



โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การศึกษาแบบที่เรี่ยที่ย่อยสลายพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลต

ชื่อบิสิต นายพีรวิษณุ พลอยประดับ รหัสประจำตัว 5932338723

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงการ

การศึกษาแบบที่เรียกว่าการย่อยสลายพลาสติกพอลิเอทิลีนเทรฟทาเลต

โดย

นายพีรวิชญ์ พลอยประดับ รหัสนิต 5932338723

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัครลาภสกุล

ปีการศึกษา

2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับโครงการฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

.....หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวานิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงการ

.....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัครลาภสกุล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติถิ์ สิริศรีธธา)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุขาดา จันทรประทีป นภาพร)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

การศึกษาแบคทีเรียที่ย่อยสลายพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลต
Study of polyethylene terephthalate degrading bacteria

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัครลาภสกุล

นิสิตในโครงการ

นายพีรวิชญ์ พลอยประดับ รหัสประจำตัว 5932338723

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์เป็นส่วนหนึ่งของ
หลักสูตรการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประจำปีการศึกษา 2562

ชื่อโครงการ	การศึกษาแบคทีเรียที่ย่อยสลายพลาสติกพอลิเอทิลีนเทรฟทาเลต
นิสิตในโครงการ	นายพีรวิชญ์ พลอยประดับ รหัสประจำตัว 5932338723
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัครวลาภสกุล
ภาควิชา	จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา	2562

บทคัดย่อ

พลาสติกกำเนิดขึ้นในช่วงศตวรรษที่ 20 เป็นหนึ่งในวัสดุสังเคราะห์ชนิดใหม่ที่มนุษย์คิดค้นขึ้นเพื่อลดข้อจำกัดต่าง ๆ ของวัสดุธรรมชาติ และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในชีวิตประจำวันหลากหลายประเภท พลาสติกพอลิเอทิลีนเทรฟทาเลตหรือพลาสติก PET เป็นพลาสติกในกลุ่มโพลีเอสเตอร์ซึ่งมีปริมาณการผลิตและใช้เพิ่มสูงขึ้นในแต่ละปี จากการเติบโตของอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มบรรจุภัณฑ์และหีบห่อจากพลาสติก PET ได้รับความนิยมและใช้อย่างแพร่หลายในชีวิตประจำวัน เนื่องจากคุณสมบัติของพลาสติกชนิดนี้มีต้นทุนการผลิตถูก น้ำหนักเบา โปร่งใส ทนแรงกระแทกและแรงเฉือนได้ดี ถึงอย่างไรก็ตามปัญหาขยะพลาสติก PET ถือว่าเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมที่ทั่วโลกให้ความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง การศึกษาวิจัยเพื่อหาแนวทางในการกำจัดขยะพลาสติก PET หนึ่งในแนวทางนั้นคือการย่อยสลายขยะพลาสติก PET ด้วยจุลินทรีย์ โครงการนี้มีจุดประสงค์ในการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพลาสติกพอลิเอทิลีนเทรฟทาเลตจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ จากงานวิจัยก่อนหน้านี้จำนวน 3 รหัส ได้แก่แบคทีเรียรหัส S3, S4 และ S7 เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 3 รหัส เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง carbon free mineral medium (CFMM) ที่ผสมพลาสติก PET เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้เพิ่มเติม 5 รหัส คือ S3-W, S4-W, S7-W, S7-Y และ S7-LW จากนั้นนำแบคทีเรียรหัส S3, S3-W, S4, S7-W และ S7-Y มาศึกษาการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ผสมพลาสติก PET ด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 14 วัน พบว่ากราฟการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 5 รหัสสามารถแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบหลัก ๆ คือ กราฟที่มีช่วงค่าการดูดกลืนแสงที่แปรปรวนและกราฟการเจริญที่มีค่าการดูดกลืนแสงเป็นไปตามทฤษฎีการเจริญ เมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานของแบคทีเรียด้วยวิธีการย้อมแกรมและศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าแบคทีเรียทุกรหัสมีแบคทีเรียลักษณะท่อนทั้งแกรมบวกและแกรมลบอาศัยอยู่ร่วมกัน

TITLE Study of polyethylene terephthalate degrading bacteria
INVESTIGATOR Mr. Peeravit Ploypradab ID 5932338723
ADVISOR Associate Professor Wanchai Assavalapsakul, Ph.D.
DEPARTMENT Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

ABSTRACT

Plastic was discovered in the 20th centuries. Plastic is the new synthetic material which human discovered in order to decrease some restrictions of natural substances. Moreover, people also developed it to become many household goods. Polyethylene terephthalate commonly abbreviated as PET plastic is in the category of polyester plastic which has high quantity of production and consumption in every year from the food and beverage industry. Packages from PET plastic are very popular and varied in everyone's life. This is because of the properties of PET plastic that has cheaper cost, light weight, transparency, impact and shear resistance. However, the problem about PET plastic waste is considered to be an environmental problem that people around the world realize about its importance. This is the reason why there are some studies to research about the ways to get rid of this kind of waste. One of the solutions is that to decomposed PET plastic by microorganism. The propose of the is project is to study the outgrowth of selected bacteria that can decompose polyethylene terephthalate. The three bacteria from the previous study, bacteria code number S3, S4, and S7, are screening on carbon-free mineral medium (CFMM) agar mixed with PET plastics which are the source of carbon can define five new bacteria codes; S3-W, S4-W, S7-W, S7-Y and S7-LW. To observe bacteria code number S3, S3-W, S4, S7-W, and S7-Y growing on the CFMM medium mixed with PET plastic by measuring the absorbance at the 600 nanometers wavelength every 24 hours within 14 days shown the growth graph of five bacteria in two different patterns. The fluctuated absorbance values graph and the graph that according to growth theory. After that, study the bacteria morphology by gram staining and observe by light microscope found the two-gram staining bacteria in all isolated bacteria.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิทยาศาสตร์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ดีด้วยความกรุณาชี้แนะและช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัครวลาภสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการการเรียนการสอนเพื่อ เสริม ประสบการณ์ที่ได้เสียสละเวลา ดูแลเอาใจใส่และให้กำลังใจ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ทั้งให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องมาโดยตลอด ตั้งแต่เริ่มงานวิจัยจนสำเร็จเรียบร้อย ขอกราบขอบพระคุณด้วยความเคารพอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความรู้และ ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการ ตลอดจนอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์จากงบประมาณภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนดำเนินโครงการนี้

ขอขอบคุณนายรพี สิ้นเนืองนอง (พีเบล) นางสาวจาร์วรรณ วรวิทย์ธาดา (พีโม) นายนันทพงศ์ หลงศรีภูมิ (พีเกมส์) นางสาวณัฐนรี แดงเอี่ยม (พีซิม) และพี่ ๆ ห้องปฏิบัติการ 2014 ทุกคนที่คอยให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่ดีในการดำเนินโครงการ ตลอดจนให้กำลังใจและให้ ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

ขอขอบคุณนางสาววิริยธิดา บุปผาสุก นางสาวกวิสรา ก้อนศิลา และเพื่อนชาวภาควิชา จุลชีววิทยา รุ่นที่ 43 รวมถึงเพื่อนสนิทต่างคณะ ที่คอยให้กำลังใจ ให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ ในโครงการนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาและบุคคลภายในครอบครัวทุกคนที่คอยให้ การช่วยเหลือสนับสนุนทั้งกำลังใจและกำลังใจที่ดี คอยดูแลให้ความรักความห่วงใยเป็นอย่างดี ตลอดจนทุนการศึกษาจนสำเร็จการศึกษา ลุล่วงไปได้ด้วยดี

พีรวิชญ์ พลอยประดับ
ผู้ดำเนินโครงการ

สารบัญ

เนื้อหา	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	16
บทที่ 4 ผลการทดลอง อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการทดลอง	19
แผนการดำเนินงานวิจัยที่คาดว่าจะทำในอนาคต	46
เอกสารอ้างอิง	47
ภาคผนวก ก	50
ภาคผนวก ข	52
ภาคผนวก ค	53

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ปริมาณการผลิตพลาสติกทั่วโลกในปี พ.ศ. 2561	1
2	การกลั่นน้ำมันดิบโดยกระบวนการกลั่นลำดับส่วน (fractional distillation)	2
3	โครงสร้างเทอร์โมพลาสติกและเทอร์โมเซตติง	3
4	ข้อแตกต่างหลักระหว่างเทอร์โมพลาสติกและเทอร์โมเซตติง	3
5	สัญลักษณ์ของพลาสติกแต่ละประเภทที่กำหนดโดยสมาคมอุตสาหกรรมพลาสติกแห่งสหรัฐอเมริกา	4
6	โครงสร้างโมเลกุลภายในพอลิเมอร์แบบ semi-crystalline	4
7	โครงสร้างเคมีของพลาสติกพอลิเอทิลีนเทรฟทาเลต	5
8	ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบแน่นในกระบวนการผลิตพลาสติกพอลิเอทิลีนเทรฟทาเลต	5
9	ความต้องการใช้พลาสติกพอลิเอทิลีนเทรฟทาเลตในทวีปเอเชียแปซิฟิกในปี พ.ศ. 2562	6
10	สัดส่วนการตลาดพลาสติกพอลิเอทิลีนเทรฟทาเลตในทวีปเอเชียแปซิฟิกในปี พ.ศ. 2562	6
11	ไมโครพลาสติกปนเปื้อนในห่วงโซ่อาหาร	7
12	กระบวนการย่อยสลายพอลิเอทิลีนเทรฟทาเลตโดย <i>Ideonella sakaiensis</i>	8
13	กระบวนการย่อยสลายโพลีเอทิลีนเทรฟทาเลต โดย <i>Delftia</i> sp. WL-3	9
14	กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S3 ทั้ง 4 ชุดการทดลอง	30
15	กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S3	31
16	กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S3-W ทั้ง 4 ชุดการทดลอง	33
17	กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S3-W	34
18	กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S4 ทั้ง 4 ชุดการทดลอง	36
19	กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S4	37
20	กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S7-W ทั้ง 4 ชุดการทดลอง	39
21	กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S7-W	40
22	กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S7-Y ทั้ง 4 ชุดการทดลอง	42
23	กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S7-Y	43

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์	17
2	องค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	17
3	สภาวะการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	18
4	ลักษณะโคโลนีแบคทีเรียรหัส S3 S4 และ S7 จาก glycerol culture stock บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ระยะเวลาบ่ม 72 ชั่วโมง	20
5	ชื่อรหัสแบคทีเรียจาก glycerol culture stock เดิมและคัดแยกเพิ่มเติมจาก S3 S4 และ S7 glycerol culture stock บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง carbon free mineral medium (CFMM)	21
6	ลักษณะโคโลนีแบคทีเรียรหัส S3 S4 และ S7 จาก glycerol culture stock บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ระยะเวลาบ่ม 120 ชั่วโมง	21-22
7	ลักษณะสัณฐานแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์	23-24
8	ผลของการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank	25
9	ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น (CFU/ml.) ในการทดลองวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย	26
10	ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรีย รหัส S3 S3-W S4 S7-W และ S7-Y โดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM	27
11	ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรีย รหัส S3 S3-W S4 S7-W และ S7-Y โดยวิธี Drop plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM	28
12	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S3 ทั้ง 4 ชุดการทดลอง	29
13	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S3	30
14	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S3-W ทั้ง 4 ชุดการทดลอง	32
15	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S3-W	33
16	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S4 ทั้ง 4 ชุดการทดลอง	35
17	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S4	36
18	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S7-W ทั้ง 4 ชุดการทดลอง	38
19	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S7-W	40
20	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S7-Y ทั้ง 4 ชุดการทดลอง	41
21	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S7-Y	43

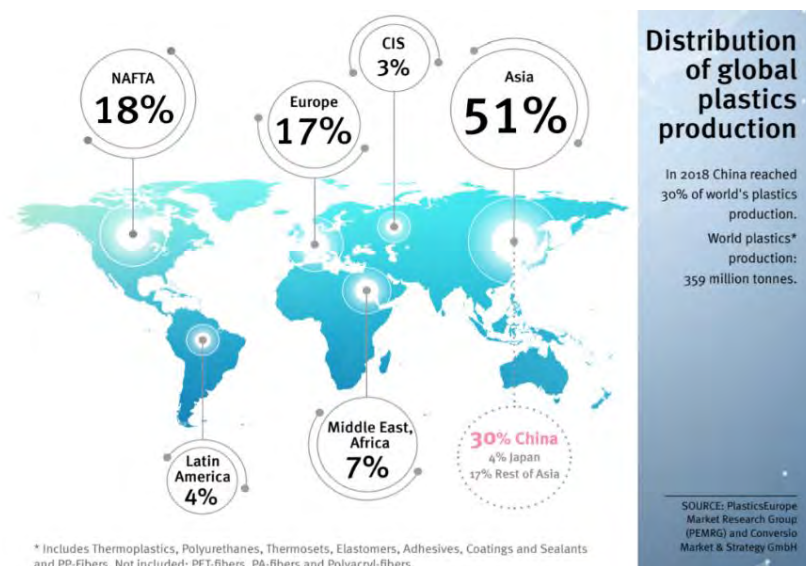
บทที่ 1

บทนำ

1. พลาสติก

ปัจจุบันสังคมมีการพัฒนาในหลากหลายด้านอย่างรวดเร็ว ไม่ว่าจะเป็นการพัฒนาและการขยายตัวของชุมชนเมือง การเติบโตทางด้านเศรษฐกิจส่งผลให้มีการผลิตสินค้าและบรรจุภัณฑ์มากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งบรรจุภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มที่เป็นพลาสติกอยู่ในประเภทใช้แล้วทิ้งเพื่ออำนวยความสะดวกและตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค ในอดีตวัสดุธรรมชาติ เช่น ไม้ เส้นใย ยางธรรมชาติ ถูกนำมาใช้งานเป็นเครื่องใช้ต่าง ๆ ภาชนะ เครื่องนุ่งห่ม ที่อยู่อาศัย แต่เมื่อจำนวนประชากรเพิ่มสูงขึ้น วัสดุธรรมชาติเริ่มมีไม่เพียงพอต่อความต้องการในการบริโภค ในช่วงศตวรรษที่ 20 ถึง 21 จึงได้มีการคิดค้นวัสดุชนิดใหม่ที่จะนำมาใช้แทนที่วัสดุธรรมชาติ วัสดุชนิดนี้คือ พลาสติก พลาสติกเป็นหนึ่งในวัสดุสังเคราะห์ชนิดใหม่ที่มนุษย์คิดค้นขึ้นเพื่อลดข้อจำกัดต่าง ๆ ของวัสดุธรรมชาติ และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับใช้ในชีวิตประจำวันของคนทุกเพศทุกวัยให้มีคุณภาพดีขึ้น (Gilbert, 2017) ด้วยคุณสมบัติของพลาสติกที่มีน้ำหนักเบา มีความแข็งแรง ยืดหยุ่นสูง เหนียว ทนต่อแรงกระแทก แรงเฉือน การสึกกร่อน มีอายุการใช้งานนานและมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำ จึงทำให้มีการใช้พลาสติกในรูปแบบผลิตภัณฑ์และบรรจุภัณฑ์อย่างแพร่หลายทั่วโลกและมีแนวโน้มการใช้งานในด้านต่าง ๆ เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง

ในปี พ.ศ. 2561 มีปริมาณการผลิตพลาสติกทั่วโลกประมาณ 359 ล้านตัน ซึ่งทวีปเอเชียเป็นทวีปที่ผลิตพลาสติกมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 51 ของการผลิตพลาสติกทั่วโลก ทั้งนี้ประเทศจีนผลิตพลาสติกมากที่สุดในทวีปเอเชียและคิดเป็นร้อยละ 30 ของพลาสติกที่ผลิตได้ทั้งหมดในทวีปเอเชีย แสดงดังรูปที่ 1 (Plastic Europe, 2019)

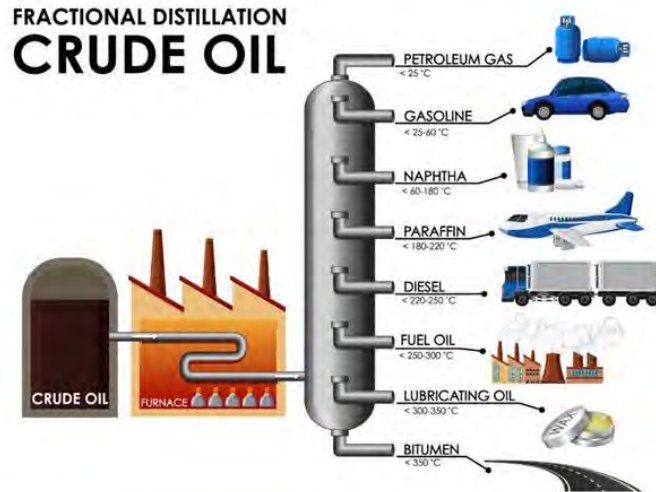


รูปที่ 1 ปริมาณการผลิตพลาสติกทั่วโลกในปี พ.ศ. 2561

(ที่มา: <https://www.plasticseurope.org/application/files>

/9715/7129/9584/FINAL_web_version_Plastics_the_facts2019_14102019.pdf)

พลาสติกสามารถผลิตได้จากเซลลูโลส ถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติและน้ำมันดิบ ซึ่งส่วนใหญ่แล้ว พลาสติกในท้องตลาดนั้นผลิตจากน้ำมันดิบโดยผ่านกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบในโรงกลั่นน้ำมันเพื่อ แยกขนาดและโครงสร้างของโมเลกุลของไฮโดรคาร์บอนต่าง ๆ รวมถึงองค์ประกอบอื่น ๆ ภายใน น้ำมันดิบดังรูปที่ 2 (Plastic Europe, 2017)



รูปที่ 2 การกลั่นน้ำมันดิบโดยกระบวนการกลั่นลำดับส่วน (fractional distillation)
(ที่มา: <https://www.bpf.co.uk/plastipedia/how-is-plastic-made.aspx>)

กระบวนการผลิตเม็ดพลาสติกเริ่มต้นจากการนำสารประกอบไฮโดรคาร์บอนซึ่งได้จากการกลั่นลำดับส่วนน้ำมันดิบมาทำปฏิกิริยากันจนได้เป็นสายโซ่ยาว เรียกว่า โพลิเมอร์ (polymer) ซึ่งโพลิเมอร์แต่ละชนิดจะถูกสังเคราะห์โดยใช้วัตถุดิบเริ่มต้นที่แตกต่างกันไป ทำให้โพลิเมอร์มีสมบัติที่แตกต่างกันออกไป (ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ, 2017)

ปฏิกิริยาสังเคราะห์พอลิเมอร์หรือพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) เป็นปฏิกิริยาเคมีที่ทำให้มอนอเมอร์ต่อกันเป็นสายโซ่ยาว สามารถเกิดได้ 2 รูปแบบ (ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ, 2017) ดังนี้

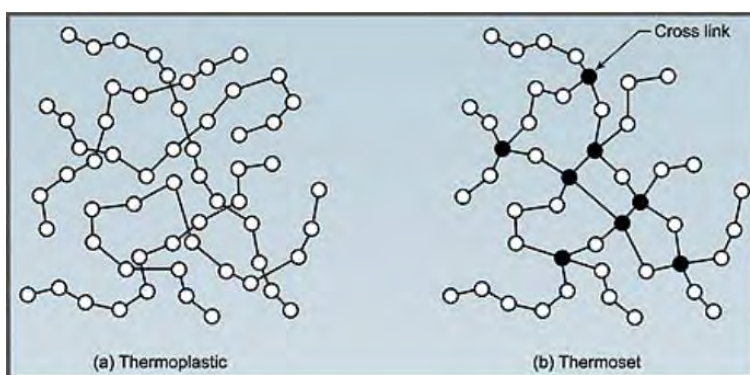
1. การสังเคราะห์พอลิเมอร์แบบเติม (addition polymerization) หรือปฏิกิริยาสังเคราะห์พอลิเมอร์แบบลูกโซ่ (chain polymerization) คือการสังเคราะห์พอลิเมอร์จากมอนอเมอร์พันธะคู่ (alkene) หรือพันธะสาม (alkyne) 1 ชนิด ภายใต้สภาวะมีตัวเร่งปฏิกิริยาและความร้อน ตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้พันธะแตกออกในมอนอเมอร์แตกออกและสร้างพันธะกับมอนอเมอร์ข้าง ๆ กลายเป็นสายโซ่ยาว การสังเคราะห์พอลิเมอร์แบบนี้ไม่ได้ผลิตผลิตภัณฑ์อื่นนอกจากพอลิเมอร์จึงส่งผลให้จำนวนอะตอมของธาตุในหน่วยซ้ำของโพลิเมอร์เท่ากับจำนวนอะตอมในโมเลกุลของโมโนเมอร์ ตัวอย่างพลาสติกในกระบวนการนี้ได้แก่ พอลิไวนิลคลอไรด์ พอลิโพรไพลีนและพอลิเอทิลีน

2. การสังเคราะห์พอลิเมอร์แบบควบแน่น (condensation polymerization) หรือปฏิกิริยาสังเคราะห์พอลิเมอร์แบบขั้น (step polymerization) คือการสังเคราะห์พอลิเมอร์จากมอนอเมอร์ 2 ชนิด ซึ่งแต่ละมอนอเมอร์มีหมู่ฟังก์ชันอย่างน้อย 2 หมู่ที่เหมือนกันเพื่อเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่ฟังก์ชันและเกิดพอลิเมอร์ขึ้น การสังเคราะห์พอลิเมอร์แบบนี้เกิดสารจากการทำปฏิกิริยา เช่น น้ำกรดไฮโดรคลอริกและเอทานอล เป็นต้น จึงส่งผลให้จำนวนอะตอมของธาตุในหน่วยซ้ำของโพลิเมอร์มักน้อยกว่าจำนวนอะตอมในโมเลกุลของโมโนเมอร์ ตัวอย่างพลาสติกในกระบวนการนี้ได้แก่ ไนลอน และพอลิเอทิลีน

พลาสติกสามารถแบ่งตามโครงสร้างโมเลกุลออกเป็น 2 ประเภทคือเทอร์โมพลาสติก (thermoplastic) และเทอร์โมเซตติง (thermosetting) ซึ่งการหลอมและนำกลับมาขึ้นรูปใหม่เป็นข้อแตกต่างหลักของพลาสติกทั้ง 2 ประเภทนี้ ดังรูปที่ 3 และ 4 (ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ, 2017)

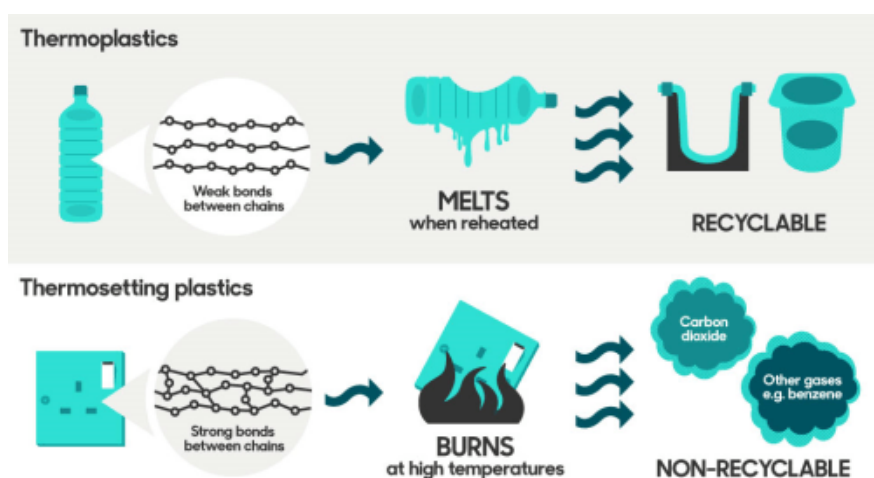
1. เทอร์โมพลาสติก (thermoplastic) คือโพลิเมอร์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลแบบเส้นตรงหรือแบบกิ่งสั้น ๆ เมื่อได้รับความร้อนจะอ่อนตัวและหลอมเหลวเป็นของเหลวหนืด เมื่อเย็นตัวลงจะแข็งตัวจึงสามารถขึ้นรูปใหม่ได้โดยไม่ทำให้สมบัติทางเคมีและทางกายภาพ รวมถึงโครงสร้างของโพลิเมอร์เปลี่ยนแปลงมากนัก ข้อดีคือสามารถนำกลับมารีไซเคิลได้โดยการบดและหลอมด้วยความร้อนเพื่อขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ได้อีกแต่พลาสติกประเภทนี้มีข้อเสียคือ ไม่สามารถใช้งานที่อุณหภูมิสูงได้

2. เทอร์โมเซตติง (thermosetting) คือโพลิเมอร์ที่มีโครงสร้างเป็นแบบร่างแหจากปฏิกิริยาเคมี ทำให้เกิดพันธะเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุล ทำให้โพลิเมอร์มีรูปร่างที่ถาวรและไม่สามารถหลอมเหลวได้อีก เมื่อได้รับความร้อนสูงเกินไปจะได้สารที่ไม่มีสมบัติของความเป็นโพลิเมอร์อีกต่อไป จึงไม่สามารถนำไปรีไซเคิลได้



รูปที่ 3 โครงสร้างเทอร์โมพลาสติกและเทอร์โมเซตติง

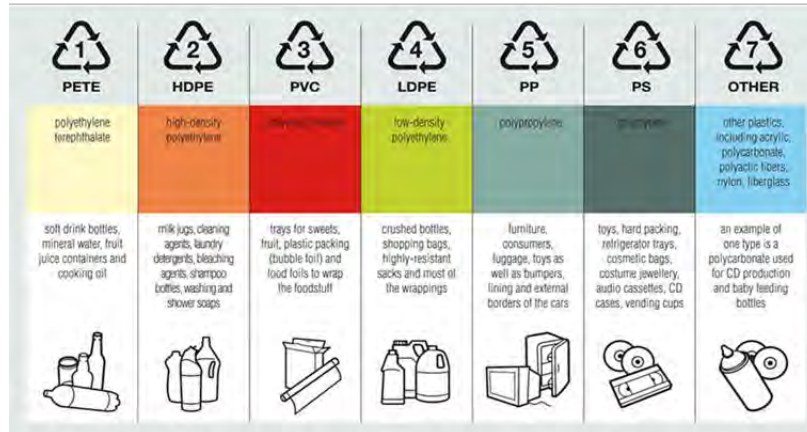
(ที่มา: <http://triitytytlerkelly.weebly.com/thermoset-and-thermoplastic.html>)



รูปที่ 4 ข้อแตกต่างหลักระหว่างเทอร์โมพลาสติกและเทอร์โมเซตติง

(ที่มา: <https://plasticmolder.com/2018/05/15/injection-molding-materials-2/>)

SPI resin code หรือสัญลักษณ์ลูกศรรูปสามเหลี่ยมล้อมรอบตัวเลขตั้งแต่ 1 ถึง 7 ดังรูปที่ 5 จัดตั้งขึ้นโดยสมาคมอุตสาหกรรมพลาสติก (The society of the plastics industry, SPI) เป็นการจัดประเภทของพลาสติกในอีกรูปแบบหนึ่งเพื่อให้ประชาชนทั่วไปสามารถทราบถึงประเภทของพลาสติกในผลิตภัณฑ์และคัดแยกประเภทก่อนทำการรีไซเคิลได้อย่างถูกต้อง (ธนัชฐา ภูววรรณ, 2016)

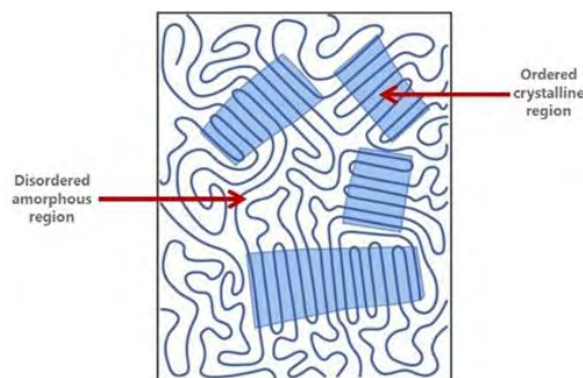


รูปที่ 5 สัญลักษณ์ของพลาสติกแต่ละประเภทที่กำหนดโดยสมาคมอุตสาหกรรมพลาสติกแห่งสหรัฐอเมริกา

(ที่มา: <https://polychem-usa.com/plastic-coding-system/>)

2. พลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลต

พลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลต (polyethylene terephthalate, PET) เป็นพอลิเมอร์ชนิดควบแน่น (condensation polymer) ในกลุ่มโพลีเอสเตอร์ (polyester) ชนิด semi-crystalline เป็นพลาสติกชนิดทนร้อนแบบ thermoplastic (Omnexus, 2017) โครงสร้างพอลิเมอร์แบบผสมหรือ semi-crystalline ของพลาสติก PET นั้น เกิดจากการเรียงตัวของโมเลกุลภายในแบบเป็นระเบียบและไม่เป็นระเบียบจนเกิดบริเวณ 2 รูปแบบขึ้น คือ crystalline region และ non-crystalline region หรือ amorphous region ดังรูปที่ 6 จึงทำให้พลาสติก PET มีคุณสมบัติทนอุณหภูมิได้สูงและขึ้นรูปได้ง่าย (Mac Varish N.K., 2017) นอกจากนั้นยังมีคุณสมบัติอื่น ๆ ได้แก่ การทนต่อแรงกระแทกและแรงเฉือน น้ำหนักเบา โปร่งใสและไม่ทำปฏิกิริยากับอาหารหรือเครื่องดื่มภายในบรรจุภัณฑ์ (Creative mechanisms, 2017) ดังนั้นจึงเป็นนิยมใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มรวมถึงอุตสาหกรรมเส้นใยสังเคราะห์และสิ่งทอ (Shah et al., 2008)

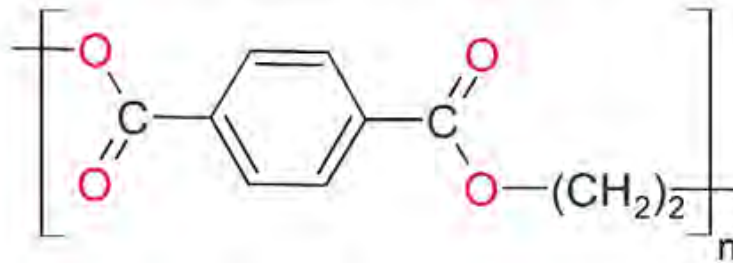


รูปที่ 6 โครงสร้างโมเลกุลภายในพอลิเมอร์แบบ semi-crystalline

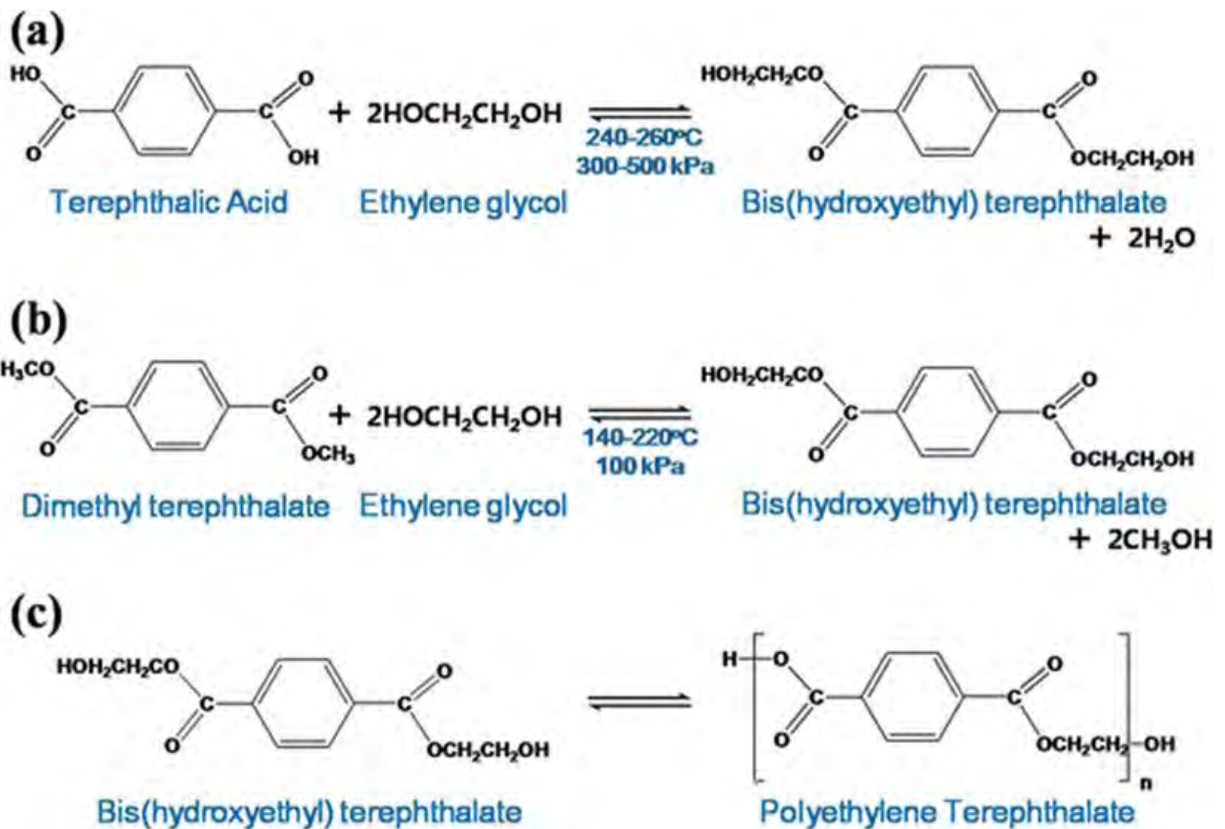
(ที่มา: <https://www.victrex.com/en/blog/2017/polymer-crystallinity-hpp-explained-part-3>)

พลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรพทาเลตมีโครงสร้างเคมีคือ $(-OOC-C_6H_4-COOCH_2-CH_2-)$ หรือ $(C_{10}H_8O_4)_n$ ดังรูปที่ 7 สร้างขึ้นจากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบแน่น (condensation polymerization) ด้วยปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) ระหว่างเอทิลีนไกลคอล (ethylene glycol, EG) และกรดเทเรพทาสิก (terephthalic acid, TPA) หรือไดเมทิลเทเรพทาเลต (dimethyl terephthalate, DMT) ดังรูปที่ 8 (Robertson, 2014)

Polyethylene terephthalate (PET)



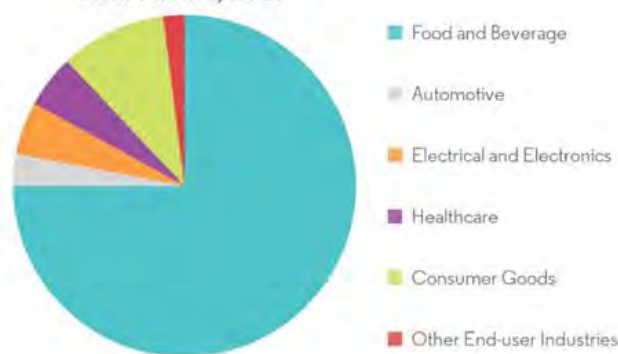
รูปที่ 7 โครงสร้างเคมีของพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรพทาเลต
(ที่มา: <http://polymerdatabase.com/Polymer%20Brands/PET.html>)



รูปที่ 8 ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบแน่นในกระบวนการผลิตพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรพทาเลต
(Kim & Park, 2014)

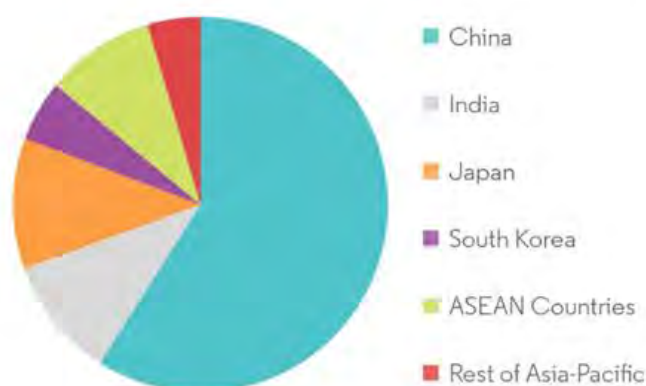
ในปี พ.ศ. 2561 มูลค่าทางการตลาดพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรพทาเลตระดับโลกมีมูลค่า 25.25 พันล้านดอลลาร์สหรัฐส่งผลให้ค่า compound annual growth rate (CAGR) หรือค่าการเติบโตเฉลี่ยต่อปีเพิ่มสูงขึ้นถึง 5.6 เปอร์เซ็นต์และคาดการณ์ว่าในปี พ.ศ. 2568 มูลค่าทางการตลาดของพลาสติกชนิดนี้จะสูงถึง 66.42 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ จากปริมาณการใช้บรรจุภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มที่เพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก โดยเฉพาะตลาดในทวีปเอเชียแปซิฟิกที่มีส่วนแบ่งทางการตลาดถึง 40.32 เปอร์เซ็นต์ จากความต้องการพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรพทาเลตในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มที่เพิ่มสูงขึ้นโดยเฉพาะประเทศจีน อินเดีย และญี่ปุ่น ดังรูปที่ 9 และ 10 (Grand view research, 2019; Mordor Intelligence, 2019)

Polyethylene Terephthalate (PET) Resin Market, Volume Share (%), by End-user Industry, Asia-Pacific, 2019



รูปที่ 9 ความต้องการใช้พลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรพทาเลตในทวีปเอเชียแปซิฟิกในปี พ.ศ. 2562 (ที่มา: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/asia-pacific-polyethylene-teraphtalate-pet-market>)

Polyethylene Terephthalate (PET) Resin Market, Volume Share (%), by Country, Asia-Pacific, 2019



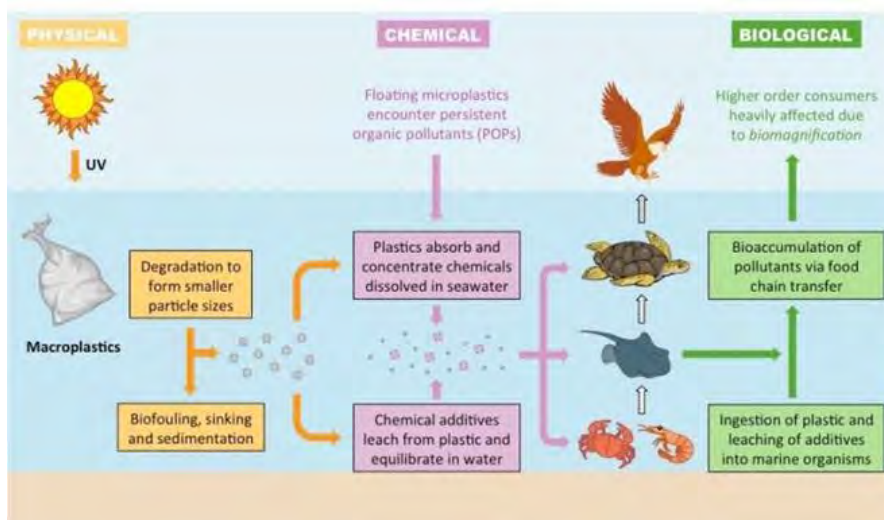
รูปที่ 10 สัดส่วนการตลาดพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรพทาเลตในทวีปเอเชียแปซิฟิกในปี พ.ศ. 2562 (ที่มา: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/asia-pacific-polyethylene-teraphtalate-pet-market>)

3. ปัญหาสิ่งแวดล้อมจากขยะพลาสติกและวิธีการกำจัดขยะพลาสติก

ในปัจจุบันขยะพลาสติกนับเป็นปัญหาที่สำคัญทั้งในและต่างประเทศจากสถานการณ์การผลิตและใช้พลาสติกเพิ่มสูงขึ้น ด้วยคุณสมบัติของพลาสติกที่มีน้ำหนักเบา มีความยืดหยุ่นสูงและราคาถูก ทำให้มีการใช้พลาสติกในรูปแบบผลิตภัณฑ์และบรรจุภัณฑ์ต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย โดยในปี พ.ศ. 2560 ประเทศไทยพบขยะถุงพลาสติกและขวดเครื่องดื่มพลาสติกปริมาณมากที่สุดในแต่ละและชายฝั่ง คิดเป็นร้อยละ 17.21 และ 12.19 ตามลำดับ (กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, 2560; Geyer et al., 2017) ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศชายฝั่งและสิ่งมีชีวิตในทะเลเป็นอย่างมาก รวมถึงสุขภาพของประชาชน

สารประกอบในพลาสติกที่เป็นอันตรายซึ่งเกิดจากการผลิตหรือใช้งานผลิตภัณฑ์ที่ไม่ถูกต้อง อาจนำไปสู่การสะสมสารพิษและเสี่ยงต่อการเกิดโรคเรื้อรัง ได้แก่ vinyl chloride และ phthalate เป็นสารตั้งต้นและสารเติมแต่งในการผลิตพลาสติกพอลิไวนิลคลอไรด์สามารถรบกวนการทำงานของระบบฮอร์โมนภายในร่างกายและเป็นสารที่อาจก่อมะเร็งในคนได้ สไตรีนเป็นวัตถุพิษในการผลิตพอลิสไตรีนหรือกล่องโฟมซึ่งเป็นสารที่ส่งผลกระทบต่อระบบประสาทส่วนกลางและระบบไหลเวียนเลือด รวมถึงเป็นสารที่อาจก่อให้เกิดมะเร็งได้ ทั้งนี้ bisphenol A มีลักษณะคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนสามารถทำให้ระบบฮอร์โมนเพศผิดปกติได้และ formaldehyde ในพลาสติกเมลามีนเมื่อได้รับความร้อนสูงเกิน 80 องศาเซลเซียสจะปลดปล่อยแก๊สฟอร์มัลดีไฮด์เป็นอันตรายต่อสุขภาพ (วารสารพิษวิทยาไทย, 2556)

การกำจัดขยะพลาสติกในประเทศไทยตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันมีทั้งหมด 5 วิธี (กรมควบคุมมลพิษ, 2561) ได้แก่ การฝังกลบ (landfill) การรีไซเคิล (recycle) การนำขยะพลาสติกมาเป็นเชื้อเพลิงในโรงงานอุตสาหกรรม (refuse derived fuel, RDF) การเผา (incineration) และการแปรรูปขยะพลาสติกเป็นน้ำมันไพโรไลซิส (pyrolysis) แต่อย่างไรก็ตามการกำจัดขยะพลาสติกโดยวิธีต่าง ๆ ข้างต้น ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของประชาชน เช่น การฝังกลบแบบผิดวิธีทำให้ดินปนเปื้อนสารพิษจากที่ปล่อยระหว่างการย่อยสลาย การเผาขยะพลาสติกปล่อยแก๊สพิษและสารอินทรีย์กระจายไปในอากาศ พื้นดิน แหล่งน้ำและไมโครพลาสติกขนาดเล็กที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายสามารถเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารของคนและสัตว์ ดังรูปที่ 11 (EcoWatch, 2019)



รูปที่ 11 ไมโครพลาสติกปนเปื้อนในห่วงโซ่อาหาร

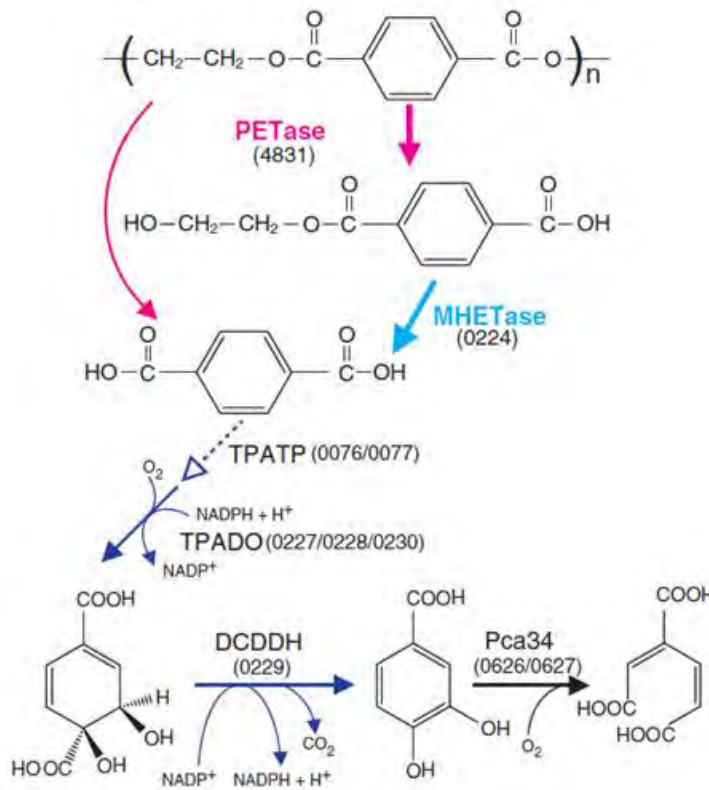
(ที่มา: <https://www.aquarium.co.za/blog/entry/microplastics-are-they-in-your-food>)

4. การย่อยสลายพลาสติกด้วยวิธีทางชีวภาพ

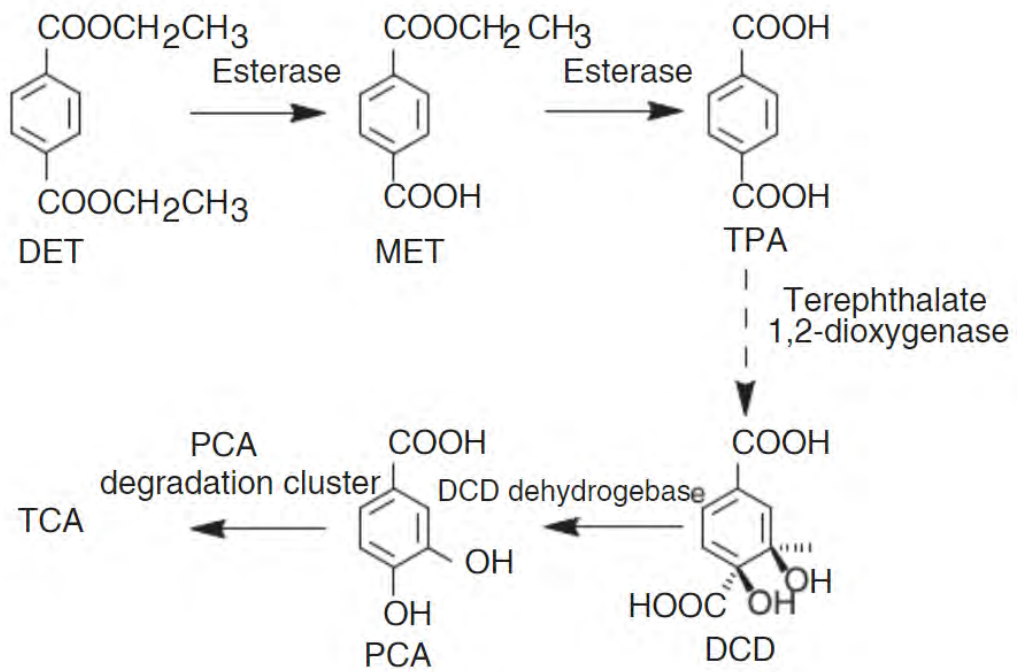
จุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการย่อยสลายโพลิเมอร์สังเคราะห์ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมโดยการย่อยสลายพลาสติกด้วยวิธีชีวภาพนั้นเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมและเอนไซม์จากจุลินทรีย์ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ depolymerization ได้แก่ hydrolysis alcoholysis glycolysis ammonolysis และ aminolysis (Teotia et al., 2017) จึงได้รับความสนใจจากนักวิจัยทั่วโลกเพื่อศึกษาวิจัยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายโพลิเมอร์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของจุลินทรีย์และเป็นแนวทางในวิธีการกำจัดขยะพลาสติกรูปแบบใหม่ในอนาคต

5. การย่อยสลายพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลตด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้แบคทีเรีย

นักวิจัยญี่ปุ่นคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายขยะพลาสติก PET จากการบ่อขยะในประเทศญี่ปุ่น พบว่า *Ideonella sakaiensis* เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่สร้างเอนไซม์ PETase และ MHETase โดยเอนไซม์ PETase ย่อยพลาสติก PET เป็น bis (2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET) mono (2-hydroxyethyl) terephthalate (MHET) และ terephthalic acid (TPA) จากนั้นเอนไซม์ MHETase ย่อยสลาย MHET เป็น TPA และ ethylene glycol (EG) การย่อยสลายพลาสติก PET ได้อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 6 สัปดาห์ ดังรูปที่ 12 (Yoshida et al., 2016) และมีการทดลองคัดแยกแบคทีเรีย *Delftia* sp. WL-3 ที่สามารถย่อยสลายสาร diethyl terephthalate (DET) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติก PET ที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ร้อยละ 94 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 7 วัน ดังรูปที่ 13 (Liu et al., 2018)



รูปที่ 12 กระบวนการย่อยสลายพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลตโดย *Ideonella sakaiensis* (Yoshida et al., 2016)



รูปที่ 13 กระบวนการย่อยสลายไดเมทิลเทเรพทาเลต โดย *Delftia* sp. WL-3 (Liu et al., 2018)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียที่ได้คัดเลือกโดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA
2. เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ได้คัดเลือก

บทที่ 2

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลองโดยแบ่งตามการทดลองดังนี้

1. การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพลาสติกพอลิเอทิลีนเทรฟทาเลต
 - 1.1. อุปกรณ์
 - 1.1.1. จานเพาะเชื้อแก้ว
 - 1.1.2. ลูบเขี่ยเชื้อ
 - 1.1.3. ตะเกียงแอลกอฮอล์
 - 1.1.4. ไฟแช็ค
 - 1.1.5. ถุงมือยางไนไตรล์ (จากบริษัท Sri trang gloves (Suratthani, Thailand))
 - 1.1.6. ตู้ปลอดเชื้อ (จากบริษัท PMI-Labortechnik GmbH (Grafstal, Switzerland))
 - 1.1.7. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
 - 1.1.8. เครื่องซั่งสาร (จากบริษัท Adam equipment (Connecticut, USA))
 - 1.1.9. กระจกซั่งสาร
 - 1.1.10. ปีกเกอร์ขนาด 1,000 และ 250 มิลลิลิตร (จากบริษัท Corning Life Sciences (Tewksbury, USA))
 - 1.1.11. แท่งแก้วคนสาร
 - 1.1.12. ขวดแก้วบรรจุสารขนาด 500 มิลลิลิตร (จากบริษัท Schott AG (Hattenbergstrasse, Germany))
 - 1.1.13. กระจกตรวางขนาด 1,000 มิลลิลิตร (จากบริษัท Schott AG (Hattenbergstrasse, Germany))
 - 1.1.14. เครื่องวัดค่า pH (จากบริษัท Ionix (Robinson road, Singapore))
 - 1.1.15. กระจกฉีดยาขนาด 15 มิลลิลิตร (จากบริษัท Nipro (New Jersey, USA))
 - 1.1.16. แผ่นกรองแบคทีเรียขนาด 0.45 ไมโครเมตร (จากบริษัท GE Healthcare Life Sciences (Chicago, USA))
 - 1.1.17. พลาสติกพอลิเอทิลีนเทรฟทาเลต (PET plastic bottle)
 - 1.1.18. เครื่องเจาะกระจก (จากบริษัท Nanmee industry CO., LTD. (Bangkok, Thailand))
 - 1.1.19. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) (จากบริษัท Bio-active Co., Ltd. (Bangkok, Thailand))
 - 1.1.20. ตู้อบแห้งอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (จากบริษัท KWF (Bangkok, Thailand))
 - 1.1.21. ปิเปต (micropipette) ขนาด 1,000, 200, 20, 10, และ 2.5 ไมโครลิตร (จากบริษัท Eppendorf (Thailand) Co., Ltd. (Bangkok, Thailand))
 - 1.1.22. ทิป (tips) ขนาด 1,000, 200 และ 10 ไมโครลิตร (จากบริษัท Bioscience, Inc. (Pennsylvania, USA))

- 1.1.23. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง
(จากบริษัท Olympus (Thailand) Co., Ltd. (Bangkok, Thailand))
- 1.1.24. เครื่องเขย่าสาร (vortex) (จากบริษัท Scientific industries (New York, USA))
- 1.1.25. ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส (จากบริษัท Sanyo (Bangkok, Thailand))
- 1.1.26. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส (จากบริษัท Sanyo (Bangkok, Thailand))
- 1.1.27. Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร
- 1.1.28. เซ็ธรัส S3, S4 และ S7 คัดแยกจากดินจังหวัดสมุทรสาคร
โดยนางสาวณัฐนรี แต่งเอี่ยม (ณัฐนรี แต่งเอี่ยม, 2561)

1.2. เคมีภัณฑ์

- 1.2.1. แอมโมเนียมไนเตรท (Ammonium nitrate, NH_4NO_3 MW. เท่ากับ 80.044 กรัมต่อโมล)
- 1.2.2. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogenphosphate, KH_2PO_4 MW. เท่ากับ 136.086 กรัมต่อโมล) (จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany))
- 1.2.3. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โดเดคาไฮเดรต (Disodium hydrogenphosphate Dodecahydrate, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ MW. เท่ากับ 358.14 กรัมต่อโมล) (จากบริษัท BDH chemicals (United Kingdom))
- 1.2.4. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต (Magnesium sulfate heptahydrate, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ MW. เท่ากับ 246.48 กรัมต่อโมล) (จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany))
- 1.2.5. เฟอริกคลอไรด์ เฮกซะไฮเดรต (Ferric chloride hexahydrate, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ MW. เท่ากับ 270.29 กรัมต่อโมล) (จากบริษัท Sigma-Aldrich (Missouri, USA))
- 1.2.6. แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต (Calcium chloride dihydrate, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ MW. เท่ากับ 147.01 กรัมต่อโมล) (จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany))
- 1.2.7. ไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl MW. เท่ากับ 36.46 กรัมต่อโมล) (จากบริษัท RCI Labscan Co., LTD. (Bangkok, Thailand))
- 1.2.8. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH MW. เท่ากับ 39.997 กรัมต่อโมล) (จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany))
- 1.2.9. Bacto agar (จากบริษัท Becton Dickson (Ho Chi Minh city, Vietnam))
- 1.2.10. 50% กลีเซอรอล

2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA (16s rDNA nucleotide sequencing)

2.1. การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอแบบคทีเรีย (Genomic DNA extraction)

2.1.1. อุปกรณ์

- 2.1.1.1. ปิเปต (micropipette) ขนาด 1,000, 200, 20, 10 และ 2.5 ไมโครลิตร
(จากบริษัท Eppendorf (Thailand) Co., Ltd. (Bangkok, Thailand))
- 2.1.1.2. ทิป (tips) ขนาด 1,000, 200 และ 10 ไมโครลิตร
(จากบริษัท Bioscience, Inc. (Pennsylvania, USA))

- 2.1.1.3. Microcentrifuge tube ขนาด 1.7 มิลลิลิตร
(จากบริษัท Eppendorf (Thailand) Co., Ltd. (Bangkok, Thailand))
- 2.1.1.4. Microcentrifuge tube rack
- 2.1.1.5. ถุงมือยางไนไตรล์ (จากบริษัท Sri trang gloves (Suratthani, Thailand))
- 2.1.1.6. ถังน้ำแข็ง
- 2.1.1.7. ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 2.1.1.8. ไฟแช็ค
- 2.1.1.9. พลาสติกพอลิเอทิลีนเทรฟทาเลตกลม (PET plastic bottle)
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 มิลลิเมตร
- 2.1.1.10. หลอดทดลอง
- 2.1.1.11. ตู้บ่มเขย่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
(จากบริษัท Labnet international, Inc. (New jersey, USA))
- 2.1.1.12. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
(จากบริษัท Bio-active Co., Ltd. (Bangkok, Thailand))
- 2.1.1.13. เครื่องปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง (จากบริษัท Hettich (Bangkok, Thailand))
- 2.1.1.14. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารตกตะกอนความเร็วรอบต่ำ (Spindown)
(จากบริษัท Laboratory & medical supplies (Brigachtal, Germany))
- 2.1.1.15. เครื่องเขย่าสาร (vortex) (จากบริษัท Scientific industries (New York, USA))
- 2.1.1.16. เครื่องให้ความร้อนหลอดทดลอง (heat block)
(จากบริษัท Labnet international, Inc. (New jersey, USA))
- 2.1.1.17. เครื่องปั่นตกตะกอน 4 องศาเซลเซียส
(จากบริษัท Eppendorf (Thailand) Co., Ltd. (Bangkok, Thailand))
- 2.1.1.18. ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (จากบริษัท Sanyo (Bangkok, Thailand))
- 2.1.1.19. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
(จากบริษัท Sandenintercool (Singburi, Thailand))
- 2.1.1.20. ขวดแก้วบรรจุสารขนาด 250 มิลลิลิตร
(จากบริษัท Schott AG (Hattenbergstrasse, Germany))
- 2.1.1.21. กระบอกรวบรวมขนาด 100 มิลลิลิตร
(จากบริษัท Schott AG (Hattenbergstrasse, Germany))
- 2.1.1.22. อุปกรณ์สำหรับเตรียมเจลสำหรับเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส
- 2.1.1.23. เครื่องเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (จากบริษัท BIO-RAD (California, USA))
- 2.1.1.24. เครื่อง gel document (จากบริษัท BIO-RAD (California, USA))
- 2.1.1.25. คิวเวตต์ (จากบริษัท Eppendorf (Thailand) Co., Ltd. (Bangkok, Thailand))
- 2.1.1.26. Spectrophotometry
(จากบริษัท Eppendorf (Thailand) Co., Ltd. (Bangkok, Thailand))

2.1.2. เคมีภัณฑ์

- 2.1.2.1. อาหารเลี้ยงเชื้อ carbon free mineral medium (CFMM)
- 2.1.2.2. TE buffer, pH 8.0
- 2.1.2.3. Lysozyme ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร
- 2.1.2.4. 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)
- 2.1.2.5. RNase A 10 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร
- 2.1.2.6. Phenol
- 2.1.2.7. Chloroform (จากบริษัท RCI Labscan Co., LTD. (Bangkok, Thailand))
- 2.1.2.8. 3 M Sodium acetate
- 2.1.2.9. Absolute ethanol (จากบริษัท RCI Labscan Co., LTD. (Bangkok, Thailand))
- 2.1.2.10. 70% ethanol
- 2.1.2.11. Ultrapure water (Type 1 water)
- 2.1.2.12. Ethidium bromide
- 2.1.2.13. Agarose LE (จากบริษัท Axxygen, Spain)
- 2.1.2.14. 1X TAE buffer
(เตรียมจาก 50X TAE Buffer, Tris base 242 กรัม; acetic acid 57.1 มิลลิลิตร; 0.5 M EDTA, pH 8.0 และ distilled water 842.9 มิลลิลิตร)

2.2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

2.2.1. อุปกรณ์

- 2.2.1.1. PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
(จากบริษัท Bioscience, Inc. (Pennsylvania, USA))
- 2.2.1.2. PCR tube rack
- 2.2.1.3. ปิเปต (micropipette) ขนาด 1,000, 200, 20, 10 และ 2.5 ไมโครลิตร
(จากบริษัท Eppendorf (Thailand) Co., Ltd. (Bangkok, Thailand))
- 2.2.1.4. ทิป (tips) ขนาด 1,000, 200 และ 10 ไมโครลิตร
(จากบริษัท Bioscience, Inc. (Pennsylvania, USA))
- 2.2.1.5. ถุงมือยางไนไตรล์ (จากบริษัท Sri trang gloves (Suratthani, Thailand))
- 2.2.1.6. ถังน้ำแข็ง
- 2.2.1.7. เครื่องเขย่าสาร (vortex) (จากบริษัท Scientific industries (New York, USA))
- 2.2.1.8. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารตกตะกอนความเร็วรอบต่ำ (Spindown)
(จากบริษัท Laboratory & medical supplies (Brigachtal, Germany))
- 2.2.1.9. Thermal cycler (จากบริษัท BIO-RAD (California, USA))
- 2.2.1.10. เครื่อง gel document (จากบริษัท BIO-RAD (California, USA))
- 2.2.1.11. อุปกรณ์สำหรับเตรียมเจลสำหรับเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

- 2.2.1.12. เครื่องเจลอิลีกโตรโพลีซิส (จากบริษัท BIO-RAD (California, USA))
- 2.2.1.13. คิวเวตต์ (จากบริษัท Eppendorf (Thailand) Co., Ltd))
- 2.2.1.14. Spectrophotometry
(จากบริษัท Eppendorf (Thailand) Co., Ltd. (Bangkok, Thailand))
- 2.2.1.15. Evaporator
(จากบริษัท Eppendorf (Thailand) Co., Ltd. (Bangkok, Thailand))
- 2.2.2. เคมีภัณฑ์
 - 2.2.2.1. 10X Reaction buffer (จากบริษัท Apsalagen Co. Ltd. (Bangkok, Thailand))
 - 2.2.2.2. 10mM dNTPs
 - 2.2.2.3. 10 μ M 27F primer
 - 2.2.2.4. 10 μ M 1492R primer
 - 2.2.2.5. 50 mM Magnesium chloride
(จากบริษัท Apsalagen Co. Ltd. (Bangkok, Thailand))
 - 2.2.2.6. Taq DNA polymerase (จากบริษัท Apsalagen Co. Ltd. (Bangkok, Thailand))
 - 2.2.2.7. Ultrapure water (Type 1 water)
 - 2.2.2.8. Ethidium bromide
 - 2.2.2.9. Agarose LE (จากบริษัท Axxygen, Spain)
 - 2.2.2.10. 1X TAE buffer
- 3. การทดลองวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยสร้างกราฟการเจริญ
 - 3.1. อุปกรณ์
 - 3.1.1. ปิเปต (micropipette) ขนาด 5,000, 1,000, 200, 20 และ 10 ไมโครลิตร
(จากบริษัท Eppendorf (Thailand) Co., Ltd. (Bangkok, Thailand))
 - 3.1.2. ทิป (tips) ขนาด 5,000, 1,000, 200 และ 10 ไมโครลิตร
(จากบริษัท Bioscience, Inc. (Pennsylvania, USA))
 - 3.1.3. ถุงมือยางไนไตรล์ (จากบริษัท Sri trang gloves (Suratthani, Thailand))
 - 3.1.4. ตู้อัดเชื้อ (จากบริษัท PMI-Labortechnik GmbH (Grafstal, Switzerland))
 - 3.1.5. เครื่องชั่งสาร (จากบริษัท Adam equipment (Connecticut, USA))
 - 3.1.6. กระดาษชั่งสาร
 - 3.1.7. พลาสติกพอลิเอทิลีนเทรฟทาเลตกลม (PET plastic bottle)
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 มิลลิเมตร
 - 3.1.8. ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร (จากบริษัท Corning Life Sciences
(Tewksbury, USA))
 - 3.1.9. ตะเกียงแอลกอฮอล์
 - 3.1.10. ไฟแช็ค

- 3.1.11. บีกเกอร์ขนาด 1,000 และ 250 มิลลิลิตร
(จากบริษัท Corning Life Sciences (Tewksbury, USA))
- 3.1.12. แท่งแก้วคนสาร
- 3.1.13. ขวดแก้วบรรจุสารขนาด 500 มิลลิลิตร
(จากบริษัท Schott AG (Hattenbergstrasse, Germany))
- 3.1.14. กระจกตวงขนาด 1,000 มิลลิลิตร
(จากบริษัท Schott AG (Hattenbergstrasse, Germany))
- 3.1.15. เครื่องวัดค่า pH (จากบริษัท Ionix (Robinson road, Singapore))
- 3.1.16. กระจกถิตยาขนาด 15 มิลลิลิตร (จากบริษัท Nipro (New Jersey, USA))
- 3.1.17. แผ่นกรองแบคทีเรียขนาด 0.45 ไมโครเมตร
(จากบริษัท GE Healthcare Life Sciences (Chicago, USA))
- 3.1.18. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
(จากบริษัท Bio-active Co., Ltd. (Bangkok, Thailand))
- 3.1.19. ตู้บ่มเขย่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
(จากบริษัท Labnet international Inc. (New jersey, USA))
- 3.1.20. คิวเวตต์ (จากบริษัท Eppendorf (Thailand) Co., Ltd. (Bangkok, Thailand))
- 3.1.21. Spectrophotometry
(จากบริษัท ThermoFisher Scientific (Thailand) Co. Ltd. (Bangkok, Thailand))
- 3.2. เคมีภัณฑ์
 - 3.2.1. แอมโมเนียมไนเตรท (Ammonium nitrate, NH_4NO_3 MW. เท่ากับ 80.044 กรัมต่อโมล)
 - 3.2.2. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogenphosphate, KH_2PO_4 MW. เท่ากับ 136.086 กรัมต่อโมล) (จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany))
 - 3.2.3. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โดเดคาไฮเดรต (Disodium hydrogenphosphate Dodecahydrate, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ MW. เท่ากับ 358.14 กรัมต่อโมล) (จากบริษัท BDH chemicals (United Kingdom))
 - 3.2.4. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต (Magnesium sulfat heptahydrate, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ MW. เท่ากับ 246.48 กรัมต่อโมล) (จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany))
 - 3.2.5. เฟอริกคลอไรด์ เฮกซะไฮเดรต (Ferric chloride hexahydrate, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ MW. เท่ากับ 270.29 กรัมต่อโมล) (จากบริษัท Sigma-Aldrich (Missouri, USA))
 - 3.2.6. แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต (Calcium chloride dihydrate, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ MW. เท่ากับ 147.01 กรัมต่อโมล) (จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany))
 - 3.2.7. ไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl MW. เท่ากับ 36.46 กรัมต่อโมล) (จากบริษัท RCI Labscan Co., LTD. (Bangkok, Thailand))
 - 3.2.8. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH MW. เท่ากับ 39.997 กรัมต่อโมล) (จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany))

บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง

1. การตัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพลาสติกพอลิเอทิลีนเทรฟทาเลต

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย คือ แบคทีเรียรหัส S3 S4 และ S7 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินจังหวัดสมุทรสาคร บริเวณที่ละติจูด $13^{\circ}38'39.1''\text{N}$ ลองจิจูดที่ $100^{\circ}15'51.5''\text{E}$ โดยนางสาวณัฐนรีแดงเอี่ยม (ณัฐนรีแดงเอี่ยม, 2561)

นำ stock culture แบคทีเรียรหัส S3, S4 และ S7 จากอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาตัดแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Carbon free mineral medium (CFMM) ที่ผสมพลาสติกพอลิเอทิลีนเทรฟทาเลต (PET) 0.5 กรัม (w/v) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเชยโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ผสมพลาสติก PET 0.1 กรัม (w/v) แล้วบ่มในสภาวะแบบเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อทำ Glycerol culture stock (อัตราส่วน 1: 1 v/v) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และศึกษาลักษณะของแบคทีเรียใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

หลังจากนั้นนำ stock culture แบคทีเรียรหัส S3, S4 และ S7 จากอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาตัดแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่ผสมพลาสติก PET 0.5 กรัม (w/v) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ศึกษาลักษณะของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM และลักษณะใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเปรียบเทียบกับ การตัดแยกแบคทีเรียชุดแรกซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หากพบลักษณะโคโลนีแตกต่างจากลักษณะโคโลนีแบคทีเรียรหัส S3 S4 และ S7 ทำ Glycerol culture stock (อัตราส่วน 1: 1 v/v) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสและกำหนดรหัสแก่แบคทีเรียที่คัดแยกได้เพิ่มเติม

2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA

2.1 การสกัดจีโนมิติเอ็นเอแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียรหัส S3, S4 และ S7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ผสมพลาสติก PET 0.1 กรัม แล้วบ่มในสภาวะแบบเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์แบคทีเรียโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาเติม TE buffer pH8 (10 mM Tris, pH8, 1 mM EDTA, pH8) ปริมาตร 280 ไมโครลิตรและ lysozyme (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติม 10% (w/v) SDS ปริมาตร 22.5 ไมโครลิตรและ RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม phenol 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากปั่นเหวี่ยง

ย้ายส่วนใสด้านบนไปยังหลอด microcentrifuge ใหม่และเติม chloroform ปริมาตรเท่ากับส่วนใส ผสมให้เข้ากันเบา ๆ และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ย้ายส่วนใสด้านบนไปยังหลอด microcentrifuge ใหม่และเติม 3M sodium acetate ปริมาตร 1/10 ของปริมาตรส่วนใส ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม absolute ethanol เย็นปริมาตรสองเท่าของสารทั้งหมด บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตกตะกอนจีโนมิกดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol เย็น ปริมาตรหนึ่งเท่าของสารละลายก่อนหน้า ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสออกและหลอด microcentrifuge คว่ำบนกระดาษทิชชูที่สะอาด ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตะกอนจีโนมิกดีเอ็นเอใน RNase free water ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของจีโนมิกดีเอ็นเอโดยวิธี spectrophotometric method และตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย 0.8% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโพลีซิส สารละลายจีโนมิกดีเอ็นเอส่วนที่เหลือ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 2.1 ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยมีองค์ประกอบดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' – 3')
27F	5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'
1492R	5'- GGTTACCTTGTTACGACTT -3'

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10X Reaction buffer	2
10 mM dNTPs	0.2
10 µM 27F primer	0.2
10 µM 1492R primer	0.2
50 mM MgCl ₂	1
Taq DNA polymerase	0.1
Template (genomic DNA 50 ng/µl)	1
RNase free water	15.3
ปริมาตรรวม	20

นำองค์ประกอบทั้งหมดใส่ลงในหลอด PCR จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycler โดยใช้สภาวะดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สภาวะการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที่)	รอบ
Initial denaturation	94	5	-
Denaturation	94	0.5	35
Annealing	57	0.5	
Extension	72	2	
Final extension	72	10	-

จากนั้นนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมาตรวจสอบด้วย 0.8 % อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโพลีซิสและนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

3. การทดลองวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

นำ glycerol culture stock ของแบคทีเรียเดิมและคัดแยกได้เพิ่มเติมจากข้อที่ 1 เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง carbon free mineral medium (CFMM) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เชื้อโคลนนี้เดี่ยวจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 20 มิลลิลิตรที่ผสมพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรพทาเลต (PET) 0.1 กรัม บ่มในสภาวะแบบเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที่ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำหัวเชื้อที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.05 OD และคำนวณความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้นโดยการทำให้ plate count technique ด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM จากนั้นนำหัวเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ใหม่ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ผสมพลาสติก PET 0.1 กรัม บ่มในสภาวะแบบเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที่ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน และตรวจติดตามการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ทุก ๆ 24 ชั่วโมง

บทที่ 4

ผลการทดลอง อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการทดลอง

1. การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพลาสติกพอลิเอทิลีนเทรฟทาเลต




จากการทดลองการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพลาสติกพอลิเอทิลีนเทรฟทาเลต แบคทีเรียรหัส S3 S4 และ S7 ที่คัดแยกจากดิน จังหวัดสมุทรสาคร บริเวณละติจูดที่ $13^{\circ}38'39.1''N$ และลองจิจูดที่ $100^{\circ}15'51.5''E$ โดยนางสาวณัฐรี แต่งเอี่ยม (ณัฐรี แต่งเอี่ยม, 2561) พบว่าเมื่อบ่มแบคทีเรียรหัส S3 S4 และ S7 จาก glycerol culture stock บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง carbon free mineral medium (CFMM) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โคโลนีแบคทีเรียรหัส S3 S4 และ S7 เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ในส่วนของโคโลนีแบคทีเรียรหัส S7 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนั้นพบว่ามีสองลักษณะคือ โคโลนีสีขาวและโคโลนีสีเหลืองเจริญทับกัน (ตารางที่ 4) ดังนั้นจึงคัดแยกโคโลนีสีขาวและสีเหลืองออกจากกันโดยแยกโคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM และซัดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ใหม่ และตั้งชื่อรหัสโคโลนีสีขาวและโคโลนีสีเหลืองจาก glycerol culture stock ของแบคทีเรียรหัส S7 คือ S7-W และ S7-Y ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

หลังจากชั่วโมงที่ 72 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแบคทีเรียรหัส S3 และ S4 พบการเจริญของโคโลนีลักษณะอื่น คือโคโลนีสีขาวขุ่นกลมโดยโคโลนีดังกล่าวบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแบคทีเรียรหัส S3 จะมีขนาดโคโลนีขนาดใหญ่กว่าโคโลนีในงานเพาะเชื้อแบคทีเรียรหัส S4 เล็กน้อยและตั้งชื่อรหัสโคโลนีสีขาวขุ่นจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแบคทีเรียรหัส S3 และ S4 คือ S3-W และ S4-W ตามลำดับ (ตารางที่ 5) รวมถึงคัดแยกและซัดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ใหม่และทำ glycerol culture stock ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งรหัส S7 พบโคโลนีสีขาวใสกลมขนาดเล็กเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM คัดแยกและซัดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ใหม่และทำ glycerol culture stock รวมถึงตั้งชื่อรหัสโคโลนีสีขาวใสจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแบคทีเรียรหัส S7 คือ S7-LW (ตารางที่ 5)

เมื่อย้อมแกรมเพื่อศึกษาลักษณะพื้นฐานของแบคทีเรียรหัส S3 S3-W S4 S4-W S7-W และ S7-Y ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบลักษณะพื้นฐานของแบคทีเรีย 2 รูปแบบที่แตกต่างกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ตารางที่ 7) ดังนั้นทำการคัดแยกแบคทีเรียอีกครั้งโดยเพิ่มระยะเวลาการบ่มเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM จากเดิมระยะเวลาการบ่มเชื้อคือ 72 ชั่วโมงเป็น 120 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อให้โคโลนีของแบคทีเรียนอกเหนือจากโคโลนีของแบคทีเรียรหัส S3 S4 และ S7 ที่เจริญได้เข้าเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM พบว่าบนงานเพาะเชื้อแบคทีเรียรหัส S3 และ S4 พบโคโลนีสีขาวกลมเจริญซึ่งมีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียรหัส S3-W และ S4-W ในส่วนของงานเพาะเชื้อแบคทีเรียรหัส S7 นั้นพบโคโลนีสีขาวใสกลมเจริญร่วม ลักษณะโคโลนีคล้ายกับโคโลนีรหัส S7-LW จากการคัดแยกแบคทีเรียครั้งแรก (ตารางที่ 6)

หลังจากบ่มเชื้อครบ 120 ชั่วโมง ย้อมแกรมเพื่อศึกษาลักษณะพื้นฐานจากโคโลนีเดี่ยวพบลักษณะพื้นฐานของแบคทีเรีย 2 รูปแบบที่แตกต่างกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์เช่นเดียวกับการคัดแยกแบคทีเรียในครั้งแรก

ตารางที่ 4 ลักษณะโคโลนีแบคทีเรียรหัส S3 S4 และ S7 จาก glycerol culture stock บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ระยะเวลาบ่ม 72 ชั่วโมง


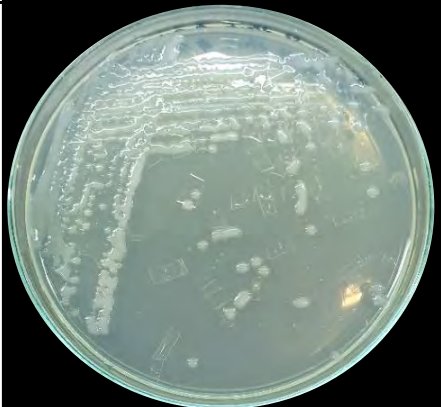
รหัส แบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM	รูปลักษณะโคโลนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM
S3	โคโลนีสีขาวใสกลม นูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ขอบเกลี้ยง ขนาดเล็ก	
S4	โคโลนีสีขาวใสกลม นูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ขอบเกลี้ยง ขนาดเล็ก	
S7	โคโลนีสีขาวขุ่นกลม นูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ขอบเกลี้ยง ขนาดเล็ก โคโลนีสีเหลืองกลม นูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ขอบเกลี้ยง ขนาดเล็ก	

ตารางที่ 5 ชื่อรหัสแบคทีเรียจาก glycerol culture stock เดิมและคัดแยกเพิ่มเติมจาก S3 S4 และ S7 glycerol culture stock บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM

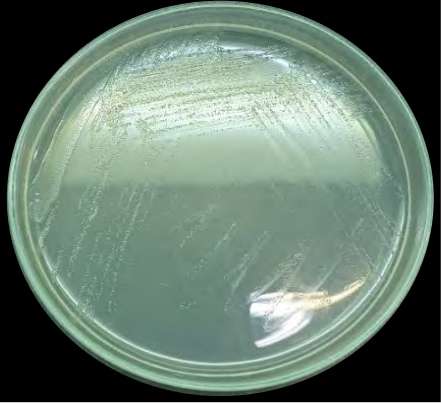
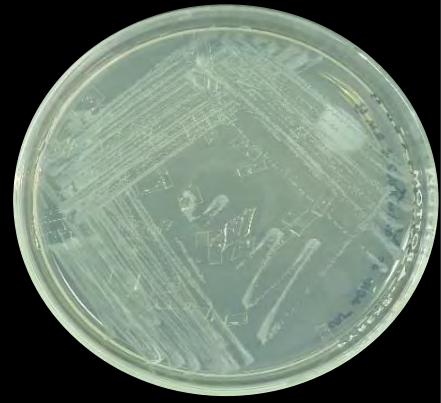
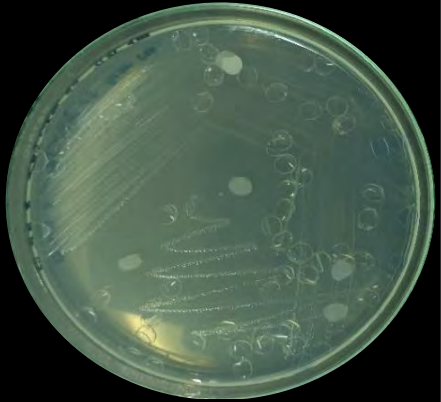

Glycerol culture stock	ประเภท	รหัส	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM
S3	glycerol culture stock เดิม	S3	โคโลนีสีขาวใสกลม
	คัดแยกเพิ่มเติม	S3-W	โคโลนีสีขาวขุ่นกลม
S4	glycerol culture stock เดิม	S4	โคโลนีสีขาวใสกลม
	คัดแยกเพิ่มเติม	S4-W	โคโลนีสีขาวขุ่นกลม
S7	คัดแยกเพิ่มเติม	S7-W	โคโลนีสีขาวขุ่นกลม
	คัดแยกเพิ่มเติม	S7-Y	โคโลนีสีเหลืองกลม
	คัดแยกเพิ่มเติม	S7-LW	โคโลนีสีขาวใสกลม

หมายเหตุ แบคทีเรียรหัส S7-W และ S7-Y เกิดจากการคัดแยกโคโลนีที่เจริญซ้อนทับกันจาก culture glycerol stock แบคทีเรียรหัส S7


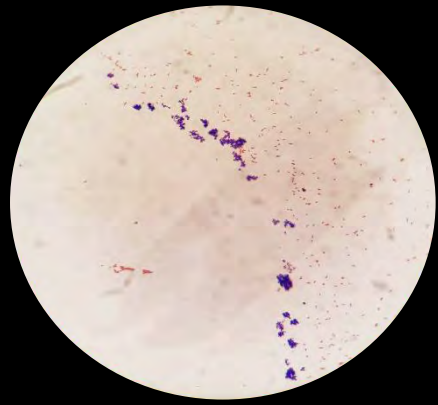
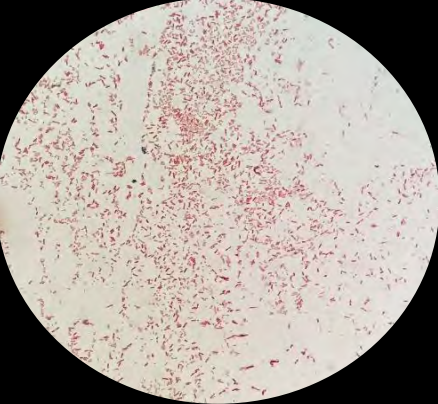
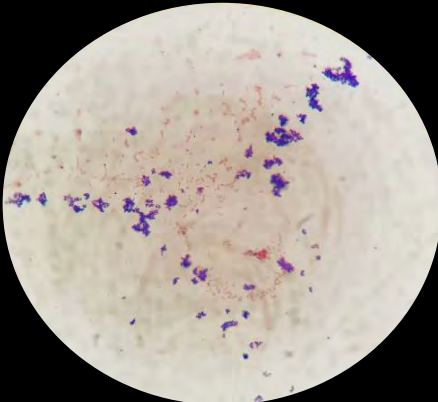
ตารางที่ 6 ลักษณะโคโลนีแบคทีเรียรหัส S3 S4 และ S7 จาก glycerol culture stock บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ระยะเวลาบ่ม 120 ชั่วโมง

รหัสแบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM	รูปลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM
S3	โคโลนีสีขาวใสกลม นูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ขอบเกลี้ยง ขนาดเล็ก	
S3-W	โคโลนีสีขาวขุ่นกลม นูน ผิวเรียบ ขอบเกลี้ยง ขนาดเล็ก	

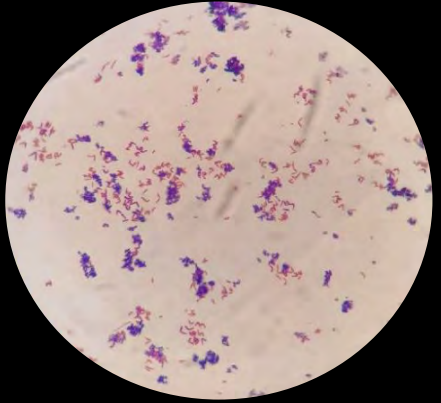
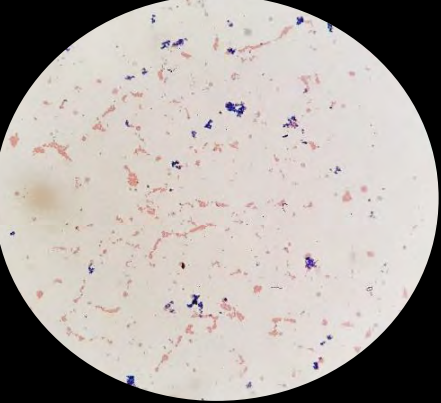
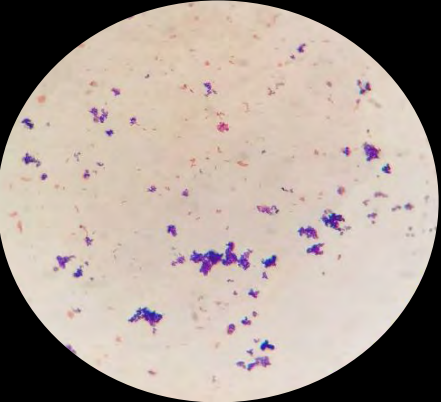
ตารางที่ 6 ลักษณะโคโลนีแบคทีเรียรหัส S3 S4 และ S7 จาก glycerol culture stock บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ระยะเวลาบ่ม 120 ชั่วโมง (ต่อ)

รหัส แบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM	รูปลักษณะโคโลนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM
S4	โคโลนีสีขาวใสกลม นูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ขอบเกลี้ยง ขนาดเล็ก	
S7-W	โคโลนีสีขาวขุ่นกลม นูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ขอบเกลี้ยง ขนาดเล็ก	
S7-LW	โคโลนีสีขาวใสกลม นูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ขอบเกลี้ยง ขนาดเล็ก	
S7-Y	โคโลนีสีเหลืองกลม นูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ขอบเกลี้ยง ขนาดเล็ก	

ตารางที่ 7 ลักษณะสัณฐานแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

รหัส แบคทีเรีย	ลักษณะสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์	รูปลักษณะสัณฐานภายใต้กล้อง จุลทรรศน์
S3	แบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะท่อนสั้น แบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะท่อนสั้น	
S3-W	แบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะท่อนสั้น แบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะท่อนสั้น	
S4	แบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะท่อนสั้น แบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะท่อนสั้น	
S4-W	แบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะท่อนสั้น แบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะท่อนสั้น	

ตารางที่ 7 ลักษณะสีฐานแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ต่อ)

รหัส แบคทีเรีย	ลักษณะสีฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์	รูปลักษณะสีฐานภายใต้กล้อง จุลทรรศน์
S7-W	แบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะท่อนสั้น แบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะท่อนยาว	
S7-LW	แบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะท่อนสั้น แบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะท่อนยาว	
S7-Y	แบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะท่อนสั้น แบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะท่อนยาว	

2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA

เมื่อนำ glycerol culture stock ของแบคทีเรียรหัส S3 S4 และ S7 มาคัดแยกแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM แล้ว วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียรหัส S3 และ S7 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในฐานข้อมูล GenBank คือ *Moraxella osloensis* strain 1910ICU268 และ *Gordonia desulfuricans* strain ASO3D ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

การเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank ของแบคทีเรียรหัส S3 และ S7 ไม่ตรงกับการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของนางสาวณัฐนรี แต่งเอี่ยม (ณัฐนรี แต่งเอี่ยม, 2561) อาจเกิดขึ้นจากการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA

ตารางที่ 8 ผลของการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank

รหัสแบคทีเรีย	จำนวนนิวคลีโอไทด์ (bp)	แบคทีเรีย	กลุ่มเสี่ยง	Percent identity	Accession no.
S3	1339	<i>Moraxella osloensis</i> strain 1910ICU268	2	100% (1339/1339)	MT225644.1
S7	1186	<i>Gordonia desulfuricans</i> strain ASO3D	2	99.92% (1185/1186)	KY888689.1

หมายเหตุ แบคทีเรียรหัส S4 ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เนื่องจากเกิดปัญหาในการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

3. การทดลองวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

จากการทดลองวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียพบว่าความเข้มข้นของหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นรหัส S3 S3-W S4 S7-W และ S7-Y เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยมีค่าประมาณ 0.05 OD และทำ plate count technique 2 วิธี คือ วิธี spread plate ที่ความเจือจาง 10^{-4} ถึง 10^{-6} และวิธี drop plate ที่ความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-6} บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง carbon free mineral medium (CFMM) จากนั้นนับโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM จากวิธี spread plate และวิธี drop plate (ตารางที่ 10 และ 11) นำจำนวนโคโลนีจากวิธี spread plate คำนวณความเข้มข้นของหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นรหัส S3, S3-W, S4, S7-W และ S7-Y ได้ดังนี้ 2.50×10^8 , 2.47×10^8 , 1.44×10^7 , 1.32×10^8 และ 4.70×10^6 CFU/ml. ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

ทำ plate count technique ด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง nutrient agar (NA) เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 5 รหัสว่ามีความแตกต่างจากการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM หรือไม่ พบว่าการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 5 รหัส บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA ด้วยวิธี spread plate ไม่สามารถนับจำนวนโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งได้ เนื่องจากจำนวนโคโลนี

บนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งมากกว่า 300 โคโลนีและโคโลนีทั้งสองลักษณะเจริญซ้อนทับกัน ดังนั้นจึงวิธี drop plate บนอาหารเลี้ยงแข็ง NA แทน พบว่าแบคทีเรียรหัส S3 และ S3-W ไม่สามารถนับจำนวนโคโลนีได้เนื่องจากโคโลนีเจริญซ้อนทับกัน แต่แบคทีเรียรหัส S4, S7-W และ S7-Y สามารถนับโคโลนีได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ non-synthetic medium ที่ใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ห้องปฏิบัติการได้หลากหลายชนิดเนื่องจากมีแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจนและแร่ธาตุอื่น ๆ ที่เพียงพอและเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้นแบคทีเรียทั้ง 5 รหัสจึงเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ selective medium ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรพทาเลต (PET) ซึ่งการเข้าถึงแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียทั้ง 5 รหัสนี้น้อยกว่าแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA

คำนวณปริมาณเชื้อเริ่มต้น (CFU/ml.) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ในการทดลองวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยวิธี spread plate

$$\text{สูตรคำนวณ CFU/ml.} = \frac{\text{(number of colony)} \times \text{(dilution factor)}}{\text{Volume of spread plate}}$$

ตารางที่ 9 ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น (CFU/ml.) ในการทดลองวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

รหัสแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนีบนความเจือจาง			CFU/ml.
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
S3	TNTC	229	29	2.50 × 10 ⁸
	TNTC	271	23	
S3-W	TNTC	238	29	2.47 × 10 ⁸
	TNTC	257	29	
S4	166	10	2	1.44 × 10 ⁷
	123	10	0	
S7-W	TNTC	119	12	1.32 × 10 ⁸
	TNTC	146	9	
S7-Y	46	5	0	4.70 × 10 ⁶
	48	8	1	

หมายเหตุ TNTC คือ too numerous to count (>300)

ตารางที่ 10 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรีย รหัส S3 S3-W S4 S7-W และ S7-Y โดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM

รหัสแบคทีเรีย	ความเจือจาง	จำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM	
		1	2
S3	10^{-4}	TNTC	TNTC
	10^{-5}	229	271
	10^{-6}	29	23
S3-W	10^{-4}	TNTC	TNTC
	10^{-5}	238	257
	10^{-6}	29	29
S4	10^{-4}	166	123
	10^{-5}	10	10
	10^{-6}	2	0
S7-W	10^{-4}	TNTC	TNTC
	10^{-5}	119	146
	10^{-6}	12	9
S7-Y	10^{-4}	46	48
	10^{-5}	5	8
	10^{-6}	0	1

หมายเหตุ TNTC คือ too numerous to count (>300) และภาคผนวก ค รูปที่ 24 และ 25

ตารางที่ 11 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียรหัส S3 S3-W S4 S7-W และ S7-Y โดยวิธี drop plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM

รหัส แบคทีเรีย	ความเจือจาง	จำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM		
		1	2	3
S3	10^{-1}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-2}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-3}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-4}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-5}	17	15	14
	10^{-6}	2	3	5
S3-W	10^{-1}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-2}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-3}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-4}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-5}	19	20	19
	10^{-6}	4	2	3
S4	10^{-1}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-2}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-3}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-4}	25	31	35
	10^{-5}	2	5	3
	10^{-6}	0	0	0
S7-W	10^{-1}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-2}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-3}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-4}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-5}	12	10	10
	10^{-6}	1	1	0
S7-Y	10^{-1}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-2}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-3}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-4}	5	7	4
	10^{-5}	1	1	0
	10^{-6}	0	0	0

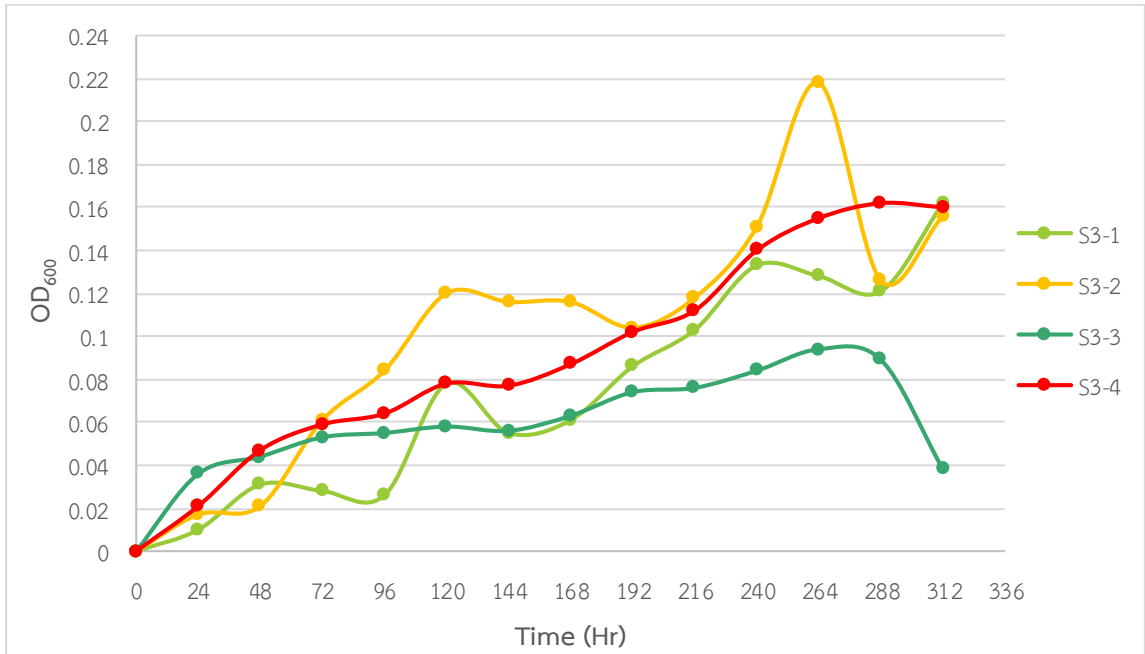
หมายเหตุ TNTC คือ too numerous to count (>300) และภาคผนวก ค รูปที่ 26 ถึง 30

หลังจากคำนวณความเข้มข้นของหัวเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 รหัสแล้ว นำหัวเชื้อดังกล่าว ทำการทดลองวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว carbon free mineral medium (CFMM) และตรวจติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 14 วัน พบว่าช่วงการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดนั้นมี lag phase, log phase และ stationary phase แตกต่างกันในแต่ละรหัสแบคทีเรีย สืบเนื่องจากแบคทีเรียแต่ละรหัสนั้นไม่ใช่แบคทีเรียชนิดเดียว ถึงแม้ว่าจะทำการคัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ selective medium หลายครั้งจนได้โคลนเดี่ยวแล้วก็ตาม เมื่อนำโคลนเดี่ยวดังกล่าวเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ซึ่งมีพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรพทาเลต (PET) 0.1 กรัม และตรวจติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ละรหัส พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้แต่ละชุดการทดลองทั้ง 4 ชุด ของแบคทีเรียแต่ละรหัสนั้น ไม่สอดคล้องกับทฤษฎีการเจริญของแบคทีเรีย

การเจริญของแบคทีเรียรหัส S3 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 ถึงชั่วโมงที่ 264 นั้นมีความแปรปรวนในแต่ละชุดการทดลองออกเป็น 2 รูปแบบ โดยรูปแบบแรกคาดว่ามีช่วง log phase 2 ช่วง คือ ช่วงแรกตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 ถึงชั่วโมงที่ 120 และช่วงที่ 2 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 216 ถึงชั่วโมงที่ 264 (รูปที่ 14; ภาคผนวกรูปที่ 38 และ 39; ตารางที่ 12) โดยช่วงที่ 2 นั้นมีค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่าช่วงแรก รูปแบบที่สอง ชั่วโมงที่ 48 ถึงชั่วโมงที่ 264 นั้นมีค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนค่าคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 264 (รูปที่ 14; ภาคผนวก ค รูปที่ 40 และ 41; ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S3 ทั้ง 4 ชุดการทดลอง

ชั่วโมง	ค่าเฉลี่ยความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เฉลี่ยของชุดการทดลอง			
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	ชุดที่ 4
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.010	0.017	0.036	0.021
48	0.031	0.021	0.044	0.047
72	0.028	0.061	0.053	0.059
96	0.026	0.084	0.055	0.064
120	0.078	0.120	0.058	0.078
144	0.055	0.116	0.056	0.077
168	0.061	0.116	0.063	0.087
192	0.086	0.104	0.074	0.102
216	0.103	0.118	0.076	0.112
240	0.133	0.151	0.084	0.140
264	0.128	0.218	0.094	0.155
288	0.121	0.126	0.089	0.162
312	0.162	0.156	0.038	0.160

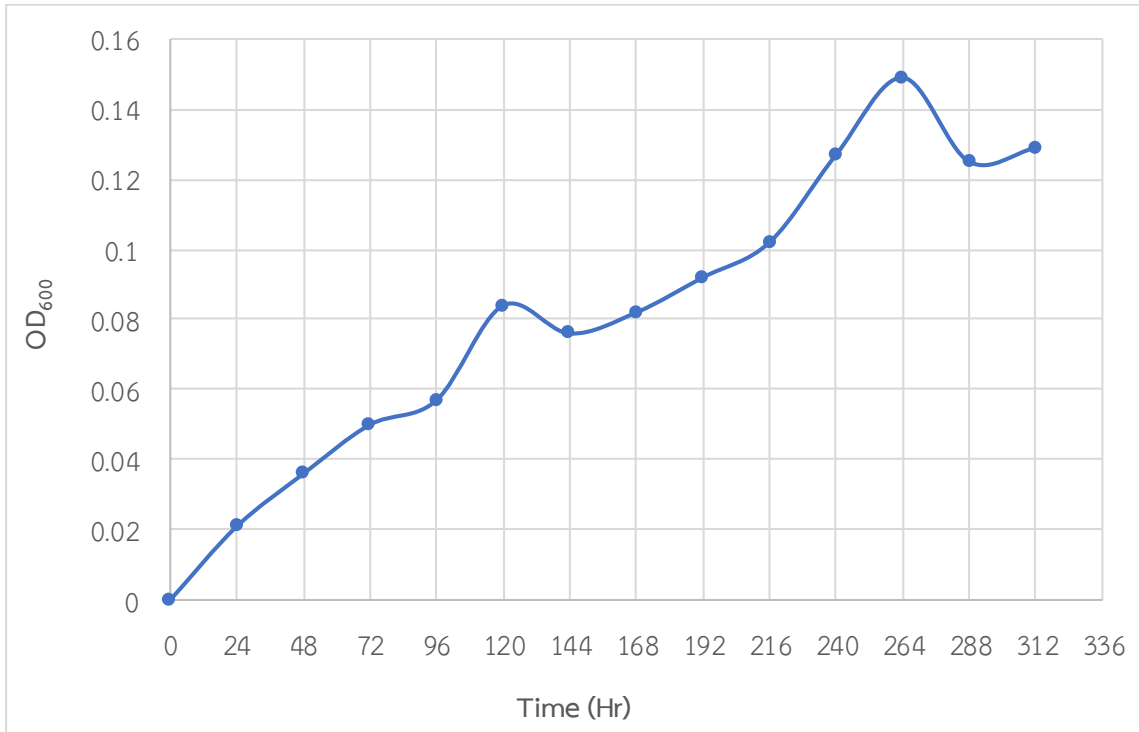


รูปที่ 14 กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S3 ทั้ง 4 ชุดการทดลอง

กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S3 นั้นไม่สามารถเห็นช่วง lag phase ได้ชัดเจนและตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 จนกระทั่งชั่วโมงที่ 264 มีค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้นโดยชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 144 คาดว่าเป็นช่วง log phase ที่หนึ่งและชั่วโมงที่ 216 ถึงชั่วโมงที่ 264 คาดว่าเป็นช่วง log phase ที่สอง อีกทั้งไม่เห็นช่วง stationary phase ที่ชัดเจนและหลังจากชั่วโมงที่ 264 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง (รูปที่ 15; ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S3

ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เฉลี่ยของชุดการทดลอง				ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	ชุดที่ 4	
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.010	0.017	0.036	0.021	0.021
48	0.031	0.021	0.044	0.047	0.036
72	0.028	0.061	0.053	0.059	0.050
96	0.026	0.084	0.055	0.064	0.057
120	0.078	0.120	0.058	0.078	0.084
144	0.055	0.116	0.056	0.077	0.076
168	0.061	0.116	0.063	0.087	0.082
192	0.086	0.104	0.074	0.102	0.092
216	0.103	0.118	0.076	0.112	0.102
240	0.133	0.151	0.084	0.140	0.127
264	0.128	0.218	0.094	0.155	0.149
288	0.121	0.126	0.089	0.162	0.125
312	0.162	0.156	0.038	0.160	0.129



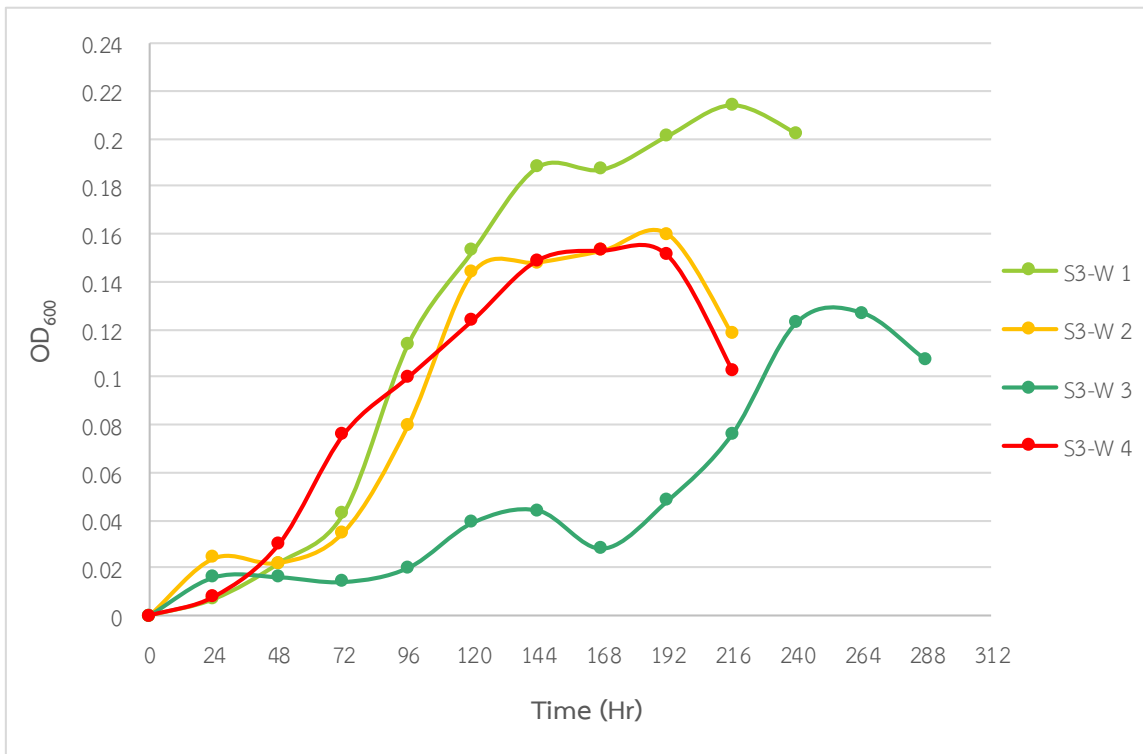
รูปที่ 15 กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S3

การเจริญของแบคทีเรียรหัส S3-W แสดงช่วง lag และ log phase ส่วนใหญ่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 120-144 (รูปที่ 16; ภาคผนวก ค รูปที่ 42 43 และ 45; ตารางที่ 14) แต่ชุดการทดลองที่ 3 มีช่วงดังกล่าวยาวกว่าอีก 3 ชุดการทดลองอย่างมาก (รูปที่ 16; ภาคผนวก ค รูปที่ 44; ตารางที่ 14) และมีค่าการดูดกลืนแสงชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 168 มีค่าขึ้นลงอย่างเห็นได้ชัด อาจเกิดจากการเจริญเพิ่มจำนวนของเชื้อผสมในชุดการทดลองที่แตกต่างกันจึงเกิดช่วงที่กราฟแปรปรวนขึ้น แบคทีเรียชนิดแรกอาจจะเริ่มเข้าสู่ช่วง log phase ก่อนที่ชั่วโมง 96 ถึงชั่วโมงที่ 144 และช่วง log phase ที่สอง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 168 ถึงชั่วโมงที่ 240 รวมถึงมีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงกว่าช่วง log phase แรก คาดว่าเป็นการเจริญของแบคทีเรียอีกชนิดรวมกับการเจริญของแบคทีเรียชนิดแรกในช่วง log phase แรก

ตารางที่ 14 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S3-W ทั้ง 4 ชุดการทดลอง

ชั่วโมง	ค่าเฉลี่ยความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เฉลี่ยของชุดการทดลอง			
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	ชุดที่ 4
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.007	0.024	0.016	0.008
48	0.022	0.022	0.016	0.030
72	0.043	0.035	0.014	0.076
96	0.114	0.080	0.020	0.100
120	0.153	0.144	0.039	0.124
144	0.188	0.148	0.044	0.149
168	0.187	0.153	0.028	0.153
192	0.201	0.160	0.048	0.151
216	0.214	0.118	0.076	0.103
240	0.202	-	0.123	-
264	-	-	0.127	-
288	-	-	0.107	-

หมายเหตุ - คือ ไม่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

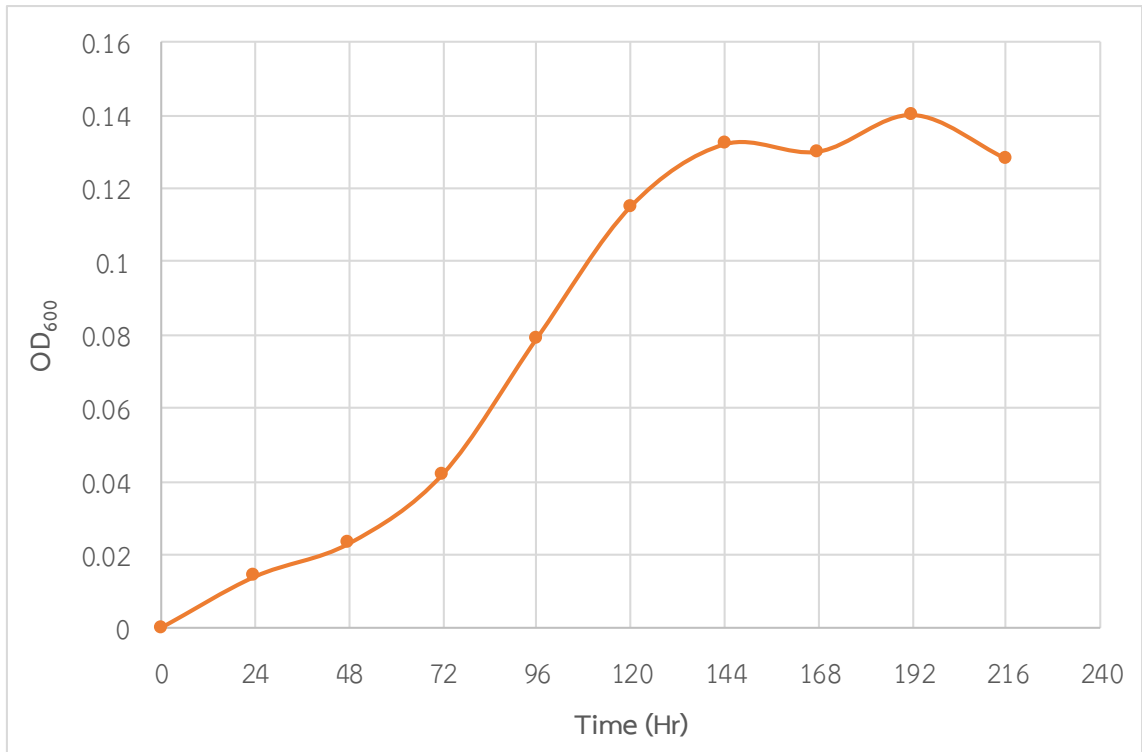


รูปที่ 16 กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S3-W ทั้ง 4 ชุดการทดลอง

กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S3-W นั้นช่วง lag และ log phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 144 และเข้าสู่ช่วง stationary phase หลังจากชั่วโมงที่ 144 (รูปที่ 17; ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S3-W

ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เฉลี่ยของชุดการทดลอง				ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	ชุดที่ 4	
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.007	0.024	0.016	0.008	0.014
48	0.022	0.022	0.016	0.030	0.023
72	0.043	0.035	0.014	0.076	0.042
96	0.114	0.080	0.020	0.100	0.079
120	0.153	0.144	0.039	0.124	0.115
144	0.188	0.148	0.044	0.149	0.132
168	0.187	0.153	0.028	0.153	0.130
192	0.201	0.160	0.048	0.151	0.140
216	0.214	0.118	0.076	0.103	0.128



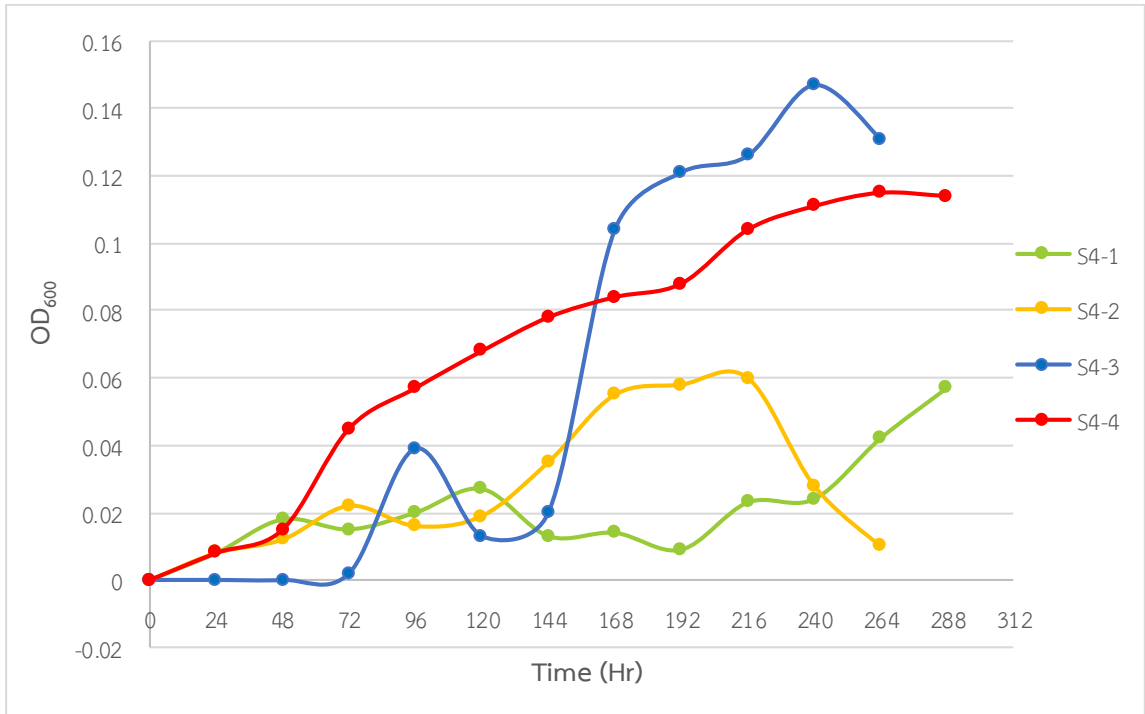
รูปที่ 17 กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S3-W

การเจริญของแบคทีเรียรหัส S4 นั้นมีค่าการดูดกลืนแสงที่น้อยมากเมื่อเทียบกับแบคทีเรียรหัสอื่น ๆ รวมถึงช่วง lag log และ stationary phase ที่ค่อนข้างแปรปรวนมาก ชุดการทดลองที่ 1 มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นและลดลงสลับกันไปอย่างสม่ำเสมอระหว่างชั่วโมงที่ 48 ถึงชั่วโมงที่ 240 (รูปที่ 18; ภาคผนวก ค รูปที่ 46; ตารางที่ 16) จนไม่สามารถคาดการณ์ log phase ของเชื้อผสมแต่ละตัวได้อย่างชัดเจน อีกทั้งชุดการทดลองที่ 2 และ 3 มีลักษณะคล้ายกับชุดการทดลองที่ 1 แต่มีความแปรปรวนช่วงเวลาดังกล่าวน้อยกว่า โดยชุดการทดลองที่ 2 คาดว่าช่วง log phase แรก ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 ถึงชั่วโมงที่ 96 และตั้งแต่ชั่วโมงที่ 120 ถึงชั่วโมงที่ 168 คาดว่าเป็นช่วง log phase ที่สอง (รูปที่ 18; ภาคผนวก ค รูปที่ 47; ตารางที่ 16) ส่วนชุดการทดลองที่ 3 นั้นคาดว่าจะมีช่วง log phase สองช่วงเช่นกันแต่ช่วง log phase แรกนั้นไม่ชัดเจนและช่วง log phase ที่สองนั้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 120 ถึงชั่วโมงที่ 192 (รูปที่ 18; ภาคผนวก ค รูปที่ 48; ตารางที่ 16) ส่วนชุดการทดลองชุดที่ 4 นั้นมีค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นสม่ำเสมอจนถึงชั่วโมงที่ 216 (รูปที่ 18; ภาคผนวก ค รูปที่ 49; ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S4 ทั้ง 4 ชุดการทดลอง

ชั่วโมง	ค่าเฉลี่ยความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เฉลี่ยของชุดการทดลอง			
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	ชุดที่ 4
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.008	0.008	0.000	0.008
48	0.018	0.012	0.000	0.015
72	0.015	0.022	0.002	0.045
96	0.020	0.016	0.039	0.057
120	0.027	0.019	0.013	0.068
144	0.013	0.035	0.020	0.078
168	0.014	0.055	0.104	0.084
192	0.009	0.058	0.121	0.088
216	0.023	0.060	0.126	0.104
240	0.024	0.028	0.147	0.111
264	0.042	0.010	0.131	0.115
288	0.057	-	-	0.114

หมายเหตุ - คือ ไม่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

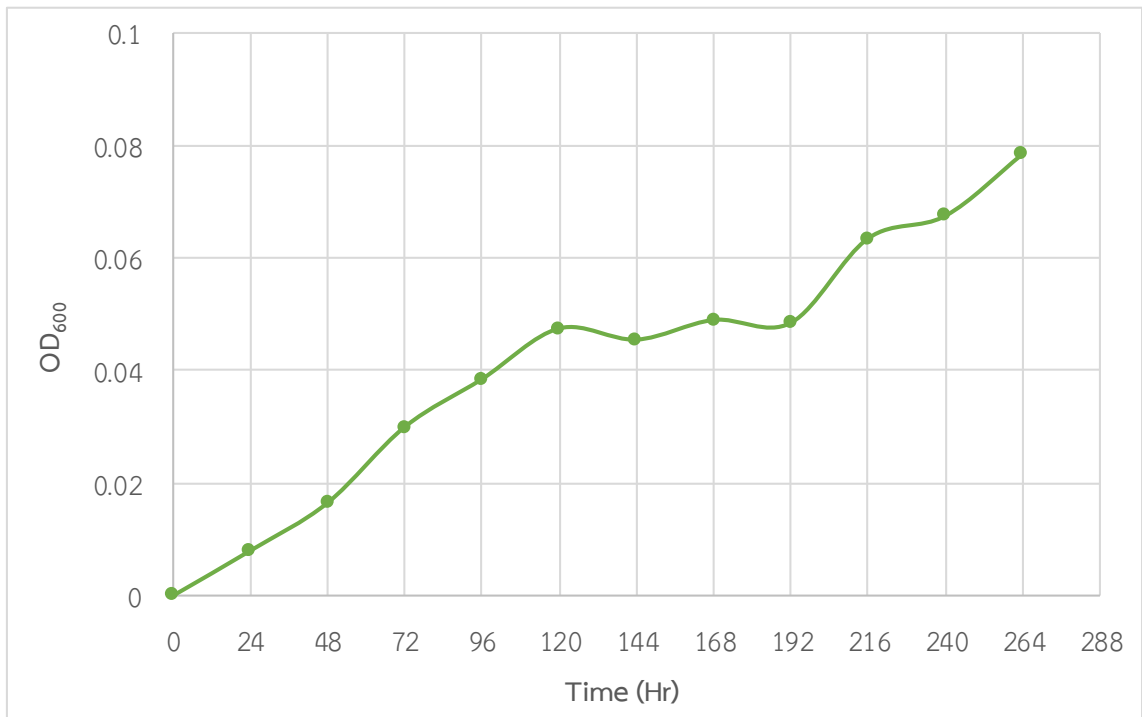


รูปที่ 18 กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S4 ทั้ง 4 ชุดการทดลอง

กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S4 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรที่น้อยมาก (ต่ำกว่า 0.1 OD) และช่วง lag และ log phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 120 และเข้าสู่ช่วง stationary phase หลังจากชั่วโมงที่ 120 ถึงชั่วโมงที่ 192 แต่หลังจาก ชั่วโมงที่ 192 นั้นค่าการดูดกลืนแสงนั้นมีค่าที่เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ (รูปที่ 19; ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S4

ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เฉลี่ยของชุดการทดลอง				ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	ชุดที่ 4	
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.008	0.008	0.000	0.008	0.008
48	0.018	0.012	0.000	0.015	0.016
72	0.015	0.022	0.002	0.045	0.030
96	0.020	0.016	0.039	0.057	0.038
120	0.027	0.019	0.013	0.068	0.048
144	0.013	0.035	0.020	0.078	0.046
168	0.014	0.055	0.104	0.084	0.049
192	0.009	0.058	0.121	0.088	0.048
216	0.023	0.060	0.126	0.104	0.064
240	0.024	0.028	0.147	0.111	0.068
264	0.042	0.010	0.131	0.115	0.078

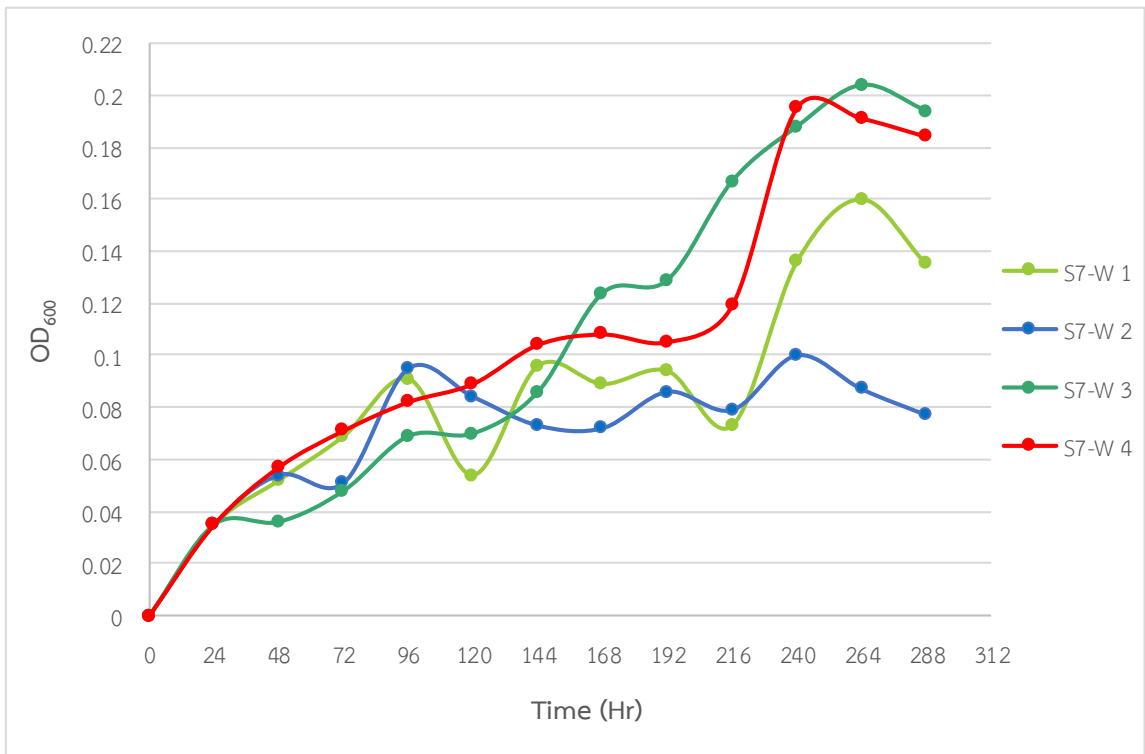


รูปที่ 19 กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S4

การเจริญของแบคทีเรียรหัส S7-W พบว่าไม่สามารถเห็นช่วง lag phase และ stationary phase ได้ชัดเจนทั้ง 4 ชุดการทดลองและมี 2 รูปแบบ คือ กราฟการเจริญตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 ถึงชั่วโมงที่ 216 มีค่าการดูดกลืนแสงขึ้นลงเมื่อระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้นพบว่ามี 2 ชุดการทดลองโดยชุดการทดลองที่ 2 นั้นมีค่าดูดกลืนแสงขึ้นลงจนไม่เห็นช่วง log phase (รูปที่ 20; ภาคผนวก ค รูปที่ 51; ตารางที่ 18) และชุดการทดลองที่ 1 นั้นมีช่วงดังกล่าวที่แปรปรวนและคาดว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 216 ถึงชั่วโมงที่ 264 เป็นช่วง log phase (รูปที่ 20; ภาคผนวก ค รูปที่ 50; ตารางที่ 18) ชุดการทดลองที่ 3 และ 4 มีรูปแบบคือ กราฟการเจริญที่ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้นแต่ไม่เห็นระยะ stationary phase ที่ชัดเจนทั้งสองชุดการทดลอง (รูปที่ 20; ภาคผนวก ค รูปที่ 52 และ 53; ตารางที่ 18) ชุดทดลองที่ 4 คาดว่าช่วง log phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 192 ถึงชั่วโมงที่ 240

ตารางที่ 18 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S7-W ทั้ง 4 ชุดการทดลอง

ชั่วโมง	ค่าเฉลี่ยความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เฉลี่ยของชุดการทดลอง			
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	ชุดที่ 4
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.035	0.035	0.035	0.035
48	0.052	0.054	0.036	0.057
72	0.069	0.051	0.048	0.071
96	0.091	0.095	0.069	0.082
120	0.054	0.084	0.070	0.089
144	0.096	0.073	0.086	0.104
168	0.089	0.072	0.124	0.108
192	0.094	0.086	0.129	0.105
216	0.073	0.079	0.167	0.119
240	0.136	0.100	0.188	0.195
264	0.160	0.087	0.204	0.191
288	0.135	0.077	0.194	0.184

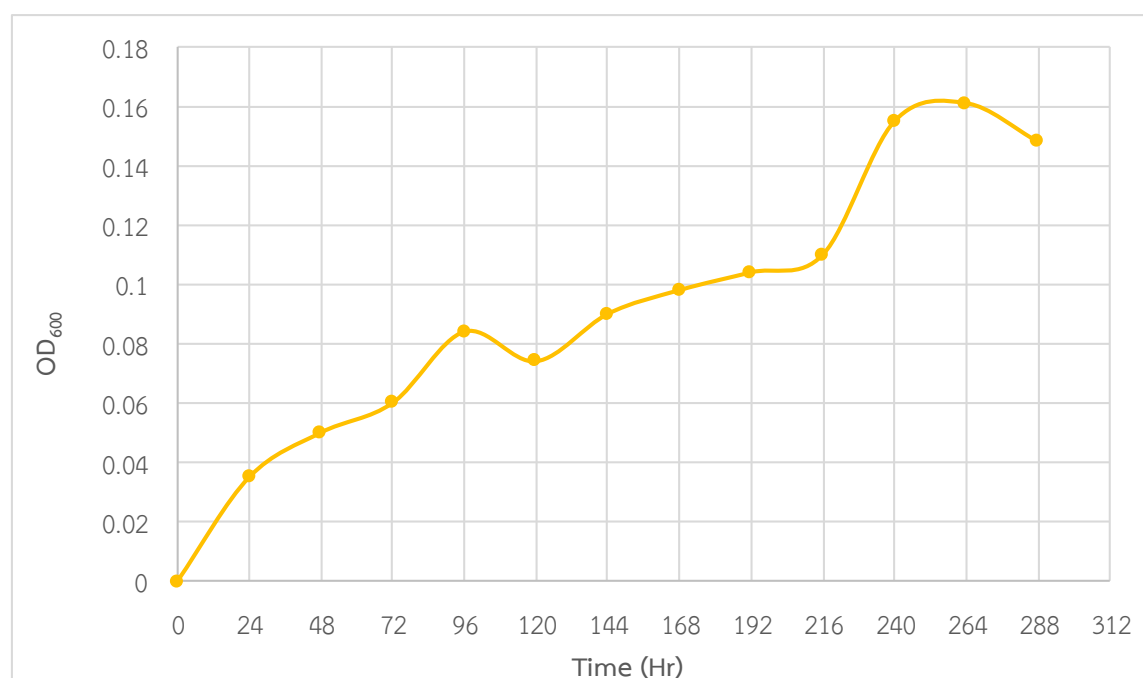


รูปที่ 20 กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S7-W ทั้ง 4 ชุดการทดลอง

กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S7-W นั้นไม่สามารถเห็นช่วง lag phase และ stationary phase ได้ชัดเจนและตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 จนกระทั่งชั่วโมงที่ 264 มีค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้นโดยชั่วโมงที่ 72 ถึงชั่วโมงที่ 120 คาดว่าเป็นช่วง log phase ที่หนึ่งและชั่วโมงที่ 192 ถึงชั่วโมงที่ 240 คาดว่าเป็นช่วง log phase ที่สอง อีกทั้งหลังจากชั่วโมงที่ 264 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง (รูปที่ 21; ตารางที่ 19)

ตารางที่ 19 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S7-W

ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เฉลี่ยของชุดการทดลอง				ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	ชุดที่ 4	
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035
48	0.052	0.054	0.036	0.057	0.050
72	0.069	0.051	0.048	0.071	0.060
96	0.091	0.095	0.069	0.082	0.084
120	0.054	0.084	0.070	0.089	0.074
144	0.096	0.073	0.086	0.104	0.090
168	0.089	0.072	0.124	0.108	0.098
192	0.094	0.086	0.129	0.105	0.104
216	0.073	0.079	0.167	0.119	0.110
240	0.136	0.100	0.188	0.195	0.155
264	0.160	0.087	0.204	0.191	0.161
288	0.135	0.077	0.194	0.184	0.148

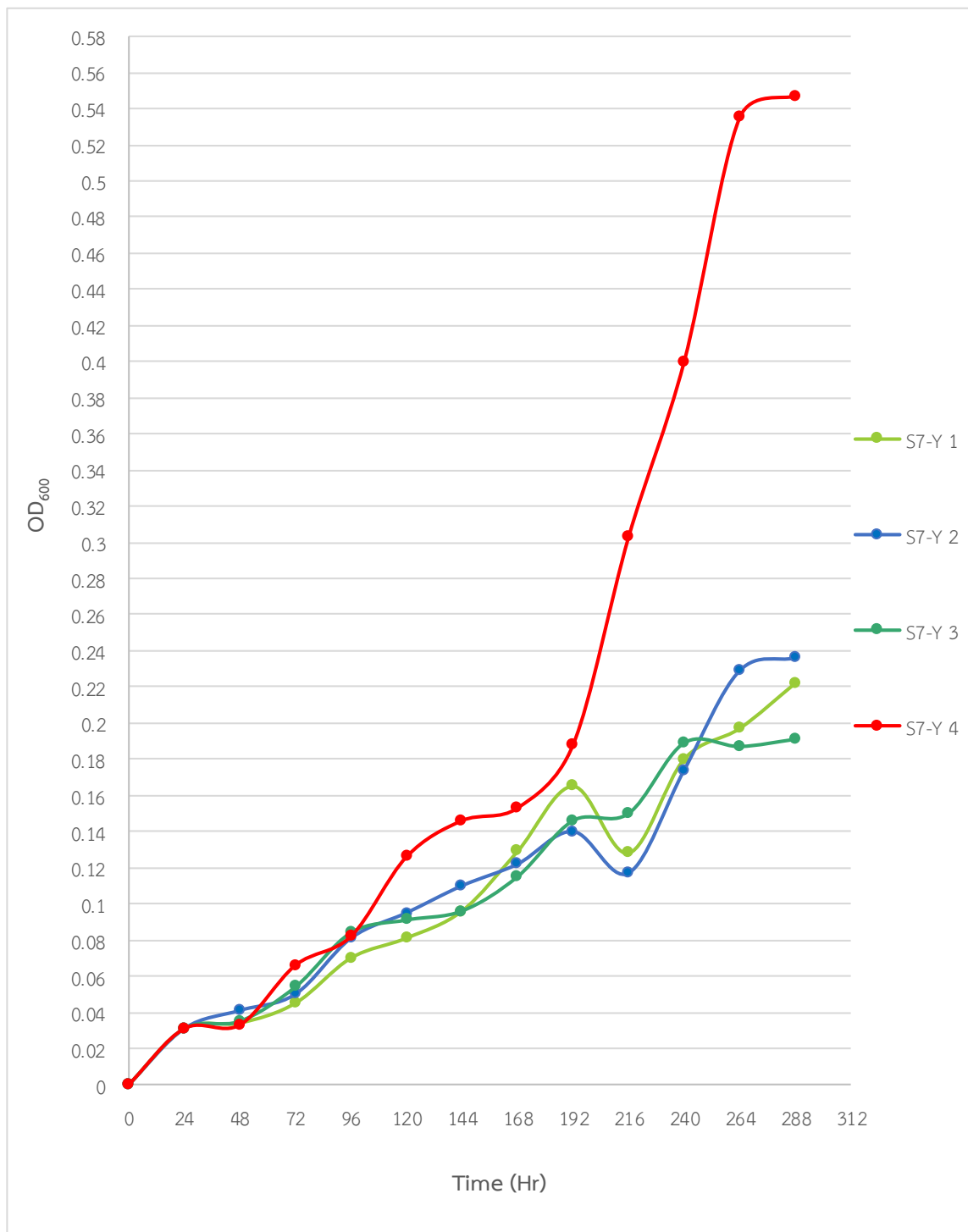


รูปที่ 21 กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S7-W

การเจริญของแบคทีเรียรหัส S7-Y ส่วนใหญ่จะเข้าสู่ช่วง stationary phase หลังจากชั่วโมงที่ 240-264 และในส่วนของช่วง lag และ log phase นั้นพบว่าชุดการทดลองที่ 1 และ 2 แสดงช่วง log phase สองช่วงที่ช่วงเวลาแตกต่างกันโดยช่วงแรกนั้นเริ่มต้นที่ชั่วโมงที่ 72 ถึงชั่วโมงที่ 192 และช่วงที่สองถัดไปอีก 24 ชั่วโมงซึ่งเริ่มต้นที่ชั่วโมง 216 จนถึงชั่วโมงที่ 264 (รูปที่ 22; ภาคผนวก ค รูปที่ 54 และ 55; ตารางที่ 20) ส่วนชุดการทดลองที่ 3 และ 4 มีช่วง log phase เพียงหนึ่งช่วง (รูปที่ 22; ภาคผนวก ค รูปที่ 56 และ 57; ตารางที่ 20) โดยชุดการทดลองที่ 4 มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง log phase ที่สูงกว่าอีก 3 ชุดการทดลองเป็นอย่างมาก

ตารางที่ 20 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S7-Y ทั้ง 4 ชุดการทดลอง

ชั่วโมง	ค่าเฉลี่ยความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เฉลี่ยของชุดการทดลอง			
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	ชุดที่ 4
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.031	0.031	0.031	0.031
48	0.034	0.041	0.035	0.033
72	0.045	0.050	0.054	0.066
96	0.070	0.081	0.084	0.082
120	0.081	0.095	0.091	0.126
144	0.096	0.110	0.096	0.146
168	0.129	0.122	0.115	0.153
192	0.165	0.140	0.146	0.188
216	0.128	0.117	0.150	0.303
240	0.180	0.174	0.189	0.400
264	0.197	0.229	0.187	0.535
288	0.222	0.236	0.191	0.547

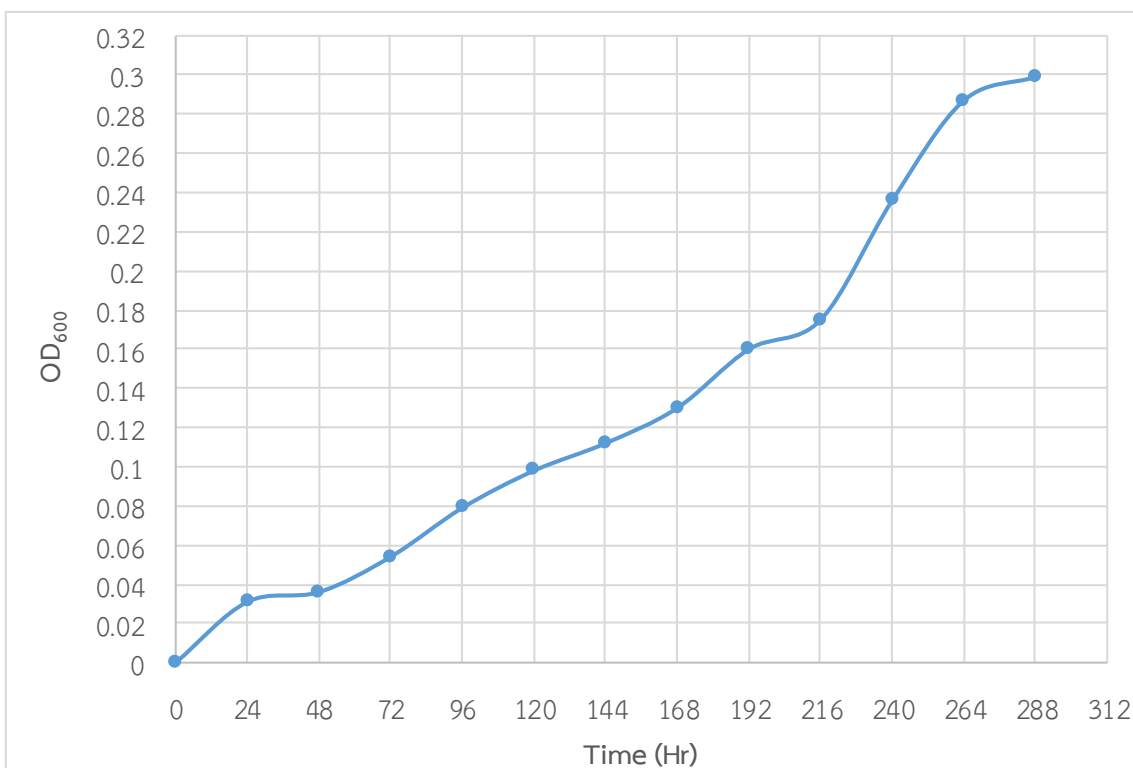


รูปที่ 22 กราฟการเจริญเติบโตของแบคทีเรียรหัส S7-Y ทั้ง 4 ชุดการทดลอง

กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S7-Y นั้นมีช่วง lag และ log phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 264 และเข้าสู่ stationary phase หลังจากชั่วโมงที่ 264 (รูปที่ 23; ตารางที่ 21)

ตารางที่ 21 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S7-Y

ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เฉลี่ยของชุดการทดลอง				ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	ชุดที่ 4	
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031
48	0.034	0.041	0.035	0.033	0.036
72	0.045	0.050	0.054	0.066	0.054
96	0.070	0.081	0.084	0.082	0.079
120	0.081	0.095	0.091	0.126	0.098
144	0.096	0.110	0.096	0.146	0.112
168	0.129	0.122	0.115	0.153	0.130
192	0.165	0.140	0.146	0.188	0.160
216	0.128	0.117	0.150	0.303	0.175
240	0.180	0.174	0.189	0.400	0.236
264	0.197	0.229	0.187	0.535	0.287
288	0.222	0.236	0.191	0.547	0.299



รูปที่ 23 กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S7-Y

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาแบคทีเรียที่ย่อยสลายพลาสติกพอลิเอทิลีนเทอร์พทาเลตจาก glycerol culture stock ของแบคทีเรียรหัส S3 S4 และ S7 จากการตัดแยกโดยนางสาวณัฐนรี แฉงเอียด (นางสาวณัฐนรี แฉงเอียด, 2561) เมื่อนำแบคทีเรียรหัส S3 S4 และ S7 มาวิเคราะห์และเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank พบว่าแบคทีเรียรหัส S3 และ S7 มีความคล้ายคลึงกับ *Moraxella osloensis* strain 1910ICU268 และ *Gordonia desulfuricans* strain ASO3D ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรีย S4 นั้นไม่ได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เนื่องจากเกิดปัญหาในการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

หลังจากนั้นนำ glycerol culture stock ของแบคทีเรียทั้ง 3 รหัส มาตัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง carbon free mineral medium (CFMM) ที่ผสมพลาสติกพอลิเอทิลีนเทอร์พทาเลต (PET) 0.5 กรัม และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมงพบว่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ของแบคทีเรียรหัส S7 พบแบคทีเรีย 2 ลักษณะที่แตกต่างกัน จากนั้นตัดแยกแบคทีเรียทั้งสองบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งใหม่ รวมถึงทำ glycerol culture stock และตั้งรหัสใหม่ให้แบคทีเรียทั้งสองคือ S7-W และ S7-Y ตามลักษณะสัโคโลยีที่แตกต่างกัน

ทำการตัดแยกแบคทีเรียเพิ่มเติมโดยใช้การตัดแยกรูปแบบเดิมแต่เพิ่มระยะเวลาการบ่มเป็น 120 ชั่วโมง พบว่าสามารถตัดแยกแบคทีเรียได้เพิ่มเติมอีก 3 รหัส คือ S3-W S4-W และ S7-LW และทำ glycerol culture stock ต่อไป จากนั้นนำแบคทีเรียรหัส S3 S3-W S4 S7-W และ S7-Y ศึกษาการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ผสมพลาสติก PET 0.1 กรัม บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและตรวจติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 14 วัน พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 รหัสนั้นว่ามีช่วง log phase 2 ช่วง โดยช่วง log phase ช่วงหลังจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่าช่วง log phase แรก อีกทั้งกราฟการเจริญมีค่าการดูดกลืนแสงที่ค่อนข้างแปรปรวนและมีค่าขึ้นลงไม่สอดคล้องกับทฤษฎีการเจริญ

แบคทีเรียรหัส S3 พบว่าความแปรปรวนของค่าการดูดกลืนแสง 2 รูปแบบ คือ รูปแบบแรกค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 ถึงชั่วโมง ที่ 264 ในความแปรปรวนนั้นพบช่วง log phase 2 ช่วง โดยช่วง log phase แรกตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 ถึงชั่วโมงที่ 120 และช่วง log phase ที่สองตั้งแต่ชั่วโมงที่ 216 ถึงชั่วโมงที่ 264 และรูปแบบที่สองค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอจนถึงช่วง stationary phase กราฟการเจริญเฉลี่ยไม่สามารถเห็นช่วง lag phase และ stationary phase ได้ชัดเจนและมีช่วง log phase 2 ช่วงคือตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 144 และตั้งแต่ชั่วโมงที่ 216 ถึงชั่วโมงที่ 264

แบคทีเรียรหัส S3-W พบว่าชุดการทดลองส่วนใหญ่จะมีช่วง lag และ log phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 120-144 แต่มีหนึ่งชุดการทดลองที่เกิดความแปรปรวนของค่าการดูดกลืนแสงและช่วง log phase 2 ช่วงคือตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 144 และชั่วโมงที่ 168 ถึงชั่วโมงที่ 240 กราฟการเจริญเฉลี่ย ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 144 คือช่วง lag และ log phase หลังจากชั่วโมงที่ 144 เข้าสู่ stationary phase

แบคทีเรียรหัส S4 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงมีความแปรปรวนมากและมีค่าการดูดกลืนแสงที่น้อยมากเมื่อเทียบกับแบคทีเรียรหัสอื่น ๆ โดยแต่ละชุดการทดลองมีรูปแบบของกราฟการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันโดยชุดการทดลองแรก ระหว่างชั่วโมงที่ 48 ถึงชั่วโมงที่ 240 มีค่าการดูดกลืนแสงที่แปรปรวนมากจนไม่สามารถระบุช่วง log และ stationary phase ได้อย่างชัดเจน อีกทั้งยังมีสองชุดการทดลองที่ค่าการดูดกลืนแสงที่แปรปรวนในช่วงเวลาเดียวกันแต่สามารถระบุช่วง log phase ได้ และชุดการทดลองสุดท้ายค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นสม่ำเสมอจนถึงชั่วโมงที่ 216 กราฟการเจริญเฉลี่ยในช่วง lag และ log phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 120 เข้าสู่ stationary phase หลังจากชั่วโมงที่ 120 แต่หลังจากชั่วโมงที่ 192 ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ

แบคทีเรียรหัส S7-W พบว่าไม่สามารถระบุช่วง lag phase และ stationary phase ได้ชัดเจนทั้ง 4 ชุดการทดลอง และมีกราฟการเจริญ 2 รูปแบบ คือตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 ถึงชั่วโมงที่ 216 มีค่าการดูดกลืนแสงที่แปรปรวนนั้นพบ 2 ชุดการทดลองโดยหนึ่งในนั้นไม่สามารถระบุ log phase ได้ และอีกชุดการทดลองคาดว่าช่วง log phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 216 ถึงชั่วโมงที่ 264 อีกสองชุดการทดลองที่เหลือนั้นเป็นรูปแบบที่สอง คือ ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้นแต่ไม่พบช่วง stationary phase กราฟการเจริญเฉลี่ยไม่สามารถระบุช่วง lag phase และ stationary phase ได้ชัดเจนและพบช่วง log phase 2 ช่วง คือตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 ถึงชั่วโมงที่ 120 คาดว่าเป็นช่วง log phase แรกและตั้งแต่ชั่วโมงที่ 192 ถึงชั่วโมงที่ 240 คาดว่าเป็นช่วง log phase ที่สอง หลังจากชั่วโมงที่ 264 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง

แบคทีเรียรหัส S7-Y พบว่าส่วนใหญ่เข้าสู่ช่วง stationary phase หลังจากชั่วโมงที่ 240-264 และมีรูปแบบชุดการทดลอง 2 รูปแบบหลัก ๆ คือ มีช่วง log phase 1 ช่วง และมีช่วง log phase 2 ช่วง โดยชุดการทดลองที่มีช่วง log phase 2 ช่วงนั้นช่วง log phase แรกตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 ถึงชั่วโมงที่ 192 และช่วง log phase ที่สองตั้งแต่ชั่วโมงที่ 216 ถึงชั่วโมงที่ 264 กราฟการเจริญเฉลี่ยมีช่วง lag และ log phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 264 และเข้าสู่ stationary phase หลังจากชั่วโมงที่ 264

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 5 รหัส ศึกษาลักษณะสัญญาณแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบแบคทีเรีย 2 ลักษณะที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนคือ แบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะท่อนและแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะท่อนสั้น ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุว่ากราฟการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 5 รหัส มีค่าการดูดกลืนแสงที่แปรปรวนและขึ้นลงตลอดการตรวจติดตามการเจริญรวมถึงการพบระยะ log phase 2 ช่วง

แผนการดำเนินงานวิจัยที่คาดว่าจะทำในอนาคต

1. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของแบคทีเรียรหัส S3 S3-W S4 S4-W S7-W S7-LW และ S7-Y
2. ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียรหัส S3 S3-W S4 S4-W S7-W S7-LW และ S7-Y เพิ่มเติม
3. ศึกษาลักษณะพลาสติกพอลิเอทิลีนเทอร์พทาเลตที่บ่มร่วมกับแบคทีเรียทั้ง 7 รหัส ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope)

เอกสารอ้างอิง

งานวิจัย สารสารและหนังสืออิเล็กทรอนิกส์

- ณัฐนรี แต่งเอี่ยม. (2561). การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชนิด พอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรต. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ธนิษฐา ภูลวรรณ. (2559). การจำแนกประเภทของพลาสติก. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ, 64(200), 14-15. สืบค้น 10 พฤษภาคม 2563, จาก http://lib3.dss.go.th/fulltext/dss_j/2559_64_200_P-14-15.pdf
- ศุภสิพร แสงกระจ่าง, ปัทมา พลอยสว่าง, และปริญดา พรหมหิตาธร. (2556). ผลกระทบของพลาสติก ต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม. วารสารพิษวิทยาไทย, 28(1), 39-50. สืบค้น 10 พฤษภาคม 2563, จาก <http://www.thaitox.org/media/upload/file/journal/2013-1/04article.pdf>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. 3(7), e1700782. doi:10.1126/sciadv.1700782 %J Science Advances
- Gilbert, M. (2017). Chapter 1 - Plastics Materials: Introduction and Historical Development. In M. Gilbert (Ed.), *Brydson's Plastics Materials (Eighth Edition)* (pp. 1-18): Butterworth-Heinemann.
- Liu, J., Xu, G., Dong, W., Xu, N., Xin, F., Ma, J., . . . Jiang, M. (2018). Biodegradation of diethyl terephthalate and polyethylene terephthalate by a novel identified degrader *Delftia* sp. WL-3 and its proposed metabolic pathway. 67(3), 254-261. doi:10.1111/lam.13014
- Park, S. H., & Kim, S. H. (2014). Poly (ethylene terephthalate) recycling for high value added textiles. *Fashion and Textiles*, 1(1), 1. doi:10.1186/s40691-014-0001-x
- Robertson, G. L. (2014). Food Packaging. In N. K. Van Alfen (Ed.), *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* (pp. 232-249). Oxford: Academic Press.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26(3), 246-265. doi:https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005
- Sharma, S. R. (2018). Bioremediation of Polythenes and Plastics: A Microbial Approach. In R. Prasad & E. Aranda (Eds.), *Approaches in Bioremediation: The New Era of Environmental Microbiology and Nanobiotechnology* (pp. 97-114). Cham: Springer International Publishing.
- Smith, R., Inomata, H., & Peters, C. (2013). Chapter 4 - Historical Background and Applications. In R. Smith, H. Inomata, & C. Peters (Eds.), *Supercritical Fluid Science and Technology* (Vol. 4, pp. 175-273): Elsevier.
- Torres, A., Li, S. M., Roussos, S., & Vert, M. (1996). Poly(lactic acid) degradation in soil or under controlled conditions. 62(13), 2295-2302. doi:10.1002/(sici)1097-4628(19961226)62:13<2295::Aid-app14>3.0.Co;2-2

Volanti, M., Cespi, D., Passarini, F., Neri, E., Cavani, F., Mizsey, P., & Fozzer, D. (2019). Terephthalic acid from renewable sources: early-stage sustainability analysis of a bio-PET precursor. *Green Chemistry*, 21(4), 885-896. doi:10.1039/C8GC03666G

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. doi:10.1126/science.aad6359

เว็บไซต์ออนไลน์

กรมควบคุมมลพิษ. (2561). Road map การจัดการขยะพลาสติก พ.ศ. 2561–2573. สืบค้น 23 เมษายน 2563, จาก [http://www.pcd.go.th/Info_serv/File/Plastic%20Road map.pdf](http://www.pcd.go.th/Info_serv/File/Plastic%20Road%20map.pdf).

กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง. (2560). ข้อมูลปริมาณขยะทะเลในประเทศไทยปีงบประมาณ 2560. สืบค้น 23 เมษายน 2563, จาก <http://tcc.dmcr.go.th/thaicoastalcleanup/report>.

ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ. (2560). กระบวนการผลิตเม็ดพลาสติก. สืบค้น 10 พฤษภาคม 2563, จาก <https://www.mtec.or.th/bio-plastic/what-is-plastic/plastic-production.html>

Creative mechanisms. (2016). Everything you need to know about the world's most useful plastic (PET and polyester). Retrieved May 10, 2020, from <https://www.creative-mechanisms.com/blog/everything-about-polyethylene-terephthalate-pet-polyester>

EcoWatch. (2019). 'Plastic is lethal': groundbreaking report reveals health risks at every stage in plastics life cycle. Retrieved April 23, 2020, from <https://www.ecowatch.com/plastics-toxic-chemicals-health-risks-2629698471.html>

Grand view research. (2019). Polyethylene terephthalate market size, share & trends analysis report, by application (packaging, films & sheets) by packaging application and segment forecasts 2019–2025. Retrieved May 10, 2020, from <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/polyethylene-terephthalate-market>

Impact Plastics. (2017). The difference between amorphous & semi-crystalline polymers. Retrieved May 10, 2020, from <http://blog.impactplastics-ct.com/blog/the-difference-between-amorphous-semi-crystalline-polymers>

Mordor Intelligence. (2019). PET packaging market-growth, trends, and forecast (2020-2025). Retrieved May 10, 2020, from <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/pet-packaging-market>

Omnexus. (2017). Polyethylene terephthalate (PET) : a comprehensive review. Retrieved May 10, 2020, from <https://omnexus.specialchem.com/selection-guide/polyethylene-terephthalate-pet-plastic>

Plastics Europe. (2017). How plastics are made. Retrieved May 10, 2020, from <https://www.plasticseurope.org/en/about-plastics/what-are-plastics/how-plastics-are-made>

Plastics Europe. (2019). Plastics–the facts 2019 : an analysis of European plastics production, demand and waste data. Retrieved May 10, 2020, from https://www.plasticseurope.org/application/files/9715/7129/9584/FINAL_web_version_Plastics_the_facts2019_14102019.pdf

ภาคผนวก ก

1. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ carbon free mineral medium (CFMM)

1.1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ carbon free mineral medium แบ่งออกเป็น 2 ส่วนดังนี้

1.1.1. การเตรียมสารละลายส่วนที่ 1 (ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร) ประกอบด้วย

1.1.1.1. Ammonium nitrate (NH_4NO_3) 3.00 กรัม

1.1.1.2. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) 2.20 กรัม

1.1.1.3. Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate 0.80 กรัม
($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)

ละลายสารเคมีส่วนที่ 1 ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ด้วย 5 M Hydrochloric acid (HCl) หรือ 5 M Sodium hydroxide (NaOH) จนได้ค่า pH เท่ากับ 7.0 และทำให้ปลอดเชื้อด้วยเครื่องนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

1.1.2. การเตรียมสารละลายส่วนที่ 2 ประกอบด้วย

1.1.2.1. Magnesium sulfate heptahydrate 0.10 กรัมต่อมิลลิลิตร
($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

1.1.2.2. Ferric chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.05 กรัมต่อมิลลิลิตร

1.1.2.3. Calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.05 กรัมต่อมิลลิลิตร

กรองสารละลายส่วนที่ 2 ด้วยแผ่นกรองแบคทีเรียชนิด cellulose acetate ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

1.1.3. เติมสารละลายส่วนที่ 2 ลงในส่วนที่ 1 ในอัตราส่วน 1 : 1,000

2. การเตรียมพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลต (Polyethylene terephthalate)

2.1. แกะฉลากขวดน้ำพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลตและตัดเป็นแผ่น

2.2. เจาะพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลตเป็นวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องเจาะกระดาษ

2.3. ชั่งพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลตประมาณ 0.5 กรัม ลงในจานเพาะเชื้อแก้ว และ 0.1 กรัม ลงในหลอดทดลอง

2.4. ทำให้ปลอดเชื้อด้วยเครื่องนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นระยะเวลา 15 นาที

2.5. นำพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลตที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อแล้ว ไปอบแห้งในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 2 วัน

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง carbon free mineral medium (CFMM) ที่ผสมพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลต (PET)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM แบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นล่างและชั้นบน

- 3.1. เทอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่หลอมเหลวแล้ว ลงในจานเพาะเชื้อแก้วที่มีพลาสติก PET 0.5 กรัมที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อและทำให้แห้งแล้ว ประมาณ 25 มิลลิลิตร เขย่าจานเพาะเชื้อแก้วเบา ๆ เพื่อให้พลาสติก PET กระจายทั่วจานเพาะเชื้อแก้ว
- 3.2. หลังจากพลาสติก PET กระจายทั่วจานเพาะเชื้อแก้วแล้ว ทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM แข็งตัว ประมาณ 30 นาที จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชั้นล่าง
- 3.3. เทอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM หลอมเหลวลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งส่วนล่าง ประมาณ 15 มิลลิลิตร ทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ชั้นบนแข็งตัว ประมาณ 30 นาที
- 3.4. เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข

1. 50X TAE electrophoresis buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

1.1. องค์ประกอบของ 50X TAE electrophoresis buffer

1.1.1. Tris(hydroxymethyl) aminomethane, $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ MW. เท่ากับ 121.14 กรัมต่อโมล	242.28 กรัม
1.1.2. Acetic acid, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ MW. เท่ากับ 60.05 กรัมต่อโมล	57.88 มิลลิลิตร
1.1.3. Ethylenedinitrilotetraacetic acid (EDTA) $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ MW. เท่ากับ 292.24 กรัมต่อโมล	100.00 มิลลิลิตร

ละลาย Tris(hydroxymethyl) aminomethane 242.28 กรัมใน acetic acid 57.88 มิลลิลิตร และ EDTA 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร

2. 1X TAE electrophoresis buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

2.1. องค์ประกอบของ 1X TAE electrophoresis buffer

2.1.1. 50X TAE electrophoresis buffer	20.0 มิลลิลิตร
2.1.2. น้ำกลั่น	980.0 มิลลิลิตร

ละลาย 50X TAE electrophoresis buffer ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 980.0 มิลลิลิตร จะได้ 1X TAE electrophoresis buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของแบคทีเรียรหัส S3 และ S7

1.1. แบคทีเรียรหัส S3

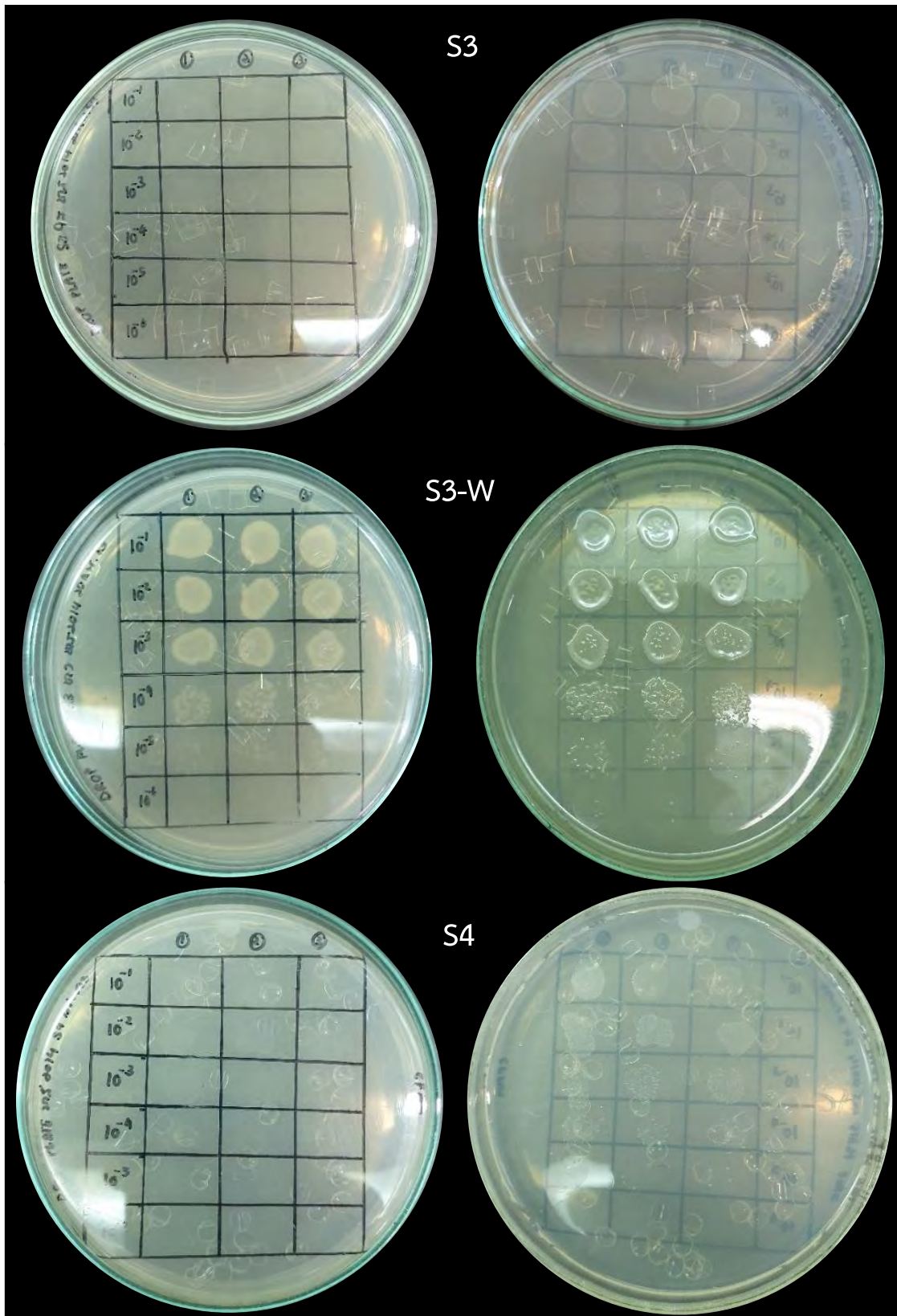
TAGCTTGCTAGATATGATTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACATTTAGGAATCTGCCTAGTAG
TGGGGGATAGCTCGGGGAACTCGAATTAATACCGCATAACGACCTACGGGTGAAAGGGGGC
GCAAGCTCTTGCTATTAGATGAGCCTAAATCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCA
CCAAGGCGACGATCTGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACCGGAACTGAGACAG
GTCCGGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCC
AGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTTAAGCAGGGAGGAGA
GGCTAATGGTTAATACCCATTAGATTAGACGTTACCTGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCT
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG
CGAGTGTAGGTGGCTCATTAAGTCACATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCAT
GTGATACTGGTGGTGTAGAATATGTGAGAGGGAAGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCTTCCTGGCATAATATTGACACT
GAGATTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
ATGTCTACTAGCCGTTGGGGTCCCTGAGACTTTAGTGGCGCAGTTAACGCGATAAGTAGAC
CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATAGTG
AGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATTCACATACAGGTGCTGCATGGCTGT
CGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCCTTA
TTTGCCAGCGGGTTAAGCCGGGAACTTTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGAAGGC
GGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTA
GGTACAGAGGGTTGCTACACAGCGATGTGATGCTAATCTCAAAAAGCCTATCGTAGTCCGG
ATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGAATGC
TGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCTAT

1.2. แบบคี่เรียงรหัส S7

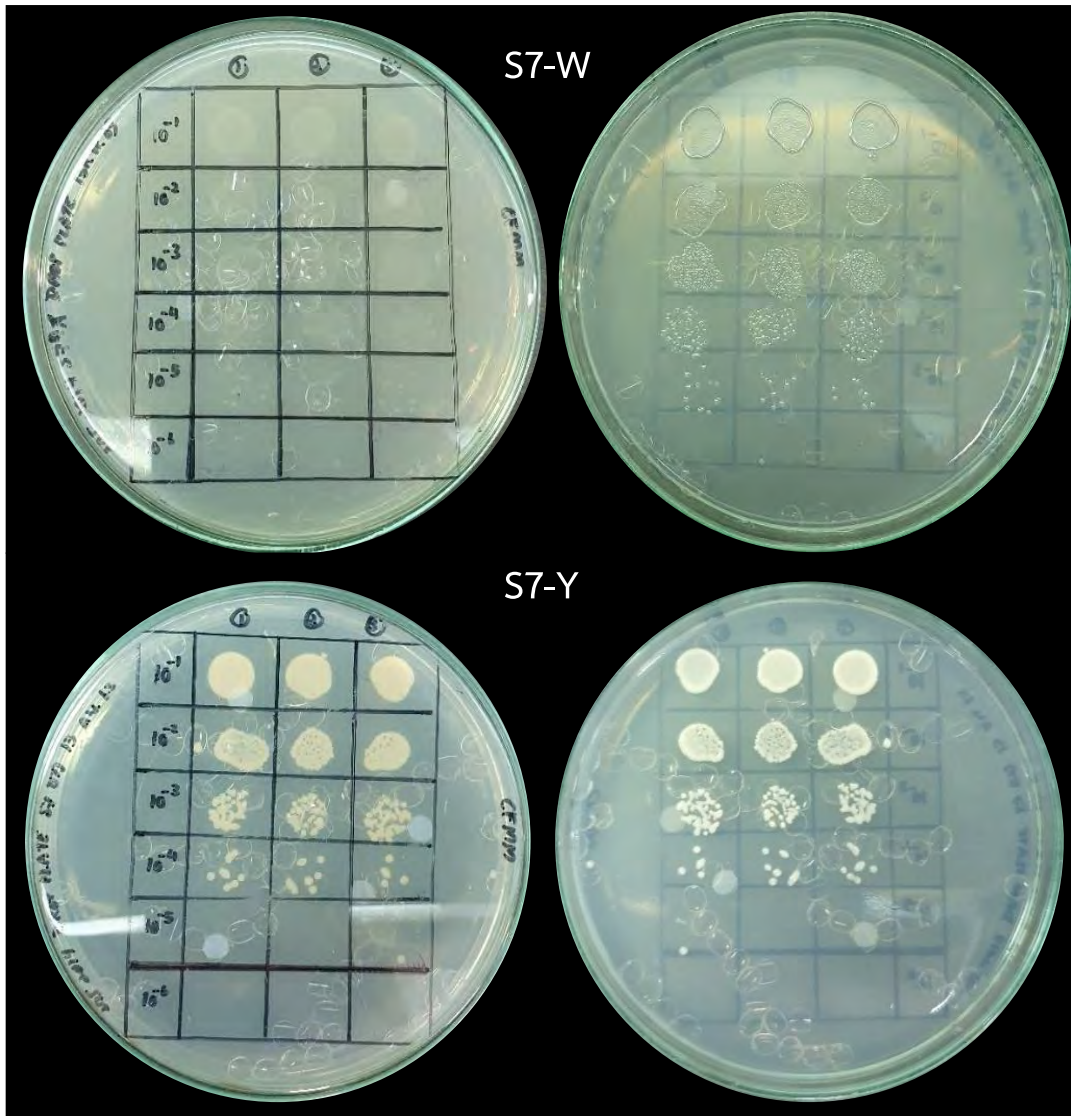
GATCTGCCCCTGACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTA
CATCGCATGGTGTGTTGGTGGAAAGCTTTTGC GGTTGGGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCT
TGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
CACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGT
AAACCTCTTTCGCCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGGAGAAGAAGCACCGGCCAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGT
AAAGAGCTCGTAGGCGGTTTTGTCGCGTCGTCTGTGAAATTCTGCAACTCAATTGCAGGCGT
GCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTACAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTG
AAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGTAGTAACTGA
CGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGGTGGGTACTAGGTGTGGGGCTCATTTACGAGTTCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA
GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCG
CACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGA
CATAACCAGACGACGGTAGAGATATCGTTTCCCTTGTGGTTGGTGTACAGGTGGTGCATG
GCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGT
CCTGTATTGCCAGCGGGTTATGCCGGGGACTTGCCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAG
GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACA
ATGGCTGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCAGTCTCA
GTTCCGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATG

2. การเจริญของแบคทีเรียที่เรียรหัส S3 S3-W S4 S7-W และ S7-Y บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM

2.1. วิธี drop plate ที่ความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-6}

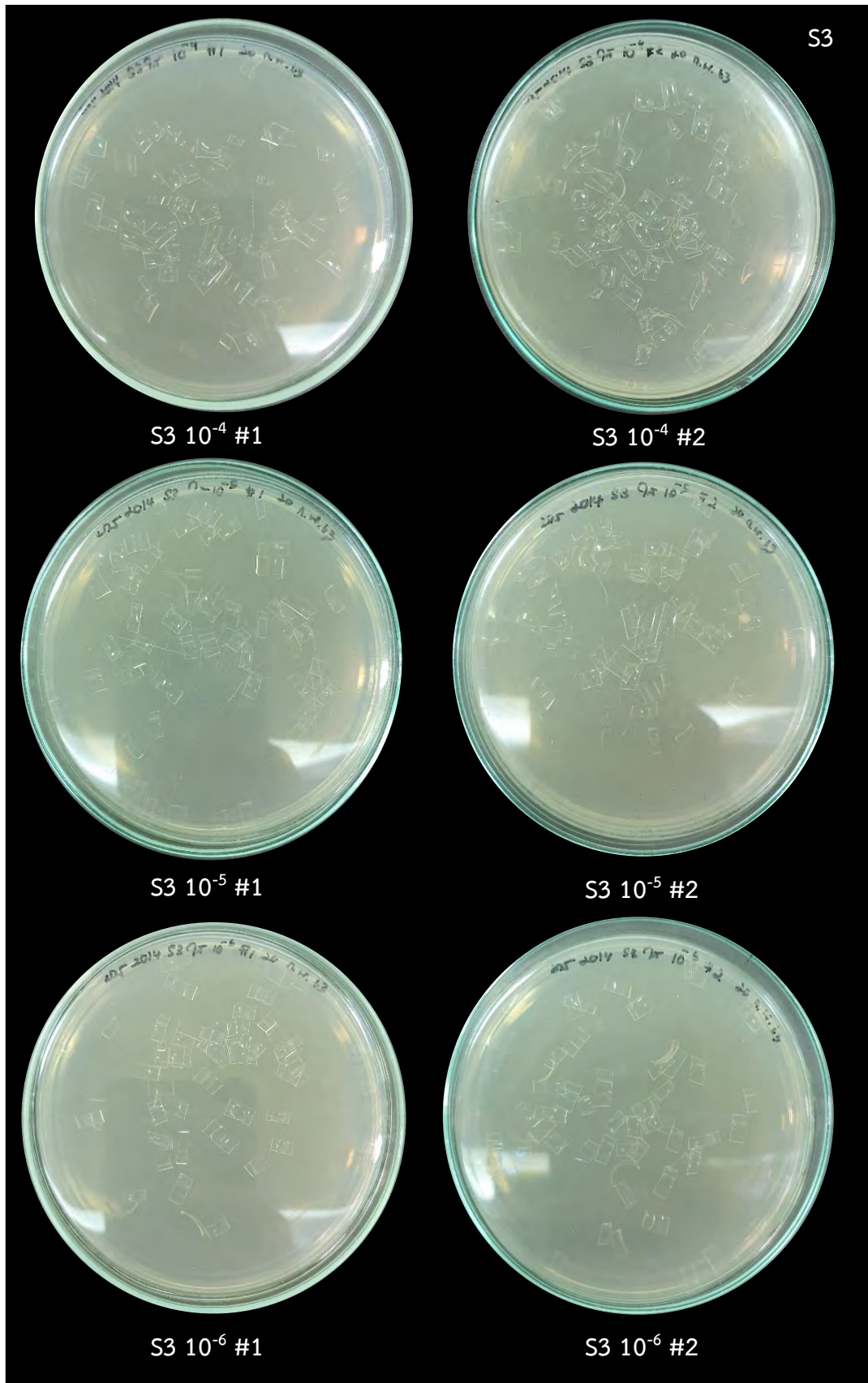


รูปที่ 24 แบคทีเรียที่เรียรหัส S3 S3-W และ S4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM โดยวิธี drop plate

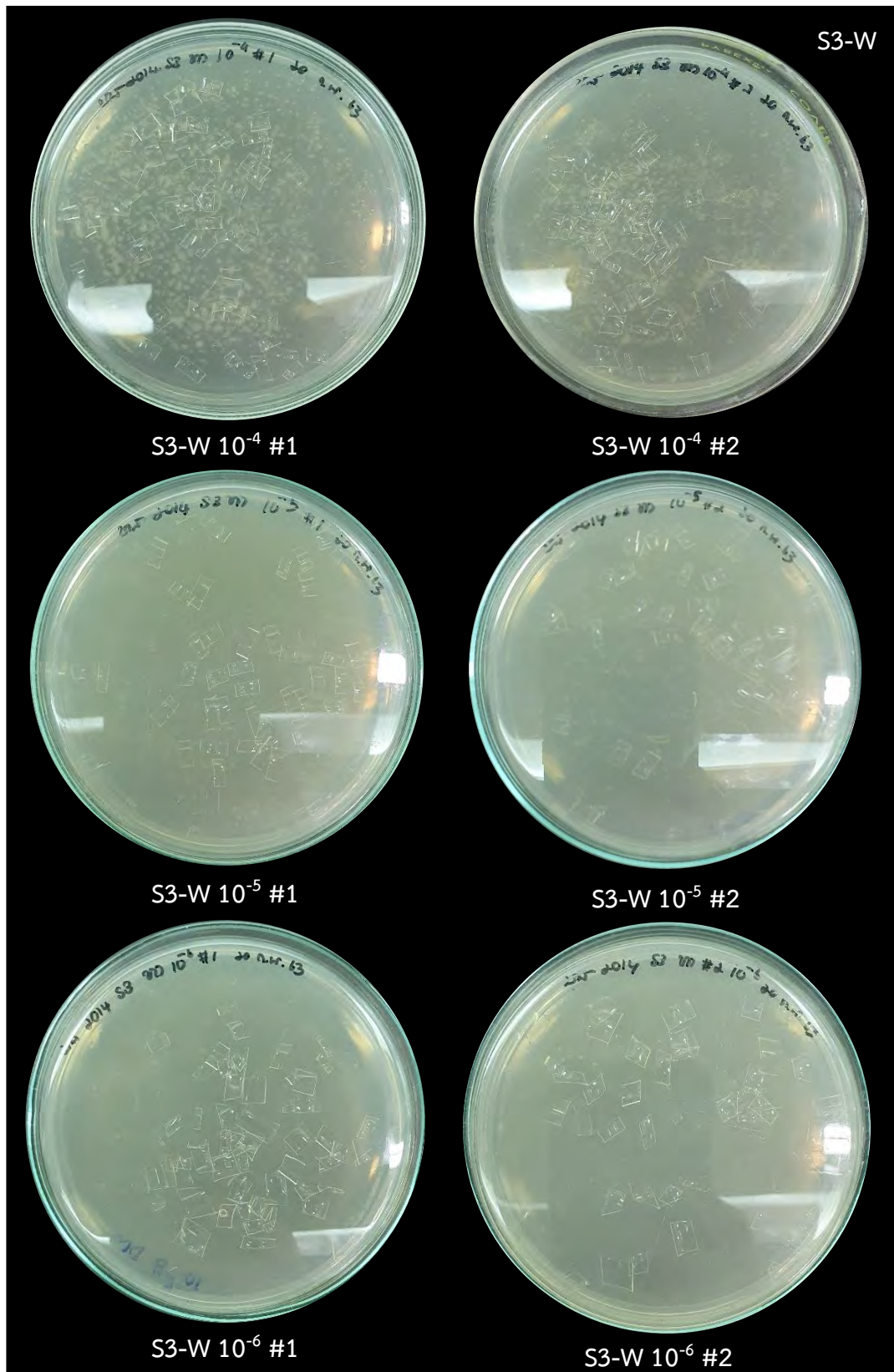


รูปที่ 25 แบคทีเรียรหัส S7-W และ S7-Y บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM โดยวิธี drop plate

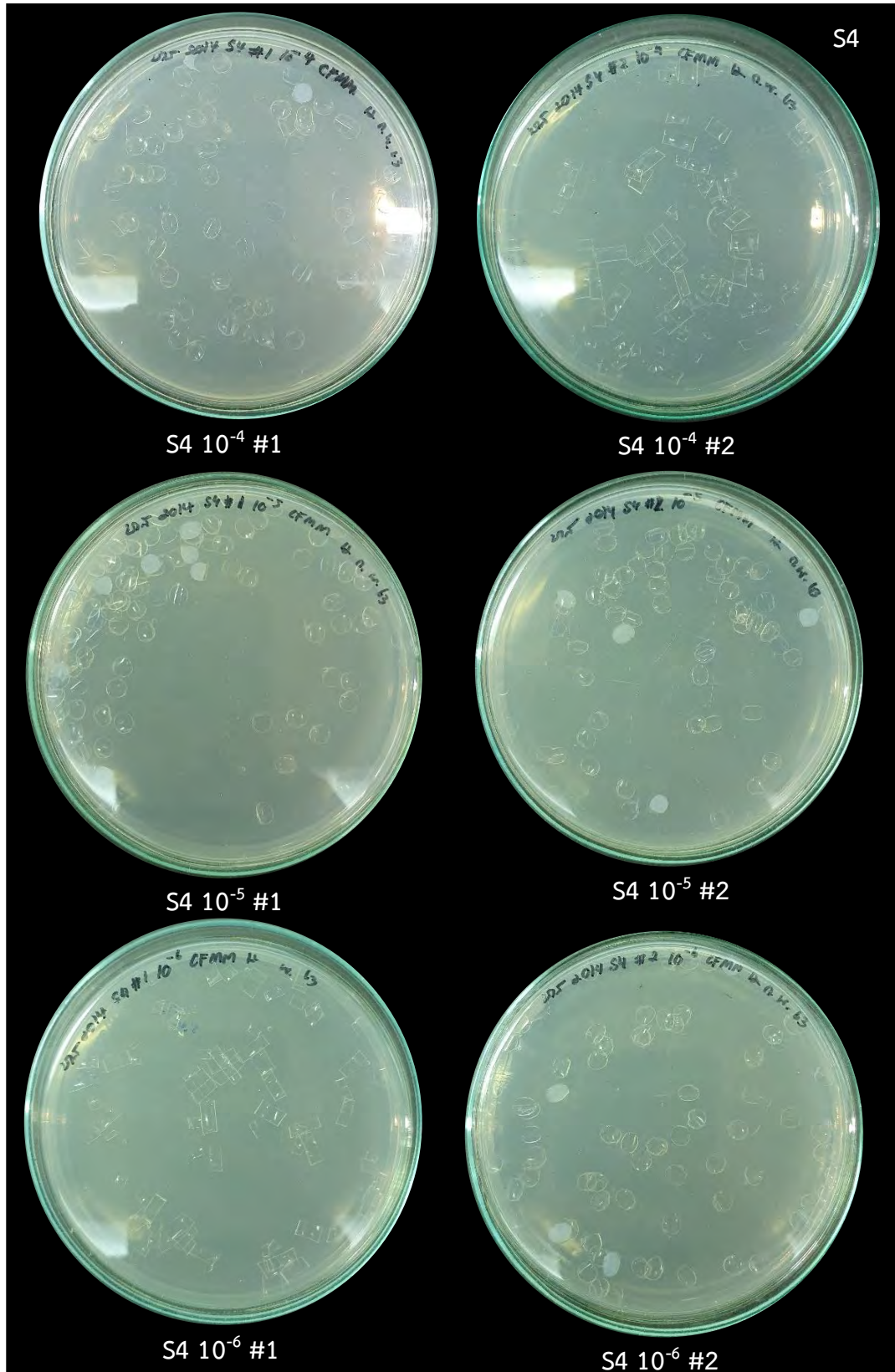
2.2. วิธี spread plate ที่ความเจือจาง 10^{-4} ถึง 10^{-6}



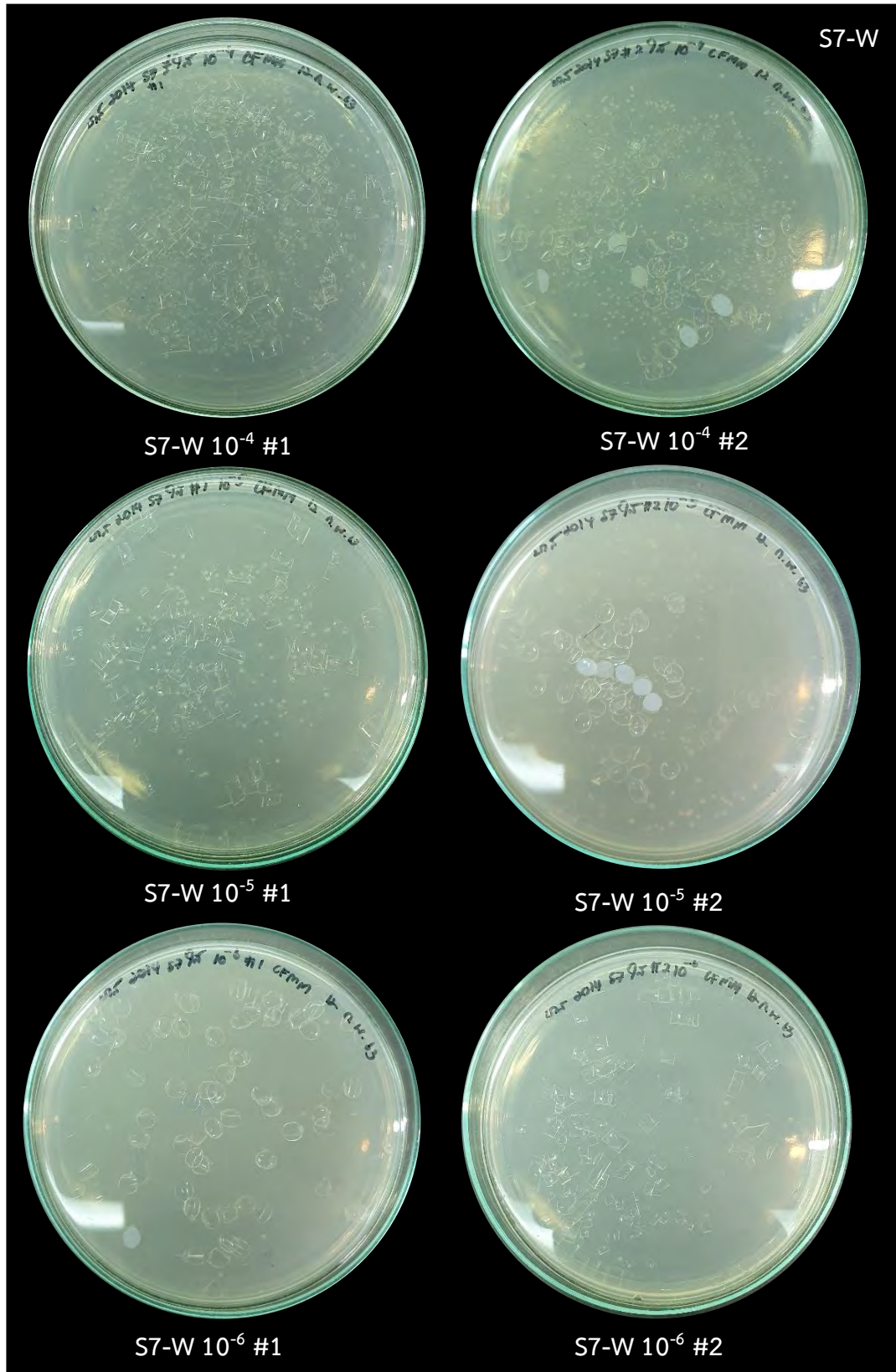
รูปที่ 26 แบคทีเรียรหัส S3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยวิธี spread plate



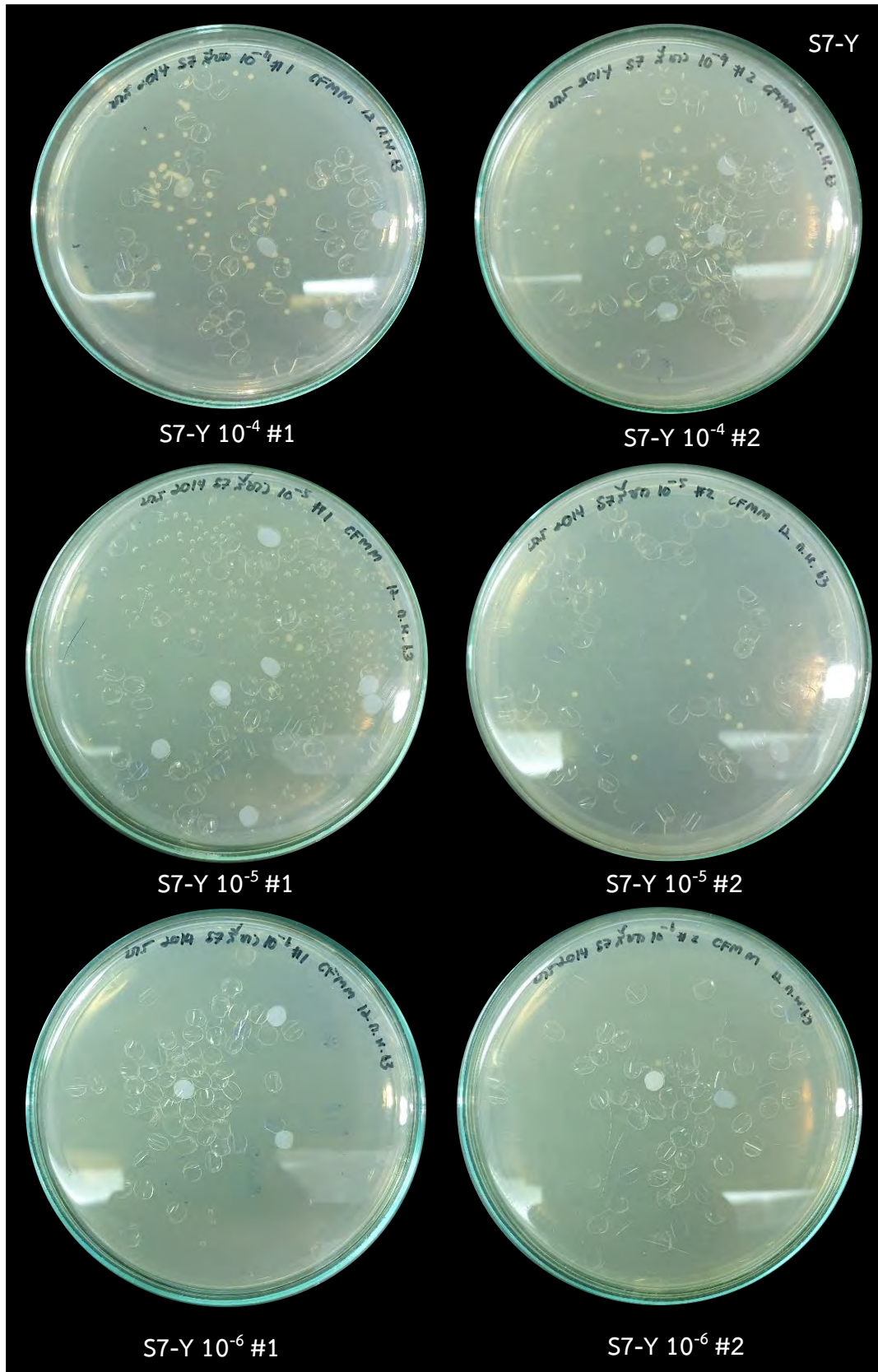
รูปที่ 27 แบคทีเรียรหัส S3-W บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยวิธี spread plate



รูปที่ 28 แบคทีเรียรหัส S4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยวิธี spread plate



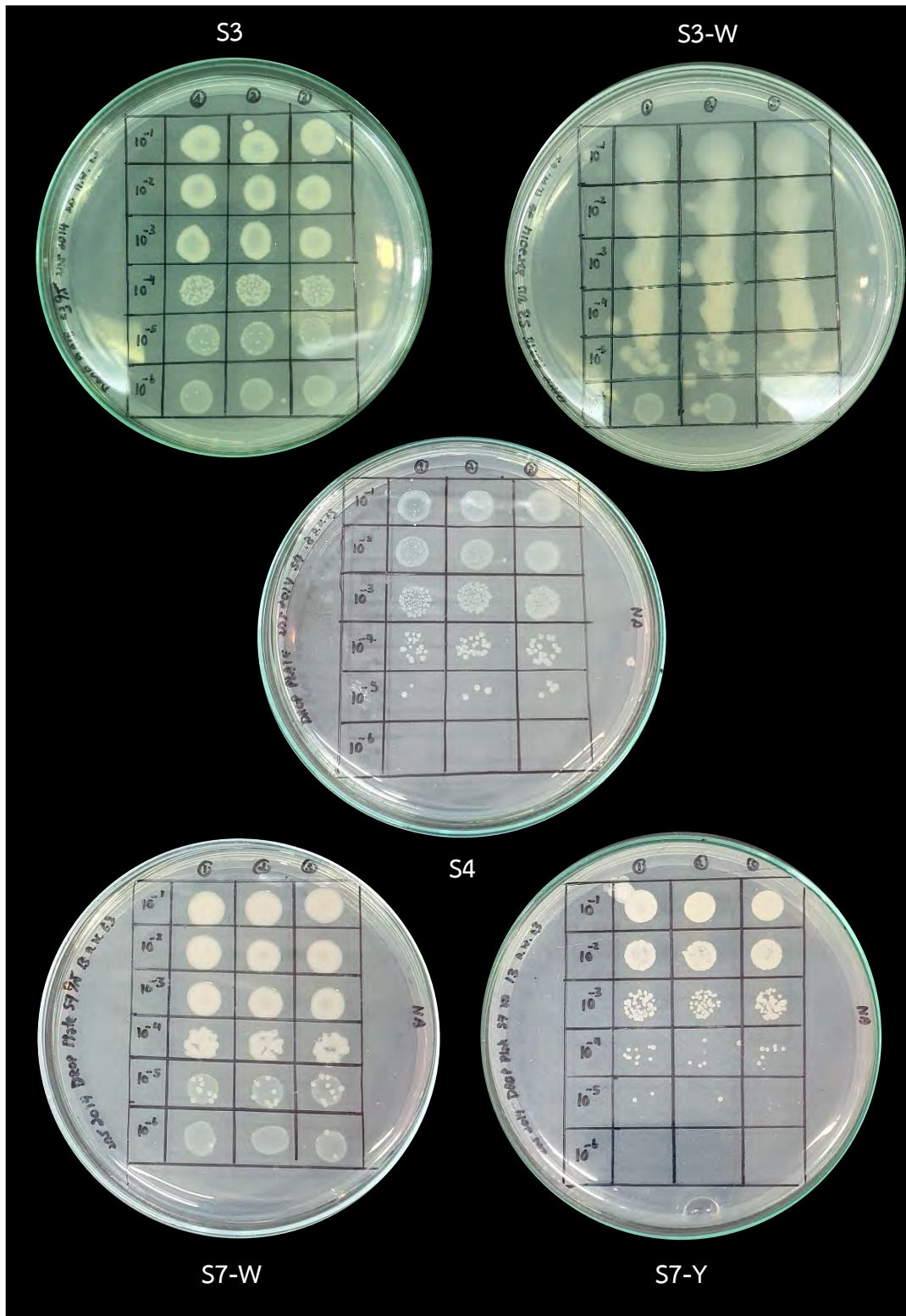
รูปที่ 29 แบคทีเรียรหัส S7-W บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยวิธี spread plate



รูปที่ 30 แบคทีเรียรหัส S7-Y บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยวิธี spread plate

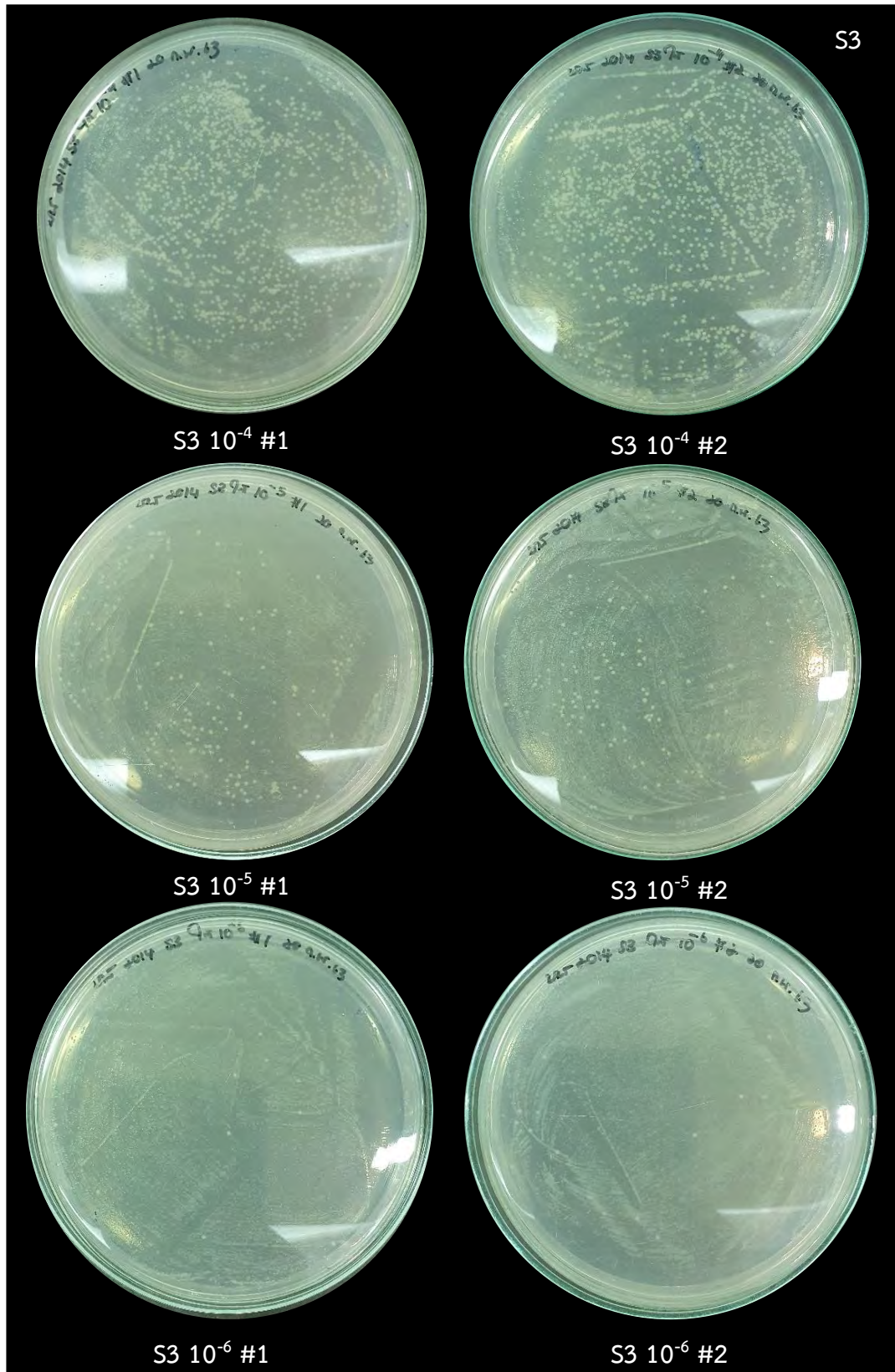
3. การเจริญของแบคทีเรียที่เรียรหัส S3 S3-W S4 S7-W และ S7-Y บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA

3.1. วิธี drop plate ที่ความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-6}

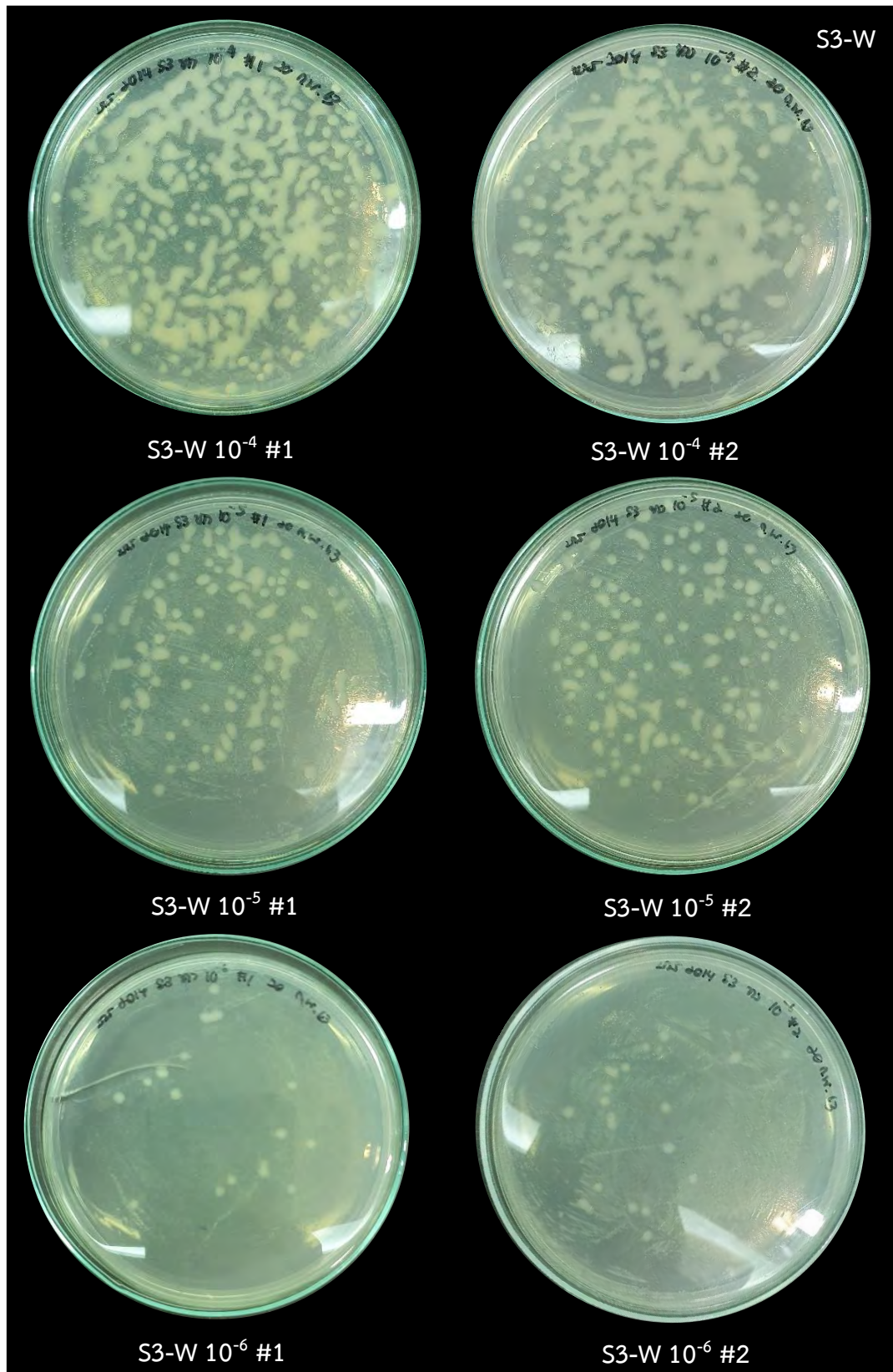


รูปที่ 31 แบคทีเรียที่เรียรหัส S3 S3-W S4 S7-W และ S7-Y บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA โดยวิธี drop plate

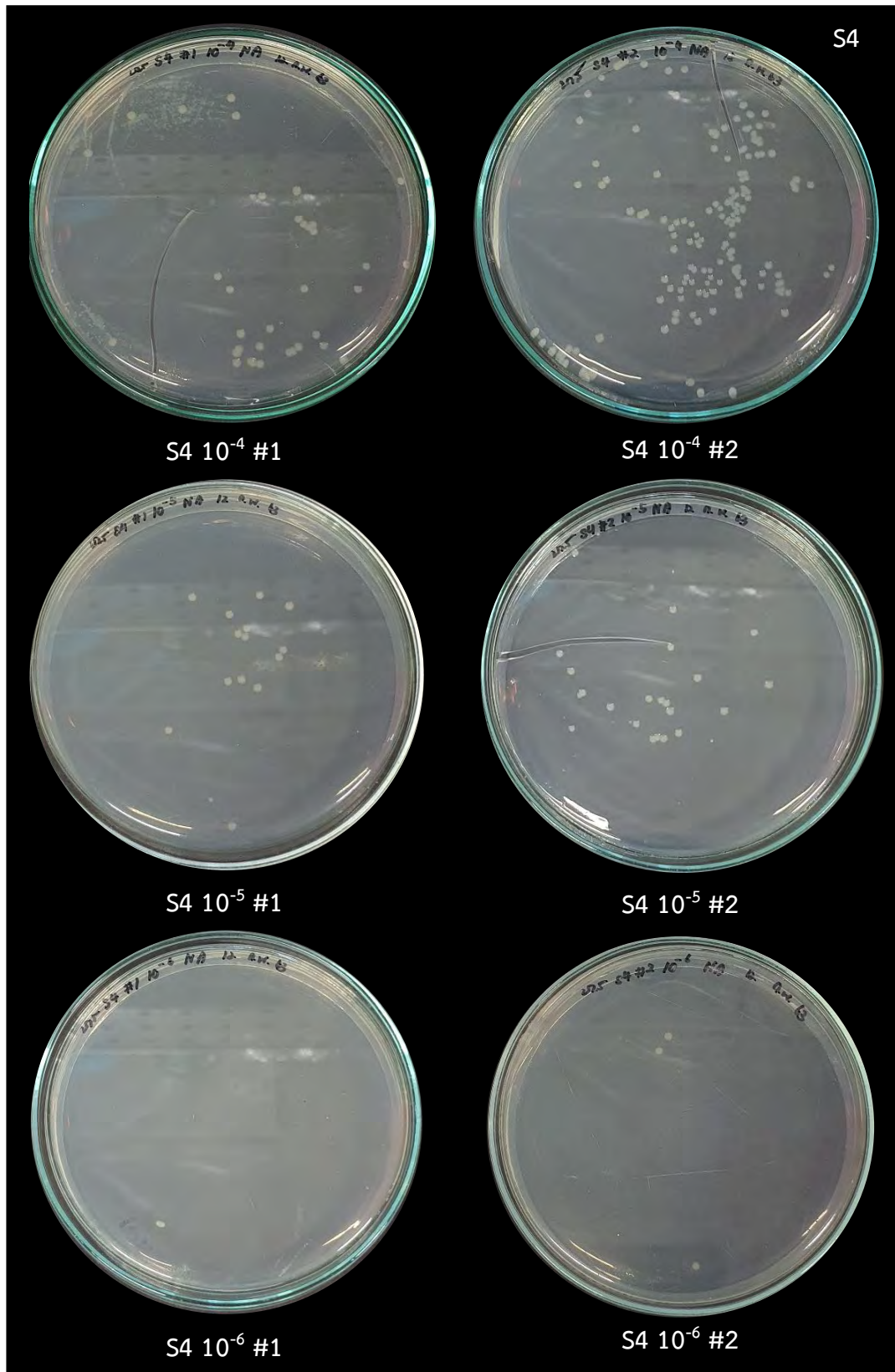
3.2. วิธี spread plate ที่ความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-6}



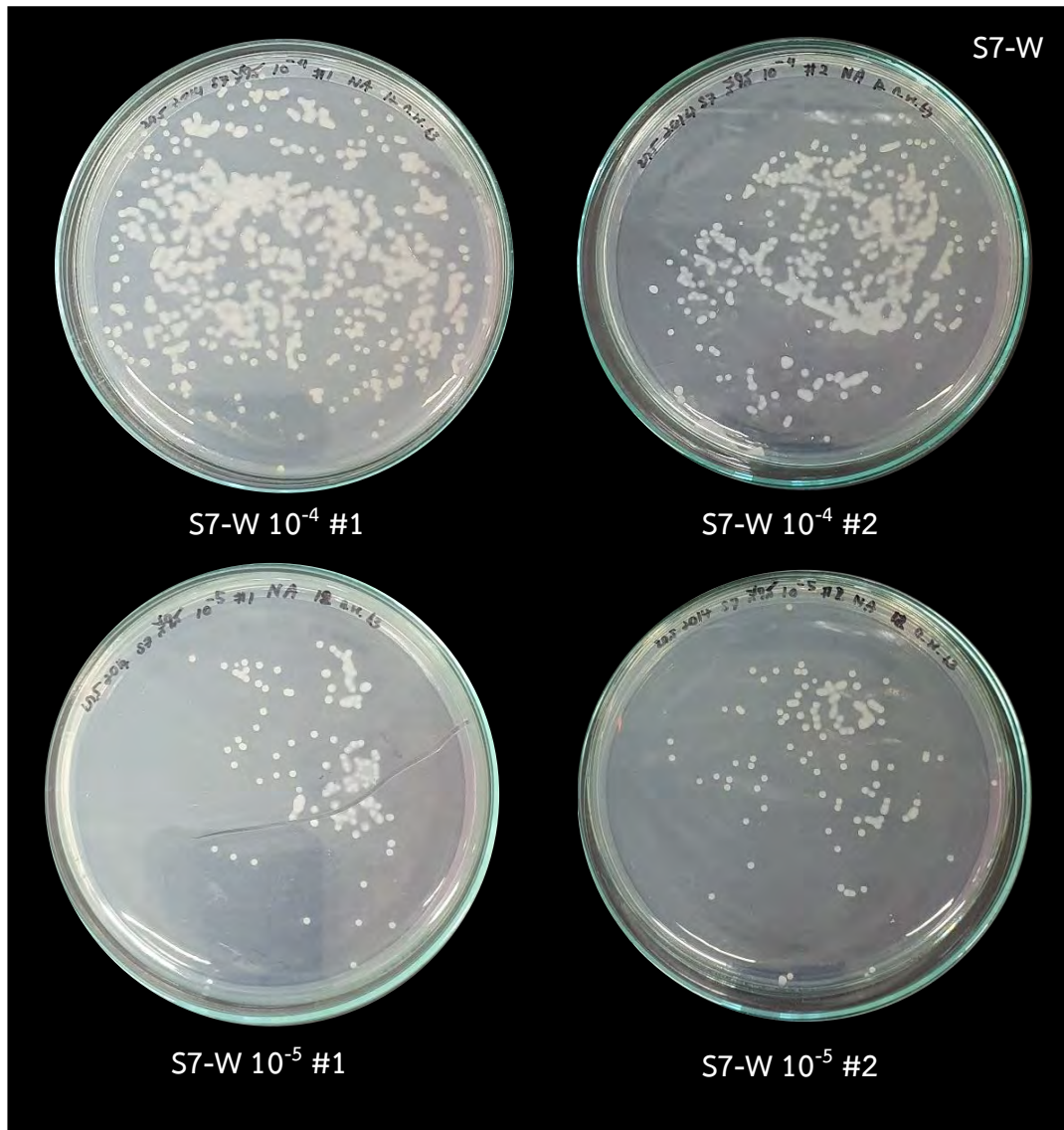
รูปที่ 32 แบคทีเรียหัตส S3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA โดยวิธี spread plate



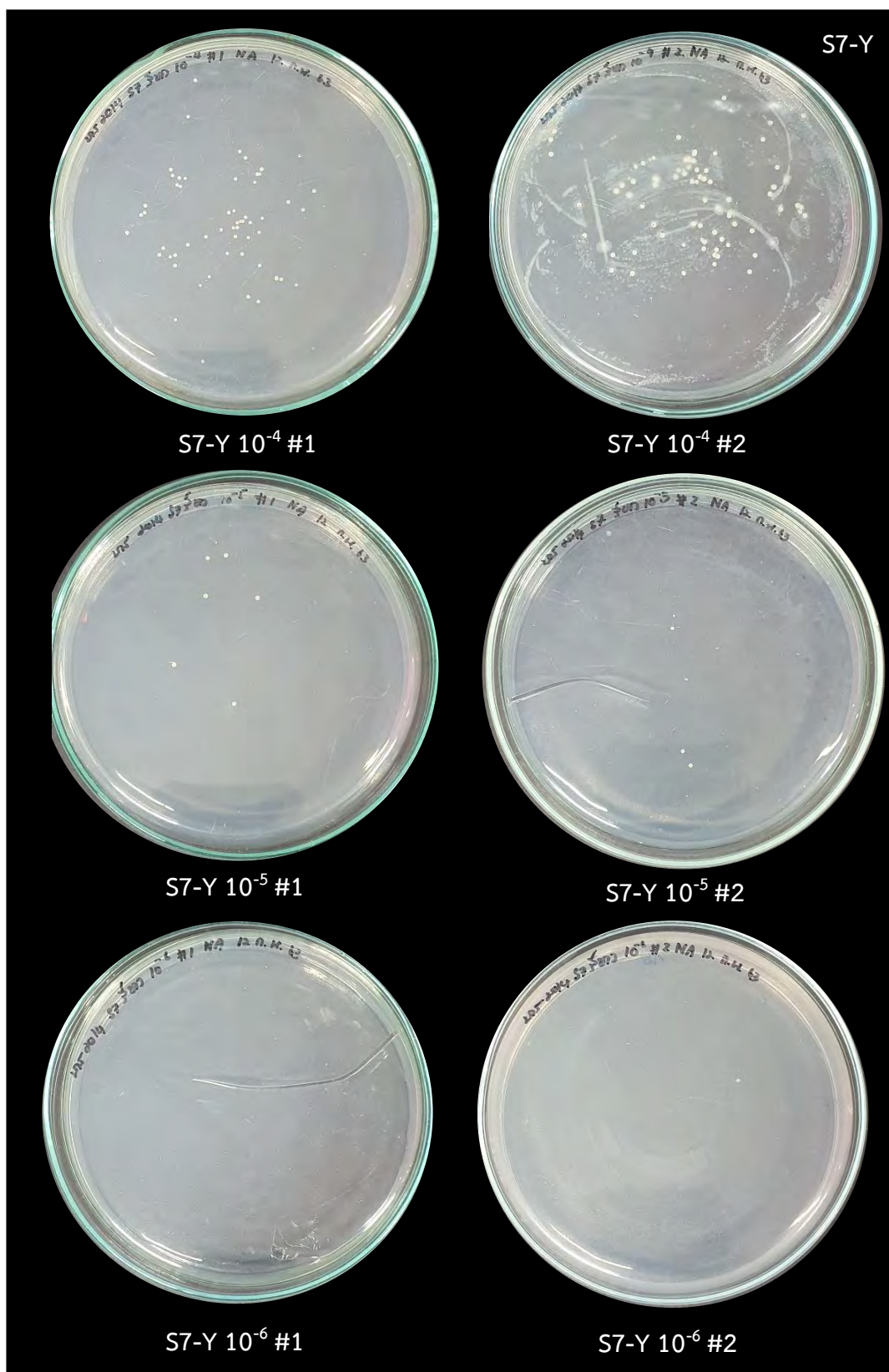
รูปที่ 33 แบคทีเรียหัตส S3-W บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA โดยวิธี spread plate



รูปที่ 34 แบคทีเรียรหัส S4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA โดยวิธี spread plate



หมายเหตุ รูป S7-W 10^{-6} # 1 และ S7-W 10^{-6} #2 ไม่ได้นำมาแสดงเนื่องจากรูปสูญหาย
รูปที่ 35 แบคทีเรียหัด S7-W บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA โดยวิธี spread plate



รูปที่ 36 แบคทีเรียรหัส S7-Y บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA โดยวิธี spread plate

ตารางที่ 22 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรีย รหัส S3 S3-W S4 S7-W และ S7-Y โดยวิธี drop plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA

รหัส แบคทีเรีย	ความเจือจาง	จำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA		
		1	2	3
S3	10 ⁻¹	TNTC	TNTC	TNTC
	10 ⁻²	TNTC	TNTC	TNTC
	10 ⁻³	TNTC	TNTC	TNTC
	10 ⁻⁴	TNTC	TNTC	TNTC
	10 ⁻⁵	TNTC	TNTC	TNTC
	10 ⁻⁶	TNTC	TNTC	TNTC
S3-W	10 ⁻¹	TNTC	TNTC	TNTC
	10 ⁻²	TNTC	TNTC	TNTC
	10 ⁻³	TNTC	TNTC	TNTC
	10 ⁻⁴	TNTC	TNTC	TNTC
	10 ⁻⁵	TNTC	TNTC	TNTC
	10 ⁻⁶	TNTC	TNTC	TNTC
S4	10 ⁻¹	TNTC	TNTC	TNTC
	10 ⁻²	TNTC	TNTC	TNTC
	10 ⁻³	TNTC	TNTC	TNTC
	10 ⁻⁴	21	23	21
	10 ⁻⁵	2	3	4
	10 ⁻⁶	0	0	0
S7-W	10 ⁻¹	TNTC	TNTC	TNTC
	10 ⁻²	TNTC	TNTC	TNTC
	10 ⁻³	TNTC	TNTC	TNTC
	10 ⁻⁴	TNTC	TNTC	TNTC
	10 ⁻⁵	8	8	9
	10 ⁻⁶	1	0	2
S7-Y	10 ⁻¹	TNTC	TNTC	TNTC
	10 ⁻²	TNTC	TNTC	TNTC
	10 ⁻³	TNTC	TNTC	TNTC
	10 ⁻⁴	11	4	8
	10 ⁻⁵	2	1	0
	10 ⁻⁶	0	0	0

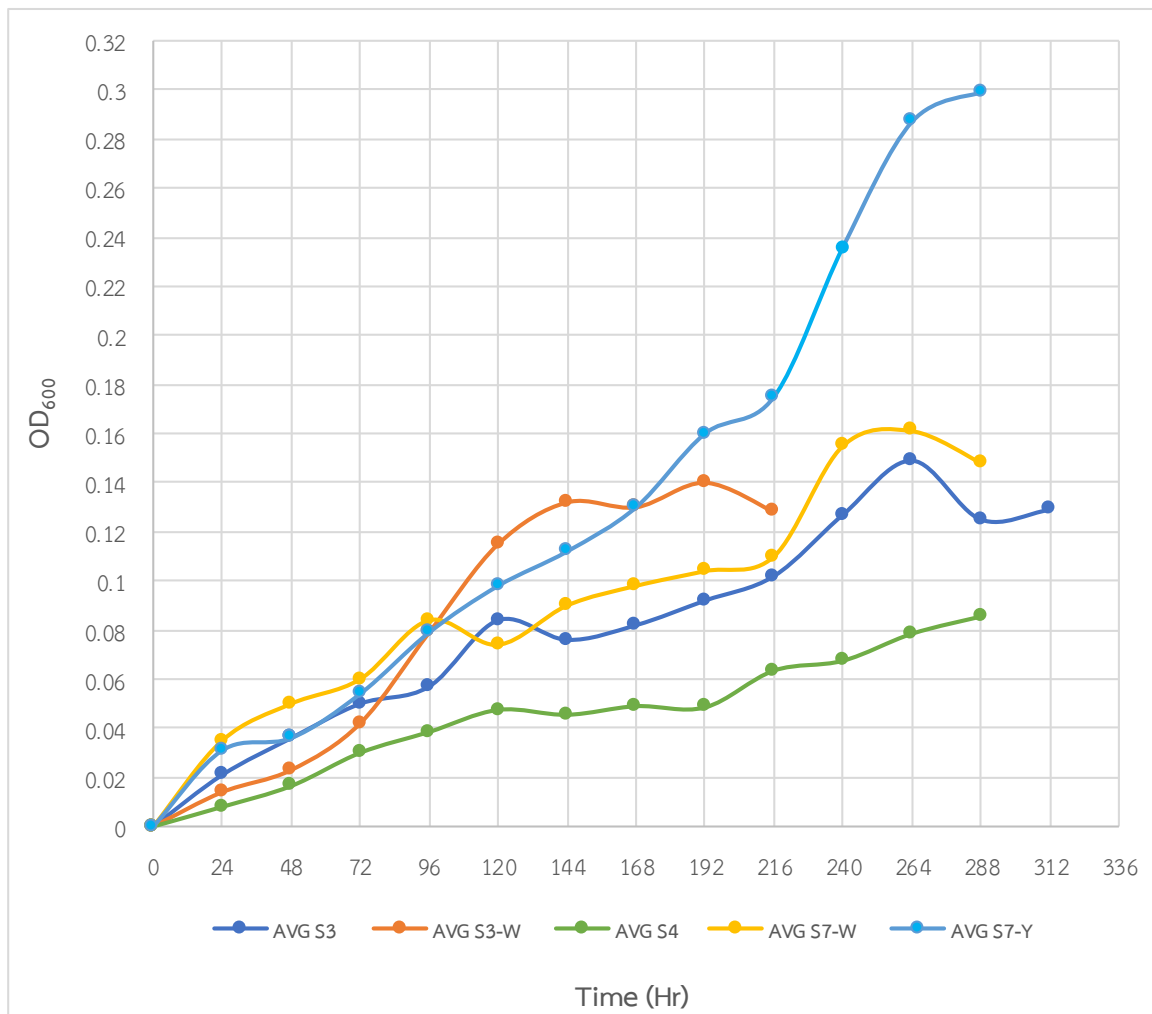
หมายเหตุ TNTC คือ too numerous to count (>300) และภาคผนวก ค รูปที่ 31

ตารางที่ 23 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรีย รหัส S3 S3-W S4 S7-W และ S7-Y โดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA

รหัสแบคทีเรีย	ความเจือจาง	จำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA	
		1	2
S3	10^{-4}	TNTC	TNTC
	10^{-5}	TNTC	TNTC
	10^{-6}	TNTC	TNTC
S3-W	10^{-4}	TNTC	TNTC
	10^{-5}	TNTC	TNTC
	10^{-6}	TNTC	TNTC
S4	10^{-4}	TNTC	TNTC
	10^{-5}	TNTC	TNTC
	10^{-6}	TNTC	TNTC
S7-W	10^{-4}	TNTC	TNTC
	10^{-5}	TNTC	TNTC
	10^{-6}	TNTC	TNTC
S7-Y	10^{-4}	TNTC	TNTC
	10^{-5}	TNTC	TNTC
	10^{-6}	TNTC	TNTC

หมายเหตุ TNTC คือ too numerous to count (>300) และภาคนวก ค รูบที่ 32 ถึง 36

4. ผลการทดลองวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียรหัส S3 S3-W S4 S7-W และ S7-Y

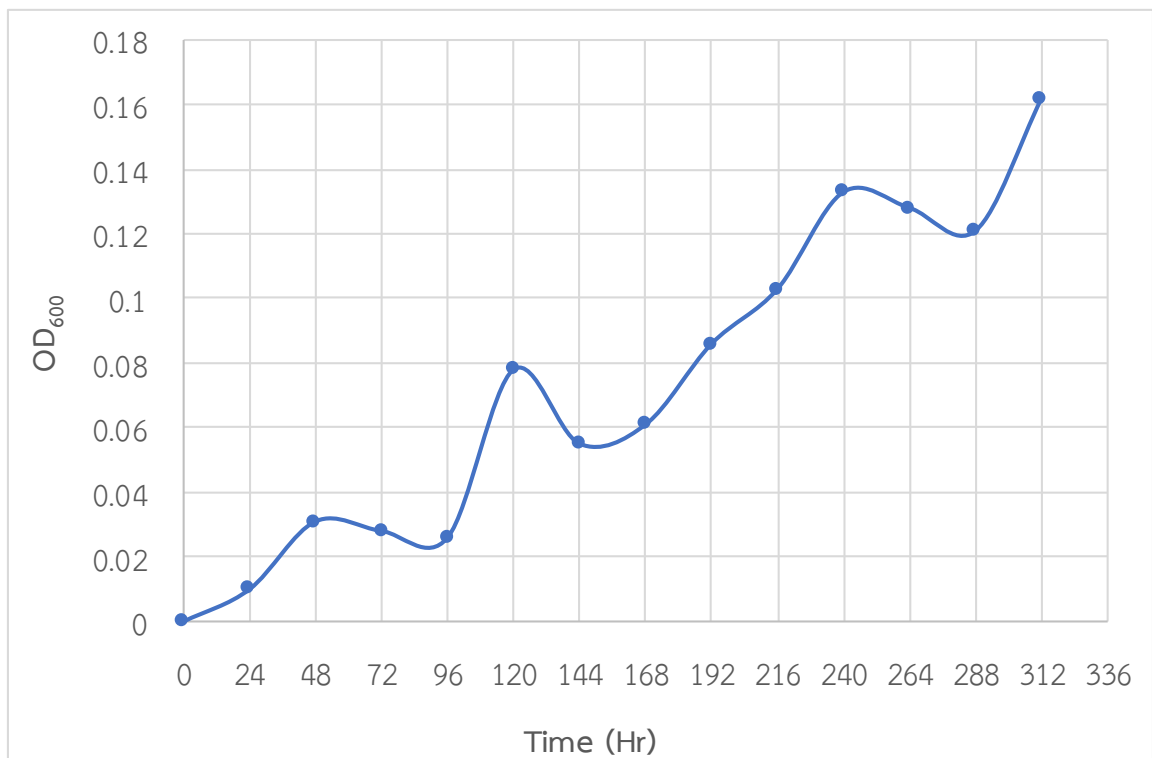


รูปที่ 37 กราฟการเจริญเฉลี่ยของแบคทีเรียรหัส S3 S3-W S4 S7-W และ S7-Y

4.1. แบคทีเรียรหัส S3

ตารางที่ 24 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรียรหัส S3 ชุดที่ 1

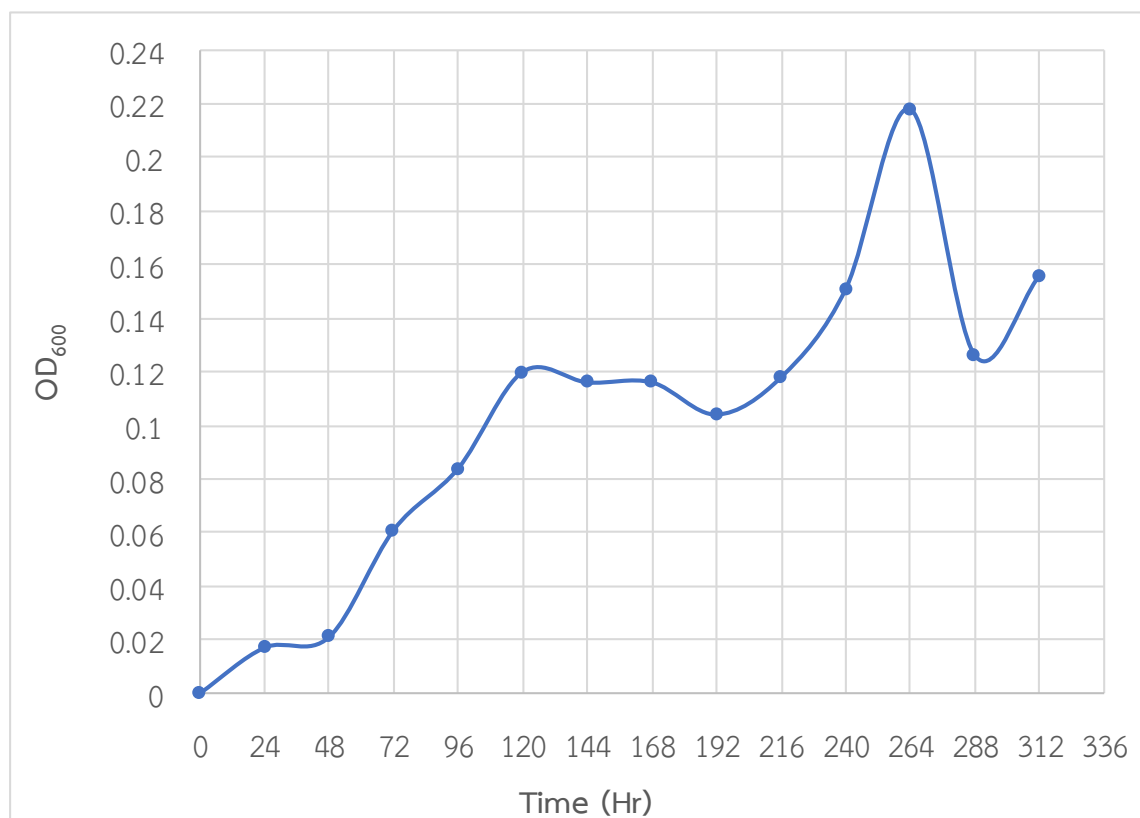
ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.010	0.010	0.010	0.010
48	0.031	0.031	0.032	0.031
72	0.028	0.028	0.028	0.028
96	0.026	0.026	0.026	0.026
120	0.079	0.078	0.077	0.078
144	0.056	0.055	0.055	0.055
168	0.061	0.061	0.062	0.061
192	0.086	0.085	0.086	0.086
216	0.103	0.104	0.103	0.103
240	0.133	0.133	0.133	0.133
264	0.128	0.128	0.127	0.128
288	0.121	0.121	0.121	0.121
312	0.163	0.162	0.162	0.162



รูปที่ 38 กราฟการเจริญของแบคทีเรียรหัส S3 ชุดที่ 1

ตารางที่ 25 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรียรหัส S3 ชุดที่ 2

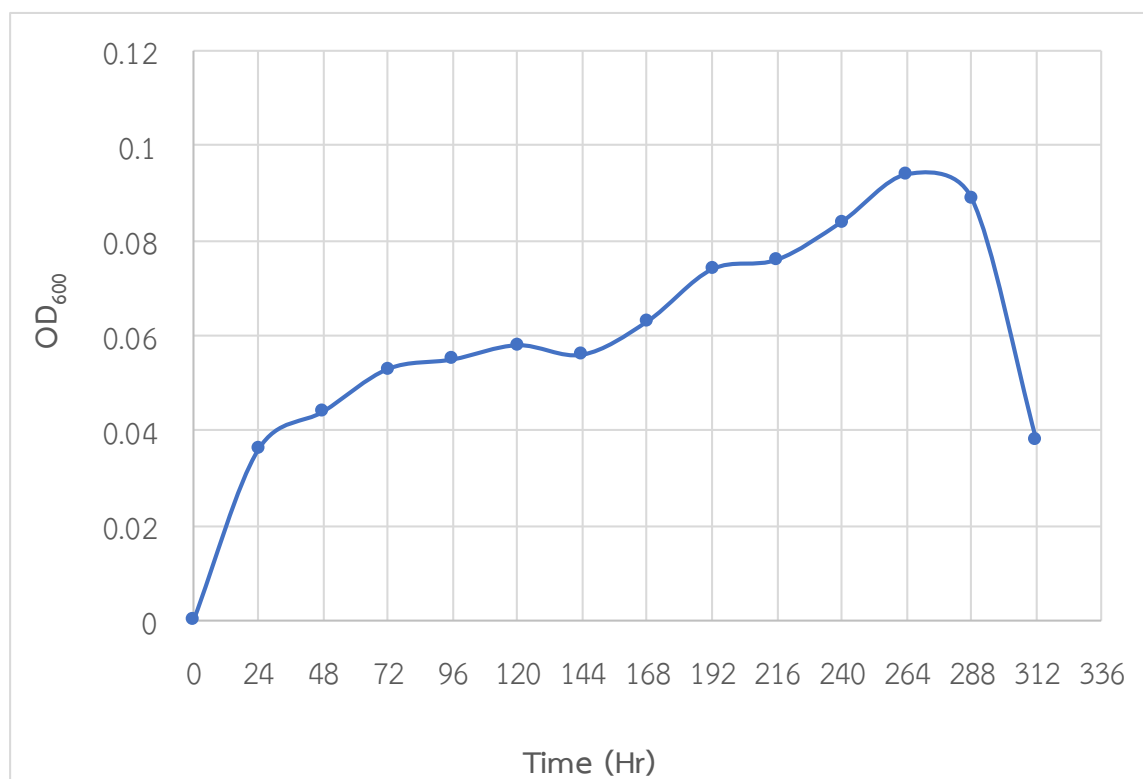
ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.017	0.018	0.017	0.017
48	0.021	0.021	0.021	0.021
72	0.061	0.062	0.061	0.061
96	0.084	0.084	0.085	0.084
120	0.120	0.120	0.120	0.120
144	0.116	0.117	0.117	0.116
168	0.116	0.116	0.116	0.116
192	0.104	0.104	0.104	0.104
216	0.118	0.118	0.119	0.118
240	0.151	0.151	0.150	0.151
264	0.217	0.218	0.218	0.218
288	0.127	0.126	0.125	0.126
312	0.156	0.157	0.156	0.156



รูปที่ 39 กราฟการเจริญของแบคทีเรียรหัส S3 ชุดที่ 2

ตารางที่ 26 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรียห้ำ S3 ชุดที่ 3

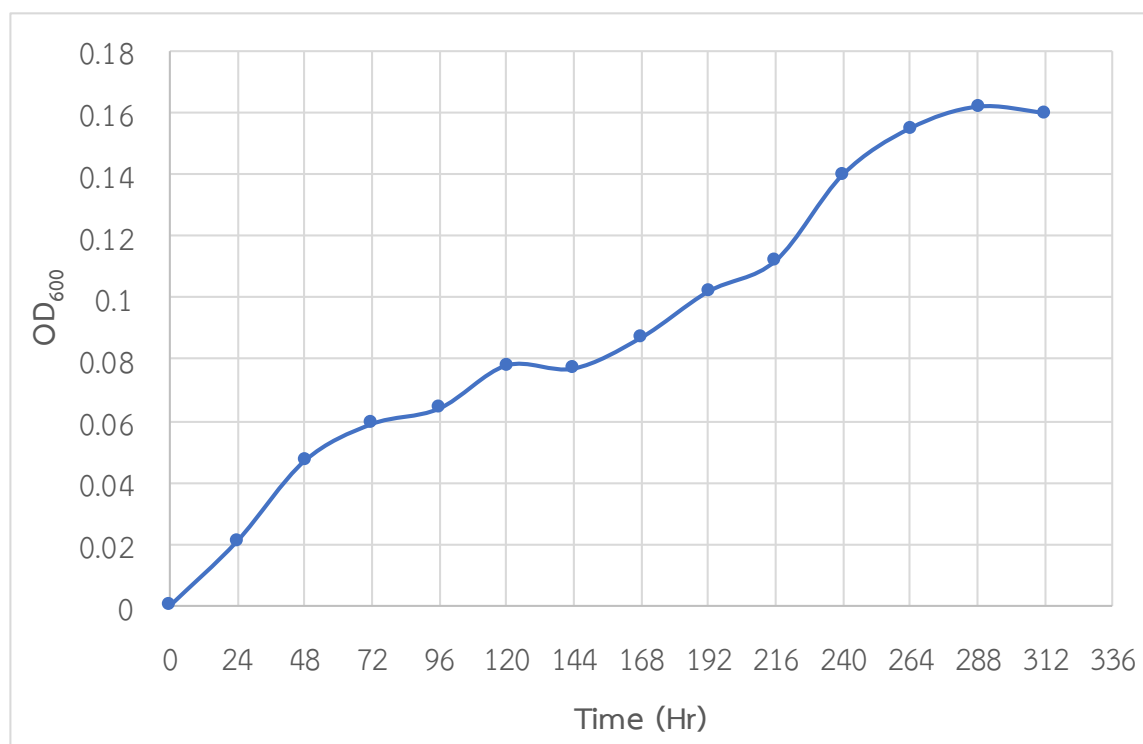
ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.036	0.037	0.036	0.036
48	0.044	0.044	0.043	0.044
72	0.053	0.053	0.053	0.053
96	0.056	0.056	0.055	0.055
120	0.058	0.058	0.058	0.058
144	0.056	0.056	0.056	0.056
168	0.063	0.063	0.063	0.063
192	0.075	0.074	0.073	0.074
216	0.076	0.076	0.075	0.076
240	0.084	0.084	0.084	0.084
264	0.095	0.094	0.094	0.094
288	0.089	0.088	0.089	0.089
312	0.038	0.038	0.039	0.038



รูปที่ 40 กราฟการเจริญของแบคทีเรียห้ำ S3 ชุดที่ 3

ตารางที่ 27 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรียห้ำ S3 ชุดที่ 4

ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.021	0.021	0.021	0.021
48	0.047	0.047	0.047	0.047
72	0.060	0.059	0.059	0.059
96	0.064	0.063	0.064	0.064
120	0.078	0.078	0.077	0.078
144	0.077	0.077	0.077	0.077
168	0.087	0.087	0.087	0.087
192	0.103	0.102	0.102	0.102
216	0.112	0.112	0.113	0.112
240	0.140	0.139	0.140	0.140
264	0.155	0.155	0.155	0.155
288	0.162	0.162	0.163	0.162
312	0.160	0.159	0.160	0.160

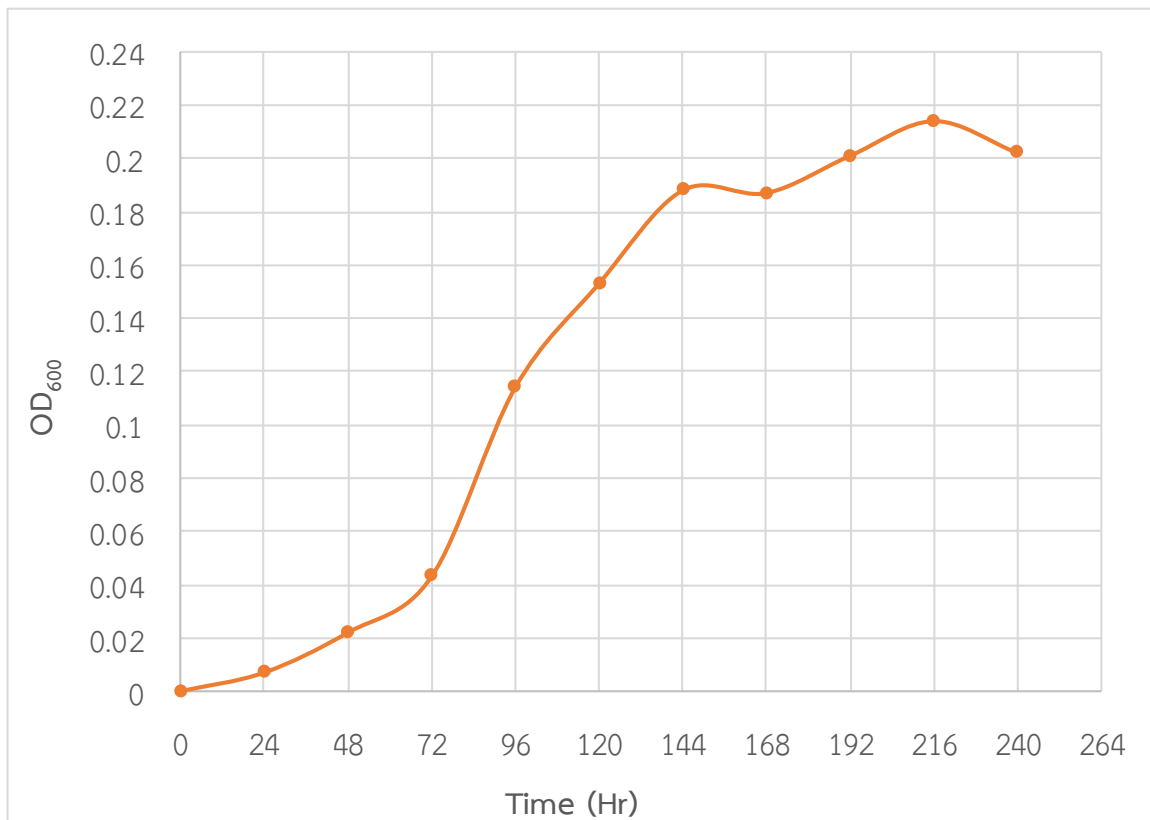


รูปที่ 41 กราฟการเจริญของแบคทีเรียห้ำ S3 ชุดที่ 4

4.2. แบคทีเรียรหัส S3-W

ตารางที่ 28 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรียรหัส S3-W ชุดที่ 1

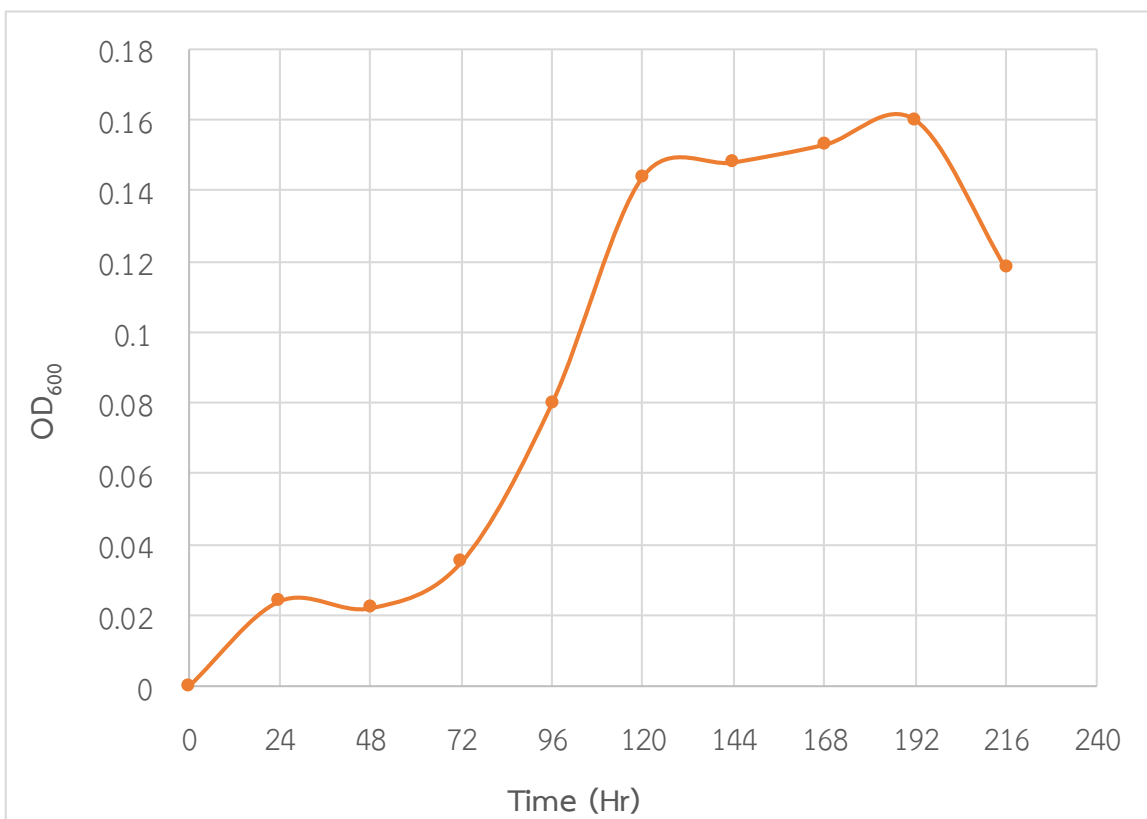
ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.007	0.007	0.007	0.007
48	0.023	0.022	0.022	0.022
72	0.043	0.043	0.043	0.043
96	0.114	0.113	0.114	0.114
120	0.152	0.153	0.153	0.153
144	0.188	0.189	0.188	0.188
168	0.187	0.187	0.187	0.187
192	0.201	0.201	0.202	0.201
216	0.214	0.215	0.214	0.214
240	0.202	0.202	0.202	0.202



รูปที่ 42 กราฟการเจริญของแบคทีเรียรหัส S3-W ชุดที่ 1

ตารางที่ 29 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรียห้ำ S3-W ชุดที่ 2

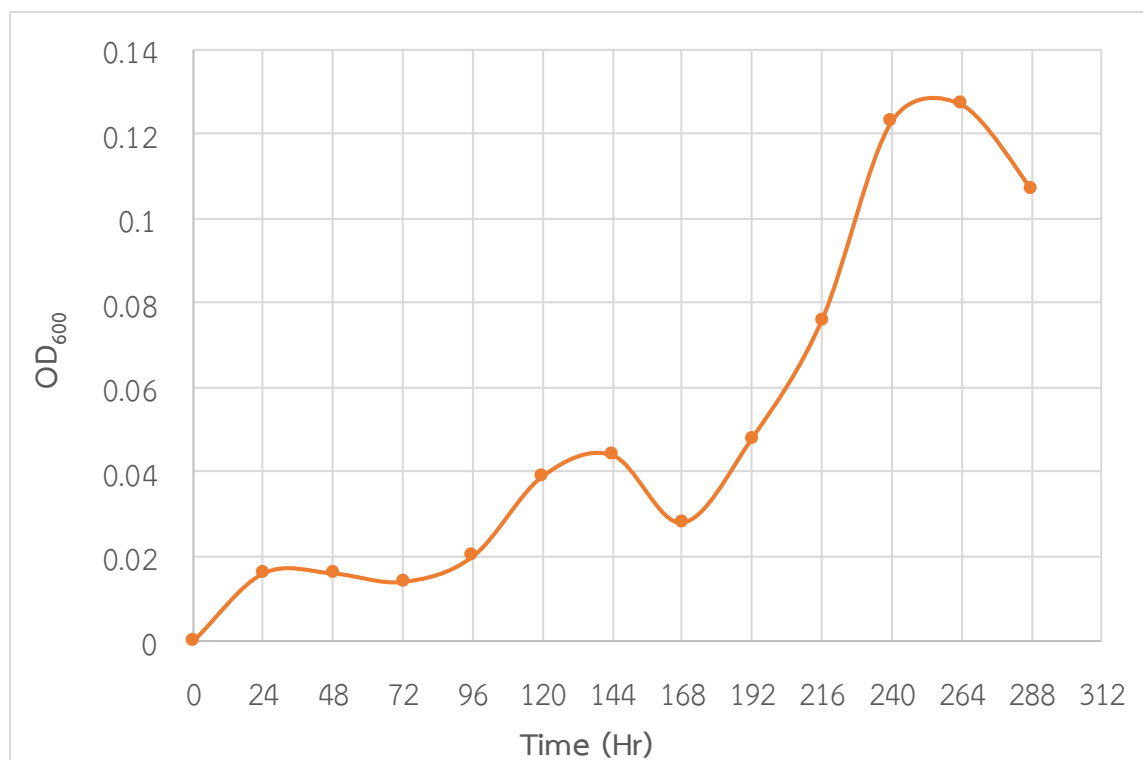
ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.024	0.024	0.024	0.024
48	0.023	0.022	0.022	0.022
72	0.035	0.035	0.035	0.035
96	0.080	0.079	0.081	0.080
120	0.144	0.144	0.144	0.144
144	0.147	0.148	0.148	0.148
168	0.152	0.153	0.153	0.153
192	0.160	0.160	0.161	0.160
216	0.118	0.118	0.119	0.118



รูปที่ 43 กราฟการเจริญของแบคทีเรียห้ำ S3-W ชุดที่ 2

ตารางที่ 30 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรียห้ำ S3-W ชุดที่ 3

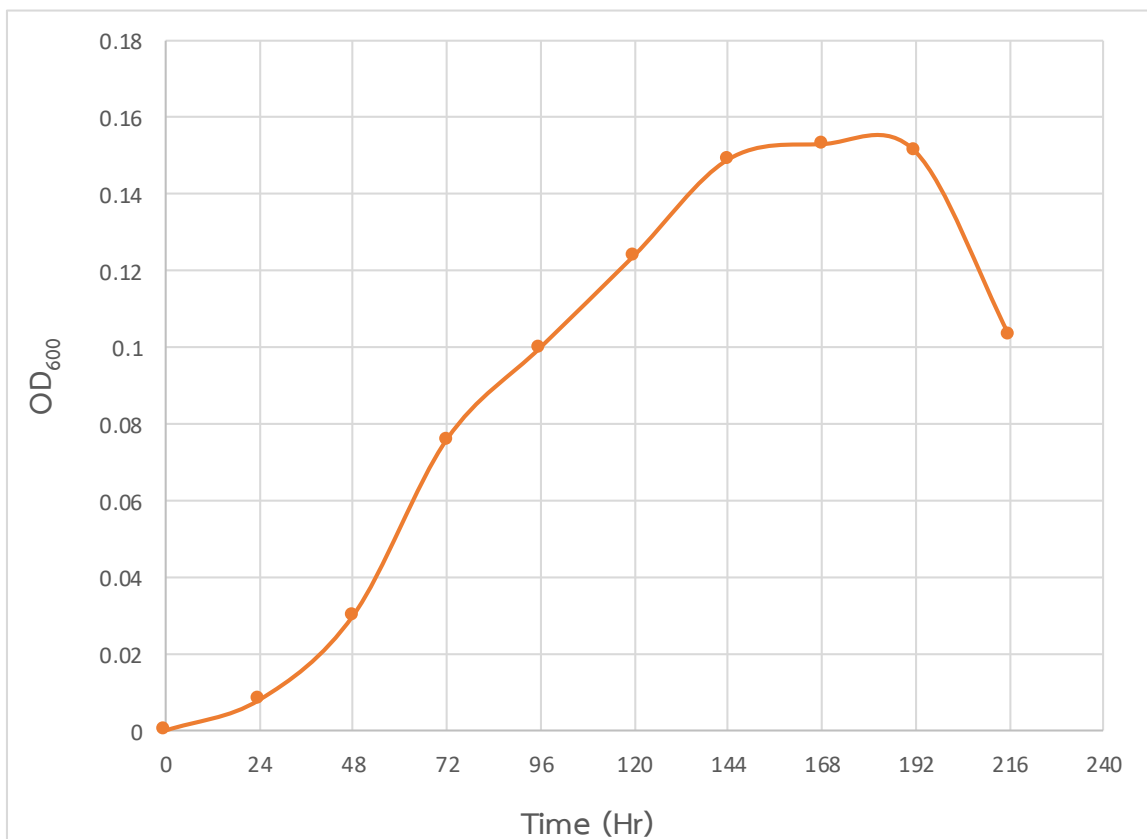
ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.016	0.016	0.016	0.016
48	0.018	0.015	0.015	0.016
72	0.014	0.013	0.014	0.014
96	0.020	0.021	0.020	0.020
120	0.040	0.039	0.039	0.039
144	0.045	0.044	0.044	0.044
168	0.028	0.028	0.028	0.028
192	0.048	0.048	0.048	0.048
216	0.076	0.076	0.075	0.076
240	0.123	0.123	0.123	0.123
264	0.126	0.127	0.127	0.127
288	0.107	0.107	0.108	0.107



รูปที่ 44 กราฟการเจริญของแบคทีเรียห้ำ S3-W ชุดที่ 3

ตารางที่ 31 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรียห้ำ S3-W ชุดที่ 4

ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.008	0.008	0.008	0.008
48	0.030	0.030	0.030	0.030
72	0.077	0.076	0.077	0.076
96	0.100	0.100	0.100	0.100
120	0.123	0.123	0.125	0.124
144	0.149	0.150	0.149	0.149
168	0.154	0.152	0.154	0.153
192	0.151	0.150	0.151	0.151
216	0.104	0.103	0.103	0.103

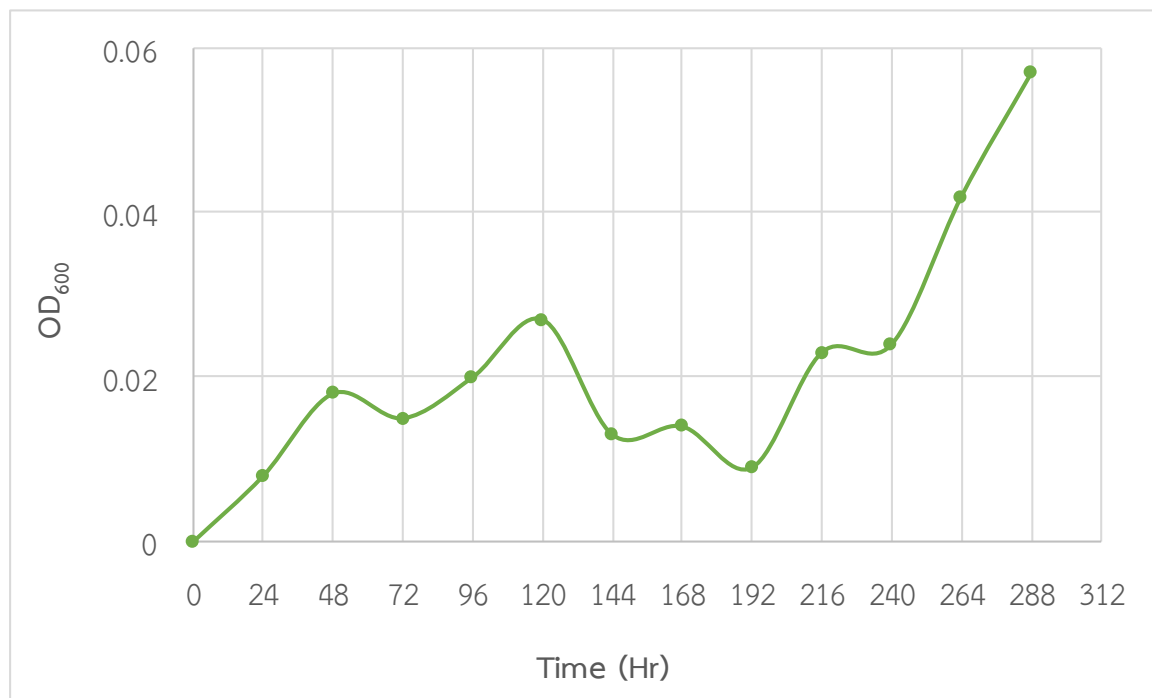


รูปที่ 45 กราฟการเจริญของแบคทีเรียห้ำ S3-W ชุดที่ 4

4.3. แบคทีเรียรหัส S4

ตารางที่ 32 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรียรหัส S4 ชุดที่ 1

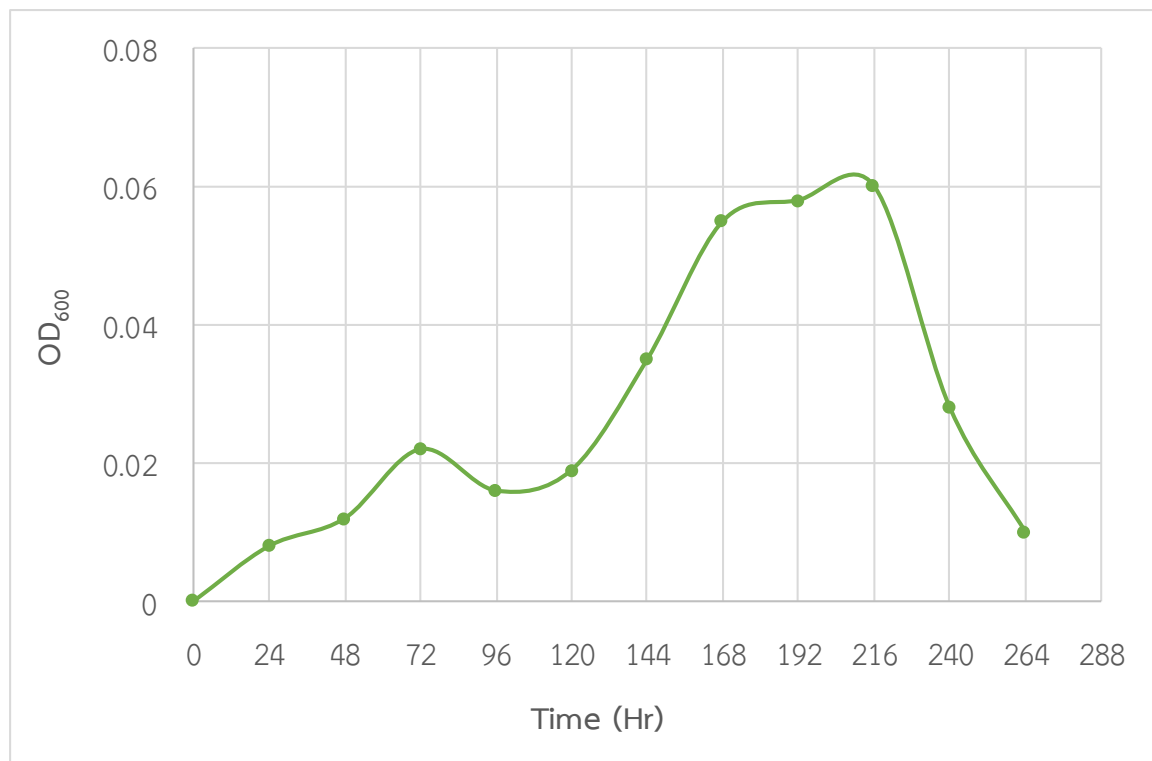
ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.008	0.008	0.008	0.008
48	0.018	0.018	0.018	0.018
72	0.015	0.015	0.015	0.015
96	0.020	0.019	0.020	0.020
120	0.027	0.027	0.027	0.027
144	0.013	0.013	0.013	0.013
168	0.014	0.014	0.014	0.014
192	0.010	0.009	0.009	0.009
216	0.022	0.023	0.023	0.023
240	0.024	0.024	0.024	0.024
264	0.042	0.042	0.043	0.042
288	0.057	0.057	0.057	0.057



รูปที่ 46 กราฟการเจริญของแบคทีเรียรหัส S4 ชุดที่ 1

ตารางที่ 33 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรียห้ำ S4 ชุดที่ 2

ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.008	0.007	0.008	0.008
48	0.012	0.011	0.012	0.012
72	0.022	0.022	0.022	0.022
96	0.016	0.016	0.016	0.016
120	0.019	0.019	0.019	0.019
144	0.035	0.036	0.035	0.035
168	0.055	0.055	0.055	0.055
192	0.058	0.057	0.058	0.058
216	0.060	0.060	0.060	0.060
240	0.028	0.028	0.028	0.028
264	0.010	0.010	0.010	0.010

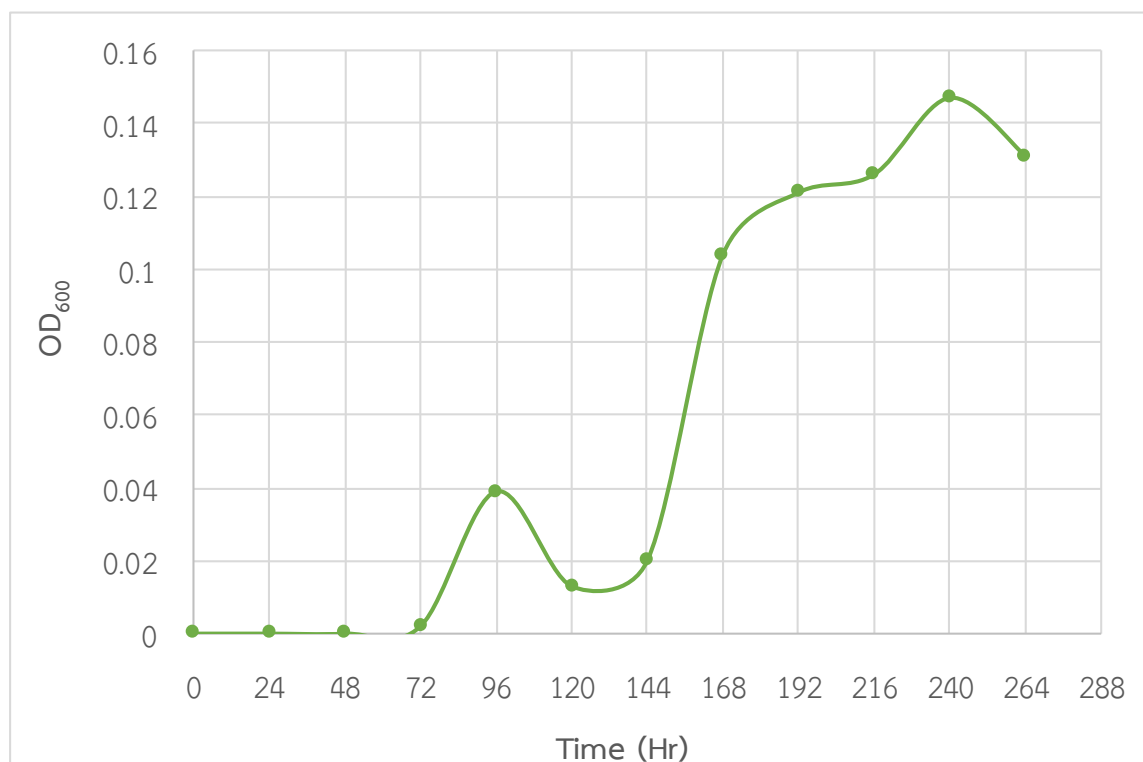


รูปที่ 47 กราฟการเจริญของแบคทีเรียห้ำ S4 ชุดที่ 2

ตารางที่ 34 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรียห้ำ S4 ชุดที่ 3

ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.000	0.000	0.000	0.000
48	0.000	0.000	0.000	0.000
72	0.002	0.002	0.003	0.002
96	0.039	0.039	0.039	0.039
120	0.013	0.013	0.013	0.013
144	0.020	0.020	0.020	0.020
168	0.104	0.105	0.104	0.104
192	0.122	0.121	0.121	0.121
216	0.126	0.126	0.126	0.126
240	0.147	0.147	0.148	0.147
264	0.130	0.131	0.131	0.131

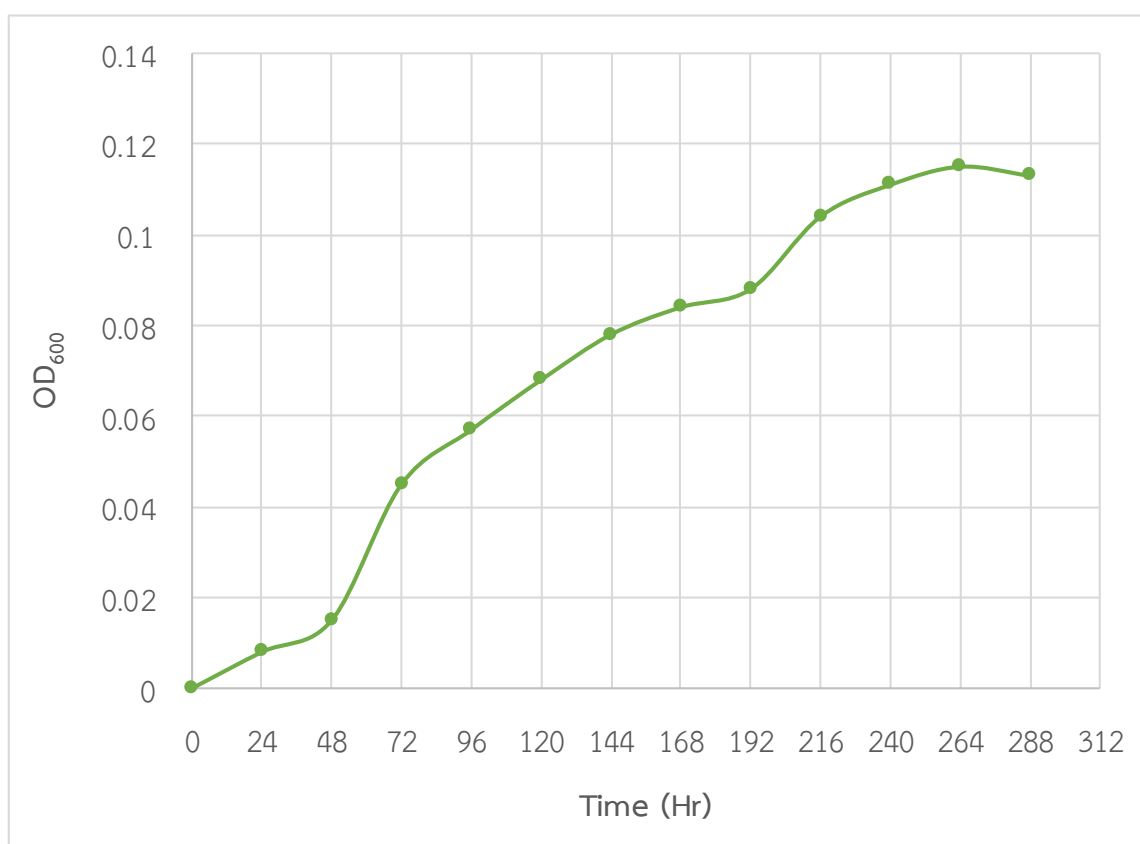
หมายเหตุ ชั่วโมงที่ 24 และ 48 ไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้



รูปที่ 48 กราฟการเจริญของแบคทีเรียห้ำ S4 ชุดที่ 3

ตารางที่ 35 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรียหีส S4 ชุดที่ 4

ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.008	0.009	0.008	0.008
48	0.015	0.015	0.015	0.015
72	0.046	0.044	0.045	0.045
96	0.057	0.057	0.057	0.057
120	0.068	0.068	0.068	0.068
144	0.078	0.078	0.078	0.078
168	0.085	0.084	0.084	0.084
192	0.088	0.088	0.088	0.088
216	0.104	0.104	0.103	0.104
240	0.111	0.111	0.111	0.111
264	0.115	0.116	0.115	0.115
288	0.114	0.114	0.114	0.114

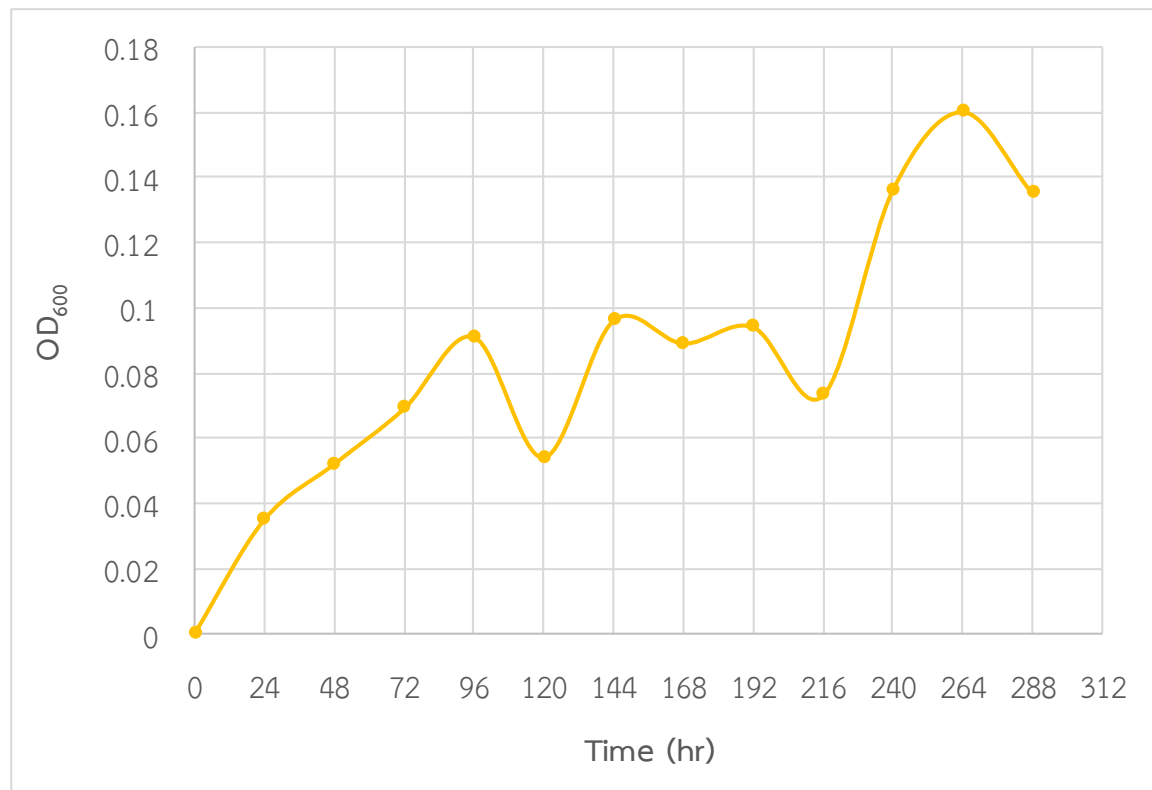


รูปที่ 49 กราฟการเจริญของแบคทีเรียหีส S4 ชุดที่ 4

4.4. แบคทีเรียรหัส S7-W

ตารางที่ 36 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรียรหัส S7-W ชุดที่ 1

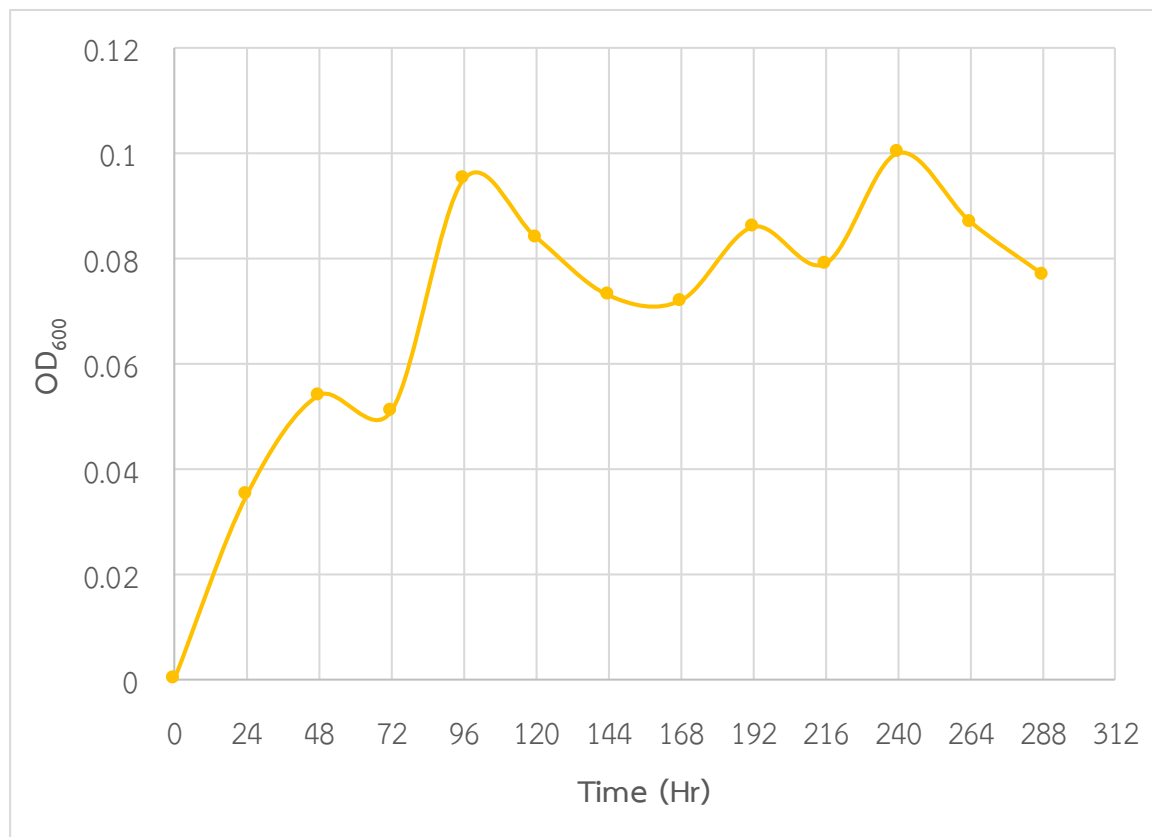
ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.035	0.035	0.035	0.035
48	0.053	0.052	0.052	0.052
72	0.069	0.069	0.070	0.069
96	0.091	0.091	0.092	0.091
120	0.053	0.055	0.055	0.054
144	0.096	0.096	0.097	0.096
168	0.090	0.089	0.089	0.089
192	0.094	0.094	0.094	0.094
216	0.072	0.073	0.073	0.073
240	0.135	0.136	0.137	0.136
264	0.160	0.160	0.160	0.160
288	0.136	0.135	0.135	0.135



รูปที่ 50 กราฟการเจริญของแบคทีเรียรหัส S7-W ชุดที่ 1

ตารางที่ 37 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรียห้ำ S7-W ชุดที่ 2

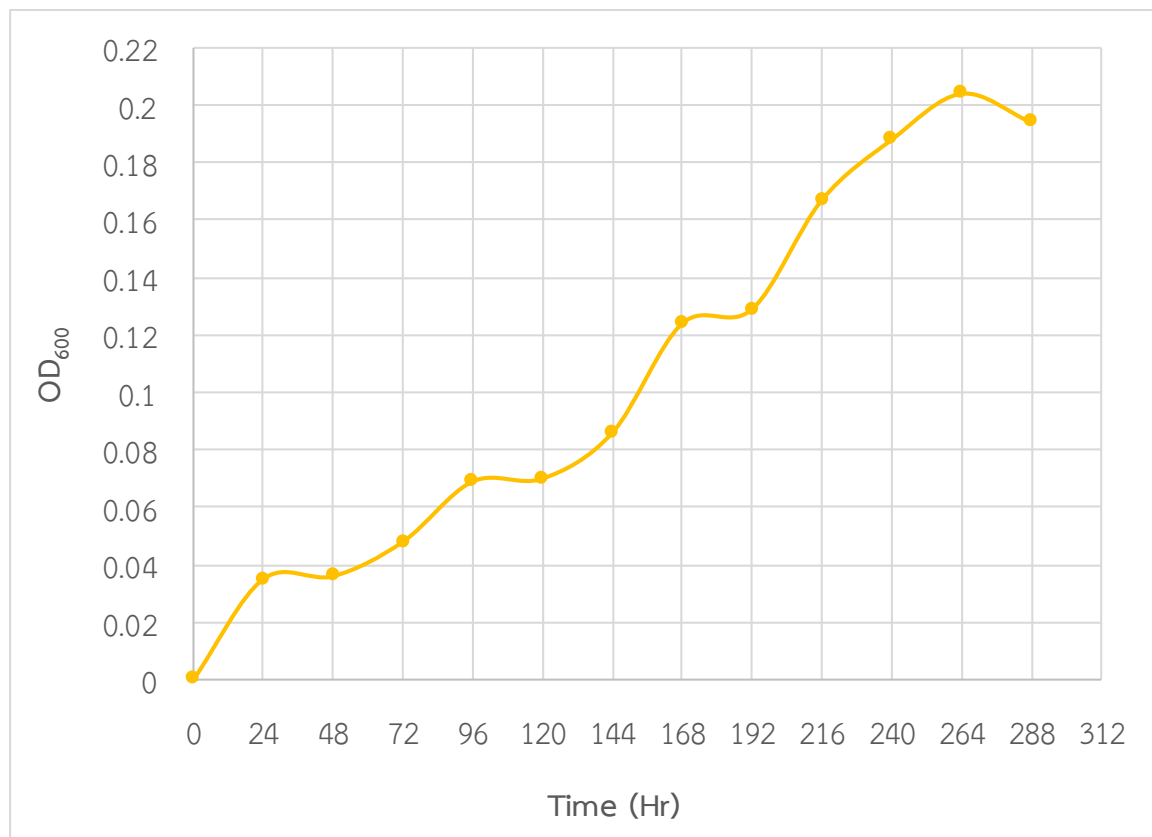
ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.035	0.035	0.035	0.035
48	0.054	0.054	0.055	0.054
72	0.050	0.051	0.051	0.051
96	0.094	0.095	0.095	0.095
120	0.084	0.084	0.084	0.084
144	0.073	0.073	0.072	0.073
168	0.072	0.072	0.073	0.072
192	0.086	0.086	0.086	0.086
216	0.078	0.079	0.079	0.079
240	0.100	0.099	0.100	0.100
264	0.087	0.087	0.087	0.087
288	0.077	0.077	0.077	0.077



รูปที่ 51 กราฟการเจริญของแบคทีเรียห้ำ S7-W ชุดที่ 2

ตารางที่ 38 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรียห้ำ S7-W ชุดที่ 3

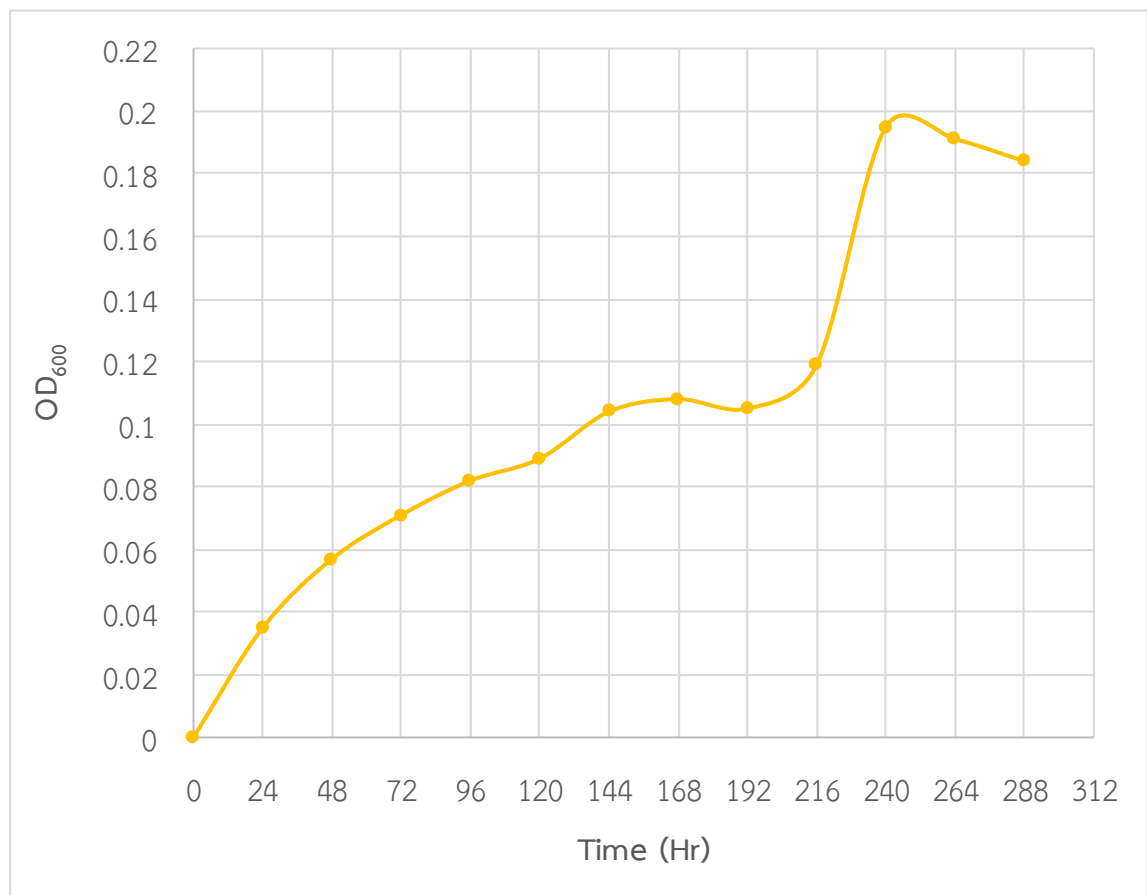
ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.035	0.035	0.035	0.035
48	0.036	0.036	0.037	0.036
72	0.048	0.048	0.048	0.048
96	0.068	0.069	0.069	0.069
120	0.069	0.071	0.071	0.070
144	0.087	0.086	0.086	0.086
168	0.124	0.124	0.124	0.124
192	0.129	0.129	0.129	0.129
216	0.166	0.167	0.167	0.167
240	0.188	0.188	0.189	0.188
264	0.204	0.204	0.205	0.204
288	0.195	0.194	0.193	0.194



รูปที่ 52 กราฟการเจริญของแบคทีเรียห้ำ S7-W ชุดที่ 3

ตารางที่ 39 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรีย S7-W ชุดที่ 4

ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.035	0.035	0.035	0.035
48	0.057	0.057	0.057	0.057
72	0.071	0.071	0.071	0.071
96	0.082	0.082	0.082	0.082
120	0.089	0.089	0.089	0.089
144	0.104	0.104	0.104	0.104
168	0.108	0.108	0.108	0.108
192	0.105	0.105	0.105	0.105
216	0.119	0.119	0.119	0.119
240	0.195	0.195	0.195	0.195
264	0.192	0.191	0.191	0.191
288	0.183	0.183	0.185	0.184

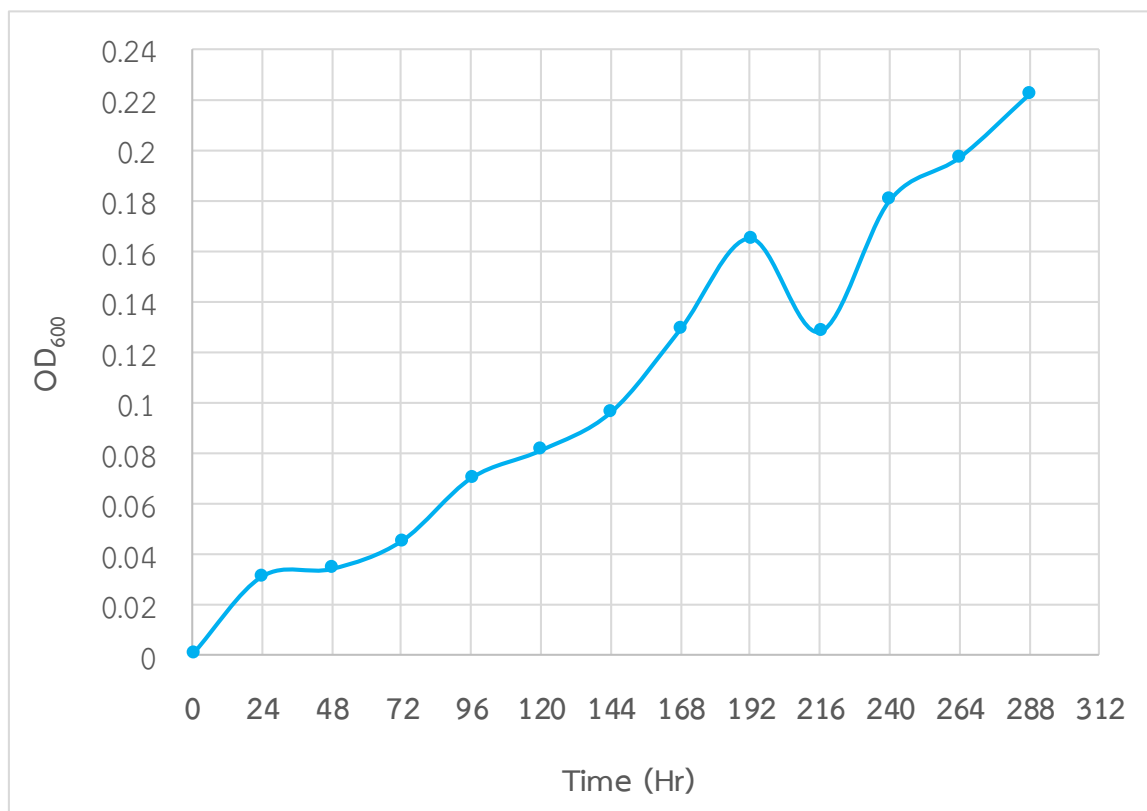


รูปที่ 53 กราฟการเจริญของแบคทีเรียห้ำ S7-W ชุดที่ 4

4.5. แบคทีเรียรหัส S7-Y

ตารางที่ 40 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรียรหัส S7-Y ชุดที่ 1

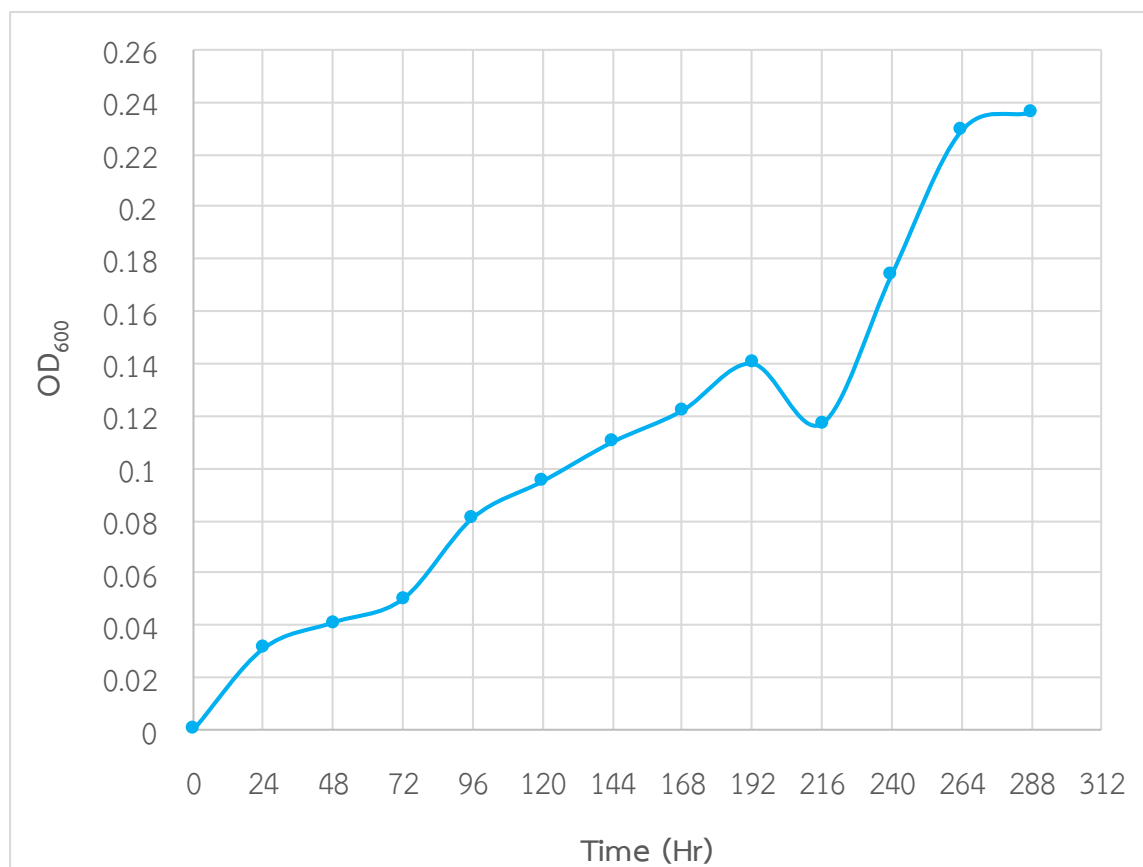
ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.031	0.031	0.031	0.031
48	0.033	0.034	0.034	0.034
72	0.045	0.045	0.045	0.045
96	0.069	0.070	0.071	0.070
120	0.080	0.080	0.082	0.081
144	0.096	0.096	0.097	0.096
168	0.130	0.128	0.129	0.129
192	0.164	0.165	0.165	0.165
216	0.128	0.127	0.128	0.128
240	0.180	0.179	0.181	0.180
264	0.197	0.197	0.198	0.197
288	0.222	0.223	0.220	0.222



รูปที่ 54 กราฟการเจริญของแบคทีเรียรหัส S7-Y ชุดที่ 1

ตารางที่ 41 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรียหีส S7-Y ชุดที่ 2

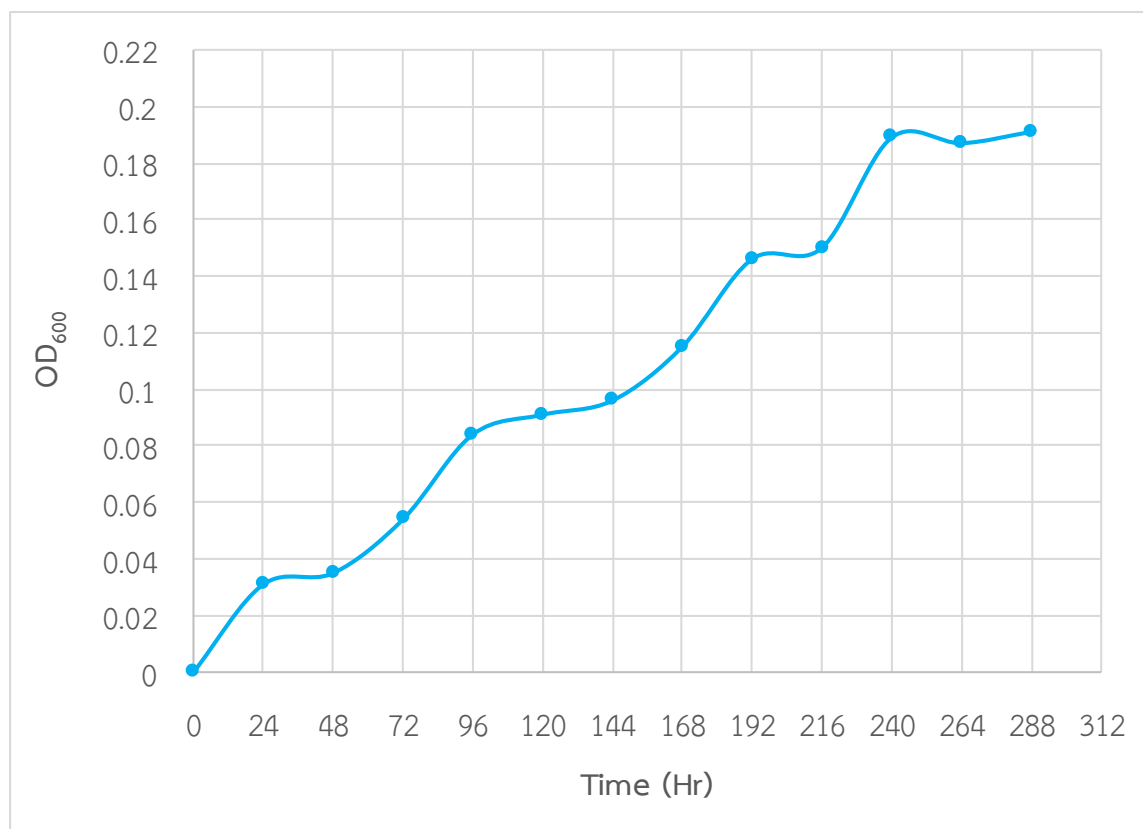
ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.031	0.031	0.031	0.031
48	0.041	0.041	0.040	0.041
72	0.051	0.050	0.050	0.050
96	0.080	0.082	0.081	0.081
120	0.094	0.095	0.095	0.095
144	0.109	0.110	0.110	0.110
168	0.121	0.122	0.122	0.122
192	0.140	0.141	0.140	0.140
216	0.117	0.117	0.118	0.117
240	0.173	0.175	0.173	0.174
264	0.228	0.229	0.230	0.229
288	0.237	0.236	0.236	0.236



รูปที่ 55 กราฟการเจริญของแบคทีเรียหีส S7-Y ชุดที่ 2

ตารางที่ 42 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรียหีส S7-Y ชุดที่ 3

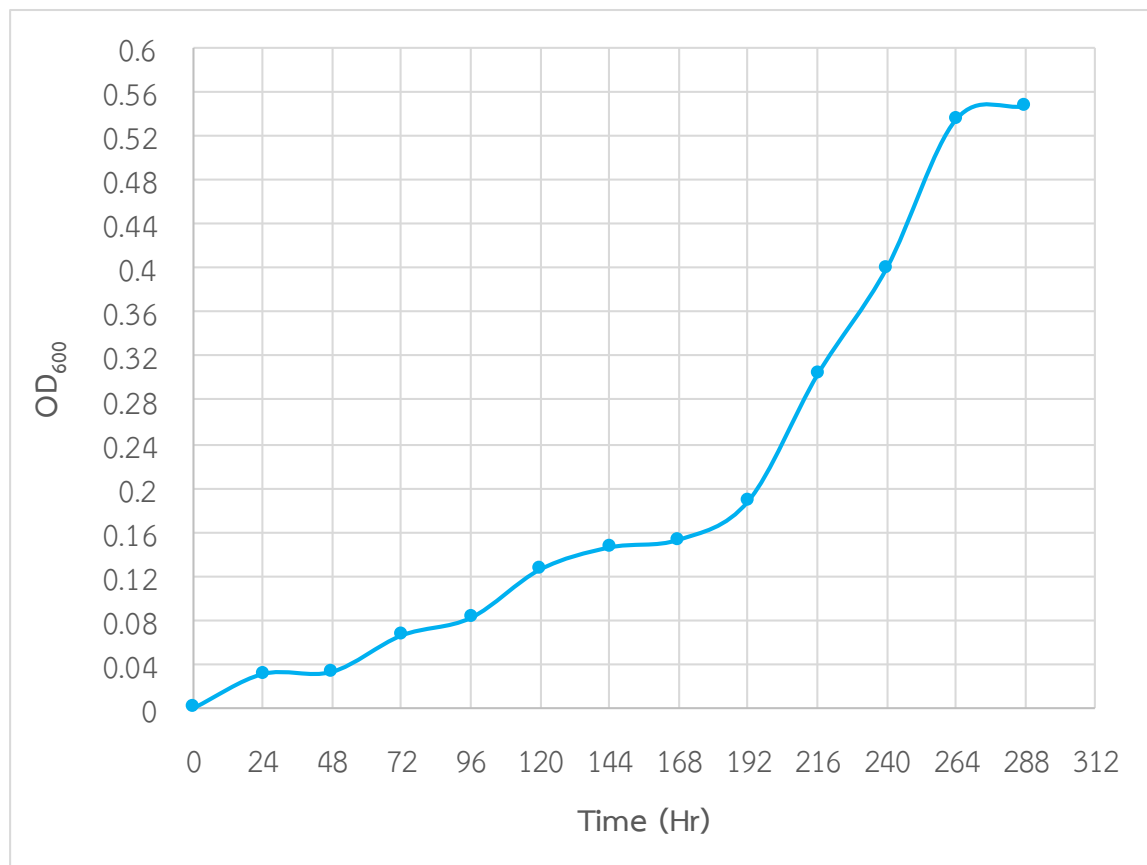
ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.031	0.031	0.031	0.031
48	0.035	0.035	0.035	0.035
72	0.054	0.054	0.053	0.054
96	0.083	0.084	0.084	0.084
120	0.090	0.091	0.091	0.091
144	0.096	0.096	0.095	0.096
168	0.115	0.116	0.115	0.115
192	0.146	0.146	0.146	0.146
216	0.150	0.151	0.150	0.150
240	0.189	0.188	0.189	0.189
264	0.186	0.188	0.188	0.187
288	0.192	0.190	0.192	0.191



รูปที่ 56 กราฟการเจริญของแบคทีเรียหีส S7-Y ชุดที่ 3

ตารางที่ 43 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรียหีส S7-Y ชุดที่ 4

ชั่วโมง	ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.031	0.031	0.031	0.031
48	0.033	0.034	0.033	0.033
72	0.066	0.067	0.067	0.066
96	0.081	0.082	0.082	0.082
120	0.124	0.126	0.127	0.126
144	0.146	0.146	0.146	0.146
168	0.154	0.153	0.153	0.153
192	0.189	0.189	0.187	0.188
216	0.302	0.303	0.303	0.303
240	0.398	0.400	0.402	0.400
264	0.534	0.535	0.535	0.535
288	0.545	0.547	0.548	0.547



รูปที่ 57 กราฟการเจริญของแบคทีเรียหีส S7-Y ชุดที่ 4