



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ

การประยุกต์ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียผสมเพื่อส่งเสริมการย่อยสลาย
ขยะพลาสติกพอลิแลคติกแอซิด

ชื่อผู้จัดทำ

นางสาวภาวิมล เพ็ชรประภา รหัสประจำตัว 6032342623

ภาควิชา

จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา

2563

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ การประยุกต์ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียผสมเพื่อส่งเสริมการย่อยสลายขยะพลาสติกพอลิแลคติก
แอซิด

โดย นางสาวภาวิมล เพ็ชรประภา รหัสประจำตัวนิสิต 6032342623

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 ศึกษานววิทยาศาสตร์

อนันท์ งาม: หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

คณะกรรมการสอบโครงการ

เอกวัล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

สุชาดา จันทร์ประทีป กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป นภทร)

อรุณทัย ภูัญญาคง กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภูัญญาคง)

ชิวานันท์ เดชอุปการ กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชิวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

การประยุกต์ใช้หัวข้อแบคทีเรียผสมเพื่อส่งเสริมการย่อยสลายขยะพลาสติก

พอลิแลคติกแอซิด

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย

นิสิตในโครงการ

นางสาวภาวิมล เพ็ชรประภา รหัสประจำตัวนิสิต 603 23426 23

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของ

การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

ชื่อโครงการ การประยุกต์ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียผสมเพื่อส่งเสริมการย่อยสลายขยะพลาสติกพอลิแลคติก
แอซิด

โดย นางสาวภาวิมล เพ็ชรประภา รหัสประจำตัวนิสิต 6032342623

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

พอลิแลคติกแอซิด (PLA) เป็นพลาสติกชีวภาพที่กำลังได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในปัจจุบัน โดยขยะพลาสติก PLA สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ แต่ใช้เวลานาน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Microbial consortium) ที่มีความสามารถสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวพลาสติก PLA เพื่อใช้ส่งเสริมการย่อยสลายพลาสติก PLA โดยเริ่มจากการทดสอบการเจริญของแบคทีเรีย 5 ชนิด แล้วพบว่าแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* GY19, *Gordonia amicalis* JC11 และ *Weissella cibaria* PN3 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) สามารถเจริญร่วมกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tryptone Soya Broth โดยโคโคไลน์มีลักษณะเป็นเมือกและเจริญทั่วจานอาหาร จึงนำแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มาใช้เป็นหัวเชื้อแบคทีเรียผสม พบว่าหัวเชื้อแบคทีเรียผสมมีการเจริญได้ดีกว่าการเจริญแบบเชื้อเดี่ยว โดยมีจำนวน 1.1×10^9 CFU/mL เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน นอกจากนั้นหัวเชื้อแบคทีเรียผสมสามารถสร้างไบโอฟิล์มในไมโครไทเทอร์เพลท ซึ่งคาดว่าจะช่วยส่งเสริมความสามารถในการเกาะของหัวเชื้อแบคทีเรียบนผิวของขยะพลาสติก PLA และอาจจะเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายพลาสติก PLA ต่อไป โดยในอนาคตจะนำหัวเชื้อแบคทีเรียผสมไปทดสอบการย่อยสลายพลาสติก PLA โดยศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อการย่อยสลาย PLA ได้แก่ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลาย ความเป็นกรดต่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น นอกจากนี้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะพื้นผิวของพลาสติกที่เวลาต่าง ๆ ความรู้ที่ได้จะนำไปใช้สำหรับการออกแบบระบบบำบัดขยะพลาสติกต่อไป

Project Application of bacterial inoculum to enhance degradation of Polylactic acid plastic waste

Student Ms. Phawimol Petchprapa Student ID. 6032342623

Project advisor Assoc. Prof. Dr. Ekawan Luepromchai, Ph.D.

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

Poly-lactic acid (PLA) is one of the most popular bioplastics available today. PLA plastic waste is degradable through biological process, but it takes a long time. The objective of this research was to select microbial consortium capable of producing biofilm on PLA substrates, which will promote the degradation of PLA plastic waste. The study started by investigating growth pattern of 5 bacterial strains and found that three bacteria including *Bacillus subtilis* GY19 *Gordonia amicalis* JC11 and *Weissella cibaria* PN3 grew well together on Tryptone Soya Broth solid culture media and formed slimy colonies over the agar surface. These bacteria are Gram-positive and have an ability to form biofilms and produce biosurfactants. Therefore, they were selected to use as a bacterial consortium. It was found that the bacterial consortium grew better than the single isolate. The number of mixed bacteria was 1.1×10^9 CFU / mL when cultured for 6 days. In addition, the bacterial consortium formed biofilm in microthermal plates. It is expected to promote the bacterial attachment on the surface of PLA plastic waste and may further enhance its degradation. In the future, the bacterial consortium will be tested for plastics degradation and various factors that affect the degradation of PLA will be investigated such as an optimum concentration of carbon and nitrogen sources, optimum temperature, acidity and alkalinity (pH) of the culture media and etc. In addition, the changes of plastic surface will be monitored over time. The acquired knowledge will be used for designing a plastic waste treatment process.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ ความเมตตา ให้คำปรึกษา ค่ะแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย รวมถึงช่วยตรวจทานแก้ไขให้โครงการฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความเมตตา และความเอาใจใส่ของอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ และให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบโครงการฉบับนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความรู้ คำแนะนำและความช่วยเหลือต่าง ๆ ตลอดการทำโครงการฉบับนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือต่าง ๆ ตลอดการทำโครงการฉบับนี้

ขอขอบพระคุณทุนโครงการวิจัยการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จากงบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้อนุเคราะห์เงินสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ ๆ และเพื่อน ๆ ร่วมห้องปฏิบัติการ 1704/14 ทุกคน ที่คอยสละเวลาอันมีค่าสำหรับให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือ และคำแนะนำ รวมถึงคอยให้กำลังใจเป็นอย่างดีตลอดมา

ขอขอบคุณพี่ ๆ และเพื่อนๆ และสมาชิกชั้น 17 ทุกคน ที่คอยให้ความรู้ คำแนะนำ และความช่วยเหลือในเรื่องต่าง ๆ รวมทั้งยังให้กำลังใจในการทำโครงการนี้เสมอมา

ขอขอบคุณเพื่อนทุกคนในรุ่น MCCU44 รวมถึงพี่ ๆ น้อง ๆ ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคน ที่คอยให้คำแนะนำ ให้กำลังใจ ช่วยรับฟังปัญหา และเป็นความสบายใจให้ตลอดการทำโครงการฉบับนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา และสมาชิกทุกคนในครอบครัว ที่มอบโอกาสในการเรียนรู้ และให้การสนับสนุนมาโดยตลอด รวมทั้งยังคอยรับฟังปัญหา และช่วยเหลือผู้วิจัยในทุก ๆ ด้าน ยิ่งไปกว่านั้นยังเป็นกำลังใจที่สำคัญแก่ผู้วิจัยเรื่อยมา

ด้วยความเคารพอย่างสูง

นางสาวภาวิมล เพ็ชรประภา

พฤษภาคม 2564

สารบัญ

| | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ข |
| กิตติกรรมประกาศ | ค |
| สารบัญ | ง |
| สารบัญรูปภาพ | ฉ |
| สารบัญตาราง | ช |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| 1.1 พลาสติกและปัญหาขยะพลาสติกในปัจจุบัน | 1 |
| 1.2 พลาสติกชีวภาพ | 3 |
| 1.3 พอลิแลคติกแอซิด | 4 |
| 1.4 การย่อยสลายพอลิแลคติกแอซิด | 6 |
| 1.5 การย่อยสลายพอลิแลคติกแอซิด โดยจุลินทรีย์ | 7 |
| 1.6 แบคทีเรียและกลุ่มแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพอลิแลคติกแอซิด | 8 |
| 1.7 ไบโอฟิล์ม | 9 |
| 1.8 การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ | 11 |
| 1.9 ภาพรวมของงานวิจัย | 13 |
| 1.10 วัตถุประสงค์ | 14 |
| 1.11 วิธีการดำเนินงาน | 14 |
| 1.12 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 14 |
| บทที่ 2 อุปกรณ์ สารเคมี และชุดทดสอบ | 15 |
| 2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย | 15 |
| 2.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย | 16 |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง | 17 |
| 3.1 แบคทีเรีย อาหารเลี้ยงเชื้อและพลาสติกที่ใช้ในการทดลอง | 17 |
| 3.2 คัดเลือกกลุ่มแบคทีเรียจากแบคทีเรีย 5 ชนิด | 18 |
| 3.3 ศึกษาการเจริญของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมและนับจำนวน | 18 |

| | หน้า |
|--|------|
| 3.4 ทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมและการย่อยพลาสติก PLA | 19 |
| 3.4.1 ทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มในไมโครไทเทอร์เพลท | 19 |
| 3.4.2 ทดสอบการยึดเกาะของแบคทีเรียผสมและการย่อยพลาสติก PLA | 19 |
| 3.4.2.1 ทดสอบการยึดเกาะของแบคทีเรียผสมบนพลาสติก PLA | 19 |
| 3.4.2.2 ทดสอบการย่อยสลายพลาสติก PLA | 20 |
| บทที่ 4 ผลการทดลอง | 21 |
| 4.1 ผลการคัดเลือกกลุ่มแบคทีเรียจากแบคทีเรีย 5 ชนิด | 21 |
| 4.2 ผลการศึกษาการเจริญของหัวเชื้อแบคทีเรียผสม | 28 |
| 4.3 ผลการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของหัวเชื้อแบคทีเรียผสม | 31 |
| 4.3.1 ผลการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มบนไมโครไทเทอร์เพลท | 31 |
| บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง | 33 |
| เอกสารอ้างอิง | 37 |
| ภาคผนวก | 42 |
| ภาคผนวก ก | 42 |
| ภาคผนวก ข | 43 |

สารบัญรูปลูกภาพ

| | หน้า |
|---|------|
| รูปที่ 1.1 ตัวอย่างโครงสร้างของพลาสติกชนิดต่างๆ | 1 |
| รูปที่ 1.2 ตารางแสดงรายชื่อประเทศที่มีการผลิตขยะพลาสติกที่สูงสุด 5 อันดับของโลก ในปี พ.ศ.2559 | 2 |
| รูปที่ 1.3 ความแตกต่างของพลาสติกที่ผลิตจากพืชและพลาสติกที่ผลิตจากปิโตรเลียม | 4 |
| รูปที่ 1.4 ขั้นตอนการผลิตและการย่อยสลายของ PLA | 5 |
| รูปที่ 1.5 กลไกการสังเคราะห์ PLA จากปฏิกิริยาต่างๆ | 6 |
| รูปที่ 1.6 กระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (Biodegradation process) | 8 |
| รูปที่ 1.7 การสร้างไบโอฟิล์มในขั้นตอนต่างๆ | 13 |
| รูปที่ 3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ <i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ GY19 (ก), <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> สายพันธุ์ GY30 (ข), <i>Gordonia westfalica</i> สายพันธุ์ GY40 (ค), <i>Gordonia amicalis</i> สายพันธุ์ JC11 (ง) และ <i>Weissella cibaria</i> สายพันธุ์ PN3 (จ) | 17 |
| รูปที่ 4.1 กราฟการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ <i>Bacillus subtilis</i> GY19, <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> GY30, <i>Gordonia westfalica</i> GY40, <i>Gordonia amicalis</i> JC11 และ <i>Weissella cibaria</i> PN3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB จากการวัดความขุ่นของ การดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600nm}) | 21 |
| รูปที่ 4.2 กราฟการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ <i>Bacillus subtilis</i> GY19 (ก), <i>Gordonia amicalis</i> JC11 (ข) และ <i>Weissella cibaria</i> PN3 (ค) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB จากการวัดความขุ่นของการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600nm}) | 23 |
| รูปที่ 4.3 การเจริญร่วมกันของโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ <i>Bacillus subtilis</i> GY19, <i>Gordonia</i> <i>amicalis</i> JC11 และ <i>Weissella cibaria</i> PN3 จากการขีดทดสอบ (cross streak) บนอาหาร เลี้ยงเชื้อแข็ง TSB | 24 |
| รูปที่ 4.4 การเจริญร่วมกันของโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ <i>Bacillus subtilis</i> GY19, <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> GY30 และ <i>Gordonia westfalica</i> GY40 | 24 |
| รูปที่ 4.5 การเจริญร่วมกันของโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ <i>Bacillus subtilis</i> GY19, <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> GY30 และ <i>Gordonia amicalis</i> JC11 | 25 |
| รูปที่ 4.6 การเจริญร่วมกันของโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ <i>Bacillus subtilis</i> GY19, <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> GY30 และ <i>Weissella cibaria</i> PN3 | 25 |

หน้า

| | |
|--|----|
| รูปที่ 4.7 การเจริญรุ่มกันของโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ <i>Bacillus subtilis</i> GY19, <i>Gordonia westfalica</i> GY40 และ <i>Gordonia amicalis</i> JC11 | 25 |
| รูปที่ 4.8 การเจริญรุ่มกันของโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ <i>Bacillus subtilis</i> GY19, <i>Gordonia westfalica</i> GY40 และ <i>Weissella cibaria</i> PN3 | 26 |
| รูปที่ 4.9 การเจริญรุ่มกันของโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> GY30, <i>Gordonia westfalica</i> GY40 และ <i>Gordonia amicalis</i> JC11 | 26 |
| รูปที่ 4.10 การเจริญรุ่มกันของโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> GY30, <i>Gordonia westfalica</i> GY40 และ <i>Weissella cibaria</i> PN3 | 26 |
| รูปที่ 4.11 การเจริญรุ่มกันของโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> GY30, <i>Gordonia amicalis</i> JC11 และ <i>Weissella cibaria</i> PN3 | 27 |
| รูปที่ 4.12 การเจริญรุ่มกันของโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ <i>Gordonia westfalica</i> GY40, <i>Gordonia amicalis</i> JC11 และ <i>Weissella cibaria</i> PN3 | 27 |
| รูปที่ 4.13 กราฟการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ที่เจริญอยู่รุ่มกันในรูปแบบของหัวเชื้อแบคทีเรียผสม | 28 |
| รูปที่ 4.14 กราฟการเจริญเฉลี่ยที่วันต่างๆ ของเชื้อแต่ละชนิด ดังนี้ <i>Bacillus subtilis</i> GY19 (ก) , <i>Gordonia amicalis</i> JC11 (ข) และ <i>Weissella cibaria</i> PN3 (ค) | 30 |
| รูปที่ 4.15 กราฟรูปแท่งแสดงปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเฉลี่ยที่วันต่างๆ (CFU/mL) | 31 |
| รูปที่ 4.16 การศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของหัวเชื้อผสมโดยวิธีการ microtiter dish biofilm formation assay | 32 |
| รูปที่ ข-1 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดบนอาหารเลี้ยงแข็ง TSB ดังนี้ <i>Bacillus subtilis</i> GY19 (ก), <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> GY30 (ข), <i>Gordonia westfalica</i> GY40 (ค), <i>Gordonia amicalis</i> JC11 (ง) และ <i>Weissella cibaria</i> PN3 (จ) | 43 |

สารบัญตาราง

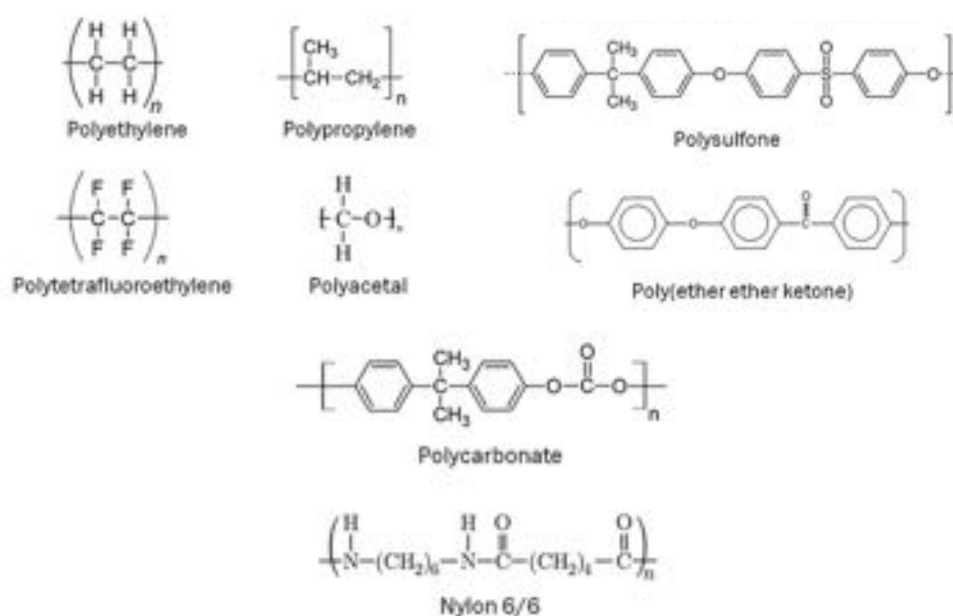
| | หน้า |
|--|------|
| ตารางที่ 1 ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเฉลี่ยที่ความเข้มข้นต่างๆ (CFU/อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร) | 30 |
| ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ใช้ตรวจติดตามการสร้างไบโอฟิล์มเมื่อใช้จำนวนเชื้อเริ่มต้นที่แตกต่างกัน | 32 |
| ตารางที่ ข-1 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรที่วันต่างๆ ของแบคทีเรียแต่ละชนิดและหัวเชื้อแบคทีเรีย | 44 |
| ตารางที่ ข-2 ผลต่างของค่าความขุ่นของสารละลายไบโอฟิล์มจากการวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุม | 44 |

บทที่ 1

บทนำ

1.1 พลาสติกและปัญหาขยะพลาสติกในปัจจุบัน

พลาสติกจัดเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbons) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ประกอบด้วย โมเลกุลซ้ำ ๆ กันต่อเป็นโมเลกุลสายยาวที่ประกอบด้วยธาตุสำคัญต่าง ๆ ดังนี้ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) และนอกจากนี้ยังสามารถมีธาตุอื่น ๆ เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างได้ด้วยเช่นกัน ซึ่งได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟลูออรีน (F) คลอรีน (Cl) และกำมะถัน (S) เป็นต้น อีกทั้งพลาสติกยังเป็นวัสดุที่มนุษย์คิดค้น และประดิษฐ์ขึ้นเพื่อช่วยให้เรามีชีวิตที่สะดวกสบายมากยิ่งขึ้น โดยเริ่มผลิตขึ้นเมื่อกลางศตวรรษที่ 19 เพื่อลด การตัดไม้ทำลายป่าและทดแทนวัสดุดั้งเดิมจากธรรมชาติ ได้แก่ แก้ว ไม้ กระดาษ ยาง และขนสัตว์



รูปที่ 1.1 ตัวอย่างโครงสร้างของพลาสติกชนิดต่าง ๆ (Jansen, 2016)

เนื่องจากพลาสติกมีหลายประเภท โดยแต่ละประเภทจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถเลือกไปใช้งานได้ต่างวัตถุประสงค์และความเหมาะสม คุณสมบัติหลักของพลาสติกแต่ละประเภทนั้นก็คือ มีความเหนียวและยืดหยุ่นที่สูง ทนทานต่อสารเคมีและรอยขีดข่วน ดูดซึมน้ำได้ต่ำมาก มีความคงตัว และยังคงความปลอดภัยโดยสามารถใช้กับอาหารและยาได้ เป็นต้น ตัวอย่างโครงสร้างของพลาสติกชนิดต่าง ๆ แสดงในรูปที่ 1.1 ด้วยเหตุนี้จึงทำให้พลาสติกได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เมื่อผู้คนหันมาเลือกใช้พลาสติกมากขึ้นนั้นก็เป็นการช่วยลดการใช้วัสดุจากธรรมชาติ แต่เมื่อมีข้อดีแล้วก็ยังมีข้อเสียตามมา นั่นคือเป็นปัญหาขยะพลาสติกเกิดขึ้นตามมา ซึ่งปัญหาขยะพลาสติกนั้นนับว่าเป็นปัญหาใหญ่อันดับต้นของโลก สามารถพบได้ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ ตัวอย่างเช่น ที่ประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่ามี การสร้างขยะพลาสติกมากถึง 42

ล้านตันซึ่งถือว่ามากที่สุดในโลก ส่วนประเทศไทยนั้นได้รับการจัดอันดับว่าเป็นประเทศที่สร้างขยะพลาสติกต่อประชากร (กิโลกรัม/ปี) สูงเป็นอันดับที่ 5 ของโลก และยังมีขยะพลาสติกในขยะทั่วไปในสัดส่วนมากเป็นอันดับ 3 ของโลกอีกด้วย (Law และคณะ, 2020) รายชื่อประเทศที่มีการผลิตขยะพลาสติกสูงสุด 5 อันดับของโลกในปี พ.ศ. 2559 แสดงในรูปที่ 1.2

| ประเทศ | ปริมาณขยะพลาสติก(ตัน/ปี) | สัดส่วนขยะพลาสติกในขยะทั่วไป (%) | การเกิดขยะพลาสติกต่อคน (กิโลกรัมต่อปี) |
|---------------|--------------------------|----------------------------------|--|
| สหรัฐอเมริกา | 42,027,215 | 12.9 | 105.30 |
| สหราชอาณาจักร | 6,471,650 | 20.2 | 98.66 |
| เกาหลีใต้ | 4,514,186 | 24.3 | 88.09 |
| เยอรมนี | 6,683,412 | 13.3 | 81.16 |
| ไทย | 4,796,494 | 17.6 | 69.54 |
| มาเลเซีย | 2,058,501 | 15.0 | 67.09 |

รูปที่ 1.2 รายชื่อประเทศที่มีการผลิตขยะพลาสติกที่สูงที่สุด 5 อันดับของโลกในปี พ.ศ. 2559 (The United States' contribution of plastic waste to land and ocean, 2020)

จากปัญหาข้างต้นจึงนำมาสู่วิธีการลดปัญหาขยะพลาสติกซึ่งสามารถทำได้โดยการงดการใช้พลาสติก แต่ถึงแม้การงดการใช้พลาสติกจะเป็นวิธีที่พอทำได้แต่ก็ยังเป็นวิธีการที่ทำได้ยากในชีวิตจริง เนื่องจากพลาสติกนั้นเป็นส่วนประกอบของของใช้หลายอย่างรอบตัวเราในตอนนี้ และยังไม่สามารถหาวัสดุอื่นที่มีคุณสมบัติเทียบเท่ามาใช้แทนแทนได้ มีอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถลดปัญหาขยะพลาสติกได้คือการลดการใช้พลาสติกแล้วหันมาใช้พลาสติกชีวภาพ (Bioplastics) แทน ซึ่งพลาสติกชีวภาพนี้มีคุณสมบัติดีเทียบเท่ากับพลาสติกแบบเดิมที่สังเคราะห์มาจากปิโตรเลียม (Petroleum-based plastics) นอกจากนี้พลาสติกชีวภาพยังมีจุดเด่นอยู่หนึ่งข้อที่พลาสติกแบบเดิมไม่สามารถทำได้ นั่นคือสามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติและยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างพลาสติกชีวภาพที่กำลังเป็นที่นิยมในขณะนี้ ได้แก่ พอลิแลคติกแอซิด (Polylactic Acid) หรือ PLA (อมรรัตน์, 2554)

1.2 พลาสติกชีวภาพ

พลาสติกชีวภาพ (Bioplastic) หรือพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้ (Biodegradable plastic) หมายถึง พลาสติกที่ผลิตขึ้นจากวัสดุธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นพืช สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ (biodegradable) และช่วยลดปัญหามลพิษในสิ่งแวดล้อม โดยวัสดุธรรมชาติที่สามารถนำมาผลิตเป็นพลาสติกชีวภาพมีหลายชนิด ตัวอย่างเช่น เซลลูโลส (cellulose) คอลลาเจน (collagen) เคซีน (casein) พอลิเอสเทอร์ (polyester) แป้ง (starch) โปรตีนจากถั่ว และข้าวโพด เป็นต้น และในบรรดาวัสดุธรรมชาติทั้งหลาย แป้ง นับว่าเหมาะสมที่สุดเพราะมีจำนวนมากและราคาถูก เนื่องจากสามารถหาได้จากพืชชนิดต่าง ๆ เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี มันฝรั่ง มันเทศ มันสำปะหลัง เป็นต้น โดยพลาสติกชีวภาพที่ผลิตจากแป้งโดยตรงจะมีขีดจำกัด เพราะจะเกิดการพองตัว และเสียรูปร่างเมื่อได้รับความชื้น จึงได้มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์เข้าไปย่อยสลายแป้งแล้วเปลี่ยนแป้งให้กลายเป็น โมโนเมอร์ (monomer) ที่เรียกว่ากรดแลคติก (lactic acid) จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ polymerization ทำให้กรดแลคติกเชื่อมกันเป็นสายยาวที่เรียกว่า โพลีเมอร์ (polymer) (thaigoodview 20th, 2010)

1.2.1 ประเภทของพลาสติกย่อยสลายได้ จะแบ่งออกเป็น 2 ประเภทตามวัตถุดิบ ดังนี้

1.2.1.1 พลาสติกแตกสลายทางชีวภาพได้ (Biodegradable plastics) เป็นพลาสติกที่ผลิตจาก วัตถุดิบที่เป็นชีวมวล (Biomass) ที่สามารถปลูกทดแทนได้เรื่อยๆ (Bio-based materials) หรืออาจจะผลิตจากปิโตรเคมีก็ได้ (Petro-based material) ความแตกต่างของพลาสติกที่ผลิตจากพืชและพลาสติกที่ผลิตจากปิโตรเลียมแสดงในรูปที่ 1.3 โดยกระบวนการแตกสลายนั้นสามารถเกิดผ่านกระบวนการหมักทางชีวภาพ (Composting) จนในที่สุดก็จะได้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) น้ำ (H₂O) สารประกอบอินทรีย์ และมวลชีวภาพอื่นๆ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ตัวอย่างพลาสติกประเภทนี้ ได้แก่ พอลิแลคติก แอซิด (PLA) พอลิบิวทีลีน ซัคซิเนต (PBS) เป็นต้น (สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ, 2014)

1.2.1.2 พลาสติกที่ผลิตจากวัตถุดิบที่ปลูกทดแทนใหม่ (Bio-based plastics) พลาสติกชนิดนี้ผลิตมาจากชีวมวล (Biomass) ที่สามารถปลูกทดแทนใหม่ได้ ตัวอย่างพืชชนิดต่าง ๆ ที่นำมาใช้ผลิตพลาสติกประเภทนี้ ได้แก่ ข้าวโพด อ้อย มันฝรั่ง เป็นต้น โดยพลาสติกประเภทนี้อาจสลายได้ทางชีวภาพหรือไม่สลายตัวทางชีวภาพก็ได้ ตัวอย่างเช่น Bio-PET และ Bio-PE เป็นต้น (สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ, 2014)

ในกรณีของพอลิแลคติก แอซิด หรือ PLA พบว่าเป็นพลาสติกทั้ง 2 ประเภทที่ได้กล่าวมาข้างต้น คือ เป็นทั้งพลาสติกแตกสลายได้ทางชีวภาพและพลาสติกที่ผลิตจากวัตถุดิบที่ปลูกทดแทนใหม่ได้ เนื่องจาก PLA มักผลิตจากแป้งที่ได้จากข้าวโพดซึ่งเป็นส่วนประกอบของวัสดุปลูกทดแทนใหม่ได้ อีกทั้งยังสามารถแตกสลายได้ทางชีวภาพ จนเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาการแตกสลายก็จะได้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในที่สุด



รูปที่ 1.3 ความแตกต่างของพลาสติกที่ผลิตจากพืชและพลาสติกที่ผลิตจากปิโตรเลียม (Happysme, 2019)

1.3 พอลิแลคติกแอซิด

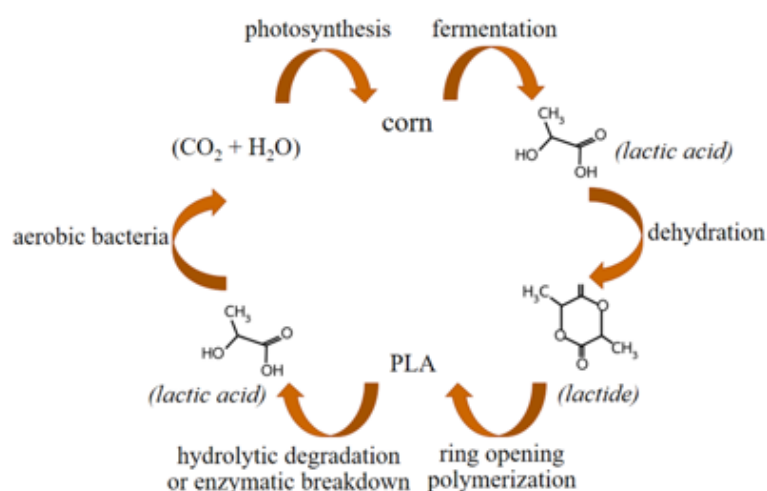
พอลิแลคติกแอซิด (Polylactic Acid : PLA) เป็นพลาสติกชีวภาพชนิดหนึ่งซึ่งมีคุณสมบัติสำคัญคือสามารถย่อยสลายได้ (Compostable polymer) โดยจะผลิตขึ้นจากวัตถุดิบที่หาได้จากทรัพยากรทางธรรมชาติที่เกิดขึ้นใหม่ได้ ตัวอย่างเช่น แป้งจากข้าวโพด มันสำปะหลัง เป็นต้น

ในช่วงแรกนั้น PLA ยังไม่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายมากนัก เนื่องจากเหตุผลหลายประการ ได้แก่ ต้นทุนการผลิตสูง สัณฐานที่ได้ปริมาณที่น้อย และน้ำหนักโมเลกุลต่ำ แต่ก็ถูกนำมาใช้ประโยชน์อยู่บ้างโดยนำมาใช้เป็นอุปกรณ์ทางการแพทย์ เช่น ไหมเย็บแผลที่ใช้ในร่างกาย เป็นต้น ส่วนในปัจจุบัน PLA กำลังได้รับความนิยมนำมาใช้งานเป็นอย่างมาก ซึ่งเป็นผลมาจากการที่นักวิจัยสามารถค้นพบและพัฒนาเทคนิคการผลิตที่ทำให้ PLA มีคุณสมบัติที่ดีและเหมาะสมที่จะใช้ในชีวิตประจำวันมากยิ่งขึ้น ดังนั้น ลดต้นทุนการผลิตให้มีราคาต่ำลง และผลิต PLA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (สถาบันพลาสติก, 2015)

1.3.1 การผลิตพอลิแลคติกแอซิด ทำได้ 2 วิธี ดังนี้

1.3.1.1 การหมักโดยจุลินทรีย์ (Microbial fermentation) ทำได้โดยนำมอนอเมอร์ (monomer) ของ PLA ซึ่งก็คือกรดแลคติก (Lactic acid: LA) มาผ่านกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตโดยใช้จุลินทรีย์ โดยอาจเป็นการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (Homofermentative) ที่ได้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์มากถึง 95% หรืออาจเป็นการหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (Heterofermentative) ที่จะให้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์เพียงแค่ 50% อีก 50% ที่เหลือจะเป็นกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก (Formic acid) เอทานอล (Ethanol) และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, 2561)

โดยกระบวนการหมักในอุตสาหกรรมส่วนมากจะเป็นการหมักแบบฮอโมเฟอเมนเททีฟเสียมากกว่า เนื่องจากให้ปริมาณกรดแลคติกที่มาก และยังสามารถผลิตก๊าซอื่นเจือปนน้อย (Jamshidian และคณะ, 2010) ขั้นตอนการผลิตและการย่อยสลายของ PLA แสดงในรูปที่ 1.4



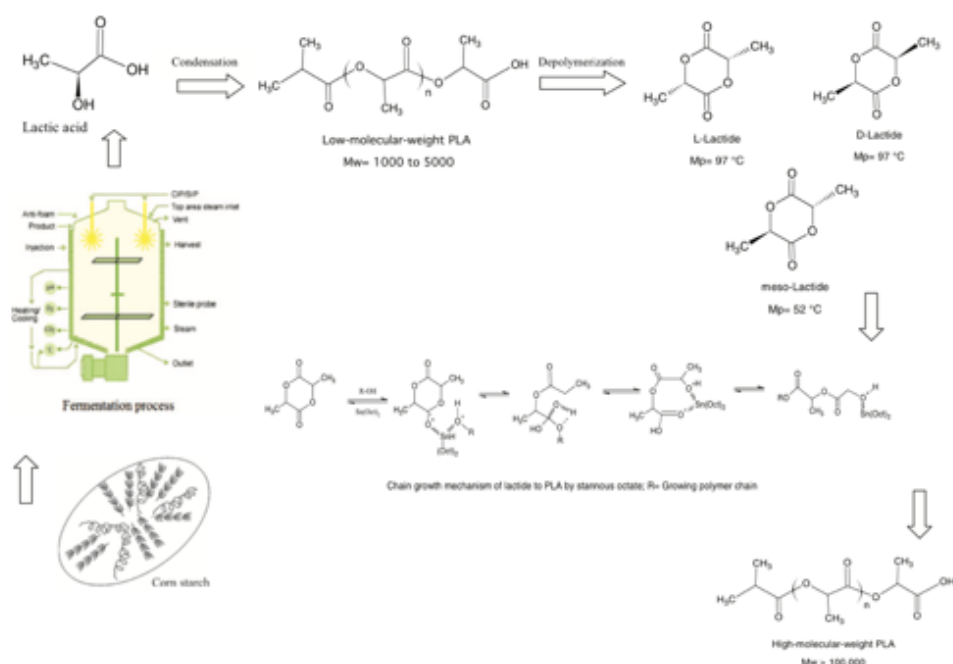
รูปที่ 1.4 ขั้นตอนการผลิตและการย่อยสลายของ PLA (มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, 2561)

1.3.1.2 การสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical synthesis) การสังเคราะห์ PLA ด้วยวิธีการนี้มีข้อดีคือ ได้ PLA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง PLA มวลโมเลกุลสูงที่เป็นที่ต้องการในอุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ต่าง ๆ โดยการสังเคราะห์ทางเคมีนี้จะใช้กระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชัน (Polymerization) เป็นหลัก กลไกการสังเคราะห์ PLA จากการหมักและการสังเคราะห์ทางเคมีแสดงดังรูปที่ 1.5 ซึ่งทำได้ 3 วิธี ดังนี้

1.3.1.2.1 การควบแน่นโดยตรง (direct condensation polymerization) วิธีนี้จะเกิดผ่านปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (Esterification) ของกรดแลคติก และปฏิกิริยานี้ยังมีการดึงน้ำส่วนเกินและตัวทำละลายอื่นออก โดยจะเกิดขึ้นที่สภาวะที่อุณหภูมิสูงและสุญญากาศ ข้อดีของวิธีนี้คือได้ PLA ที่มีมวลโมเลกุลสูง คุณสมบัติดี แต่ข้อเสียคือปฏิบัติยาก

1.3.1.2.2 การควบแน่นในสารละลายอะซิโโทรปโดยตรง (direct polycondensation in an azeotropic solution) วิธีนี้จะเติมตัวเร่งปฏิกิริยาบางอย่างลงไปในสารละลายอะซิโโทรปเพื่อเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ PLA โดยการสังเคราะห์แบบนี้จะเกิดในสารละลายอะซิโโทรปสารละลายอะซิโโทรปนี้จะช่วยลดความดันในการกลั่นและช่วยในการแยก PLA มวลโมเลกุลสูงที่สังเคราะห์ได้ง่ายขึ้น

1.3.1.2.3 การควบแน่นโดยการเกิดโครงสร้างแลคไทด์ (polymerization through lactide formation) วิธีนี้นิยมเป็นอย่างมากในอุตสาหกรรมที่ต้องการผลิต PLA มวลโมเลกุลสูง โดยเมื่อแลคไทด์หลาย ๆ โมเลกุลมาต่อกันแล้วก็ได้ได้เป็นพอลิแลคไทด์ (Polylactide) ซึ่งจะสามารถใช้ได้ทำนองเดียวกันกับ PLA (Jamshidian และคณะ, 2010)



รูปที่ 1.5 กลไกการสังเคราะห์ PLA จากการหมักและการสังเคราะห์ทางเคมี (Jamshidian และคณะ, 2019)

1.4 การย่อยสลายพอลิแลคติกแอซิด

การย่อยสลาย PLA นั้นสามารถเกิดได้เมื่อมีปัจจัยที่เหมาะสม ได้แก่ ความชื้น ออกซิเจน ความเป็นกรดต่าง (pH) ชนิดจุลินทรีย์ สารอาหาร เป็นต้น ซึ่งการย่อยสลาย PLA นี้เริ่มแรกมักเป็นการทำให้สูญเสียคุณสมบัติบางอย่างไป โดยเมื่อการย่อยสลาย PLA เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์แล้ว ก็จะได้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Vu T. และคณะ, 2020)

สำหรับการย่อยสลาย PLA นั้นสามารถเกิดผ่านหลายกลไกได้ ดังนี้ การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolytic Degradation) การย่อยสลายโดยแสง (Photodegradation) การย่อยสลายทางกล (Mechanical Degradation) การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative Degradation) และการย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation) (Zaaba และ Jaafar, 2020)

การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolytic Degradation) หลังจากทีโครงสร้างของ PLA ถูกทำให้แตกออก มวลโมเลกุลลดลง จนเหลืออยู่ในรูปของดอลิโกเมอร์ (Oligomer) และมอนอเมอร์ (Monomer) โดยการย่อยสลายด้วยวิธีนี้จะเกิดกับพอลิเมอร์ที่มีหมู่เอสเทอร์ หรือเอไมด์ เช่น แป้ง พอลิยูรีเทน

(Polyurethane) เป็นต้น ซึ่งสามารถแบ่งย่อยได้อีก 2 แบบ คือ แบบที่ใช้คะตะลิสต์ (Catalyst Hydrolysis) และแบบที่ไม่ใช้คะตะลิสต์ (Non-catalyst Hydrolysis) แบบที่ใช้คะตะลิสต์นั้นยังสามารถแบ่งออกได้เป็น ใช้คะตะลิสต์ภายนอกและใช้คะตะลิสต์จากภายในโมเลกุล ตัวอย่างคะตะลิสต์ภายนอก เช่น เอนไซม์ไลเปส (Lipase) เอสเทอเรส (Esterase) ไกลโคไฮโดรเลส (Glycohydrolase) เป็นต้น ส่วนแบบที่ไม่ใช้คะตะลิสต์ จะใช้อย่างอื่นเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแทน เช่น กรด เบส เป็นต้น (Zaaba และ Jaafar, 2020)

การย่อยสลายโดยแสง (Photodegradation) เกิดขึ้นจากการที่ PLA ดูดกลืนรังสียูวีเข้าไปทำให้รังสียูวีทำลายโครงสร้างของพอลิเมอร์ โดยเริ่มแรกจะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างพอลิเมอร์ (Polymer transformation) ก่อน จากนั้นจึงตัดสายพอลิเมอร์ให้สั้นลง (polymer chain scission) (Zaaba และ Jaafar, 2020)

การย่อยสลายทางกล (Mechanical Degradation) เป็นการให้แรงกระทำทำให้พอลิเมอร์หรือพลาสติกมีขนาดเล็กกลง โดยมักทำให้แตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ (Bio-plastic, 2017)

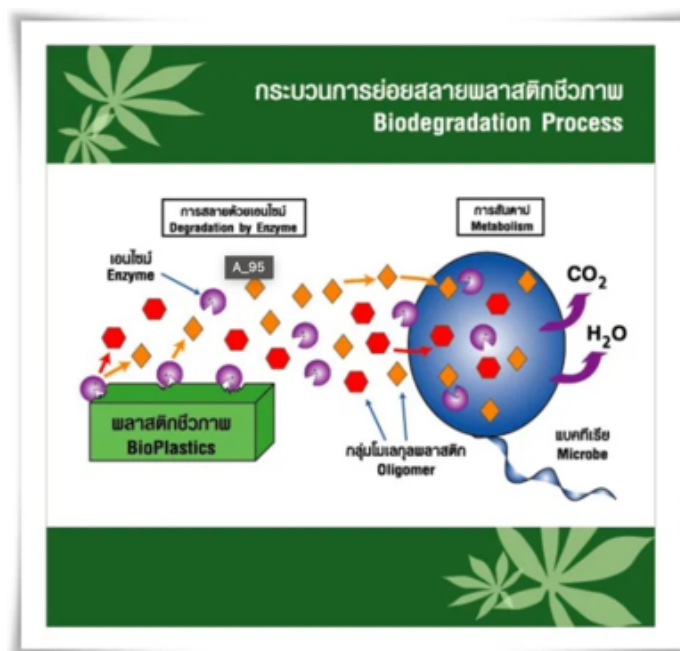
การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative Degradation) เป็นการย่อยสลายที่สามารถพบเจอในธรรมชาติอย่างช้าๆ โดยมีปัจจัยสำคัญ คือ ออกซิเจน ความร้อน รังสียูวี และอื่นๆจนเกิดเป็นสารไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ให้แตกตัวเป็นอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียรซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้จะเข้าทำปฏิกิริยาที่พันธะเคมีที่คาร์บอนในสายโซ่ ทำให้สูญเสียสมบัติเชิงกลอย่างรวดเร็ว (Bio-plastic, 2017)

การย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation) จะเกิดขึ้นจากกระบวนการทำงานของแบคทีเรีย เมื่อ PLA มวลโมเลกุลสูงถูกไฮโดรไลซ์เรียบร้อยแล้ว จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PLA ได้ (PLA-degrading microorganisms) ก็จะหลั่งเอนไซม์ (Extracellular enzymes) ออกมาทำลาย PLA ให้อยู่ในรูปของโพลิโกลิเมอร์สายสั้นๆ หรือมอนอเมอร์ จากนั้นจึงดูดซึมเข้าสู่เซลล์แล้วจึงย่อยสลายโมเลกุลเหล่านี้ด้วยเอนไซม์ภายในเซลล์ (Intracellular enzyme) จนสามารถย่อยสลายได้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (Bio-plastic, 2017)

1.5 การย่อยสลายพอลิแลคติกแอซิด โดยจุลินทรีย์

กลไกการย่อยสลาย PLA เริ่มจากการที่จุลินทรีย์เจริญเติบโตและสร้างโคโลนีบนพื้นผิวของพลาสติก จากนั้นจึงเริ่มเกิดกระบวนการย่อยสลายโดยการหลั่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) โดยเอนไซม์ที่จุลินทรีย์หลั่งออกมาจะไปจับกับพอลิเมอร์ แล้วจะเร่งให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลติกคลีเวจ (Hydrolytic cleavage) ซึ่งส่งผลทำให้พอลิเมอร์ (PLA) นั้นมีขนาดและน้ำหนักโมเลกุลที่ลดลงแล้วปรากฏอยู่ในรูปของไดเมอร์ (dimer) และมอนอเมอร์ (monomer) โดยเมื่อถูกย่อยสลายจนสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วจะได้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ซึ่งแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำนั้นล้วนเป็นสิ่งจำเป็นในการเจริญเติบโตและดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด (Jamshidian และคณะ, 2010)

การย่อยสลาย PLA โดยจุลินทรีย์เป็นวิธีการทางชีวภาพ โดยเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส (Hydrolytic enzyme) เช่น เอนไซม์โปรตีเอส (Protease) และเอนไซม์ไลเปส (Lipase) โดยเอนไซม์เหล่านี้เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสบริเวณพันธะเอสเทอร์อยู่ในโครงสร้างของ PLA โดยจุลินทรีย์หลั่งออกมาเพื่อไฮโดรไลซ์ PLA โมเลกุลใหญ่ให้เป็นกรดแลคติก ทำให้โครงสร้างของ PLA มีขนาดเล็กลงจนจุลินทรีย์สามารถดูดซึมไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ ในที่สุดก็จะได้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Fu และคณะ, 2020) กระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (Biodegradation process) แสดงดังรูปที่ 1.6



รูปที่ 1.6 กระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (Biodegradation process) ซึ่งในกรณีของ PLA ก็เป็นเช่นเดียวกัน (POLYMER, 2012)

1.6 แบคทีเรียและกลุ่มแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพอลิแลคติก แอซิด

อย่างที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าจุลินทรีย์หลายชนิดมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลาย PLA ได้ ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถสร้างสปอร์ได้ รูปทรงแท่ง ได้แก่ *B. subtilis* และ *B. thuringiensis* เป็นต้น โดยแบคทีเรียสองชนิดที่ยกตัวอย่างนี้เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตและหลั่งเอนไซม์ออกมาที่บริเวณผิวเซลล์ได้มาก (Schallmey และคณะ, 2004) โดยเอนไซม์ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นมาสำหรับย่อยสลาย PLA มักเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส ตัวอย่างเช่น โปรตีนเนส เค (Proteinase K) โดยจุลินทรีย์จะหลั่งเอนไซม์ที่ผลิตออกมาภายนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) บริเวณที่ผิวเซลล์ เพื่อทำลายโครงสร้างของพอลิเมอร์ให้เล็กลง (depolymerized) ซึ่งเอนไซม์นี้นับว่าเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่ช่วยในการย่อยสลาย PLA (Nair และคณะ, 2016)

สถานะที่ส่งเสริมการย่อยสลาย PLA มีดังนี้ ความเข้มข้นและแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม โดยเมื่อใช้น้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น มอลโทส เป็นแหล่งคาร์บอนอันดับแรก (primary carbon source) จะทำให้มีการย่อยสลาย PLA มากกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้เนื่องจากการใช้น้ำตาลโมเลกุลคู่ จุลินทรีย์สามารถ

นำไปใช้ได้ยากกว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว จึงทำให้ต้องมีการแสดงออกของยีนที่สามารถผลิตเอนไซม์ เช่น โพรทีเนส เค ออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลาย PLA สำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ใช้ในการเจริญต่อไป ในกรณีของการเติมกลูโคสก็สามารถส่งเสริมการย่อยสลาย PLA ได้เช่นกัน แต่ก็ยังไม่ได้มีประสิทธิภาพเท่ากับการเติมน้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น มอลโทส เนื่องจากกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ง่ายที่สุด จึงทำให้ยังไม่มีมีการกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ผลิตเอนไซม์เพื่อที่จะมาย่อยสลาย PLA ในสภาวะที่ยังมีกลูโคสอยู่ เนื่องจากโมเลกุลกลูโคสจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้สะดวกกว่า (Bonifer และคณะ, 2019)

แหล่งไนโตรเจนก็สำคัญเกี่ยวกับกระบวนการย่อยสลาย PLA โดยจุลินทรีย์เช่นกัน การเติมไบโอเจนให้กับจุลินทรีย์ไม่ได้เพิ่มความสามารถในการย่อยสลาย PLA เสมอไป การเติมไนโตรเจนในรูปของกรดอะมิโนจะช่วยเพิ่มความสามารถในการย่อยสลาย PLA ได้ ยกเว้นการเติมเบสอะดีนีน (Adenine) ซึ่งจะทำให้เกิดการย่อยสลาย PLA เกิดได้ไม่ดี ที่เป็นเช่นนี้เพราะเบสอะดีนีนจะไปทำให้เกิดกระบวนการพิวรีนไรโบสวิตช์ (Purine riboswitch) ทำให้โครงสร้าง mRNA ที่ใช้ในการแสดงออกของยีนที่ผลิตเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป จึงทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลาย PLA ได้ลดลง (Bonifer และคณะ, 2019)

อุณหภูมิ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมควรจะเป็นไปตามชนิดของแบคทีเรีย ควรเป็นอุณหภูมิที่ทำให้แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ดีและกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ โดยเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะช่วยเร่งอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพได้มากขึ้น

ความชื้นก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการย่อยสลาย PLA เนื่องจากน้ำจะช่วยให้เกิดการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส หากมีความชื้นมากเกินไปก็จะทำให้การย่อยสลายลดลงได้

pH ควรใช้ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งส่วนมากมักใช้ pH เป็นกลาง เนื่องจากที่ pH เป็นกลางจะช่วยให้การย่อยสลายเกิดขึ้นได้รวดเร็วกว่าช่วงกรดหรือด่าง

ชนิดของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PLA ได้นั้นจะต้องมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่จำเพาะเหมาะสมต่อพอลิเมอร์นั้นๆ (Nair และคณะ, 2016)

1.7 ไบโอฟิล์ม

ไบโอฟิล์ม (Biofilm) เป็นการรวมกลุ่มกันของจุลินทรีย์จากการเกาะติดบนพื้นผิวที่มีความชื้นสูงหรืออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีของเหลวล้อมรอบ โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะร่วมกันผลิตพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นเมทริกซ์ประกอบด้วยสารคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และกรดนิวคลีอิก ทำหน้าที่เป็นโล่ป้องกันสมาชิกที่อยู่ภายในโครงสร้าง ทั้งนี้สภาพภายในโครงสร้างรวมทั้งการเจริญและเพิ่มจำนวน มีความแตกต่างจากจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันที่อยู่ในสภาวะเซลล์เดี่ยว โดยลักษณะรูปร่างของไบโอฟิล์มมีความแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์และสภาพแวดล้อมเป็นหลัก (Boonbumrung, 2018)

นอกจากนี้ไบโอฟิล์มยังเป็นโครงสร้างที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายซัสเตรทบางชนิด ในกรณีของ PLA ซึ่งเป็นหนึ่งในไฮโดรคาร์บอนที่มีคาร์บอนเป็นโครงสร้างหลักในโมเลกุล ซึ่งคาร์บอนภายใน

โครงสร้าง PLA นี้ หากจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์มาย่อยสลายได้ก็จะสามารถใช้คาร์บอนเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญต่อไปได้ กล่าวคือ ไบโอฟิล์มมีความสัมพันธ์กับการย่อยสลาย PLA ดังนี้ เมื่อจุลินทรีย์สร้างโครงสร้างไบโอฟิล์มขึ้นมาเพื่อยึดเกาะพื้นผิวของ PLA แล้ว จุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ภายในโครงสร้างไบโอฟิล์มก็จะผลิตเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PLA ได้ออกมา จากนั้น PLA ก็จะถูกย่อยสลายเป็นโมเลกุลเล็ก เช่น โอลิโกเมอร์ (Oligomer) และ มอนอเมอร์ (Monomer) และถูกดูดซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ จากนั้นเอนไซม์ภายในเซลล์ (Intracellular enzymes) ก็จะย่อยสลายโมเลกุลดังกล่าวให้เป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำในที่สุด (Boonbumrung, 2018)

1.7.1 องค์ประกอบโครงสร้างของไบโอฟิล์ม

เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharides) เป็นองค์ประกอบหลักของโครงสร้าง ซึ่งมีสัดส่วนได้สูงถึงร้อยละ 90 ประกอบด้วยสารอินทรีย์ หลายชนิดแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ภายใน โดยส่วนมากเป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์มีสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และชอบน้ำ (hydrophilic) ทั้งนี้สมบัติการละลายน้ำขึ้นกับชนิดของสารประกอบ เช่น เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างหลักประกอบด้วย 1,3- หรือ 1,4 - β -linked hexose residues มีความแข็งแรง ไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำไม่ดี แต่หากเป็นชนิดอื่นจะละลายน้ำได้ดีกว่า ทำให้มีสมบัติอุ้มน้ำได้ดี สารประกอบภายในโครงสร้างไบโอฟิล์มมีความซับซ้อนมาก สามารถพบโปรตีน ไขมัน และที่น่าสนใจคือ ยังพบว่ามี การตรวจพบสารพันธุกรรมชนิด extra-cellular DNA (eDNA) ซึ่งมีส่วนสำคัญในการส่งต่อ ถ่ายทอด และแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมให้สมาชิกที่อยู่ภายใน (Flemming และคณะ, 2000)

ในกรณีของแบคทีเรียแกรมลบถ้าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ สารประกอบพอลิเมอร์มักเป็นชนิดประจุลบหรือเป็นกลางทำให้เชื่อมต่อกับสารที่มีประจุบวก เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม เกิดเป็นโครงสร้างที่แข็งแรงขึ้น ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกจะพบสารประกอบที่เป็นประจุบวก โดยเชื่อที่อยู่ภายในโครงสร้างไบโอฟิล์มนี้อาจเป็นเชื้อเพียงชนิดเดียวหรือจะเป็นเชื้อหลายชนิดผสมกันก็ได้ แต่พบว่าไบโอฟิล์มที่มีเชื้อชนิดเดียวเป็นองค์ประกอบจะมีความหนาน้อยกว่าไบโอฟิล์มที่เกิดจากเชื้อผสม (Donlan, 2002)

1.7.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์ม

1.7.2.1 สภาพพื้นผิวของพลาสติกสำหรับให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์มโดยแบคทีเรีย ซึ่งหมายถึงความมันเงา โดยพลาสติก PLA จะมีความมันเงาค่อนข้างมาก ทำให้เกิดการเกาะและสร้างไบโอฟิล์มได้ยากกว่า PHBH และ PCL สามารถทำให้สลับได้ว่าพื้นผิวที่มีความมันเงามากกว่า จะทำให้เกิดโครงสร้างไบโอฟิล์มได้ยากกว่า (Morohoshi และคณะ, 2018)

1.7.2.2 การให้แรงเชิงกลกระทำกับพลาสติก ก็มีผลในการช่วยให้เกิดการสร้างเป็นโครงสร้างไบโอฟิล์มได้ง่ายขึ้น เช่น การทุบ อัด บีบ ชัด หรือตัด เนื่องจากจะช่วยลดความมันเงาของ PLA จะมีผลทำให้จุลินทรีย์สามารถสร้างโครงสร้างไบโอฟิล์มได้ง่ายขึ้น (Morohoshi และคณะ, 2018)

1.7.2.3 สังคมจุลินทรีย์ (Microbial Community) ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้เชื่อเป็น Bacterial Consortium โดยการที่จุลินทรีย์อยู่ร่วมกันเป็นกลุ่มนั้นอาจจะช่วยกระตุ้นการสร้างไบโอฟิล์มได้มากขึ้น โดยจะมีการสื่อสารกันระหว่างจุลินทรีย์โดยใช้ Quorum Sensing (Morohoshi และคณะ, 2018)

1.7.2.4 ชนิดของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ต้องมีความสามารถในการผลิตโครงสร้างไบโอฟิล์มได้ ไม่ว่าจะในรูปแบบของการใช้เชื้อเดี่ยว หรือเชื้อผสม หากจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ไม่มีความสามารถในการสร้างโครงสร้างไบโอฟิล์มก็จะไม่สามารถสร้างไบโอฟิล์มมายึดเกาะบริเวณพื้นผิวต่างๆได้ (Kirstein และคณะ, 2019)

1.7.2.5 สภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน ความชื้น ความเป็นกรดต่าง อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน รวมถึงสารอาหารต่าง ๆ ซึ่งจะต้องเหมาะสมกับจุลินทรีย์เพื่อให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเชื้อซึ่งจะนำไปสู่การสร้างไบโอฟิล์ม อีกทั้งความหนาแน่นของเซลล์จุลินทรีย์ก็ยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม (Oberbeckmann และคณะ, 2018)

1.8 การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์

อย่างที่พอจะทราบมาแล้วว่าการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์นั้นทำเพื่อส่งสัญญาณติดต่อและประสานงานกับจุลินทรีย์เซลล์อื่นให้รับรู้ หรือที่เรียกว่า Quorum sensing (QS) เมื่อมีการเกิด QS เกิดขึ้นก็จะทำให้เกิดการรวมตัวกันของแบคทีเรีย ซึ่งในช่วงนี้อาจจะทำให้มีแบคทีเรียบางเซลล์หลุดลอยและกลับมาเกาะได้อีก จากนั้นจึงเริ่มมีการสร้างโคโลนี แล้วจึงแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอีกราว 4 รอบของการแบ่งตัว ซึ่งนักวิจัยพบว่าโคโลนีขนาดเล็กจะเกิดขึ้นใหม่ จึงทำให้ทราบว่าแบคทีเรียมีการแยกตัวออกจากโครงสร้างไบโอฟิล์มเดิมแล้วเคลื่อนมาเกาะพื้นผิวใหม่และเริ่มขั้นตอนการสร้างไบโอฟิล์มต่อไป (Boonbumrung, 2018)

1.8.1. ขั้นตอนการสร้างไบโอฟิล์ม การสร้างไบโอฟิล์มในขั้นตอนต่างๆ แสดงดังรูปที่ 1.7 ประกอบไปด้วย 4 ขั้นตอน ดังนี้

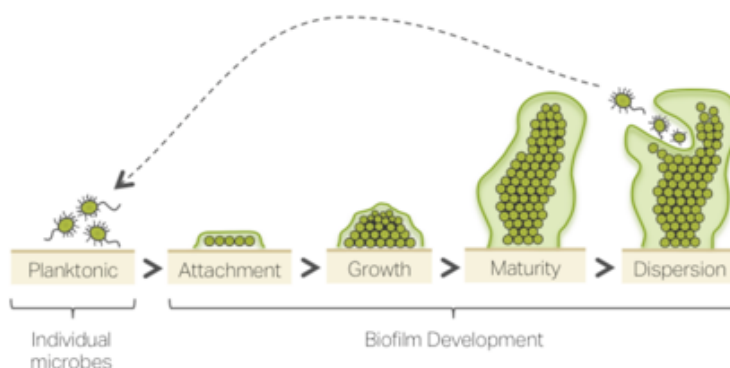
1.8.1.1 ในขั้นตอนที่หนึ่ง แบคทีเรียจะยึดเกาะกับพื้นผิวใดๆ (Bacterial attachment) ก่อนเป็นการเริ่มเกาะติดบนพื้นผิวแบบสามารถผันกลับไปได้ (reversible) ทำให้เกิดลักษณะเหมือนการแพร่กระจาย ซึ่งมีผลทำให้แบคทีเรียสามารถเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้นและมีทิศทางเดียวกันกับการเคลื่อนที่ของของเหลว

1.8.1.2 ขั้นตอนที่สอง จะเกิดการสร้างเป็นโคโลนีขนาดเล็กขึ้น (Microcolony formation)

1.8.1.3 ขั้นตอนที่สาม จะเป็นการสร้างและพัฒนาโครงสร้างไบโอฟิล์มที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมา (Biofilm maturation) โดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในโครงสร้างนี้จะยึดติดอยู่กับพื้นผิวที่ได้สร้างไบโอฟิล์มขึ้นมา ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะผลิตเอนไซม์และแสดงออกลักษณะทางพันธุกรรมต่างๆ จุลินทรีย์ที่อยู่ภายในนั้นจะไม่สามารถผันกลับไปอยู่ในสภาวะล่องลอยเป็นเซลล์อิสระได้ เมื่อมีการเข้ายึดเกาะโดยจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งแล้วจะสามารถเหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นเข้าร่วมเกาะพื้นผิวในบริเวณเดียวกันได้ ในระยะเริ่มต้นของการยึดเกาะกับพื้นผิว เซลล์เป็นชั้นเดียว (monolayer) จากนั้นจึงเริ่มมีการเรียงตัวเป็นชั้นถัดขึ้นมาด้วยการเคลื่อนที่แบบคืบคลานไปบนชั้นเซลล์เดิม (twitching motility) (Boonbumrung, 2018)

1.8.1.4 ขั้นตอนที่สุดท้าย จะเกิดการหลุดออก (Detachment) ของจุลินทรีย์และนำไปสู่การสร้างโคโลนีใหม่ที่บริเวณอื่นๆ เนื่องจากเซลล์ที่อยู่ภายในโครงสร้างถูกจำกัดด้วยอาหาร พื้นที่ และของเสียที่เซลล์ขับออกมา จึงนำไปสู่การกระจายตัวออกจากโครงสร้างไบโอฟิล์ม เรียกกระบวนการนี้ว่า การปลดปล่อยเซลล์ (releasing) ภายในให้ ล่องลอยและเกิดการเกาะติดบนพื้นผิวใหม่ ส่วนด้านการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการแบ่งตัวก็มีความแตกต่างจากเซลล์ที่ล่องลอยอย่างอิสระอยู่นอกโครงสร้าง (Crouzet และคณะ, 2014)

Microbial Biofilm Lifecycle



รูปที่ 1.7 การสร้างไบโอฟิล์มในขั้นตอนต่างๆ (ที่มา <https://www.visittbo.com/what-is-biofilm-th.html>)

1.9 ภาพรวมของงานวิจัย

โครงการวิจัยนี้สนใจที่จะพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ย่อยสลายขยะพลาสติก PLA ที่มีอยู่มากในปัจจุบัน โดยเริ่มจากการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวพลาสติก เนื่องจากแบคทีเรียที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ส่วนมากสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและไบโอฟิล์มนั้นก็มีความสัมพันธ์กัน การที่แบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพขึ้นมานั้นจะช่วยให้ผิวเซลล์แบคทีเรียมีความไม่ชอบน้ำมากขึ้น จึงนำไปสู่การยึดเกาะกับซับสเตรทที่ไม่ชอบน้ำด้วยเช่นกัน ตัวอย่างเช่น พลาสติก PLA จากนั้นแบคทีเรียจึงสร้างโครงสร้างไบโอฟิล์มขึ้นมา แบคทีเรียที่เจริญอยู่ในโครงสร้างนั้นก็จะหลั่งเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลสออกมาย่อยสลาย PLA สำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ งานวิจัยนี้สนใจที่จะทดสอบแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ GY19 รหัส MSCU 0789 ที่แยกได้จากดิน จ.ชลบุรี, *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ GY30 รหัส MSCU 0790 ที่แยกได้จากดิน จ. ชลบุรี, *Gordonia westfalica* สายพันธุ์ GY40 รหัส MSCU 0793 ซึ่งแยกได้จากดิน จ. ชลบุรี, *Gordonia amicalis* สายพันธุ์ JC11 รหัส MSCU 0794 ซึ่งแยกได้จากน้ำทะเล จ.จันทบุรี และ *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3 รหัส MSCU 0840 ที่แยกได้จากหมม ซึ่งจะใช้เป็นหัวเชื้อในรูปแบบของกลุ่มของแบคทีเรีย (Microbial consortium) ซึ่งจะคัดเลือกเพียง 3 ชนิด ที่สามารถเจริญและสามารถทำงานร่วมกันได้ จากนั้นจึงนำมาทดสอบการสร้างไบโอฟิล์ม เพื่อดูความสามารถในการยึดเกาะของกลุ่มแบคทีเรีย (Microbial consortium) เหล่านี้ ต่อมาจึงสนใจที่จะนำไปทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของพลาสติก PLA ที่มาจากแก้วกาแพอินทิลที่ผ่านการใช้งานมาแล้ว แล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope : SEM) เพื่อดูลักษณะการเกาะและลักษณะพื้นผิวของพลาสติก PLA ที่เปลี่ยนแปลงไป

1.10 วัตถุประสงค์

1. เพื่อค้นหากลุ่มของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม (Biofilm) บนพื้นผิวพลาสติกชนิด PLA ได้
2. เพื่อศึกษาและตรวจติดตามการย่อยสลายของขยะพลาสติก PLA หลังจากที่มีการสร้างไบโอฟิล์ม (Biofilm) ขึ้นมาบนพื้นผิวพลาสติก

1.11 วิธีการดำเนินงาน

1. คัดเลือกกลุ่มแบคทีเรียจากแบคทีเรีย 5 ชนิด
2. ศึกษาลักษณะการเจริญของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมและนับจำนวน
3. ทดสอบการสร้างไบโอฟิล์ม (Biofilm) ของหัวเชื้อแบคทีเรียผสม และการย่อยพลาสติก PLA

1.12 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ในด้านความรู้และประสบการณ์ต่อตัวนิสิตเอง

การทำวิจัยเป็นการพัฒนากระบวนการคิดให้มีความเป็นระบบและรอบคอบมากยิ่งขึ้น อีกทั้งยังช่วยพัฒนาวิธีการคิดแก้ไขปัญหาที่ไม่ได้คาดว่าจะเกิดขึ้นตามมา ช่วยเพิ่มประสบการณ์ในการทำการทดลองมากยิ่งขึ้นเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการทำงานในชีวิตจริง และทำให้รับความรู้มากมายจากการศึกษาบทความวิจัยต่างๆ ยิ่งไปกว่านั้นยังฝึกให้มีความคิดเชื่อมโยง หาสาเหตุและผลที่เกิดตามมาเสมอ ช่วยพัฒนาด้านความคิดวิเคราะห์ และฝึกความอดทนต่างๆ

2. ความรู้ ความเข้าใจที่นำไปสู่การแก้ไขปัญหาของสังคมหรือสภาพแวดล้อม

สามารถนำกลุ่มแบคทีเรียผสมที่ทราบชนิดของแบคทีเรีย มาใช้ในการย่อยสลายพลาสติก PLA ได้ ซึ่งอาจเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถนำไปใช้ในการแก้ไขปัญหาทางสังคมและปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นในปัจจุบันได้ อีกทั้งยังลดปัญหาทางมลภาวะทางอากาศ ภาวะแก๊สเรือนกระจกที่เกิดจากการเผาเพื่อกำจัดพลาสติกได้ เนื่องจากการย่อยสลายพลาสติกด้วยจุลินทรีย์ซึ่งเป็นกระบวนการทางชีวภาพอย่างหนึ่ง จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม โดยสิ่งมีชีวิตบนโลกก็สามารถนำไปใช้ในการสร้างพลังงานและก่อให้เกิดประโยชน์อื่นๆ ได้

บทที่ 2

อุปกรณ์ สารเคมี และชุดทดสอบ

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระจกบอทวง (Cylinder) ของบริษัท PYREX, USA
2. กระจกบอทเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge ware) ของบริษัท NALGENE, USA
3. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX, USA
4. เครื่องเขย่า (Incubator shaker) รุ่น Innova 2100 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Edison, N.J., USA และรุ่น GREEN SSeriker 2 ของบริษัท PanaPolytech Co., Ltd., Thailand
5. เครื่องชั่งหยาบ (Laboratory balance) รุ่น PG 2002-S ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (High Speed Refrigerated Centrifuge) รุ่น 6500 ของบริษัท KUBOTA, Japan
7. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific industries, USA
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Scientific, USA
9. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ของบริษัท Hycon Plastics
10. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) แบบ ISSco รุ่น BV-124 ของบริษัท Internal Scientific Supply Co., Ltd., Thailand
11. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)
12. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
13. ทิปไมโครปิเปต (Pipette tip) ขนาด 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Hycon Plastics
14. ปีกเกอร์ (Beaker) ของบริษัท PYREX, USA
15. ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)
16. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Kogyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท HIRAYAMA, Japan
17. หลอดทดลอง (Test tube) ของบริษัท PYREX, USA
18. ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น P10, P200, P1000 และ P5000 ของบริษัท Eppendorf, Thailand
19. ไมโครไทเทเตอร์เพลท (Microtiter plate or 96-well plate)

20. ไมโครเพลท รีดเดอร์ (Microplate reader) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA

2.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. Tryptone Soya Broth ของบริษัท Sisco Research Laboratories, India
2. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
3. ผงวุ้น ตรานางเงือก ของบริษัท ห้างหุ้นส่วนจำกัด
4. เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท Merck, Germany
5. คริสตัลไวโอเลต (Crystal Violet)

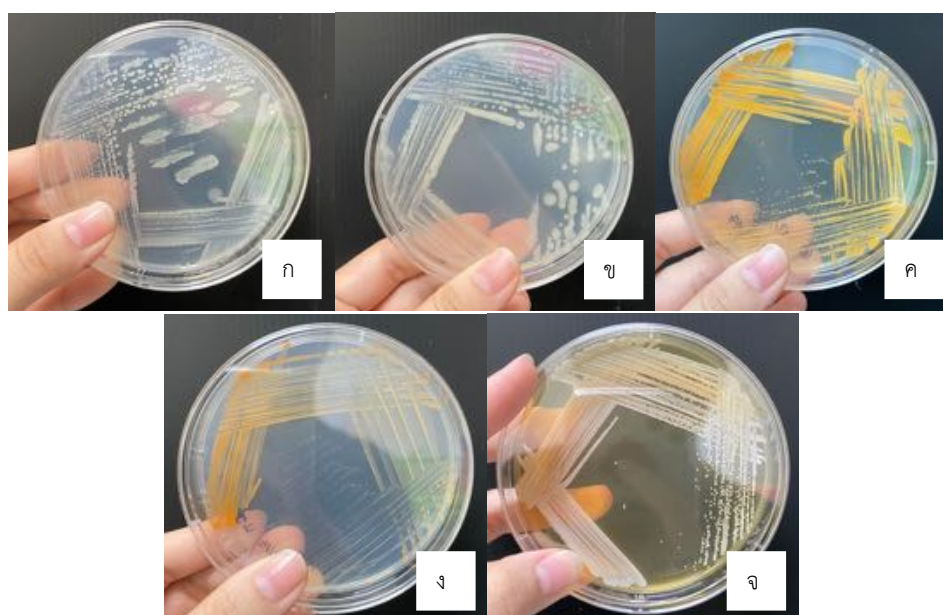
บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 แบคทีเรีย อาหารเลี้ยงเชื้อและพลาสติกที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียที่ใช้วิจัย ได้แก่ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ GY19 รหัส MSCU 0789 ที่แยกได้จากดิน จ. ชลบุรี, *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ GY30 รหัส MSCU 0790 ที่แยกได้จากดิน จ. ชลบุรี, *Gordonia westfalica* สายพันธุ์ GY40 รหัส MSCU 0793 ซึ่งแยกได้จากดิน จ. ชลบุรี, *Gordonia amicalis* สายพันธุ์ JC11 รหัส MSCU 0794 ซึ่งแยกได้จากน้ำทะเล จ.จันทบุรี และ *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3 รหัส MSCU 0840 ที่แยกได้จากหมนม โดยเชื้อทั้ง 5 ถูกเก็บไว้ในคลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รูปแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ในงานวิจัย แสดงในรูปที่ 3.1

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดลองงานวิจัยนี้ ได้แก่ Tryptone Soya Broth ส่วนพลาสติกที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ แก้วน้ำ PLA จากร้านกาแฟอินทนิลที่ผ่านการใช้งานมาแล้ว นำมาล้างทำความสะอาด จากนั้นปล่อยให้แห้ง แล้วนำมาตัดเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 1 เซนติเมตร x 1 เซนติเมตร



รูปที่ 3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ GY19 (ก), *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ GY30 (ข), *Gordonia westfalica* สายพันธุ์ GY40 (ค), *Gordonia amicalis* สายพันธุ์ JC11 (ง) และ *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3 (จ)

3.2 คัดเลือกกลุ่มแบคทีเรียจากแบคทีเรีย 5 ชนิด

แบคทีเรียที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ *Bacillus subtilis* GY19, *Bacillus amyloliquefaciens* GY30, *Gordonia westfalica* GY40, *Gordonia amicalis* JC11 และ *Weissella cibaria* PN3 โดยจะคัดเลือกเข้ามาแค่ 3 ชนิด เพื่อมาเพาะเลี้ยงให้เจริญร่วมกันในรูปแบบของกลุ่มแบคทีเรีย (Microbial consortium)

โดยขั้นตอนในการคัดเลือกแบคทีเรียที่ใช้ คือ นำแบคทีเรียแต่ละชนิดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นจึงนำมาขีดทดสอบ (cross streak) ทีละ 3 เชื้อต่อหนึ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSB (TSB agar) 3 ซ้ำ แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 2 วัน ส่วนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB นำมาวัด OD_{600nm} ทุกๆ 2 วัน จนครบระยะเวลา 10 วัน เพื่อสร้างกราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิด

เมื่อได้กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดมาแล้ว ทำให้สามารถดูการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดได้ เพื่อนำมาคัดเลือกในรูปแบบของกลุ่มแบคทีเรีย (Microbial consortium) โดยจะนำมาพิจารณา ร่วมกับผลจากการขีดทดสอบ (cross streak)

3.3 ศึกษาการเจริญของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมและนับจำนวน

นำเชื้อ *Bacillus subtilis* GY19, *Gordonia amicalis* JC11 และ *Weissella cibaria* PN3 เชื้อละ 1 ลูบ (อัตราส่วน 1 : 1 : 1) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 1 วัน เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที แล้วนำมาวัด OD_{600nm} ให้อยู่ในช่วง 0.2 – 0.5 ก็จะได้เป็นหัวเชื้อแบคทีเรียผสม แล้ววัด OD_{600nm} ทุก 2 วันจนครบระยะเวลา 14 วัน เพื่อสร้างกราฟการเจริญของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมนี้

จากนั้นนำหัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่บ่มเป็นระยะเวลา 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 วัน มาปั่นแยกส่วน (centrifuge) ที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างตะกอนของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมและอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำมาแขวนลอย (resuspend) ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วจึงเจือจางหัวเชื้อแบคทีเรียผสมโดยนำเซลล์หัวเชื้อแบคทีเรียผสม 1 มิลลิลิตร ลงสู่สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 9 มิลลิลิตร ทำแบบนี้ไปเรื่อย ๆ จนได้ความเข้มข้น 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} แล้วจึงนำไปตรอปเพลท (Drop plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSB (TSB agar) โดยปริมาตรที่ใช้คือ จุดละ 10 ไมโครลิตร โดยจะใช้ 3 จุดต่อความเข้มข้นหนึ่ง ๆ ทำแบบนี้ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณกลับเป็น CFUs/mL

เมื่อได้ผลจากการศึกษาการเจริญของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมและนับจำนวนแล้ว ผลที่ได้สามารถนำไปใช้สำหรับพิจารณาระยะเวลาที่ใช้เลี้ยงหัวเชื้อแบคทีเรียในการทดลองต่อไปได้ นั่นคือการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์ม

3.4 ทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียผสมและการย่อยพลาสติก PLA

3.4.1 ทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มในไมโครไทเทอร์เพลท

นำหัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่ OD_{600nm} ให้อยู่ในช่วง 0.2 – 0.5 ลงในไมโครไทเทอร์เพลท (96-well plate) จำนวน 6 คอลัมน์ คอลัมน์ละ 20 ไมโครลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 180 ไมโครลิตร จากนั้นจึงเจือจางลงทีละ 10 เท่า (10-fold dilutions) จนถึงความเข้มข้น 10^{-7} จากนั้นปิดด้วยพาราฟิล์ม (Parafilm) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1, 2, 4 และ 7 วัน เพื่อให้หัวเชื้อแบคทีเรียผสมเกิดการสร้างไบโอฟิล์ม

เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดจึงนำมาย้อมไบโอฟิล์มโดยใช้คริสตัลไวโอเลต (Crystal violet staining) โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อออกไปก่อน แล้วจึงล้างด้วยน้ำปราศจากเชื้อ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นวางทิ้งไว้ให้แห้ง (Air dry) 30 นาทีในตู้ลามีนา แล้วจึงนำมาย้อม 1% คริสตัลไวโอเลตในน้ำ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปล่อยให้ 45 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำปราศจากเชื้อ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ปล่อยให้แห้งในตู้ลามีนาเป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม 95% เอทานอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 10-15 นาที จากนั้นจึงนำสารละลายไบโอฟิล์มในคริสตัลไวโอเลต ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ไปวัด OD_{600nm} โดยใช้ Microplate reader (Gressler และคณะ, 2015)

3.4.2 ทดสอบการยึดเกาะของแบคทีเรียผสมและการย่อยพลาสติก PLA

ในการทดลองนี้ผู้วิจัยไม่ได้ทดลอง เนื่องจากติดสถานการณ์การระบาดของโรคโควิด-19 จึงทำให้ไม่สามารถเข้าปฏิบัติการทดลองได้

3.4.2.1 ทดสอบการยึดเกาะของแบคทีเรียผสมบนพลาสติก PLA

นำแก้วพลาสติก PLA จากร้านกาแฟอินทนิลที่ผ่านการใช้งานมาแล้ว โดยนำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสบู่และล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก (1 เซนติเมตร x 1 เซนติเมตร) แล้วนำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (Mukherjee และคณะ, 2016)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 21 ขวดรูปชมพู่ จากนั้นนำพลาสติก PLA ที่เป็นสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก ขนาด 1 เซนติเมตร x 1 เซนติเมตร ใส่ลงไปขวดละ 5 ชิ้น จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที แล้วนำมาวัดไบโอฟิล์มและจำนวนเชื้อที่เกาะอยู่บนชิ้นพลาสติกทุก 2 วัน เป็นระยะเวลา 14 วัน โดยการเก็บผลจะแยกเป็น 2 ส่วน คือ

- นำมาทดสอบการสร้างไบโอฟิล์ม

เก็บตัวอย่างชิ้นพลาสติก PLA มา 2 ชิ้น จากนั้นนำมาทำให้เกิดการสั่นสะเทือน (sonicate) ให้แบคทีเรียหลุดแล้วจึงนำมาล้างด้วยน้ำปราศจากเชื้อ โดยจะคืบชิ้นพลาสติกออกมา แล้วจึงล้างด้วยน้ำปราศจากเชื้อ จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นวางทิ้งไว้ให้แห้ง (Air dry) 30 นาทีในตู้ลามีนา แล้วจึงนำมาล้างด้วยน้ำปราศจากเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปล่อยให้ 45 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำปราศจากเชื้อจำนวน 3 ครั้ง ปล่อยให้แห้งในตู้ลามีนาเป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม 95% เอทานอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 10-15 นาที จากนั้นจึงปิเปตสารละลายไบโอฟิล์มในคริสตัลไวโอเลต ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงสู่ 96-well plate แล้วจึงนำไปวัด OD_{600nm} โดยใช้ Microplate reader

- นำมานับจำนวนเชื้อ

โดยจะเก็บตัวอย่างชิ้นพลาสติก PLA มา 2 ชิ้นเช่นเดียวกัน จากนั้นมาปั่นแยกส่วน (centrifuge) ที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างเซลล์แบคทีเรียผสม จากนั้นนำมาแขวนลอย (resuspend) ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วจึงเจือจางหัวเชื้อแบคทีเรียผสมโดยนำเซลล์หัวเชื้อแบคทีเรียผสม 1 มิลลิลิตร ลงสู่สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 9 มิลลิลิตร ทำแบบนี้ไปเรื่อย ๆ จนได้ความเข้มข้น 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} แล้วจึงนำไปตรอปเพลท (Drop plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSB (TSB agar) โดยปริมาตรที่ใช้คือ จุดละ 10 ไมโครลิตร โดยจะใช้ 3 จุดต่อความเข้มข้นหนึ่ง ๆ ทำแบบนี้ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณกลับเป็น CFUs/mL

3.4.2.2 ทดสอบการย่อยสลายพลาสติก PLA

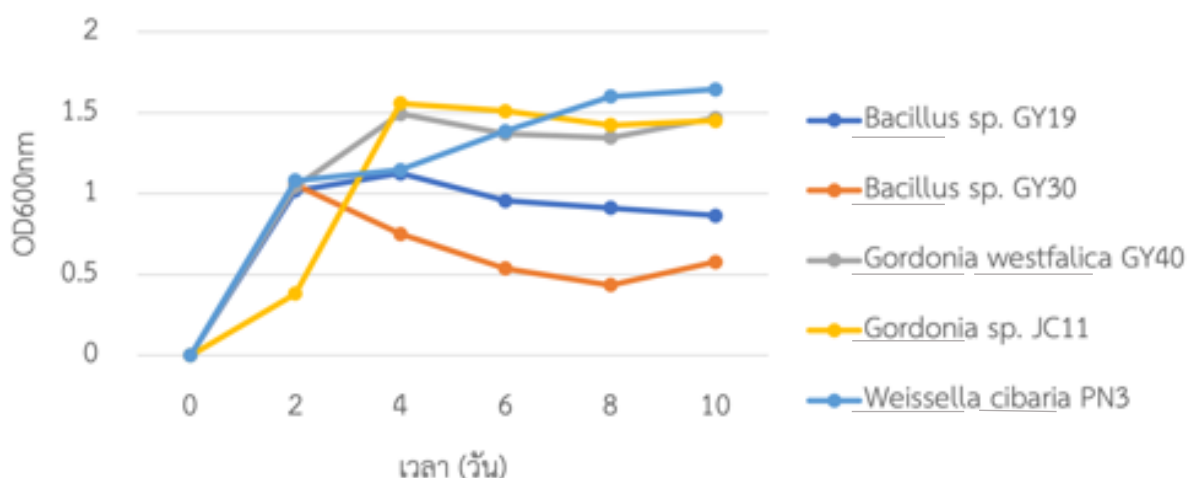
โดยการนำชิ้นพลาสติก PLA ที่นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ในจำนวนวันต่าง ๆ มาส่องกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM : Scanning Electron Microscope) เพื่อติดตามการย่อยสลายโดยดูจากพื้นผิวของพลาสติกที่เปลี่ยนแปลงไป

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการคัดเลือกกลุ่มแบคทีเรียจากแบคทีเรีย 5 ชนิด

จากผลการคัดเลือกกลุ่มแบคทีเรีย 3 ชนิดจากแบคทีเรียที่ใช้ทั้งหมด 5 ชนิด โดยใช้วิธีการขีดทดสอบ (cross streak) และการวัดการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดร่วมกันทำให้ได้ว่า แบคทีเรีย 3 ชนิดที่เหมาะสมต่อการใช้ในรูปของกลุ่มของแบคทีเรีย (Microbial consortium) ได้แก่ *Bacillus subtilis* GY19, *Gordonia amicalis* JC11 และ *Weissella cibaria* PN3 ซึ่งพิจารณาจากค่า OD_{600nm} ของเชื้อแต่ละชนิดเทียบกันและจากการเจริญร่วมกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSB แสดงในรูปที่ 4.1, 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ

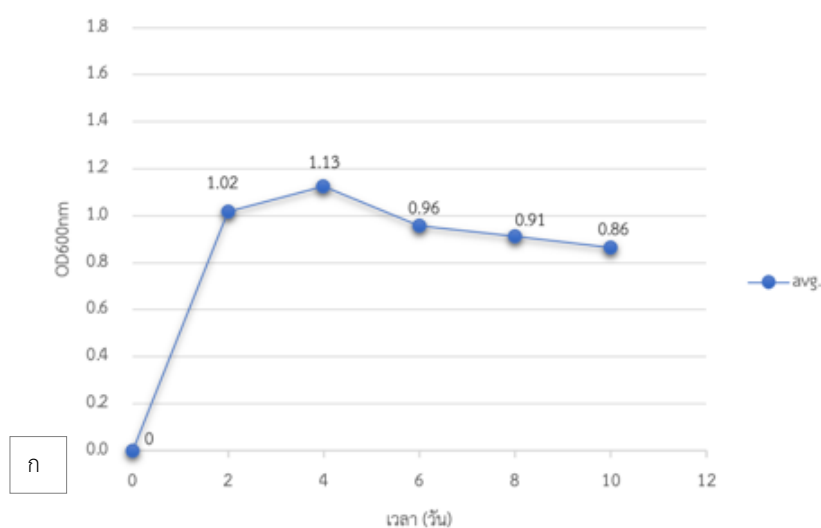


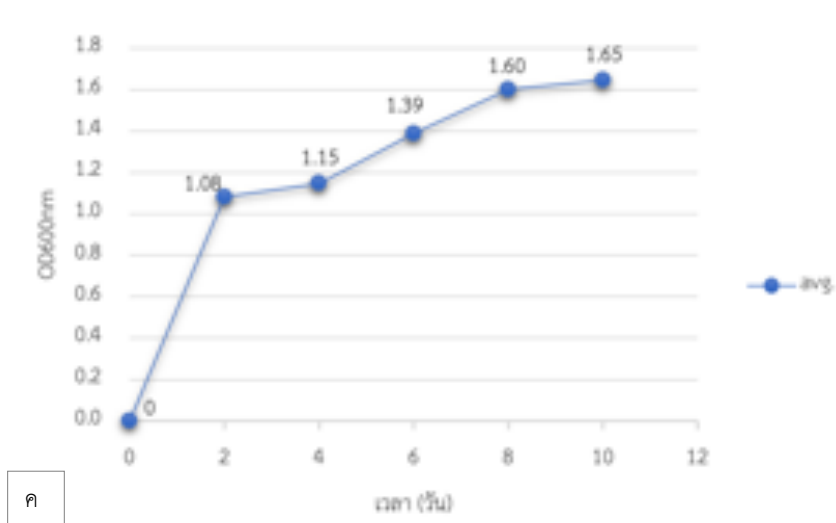
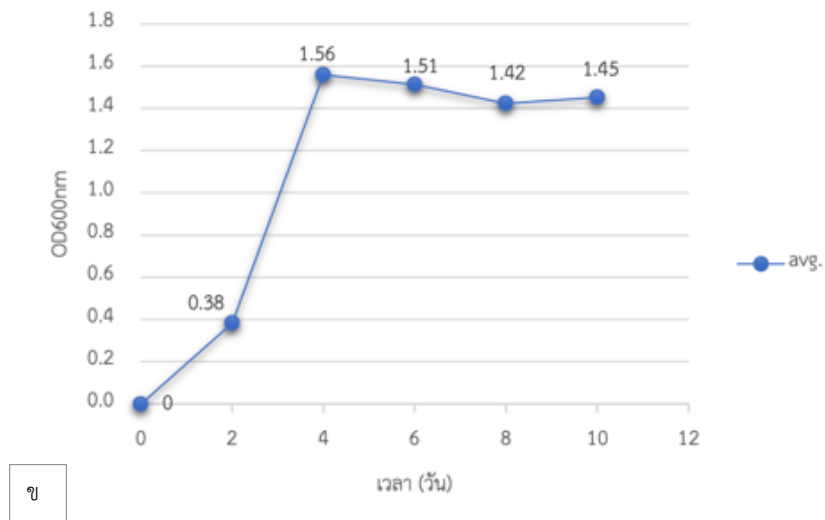
รูปที่ 4.1 กราฟการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* GY19, *Bacillus amyloliquefaciens* GY30, *Gordonia westfalica* GY40, *Gordonia amicalis* JC11 และ *Weissella cibaria* PN3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB จากการวัดความขุ่นของการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600nm})

หัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่ประกอบด้วย *Bacillus subtilis* GY19, *Gordonia amicalis* JC11 และ *Weissella cibaria* PN3 คัดเลือกได้จากการพิจารณาการเจริญจากการขีดทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSB ร่วมกับการพิจารณาค่า OD_{600nm} ร่วมด้วย จาก OD_{600nm} นำมาสร้างกราฟการเจริญของเชื้อแต่ละชนิดในรูปที่ 4.1 พบว่า กราฟการเจริญของแต่ละเชื้อมีการเจริญไปในทางเดียวกันในช่วงวันที่ 0 – 2 แบคทีเรียจะมีการปรับตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB นี้และเมื่อเวลาผ่านไป เชื้อจะมีการเจริญที่แตกต่างกัน โดย *Bacillus*

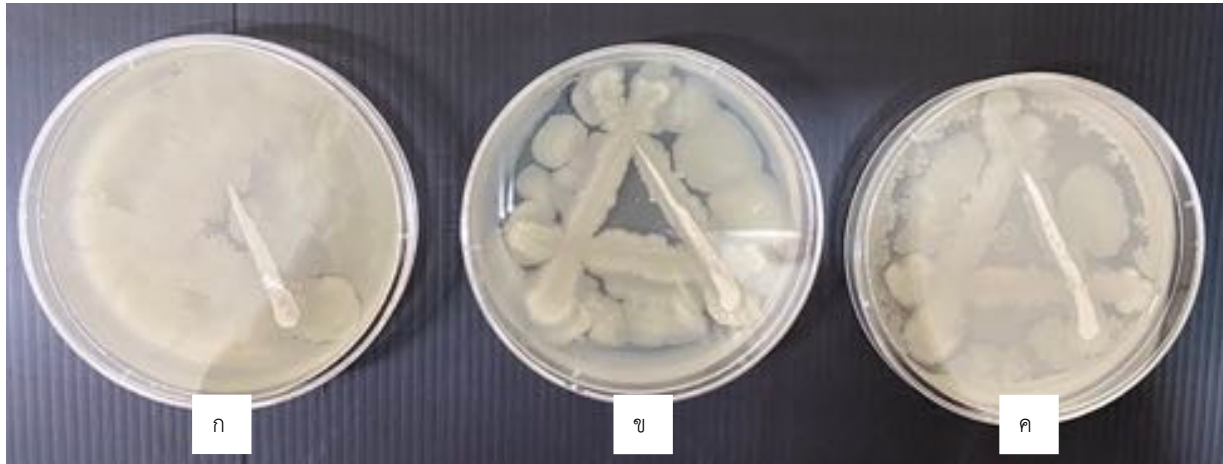
subtilis GY19 เชื่อจะมีการเจริญเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 2 ถึงวันที่ 4 จากนั้นก็จะค่อยๆ ลดการเจริญของ *Bacillus amyloliquefaciens* GY30 เชื่อมีการเจริญลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 8 และมีแนวโน้มที่จะเจริญเพิ่มขึ้นในวันที่ 10 ส่วน *Gordonia westfalica* GY40 มีการเจริญเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 และจะค่อยๆ ลดลงเวลาระยะเวลาผ่านไป สำหรับ *Gordonia amicalis* JC11 มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 ถึงวันที่ 4 ซึ่งสังเกตได้จากกราฟที่มีความชันมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และจึงค่อยๆ ลดการเจริญลงเมื่อเวลาผ่านไป และสุดท้าย *Weissella cibaria* PN3 มีการเจริญเติบโตเรื่อย ๆ เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น แสดงในรูปที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ

จากผลการทดลองการหาหัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่สามารถเจริญร่วมกันได้ พบว่าเมื่อขีดเชื้อทดสอบ (cross streak) ด้วย 3 เชื้อนี้ ได้แก่ โคโลนีที่มีการเจริญร่วมกันได้ดีมากที่สุดเมื่อเทียบกับ 3 เชื้ออื่นๆ ดังรูปที่ 4.3 โดยโคโลนีมีลักษณะ ดังนี้ โคโลนีมีสีขาวออกเหลืองอ่อน สามารถเจริญได้ทั้งบนรอยขีดทดสอบและเจริญไปทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ อีกทั้งยังมีลักษณะเป็นเมือก จึงสันนิษฐานว่าอาจจะเป็นโครงสร้างไบโอฟิล์มหรือสารเมแทบอลิต์บางอย่างที่แบคทีเรียทั้ง 3 เชื้อ นี้ ร่วมกันผลิตขึ้นมาเพื่อช่วยในการเจริญ แสดงในรูปที่ ข-1 จะแสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ *Bacillus subtilis* GY19 (ก), *Bacillus amyloliquefaciens* GY30 (ข), *Gordonia westfalica* GY40 (ค), *Gordonia amicalis* JC11 (ง) และ *Weissella cibaria* PN3 (จ) ส่วนผลการทดลองของการขีดทดสอบด้วย 3 เชื้ออื่น ๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 และ 4.12





รูปที่ 4.2 กราฟการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* GY19 (ก), *Gordonia amicalis* JC11 (ข) และ *Weissella cibaria* PN3 (ค) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB จากการวัดความขุ่นของการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600nm})



รูปที่ 4.3 การเจริญร่วมกันของโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* GY19, *Gordonia amicalis* JC11 และ *Weissella cibaria* PN3 จากการขีดทดสอบ (cross streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSB โดยจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ก., ข. และ ค. แสดงถึงการทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate)



รูปที่ 4.4 การเจริญร่วมกันของโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* GY19, *Bacillus amyloliquefaciens* GY30 และ *Gordonia westfalica* GY40 จากการขีดทดสอบ (cross streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSB โดยจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ก., ข. และ ค. แสดงถึงการทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate)



รูปที่ 4.5 การเจริญร่วมกันของโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* GY19, *Bacillus amyloliquefaciens* GY30 และ *Gordonia amicalis* JC11 จากการขีดทดสอบ (cross streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSB โดยงานอาหารเลี้ยงเชื้อ ก., ข. และ ค. แสดงถึงการทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate)



รูปที่ 4.6 การเจริญร่วมกันของโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* GY19, *Bacillus amyloliquefaciens* GY30 และ *Weissella cibaria* PN3 จากการขีดทดสอบ (cross streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSB โดยงานอาหารเลี้ยงเชื้อ ก., ข. และ ค. แสดงถึงการทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate)



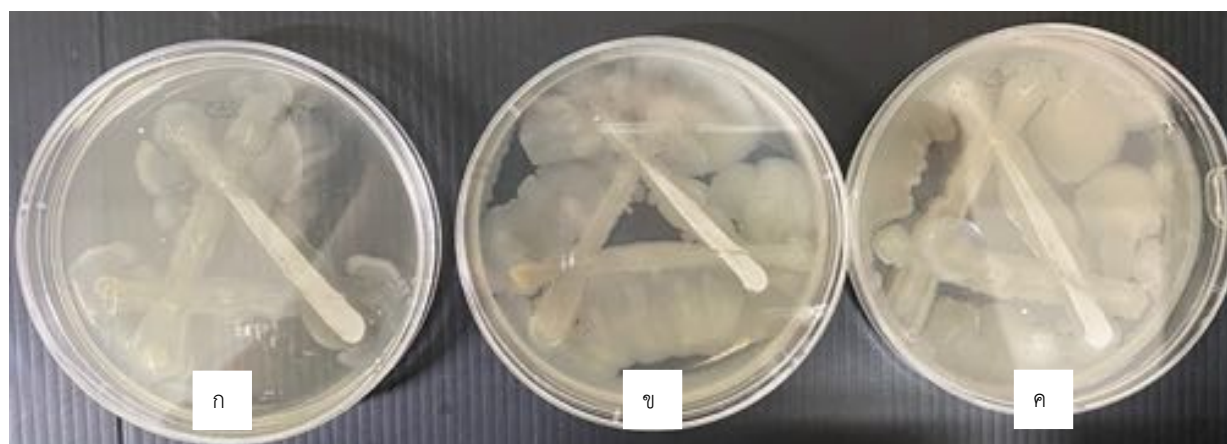
รูปที่ 4.7 การเจริญร่วมกันของโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* GY19, *Gordonia westfalica* GY40 และ *Gordonia amicalis* JC11 จากการขีดทดสอบ (cross streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSB โดยงานอาหารเลี้ยงเชื้อ ก., ข. และ ค. แสดงถึงการทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate)



รูปที่ 4.8 การเจริญรุ่มกันของโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* GY19, *Gordonia westfalica* GY40 และ *Weissella cibaria* PN3 จากการขีดทดสอบ (cross streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSB โดยจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ก., ข. และ ค. แสดงถึงการทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate)



รูปที่ 4.9 การเจริญรุ่มกันของโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* GY30, *Gordonia westfalica* GY40 และ *Gordonia amicalis* JC11 จากการขีดทดสอบ (cross streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSB โดยจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ก., ข. และ ค. แสดงถึงการทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate)



รูปที่ 4.10 การเจริญรุ่มกันของโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* GY30, *Gordonia westfalica* GY40 และ *Weissella cibaria* PN3 จากการขีดทดสอบ (cross streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSB โดยจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ก., ข. และ ค. แสดงถึงการทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate)



รูปที่ 4.11 การเจริญร่วมกันของโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* GY30, *Gordonia amicalis* JC11 และ *Weissella cibaria* PN3 จากการขีดทดสอบ (cross streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSB โดยจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ก., ข. และ ค. แสดงถึงการทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate)



รูปที่ 4.12 การเจริญร่วมกันของโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Gordonia westfalica* GY40, *Gordonia amicalis* JC11 และ *Weissella cibaria* PN3 จากการขีดทดสอบ (cross streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSB โดยจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ก., ข. และ ค. แสดงถึงการทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate)

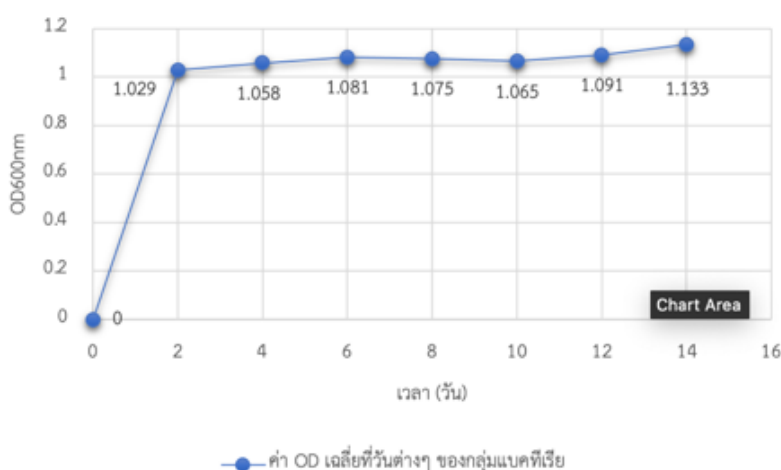
จากการศึกษาการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียในรูปแบบกลุ่มแบคทีเรียพบว่า แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* GY19, *Bacillus amyloliquefaciens* GY30, *Gordonia westfalica* GY40, *Gordonia amicalis* JC11 และ *Weissella cibaria* PN3 ทดสอบโดยการขีดทดสอบที่ละ 3 เชื้อ (cross streak) พบว่ากลุ่มหัวเชื้อแบคทีเรียที่ประกอบด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* GY19, *Gordonia amicalis* JC11 และ *Weissella cibaria* PN3 มีการเจริญร่วมกันได้ดีที่สุด โดยพบว่าลักษณะโคโลนีมีสีขาว โคโลนีมีลักษณะเงาและเป็นเมือก อีกทั้งมีการเจริญรอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนอกเหนือจากรอยที่ขีดทดสอบ (รูปที่ 4.3) และจากการพิจารณากราฟแสดงการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดร่วมด้วย พบว่า

กราฟแสดงการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* GY19, *Gordonia amicalis* JC11 และ *Weissella cibaria* PN3 มีแนวโน้มใช้เวลาในการเจริญจนถึงช่วงระยะ log phase ใกล้เคียงกัน ดังรูปที่ 4.1 และ 4.2 คือ การเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 ถึง 4 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อนำมาขีดทดสอบความสามารถในการเจริญร่วมกัน (cross streak) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้จะนำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* GY19, *Gordonia amicalis* JC11 และ *Weissella cibaria* PN3 มาใช้เตรียมในรูปแบบหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเพื่อนำไปใช้ทดสอบการย่อยพลาสติก PLA ต่อไป

4.2 ผลการศึกษาการเจริญของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมและนับจำนวน

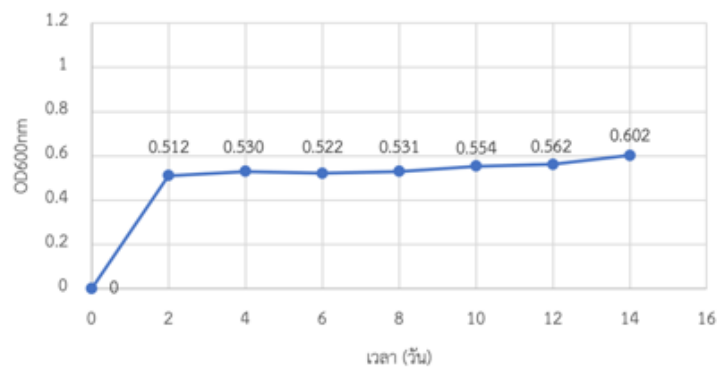
จากการทดลองศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* GY19, *Gordonia amicalis* JC11 และ *Weissella cibaria* PN3 พบว่า *Bacillus subtilis* GY19, *Gordonia amicalis* JC11 และ *Weissella cibaria* PN3 มีการเจริญเข้าสู่ช่วง log phase หลังจากวันที่ 2 เป็นต้นไป ดังที่แสดงในรูปที่ 4.14 หลังจากนั้นจึงทดลองศึกษาการเจริญโดยผสมแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ในรูปแบบหัวเชื้อผสม

จากการผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 4.3 พบว่าการเจริญของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่ประกอบไปด้วยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* GY19, *Gordonia amicalis* JC11 และ *Weissella cibaria* PN3 เจริญอยู่ร่วมกันได้ และจากการวัดความขุ่นของเชื้อผสมทุก ๆ 2 วันจนครบ 14 วัน พบว่ากลุ่มแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในแต่ละวัน โดยการเจริญของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเข้าสู่ระยะ log phase ตั้งแต่วันที่ 2 เป็นต้นไป ดังผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 4.13



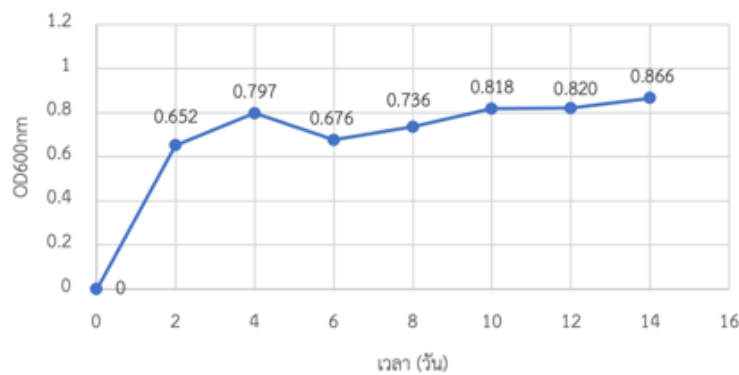
รูปที่ 4.13 กราฟการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ที่เจริญอยู่ร่วมกันในรูปแบบของหัวเชื้อแบคทีเรียผสม *Bacillus subtilis* GY19, *Gordonia amicalis* JC11 และ *Weissella cibaria* PN3

จากผลการนับจำนวนเชื้อกลุ่มแบคทีเรียผสมที่ระยะเวลาผ่านไปตั้งแต่ 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 วัน พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อนานขึ้นปริมาณของเชื้อกลุ่มแบคทีเรียผสมก็เพิ่มมากขึ้น ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่าเมื่อเจือจางเจือจนให้ได้ความเข้มข้น 10-6 จะทำให้ได้จำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 3-30 โคโลนี/จุด ซึ่งสามารถเป็นช่วงที่ยอมรับได้ ตามตารางที่ 1 และรูปที่ 4.7 ที่แสดงด้านล่างนี้ โดยข้อมูลนี้ทำให้ทราบระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้หัวเชื้อแบคทีเรียผสมอยู่ในปริมาณที่ต้องการ คือ 6 วัน และการทราบจำนวนเชื้อที่มีอยู่ในแต่ละวันหลังจากการเพาะเลี้ยงก็สามารถช่วยในการหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อและการสร้างไบโอฟิล์มในการทดลองต่อไปได้ ที่เริ่มนับเชื้อตั้งแต่วันที่ 4 เนื่องจากวันที่ 2 ไม่สามารถเข้าไปเก็บผลการทดลองได้ จึงเป็นผลทำให้ไม่ได้ข้อมูลสำหรับการนับปริมาณหัวเชื้อ



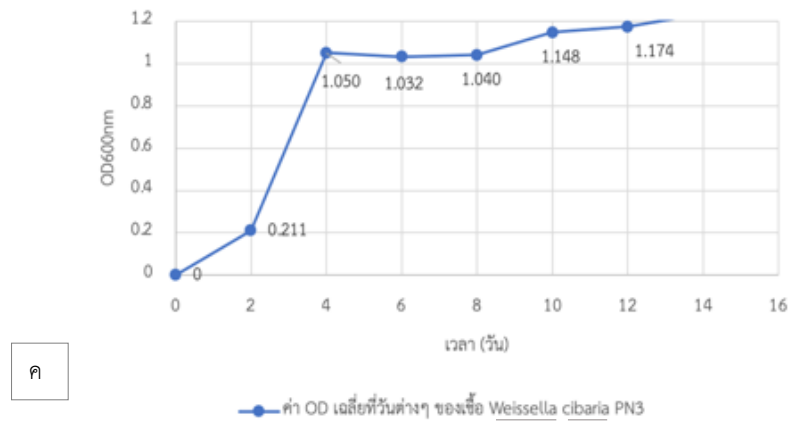
ก

—●— ค่า OD เฉลี่ยที่วันต่างๆ ของเชื้อ *Bacillus subtilis* GY19



ข

—●— ค่า OD เฉลี่ยที่วันต่างๆ ของเชื้อ *Gordonia amicalis* JC11

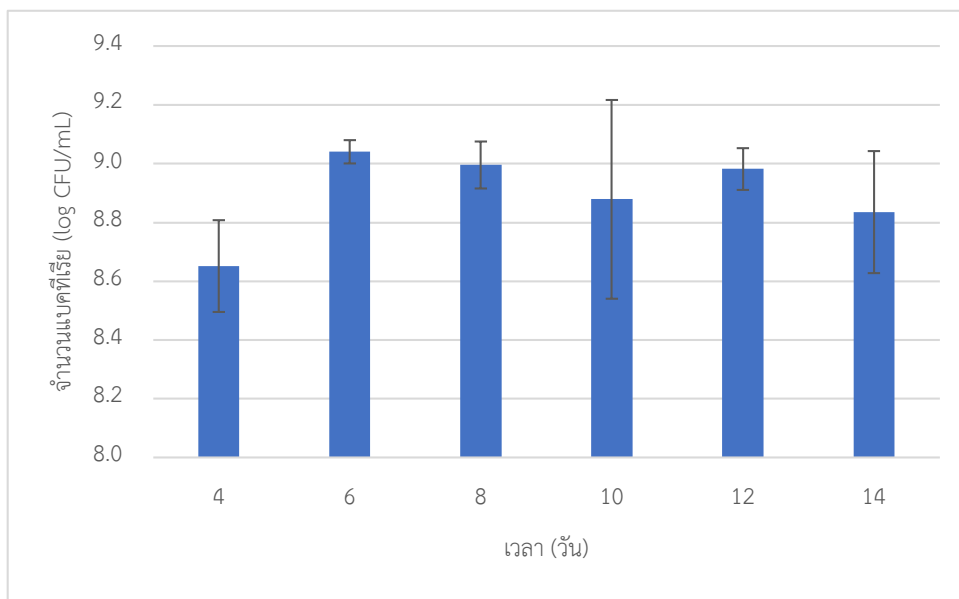


ค

รูปที่ 4.14 กราฟการเจริญเฉลี่ยที่วันต่างๆ ของเชื้อแต่ละชนิด ดังนี้ *Bacillus subtilis* GY19 (ก) , *Gordonia amicalis* JC11 (ข) และ *Weissella cibaria* PN3 (ค)

ตารางที่ 1 ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียผสม

| Day | ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (CFU/mL) | | | Avg. | log CFU/mL | Sd. |
|-----|--|-------------------|-------------------|-------------------|---------------|-------|
| 4 | 6.0×10^8 | 3.0×10^8 | 5.0×10^8 | 4.7×10^8 | 8.651 | 0.156 |
| 6 | 1.0×10^9 | 1.1×10^9 | 1.2×10^9 | 1.1×10^9 | 9.040 | 0.040 |
| 8 | 1.1×10^9 | 8.0×10^8 | 1.1×10^9 | 1.0×10^9 | 8.995 | 0.080 |
| 10 | 6.0×10^8 | 4.0×10^8 | 1.8×10^9 | 9.3×10^8 | 8.878 | 0.338 |
| 12 | 1.0×10^9 | 8.0×10^8 | 1.1×10^9 | 9.7×10^8 | 8.981 | 0.071 |
| 14 | 8.0×10^8 | 4.0×10^8 | 1.0×10^9 | 7.3×10^8 | 8.835 | 0.208 |



รูปที่ 4.15 ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเฉลี่ยที่วันต่างๆ (log CFU/mL)

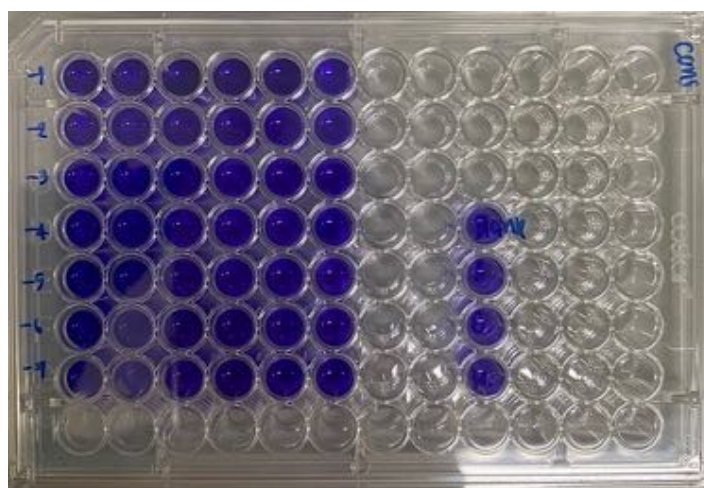
4.3 ผลการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียผสมและการย่อยพลาสติก PLA

4.3.1 ทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มในไมโครไทเทอร์เพลท

จากการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มโดยการเลี้ยงหัวเชื้อแบคทีเรียผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 4 วัน เพื่อให้ OD_{600nm} ให้อยู่ในช่วง 1.0 โดยมีจำนวนหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเริ่มต้น คือ 4.7×10^8 CFU/mL ที่เลือกเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วันเนื่องจากเป็นช่วงที่หัวเชื้อแบคทีเรียผสมเจริญอยู่ในช่วง log phase และระยะเวลาในการทดลองมีจำกัด จึงมีความจำเป็นต้องเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลา 4 วัน จากนั้นนำลงในไมโครไทเทอร์เพลท (96-well plate) เพื่อทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มที่วันต่าง ๆ สำหรับการทดลองนี้ผู้วิจัยสามารถทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มได้เพียงวันที่ 2 เท่านั้น เนื่องจากระยะเวลาในการทดลองมีจำกัด โดยผลการทดลองทราบได้จากการเปรียบเทียบค่าความขุ่นจากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรที่ใช้สำหรับตรวจติดตามการสร้างไบโอฟิล์ม ในวันที่ 2 หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อในไมโครไทเทอร์เพลทพบว่าหัวเชื้อแบคทีเรียผสมมีปริมาณ 4.7×10^3 CFU/mL มีความสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้มากที่สุด ในขณะที่หัวเชื้อแบคทีเรียผสมปริมาณ 4.7×10^5 CFU/mL สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้น้อยที่สุด ซึ่งสร้างได้เพียง 0.825 เท่านั้น ดังที่แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างหลังจากย้อมด้วย Crystal violet ที่ใช้ตรวจติดตามการสร้างไบโอฟิล์ม เมื่อใช้จำนวนเชื้อเริ่มต้นที่แตกต่างกัน

| Bacterial cell number (CFU/mL) | OD600 (Day 0) | OD600 (Day 2) |
|--------------------------------|---------------|---------------|
| 4.7×10^5 | 0.00 | 0.825 |
| 4.7×10^4 | 0.00 | 1.6055 |
| 4.7×10^3 | 0.00 | 1.7355 |
| 4.7×10^1 | 0.00 | 1.495 |



รูปที่ 4.16 การศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของหัวเชื้อผสมโดยวิธีการ microtiter dish biofilm formation assay

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

5.1 การคัดเลือกกลุ่มแบคทีเรียจากแบคทีเรีย 5 ชนิด

การที่แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* GY19, *Gordonia amicalis* JC11 และ *Weissella cibaria* PN3 สามารถเจริญอยู่ด้วยกันได้ในรูปแบบของกลุ่มแบคทีเรีย (Microbial consortium) นั้น น่าจะเป็นผลมาจากที่แบคทีเรียชนิดใดชนิดหนึ่ง สองชนิด หรือทั้งสามชนิด เมื่อมาเจริญอยู่ร่วมกันแล้ว ส่งเสริมให้มีการผลิตสารพอลิแซคคาไรด์บางอย่างออกมา สำหรับส่งเสริมการเจริญเติบโต และยึดเกาะพื้นที่ผิวนั้น ๆ ซึ่งทำให้เป็นไบโอฟิล์ม (Biofilm) (Morohoshi และคณะ, 2018) โดยที่มีการสันนิษฐานว่าเป็นไบโอฟิล์มนั้นเป็นผลมาจากทั้งแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างแน่นอน เนื่องจาก *Bacillus subtilis* เป็นแบคทีเรียที่ใช้เป็นแบคทีเรียหลักที่ใช้ในการศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มและกลไกต่าง ๆ อยู่แล้ว (Pisithkul และคณะ, 2019) ยิ่งไปกว่านั้นยังมีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactants) ได้ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แบคทีเรียชนิดนี้ผลิตได้เป็นพวกลิโปเพพไทด์ (Lipopeptides) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีมวลโมเลกุลต่ำซึ่งเหมาะสำหรับการใช้ลดแรงตึงผิว (Surface tension) บริเวณพื้นผิวหรือบริเวณผิวหน้าของสารต่างๆที่สัมผัสกัน (Pacwa-Plociniczak และคณะ, 2011) ซึ่งก็น่าจะเหมาะสมหากมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมาก่อน จะมีการสร้างไบโอฟิล์มเพื่อให้แบคทีเรียยึดเกาะและย่อยสลายพลาสติก PLA ที่สนใจ ส่วนแบคทีเรีย *Gordonia amicalis* นั้นยังเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เช่นเดียวกับแบคทีเรียชนิดก่อนหน้า (Domingos และคณะ, 2013) อีกทั้งยังสามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส เช่น ลิเปส (Lipase) และเอสเทอเรส (Esterase) ได้ โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีพันธะเอสเทอร์เป็นส่วนประกอบในโครงสร้าง ซึ่งพอลิแลคติก แอซิด หรือ PLA ก็มีพันธะดังกล่าวอยู่ในโครงสร้างเช่นกัน และแบคทีเรียชนิดสุดท้าย *Weissella cibaria* PN3 เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพวกไกลโคลิพิด (Glycolipid) (Subsangan และคณะ, 2020) ที่มีความสามารถในการลดแรงตึงผิวในทำนองเดียวกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพวกลิโปเพพไทด์ (Franzetti และคณะ, 2010)

ดังนั้นจึงสนใจที่จะนำมาเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 เชื้อมาใช้ร่วมกันเป็นหัวเชื้อแบคทีเรียผสมในงานวิจัยนี้ เนื่องจากการที่แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ ก็จะสามารถสู่การย่อยสลายพลาสติก PLA ได้เมื่อมีการยึดเกาะที่ผิวพลาสติก PLA โดยหัวเชื้อแบคทีเรียผสม โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและไบโอฟิล์มนั้นก็มีความสัมพันธ์กัน คือ เมื่อแบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาบริเวณที่ผิวเซลล์ก็จะทำให้ผิวเซลล์มีความไม่ชอบน้ำมากขึ้น (Hydrophobic) จึงส่งผลทำให้แบคทีเรียไปเกาะหรือยึดติดอยู่กับซัสเตรทที่มีความไม่ชอบน้ำด้วยเช่นกัน จากนั้นแบคทีเรียก็จะเกิดการสร้างโครงสร้างไบโอฟิล์มขึ้นมา

บนชั้นสเตรทที่ไม่ชอบน้ำ แล้วแบคทีเรียที่เจริญอยู่ในโครงสร้างไบโอฟิล์มก็จะผลิตเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลสเพื่อมาย่อยสลายชั้นสเตรทนั้นๆได้ (Bak และคณะ, 2015)

5.2 การศึกษาการเจริญของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมและนับจำนวน

จากผลการทดลองการคัดเลือกกลุ่มแบคทีเรียจากแบคทีเรีย 5 ชนิด ทำให้สามารถคัดเลือกแบคทีเรีย 3 ชนิด ที่สามารถเจริญร่วมกันได้ นั่นคือ *Bacillus subtilis* GY19, *Gordonia amicalis* JC11 และ *Weissella cibaria* PN3 และจากการศึกษาการเจริญของกลุ่มหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเปรียบเทียบกับการศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดเดี่ยว ๆ พบว่า เมื่อจลุนทรีย์ทั้ง 3 ชนิด มาเจริญอยู่ร่วมกันนั้นมีการเจริญเติบโตได้ดีมากขึ้น ซึ่งทราบได้จากการวัดค่าความขุ่นของการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600nm}) โดยพบว่าค่าความขุ่นของการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของแบคทีเรียผสมนั้นมีค่าสูงกว่าค่าความขุ่นของการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของแบคทีเรียแต่ละชนิดแบบเดี่ยวที่เพาะเลี้ยงในจำนวนวันที่เท่ากัน ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียผสมในรูปแบบหัวเชื้อผสมนี้สามารถเจริญได้ดีกว่าการเจริญแบบเชื้อเดี่ยว

ส่วนการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียผสมเมื่อเวลาผ่านไป 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 วัน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเป็นเวลา 6 วัน ทำให้มีปริมาณของแบคทีเรียผสมเฉลี่ยมากที่สุด ซึ่งมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียผสมมากถึง 1.1×10^9 CFU/mL ด้วยเหตุนี้จึงส่งผลทำให้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อแบคทีเรียผสม 6 วัน เป็นจำนวนวันที่เหมาะสมสำหรับใช้ศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของกลุ่มแบคทีเรียเหล่านี้ต่อไป แต่ในงานวิจัยนี้มีความจำเป็นที่ต้องเพาะเลี้ยงหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแค่ระยะเวลา 4 วัน เนื่องจากระยะเวลาในการทดลองมีจำกัด จึงสนใจที่จะศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 วันแทน 6 วัน

5.3 การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียผสมและการย่อยพลาสติก PLA

5.3.1 ทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มในไมโครไทเทอร์เพลท

จากผลการทดลองการสร้างไบโอฟิล์มของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่เพาะเลี้ยงในไมโครไทเทอร์เพลทเป็นระยะเวลา 2 วัน โดยปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเริ่มต้น เท่ากับ 4.7×10^8 CFU/mL พบว่าเมื่อจำนวนหัวเชื้อแบคทีเรียมีปริมาณลดลงเหลือ 4.7×10^3 CFU/mL จะมีความสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้มากที่สุด

จากตารางที่ 2 และรูปที่ 4.7 ทำให้สามารถสรุปได้ว่า เมื่อที่ปริมาณเชื้อน้อยจะมีความสามารถในการสร้างโครงสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับที่ 2 วัน แต่เมื่อปริมาณเชื้อน้อยลงจนสู่ค่าหนึ่ง ซึ่งในการทดลองของผู้วิจัยนี้ คือ 4.7×10^1 CFU/mL จะทำให้ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มเริ่มกลับมามีค่าลดลงอีกครั้ง ที่เป็นเช่นนี้เกิดจากหัวเชื้อแบคทีเรียผสมมีปริมาณหนึ่ง แบคทีเรียจะมีการติดต่อกันด้วย QS เพื่อกระตุ้นการรวมกลุ่มและเจริญร่วมกัน แต่เมื่อที่เชื้อมีปริมาณมาจนมากขึ้นจนถึงจุดหนึ่งอาจทำให้มีความ

หนาแน่นของจำนวนแบคทีเรียมากเกินไป เกิดการแย่งสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโตซึ่งกันและกันได้ ในขณะที่เชื้อปริมาณน้อยๆ สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ดีกว่านั้น มาจากการที่เชื้อไม่นำอาหารไปใช้สำหรับการเจริญและเพิ่มจำนวน โดยเมื่อเชื้อเจริญเติบโตจนมีปริมาณหนึ่ง ซึ่งในที่นี้ คือ 4.7×10^3 CFU/mL หัวเชื้อแบคทีเรียผสมนี้ จะนำสารอาหารที่ได้ไปใช้ในการสร้างไบโอฟิล์มซึ่งเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) เพื่อยึดเกาะกับพื้นผิววัสดุและป้องกันอันตรายให้กับแบคทีเรียที่อยู่ในโครงสร้างไบโอฟิล์ม เพื่อเพิ่มความสามารถในการอยู่รอดในสิ่งแวดล้อมต่อไป (Guzmán-Soto และคณะ, 2021)

5.4 แผนการทดลองที่จะทดลองต่อไปในอนาคต

จากผลการทดลองทั้งหมดที่ผู้วิจัยได้ทดลอง ทำให้ทราบว่า เชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด สามารถเจริญร่วมกันในรูปแบบของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมได้ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเป็นเวลา 6 วัน มีปริมาณของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเฉลี่ยมากที่สุด คือ 1.1×10^9 CFU/mL ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 6 วัน ก่อนที่จะนำไปทดสอบการสร้างไบโอฟิล์ม

แต่เนื่องจากระยะเวลาสำหรับการทดลองมีจำกัด ผู้วิจัยจึงเพาะเลี้ยงหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเพียงแค่ 4 วัน โดยให้มีค่าความขุ่นจากการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร ประมาณ 1.0 ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเริ่มต้น คือ 4.7×10^3 CFU/mL พบว่าปริมาณเชื้อน้อยจะมีความสามารถในการสร้างโครงสร้างไบโอฟิล์มได้ดีมากกว่าที่ปริมาณเชื้อที่มาก โดยจากผลการทดลองที่มีอยู่เพียงเท่านี้ อาจยังไม่เพียงพอที่จะศึกษาเกี่ยวกับการย่อยสลาย PLA ต่อไป จึงต้องมีการทดลองเพิ่ม ดังนี้

5.4.1 ทดสอบการยึดเกาะของแบคทีเรียผสมบนพลาสติก PLA แก้วพลาสติก PLA จากร้านกาแฟ อินทนิลที่ผ่านการใช้งานมาแล้ว โดยนำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสบู่และล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก (1 cm x 1 cm) แล้วนำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ โดยจะใส่ชิ้นพลาสติกลงไป 5 ชิ้น ต่อ 1 ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.4.2 ทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มบนชิ้นพลาสติก PLA ต่อเนื่องจากการทดลองในหัวข้อ 5.4.1 จึงเก็บตัวอย่างพลาสติกมาล้อมไบโอฟิล์ม ทุกๆ 2 วัน ไปเรื่อยๆ จนครบ 14 วัน โดยจะเก็บตัวอย่างมา 2 ชิ้น ต่อ 1 ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ และการทดลองนี้ทำ 3 ซ้ำ (Triplicates) ดังนั้นในหนึ่งวันของการเก็บผลการทดลองจะเก็บตัวอย่างพลาสติกวันละ 6 ชิ้น เพื่อนำไปศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มโดยการย้อมด้วยคริสตัลไวโอเลต

5.4.3 การนับจำนวนหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเพื่อหาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการสร้างไบโอฟิล์ม โดยพลาสติกที่เหลือในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อจากการทดลองในหัวข้อ 5.4.2 จะนำมานับจำนวนโดยนำมาปั่นแยกส่วน (centrifuge) ที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาแขวนลอย (resuspend) ใน

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วจึงเจือจางหัวเชื้อแบคทีเรียผสมโดยนำเซลล์หัวเชื้อแบคทีเรียผสม 1 มิลลิลิตร ลงสู่สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 9 มิลลิลิตร ทำแบบนี้ไปเรื่อยๆ จนได้ความเข้มข้น 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} แล้วจึงนำไปตropicเพลท (Drop plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSB (TSB agar) โดยปริมาตรที่ใช้คือ จุดละ 10 ไมโครลิตร โดยจะใช้ 3 จุดต่อความเข้มข้นหนึ่งๆ ทำแบบนี้ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณกลับเป็น CFUs/mL เพื่อดูปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเปรียบเทียบกับ การสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวชิ้นพลาสติก PLA

5.4.5 ส่วนขั้นตอนสุดท้าย ก็จะนำชิ้นพลาสติกตัวอย่างที่เหลืออีก 1 ชิ้นในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) เพื่อดูลักษณะพื้นผิวชิ้นพลาสติก PLA ที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งนำไปสู่ข้อสรุปว่าการใช้หัวเชื้อแบคทีเรียผสมจากเชื้อ 3 ชนิดนี้มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงลักษณะพื้นผิว PLA ซึ่งจะนำไปสู่การย่อยสลาย PLA ในอนาคตได้หรือไม่

5.5 ผลการทดลองที่คาดหวัง

ผู้วิจัยมีความเห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่หัวเชื้อแบคทีเรียผสมจากงานวิจัยนี้ จะสามารถผลิตโครงสร้างไบโอฟิล์มมายึดเกาะที่ผิวหน้าของชิ้นพลาสติก PLA ที่มีความเห็นเช่นนี้ เนื่องจากผลการทดลองการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มในไมโครไทเทอร์เพลท พบว่าหัวเชื้อแบคทีเรียผสมนี้สามารถสร้างไบโอฟิล์มในไมโครไทเทอร์เพลทได้ โดยไมโครไทเทอร์เพลทผลิตจากพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน (PVC) ซึ่งเป็นพลาสติกที่มีความมันเงาในระดับหนึ่ง การที่หัวเชื้อผสมสามารถสร้างไบโอฟิล์มบนพลาสติกนี้ได้ นั้น คาดว่าจะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงบริเวณพื้นผิวของ PLA และการย่อยสลายขยะพลาสติก PLA ต่อไป ในอนาคตจะนำหัวเชื้อแบคทีเรียผสมไปทดสอบการย่อยสลายพลาสติก PLA โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อการย่อยสลาย PLA ได้แก่ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลาย ความเป็นกรดต่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น นอกจากนี้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะพื้นผิวของพลาสติกที่เวลาต่างๆ ความรู้ที่ได้จะนำไปใช้สำหรับการออกแบบระบบบำบัดขยะพลาสติกต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 2561. บทที่ 39 รายละเอียดข้อมูลสารเคมีชีวภาพประเภทกรดแลคติก (Lactic Acid) เข้าถึงจาก http://asp.plastics.or.th:8001/files/article_file/20181016080519u เข้าถึงเมื่อ 18 พฤษภาคม 2564
- ศิริวิมล สุขสวัสดิ์ และ วสุ ปฐมอารีย์. 2555. บทบาทของแบคทีเรียต่อพลาสติกชีวภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว ปีที่ 28, หน้า 285-304
- สถาบันพลาสติก. 2015. เข้าถึงจาก <http://asp.plastics.or.th:8001/ArticleKnowledgeList-Detail.aspx?id=55> เข้าถึงเมื่อ 18 พฤษภาคม 2564
- สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ. 2014. เข้าถึงจาก <http://www.nia.or.th/nia/strategy/innovation-project/strategy/bio-based-materials/> เข้าถึงเมื่อ 18 พฤษภาคม 2564
- Auras, R., Harte, B., Selke, S. (2004) An overview of polylactides as packaging materials. *Macromol Biosci*, 4, 835-864.
- Bak, F., Bonnichsen, L., Jorgensen, N. O. G., Nicolaisen, M. H. & Nybroe, O. (2015) The biosurfactant viscosin transiently stimulates n-hexadecane mineralization by a bacterial consortium. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99, 1475-1483.
- Bandopadhyay S., González, J. E. L., Henderson, K. B., Anunciado, M. B., Hayes, D. G. & DeBruyn, J. M. (2020) Soil microbial communities associated with biodegradable plastic mulch films. *Frontiers in Microbiology*, 11, 587074.
- Bio-plastic. 2017. เข้าถึงจาก <https://www.mtec.or.th/bio-plastic/plastics-degradation/degradable-plastic-type.html> เข้าถึงเมื่อ 16 พฤษภาคม 2564
- Bonifer, K. S. Wen, X., Hasim, S., Phillips, E. K., Dunlap, R. N., Gann, E. R., DeBruyn, J. M. & Reynolds, T. (2019) *Bacillus pumilus* B12 degrades polylactic acid and degradation is affected by changing nutrient conditions. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2548.
- Boonbumrung, K. (2018) Biofilm: Impact on public health. *J Med Tech Assoc Thailand*, 46, 2.
- Chomchoei, A., Pathom-aree, W., Yokota, T., Kanonguch C., and Lumyong, S. (2011) *Amycolatopsis thailandensis* sp. nov., A poly (L-Lactic Acid)-degrading Actinomycete, isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 839-834

- Crouzet, M., Senechal, C. L., Brozel, V. S., Costaglioli, P., Barthe, C., Bonne, M., Garbay, B. & Vilain, S. (2014) Exploring early steps in biofilm formation: set-up of an experimental system for molecular studies. *BMC Microbiology*, 14, 253.
- Domingos, D. F., Dellagnezze, B. M., Greenfield, P., Reyes, L. R., Melo, I. S., Midgley, D. J. & Oliveria, V. M. (2013) Draft genome sequence of biosurfactant-producing bacterium *Gordonia amicalis* strain CCMA-559, isolated from petroleum-impacted sediment. *Genome Announcements*, 1, 6.
- Donlan R. M. (2002) Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 9.
- Dutkiewicz, S., Grochowska-Lapienis, D., Tomaszewski, W. (2003) Synthesis of poly(L +)lactic acid) by polycondensation method in solution. *Fibres Text Eastern Eur*, 11, 66-70.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Mayer, C., Köstgens, V. & Borchard, W. (2000) Cohesiveness in biofilm matrix polymers. *Cambridge University Press.*, 87-105.
- Franzatti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Smyth T. J. P. & Banat, I. M. (2010) Production and application of trehalose lipid biosurfactants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 112, 617-627.
- Fu, Y., Bian, X., Zang, J. & Weng Y. (2020) Biodegradation behavior of poly(Butylene Adipate-Co-Terephthalate) (PBAT), poly(Lactic Acid) (PLA), and their blend in freshwater with sediment. *Molecules.*, 25(17), 3946.
- Gao, Q., Lan, P., Shao, H. & Hu X (2002) Direct synthesis with melt polycondensation and microstructure analysis of poly(L-lactic acid-co-glycolic acid). *Polymer Journal*, 34, 786-793.
- Garlotta, D. (2001) A literature review of poly(lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment*, 9, 63-84.
- Gressler, L. T., de Vargas, A. C., ca Costa, M. M., Sutili, F. J., Schwab, M., Pereira, D. I. B., Sangioni, L. A. & de A. Botton, S., (2015) Biofilm formation by *Rhodococcus equi* and putative association with macrolide resistance. *Pesq. Vet. Bras.*, 35 (10), 835-841
- Guzmán-Soto, I., McTiernan, C., Gonzales-Gomez, M., Ross, A., Gupta, K., Suuronen, E. J., Mah, T. F., Griffith, M. & Alarcon, E. I. (2021) Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in *in vitro* and *in vivo* biofilm models. *iScience*, 24, 102443.

Happysme. 2019. เข้าถึงจาก <https://happysme.co/plastic-innovation-from-pla/>

เข้าถึงเมื่อ 16 พฤษภาคม 2564

<https://www.visittbo.com/what-is-biofilm-th.html> เข้าถึงเมื่อ 18 พฤษภาคม 2564

Ichikawa, F., Kobayashi, M., Ohta, M., Yoshida, Y., Obuchi, S. & Itoh, H. (1995) Process for preparing polyhydroxycarboxylic acid. US Patent 5440008 A.

Ikeda, K., Obuchi, S., Ohta, M. (1995) Preparation process of polyhydroxycarboxylic acid. US Patent 5646238 A.

Jamshidian, M., Tehrani, E. A., Imran, M., Jacquot, M. & Desorby, S. (2010) Poly-Lactic Acid: production, applications, nanocomposites, and release studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 552-571.

Kirstein, I. V., Wichels, A., Krohne, E. & Gerdt, G. (2019) The plastisphere – uncovering tightly attached plastic “specific” microorganisms. *PLOS ONE.*, 14(4), 1-17.

Lasprilla, A. J., Martinez G. A., Lunelli, B. H., Jardini, A. L., Filho, R. M. (2012) Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - a review. *Biotechnol Adv*, 30, 321-328.

Law, K. L., Starr, N., Siegler, T. R., Jambeck, J. R., Mallos N. J. & Leonard, G. H. (2020) The United States' contribution of plastic waste to the land and ocean. *Sci. Adv.*, 6, 1-7.

Lunt, J. (1998) Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. *Polymer Degradation and Stability*, 59, 145-152.

Maharana, T., Mohanty, B., Negi, Y. S., (2009) Melt-solid polycondensation of lactic acid and its biodegradability. *Progress in Polymer Science*, 34, 99-124.

Mehta, R., Kumar, V., Bhunia, H., Upadhyay, S. (2005) Synthesis of poly(lactic acid): a review. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, 45, 325-349.

Morohoshi, T., Ogata, K., Okura, T. & Sato, S. (2018) Molecular characterization of the bacterial community in biofilms for degradation of poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate) films in seawater. *Microbes Environ.*, 33, 19-25

- Mukherjee, S., Chowdhuri, U. R. & Kundu, P. P. (2016) Bio-degradation of polyethylene waste by simultaneous use of two bacteria: *Bacillus licheniformis* for production of bio-surfactant and *Lysinibacillus fusiformis* for bio-degradation. *RSC Adv.*, 6, 2982-2992
- Nair, N. R., Sekhar, V. C. & Nampoothiri, K. M. (2016) Augmentation of microbial consortium for enhanced polylactide (PLA) degradation. *Indian J Microbiol.*, 56 (1), 59-63
- Nikolic, L1., Ristic, I., Adnadjevic, B., Nikolic, V., Jovanovic, J. & Stankovic, M. (2010) Novel microwave- assisted synthesis of poly(D,L-lactide): the influence of monomer/initiator molar ratio on the product properties. *Sensors (Basel)*, 10, 5063-5073.
- Oberbeckmann, S., Kriekemeyer, B. & Labrenz, M. (2018) Environmental factors support the formation of specific bacterial assemblages on microplastics. *Frontiers In Microbiology.*, 8, 2709.
- Pacwa-Plocinizak, M., Plaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z. & Cameotra, S. S. (2011) Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 633-654.
- Pattanasuttichonlakul, W. & Sombatsompop, N. (2018) Accelerating biodegradation of PLA using microbial consortium from dairy wastewater sludge combined with PLA-degradating bacterium. *International Biodeterioration & Biodegradation.*, 132, 74-83
- Pisithkul, T., Schroeder, J. W., Trujillo, E. A., Yeesin, P., Stevenson, D. M., Chaiamarit, T., Coon, J. J., Wang, J. D. & Amador-Noguez, D. (2019) Metabolic remodeling during biofilm development on *Bacillus subtilis*. *mBio*, 10, 3
- POLYMER. 2012. เข้าถึงจาก <https://enchemcom1po.wordpress.com/bioplasticsไบโอพลาสติก/กระบวนการย่อยสลายของพล/> เข้าถึงเมื่อ 18 พฤษภาคม 2564
- Pranamuda, H., Tokiwa, Y., and Tanaka, H. (1997) Polylactide degradation by an *Amycolatopsis* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1637-1640.
- Subsangan, T., Khondee, N., Nawawimarn, P., Rongsayamanont, W., Chen, C. Y. & Luepromchai, E. (2020) Reuse of immobilized *Weissella cibaria* PN3 for long-term production of both extracellular and cell-bound glycolipid biosurfactants. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 751.
- thaigoodview 20th. 2010. เข้าถึงจาก <http://www.thaigoodview.com/node/17034> เข้าถึงเมื่อ 16 พฤษภาคม 2564

- Tomita, K., Nakajima, T., Kikuchi, Y., and Miwa, N. (2004) Degradation of poly (L-Lactic Acid) by a newly isolated thermophile. *Polymer Degradation and Stability*, 84, 433-438.
- Vu, T., Nikaeen, P., Chirdon, W., Khattab, A. & Depan, D. (2020) Improved weathering performance of poly(Lactic) acid through carbon nanotubes addition: thermal, microstructural, and nanomechanical analyses. *Biomimetics*, 5(4), 61.
- Zaaba, N. F. & Jaafar, M. (2020) A review on degradation mechanisms of polylactic acid: Hydrolytic, photodegradative, microbial, and enzymatic degradation. *Polym Eng Sci.*, 60, 2061–2075.
- Zhang, W., Wang, Y (2008) Synthesis and properties of high molecular weight poly(lactic acid) and its resultant fibers. *Chinese J Polym Sci* 26: 425-432.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Broth

อาหารสำเร็จรูป 30.0 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูป 30.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tryptone Soya Broth

อาหารสำเร็จรูป 30.0 กรัม

ผงวุ้นทรานางเงือก 18.0 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูป 30.0 กรัม และผงวุ้น 18.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์ 8.5 กรัม

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. สีย้อมคริสตัลไวโอเลต

คริสตัลไวโอเลต 2.0 กรัม

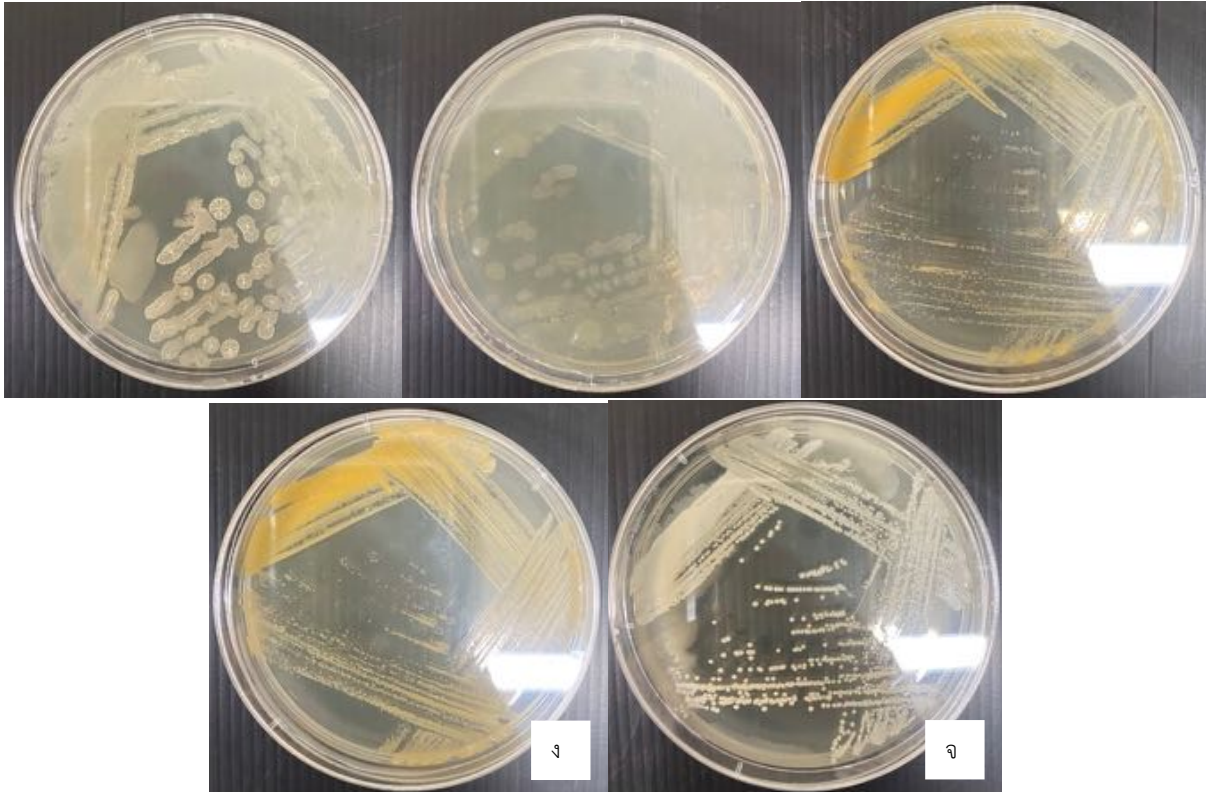
เอทิลแอลกอฮอล์ 20.0 มิลลิลิตร

แอมโมเนียมออกซาลेट 0.8 กรัม

น้ำกลั่น 80.0 มิลลิลิตร

ละลายคริสตัลไวโอเลต 2.0 กรัม ในเอทิลแอลกอฮอล์ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร และละลายแอมโมเนียมออกซาลेट 0.8 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 80.0 มิลลิลิตร แล้วนำทั้งสองส่วนผสมเข้าด้วยกันและคนให้เข้ากัน

ภาคผนวก ข
ข้อมูลจากการทดลอง



รูปที่ ข-1 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ดังนี้ *Bacillus subtilis* GY19 (ก), *Bacillus amyloliquefaciens* GY30 (ข), *Gordonia westfalica* GY40 (ค), *Gordonia amicalis* JC11 (ง) และ *Weissella cibaria* PN3 (จ)

ตารางที่ ข-1 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ที่วันต่างๆ ของแบคทีเรียแต่ละชนิด และหัวเชื้อแบคทีเรีย

| วัน | ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร | | | |
|-----|--|-------------------------|-----------------------|----------------------|
| | <i>B. subtilis</i> GY19 | <i>G. amicalis</i> JC11 | <i>W. cibaria</i> PN3 | Microbial consortium |
| 2 | 0.512 | 0.652 | 0.210 | 1.029 |
| 4 | 0.530 | 0.797 | 1.053 | 1.058 |
| 6 | 0.522 | 0.676 | 1.032 | 1.081 |
| 8 | 0.530 | 0.736 | 1.042 | 1.075 |
| 10 | 0.554 | 0.818 | 1.148 | 1.065 |
| 12 | 0.562 | 0.820 | 1.174 | 1.091 |
| 14 | 0.602 | 0.866 | 1.234 | 1.160 |

ตารางที่ ข-2 ผลต่างของค่าความขุ่นของสารละลายไบโอฟิล์มจากการวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

| ปริมาณเชื้อ (CFU/mL) | ผลต่างของค่าความขุ่นของสารละลายไบโอฟิล์ม จากการวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร | | | | | | เฉลี่ย |
|-------------------------|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|
| | คอลัมน์ที่ 1 | คอลัมน์ที่ 2 | คอลัมน์ที่ 3 | คอลัมน์ที่ 4 | คอลัมน์ที่ 5 | คอลัมน์ที่ 6 | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| 10^6 | 0.186 | 1.419 | *** | *** | *** | *** | 0.8025 |
| 10^5 | 1.215 | 1.541 | 1.364 | 1.719 | 1.718 | 2.076 | 1.6055 |
| 10^4 | *** | *** | *** | 2.473 | *** | 0.994 | 1.7355 |
| 10^2 | *** | 1.495 | *** | *** | *** | *** | 1.495 |

หมายเหตุ : *** หมายถึง ไม่สามารถอ่านค่าได้