โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การประยุกต์ใช้ขยะกระดาษเคลือบพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต สำหรับตรึงแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของอ้อย

ชื่อนิสิต นางสาวกวิสรา ไชยศรีรัมย์ รหัสประจำตัว 6032302523

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การประยุกต์ใช้ขยะกระดาษเคลือบพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต สำหรับตรึงแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของอ้อย

Utilization of Polybutylene succinate coated paper waste for immobilizing sugarcane growth promoting bacteria

ชื่อนิสิต นางสาว กวิสรา ไชยศรีรัมย์ **เลขประจำตัว** 6032302523

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงงาน การประยุกต์ใช้ขยะกระดาษเคลือบพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต สำหรับตรึงแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของอ้อย

โดย นางสาวกวิสรา ไชยศรีรัมย์ รหัสนิสิต 6032302523

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย

ปีการศึกษา 2563

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา

(ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน

(รองศาสตราจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อรฤทัย ภิญญาคง)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

การประยุกต์ใช้ขยะกระดาษเคลือบพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต สำหรับตรึงแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของอ้อย

โดย

นางสาวกวิสรา ไชยศรีรัมย์

รหัสประจำตัว 6032302523

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาตราจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ประจำปีการศึกษา 2563

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ การประยุกต์ใช้ขยะกระดาษเคลือบพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต สำหรับตรึงแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของอ้อย

ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวกวิสรา ไชยศรีรัมย์ รหัสประจำตัวนิสิต 6032302523

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย โทร 082 218 5070

ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการมีการใช้งานพลาสติกในชีวิตประจำวันอย่างกว้างขวาง พลาสติก Polybutylene succinate (PBS) ชนิด BioPBS เป็นพลาสติกชีวภาพที่ผลิตขึ้นจากวัตถุดิบธรรมชาติจึงสามารถย่อยสลายได้โดยไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ในงานวิจัยนี้สนใจใช้ประโยชน์ของกระดาษเคลือบ BioPBS ที่มาจากแก้วเครื่องดื่มใช้แล้ว เป็นวัสดุตรึงแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant growth promoting bacteria) ที่ประกอบด้วย *Bacillus thuringiensis* B2, *Bacillus stratosphericus* L19 และ *Bacillus altitudinis* T17 ผลการศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด พบว่าลักษณะพื้นผิวของกระดาษเคลือบ BioPBS เรียงตัวเป็นเส้นใยอัดแน่นและผิวขรุขระซึ่งง่ายต่อการยึดเกาะของแบคทีเรีย และเมื่อนำหัวเชื้อแบคทีเรียผสมตรึงบนกระดาษเคลือบ BioPBS ด้วยวิธีการบ่มแบบเขย่าเป็นเวลา 2 วัน พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียบนวัสดุตรึง 10^8 - 10^9 CFU ต่อกรัมวัสดุตรึง โดยการเขย่าทำให้วัสดุตรึงกระจายตัวและเส้นใยบนพื้นผิวของวัสดุตรึงเกิดการคลายตัว ส่งผลให้แบคทีเรียสามารถเข้าไปอยู่ในช่องว่างภายในวัสดุตรึงได้ นอกจากนั้นเมื่อทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียบนวัสดุตรึงในขวดทดลองปิดสนิท ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าแบคทีเรียบน BioPBS สามารถอยู่รอดได้ถึง 97% เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น ในขณะที่ชุดควบคุม คือ พลาสติก PLA มีปริมาณเชื้ออยู่รอดได้เพียง 79% เท่านั้น การติดตามการย่อยสลายของวัสดุตรึงทั้ง BioPBS และ PLA ในดินตัวอย่าง ในสภาวะอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วัน พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดเจน คาดว่าเนื่องจากดินมีความชื้นต่ำและโดนแสงแดดจัด ในเบื้องต้นจึงสรุปได้ว่าสามารถใช้กระดาษเคลือบ BioPBS เป็นวัสดุตรึงสำหรับแบคทีเรียในกลุ่ม PGPB และสามารถเก็บรักษาในรูปแห้งเพื่อใช้ประโยชน์ทางการเกษตรต่อไป โดยแผนงานต่อไปจะนำแบคทีเรียบนวัสดุตรึง BioPBS ไปทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของต้นอ้อยในสภาวะแล้ง โดยจะเก็บผลการทดลองความยาวใบ ลำต้น และราก พร้อมทั้งตรวจติดตามปริมาณเชื้อแบคทีเรียทนแล้งบริเวณราก

Project title Utilization of Polybutylene succinate coated paper waste for immobilizing sugarcane growth promoting bacteria

Name of student Miss Kawisara Chaisrirum Student ID. 6032302523

Project Advisor Assoc. Prof. Ekawan Luepromchai, Ph.D.

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Academic year 2020

Abstract

Plastics are extensively used in our everyday life. Polybutylene succinate (PBS) or BioPBS is a plastic derived from agricultural raw materials and can be degraded under natural environment. This research aimed to use BioPBS coated paper from the used drinking cups as carrier material to immobilize plant growth promoting bacteria (*Bacillus thuringiensis* B2, *Bacillus stratosphericus* L19 and *Bacillus altitudinis* T17). The characteristics under Scanning Electron Microscope (SEM) showed the surface of BioPBS coated paper was packed with fiber, of which its porosity allowed bacterial cells to attach on the surface and inside the carrier. After incubation for 2 days, the number of immobilized cells was 10^8 – 10^9 CFU/g carrier. Moreover, bacteria survival rate in BioPBS carriers after 8 weeks was 97% compared with the initial, meanwhile the bacterial survival rate on the controlled PLA was 79%. The degradation of BioPBS and PLA with immobilized cells were not detected in soil sample after 30 days. This was probably due to the low humidity and intense sunlight in soil. It was preliminary concluded that BioPBS coated paper could be applied as carrier for plant growth promoting bacteria and the immobilized cells could be stored for agricultural purposes. Further study will investigate the effect of bioPBS immobilized cells on promoting sugarcane growth under drought stress. The experiment will monitor the length of leaves, stalks and roots. In addition, the numbers of rhizosphere bacteria will be investigated.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือของรองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ ให้คำปรึกษาตั้งแต่ขั้นเริ่มต้นของการทำโครงการ ให้โอกาสได้ศึกษาดูงานการทำวิจัยในสถานที่จริงนอกห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นแรงบันดาลใจในการทำโครงการ ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขโครงการฉบับนี้ด้วยความเอาใจใส่ เพื่อให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความเมตตาและเอาใจใส่ของอาจารย์เป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ และให้เกียรติในการเป็นกรรมการในการสอบโครงการฉบับนี้

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จากงบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา

ขอขอบคุณพี่ ๆ ในห้องแลป 1704/14 ทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำ และคอยช่วยเหลือในการทำโครงการอย่างเต็มใจและเป็นกันเอง ทำให้รู้สึกดีและอบอุ่นใจเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบคุณเพื่อนๆภาควิชาจุลชีววิทยา รุ่นที่ 44 สำหรับความเข้าใจ ให้กำลังใจในการทำโครงการและคอยอยู่ข้าง ๆ เสมอมา

ขอขอบคุณนางสาวรวีวิชญ์ ตาคำ และ นายธนากร เดชโชติ สำหรับความช่วยเหลือและเป็นที่ปรึกษาตลอดการทำโครงการฉบับนี้

และสุดท้ายขอขอบคุณคุณแม่ คุณพ่อ แมวทั้ง 6 ตัว และสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่เอาใจใส่ อยู่เคียงข้าง สนับสนุนและช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างดินเพื่อใช้ในโครงการ ตลอดจนเป็นกำลังใจสำคัญแก่ผู้วิจัยเรื่อยมา

ด้วยความเคารพอย่างสูง

นางสาวกวิสรา ไชยศรีรัมย์

พฤษภาคม 2564

สารบัญ

บทคัดย่อ ก

Abstract ข

กิตติกรรมประกาศ ค

สารบัญ ง

สารบัญภาพ ช

สารบัญตาราง ซ

บทที่ 1 1

บทนำ 1

1.1 อ้อย 1

1.2 แบคทีเรียในดินที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช 1

1.3 วัสดุตรึงแบคทีเรีย 6

1.4 พลาสติกชนิด Polybutylene Succinate (PBS) 8

1.5 ภาพรวมของงานวิจัย 10

1.6 วัตถุประสงค์ 12

1.7 วิธีการดำเนินงาน 12

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 12

บทที่ 2 13

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินงาน 13

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 13

2.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 14

2.3 วิธีดำเนินงาน 14

2.3.1 แบคทีเรีย วัสดุตรึง ต้นอ้อย และดินที่ใช้ในการทดลอง 14

2.3.2 ศึกษาการเกาะของเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เป็นกระดาษเคลือบพลาสติก PBS 15
2.3.2.1 เตรียมวัสดุตรึง 15
2.3.2.2 เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียผสม 15
2.3.2.3 ตรึงเชื้อผสมบนวัสดุตรึง 15
2.3.2.4 วัดปริมาณแบคทีเรียที่เจริญอยู่บนวัสดุตรึง 16
2.3.3 ทดสอบประสิทธิภาพของวัสดุตรึงในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียผสม 16
2.3.3.1 ตรึงหัวเชื้อผสมลงบนวัสดุตรึง 16
2.3.3.2 ทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียผสมบนวัสดุตรึง 16
2.3.4 การย่อยสลายของวัสดุตรึงในดิน 17
2.3.4.1 เตรียมวัสดุตรึงที่ผ่านการตรึงเชื้อแล้ว และวัสดุตรึงที่ไม่ผ่านการตรึงเชื้อ 17
2.3.4.2 การย่อยสลายของวัสดุตรึงในดิน 17
แผนงานการทดลองต่อไป 18
2.3.5 ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงในการส่งเสริมเจริญของต้นอ้อย 18
2.3.5.1 เตรียมวัสดุตรึงที่ทำการตรึงแบคทีเรียผสม 18
2.3.5.2 ทำการทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อผสมแบบตรึงในดินที่ปลูกต้นอ้อย 18
บทที่ 3 19
ผลการทดลอง 19
3.1 การเกาะของเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุตรึงกระดาษเคลือบพลาสติก PBS 19
3.2 อัตราการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียในวัสดุตรึง 22
3.3 การย่อยสลายของกระดาษเคลือบพลาสติก PBS และพลาสติก PLA ในดิน 23
บทที่ 4 25
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง 25
แผนการดำเนินงานต่อไป 27

1. ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงในการส่งเสริมเจริญของต้นอ้อยในสภาวะแล้ง 27

2. ศึกษาการย่อยสลายของวัสดุตรึงกระดาษเคลือบ PBS ในดินชนิดอื่น ๆ 28

เอกสารอ้างอิง 30

ภาคผนวก ก 36

ภาคผนวก ข 37

สารบัญภาพ

รูปที่ 1.1 โครงสร้างของโมเลกุลไซเดอโรฟอร์กลุ่ม hydroxamates (a), catecholates (b) และ carboxylates (c) 2

รูปที่ 1.2 ความสัมพันธ์ระหว่างพืชที่ได้รับความเครียดกับการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase และการผลิตกรดอินโดลอะซีติกของแบคทีเรีย 3

รูปที่ 1.3 กระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช 4

รูปที่ 1.4 โครงสร้างของ Polybutylene succinate (PBS) 8

รูปที่ 1.5 การย่อยสลายของแผ่นฟิล์ม PBS ผสมเซลลูโลสในดินฝังกลบ 10

รูปที่ 1.6 โครงการ Chula Zero Waste โดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 11

รูปที่ 2.1 วัสดุตรึงที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ กระดาษเคลือบพลาสติก PBS แบบที่ 1 (ก) แบบที่ 2 (ข) และพลาสติกชนิด PLA (ค) 15

รูปที่ 2.2 การทดลองการอยู่รอดของแบคทีเรียผสมบนวัสดุตรึงกระดาษเคลือบพลาสติก PBS (ก) และพลาสติกชนิด PLA (ข) 17

รูปที่ 2.3 การทดลองการย่อยสลายของวัสดุตรึงในดิน 17

รูปที่ 3.1 จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ถูกตรึงบนวัสดุตรึงกระดาษเคลือบพลาสติก PBS 20

รูปที่ 3.2 ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด แสดงการยึดเกาะของแบคทีเรียบนผิวของวัสดุตรึงกระดาษเคลือบพลาสติก PBS ที่นึ่งฆ่าเชื้อ ใต้กล้องกำลังขยาย 2000x (ก) และ 5000x (ข) ลักษณะพื้นผิวของวัสดุตรึงพลาสติก PLA ที่นึ่งฆ่าเชื้อ ใต้กล้องกำลังขยาย 2000x (ค) และ 5000x (ง) และกระดาษเคลือบพลาสติก PBS2 ที่ตรึงเชื้อแบคทีเรียด้วยการบ่มเขย่า 2 วัน ที่กำลังขยาย 2000x (จ) และ 5000x (ฉ) 21

รูปที่ 3.3 การมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียผสมในวัสดุตรึง 22

รูปที่ 3.4 ภาพวัสดุตรึงที่จากการทดลองการย่อยสลายของกระดาษเคลือบพลาสติก PBS และพลาสติก PLA ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และผ่านการตรึงแบคทีเรีย ทดลองฝังในดินปลูกกล้วย ติดตามผลการทดลองก่อนฝังดินวันที่ 0 และหลังจากการฝังดินวันที่ 30 24

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการนำแบคทีเรียมาใช้ส่งเสริมการเจริญของพืช 6

ตารางที่ 2 ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้การตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึงในอุตสาหกรรมต่าง ๆ 7

ตารางที่ 3 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาการใช้ประโยชน์ PBS polymer ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ 9

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์ของอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อผสมในวัสดุตรึง 22

ตารางที่ ข-1 จำนวนหัวเชื้อแบคทีเรียผสมบนวัสดุตรึงกระดาษเคลือบพลาสติก PBS 2 แบบ 37

ตารางที่ ข-2 อัตราการมีชีวิตของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมบนวัสดุตรึง 37

บทที่ 1

บทนำ

1.1 อ้อย

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อประเทศไทย เพราะเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำตาลทรายใช้ภายในประเทศและยังมีการส่งออกต่างประเทศเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก นอกจากนั้นอ้อยยังเป็นพืชอุตสาหกรรมที่มีผู้เกี่ยวข้องมากมายในทุกระดับ ตั้งแต่ ระดับไร่นาและอุตสาหกรรมต่อเนื่องอื่น ๆ เช่น การผลิตไฟฟ้า ไม้อัด กระดาษ เอทานอล สุราและผลิตภัณฑ์ อาหาร เป็นต้น โดยในปีการผลิต 2562/63 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกอ้อยทั่วประเทศ จำนวน 10,988,489 ไร่ และมีผลผลิตอ้อยสูงถึง 74 ล้านตัน (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2563) อ้อยจึงมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศเป็นอย่างมาก ซึ่งในการปลูกอ้อย น้ำถือเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตอ้อย หากได้รับน้ำเพียงพอ การเจริญเติบโตของอ้อยจะเพิ่มปริมาณสูงขึ้น (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2561) แต่ในปัจจุบันพบว่าพื้นที่ปลูกอ้อยส่วนใหญ่จะอยู่นอกเขตชลประทาน และมักจะประสบกับปัญหาภัยแล้ง ทำให้เกษตรกรได้รับความเดือดร้อนจากความเสียหายของไร่อ้อยที่ขาดน้ำ

1.2 แบคทีเรียในดินที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant Growth Promoting Bacteria)

การเจริญเติบโตของพืช จะได้รับผลกระทบจากปัจจัยต่าง ๆ ที่พบได้ในบริเวณพื้นที่ปลูก สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ 1. ปัจจัยทางเทคโนโลยี เช่น ความรู้และความชำนาญของเกษตรกร การจัดการทรัพยากร 2. ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น แสง อุณหภูมิ ความชื้น คุณภาพของดินปลูก และ 3. ปัจจัยทางชีวภาพ เช่น แมลงศัตรูพืช วัชพืช โรคพืช และจุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรีย ซึ่งมีงานวิจัยจำนวนมากที่นำแบคทีเรียมาศึกษา และพบว่าแบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้ในสภาวะไม่เหมาะสม และสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้

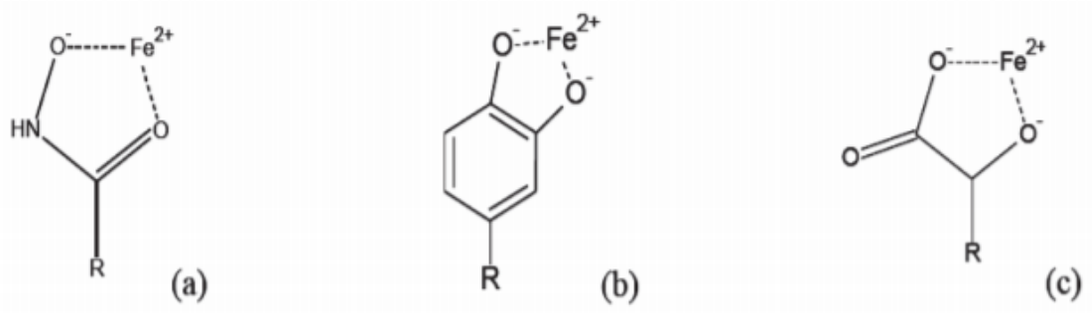
โดยแบคทีเรียมีกลไกที่ช่วยให้พืชสามารถปรับตัวเพื่อมีชีวิตรอดอยู่ในสภาวะไม่เหมาะสม ได้แก่

1. การผลิตเอนไซม์ ACC deaminase หรือ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate เพื่อไปย่อยสลาย ACC ที่เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอธีลีน ช่วยลดผลกระทบที่จะเกิดขึ้นกับพืชได้ เนื่องจากเมื่อพืชอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมหรือความเครียด เช่น การปลูกในดินปนเปื้อนโลหะหนัก สภาพดินเค็ม สภาวะแห้งแล้งขาดน้ำ สภาวะน้ำท่วมหรือมีน้ำมากเกินความต้องการ จะเกิดการตอบสนองต่อความเครียดด้วยการสะสมฮอร์โมนเอธีลีน ซึ่งส่งผลต่อพืชในการ เร่งการแก่ชรา มีอาการใบเหลือง และมีการหลุดร่วงของใบ (Backer และคณะ, 2018, Saikia และคณะ, 2018)

2. การผลิตเอกโซโพลิแซคคาไรด์ (Exopolysaccharides หรือ EPS) และหลั่งออกนอกเซลล์ โดยเอกโซโพลิแซคคาไรด์สามารถจับแคตไอออนได้ ทำให้ช่วยลดการดูดซึมแคตไอออน เช่น ในสภาวะดินเค็ม สามารถช่วยลดการดูดซึมโซเดียมไอออนเข้าสู่เซลล์พืช จึงลดความเป็นพิษต่อพืชได้ (Ashraf และคณะ, 2004, Upadhyay และ Singh, 2015)

3. การผลิตออสโมไลท์ เช่น กรดอะมิโนโพรลีน ไกลซีนบีเทน และทรีฮโลส โดยสารออสโมไลท์จะช่วยปรับค่าแรงดันออสโมติก และปริมาณไอออน ช่วยให้พืชทนต่อสภาวะแล้งได้ (Kaushal และ Wani, 2015)

4. การผลิตไซเดอโรฟอร์ (Siderophores) เป็นโมเลกุลเปปไทด์ที่มีหมู่ฟังก์ชั่นสามารถจับกับเฟอริกไอออนได้ โดยโครงสร้างหลักของไซเดอโรฟอร์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสามารถแบ่งเป็นกลุ่ม ได้แก่ hydroxamates, catecholates และ carboxylates โดยลักษณะของโครงสร้างไซเดอโรฟอร์แต่ละกลุ่มแสดงในรูปที่ 1.1 ไซเดอโรฟอร์ทำหน้าที่เป็นตัวกลางขนส่งเฟอริกไอออนไปให้รากพืชดูดซึมไปใช้งานได้ (Goswami และคณะ, 2016, Laschat และคณะ, 2017, Radzki และคณะ, 2013)



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของโมเลกุลไซเดอโรฟอร์กลุ่ม hydroxamates (a), catecholates (b) และcarboxylates (c) (มานิตา คำแจ่ม และ วสุ ปฐมอารีย์., 2557)

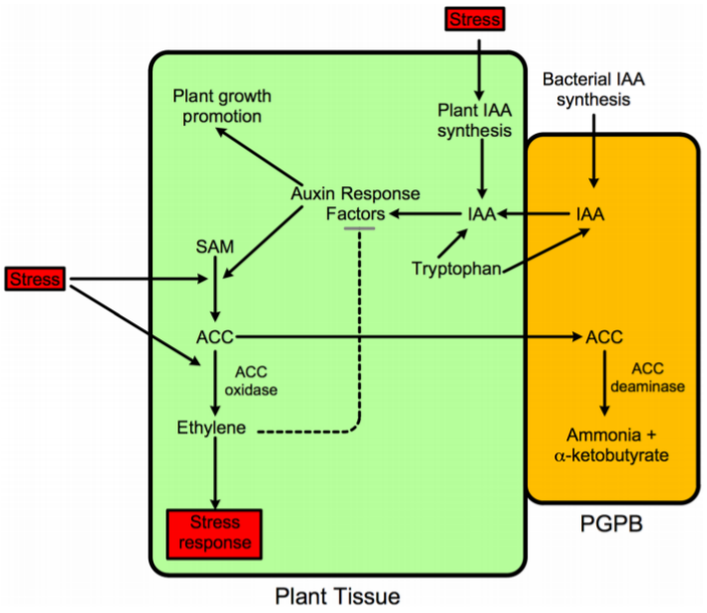
แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชสามารถผลิตฮอร์โมนพืชที่สำคัญ ได้แก่

1. จิบเบอเรลลิน (Gibberellin) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของพืช เช่น การยืดยาวของลำต้น การงอกของเมล็ด การมีดอก การมีผล ทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงดีขึ้น และ ทำให้มีปริมาณคลอโรฟิลล์มากขึ้น (Olanrewaju และคณะ, 2017)

2. กรดแอบไซซิก (Abscisic acid) เป็นฮอร์โมนพืชที่ทำหน้าที่ควบคุมการเปิดปิดของปากใบ เกี่ยวข้องกับการเจริญของพืช และการปรับตัวของพืชในสภาวะเครียด เช่น ในสภาวะแล้ง พืชจะสะสมกรดแอบไซซิกปริมาณมากทำให้ปากใบปิด ลดการคายน้ำ นอกจากนี้กรดแอบไซซิกยังส่งผลกระทบต่อการเจริญของเมล็ดพืชและการผลัดใบ (Cohen และคณะ, 2009, Munemasa และคณะ, 2015; Sah และคณะ, 2016)

3. ไซโตไคนิน (Cytokinins) เป็นฮอร์โมนพืชที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเซลล์ในเนื้อเยื่อเจริญของพืช การเจริญของเซลล์ การข่มของตายอด การเจริญของราก การงอกของเมล็ด การสร้างไซเลมและคลอโรพลาสต์ การเจริญของดอกและผล ความชราของใบ และมีปฏิสัมพันธ์กับศัตรูพืช (Olanrewaju และคณะ, 2017)

4. กรดอินโดลอะซีติก (indole-3-acetic acid หรือ IAA) เป็นฮอร์โมนกลุ่มออกซิน ซึ่งกระตุ้นการยืดยาวและการขยายขนาดของราก ทำให้รากมีพื้นที่ผิวมากขึ้น สามารถดูดซึมน้ำและแร่ธาตุได้มากขึ้น (Olanrewaju และคณะ, 2017, Vessey, 2003) ซึ่งการผลิตกรดอินโดลอะซีติกและการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ของแบคทีเรียมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อความเครียดของพืช ดังแสดงในรูปที่ 1.2



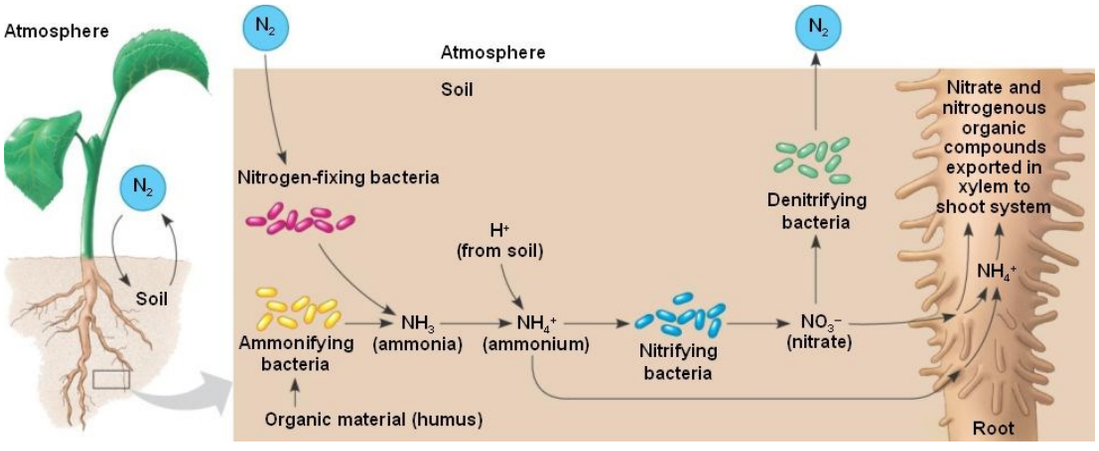
รูปที่ 1.2 ความสัมพันธ์ระหว่างพืชที่ได้รับความเครียดกับการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase และการผลิตกรดอินโดลอะซีติกของแบคทีเรีย (Olanrewaju และคณะ, 2017)

นอกจากนี้แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติอื่น ๆ ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น

1. การผลิตยาปฏิชีวนะ (Antibiotics) เพื่อกำจัดเชื้อก่อโรคพืช เป็นกลไกทางอ้อมที่ช่วยในการบรรเทาการเกิดโรคพืช ตัวอย่างยาปฏิชีวนะที่ผลิตจากแบคทีเรียจีนัส *Bacillus* เช่น sublancin, bacilysin, surfactin, iturin และ fengycin นอกจากนี้ยังมีจีนัส *Pseudomonas* ที่สามารถผลิต Ecomycins, 2,4-Diacetyl Phloroglucinol (DAPG), Pseudomonic acid, Phenazine-1-carboxylic acid (PCA), Viscosinamide, Butyrolactones, Aerugine, Azomycin, และ Karalicin (Goswami และคณะ, 2016)

2. การละลายฟอสฟอรัสในดิน (Phosphate solubilization) เนื่องจากส่วนใหญ่ฟอสฟอรัสจะอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ พืชจึงไม่สามารถดูดซึมนำไปเป็นธาตุอาหารได้ ดังนั้นแบคทีเรียจะช่วยในการหลั่งเอนไซม์ฟอสฟาเทสเพื่อเปลี่ยนฟอสฟอรัสให้อยู่ในโครงสร้างที่พืชสามารถนำใช้งานได้ (Vacheron และคณะ, 2013, Vessey, 2003)

3. การตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation) แบคทีเรียบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนในชั้นบรรยากาศแล้วเปลี่ยนให้อยู่ในโครงสร้างที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ เช่น แอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรต (Olanrewaju และคณะ, 2017, Vessey, 2003) ดังรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 กระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช (Campbell และ Reece, 2005)

ด้วยคุณสมบัติของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชดังที่ได้กล่าวไปข้างต้นนี้ ทำให้นักวิจัยจำนวนมากที่ให้ความสนใจกับงานวิจัยแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของพืชชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งงานวิจัยหลายงานมักจะเน้นใช้พืชเศรษฐกิจ หรือพืชไร่เป็นเป้าหมายในการวิจัย เนื่องจากเป็นพืชที่ส่งผลกระทบต่อเกษตรกรอย่างมาก เช่น ข้าวโพด มีการใช้แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติสามารถละลายฟอสเฟตในดินและผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ในการส่งเสริมการเจริญของข้าวโพด (Alori และคณะ, 2019, Danish และคณะ, 2020) ส่วนในพืชเศรษฐกิจสำคัญของไทยอย่างเช่นอ้อย มีผู้วิจัยได้ทดลองใช้แบคทีเรียจีนัส *Bacillus* ในการส่งเสริมการเจริญของอ้อย จากการแยกเชื้อและศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ พบว่า *Bacillus subtilis* และ *Bacillus megaterium* สามารถย่อยสลายฟอสเฟต ผลิต siderophores และ IAA ซึ่งผลการทดลองใส่เชื้อร่วมกับการปลูกอ้อยพบว่า สามารถส่งเสริมการเจริญของต้นอ้อยให้มีความยาวราก ลำต้น และน้ำหนักของต้นอ้อยสูงกว่าชุดการทดลองอื่น (Chandra และคณะ, 2018) ซึ่งผลก็สอดคล้องกับอีกงานวิจัยหนึ่งที่ใช้แบคทีเรีย *Bacillus xiamenensis* พบว่าชุดการทดลองปลูกแบบใส่เชื้อมีค่าน้ำหนักและความสูงของต้นอ้อยมากกว่าการปลูกแบบไม่ใส่เชื้อ นั่นคือการใส่เชื้อทำให้โตได้ดีกว่าไม่ใส่เชื้อ (Amna และคณะ, 2020) นอกจากการส่งเสริมการเจริญเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรแล้ว แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชยังสามารถช่วยให้พืชอยู่รอดในสภาวะที่ไม่เหมาะสมอีก เพราะปัญหาพื้นที่ไม่สมบูรณ์มักจะส่งผลกระทบต่อเกษตรกรผู้เพาะปลูก ทำให้ผลผลิตเสียหาย ผู้วิจัยจึงได้คิดหาวิธีแก้ไขโดยใช้วิธีการทางชีวภาพเพื่อช่วยเหลือเกษตรกร เช่น การทำให้มะเขือเทศมีความทนและอยู่รอดในสภาวะแล้งได้ (Wang และคณะ, 2019) แต่การทำงานของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชจะเกิดขึ้นไม่ได้ ถ้าเกิดแบคทีเรียไม่สามารถทนอยู่ในสภาวะนั้นได้เสียเอง จึงได้มีการใช้วัสดุตรึงเข้ามาช่วย เพื่อให้แบคทีเรียมีโอกาสอยู่รอดมากยิ่งขึ้น โดยวัสดุตรึงก็จะมีหลายชนิด ที่นิยมใช้ก็จะมีถ่านชีวภาพ มีงานวิจัยที่ใช้ถ่านชีวภาพในการตรึงแบคทีเรียเพื่อไปส่งเสริมการเจริญของข้าวสาลีในสภาวะแล้ง ซึ่งผลการทดลองพบว่าทำให้ผลผลิตสูงขึ้นจริง (Danish และคณะ, 2019) นอกจากจะมีการใช้แบคทีเรียร่วมกับการปลูกพืชระดับไร่นาแล้ว ก็เริ่มมีผู้วิจัยทดลองเพาะเลี้ยงพืชโดยใส่แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชตั้งแต่ในระยะงอกของเมล็ด ตัวอย่างเช่นเมล็ดฝ้าย เมื่อทดลองใส่แบคทีเรียหลายชนิดเพื่อเปรียบเทียบการงอกของเมล็ด และเลือกแบคทีเรียที่ส่งเสริมการงอกของเมล็ดฝ้ายได้ดีที่สุด ผลการทดลองปรากฏว่า เมล็ดฝ้ายงอกได้ดีที่สุดเมื่อใส่เชื้อ *Brevibacillus brevis* ซึ่งพอศึกษาเพิ่มเติมก็พบว่ามีคุณสมบัติการยับยั้งราก่อโรค ผลิต IAA และแอมโมเนีย (Nehra และคณะ, 2016) และยังมีงานวิจัยอื่น ๆ ที่คิดค้นการใช้แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชในการแก้ไขปัญหาการเพาะปลูกเพื่อช่วยเหลือเกษตรกร

ตารางที่ 1 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการนำแบคทีเรียมาใช้ส่งเสริมการเจริญของพืช

แบคทีเรีย	คุณสมบัติแบคทีเรีย	พืชที่ใช้ทดสอบ	อ้างอิง
Pseudomonas kilonensis *Pseudomonas protegens*	การละลายฟอสเฟต	ข้าวโพด (*Zea mays*)	Alori และคณะ, 2019
Bacillus subtilis *Bacillus megaterium*	การละลายฟอสเฟต ผลิต Siderophore และ IAA	อ้อย (*Saccharum officinarum*)	Chandra และคณะ, 2018
Enterobacter cloacae	ACC deaminase	ข้าวโพด (*Zea mays*)	Danish และคณะ, 2020
Bacillus amyloliquefaciens	ผลิต EPS และกรดแอบไซซิก	มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum)*	Wang และคณะ, 2019
Leclercia adecarboxylata *Pseudomonas aeruginosa* *Agrobacterium fabrum* *Bacillus amyloliquefaciens*	ACC deaminase	ข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.)	Danish และคณะ, 2019
Brevibacillus brevis	ผลิตกรดแอบไซซิก	ฝ้าย (*Gossypium hirsutum*)	Nehra และคณะ, 2016
Bacillus xiamenensis	ยับยั้งราก่อโรค ย่อยสลายฟอสเฟต ผลิต IAA, EPS และ ACC deaminase	อ้อย (*Saccharum officinarum*)	Amna และคณะ, 2020

1.3 วัสดุตรึงแบคทีเรีย

การใช้วัสดุตรึงแบคทีเรียเป็นเหมือนการหาที่อยู่อาศัยให้กับแบคทีเรียเพื่อส่งเสริมความอยู่รอดและเตรียมความพร้อมสำหรับการเปลี่ยนสภาพแวดล้อมไปอยู่ในสภาวะต่าง ๆ ต่อไป เนื่องจากการนำเอาจุลินทรีย์ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชมาใช้งาน พบว่าประสบปัญหาในเรื่องของการเก็บรักษา และอัตราการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์เมื่ออยู่ในดิน ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าการใส่เชื้อที่ผสมกับวัสดุตรึงลงในดินจะช่วยเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ได้มากกว่าการใส่เชื้อลงไปในดินโดยตรง (Hale และคณะ, 2015) จากนั้นก็เริ่มมีงานวิจัยทดลองใช้ประโยชน์จากการตรึงเซลล์ แสดงดังตารางที่ 2 มีการใช้ประโยชน์เซลล์

แบคทีเรียแบบตรึงในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อน ซึ่งพบว่าการบำบัดน้ำเสียโดยใช้การตรึงเซลล์บนวัสดุตรึงสามารถบำบัดน้ำเสียได้มีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้เซลล์อิสระ (Sun และคณะ, 2020; Bestawy และคณะ, 2020; Zhang และคณะ, 2021) และในการใช้วัสดุตรึงต่างชนิดกันก็มีผลต่อการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ได้แตกต่างกัน วัสดุตรึงมีทั้งที่เป็นอินทรียวัตถุ เช่น ชานอ้อย ถ่านหินและพีต และอนินทรียวัตถุ เช่น แร่เวอร์มิคูไลท์ อะลูมิเนียมซิลิเคต และแป้งทัลคัม (Saharan และคณะ, 2010) โดยในการเลือกวัสดุตรึงที่ดีนั้นจะต้องคำนึงถึงการไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์แบคทีเรีย มีพื้นที่ผิวให้แบคทีเรียสามารถเกาะ สามารถหาได้ง่าย มีความสามารถในการอุ้มน้ำ มีความชื้นสัมพัทธ์เหมาะสม และไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม (Borowik และ Wyszkowska, 2016) มีการทดลองผลิตเซลลูโลสนาโนไฟเบอร์จากกระบวนการของแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นวัสดุตรึงในการส่งเสริมการอยู่รอดของโพรไบโอติกแบคทีเรีย พบว่าเวลาผ่านไป 24 วัน เชื้อสามารถอยู่รอดได้ถึง 71% (Jayani และคณะ, 2020) และผลการทดลองจะนำไปใช้เป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและยาต่อไป

ตารางที่ 2 ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้การตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึงในอุตสาหกรรมต่าง ๆ

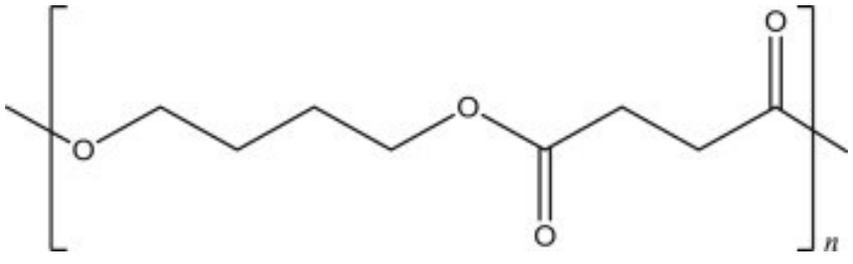
แบคทีเรีย	วัสดุตรึงที่ใช้	การใช้ประโยชน์	อ้างอิง
methane-oxidizing bacteria (MOB) consortium	เถ้าลอย (fly ash ceramsite)	ใช้เป็น biofilter ในการกำจัดแก๊สมีเทน	Sun และคณะ, 2020
Enterobacter cloacae *Pseudomonas otitidis*	Magnetite Nanoparticles (Fe_3O_4)	การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม	Bestawy และคณะ, 2020
Pseudomonas putida *Serratia ficaria* *Pseudomonas luorescens*	ปุ๋ยหมัก, ตะกอน biogas, ซังข้าวโพด และ ซีโอไลต์	ส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวสาลีในสภาวะดินเค็ม (salinity stress)	Sohaib และคณะ, 2020
Lactobacillus acidophilus	เซลลูโลสนาโนไฟเบอร์	ส่งเสริมการอยู่รอดของโพรไบโอติกแบคทีเรีย	Jayani และคณะ, 2020
Methylomicrobium album *Methylomicrobium* ryophila *Methylomicrobium* stellata	ไคโตซาน (Chitosan)	ใช้ในการผลิตเมทานอลแบบ Batch culture	Patel และคณะ, 2020
Pseudomonas mendocina	ถ่านชีวภาพ (Biochar)	กำจัดไนเตรทในน้ำเสีย	Zhang และคณะ, 2021
Lactobacillus pentosus	Sodium alginate	กระบวนการหมักให้ได้ผลิตภัณฑ์กรดแลกติก	Wang และคณะ, 2020

การตรึงเซลล์ทำให้สามารถนำเซลล์นั้นกลับมาใช้งานใหม่ได้ เป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น ในกระบวนการผลิตหรือกระบวนการหมัก จะช่วยลดต้นทุนในการเลี้ยงเซลล์ใหม่ได้ ดังตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้ประโยชน์การตรึงเซลล์แบคทีเรียบนไคโตซานเพื่อใช้ในกระบวนการหมักเมทานอลแบบ Batch culture methanol production (Patel และคณะ, 2020) และการหมักกรดแลกติกด้วยเซลล์แบคทีเรียแบบตรึงบนเม็ดบีดส์ (Wang และคณะ, 2020) ส่วนในอุตสาหกรรมการเกษตร การลดต้นทุนทางการเกษตร หรือการแก้ปัญหาดินที่ไม่เหมาะสมในการเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจ ทำได้ด้วยการตรึงแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชลงบนวัสดุตรึงที่หาได้ง่าย เช่น วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรหรือวัสดุย่อยสลายได้เองในดินอย่างซังข้าวโพดร่วมกับการปลูกพืชเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชในสภาวะดินเค็ม (Sohaib และคณะ, 2020)

1.4 พลาสติกชนิด Polybutylene Succinate (PBS)

ปัจจุบันการใช้งานพลาสติกมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย อาทิเช่นในอุตสาหกรรมอาหาร ที่มีการใช้พลาสติกเป็นบรรจุภัณฑ์ ซึ่งอาหารแต่ละประเภทก็ต้องการคุณสมบัติของบรรจุภัณฑ์ที่แตกต่างกันไป ดังนั้นจึงมีการผลิตพลาสติกชนิดต่าง ๆ ขึ้นเพื่อตอบสนองต่อวัตถุประสงค์ในการใช้งาน แต่ปริมาณการผลิตพลาสติกจำนวนมากเพื่อใช้งานนั้นกลับไม่สอดคล้องกับปริมาณความสามารถในการจัดการขยะพลาสติก มีขยะพลาสติกสะสมเป็นปัญหาอยู่ในสิ่งแวดล้อมจำนวนมากที่จัดการได้ยากและใช้เวลานานกว่าจะย่อยสลายไป จึงนำไปสู่การคิดค้นวัสดุที่มีคุณสมบัติใช้ทดแทนกันได้แต่สามารถจัดการขยะได้ง่ายกว่าและใช้เวลาน้อยกว่า เรียกว่าพลาสติกประเภท พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastic) และพลาสติกสลายตัวได้ทางชีวภาพ (compostable plastic)

Polybutylene Succinate (PBS) เป็นพลาสติกสลายตัวได้ทางชีวภาพที่นิยมใช้งานอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน การผลิต PBS จะต้องผ่านกระบวนการ polymerization ของสาร butanediol และกรดซัคซินิก (Liu และคณะ, 2009) ทำให้มีโครงสร้างดังรูปที่ 1.4 สารทั้งสองชนิดนี้ผลิตได้จากกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ (Xu และคณะ, 2010) PBS สามารถย่อยสลายได้ด้วยการฝังกลบในดิน และการทำปุ๋ยหมักด้วยกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ในธรรมชาติ (Puchalski และคณะ, 2018)

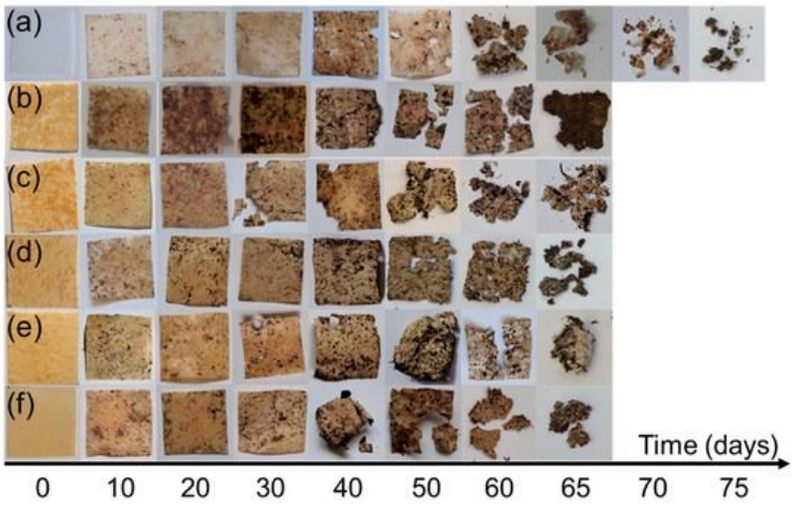


รูปที่ 1.4 โครงสร้างของ Polybutylene succinate (PBS) (Niaounakis, 2015)

เนื่องจาก PBS มีราคาสูงเมื่อเทียบกับการใช้พอลิเมอร์ชนิดอื่น ๆ นักวิจัยจึงได้ค้นหาวิธีการเพื่อทำให้ราคาผลิตภัณฑ์ที่ทำจาก PBS ให้มีราคาที่ต่ำลง โดยการทดลองใช้ PBS ผสมกับวัสดุราคาถูกอื่น ๆ เช่น การอัดขึ้นรูป PBS ผสมกับ Polylactic acid (PLA) (Jompang และคณะ, 2013) การอัดเป็นฟิล์มผสมกับเศษกระดาษเหลือใช้ (Zhao และคณะ, 2020) หรือผสมกับเซลลูโลสเพื่อผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้และมีความแข็งแรง (Platnieks และคณะ, 2020) ทำให้การใช้งานวัสดุที่ทำจาก PBS จึงเริ่มมีความนิยมมากขึ้น ดังแสดงตัวอย่างงานวิจัยในตารางที่ 3 นอกจากผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์แล้วยังมีการนำไปใช้ด้านอื่น ๆ เช่นการแพ็คเม็ด PBS บรรจุในคอลัมน์สำหรับบำบัดน้ำเสีย เพื่อให้ PBS เป็นแหล่งอาหารและที่ยึดเกาะของแบคทีเรีย (Zhu และคณะ, 2015) และล่าสุดเนื่องจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคโควิด ทำให้เกิดปัญหาการจัดการกับขยะหน้ากากอนามัยใช้แล้ว เริ่มมีสัตว์ทะเลที่ตายเพราะโดนหน้ากากอนามัยรัด และมีขยะจำพวกหน้ากากอนามัยผ่านที่การใช้งานแล้วจำนวนมาก เพราะหน้ากากอนามัยเป็นวัสดุใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้ง ดังนั้นผู้วิจัยจึงทดลองผลิตเมมเบรนฟิลเตอร์สำหรับหน้ากากอนามัย ให้สามารถย่อยสลายได้โดยใช้ PBS fiber และ chitosan เป็นองค์ประกอบ (Choi และคณะ, 2021) ซึ่งการย่อยสลายของวัสดุที่ทำขึ้นจาก PBS ผสมเซลลูโลสแสดงดังรูปที่ 1.5 การย่อยสลายแผ่นฟิล์มที่ใช้อัตราส่วน PBS และ เซลลูโลสแตกต่างกัน ทำให้ใช้เวลาในการย่อยสลายต่างกัน แต่ทุกชุดการทดลองก็แสดงว่าสามารถย่อยสลายได้ (Platnieks และคณะ, 2020)

ตารางที่ 3 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาการใช้ประโยชน์ PBS polymer ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ

การใช้ประโยชน์	รูปแบบของพอลิเมอร์	อ้างอิง
ผลิตบรรจุภัณฑ์	ผสม PBS resin กับ cellulose รีไซเคิล อัดเป็นแผ่นฟิล์ม	Platnieks และคณะ, 2020
	PBS fiber ผสมกับ wastepaper อัดแผ่นฟิล์ม	Zhao และคณะ, 2020
	ใช้ PBS เป็น copolymer กับ PLA ขึ้นรูปฟิล์ม	Jompang และคณะ, 2013
Solid-phase denitrification ในการบำบัดน้ำเสีย	PBS granules บรรจุในคอลัมน์ bioreactor ทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและวัสดุเกาะของแบคทีเรีย	Zhu และคณะ, 2015
แผ่นฟิลเตอร์กรองในหน้ากากอนามัย	PBS microfibers และ nanofibers เคลือบ chitosan ทำเป็นเมมเบรนฟิลเตอร์	Choi และคณะ, 2021



รูปที่ 1.5 การย่อยสลายของแผ่นฟิล์ม PBS ผสมเซลลูโลสในดินฝังกลบ (Platnieks และคณะ, 2020)

โครงการวิจัยนี้สนใจการใช้ประโยชน์พลาสติก PBS ชนิด BioPBS ซึ่งเป็นพลาสติกชีวภาพที่ผลิตขึ้นจากวัตถุดิบธรรมชาติ อาทิ อ้อย มันสำปะหลัง และข้าวโพด พลาสติกชีวภาพจึงสามารถย่อยสลายด้วย 3 ปัจจัย คือ จุลินทรีย์ ความชื้น และอุณหภูมิที่เหมาะสม จนสุดท้ายกลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดยไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยทั่วไปมักจะเห็นพลาสติกชีวภาพถูกใช้งานในรูปของบรรจุภัณฑ์เป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะบรรจุภัณฑ์อาหาร เพราะผู้ประกอบการยุคใหม่เริ่มปรับเปลี่ยนมาใช้บรรจุภัณฑ์กระดาษเคลือบพลาสติกชีวภาพ หรือ BioPBS กันมากขึ้น เพื่อต้องการลดปัญหาการขยะพลาสติก ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่มีการใช้งานในไทย เช่น บรรจุภัณฑ์กระดาษ ที่ด้านในเคลือบด้วยพลาสติกชีวภาพ PBS สำหรับใส่อาหาร น้ำหรือกาแฟ ซึ่งมีความปลอดภัย ไม่เป็นอันตรายต่ออาหารที่ใส่ (Sandaru และคณะ, 2020) BioPBS จึงเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมอย่างแท้จริง

1.5 ภาพรวมของงานวิจัย

โครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยได้นำ BioPBS ที่อยู่ในรูปแบบแก้วกระดาษเคลือบพลาสติก PBS ที่ผ่านการใช้งานแล้วมาใช้ประโยชน์ ซึ่งมีการใช้งานและหาได้ง่ายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตัวอย่างร้านค้าที่ใช้แก้วกระดาษเคลือบพลาสติก PBS เช่น ร้านกาแฟอินทนิล ร้านกาแฟอเมซอน รวมถึงแก้วที่รณรงค์ให้ใช้ในโรงอาหารมหาวิทยาลัยของโครงการ Chula Zero Waste แสดงในรูปที่ 1.6 ก็ทำมาจากกระดาษเคลือบพลาสติก PBS ทราบได้จากรายละเอียดที่ทางเว็บไซต์ของโครงการได้ระบุไว้ใน http://www.chulazerowaste.chula.ac.th

การจัดการขยะ BioPBS มักจะไปจบอยู่ที่การฝังกลบเพื่อรอให้ย่อยสลาย แต่ด้วยการใช้งานจำนวนมากในปัจจุบัน ดังนั้นการรอฝังกลบเพียงอย่างเดียวจึงไม่เพียงพอ เมื่อมีงานวิจัยก่อนหน้าได้ศึกษาแล้วว่า PBS สามารถย่อยสลายได้เองด้วยจุลินทรีย์ธรรมชาติในดิน ทำให้ผู้วิจัยจึงเล็งเห็นแนวทางที่จะใช้ประโยชน์ขยะ BioPBS หรือกระดาษเคลือบพลาสติก PBS ในระหว่างที่รอให้เกิดการย่อยสลาย ด้วยการนำมาใช้เป็นวัสดุตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียผสม โดยแบคทีเรียที่ใช้ประกอบด้วย *Bacillus thuringiensis* B2, *Bacillus stratosphericus* L19 และ *Bacillus altitudinis* T17 แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช โดยสามารถผลิตฮอร์โมน IAA ที่มีบทบาทต่อการยืดยาว การแบ่งเซลล์ และยังสามารถกระตุ้นการเจริญของรากพืช ส่งเสริมประสิทธิภาพในการลำเลียงสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของพืช (เอกวัล ลือพร้อมชัย, 2560) ในการดำเนินงานผู้วิจัยจะศึกษาการเกาะของหัวเชื้อผสมบนวัสดุตรึง โดยใช้วัสดุตรึงเป็นเศษกระดาษเคลือบพลาสติก PBS หลังจากนั้นจะทำการตรึงหัวเชื้อผสมเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการส่งเสริมความอยู่รอดของแบคทีเรียบนวัสดุตรึงแบบแห้ง โดยเพิ่มการใช้เศษพลาสติก PLA เป็นชุดควบคุมเปรียบเทียบ และติดตามการย่อยสลายของวัสดุตรึงในดินสภาวะปกติ เพื่อทดสอบระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายและจำลองสถานการณ์เมื่อนำวัสดุตรึงไปใช้ร่วมกับการปลูกพืช

รูปที่ 1.6 โครงการ Chula Zero Waste โดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(http://www.chulazerowaste.chula.ac.th/)

1.6 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเกาะของเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุตรึงเศษกระดาษเคลือบพลาสติก PBS
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของวัสดุตรึงในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียผสม
3. เพื่อทดสอบการย่อยสลายของวัสดุตรึงในดิน
4. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงในการส่งเสริมการเจริญของต้นอ้อยในสภาวะแล้ง

1.7 วิธีการดำเนินงาน

1. ทดสอบคุณสมบัติของวัสดุตรึง
2. ศึกษาการเกาะของเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เป็นเศษกระดาษเคลือบพลาสติก PBS
3. ทดสอบประสิทธิภาพของวัสดุตรึงในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียผสม
4. ทดสอบการย่อยสลายของวัสดุตรึงในดิน
5. ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงในการส่งเสริมการเจริญของต้นอ้อยในสภาวะแล้ง

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยนี้คาดว่าจะสามารถนำเศษกระดาษเคลือบพลาสติก PBS ซึ่งถูกใช้งานมากในปัจจุบันและเป็นขยะที่รอการจัดการ มาใช้ให้เกิดประโยชน์ ด้วยการนำมาประยุกต์ใช้เป็นวัสดุตรึงแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช เพื่อสามารถนำไปใช้เป็นวัสดุตรึงส่งเสริมการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียในรูปแบบของแข็งที่สามารถเก็บรักษาแบบแห้งได้ ใช้เป็นวัสดุปลูกพืชหรือปุ๋ยชีวภาพผสมลงในดินปลูก สามารถใช้แทนปุ๋ยเคมีเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรได้ในอนาคต

บทที่ 2

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินงาน

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระบอกเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge ware) ของบริษัท NALGENE, USA

2. กระบอกตวง (Cylinder) ของบริษัท PYREX, USA

3. ขวดดูแรน (Laboratory bottle) ของบริษัท Schott, Germany

4. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX, USA

5. ขวดใส่สารขนาดเล็ก (Vial) ของบริษัท PYREX, USA

6. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น Innova 2100 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Edison, N.J., USA และ รุ่น GREEN SSeriker 2 ของบริษัท PanaPolytech Co., LTD., Thailand

7. เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance) รุ่น AG 285 ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland

8. เครื่องชั่งหยาบ (Laboratory balance) รุ่น PG 2002-S ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland

9. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (High Speed Refrigerated Centrifuge) รุ่น 6500 ของบริษัท KUBOTA, Japan

10. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific industries, USA

11. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น MP125 ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland

12. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Scientific, USA

13. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ของบริษัท PYREX, USA

ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) แบบ ISSco รุ่น BV-124 ของบริษัท Internal Scientific Supply Co., Ltd., Thailand

14. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

15. แท่งแก้วปาดเชื้อ (Spreader) ของบริษัท Suzhou Yunbo Glass Co., Ltd., Chinese

16. ปิเปตทิป (Tip) ขนาด 200, 1000, 5000 และ 10000 ไมโครลิตร ของบริษัท Hycon Plastics

17. บีกเกอร์ (Beaker) ของบริษัท PYREX, USA

18. ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)

19. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Kogyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท HIRAYAMA, Japan

20. หลอดเอพเพนดอร์ฟ (Eppendorf tube) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท Axygen, INC., USA

21. ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น P10, P200, P1000, P5000 และ P10000 ของบริษัท Eppendorf, Thailand

2.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

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

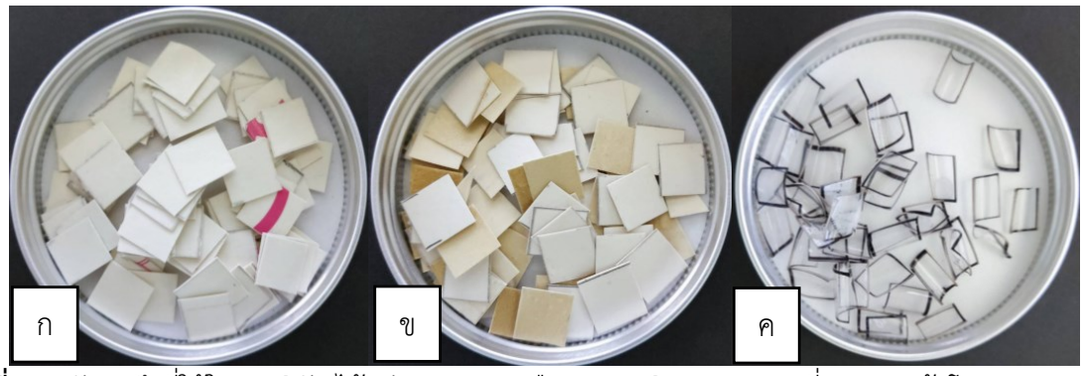
2.3 วิธีดำเนินงาน

2.3.1 แบคทีเรีย วัสดุตรึง ต้นอ้อย และดินที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ *Bacillus thuringinesis* สายพันธุ์ B2 รหัส MSCU 0882 ซึ่งแยกจากดินบริเวณที่ปลูกอ้อย อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี, *Bacillus stratophericus* สายพันธุ์ L19 รหัส MSCU 0873 ซึ่งแยกจากดินบริเวณที่ปลูกอ้อย อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี และ *Bacillus altitudinis* สายพันธุ์ T17 รหัส MSCU 0867 ซึ่งแยกจากดินบริเวณที่ปลูกข้าว อ.ท่าวุ้ง จ.ลพบุรี โดยเชื้อทั้ง 3 ชนิด ถูกเก็บอยู่ในคลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัสดุตรึงที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ แก้วกระดาษเคลือบด้วยพลาสติก PBS ที่ผ่านการใช้งานแล้ว นำมา 2 แบบ คือ แก้วจากโรงอาหารซึ่งทางโครงการ Chula Zero Waste ได้ระบุไว้ว่าแก้วใช้วัสดุเป็นกระดาษเคลือบด้วย PBS ซึ่งผลิตและจัดจำหน่ายโดยบริษัท ไบโอ-อีโค จำกัด และอีกแบบหนึ่งคือแก้วร้านกาแฟอินทนิลภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งทางอินทนิลได้ระบุไว้ โดยบริษัท บางจาก คอร์ปอเรชั่น จำกัด (มหาชน) และ แก้วพลาสติก PLA ที่ผ่านการใช้งานแล้ว เก็บจากศูนย์การจัดการทรัพยากรจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แสดงดังรูปที่ 2.1 โดยการทดลองนี้ใช้แก้วพลาสติก PLA เป็นชุดควบคุม เนื่องจากต้องการศึกษาเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้าที่มีการทดลองใช้แก้วพลาสติก PLA ที่ผ่านการใช้งานแล้วสำหรับตรึงแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของอ้อย (ภาณุมาศ เมืองวุฒฑานันท์, 2563)

ดินใช้ทดสอบการย่อยสลายของวัสดุตรึงเศษกระดาษเคลือบด้วยพลาสติก PBS และเศษพลาสติก PLA เก็บจากบริเวณใต้ต้นกล้วยในสวนพื้นที่พักอาศัยของผู้วิจัย, ดินปลูกอ้อย และต้นกล้าของต้นอ้อยอายุ 2 เดือน จากแปลงทดลองที่จังหวัดนครสวรรค์ ของบริษัท เคทิส วิจัยและพัฒนา จำกัด



รูปที่ 2.1 วัสดุตรึงที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ กระดาษเคลือบพลาสติก PBS แบบที่ 1 จากแก้วโครงการ Chula Zero Waste (ก) แบบที่ 2 จากแก้วกาแฟร้านอินทนิล (ข) และพลาสติกชนิด PLA (ค)

2.3.2 ศึกษาการเกาะของเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เป็นกระดาษเคลือบพลาสติก PBS

เพื่อดูปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่เกาะบนวัสดุตรึงที่เป็นกระดาษเคลือบพลาสติก PBS

2.3.2.1 เตรียมวัสดุตรึง

นำแก้วกระดาษเคลือบพลาสติก PBS ทั้งสองแบบ มาตัดให้เป็นแผ่นราบขนาดกว้าง 1 เซนติเมตร ยาว 1 เซนติเมตร นำเศษกระดาษเคลือบพลาสติก PBS จำนวน 30 ชิ้น ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหาร TSB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ชนิดละ 3 ขวด จากนั้นนำขวดรูปชมพู่ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ

2.3.2.2 เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียผสม

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus thuringinesis* B2, *Bacillus stratosphericus* L19, *Bacillus altitudinis* T17 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) แล้วนำไปบ่ม จากนั้นนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy broth (TSB) บ่มด้วยเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Refrigerated Microcentrifuge ความเร็ว 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน ล้างเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้วเตรียมหัวเชื้อโดยผสมเซลล์กับ 0.85%NaCl ปรับ OD ของเชื้อทั้ง 3 ชนิดให้แต่ละเชื้อมีความเข้มข้นประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร นั่นคือปรับให้เชื้อ *B. thuringinesis* B2, *B. stratophericus* L19, *B. altitudinis* T17 มีค่า OD เท่ากับ 1 และผสมหัวเชื้อในอัตราส่วน 1:1:1 (ปฐมาวดี ตรีสอน, 2561)

2.3.2.3 ตรึงเชื้อผสมบนวัสดุตรึง

ใส่หัวเชื้อผสม 3 ชนิด ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหาร TSB ที่มีวัสดุตรึงที่เตรียมไว้ในหัวข้อ 2.3.2.1 จากนั้นนำไปบ่มเชื้อแบบเขย่าเพื่อให้เศษวัสดุตรึงกระจายในอาหาร

2.3.2.4 วัดปริมาณแบคทีเรียที่เจริญอยู่บนวัสดุตรึง

เก็บเศษวัสดุตรึงทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน โดยสุ่มเก็บเศษกระดาษเคลือบพลาสติก PBS จำนวน 1 ชิ้นใส่ใน 0.85%NaCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปใส่อ่างส่งคลื่นความถี่สูง (sonicator bath) เป็นเวลา 1 นาที และนำมาเขย่าสารอีก 1 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากผิววัสดุตรึง ดูดสารละลายเซลล์มาทำการเจือจางโดยวิธีการเจือจางตัวอย่างเป็นลำดับส่วน (serial dilution techniques) และดูปริมาณเชื้อด้วยวิธี MPN หลังจากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟแสดงอัตราการเกาะของเชื้อแบคทีเรีย และนำตัวอย่างวัสดุตรึงบางส่วนไปส่องดูลักษณะการเกาะของแบคทีเรียบนพื้นผิวของพลาสติก ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (scanning electron microscopy, SEM)

2.3.3 ทดสอบประสิทธิภาพของวัสดุตรึงในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียผสม

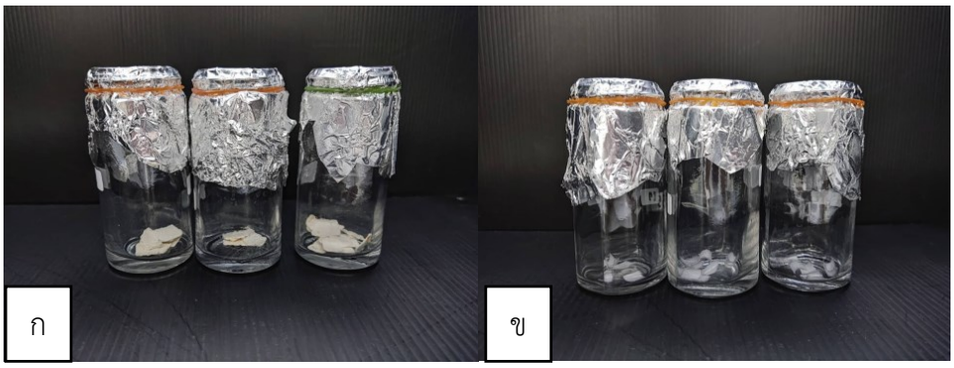
เพื่อทดลองเก็บรักษาวัสดุตรึงหัวเชื้อผสมแบบแห้ง โดยเปรียบเทียบปริมาณเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของหัวเชื้อผสม

2.3.3.1 ตรึงหัวเชื้อผสมลงบนวัสดุตรึง

ทำการตรึงหัวเชื้อผสมลงบนวัสดุตรึงตามวิธีในข้อที่ 2.3.2 แต่จะใช้การผสมกระดาษเคลือบพลาสติก PBS ทั้ง 2 แบบรวมกัน ในอัตราส่วน 1:1 แล้วทำการทดลองโดยใช้ชุดควบคุมเป็นพลาสติกชนิด PLA ที่นำมาตัดให้มีขนาดเท่ากัน โดยจำนวนวันที่ใช้ตรึงจะดูจากกราฟแสดงอัตราการเกาะของเชื้อแบคทีเรียวันที่มีปริมาณเชื้อสูงที่สุด หลังจากตรึงเสร็จแล้วจะทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ biosafety hood

2.3.3.2 ทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียผสมบนวัสดุตรึง

ใส่วัสดุตรึงหัวเชื้อผสมที่เตรียมไว้ 15 ชิ้น ลงในขวดแก้วสำหรับบรรจุสาร (vial) ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ปิดฝาสนิท โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเตรียมแบคทีเรียตรึงทั้งหมด 5 ชุดการทดลอง เพื่อใช้เก็บผลในแต่ละสัปดาห์ บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เนื่องจากต้องการจำลองสภาวะคล้ายการอยู่ในดิน จากนั้นจะเก็บตัวอย่างที่ 0, 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ โดยนำวัสดุตรึงตัวอย่างของแต่ละสัปดาห์มาเติม 0.85%NaCl 10 มิลลิลิตร นำไปใส่อ่างส่งคลื่นความถี่สูง (sonicator broth) 1 นาที จากนั้นนำมาเขย่าสารอีก 1 นาที ทำซ้ำแบบนี้ 2 รอบ เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากผิววัสดุตรึง ดูดสารละลายเซลล์มาทำการเจือจางโดยวิธีการเจือจางตัวอย่างเป็นลำดับส่วน (serial dilution techniques) และวิธีการกระจายเชื้อ (spread plate) ลงอาหาร TSA เพื่อดูปริมาณเชื้อมีชีวิต จากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟแสดงอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรีย และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียเทียบกับปริมาณเชื้อวันที่ 0



รูปที่ 2.2 การทดลองการอยู่รอดของแบคทีเรียผสมบนวัสดุตรึงกระดาษเคลือบพลาสติก PBS (ก) และพลาสติกชนิด PLA (ข)

2.3.4 การย่อยสลายของวัสดุตรึงในดิน

เพื่อดูการย่อยสลายของวัสดุตรึง จำลองเหตุการณ์เมื่อนำวัสดุตรึงไปใช้ในดินสำหรับปลูกพืช และเพื่อให้แน่ใจว่ากระดาษเคลือบพลาสติก PBS และพลาสติก PLA จะย่อยสลายได้ในดินปกติโดยไม่มีการตกค้างในสิ่งแวดล้อม

2.3.4.1 เตรียมวัสดุตรึงที่ผ่านการตรึงเชื้อแล้ว และวัสดุตรึงที่ไม่ผ่านการตรึงเชื้อ

ชุดการทดลองที่หนึ่ง นำกระดาษเคลือบพลาสติก PBS และพลาสติกชนิด PLA ที่ตัดแล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วอบแห้งที่ตู้อบ 80 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ชุดการทดลองที่สองทำการตรึงหัวเชื้อผสมบนวัสดุตรึงตามวิธีข้อที่ 2.3.3.1 แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ biosafety hood ที่อุณหภูมิห้อง

2.3.4.2 การย่อยสลายของวัสดุตรึงในดิน

นำวัสดุตรึงมาชุดการทดลองละ 1 ชิ้น ใส่ลงในกระถางที่บรรจุดิน 50 กรัม เพื่อให้สามารถฝังวัสดุตรึงได้คลุมทั่วทุกส่วน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และแสงธรรมชาติส่องถึง ติดตามการย่อยสลายต่อไปจนครบ 60 วัน

รูปที่ 2.3 การทดลองการย่อยสลายของวัสดุตรึงในดิน

แผนงานการทดลองต่อไป

2.3.5 ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงในการส่งเสริมเจริญของต้นอ้อย

2.3.5.1 เตรียมวัสดุตรึงที่ทำการตรึงแบคทีเรียผสม

ทำการทดลองโดยเตรียมหัวเชื้อผสมตรึงบนกระดาษเคลือบพลาสติก PBS ดังวิธีในข้อ 2.3.3.1 จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้ง และเตรียมวัสดุตรึงปลอดเชื้อที่ไม่ผ่านการตรึงหัวเชื้อผสม

2.3.5.2 ทำการทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อผสมแบบตรึงในดินที่ปลูกต้นอ้อย

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมในดินปลูกอ้อย โดยนำวัสดุตรึงเชื้อปริมาณ 125 กรัม มาผสมกับดินปลูกอ้อย 500 กรัม ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่อ้างอิงมาจากการใช้ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยบำรุงดิน Soil booster ยี่ห้อ Siam Biofert ซึ่งระบุว่าประกอบด้วยแบคทีเรียและวัสดุชีวภาพต่าง ๆ เช่น ถ่านชีวภาพ ใยปาล์ม ใบไผ่และอื่น ๆ ในการหมัก ใช้โดยผสมปุ๋ย 1 ส่วนกับดิน 4 ส่วน งานวิจัยนี้ต้องการจะนำวัสดุตรึงมาทำปุ๋ย จึงทดลองใช้ผสมตามอัตราส่วนของปุ๋ยที่มีการใช้งานจริงด้วยการใส่วัสดุตรึง 1 ส่วนต่อดิน 4 ส่วน โดยจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นในวัสดุตรึงจะมีประมาณ 10^8 – 10^9 CFU ต่อกรัม และนำต้นกล้าอ้อยอายุ 2 เดือนมาปลูกในดินที่เตรียมไว้ ใส่ในกระถางปลูกโดยจัดเตรียม 3 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 5 กระถาง ประกอบด้วย ชุดการทดลองที่ 1 เป็นชุดควบคุมที่จะใช้ดินในการปลูกเพียงอย่างเดียว โดยไม่ผสมวัสดุตรึง ชุดการทดลองที่ 2 จะใช้วัสดุตรึงที่ไม่ผ่านการตรึงหัวเชื้อในการปลูก และชุดการทดลองที่ 3 จะใช้วัสดุตรึงที่ผ่านการตรึงเชื้อผสมในการปลูก ทำการรดน้ำทุกวันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และหลังจากนั้นงดให้น้ำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อจำลองสภาวะแล้ง วัดผลการเจริญของอ้อยโดยวัดความยาวราก ลำต้น และใบ และวัดปริมาณเชื้อที่เจริญบริเวณผิวราก โดยการนำราก 1 กรัม ใส่ลงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และนำไปเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำให้เซลล์แบคทีเรียหลุดออกจากผิวราก และนำไปใส่อ่างเครื่องความถี่สูง (sonicator bath) เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาปั่นเหวี่ยงด้วย Refrigerated Microcentrifuge ที่ความเร็ว 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตะกอนเซลล์มาละลายใน 0.85%NaCl และดูปริมาณเชื้อโดยใช้วิธี MPN ในอาหาร 2 ชนิด คือ อาหาร TSB เพื่อดูปริมาณเชื้อทั้งหมดและอาหาร TSB ที่ใส่ PEG 20% เพื่อใช้ดูปริมาณเชื้อทนแล้ง

บทที่ 3

ผลการทดลอง

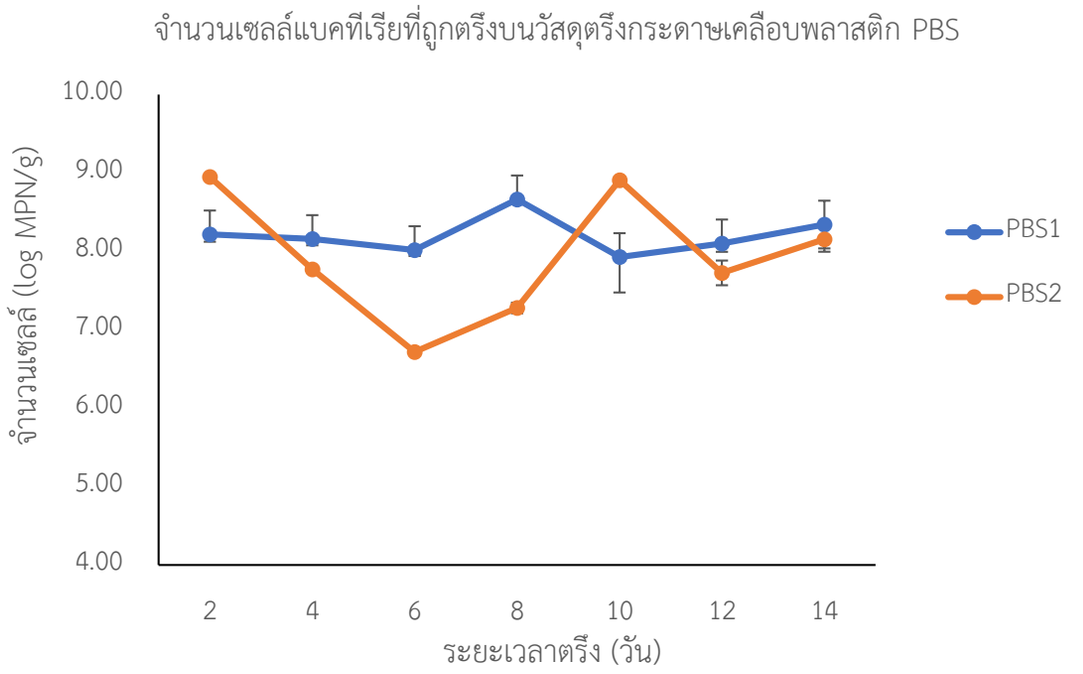
3.1 การเกาะของเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุตรึงกระดาษเคลือบพลาสติก PBS

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสนใจการตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียผสมบนเศษกระดาษเคลือบพลาสติก PBS ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งรอการจัดการ มาใช้ให้เกิดประโยชน์โดยการใช้เป็นวัสดุตรึงหัวเชื้อผสมสำหรับปลูกอ้อย โดยวัสดุตรึงกระดาษเคลือบพลาสติก PBS นำมาจากแก้วกระดาษเคลือบ PBS ที่ผ่านการใช้งานแล้วของ 2 แหล่งที่มา ได้แก่ PBS1 นำมาจากร้านค้าในโรงอาหารจุฬาลงกรณ์ และ PBS2 เป็นแก้วกระดาษเคลือบ PBS สำหรับใส่กาแฟร้อนของร้านกาแฟแห่งหนึ่ง เพื่อต้องการทดสอบว่าวัสดุตรึงชนิดเดียวกันแต่ผลิตคนละที่จะสามารถใช้เป็นวัสดุตรึงเชื้อได้ต่างกันหรือไม่ ซึ่งขั้นแรกคือ การหาจำนวนวันที่เหมาะแก่การตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียผสม ซึ่งจะต้องทดลองเพื่อหาว่าควรใช้เวลาตรึงกี่วัน จึงจะมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียผสมบนวัสดุตรึงมากที่สุด โดยผลการตรึงเชื้อแบคทีเรียผสมบนวัสดุตรึงแสดงได้ดังรูปที่ 3.1 ซึ่งเป็นกราฟแสดงจำนวนเซลล์บนวัสดุตรึง PBS1 และ PBS2 จะเห็นได้ว่าจำนวนเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึง PBS1 และ PBS2 มีจำนวนเซลล์สูงสุดที่ชุดการทดลองที่ใช้เวลาตรึง 2 วัน และ 8 วันตามลำดับ แต่โดยภาพรวมแล้วจำนวนเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึงทั้งสองไม่ได้แตกต่างกันมาก และในแง่ของการนำไปใช้งานจริงนั้นไม่สามารถแบ่งแยกยี่ห้อหรือแหล่งผลิตขยะแก้วกระดาษเคลือบ PBS เหล่านี้ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำเอาวัสดุตรึงทั้งสองมาผสมกัน โดยเมื่อลองนำจำนวนเซลล์แบคทีเรียของแต่ละวันมารวมกัน และหาค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อแล้ว พบว่ามีจำนวนเซลล์แบคทีเรียสูงที่สุดในชุดการทดลองตรึงเป็นเวลา 2 วัน นั่นคือประมาณ 8.57 log MPN/g ดังนั้นจึงเลือกใช้การตรึงเป็นเวลา 2 วันในการทดลองขั้นต่อไป

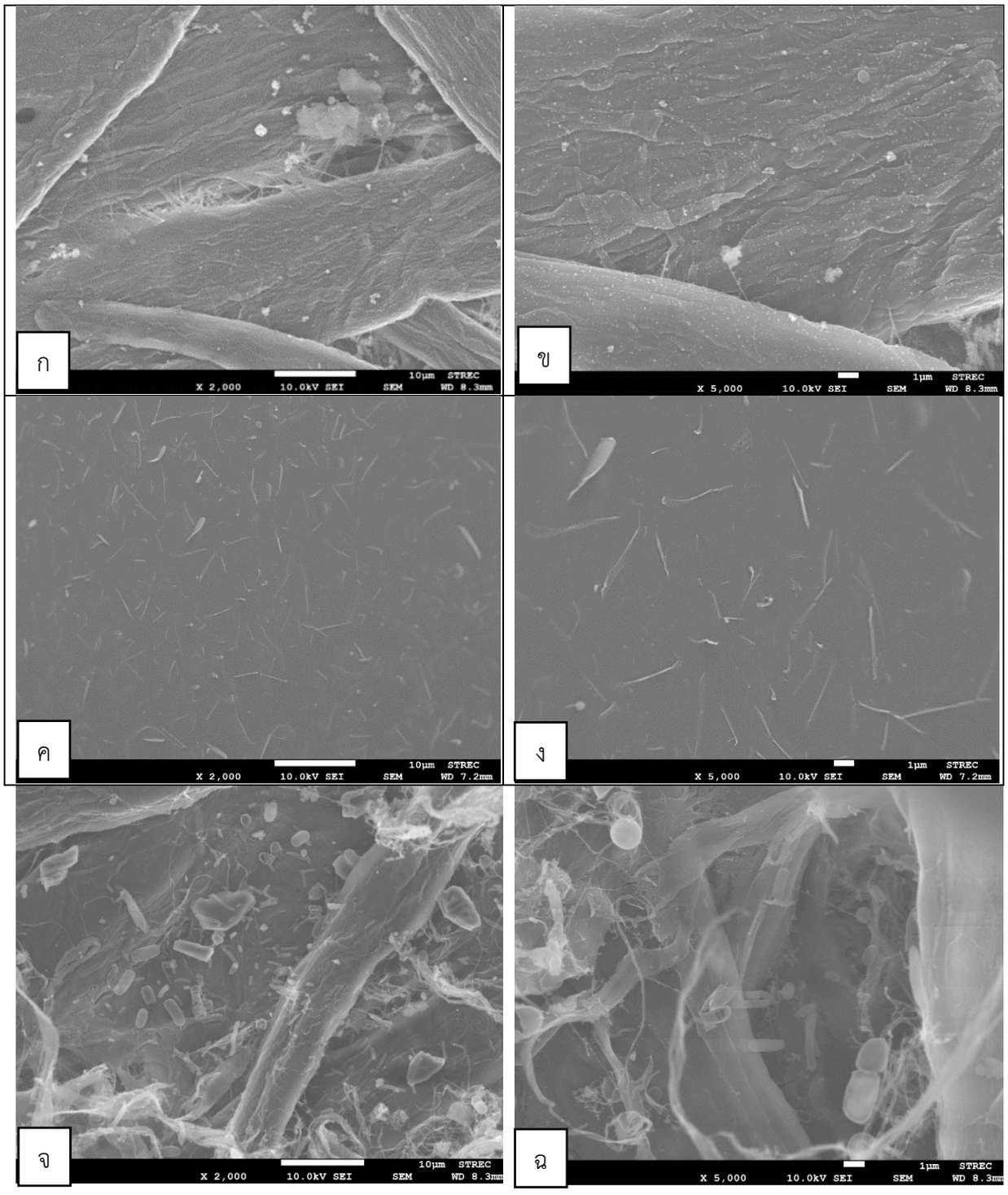
จากนั้นจึงสุ่มนำตัวอย่างวัสดุตรึง PBS2 ที่ผ่านการตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเป็นเวลา 2 วันไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด เพราะมีปริมาณเชื้อสูงที่สุด นั่นคือประมาณ 8.95 log MPN ต่อวัสดุตรึง 1 กรัม เมื่อดูลักษณะการเกาะของแบคทีเรียบนวัสดุตรึง ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.2จ และ 3.2ฉ พบว่าเมื่อวัสดุตรึงกระดาษเคลือบพลาสติก PBS ผ่านการตรึงโดยวิธีการบ่มแบบเขย่า ทำให้วัสดุตรึงมีการพองขึ้นและมีช่องว่างลักษณะเป็นโพรงระหว่างเส้นใยภายในวัสดุตรึง แบคทีเรียจึงสามารถเข้าไปจับอยู่ภายในช่องว่างเหล่านั้นได้ เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะพื้นผิวของวัสดุตรึงทั้งสองชนิด ที่ถูกนึ่งฆ่าเชื้อแต่ยังไม่ได้นำไปตรึงเชื้อด้วยการบ่มเขย่า วัสดุตรึงกระดาษเคลือบ PBS ในรูปที่ 3.2ก และ 3.2ข มีลักษณะของพื้นผิวขรุขระ เมื่อสังเกตจะเห็นเป็นเส้นใยเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ มีรอยแยกออกจากกันเล็กน้อย อาจจะเกิดจากการนึ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งลักษณะของการเรียงตัวอัดแน่นและผิวขรุขระนี้อาจทำให้แบคทีเรียเกาะได้ แต่อาจจะเกาะได้ไม่ดีเท่าวิธีการบ่มเขย่าที่ใช้ในการตรึงเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งทำให้เส้นใยที่อัดแน่นค่อย ๆ คลายตัวออกจากกัน เป็นลักษณะโพรงช่องว่างเล็ก ๆ เอื้อให้แบคทีเรียสามารถเข้าไปเกาะอยู่ได้ ดังนั้นการใช้วิธีบ่มเขย่าในการ

ตรึงแบคทีเรียจึงเหมาะสมแล้ว ส่วนวัสดุตรึง PLA ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ แสดงในรูปที่ 3.2ค และ 3.2ง มีลักษณะพื้นผิวเรียบ มีรอยเป็นทางสั้น ๆ ไม่พบรอยแยกช่องว่างหรือรูพรุน ดังนั้นคิดว่าเนื่องจากพื้นผิวลักษณะนี้เอง จึงทำให้แบคทีเรียสามารถเกาะได้น้อย หากต้องการให้แบคทีเรียสามารถเกาะได้เยอะขึ้น ทั้งในแง่ของการใช้ประโยชน์ในการตรึงแบคทีเรียและในการย่อยสลายพลาสติก อาจจะทดลองทำให้พื้นผิวมีความขรุขระเพิ่มขึ้น หรือเปลี่ยนวิธีการที่ใช้ในการตรึงแบคทีเรีย การบ่มแบบเขย่าอาจทำให้แบคทีเรียยึดเกาะกับผิวพลาสติก PLA ได้ยากกว่า อาจจะทดลองใช้การตรึงแบบบ่มทิ้งไว้เฉย ๆ อยู่กับที่แทน

จากผลการทดลอง ผู้วิจัยจึงตั้งข้อสังเกตว่า ถ้าหากตรึงแบคทีเรียบนวัสดุตรึงแล้วจะสามารถเก็บรักษาแบบแห้งได้หรือไม่ เพื่อให้ง่ายต่อการขนส่งไปยังพื้นที่เพาะปลูกต่าง ๆ ที่อยู่ไกล ถ้าสามารถเก็บรักษาแบบแห้งได้แล้วแบคทีเรียจะอยู่รอดได้นานแค่ไหน จึงทดลองการเก็บวัสดุตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียแบบแห้งในขวดทดลองที่ปิดสนิทในที่มืด เพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้เซลล์แบคทีเรียถูกทำลายโดยแสง



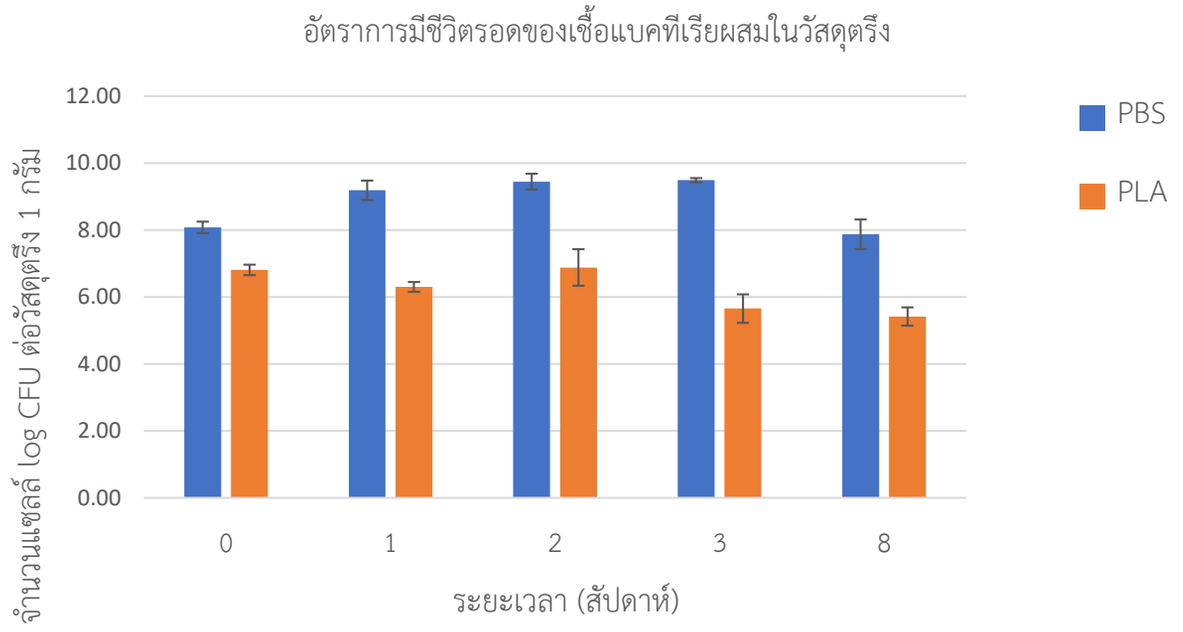
รูปที่ 3.1 จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ถูกตรึงบนวัสดุตรึงกระดาษเคลือบพลาสติก PBS



รูปที่ 3.2 ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด แสดงการยึดเกาะของแบคทีเรียบนผิวของวัสดุตรึงกระดาษเคลือบพลาสติก PBS ที่นึ่งฆ่าเชื้อ ใต้กล้องกำลังขยาย 2000x (ก) และ 5000x (ข) ลักษณะพื้นผิวของวัสดุตรึงพลาสติก PLA ที่นึ่งฆ่าเชื้อ ใต้กล้องกำลังขยาย 2000x (ค) และ 5000x (ง) และกระดาษเคลือบพลาสติก PBS2 ที่ใช้เวลาตรึงเชื้อแบคทีเรียด้วยการบ่มเขย่า 2 วัน ที่กำลังขยาย 2000x (จ) และ 5000x (ฉ)

3.2 อัตราการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียในวัสดุตรึง

ในการทดลองเก็บวัสดุตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียแบบแห้งนี้ จะใช้การผสมวัสดุตรึงกระดาษเคลือบพลาสติก PBS1 และ PBS2 รวมกันเป็นชุดการทดลองเดียวสำหรับวัสดุตรึงชนิด PBS และจะเพิ่มวัสดุตรึงพลาสติกชนิด PLA เข้ามาเป็นชุดควบคุม เนื่องจากมีงานวิจัยก่อนหน้าได้ทำการทดลองใช้ประโยชน์พลาสติกชนิด PLA ซึ่งเป็นขยะเหลือทิ้งที่หาได้ง่าย ในการทำปุ๋ยชีวภาพเพื่อใช้ปลูกอ้อยแล้ว (ภาณุมาศ เมืองวุฒฑานันท์, 2563) จึงต้องการทำการทดลองเปรียบเทียบว่ากระดาษเคลือบพลาสติก PBS ซึ่งเป็นขยะเหลือทิ้งที่หาได้ง่ายเช่นกัน จะใช้เป็นวัสดุตรึงแบคทีเรียได้ดีกว่าหรือไม่ อย่างไร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.3 กราฟอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อผสมในวัสดุตรึง พบว่าในการใช้วัสดุตรึงกระดาษเคลือบพลาสติก PBS มีการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียผสมในช่วง 1 ถึง 3 สัปดาห์ แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังตารางที่ 3.1 และในสัปดาห์ที่ 8 ลดลงเหลือ 97% หรือเท่ากับ 7.87 log CFU ต่อวัสดุตรึง 1 กรัม เทียบกับสัปดาห์ที่ 0 ที่มีอยู่ 8.08 log CFU ต่อวัสดุตรึง 1 กรัม



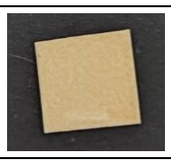
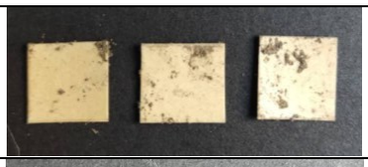
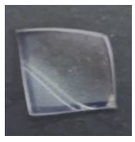
รูปที่ 3.3 การมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียผสมในวัสดุตรึง

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์ของอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อผสมในวัสดุตรึง

ชนิดวัสดุตรึง	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 8
PBS	100%	113%	116%	117%	97%
PLA	100%	92%	101%	83%	79%

3.3 การย่อยสลายของกระดาษเคลือบพลาสติก PBS และพลาสติก PLA ในดิน

ในการจะนำเอาวัสดุตรึงแบคทีเรียผสมนี้ไปใช้ในการทำปุ๋ยชีวภาพปลูกอ้อย นอกจากจะทดสอบการยึดเกาะและการอยู่รอดของแบคทีเรียแล้ว จะต้องทดสอบก่อนว่าวัสดุตรึงที่จะใส่ลงไปในดินนั้นจะสามารถถูกจุลินทรีย์ทั่วไปในดินย่อยสลายได้และไม่ตกค้างสะสมในดิน เพื่อไม่ให้กลายเป็นการเพิ่มขยะให้กับสิ่งแวดล้อมแทน จึงได้ทำการทดลองนำวัสดุตรึงกระดาษเคลือบพลาสติก PBS และพลาสติก PLA ฝังลงในดินดูการย่อยสลาย โดยจะใช้วัสดุตรึงที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ เปรียบเทียบกับวัสดุตรึงที่ผ่านการตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียผสมโดยใช้เวลาตรึง 2 วัน เพื่อต้องการทดสอบว่าการตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียผสมจะช่วยเร่งการย่อยสลายวัสดุตรึงในดินได้หรือไม่ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.4 เมื่อฝังวัสดุตรึงในดินทิ้งไว้เป็นเวลา 30 วัน พิจารณาเปรียบเทียบระหว่างวันที่ 30 กับวันที่ 0 แล้ว พบว่ายังไม่สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงด้วยตาเปล่าได้ ควรจะส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ หรือเป็นไปได้ว่าระยะเวลา 30 วันอาจจะน้อยเกินไป รวมถึงความชื้นของดินน้อย เนื่องจากพื้นที่เก็บดินตัวอย่างอยู่ในบริเวณที่โดนแสงแดดจ้าอย่างเต็มที่ในเวลากลางวัน หากต้องการจะเร่งให้มีการย่อยสลายเร็วขึ้น การรดน้ำให้ดินมีความชื้น หรือทดลองในดินที่มีความชื้นสูง น่าจะทำให้การย่อยสลายเกิดได้เร็วยิ่งขึ้น และนอกจากนี้ควรเพิ่มระยะเวลาในการติดตามผลการทดลองให้นานขึ้น ซึ่งเมื่ออ้างอิงจากการทดลองย่อยสลายแก้วกระดาษเคลือบ PBS ของทางโครงการ Chula Zero Waste ที่ได้ระบุผลการทดสอบการย่อยสลายว่า แก้วกระดาษเคลือบ PBS นี้สามารถย่อยสลายได้โดยใช้เวลาประมาณ 4-6 เดือน ในดินสภาวะการหมักปุ๋ยทั่วไปที่สามารถทำได้ตามบ้านเรือน ซึ่งได้ระบุไว้ในบทความในเว็บไซต์ของโครงการ http://www.chulazerowaste.chula.ac.th และในส่วนของแก้วกระดาษเคลือบ PBS จากบริษัทบางจากร้านกาแฟอินทนิลได้ระบุว่า แก้วกระดาษเคลือบพลาสติก PBS อินทนิลใช้เวลาในการย่อยสลายประมาณ 180 วัน ดังระบุไว้ในเว็บไซต์ของทางบริษัท https://csc-pttgcgroup.com ดังนั้น การทดลองย่อยสลายวัสดุตรึงนี้อาจจะสามารถมองเห็นความเปลี่ยนแปลงในการย่อยสลายได้ชัดเจนขึ้น ถ้าใช้เวลาติดตามผลการทดลองอย่างน้อย 4 เดือนขึ้นไป

ชนิดของวัสดุตรึง	ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ		ผ่านการตรึงแบคทีเรีย	
กระดาษเคลือบ PBS	วันที่ 0	วันที่ 30	วันที่ 0	วันที่ 30
				
พลาสติก PLA				

รูปที่ 3.4 ภาพวัสดุตรึงที่จากการทดลองการย่อยสลายของกระดาษเคลือบพลาสติก PBS และพลาสติก PLA ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และผ่านการตรึงแบคทีเรีย ทดลองฝังในดินปลูกกล้วย ติดตามผลการทดลองก่อนฝังดินวันที่ 0 และหลังจากการฝังดินวันที่ 30

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เลือกใช้หัวเชื้อแบคทีเรียผสมทั้งหมด 3 ชนิด ประกอบด้วย *Bacillus thuringiensis* B2, *Bacillus stratosphericus* L19 และ *Bacillus altitudinis* T17 โดยแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ นี้ มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช โดยสามารถผลิตฮอร์โมน IAA ที่มีบทบาทต่อการยืดยาว การแบ่งเซลล์ และยังสามารถกระตุ้นการเจริญของรากพืช ส่งเสริมประสิทธิภาพในการลำเลียงสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของพืช และสามารถผลิต exopolysaccharides (เอกวัล ลือพร้อมชัย, 2560) โดยใช้วัสดุตรึงเป็นกระดาษเคลือบพลาสติก PBS เปรียบเทียบกับพลาสติก PLA ผิวกระดาษเคลือบพลาสติก PBS มีลักษณะขรุขระและเป็นเส้นใยเรียงตัวกัน เมื่อนำไปใช้เป็นวัสดุตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียผสมโดยใช้วิธีการบ่มแบบเขย่าเป็นเวลา 2 วัน ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่จำนวนเชื้อแบคทีเรียผสมสูงที่สุดคืออยู่ที่ประมาณ 10^8 - 10^9 CFU ต่อวัสดุตรึง 1 กรัม การบ่มเขย่าจะทำให้วัสดุตรึงกระจายตัว มีการพองขึ้นและเส้นใยคลายตัวเป็นช่องโพรงเล็ก ๆ ระหว่างเส้นใย ทำให้เอื้อต่อแบคทีเรียในการเข้าไปเกาะภายในโพรงนั้น ๆ และผู้วิจัยได้ตั้งข้อสงสัยต่อไปว่าถ้าต้องการให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียต่อวัสดุตรึง 1 กรัม มีปริมาณสูงขึ้นนั้น การทำให้วัสดุตรึงมีขนาดเล็กลงเพื่อเพิ่มขึ้นที่ผิวให้กับวัสดุตรึงจะช่วยได้หรือไม่ จึงคิดที่จะทดลองเปลี่ยนขนาดวัสดุตรึงให้เล็กลง จากเดิมใช้ขนาดกว้าง 1 เซนติเมตร ยาว 1 เซนติเมตร เนื่องจากเป็นขนาดที่สะดวกต่อการใส่ลงในขวดทดลองได้ อาจจะเปลี่ยนเป็นขนาดกว้าง 0.5 เซนติเมตร ยาว 0.5 เซนติเมตร สำหรับการทดลองต่อในอนาคต เพื่อเปรียบเทียบดูว่าขนาดมีผลหรือไม่

จากการทดลองดูอัตราการอยู่รอดของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมบนวัสดุตรึง โดยใช้การเก็บในรูปแบบแห้งนั้น เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ จำนวนเซลล์ของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมบนวัสดุตรึงกระดาษเคลือบพลาสติก PBS ลดลงไปเพียงแค่ 3% เทียบกับสัปดาห์ที่ 0 และในระหว่างสัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 3 มีการเพิ่มขึ้นของเชื้อบนวัสดุตรึง อาจเกิดจากอาหารเลี้ยงเชื้อบางส่วนที่แห้งติดอยู่กับวัสดุตรึง ทำให้แบคทีเรียที่ตรึงอยู่สามารถใช้เป็นอาหารในการเจริญเติบโตได้ หรือในระยะเวลาที่นานขึ้น คาดว่าแบคทีเรียที่ตรึงอยู่จะสามารถใช้กระดาษเคลือบ PBS เป็นแหล่งอาหารได้ เพราะเก็บแบบแห้งโดยในขวดมีเพียงวัสดุตรึงกับเชื้อแบคทีเรีย ไม่ได้ใส่อาหารเพิ่มลงไป ซึ่งผลงานวิจัยก่อนหน้าของ Platnieks และคณะ(2020) ที่ได้มีการทดสอบการย่อยสลายแผ่น PBS ผสมกับเซลลูโลส ด้วยการใส่ลงไปในดิน แล้วจุลินทรีย์ในดินสามารถย่อยสลายแผ่น PBS ผสมเซลลูโลสใช้เป็นอาหารได้ และอีกหนึ่งงานวิจัยของ Zhu และคณะ (2015) ที่ได้ระบุว่าจุลินทรีย์สามารถใช้เม็ดพลาสติก PBS ในคอลัมน์บำบัดน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไปโดยไม่เติมอาหารเพิ่มลงไป แบคทีเรียจะใช้วัสดุตรึงกระดาษเคลือบพลาสติก PBS เป็นแหล่งอาหารและทำให้เกิดการย่อยสลายได้ ทำให้จำนวนของจุลินทรีย์มีการเพิ่มขึ้น และจากผลการทดลองสรุปได้ว่า วัสดุตรึงกระดาษเคลือบ PBS ที่ตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียผสมสามารถเก็บในรูปแบบแห้งโดยมีปริมาณเชื้อลดลงเพียงเล็กน้อยได้นานถึง 8 สัปดาห์

หรืออาจจะเก็บได้นานกว่านั้น ซึ่งการอยู่รอดของแบคทีเรียผสมบนวัสดุตรึงกระดาษเคลือบพลาสติก PBS ที่ได้ทดลองนี้ มีเปอร์เซ็นต์อยู่รอดสูงเทียบกับในงานวิจัยของ Jayani และคณะ (2020) ที่ใช้วัสดุตรึงเป็นเซลลูโลสนาโนไฟเบอร์ที่ผลิตจากกระบวนการทางชีวภาพของแบคทีเรีย ทดลองใช้เป็นวัสดุตรึงในการส่งเสริมการอยู่รอดของแบคทีเรีย *Lactobacillus acidophilus* ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง ผลรายงานว่ามีปริมาณเชื้อเริ่มต้นอยู่ที่ 10.72 log CFU ต่อกรัมวัสดุตรึง เมื่อเวลาผ่านไป 24 วัน เชื้ออยู่ที่ 7.63 log CFU ต่อวัสดุตรึง 1 กรัม คิดเป็น 71% เทียบกับวันเริ่มต้น ดังนั้นวัสดุตรึงกระดาษเคลือบ PBS ในงานวิจัยนี้จึงมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการอยู่รอดของหัวเชื้อแบคทีเรียในการเก็บรักษาแบบแห้งได้ดี ในขณะที่วัสดุตรึงพลาสติกชนิด PLA มีการลดลงของจำนวนเซลล์แบคทีเรียในสัปดาห์ที่ 8 เหลือจำนวนแบคทีเรียคิดเป็น 79% เทียบกับวันเริ่มต้น

หากต้องการให้แบคทีเรียอยู่รอดได้ดีขึ้น อาจจะต้องเติมสารปกป้องเซลล์ (Protective agents) ระหว่างเตรียมเซลล์ตรึง ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Sun และคณะ (2020) ที่ได้ใส่ whey protein concentrate (WPC), pullulan, trehalose, และ sodium glutamate รวมกันเพื่อเป็น protective agent ในการส่งเสริมการอยู่รอดของ *Lactobacillus plantarum* และใช้การพ่นฝอยอบแห้ง (Spray drying) ในอัตราส่วนแบคทีเรีย 3 ส่วนและ protective agent 1 ส่วน เพื่อให้ได้เชื้ออยู่ในรูปแบบผง ทำการทดลองเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ผ่านไป 360 วัน ปรากฏว่าที่ -20 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อสามารถอยู่รอดได้ถึง 85.12 %

จากการทดลองติดตามการย่อยสลายวัสดุตรึงกระดาษเคลือบพลาสติก PBS ยังไม่สามารถมองเห็นการเปลี่ยนแปลงด้วยตาเปล่า ควรเพิ่มระยะเวลาในการตรวจติดตาม และเพิ่มปัจจัยในเรื่องของอุณหภูมิเข้าไปด้วย เพราะงานวิจัยของ Platnieks และคณะ (2020) แสดงให้เห็นว่า PBS สามารถย่อยสลายในดินอุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส ได้ภายในระยะเวลาประมาณ 75 วัน ซึ่งหากต้องการเร่งการย่อยสลายให้เร็วขึ้นก็อาจจะทดลองเพิ่มอุณหภูมิในการย่อยสลาย อุณหภูมิดินปกติทำให้การย่อยสลายเกิดได้ช้ากว่า ซึ่งทางโครงการ Chula zero waste รายงานว่าใช้เวลาอย่างต่ำ 4 – 6 เดือน ดังนั้นในการนำไปใช้ร่วมกับการปลูกพืชในแปลงปลูกที่มีอุณหภูมิปกติ วัสดุตรึงกระดาษเคลือบพลาสติก PBS จึงเหมาะแก่การใช้ปลูกพืชที่ใช้เวลาเจริญเติบโตเกิน 4 เดือนขึ้นไป ซึ่งคาดว่าเมื่อถึงเวลาเก็บเกี่ยวแล้ววัสดุตรึงจะย่อยสลายจนหมดพอดี

งานวิจัยนี้สามารถใช้ประโยชน์จากขยะจำพวกแก้วกระดาษเคลือบพลาสติก PBS ในการใช้ตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียผสม ซึ่งเป็นวัสดุตรึงที่ได้มาฟรี ไม่ต้องเสียเงินซื้อ ในขณะที่วัสดุตรึงที่มีงานวิจัยก่อนหน้าได้นำมาใช้งานเช่น ถ่านชีวภาพ เถ้าลอย และกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม (ปฐมาวดี ตรีสอน, 2561) และอื่น ๆ จะต้องใช้เงินในการซื้อมาจากโรงงานหรือบริษัทเพื่อนำมาใช้งาน ดังนั้นจึงสามารถลดต้นทุนในการตรึงหัวเชื้อผสมบนวัสดุตรึงได้ และด้วยผลการทดลองทั้งหมดที่ได้กล่าวมานี้ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำหัวเชื้อผสมแบบตรึงบนกระดาษเคลือบ PBS ไปใช้ร่วมกับการปลูกเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชได้จริง

แผนการดำเนินงานต่อไป

1. ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงในการส่งเสริมเจริญของต้นอ้อยในสภาวะแล้ง

ในการทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของอ้อย มีงานวิจัยของ Amna และคณะ (2020) ที่ได้ศึกษาการใช้แบคทีเรีย *Bacillus xiamenensis* PM14 ที่คัดแยกได้จากดินที่รากบริเวณพื้นที่ปลูกอ้อย ซึ่งมีคุณสมบัติสำคัญหลายอย่าง สามารถยับยั้งราก่อโรค, ย่อยสลายฟอสเฟต, ผลิต IAA, EPS, ACC deaminase และ extracellular enzyme แล้วรายงานผลการทดลองว่า การปลูกแบบใส่เชื้อมีค่าน้ำหนักและความสูงของต้นอ้อยมากกว่าการปลูกแบบไม่ใส่เชื้อ และงานวิจัยของ Antunes และคณะ (2019) ได้เปรียบเทียบระหว่างการใส่หัวเชื้อเดี่ยวกับหัวเชื้อแบบผสม พบว่าการใส่แบคทีเรียหัวเชื้อผสมให้ประสิทธิภาพการเจริญโตของอ้อยที่ดีกว่า นอกจากการใช้หัวเชื้อแบคทีเรียแบบเดี่ยว และแบบผสมแล้ว ยังมีงานวิจัยที่ใส่ปุ๋ยแร่ธาตุ และปุ๋ยหมักร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรียในการปลูกอ้อย โดย Santos และคณะ (2018) รายงานว่านอกจากการใส่แบคทีเรียและปุ๋ยแล้ว การอยู่รอดได้ในสภาวะดินปลูกของแบคทีเรียที่ใส่ก็ถือเป็นปัจจัยสำคัญอย่างยิ่ง โดยงานวิจัยของ Sohaib และคณะ (2020) ยังได้เปรียบเทียบการตรึงหัวเชื้อผสมลงบนวัสดุตรึงหลายชนิด เพื่อนำไปใช้ปลูกพืชในสภาวะดินเค็ม (salinity stress) โดยวัสดุตรึงที่ใช้ได้แก่ ปุ๋ยหมัก, ตะกอนจาก biogas, ซังข้าวโพด และ ซีโอไลต์ พบว่าการตรึงเชื้อผสมกับปุ๋ยหมักและตะกอน biogas สามารถทำให้ข้าวสาลีที่ปลูกในระดับกระถางมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าการใส่เพียงเชื้อผสมเพียงอย่างเดียว เพราะวัสดุตรึงช่วยปกป้องเชื้อผสมให้สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะดินเค็ม โดยส่วนตัวแล้วผู้วิจัยสนใจปัญหาพื้นที่เพาะปลูกที่ประสบกับปัญหาความแห้งแล้ง น้ำไม่เพียงพอต่อการทำการเกษตร เนื่องจากฝนทิ้งช่วงและพื้นเพาะปลูกอยู่ห่างไกลจากเขตชลประทาน ด้วยเหตุนี้จึงต้องการทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงบนกระดาษเคลือบพลาสติก PBS ในการปลูกอ้อยและจำลองการปลูกในสภาวะแล้งต่อไป

การทดลองจะใช้แบคทีเรียแบบตรึงบนกระดาษเคลือบ PBS และพลาสติก PLA มาใช้ผสมกับดินในการปลูกอ้อย เปรียบเทียบกับหัวเชื้อผสมแบบไม่ตรึง และชุดควบคุมที่ใส่เพียงดินอย่างเดียว เพื่อดูประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย การทดลองจะใช้ต้นกล้าอ้อยอายุประมาณ 2 เดือน ทดลองโดยปลูกในกระถาง ทำการรดน้ำทุกวันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และหลังจากนั้นงดให้น้ำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อจำลองสภาวะแล้ง วัดผลการเจริญของอ้อยโดยวัดความยาวราก ลำต้น และใบ และวัดปริมาณเชื้อที่เจริญบริเวณผิวราก โดยการนำราก 1 กรัม ใส่ลงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และนำไปเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำให้เซลล์แบคทีเรียหลุดออกจากผิวราก และนำไปใส่อ่างเครื่องความถี่สูง (sonicator bath) เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาปั่นเหวี่ยงด้วย Refrigerated Microcentrifuge ที่ความเร็ว 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตะกอนเซลล์มาละลายใน

0.85%NaCl และดูปริมาณเชื้อโดยใช้วิธี MPN ในอาหาร 2 ชนิด คือ อาหาร TSB เพื่อดูปริมาณเชื้อทั้งหมด และอาหาร TSB ที่ใส่ PEG 20% เพื่อใช้ดูปริมาณเชื้อทนแล้ง

ผลการทดลองที่คาดว่าจะได้รับ

อ้างอิงจากงานวิจัยของ Chandra และคณะ (2018) ที่ได้ศึกษาแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญของพืช กลุ่มจีนัส *Bacillus* พบว่าอ้อยในชุดการทดลองที่ใส่แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตดีกว่าชุดควบคุม และจากงานวิจัยของ ปฐมาวดี ตรีสอน (2561) ที่ได้ทดลองตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียผสมบนวัสดุตรึงผสมที่ประกอบด้วยเถ้าลอย ถ่านชีวภาพ และกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม ใช้ในการทดลองปลูกอ้อยในสภาวะแล้ง พบว่าหัวเชื้อผสมแบบตรึงทำให้อ้อยเจริญได้ดีกว่าชุดควบคุม

ดังนั้นคาดว่าการเจริญเติบโตของต้นอ้อยที่ใส่หัวเชื้อผสมแบบตรึงบนกระดาษเคลือบ PBS น่าจะมีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด กว่าการใส่เพียงวัสดุตรึงเพียงอย่างเดียว และคาดว่าในการจำลองสภาวะแล้ง หัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมจะสามารถอยู่รอดได้บนวัสดุตรึง และส่งเสริมการเจริญของต้นอ้อยได้ดีกว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อแบคทีเรียผสม

2. ศึกษาการย่อยสลายของวัสดุตรึงกระดาษเคลือบ PBS ในดินชนิดอื่น ๆ

ผู้วิจัยจะใช้วิธีการคล้ายกันกับการทดลองติดตามการย่อยสลายของวัสดุตรึงในดินปลูกต้นกล้วย เพราะเนื่องจากดินปลูกกล้วยมีความชื้นค่อนข้างน้อย จากการอยู่ในบริเวณที่โดนแสงแดดจัดในเวลากลางวัน จึงจะเพิ่มชนิดของดิน เป็นดินปลูกกล้วย ดินปลูกอ้อย ดินผสมปุ๋ยหมักชีวภาพ และดินที่อยู่บริเวณริมแม่น้ำ เพราะต้องการจะทดสอบว่าลักษณะของดิน เช่น ความชื้นที่แตกต่างกัน และชนิดของดิน จะมีผลต่อการย่อยสลายวัสดุตรึงหรือไม่ และจะเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการติดตามเป็น 4 เดือน หรือ 120 วัน อ้างอิงจากระยะเวลาน้อยที่สุดที่ทางโครงการ Chula Zero Waste ได้ระบุไว้ เพื่อเปรียบเทียบและดูความเปลี่ยนแปลงจากการย่อยสลาย

และจะเพิ่มปัจจัยในเรื่องของอุณหภูมิในการย่อยสลายเข้าไปด้วย เนื่องจากงานมีวิจัยของ Delamarche และคณะ (2020) ได้ทดลองติดตามย่อยสลายพลาสติกที่อัดขึ้นรูปจากการผสม PBS และ PLA เข้าด้วยกัน ทดสอบการย่อยสลายในดินฝังกลบ ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส พบว่ามีการย่อยสลายได้เร็วกว่าอุณหภูมิปกติ ซึ่งที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นี้ ก็ได้ถูกใช้ในการทดลองย่อยสลายแผ่น PBS ผสมกับเซลลูโลสของ Platnieks และคณะ (2020) แล้วก็พบว่าการย่อยสลายเกิดขึ้นได้เร็วกว่าเช่นกัน ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทดลองย่อยสลายวัสดุตรึงกระดาษเคลือบ PBS และพลาสติก PLA ในอุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เพิ่มเติมจาก

อุณหภูมิปกติ โดยจะทดลองวางในบริเวณที่ไม่มีแสงแดดส่อง เพื่อป้องกันไม่ให้แสงแดดทำลายแบคทีเรียและทำให้ดินตัวอย่างเกิดการแห้ง จนความชื้นในดินต่ำลง

ผลการทดลองที่คาดว่าจะได้รับ

คาดว่าการทดลองย่อยสลายวัสดุตรึงในดินผสมปุ๋ยหมักชีวภาพ น่าจะช่วยเร่งการย่อยสลายกระดาษเคลือบพลาสติก PBS ได้ดีที่สุด เพราะความหลากหลายของจุลินทรีย์ในปุ๋ยหมักน่าจะทำให้การย่อยสลายเกิดเร็วขึ้นได้ และจะสามารถเห็นผลการทดลองได้ชัดเจนด้วยตาเปล่า ถ้าเปรียบเทียบระหว่างการย่อยสลายในอุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส กับอุณหภูมิทั่วไป 37 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงกว่าทำให้การย่อยสลายเกิดได้เร็วกว่า และอุณหภูมิปกติทำให้การย่อยสลายเกิดช้ากว่า คาดว่าจะใช้เวลา 4 เดือนขึ้นไป ตามที่โครงการ Chula zero waste รายงาน ดังนั้นในการนำไปใช้งานจริงในแปลงปลูกพืชที่มีอุณหภูมิของดินเป็นอุณหภูมิปกติ วัสดุตรึงกระดาษเคลือบพลาสติก PBS จึงน่าจะเหมาะแก่การใช้ปลูกพืชที่เวลาเจริญเติบโตเกิน 4 เดือนขึ้นไป มีความเป็นไปได้ว่าเมื่อถึงเวลาเก็บเกี่ยวแล้ววัสดุตรึงพลาสติกกระดาษเคลือบ PBS จะย่อยสลายจะหมดพอดี

เอกสารอ้างอิง

Alori ET, Glick BR, Babalola, (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. Front Microbiol 8, 971.

Amna, Ud., Din, B., Sarfraz, S., Xia, Y., Kamran, M.A., Javed, M.T., Sultan, T., Hussain Munis, M.F., Chaudhary, H.J., (2019). Mechanistic elucidation of germination potential and growth of wheat inoculated with exopolysaccharide and ACC- deaminase producing *Bacillus* strains under induced salinity stress. Ecotoxicology and Environmental Safety 183, 109466.

Antunes, J.E.L., Freitas, A.D.S.D., Oliveira, L.M.S., Lyra, M.D.C.C.P.D., Fonseca, M.A.C., Santos, C.E.R.S., Oliveira, J.D.P., Araújo, A.S.F.D., Figueiredo, M.V.B., (2019). Sugarcane inoculated with endophytic diazotrophic bacteria: effects on yield, biological nitrogen fixation and industrial characteristics. Anais da Academia Brasileira de Ciências 91(4).

Ashraf, M., Hasnain, S., Berge, O., Mahmood, T., (2004). Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. Biology and Fertility of Soils 40, 157-162.

Backer, R., Rokem, J.S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., Smith, D.L., (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. Frontiers in Plant Science 9., 1473.

Bestawy, E. E., El-Shatby, B. F., Eltaweil, A. S., (2020). Integration between bacterial consortium and magnetite (Fe3O4) nanoparticles for the treatment of oily industrial wastewater, World Journal of Microbiology and Biotechnology 36(9),141.

Bonaccorso, A., Russo, N., Romeo, A., Carbone, C., Grimaudo, M.A., Alvarez-Lorenzo, C., Randazzo, C., Musumeci, T., Caggia, C., (2021). Coating *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG in Alginate Systems: an Emerging Strategy Towards Improved Viability in Orange Juice. AAPS PharmSciTech 22, 123.

Borowik, A. & Wyszkowska, J. (2016). Soil moisture as a factor affecting the microbiological and biochemical activity of soil Plant, Soil and Environment 62 (No. 6), 250-255.

Chandra, P., Tripathi, P., Chandra, A., (2018). Isolation and molecular characterization of plant growth-promoting *Bacillus* spp. and their impact on sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) growth and tolerance towards drought stress. Acta Physiologiae Plantarum 40,199.

Choi, S., Jeon, H., Jang, M., Kim, H., Shin, G., Koo, J.M., Lee, M., Sung, H.K., Eom, Y., Yang, H., Jegal, J., Park, J., Oh, D.X., Hwang, S.Y., (2021). Biodegradable, Efficient, and Breathable Multi-Use Face Mask Filter. Advanced Science 8, 2003155.

Cohen, A. C., Travaglia, C. N., Bottini, R. & Piccoli, P. N. (2009). Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. Botany, 87 (5), 455-462.

Danish, S., Zafar-Ul-Hye, M., (2019). Co-application of ACC-deaminase producing PGPR and timber-waste biochar improves pigments formation, growth and yield of wheat under drought stress. Scientific Reports 9, 5999.

Danish, S., Zafar-Ul-Hye, M., Mohsin, F., Hussain, M., (2020). ACC-deaminase producing plant growth promoting rhizobacteria and biochar mitigate adverse effects of drought stress on maize growth. PLOS ONE 15, e0230615.

Delamarche, E., Mattlet, A., Livi, S., Gérard, J.-F., Bayard, R., Massardier, V., (2020). Tailoring Biodegradability of Poly(Butylene Succinate)/Poly(Lactic Acid) Blends With a Deep Eutectic Solvent. Frontiers in Materials 7.

Goswami, D., Thakker, J.N., Dhandhukia, P.C., (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. Cogent Food & Agriculture 2, 1127500.

Hale, L., Luth, M. & Crowley, D. (2015). Biochar characteristics relate to its utility as an alternative soil inoculum carrier to peat and vermiculite. Soil Biology and Biochemistry 81, 228 - 235.

Jayani, T., Sanjeev, B., Marimuthu, S., Uthandi, S., (2020). Bacterial Cellulose Nano Fiber (BCNF) as carrier support for the immobilization of probiotic, *Lactobacillus acidophilus* 016. Carbohydrate Polymers 250, 116965.

Jompang, L., Thumsorn, S., On, J.W., Surin, P., Apawet, C., Chaichalermwong, T., Kaabbuathong, N., O-Charoen, N., Srisawat, N., (2013) Poly(Lactic Acid) and

Poly(Butylene Succinate) Blend Fibers Prepared by Melt Spinning Technique. Energy Procedia 34, 493–499.

Kaushal, M. & Wani, S. P. (2015). Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. Annals of Microbiology, 66 (1), 35 - 42.

Liu, J., Tang, L., Gao, H., Zhang, M., Guo, C., (2019). Enhancement of alfalfa yield and quality by plant growth-promoting rhizobacteria under saline-alkali conditions. Journal of the Science of Food and Agriculture 99, 281–289.

Liu, L., Yu, J., Cheng, L., Yang, X., (2009). Biodegradability of poly(butylene succinate) (PBS) composite reinforced with jute fibre. Polymer Degradation and Stability 94, 90–94.

Munemasa, S., Hauser, F., Park, J., Waadt, R., Brandt, B., Schroeder, J.I., (2015). Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. Current Opinion in Plant Biology 28, 154–162.

Nehra, V., Saharan, B.S., Choudhary, M., (2016). Evaluation of *Brevibacillus brevis* as a potential plant growth promoting rhizobacteria for cotton (*Gossypium hirsutum*) crop. SpringerPlus 5, 948.

Neil A.Campbell and Jane B.Reece. (2005). Biology, 7th Edition (International Edition). Benjamin Cummings, San Francisco, CA, USA.

Ngoune Liliane, T., Shelton Charles, M., (2020). Factors Affecting Yield of Crops. intechOpen.

Olanrewaju, O.S., Glick, B.R., Babalola, O.O., (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology 33(11), 197.

Patel, S.K.S., Gupta, R.K., Kondaveeti, S., Otari, S.V., Kumar, A., Kalia, V.C., Lee, J.-K., (2020). Conversion of biogas to methanol by methanotrophs immobilized on chemically modified chitosan. Bioresource Technology 315, 123791.

Platnieks, O., Barkane, A., Ijudina, N., Gaidukova, G., Thakur, V.K., Gaidukovs, S., (2020). Sustainable tetra pak recycled cellulose / Poly(Butylene succinate) based woody-like composites for a circular economy. Journal of Cleaner Production 270, 122321.

Platnieks, O., Gaidukovs, S., Barkane, A., Sereda, A., Gaidukova, G., Grase, L., Thakur, V.K., Filipova, I., Fridrihsone, V., Skute, M., Laka, M., (2020). Bio-Based Poly(butylene

succinate)/Microcrystalline Cellulose/Nanofibrillated Cellulose-Based Sustainable Polymer Composites: Thermo-Mechanical and Biodegradation Studies. Polymers 12, 1472.

Puchalski, M., Szparaga, G., Biela, T., Gutowska, A., Sztajnowski, S., Krucińska, I., (2018). Molecular and Supramolecular Changes in Polybutylene Succinate (PBS) and Polybutylene Succinate Adipate (PBSA) Copolymer during Degradation in Various Environmental Conditions. Polymers 10, 251.

Rosa, P.A.L., Mortinho, E.S., Jalal, A., Galindo, F.S., Buzetti, S., Fernandes, G.C., Barco Neto, M., Pavinato, P.S., Teixeira Filho, M.C.M., (2020). Inoculation with Growth-Promoting Bacteria Associated with the Reduction of Phosphate Fertilization in Sugarcane. Frontiers in Environmental Science 8, 32.

Saharan, K., Sarma, M. V. R. K., Srivastava, R., Sharma, A. K., Johri, B. N., Prakash, A., Sahai, V. & Bisaria, V. S. (2010). Development of non-sterile inorganic carrier-based formulations of fluorescent *pseudomonad* R62 and R81 and evaluation of their efficacy on agricultural crops. Applied Soil Ecology, 46 (2), 251-258.

Saikia, J., Sarma, R.K., Dhandia, R., Yadav, A., Bharali, R., Gupta, V.K., Saikia, R., (2018). Alleviation of drought stress in pulse crops with ACC deaminase producing rhizobacteria isolated from acidic soil of Northeast India. Scientific Reports 8, 3560.

Santos, R.M., Kandasamy, S., Rigobelo, E.C., (2018). Sugarcane growth and nutrition levels are differentially affected by the application of PGPR and cane waste. MicrobiologyOpen 7, e00617.

Shaiju, P., Dorian, B.B., Senthamaraikannan, R., Padamati, R.B., (2020). Biodegradation of Poly (Butylene Succinate) (PBS)/Stearate Modified Magnesium-Aluminium Layered Double Hydroxide Composites under Marine Conditions Prepared via Melt Compounding. Molecules 25, 5766.

Sohaib, M., Zahir, Z.A., Khan, M.Y., Ans, M., Asghar, H.N., Yasin, S., Al-Barakah, F.N.I., (2020). Comparative evaluation of different carrier-based multi-strain bacterial formulations to mitigate the salt stress in wheat. Saudi Journal of Biological Sciences 27, 777–787.

Sun, H., Hua, X., Zhang, M., Wang, Y., Chen, Y., Zhang, J., Wang, C., Wang, Y., (2020). Whey Protein Concentrate, Pullulan, and Trehalose as Thermal Protective Agents for Increasing Viability of *Lactobacillus plantarum* Starter by Spray Drying. Food Science of Animal Resources 40, 118–131.

Sun, M.-T., Zhao, Y.-Z., Yang, Z.-M., Shi, X.-S., Wang, L., Dai, M., Wang, F., Guo, R.-B., (2020). Methane Elimination Using Biofiltration Packed With Fly Ash Ceramsite as Support Material. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 8, 351.

Upadhyay, S.K., Singh, D.P., (2015). Effect of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment. Plant Biology 17, 288–293.

Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M. L., Touraine, B., Moenne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dye, F. & Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. Front Plant Sci, 4, 356.

Vessey, J. K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil, 255 (2), 571-586.

Wang, D.-C., Jiang, C.-H., Zhang, L.-N., Chen, L., Zhang, X.-Y., Guo, J.-H., (2019). Biofilms Positively Contribute to *Bacillus amyloliquefaciens* 54-induced Drought Tolerance in Tomato Plants. International Journal of Molecular Sciences 20, 6271.

Wang, J., Chu, L., (2016). Biological nitrate removal from water and wastewater by solid-phase denitrification process. Biotechnology Advances 34, 1103–1112.

Wang, J., Huang, J., Laffend, H., Jiang, S., Zhang, J., Ning, Y., Fang, M., Liu, S., (2020). Optimization of immobilized *Lactobacillus pentosus* cell fermentation for lactic acid production. Bioresources and Bioprocessing 7, 15.

Xu, J., Guo, B.-H., (2010). Poly(butylene succinate) and its copolymers: Research, development and industrialization. Biotechnology Journal 5, 1149–1163.

Zhang, W., Shen, J., Zhang, H., Zheng, C., Wei, R., Gao, Y., Yang, L., (2021). Efficient nitrate removal by *Pseudomonas mendocina* GL6 immobilized on biochar. Bioresource Technology 320, 124324.

Zhao, L., Huang, H., Han, Q., Yu, Q., Lin, P., Huang, S., Yin, X., Yang, F., Zhan, J., Wang, H., Wang, L., (2020). A novel approach to fabricate fully biodegradable poly(butylene

succinate) biocomposites using a paper-manufacturing and compression molding method. Composites Part A: Applied Sciences 139, 106117.

Zhu, S.-M., Deng, Y.-L., Ruan, Y.-J., Guo, X.-S., Shi, M.-M., Shen, J.-Z., (2015). Biological denitrification using poly(butylene succinate) as carbon source and biofilm carrier for recirculating aquaculture system effluent treatment. Bioresource Technology 192, 603–610.

ปฐมาวดี ตรีสอน. 2561. การผลิตและประยุกต์ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงสำหรับส่งเสริมการเจริญของอ้อยในสภาวะแล้ง. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาณุมาศ เมืองวุฒฑานันท์. 2563. การตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียผสมบนเศษพลาสติกชีวภาพเพื่อใช้ส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าอ้อยในสภาวะแล้ง. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มานิตา คำแจ่ม และ วสุ ปฐมอารีย์. 2557. สารไซเดอโรฟอร์จากจุลินทรีย์. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว ปีที่ 30, ฉบับที่ 1: หน้า 119-247.

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2561. รายงานการผลิตอ้อยของประเทศไทยประจำปีการผลิต 2560/61. สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย.

สำนักบริหารอ้อยและน้ำตาลทราย. 2563. รายงานการผลิตน้ำตาลทรายของโรงงานน้ำตาลทั่วประเทศประจำปีการผลิต 2562/2563. สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย.

เอกวัล ลือพร้อมชัย และคณะ. 2560. การพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเพื่อส่งเสริมการเจริญและการฟื้นตัวของพืชเศรษฐกิจในสภาวะแห้งแล้ง. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Broth

อาหารสำเร็จรูป Tryptone Soya Broth 30.0 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูป 30.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์(NaCl) 8.5 กรัม

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 8.5 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

ข้อมูลจากการทดลอง

ตารางที่ ข-1 จำนวนหัวเชื้อแบคทีเรียผสมบนวัสดุตรึงกระดาษเคลือบพลาสติก PBS 2 แบบ

จำนวนวันในการตรึงเชื้อ (วัน)	จำนวนแบคทีเรีย บนวัสดุตรึงชนิด (MPN/g)	
	PBS1	PBS2
2	1.67×10^8	8.94×10^8
4	1.46×10^8	5.91×10^7
6	1.05×10^8	5.24×10^6
8	4.62×10^8	1.99×10^7
10	1.25×10^8	8.11×10^8
12	1.29×10^8	5.54×10^7
14	2.53×10^8	1.48×10^8

ตารางที่ ข-2 อัตราการมีชีวิตของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมบนวัสดุตรึง

ชนิดวัสดุตรึง	ปริมาณแบคทีเรียในสัปดาห์ที่ (CFU ต่อวัสดุ 1 กรัม)				
	0	1	2	3	8
กระดาษเคลือบพลาสติก PBS	1.20×10^8	1.53×10^9	2.78×10^9	3.08×10^9	7.46×10^7
พลาสติก PLA	6.43×10^6	1.99×10^6	7.60×10^6	4.49×10^5	2.61×10^5