

ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิด  
และเชื้อราน้อยและผลของการย่อยสลายต่อประชาคมแบคทีเรียในดิน



นางสาวสาธินี ศิริวัฒน์

## ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OPTIMAL CONDITIONS FOR BIODEGRADATION OF POLYLACTIC ACID AND BAGASSE  
PULP PACKAGING AND THE EFFECT OF DEGRADATION  
ON SOIL BACTERIA COMMUNITY



Miss Satinee Siriwat

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์  
ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อขานอ้อยและผลของการย่อย  
สลายต่อประชาคมแบคทีเรียในดิน

โดย

นางสาวสาธินี ศิริวัฒน์

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์

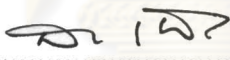
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

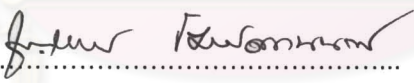
ดร.ธนาวดี ลี้จากภัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

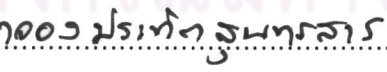
  
..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพจน์ เปี่ยมสมบุญรณ์)

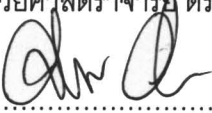
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

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

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ดร. ธนาวดี ลี้จากภัย)

  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อาจง ประทัดสุนทรสาร)

  
..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร. จินต์ อโนทัย)

สาธินี ศิริวัฒน์ : ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิ-แลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อยและผลของการย่อยสลายต่อประชาคมแบคทีเรียในดิน. (OPTIMAL CONDITIONS FOR BIODEGRADATION OF POLYLACTIC ACID AND BAGASSE PULP PACKAGING AND THE EFFECT OF DEGRADATION ON SOIL BACTERIA COMMUNITY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.ดร.ชาญวิทย์ ไชษิตานนท์ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร.ธนาวดี ลี้จากภัย, 87 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ที่ทำจากพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อยและผลของการย่อยสลายต่อประชาคมแบคทีเรียในดิน จากการทดลองแบบแฟคตอเรียล (Factorial Design) สำหรับ 3 ปัจจัย คือ บรรจุภัณฑ์ อุณหภูมิและปริมาณไนโตรเจน ใช้เวลาในการทดสอบ 30 วัน และใช้ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นเป็นดัชนีการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ พบว่าที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียสและไม่เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนในดิน มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นสูงสุดสำหรับบรรจุภัณฑ์ทั้ง 2 ชนิด เมื่อนำผลการศึกษาดังกล่าวมาขยายเวลาศึกษาเป็น 90 วัน พบว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 45 แล้วลดลงในช่วงเวลาต่อมา น้ำหนักบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อยลดลง 100 และ 96 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ บรรจุภัณฑ์ทั้ง 2 ชนิดเมื่อเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพไม่มีผลต่อความเป็นกรดต่างของดิน การย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดด้วยภาวะที่ควบคุมในห้องปฏิบัติการเกิดขึ้นเร็วกว่าการย่อยสลายในพื้นที่ฝังกลบจริงในสภาพตามธรรมชาติถึง 5 เท่า การใช้เทคนิค Denature Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) พบว่าประชาคมแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการศึกษาและแบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้จนถึงวันสิ้นสุดการทดลองจากการตรวจสอบพบว่าเป็นแบคทีเรียชนิดที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะกำจัดบรรจุภัณฑ์ทั้ง 2 ชนิด ด้วยวิธีการฝังกลบแต่ต้องใช้เวลาานานกว่าการหมักที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนิสิต

สาธินี ศิริวัฒน์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ชาญวิทย์ ไชษิตานนท์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ธนาวดี ลี้จากภัย



## 5087205120 : MAJOR ENVIRONMENTAL SCIENCE

KEYWORDS : BIODEGRADABLE / POLYLACTIC ACID / BAGASSE / PACKAGING

SATINEE SIRIWAT : OPTIMAL CONDITIONS FOR BIODEGRADATION OF POLYLACTIC ACID AND BAGASSE PULP PACKAGING AND THE EFFECT OF DEGRADATION ON SOIL BACTERIA COMMUNITY. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. CHARNWIT KOSITANONT, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: THANAWADEE LEEJARKPAI , Ph.D., 87 pp.

This research aimed to study optimal degradation conditions of packaging materials made of polylactic acid and bagasse as well as the effect of degradation on soil bacteria community. Using three factors, packaging, temperature and nitrogen source, factorial design experiment for biodegradation evaluation with CO<sub>2</sub> as a biodegradation indicator during 30 days. It was found that at 58°C without adding urea as nitrogen source, the highest CO<sub>2</sub> concentration was obtained from both type of materials. After extension the experiment to 90 days under the selected conditions. The results shown that CO<sub>2</sub> concentration was maximum at 45<sup>th</sup> day and then decreased. Weight loss of polylactic acid and bagasse were 100% and 96%, respectively. Degradation of both materials did not affect the soil pH. Under laboratory controlled conditions, polylactic acid was degraded 5 times faster than those under natural sanitary landfill conditions. Using Denature Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) technique, it was found that the bacterial community was diverse and changed throughout the study. At the end of the study, the major bacteria were unculturable. Therefore, using sanitary landfill with both, packaging materials are feasible and the packages could be degraded completely but would take a longer time than composting at 58 °C.

Field of Study : Environmental Science .....

Student's Signature .....

*Satinee Siriwat*

Academic Year : 2010 .....

Advisor's Signature .....

*C. Kositanont*

Co-Advisor's Signature .....

*Thanawadee Leejarkpai*

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่ง จากหลายๆฝ่ายขอกราบ  
ขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้  
กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ จนมีผลให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี  
นอกจากนี้ยังได้กรุณาให้ข้อคิดต่างๆ และทักษะในการทำงาน ตลอดจนอบรมสั่งสอนการดำเนิน  
ชีวิตในสังคมอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. ธนาวัต ลี้จากภัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งกรุณาให้  
คำปรึกษาในการแก้ไขปัญหาและอุปสรรคที่เกิดขึ้นระหว่างการวิจัยด้วยดีตลอดมา รวมทั้งขอกราบ  
ขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เป็นประธาน  
กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รวมถึงผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อาจอง ประพัทธ์สุนทรสารและ  
รองศาสตราจารย์ ดร.จินต์ อโณทัย ที่กรุณาเสียสละเวลาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์  
พร้อมให้ข้อคิดเห็น ข้อเสนอแนะ ตลอดจนช่วยตรวจรายละเอียดต่างๆในวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์  
ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณทุนสนับสนุนจากสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย  
(TGIST) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ(สวทช.)และทุนสนับสนุนจาก  
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้มอบทุนอุดหนุนวิจัย สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์  
สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้าน  
เทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์  
เครื่องมือและห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณคุณโยษิตา ฤดีกิจ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ  
ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (MTEC) ที่กรุณาให้คำปรึกษาและเก็บตัวอย่างในการศึกษา  
ครั้งนี้

ขอขอบคุณรุ่นพี่ เพื่อนๆและน้องๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา รวมทั้งสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่คอยให้การ  
สนับสนุน ให้โอกาสและให้กำลังใจอย่างดีเยี่ยมเสมอมา

## สารบัญ

|   | หน้า |
|---|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย.....                                    | ง    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....                                 | จ    |
| กิตติกรรมประกาศ.....                                    | ฉ    |
| สารบัญ.....   | ช    |
| สารบัญตาราง.....  | ฎ    |
| สารบัญภาพ.....  | ฏ    |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....                          | ท    |
| บทที่   |      |
| 1. บทนำ.....  | 1    |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....                 | 1    |
| 1.2 วัตถุประสงค์.....                                   | 2    |
| 1.3 ขอบเขตการศึกษา.....                                 | 2    |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....                      | 2    |
| 2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....                  | 3    |
| 2.1 บรรจุภัณฑ์ที่ย่อยสลายทางชีวภาพ.....                 | 3    |
| 2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตบรรจุภัณฑ์.....              | 9    |
| 2.2.1 วัตถุดิบจากธรรมชาติ (Natural polymer) .....       | 9    |
| 2.2.2 วัตถุดิบจากการสังเคราะห์ (Synthetic polymer)..... | 13   |
| 2.3 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ.....      | 17   |
| 2.3.1 อุณหภูมิ (Temperature).....                       | 18   |
| 2.3.2 ความชื้น (Soil moisture).....                     | 18   |
| 2.3.3 ปริมาณธาตุอาหาร (Nutrients).....                  | 18   |
| 2.3.4 ความเป็นกรดด่าง (pH).....                         | 19   |
| 2.3.5 เนื้อดิน (Soil texture).....                      | 19   |
| 2.3.6 การถ่ายเทอากาศ (Aeration).....                    | 19   |
| 2.3.7 จุลินทรีย์ในดิน (Soil microorganism).....         | 20   |

| บทที่   | หน้า |
|---|------|
| 2.4 ชนิดของจุลินทรีย์ในดินและเทคโนโลยีการติดตามจุลินทรีย์.....  | 20   |
| 2.4.1 ชนิดของจุลินทรีย์ในดิน .....  | 20   |
| 2.4.2 เทคโนโลยีในการติดตามจุลินทรีย์.....   | 22   |
| 2.5 วัฏจักรของธาตุที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายบรมจุลินทรีย์.....   | 24   |
| 2.5.1 วัฏจักรไนโตรเจนเนื่องจากจุลินทรีย์ในดิน.....  | 24   |
| 2.5.2 วัฏจักรคาร์บอนเนื่องจากจุลินทรีย์ในดิน.....   | 27   |
| 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....  | 28   |
| 3. วิธีดำเนินการวิจัย.....  | 31   |
| 3.1 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ดำเนินการศึกษา.....  | 31   |
| 3.2 เคมีภัณฑ์.....  | 32   |
| 3.3 วัสดุที่ใช้ในการศึกษา.....  | 34   |
| 3.4 วิธีดำเนินการศึกษา.....   | 34   |
| 3.4.1 การเตรียมชุดทดลอง.....  | 34   |
| 3.4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายทางชีวภาพของบรมจุลินทรีย์..  | 35   |
| 3.4.3 การย่อยสลายบรมจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพจากปัจจัยที่<br>คัดเลือก.....                                    | 37   |
| 3.4.4 การย่อยสลายบรมจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพต่อประชาคม<br>แบคทีเรียในดิน.....                                | 37   |
| 3.5 วิธีวิเคราะห์.....  | 37   |
| 3.5.1 ตรวจวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ<br>ย่อยสลายทางชีวภาพ.....                              | 37   |
| 3.5.2 ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของบรมจุลินทรีย์ด้วยเครื่อง Scanning<br>electron microscope (SEM).....                    | 39   |
| 3.5.3 หาเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายทางชีวภาพของบรมจุลินทรีย์ชนิดพอลิแลค-<br>ติกแอซิดและเยื่อชานอ้อยโดยวิธีชั่งน้ำหนัก..... | 39   |
| 3.5.4 วัดค่าความเป็นกรด ด่าง (pH) ของดิน.....   | 40   |

|  |    |
|--|----|
| 3.5.5 วิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียในดินระหว่างเกิดกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพโดยวิธี denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)..... | 40 |
| 3.5.6 หาปริมาณแบคทีเรียในดิน.....  | 44 |
| 4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล.....   | 45 |
| 4.1 ลักษณะทางกายภาพของดินทดสอบและบ่อฝังกลบขยะเทศบาลจังหวัดสุพรรณบุรี.....  | 45 |
| 4.2 ปัจจัยที่เหมาะสมในการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อย.....                                       | 46 |
| 4.2.1 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่าง(pH) ของดิน.....  | 47 |
| 4.2.2 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของบรรจุภัณฑ์.....  | 48 |
| 4.3 การย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อยภายใต้ภาวะที่คัดเลือก.....                                    | 49 |
| 4.3.1 ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้จากการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อย.....                    | 49 |
| 4.3.2 เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อยที่หายไป.....                                    | 51 |
| 4.3.3 ความเป็นกรดต่าง(pH)ของดินขณะที่มีการย่อยสลายชีวภาพ.....  | 52 |
| 4.3.4 ปริมาณจุลินทรีย์ในดินระหว่างเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพ.....  | 53 |
| 4.3.5 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อย.....  | 54 |
| 4.3.5.1 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวในแนวระนาบของบรรจุภัณฑ์จากการศึกษาในชุดทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการ..... | 54 |
| 4.3.5.2 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวในแนวระนาบของบรรจุภัณฑ์จากการศึกษาในบ่อฝังกลบ.....                                    | 56 |



|  |    |
|--|----|
| 4.3.5.3 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวในแนวขวางของ<br>บรรจุก้อนท์จากการศึกษาในชุดทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ<br>ในห้องปฏิบัติการ..... | 58 |
| 4.3.5.4 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวในแนวขวาง<br>ของบรรจุก้อนท์จากการศึกษาในบ่อฝังกลบ.....  | 60 |
| 4.4 ผลจากการย่อยสลายทางชีวภาพต่อประชาคมแบคทีเรียในดิน.....   | 62 |
| 4.4.1 การสกัดดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ในดินจากการย่อยสลายบรรจุก้อนท์ชนิด<br>พอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อย.....                                  | 62 |
| 4.4.2 กำจัดสารประเภทฮิวมิคจากตัวอย่างดีเอ็นเอ.....   | 63 |
| 4.4.3 ประชาคมแบคทีเรียจากการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุก้อนท์ชนิด<br>พอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อย.....                                       | 63 |
| 4.4.3.1 ประชาคมแบคทีเรียจากการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุก้อนท์<br>ชนิดเยื่อชานอ้อย.....   | 64 |
| 4.4.3.2 ประชาคมแบคทีเรียจากการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุก้อนท์<br>ชนิดพอลิแลคติกแอซิด.....  | 66 |
| 4.4.3.3 ประชาคมแบคทีเรียจากการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ<br>ในฝังกลบ.....   | 67 |
| 4.4.3.4 การระบุชนิดของแบคทีเรียที่น่าสนใจ.....   | 68 |
| 5. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....  | 70 |
| 5.1 สรุปผลการวิจัย.....  | 70 |
| 5.2 ข้อเสนอแนะ.....  | 71 |
| รายการอ้างอิง.....   | 72 |
| ภาคผนวก.....   | 79 |
| ภาคผนวก ก.....   | 80 |
| ภาคผนวก ข.....   | 84 |
| ภาคผนวก ค.....   | 85 |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....  | 87 |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่ |  | หน้า |
|----------|--|------|
| 2.1      | ลำดับการย่อยสลายของสารประกอบอินทรีย์ชนิดต่างๆ.....   | 19   |
| 3.1      | ปัจจัยที่ใช้ในการทดสอบ.....  | 35   |
| 3.2      | การทดลองแบบแฟกตอเรียล ดีไซน์ หมายเลข BB0316.....   | 36   |
| 4.1      | ลักษณะทางกายภาพของดินก่อนทำการทดลอง.....   | 45   |
| 4.2      | ลักษณะทางกายภาพของบ่อฝังกลบขยะเทศบาลจังหวัดสุพรรณบุรีระหว่าง<br>เดือนกันยายน พ.ศ 2551 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2552.....                     | 45   |
| 4.3      | ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษาการย่อย<br>สลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อย..... | 69   |

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญภาพ

| ภาพที่ |   | หน้า |
|--------|---|------|
| 2.1    | วัฏจักรพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....   | 5    |
| 2.2    | การย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิเมอร์.....   | 7    |
| 2.3    | ชนิดของพอลิเอสเทอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ .....  | 8    |
| 2.4    | โครงสร้างของเซลลูโลส .....  | 11   |
| 2.5    | กระบวนการผลิต PLA จากแหล่งวัตถุดิบที่สามารถปลูกทดแทนใหม่ได้ .....   | 13   |
| 2.6    | โครงสร้างทางเคมีของ PLA.....  | 14   |
| 2.7    | กระบวนการผลิต PLA โดยไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์.....  | 15   |
| 2.8    | การย่อยสลาย PLA ด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส.....  | 16   |
| 2.9    | ไดอะแกรมของวัฏจักรคาร์บอน.....  | 27   |
| 3.1    | ชุดทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์.....  | 34   |
| 3.2    | บรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในการทดสอบชนิดเยื่อชานอ้อยและพอลิแลคติกแอซิด.....   | 35   |
| 3.3    | ขั้นตอนการกำจัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากชุดทดสอบการย่อยสลาย.....   | 38   |
| 3.4    | เครื่องวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxy analyzer) ยี่ห้อ LI-COR รุ่น LI-6400.....   | 38   |
| 3.5    | หัววัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์โดยต่อเข้ากับชุดทดสอบ .....   | 39   |
| 4.1    | ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อยเมื่อพิจารณาแต่ละปัจจัย .....                               | 46   |
| 4.2    | ผลการตรวจวัดค่าความเป็นกรดต่างของดินทดสอบที่ 20, 30 และ 58 °C ก่อนและหลังการศึกษากการย่อยสลายทางชีวภาพเป็นระยะเวลา 30 วันในดินที่ไม่ใส่บรรจุภัณฑ์ทดสอบ..... | 48   |
| 4.3    | ผลการศึกษากการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิด PLA และเยื่อชานอ้อยที่ 20, 30 และ 58 °C ที่ระยะเวลาการศึกษา 30 วัน .....                                   | 49   |
| 4.4    | ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่วัดได้จากการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิด PLA และเยื่อชานอ้อย.....  | 50   |
| 4.5    | การย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อย .....   | 52   |

| ภาพที่  | หน้า |
|---|------|
| 4.6 ค่าความเป็นกรดต่าง(pH) ของดินจากการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของ<br>บรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อยที่ระยะเวลาการศึกษา<br>90 วัน.....         | 53   |
| 4.7 จำนวนจุลินทรีย์จากตัวอย่างดิน 1 กรัมจากการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพ<br>ของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อยที่ระยะเวลาการศึกษา<br>90 วัน ..... | 54   |
| 4.8 ลักษณะทางกายภาพของการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิแลคติก-<br>แอซิดในแนวระนาบที่ 0 (ก่อนการศึกษา) 30 และ 60 วัน ในห้องปฏิบัติการ.....                   | 55   |
| 4.9 ลักษณะทางกายภาพของการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของเยื่อชานอ้อย<br>ในแนวระนาบ ที่ 0, 30, 60 และ 90 วัน ในห้องปฏิบัติการ .....                               | 56   |
| 4.10 ลักษณะทางกายภาพของการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิแลคติก-<br>แอซิดในแนวระนาบ ที่ 0, 2, 4, 6, 10 และ 12 เดือน ในบ่อฝังกลบ.....                         | 57   |
| 4.11 ลักษณะทางกายภาพของการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิแลคติก-<br>แอซิดในแนวขวางที่ระยะเวลา 0, 30 และ 60 วัน ในห้องปฏิบัติการ.....                         | 58   |
| 4.12 ลักษณะทางกายภาพของการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของเยื่อชานอ้อย<br>ในแนวขวางที่ 0, 30, 60 และ 90 วัน ในห้องปฏิบัติการ.....                                 | 59   |
| 4.13 ลักษณะทางกายภาพของการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิแลคติก-<br>แอซิดในแนวขวางที่ 0, 2, 4, 6,10 และ 12 เดือน ในบ่อฝังกลบ.....                            | 61   |
| 4.14 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างดินที่ใช้ในการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพ.....  | 62   |
| 4.15 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกลูโซไฟโพลีเมอเรส.....  | 63   |
| 4.16 ประชาคมแบคทีเรียจากตัวอย่างดินระหว่างเกิดกระบวนการย่อยสลายทาง<br>ชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดเยื่อชานอ้อยด้วยเทคนิค DGGE.....                                 | 65   |
| 4.17 ประชาคมแบคทีเรียจากตัวอย่างดินระหว่างเกิดกระบวนการย่อยสลายทาง<br>ชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดด้วยเทคนิค DGGE.....                              | 66   |
| 4.18 ประชาคมแบคทีเรียจากการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพด้วยการฝังกลบ<br>จากบ่อฝังกลบเทศบาลจังหวัดสุพรรณบุรีด้วยเทคนิค DGGE.....                                  | 68   |

### คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

|                  |         |  |
|------------------|---------|--|
| PLA              | หมายถึง | พอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid)            |
| °C               | หมายถึง | องศาเซลเซียส                                 |
| CO <sub>2</sub>  | หมายถึง | ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์                         |
| μl               | หมายถึง | ไมโครลิตร                                    |
| μmol             | หมายถึง | ไมโครโมล                                     |
| ml               | หมายถึง | มิลลิลิตร                                    |
| ng               | หมายถึง | นาโนกรัม                                     |
| A <sub>260</sub> | หมายถึง | ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร |
| A <sub>280</sub> | หมายถึง | ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร |



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันการเพิ่มขึ้นของประชากรและการพัฒนาทางด้านเศรษฐกิจก่อให้เกิดความต้องการใช้ทรัพยากรมากขึ้น วัสดุหรือผลิตภัณฑ์ที่อำนวยความสะดวกตอบสนองการใช้งานเกือบทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกที่ได้มาจากกระบวนการปิโตรเคมี จากคุณสมบัติที่มีความทนทานสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางและมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง (Mueller, 2006) ทำให้พลาสติกถูกนำไปใช้งานอย่างแพร่หลายไปทั่วโลก ถึงแม้ว่าพลาสติกสังเคราะห์จะมีประโยชน์ในการใช้งาน แต่กลับส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องจากขยะพลาสติกย่อยสลายยาก จึงเป็นการเพิ่มปัญหาในการจัดการขยะ ในทางปฏิบัติส่วนใหญ่ใช้วิธีการเผาและฝังกลบ (Chillini และ Solaro, 2002) จากปัญหาดังกล่าว มนุษย์ได้คิดค้นและพัฒนาพลาสติกจากวัสดุธรรมชาติที่สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ เช่น พลาสติกที่มีแปงเป็นองค์ประกอบพื้นฐาน poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate (PHA) polylactic acid (PLA) หรือ polylactide เป็นพอลิเมอร์ที่ได้รับความนิยมมากในประเภทพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (ปกรณ โสภาประกาศิตและมัทธนา โสภาประกาศิต, 2551) รวมถึงบรรจุภัณฑ์ที่สามารถย่อยสลายได้ในระยะเวลาอันสั้นก็เป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งในการลดปริมาณขยะที่ย่อยสลายได้ยากโดยพอลิเมอร์เหล่านี้เตรียมได้จากวัตถุดิบที่สามารถปลูกทดแทนได้ (Hiemenz and Lodge, 2007) จากการให้ความสำคัญกับปัญหาสิ่งแวดล้อมหลายประเทศได้ออกมาตรการเพื่อลดปริมาณการใช้วัสดุสังเคราะห์และสนับสนุนให้ประชาชนใช้วัสดุที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพมากขึ้น (Berkesch, 2005) ประเทศไทยซึ่งมีความพร้อมทางด้านวัตถุดิบด้านการเกษตรอยู่แล้ว จึงมีแผนพัฒนาเพื่อให้เป็นผู้นำด้านอุตสาหกรรมและพลาสติกที่ย่อยสลายได้ในภูมิภาค (ผู้จัดการออนไลน์, 2551) การใช้บรรจุภัณฑ์ที่สามารถย่อยสลายได้มากขึ้นเมื่อนำไปบำบัดโดยปล่อยให้เกิดกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมหลายด้านโดยเฉพาะต่อจุลินทรีย์ในดินซึ่งมีส่วนสำคัญในกระบวนการย่อยสลายในดิน

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อยที่ออกแบบให้ย่อยสลายได้ทางชีวภาพและศึกษาผลการย่อยสลายที่มีต่อประชาคมแบคทีเรียในดินโดยศึกษาควบคู่กับการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ

ด้วยการฝังกลบของศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ เพื่อเป็นพื้นฐานในการจัดการ  
บรรจุภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพและเป็นข้อมูลสำหรับการจัดการสิ่งแวดล้อมในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชาน  
อ้อยที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพและศึกษาผลการย่อยสลายต่อประชาคมแบคทีเรียในดิน

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 การทดลองใช้บรรจุภัณฑ์ 2 ชนิด คือ บรรจุภัณฑ์ที่ผลิตมาจาก polylactic acid  
(PLA) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (MTEC) และ  
บรรจุภัณฑ์ที่ผลิตจากเยื่อชานอ้อย

1.3.2 ใช้ดินในการทดสอบตรวจจุ่มจุรี

1.3.3 ทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการและบ่อฝังกลบขยะเทศบาลจังหวัดสุพรรณบุรี

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

1.4.2 ทราบผลการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่มีต่อประชาคม  
แบคทีเรียในดิน

1.4.3 ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปใช้ในการจัดการขยะที่ย่อยสลายทางชีวภาพในอนาคต

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

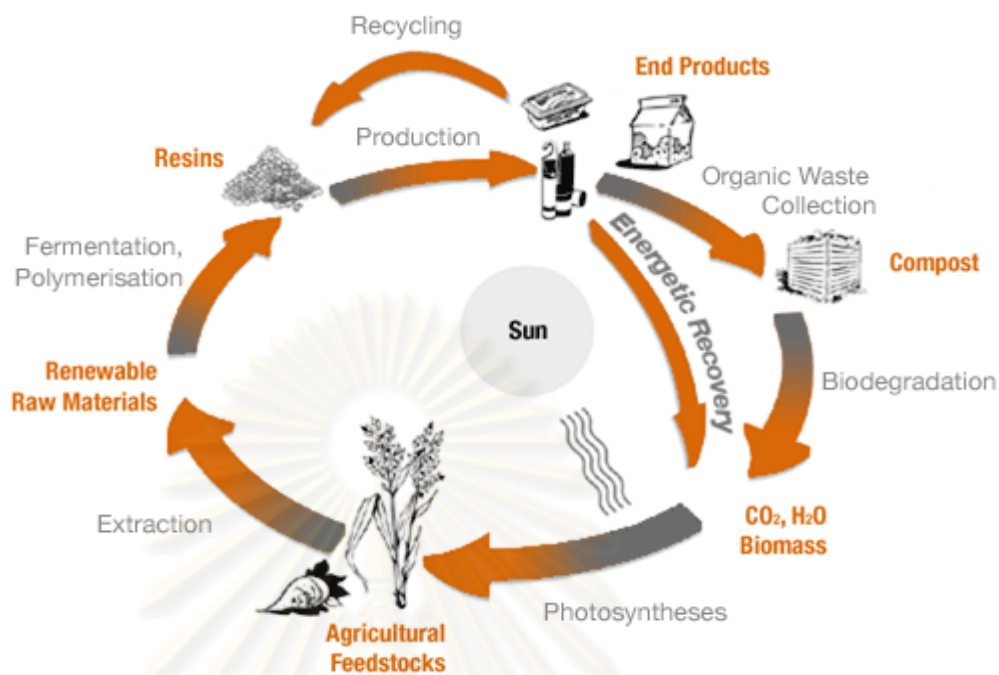
#### 2.1 บรรจุภัณฑ์ที่ย่อยสลายทางชีวภาพ

ปัจจุบันหลายประเทศได้ให้ความสำคัญเกี่ยวกับพลาสติกชีวภาพ ทั้งด้านนโยบายการวิจัย เพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมและการสร้างผลิตภัณฑ์ เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกาซึ่งเป็นประเทศผู้นำด้านการผลิตพลาสติกทางชีวภาพ บริษัท Wal Mart ได้ประกาศให้ใช้ถุงพลาสติกชนิดพอลิแลคติก-แอซิด (PLA) ในขณะที่บริษัท Metabolix Inc. เป็นผู้นำด้านการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHAs นอกจากนี้ประเทศสหรัฐอเมริกาได้ตั้งเป้าให้มีการใช้ผลิตภัณฑ์จากชีวมวลเพิ่มเป็น 12 % ในปี พ.ศ. 2553 และ 20% ในปี พ.ศ. 2573 สำหรับประเทศเยอรมันมุ่งเน้นการพัฒนาเทคโนโลยีการผสมเม็ดพลาสติกชีวภาพเพื่อเพิ่มคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ ในส่วนองค์กรของรัฐได้ออกมาตรการด้านภาษีซึ่งพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพจะถูกเรียกเก็บภาษีเพิ่มขึ้น ขณะที่ประเทศเม็กซิโกและประเทศฝรั่งเศสออกกฎหมายบังคับให้ใช้ถุงพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพภายในปี พ.ศ. 2553 ส่วนประเทศญี่ปุ่นได้ให้การสนับสนุนการพัฒนาอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพผ่านทางกลุ่ม Japan BioPlastics Association (JBPA) และมีการพัฒนาพลาสติกชีวภาพอย่างรวดเร็ว ซึ่งบริษัทส่วนใหญ่เน้นการพัฒนาพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิแลคติก-แอซิดเป็นหลัก เช่น บริษัทโตโยตาได้พัฒนาและผลิตพลาสติกชีวภาพเพื่อใช้เป็นชิ้นส่วนประกอบรถยนต์ บริษัท Sony, NEC, Panasonic, Toshiba, Fujitsu ต่างพัฒนาผลิตภัณฑ์จากพลาสติกชีวภาพและคาดว่าในปี พ.ศ. 2553 ญี่ปุ่นจะมีความต้องการพลาสติกชีวภาพ 100,000-200,000 ตันต่อปีนอกจากนี้รัฐบาลญี่ปุ่นมีนโยบายให้มีการใช้พลาสติกชีวภาพ 20% ในปี พ.ศ. 2563 ส่วนประเทศจีนและเบลเยียมเป็นผู้ผลิตกรดแลคติกที่มีกำลังผลิตเป็นอันดับสองของโลกจะเห็นว่าการต้องการพลาสติกชีวภาพมีแนวโน้มเติบโตอย่างรวดเร็ว ซึ่งประเทศไทยมีความอุดมสมบูรณ์ด้านชีวมวลและวัตถุดิบที่มีศักยภาพในการพัฒนาสู่อุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ เช่น มันสำปะหลังและอ้อย ขณะที่วัตถุดิบซึ่งมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพอีกชนิดหนึ่งคือ เซลลูโลสที่เหลือใช้จากส่วนต่างๆของพืช เช่น ลำต้น ก้าน ใบ ซึ่งถือเป็นวัตถุดิบชีวภาพทำ

ให้ไม่เกิดปัญหาการแย่งชิงทรัพยากรระหว่างการใช้พืชเป็นอาหารกับการใช้พืชในการผลิตพลาสติกชีวภาพ (วลัยพร ทิมบุญธรรมและคณะ, 2552)

ในปัจจุบันตลาดของพลาสติกชีวภาพได้มุ่งเน้นไปยังพลาสติกสำหรับบรรจุภัณฑ์เนื่องจากเป็นการใช้งานที่ก่อให้เกิดขยะมากที่สุด หากบรรจุภัณฑ์เหล่านั้นย่อยสลายทางชีวภาพได้ก็จะเป็นการช่วยลดปัญหาขยะ (Shimao, 2001) ซึ่งวัฏจักรพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพแสดงดังภาพที่ 2.1 การกำจัดขยะมูลฝอยที่นิยมใช้ทั่วไป ได้แก่ การหมักทำปุ๋ย (composting) การเผา (Incineration) การฝังกลบอย่างถูกหลักสุขาภิบาล (sanitary landfill) ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับท้องถิ่นต่างๆ ในประเทศไทย การกำจัดขยะมูลฝอยโดยวิธีฝังกลบเป็นการนำขยะมูลฝอยมาเทกองในพื้นที่ที่จัดเตรียมไว้สำหรับฝังกลบโดยเฉพาะ ซึ่งจะมีการวางระบบต่างๆ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการปลดปล่อยมลสารต่างๆ ออกสู่พื้นที่ภายนอก แล้วใช้เครื่องจักรกลเกลี่ยและบดอัดให้ยุบตัวลง หลังจากนั้นใช้ดินกลบทับและบดอัดให้แน่นอีกครั้ง เป็นลักษณะนี้จนเต็มพื้นที่ฝังกลบ เพื่อป้องกันปัญหาในด้านกลิ่น แมลง สัตว์พาหะ น้ำฝนชะล้างมูลฝอย และเหตุรำคาญอื่นๆ สารอินทรีย์ที่มีอยู่ในขยะมูลฝอยจะถูกย่อยสลายตามธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ในกระบวนการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic decomposition) ทำให้ขยะมูลฝอยยุบตัวเกิดก๊าซมีเทนและน้ำเสียขึ้นในชั้นของขยะมูลฝอยออกนอกพื้นที่ ซึ่งพื้นที่ที่จะใช้ในการฝังกลบนี้จะต้องมีการศึกษาความเหมาะสมและออกแบบรายละเอียดโครงสร้างทางวิศวกรรมที่เหมาะสม (กรมควบคุมมลพิษ, 2552)

พลาสติกย่อยสลายได้ (degradable plastics) เป็นพลาสติกที่ได้รับการออกแบบมาเพื่อให้สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีภายใต้สภาวะที่กำหนดเนื่องมาจากการทำงานของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติเช่น แบคทีเรีย รา และสาหร่าย เป็นผลทำให้เกิดการสูญเสียสมบัติบางประการที่สามารถวัดค่าได้โดยใช้วิธีทดสอบตามมาตรฐานต่างๆ [American Society for Testing and Materials (ASTM) และ International Organization for Standardization (ISO)] ซึ่งในช่วงเวลาหลายสิบปีที่ผ่านมางานวิจัยด้านนี้มีเพิ่มมากขึ้น โดยในระยะแรกงานวิจัยมุ่งประยุกต์ใช้งานด้านต่างๆ เช่น การสังเคราะห์ไหมละลายลาย กระดุกเทียม แผ่นฟิล์มคลุมหน้าดิน หรือถุงสำหรับเพาะชำกล้าไม้ (Gupta และ Kumar, 2007)



ภาพที่ 2.1 วัฏจักรพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (European-bioplastics, 2010)

พลาสติกย่อยสลายได้โดยทั่วไปเราสามารถแบ่งเป็น 4 ประเภทใหญ่ๆ ตามกลไกการย่อยสลาย คือ

- **การย่อยสลายได้โดยแสง (photodegradation)** การย่อยสลายโดยแสงมักเกิดจากการเติมสารเติมแต่งที่มีความไวต่อแสงลงในพลาสติกหรือสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ให้มีหมู่ฟังก์ชันหรือพันธะเคมีที่ไม่แข็งแรง แตกหักง่ายภายใต้รังสียูวี เช่น หมู่คีโตน (ketone group) อยู่ในโครงสร้าง เมื่อสารหรือหมู่ฟังก์ชันดังกล่าวสัมผัสกับรังสียูวีจะเกิดการแตกของพันธะกลายเป็นอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งไม่เสถียร จึงเข้าทำปฏิกิริยาต่ออย่างรวดเร็วที่พันธะเคมีบนตำแหน่งคาร์บอนในสายโซ่พอลิเมอร์ ทำให้เกิดการขาดของสายโซ่ แต่การย่อยสลายนี้จะไม่เกิดขึ้นภายในปอฝึงกลบขยะ กองคอมโพสท์ หรือสภาวะแวดล้อมอื่นที่มีดี หรือแม้กระทั่งชิ้นพลาสติกที่มีการเคลือบด้วยหมึกที่หนาบบนพื้นผิว เนื่องจากพลาสติกจะไม่ได้สัมผัสกับรังสียูวีโดยตรง

- **การย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative degradation)** การย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันของพลาสติก เป็นปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนลงในโมเลกุลของพอลิเมอร์ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติอย่างช้าๆ โดยมีออกซิเจน และความร้อน แสงยูวี หรือแรงทางกลเป็นปัจจัยสำคัญ เกิดเป็นสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide, ROOH) ในพลาสติกที่ไม่มีการเติมสารเติมแต่งที่ทำหน้าที่เพิ่มความเสถียร (stabilizing additive)

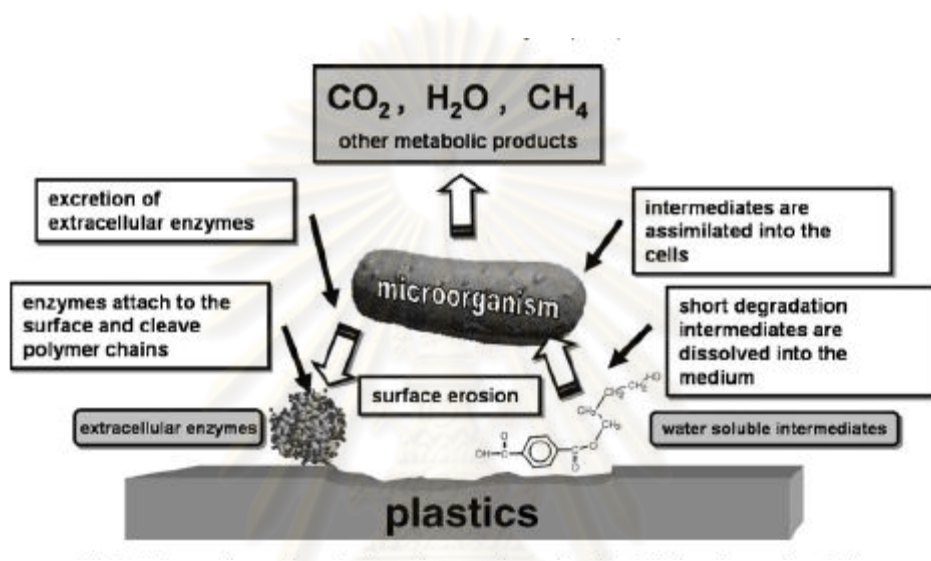


แสงและความร้อนจะทำให้ ROOH แตกตัวกลายเป็นอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียรและเข้าทำปฏิกิริยาต่อที่พันธะเคมีบนตำแหน่งคาร์บอนในสายโซ่พอลิเมอร์ ทำให้เกิดการแตกหักและสูญเสียสมบัติเชิงกลอย่างรวดเร็วแต่ด้วยเทคโนโลยีการผลิตที่ได้รับการวิจัยและพัฒนาขึ้นในปัจจุบันทำให้พอลิโอเลฟินเกิดการย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนได้เร็วขึ้นภายในช่วงเวลาที่กำหนดโดยการเติมสารเติมแต่งที่เป็นเกลือของโลหะทรานซิชัน ซึ่งทำหน้าที่คะตะลิสต์เร่งการแตกตัวของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์เป็นอนุมูลอิสระทำให้สายโซ่พอลิเมอร์เกิดการแตกหักและสูญเสียสมบัติเชิงกลรวดเร็วยิ่งขึ้น

- **การย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส** (hydrolytic degradation) การย่อยสลายของพอลิเมอร์ที่มีหมู่เอสเทอร์ หรือเอไมด์ เช่น แป้ง พอลิเอสเทอร์ พอลิแอนไฮดริด พอลิคาร์บอเนต และพอลิยูรีเทน ผ่านปฏิกิริยาก่อให้เกิดการแตกหักของสายโซ่พอลิเมอร์ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เกิดขึ้น โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ประเภทที่ใช้คะตะลิสต์ (catalytic hydrolysis) และไม่ใช้คะตะลิสต์ (non-catalytic hydrolysis) ซึ่งประเภทแรกยังแบ่งออกได้เป็น 2 แบบคือ แบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายนอกโมเลกุลของพอลิเมอร์เร่งให้เกิดการย่อยสลาย (external catalytic degradation) และแบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์เองในการเร่งให้เกิดการย่อยสลาย (internal catalytic degradation) โดยคะตะลิสต์จากภายนอกมี 2 ชนิด คือ คะตะลิสต์ที่เป็นเอนไซม์ต่างๆ (enzyme) เช่น depolymerase lipase esterase และ glycohydrolase ในกรณีนี้จัดเป็นการย่อยสลายทางชีวภาพ และคะตะลิสต์ที่ไม่ใช่เอนไซม์ (non-enzyme) เช่น โลหะแอสคาไลด์ (alkaline metal) เบส (base) และกรด (acid) ที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมในธรรมชาติ ในกรณีนี้จัดเป็นการย่อยสลายทางเคมี สำหรับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์นั้นใช้หมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ของหมู่เอสเทอร์หรือเอไมด์บริเวณปลายของสายโซ่พอลิเมอร์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

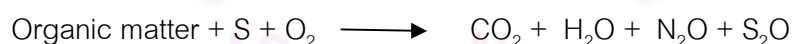
- **การย่อยสลายทางชีวภาพ** (biodegradation) การย่อยสลายของพอลิเมอร์จากการทำงานของจุลินทรีย์โดยทั่วไปมีกระบวนการ 2 ขั้นตอน เนื่องจากขนาดของสายพอลิเมอร์ยังมีขนาดใหญ่และไม่ละลายน้ำ ในขั้นตอนแรกของการย่อยสลายจึงเกิดขึ้นภายนอกเซลล์โดยการปลดปล่อยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ซึ่งเกิดได้ทั้งแบบใช้ endo-enzyme หรือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกตัวของพันธะภายในสายโซ่พอลิเมอร์อย่างไม่เป็นระเบียบและแบบ exo-enzyme หรือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกหักของพันธะที่ละหน่วยจากหน่วยซ้ำที่เล็กที่สุดที่อยู่ด้านปลายของสายโซ่พอลิเมอร์เมื่อพอลิเมอร์แตกตัวจนมีขนาดเล็กพอจะแพร่ผ่านผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์และเกิด

การย่อยสลายต่อในขั้นตอนที่ 2 ได้ผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้าย (ultimate biodegradation) คือ พลังงานและสารประกอบขนาดเล็กที่เสถียรในธรรมชาติ (Mineralization) เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซมีเทน น้ำ แร่ธาตุต่างๆ และมวลชีวภาพ (biomass)(National Metal and Materials Technology Center, 2007; Shah และคณะ, 2008) การย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิเมอร์ แสดงดังภาพที่ 2.2

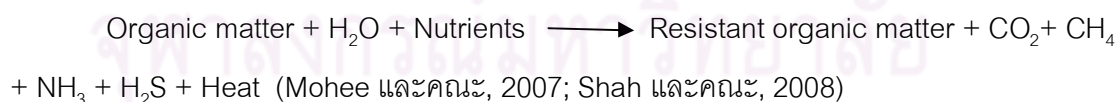


ภาพที่ 2.2 การย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิเมอร์ (Mueller, 2006)

การย่อยสลายทางชีวภาพในสิ่งแวดล้อมแบบมีอากาศ จุลินทรีย์จะมีกิจกรรมการย่อยสลายที่ซับซ้อน ได้ผลผลิตดังแสดงในสมการ



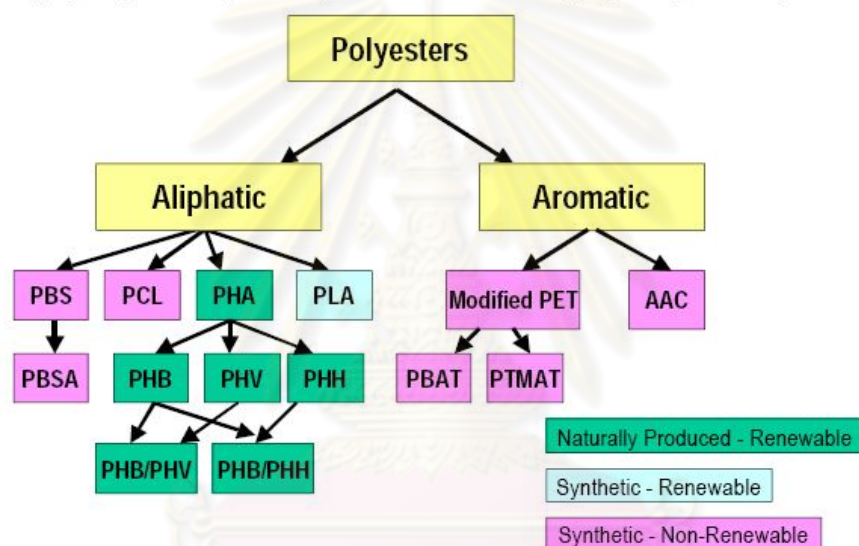
การย่อยสลายทางชีวภาพแบบไม่มีอากาศ



ตัวอย่างพอลิเมอร์ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ได้แก่ พอลิเมอร์ย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบพื้นฐาน (biodegradable starch based polymers) พอลิเมอร์ย่อยสลายได้ทางชีวภาพประเภทพอลิเอสเทอร์ (biodegradable polyester) เช่น PHA, PHB, PHH PHV, PLA และ PCL ซึ่งชนิดของพอลิเอสเทอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพแสดงดังภาพที่ 2.3 นอกจากนี้ยังมีพอลิเมอร์ย่อยสลายได้ชนิดอื่นๆ เช่น พลาสติกย่อยสลายได้โดยแสง (photobiodegradable

polymers) พอลิเมอร์ที่มีการเติมสารเติมแต่งที่มีคุณสมบัติควบคุมการย่อยสลาย (controlled degradation additive masterbatches) เพื่อให้พอลิเมอร์มีขนาดโมเลกุลเหมาะสมต่อการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ต่อไป (ธนาวัต ลี้จากภัย, 2549)

|   |  |
|---|--|
| PHA – polyhydroxyalkanoates               | PHB – polyhydroxybutyrate                  |
| PHH – polyhydroxyhexanoate                | PHV - polyhydroxyvalerate                  |
| PLA – polylactic acid                     | PCL – polycaprolactone                     |
| PBS – polybutylene succinate              | PBSA - polybutylene succinate adipate      |
| AAC – Aliphatic-Aromatic copolyesters     | PET – polyethylene terephthalate           |
| PBAT – polybutylene adipate/terephthalate | PTMAT- polymethylene adipate/terephthalate |



ภาพที่ 2.3 ชนิดของพอลิเอสเทอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Nolan-ITU Pty Ltd, 2002)

การทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพโดยทั่วไปมักใช้เวลาในการทดสอบประมาณ 6 เดือน เช่น มาตรฐาน ASTM 5338 กำหนดไว้ว่าพลาสติกที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์เพียง 1 ชนิด จะต้องเกิดการย่อยสลายอย่างน้อย 60% โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารประกอบโมเลกุลเล็ก เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ สารประกอบอินทรีย์สารชีวมวล ภายใต้สภาวะการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์แบบใช้ออกซิเจนภายในเวลา 6 เดือน และสำหรับพอลิเมอร์ผสมต้องเกิดการย่อยสลาย 90% และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักสามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นสารปรับสภาพดินได้ และต้องไม่มีความเป็นพิษต่อพืชและสัตว์ จึงจะได้อ้างว่าเป็นพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และสามารถกำจัดได้โดยกระบวนการหมักขยะอินทรีย์ เมื่อตัวอย่างได้ผ่านการทดสอบตามมาตรฐาน และมีสมบัติเป็นไปตามที่มาตรฐานกำหนด จะได้รับอนุญาตให้ติดสัญลักษณ์ที่แสดงว่าเป็น

ผลิตภัณฑ์ที่มีสมบัติย่อยสลายได้ทางชีวภาพเช่น “OK compost” ของประเทศเบลเยียม “compostable DIN CERTCO” ของประเทศเยอรมนี “Compostable” ของประเทศสหรัฐอเมริกา และ “PBS GreenPla” ของประเทศญี่ปุ่น เป็นต้น (ธนาวัต ลี้จากภัย, 2549)

## 2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตบรรจุภัณฑ์

วัสดุชีวภาพส่วนใหญ่เป็นพอลิเมอร์ (polymer) ที่เกิดจากมอนอเมอร์ (monomer) หน่วยย่อยประกอบกัน พอลิเมอร์ที่ใช้ในการพัฒนาวัสดุชีวภาพมีทั้งที่มาจากธรรมชาติ (natural sources) และที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นมา (synthetic sources) ข้อสำคัญของการใช้พอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติในการพัฒนาวัสดุชีวภาพ คือ ความสามารถในการย่อยสลายได้หรือด้านกระบวนการทางชีวภาพ (Health Environment and Regulatory Affairs, 1997) ดังนั้นจึงแบ่งวัตถุดิบหรือพอลิเมอร์ที่ใช้ในการผลิตวัสดุชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพออกเป็น 2 ชนิดคือ พอลิเมอร์ที่มีแหล่งกำเนิดหรือแหล่งวัตถุดิบจากธรรมชาติ (natural polymers) และพอลิเมอร์จากการสังเคราะห์ (synthetic polymers)

### 2.2.1 วัตถุดิบจากธรรมชาติ (Natural polymer)

1) **พอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharides)** เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ เซลลูโลสและแป้ง เป็นกลุ่มที่มีปริมาณมากที่สุดที่พบในธรรมชาติ (Chandra และ Rustgi, 1998) พอลิแซคคาไรด์เป็นสารประกอบพอลิเมอร์ของน้ำตาล (saccharides) ซึ่งอาจเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides) หรือน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharides) หลายๆโมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโคเวเลนต์ที่เรียกว่าพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bonds) โดยทั่วไปพอลิแซคคาไรด์จะมีน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบมากกว่า 20 หน่วยขึ้นไป หน่วยของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซคคาไรด์เรียกว่า “มอนอเมอร์” กรณีที่จำนวนน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบน้อยกว่า 20 หน่วยจะเรียกคาร์โบไฮเดรตประเภทนี้ว่า “โอลิโกแซคคาไรด์” แต่โดยส่วนใหญ่แล้วพอลิแซคคาไรด์ที่พบในธรรมชาติมักมีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 200-3,000 หน่วย สารประกอบพอลิแซคคาไรด์บางประเภท เช่น แป้งและเซลลูโลสมีขนาดโมเลกุลใหญ่มากถึง 90,000 หน่วย ดังนั้นพอลิแซคคาไรด์จึงเป็นสารประกอบที่มีขนาดใหญ่และมีน้ำหนักโมเลกุลมาก พอลิแซคคาไรด์มีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์ว่า “ไกลแคน (glycan)” (เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญและคณะ 2552) จะพบ



พอลิแซคคาไรด์ในวัตถุดิบทางการเกษตร ได้แก่ ข้าวโพด อ้อย มันสำปะหลัง (Gupta และ Kumar, 2001) ซึ่งชนิดของพอลิแซคคาไรด์ที่สำคัญมี ดังนี้

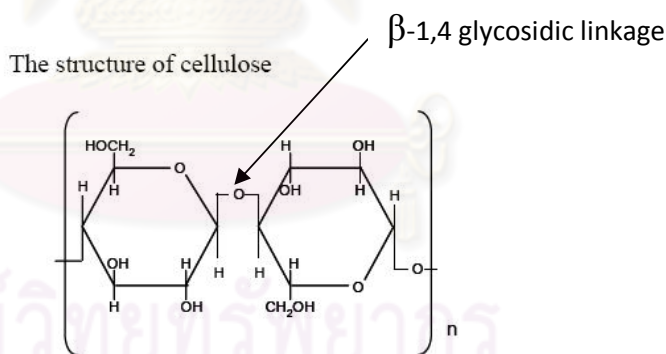
- **แป้ง (starch)** เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากพืชจำพวกไฮโมพอลิเมอร์ที่ได้จากพืช ในธรรมชาติแป้งจะพบในรูปของเม็ด (granules) ที่มีรูปร่างขนาดแตกต่างกันตามแหล่งที่มาซึ่งจะประกอบด้วยพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส 2 ชนิด คือพอลิเมอร์เชิงเส้นที่เรียกว่า “อะมิโลส (amylose)” และพอลิเมอร์เชิงกิ่งที่เรียกว่า “อะมิโลเพกติน (amylopectin)” โมเลกุลของแป้งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลจำนวนมาก ยึดเกาะกันด้วยพันธะไฮโดรเจนที่มีสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) การนำแป้งมาใช้ประโยชน์ด้านบรรจุภัณฑ์และวัสดุที่เกี่ยวข้อง โดยคุณสมบัติของการใช้แป้งเป็นบรรจุภัณฑ์ คือ สมบัติการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของแป้งที่ช่วยลดปัญหาขยะที่เกิดจากการใช้พลาสติกที่ไม่ย่อยสลาย โดยเอนไซม์  $\beta$ -amylase จากแบคทีเรียหรือราสามารถย่อยบริเวณ  $\alpha$ -1-4 glycosidic bond ของแป้งได้ (วีรนุช หลาง, 2553)

พลาสติกที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบพื้นฐานอาจมีปริมาณแป้งเป็นองค์ประกอบตั้งแต่ร้อยละ 10 จนถึงมากกว่าร้อยละ 90 แต่พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ต้องมีปริมาณแป้งเป็นองค์ประกอบมากกว่าร้อยละ 60 ขึ้นไป โดยที่ปริมาณแป้งยิ่งมากขึ้นส่งผลให้พลาสติกสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพได้ดีขึ้น และทิ้งสารตกค้าง (recalcitrant residues) ในปริมาณน้อย พลาสติกที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบพื้นฐานส่วนใหญ่ถูกผสมกับพอลิเมอร์ที่มีสมรรถนะสูง (high performance polymers) เช่น พอลิเอสเตอร์แบบสายโซ่ตรง เพื่อให้ได้วัสดุที่มีสมบัติเฉพาะและเหมาะสมในการนำไปใช้งานในด้านต่างๆ พลาสติกที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบพื้นฐานสามารถจำแนกได้หลายประเภท ได้แก่ แป้งที่มีสมบัติเทอร์โมพลาสติก (TPS) แป้งผสมพอลิเอสเตอร์สังเคราะห์แบบสายโซ่ตรง เช่น พอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid: PLA) พอลิคาโพรแลกโตน ( polycaprolactone: PCL) พอลิบิวทิลินซัคซิเนต (polybutylene succinate: PSB) พอลิบิวทิลินซัคซิเนตอะดิเปต (polybutylene succinate adipate: PBSA) เป็นต้น (Nolan-ITU Pty Ltd., 2002; Oliver, 2005)

- **เซลลูโลสและอนุพันธ์เซลลูโลส (Cellulose and cellulose derivatives)** เซลลูโลสเป็นโครงสร้างหลักที่พบในผนังพืชเป็นสารอินทรีย์คาร์บอนที่พบมากในสิ่งแวดล้อม โดยปกติมักอยู่ร่วมกับเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เพคติน (pectin) และลิกนิน (lignin) (วีรนุช หลาง, 2553) องค์ประกอบเหล่านี้มีหน้าที่ให้ความแข็งแรงต่อผนังของพืช โดยโครงสร้างของเซลลูโลส (ภาพที่ 2.4) เกิดจากการต่อเป็นสายโซ่ยาวของน้ำตาล D-กลูโคส ที่มาจับต่อกันด้วย



พันธะเบต้า-1,4 ไกลโคซิดิก ( $\beta$ -1,4 glycosidic linkages) เซลลูโลสมีลักษณะเป็นสายโซ่ยาวและมีพันธะไฮโดรเจนระหว่างโซ่ของเซลลูโลส (Oliver, 2005) จึงทำให้เกิดเป็นเส้นใยที่เรียกว่า "ไมโครไฟบริล (microfibril)" เซลลูโลสเป็นวัสดุธรรมชาติที่มีการใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมาย เนื่องจากสามารถตัดแปรหรือปรับปรุงคุณสมบัติได้หลากหลายและถือเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ โดยปกติโครงสร้างของเซลลูโลสจะมีขนาดใหญ่และมีลักษณะความเป็นผลึกค่อนข้างสูงจึงทำให้สมบัติการละลายของเซลลูโลสในน้ำหรือตัวทำละลายอินทรีย์ไม่ดี จึงใช้สมบัติเหล่านี้ในผลิตภัณฑ์ที่ไม่ละลายน้ำ เช่น สาลี กระดาษ แผ่นกรอง สิ่งทอ เป็นต้น (เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญและคณะ, 2552) นอกจากนี้เซลลูโลสสามารถตัดแปรทางเคมีทำให้สามารถละลายในน้ำในสารละลายอินทรีย์หรือในสารละลายที่มีอนุพันธ์ของโลหะได้ การตัดแปรสมบัติของเซลลูโลสให้เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ของเซลลูโลสใหม่ที่เรียกว่า "อนุพันธ์ของเซลลูโลส (cellulose derivatives)" อนุพันธ์เซลลูโลสที่ผ่านการตัดแปรสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ยา อาหาร เครื่องสำอาง สิ่งก่อสร้างและบรรจุภัณฑ์ เป็นต้น



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของเซลลูโลส (Oliver, 2005)

ปัจจุบันพืชที่นำมาใช้ประโยชน์อย่างมากในอุตสาหกรรมน้ำตาลได้แก่ อ้อยเมื่อผ่านกระบวนการผลิตน้ำตาลแล้วจะได้เยื่อขานอ้อย (bagasse) ซึ่งเป็นส่วนเส้นใยของลำต้น เยื่อขานอ้อยมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบสามารถนำมาผ่านกระบวนการขึ้นรูปเป็นบรรจุภัณฑ์ใช้สำหรับบรรจุอาหาร (บริษัท บรรจุภัณฑ์เพื่อสิ่งแวดล้อม จำกัด, 2008)

● **ไคตินและไคโตซาน (chitin and chitosan)** ไคตินถือเป็นสายพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีมากรองจากเซลลูโลส โดยถือเป็นองค์ประกอบหลักของโครงสร้างภายในเซลล์สัตว์ทะเลต่างๆ นอกจากนี้ยังพบในแมลง ราและยีสต์ โครงสร้างหลักของไคตินคือ poly ( $\beta$ -(1-4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose) ซึ่งถือว่าเป็นวัสดุชีวภาพที่มีโครงสร้างคล้ายกับเซลลูโลส ส่วนไคโตซานเป็นอนุพันธ์ของไคติน ทั้งไคตินและไคโตซานสามารถนำมาใช้ในงานหลายด้าน เช่น ด้านการเกษตร ด้านเส้นใยและสิ่งทอหรือวัสดุปิดแผล เป็นต้น

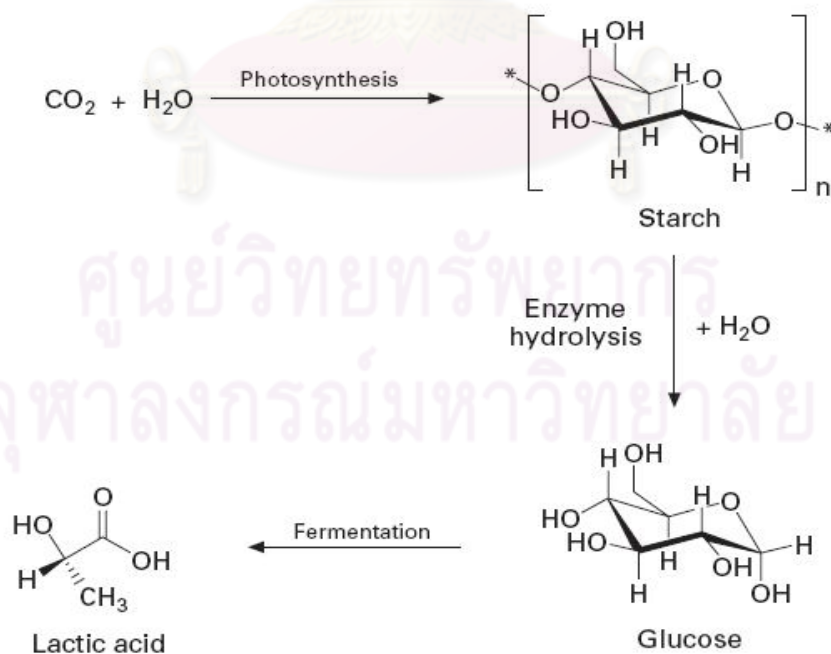
2) **โปรตีน (Proteins)** เป็นสารอินทรีย์ซึ่งพบได้ในสิ่งแวดล้อมทุกชนิด มีโครงสร้างซับซ้อนและมีน้ำหนักโมเลกุลมาก โปรตีนมีหน่วยย่อยคือกรดอะมิโน ที่เรียงกันด้วยพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ชนิดของโปรตีนที่สำคัญ ได้แก่ ไหม (silk) คอลลาเจน (collagen) เคราติน (keratin) อีลาสติน (elastin) เป็นต้น (เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญและคณะ, 2552)

3) **พอลิเอสเทอร์จากแบคทีเรีย (Bacteria polyesters)** พอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ (polyhydroxyalkanoates: PHAs) คือกลุ่มของพอลิเอสเทอร์แบบสายโซ่ตรง (aliphatic polyester) ผลิตจากแบคทีเรียโดยกระบวนการหมัก (fermentation) ที่ใช้น้ำตาลและลิพิดเป็นสารอาหาร แบคทีเรียจะผลิตและสะสม PHAs ไว้ในเซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน โดยการเปลี่ยนแปลงชนิดของสารอาหารและแบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการผลิตจะทำให้ได้พอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างแตกต่างกันออกไปและมีสมบัติทางกายภาพที่หลากหลาย (Siracusa และคณะ 2008) โดย PHAs ที่พบมากที่สุดในธรรมชาติและเป็นชนิดแรกที่ถูกค้นพบคือ พอลิ-3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต (poly-3-hydroxybutyrate: PHB) ผลิตภัณฑ์ที่ทำจาก PHB มีลักษณะแข็งเปราะ การใช้ประโยชน์ค่อนข้างจำกัด ในการใช้งานนิยมใช้ในรูปของโคพอลิเมอร์ ได้แก่ พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต-วาเลอริต (polyhydroxybutyrate-valerate: PHBV) ส่วนมากนำมาใช้ในงานทางการแพทย์ เช่น วัสดุควบคุมการปลดปล่อยตัวยา ไหมละลาย แผ่นปิดแผล เป็นต้น (Bordes และคณะ, 2009) นอกจากนี้ยังมีการนำมาผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์ชนิดต่างๆ PHAs ถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพในสภาวะแวดล้อมธรรมชาติต่างๆ เช่น ในดิน น้ำจืด น้ำเค็ม ในระบบการทำปุ๋ยหมัก (compost) อัตราการย่อยสลายของ PHAs ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ชนิดของมอนอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ น้ำหนักโมเลกุล เป็นต้น ซึ่งมีรายงานว่าสามารถแยกแบคทีเรียและฟังไจที่ย่อยสลาย PHA จากสิ่งแวดล้อมได้แก่ *Acidovorax faecilis*, *Aspergillus fumigatus*, *Comamonas* sp., *Pseudomonas lemoignei* และ *Variovorax paradoxus* ซึ่งพบในดินส่วน *Alcaligenes faecalis* และ *Pseudomonas* พบในตะกอนน้ำเสียและพบ *Comamonas testosteroni* จากการ

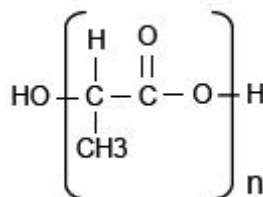
แยกเชื้อในน้ำทะเลและยังพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* AF3 สามารถย่อยสลาย PHA และ PHBV ได้ (Shah และคณะ, 2008)

## 2.2.2 วัสดุชีวภาพจากการสังเคราะห์ (Synthetic polymer)

1) พอลิเมอร์สังเคราะห์จากชีวมวล (Bio-based synthetic polymer) พอลิเมอร์กลุ่มนี้ไม่ได้อยู่ในธรรมชาติแต่สามารถสังเคราะห์ได้ด้วยกระบวนการทางเคมี โดยใช้มอนอเมอร์หรือวัตถุดิบทางชีวภาพที่มีอยู่ในธรรมชาติ พอลิเมอร์สังเคราะห์จากวัตถุดิบทางชีวภาพที่สำคัญได้แก่ พอลิแลคติกแอซิด (Polylactic Acid, PLA) หรือพอลิแลคไทด์ (Polylactide) (ภาพที่ 2.5 และ 2.6) เป็นพอลิเมอร์ที่ได้รับความสนใจมากที่สุด ในประเภทพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ กลุ่มพอลิเอสเทอร์ (เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญและคณะ, 2552) สำหรับการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อการค้าอย่างแพร่หลายในขณะนี้ โดยพอลิเมอร์ชนิดนี้สามารถเตรียมได้จากแหล่งวัตถุดิบที่ปลูกทดแทนใหม่ได้ PLA มีมวลโมเลกุลสูงทำจากวัสดุจากธรรมชาติ เช่น ข้าวโพด หรือแป้ง จากคุณสมบัติที่สามารถย่อยสลายได้ PLA จึงสามารถหมุนเวียนในธรรมชาติซึ่งเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์และกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพ (Li และคณะ, 2008)



ภาพที่ 2.5 กระบวนการผลิต PLA จากแหล่งวัตถุดิบที่สามารถปลูกทดแทนใหม่ได้ (Farrington และคณะ, 2007)



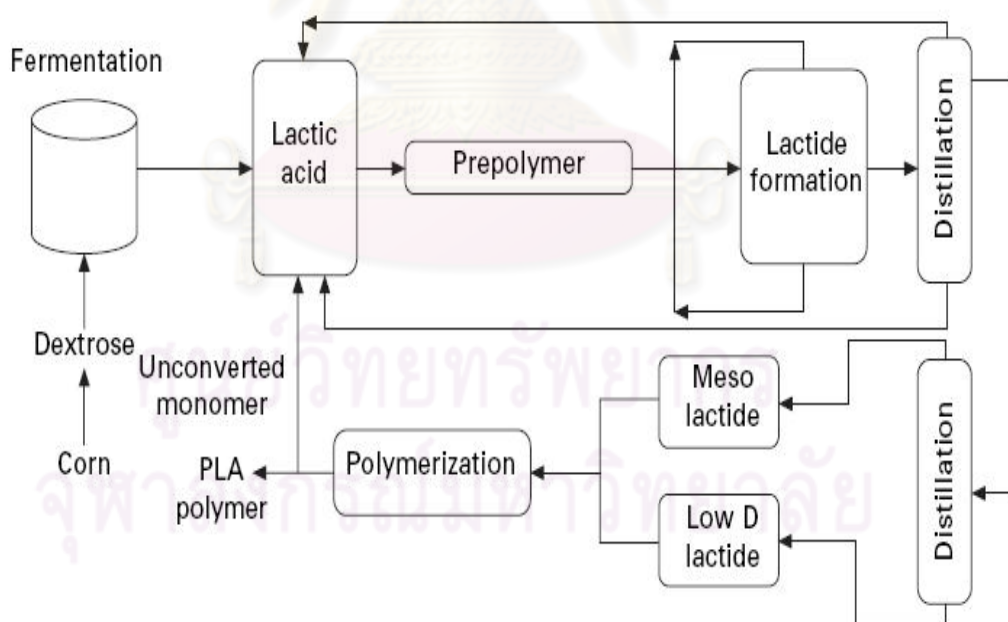
ภาพที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของ PLA (Oliver, 2005)

กรดแลกติกผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีหรือกระบวนการหมัก (fermentation) ซึ่งในปัจจุบันกระบวนการหมักเป็นวิธีการหลักในการผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจาก PLA มีต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูง ดังนั้นการผลิต PLA โดยส่วนมากจะเตรียมจากกระบวนการพอลิเมอไรเซชันโดยการเปิดวง เริ่มจากปฏิกิริยาการควบแน่นแบบต่อเนื่องของกรดแลกติกเพื่อผลิตพรีพอลิแลกติกแอซิดน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low MW PLA prepolymer) จากนั้นพรีพอลิเมอร์จะถูกเปลี่ยนไปเป็นแลคไทด์โดยการเร่งปฏิกิริยาจากสารประกอบดีบุก (tin catalysis) จากนั้นจะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่นภายใต้สุญญากาศ จะได้ PLA โมเลกุลสูงเป็นผลิตภัณฑ์และเนื่องจากกระบวนการผลิตไม่มีการใช้สารละลายอินทรีย์ กระบวนการนี้จึงมีต้นทุนต่ำและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการพอลิเมอไรเซชันแล้วแลคไทด์ที่เหลือจะถูกกลั่นออกมาภายใต้สุญญากาศและนำกลับไปใช้อีกกระบวนการผลิต PLA โดยไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์แสดงดังภาพที่ 2.7

PLA เป็นเทอร์โมพลาสติกมีลักษณะใส มีความแวววาวสูง สามารถขึ้นรูปได้หลากหลายรูปแบบเช่นเดียวกับพอลิเมอร์พื้นฐานทั่วไป มีการนำไปใช้ประโยชน์ในหลายด้าน ในทางการแพทย์ ใช้ทำอุปกรณ์ยึดจับกระดูกและเนื้อเยื่อ ไหมละลาย เป็นต้น มีการนำไปใช้ในการผลิตบรรจุภัณฑ์ต่างๆเช่น ขวดน้ำ ถ้วยโยเกิร์ต อุปกรณ์สำหรับรับประทานอาหารแบบใช้ครั้งเดียวทิ้ง ถูเก็บเศษใบไม้และขยะชีวภาพ นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในงานสิ่งทอและเส้นใย เช่น เสื้อผ้า พรหมผ้าเช็ดตัว เป็นต้น (Lim และคณะ, 2008)

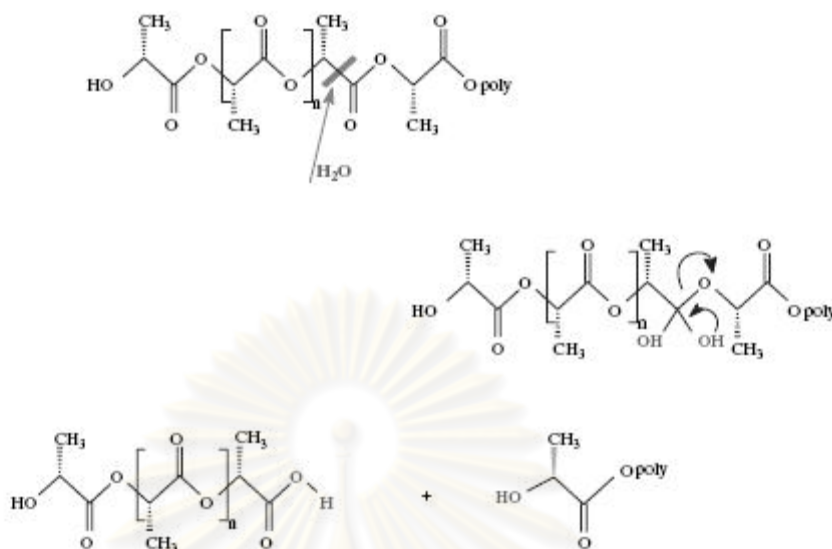
PLA ย่อยสลายได้ทางชีวภาพภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิและความชื้นสูง ตัวอย่างเช่นสภาวะของโรงหมักปุ๋ยอินทรีย์ (compost) โดยทั่วไปในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส PLA จะย่อยสลายได้ไม่ดี เนื่องจาก PLA มีอุณหภูมิการทรานซิชัน (Glass Transition Temperature) ใกล้เคียง 60 องศาเซลเซียส (Gupta และคณะ, 2007) การย่อยสลายของ PLA แบ่งออกเป็น 2 ระยะ โดยในระยะแรกการย่อยสลายเกิดโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (ภาพที่ 2.8) ซึ่งเกิดที่พันธะ

เอสเทอร์ของพอลิเมอร์ทำให้โมเลกุลมีขนาดเล็กลง หลังจากนั้นจึงถูกย่อยสลายต่อโดยการทำงานของจุลินทรีย์ (Farrington และคณะ, 2007; Fukushima และคณะ, 2009) การย่อยสลายด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิสเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการกำหนดอัตราเร็วในการย่อยสลายพอลิเมอร์ โดย PLA จะถูกย่อยสลายไปเป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้และกรดแลคติกโดยมีปัจจัยที่สำคัญคือ อุณหภูมิและความชื้น สารประกอบและกรดแลคติกที่ได้จะถูกย่อยต่อไปโดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยการ metabolism อย่างรวดเร็วไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และมวลชีวภาพ (Fukushima และคณะ, 2009; Nolan-ITU Pty Ltd., 2002; Oliver, 2005) Shah และคณะ 2008 ได้รายงานว่ายูนิทรีย์ที่ย่อยสลาย PLA ได้แก่ *Fusarium moniliforme*, *Penicillium roquefort*, *Amycolatopsis sp.*, *Bacillus brevis*, *Rhizopus delemere* ซึ่งอัตราไฮโดรไลซิสของ PLA ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น ความเป็นกรดต่างของสภาวะและยังขึ้นอยู่กับสมบัติบางประการของพอลิเมอร์ด้วย เช่น น้ำหนักโมเลกุล ระดับความเป็นผลึก ขนาดและรูปร่างของวัสดุที่ผลิตจากพอลิเมอร์ เป็นต้น (Anderson และ Shive, 1997)



ภาพที่ 2.7 กระบวนการผลิต PLA โดยไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (Farrington และคณะ, 2007)





ภาพที่ 2.8 การย่อยสลายพอลิแลคติกแอซิดด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส (Siracusa และคณะ, 2008 )

## 2) พอลิเมอร์สังเคราะห์จากปิโตรเลียม (Petroleum-based synthetic polymer)

พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์จากวัตถุดิบทางปิโตรเคมีเป็นพอลิเมอร์ที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพแต่ความจริงแล้วคุณสมบัติการย่อยสลายทางชีวภาพของวัสดุไม่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตแต่ขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมี ในปัจจุบันมีการพัฒนาพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่สังเคราะห์จากผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมีขึ้นมาหลายชนิด อาจแบ่งเป็นกลุ่มได้ดังนี้

- พอลิเอสเตอร์แบบสายโซ่ตรง (aliphatic polyester) เป็นพอลิเอสเตอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เนื่องจากโครงสร้างของพอลิเมอร์มีพันธะเอสเตอร์ซึ่งเป็นพันธะที่เกิดจากการไฮโดรไลซิสได้ง่ายอยู่บนสายโซ่หลัก โดยทั่วไปกลไกการย่อยสลายจะเริ่มต้นด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่พันธะเอสเตอร์ ทำให้พอลิเมอร์มีขนาดเล็กลง หลังจากนั้นโมเลกุลที่เล็กลงจึงถูกการย่อยสลายผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิต อัตราการย่อยสลายของพอลิเอสเตอร์ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและโครงสร้างทางเคมีของพอลิเอสเตอร์ จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงได้รับความสนใจในการพัฒนาเพื่อนำมาใช้งานทางด้านวัสดุทางการแพทย์และวัสดุที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม



ตัวอย่างของพอลิเอสเทอร์แบบสายโซ่ตรงที่ผลิตจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมี เช่น พอลิไกลโคลิกแอซิด (polyglycolic acid: PGA) พอล리카โพรแลกโตน (polycaprolactone: PCL) พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (polybutylene succinate: PSB) พอลิบิวทิลีนซัคซิเนตอะดิเปต (polybutylene succinate adipate: PBSA) (Bodes และคณะ, 2009)

- พอลิเอสเทอร์แบบสายโซ่ตรงที่มีวงแหวนอะโรมาติกในโครงสร้าง (aliphatic aromatic copolyester: AAC) อะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์หรือพอลิเอสเทอร์แบบสายโซ่ตรงเป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพแต่มีคุณสมบัติเชิงกลบางประการที่จำกัดการนำไปใช้ประโยชน์ในงานด้านต่างๆ ในขณะที่อะโรมาติกพอลิเอสเทอร์หรือพอลิเอสเทอร์ของวงแหวนอะโรมาติกมีสมบัติทางกายภาพและเชิงกลดีเยี่ยม เหมาะกับการใช้งานที่หลากหลายด้านวัสดุศาสตร์แต่ไม่สามารถย่อยสลายได้ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาโคพอลิเมอร์ที่ผลิตขึ้นโดยการสังเคราะห์รวมกันของพอลิเอสเทอร์แบบสายโซ่ตรงและพอลิเอสเทอร์ของวงแหวนอะโรมาติกเพื่อรวมคุณสมบัติที่ดีของทั้งสองไว้ด้วยกัน AAC ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ โดยการย่อยสลายเริ่มจากการไฮโดรไลซิสของพันธะเอสเทอร์โดยเฉพาะในส่วนหนึ่งของโครงสร้างแบบสายโซ่ตรง อัตราเร็วของการย่อยสลายจะลดลงเมื่อสัดส่วนของวงแหวนอะโรมาติกในพอลิเมอร์มีปริมาณสูงขึ้น นอกจากนี้ อัตราการย่อยสลายของพอลิเมอร์ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ เช่น ความชื้น อุณหภูมิ พื้นที่ผิวและกระบวนการที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ (Shah และคณะ, 2008)

- พอลิเมอร์สลายได้ทางชีวภาพประเภทอื่นๆ แม้ว่าพอลิเอสเทอร์จะเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่มีศักยภาพสูงแต่ก็มีการพัฒนาพอลิเมอร์ประเภทอื่นๆ ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างออกไป ได้แก่ พอลิเอสเทอร์เอไมด์ (polyester amide) พอลิยูรีเทน (polyurethane) พอลิแอนไฮไดรด์ (polyanhydride) เป็นต้น (เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญและคณะ, 2552)

### 2.3 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ

ในกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพจนกลายเป็นฮิวมัสในดินนั้นต้องอาศัยปัจจัยต่างๆ ทั้งทางกายภาพ เคมี สิ่งแวดล้อม ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ (Shah และคณะ, 2008)

### 2.3.1. อุณหภูมิ (Temperature)

บริเวณที่มีอุณหภูมิสูงย่อมมีอัตราการสลายตัวของเศษพืชหรือซากสัตว์ได้เร็วกว่าในบริเวณที่มีอุณหภูมิต่ำ ถ้าอุณหภูมิต่ำอินทรีย์วัตถุมีการสะสมในดินมาก แต่ถ้าอุณหภูมิสูงการสลายตัวเร็วยิ่งขึ้น การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิจนถึงระดับหนึ่งส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาในจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนั้นอุณหภูมิมีผลต่อโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์ในวิถีเมแทบอลิซึมต่างๆของจุลินทรีย์ ดังนั้น การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิที่สูงเกินไปจึงมีผลเสียต่อความเสถียรของโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์

### 2.3.2. ความชื้น (Soil moisture)

ความชื้นเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการย่อยสลายทางชีวภาพของอินทรีย์วัตถุ เนื่องจากมีผลต่อการเจริญและวิถีเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ การกระจายตัวและการละลายน้ำของก๊าซในดินย่อมต้องการความชื้นทั้งสิ้น สภาพความชื้นค่อนข้างเปียก มีสภาพในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุดีกว่าความชื้นที่มีสภาพความชื้นสนาม พื้นที่ ๆ มีความแห้งแล้งและสภาพการขาดออกซิเจนทำให้การเจริญเติบโตและกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินลดลง ดินที่มีการระบายน้ำดีและมีพืชพรรณเจริญเติบโต มีปริมาณฮิวมัสสูง เพราะสภาพเช่นนี้ทำให้เกิดดินอินทรีย์ขึ้น โดยปกติความชื้นที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการย่อยสลายของพีสนั้นควรอยู่ในช่วงร้อยละ 50-60 ถ้าความชื้นมากหรือน้อยกว่านี้ อาจทำให้จุลินทรีย์บางชนิดหยุดซังกหรือตายได้ อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ในดินที่แตกต่างกันย่อมต้องการปริมาณความชื้นที่เหมาะสมแตกต่างกันด้วย

### 2.3.3. ปริมาณธาตุอาหาร (Nutrients)

ธาตุอาหารเป็นสิ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ สารอาหารที่จำเป็นได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส การขาดธาตุอาหารโดยเฉพาะไนโตรเจน มีผลทำให้การเจริญเติบโตของพืชลดลงมากกว่าการดำเนินกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดิน จุลินทรีย์สามารถดูดซึมสารอาหารจากสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติมาใช้ในการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนทั้งนี้เพราะจุลินทรีย์จะใช้อินทรีย์วัตถุที่สลายตัวแล้ว ซึ่งมีธาตุอาหารอยู่ไปใช้เพื่อดำเนินกิจกรรมของจุลินทรีย์ต่อไป สำหรับสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อน จุลินทรีย์อาจนำสารเหล่านั้นมาใช้เป็นอาหารได้ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของประกอบและโครงสร้างของสารปนเปื้อนนั่น

### 2.3.4. ความเป็นกรดต่าง (pH)

ความเป็นกรดต่างมีผลต่อการดูดซึมอาหารและการเจริญของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในสิ่งแวดล้อม โดยปกติจุลินทรีย์ในดินเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ pH 6-8 แต่สามารถอยู่ในสภาพที่เป็นกรดได้เมื่อ pH ต่ำกว่า 4-5 และทนสภาพที่เป็นด่างได้เมื่อ pH 8.5 ดินที่เป็นกรดจัดมีผลทำให้จุลินทรีย์ดินชะงักการเจริญเติบโต มากกว่าดินที่เป็นด่างจัด พีชจะทนการเปลี่ยนแปลงของ pH อย่างรวดเร็วมากกว่าจุลินทรีย์ ดังนั้นในกิจกรรมย่อยสลายอินทรีย์วัตถุที่ทำปุ๋ยหมักจึงต้องเติมปูนลงไปเพื่อปรับสภาพ pH ที่เป็นกรดให้เป็นกลางส่งผลให้การย่อยสลายของปุ๋ยหมักเร็วขึ้น

### 2.3.5. เนื้อดิน (Soil texture)

ดินที่มีปริมาณเคลย์มากจะมีฮิวมัสมากกว่าดินประเภทอื่น เมื่ออยู่สภาพแวดล้อมเดียวกัน ฮิวมัสเหล่านี้จะดูดอนุมูลของสารต่าง ๆ ที่มีอนุมูล = O - OH , - Al-OH , - Fe-OH และประจุบวกที่แลกเปลี่ยนได้รวมทั้ง  $-NH_3^+$  - SH , -OH และ -COOH

ลำดับการย่อยสลายของสารประกอบอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ดำเนินไปดังนี้

ตารางที่ 2.1 ลำดับการย่อยสลายของสารประกอบอินทรีย์ชนิดต่างๆ

|  |   |
|--|---|
| 1. น้ำตาล แป้ง และโปรตีนที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน | <p>อัตราการย่อยสลายเร็ว</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>อัตราการย่อยสลายช้า</p> |
| 2. โปรตีนที่มีโครงสร้างซับซ้อน                   |   |
| 3. เฮมิเซลลูโลส                                  |   |
| 4. เซลลูโลส                                      |   |
| 5. ไขมัน ขี้ผึ้ง ฯลฯ                             |   |
| 6. ลิกนิน  |   |

### 2.3.6. การถ่ายเทอากาศ (Aeration)

ในสภาพที่มีการถ่ายเทอากาศดีหรือมีปริมาณออกซิเจนมีผลทำให้กิจกรรมย่อยสลายอินทรีย์วัตถุได้ดีกว่าในสภาพที่ขาดออกซิเจน เช่น การย่อยสลายของฟางข้าวในสภาพที่มีอากาศจะสลายตัวได้เร็วกว่าในสภาพที่มีน้ำขัง หรือสภาพที่ขาดอากาศ

### 2.3.7. จุลินทรีย์ในดิน (Soil microorganism)

จุลินทรีย์เป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดของกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ บทบาทของจุลินทรีย์ดินที่มีกิจกรรมเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน กระบวนการนี้อาศัยเอนไซม์ในจุลินทรีย์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ จุลินทรีย์ที่ต่างชนิดกันจะมีการสร้างเอนไซม์ที่มีลักษณะแตกต่างกัน ชนิดของเอนไซม์มีผลต่อประเภทของปฏิกิริยาการย่อยสลายและมีผลต่อวิถีเมแทบอลิซึม จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายจัดอยู่ในจำพวกเฮเทอโรโทรฟิก (heterotrophic microorganism) เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องใช้พลังงานจากออกซิเดชันสารประกอบอินทรีย์และใช้คาร์บอนในการสร้างสารประกอบที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์จากสารประกอบอินทรีย์ จุลินทรีย์เหล่านั้นได้แก่ แบคทีเรีย รา สาหร่าย เป็นต้น ซึ่งจะกล่าวในหัวข้อถัดไป (มัทชนิย์ เศรษฐภักดี, (ม.ป.ป.); อลิสซา วังใน, 2553; Shah และคณะ, 2008)

## 2.4 ชนิดของจุลินทรีย์ในดินและเทคโนโลยีการติดตามจุลินทรีย์

### 2.4.1 ชนิดของจุลินทรีย์ในดิน

ดินเป็นแหล่งของสิ่งมีชีวิตรวมทั้งจุลินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา สาหร่าย และโพรทิสต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในดินที่มีสารอินทรีย์สูงจะทำให้มีจำนวนของจุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรฟิกสูงด้วยจุลินทรีย์ในดินจะอยู่ในสภาพที่อดอยากและมีอัตราการสืบพันธุ์ที่ต่ำ การศึกษาโดยการวัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปล่อยออกมาโดยจุลินทรีย์จนกระทั่งมีการเติมสารอาหารเข้าไปในดินพวกจุลินทรีย์จะมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วจนกว่าสารอาหารจะหมดลง และหลังจากนั้นอัตราการเกิดกิจกรรมของจุลินทรีย์จะลดลงเพราะเข้าสู่สภาพที่อดอยากเหมือนเดิม จุลินทรีย์ในดินทำหน้าที่ย่อยสลายพวกซากพืชซากสัตว์ต่างๆทำให้เกิดการหมุนเวียนของแร่ธาตุและสารอาหาร (สุบัญญัติ นิมิตรณ์, 2549)

ปริมาณของจุลินทรีย์แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหรือปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดและปริมาณของสารอาหาร ความชื้นในดิน การระบายอากาศ อุณหภูมิ pH

- **แบคทีเรีย** เป็นจุลินทรีย์ที่มีมากที่สุดทั้งชนิดและจำนวน พบมากที่ผิวดินโดยแบคทีเรียในดินมักจะยึดเกาะกับอนุภาคของดินเพราะในอนุภาคของดินมีทั้งประจุบวกและลบ ดังนั้นเซลล์แบคทีเรียที่มีประจุลบก็จะเกาะกับอนุภาคดินได้ จากการนับโดยตรงด้วยกล้อง

จุลทรรศน์อาจพบแบคทีเรียมากเป็นพันล้านเซลล์ต่อดินหนึ่งกรัม แต่การนับจากจานเพาะเชื้อของตัวอย่างเดียวกัน จะเหลือประมาณสิบล้านเซลล์ ทั้งนี้เนื่องจากดินมีแบคทีเรียมากมายซึ่งมีความต้องการสารอาหารและสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตแตกต่างกันมาก ดังนั้นจึงไม่สามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญได้ทุกชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จัดเตรียมขึ้น นอกจากนี้จำนวนแบคทีเรียขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น จำนวนอินทรียสารในดินเพราะแบคทีเรียต้องใช้ในการเจริญ แบคทีเรียในดินมีทั้งออโตโทรฟ เฮเทอโรโทรฟ มีโซโทรฟ เทอร์โมไฟล์ ไสโครไฟล์ แอโรบ แอนแอโรบ บางพวกย่อยสลายเซลล์ลูไลส บางพวกย่อยสลายโปรตีน บางชนิดย่อยสลายซัลเฟอร์หรือตรึงไนโตรเจนได้ แบคทีเรียที่พบในดิน ได้แก่ *Pseudomonas*, *Thiobacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Acinetobacter*, *Cellulomonas*, *Brevibacterium*, *Bacillus* นอกจากนี้ยังพบ *Actinomycetes* ซึ่งชนิดที่สำคัญ คือ *Nocardia*, *Streptomyces*, *Micromonospora*

Tomita และคณะ (2003) รายงานว่า *Bacillus stearothermophilus* มีคุณสมบัติสามารถย่อยสลายพอลิแลคติกแอซิดชนิดฟิล์มที่ 60 องศาเซลเซียส ในปีถัดมา Tomita และคณะ(2004) ทำการศึกษาการย่อยสลายพอลิแลคติกแอซิดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและทำการแยกเชื้อจากดินที่สามารถย่อยสลายพอลิแลคติกแอซิดได้ พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Geobacillus thermocatenulatus* ซึ่งเจริญในภาวะอุณหภูมิสูงและย่อยสลายพอลิแลคติกได้ดีที่สุด Ikura และ Kudo (1999) สามารถแยกเชื้อ actinomycetes ในการศึกษาการย่อยสลายพอลิแลคติกแอซิดชนิดฟิล์มโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 43 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวความเข้มข้นต่ำ ส่วน Tokiwa และ Jarerat (2004) รายงานว่า actinomycetes มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายพอลิแลคติกแอซิด Fukushima และคณะ(2009) ศึกษาการย่อยสลายพอลิแลคติก-แอซิดโดยจุลินทรีย์พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* สามารถย่อยสลายพอลิแลคติกแอซิดได้ โดยพบแบคทีเรียชนิดนี้ในดินเหนียวซึ่งการย่อยสลายขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของวัสดุและการกระจายตัวของแบคทีเรียที่เกาะอยู่ในดิน

- รา พบในดินมีจำนวนมากพบมากที่ผิวดินซึ่งมีอากาศ พบทั้งสภาพที่มีไม่ซีเลียมและสปอร์จำนวนของรามีประมาณแสนต่อดินหนึ่งกรัม รามีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ เช่น เซลลูโลส ลิกนิน เพกทิน ได้ดี และยังสามารถเปลี่ยนคาร์บอนจากสารอินทรีย์ในดินให้เป็นองค์ประกอบของเซลล์ได้ นอกจากนี้ร่ายังเจริญได้ดีในดินที่เป็นกรด ราจึงช่วยปรับปรุงโครงสร้างของดิน โดยการที่เส้นใยไม่ซีเลียมจะสานเป็นตาข่ายยึดอนุภาคดินไว้เป็นกลุ่มก้อนทำให้



ไม่ละลายน้ำไปเรียกว่า “ครัมเบิลสตรัคเจอร์ (crumble structure)” ราที่พบมาก ได้แก่ *Aspergillus, Rhizopus, Mucor, Cladosporium, Fusarium* เป็นต้น

- **สาหร่าย** สามารถพบได้ในดินทั่วไปแม้แต่ในดินที่แห้งแล้งมาก เช่น ทะเลทราย จำนวนของสาหร่ายในดินมีน้อยกว่าแบคทีเรียและรา สาหร่ายที่พบส่วนใหญ่เป็นสาหร่ายสีเขียว เช่น พวก *Chlamydomonas, Chlorococcum* และไดอะตอม ในดินที่อุดมสมบูรณ์ กิจกรรมทางชีวเคมีของสาหร่ายจะลดลง เพราะถูกแย่งอาหารโดยแบคทีเรียและรา เนื่องจากสาหร่ายเป็นพวกที่สังเคราะห์แสง จึงพบมากที่ผิวดินหรือใต้ผิวดินเล็กน้อย ผลจากการสังเคราะห์แสงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงและแทนที่ (succession) โดยสาหร่ายบางชนิดสามารถเจริญเกาะอยู่บนหินได้ เมื่อสาหร่ายเจริญขึ้นมากๆ สังเคราะห์แสงได้สารอินทรีย์และพวกที่ตายยังทับถมกันอีกกลายเป็นอินทรียสารที่ทำให้แบคทีเรียและราเจริญขึ้นได้ เมื่อจุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญและสร้างสารต่างๆขึ้น เช่น กรดไปยอยสลายหินทำให้แร่ธาตุละลายออกมาอย่างช้าๆ ต่อมาสภาพนั้นเหมาะกับการเจริญของไลเคนส์ มอส และพืชชั้นสูงตามลำดับ นอกจากนี้สาหร่ายบางชนิด เช่น นอสตอก อนุาบีนา ยังช่วยตรึงก๊าซไนโตรเจนจากอากาศให้อยู่ในรูปสารประกอบไนเตรตที่พืชนำไปใช้ได้

- **โพรโทซัว** พบมากในดินเช่นกันโดยจะเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ชนิดที่อาศัยอยู่อย่างอิสระ โพรโทซัวส่วนใหญ่ในดินเป็นพวกมีแฟลกเจลลาและพวกอะมีบาพบมากในดินที่มีอินทรีย์วัตถุสูงและชุ่มชื้น โพรโทซัว ในดินช่วยกินแบคทีเรียบางชนิด จึงเป็นการควบคุมปริมาณแบคทีเรียให้อยู่ในสมดุล (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจและปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547; สุภัณฑิต นิर्मรัตน์, 2549; Maier และคณะ, 2000)

#### 2.4.2 เทคโนโลยีในการติดตามจุลินทรีย์

เนื่องจากการศึกษาเพื่อใช้จุลินทรีย์บำบัดสิ่งแวดล้อม จำเป็นจะต้องมีขั้นตอนติดตามจุลินทรีย์เพื่อให้ทราบว่าจุลินทรีย์ชนิดนั้นสามารถอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมและมีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายทางชีวภาพได้จริง ซึ่งตัวอย่างของดินที่เก็บที่ได้จากสิ่งแวดล้อมมีส่วนประกอบต่างๆ มากมายซึ่งได้แก่ส่วนประกอบที่อยู่ในสถานะของแข็ง ของเหลวและก๊าซ ส่วนประกอบหลักที่อยู่ในดินประกอบด้วยส่วนที่เป็นสารอินทรีย์และสารอินทรีย์ (humic: humic matter) ซึ่งมีปริมาณที่ผูกพันขึ้นอยู่กับแหล่งของดิน สิ่งมีชีวิตในดินซึ่งประกอบไปด้วย จุลินทรีย์ดินจะอาศัยอยู่ในโพรง



ส่วนต่างๆของอนุภาคดิน ซึ่งเป็นสิ่งที่กำหนดความอยู่รอดของจุลินทรีย์ แม้ว่าแบคทีเรียจะเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีรูปแบบและความหลากหลายมากบนโลกแต่ความรู้เกี่ยวกับโครงสร้างของความสัมพันธ์และการเปลี่ยนแปลงของประชากรยังมีอยู่น้อย (หนึ่ง เตียอำรุงและนันทกร บุญเกิด, 2544) การติดตามจุลินทรีย์นั้นสามารถทำได้หลายวิธี วิธีหนึ่งที่นิยมอย่างยิ่งในปัจจุบันคือการใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ซึ่งเป็นวิธีการที่ให้ผลได้ดี เทคนิคดังกล่าวอาศัยหลักการที่ว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งแวดล้อมสามารถใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวน 16s rDNA ซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของแบคทีเรียแต่ละชนิด ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (polymerase chain reaction: PCR) โดยอาศัยปริมาณคู่เบส GC เรียกว่า GC clamp ที่ปลายสาย 5' ของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนขึ้นดีเอ็นเอ เพื่อทำหน้าที่เป็น high melting domain บนสายดีเอ็นเอทำให้ไม่แยกจากกันเป็นสายเดี่ยวเมื่อเคลื่อนที่บนเจล

ดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ดังกล่าวจะถูกนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในเจลที่มีเกรเดียนต์ฟอร์มาไมด์และยูเรีย จะทำให้สายดีเอ็นเอที่ได้แยกออกจากกัน โดยจะแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสต่างกันได้แม้ว่าขนาดความยาวของดีเอ็นเอจะเท่ากัน ซึ่งจะอาศัยความเข้มข้นของสารที่มีคุณสมบัติในการแยกสายดีเอ็นเอ (denaturant) ที่มีสัดส่วนความเข้มข้นของสาร (gradient) จากส่วนบนของเจลที่มีความเข้มข้นน้อยไปสู่ส่วนล่างของเจลซึ่งมีความเข้มข้นมากรวมไปถึงการใช้อุณหภูมิสูงในการทำลายพันธะระหว่างคู่เบส GC ซึ่งเป็นการจับกันโดยใช้พันธะที่เหนียวแน่น ซึ่งความเข้มข้นหรือปริมาณของคู่เบส GC ที่มีในดีเอ็นเอแต่ละคู่ที่แตกต่างกันนี้ทำให้การเคลื่อนที่ในตัวกลางดังที่กล่าวมาข้างต้นแตกต่างกันจึงสามารถมองเห็นรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลต่างกัน ดังนั้น DGGE จึงเป็นเป็นเทคนิคหนึ่งที่สามารถแยกชนิดของสิ่งมีชีวิตที่สนใจได้แม้สิ่งมีชีวิตดังกล่าวจะมีลำดับเบสต่างกันเพียงหนึ่งตำแหน่งก็ตาม

นอกจากนี้ยังสามารถตัดแถบดีเอ็นเอที่สนใจไปทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสเพื่อใช้ศึกษาในระดับที่ลึกลงไปได้คุณภาพของ DGGE ขึ้นอยู่กับคุณภาพของ PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่ต้องการศึกษา โดย PCR ที่ได้เป็นดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ มีขนาดที่เหมาะสม และมีปริมาณเพียงพอ การศึกษาประชาคมแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค DGGE เริ่มขึ้นจากการศึกษาจุลินทรีย์ในดิน ซึ่งสามารถศึกษาแบคทีเรียในตัวอย่างได้โดยตรงเป็นการลดปัญหาจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารในห้องปฏิบัติการได้และสามารถประเมินความหลากหลายของจุลินทรีย์ได้อย่างสมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งเป็นวิธีที่ สะดวก รวดเร็ว และไม่ยุ่งยาก ทำให้นักวิทยาศาสตร์และวิศวกรทางชีวภาพเข้าใจโครงสร้าง ชนิดและปริมาณของแบคทีเรียว่าเป็นอย่างไร มากหรือ

น้อยต่างกันในระดับอนุวิทยา ทั้งยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ หรือตรวจสอบความหลากหลายของประชาคมแบคทีเรียที่มีอยู่ในธรรมชาติ น้ำเสียหรือของเสียทางอุตสาหกรรมและการเกษตรรวมไปถึงทางการแพทย์ด้วยและสามารถคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่สนใจไปทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสเพื่อใช้ศึกษาในระดับที่ลึกลงไปได้ (Muyzer และคณะ, 1993) เทคนิค DGGE สามารถใช้ติดตามจุลินทรีย์ทุกประเภทเช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ รวมทั้งไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีการประยุกต์ใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวยังสามารถใช้ติดตามประชาคมจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น การกลายพันธุ์ของยีนในทางการแพทย์ จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักต่างๆ จุลินทรีย์ในอาหาร เป็นต้น วิธีดังกล่าวจึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งกับงานวิจัยในสาขาต่างๆ (ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2548)

## 2.5 วัฏจักรของธาตุที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์

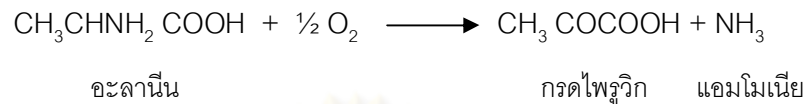
การย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ด้วยจุลินทรีย์เป็นการเปลี่ยนรูปของบรรจุภัณฑ์ให้กลายเป็นสารอาหารที่จุลินทรีย์เอาไปใช้ได้ ในขณะที่บางส่วนกลายเป็นธาตุหมุนเวียนไปในวัฏจักรแร่ธาตุซึ่งมีวัฏจักรที่สำคัญดังต่อไปนี้

### 2.5.1 วัฏจักรไนโตรเจนเนื่องจากจุลินทรีย์ในดิน

วัฏจักรไนโตรเจนเป็นการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่ก๊าซไนโตรเจนจนเป็นสารอินทรีย์และสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่ซับซ้อนในเนื้อเยื่อของพืชสัตว์และจุลินทรีย์และการย่อยสลายกลับไปเป็นก๊าซไนโตรเจนอีก กระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนได้แก่

1) การย่อยสลายโปรตีน (Proteolysis) การย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก ที่อยู่ในซากพืชซากสัตว์ด้วยเอนไซม์ ทำให้โมเลกุลเล็กลง ผลที่ได้จากการย่อยจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรียและสภาพแวดล้อมในการย่อย ถ้าอยู่ในสภาพมีออกซิเจนจะได้กรดอะมิโนหรืออาจจะย่อยจนได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำและแอมโมเนียมซัลเฟต ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ถ้าย่อยในสภาพไม่มีออกซิเจนจะได้กรดอินทรีย์ (organic acid) แอมโมเนีย (ammonia, NH<sub>3</sub>) เอมีน (amine) แอลกอฮอล์ (alcohol) อินโดล (indole) สเคโตล (skatol) เมอร์แคปแทน (mercaptan) ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide, H<sub>2</sub>S) มีเทน (methane, CH<sub>4</sub>) เป็นต้น

2) การย่อยสลายกรดอะมิโน (ammonification) กรดอะมิโนซึ่งได้จากการย่อยโปรตีนจะถูกจุลินทรีย์ในดินใช้เป็นอาหาร โดยกรดอะมิโนจะถูกจุลินทรีย์ย่อยสลายตั้งหมู่อะมิโนออกจากโครงสร้างของกรดอะมิโน โดยวิธีดีอะมิเนชัน (deamination) ได้แอมโมเนีย (NH<sub>3</sub>)



ปฏิกิริยานี้จัดเป็นออกซิเดทีฟดีอะมิเนชัน (oxidative deamination) และได้แอมโมเนียเกิดขึ้นจึงเรียกปฏิกิริยานี้ว่า “แอมมอนิฟิเคชัน (ammonification)” แอมโมเนียที่เกิดขึ้นอาจจะหายจากดิน หรือถ้าละลายน้ำกลายเป็น NH<sub>4</sub><sup>+</sup> หรืออาจถูกพืชหรือจุลินทรีย์นำไปใช้และอาจเปลี่ยนต่อไปเป็นไนเตรต (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)

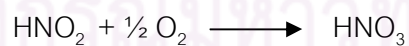
3) ไนตริฟิเคชัน (nitrification) จุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนแอมโมเนียให้เป็นไนเตรต โดยอาศัยแบคทีเรียแกรมลบพวกเคโมลิโโทรฟ ซึ่งใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนและได้พลังงานจากระบวนการออกซิเดชันแอมโมเนียหรือไนไตรต์ (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ 2 ขั้นตอน คือ

- กระบวนการออกซิเดชันแอมโมเนียเป็นไนไตรต์ (nitrosification) เกิดดังนี้



ซึ่งเกิดจากการกระทำของแบคทีเรียจำพวกออกซิไดซ์แอมโมเนีย (ammonia oxidizing bacteria) ได้แก่ *Nitrosomonas*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosococcus*

- กระบวนการออกซิเดชันไนไตรต์เป็นไนเตรต (nitrification) เกิดดังนี้

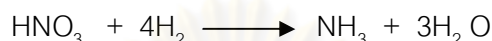


เกิดโดยแบคทีเรียจำพวกออกซิไดซ์ไนไตรต์ (nitrite oxidizing bacteria) ได้แก่ *Nitrobacter*, *Nitrospina* และรา เช่น *Aspergillus*, *Penicillium* กระบวนการไนตริฟิเคชันจะเกิดได้ดีในที่มีออกซิเจนหรือที่มีการถ่ายเทอากาศ

#### 4) การรีดิวส์ไนเตรตกลับเป็นแอมโมเนีย (reduction of nitrate to ammonia)

เกิดจากการกระทำของแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรฟหลายชนิดที่เปลี่ยนไนเตรตกลับเป็นไนไตรต์หรือแอมโมเนีย กระบวนการนี้เกิดในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ออกซิเจนที่อยู่ในไนเตรตจะเป็นตัวรับอิเล็กตรอนและไฮโดรเจน

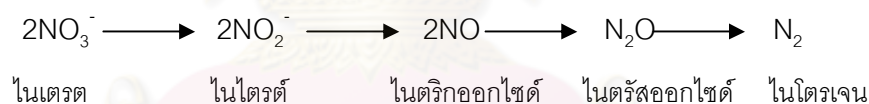
ปฏิกิริยาการรีดิวส์เป็นแอมโมเนีย เกิดดังนี้



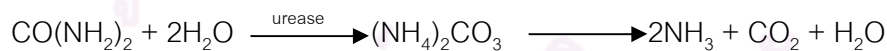
ปฏิกิริยานี้เกิดโดยจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Candida* เป็นต้น

#### 5) ดีไนตริฟิเคชัน (denitrification) เป็นการเปลี่ยนแปลงไนเตรตเป็นก๊าซไนโตรเจน

หรือไนตรัสออกไซด์ ( $\text{N}_2\text{O}$ ) โดยดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (denitrifying bacteria) ซึ่งได้แก่ *Thiobacillus denitrificans*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus* เป็นต้น กระบวนการนี้ทำให้ดินสูญเสียธาตุไนโตรเจนไป การเปลี่ยนแปลงกระบวนการดีไนตริฟิเคชันเป็นดังนี้ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจและปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547)



แหล่งไนโตรเจนที่เติมเข้าไปในดินและสิ่งมีชีวิตสามารถนำไปใช้ประโยชน์ เช่น ปุ๋ยยูเรีย เป็นปุ๋ยเดี่ยวไนโตรเจนชนิดแข็งที่มีปริมาณไนโตรเจนมากที่สุด คือมีไนโตรเจนทั้งหมด 46% ยูเรียเมื่อละลายน้ำทำให้ยูเรียละลายอย่างรวดเร็วได้แอมโมเนียมคาร์บอเนต ดังสมการ



แอมโมเนียมคาร์บอเนตถูกจุลินทรีย์ย่อยเป็นไอออนของแอมโมเนียม ( $\text{NH}_4^+$ ) และไนเตรต ( $\text{NO}_3^-$ ) ซึ่งอยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้แต่รูปของแอมโมเนียมคาร์บอเนตไม่คงรูปอยู่ตลอดไป เพราะถ้า pH สูงกว่า 7 จะปลดปล่อยก๊าซแอมโมเนีย ( $\text{NH}_3$ ) (มัณฑนีย์ เศรษฐฐฎกดี, (ม.ป.ป.); ยงยุทธ โสสถสภา, 2553)

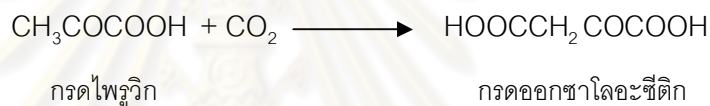
## 2.5.2 วัฏจักรคาร์บอนเนื่องจากจุลินทรีย์ในดิน

แหล่งของสารประกอบคาร์บอนในธรรมชาติคือก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่พืชสังเคราะห์ด้วยแสงโดยพืชสีเขียว สาหร่าย โดยวิธีสังเคราะห์แสงให้กลายเป็นสารอินทรีย์ ส่วนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากแบคทีเรีย คือ

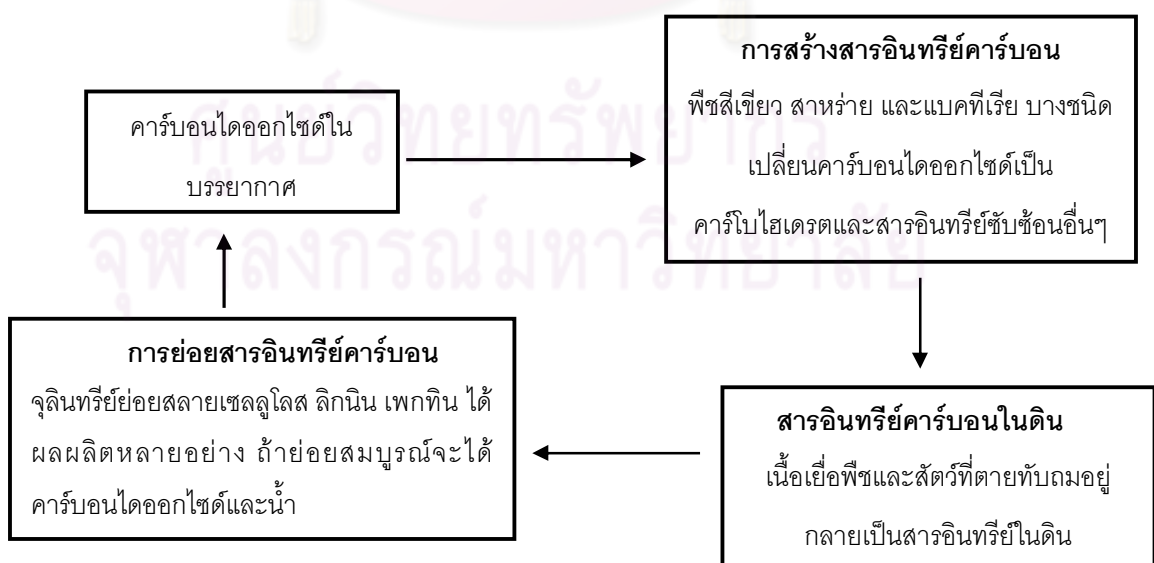
- การที่ออกโตโทรฟิคมแบคทีเรียใช้คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเปลี่ยนเป็นคาร์โบไฮเดรต ดังสมการ



- การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์โดยเฮเทอโรโทรฟิคมแบคทีเรีย



สารอินทรีย์คาร์บอนที่เกิดขึ้นจะถูกนำมาใช้ในกระบวนการหายใจให้ได้พลังงานและคาร์บอนไดออกไซด์หรืออาจใช้สร้างเนื้อเยื่อของพืชของสัตว์หรือของจุลินทรีย์เอง ซึ่งเมื่อสิ่งมีชีวิตตายลงจะถูกจุลินทรีย์ย่อยสลายเนื้อเยื่อเหล่านั้นทำให้ได้คาร์บอนไดออกไซด์กลับคืนสู่บรรยากาศเพื่อใช้เป็นอาหารของพืชต่อไป ดังแสดงดังภาพที่ 2.9



ภาพที่ 2.9 ไคอะแกรมของวัฏจักรคาร์บอน



สารอินทรีย์คาร์บอนที่อยู่ในเนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่เป็นเซลลูโลส (cellulose) ลิกนิน (lignin) เพกทิน (pectin) แป้ง (starch) และน้ำตาลต่างๆ การย่อยสลายต้องอาศัยเอนไซม์หลายชนิดทั้งแบบที่เรียและรา เช่น การย่อยเซลลูโลส



สารอื่นๆที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อพืช เช่น เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ลิกนิน เพกทิน ก็อาจถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ต่างๆ ได้เช่นเดียวกัน (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจและปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547) เซลลูโลสมีขนาดใหญ่และไม่ละลายน้ำการนำเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์จึงต้องอาศัย extracellular enzyme ย่อยเซลลูโลสให้มีขนาดโมเลกุลเล็กก่อนนำเข้าสู่เซลล์ เอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลสสองชนิดแรกได้แก่  $\beta$ -1,4- endoglucanase และ  $\beta$ -1,4- exoglucanase โดยที่ทั้งคู่เป็น extracellular enzyme ซึ่ง endoglucanase ย่อยโมเลกุลเซลลูโลสแบบสุ่มเกิดเป็นเซลลูโลสที่มีขนาดเล็กบางส่วน exoglucanase ย่อยกลูโคส 2 โมเลกุล เอนไซม์ชนิดที่สาม ได้แก่  $\beta$ -glucosidase หรือ cellobiase ซึ่งเป็นทั้ง extra และ intracellular enzyme โดยทำหน้าที่ย่อยเซลโลไบโอสไปเป็นกลูโคสซึ่งสามารถดูดซึมได้โดยแบคทีเรียและรา (วีรานูช หลาง, 2553) ซึ่งได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเป็นผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ยังอาจได้จากกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) ของกรดอะมิโน หรือจะได้จากกระบวนการย่อยสลายของกรดไขมัน และกระบวนการเหล่านี้เกิดขึ้นในดิน (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจและปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547)

## 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ธนาวดี ลีจากภัย และคณะ (2548) ศึกษาอัตราการย่อยสลายของวัสดุพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ คือ เซลลูโลส เทอร์โมพลาสติกสตาเร็กซ์ พอลิแลคติกแอซิดและพอลิเอทิลีน โดยจุลินทรีย์แบบใช้ออกซิเจนในภาชนะปิดภายใต้ภาวะหมักที่มีการควบคุมสภาวะทดสอบไว้ที่  $58 \pm 2$  องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิในการทดสอบการย่อยสลายตามมาตรฐาน ASTM ค่าความเป็นกรดต่างของดิน



6-8 และความชื้น 50-55 % ในระยะเวลา 90 วัน ดินที่ใช้ในการทดสอบ 600 กรัมผสมกับวัสดุทดสอบ 10 กรัมซึ่งวัสดุทดสอบถูกตัดให้มีขนาด  $2 \times 2$  ซม<sup>2</sup>. ทำการวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง คำนวณอัตราการย่อยสลายจากระบบการย่อยสลายทางชีวภาพ และเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายทางชีวภาพของวัตถุพอลิเมอร์ พบว่าการย่อยสลายเซลลูโลส เทอร์โมพลาสติกสตาร์ช และโพลิแลคติกแอซิด เกิดการย่อยสลายทางชีวภาพได้ 6, 34 และ 24 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับและพอลิเอทิลีนไม่เกิดการย่อยสลายภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดลองเดียวกัน

Iovino และคณะ (2007) ศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของ polylactic acid (PLA) thermoplastic starch (TPS) และกาบมะพร้าวเป็นส่วนผสมของเส้นใยภายใต้สภาวะมีอากาศ โดยใช้วิธีทดสอบตามมาตรฐาน อุณหภูมิ  $58 \pm 2$  องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง 90 วัน หลังจากระบบการย่อยสลายพบว่า การย่อยสลายทางชีวภาพของ TPS มีการอัตราการย่อยสลายสูงกว่า PLA และการเพิ่มของเปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์ของ TPS ก็มากกว่า PLA เมื่อผสมเส้นใยจากกาบมะพร้าวเข้ากับ PLA และ TPS พบว่าปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ไม่แตกต่างกันนอกจากนั้นผลของการศึกษายังยืนยันจากการทดสอบโดย scanning electron microscopy (SEM) สามารถเห็นโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไปของวัสดุทดสอบตามระยะเวลาการย่อยสลายที่เพิ่มขึ้น

Ho และ Pometto (1999) ศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพโดยให้ระบบการหายใจมาวิเคราะห์ฟิล์มพลาสติก PLA ในดินภายใต้การควบคุมในห้องปฏิบัติการ การทดลองใช้ดินผสม 200 กรัม และพลาสติก 1.5 กรัม ตัดให้มีขนาด  $1 \times 1$  ซม<sup>2</sup>. ทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 28, 40 และ 55°C ระยะเวลาการทดลอง 182 วัน พบว่าระดับของการย่อยสลายซึ่งได้จากการเพิ่มขึ้นของการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากระบบการหายใจ อัตราการย่อยสลายของสารอินทรีย์มีค่าเท่ากับ 24.3, 41.5 และ 76.9 มิลลิกรัมต่อวัน และเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายของพลาสติก PLA เท่ากับ 27, 45 และ 70 % ตามลำดับ การควบคุมอุณหภูมิการย่อยสลายในดินที่สูงขึ้นช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของฟิล์มพลาสติก PLA ภายใต้การควบคุมในห้องปฏิบัติการ

Kale และคณะ (2007) ศึกษาพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพและบรรจุภัณฑ์ซึ่งในการย่อยสลายต้องอาศัยระยะเวลาเพื่อให้เกิดการย่อยสลายที่สมบูรณ์ก่อนที่จะผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อการค้าและตรวจสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ ในการ

ทดลองนี้ทำการตรวจสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของขวด polylactide (PLA) และเปรียบเทียบผลของการย่อยสลายในสภาวะจริงกับสภาวะจำลองตามมาตรฐาน ASTM และ ISO ระยะเวลาในการทดลอง 30 วัน สำหรับการย่อยสลายในสภาวะจริงควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียสและการย่อยสลายแบบสภาวะจำลองควบคุมอุณหภูมิที่ 58 องศาเซลเซียส ขวด PLA ถูกตัดให้มีขนาด  $1 \times 1$  ซม<sup>2</sup>. พบว่าการย่อยสลายในสภาวะจริงมีความสัมพันธ์กับการแตกสลายและการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักมวลโมเลกุล ส่วนการย่อยสลายขวด PLA ในสภาพจำลองเป็นไปตามทฤษฎี ผลการย่อยสลายทางชีวภาพของขวด PLA เท่ากับ  $84.2 \pm 0.9$  เปอร์เซ็นต์ใน 58 วัน

Mohee และคณะ (2007) กล่าวว่า การย่อยสลายพลาสติกในสิ่งแวดล้อมเป็นกระบวนการที่มีความซับซ้อน ซึ่งอิทธิพลที่มีต่อการย่อยสลาย ได้แก่ ธรรมชาติของพลาสติก ปัจจัยในการย่อยสลายที่เหมาะสม ซึ่งในการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของพลาสติกทำการตรวจวัดอัตราการย่อยสลายของพลาสติกโดยการตรวจวัดอุณหภูมิ ความชื้นของดิน การชั่งน้ำหนักแห้งของตัวอย่างก่อนและหลังทำการทดสอบเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย รวมทั้งการวัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้จากการย่อยสลายทางชีวภาพและการวัดก๊าซมีเทนจากการย่อยสลายแบบไม่มีอากาศ

Kale และคณะ (2006) ได้ศึกษาการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ที่ผลิตจากพอลิแลคติกแอซิดศึกษาต่อเนื่อง 30 วัน ภายใต้สภาวะ real compost พบว่า 96% L-lactide ย่อยสลายได้ช้ากว่าพอลิแลคติกแอซิดชนิด 94% L-lactide เนื่องจากมีโครงสร้างและมีผลึกสูงกว่า อัตราการย่อยสลายในเบื้องต้นควรควบคุม อุณหภูมิสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 65% และ pH ประมาณ 7.5 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์

Itavaara และคณะ (2002) ได้สรุปผลการศึกษาว่าการย่อยสลายพอลิแลคติกแอซิดสามารถย่อยสลายได้ง่ายถ้ามีการควบคุมปัจจัยโดยที่อุณหภูมิสูงจะย่อยสลายได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิต่ำและในสภาวะไม่มีอากาศจะย่อยสลายได้ง่ายกว่าเนื่องจากมีความคล้ายกับธรรมชาติมากกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าพอลิแลคติกแอซิดสามารถใช้เป็นวัสดุทำปุ๋ยหมักได้

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ดำเนินการศึกษา

1. เครื่องชั่งที่ตั้งตำแหน่ง รุ่น AB 204-S บริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
2. เครื่องชั่งสองตำแหน่ง รุ่น BJ 1000C บริษัท Precisa, Switzerland.
3. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง(pH meter) รุ่น BA 350 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
4. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS 325 บริษัท TOMY, USA.
5. ตู้อบ (hot air oven) รุ่น UE/BE 200-800 บริษัท Memmert, Germany.
6. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น 3016 บริษัท GFL, Germany.
7. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น SF-C997 บริษัท Sanyo, Japan.
8. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส รุ่น ULT1786 บริษัท Forma Scientific, USA.
9. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Helios Alpha บริษัท Thermo, USA.
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Compact High Speed refrigerated centrifuge) รุ่น 6500 บริษัท KUBOTA, Japan.
11. อ่างให้ความร้อน (heating waterbath) รุ่น WB 22 บริษัท Memmert, Germany.
12. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น VX100 บริษัท Labnet, USA.
13. ไมโครปิเปต(micropipette) ขนาด 20, 100, 200, 1000 และ 10000 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf AG, Germany.
14. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (drybath incubator) รุ่น MD01N บริษัท Major Science, Taiwan.

15. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycle) รุ่น class I IP20 บริษัท Bioer, China.
16. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสอิเล็กโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) รุ่น IMR บริษัท Cosmo Bio, Japan.
17. ชุดเครื่องมือ DCode™ system บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
18. ชุดเครื่องมือแยกสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Electrophoresis System รุ่น DGGE - 2401 บริษัท C.B.S. Scientific Inc., USA.
19. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
  - Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
  - กล้องจุลทรรศน์ รุ่น ECLIPSE E200 บริษัท Nikon, Japan
  - กล้องดิจิทัล รุ่น COOLPIX P5100 บริษัท Nikon, Japan
20. โปรแกรม Image-Pro Plus Visual Guide
21. เครื่องวัดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxy analyzer) รุ่น LI-6400 บริษัท LI-COR, USA.
22. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น SIGMA 4-15 บริษัท Sigma, England.
23. เครื่องวัดและควบคุมอุณหภูมิ รุ่น MD-N บริษัทแสงชัยมิเตอร์ จำกัด ประเทศไทย
24. ตู้ดูดความชื้น รุ่น ST48-A บริษัท โคเอกซ์ กรุ๊ป คอร์ปอเรชั่น จำกัด ประเทศไทย

### 3.2 เคมีภัณฑ์

1. แบเลียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ) บริษัท J.T Baker, USA.
2. โซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ ) บริษัท Merck, Germany.
3. แบคโตเคซีน (Bacto™ Casein peptone) บริษัท Difco Laboratories, USA.
4. แบคโตชอยเปปโตน (Bacto™ Soy peptone) บริษัท Difco Laboratories, USA.
5. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) บริษัท Merck, Germany.
6. กลูโคส (glucose) บริษัท Merck, Germany.
7. 2,3,5 -triphenyltetrazolium chloride (TTC) บริษัท Zigma, England.

8. เอทานอล บริษัท Merck, Germany.
9. ไอโซโพรพานอล (isopropanol) บริษัท Merck, Germany.
10. ปู่ยยูเรีย บริษัท เว็ไปวก๊ิง ประเทศไทย
11. อะกาโรสเจล (agarose gel) บริษัท IUAJ, Japan.
12. สาร EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ( $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$ ) บริษัท Sigma, USA.
13. lysozyme บริษัท Boehringer Mannheim ,Germany.
14. สาร SDS (sodium dodecyl sulfate), ( $C_{12}H_{25}OSO_3$ ) บริษัท Nacal tesque, Japan.
15. ไตรโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ) บริษัท Merck, Germany.
16. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท BDH Chemicals, Australia.
17. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany.
18. ฟีนอล (phenol) บริษัท Merck, Germany.
19. ฟีนอล คอลโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ [( phenol-chloroform-isoamyl alcohol ( 25:24:1)] บริษัท USB, USA.
20. 100 base pair DNA ladder บริษัท New England Biolabs, USA.
21. Lambda *Hind*III marker บริษัท Fermentas, USA.
22. ชุดสารละลาย KAPA2G Robust HotStart บริษัท Kapa Biosystems , USA.
23. ชุดสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kit บริษัท Macherey-Nagel, Germany.
24. สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค DGGE บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
  - ฟอร์มามาไมด์ [Formamide (Deionized)]
  - สารละลาย 40% Acrylamide/Bis solution, 37.5:1 (2.6% C)
  - ยูเรีย (urea)
  - แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate)
  - TEMED (N,N,N,N-Tetra-methyl-ethylenediamine)
  - ทีเออี เข้มข้น 50 เท่า (50xTAE)
  - สีสติดตาม ( dye solution )



- เอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide solution) เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

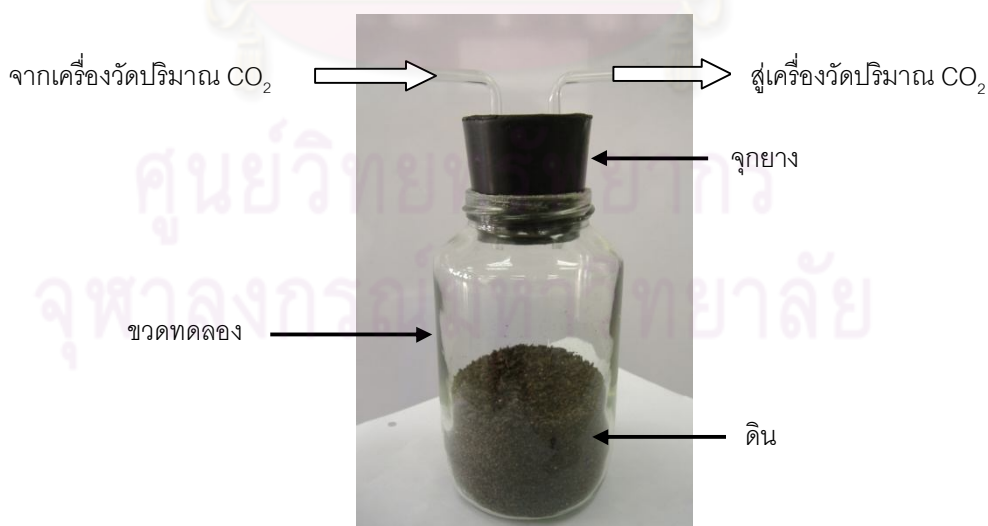
### 3.3 วัสดุที่ใช้ในการศึกษา

1. บรรจุภัณฑ์ที่ทำจากพอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid ; PLA)
2. บรรจุภัณฑ์ที่ทำจากเยื่อชานอ้อย
3. ดินผสมใบจามจุรี

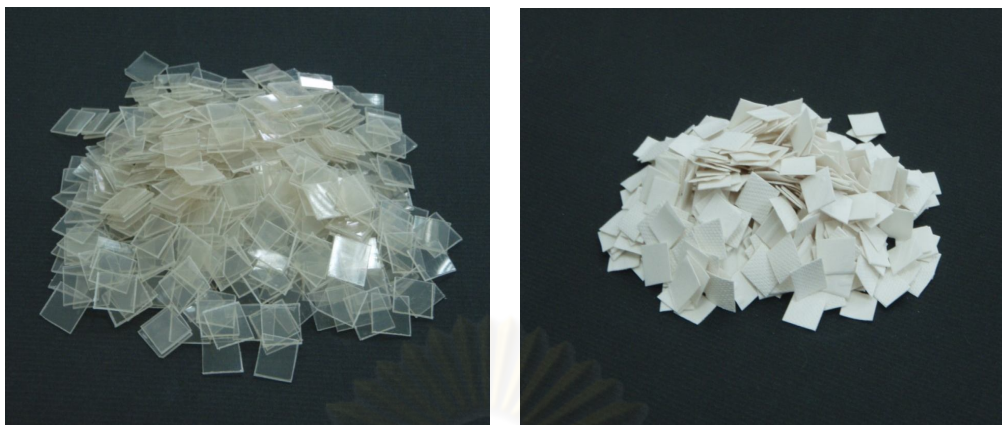
### 3.4 วิธีดำเนินการศึกษา

#### 3.4.1 การเตรียมชุดทดสอบ

เตรียมดินโดยการร่อนดินผ่านตะแกรงขนาด 5x5 ตารางมิลลิเมตร ทำการวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นในดิน วัดค่าความเป็นกรดต่าง(pH) วิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) เตรียมวัสดุทดสอบโดยตัดบรรจุภัณฑ์ที่ทำจากพอลิแลคติกแอซิดและบรรจุภัณฑ์ที่ทำจากเยื่อชานอ้อยให้มีขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร โดยในการทดลองใช้บรรจุภัณฑ์ต่อดินเท่ากับ 1:400 โดยน้ำหนักในหนึ่งชุดการทดลอง ใช้ปุ๋ยยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใส่ดินและวัสดุทดสอบในขวดแก้วขนาด 24 ออนซ์ ปิดปากขวดให้สนิทด้วยจุกยางที่มีหลอดนำก๊าซต่ออยู่ แสดงดังภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 ชุดทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์



ภาพที่ 3.2 บรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในการทดสอบชนิดพอลิแลคติกแอซิด (ข้าว) และบรรจุภัณฑ์ชนิดเยื่อชานอ้อย (ขวา) ซึ่งตัดให้มีขนาด  $1 \times 1$  ซม.<sup>2</sup>.

### 3.4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์

ทดสอบปัจจัยที่คาดว่าจะมีผลต่อการย่อยสลาย 3 ปัจจัย คือ ชนิดของบรรจุภัณฑ์ อุณหภูมิ และปริมาณไนโตรเจนที่เติมลงในดินที่ใช้ในการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ (ตารางที่ 3.1) ใช้แบบการทดลองแบบแฟกตอเรียล(Factorial Design) หมายเลข BB0316 สำหรับ 3 ปัจจัย พร้อมจุดกลาง (ตารางที่ 3.2) (Haaland, 1989) คิดเป็น 16 การทดลองและทำ 3 ซ้ำ ใช้เวลาทดลอง 30 วัน เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพและนำสภาวะที่เหมาะสมนั้นมาใช้สำหรับการติดตามการย่อยสลายโดยขยายเวลาการศึกษา 90 วัน

ตารางที่ 3.1 ปัจจัยที่ใช้ในการทดสอบ

| ปัจจัยทดสอบ                   | ระดับ        |               |             |
|-------------------------------|--------------|---------------|-------------|
|                               | High<br>(1)  | Medium<br>(0) | Low<br>(-1) |
| A: ชนิดบรรจุภัณฑ์             | เยื่อชานอ้อย | ไม่ใส่        | PLA         |
| B: อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส:°C)  | 58           | 30            | 20          |
| C: ไนโตรเจน (กรัม: ดิน 1 กก.) | 0.4          | 0.2           | 0           |

ตารางที่ 3.2 การทดลองแบบแฟกตอเรียลดีไซด์ หมายเลข BB0316 (Haaland, 1989)

| <u>run</u> | <u>Factors</u> |          |          |
|------------|----------------|----------|----------|
|            | <u>A</u>       | <u>B</u> | <u>C</u> |
| 1          | -1             | -1       | 0        |
| 2          | -1             | +1       | 0        |
| 3          | +1             | -1       | 0        |
| 4          | +1             | +1       | 0        |
| 5          | -1             | 0        | -1       |
| 6          | -1             | 0        | +1       |
| 7          | +1             | 0        | -1       |
| 8          | +1             | 0        | +1       |
| 9          | 0              | -1       | -1       |
| 10         | 0              | -1       | +1       |
| 11         | 0              | +1       | -1       |
| 12         | 0              | +1       | +1       |
| 13         | 0              | 0        | 0        |
| 14         | 0              | 0        | 0        |
| 15         | 0              | 0        | 0        |
| 16         | 0              | 0        | 0        |

เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28 และ 30 ทำการตรวจวัดปริมาณก๊าซ

คาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ หาน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงหลัง

การย่อยสลายทางชีวภาพและวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของดิน

### 3.4.3 การย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพจากปัจจัยที่คัดเลือก

การศึกษาการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพจากปัจจัยที่คัดเลือกในชุดการทดลองใช้บรรจุภัณฑ์ 2 ชนิด คือ บรรจุภัณฑ์ที่ผลิตมาจาก polylactic acid (PLA) และบรรจุภัณฑ์จากเยื่อชานอ้อย ในแต่ละชุดการทดลองใช้วัสดุทดสอบที่เตรียมไว้และดินลงในขวดแก้วทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองดังแสดงในภาพที่ 3.1 โดยควบคุมปัจจัยการทดลองตามผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (ในหัวข้อ 3.4.2) ทดลองต่อเนื่อง 90 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 แต่ละตัวอย่างนำมาตรวจวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ ศึกษาลักษณะทางกายภาพของวัสดุทดสอบโดย Scanning electron microscope (SEM) หาน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงหลังการย่อยสลายทางชีวภาพและวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของดิน

### 3.4.4 การย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพต่อประชาคมแบคทีเรียในดิน

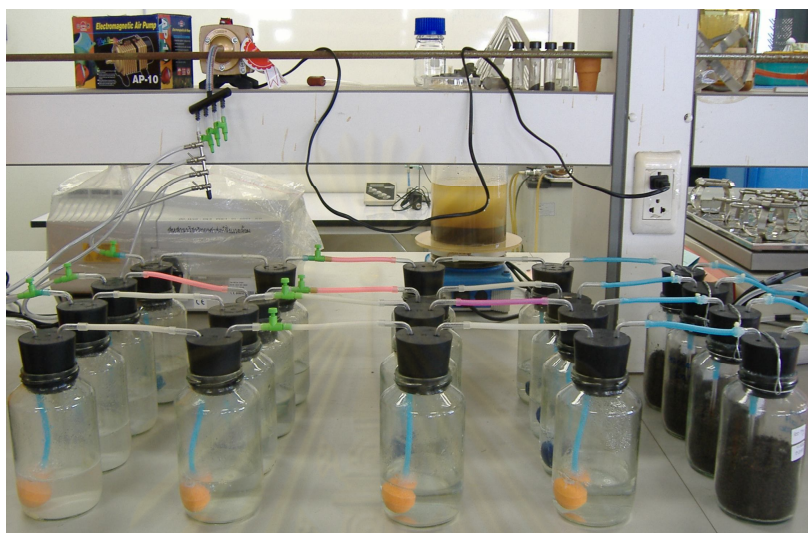
ศึกษาชนิดของแบคทีเรียในดินระหว่างเกิดกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพโดยวิธี denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) และหาปริมาณแบคทีเรียในดินทำการทดลองต่อเนื่อง 90 วัน เก็บตัวอย่างดินจากชุดทดลองทุกๆ 30 วัน โดยศึกษาควบคู่กับผลจากการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติที่ทำการฝังกลบขึ้นตัวอย่างลึก 1 เมตรจากพื้นที่ฝังกลบขยะจริงเก็บตัวอย่างดินและวัสดุทดสอบทุกๆ 2 เดือน

## 3.5 วิธีวิเคราะห์

### 3.5.1 ตรวจวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ

ก่อนการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ทดสอบ ทำการกำจัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากขวดตัวอย่าง โดยใช้สารละลายแบเรียมไฮดรอกไซด์  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  (ASTM, 2006) เป็นตัวจับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศนาน 10 นาที จากนั้นเป่าอากาศเข้าไปในขวดตัวอย่าง จนปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในชุดทดสอบที่วัดได้มีค่าคงที่ (ภาพที่ 3.3) แล้วจึงนำไปเก็บตามสภาวะที่กำหนดไว้ เมื่อครบกำหนดเวลาเก็บตัวอย่าง นำไปตรวจวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพโดยใช้เครื่องมือตรวจวัด

คาร์บอนไดออกไซด์แสดงดังภาพที่ 3.4 โดยต่อเครื่องมือเข้ากับหลอดนำก๊าซที่ต่อไว้กับชุดทดลอง ทำการตรวจวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จนได้ค่าคงที่ (ภาพที่ 3.5)

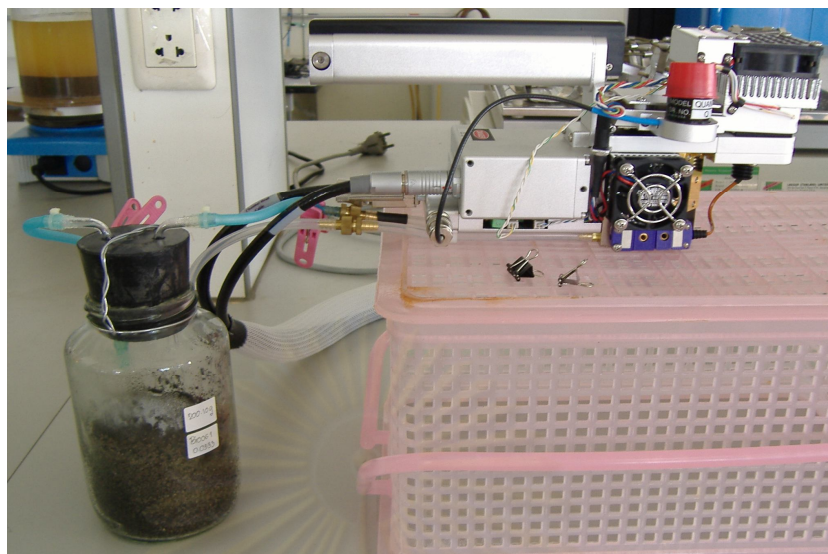


ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการกำจัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากชุดทดสอบการย่อยสลาย



ภาพที่ 3.4 เครื่องวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxy analyzer) ยี่ห้อ LI-COR รุ่น LI-6400





ภาพที่ 3.5 หัววัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์โดยต่อเข้ากับชุดทดสอบ

### 3.5.2 ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของบรรจุภัณฑ์ด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (SEM) (Ishigaki และคณะ, 2004)

นำบรรจุภัณฑ์จากการศึกษามาตรวจสอบลักษณะทางกายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และทำการบันทึกภาพเพื่อดูลักษณะพื้นผิวและลักษณะการบุฟุ้งที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพที่เวลาต่างกัน

### 3.5.3 หาเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติก-แอซิดและเยื่อชานอ้อยโดยวิธีชั่งน้ำหนัก (Gupta และ Kumar, 2007)

เก็บตัวอย่างขึ้นบรรจุภัณฑ์ทั้งสองชนิดจากชุดทดสอบการย่อยสลายในตู้ดูความชื้นและชั่งน้ำหนักนำมาหาเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่หายไปตามสูตร

$$w_L \% = \frac{w_0 - w_t}{w_0} \times 100$$

เมื่อ  $w_L \% =$  เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่หายไป

$w_0 =$  น้ำหนักเริ่มต้น (น้ำหนักแห้ง)

$w_t =$  น้ำหนักตามระยะเวลาการทดลอง (น้ำหนักแห้ง)

### 3.5.4 วัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของดิน (ASTM Standards, 2006)

ซึ่งตัวอย่างดิน 20 กรัม มาทำให้เป็นสารแขวนลอยในน้ำ 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันนาน 10 นาที จากนั้นวางให้ตกตะกอน 15 นาทีแล้วคนให้เข้าอีกรอบ วางทิ้งไว้ให้ตกตะกอนอีก 15 นาที จากนั้นคนให้เข้ากันก่อนทำการวัดด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter)

### 3.5.5 วิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียในดินระหว่างเกิดกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพโดยวิธี denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

เก็บตัวอย่างดินทำการสกัดดีเอ็นเอ ตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอที่สกัด วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) แยกสายดีเอ็นเอ โดยใช้วิธี DGGE นำไปหาลำดับเบสเพื่อตรวจสอบประชาคมแบคทีเรีย (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2548) จากกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพในดิน โดยวิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลองแสดงไว้ในภาคผนวก ก

#### 1) สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน

วิธีการสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงมาจาก Zhou และคณะ(1996) โดยชั่งดินตัวอย่าง 500 มิลลิกรัมใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์เติม DNA extraction buffer 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เติมไลโซไซม์ (lysozyme) 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37°C นาน 30 นาที เติม 20% SDS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่ 65°C นาน 2 ชั่วโมง โดยผสมให้เข้ากัน ทุก 20 นาที ทำการเยือกแข็ง-ละลาย (freeze-thaw) 3 ครั้ง โดยแช่เยือกแข็งที่ -80°C นาน 30 นาที และละลายที่ 65°C นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสซึ่งมีดีเอ็นเอลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ทำการสกัดด้วยฟีนอลคลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) โดยผสมให้เข้ากันอย่างช้าๆ นาน 2-3 นาที และทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์และเติมคลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) เท่ากับปริมาตรของส่วนน้ำใส ผสมให้เข้ากันอย่างช้าๆ นาน 2-3 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสซึ่งมีดีเอ็นเอลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 0.8 เท่าของปริมาตรส่วนน้ำใส ผสมให้เข้ากันอย่างช้าๆ นาน 30 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอลปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ระบายเอทานอลออกจากตะกอน

ดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer 30 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่  $-20^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำมาใช้ (Yang และคณะ, 2007)

## 2) ตรวจความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้และกำจัดสารประเภทอิวมิกโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

โดยเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1% หลอมในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 0.5 เท่า เทลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหัวเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสแข็งตัวประมาณ 30 นาที วางชิ้นอะกาโรสที่ได้ลงในแชนเบอร์เทปบัฟเฟอร์ TAE ให้ท่วมเหนืออะกาโรสเจล 2-3 มม. ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (6X loading dye) หยดลงในช่องวิ่ง โดยช่องวิ่งแรกจะหยอดด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda HindIII marker ที่ผสมกับสีติดตาม จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำปลอดประจุเป็นเวลา 10 นาที (Thakuria และคณะ, 2008) นำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ตัดส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอจากเจลและทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอด้วยชุด NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kit (MACHEREY-NAGEL, Germany) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยนำเจลที่ตัดได้ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์และซังน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจลโดยหักออกจากน้ำหนักหลอดเปล่า เต็ม NT ปริมาตร 2 เท่าของน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ  $50^{\circ}\text{C}$  นาน 10 นาที เพื่อให้อะกาโรสเจลละลายหมด นำสารอะกาโรสเจลที่ละลายแล้วใส่ลงในคอลัมน์ ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อ นาที นาน 1 นาที ล้างซิลิกาเมมเบรนโดยเติม NT3 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ทำการปั่นเหวี่ยง 11,000 รอบต่อ นาที นาน 1 นาที และทำการปั่นเพื่อทำให้ซิลิกาเมมเบรนแห้งที่ 11,000 รอบต่อ นาที นาน 2 นาที นำคอลัมน์ต่อเข้ากับหลอดไมโครเซนติฟิวส์ใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer NE ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อ นาที นาน 1 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่  $-20^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำมาใช้

## 3) วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดหาปริมาณด้วยเครื่อง spectrophotometer ด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ( $A_{260}$ ) และ 280 นาโนเมตร ( $A_{280}$ ) สำหรับดีเอ็นเอและโปรตีนตามลำดับ (Yang และคณะ, 2007) คำนวณค่า  $A_{260}$  ต่อ  $A_{280}$  โดยหากอัตราส่วนที่ได้มีค่านี้น้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง แต่ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูงและคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

$$\text{ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$





ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 0.5 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

### 5) วิเคราะห์ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

วิเคราะห์ DGGE โดยเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 8% ที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant 30 - 70% (100% denaturant ประกอบด้วย 7 M urea และ 40% formamide) ซึ่งทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant โดยใช้ระบบจ่ายเกรเดียนท์ตามวิธีที่ระบุในคู่มือของเครื่อง เมื่อทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant ลงในชุดแซนวิชเตรียมเจลแล้ว เสียบหัวลงไประหว่างกระจกแซนวิช โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้พอลิอะคริลาไมด์เจลแข็งตัว นำชุดเจลแซนวิชใส่ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ TAE ให้ความร้อนจนอุณหภูมิประมาณ 60 °C ผสมผลิตภัณฑ์ PCR กับสียติดตามหยอดลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 120 V ที่ 60 °C นาน 5 ชั่วโมงและย้อมพอลิอะคริลาไมด์เจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาที นำไปดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV)

ตัดชิ้นพอลิอะคริลาไมด์เจลบริเวณแถบดีเอ็นเอที่สนใจลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ เติมน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ 20 ไมโครลิตร แซ่ขึ้นเจลที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายออกมาจากเจล (Ros และคณะ 2008, Jianzhong และคณะ 2009) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาปลูกไข่พอลิเมอไรส (ตามวิธี 3.4.5 ข้อ 4) จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด NucleoSpin® Extract II Kit (MACHEREY-NAGEL, Germany) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยเติม Buffer NT ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ไมโครลิตร จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ใส่ลงในคอลัมน์ที่ต่อเข้ากับหลอดคอเล็กชั่น บันเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ล้างซิลิกาเมมเบรนโดยเติม NT3 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ทำการปั่นเหวี่ยง 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที และทำการปั่นเพื่อทำให้ซิลิกาเมมเบรนแห้งที่ 11,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที นำคอลัมน์ต่อเข้ากับหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer NE ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 °C

นำดีเอ็นเอมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ( $A_{260}$ ) และ 280 นาโนเมตร ( $A_{280}$ ) และคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ส่งดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ Molecular Informatic Laboratory ประเทศฮ่องกง โดยผ่านทางบริษัท ไชบีเอส



(ประเทศไทย) จำกัด เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของซันดีเอ็นเอแล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจาก Genbank โดยใช้โปรแกรม BLASTn ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/))

### 3.5.6 หาปริมาณแบคทีเรียในดิน

วิธีนี้ดัดแปลงมาจาก Pollack และคณะ (2002) และ Kang และ Mills (2006) โดยชั่งดิน 10 กรัม น้ำ 90 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันนาน 10 นาที จากนั้นปล่อยให้ตกตะกอนนาน 30 นาที ดูดส่วนที่เป็นน้ำใส่ปริมาตร 10 มิลลิลิตรใส่หลอดเซนติฟิวส์ขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูดส่วนใส 5 มิลลิลิตรใส่หลอดเซนติฟิวส์ปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสออก 4 มิลลิลิตรให้เหลือน้ำตะกอนในหลอด 1 มิลลิลิตร เติม 3 % 2,3,5-triphenyltetrazoliumchloride (TTC) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรและเติม Trypticase Soy Broth (TSB) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้เวลานาน 24 ชั่วโมง เตรียมสไลด์เพื่อนับแบคทีเรียในดินที่มีชีวิตด้วยกล้องจุลทรรศน์และทำการถ่ายภาพเพื่อตรวจนับปริมาณแบคทีเรียด้วยโปรแกรม Image-Pro Plus Visual Guide

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

#### 4.1 ลักษณะทางกายภาพของดินทดสอบและบ่อฝังกบขยะเทศบาลจังหวัดสุพรรณบุรี

ดินปลูกต้นไม้ที่ตรวจจากจู่ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีลักษณะทางกายภาพดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยส่งดินวิเคราะห์อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่กลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร (ภาคผนวก ข) และลักษณะทางกายภาพของบ่อฝังกบขยะเทศบาลจังหวัดสุพรรณบุรี ระยะเวลาการศึกษาระหว่างเดือนกันยายน พ.ศ.2551 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ.2552 แสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพของดินก่อนทำการทดลอง

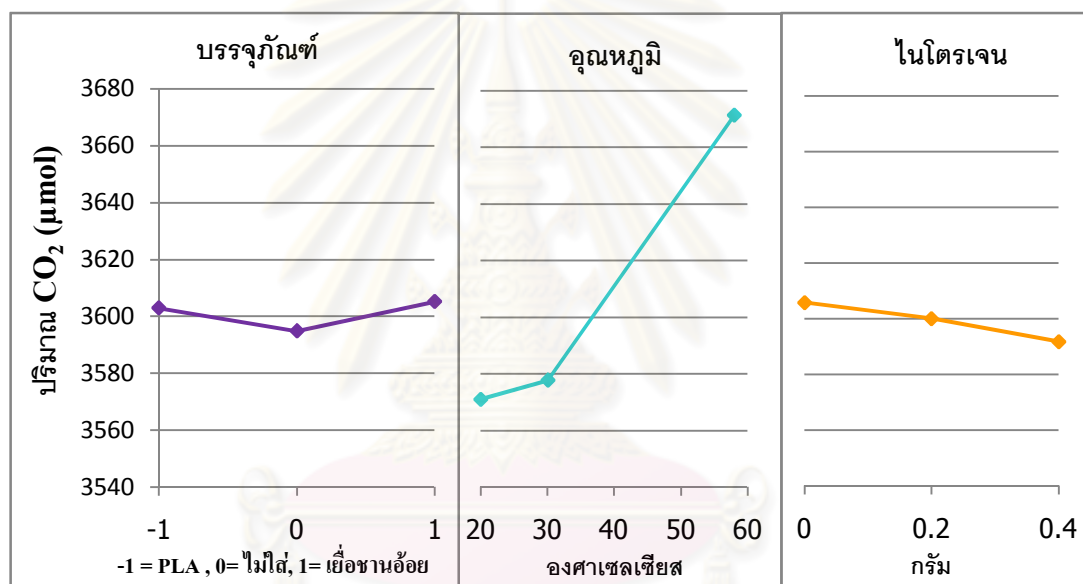
| พารามิเตอร์                 | ผลการวิเคราะห์ | วิธีวิเคราะห์          |
|-----------------------------|----------------|------------------------|
| ค่าความเป็นกรดด่าง          | 7.24           | pH meter               |
| ค่าความชื้น                 | 54 %           | Physical method        |
| อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน | 11.6           | Walkley - black method |

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางกายภาพของบ่อฝังกบขยะเทศบาลจังหวัดสุพรรณบุรีระหว่างเดือนกันยายน พ.ศ. 2551 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2552

| พารามิเตอร์        | ผลการวิเคราะห์ | หมายเหตุ                      |
|--------------------|----------------|-------------------------------|
| ค่าความเป็นกรดด่าง | 4.2 - 6.5      | เดือนกันยายนถึงพฤศจิกายน 2551 |
| ค่าความชื้น        | 70 - 95 %      | และกรกฎาคมถึงกันยายน 2552     |
| อุณหภูมิในบ่อฝังกบ | 31 - 40.5 °C   | เป็นช่วงฤดูฝนมีน้ำท่วมขัง     |

#### 4.2 ปัจจัยที่เหมาะสมในการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อย

จากแบบการทดลองแฟคตอเรียล เพื่อหาผลของปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัยอันได้แก่ชนิดของบรรจุภัณฑ์ อุณหภูมิและไนโตรเจน โดยทำการศึกษาค้นคว้าต่อเนื่อง 30 วัน ในชุดทดสอบการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์พบว่า การย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ทั้งสองชนิดให้ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) สูงกว่าการไม่ใส่บรรจุภัณฑ์การศึกษาที่อุณหภูมิ  $58^\circ\text{C}$  ทำให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงขึ้นกว่าที่อุณหภูมิ  $20$  และ  $30^\circ\text{C}$  อย่างชัดเจน การเติมยูเรียทำให้ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลดลง (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อยเมื่อพิจารณาแต่ละปัจจัย

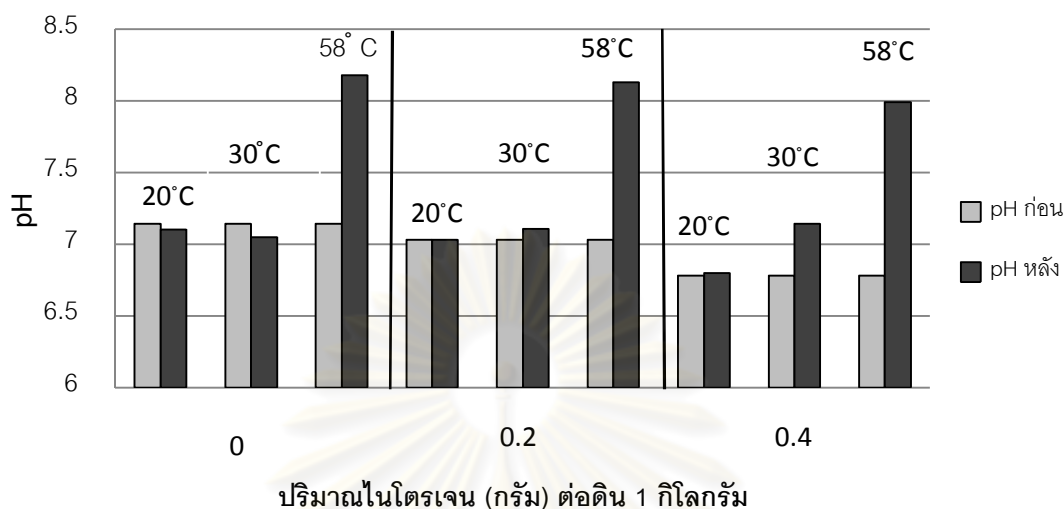
เมื่อพิจารณาปัจจัยการเติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีค่าต่ำสุดเมื่อเติมไนโตรเจนที่  $0.4$  กรัมและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีค่าสูงสุดเมื่อไม่เติมไนโตรเจน ส่วนปัจจัยบรรจุภัณฑ์คือ พอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อยนั้น พบว่าการใส่บรรจุภัณฑ์ทั้งสองชนิดให้ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงขึ้นกว่าการไม่ใส่บรรจุภัณฑ์จากการทดลองและสมมติฐานที่ว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะสะท้อนกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดินที่ย่อยสลายวัสดุทดสอบ อธิบายได้ว่าที่อุณหภูมิ  $58^\circ\text{C}$  มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงที่สุด แสดงว่ามีการย่อยสลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในดินสูงกว่าที่

อุณหภูมิ 20 และ 30 °C การใส่บรรจุภัณฑ์ทั้งพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นทำให้มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการย่อยสลายสูงขึ้น นอกจากนี้พบว่า การไม่เติมไนโตรเจนเป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการทดลองอาจเป็นเพราะดินที่ใช้ในการทดลองมีไนโตรเจนที่สูง (คาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 11.6) การเติมยูเรียลงไปอีกจึงทำให้ปริมาณไนโตรเจนมากเกินไปจึงไปลดอัตราการย่อยสลายและลดอัตราการหายใจของจุลินทรีย์ในดิน (Soderstromและคณะ, 1983) Fog (1988) และ Wie และคณะ (2008) ระบุว่าปริมาณไนโตรเจนที่มากเกินไปจะขัดขวางกระบวนการผลิตเอนไซม์ทำให้จุลินทรีย์มีกิจกรรมลดลงและลดกระบวนการเกิดชีวมีสจึงพบว่าการปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากดินลดลง สรุปได้ว่าปัจจัยที่สำคัญสำหรับการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ทั้งสองชนิดคืออุณหภูมิ 58 °C และไม่ต้องเติมไนโตรเจน

#### 4.2.1 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างของดิน

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อยทำการตรวจวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของดินก่อนและหลังทำการทดสอบเมื่อทำการศึกษาการย่อยสลายเป็นระยะเวลาต่อเนื่อง 30 วัน ที่อุณหภูมิ 20 °C ผลการศึกษาพบว่า pH ของดินที่ไม่เติมไนโตรเจน ดินที่เติมไนโตรเจน 0.2 และ 0.4 กรัมต่อดิน 1 กิโลกรัมนั้น มีค่า pH เริ่มต้นคือ 7.14, 7.03 และ 6.78 ตามลำดับ โดยไม่ได้ใส่บรรจุภัณฑ์ทดสอบ พบว่าค่า pH ไม่เปลี่ยนแปลงมากนักโดยมีค่า pH หลังการศึกษาคือ 7.10, 7.03 และ 6.80 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 °C พบว่าค่า pH ในดินที่ไม่เติมไนโตรเจนมีค่า pH ลดลงส่วนในดินที่เติมไนโตรเจน 0.2 และ 0.4 กรัม มีค่า pH สูงขึ้นเล็กน้อยจากค่า pH เริ่มต้นโดยมีค่า pH หลังการศึกษาคือ 7.05, 7.11 และ 7.14 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 58 °C พบว่าค่า pH ในดินมีค่าสูงขึ้น โดยมีค่า pH หลังการศึกษาคือ 8.18, 8.13 และ 7.99 ตามลำดับ

ผลการตรวจวัดค่าความเป็นกรดต่างของดินทดสอบที่ 20, 30 และ 58 °C ก่อนและหลังการศึกษการย่อยสลายทางชีวภาพ แสดงดังภาพที่ 4.2



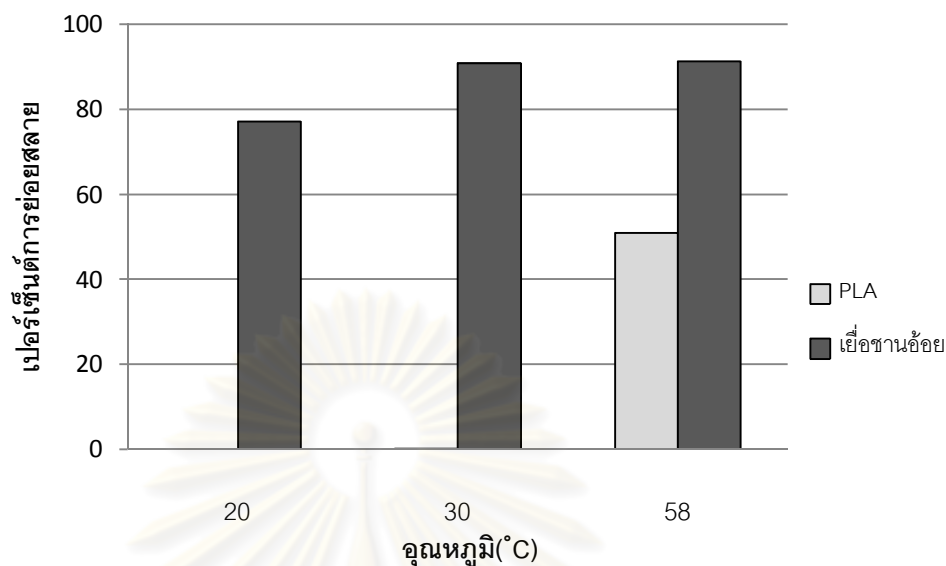
ภาพที่ 4.2 ผลการตรวจวัดค่าความเป็นกรดต่างของดินทดสอบที่ 20, 30 และ 58 °C ก่อนและหลัง การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพเป็นระยะเวลา 30 วันในดินที่ไม่ใส่บรรจุภัณฑ์ทดสอบ

#### 4.2.2 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของบรรจุภัณฑ์

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพได้ ทำการศึกษาน้ำหนักของบรรจุภัณฑ์ทั้งสองชนิดคือ พอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid: PLA) และเยื่อชานอ้อย พบว่า PLA มีเปอร์เซ็นต์ (%) การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของบรรจุภัณฑ์ (ภาพที่ 4.3) ที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 58 °C เท่ากับ 0.13, 0.16 และ 50.93 % ตามลำดับ ส่วนเยื่อชานอ้อย มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายต่อน้ำหนักเท่ากับ 77.20, 90.91 และ 91.28% ตามลำดับที่ระยะเวลาการศึกษา 30 วัน ผลการศึกษาพบว่า PLA จะไม่ย่อยสลายหรือย่อยสลายได้ช้ามากที่อุณหภูมิต่ำกว่า 58°C ส่วนเยื่อชานอ้อยสามารถย่อยสลายได้ที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 58 °C

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





ภาพที่ 4.3 ผลการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิด PLA และเชื้อยีสต์ที่ 20, 30 และ 58°C ที่ระยะเวลาการศึกษา 30 วัน

สรุปได้ว่า ปัจจัยที่สำคัญสำหรับการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเชื้อยีสต์ที่นำมาทดสอบต่อไปคืออุณหภูมิ 58°C และไม่ต้องเติมไนโตรเจน

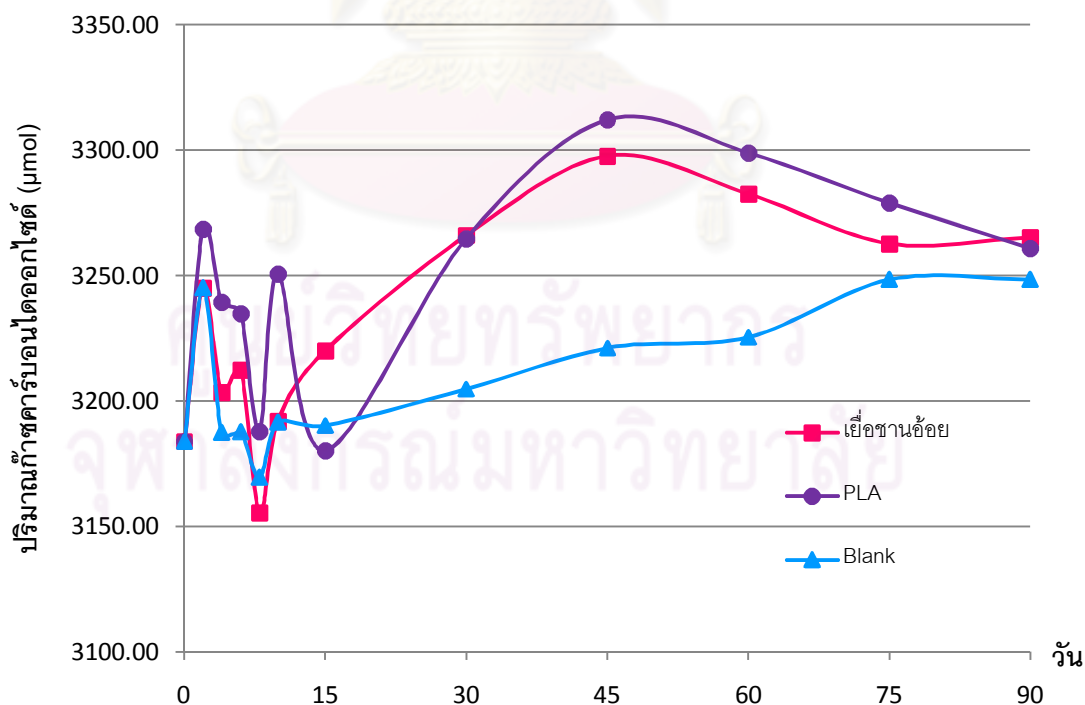
#### 4.3 การย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเชื้อยีสต์ภายใต้ภาวะที่คัดเลือก

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในหัวข้อที่ 4.2 นำปัจจัยที่คัดเลือกมาศึกษาต่อโดยทำการศึกษาต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 90 วันโดยมีการเตรียมตัวอย่างและศึกษาในชุดทดสอบการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์เช่นเดียวกับหัวข้อ 4.2 เก็บตัวอย่างที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน

##### 4.3.1 ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้จากการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเชื้อยีสต์

ผลการศึกษาการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ภายใต้สภาวะที่คัดเลือกไว้จากข้อ 4.2 พบว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้จากการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ทั้งสองชนิดเกิดขึ้นน้อยในช่วง 15 วันแรก (ภาพที่ 4.4) และมีมากที่สุดที่ 45 วัน และพบว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้จากการย่อยสลายพอลิแลคติกแอซิดมีปริมาณสูงกว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้จากการย่อยสลายเชื้อยีสต์ ซึ่งหมายความว่ากิจกรรมของจุลินทรีย์ในขวดที่บรรจุพอลิแลคติกแอซิดสูงกว่าขวดบรรจุเชื้อยีสต์ เนื่องจากพันธะเอสเทอร์ของพอลิแลคติกแอซิดเกิดปฏิกิริยา

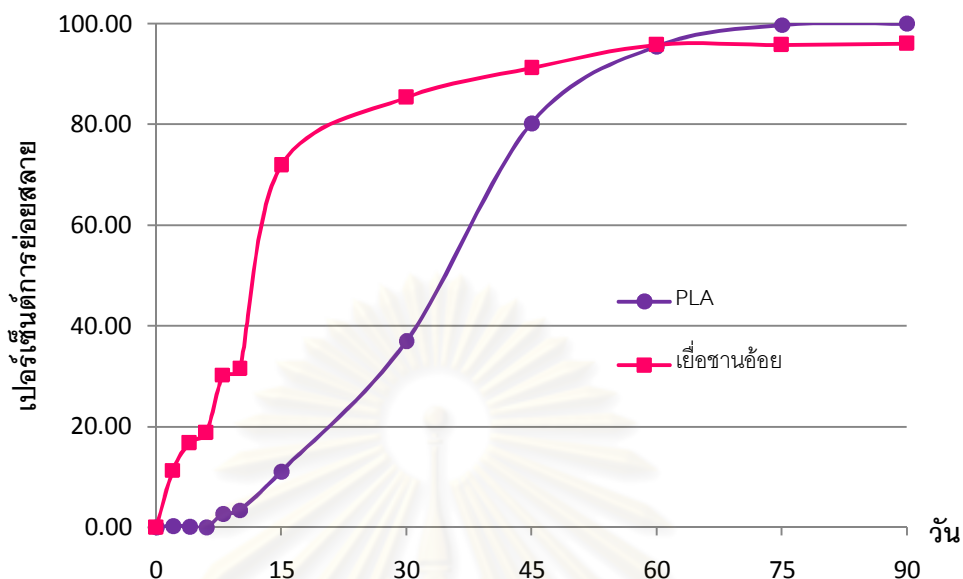
ไฮโดรไลซิสได้ง่ายเมื่อใกล้อุณหภูมิการสทรานซิชัน (Glass Transition Temperature:  $T_g$ ) 60 องศาเซลเซียส (Guptaและคณะ, 2007) ทำให้สายโซ่พอลิเมอร์ขาดง่ายสอดคล้องกับการศึกษาลักษณะทางกายภาพซึ่งพบการแตกสลายทั่วผิวหน้า ส่วนเยื่อขานอ้อยเป็นเซลลูโลสซึ่งมีพันธะแบบ  $\beta$ -1,4 glycosidic linkages เป็นพันธะเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลน้ำตาลทำให้การเรียงตัวของสายโซ่พอลิเมอร์เป็นระเบียบ (ธนาวัต ลี้จากภัยและคณะ, 2548) ที่อุณหภูมิสูงทำให้จุลินทรีย์ทำการย่อยสลายได้ยาก การทดสอบการย่อยสลายหลังจาก 45 วัน พบว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลดลงเรื่อยๆ อาจเนื่องมาจากการทดสอบการย่อยสลายซึ่งทำในขวดแบบปิด ไม่มีการเติมอากาศ เมื่อระยะเวลาการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้น ทำให้จุลินทรีย์กลุ่มออโตโทรฟ (Autotroph) เจริญเติบโตมากขึ้นหรืออาจมีการหายใจน้อยลงขณะที่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ถูกดูดซับไว้ด้วยสารอินทรีย์ในดินซึ่งต้องศึกษาเพื่อยืนยันต่อไป จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในช่วง 15 วันแรกไม่แตกต่างกันแต่หลังจากนั้นพบว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ของชุดทดสอบที่ใส่บรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและชนิดเยื่อขานอ้อยแตกต่างกันกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05



ภาพที่ 4.4 ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่วัดได้จากการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อขานอ้อย

#### 4.3.2 เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติก แอซิดและเยื่อชานอ้อยที่หายไป

จากการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อยที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เก็บชิ้นบรรจุภัณฑ์ที่พบในชุดทดสอบตามระยะเวลาการทดสอบที่เพิ่มขึ้น มาหาเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายโดยวิธีซึ่งนำนักตามข้อ 3.5.3 พบว่าพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อยถูกย่อยไปกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ที่ 60 วัน (ภาพที่ 4.5) หลังจากนั้นพอลิแลคติกแอซิดจะถูกย่อยไปจนหมดขณะที่เยื่อชานอ้อยยังคงเหลืออยู่ เป็นที่สังเกตว่าเยื่อชานอ้อยถูกย่อยสลายเร็วกว่าในระยะ 15 วันแรกทั้งนี้อาจเป็นเพราะดินที่ใช้เป็นดินผสมสำหรับปลูกต้นไม้ ดังนั้นจึงมีเศษใบพืชซึ่งเป็นเซลลูโลสปนอยู่จุลินทรีย์ในดินจึงคุ้นเคยกับการย่อยเซลลูโลสหรือมีเอนไซม์ที่มีอยู่เดิมสำหรับย่อยเซลลูโลสปนอยู่จึงย่อยสลายได้เร็วกว่าพอลิแลคติกแอซิดซึ่งจัดเป็นสิ่งใหม่สำหรับจุลินทรีย์ในดิน อัตราการย่อยที่พบไม่สอดคล้องกับปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น (ภาพที่ 4.4) ลักษณะการย่อยสลายพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อยแตกต่างกัน เยื่อชานอ้อยมีลักษณะเป็นเส้นใยขนาดค่อนข้างใหญ่ เมื่อถูกย่อยสลายจะมีขนาดเล็กลงแต่ยังคงรูปความเป็นเส้นใยอยู่ส่วนที่ถูกย่อยเป็นชิ้นเล็กจะหลุดแยกไปได้มากอาจเป็นสาเหตุที่น้ำหนักลดลงเร็วกว่าในขณะที่พอลิแลคติกแอซิดแตกย่อยออกเป็นชิ้นเล็กๆลงไป โดยที่ผิวหน้ายังคงสภาพความเป็นแผ่น (ภาพที่ 4.8 และ 4.9) ทำให้น้ำหนักไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงในระยะ 30 วันแรก แต่เมื่อผิวหน้าแตกจนปนแล้วอาจหลุดร่วงติดไปกับดินจึงหาไม่พบ จึงทำให้คิดเปอร์เซ็นต์การย่อยเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อยที่หายไปไม่แตกต่างกัน ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่หายไปของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดมีความสัมพันธ์กันในทางบวกอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 เช่นเดียวกันกับความสัมพันธ์ของปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่หายไปของบรรจุภัณฑ์ชนิดเยื่อชานอ้อย

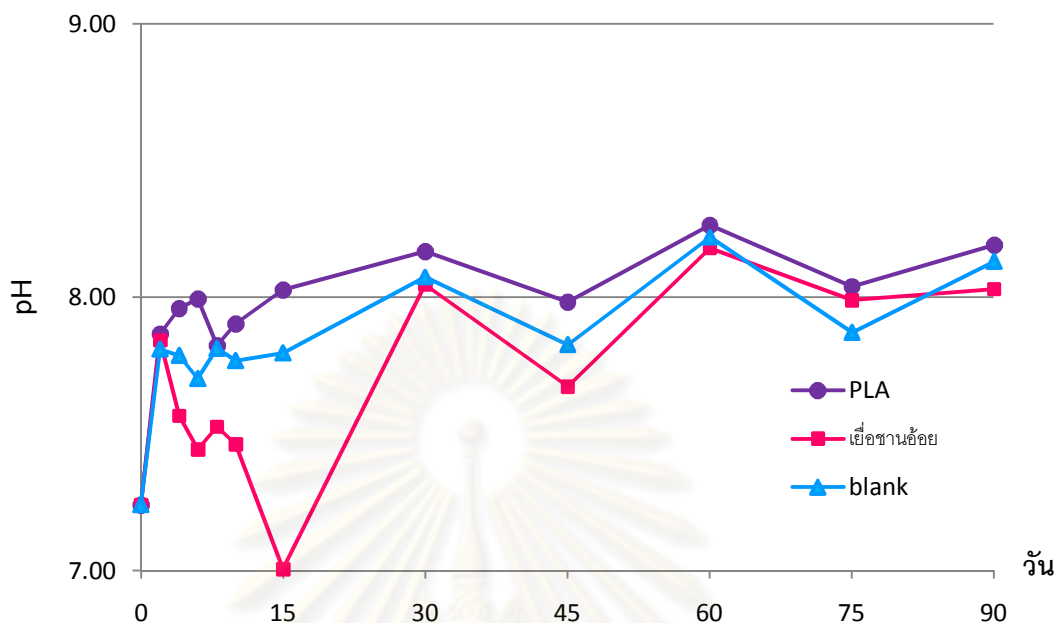


ภาพที่ 4.5 การย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเชื้อยีสต์

#### 4.3.3 ความเป็นกรดต่าง (pH) ของดิน ขณะมีการย่อยสลายทางชีวภาพ

ผลการศึกษาความเป็นกรดต่าง (pH) ของดินจากการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเชื้อยีสต์ พบว่าการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ทั้งสองชนิดไม่มีผลต่อความเป็นกรดต่างของดินมากนักเพราะ pH ใกล้เคียงกับดินชุดควบคุมทั้งคู่ยกเว้นช่วงแรกที่มีการย่อยเชื้อยีสต์เกิดอย่างรวดเร็วทำให้ค่า pH ของดินต่ำกว่าชุดทดลองควบคุมเล็กน้อยแต่ก็ยังคงอยู่ในช่วงเป็นกลาง โดยเริ่มต้นการทดลองมีค่า pH อยู่ที่ 7.24 (ภาพที่ 4.6) หลังจากนั้นพบว่า pH มีค่าสูงขึ้นอาจเนื่องมาจากดินที่ใช้ศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพนั้นมีส่วนผสมของไบจามจุรีซึ่งมีโปรตีนสูง (วรรณะ ม้าเจียว, 2540) ผลจากการย่อยสลายได้กรดอะมิโนซึ่งจุลินทรีย์ในดินใช้เป็นอาหารโดยกระบวนการดีอะมิเนชัน (deamination) ได้แอมโมเนีย ( $\text{NH}_3$ ) (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจและปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547) เมื่อระยะเวลาการย่อยสลายเพิ่มขึ้นทำให้ดินมีค่า pH เพิ่มขึ้น

ความเป็นกรดต่างของดินในช่วง 15 วันแรกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 แต่ในช่วง 30 ถึง 90 วัน พบว่าไม่แตกต่างกัน



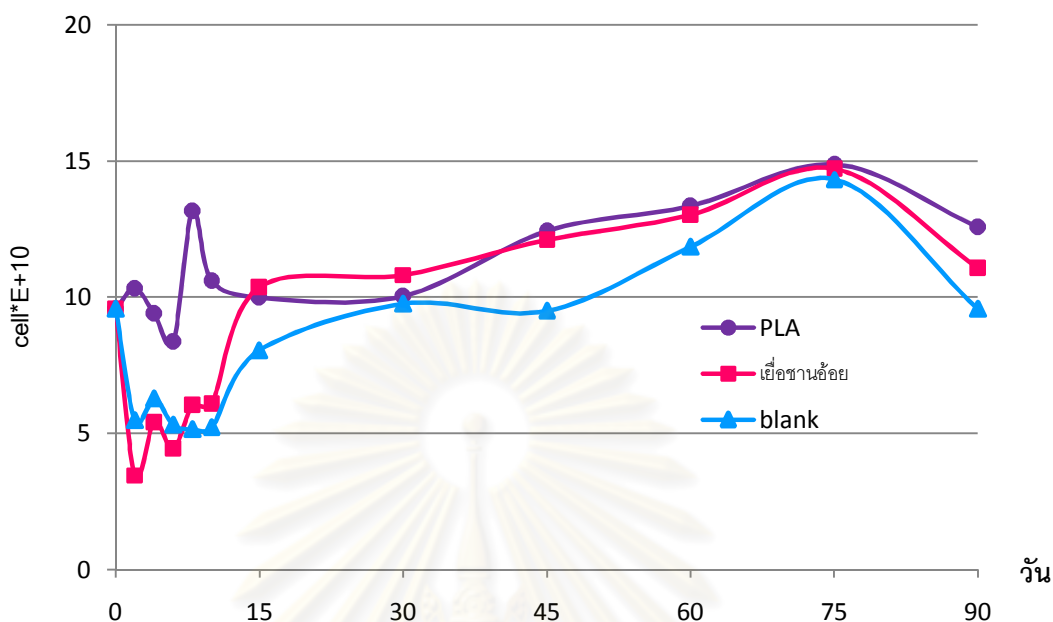
ภาพที่ 4.6 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของดินจากการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเชื้อขาน้อยที่ระยะเวลาการศึกษา 90 วัน

#### 4.3.4 ปริมาณจุลินทรีย์ในดินระหว่างเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพ

ปริมาณจุลินทรีย์ในดินระหว่างการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติก-แอซิดและเชื้อขาน้อยมีจำนวนเพิ่มขึ้นโดยจำนวนจุลินทรีย์ในดินที่ฝังพอลิแลคติกแอซิดมีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเร็วกว่าในดินที่ฝังเชื้อขาน้อย (ภาพที่ 4.7) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในช่วงแรกทั้งนี้อาจเป็นเพราะจุลินทรีย์ที่ย่อยเซลลูโลสปกติเป็นพวกมีโซไฟล์ (Mesophile) เจริญได้ดีในอุณหภูมิห้องจึงปรับตัวให้เข้ากับอุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียสได้ช้า ในขณะที่อุณหภูมิสูงทำให้อุณหภูมิการสทรานซิชันของพอลิแลคติกแอซิดมีแนวโน้มแตกสลายง่ายอยู่แล้วเมื่อแตกสลายเป็นกรดแลคติกที่จุลินทรีย์นำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายจึงมีจำนวนจุลินทรีย์และคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นได้เร็ว อย่างไรก็ตามหลังจากบ่ม 15 วันแล้วจำนวนจุลินทรีย์ก็ใกล้เคียงกันไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง

จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณจุลินทรีย์ในดินระหว่างเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพในดินที่ใส่บรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิด เชื้อขาน้อยและชุดควบคุมแตกต่างกันในช่วง 15 วันแรกอย่างมีนัยสำคัญแต่ในช่วง 30 ถึง 90 วันพบว่าปริมาณจุลินทรีย์ในดินไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05





ภาพที่ 4.7 จำนวนจุลินทรีย์จากตัวอย่างดิน 1 กรัมจากการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเชื้อชานอ้อยที่ระยะเวลาการศึกษา 90 วัน

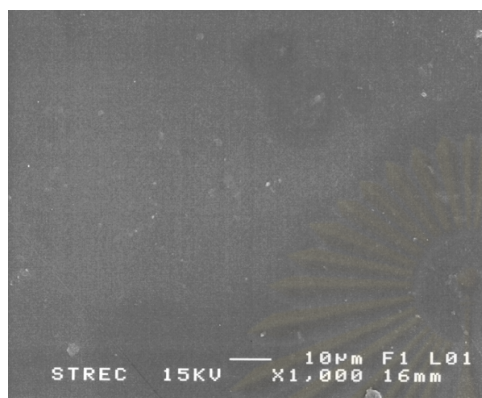
#### 4.3.5 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติก-แอซิดและเชื้อชานอ้อย

ศึกษาลักษณะทางกายภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเชื้อชานอ้อยด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (SEM) โดยบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในการศึกษาเป็นบรรจุภัณฑ์ที่พบในชุดทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวในแนวระนาบและแนวขวางของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเชื้อชานอ้อยที่ทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการตามเงื่อนไขที่ระบุไว้ในหัวข้อ 4.3 และบ่งชี้ถึงผลกระทบของสิ่งแวดล้อม

##### 4.3.5.1 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวในแนวระนาบของบรรจุภัณฑ์จากการศึกษาในชุดทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการ

ลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวในแนวระนาบของบรรจุภัณฑ์ พบว่าก่อนทำการศึกษาบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดมีพื้นผิวเรียบ (ภาพที่ 4.8 วันที่ 0) เมื่อบ่มที่ 58 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วัน เริ่มมีรอยแตกกระจายอยู่ทั่วพื้นผิวอย่างชัดเจน ที่ 60 วัน พอลิแลคติกแอซิดมี

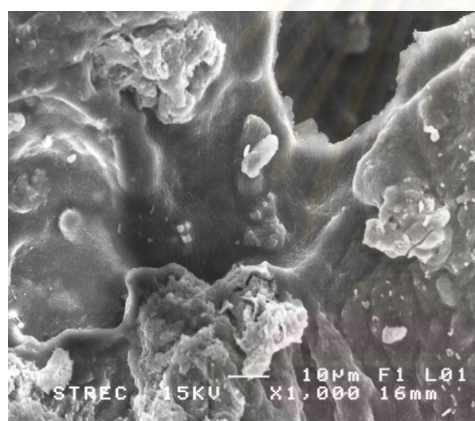
ลักษณะพื้นผิวขรุขระอาจเนื่องมาจากพื้นผิวที่แตกได้หลุดออกไป ในวันที่ 90 ไม่พบชั้นบรรจุภัณฑ์ ในชุดทดสอบเลย



วันที่ 0



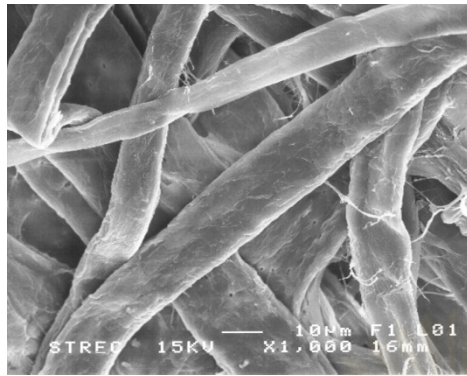
วันที่ 30



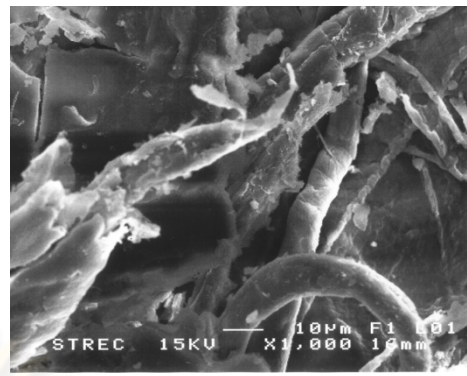
วันที่ 60

ภาพที่ 4.8 ลักษณะทางกายภาพของการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิแลคติกแอซิด ในแนวระนาบที่ 0 (ก่อนการศึกษา), 30 และ 60 วัน ในห้องปฏิบัติการ

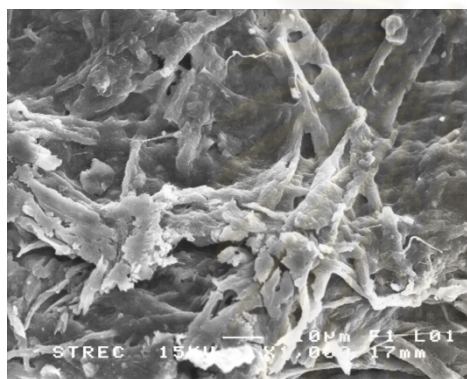
การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดเยื่อชานอ้อย ลักษณะของวัสดุเป็นเส้นใย เห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 4.9 วันที่ 0) ซึ่งเป็นลักษณะปกติของเยื่อชานอ้อย เมื่อบ่มไปจนถึงวันที่ 30 พบว่าเส้นใยถูกย่อยสลายไปบางส่วนและยังคงมีเส้นใยที่ยังสมบูรณ์เหลืออยู่ ไม่สามารถระบุได้ ชัดเจนว่าการย่อยสลายเกิดขึ้นที่เปอร์เซ็นต์แต่เส้นใยที่เหลือไม่ทับซ้อนกันหนาเหมือนวันที่ 0 ทำให้มองเห็นพื้นเรียบๆที่คาดว่าเป็นสารยึดเส้นใยให้คงรูปเป็นภาชนะ เมื่อถึงวันที่ 60 เส้นใยสลายไป เกือบหมดเหลือเพียงร่องรอยของเส้นใยอยู่บนพื้นหลังเรียบๆ ซึ่งพอถึงวันที่ 90 ก็ไม่เหลือร่องรอย ของเส้นใยเหลืออยู่ มีเหลือเพียงผิวค่อนข้างเรียบของเยื่อบางๆ เท่านั้น



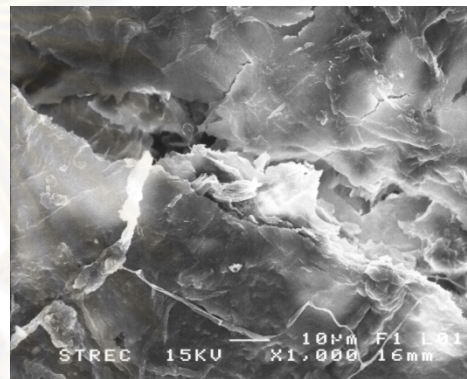
วันที่ 0



วันที่ 30



วันที่ 60



วันที่ 90

ภาพที่ 4.9 ลักษณะทางกายภาพของการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของเยื่อชานอ้อยในแนวระนาบ ที่ 0, 30, 60 และ 90 วัน ในห้องปฏิบัติการ

#### 4.3.5.2 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวในแนวระนาบของบรรจุภัณฑ์จากการศึกษาในบ่อฝังกลบ

การย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและบรรจุภัณฑ์ชนิดเยื่อชานอ้อย ณ บ่อฝังกลบเทศบาลจังหวัดสุพรรณบุรี โดยการฝังกลบขึ้นตัวอย่างลึก 1 เมตรจากพื้นที่ฝังกลบขยะจริงในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติแล้วเก็บตัวอย่างออกมาทุก 2 เดือน พบว่าบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดก่อนการทดสอบมีลักษณะพื้นผิวเรียบตลอดทั้งแผ่นเมื่อเพิ่มระยะเวลาการย่อยสลายเป็น 2 เดือนลักษณะพื้นผิวไม่แตกต่างจากเดิม (ภาพที่ 4.10) ที่ 4 เดือนเริ่มเห็นลักษณะการผุพังที่พื้นผิวโดยมีรอยแตกและมีการหลุดออกบางส่วน ที่ 6 เดือนพบว่ามีลักษณะของพอลิแลคติกแอซิดมีรอยแตกเพิ่มมากขึ้นมีการผุพังและหลุดออกของพื้นผิวที่ 10 เดือนมีลักษณะการผุพังทั่วพื้นผิวอย่างชัดเจนแต่ยังคงรูปแผ่นอยู่ เดือนที่ 12 มีการหลุดร่อนของผิวหน้าบางส่วนออกไปพื้นผิวที่เหลือมีลักษณะเป็นรูพรุน ส่วนบรรจุภัณฑ์ชนิดเยื่อชานอ้อยไม่พบชั้นบรรจุภัณฑ์เหลืออยู่ในบ่อฝังกลบที่ 2 เดือน

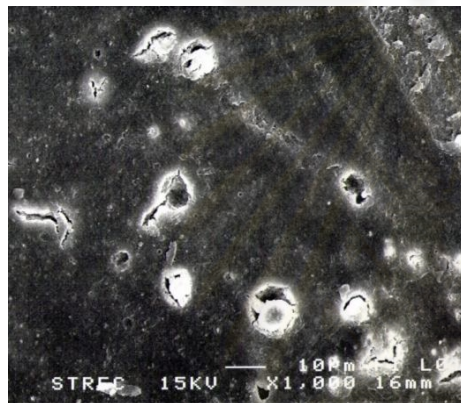




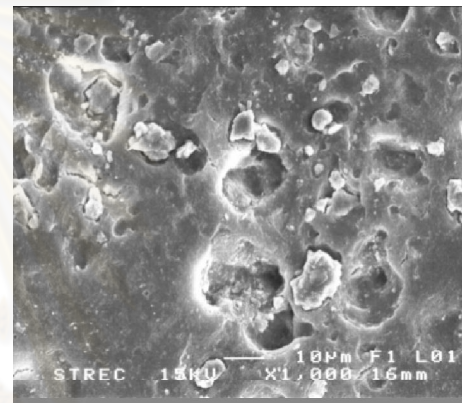
วันที่ 0



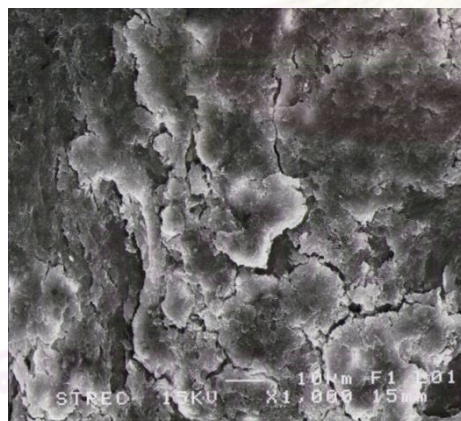
2 เดือน



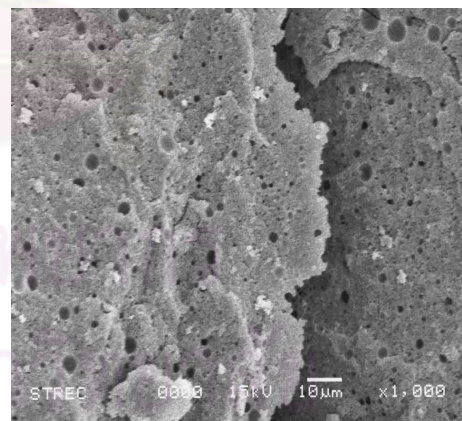
4 เดือน



6 เดือน



10 เดือน

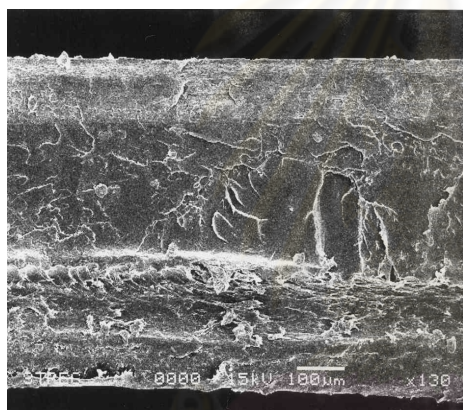


12 เดือน

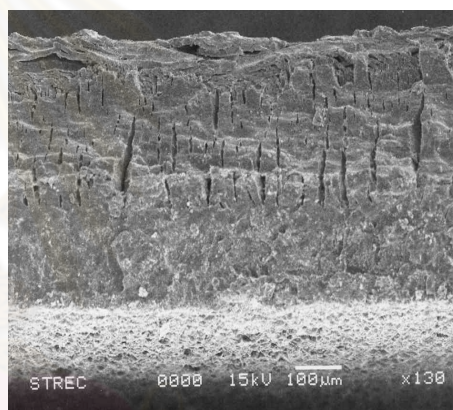
ภาพที่ 4.10 ลักษณะทางกายภาพของการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิแลคติกแอซิด  
ในแนวระนาบ ที่ 0, 2, 4, 6, 10 และ 12 เดือน ในบ่อฝังกลบ

#### 4.3.5.3 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวในแนวขวางของบรรจุภัณฑ์จากการศึกษาในชุดทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการ

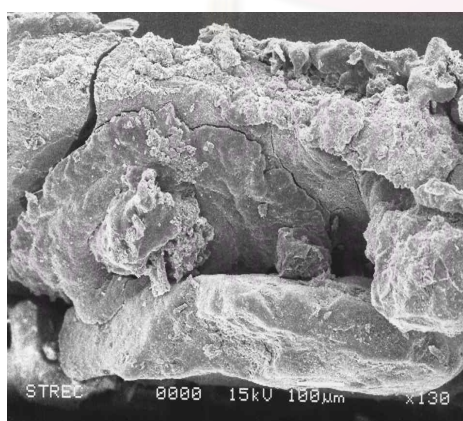
ศึกษาลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวในแนวขวางของบรรจุภัณฑ์ด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (SEM) เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงหลังการบ่มและเปรียบเทียบระหว่างบรรจุภัณฑ์ทั้งสองชนิดพบว่าก่อนทำการศึกษาพอลิแลคติกแอซิดมีลักษณะพื้นผิวแนวขวางไม่สม่ำเสมอไม่เหมือนพื้นผิวในแนวระนาบซึ่งเป็นพื้นผิวเรียบ (ภาพที่ 4.8) เนื่องจากลักษณะแนวขวางจะเห็นร่องรอยของการตัดบรรจุภัณฑ์ (ภาพที่ 4.11) เมื่อบ่มที่ 58 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วัน เริ่มมีรอยแตกเล็กกระจายอยู่ทั่วพื้นผิวแนวขวางอย่างชัดเจน ที่ 60 วันพอลิแลคติกแอซิดมีการแตกหักและพื้นผิวที่แตกได้หลุดออกไป ในวันที่ 90 ไม่พบชิ้นบรรจุภัณฑ์ทดสอบในชุดทดสอบเลย



0 วัน



30 วัน

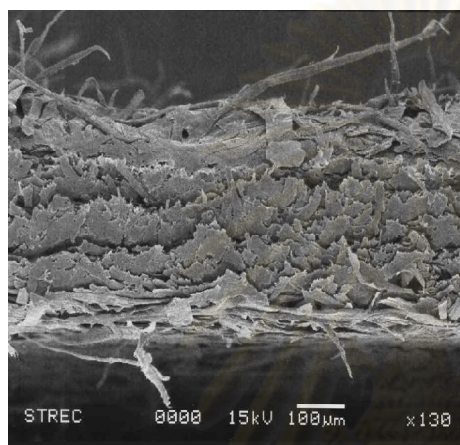


60 วัน

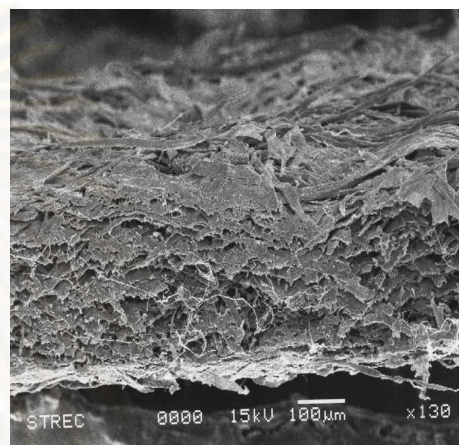
ภาพที่ 4.11 ลักษณะทางกายภาพของการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิแลคติกแอซิดในแนวขวางที่ระยะเวลา 0, 30 และ 60 วัน ในห้องปฏิบัติการ



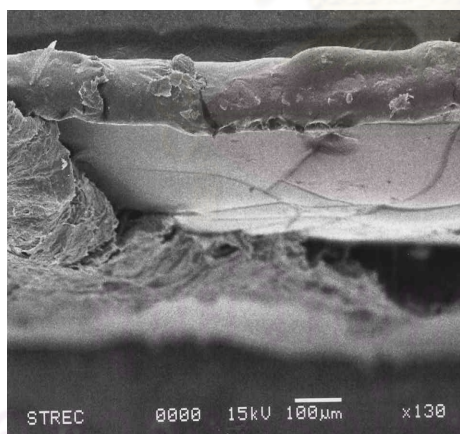
ในกรณีของบรรจุภัณฑ์ชนิดเยื่อชานอ้อย ก่อนการบ่มที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส มีลักษณะเป็นเส้นใยเห็นได้ชัดเจนรอยตัดมีลักษณะเป็นแผ่นแบนซ้อนกันเป็นชั้นๆ (ภาพที่ 4.12 วันที่ 0) วันที่ 30 พบว่าเส้นใยถูกย่อยสลายไปบางส่วนขึ้นบรรจุภัณฑ์ชนิดเยื่อชานอ้อยบางลงแม้ความหนาของบรรจุภัณฑ์ยังเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก เมื่อถึงวันที่ 60 เส้นใยสลายไปเกือบหมดและวันที่ 90 ยังพบขึ้นบรรจุภัณฑ์ในชุดทดสอบซึ่งมีความหนาลดลง



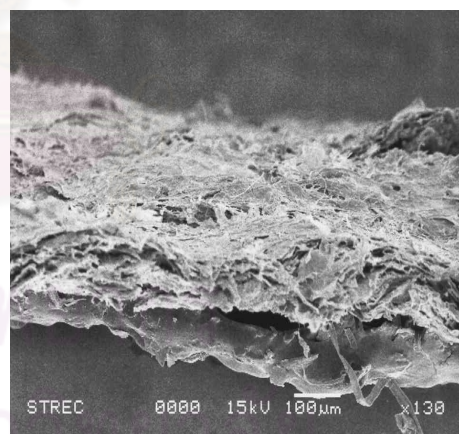
0 วัน



30 วัน



60 วัน



90 วัน

ภาพที่ 4.12 ลักษณะทางกายภาพของการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของเยื่อชานอ้อยในแนวขวางที่ 0, 30, 60 และ 90 วัน ในห้องปฏิบัติการ

#### 4.3.5.4 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวในแนวขวางของ บรรจุภัณฑ์จากการศึกษาในบ่อฝังกลบ

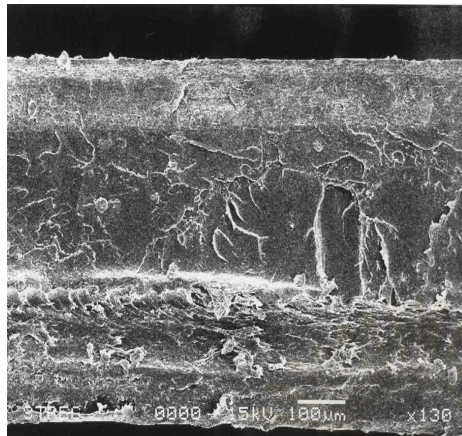
การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดที่ทำกา  
ทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพจากบ่อฝังกลบเทศบาลจังหวัดสุพรรณบุรี พบว่าพอลิแลคติก-  
แอซิดก่อนการทดสอบไม่มีลักษณะของการผุปรากฏเมื่อเพิ่มระยะเวลาการย่อยสลายเป็น 2 เดือน  
ลักษณะพื้นผิวไม่แตกต่างจากเดิม (ภาพที่ 4.13) ที่ 4 เดือนเริ่มเห็นลักษณะการผุพังที่บริเวณขอบ  
ของบรรจุภัณฑ์และมีการหลุดออกบางส่วน ที่ 6 เดือนพบว่าลักษณะของพอลิแลคติกแอซิดมีรอย  
แตกเพิ่มมากขึ้นมีการผุพังและหลุดออกของพื้นผิวลึกเข้าไปในเนื้อบรรจุภัณฑ์ ที่ 10 เดือนมี  
ลักษณะการแตกและผุพังอย่างชัดเจนและที่ 12 เดือนขึ้นบรรจุภัณฑ์แตกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ให้ความ  
หนาของชิ้นบรรจุภัณฑ์ลดลงและไม่พบชิ้นบรรจุภัณฑ์ที่ 16 เดือน

ลักษณะที่สังเกตเห็นจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่าบรรจุภัณฑ์ชนิดเยื่อชานอ้อยถูก  
ย่อยสลายไปเกือบหมดเหลือเพียงเยื่อบางๆ ซึ่งอาจเป็นสารเคลือบผิวหน้าบรรจุภัณฑ์เพื่อกันน้ำซึม  
เข้าเนื้อวัสดุ เมื่อเทียบกับบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดแล้วเยื่อชานอ้อยมีบางส่วนเหลืออยู่ที่  
90 วันแต่พอลิแลคติกแอซิดไม่เหลือชิ้นส่วนอยู่เลย

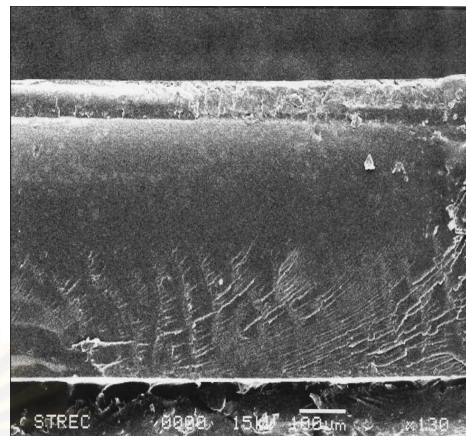
บรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดใช้เวลาถึง 4 เดือนในบ่อฝังกลบจึงเริ่มมีร่องรอยของการ  
ผุพังที่ชัดเจนดังแสดงในภาพที่ 4.10 และ 4.13 และใช้เวลา 16 เดือน จึงไม่พบบรรจุภัณฑ์ทดสอบ  
ในบ่อฝังกลบเช่นเดียวกับการทดลองในห้องปฏิบัติการที่ 90 วัน แสดงว่าปัจจัยที่ควบคุมในการ  
ทดลองในห้องปฏิบัติการมีผลให้การย่อยสลายเกิดขึ้นเร็วกว่า 5 เท่า ส่วนเยื่อชานอ้อยไม่พบ  
ชิ้นส่วนของบรรจุภัณฑ์ในการเก็บตัวอย่างที่ 2 เดือน แสดงว่าบ่อฝังกลบขณะในสภาพแวดล้อมตาม  
ธรรมชาติมีปัจจัยที่สามารถย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ชนิดเยื่อชานอ้อยได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

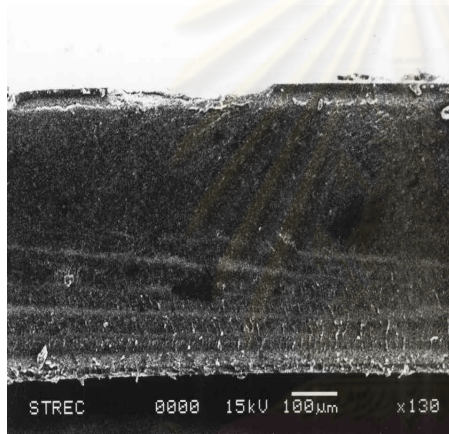




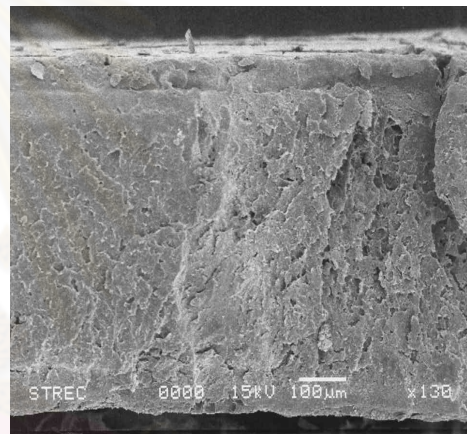
0 วัน



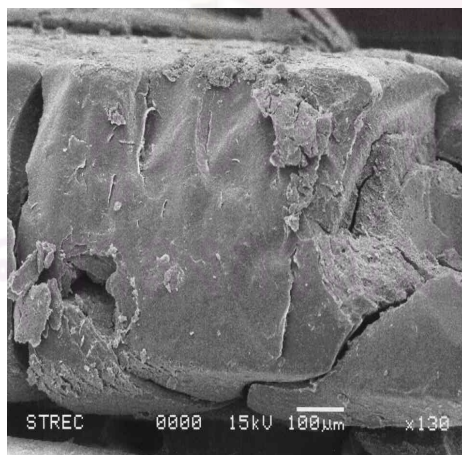
2 เดือน



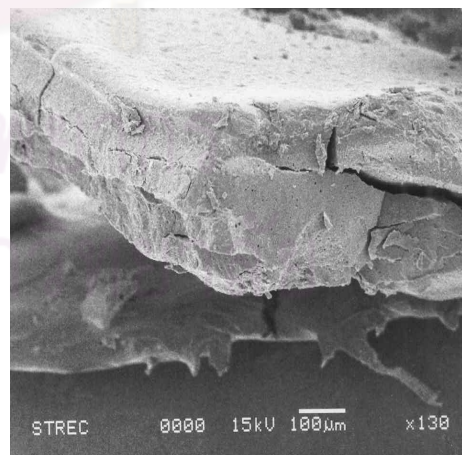
4 เดือน



6 เดือน



10 เดือน



12 เดือน

ภาพที่ 4.13 ลักษณะทางกายภาพของการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิแลคติกแอซิด  
ในแนวขวางที่ 0, 2, 4, 6, 10 และ 12 เดือน ในบ่อฝังกลบ

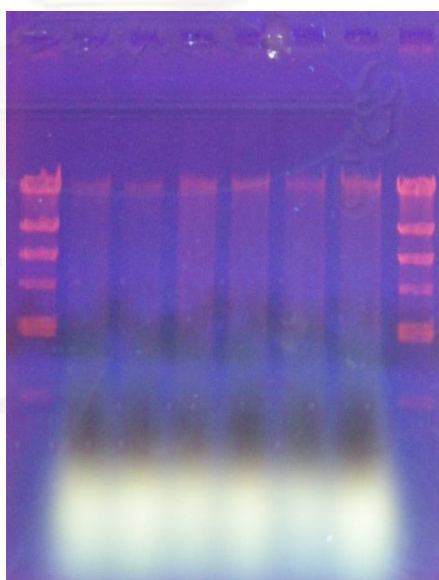
#### 4.4 ผลการย่อยสลายทางชีวภาพต่อประชาคมแบคทีเรียในดิน

ศึกษาประชาคมแบคทีเรียในดินที่มีการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์โดยใช้วิธีในหัวข้อ 3.5.5

##### 4.4.1 การสกัดดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ในดินจากการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อย

สกัดดีเอ็นเอจากดินที่ใช้ในการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพ โดยทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี freeze-thaw แล้วแยกเอาดีเอ็นเอพบว่า สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มีสารปนเปื้อนสีน้ำตาลถึงสีดำคาดว่าเป็นสารประเภทฮิวมิก (humic substances) ซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายดีเอ็นเอ มีผลในการยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (polymerase chain reaction) (Donnell และ Gorres, 1999) โดยจำกัดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย (Marschner, 2007) เมื่อทำการตรวจดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสพบว่าเกิด bright blue green band (ภาพที่ 4.14) เหมือนกับรายงานของหนึ่ง เตียอำรุงและนันทกร บุญเกิด (2544) ดังนั้นจึงต้องมีการทำดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินให้บริสุทธิ์เพื่อกำจัดสารประกอบฮิวมิกและสารที่ยับยั้งปฏิกิริยาชนิดอื่นๆ ก่อนการเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสต่อไป

1 2 3 4 5 6 7 8



ภาพที่ 4.14 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างดินที่ใช้ในการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพ  
ช่องวิ่งที่ 1 และ 8 : Lambda HindIII marker ช่องวิ่งที่ 2-7: ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างดิน

#### 4.2.2 การกำจัดสารประเภทชีวมิกจากตัวอย่างดีเอ็นเอ

กำจัดสารประเภทชีวมิกโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสแล้วทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยชุด NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kit (MACHERY-NAGEL, Germany) ตามหัวข้อ 3.5.5 ข้อ 2) และ ข้อ 3) พบว่าได้สารละลายดีเอ็นเอใสไม่มีสีมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามข้อ 3.5.5 ข้อ 4) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (ภาพที่ 4.15)

1 2 3 4



ภาพที่ 4.15 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ช่องวิ่งที่ 1: 100 bp DNA ladder ช่องวิ่งที่ 2-4 : ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

#### 4.4.3 ประชาคมแบคทีเรียจากการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อย

ศึกษาประชาคมแบคทีเรียในดินระหว่างเกิดกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ทั้งสองชนิดคือ พอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อยด้วยเทคนิค DGGE โดยใช้พอลิอะคริลาไมด์เจลที่มีเกรเดียนต์ของความเข้มข้น denaturant 30- 70 % เพื่อแสดงให้เห็นความหลากหลายทางโครงสร้างของประชาคมแบคทีเรียในเวลาที่แตกต่างกันเก็บตัวอย่างดินตั้งแต่วันที่ 0 (ดินก่อนการทดลอง) 30, 60 และ 90 ของการศึกษา แลบดีเอ็นเอที่ปรากฏจะเป็นตัวแทนของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์



#### 4.4.3.1 ประชาคมแบคทีเรียจากการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดเยื่อชานอ้อย

จากตัวอย่างดินที่ใช้ศึกษาการย่อยบรรจุภัณฑ์ชนิดเยื่อชานอ้อย พบว่าประชาคมแบคทีเรียในดินมีความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอจาก DGGE เพิ่มขึ้นตามเวลาที่ย่อยสลาย (ภาพที่ 4.16) อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียในดินได้อาหารจากการย่อยสลายทำให้มีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น จนมากพอที่จะตรวจพบได้ด้วย DGGE ในวันที่ 90 อาหารลดลงทำให้แถบดีเอ็นเอกลับจางลงเหลือแถบที่ชัดเจนน้อยมาก

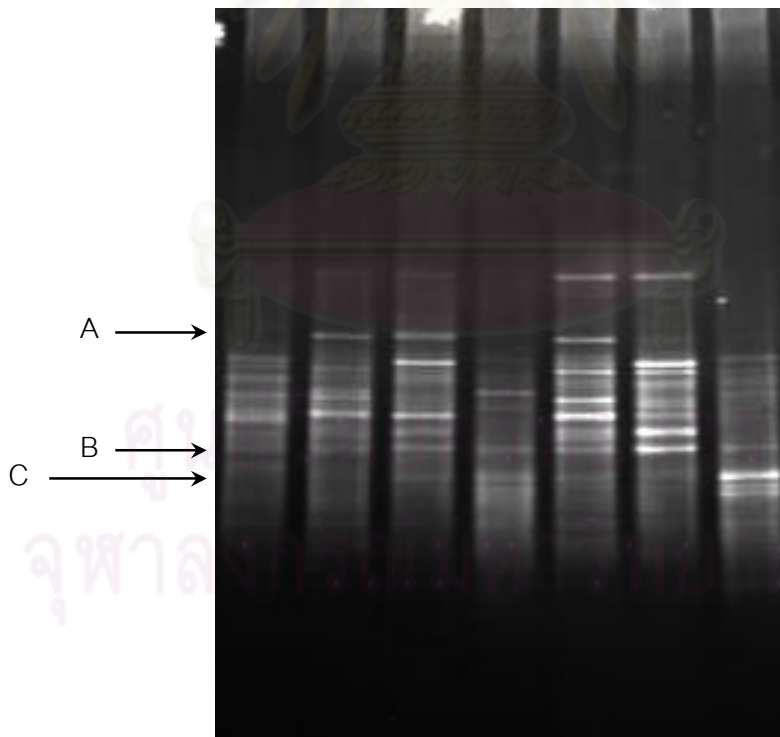
จากการศึกษาประชาคมแบคทีเรียในดินระหว่างเกิดกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดเยื่อชานอ้อยพบว่า มีการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียที่น่าสนใจคือตำแหน่ง A จากภาพแสดงให้เห็นว่าก่อนทำการทดสอบในดิน ไม่พบแถบดีเอ็นเอ (ช่องวิ่งที่ 1) เมื่อศึกษาการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ชนิดเยื่อชานอ้อยที่ระยะเวลา 30 วันพบว่ามีแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้นอย่างชัดเจนจนกระทั่งถึงวันที่ 60 ของการศึกษา ส่วนในวันที่ 90 ไม่พบแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งดังกล่าว ส่วนในชุดควบคุมที่ไม่ใส่บรรจุภัณฑ์ทดสอบพบว่า ในวันที่ 30 ของการศึกษามีแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้นอย่างชัดเจน (ช่องวิ่งที่ 5) แต่กลับจางลงที่ 60 วันและหายไปเลยในวันที่ 90 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะที่อุณหภูมิสูง 58 องศาเซลเซียส แบคทีเรียเทอร์โมไฟล์จะเจริญเติบโตได้ดีมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น จึงพบว่าในวันที่ 30 มีแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้นชัดเจน ทั้งในดินที่ใส่บรรจุภัณฑ์ทดสอบและดินชุดควบคุม ในวันที่ 60 และ 90 ชุดทดลองมีการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์จึงยังมีอาหารให้แบคทีเรียใช้ จนถึงวันที่ 60 ส่วนในวันที่ 90 อาหารของแบคทีเรียตำแหน่ง A ถูกย่อยสลายไปหมดแล้วจึงไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งดังกล่าว แบคทีเรียที่ตำแหน่งนี้อาจเป็นผู้ย่อยสลายหรือได้รับอาหารจากการย่อยสลายก็ได้ซึ่งต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ในตำแหน่ง B พบว่าในดินก่อนการศึกษาการย่อยสลายมีแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้นบ้าง เมื่อทำการศึกษาโดยการใส่บรรจุภัณฑ์ชนิดเยื่อชานอ้อยพบว่าในวันที่ 30, 60 และ 90 ยังคงมีแถบดีเอ็นเอปรากฏอยู่ตลอดการศึกษาและพบว่าที่ 60 วัน แถบดีเอ็นเอมีความเข้มมากที่สุดซึ่งสอดคล้องกับวันที่ 60 ของการศึกษาในดินที่ไม่ใส่บรรจุภัณฑ์ทดสอบคือมีแถบดีเอ็นเอเด่นชัดที่สุด

แสดงว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถอยู่รอดได้จนถึงวันสุดท้ายของการทดลองแต่ไม่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์เพราะพบได้ในชุดควบคุมเช่นกัน

ในตำแหน่ง C พบว่าในดินก่อนการศึกษาการย่อยสลายมีแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้นบ้างๆ เมื่อทำการศึกษาการย่อยสลายโดยการใส่บรรจุภัณฑ์ชนิดเยื่อชานอ้อยพบว่ามีความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอจากวันที่ 30, 60 และ 90 ตามลำดับ ส่วนในดินที่ไม่ได้ใส่บรรจุภัณฑ์ทดสอบ พบว่ามีความสอดคล้องกัน ดังนั้นแบคทีเรียในตำแหน่งนี้จึงไม่ใช่แบคทีเรียที่ย่อยสลายบรรจุภัณฑ์เช่นเดียวกับตำแหน่ง B

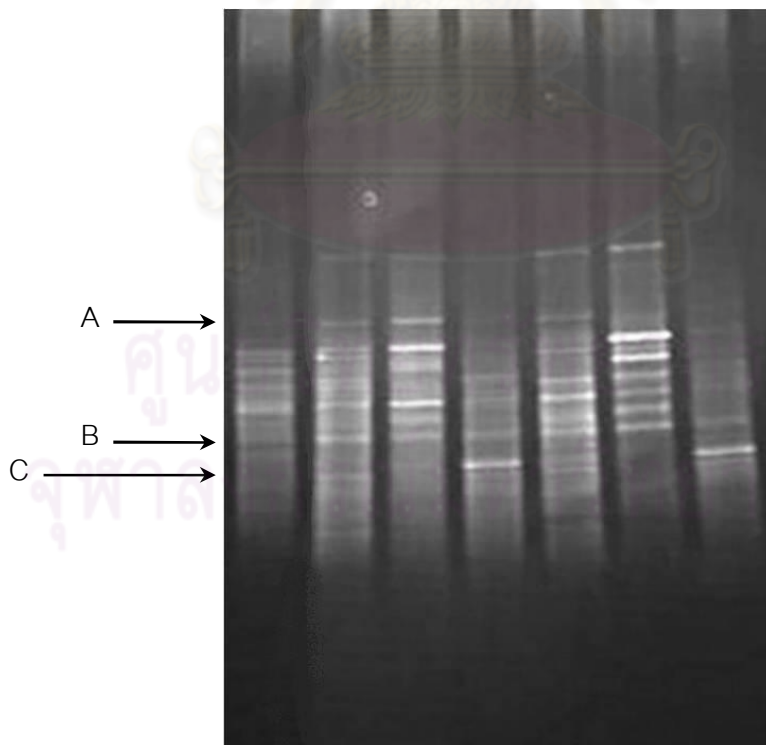
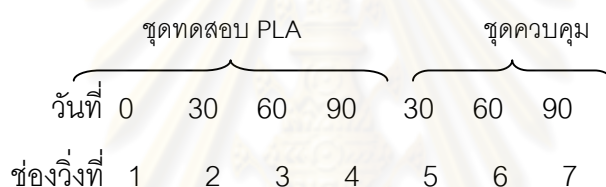
| ชุดทดสอบเยื่อชานอ้อย |    |    |    | ชุดควบคุม |    |    |
|----------------------|----|----|----|-----------|----|----|
| วันที่ 0             | 30 | 60 | 90 | 30        | 60 | 90 |
| ช่องวิ่งที่ 1        | 2  | 3  | 4  | 5         | 6  | 7  |



ภาพที่ 4.16 ประชาคมแบคทีเรียจากตัวอย่างดินระหว่างเกิดกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดเยื่อชานอ้อยด้วยเทคนิค DGGE

#### 4.4.3.2 ประชาคมแบคทีเรียจากการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิด

พบว่ามีความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 4.17) ในโปรไฟล์ DGGE ของดินที่ใส่วัสดุทดสอบและดินชุดควบคุมเพิ่มขึ้นในวันที่ 30 และ 60 แล้วลดลงในวันที่ 90 อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ได้อาหารจากการย่อยสลายสารอินทรีย์และบรรจุภัณฑ์ในดินเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตแล้วอาหารลดลงในวันที่ 90 และพบว่าโปรไฟล์ DGGE ของแบคทีเรียในดินที่ใส่วัสดุทดสอบมีแถบดีเอ็นเอบางกว่าโปรไฟล์ DGGE ของแบคทีเรียในดินชุดควบคุม อาจเนื่องมาจากดินชุดทดสอบมีบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดที่เติมลงไปในการย่อยสลายอาจเกิดกรดแลคติกขึ้นทำให้แบคทีเรียต้องปรับตัวเพื่อให้สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตมากกว่า



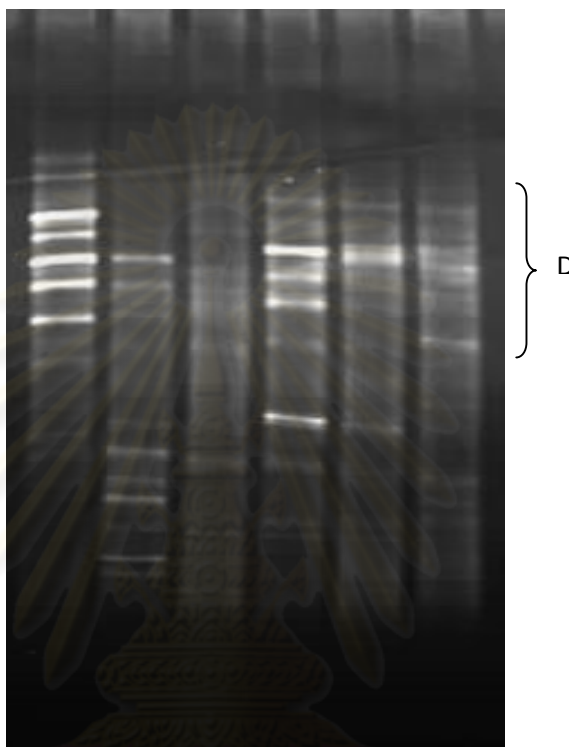
ภาพที่ 4.17 ประชาคมแบคทีเรียจากตัวอย่างดินระหว่างเกิดกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดด้วยเทคนิค DGGE

จากการศึกษาประชาคมแบคทีเรียในดินระหว่างเกิดกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของ  
 บรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิด พบว่าคล้ายกันกับการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ชนิดเยื่อชานอ้อย  
 แม้กระทั่งตำแหน่งดีเอ็นเอที่เปลี่ยนแปลงอย่างน่าสนใจ 3 แถบคือ A B และ C

#### 4.4.3.3 ประชาคมแบคทีเรียจากการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพใน บ่อฝังกลบ

การศึกษาโดยทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพจากบ่อฝังกลบเทศบาลจังหวัดสุพรรณบุรี  
 โดยการฝังกลบชิ้นตัวอย่างเล็ก 1 เมตร จากพื้นที่ฝังกลบขยะจริงในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ  
 แล้วเก็บตัวอย่างออกมามีวิเคราะห์ทุก 2 เดือน นำตัวอย่างดินมาศึกษาประชาคมแบคทีเรียของการ  
 ย่อยสลายพอลิแลคติกแอซิด(ภาพที่ 4.18) จากเดือนที่ 2 ของการศึกษาการย่อยสลายจนถึงเดือน  
 ที่ 12 (ช่องวิ่งที่ 2-6) พบว่าลักษณะโปรไฟล์ DGGE มีความหลากหลายและพบแถบดีเอ็นเอใน  
 บริเวณตำแหน่ง D ตลอดการศึกษาทั้งในการย่อยสลายเยื่อชานอ้อยและพอลิแลคติกแอซิดแสดง  
 ว่าในบ่อฝังกลบขยะมีแบคทีเรียที่สามารถอยู่รอดได้ตลอดการศึกษาเป็นแบคทีเรียเด่น ที่การย่อย  
 สลาย 6 เดือน (ช่องวิ่งที่ 4) มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอมากที่สุดแสดงว่ามีจำนวนแบคทีเรียมาก  
 ซึ่งจากผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของวัสดุทดสอบด้วยเครื่อง SEM (ภาพที่ 4.10 และ  
 4.13) พบว่าที่ 2 เดือนยังไม่มีการฝังที่พื้นผิวของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแต่เริ่มมีการฝังที่  
 ระยะเวลาการย่อยสลายที่ 4 เดือนและมีการฝังและแตกของพื้นผิวบรรจุภัณฑ์อย่างชัดเจนที่  
 ระยะเวลาการย่อยสลายที่ 6 เดือน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาด้วยเทคนิค DGGE ที่ปรากฏแถบ  
 ดีเอ็นเอชัดเจนที่สุดแต่กลับพบว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ 4 เดือนจางกว่าที่ 2 เดือน แสดงว่า  
 แบคทีเรียในดินอย่างเดี่ยวแทบจะไม่มีส่วนในการย่อยสลายในระยะ 2 เดือนแรก อาจเป็นไปได้ว่า  
 แบคทีเรียบางชนิดยังไม่เจริญหรือเจริญได้น้อยมากจนไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอออกมาได้หรืออาจมี  
 แบคทีเรียบางชนิดกำลังปรับตัวเพื่อให้เกิดความเคยชินกับบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิด เมื่อ  
 เปรียบเทียบการย่อยสลายในบ่อฝังกลบขยะกับการศึกษาการย่อยสลายในห้องปฏิบัติการพบว่า  
 การย่อยสลายในบ่อฝังกลบขยะมีการย่อยสลายได้ช้ากว่า ส่วนบรรจุภัณฑ์เยื่อชานอ้อยเมื่อเก็บ  
 ตัวอย่างที่ 2 เดือนไม่พบวัสดุทดสอบเหลืออยู่แล้ว เมื่อดูโปรไฟล์ DGGE ของการศึกษาการย่อย  
 สลายเยื่อชานอ้อย (ช่องวิ่งที่ 1) พบว่ามีความหลากหลายของประชาคมแบคทีเรียและแถบดีเอ็นเอ  
 มีความเด่นชัดกว่าโปรไฟล์ DGGE ของการศึกษาการย่อยสลายพอลิแลคติกแอซิดที่ 2 เดือน (ช่อง  
 วิ่งที่ 2)

| เยื่อชานอ้อย  | PLA |   |   |    |    |
|---------------|-----|---|---|----|----|
| เดือนที่ 2    | 2   | 4 | 6 | 10 | 12 |
| ช่องวิ่งที่ 1 | 2   | 3 | 4 | 5  | 6  |



ภาพที่ 4.18 ประชาคมแบคทีเรียจากการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพด้วยการฝังกลบจากบ่อฝังกลบเทศบาลจังหวัดสุพรรณบุรีด้วยเทคนิค DGGE

#### 4.4.3.4 การระบุชนิดของแบคทีเรียที่น่าสนใจ

ประชาคมแบคทีเรียของการศึกษาการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อยมีแถบดีเอ็นเอที่น่าสนใจอยู่ 3 ตำแหน่งคือ A B และ C ดังแสดงในภาพที่ 4.16 และ 4.17 ตัดชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจออกจากเจลละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำปลอดประจุและนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าตำแหน่ง A, B และ C มีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์แบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียที่พบเป็นกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงหรือเพาะเลี้ยงได้ยากในห้องปฏิบัติการ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.3 โดยลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงไว้ในภาคผนวก ค



ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อย

| ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอ | สายพันธุ์แบคทีเรีย             | หมายเลขอ้างอิง | เปอร์เซ็นต์ความเหมือน |
|--------------------|--------------------------------|----------------|-----------------------|
| A                  | Uncultured bacterium           | AY344879       | 79 %                  |
| B                  | Uncultured <i>Bacillus</i> sp. | EF370659       | 98 %                  |
| C                  | Uncultured bacterium           | EF418074       | 95 %                  |

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ โดยเลือกใช้บรรจุภัณฑ์ที่ทำจากพอลิแลคติกแอซิดและบรรจุภัณฑ์ที่ทำจากเยื่อชานอ้อย จากการทดลองแบบแฟคตอเรียล ดีไซน์ (Factorial Design) สำหรับ 3 ปัจจัยได้แก่ ชนิดของบรรจุภัณฑ์ อุณหภูมิและไนโตรเจน โดยใช้ปฏิกิริยาเป็นแหล่งของไนโตรเจน ใช้เวลาในการทดสอบ 30 วัน วัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นเพื่อเป็นดัชนีการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ด้วยจุลินทรีย์ พบว่าที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียสและไม่เติมยูเรียมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นสูงสุดสำหรับบรรจุภัณฑ์ ทั้ง 2 ชนิด นำปัจจัยที่ได้มาทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของบรรจุภัณฑ์ทั้ง 2 ชนิดโดยขยายเวลาศึกษาเป็น 90 วัน พบว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 45 แล้วลดลง ในช่วงเวลาต่อมา น้ำหนักบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและเยื่อชานอ้อยลดลง 100 และ 96 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักตามลำดับ การย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ทั้ง 2 ชนิดไม่มีผลต่อความเป็นกรดต่าง ของดิน การฝังกลบขึ้นบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดและชนิดเยื่อชานอ้อยลึก 1 เมตรในหลุม ฝังกลบขยะจริงในสภาพธรรมชาติ พบว่าการย่อยสลายของบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดในห้องปฏิบัติการเกิดขึ้นเร็วกว่าการย่อยสลายในพื้นที่ฝังกลบถึง 5 เท่า แต่บรรจุภัณฑ์ชนิดเยื่อชานอ้อยในพื้นที่ฝังกลบย่อยสลายเร็วกว่าในห้องปฏิบัติการ

ดังนั้นการย่อยสลายบรรจุภัณฑ์ชนิดพอลิแลคติกแอซิดต้องใช้อุณหภูมิสูงที่ 58 องศาเซลเซียสและใช้เวลา 90 วัน สามารถย่อยสลายได้หมด ส่วนบรรจุภัณฑ์ชนิดเยื่อชานอ้อยย่อยสลายหมดภายใน 60 วันในหลุมฝังกลบขยะตามสภาวะธรรมชาติ การย่อยสลายจะช้าลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 58 องศาเซลเซียส การใช้เทคนิค Denature Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ศึกษาประชาคมแบคทีเรีย พบว่าประชาคมแบคทีเรียมีความหลากหลาย มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการศึกษาและแบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้จนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง จากการตรวจสอบพบว่า เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การนำเทคโนโลยีการติดตามจุลินทรีย์มาใช้ควรสกัดดีเอ็นเอจากดินให้ได้ปริมาณมากที่สุดเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่เป็นตัวแทนของตัวอย่าง การติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียด้วยเทคนิค DGGE ควรปรับเปอร์เซ็นต์เกรเดียนท์ของความเข้มข้น denaturant ให้แคบลงเพื่อให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลยึดออกจากกันมากขึ้น
2. การศึกษาประชาคมจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการย่อยสลายทางชีวภาพควรเก็บตัวอย่างดินที่บริเวณพื้นผิวของวัสดุทดสอบเพื่อให้ได้ตัวแทนจุลินทรีย์ในการศึกษาที่ถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น
3. ควรเพิ่มความถี่ของระยะเวลาการเก็บตัวอย่างทดลองเพื่อให้เห็นผลการศึกษาที่ชัดเจนยิ่งขึ้น
4. เนื่องจากพลาสติกชีวภาพมีอยู่หลายชนิดได้มาจากแหล่งวัตถุดิบในการผลิตแตกต่างกัน จึงควรศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของพลาสติกชีวภาพชนิดอื่นเพิ่มเติม

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, กุลฤดี แสงสีทอง, สุนีย์ โชตินิรันดา และรังสิมา ชลคุปรอด. 2552.

วัสดุชีวภาพรักษ์โลก. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์มันส์ฟิล์ม.

ควบคุมมลพิษ, กรม. 2552. การกำจัดขยะมูลฝอยแบบฝังกลบอย่างถูกหลักสุขาภิบาล. ส่วนขยะ  
มูลฝอยและสิ่งปฏิกูล สำนักงานจัดการกากของเสียและสารอันตราย กรมควบคุมมลพิษ  
กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.

ธนาดี ลีจากภัย. 2549. พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ. วารสารสมาคมโพลีเมอร์ประเทศไทย  
6 (มกราคม- เมษายน 2549): 3.

ธนาดี ลีจากภัย, นุกุล เอื้อพันธเศรษฐ, ก้องเกียรติ คงสุวรรณ, โยษิตา ฤดีกิจ และภักดี รัตนนทร์  
.2548. การย่อยสลายของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์แบบใช้  
ออกซิเจน. ใน เอกสารประกอบการนำเสนอบทความวิชาการ การประชุมประจำปี สวทช.  
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทยสู่เศรษฐกิจยุคโมเดล.

นางลักษณ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 4.  
กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

บริษัท บรรจุก๊าซเพื่อสิ่งแวดล้อม จำกัด. 2008. บรรจุก๊าซเพื่อสิ่งแวดล้อม [ออนไลน์].  
แหล่งที่มา : [www.thaibpe.com](http://www.thaibpe.com) [2551, สิงหาคม 25]

ปกรณ์ โอภาประกาศิต และมัทนา โอภาประกาศิต. 2551. พอลิเมอร์วัสดุอเนกประสงค์  
[ออนไลน์]. แหล่งที่มา : [www.vcharkarn.com/varticle/18774/6](http://www.vcharkarn.com/varticle/18774/6) [2551, มิถุนายน 4]

ผู้จัดการออนไลน์. 2551. กรม.อนุมัติแผนพลาสติกชีวภาพ 1,800 ล้าน [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:  
[www.manager.co.th](http://www.manager.co.th) [2551, กรกฎาคม 23]

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ศูนย์วิจัยแห่งชาติด้าน  
การจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย และ Department of Environmental  
Engineering Osaka University, Japan. ใน รายงานการสัมมนาปฏิบัติการเรื่อง  
Monitoring Microbial Community Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis  
(DGGE). 18-20 เมษายน 2548 ณ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มัทนีย์ เศรษฐภักดี. (ม.ป.ป.). ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. คณะวิศวกรรมและเทคโนโลยีการเกษตร  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:  
<http://203.158.184.2/elearning/soilscience.htm> [2551, มกราคม 5]

ยงยุทธ โอสถสภา. 2553. ยูเรีย: การผลิต สมบัติการแปรสภาพในดินและความเป็นประโยชน์ต่อ  
พืช [ออนไลน์]. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.  
แหล่งที่มา: <http://www.dryongyuth.com/journal.html> [2553, สิงหาคม 1]

วลัยพร ทิมบุญธรรม, วีรศักดิ์ สมितिพงศ์, วิไลพร เจตจันทร์ และกล้าณรงค์ ศรีรอด. 2552.  
วัสดุชีวภาพรักษ์โลก. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์มนัสฟิล์ม.

วรรณะ ม้าเฉี่ยว. 2540. การใช้ไบโจามจุรีเป็นอาหารโคนม. ใน รายงานการประชุมสัมมนาทาง  
วิชาการสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 14 : สาขาสัตวศาสตร์และการประมง สถาบัน  
เทคโนโลยีราชมงคล ณ สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง.

วีรนุช หลาง. 2553. จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภัณฑิ์ นิรมัตน์. 2549. จุลชีววิทยาทางดิน. กรุงเทพมหานคร: โอ.เอส. พรีนติ้ง เฮาส์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2548. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร:  
สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

หนึ่ง เตียอำรุงและนันทกร บุญเกิด. 2544. ใน รายงานการวิจัยการพัฒนากาตรวจสุขภาพใบที่เรีย  
ในดินโดยใช้เทคนิคดีเอ็นเอติดตาม. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชา  
เทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

อลิสา วังใน. 2553. การบำบัดสารพิษทางชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์  
แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.



## ภาษาอังกฤษ

- Anderson, J. M., and Shive, M. S. 1997. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. Advanced Drug Delivery Reviews 28:5-24.
- Atlas, R. M., Brown, A. E., Dobra, K. W., and Miller, L. 1984. Experimental Microbiology: Fundamentals and Applications. New York: Collier Macmillan.
- ASTM international. 2006. Annual book of ASTM standards: D 5338 Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials Under Controlled Composting Conditions. 08. 03 vols. West Conshohocken.
- Berkesch, S. 2005. Biodegradable Polymers. Michigan State University.
- Border, P., Pollet, E., and Averous, L. 2009. Nano-biocomposites: Biodegradable polyester/nanoclay systems. Progress in Polymer Science 34:125- 155.
- Chandra, R., and Rustgi, R. 1998. Biodegradable polymers. Progress in Polymer science 23 : 1273-1335.
- Chiellini, E., and Solaro, R. 2002. Biodegradable Polymers and Plastics. 7<sup>th</sup> ed. New York: Plenum.
- Donnell, A. G. O., and Gorres, H.E. 1999. 16S rDNA method in soil microbiology. Environmental biotechnology 10 : 225-229.
- European-bioplastics. 2010. Life - Cycle Economy [online]. Available from: [www.european-bioplastics.org](http://www.european-bioplastics.org) [2010, January 4]
- Farrington, D. W., Lunt, J., Davies, S., and Blackburn, R. S. 2007. Biodegradable and sustainable fibres 192-220.
- Fog, K. 1988. The effect of added nitrogen on the rate of decomposition of organic matter. Biological review 63 : 433-462.

- Fukushima, K., Abbate, C., Tabuani, D., Gennari, M., and Camino, G. 2009. Biodegradation of poly (lactic acid) and its nanocomposite. Polymer Degradation and Stability 94:1646-1655.
- Gupta, A.P., and Kumar, V. 2007. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers- Polylactide : A critique. European Polymer 43: 4053-4074.
- Gupta, B., Revagade, N., and Hilborn, J. 2007. Poly-lactic acid fiber : An overview. Progress in Polymer science 32: 455-482.
- Haaland, P. D. 1989. Experimental Design in Biotechnology. New York : Marcel Dekker.
- Health Environment and Regulatory Affairs (HERA). 1997. Degradation of Polymers in Nature. Dow Corning .
- Hiemenz, P. C., and Lodge, T. P. 2007. Polymer Chemistry. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton : CRC Press.
- Ho, K. L. G., and Pometto, A. L. 1999. Temperature Effects on Soil Mineralization of Polylactic Acid Plastic in Laboratory Respirometers. Journal of Environmental Polymer Degradation 7:101-108.
- Ikura, Y., and Kudo. T. 1999. Isolation of microorganism capable of degrading poly-(L-lactide). The Journal of General and Applied Microbiology 45:247-251.
- Iovino, R., Zullo, R., Rao, M. A., Cassar, L., and Gianfreda, L. 2007. Biodegradation of polymer (lactic acid)/starch/coir biocomposites under controlled composting conditions. Polymer Degradation and Stability 93: 147-157.
- Ishigaki, I., Sugano, W., Nakanishi, A., Tateda, M., Ike, M., and Fujita, M. 2004. The degradability of biodegradable plastics and anaerobic waste landfill model reactors. Chemosphere 54: 225-233.

- Itavaara, M., Karjomaa, S., and Selin, J. F. 2002. Biodegradation of polylactide in aerobic and anaerobic thermophilic conditions. Chemosphere 46: 879-885.
- Jianzhong, Z., Xioli, L., Hanhu, J., and Mingsheng, D. 2009. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. Food Microbiology 26: 770-775.
- Kang, S., and Mills, A. L. 2006. The effect of sample size in studies of soil microbial community structure. Journal of Microbiological Method 66: 242-250.
- Kale, G., Auras, R., Singh, S. P., and Narayan, R. 2007. Biodegradability of polylactide bottles in real and simulated composting conditions. Polymer Testing 26 :1049-1061.
- Kale, G., Auras, R., and Singh, S.P. 2006. Degradation of Commercial Biodegradable Packages under Real composting and Ambient Exposure Condition. Polymer Environment 14: 317-334.
- Li, F., Wang, S., Liu, W., and Chen, G. 2008. Progress on biodegradation of polylactic acid a review. Acta Microbiologica Sinica 48(2):262-8
- Lim, L. T., Auras, R., and Rubino, M. 2008. Processing technologies for poly(lactic acid). Progress in Polymer Science 33: 820-852.
- Maier, R. M., Pepper, I. L., and Gerba, C. P. 2000. Environmental Microbiology. Academic Press. CANADA.
- Marschner, P. 2007. Soil Biology : Soil Microbial community Structure and Function Assessed by FAME, PLFA and DGGE - Advantages and Limitation. Vol 11 : Advanced Techniques in soil Microbiology. Verlag Berlin Heidelberg : Springer.
- Mohee, R., Unmar. G. D., Mudhoo, A., and Khadoo, P. 2007. Biodegradability of biodegradable/degradable plastic materials under aerobic and anaerobic conditions. Waste Management (19 July 2007).

- Mueller, R. J. 2006. Biological degradation of synthetic polyesters-Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. Process Biochemistry 41: 2124-2128.
- Muyzer, G., Waal, E. C. D., and Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology 59: 695-700.
- National Metal and Materials Technology Center (MTEC). 2007. biodegradable plastic [online]. Available from : [www2.mtec.or.th](http://www2.mtec.or.th) [ 2008, October 13]
- Nolan-ITU Pty Ltd. 2002. Environment Australia Biodegradable Plastics - Development and Environment Impact. Environment Australia.
- Oliver, W. 2005. Techno-economic Feasibility of Large-scale Production of Bio-based Polymers in Europe. Technical Report EUR 22103: European Communities. Spain.
- Pollack, R. A., Findlay, L., Mondschein, W., and Modesto, R. 2002. Laboratory exercises In microbiology. John Wiley & Sons. USA.
- Ros, M., Goberna, M., Pascual, J. A., Klammer, S., and Insam, H. 2008. 16S rDNA analysis reveals low microbial diversity in community level physiological profile assays. Journal of Microbiological Methods 72 : 221-226.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., and Ahmed, S. 2008. Biological degradation of plastic : A comprehensive review. Biotechnology Advances 26: 246-265.
- Shimao, M. 2001. Biodegradation of plastics. Environment biotechnology 12: 242-247.
- Siracusa, V., Rocculib, P., Romanib, S., and Rosa, M. D. 2008. Biodegradable polymers for food packaging : a review. Trends in Food Science & Technology 19: 634-643.

- Soderstrom, B., Baath, E., and Lundgren, B. 1983. Decrease in soil microbial activity and biomasses owing to nitrogen amendments. Canadian Journal Microbiology 29: 1500-1506.
- Thakuria, D., Schmidt, O., Siurta, M. M., Egan, D., and Doohan, F. M. 2008. Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses. Soil Biology & Biochemistry 40: 1390-1403.
- Tokiwa, Y., and Jarerat, A. 2004. Biodegradation of poly(L-lactide). Biotechnology Letters 26:771-777.
- Tomita, K., Tsuji, H., Nakajima, T., Kikuchi, Y., Ikarashi, K., and Ikeda, N. 2003. Degradation of poly (D-lactic acid) by a thermophile. Polymer Degradation and Stability 81:167-171.
- 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.
- Wei, Z., Jiangming, M., Yunting, F., Xiankai, L., and Hui, W. 2008. Effects of nitrogen deposition on the greenhouse gas fluxes from forest soils. Acta Ecologica Sinica 28: 2309-2319.
- Yang, Z. H., Xiao, Y., Zeng, G.M., Xu, Z. Y., and Liu, Y. S. 2007. Comparison of methods for total community DNA extraction and purification from compost. Applied Microbiology and Biotechnology 74: 918-925.
- Zhou, J., Bruns, M, A., and Tiedje, J. M. 1996. DNA recovery from soil of diverse composition. Applied and Environmental Microbiology 62: 316-322.





ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

## สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

## 1. สารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัล

|                            |       |           |
|----------------------------|-------|-----------|
| กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 12 N | 8.33  | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น                   | 91.67 | มิลลิลิตร |

## 2. 70 % เอทานอล

|                   |     |           |
|-------------------|-----|-----------|
| 99 % เอทานอล      | 700 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่นปลอดประจุ | 300 | มิลลิลิตร |

## 3. 20 % โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS)

|                             |    |      |
|-----------------------------|----|------|
| sodium dodecyl sulfate, SDS | 20 | กรัม |
|-----------------------------|----|------|

ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้ออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 100 มล. นิ่งงาเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 4. สารละลาย Tris-HCl pH 8 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

|                                 |     |      |
|---------------------------------|-----|------|
| Trizma base ( $C_4H_{11}NO_3$ ) | 1.2 | กรัม |
|---------------------------------|-----|------|

ละลายในน้ำประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเข้มข้นกรด-ด่าง เป็น 8 ด้วย กรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำปลอดประจุจนได้ ปริมาตร 1000 มิลลิิตร นิ่งงาเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 5. สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์

|   |       |      |
|---|-------|------|
| EDTA ( $C_{10}H_{14}Na_2 \cdot 2H_2O$ ) | 186.1 | กรัม |
| โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaCl)                | 20    | กรัม |

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมกรดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากัน รอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ ปริมาตร 1000 มล. นิ่งงาเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 6. บัฟเฟอร์ TE

|  |     |           |
|--|-----|-----------|
| Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ | 10  | มิลลิลิตร |
| EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์    | 0.2 | มิลลิลิตร |

เติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร หนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 7. สารละลาย 5% CTAB

|      |   |      |
|------|---|------|
| CTAB | 5 | กรัม |
|------|---|------|

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตรนำไปหนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 8. DNA extraction buffer ปริมาณ 150 มิลลิลิตร

|                                  |    |           |
|----------------------------------|----|-----------|
| Tris-HCl 1 M pH 8.0              | 15 | มิลลิลิตร |
| สารละลายโซเดียมฟอสเฟต 1 M pH 8.0 | 15 | มิลลิลิตร |
| ละลาย EDTA 0.5M pH 8.0           | 30 | มิลลิลิตร |
| สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 M       | 45 | มิลลิลิตร |
| 5% CTAB                          | 30 | มิลลิลิตร |
| น้ำปลอดประจุ                     | 15 | มิลลิลิตร |

## สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ DGGE

### 9. 0% denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล

|                              |    |           |
|------------------------------|----|-----------|
| 40% อะคริลาไมด์/ บิส         | 20 | มิลลิลิตร |
| บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า | 2  | มิลลิลิตร |
| น้ำปลอดประจุ                 | 78 | มิลลิลิตร |

### 10. 100 % denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล

|                                    |     |           |
|------------------------------------|-----|-----------|
| 40% อะคริลาไมด์/ บิส               | 20  | มิลลิลิตร |
| บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า       | 2   | มิลลิลิตร |
| ฟอร์มามาไมด์                       | 40  | มิลลิลิตร |
| ยูเรีย                             | 42  | กรัม      |
| เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรสุทธิ | 100 | มิลลิลิตร |

**11. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10%**

|                       |     |           |
|-----------------------|-----|-----------|
| แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต | 0.1 | กรัม      |
| น้ำปลอดประจุ          | 1   | มิลลิลิตร |

**12. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร**

|   |     |           |
|---|-----|-----------|
| เอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร | 10  | ไมโครลิตร |
| น้ำกลั่น  | 200 | มิลลิลิตร |

ละลายให้เข้ากันเก็บในภาชนะปิดสนิทในที่มืด (ขณะเตรียมควรสวมถุงมือป้องกัน เนื่องจากเป็นสารก่อมะเร็ง)

**13. บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า**

|                                |      |           |
|--------------------------------|------|-----------|
| Tris-HCl                       | 242  | กรัม      |
| EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 โมลาร์ | 100  | มิลลิลิตร |
| กรดอะซิติกเข้มข้น              | 57.1 | มิลลิลิตร |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร หนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**14. อีการโรสเจลเข้มข้น 1 %**

|                              |     |           |
|------------------------------|-----|-----------|
| อีการโรสเจล                  | 1   | กรัม      |
| บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า | 100 | มิลลิลิตร |

หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟ

**15. อีการโรสเจลเข้มข้น 2 %**

|                              |     |           |
|------------------------------|-----|-----------|
| อีการโรสเจล                  | 2   | กรัม      |
| บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า | 100 | มิลลิลิตร |

หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟ

**16. สารละลายแบเรียม ไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.024 N**

|                   |     |      |
|-------------------|-----|------|
| แบเรียมไฮดรอกไซด์ | 3.8 | กรัม |
|-------------------|-----|------|

ละลายในน้ำอุ่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

## 17. Trypticase Soy Broth (TSB)

|                                 |          |
|---------------------------------|----------|
| Casein peptone                  | 17 กรัม  |
| Soybean peptone                 | 3 กรัม   |
| NaCl                            | 5 กรัม   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 2.5 กรัม |
| Glucose                         | 2.5 กรัม |

ปรับปริมาณให้ได้ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





## ภาคผนวก ค

## ลำดับนิวคลีโอไทด์

## ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วนของ 16S rDNA

## ตำแหน่ง A

```

>gb|AY344879.1| Uncultured bacterium clone ARDS67 16S rDNA ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=486

Score = 57.2 bits (62), Expect = 8e-06
Identities = 58/73 (79%), Gaps = 2/73 (2%)
Strand=Plus/Plus

Query 3   CCGAAGGGCTTCAGCGTTCACGCGGTTGTGCTCCATTC-CCCTTGGTGCCCTGCGG-AGA 60
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 61   CCGAAGGCCTTCATCGTTCACGCGGCGTTGCTCCGTTCCAGACTTCGTCCATTGCGGAAGA 120

Query 61   TTCCCCCTGCTG 73
          |||||  |||||
Sbjct 121  TTCCCTACTGCTG 133

```

## ตำแหน่ง B

```

>gb|GU397390.1| Bacillus jeotgali strain B36 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1454

Score = 250 bits (135), Expect = 1e-63
Identities = 140/142 (98%), Gaps = 1/142 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1    CGTC-AGGTACCGGCAGTTACTCCGGTACTTGTTCCTCCCTGACAACATAGCTTTACGAC 59
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 484  CGTCAAGGTACCGGCAGTTACTCCGGTACTTGTTCCTCCCTGACAACAGAGCTTTACGAC 425

Query 60   CCGAAGGCCTTCATCGCTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGA 119
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 424  CCGAAGGCCTTCATCGCTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGA 365

Query 120  TTCCCTACTGCTGCCTCCCGTA 141
          |||||  |||||
Sbjct 364  TTCCCTACTGCTGCCTCCCGTA 343

```

## ตำแหน่ง C

> [gb|EF418074.1](#) Uncultured bacterium clone BHS-16S13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=581

Score = 191 bits (103), Expect = 7e-46  
Identities = 115/121 (95%), Gaps = 0/121 (0%)  
Strand=Plus/Minus

```
Query 1 CCGGGTTTTCTCCCGCATAAAAAGCAGTTTACGACCCGTAGGGCCTTCATCCTGCACGC 60
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 124 CCGGGGGTTTCTCCCATATAAAAAGCAGTTTACAACCCATAGGGCCTTCATCCTGCACGC 65

Query 61 GGCATGGCTGGGTCAGGCTTTCGCCCATTTGCCCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAG 120
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 64 GGCATGGCTGGGTCAGGCTTTCGCCCATTTGCCCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAG 5

Query 121 G 121
      |
Sbjct 4 G 4
```



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสาธินี ศิริวัฒน์ เกิดเมื่อวันที่ 13 ตุลาคม พ.ศ. 2527 ที่จังหวัดสกลนคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีการศึกษา 2549 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย