 1)	33

20	การเปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับ พลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S7 (ครั้งที่ 2)	34
21	การเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S7 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วม กับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S7 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก (ครั้งที่ 2)	35
22	การเปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับ พลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S1	48
23	การเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S1 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วม กับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S1 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก	49
24	การเปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับ พลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S2	50
25	การเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S2 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วม กับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S2 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก	51
26	การเปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับ พลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S5	52
27	การเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S5 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วม กับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S5 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก	53
28	การเปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับ พลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S6	54
29	การเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S6 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วม กับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S6 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก	55
30	การเปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับ พลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S8	56
31	การเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S8 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วม กับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S8 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก	57
32	การเปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับ พลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S9	58
33	การเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S9 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วม กับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S9 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก	59
34	การแสดงการเจริญของแบคทีเรียเมื่อบ่มร่วมกับพลาสติก (วันที่ 0)	60
35	การแสดงการเจริญของแบคทีเรียเมื่อไม่ได้บ่มร่วมกับพลาสติก (วันที่ 0)	61
36	การแสดงการเจริญของแบคทีเรียเมื่อบ่มร่วมกับ อาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (วันที่ 0)	62
37	การแสดงการเจริญของแบคทีเรียเมื่อบ่มร่วมกับพลาสติก (วันที่ 7)	63
38	การแสดงการเจริญของแบคทีเรียเมื่อไม่ได้บ่มร่วมกับพลาสติก (วันที่ 7)	64

39	การแสดงการเจริญของแบคทีเรียเมื่อบ่มร่วมกับ อาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (วันที่ 7)	65

บทที่ 1

บทนำ

1. พลาสติก

พลาสติกมีบทบาทสำคัญในชีวิตประจำวันเป็นอย่างมาก เนื่องจากนิยมนำมาทำเป็นสินค้าต่าง ๆ โดยพลาสติกเริ่มผลิตขึ้นในช่วงทศวรรษที่ 1940 และผลิตปริมาณมากขึ้นในทุก ๆ ปี (Gewert. et al. 2015) พลาสติกเป็นวัสดุพอลิเมอร์มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Tokiwa. et al. 2009) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้แทนวัสดุธรรมชาติ วัตถุดิบหลักในการสังเคราะห์พลาสติก คือ ปิโตรเลียม และน้ำมันดิบ ซึ่งเป็นสารไฮโดรคาร์บอนที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ปิโตรเลียมจะอยู่ในสถานะของแข็ง ของเหลว หรือก๊าซ ขึ้นกับอุณหภูมิ ความดัน จำนวน รวมถึงการจัดเรียงตัวของคาร์บอนในโมเลกุล สารประกอบไฮโดรคาร์บอนสามารถแยกเป็นชนิดต่าง ๆ โดยการกลั่นลำดับส่วน (National Metal and Materials Technology Center . 2007) สมบัติทั่วไปของพลาสติก ส่วนมาก น้ำหนักเบา แข็งแรง บางชนิดทนต่อการกัดกร่อน บางชนิดทนต่ออุณหภูมิสูง (Thompson. et al. 2009)

พลาสติกถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยปฏิกิริยาการสังเคราะห์พอลิเมอร์ หรือ ปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชั่น (Polymerization) เป็นปฏิกิริยาเคมีที่ทำให้มอนอเมอร์เกิดปฏิกิริยาต่อกันเป็นสายโซ่ยาว เกิดได้ 2 แบบ (National Metal and Materials Technology Center. 2007) ได้แก่

1) การสังเคราะห์พอลิเมอร์แบบลูกโซ่ หรือรวมตัว เป็นกระบวนการที่นำเอามอนอเมอร์ซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็กและไม่อิ่มตัว มาทำปฏิกิริยากันจนได้โมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งปฏิกิริยาเริ่มต้นจากพันธะคู่หรือพันธะสามจะถูกความร้อนและตัวเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสม ทำให้พันธะ 1 พันธะ แตกออก ซึ่งพันธะที่แตกออกจะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับพันธะข้างเคียงที่แตกออกเช่นกัน ทำให้เกิดการต่อกันทีละโมเลกุลจนได้โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่และมีลักษณะเป็นสายโซ่ที่ยาวขึ้น ตัวอย่างพลาสติกที่สังเคราะห์โดยวิธีนี้ เช่น โพลิไวนิลคลอไรด์ (Polyvinylchloride), โพลิโพรพิลีน (Polypropylene) และโพลิเอทธิลีน (polyethylene) เป็นต้น

2) การสังเคราะห์พอลิเมอร์แบบควบแน่น โดยกระบวนการสังเคราะห์แบบควบแน่นเกิดจากมอนอเมอร์ 2 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีโมเลกุลขนาดเล็ก และมีหมู่ฟังก์ชันเหมือนกันอย่างน้อย 2 หมู่ที่ปลายสุดของโมเลกุล หรืออาจเกิดจากมอนอเมอร์เพียง 1 ชนิด ที่มีหมู่ฟังก์ชันแตกต่างกันอย่างน้อย 2 หมู่ ที่ปลายสุดของโมเลกุล ที่สามารถทำปฏิกิริยากันระหว่างหมู่ฟังก์ชันอย่างต่อเนื่องได้ผลิตภัณฑ์เป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ ตัวอย่างพลาสติกที่เกิดจากการสังเคราะห์ด้วยกระบวนการควบแน่น ได้แก่ ไนลอน (Nylon) และโพลิเอสเทอร์ (Polyester) เป็นต้น

ประเภทของพลาสติกแบ่งตามสมบัติทางความร้อนได้ 2 ประเภท คือ เทอร์โมพลาสติก (Thermoplastic) และ เทอร์โมเซตติง (Thermosetting) โดยเทอร์โมพลาสติกคือพลาสติกที่ได้รับความร้อนแล้วจะอ่อนตัวได้ง่าย และเมื่อปล่อยให้เย็นตัวจะกลับมาแข็งตัว โดยพลาสติกประเภทนี้มีโครงสร้างของโมเลกุลเป็นแบบโซ่ตรงยาว และมีการเชื่อมต่อระหว่างกันของโซ่พอลิเมอร์น้อยมาก ทำให้สามารถหลอมเหลวได้ง่าย ผ่านแรงอัดมาก โดยไม่ทำลายโครงสร้างเดิม ตัวอย่างของพลาสติกประเภทนี้ เช่น High density polyethylene (HDPE), Low density polyethylene (LDPE), Polypropylene (PP), Polystyrene (PS) แต่พลาสติกชนิดเทอร์โมเซตติง คือพลาสติกที่คงรูปหลังผ่านความร้อนหรือแรงดันเพียงหนึ่งครั้ง และเมื่อเย็นตัวลงจะแข็งมากและเปราะง่าย แต่มีความสามารถในการทนความร้อน และความดันได้ดี อ่อนตัวและเปลี่ยนรูปร่างไม่ค่อยได้ เนื่องจากเมื่อเย็นตัวจะแข็งตัวได้เร็ว เมื่อได้รับอุณหภูมิที่สูงจะแตกและไหม้เป็นขี้เถ้าสีดำ โดยพลาสติกประเภทนี้มีโมเลกุลเชื่อมโยงกันเป็นร่างแหจับตัวกันแน่น ทำให้มีแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลแข็งแรงมาก ทำให้ไม่

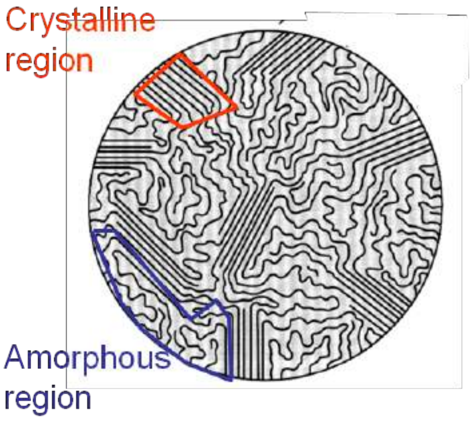
สามารถนำกลับมาหลอมเหลวใหม่ได้ ตัวอย่างของพลาสติกประเภทนี้ เช่น เมลามีน (Melamine), พอลิยูรีเทน (Polyureathane) (Dynatech. 2017)

พลาสติกที่นิยมใช้และสามารถนำมาผ่านกระบวนการรีไซเคิลมี 7 ประเภท โดยพลาสติกที่นิยมนำผ่านกระบวนการรีไซเคิล คือ พลาสติกชนิดเทอร์โมพลาสติก (Thermoplastic) เช่น Poly(ethylene terephthalate) หรือ PET, High-density polyethylene (HDPE), Polyvinyl chloride (PVC), low-densitypolyethylene (LDPE), Polypropylene (PP), polystyrene (PS) และอื่น ๆ ซึ่งพลาสติกทั้ง 7 ประเภทนี้เป็นพลาสติกที่นิยมและสามารถนำมาผ่านกระบวนการรีไซเคิลและนำกลับมาใช้ใหม่ได้ โดยสมาคมอุตสาหกรรมพลาสติกแห่งอเมริกา (The Society of the Plastics Industry, Inc.) ได้กำหนดสัญลักษณ์มาตรฐานของพลาสติกยอดนิยมกลุ่มต่าง ๆ ที่สามารถนำกลับมาหมุนเวียนหรือที่เรียกว่าการรีไซเคิล (Recycle) ไว้ 7 ประเภทหลัก ๆ ดังแสดงในรูปที่ 1 (Deemark. 2016)

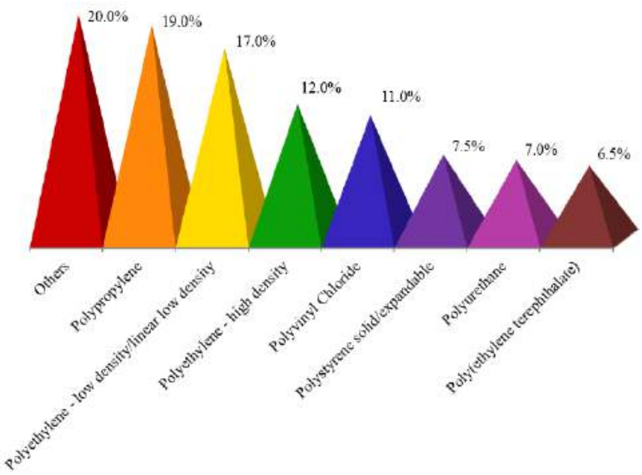
รูปที่ 1 สัญลักษณ์ที่แสดงถึงพลาสติกแต่ละชนิด ตามตัวเลขที่สามารถนำมารีไซเคิลได้ (https://lowimpactmovement.org/all-in-week-1/2018/10/4/understanding-the-plastic-recycling-symbols-types-of-plastics)

2. พอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรต (Poly(ethylene terephthalate))

พอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรต เป็นเทอร์โมพลาสติกชนิดหนึ่งในตระกูล โพลิเอสเตอร์ มีความเสถียรทางเคมี โดยมีโครงสร้างผลึกพอลิเมอร์เป็นแบบผสม (Semi-crystalline) (Omnexus. 2018) ซึ่งจะมีส่วนผสมระหว่างโครงสร้างที่เป็นระเบียบ (Crystalline) และโครงสร้างแบบไม่เป็นระเบียบ (Non-crystalline หรือ Amorphous) (Jog. 1995) (รูปที่ 2) พอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรตสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) ระหว่างกรดเทเรฟทาลิก (Terephthalic acid) และ เอทิลีนไกลคอล (Ethylene glycol) ซึ่งได้จากแหล่งเชื้อเพลิงฟอสซิล โดยพลาสติกชนิดนี้จะมีต้นทุนค่อนข้างต่ำ ความโปร่งใสสูง มีความแข็งแรง คงทน มีความเสถียรทางเคมี และความร้อน มีการซึมผ่านของแก๊สต่ำ สามารถผ่านกระบวนการต่าง ๆ ได้ง่าย ซึ่งคุณสมบัติต่าง ๆ เหล่านี้ ทำให้พลาสติกชนิดนี้เป็นวัสดุที่นิยมและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ที่หลากหลาย ในปี ค.ศ. 2011 พบว่า ความต้องการพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรตในสหภาพยุโรปสูงถึง 6.5 เปอร์เซ็นต์ ของความต้องการพลาสติกทั้งหมดในสหภาพยุโรปที่สูงถึง 3,000 ตัน (รูปที่ 3) (Webb. 2013)



รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างโครงสร้างผลึกพอลิเมอร์แบบผสม
(http://www.ltas-cm3.ulg.ac.be/FractureMechanics/overview_P3.html)



รูปที่ 3 ความต้องการพลาสติกประเภทต่าง ๆ ในสหภาพยุโรปในปี 2011
(https://www.mdpi.com/2073-4360/5/1/1/htm)

พลาสติกชนิดนี้ส่วนมากมักนำมาใช้ในรูป เส้นใย (Fibers), แผ่น (Sheets), แผ่นฟิล์ม (Films) โดยเฉพาะอย่างยิ่งมักนำมาใช้ในบรรจุภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มต่าง ๆ เช่น ขวดน้ำขวดน้ำอัดลม ด้านอิเล็กทรอนิกส์ ชิ้นส่วนยานยนต์ ผลิตภัณฑ์ในครัวเรือน อุปกรณ์การกีฬา แผ่นฟิล์มเอกซเรย์ และผลิตภัณฑ์สิ่งทอต่าง ๆ เป็นต้น โดยการนำมาใช้จะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติเฉพาะบางประการของพลาสติกชนิดนี้ด้วยเช่นกัน (Webb. 2013)

3. ปัญหาของพลาสติกในปัจจุบัน

ปัญหาของพลาสติกเป็นปัญหารุนแรงส่งผลกระทบมากมาย โดยมีรายงานการวิจัยกล่าวว่าขยะพลาสติกที่พบในน้ำและก้นทะเล มาจากอุตสาหกรรมต่าง ๆ ทั้งภายในประเทศ และ นอกประเทศ โดยขยะที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมนี้ย่อยสลายได้ยาก มีเพียงบางชิ้นเท่านั้นที่สามารถย่อยสลายเป็นชิ้นเล็กลงได้ เนื่องจากพลาสติก

สามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้อย่างยาวนาน และ ทนต่อการกัดกร่อน การที่พลาสติกอยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้นมีผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตเนื่องจากพลาสติกที่มีขนาดเล็กสามารถเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ได้ ในสัตว์เช่น ปลา นกทะเล หรือ สิงโตทะเล ทำให้เกิดการสะสมพลาสติกปริมาณมากในร่างกายจึงก่อให้เกิดอันตรายจนถึงตายได้ (Li. et al. 2016) พลาสติกที่ถูกทิ้งในสิ่งแวดล้อมจะทำให้สารอาหารในดินลดลง ทำให้ความอุดมสมบูรณ์ลดลง และส่งผลเสียต่อภาคการเกษตร (Pavani. 2014) และส่งผลต่อเศรษฐกิจของประเทศได้ ส่วนผลกระทบของพลาสติกต่อสุขภาพมนุษย์พบว่าพลาสติกอาจปนเปื้อนสู่ห่วงโซ่อาหารและเป็นอันตรายต่อสุขภาพมนุษย์ได้ และหากมีการใช้งานพลาสติกที่ไม่ถูกวิธีหรือใช้ไม่เหมาะสมกับประเภท ของพลาสติก อาจนำมาซึ่งผลกระทบต่อการเกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ ได้จากรายงานของ International Agency for Research on Cancer (IARC) กล่าวว่า สารเติมแต่งในการผลิตพลาสติก เช่น Vinyl chloride และ Formaldehyde จัดเป็นสารก่อมะเร็งกลุ่ม 1 คือ เป็นสารที่มีหลักฐานยืนยันได้ว่าสามารถก่อให้เกิดโรคมะเร็งในคนได้ (วารสารพิษวิทยาไทย. 2013)

4. วิธีการกำจัดพลาสติก

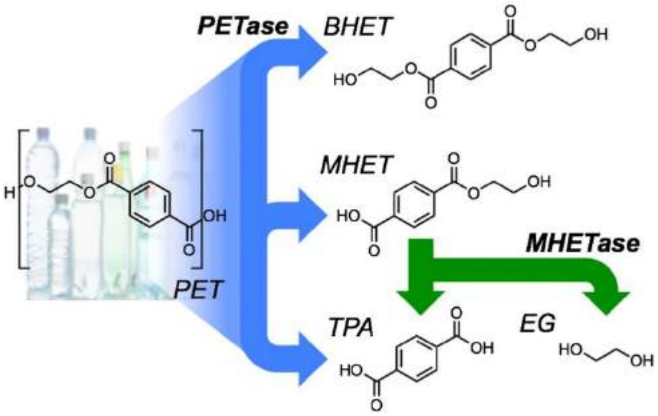
วิธีการกำจัดพลาสติกหลัก 3 วิธี คือ การฝังกลบ (Landfilling), การเผา (Incineration) และการนำกลับมาใช้ใหม่ (Recycling) ซึ่งแต่ละวิธีต่างมีข้อจำกัด วิธีแรก คือ วิธีการฝังกลบในหลุมฝังกลบ วิธีการนี้สามารถฝังกลบพลาสติกได้ทุกชนิด อย่างไรก็ตามการฝังกลบพลาสติกใช้พื้นที่มาก และสูญเสียองค์ประกอบทางเคมีและพลังงานในพลาสติก และการฝังกลบพลาสติกจะทำให้พลาสติกเกิดการย่อยสลายทางกายภาพและ/หรือชีวภาพได้สารที่เป็นมลพิษ อาทิเช่น Phthalates และ Bisphenol A เมื่อฝนตกหรือเกิดอุทกภัยอาจทำให้สารพิษเหล่านั้นรั่วไหลสู่สิ่งแวดล้อมได้ สำหรับวิธีการเผาพลาสติกก็ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพ เช่นกัน เนื่องจากสารที่อันตรายจะถูกปล่อยสู่บรรยากาศในระหว่างกระบวนการเผา วิธีสุดท้ายคือวิธีการนำกลับมาใช้ใหม่ (Recycling) พลาสติกหลายชนิดสามารถนำมารีไซเคิลได้ ซึ่งวิธีการนี้ต้องมีกระบวนการจัดการบริหารขยะที่ดี กล่าวคือมีการจำแนกและคัดแยกที่ดี เพราะหากมีการจัดการขยะที่ไม่ดีอาจทำให้เกิดการรั่วไหลได้ ซึ่งปัญหาการจัดการขยะส่วนมากมักพบในประเทศที่กำลังพัฒนา (Centre for Instructional Technology, 2016) แต่ปัจจุบันพบว่ามีทางเลือกในการกำจัดพลาสติกเพิ่มขึ้นมา คือ วิธีการย่อยสลายทางชีวภาพ (Webb. H 2013) โดยกระบวนการย่อยสลายของสิ่งมีชีวิต

5. **การย่อยสลายพลาสติกโดยวิธีการทางชีวภาพ**

การย่อยสลายโดยวิธีการทางชีวภาพ เกิดโดยกระบวนการย่อยสลายของจุลินทรีย์ (Trivedi. 2016) ซึ่งการย่อยสลายโดยวิธีการทางชีวภาพมักจะนำมาใช้ในกระบวนการฟื้นฟูธรรมชาติ (Joutey. 2013) ดังนั้นการกำจัดพลาสติกโดยวิธีการดังกล่าวจึงเป็นวิธีที่ดีต่อสิ่งแวดล้อม ในปัจจุบันมีรายงานวิจัยพบว่าจุลินทรีย์บางชนิดสามารถใช้พลาสติกเป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะพลาสติกชนิดพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรตโดยพบว่า ราบางชนิด (*Fusarium oxysporum* และ *Fusarium solani*) ที่สามารถเจริญเติบโตได้ใน mineral medium ที่มีส่วนประกอบของพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรต (Nimchua. et al. 2007) และพบแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์มาย่อยสลายพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรตได้ เช่นกัน แบคทีเรียที่ชื่อว่า *Ideonella sakaiensis* 201-F6 (Yoshida. et al 2016) โดยในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะแบคทีเรีย

6. **การย่อยสลายพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรตด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้แบคทีเรีย**

เมื่อไม่นานมานี้มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้แบคทีเรียในกระบวนการย่อยสลายพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรตด้วยวิธีการทางชีวภาพ จากผลการศึกษาจึงพบว่ามีแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยพลาสติกชนิดนี้ได้ โดยเอนไซม์นั้นมีชื่อว่า PET hydrolase (PETase) เอนไซม์นี้ถูกผลิตโดยแบคทีเรียที่ชื่อว่า *Ideonella sakaiensis* 201-F6 แบคทีเรียชนิดนี้จะหลั่งเอนไซม์ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ PETase และ MHETase (Yoshida. et al 2016) โดย PETase จะย่อย PET เป็น bis (2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET), mono (2-hydroxyethyl) terephthalic acid (MHET) และ Terephthalic acid (TPA) จากนั้นเอนไซม์ชนิดที่ 2 คือ MHETase จะย่อย MHET ได้ Terephthalic acid (TPA) และ Ethylene glycol (EG) (Austin. et al. 2018) (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 การย่อยสลายพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรตโดยเอนไซม์ PETase (Austin. et al. 2018)

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรต

บทที่ 2
อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลองโดยแบ่งตามการทดลองมีดังนี้

1. การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรต

1.1 อุปกรณ์

1.1.1 ตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

1.1.2 เครื่องบ่มแบบเขย่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (จากบริษัท PMI-Labortechnik GmbH (Grafstal, switzerland))

1.1.3 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar cabinet) (จากบริษัท Lab Service Ltd., Part. (Bangkok, Thailand))

1.1.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.1.5 หลอดทดลอง

1.1.6 เครื่องวัดค่า pH (จากบริษัท Ionix (Robinson road, Singapore))

1.1.7 พลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรตขนาด 0.5 × 0.5 เซนติเมตร

1.1.8 ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)

1.1.9 แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Spreader)

1.1.10 จานเพาะเชื้อ (Plate)

1.1.11 กระบอกฉีดยา (Syringe) (จากบริษัท Nipro (New Jersey, USA))

1.1.12 แผ่นกรองแบคทีเรียขนาด 0.45 ไมโครเมตร (filter paper) (จากบริษัท GE healthcare (Illinois, USA))

1.1.13 ตู้แช่เย็น 4 องศาเซลเซียส (จากบริษัท Sanyo (Bangkok, Thailand))

1.1.14 ปิเปตขนาด 1,000, 200, 20, 10, 2.5 ไมโครลิตร (จากบริษัท Eppendorf (Bangkok, Thailand))

1.1.15 ทิป (Tips) ขนาด 1,000, 200, 10 ไมโครลิตร (จากบริษัท Bio Science, Inc. (Pennsylvania, USA))

1.1.16 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) (จากบริษัท Bio-active (Bangkok, Thailand))

1.1.17 เครื่องชั่ง (จากบริษัท Adam equipment (Connecticut, USA))

1.1.18 ตู้อบแห้งอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

1.1.19 ดินที่ผ่านการฝังกับพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรตเป็นเวลา 6 เดือน

1.2 เคมีภัณฑ์

1.2.1 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany))

1.2.2 แอมโมเนียมไนเตรต จากบริษัท (จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany))

1.2.3 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (จากบริษัท Ajax Finechem (Auckland, New Zealand))

1.2.4 แมกนีเซียมซัลเฟต (จากบริษัท Ajax Finechem (Auckland, New Zealand))

1.2.5 เฟอร์ริคคลอไรด์ (จากบริษัท Sigma-Aldrich (Missouri, USA))

1.2.6 แคลเซียมคลอไรด์ จากบริษัท (จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany))
1.2.7 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany))
1.2.8 ไฮโดรคลอริก (จากบริษัท RCI Labscan CO.,LTD. (Bangkok, Thailand))
1.2.9 Bacto Agar (จากบริษัท Becton Dickinson (Ho Chi Minh City, Vietnam))

2. การระบุสายพันธุ์แบคทีเรีย

2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA)

2.1.1 อุปกรณ์

2.1.1.1 หลอด microcentrifuge ขนาด 1.7 มิลลิลิตร
(จากบริษัท Eppendorf (Bangkok, Thailand))
2.1.1.2 ปิเปตขนาด 1,000, 200, 20, 10, 2.5 ไมโครลิตร
(จากบริษัท Eppendorf (Bangkok, Thailand))
2.1.1.3 ทิป (Tips) ขนาด 1,000, 200, 10 ไมโครลิตร
(จากบริษัท Bio Science, Inc. (Pennsylvania, USA))
2.1.1.4 หลอดทดลอง
2.1.1.5 ตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
2.1.1.6 คิวเวตต์ (cuvette) (จากบริษัท Eppendorf (Bangkok, Thailand))
2.1.1.7 ตะเกียงแอลกอฮอล์
2.1.1.8 Vortex (จากบริษัท Scientific Industries (Newyork, USA))
2.1.1.9 Spindown
(จากบริษัท Laboratory & Medical Supplies (Brigachtal, Germany))
2.1.1.10 เครื่องปั่นตกตะกอน 4 องศาเซลเซียส (Centrifuge)
(จากบริษัทEppendorf (Bangkok, Thailand))
2.1.1.11 เครื่องปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง
(จากบริษัท Hettich (Bangkoknoi, Bangkok))
2.1.1.12 Heat box
(จากบริษัท Labnet International, Inc. (New Jersey, USA))
2.1.1.13 Spectrophotometer (จากบริษัท Eppendorf (Bangkok, Thailand))
2.1.1.14 ตู้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
(จากบริษัท Sandenintercool (Phromburi, Singburi))
2.1.1.15 ถุงมือ (จากบริษัท Sri trang gloves (Suratthani, Bangkok))
2.1.1.16 เครื่อง Gel document (จากบริษัท BIO-RAD (California, USA))
2.1.1.17 อุปกรณ์สำหรับการทำ Gel electrophoresis

2.1.2 เคมีภัณฑ์

2.1.2.1 TE Buffer pH 8 (10mM Tris, pH 8 ; 1mM EDTA, pH 8)

2.1.2.2 Lysozyme

2.1.2.3 10% SDS

2.1.2.4 RNase A

2.1.2.5 Phenol

2.1.2.6 Chloroform

2.1.2.7 Sodium acetate

2.1.2.8 Absolute ethanol

2.1.2.9 70% ethanol

2.1.2.10 RNase free water

2.1.2.11 1x TAE buffer (เตรียมจาก 50x TAE, Tris base 242 กรัม ; Acetic acid 57.1 มิลลิลิตร ; 0.5M EDTA, pH 8 ; น้ำ 842.9 มิลลิลิตร)

2.2 การเพิ่มจำนวนโดยวิธีการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเลส (Polymerase chain reaction, PCR)

2.2.1 อุปกรณ์

2.2.1.1 หลอดสำหรับทำพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (PCR tube) (จากบริษัท Bio Science, Inc. (Pennsylvania, USA))

2.2.1.2 ปิเปตขนาด 1,000, 200, 20, 10, 2.5 ไมโครลิตร (จากบริษัท Eppendorf (Bangkok, Thailand))

2.2.1.3 ทิป (Tips) ขนาด 1,000, 200, 10 ไมโครลิตร (จากบริษัท Bio Science, Inc. (Pennsylvania, USA))

2.2.1.4 เครื่อง Thermal Cycler (จากบริษัท BIO-RAD (California, USA))

2.2.1.5 ที่วางหลอดขนาด 1.7 และ 0.2 มิลลิลิตร (Rack)

2.2.1.6 เครื่อง Gel document (จากบริษัท BIO-RAD (California, USA))

2.2.1.7 อุปกรณ์สำหรับการทำ Gel electrophoresis

2.2.1.8 ถุงมือ (จากบริษัท Sri trang gloves (Suratthani, Bangkok))

2.2.1.9 Vortex (จากบริษัท Scientific Industries (Newyork, USA))

2.2.2 เคมีภัณฑ์

2.2.2.1 10X Reaction Buffer (จากบริษัท Apsalagen Co. Ltd. (Bangkok, Thailand))

2.2.2.2 50mM $MgCl_2$ (จากบริษัท Apsalagen Co. Ltd. (Bangkok, Thailand))

2.2.2.3 10mM dNTPs (จากบริษัท Thermo Scientific (Massachusetts, USA))

2.2.2.4 10 μM 27F (จากบริษัท Macrogen (Seoul, South Korea))

2.2.2.5 10 μM 1492R (จากบริษัท Macrogen (Seoul, South Korea))

2.2.2.6 *Taq* DNA Polymerase (จากบริษัท Apsalagen Co. Ltd. (Bangkok, Thailand))

3. การเจริญของแบคทีเรียเมื่อบ่มร่วมกับพลาสติกและไม่ได้บ่มร่วมกับพลาสติก และการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 ตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.1.2 เครื่องบ่มแบบเขย่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
(จากบริษัท PMI-Labortechnik GmbH (Grafstal, switzerland)

3.1.3 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar cabinet)
(จากบริษัท Lab Service Ltd., Part. (Bangkok, Thailand))

3.1.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.5 หลอดทดลอง

3.1.6 เครื่องวัดค่า pH (จากบริษัท Ionix (Robinson road, Singapore))

3.1.7 พลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรตขนาด 0.5 × 0.5 เซนติเมตร

3.1.8 ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)

3.1.9 แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Spreader)

3.1.10 จานเพาะเชื้อ (Plate)

3.1.11 กระบอกฉีดยา (Syringe) (จากบริษัท Nipro (New Jersey, USA))

3.1.12 แผ่นกรองแบคทีเรียขนาด 0.45 ไมโครเมตร (filter paper)
(จากบริษัท GE healthcare (Illinois, USA))

3.1.13 ตู้แช่เย็น 4 องศาเซลเซียส (จากบริษัท Sanyo (Bangkok, Thailand))

3.1.14 ปิเปตขนาด 1,000, 200, 20, 10, 2.5 ไมโครลิตร
(จากบริษัท Eppendorf (Bangkok, Thailand))

3.1.15 ทิป (Tips) ขนาด 1,000, 200, 10 ไมโครลิตร
(จากบริษัท Bio Science, Inc. (Pennsylvania, USA))

3.1.16 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) (จากบริษัท Bio-active (Bangkok, Thailand)

3.1.17 เครื่องชั่ง (จากบริษัท Adam equipment (Connecticut, USA))

3.1.18 ตู้อบแห้งอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

3.2 เคมีภัณฑ์

3.2.1 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany))

3.2.2 แอมโมเนียมไนเตรต จากบริษัท (จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany))

3.2.3 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต
(จากบริษัท Ajax Finechem (Auckland, New Zealand))

3.2.4 แมกนีเซียมซัลเฟต (จากบริษัท Ajax Finechem (Auckland, New Zealand))

3.2.5 เฟอร์ริคคลอไรด์ (จากบริษัท Sigma-Aldrich (Missouri, USA))

3.2.6 แคลเซียมคลอไรด์ จากบริษัท (จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany))

3.2.7 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany))

3.2.8 ไฮโดรคลอริก (จากบริษัท RCI Labscan CO.,LTD. (Bangkok, Thailand))

3.2.9 Bacto Agar (จากบริษัท Becton Dickinson (Ho Chi Minh City, Vietnam))

4. ตรวจดูลักษณะของพลาสติกที่บ่มร่วมกับแบคทีเรียโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

4.1 อุปกรณ์

4.1.1 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) รุ่น JSM-IT500HR (JEOL)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

1. การหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายพลาสติก

นำตัวอย่างดินที่อยู่บริเวณรอบพลาสติกที่ผ่านการฝังเป็นเวลา 6 เดือนจากจังหวัดสมุทรสาคร บริเวณที่ละติจูด 13°38'39.1"N ลองจิจูดที่ 100°15'51.5"E มาชั่งน้ำหนักให้ได้ 1 กรัม จากนั้นนำมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon free mineral medium (CFMM) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่มีพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรต 0.1 กรัมจะได้ค่าการเจือจางที่ 10^{-1} จากนั้นทำการเจือจาง โดยปิเปตต์อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีดินจากหลอดทดลองที่ 1 ลงหลอดทดลองที่ 2 ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM 9 มิลลิลิตรจะได้ค่าการเจือจางที่ 10^{-2} ทำซ้ำจนได้ค่าการเจือจางที่ 10^{-6} จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

ปิเปตต์อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีค่าการเจือจางที่ 10^{-4} ถึง 10^{-6} ปริมาตร 100 ไมโครลิตรมาเกลี่ยลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่ประกอบด้วยพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรต 0.5 กรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันเมื่อเชื้อเจริญจะนำมาคัดแยกโดยทำ Master plate เมื่อเชื้อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว จึงนำมาเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ทำโดยนำโคโลนีของเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM 5 มิลลิลิตร โดยมีพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรตเป็นแหล่งคาร์บอน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเติม Absolute glycerol 500 ไมโครลิตร ลงใน Cryotube ปิเปตต์เชื้อที่บ่มมา 1,000 ไมโครลิตร ใส่ใน Cryotube ผสมโดยพลิกกลับไปมาเบา ๆ นำเชื้อที่เก็บรักษาใน 50% glycerol ไปเก็บไว้ภายใต้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2. การระบุสายพันธุ์แบคทีเรีย

2.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA)

นำเชื้อที่แยกได้จนเป็นโคโลนีเดี่ยวมาบ่มเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM 2 มิลลิลิตร ที่มีพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรต 0.1 กรัม เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปิเปตต์เชื้อที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการบ่มปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอด microcentrifuge จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนโดยปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ณ อุณหภูมิห้อง เทส่วนใสทิ้ง และทำซ้ำอีกครั้ง นำเซลล์ที่ได้มาเติม TE Buffer pH 8 (10mM Tris ,pH 8 ; 1mM EDTA ,pH 8) ปริมาตร 280 ไมโครลิตร และ Lysozyme (10 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติม 10% (W/V) SDS 22.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกกลับไปมา จากนั้นเติม RNase A (10 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร) 5 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม phenol ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกกลับไปมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนลงหลอด microcentrifuge ใหม่ และเติม Chloroform ปริมาตรเท่ากับส่วนใส ผสมให้เข้ากันโดยพลิกกลับไปมา นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนลงหลอด centrifuge tube ใหม่ เติม 3 M Sodium acetate ปริมาตร 1/10 เท่าของปริมาตรส่วนใส ผสมให้เข้ากันโดย

พลิกกลับไปมา จากนั้นเติม Absolute ethanol ที่เย็น ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารทั้งหมดที่มี นำไปตกตะกอนดีเอ็นเอโดยบ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนโดย 70% เอทานอลที่เย็น จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออก นำตะกอนจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้แห้ง ละลายตะกอนใน RNase Free Water ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้ 1% Agarose Gel Electrophoresis ใน 1x TAE Buffer และนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเลส (Polymerase chain reaction, PCR)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเลส (Polymerase chain reaction, PCR) มีองค์ประกอบดังนี้ RNase Free Water, 10X Reaction Buffer, 50 mM $MgCl_2$, 10 µM dNTPs, ไพรเมอร์ (10 µM 27F และ 10 µM 1492R, ตารางที่ 1) และ Taq Polymerase โดยผสมองค์ประกอบทุกอย่างรวมกันลงในหลอด ยกเว้น Template เพื่อทำ Master mix จากนั้นแบ่ง Master mix ลงในแต่ละหลอดและเติมจีโนมิกดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยจีโนมิกดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างจะถูกนำไปวัดความเข้มข้นและคุณภาพด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยปริมาตรรวมในแต่ละหลอดจะเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ซึ่งองค์ประกอบและปริมาตรของแต่ละองค์ประกอบแสดงดังตารางที่ 2 และมีสภาวะในการทำพีซีอาร์ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

Primers	Sequence (5' - 3')
27F	5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'
1492R	5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเลส (Polymerase chain reaction, PCR)

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10X Reaction Buffer	2
10 mM dNTPs	0.2
10 µM 27F	0.2
10 µM 1492R	0.2
50mM $MgCl_2$	1
Taq Polymerase	0.1
Template (50 ng/µl)	1
RNase Free Water	15.3
ปริมาตรรวม	20

<u>หมายเหตุ</u> Template ใช้ความเข้มข้นประมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

ตารางที่ 3 สภาวะการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเลส (Polymerase chain reaction, PCR)

	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	รอบ
Initial denaturation	94	5 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	35
Annealing	57	30 วินาที	
Extention	72	2 นาที	
Final extention	72	10 นาที	1

หมายเหตุ เมื่อนำมาวัดความเข้มข้นแล้วพบว่าตัวอย่างมีความเข้มข้นเกิน 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จะนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยใช้ RNase free water

3. การเจริญของแบคทีเรียเมื่อบ่มร่วมกับพลาสติกและไม่ได้บ่มร่วมกับพลาสติก และการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน

3.1 การเจริญของแบคทีเรียเมื่อบ่มร่วมกับพลาสติก

นำลูปเขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Medium (CFMM) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มีพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรต 0.1 กรัม จากนั้นปิเปตต์อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวข้างต้นมา 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร จะได้ค่าการเจือจางที่ 10^{-1} และทำการเจือจางซ้ำไปเรื่อย ๆ จนเจือจางถึงค่า 10^{-3} จากนั้นนำค่าการเจือจางทั้งหมด ได้แก่ 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM นำไปบ่มเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 5 วัน จึงนำมานับจำนวนโคโลนี โดยจำนวนโคโลนีที่ได้จะนำมาคำนวณปริมาณเชื้อเริ่มต้น (วันที่ 0) โดยรายงานผลเป็น CFU/ml ซึ่งเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM 3 มิลลิลิตรที่กล่าวไปในช่วงแรกไปบ่มต่อเพื่อคำนวณหาปริมาณเชื้อหลังจากบ่มเป็นเวลา 7 วัน โดยจะนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เพื่อดูปริมาณเชื้อที่เพิ่มขึ้น เมื่อบ่มครบ 7 วัน ปิเปตต์อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวข้างต้นมา 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร จะได้ค่าการเจือจางที่ 10^{-1} จากนั้นทำการเจือจางซ้ำจนเจือจางถึงค่า 10^{-7} จากนั้นนำค่าการเจือจางที่ 10^{-6} และ 10^{-7} มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM นำไปบ่มเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 5 วัน จึงนำมานับจำนวนโคโลนี

3.2 การเจริญของแบคทีเรียเมื่อไม่ได้บ่มร่วมกับพลาสติก

นำลูปเขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Medium (CFMM) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่ไม่ได้เติมพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรตลงไป จากนั้นปิเปตต์อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวข้างต้นมา 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร จะได้ค่าการเจือจางที่ 10^{-1} จากนั้นทำการเจือจางซ้ำไปเรื่อย ๆ จนเจือจางถึงค่า 10^{-3} จากนั้นนำค่าการเจือจางทั้งหมด ได้แก่ 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM นำไปบ่มเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 5 วัน จึงนำมานับจำนวนโคโลนี โดยจำนวนโคโลนีที่ได้จะนำมาคำนวณปริมาณเชื้อเริ่มต้น (วันที่ 0) โดยรายงานผลเป็น CFU/ml ซึ่งเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM 3 มิลลิลิตรที่กล่าวไปในช่วงแรกไปบ่มต่อเพื่อคำนวณหาปริมาณเชื้อหลังจากบ่มเป็นเวลา 7 วัน โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เพื่อดูปริมาณเชื้อที่เพิ่มขึ้น เมื่อบ่มครบ 7 วัน ปิเปตต์อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวข้างต้นมา 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM

ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร จะได้ค่าการเจือจางที่ 10^{-1} จากนั้นทำการเจือจางซ้ำ จนเจือจางถึงค่า 10^{-7} และนำค่าการเจือจางที่ 10^{-6} และ 10^{-7} มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM นำไปบ่มเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 5 วัน จึงนำมานับจำนวนโคโลนี

3.3 การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน

นำลูปเขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Medium (CFMM) ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตต์อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวข้างต้นมา 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร จะได้ค่าการเจือจางที่ 10^{-1} จากนั้นทำการเจือจางซ้ำไปเรื่อย ๆ จนเจือจางถึงค่า 10^{-3} จากนั้นนำค่าการเจือจางทั้งหมด ได้แก่ 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน นำไปบ่มเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 5 วัน จึงนำมานับจำนวนโคโลนี โดยจำนวนโคโลนีที่ได้จะนำมาคำนวณปริมาณเชื้อเริ่มต้น (วันที่ 0) โดยรายงานผลเป็น CFU/ml ซึ่งเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM 3 มิลลิลิตรที่กล่าวไปในช่วงแรกจะนำไปบ่มต่อเพื่อคำนวณหาปริมาณเชื้อหลังจากบ่มเป็นเวลา 7 วัน โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เพื่อดูปริมาณเชื้อที่เพิ่มขึ้น เมื่อบ่มครบ 7 วัน ปิเปตต์อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวข้างต้นมา 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร จะได้ค่าการเจือจางที่ 10^{-1} จากนั้นทำการเจือจางซ้ำไปเรื่อย ๆ จนเจือจางถึงค่า 10^{-7} จากนั้นนำค่าการเจือจางที่ 10^{-6} และ 10^{-7} มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน นำไปบ่มเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 5 วัน จึงนำมานับจำนวนโคโลนี

4. ตรวจดูลักษณะของพลาสติกที่บ่มร่วมกับแบคทีเรียโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

นำเชื้อจากข้อ 3.3 ที่ผ่านการบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน แบ่งตัวอย่างทั้งหมดเป็น 3 ตัวอย่าง หลอดที่ 1 แบ่งเป็น 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างพลาสติก และ ตัวอย่างเชื้อที่บ่มร่วมกับพลาสติก และ หลอดที่ 2 มี 1 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างเชื้อที่ไม่ได้บ่มร่วมกับพลาสติก รวมทั้งหมดเป็น 3 ตัวอย่าง และ มีชุดควบคุมคือพลาสติก ซึ่งเตรียมโดยนำพลาสติก 0.1 กรัม ที่อยู่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เท่านั้น โดยไม่ได้เลี้ยงเชื้อในหลอด ตัวอย่างทั้งหมดถูกนำไปเตรียมและตรวจสอบตามวิธีการด้านล่าง ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (Scienctific and Technological Reserch Equipment Center) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซอยจุฬา 62 อาคารสถาบัน 2-3 ถนน พญาไท แขวง ปทุมวัน เขต ปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

5. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง SEM

5.1 ตัวอย่างพลาสติก

ตัวอย่างพลาสติกเตรียมโดยนำไปแช่ในน้ำยา 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 ข้ามคืนในตู้เย็นล้างน้ำยาออกด้วย phosphate buffer 2 ครั้ง แล้วตามด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้น dehydrate ด้วย ethanol ปริมาณท่วมตัวอย่าง ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 30%, 50%, 70%, 95% และ 100% ขั้นตอนละ 10 นาที โดยที่ 100% ให้ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำไปทำแห้ง ณ จุดวิกฤตด้วยเครื่อง critical point dryer (Leica model EM CPD300, Austria) และติดตัวอย่างลงบนแท่นวาง (stub) ด้วยเทปกาวสองหน้า จากนั้นนำไปฉาบทอง (sputter coater, Balzers model SCD 040, Germany) จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้อง SEM รุ่น JSM-IT500HR (JEOL) โดยใช้ กำลังขยาย 1,000 เท่า, 5,000 เท่า และ 10,000 เท่า และใช้ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

5.2 การเตรียมตัวอย่างจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้กระดาษกรอง

กรองตัวอย่างด้วยเมมเบรนชนิด polycarbonate เลือกขนาดของรูบนเมมเบรนให้เหมาะสมกับขนาดของตัวอย่าง จากนั้นแช่ตัวอย่างที่อยู่บนกระดากรองในน้ำยา 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงล้างน้ำยาออกด้วย phosphate buffer 2 ครั้ง แล้วตามด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที dehydrate ด้วย ethanol ปริมาณท่วมตัวอย่าง ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 30%, 50%, 70%, 95% และ 100% ขั้นตอนละ 10 นาที โดยที่ 100% ให้ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำไปทำแห้ง ณ จุดวิกฤตด้วยเครื่อง critical point dryer (Leica model EM CPD300, Austria) และติดตัวอย่างลงบนแท่นวาง (stub) ด้วยเทปกาวสองหน้า นำไปฉาบทอง (sputter coater, Balzers model SCD 040, Germany) จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้อง SEM รุ่น JSM-IT500HR (JEOL) โดยใช้ กำลังขยาย 1,000 เท่า, 5,000 เท่า และ 10,000 เท่า และใช้ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

บทที่ 4
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายพลาสติก

จากผลการทดลองการคัดแยกแบคทีเรียจากดินที่อยู่บริเวณรอบพลาสติกที่ผ่านการฝังเป็นเวลา 6 เดือนที่จังหวัดสมุทรสาคร พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียได้ 8 ไอโซเลท โดยมีรหัสดังต่อไปนี้ S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 และ S8 เมื่อนำมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA แล้วพบว่ามีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในฐานข้อมูล GenBank ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลของการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล

รหัส	แบคทีเรีย	Percent identity	Acession
S1	*Gordonia* sp. 61	93.13%	AB638859.1
S2	*Ensifer adhaerens* strain JS1020 Soil 9_F3Ptero	99.90%	KX507144.1
S3	*Pseudogulbenkiania* sp. NS25	100%	KU175411.1
S4	*Pseudogulbenkiania* sp. NS25	99.93%	KU175411.1
S5	*Bacillus subtilis* strain EC2	100%	MK894127.1
S6	*Pseudogulbenkiania* sp. NS25	99.36%	KU175411.1
S7	*Nocardioides panaciterrae*	99.75%	AB257719.1
S8	*Ochrobactrum* sp. JS-4	99.27%	DQ884346.1

เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล โดยผลของการเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแบคทีเรียรหัส S1 มีผลของเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงที่ต่ำกว่าตัวอย่างแบคทีเรียรหัสอื่น ๆ เนื่องมาจากผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงของ 27F มีความยาวสั้นกว่าปกติและคุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่สูงจึงทำให้ประสิทธิภาพของการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เปอร์เซ็นต์ต่ำกว่าที่ควร

4.2 การเจริญของแบคทีเรียเมื่อบ่มร่วมกับพลาสติกและไม่ได้บ่มร่วมกับพลาสติก และการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน

จากการทดลองการเจริญของแบคทีเรียในสภาวะทั้งหมด 3 สภาวะ ได้แก่ การเจริญของแบคทีเรียเมื่อบ่มแบคทีเรียร่วมกับพลาสติก การเจริญของแบคทีเรียเมื่อไม่ได้บ่มแบคทีเรียร่วมกับพลาสติก และ การเจริญของแบคทีเรียเมื่อปราศจากแหล่งไนโตรเจน โดยการทดลองแรก คือ การเจริญของแบคทีเรียเมื่อบ่มแบคทีเรียร่วมกับพลาสติก พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญเพิ่มขึ้นหลังบ่มไป 7 วัน โดยในตัวอย่างแบคทีเรียรหัส S3 พบว่ามีการเพิ่มจำนวนจาก 2.75×10^{6} CFU/ml เป็น 7.53×10^{6} CFU/ml ตัวอย่างแบคทีเรียรหัส S4 พบว่าหลังบ่มไป 7 วัน พบว่ามีแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 2.76×10^{6} CFU/ml เป็น 4.10×10^{8} CFU/ml และในตัวอย่างแบคทีเรียรหัส S7 พบว่ามีแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 2.72×10^{6} CFU/ml เป็น 1.51×10^{9} CFU/ml ส่วนในการทดลองการเจริญของแบคทีเรียเมื่อไม่ได้บ่มแบคทีเรียร่วมกับพลาสติก พบว่าแบคทีเรียรหัส S3, S4 และ S7 สามารถเจริญได้ เช่นกัน โดยหลังบ่มเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าแบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนได้ โดยแบคทีเรียรหัส S3 เพิ่มจำนวนจาก 2.97×10^{6} CFU/ml เป็น 3.77×10^{8} CFU/ml ในตัวอย่างแบคทีเรียรหัส S4 มีแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 2.81×10^{6} CFU/ml และในตัวอย่างแบคทีเรียรหัส S7 มีแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 1.74×10^{6} CFU/ml ซึ่งหลังจากบ่มเป็นเวลา 7 วัน พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 รหัสมีจำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นมากกว่า 300 โคโลนี ทำให้ไม่สามารถคำนวณปริมาณแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นได้ และการทดลองสุดท้ายคือ การเจริญของแบคทีเรียเมื่อปราศจากแหล่งไนโตรเจน ทั้งในตัวอย่าง S3 และ S4 หลังบ่ม 7 วัน พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญเพิ่มมากขึ้น โดยในตัวอย่างแบคทีเรียรหัส S3 พบว่าแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 2.84×10^{6} CFU/ml เป็น 1.63×10^{8} CFU/ml และในตัวอย่างแบคทีเรียรหัส S4 พบว่าแบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนจาก 2.59×10^{6} CFU/ml เป็น 1.39×10^{9} CFU/ml แต่จากการทดลองจะพบว่าแบคทีเรียที่นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจนพบว่าแบคทีเรียจะใช้เวลาในการเจริญนานกว่าแบคทีเรียรหัสเดียวกันที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ

4.2.1 การเจริญของแบคทีเรียเมื่อบ่มร่วมกับพลาสติก

ตารางที่ 5 ตารางแสดงการเจริญของแบคทีเรียเมื่อบ่มร่วมกับพลาสติก

	วันที่ 0			ปริมาณเชื้อ (CFU/ml)	วันที่ 7		ปริมาณเชื้อ (CFU/ml)
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		10^{-6}	10^{-7}	
ตัวอย่าง S3	>300	>300	298	2.75×10^{6}	82	11	7.53×10^{8}
	>300	>300	>300		65	15	
	>300	>300	253		79	16	
ตัวอย่าง S4	>300	>300	283	2.76×10^{6}	43	11	4.10×10^{8}
	>300	>300	279		32	12	
	>300	>300	267		48	6	
ตัวอย่าง S7	>300	>300	269	2.72×10^{6}	141	10	1.51×10^{9}
	>300	>300	265		147	25	
	>300	>300	282		166	21	

4.2.2 การเจริญของแบคทีเรียเมื่อไม่ได้บ่มร่วมกับพลาสติก

ตารางที่ 6 ตารางแสดงการเจริญของแบคทีเรียเมื่อไม่ได้บ่มร่วมกับพลาสติก

	วันที่ 0			ปริมาณเชื้อ (CFU/ml)	วันที่ 7		ปริมาณเชื้อ (CFU/ml)
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		10^{-6}	10^{-7}	
ตัวอย่าง S3	>300	>300	295	2.97×10^{6}	36	-	3.77×10^{8}
	>300	>300	>300		32	2	
	>300	>300	298		45	-	
ตัวอย่าง S4	>300	>300	>300	2.81×10^{6}	>300	>300	-
	>300	>300	287		>300	>300	
	>300	>300	276		>300	>300	
ตัวอย่าง S7	>300	>300	125	1.74×10^{6}	>300	>300	-
	>300	>300	252		>300	>300	
	>300	>300	146		>300	>300	

4.2.3 การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน

ตารางที่ 7 ตารางแสดงการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน

	วันที่ 0			ปริมาณเชื้อ (CFU/ml)	วันที่ 7		ปริมาณเชื้อ (CFU/ml)
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		10^{-6}	10^{-7}	
ตัวอย่าง S3	>300	>300	290	2.84×10^{6}	175	70	1.63×10^{9}
	>300	>300	285		158	50	
	>300	>300	278		155	58	
ตัวอย่าง S4	>300	>300	275	2.59×10^{6}	144	48	1.39×10^{9}
	>300	>300	253		141	29	
	>300	>300	251		132	47	

4.3 การตรวจดูลักษณะของพลาสติกที่บ่มร่วมกับแบคทีเรียโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

จากตารางการเปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับพลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียรหัส S3, S4 และ S7 มีแนวโน้มที่จะสามารถย่อยพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรตได้ เนื่องจากภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) ของพลาสติกที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัสดังกล่าวมีความแตกต่างจากภาพของพลาสติกชุดควบคุมอย่างชัดเจน โดยจะเห็นว่าลักษณะของผิวหน้าพลาสติกมีรอยฉีกขาดเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ผิวหน้าพลาสติกมีลักษณะเรียบ จากงานวิจัยก่อนหน้าที่พบว่าแบคทีเรีย *Ideonella sakaiensis* 201-F6 สามารถผลิตเอนไซม์ PETase มาย่อยพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรตได้ โดยจะเห็นลักษณะของพลาสติกเปลี่ยนแปลงไปโดยจะเห็นเป็นรูพรุนที่ผิวพลาสติกเมื่อนำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) (Yoshida. et al 2016) ดั้งนั้นจึงอาจคาดการณ์ได้ว่าแบคทีเรียรหัส S3, S4 และ S7 อาจจะมีความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรตได้

การตรวจสอบพลาสติกที่บ่มร่วมกับแบคทีเรียรหัส S3 ครั้งที่ 1 พบว่า พลาสติกมีลักษณะแตกต่างไปจากชุดควบคุม จึงนำพลาสติกไปตรวจสอบเป็นครั้งที่ 2 พบว่า พบว่าพลาสติกไม่แตกต่างจากชุดควบคุม โดยจะเห็นผิวหน้าพลาสติกมีลักษณะเรียบ จึงนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) เป็นครั้งที่ 3 พบว่าพื้นผิวพลาสติกมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปโดยจะเห็นเป็นรอย ซึ่งแตกต่างจากพลาสติกชุดควบคุมอย่างชัดเจน

ส่วนพลาสติกที่บ่มร่วมกับแบคทีเรียรหัส S4 และ S7 ในการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) ครั้งที่ 1 พบว่าพลาสติกไม่แตกต่างจากชุดควบคุม จึงนำมาตรวจสอบเป็นครั้งที่ 2 พบว่าพื้นผิวพลาสติกมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปโดยจะเห็นเป็นรอย ซึ่งแตกต่างจากพลาสติกชุดควบคุมอย่างชัดเจน

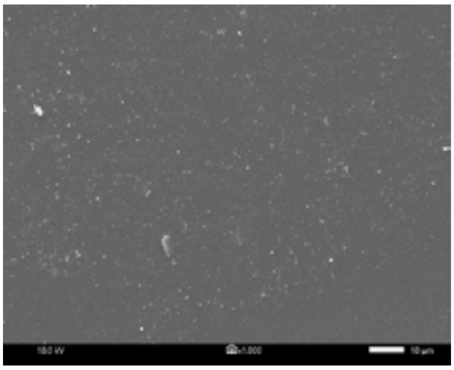
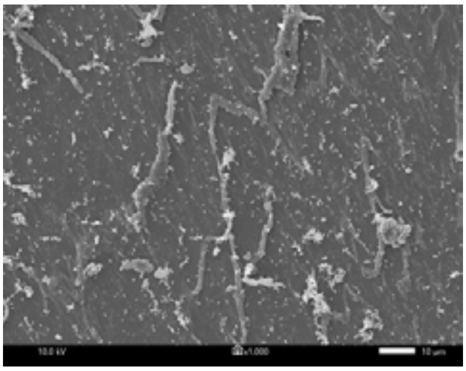
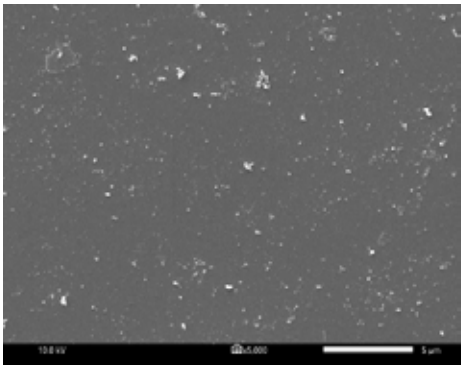
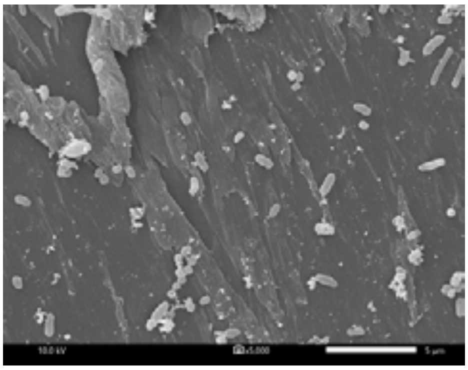
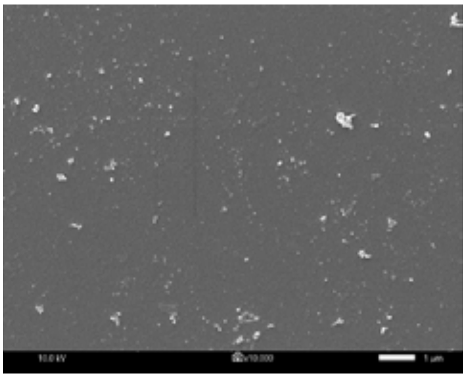
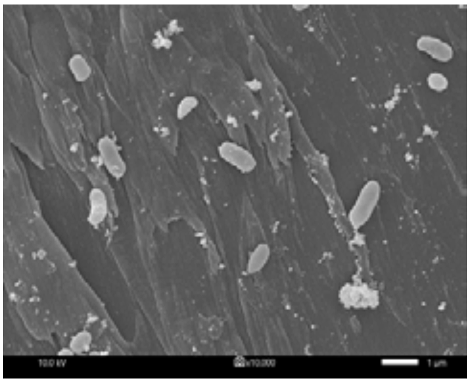
ดังนั้นจึงอาจคาดการณ์ได้ว่าแบคทีเรียรหัส S3, S4 และ S7 อาจจะมีความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรตได้

จากการที่นำพลาสติกมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) และพบว่าพลาสติกไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ซึ่งอาจเนื่องมาจากหลายสาเหตุ เช่น 1) ปริมาณแบคทีเรียตั้งต้นที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณน้อยเกินไป ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายพลาสติกไม่ดีเท่าที่ควร หรืออาจไม่เกิดการย่อยพลาสติก ทำให้พลาสติกในชุดทดลองไม่แตกต่างจากชุดควบคุม 2) อายุของแบคทีเรียอาจมีผลต่อการย่อยสลายพลาสติกเนื่องจากแบคทีเรียที่เก็บไว้มีอายุมากเกินจึงทำให้ความสามารถในการเจริญลดลง ดังนั้นจึงควรนำแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ก่อนเพื่อกระตุ้นให้แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตที่ดี แล้วจึงนำไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกโดยการนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

ส่วนตัวอย่างอื่น ๆ ได้แก่ รหัส S1, S2, S4, S5, S6 และ S8 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติกนั้นพบว่าผลการทดลองไม่แตกต่างจากพลาสติกชุดควบคุมเช่นกัน จึงอาจสรุปได้ว่าเชื้อดังกล่าวไม่สามารถย่อยสลายพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรต แต่เนื่องจาก ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) ของตัวอย่างอื่น ๆ ยังไม่ชัดเจน และปริมาณของแบคทีเรียที่ไม่มากพอ หรืออายุของแบคทีเรียที่มากไปอาจทำการทดลองอีกครั้งเพื่อยืนยันและตรวจสอบผลการทดลอง และผลจากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) ของแบคทีเรียที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติกและไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติกพบว่าแบคทีเรียรหัสเดียวกันมีลักษณะไม่ต่างกัน

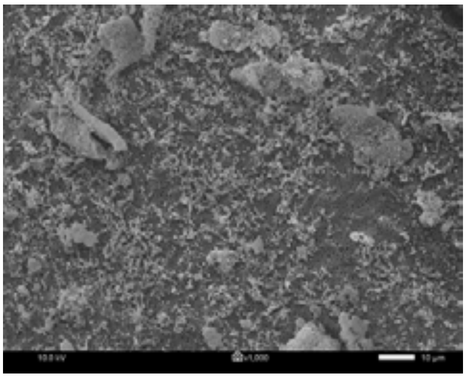
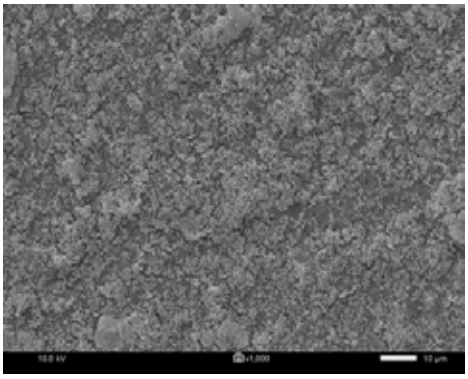
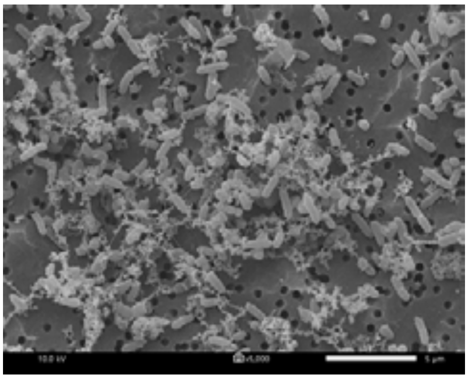
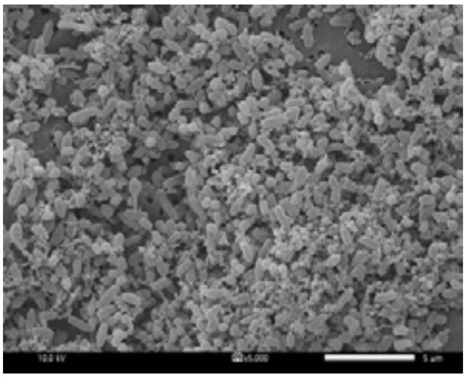
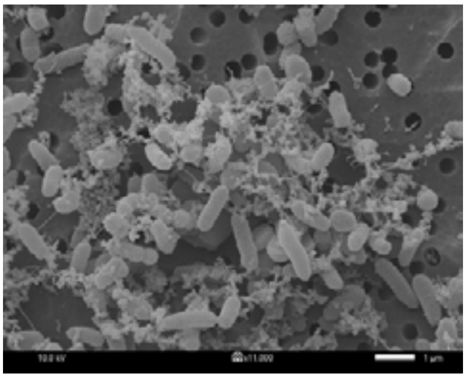
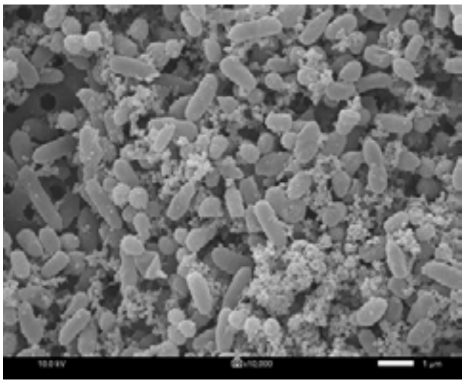
จากการนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาศึกษาความสามารถในการย่อยสลายพลาสติก โดยนำพลาสติกบ่มร่วมกับแบคทีเรีย จากนั้นนำมาพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของพลาสติกเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งผลการทดลองแสดงดังตาราง 8-21

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับพลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S3 (ครั้งที่ 1)

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	พลาสติกชุดควบคุม	พลาสติกที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S3
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า (1 µm)		

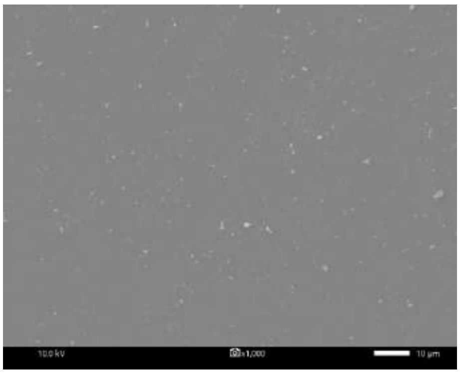
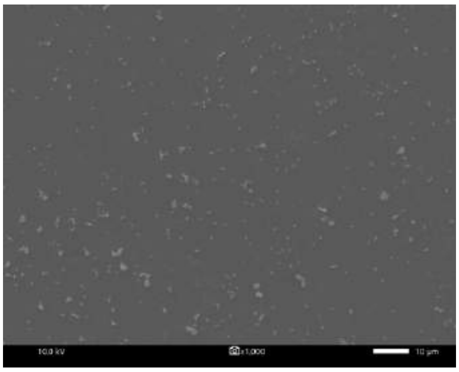
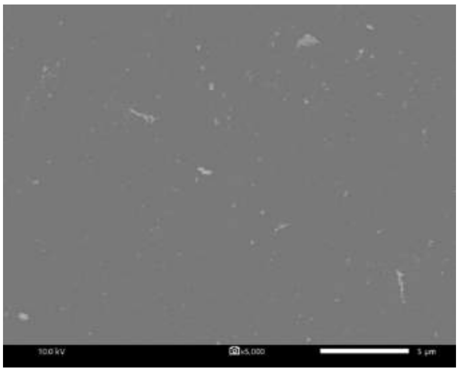
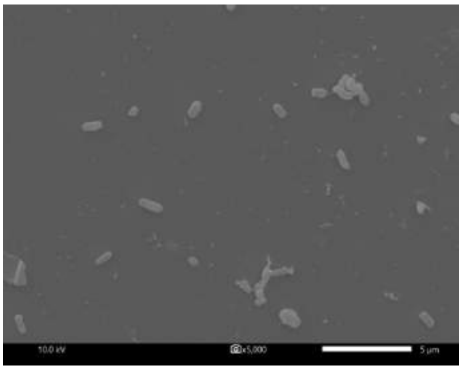
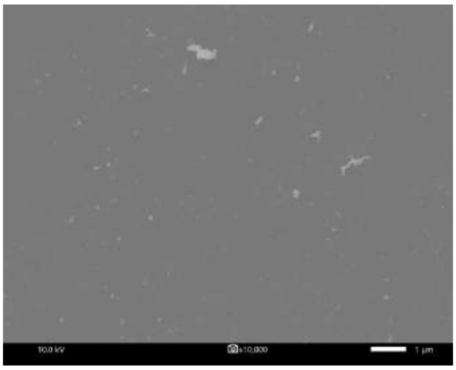
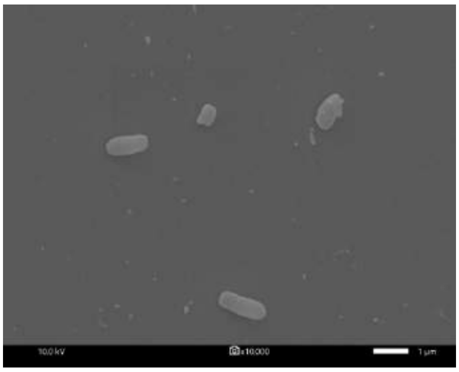
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S3 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S3 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก (ครั้งที่ 1)

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	แบคทีเรียรหัส S3 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติก	แบคทีเรียรหัส S3 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า (1 µm)		

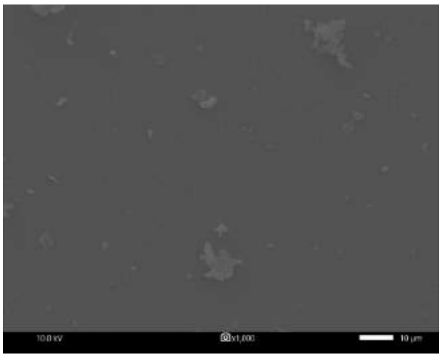
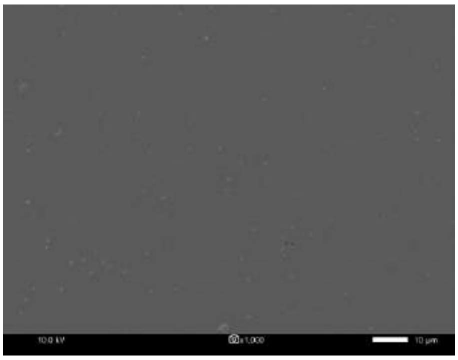
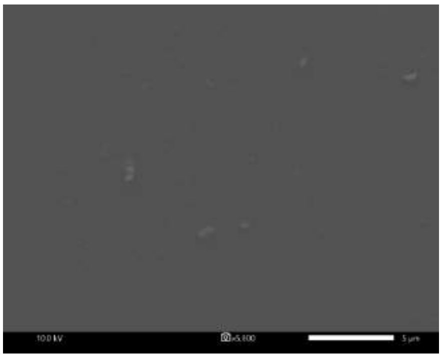
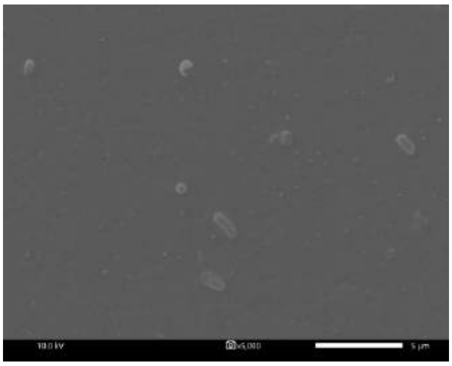
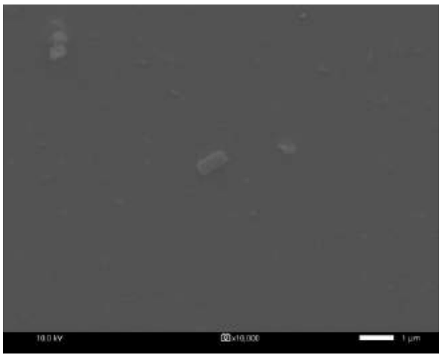
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับพลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย รหัส S3 (ครั้งที่ 2)

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	พลาสติกชุดควบคุม	พลาสติกที่เลี้ยงร่วมกับ แบคทีเรียรหัส S3
1,000 เท่า (10 μm)		
5,000 เท่า (5 μm)		
10,000 เท่า (1 μm)		

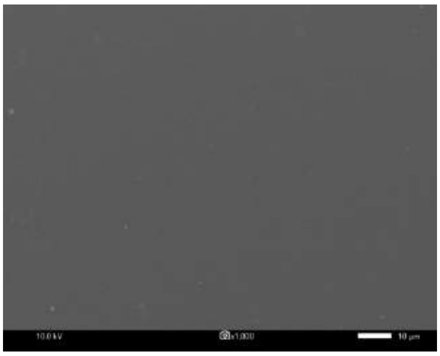
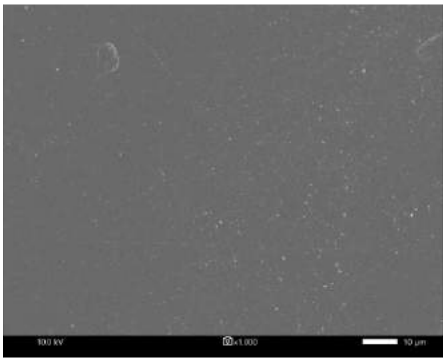
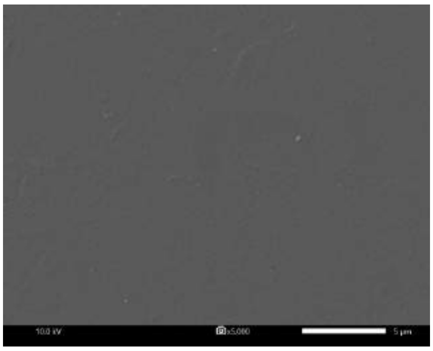
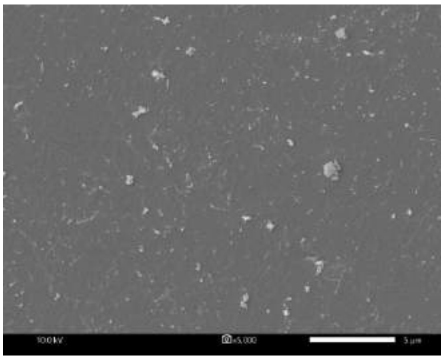
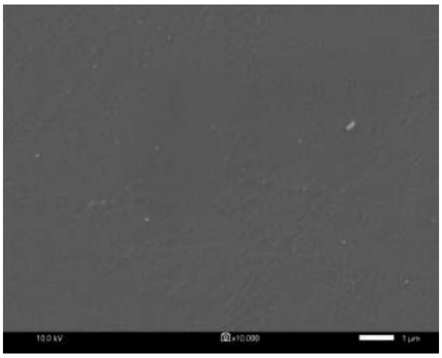
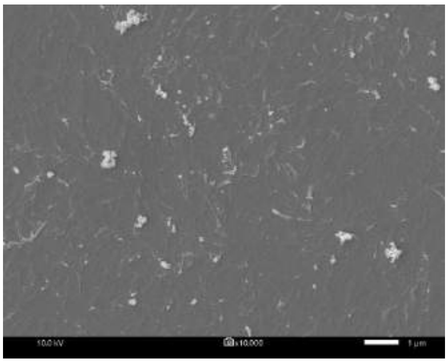
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S3 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S3 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก (ครั้งที่ 2)

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	แบคทีเรียรหัส S3 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติก	แบคทีเรียรหัส S3 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า (1 µm)		

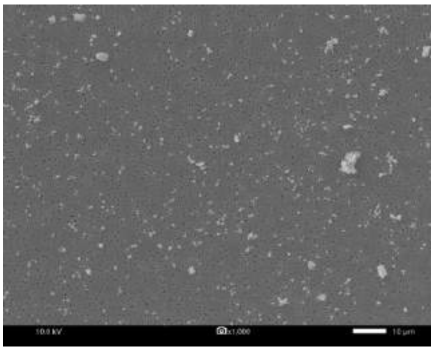
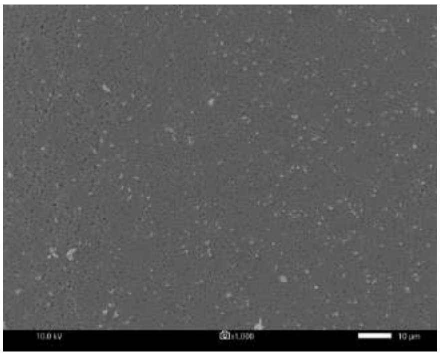
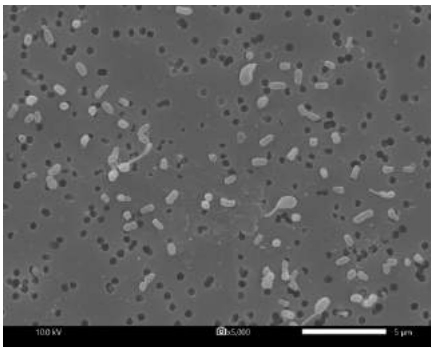
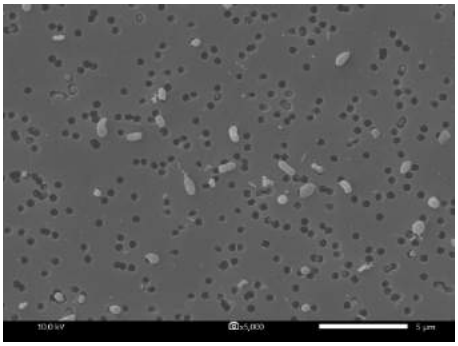
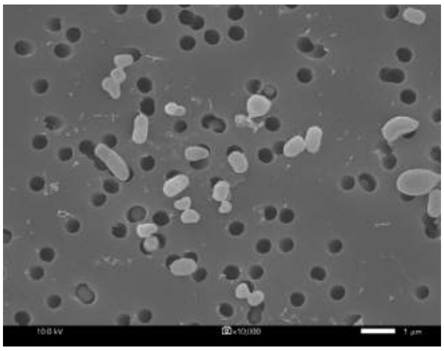
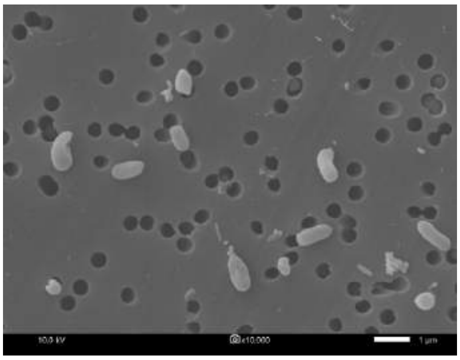
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับพลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S3 (ครั้งที่ 3)

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	พลาสติกชุดควบคุม	พลาสติกที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S3
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า (1 µm)		

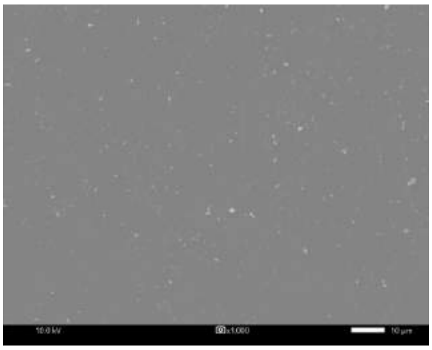
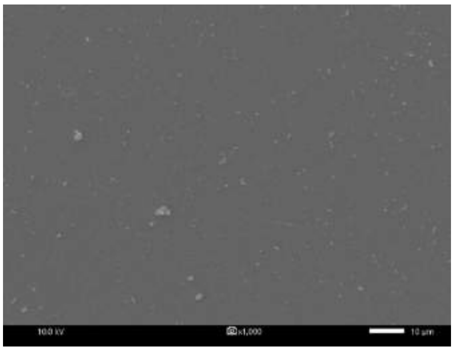
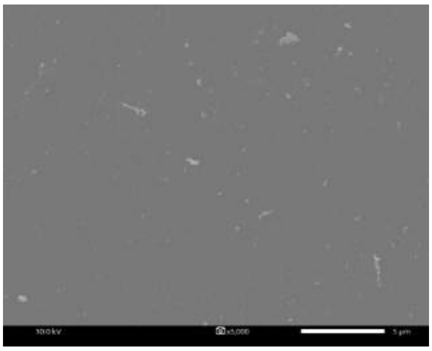
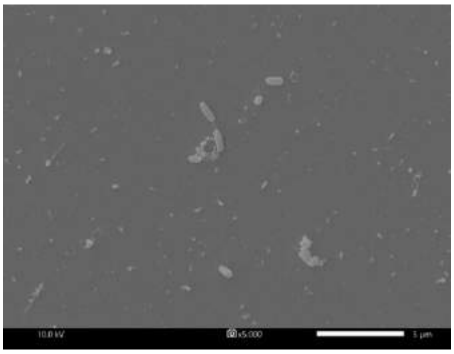
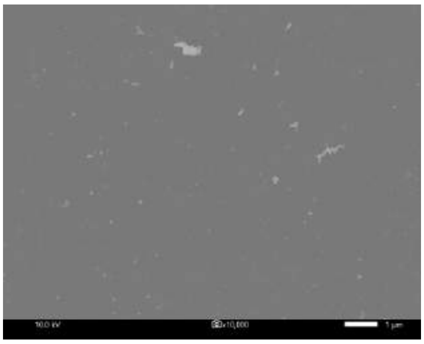
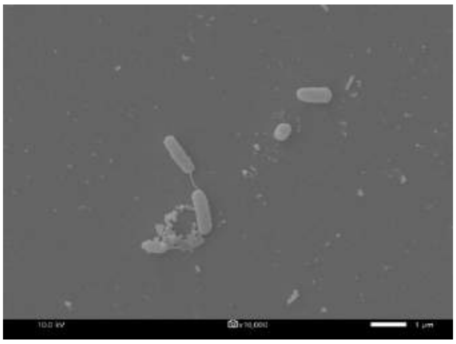
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S3 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S3 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก (ครั้งที่ 3)

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	แบคทีเรียรหัส S3 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติก	แบคทีเรียรหัส S3 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า (1 µm)		

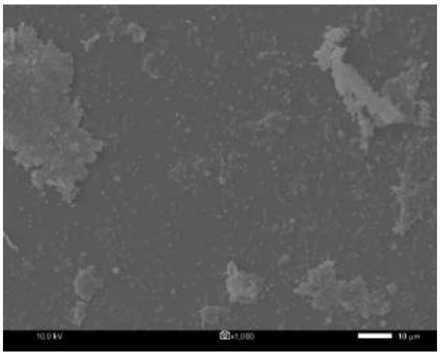
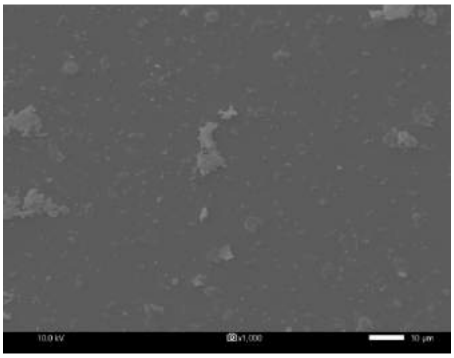
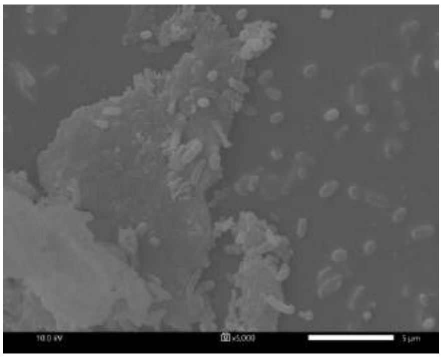
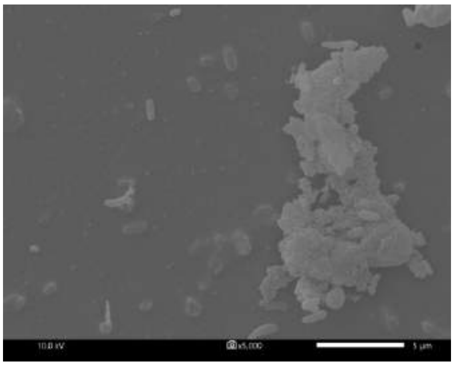
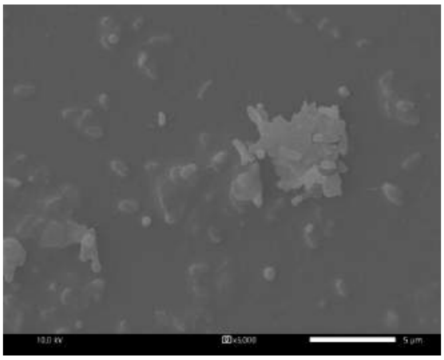
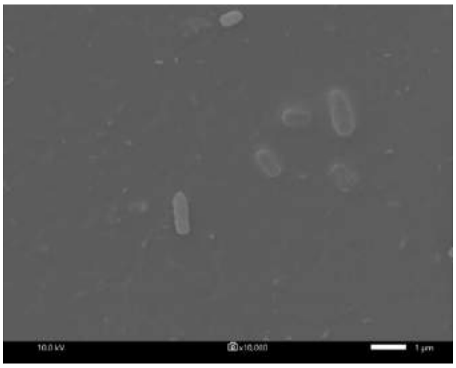
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับพลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S4 (ครั้งที่ 1)

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	พลาสติกชุดควบคุม	พลาสติกที่เลี้ยงร่วมกับ แบคทีเรียรหัส S4
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า (1 µm)		

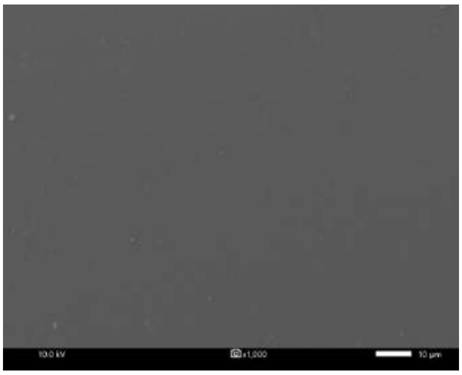
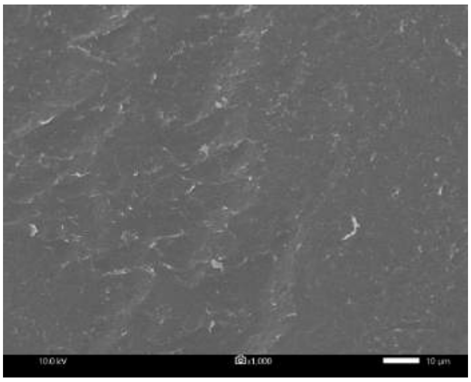
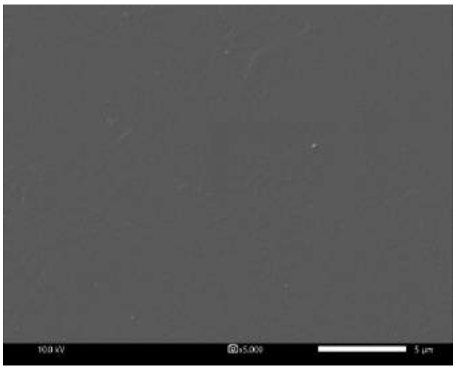
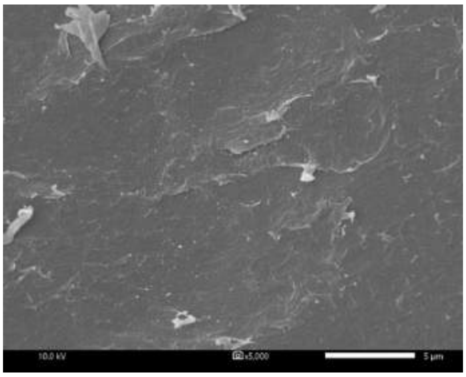
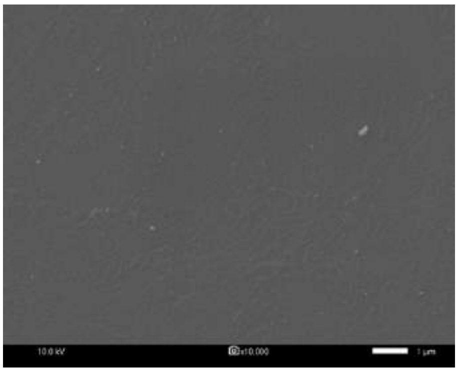
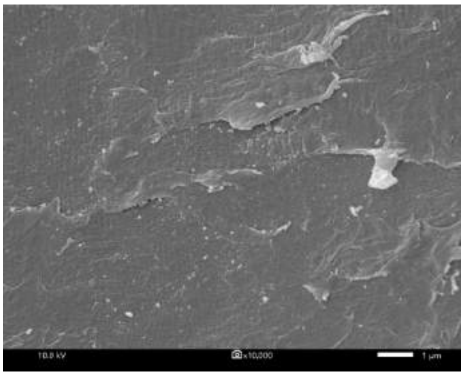
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S4 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S4 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก (ครั้งที่ 1)

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	แบคทีเรียรหัส S4 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติก	แบคทีเรียรหัส S4 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า (1 µm)		

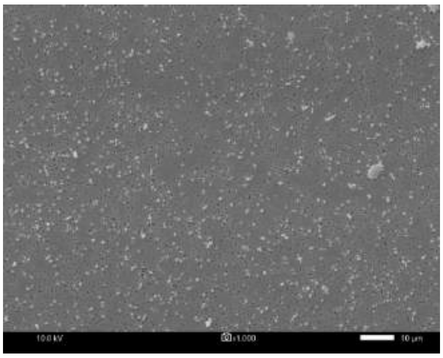
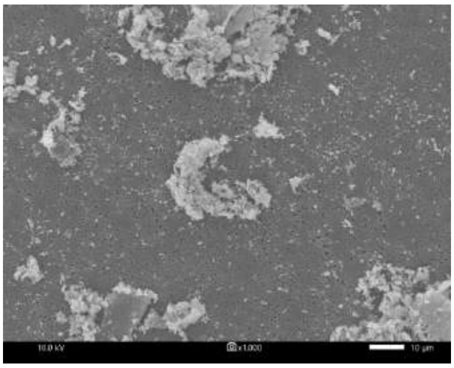
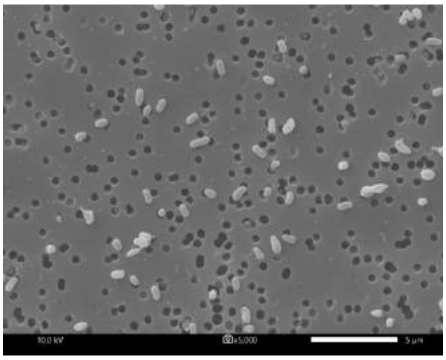
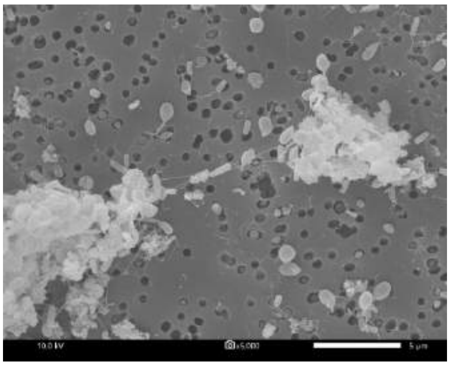
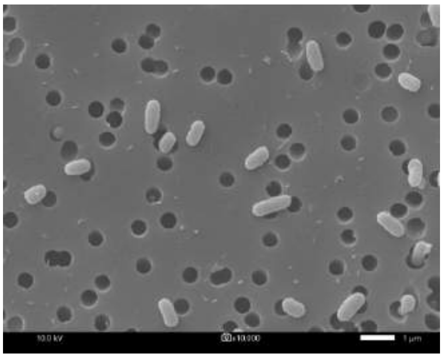
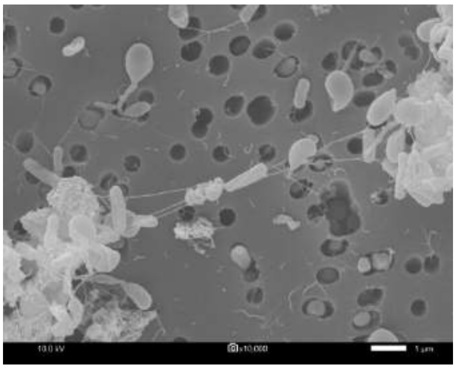
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับพลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S4 (ครั้งที่ 2)

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	พลาสติกชุดควบคุม	พลาสติกที่เลี้ยงร่วมกับ แบคทีเรียรหัส S4
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า (1 µm)		

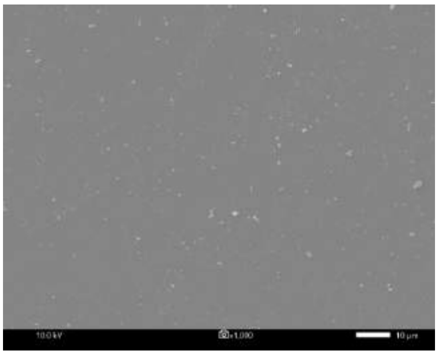
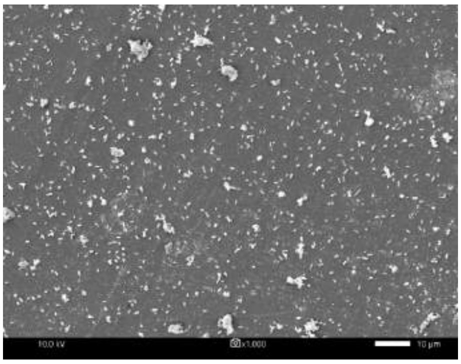
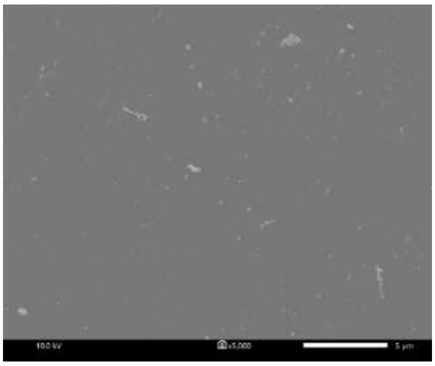
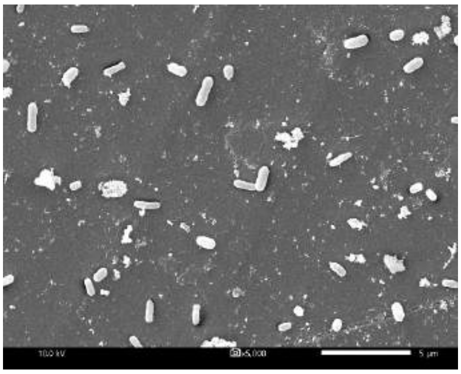
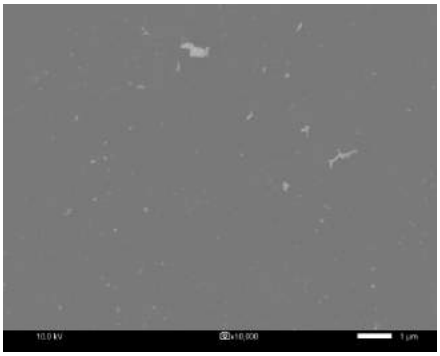
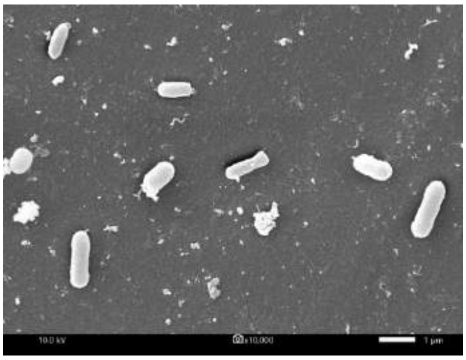
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S4 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S4 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก (ครั้งที่ 2)

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	แบคทีเรียรหัส S4 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติก	แบคทีเรียรหัส S4 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า (1 µm)		

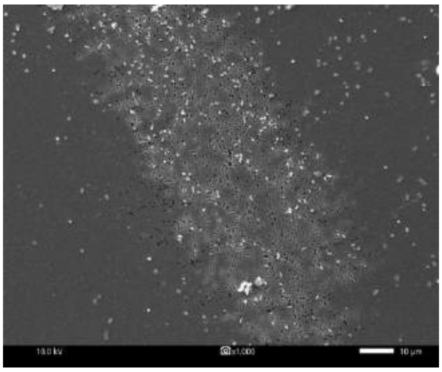
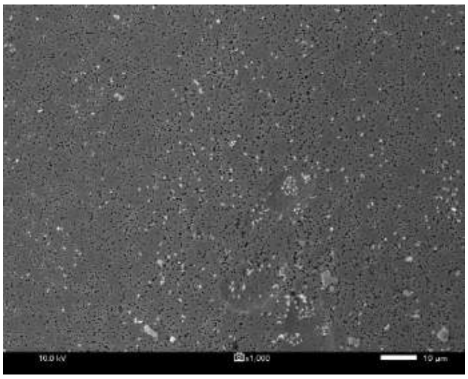
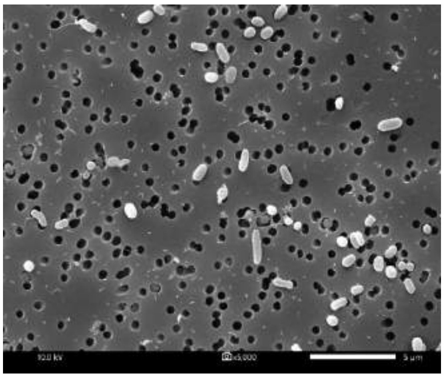
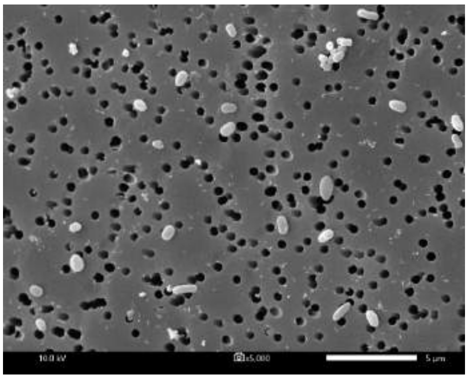
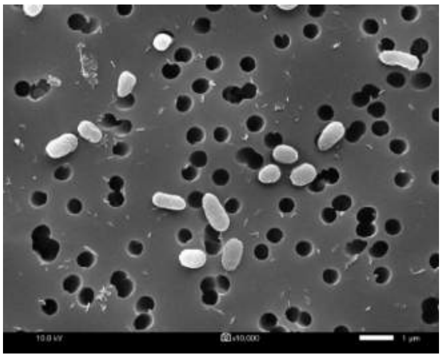
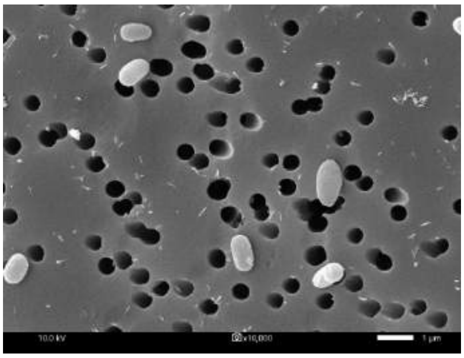
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 18 เปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับพลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S7 (ครั้งที่ 1)

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	พลาสติกชุดควบคุม	พลาสติกที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S7
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า (1 µm)		

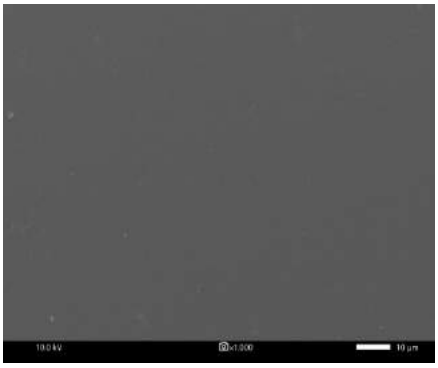
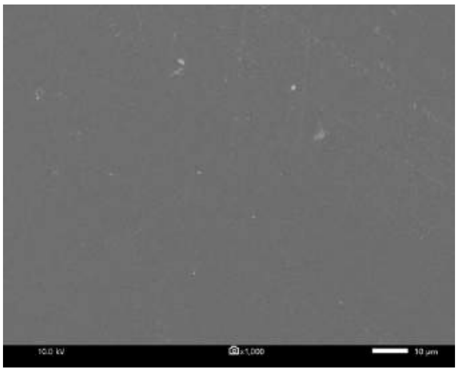
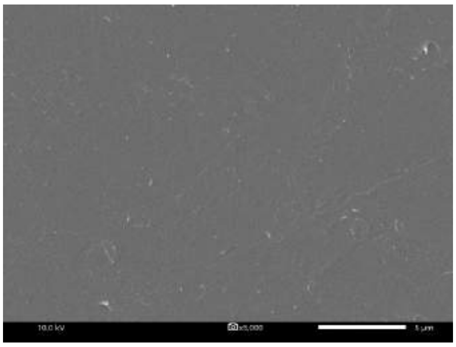
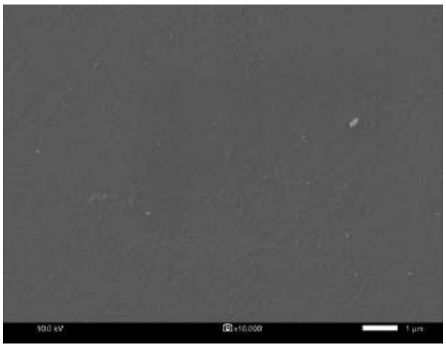
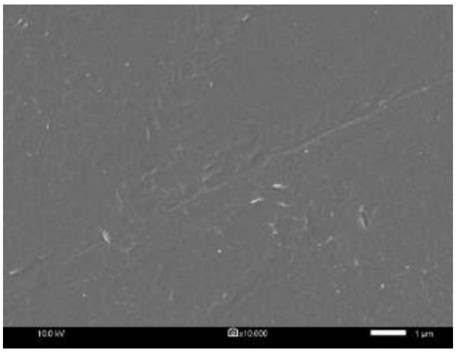
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 19 เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S7 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S7 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก (ครั้งที่ 1)

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	แบคทีเรียรหัส S7 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติก	แบคทีเรียรหัส S7 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า (1 µm)		

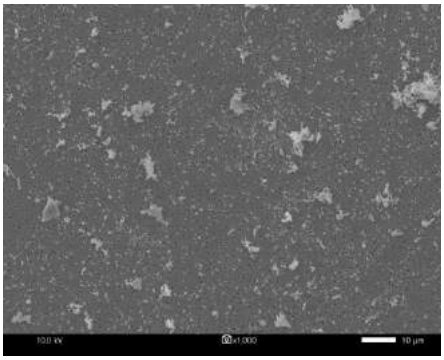
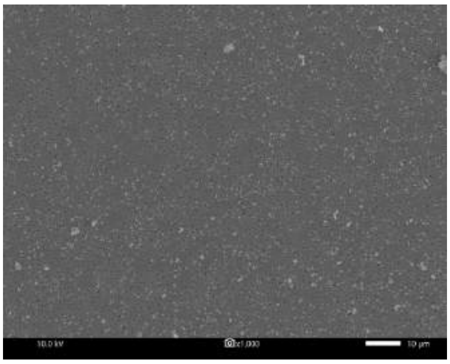
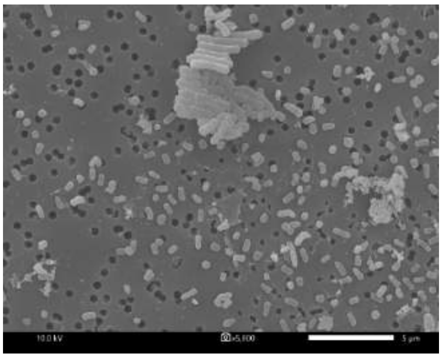
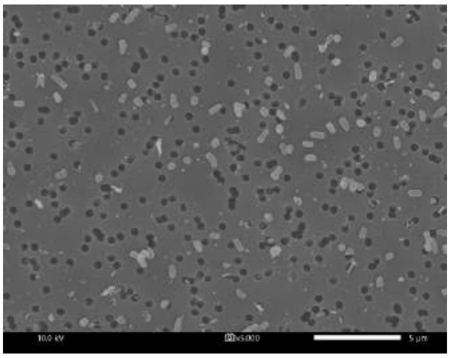
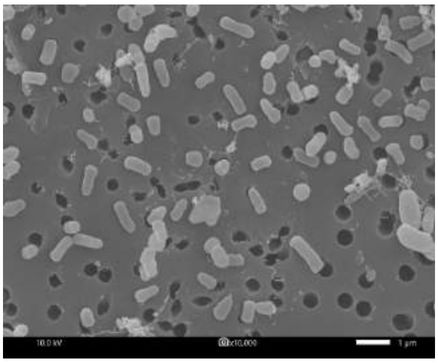
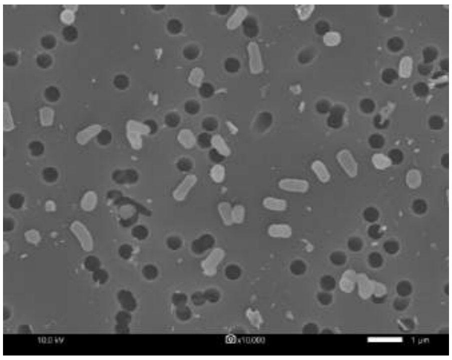
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 20 เปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับพลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S7 (ครั้งที่ 2)

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	พลาสติกชุดควบคุม	พลาสติกที่เลี้ยงร่วมกับ แบคทีเรียรหัส S7
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า (1 µm)		

<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 21 เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S7 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S7 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก (ครั้งที่ 2)

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	แบคทีเรียรหัส S7 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติก	แบคทีเรียรหัส S7 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก
1,000 เท่า (10 μm)		
5,000 เท่า (5 μm)		
10,000 เท่า (1 μm)		

<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ข้อเสนอแนะ

1. อาจนำแบคทีเรียไปทดสอบการย่อยสลายพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรตเพิ่มเติม โดยการนำไปทดสอบด้วย High performance liquid chromatography ร่วมกับการนำพลาสติกมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)
2. อาจนำตัวอย่างดินจากหลาย ๆ แหล่งมาทดสอบหาแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพลาสติกได้เพิ่มเติม

เอกสารอ้างอิง

งานวิจัย วารสาร และหนังสืออิเล็กทรอนิกส์

Austin, H. P., Allen, M. D., Donohoe, B. S., Rorrer, N. A., Kearns, F. L., Silveira, R. L. & Mykhaylyk, V. (2018). Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(19), E4350-E4357.

Gewert, B., Plassmann, M. M. & MacLeod, M. (2015). Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17(9), 1513-1521.

Jog, J. P. (1995). Crystallization of polyethylene terephthalate. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, 35(3), 531-553.

Joutey, N. T., Bahafid, W., Sayel, H., & El Ghachtouli, N. (2013). Biodegradation: involved microorganisms and genetically engineered microorganisms. In *Biodegradation-life of science*. InTechOpen.

Nimchua, T., Punnapayak, H., & Zimmermann, W. (2007). Comparison of the hydrolysis of polyethylene terephthalate fibers by a hydrolase from *Fusarium oxysporum* LCH I and *Fusarium solani* f. sp. pisi. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 2(3), 361-364.

Pavani, P. & Rajeswari, R. (2014). Impact of plastics on environmental pollution. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences, Special*, 3, 2087-93.

Thompson, R. C., Moore, C. J., Vom Saal, F. S. & Swan, S. H. (2009). Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2153-2166.

Tokiwa, Y., Calabia, B., Ugwu, C., & Aiba, S. (2009). Biodegradability of plastics. *International journal of molecular sciences*, 10(9), 3722-3742.

Trivedi, P., Hasan, A., Akhtar, S., Siddiqui, M. H., Sayeed, U., & Khan, K. (2016). Role of microbes in degradation of synthetic plastics and manufacture of bioplastics. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(3), 211-216.

Webb, H., Arnott, J., Crawford, R., & Ivanova, E. (2013). Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly (ethylene terephthalate). *Polymers*, 5(1), 1-18.

Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y. & Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). *Science*, 351(6278), 1196-1199.

วารสารพิษวิทยาไทย. (2556). ผลกระทบของพลาสติกต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม, 28(1), 39-60. สืบค้นจาก http://www.thaitox.org/media/upload/file/Journal/2013-1/04aricle.pdf

เว็บไซต์ออนไลน์

http://www2.mtec.or.th/th/special/biodegradable_plastic/process_plas.html : สืบค้นเมื่อวันที่ 21 เมษายน 2562

https://lowimpactmovement.org/all-in-week-1/2018/10/4/understanding-the-plastic-recycling-symbols-types-of-plastics : สืบค้นเมื่อวันที่ 21 เมษายน 2562

http://dynatech.grit.cloud/?p=518 : สืบค้นเมื่อวันที่ 23 เมษายน 2562

http://www.ltas-cm3.ulg.ac.be/FractureMechanics/overview_P3.html: สืบค้นเมื่อวันที่ 23 เมษายน 2562

http://blog.nus.edu.sg/plasticworld/2016/09/06/x-methods-of-plastic-waste-disposal-and-possible-complications/ : สืบค้นเมื่อวันที่ 23 เมษายน 2562

https://omnexus.specialchem.com/selection-guide/polyethylene-terephthalate-pet-plastic : สืบค้นเมื่อวันที่ 26 เมษายน 2562

http://www.deemarkthailand.com/ : สืบค้นเมื่อวันที่ 26 เมษายน 2562

ภาคผนวก ก

1. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Free Mineral Mediium (CFMM**)**

1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon free mineral โดยมีส่วนประกอบ ดังนี้

1.1.1 สารละลายส่วนที่ 1 (ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	3.0 กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	2.2 กรัม
Sodium dihydrogen phosphate dodecahydrate ($Na_2HPO_4{\cdot}12H_2O$)	0.8 กรัม

ปรับ pH ด้วย NaOH หรือ HCl ประมาณ 7.00

นำไป Autoclave (121 องศาเซลเซียส 15 นาที)

1.1.2 สารละลายส่วนที่ 2 (ปริมาตร 1 มิลลิลิตร)

Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4{\cdot}7H_2O$)	0.1 กรัม
Iron(III) Chloride Hexahydrate ($FeCl_3{\cdot}6H_2O$)	0.05 กรัม
Calcium Chloride dihydrate ($CaCl_2{\cdot}2H_2O$)	0.05 กรัม

กรองสารละลายแต่ละชนิดผ่านตัวกรอง Cellulose acetate

1.1.3 เติมสารละลายส่วนที่ 2 ลงในส่วนที่ 1 ในอัตราส่วน 1:1,000

2.2 เตรียมตัวอย่าง Poly (ethylene terepthalate) หรือ PET

2.2.1 นำขวดพลาสติกชนิด Poly (ethylene terepthalate) มาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5 × 0.5 เซนติเมตร

2.2.2 ชั่งชิ้นพลาสติกให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม และ นำไป Autoclave

2.2.3 นำไปอบให้แห้งที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

2. ลำดับนิวคลีโอไทด์

2.1 รหัส S1

GCCCCTGACTTCGGGATAAGCCTGACAAACTGGGTCTAATACCGGATAGATCCTTCCATCGAATGA
TTGTTTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTTGGGGATGGGCCCCCTGCCTATCCGCTTGTCCGTGGGGTAA
CGGACAAGATGAGCGACCACAGGTAGACGAACAGAGAGGGCGATCTCCCACGGTAGGGCTGAGAC
GGGAACCAGACTCCTAGGGGAGGCACCTGAGGGGAGGTGCCACGAGGGGCGCGAGCGTGTTGCGG
TGAAATTCTCGAGGCCGGTGAATTCAACCACCGTAACCGGAGAAGATTTGGCGGAAAACTTTGTGC
CGGCGGGGCGGAAAAACCATAGAAAAATTACTTGCGGGGAATGTCGGACTTTCTTGGGGTATAAAG
GGGTTAAAAAAGCCCTTTTTTAAAAAGACGGGCAAGCGTTTTGTCCCGCCTTCAGTACAATTCTGCA
ACTCTATGGAGGAGGTAGGGCGTATGCCGAGGGTCTGATTACTACTTGTGTTACTGAAAGTTTGATC
ATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGAGAGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGCCCAGCTTG
CTGGGTACTCGAGTGGAGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCAAGACTTCGGGATAAGC
CTGTTAAAGTGGGTTTAATACCGGATATGACCTTACATCGCATGGTGTTTGGTGGAAAGCTTTTGCG
GTTGGGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGAGGACGGG
TAGCAGACCTGATAGGGTGATCGGCCACACCACGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTATCGGAGGC
AGCAGTGCGGAATATAACACAATGGGAGCAAGCCTGACGCAATGCAGCCGCGCGAGGGAAGAGGG
CCTTCCGGTTGTAAACTTATTTTGCCTGGGAGGAAGAGCAAGTGACGGTACTTGGAGAAGAAGCCC
CGGCCAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGC
GTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTCGAGTCGTGTGTGAAATTCTGCAACTCAATTGCAGGCGTGCA
GGCGATACGGGCAGTCTTGAGTACTGCAGGGGAGAGTGGAATTCCGGGTGTAGCGGTGAAATTCGC
AGATATTAGGAGGAACGGGCTCAATTCAGGAGTTCCGTGCAGTAGATACATCATTCAGTCCCCCTC
GGGGGGAGTGTGGCAGCAAGGCTACTCCTCAAAGGAATTGGGGGGGGCCCCCACAAGCGGCGGAG
CATGTGGAATAATTAGCTGCAAGCAGAACAACCTCACCTGGGTTCATCATGCGCCAGACCACGGTA
GAGATATTCTTTCCCTTGTGGTGGCCGCACAGCAGGTGCAGCGCGGTTGTCATCTGGTGTTGTGAG
AAGATGGGGTAAGTACTCCAACGAGGGCCACCCCCGTCGCCTATAGCCACCGGCATATGCCGGGGC
ACTGCAGGGGGATGCCGGGGTCTAATCGGAGGAAGGGGGGGGGGAGGTCACGTCTCCTCGCCCCC
TATGTGCGGGGGTTCACACATGTTACACAGGGGGGTACACAGGGGGCAGATACCCAGAGATGGAGA
GAATCCCTTCAAAACCGTTTCAGTTTGGGATGGGGTTTGCAACT

2.2 รหัส S2

GGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCATGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTC
CAACTTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGCAATCCGAACTGAGATGGCTTTTGGAGATTAGCTCGAC
CTCGCGGTCTCGCTGCCCACTGTCACCACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGCCCGTAAGGGCCA
TGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCTCGGCTTATCACCGGCAGTCCCCTTAGAGTGCCCAA
CCAAATGCTGGCAACTAAGGGCGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACA
CGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCCGATCCAGCCGAACTGAAGGAAAACATCTCTGTA
ATCCGCGATCGGGATGTCAAGGGCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTC
CACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGG
AATGTTTAATGCGTTAGCTGCGCCACCGAACAGTAAACTGCCCGACGGCTAACATTCATCGTTTACG
GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTAATG
GACCAGTGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCGAATATCTACGAATTTCACCTCTACACTCGGA
ATTCCACTCACCTCTTCCATACTCTAGACACCCAGTATCAAAGGCAGTTCCGGGGTTGAGCCCCGG
GATTTCACCCCTGACTTAAATGTCCGCCTACGTGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCGAACAACGCTAG
CCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTCCGGTTACCGTCAT
TATCTTCACCGGTGAAAGAGCTTTACAACCCTAGGGCCTTCATCACTCACGCGGCATGGCTTGTACA
AGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCATGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCAACTTCATGCAC
TCGAGTTGCAGAGTGCAATCCGAACTGAGATGGCTTTTGGAGATTAGCTCGACCTCGCGGTCTCGC
TGCCCACTGTCACCACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGCCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACG
TCATCCCCACCTTCCTCTCGGCTTATCACCGGCAGTCCCCTTAGAGTGCCCAACCAAATGCTGGCAA
CTAAGGGCGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAG
CCATGCAGCACCTGTCTCCGATCCAGCCGAACTGAAGGAAAACATCTCTGTAATCCGCGATCGGGA
TGTCAAGGGCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGG
GCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAATGTTTAATGCGTT
AGCTGCGCCACCGAACAGTAAACTGCCCGACGGCTAACATTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAG
GGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTAATGGACCAGTGAGCCGC
CTTCGCCACTGGTGTTCCTCCGAATATCTACGAATTTCACCTCTACACTCGGAATTCCACTCACCTC
TTCCATACTCTAGACACCCAGTATCAAAGGCAGTTCCGGGGTTGAGCCCCGGGATTTCACCCCTGA
CTTAAATGTCCGCCTACGTGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCGAACAACGCTAGCCCCCTTCGTATTA
CCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTCCGGTTACCGTCATTATCTTCACCGGTG
AAAGAGCTTTACAACCCTAGGGCCTTCATCACTCACGCGGCATGGC

2.3 รหัส S3

AAGTCGAACGGTAACAGGGGCTTCGGCCCGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTCGGAA
CGCACCGAGTAATGGGGGATAACGCAGCGAAAGCTGTGCTAATACCGCATACGCTCCGAGGAGGAA
AGCAGGGGATCGTAAGACCTTGCGTTATTCGAGCGGCCGACGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTA
AAGGCCCACCAAGGCTTCGATCAGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAG
CCATGCCGCGTGTCTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGGACTTTTGTCCGGGAGCAAATGCCGGT
GGCTAATATCCACTGGAGCTGAGAGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTGT
GCAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGCATTGGAGACTGCACGGCTAGAGTG
CGTCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATG
GCGAAGGCAGCCCCCTGGGATGACACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAATTAGCTGTTGGGGGTTTGAATCCTTGGTAGC
GTAGCTAACGCGTGAAATTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTGCT
CTTGACATGTCCGGAACCTCGCAGAGACGTGAGGGTGCCCGAAAGGGAGCCGGAACACAGGTGCTG
CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTC
ATTAGTTGCCATCATTTGGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG
GATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGAGCAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGTACAGA
GGGTCGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCTCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCA
ACTCGAGTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCC
GGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGGGATACCAGAAGTGGCTAGGATAACCT
TCGGGAGT

2.4 รหัส S4

ACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTCGGAACGCACCGAGTAATGGGGGATAACGCAGCGAAA
GCTGTGCTAATACCGCATACGCTCCGAGGAGGAAAGCAGGGGATCGTAAGACCTTGCGTTATTCGA
GCGGCCGACGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCACCAAGGCTTCGATCAGTAGCGGGT
CTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTCTGAAGAAGGCCTTCGGGT
TGTAAAGGACTTTTGTCCGGGAGCAAATGCCGGTGGCTAATATCCACTGGAGCTGAGAGTACCGGA
AGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGG
AATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTGTGCAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACC
TGGGAACGGCATTGGAGACTGCACGGCTAGAGTGCGTCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCA
GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGATGACACTGACGC
TCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGT
CAATTAGCTGTTGGGGGTTTGAATCCTTGGTAGCGTAGCTAACGCGTGAAATTGACCGCCTGGGGA
GTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGA
TTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTGCTCTTGACATGTCCGGAACCTCGCAGAGACGTGA
GGGTGCCCGAAAGGGAGCCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGT
TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCATTAGTTGCCATCATTTGGTTGGGCACTCTAAT
GAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGAGCA
GGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGTACAGAGGGTCGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCTCA
TAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT
CGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGG
AGTGGGGGATACCAGAAGTGGCGTAGG

2.5 รหัส S5

ACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGT
TTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCA
TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTG
TTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTA
AAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTG
GAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGC
GTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAG
GGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAA
GACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC
AACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGG
GGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA
CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG
CTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCA
GTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATG
CCGCGGTG

2.6 รหัส S6

TGAGTAATGCGTCGGAACGCACCGAGTAATGGGGGATAACGCAGCGAAAGCTGTGCTAATACCGCA
TACGCTCCGAGGAGGAAAGCAGGGGATCGTAAGACCTTGCGTTATTCGAGCGGCCGACGTCTGATT
AGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCGCCAAGGCTTCGATCAGTAGCGGGTCTGAGAGGATGACCCGC
CACACTGGGACTGATGCACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGG
GCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTCTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGGACTTTTGTC
CGGGAGCAAATGCCGGTGGCTAATATCCACTGGAGCTGAGAGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG
CGTGCGCAGGCGGTTGTGCAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGCATTGGAG
ACTGCACGGCTAGAGTGCGTCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGAT
GTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAG

2.7 รหัส S7

ATAGCCACCGGAAACGGTGATTAATACCGGATACAACCACTATCCGCATGGGTTGGTGGTGGAAAG
TTTTTCGGCACAGGATGTGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCTT
TGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGTCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGGAAGCCTGATCCAGCAACGCCGCGTGAGGG
ATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTACCGACGAAGCGCAAGTGACGGTAGGTACAGAA
GAAGGACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCGAGCGTTGTCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTTGTCGCGTCGGGAGTGAAAACACCGGGCTTAACTCGGT
GCTTGCTTCCGATACGGGCAGACTAGAGGTATGCAGGGGAGAATGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGA
AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGTTCTCTGGGCATTACCTGACGCTGAG
GAGCGAAAGTGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGTTGGGCGC
TAGGTGTGGGGCCTATTCCATGGGTTCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAG
TACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGAT
TAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAGCCCCCAGAGATGGGG
GTCTCTTTGATACTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCCATGTTGCCAGCGGGTTATGCCGGGGACTCATGGGA
GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGG
GCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATCCCGTGAGGGGGAGCGAATCCCAAA
AAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCG
C

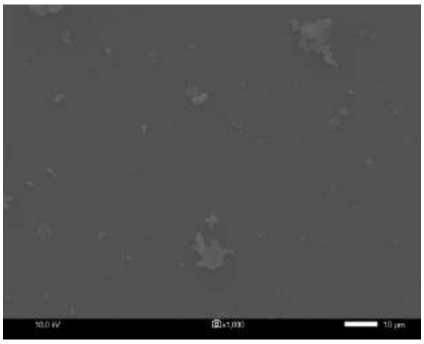
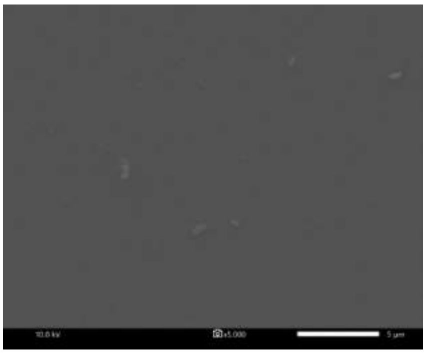
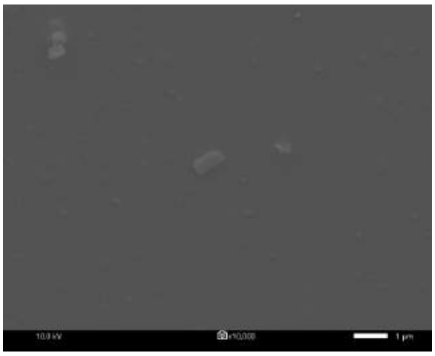
2.8 รหัส S8

GGGAACGTACCTTTTGCTACGGAATAACTCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGTGCCCTTCGGG
GGAAAGATTTATCGGCAAAGGATCGGCCCGCGTTGGATTGCTAGTTGGTGAAGTAAAGGCTCACCA
AGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCCAAAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGT
GAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAA
TAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGATTT
ACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACTTTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGG
AACTGCCTTTGATACTGGAAGTCTTGAGTATGGTAGAGGTGAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGA
AATTCGTAGATATTCGGGGTTACACACGTGTTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGCACGGGA
GTGTGAGTTAATTTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTG
GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCG

ภาคผนวก ข

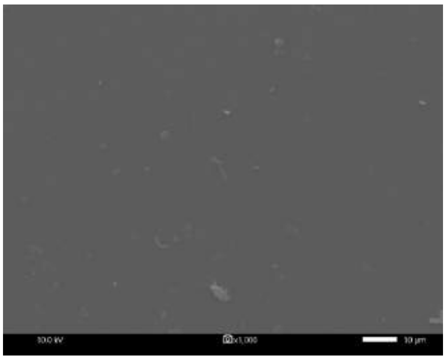
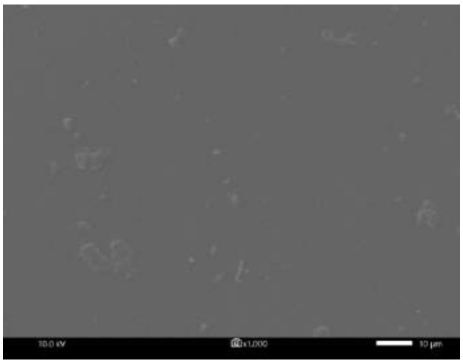
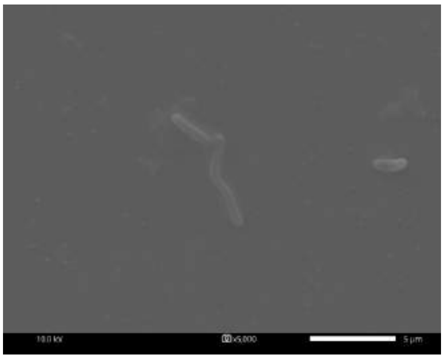
ผลการทดลองของการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

ตารางที่ 22 เปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับพลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S1

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	พลาสติกชุดควบคุม	พลาสติกที่เลี้ยงร่วมกับ แบคทีเรียรหัส S1
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า (1 µm)		

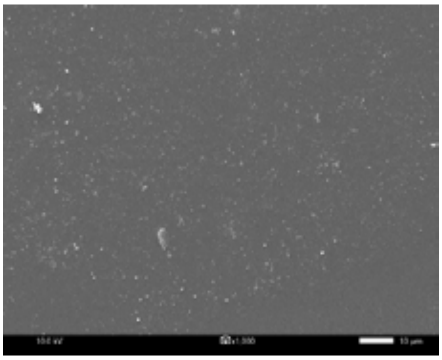
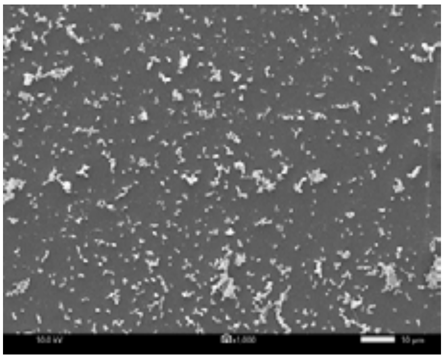
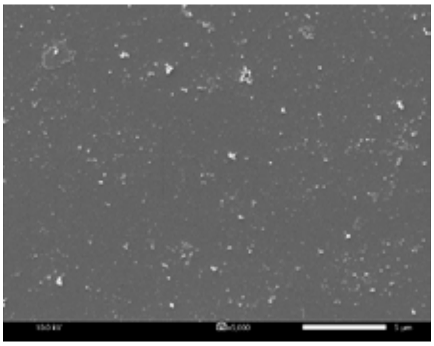
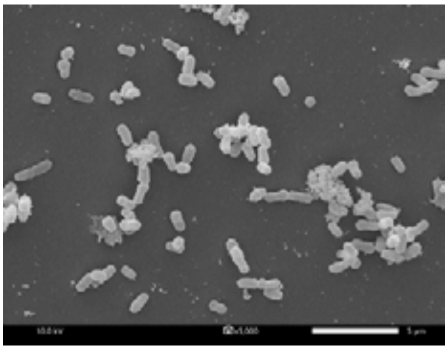
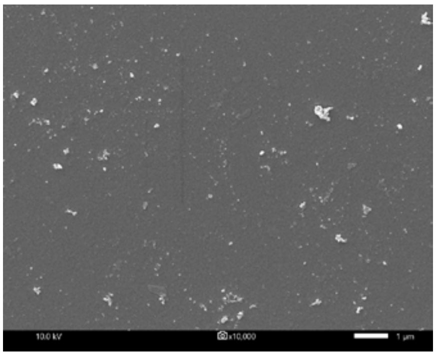
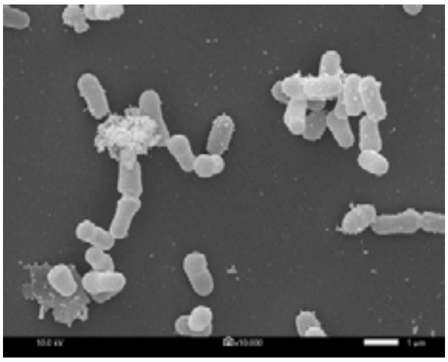
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 23 เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S1 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S1 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	แบคทีเรียรหัส S1 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติก	แบคทีเรียรหัส S1 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า (1 µm)		

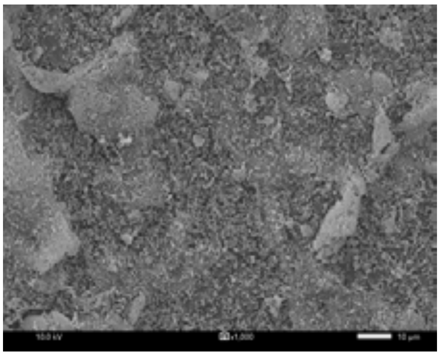
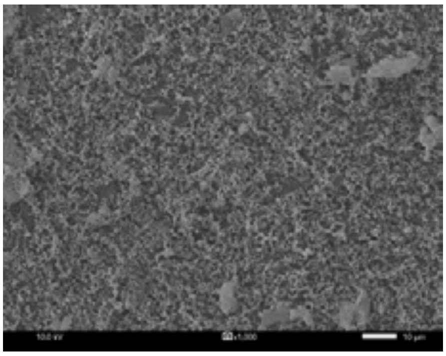
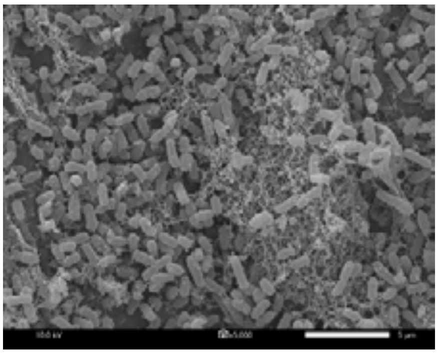
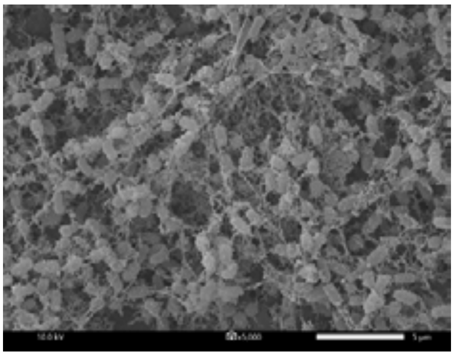
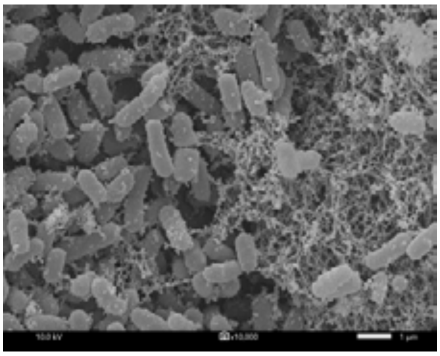
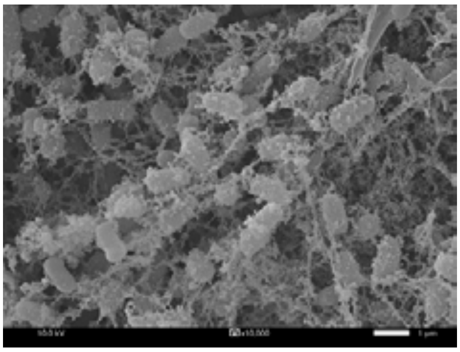
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 24 เปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับพลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S2

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	พลาสติกชุดควบคุม	พลาสติกที่เลี้ยงร่วมกับ แบคทีเรียรหัส S2
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า (1 µm)		

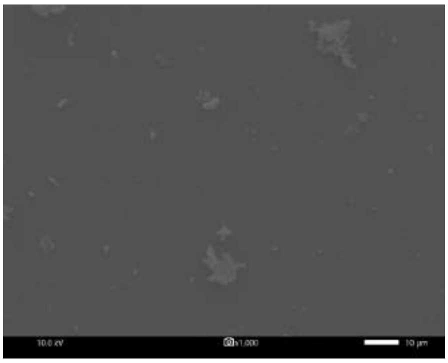
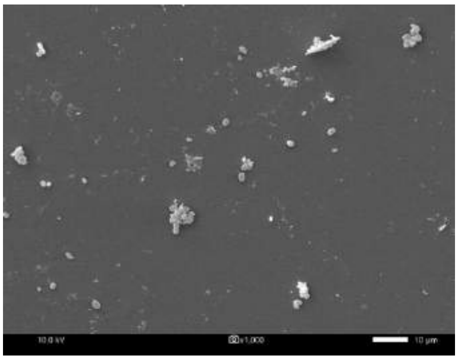
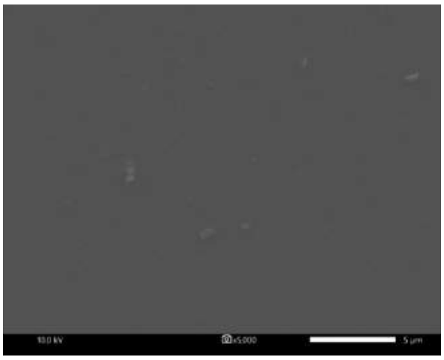
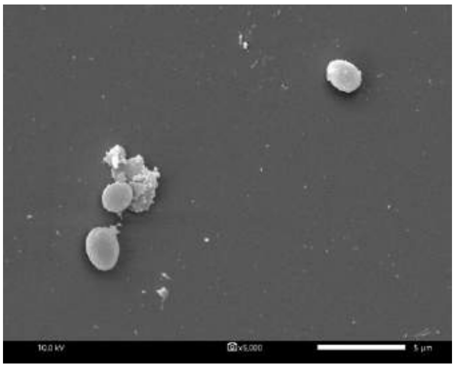
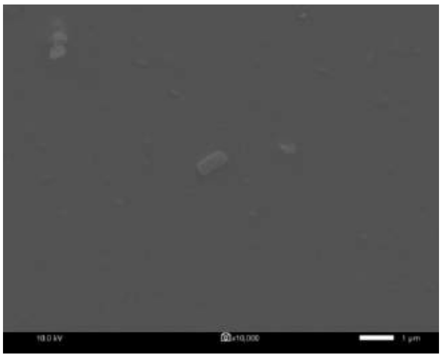
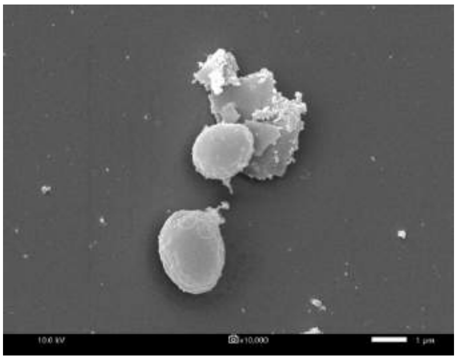
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 25 เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S2 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S2 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	แบคทีเรียรหัส S2 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติก	แบคทีเรียรหัส S2 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก
1,000 เท่า (10 μm)		
5,000 เท่า (5 μm)		
10,000 เท่า (1 μm)		

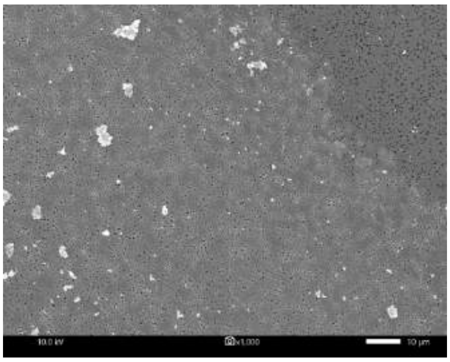
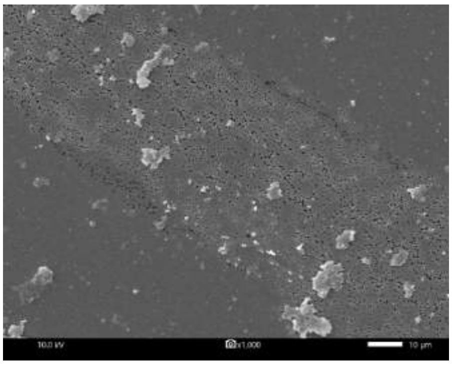
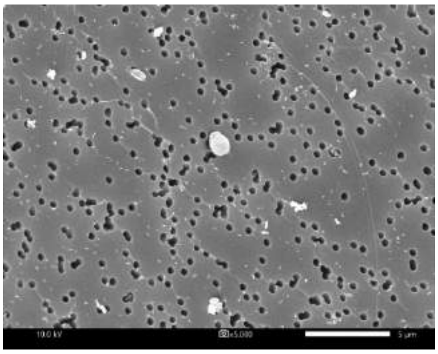
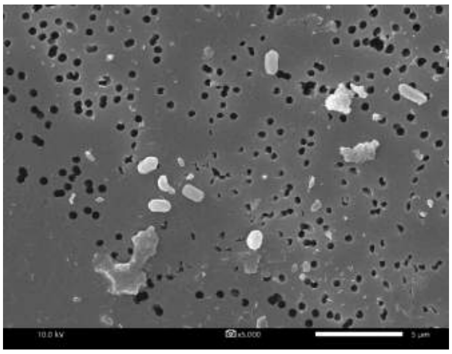
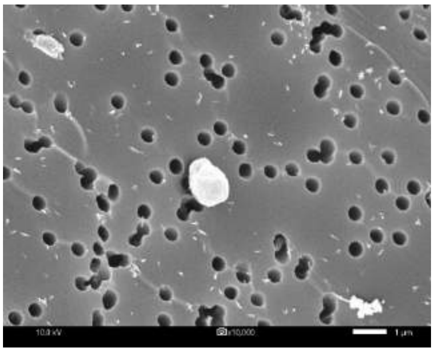
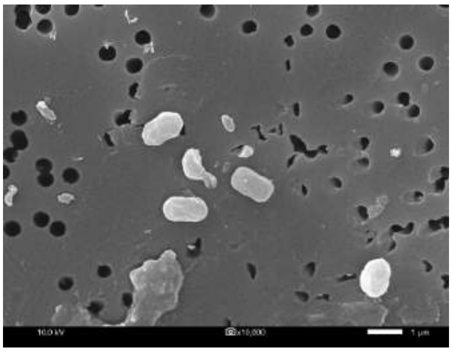
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 26 เปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับพลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S5

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	พลาสติกชุดควบคุม	พลาสติกที่เลี้ยงร่วมกับ แบคทีเรียรหัส S5
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า (1 µm)		

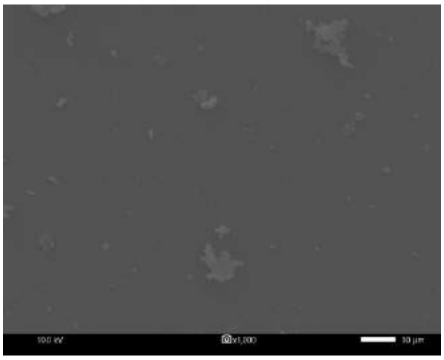
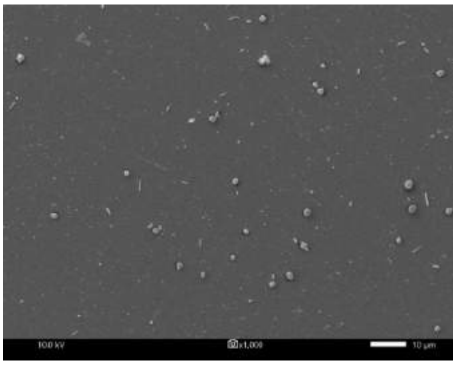
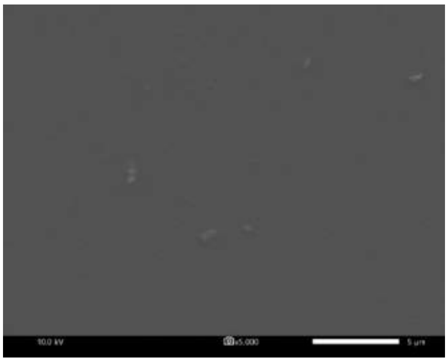
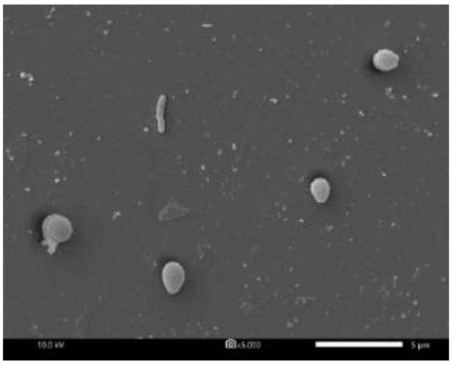
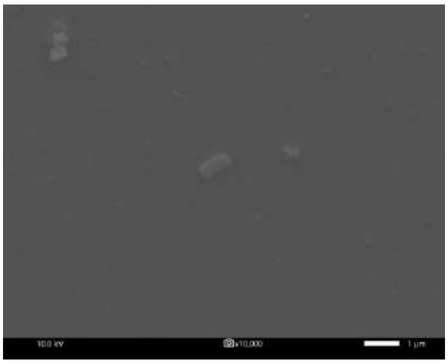
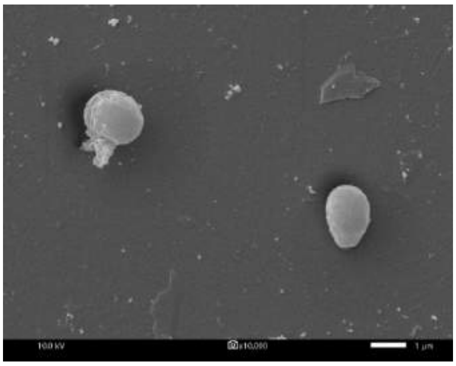
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 27 เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S5 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S5 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	แบคทีเรียรหัส S4 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติก	แบคทีเรียรหัส S5 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก
1,000 เท่า (10 μm)		
5,000 เท่า (5 μm)		
10,000 เท่า (1 μm)		

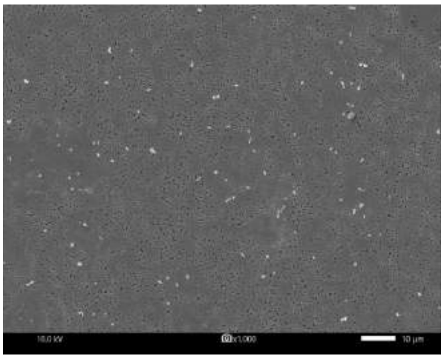
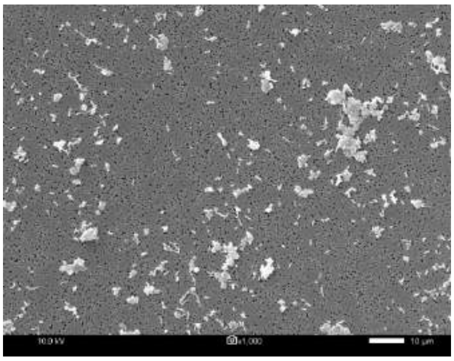
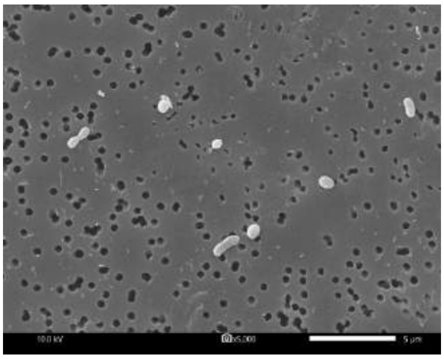
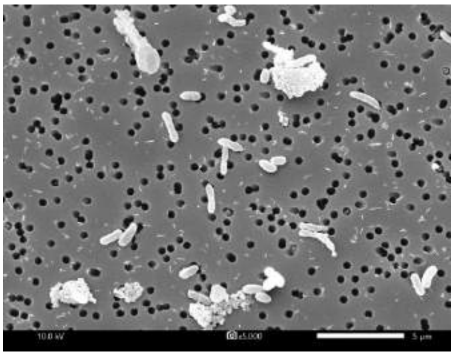
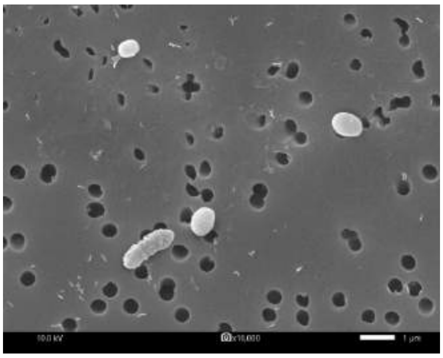
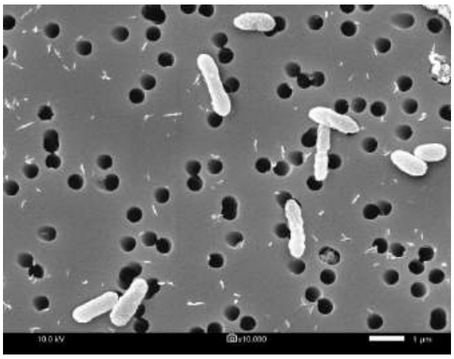
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 28 เปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับพลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S6

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	พลาสติกชุดควบคุม	พลาสติกที่เลี้ยงร่วมกับ แบคทีเรียรหัส S6
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า 1 µm		

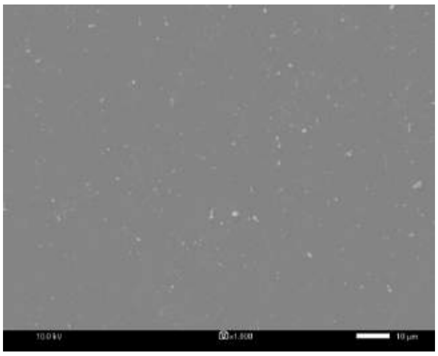
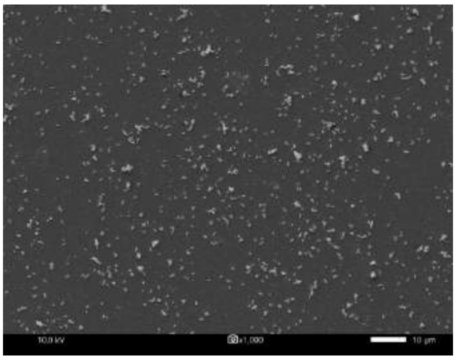
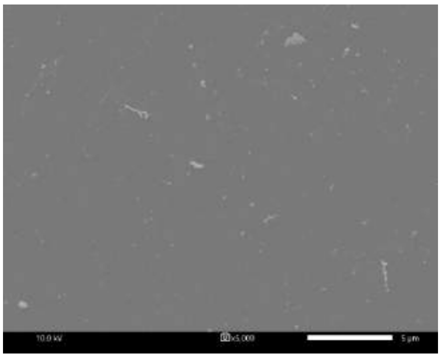
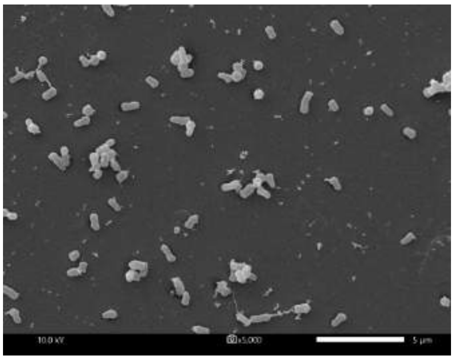
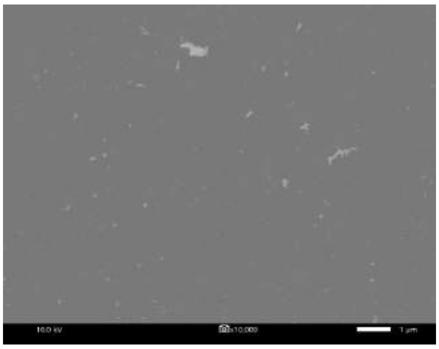
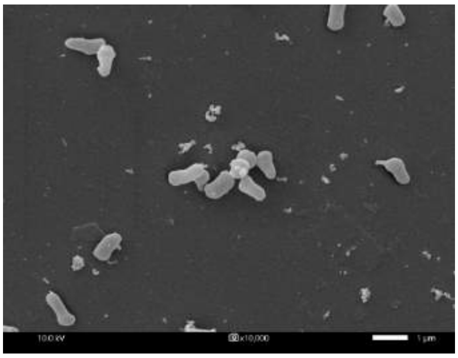
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 29 เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S6 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S6 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	แบคทีเรียรหัส S6 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติก	แบคทีเรียรหัส S6 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า (1 µm)		

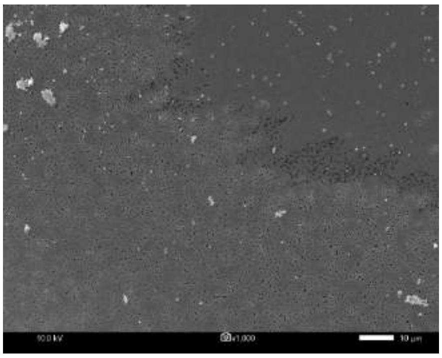
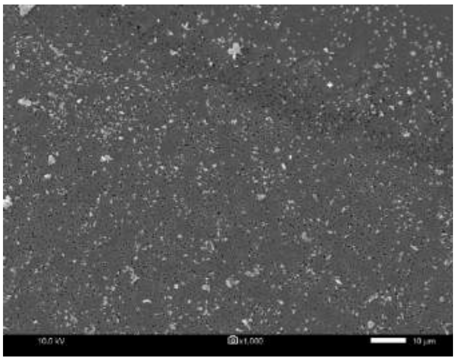
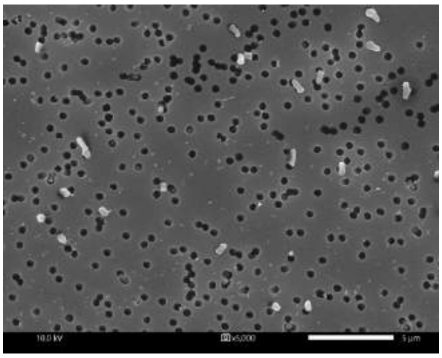
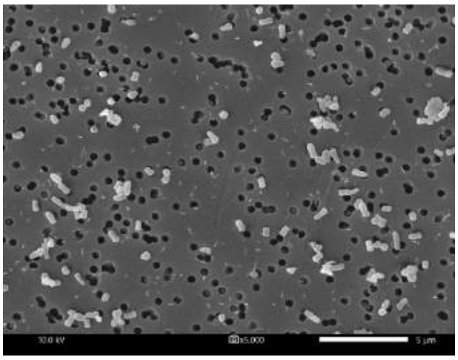
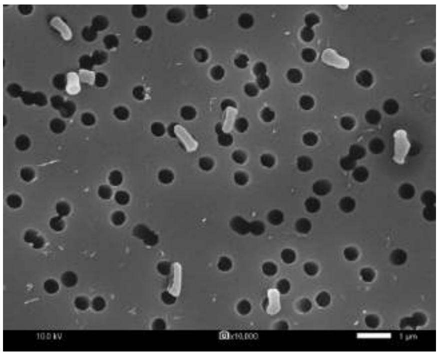
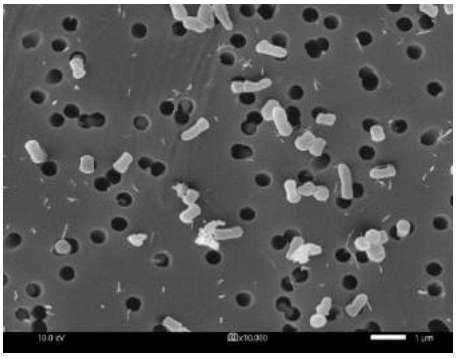
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 30 เปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับพลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S8

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	พลาสติกชุดควบคุม	พลาสติกที่เลี้ยงร่วมกับ แบคทีเรียรหัส S8
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า (1 µm)		

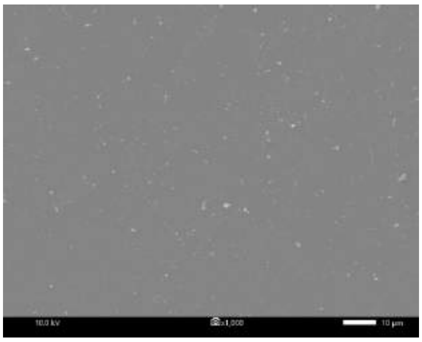
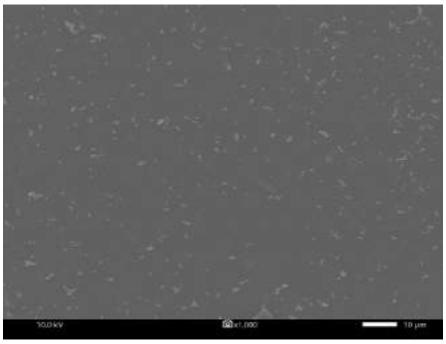
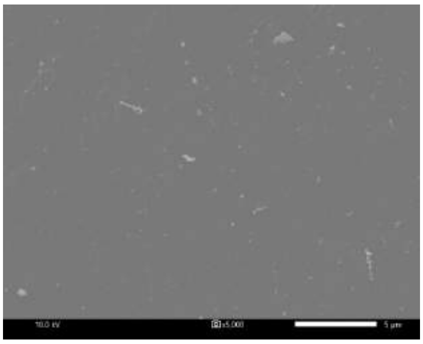
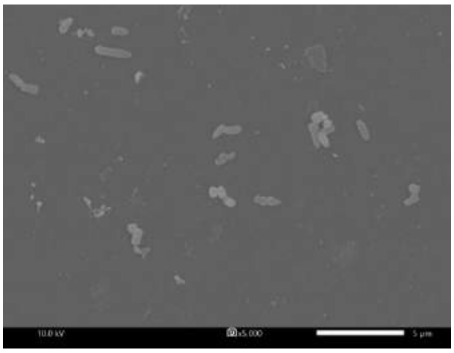
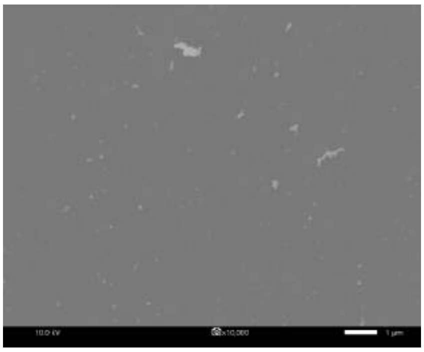
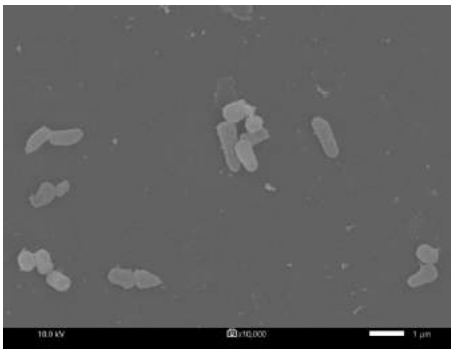
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 31 เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S8 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S8 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	แบคทีเรียรหัส S8 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติก	แบคทีเรียรหัส S8 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า (1 µm)		

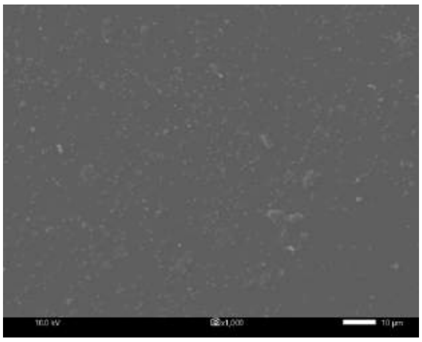
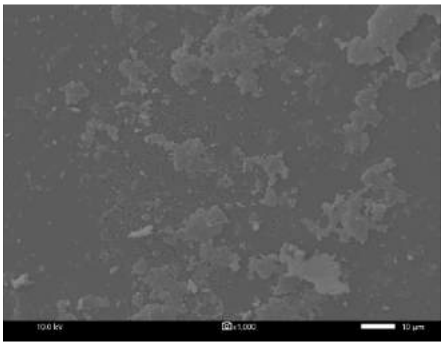
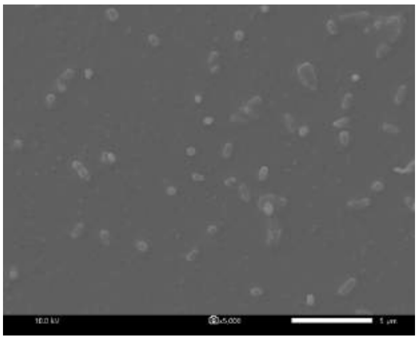
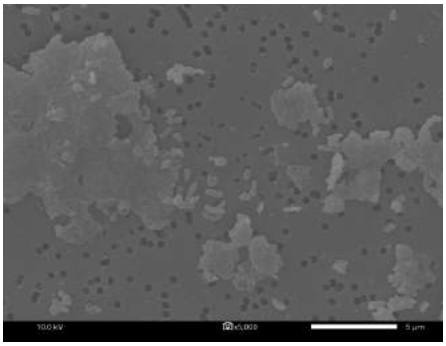
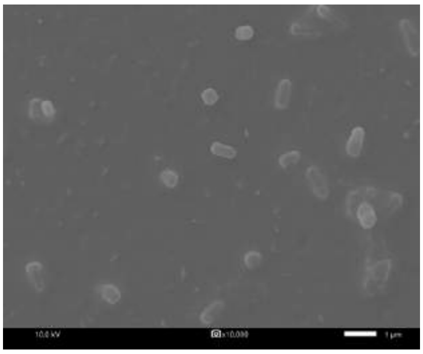
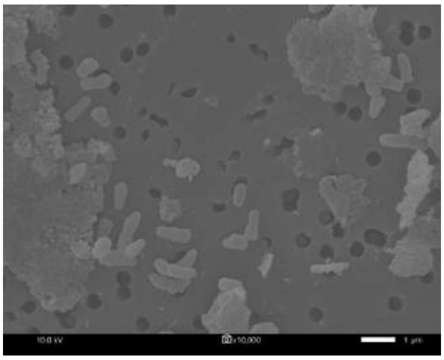
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 32 เปรียบเทียบลักษณะของพลาสติกของชุดควบคุมกับพลาสติกที่นำไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียรหัส S9

กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	พลาสติกชุดควบคุม	พลาสติกที่เลี้ยงร่วมกับ แบคทีเรียรหัส S9
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า (1 µm)		

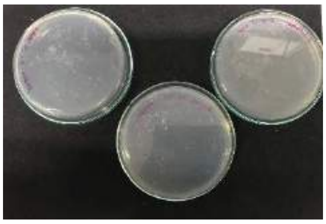
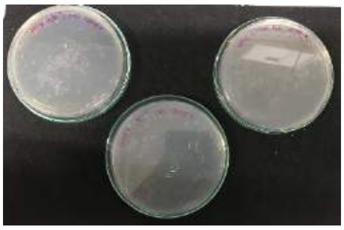
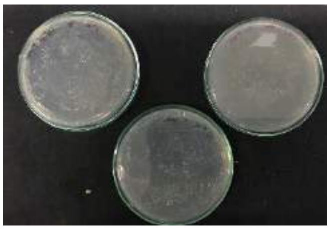
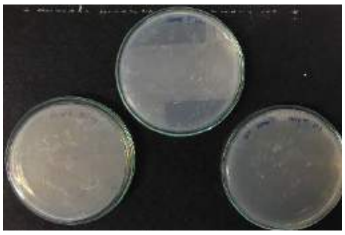
<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

ตารางที่ 33 เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียรหัส S9 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติกและแบคทีเรียรหัส S9 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก

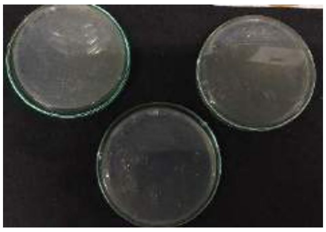
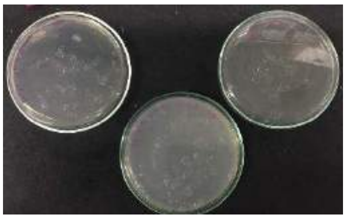
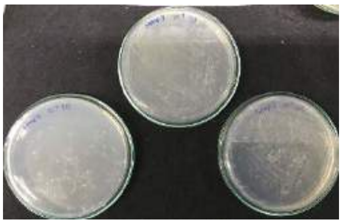
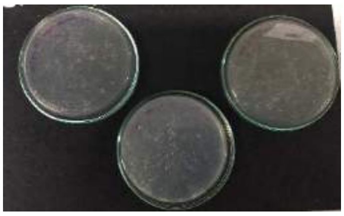
กำลังขยาย (ขนาดสเกล)	แบคทีเรียรหัส S9 ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับพลาสติก	แบคทีเรียรหัส S9 ที่เลี้ยงร่วมกับพลาสติก
1,000 เท่า (10 µm)		
5,000 เท่า (5 µm)		
10,000 เท่า (1 µm)		

<u>หมายเหตุ</u> ศักย์เร่งอิเล็กตรอน 10.0 kV

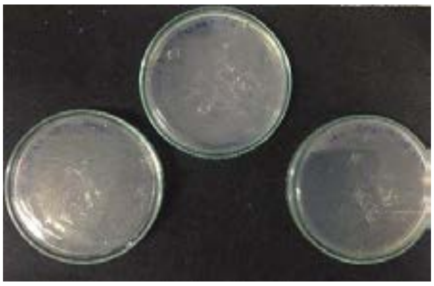
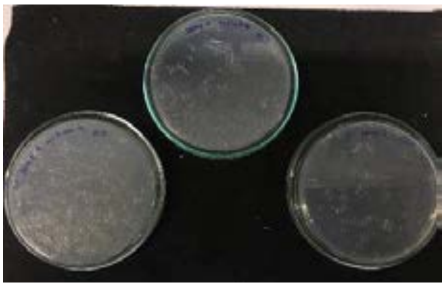
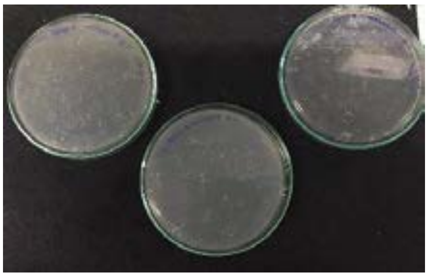
ตารางที่ 34 แสดงการเจริญของแบคทีเรียเมื่อบ่มร่วมกับพลาสติก (วันที่ 0)

	ระดับความเจือจาง		
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
ตัวอย่าง S3			
ตัวอย่าง S4			
ตัวอย่าง S7			

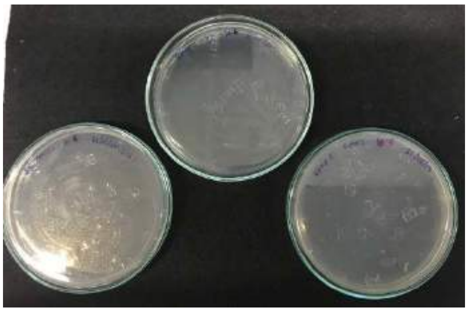
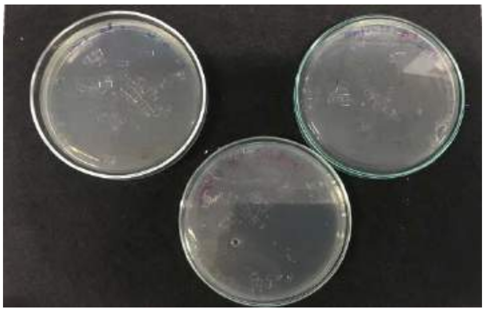
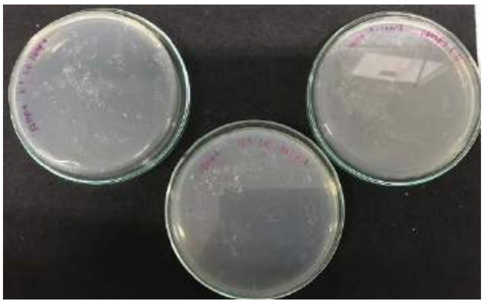
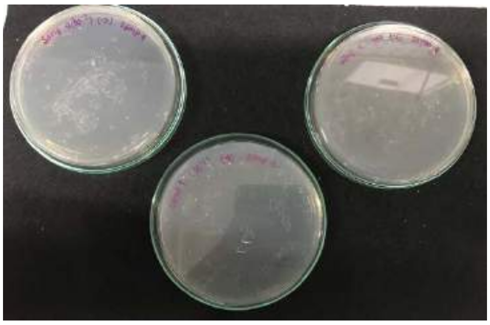
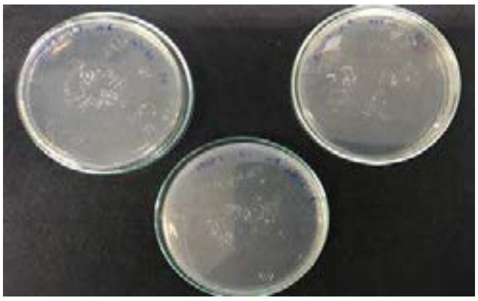
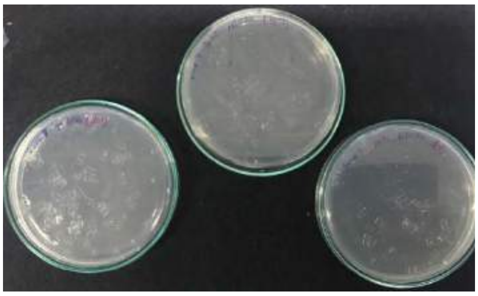
ตารางที่ 35 แสดงการเจริญของแบคทีเรียเมื่อไม่ได้บ่มร่วมกับพลาสติก (วันที่ 0)

	ระดับความเจือจาง		
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
ตัวอย่าง S3			
ตัวอย่าง S4			
ตัวอย่าง S7			

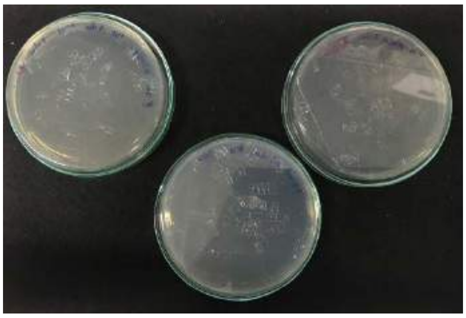
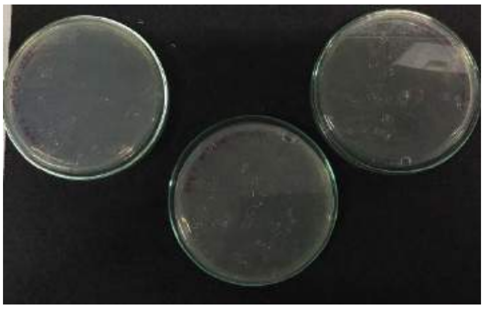
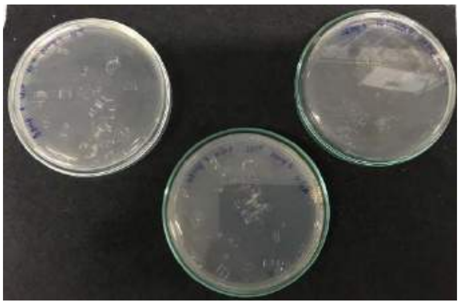
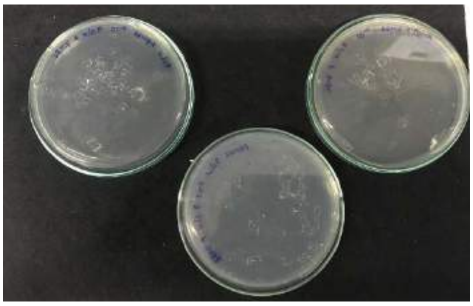
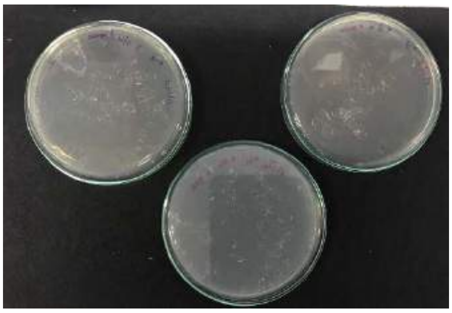
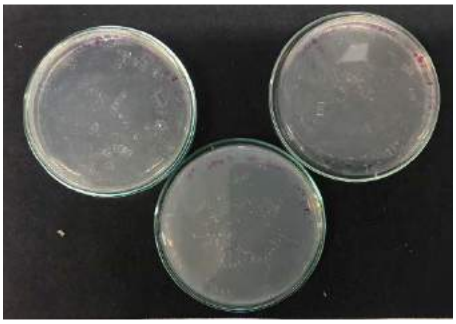
ตารางที่ 36 แสดงการเจริญของแบคทีเรียเมื่อบ่มร่วมกับอาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (วันที่ 0)

	ระดับความเจือจาง	
	10^{-2}	10^{-3}
ตัวอย่าง S3		
ตัวอย่าง S4		

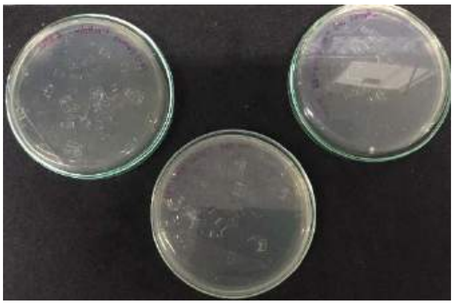
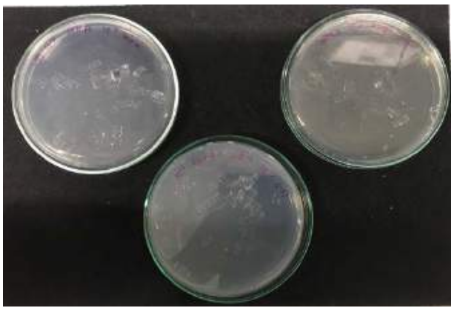
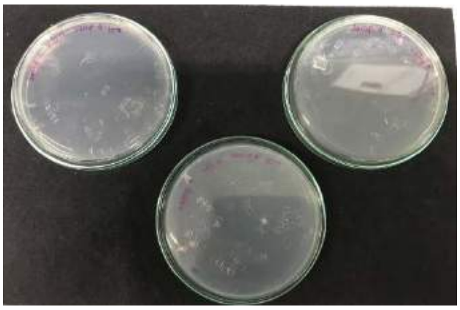
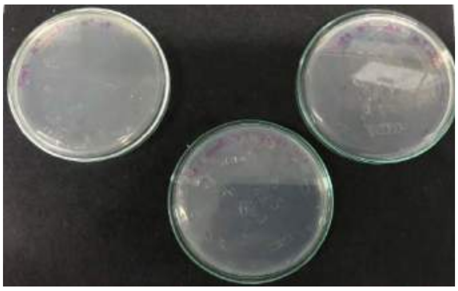
ตารางที่ 37 แสดงการเจริญของแบคทีเรียเมื่อบ่มร่วมกับพลาสติก (วันที่ 7)

	ระดับความเจือจาง	
	10^{-6}	10^{-7}
ตัวอย่าง S3		
ตัวอย่าง S4		
ตัวอย่าง S7		

ตารางที่ 38 แสดงการเจริญของแบคทีเรียเมื่อไม่ได้บ่มร่วมกับพลาสติก (วันที่ 7)

	ระดับความเจือจาง	
	10^{-6}	10^{-7}
ตัวอย่าง S3		
ตัวอย่าง S4		
ตัวอย่าง S7		

ตารางที่ 39 แสดงการเจริญของแบคทีเรียเมื่อปราศจากแหล่งไนโตรเจน (วันที่ 7)

	ระดับความเจือจาง	
	10^{-6}	10^{-7}
ตัวอย่าง S3		
ตัวอย่าง S4