



การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของโฟมพอลิยูรีเทนที่ผลิตจากยางธรรมชาติ
Investigation of Biodegradation of Polyurethane Foam
Made from Natural Rubber

วิลาลินี อัครबंधิตสกุล
Vilasinee Akkharabunditsakul

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Microbiology
Prince of Songkla University
2559
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของโฟมพอลิยูรีเทนที่ผลิตจากยาง
ธรรมชาติ
ผู้เขียน นางสาววิลาสินี อัครบัณฑิตสกุล
สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กมลธรรม อ่ำสกุล)

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาหาร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กมลธรรม อ่ำสกุล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณทัย ภิญญาคง)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มี
ส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กมลธรรม อ่ำสกุล)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นางสาววิลาสินี อัครบัณฑิตสกุล)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาววิลาสินี อัครบัณฑิตสกุล)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของโพนพอลิยูรีเทนที่ผลิตจากยางธรรมชาติ
ผู้เขียน	นางสาววิลาสินี อัครบัณฑิตสกุล
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2559

บทคัดย่อ

โพนพอลิยูรีเทนที่ผลิตจากยางธรรมชาติซึ่งใช้ในการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพครั้งนี้ถูกนำมาใช้ศึกษาเพื่อคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายโพนชนิดนี้ได้จากตัวอย่างดินและน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำยางธรรมชาติ จำนวน 12 ตัวอย่าง จุลินทรีย์ที่คาดว่าสามารถย่อยสลายโพนชนิดนี้ได้มีจำนวน 18 ไอโซเลท ถูกจัดกลุ่มเป็นกลุ่มละ 3 ไอโซเลท ได้ทั้งหมด 6 กลุ่มจุลินทรีย์ โดยใช้เกณฑ์การจับกลุ่มจุลินทรีย์พิจารณาจากแหล่งที่มาของจุลินทรีย์หรือจุลินทรีย์ที่มีโคไลน์แตกต่างกัน จุลินทรีย์ทั้ง 6 กลุ่มถูกนำไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลายโพนพอลิยูรีเทนและวัสดุอ้างอิงอีก 2 ชนิด (ถุงมีเอียงและยางอิพอกไซด์) เป็นเวลา 30 วัน จุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย ไอโซเลท P1 P2 และ P5 ถูกนำมาใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาการย่อยสลายโพนชนิดนี้ เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 ทำให้น้ำหนักแห้งของโพนพอลิยูรีเทนหายไป คิดเป็นร้อยละ 5.32 ของน้ำหนักแห้งเริ่มต้นในระยะเวลา 30 วัน จากการศึกษาด้วยเทคนิค FT-IR พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 สามารถทำลายพันธะยูรีเทนในโครงสร้างโพนพอลิยูรีเทนได้และสามารถเปลี่ยนโครงสร้างของวัสดุอ้างอิงได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดไม่ปรากฏการเกาะติดของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ในชุดทดสอบโพนพอลิยูรีเทน ขณะที่ปรากฏการเกาะติดของจุลินทรีย์อย่างหนาแน่นในชุดทดสอบของวัสดุอ้างอิงทั้งสองชนิดภายหลังการบ่ม 30 วัน ผลการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่างกระบวนการย่อยสลายโพนพอลิยูรีเทนด้วยจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 เปรียบเทียบกับถุงมีเอียงและยางอิพอกไซด์ คิดเป็นร้อยละของการย่อยสลายทางชีวภาพเท่ากับ 6.79 16.42 และ 24.38 ตามลำดับภายในระยะเวลา 28 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ผลของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 ในชุดทดสอบโพนพอลิยูรีเทนถูกวัดได้ปริมาณได้ต่ำมากภายหลัง 30 วัน เมื่อบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 โดยลำดับเบสของยีน 16S rRNA ประกอบด้วย *Gordonia westfalica* สายพันธุ์ P1 *Xanthomonas maliensis* สายพันธุ์ P2 และ *Ochrobactrum intermedium* สายพันธุ์ P5 และเป็นรายงานครั้งแรกในจีนัส *Ochrobactrum* sp. เกี่ยวกับบทบาทการย่อยสลายยางธรรมชาติ ซึ่งปัจจัยที่ทำให้โพนชนิดนี้ย่อยสลายทางชีวภาพได้น้อย อาจเกิดจากพื้นผิวของโพนที่ไม่สนับสนุนการเกาะติดของจุลินทรีย์ หรือสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในกระบวนการผลิตโพนอาจมีผลต่อการเจริญของเชื้อซึ่งข้อจำกัดเหล่านี้ควรปรับปรุงและพัฒนาต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: โพนพอลิยูรีเทน ถุงมีเอียง ยางอิพอกไซด์ กลุ่มจุลินทรีย์ผสม การย่อยสลายทางชีวภาพ

Thesis Title	Investigation of Biodegradation of Polyurethane Foam Made from Natural Rubber
Author	Miss Vilasinee Akkharabunditsakul
Major Program	Microbiology
Academic Year	2016

ABSTRACT

Polyurethane foam (PU) made from natural rubber, a promising biodegradable material, was used in this study. The aims of this study were screening of PU foam-degrading microorganisms from 12 samples of rubber contaminated soil and waste water and testing for their abilities to degrade PU. Eighteen isolates of PU-degrading microorganisms were isolated and grouped into 3 isolates/group to form 6 mixed cultures. Grouping criteria based on the sample isolated or different colony morphology. The 6 mixed cultures were tested for their biodegradability of PU foam and 2 reference materials including rubber glove and epoxidized natural rubber (ENR) for 30 days of incubation. The mixed culture 4 including isolate P1, P2 and P5 was selected as a representative mixed culture due to the high percentage of weight loss of PU foam of 5.32% and FT-IR results showed urethane linkage in PU foam structure was broken down. In addition, the mixed culture 4 could degrade 2 reference materials efficiently. The microbial attachment of the mixed culture 4 cannot be observed on PU foam's surface by Scanning Electron Microscope (SEM); but very dense population of microbial cells were presented on rubber glove and ENR's surfaces after 30 days of incubation. The CO₂ evolution test showed the small amount of only 6.79% biodegradation from PU foam, whereas, rubber glove and ENR gave 16.42 and 24.38 % biodegradation during 28 days of incubation at room temperature, respectively. The lipase activity in cell-free supernatant of PU foam treated with the mixed culture 4 was detected slightly after 30 days of incubation. Three isolates of the mixed culture 4 were identified using 16S rRNA gene sequences analysis as *Gordonia westfalica* strain P1, *Xanthomonas maliensis* strain P2 and *Ochrobactrum intermedium* strain P5. This is the first report of the natural rubber biodegradability of *Ochrobactrum* sp. The important factors on biodegradability were discussed about the surface of PU foam which did not support the microbial attachment or chemicals added during PU foam producing process might affect on microbial growth. The factors limiting the biodegradation of PU foam should be considered for further new PU production.

Keywords: Polyurethane foam, rubber glove, epoxidized natural rubber, mixed culture, biodegradation

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. กมลธรรม อ่ำสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่กรุณาให้คำแนะนำและเสียสละเวลาให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูง ผศ.ดร. พิมลศรี มิตรภาพอาทร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และ รศ.ดร. อรุณทัย ภิญญาคง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ให้คำแนะนำและสอนความรู้ทางวิชาการ พร้อมทั้งให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนงบประมาณเพื่อการวิจัยและขอขอบพระคุณทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปี 2556 สัญญาเลขที่ SC1560399S

ขอขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่อนุเคราะห์ด้านวัสดุและอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการวิจัย และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และเพื่อนๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่คอยให้กำลังใจ สนับสนุน กำลังทรัพย์ และเป็นທີ່ปรึกษาปัญหาด้านต่างๆ มาโดยตลอด

วิลาสินี อัครบัณฑิตสกุล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อไทย	(5)
บทคัดย่ออังกฤษ	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(10)
สัญลักษณ์และคำย่อ	(12)
รายการผลงานที่ตีพิมพ์และการประชุมวิชาการ	(13)
สำเนาต้นฉบับที่ได้รับการยินยอมจากผู้พิมพ์ผลงาน	(14)
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของหัวข้อวิจัย	1
ทฤษฎีและหลักการ	2
พอลิเมอร์สังเคราะห์	2
โพลีพลาสติก	3
การย่อยสลายทางชีวภาพ	3
พอลิเมอร์ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ	4
ยางธรรมชาติ	4
พอลิเอสเทอร์	5
พอลิยูรีเทน	5
องค์ประกอบและการสังเคราะห์โพลีพอลิยูรีเทน	6
การย่อยสลายของพอลิยูรีเทนและเมตาบอไลต์ที่เกิดขึ้น	7
วิธีการตรวจสอบและติดตามกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิเมอร์	8
เอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายพอลิยูรีเทน	9
จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายพอลิยูรีเทน	10
วัตถุประสงค์	11
วิธีการวิจัย	12
ผลและวิเคราะห์ผลการทดลอง	18
สรุปผลการทดลอง	36
ข้อเสนอแนะ	37
บรรณานุกรม	38
ภาคผนวก	45
วิธีการทดลองเพิ่มเติม	46
ต้นฉบับที่ส่งไปยังวารสารวิชาการ	48
ประวัติผู้เขียน	49

รายการตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	จำนวนเซลล์ของเชื้อแต่ละไอโซเลท (CFU/mL) ในแต่ละกลุ่มจุลินทรีย์ ภายหลังทดสอบการย่อยสลายกับวัสดุโพลีเอทิลีนและวัสดุอ้างอิง ได้แก่ ถุงมือยางและยางอิพอกไซด์ เป็นเวลา 30 วัน ที่สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที	19
ตารางที่ 2	การทดสอบเอนไซม์ของเชื้อแต่ละไอโซเลทเมื่อทดสอบด้วยอาหารแข็ง ยูเรีย อาหารแข็งไทริบิวทีริน และอาหารเหลวเจลาติน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน	21
ตารางที่ 3	ร้อยละของน้ำหนักแห้งที่หายไปภายหลังการย่อยสลายถุงมือยาง เสื่อยาง และแผ่นฟิล์มโพลีเอทิลีนทางการค้า	22

รายการภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 กลไกการย่อยสลายทางชีวภาพโดยทั่วไปของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพโดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในสภาวะมีออกซิเจน	4
รูปที่ 2 โครงสร้างของยางธรรมชาติ (<i>cis</i> -1,4 polyisoprene)	5
รูปที่ 3 ตำแหน่งของพันธะเอสเทอร์และพันธะอีเทอร์ภายในโครงสร้างของพอลิโออล	6
รูปที่ 4 การสังเคราะห์พอลิยูรีเทนโดยการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน	7
รูปที่ 5 ตำแหน่งพันธะเอสเทอร์ในส่วนพอลิโออลของพอลิเอสเทอร์พอลิยูรีเทนที่มีความไวต่อเอนไซม์เอสเทอร์เรส	10
รูปที่ 6 ระบบจับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ	16
รูปที่ 7 ร้อยละของน้ำหนักพอลิเมอร์ที่หายไป ประกอบด้วยพอลิเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ ถูมมียาง ยางอิพอกไซด์ และโพลีพอลิยูรีเทน ภายหลังจากทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพโดยกลุ่มจุลินทรีย์ 6 กลุ่ม เป็นเวลา 30 วัน ที่สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที สัญลักษณ์ (*) แสดงถึงร้อยละของน้ำหนักแห้งโพลีพอลิยูรีเทนที่หายไปมากที่สุด 2 ลำดับแรก โดยที่น้ำหนักพอลิเมอร์ในชุดควบคุมของพอลิเมอร์แต่ละชนิดไม่พบการเปลี่ยนแปลง	23
รูปที่ 8 โครงสร้างของโพลีพอลิยูรีเทนในชุดควบคุมและชุดทดสอบที่ผ่านการทดสอบด้วยจุลินทรีย์กลุ่มที่ 2 และ 4 เป็นเวลา 30 วัน ในอาหารเหลว MSM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที	24
รูปที่ 9 โครงสร้างของถูมมียางในชุดควบคุม และชุดทดสอบที่ผ่านการทดสอบด้วยจุลินทรีย์กลุ่มที่ 2 และ 4 เป็นเวลา 30 วัน ในอาหารเหลว MSM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที	25
รูปที่ 10 โครงสร้างของยางอิพอกไซด์ในชุดควบคุม และชุดทดสอบที่ผ่านการทดสอบด้วยจุลินทรีย์กลุ่มที่ 2 และ 4 เป็นเวลา 30 วัน ในอาหารเหลว MSM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที	26
รูปที่ 11 การเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์บนผิวของวัสดุต่างชนิดกัน (ถูมมียาง ยางอิพอกไซด์ และโพลีพอลิยูรีเทน) เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าภายหลังจากการบ่มในอาหารเหลว MSM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ที่ระยะเวลา 0 1 2 3 และ 4 สัปดาห์	27
รูปที่ 12 ลักษณะพื้นผิวโพลีพอลิยูรีเทนที่ผลิตจากยางธรรมชาติ (วัสดุทดสอบ) ในชุดควบคุม (12a–12c) และชุดทดสอบ (12d–12f) หลังบ่มในอาหารเหลว MSM เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์แบบส่องกราด ที่กำลังขยาย 100X 1000X และ 5000X	28

	หน้า
รูปที่ 13 ลักษณะพื้นผิวถุงมือยาง (วัสดุอ้างอิง) ในชุดควบคุม (13a–13c) และชุดทดสอบ (13d–13f) หลังบ่มในอาหารเหลว MSM เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดที่กำลังขยาย 2500X 5000X และ 10000X	29
รูปที่ 14 ลักษณะพื้นผิวยางอิพอกไซด์ (วัสดุอ้างอิง) ในชุดควบคุม (14a–14c) และชุดทดสอบ (14d–14f) หลังบ่มในอาหารเหลว MSM เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดที่กำลังขยาย 2500X 5000X และ 10000X	29
รูปที่ 15 ชั้นถุงมือยาง ยางอิพอกไซด์ และโพลีเอทิลีนในชุดควบคุม (a) และชุดทดสอบ (b) ที่สัปดาห์ที่ 4 ของการบ่มด้วยจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 ในอาหารเหลว MSM เมื่อจุ่มในสารละลาย Bradford เป็นเวลา 10 นาที	32
รูปที่ 16 ร้อยละการย่อยสลายทางชีวภาพของโพลีเอทิลีน (วัสดุทดสอบ) ถุงมือยาง และยางอิพอกไซด์ (วัสดุอ้างอิง) หลังบ่มร่วมกับจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 ในอาหารเหลว MSM เป็นเวลา 28 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส)	33
รูปที่ 17 ร้อยละของการย่อยสลายทางชีวภาพของโพลีเอทิลีนที่ผลิตจากยางธรรมชาติ (PUF1) ซึ่งเป็นโพลีชนิดเดียวกับโพลีเอทิลีนที่ใช้ในการศึกษานี้ เปรียบเทียบกับโพลีเอทิลีนที่ผลิตจากยางธรรมชาติและพอลิคาร์โพรแลกโตนในอัตราส่วนต่างๆ ได้แก่ อัตราส่วน 1:0.5 (PUF2) อัตราส่วน 1:1 (PUF3) และอัตราส่วน 0.5:1 (PUF4)	34
รูปที่ 18 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA ของเชื้อ ไอโซเลท P1 P2 และ P5 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้ออื่น ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้จากฐานข้อมูล NCBI แผนภาพแสดงความสัมพันธ์สร้างโดยวิธี neighbor-joining จากโปรแกรม MEGA Sequencing ตัวเลขแสดงบนกิ่ง (% bootstrap) มาจากการคำนวณ 1,000 ซ้ำ	35

สัญลักษณ์และคำย่อ

%	=	Percentage
ACT	=	Actinomycete isolation agar
CFU	=	Colony forming unit
ENR	=	Epoxidized natural rubber
Lcp	=	Latex clearing protein
McF	=	McFarland
mL	=	Milliliter
MSM	=	Mineral salts medium
NaCl	=	Sodium chloride
NCBI	=	The National Center for Biotechnology Information
NRL	=	Natural rubber latex
PCA	=	Plate count agar
PCR	=	Polymerase chain reaction
PDA	=	Potato dextrose agar
PU	=	Polyurethane

รายการผลงานที่ตีพิมพ์และการประชุมวิชาการ

ชื่อบทความที่นำเสนอต่อที่ประชุมวิชาการ

1. **ชื่อภาษาไทย** การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิยูรีเทนที่ผลิตจากพอลิแลคติกแอซิดและยางธรรมชาติ

ชื่อภาษาอังกฤษ The Investigation of Biodegradation of Polyurethane Made from Polylactic Acid and Natural Rubber
2. **ชื่อภาษาไทย** การย่อยสลายทางชีวภาพของยางสังเคราะห์โดยกลุ่มเชื้อผสมที่คัดแยกจากตัวอย่างดินบริเวณโรงงานยางพารา จังหวัดสงขลา ประเทศไทย

ชื่อภาษาอังกฤษ Biodegradation of Synthetic Rubbers by a Mixed Culture Isolated from Various Rubber Factory Soils in Songkhla, Thailand

ชื่อบทความที่ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสาร

1. **ชื่อภาษาไทย** การศึกษากระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของโฟมพอลิยูรีเทนที่ผลิตจากยางธรรมชาติ

ชื่อภาษาอังกฤษ Investigation of Biodegradation of Polyurethane Foam Made from Natural Rubber (submitted)

สำเนาต้นฉบับที่ได้รับการยินยอมจากผู้พิมพ์ผลงาน

Manuscript Number: EJBT-D-16-00184

Title: Investigation of biodegradation of polyurethane foam made from natural rubber

Article Type: Original Research Article

Keywords: Mixed culture; *Gordonia* sp.; *Xanthomonas* sp.; *Ochrobactrum* sp.; rubber glove; natural rubber; polyurethane

Corresponding Author: Dr. Kamontam Umsakul,

Corresponding Author's Institution: Prince of Songkla university

First Author: Vilasinee Akkharabunditsakul

Order of Authors: Vilasinee Akkharabunditsakul; Varaporn Tanrattanakul; Kamontam Umsakul

Abstract: Background: A new polyurethane foam made from natural rubber has been formulated to use in agricultural fields however, its biodegradable properties should be considered and further investigated before releasing this product. This study focused on the isolation of a polyurethane foam-degrading mixed culture from various soil and wastewater samples that has the ability to degrade this new polyurethane in broth within 30 days.

Results: An effective mixed culture including 3 isolates was able to degrade polyurethane foam. *Gordonia westfalica* strain P1, *Xanthomonas maliensis* strain P2 and *Ochrobactrum intermedium* strain P5 were identified based on a 16S rRNA gene analysis. This mixed culture used polyurethane foam as a carbon source and gave 5.32% dried weight loss of the polyurethane foam, 18.29% of the rubber glove and 1.54% of the epoxidized natural rubber within 30 days. A FT-IR analysis revealed that the urethane bonds in the polyurethane structure were broken down. No microbial cells on the polyurethane's surface were found, while the surfaces of the reference rubber materials (rubber glove and epoxidized natural rubber) were abundantly covered by microbial cells. The highest lipase activity of 0.018 Units/mg protein in a cell-free supernatant was obtained from the polyurethane foam degradation test at week 2. The biodegradation rates of the polyurethane foam, the rubber glove and the epoxidized natural rubber revealed 6.79%, 16.42% and 24.38%, respectively.

Conclusions: The biodegradation of polyurethane foam was confirmed, but at a slow rate after 30 days of treatment with the mixed culture containing *Gordonia westfalica* strain P1, *Xanthomonas maliensis* strain P2 and *Ochrobactrum intermedium* strain P5. A gram negative bacterium, *Ochrobactrum* sp. was first reported in this study as playing an important role in rubber biodegradation.

Suggested Reviewers: SUDESH KUMAR
ksudesh@usm.my
He works on rubber degradation

Akio Tsuchii
atsuchii@nibh.go.jp

Masao Fukuda
masao@vos.nagaokaut.ac.jp

Helge bODE
H.Bode@bio.uni-frankfurt.de

Opposed Reviewers:

23-11-2016

Dear Editor,

A manuscript entitled “**Investigation of biodegradation of polyurethane foam made from natural rubber**” authored by “Vilasinee Akkharabunditsakul, Varaporn Tanrattanakul, Kamontam Umsakul”, is submitted online to EJBT for reviewing. The manuscript is submitted for publication as an original research article;

1. All of the authors of the manuscript agreed to submit the work to the journal.

All of the authors certified that:

(a) the work has not been published or submitted or being submitted to another journal;

(b) the submission is the original work of the authors;

(c) we have carefully read the Guide for Authors and accept the publication fee once the manuscript is accepted to be published.

This project arose from a request to see if we could find microorganisms that can degrade the new polyurethane (PU) foam made from rubber latex well. Our group has been trying to degrade rubber products using single bacterial strain and also bacterial consortia. In this study we could isolate the mixed culture that can degrade the PU foam and rubber gloves. Even though the polymer weight loss did not decrease significantly (5.32% dried weight loss of the polyurethane foam, 18.29% of the rubber glove and 1.54% of the epoxidized natural rubber) but it is promising to use these bacterial strains in degrading other rubber products. This is also the first study to report a gram negative bacterium *Ochrobactrum intermedium* P5 to have an ability to degrade rubber product.

We look forward to hearing favorable news from your side.

Kind regards,

Corresponding author

(Asst. Prof. Kamontam umsakul, Ph.D.)

Faculty of Science

Prince of Songkla University

Hatyai, Thailand

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของหัวข้อวิจัย

ปัจจุบันมีการใช้งานผลิตภัณฑ์จากพอลิเมอร์สังเคราะห์มากขึ้นในอุตสาหกรรมทางการแพทย์และทางการเกษตร เพื่อตอบสนองความต้องการดังกล่าว จึงมีการคิดค้นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ ซึ่งมีสมบัติเหมาะสมกับการใช้งานที่หลากหลาย ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงคิดค้นวิธีปรับปรุงสมบัติของพอลิเมอร์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น เช่น การปรับแต่งโครงสร้าง การเติมสารตัวเติมและ/หรือสารเคมี การเติมสารเสริมแรง การผสมพอลิเมอร์ชนิดอื่น เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีอายุการใช้งานที่ยาวนานขึ้น เมื่อผลิตภัณฑ์เหล่านี้สิ้นสุดอายุการใช้งาน ปัญหาที่ตามมาเป็นกองขยะจำนวนมากที่สะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นระยะเวลาอันยาวนานหลายร้อยปี ซึ่งขยะเหล่านี้มีผลกระทบต่อทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศน์ โดยปกติมนุษย์ใช้กระบวนการกำจัดขยะเหล่านี้ด้วยวิธีการฝังกลบ การเผา การใช้กระบวนการทางเคมี เป็นต้น แต่วิธีเหล่านี้มีข้อจำกัดซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมโดยตรง เช่น การเกิดสารพิษตกค้างในดิน น้ำ อากาศ ทำให้เกิดมลพิษอย่างรุนแรงต่อห่วงโซ่อาหาร อีกทั้งปัญหาของพื้นที่ที่ใช้ในการฝังกลบขยะมีปริมาณไม่เพียงพอ โดยเฉพาะในเมืองใหญ่ที่มีประชากรมาก และการกำจัดขยะแบบเดิมนี้อาจมีต้นทุนที่สูง ดังนั้นการผลิตพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและมีสมบัติเหมาะสมกับการใช้งานจึงกลายเป็นประเด็นที่นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจ ซึ่งพอลิเมอร์นั้นควรมีสมบัติที่สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมร่วมกับการย่อยสลายทางกายภาพได้ดี เช่น พอลิเมอร์สังเคราะห์ที่สามารถย่อยสลายด้วยน้ำหรือแสงอาทิตย์ได้ เป็นต้น ภายหลังจากที่พอลิเมอร์นั้นๆ ถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ควรเป็นสารโมเลกุลขนาดเล็ก เสถียร ไม่เป็นพิษ และพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซมีเทน และน้ำ หรือในกรณีที่ย่อยสลายเกิดขึ้นอย่างไม่สมบูรณ์ อาจมีการตกค้างของสารตัวกลางภายหลังจากการย่อยสลายในสิ่งแวดล้อมได้ แต่สารตัวกลางเหล่านั้นต้องไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม คณะวิจัยของภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีวัสดุ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ มีแนวคิดที่น่าสนใจในการผลิตโพลีเอทิลีนที่ผลิตจากยางธรรมชาติออกสู่ท้องตลาดในอนาคต โพลีเอทิลีนชนิดนี้ผลิตจากยางธรรมชาติเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งได้มาจากต้นยางพารา (*Hevea brasiliensis*) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญทางภาคใต้ของประเทศไทยและยังจัดเป็นกลุ่มพอลิเมอร์ชีวภาพอีกด้วย โครงสร้างของยางธรรมชาติถูกนำมาดัดแปรโครงสร้างให้มีหมู่ปลายเป็นไดออล เรียกว่า พอลิไอโซพรีนไดออล นำมาทำปฏิกิริยากับไดไอโซไซยาเนต และใช้น้ำเป็นตัวทำให้เกิดฟอง เกิดเป็นวัสดุโพลีเอทิลีนที่มีพันธะยูรีเทนเป็นพันธะหลักภายในสายโซ่ พันธะดังกล่าวมีรายงานว่า เป็นพันธะที่มีความไวต่อการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส ได้แก่ เอสเตอร์เรส ไลเปส ยูรีเอสและโปรติเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิดตามธรรมชาติ เอนไซม์กลุ่มนี้มีบทบาททำให้สายโซ่ของโพลีเอทิลีนมีขนาดสั้นลงจนกระทั่งสามารถถูกดูดซึมผ่านผนังเซลล์ของจุลินทรีย์และถูกนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งพลังงานแก่จุลินทรีย์ได้ อีกทั้งโพลีเอทิลีนมีลักษณะเป็นรูพรุน จึงสันนิษฐานว่าการเพิ่มพื้นที่ผิวให้จุลินทรีย์สามารถเกาะติดได้ง่ายขึ้น อาจเป็นการเพิ่มโอกาสในการย่อยสลายทาง

ชีวภาพให้เป็นไปได้มากขึ้นด้วย และเพื่อสร้างความมั่นใจว่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจะไม่ใช่ปัญหาและมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมในอนาคต จึงได้ร่วมมือกับภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ เพื่อศึกษาสมบัติของโพลิเมอร์เทรนชนิดนี้ในแง่การย่อยสลายทางชีวภาพ ดังนั้นงานวิจัยฉบับนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อคัดแยกจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมที่มีความสามารถย่อยสลายโพลิเมอร์เทรนชนิดนี้ได้ โดยเน้นศึกษาการใช้กลุ่มจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) เพื่อเพิ่มโอกาสให้กระบวนการย่อยสลายโพลิเมอร์เทรนเกิดขึ้นสมบูรณ์มากที่สุด ตามสมมุติฐานการทำงานร่วมกันของกลุ่มจุลินทรีย์ จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารตัวกลางที่เกิดขึ้นในแต่ละขั้นตอนของการย่อยสลายแตกต่างกัน โอกาสที่สารตัวกลางจะถูกใช้จนหมดโดยจุลินทรีย์หลายๆ ชนิดจึงเพิ่มขึ้น จนกระทั่งได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายอยู่ในรูปของโมเลกุลน้ำ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจัดเป็นกระบวนการย่อยสลายที่สมบูรณ์และเป็นที่ยอมรับตามหลักสากล ด้วยเหตุนี้คณะวิจัยได้เล็งเห็นถึงความสำคัญของการลดมลพิษจากขยะพอลิเมอร์สังเคราะห์ในสิ่งแวดล้อมโดยใช้ความรู้ทางจุลชีววิทยาเข้ามาเกี่ยวข้อง จึงเป็นที่มาของงานวิจัยเพื่อศึกษากระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของโพลิเมอร์เทรนชนิดนี้ และเพื่อนำไปปรับปรุงและพัฒนาผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ให้มีสมบัติเหมาะสำหรับการใช้งานและถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ต่อไป

ทฤษฎีและหลักการ

1. พอลิเมอร์สังเคราะห์

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีได้ถูกพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่องหลายปีก่อน ทำให้การคิดค้นการผลิตพอลิเมอร์สังเคราะห์เกิดขึ้นอย่างมากมาย แต่ละปีพบว่ามียานพอลิเมอร์สังเคราะห์ประมาณ 140 ล้านตัน (Shimao, 2001) ในหลายประเทศแถบอเมริกาและยุโรปหลายประเทศมีแนวโน้มในการผลิตพอลิเมอร์สังเคราะห์สูงในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณขยะของแข็งทั้งหมด พบว่าขยะที่เป็นของแข็งประมาณ 20-25% เป็นขยะจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ (Jayasekara *et al.*, 2005) และเมื่อพิจารณาอัตราการผลิตพอลิเมอร์เทรนในตลาดโลกในปี 2010 มีประมาณ 13,650.00 กิโลตัน และคาดว่าจะเพิ่มขึ้นถึง 17,946.20 กิโลตัน ในปี 2016 เมื่อพิจารณาอัตราการเติบโตเฉลี่ยสะสมต่อปีของพอลิเมอร์เทรน จากปี 2011 ถึงปี 2016 มีอัตราการเติบโตเพิ่มขึ้น 4.7% ซึ่งพอลิเมอร์สังเคราะห์ปริมาณมากเหล่านี้จะกลายเป็นขยะพลาสติกจำนวนมาก (Shah *et al.*, 2013) วิธีการกำจัดขยะของหน่วยงานเทศบาลมักใช้วิธีฝังกลบในพื้นที่ขนาดใหญ่และการเผาขยะ ซึ่งนำไปสู่ปัญหามลพิษจากสารพิษและสิ่งตกค้างไหลลงสู่แหล่งน้ำใต้ดิน น้ำผิวดิน และแพร่กระจายในอากาศ โดยสาเหตุหลักมาจากการกำจัดขยะพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่สิ้นอายุการใช้งาน ต่อมาการใช้เคลือบขยะเหลือใช้เริ่มเข้ามามีบทบาทมากขึ้น แต่การฝังกลบและการเผายังคงเป็นวิธีพื้นฐานที่นิยมใช้ในการกำจัดของเสียที่เป็นของแข็ง พอลิเมอร์สังเคราะห์หลายชนิดมีสมบัติทนทานต่อการย่อยสลายทางเคมีและทางกายภาพ ดังนั้นวิธีการย่อยสลายทางชีวภาพจึงเป็นทางเลือกสำหรับปัญหาดังกล่าว ร่วมกับการออกแบบพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้มีสมบัติสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น เรียกว่า พอลิเมอร์ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable polymers) (Kirikou and Briassoulis, 2007) ต่อมาผู้ให้ความสำคัญกับกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพมากขึ้น จึงมีโครงการพัฒนาผลิตภัณฑ์ทาง

ชีวภาพเกิดขึ้นมากมาย เช่น การผลิตปุ๋ยชีวภาพจากขยะที่ได้จากการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ การนำก๊าซที่ได้จากการย่อยสลายทางชีวภาพ เช่น ก๊าซมีเทน นำไปใช้เป็นพลังงานทดแทน การผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีสมบัติเป็นพอลิเมอร์ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เช่น ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากแป้ง เซลลูโลส พอลิเอสเทอร์จากจุลินทรีย์ และยางธรรมชาติ เป็นต้น สิ่งที่ทำทลายของการผลิตพอลิเมอร์ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ คือ การพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้มีความเหมาะสมทางโครงสร้างทางเคมี ทางกายภาพ และสมบัติเชิงกลที่เหมาะสมแก่การใช้งานและสามารถย่อยสลายได้ในสิ่งแวดล้อม (Fritz *et al.*, 1994)

2. โฟมพลาสติก

โฟมพลาสติกจัดอยู่ในกลุ่มพอลิเมอร์สังเคราะห์ชนิดหนึ่งที่มีการใช้งานอย่างแพร่หลายทั่วโลก และมีแนวโน้มที่เพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง การผลิตโฟมพลาสติกสังเคราะห์มีแนวคิดจากการเลียนแบบลักษณะของฟองน้ำทะเล และพัฒนาวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตโฟมเรื่อยมา โดยทั่วไปโฟมพลาสติกประกอบด้วย 2 เฟส ประกอบด้วยเฟสแก๊สและเฟสของแข็ง สองเฟสนี้มีผลต่อสมบัติของโฟมโดยตรง โดยส่วนเฟสของแข็งทำหน้าที่เป็นส่วนเนื้อโฟม และส่วนเฟสแก๊สทำให้เกิดช่องว่างภายในเนื้อโฟม โฟมพลาสติกสามารถแบ่งจำแนกได้ 2 ประเภทใหญ่ คือ โฟมเทอร์โมพลาสติก (thermoplastic foams) และโฟมเทอร์โมเซต (thermoset foams) นอกจากนี้ยังมีเกณฑ์การแบ่งจำแนกชนิดของโฟมพลาสติกโดยใช้ลักษณะของผนังกันเซลล์ภายในเนื้อโฟม คือ โฟมเซลล์ปิด (closed cell foam) และโฟมเซลล์เปิด (open cell foam) หรือจำแนกชนิดของโฟมตามความแข็งของเนื้อโฟม (rigidity) ได้แก่ ชนิดแข็ง (rigid) ชนิดกึ่งแข็ง (semi-rigid) ชนิดกึ่งยืดหยุ่น (semi-flexible) และชนิดยืดหยุ่น (flexible)

3. การย่อยสลายทางชีวภาพ

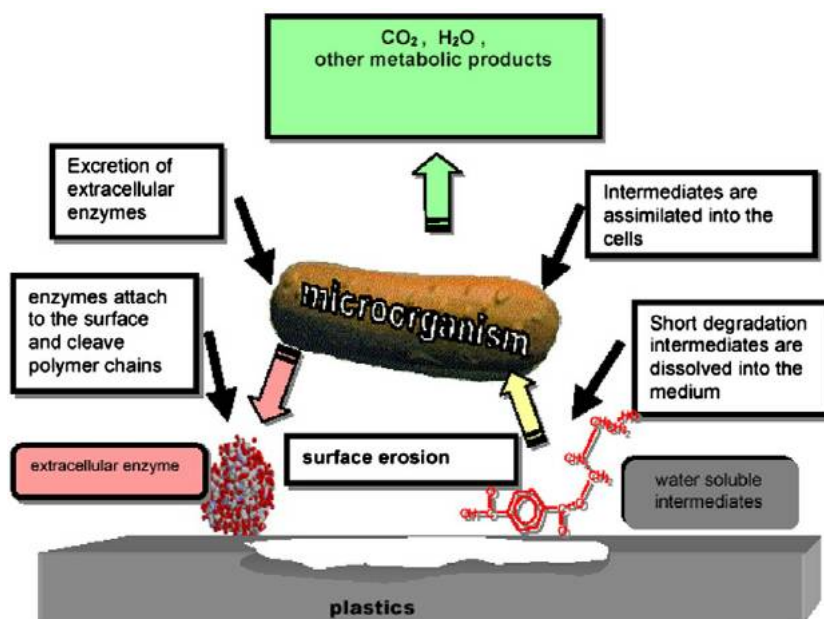
3.1 คำนิยามของการย่อยสลายทางชีวภาพ

การย่อยสลายทางชีวภาพ โดยภาพรวมกล่าวถึงการย่อยสลายโดยสิ่งแวดล้อม การย่อยสลายโดยใช้แสง การย่อยสลายโดยใช้อุณหภูมิ และการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์

3.1.1 การย่อยสลายโดยสิ่งแวดล้อม หมายถึง ปัจจัยต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมที่มีผลกระทบต่อวัสดุต่างๆ เช่น แสงอาทิตย์ ความร้อน ออกซิเจน อากาศ ลม ฝน ฝุ่น น้ำ สารเคมีที่เป็นมลพิษ จุลินทรีย์ แมลง และสัตว์ต่างๆ เป็นต้น สิ่งเหล่านี้เป็นตัวการสำคัญที่ก่อให้เกิดการย่อยสลายวัสดุต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม

3.1.2 การย่อยสลายทางชีวภาพ หมายถึง กระบวนการย่อยสลายและการดูดซึมสารตัวกลางที่ได้จากการย่อยสลายวัสดุต่างๆ ไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานโดยจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และสาหร่าย โดยปลดปล่อยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายออกสู่สิ่งแวดล้อม เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ ก๊าซมีเทน และเซลล์จุลินทรีย์ (รูปที่ 1)

3.1.3 การย่อยสลายทางชีวภาพโดยใช้เอนไซม์ หมายถึง การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของวัสดุต่างๆ แต่เน้นศึกษาบทบาทของการใช้เอนไซม์ของสิ่งมีชีวิตในการย่อยสลายเป็นหลัก



รูปที่ 1 กลไกการย่อยสลายทางชีวภาพโดยทั่วไปของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพโดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในสภาวะมีออกซิเจน (Müller, 2003)

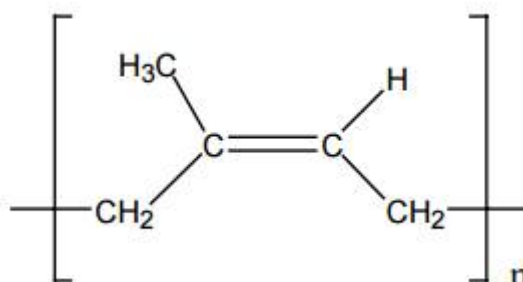
4. พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable polymer) หมายถึง “พอลิเมอร์ที่ถูกย่อยสลายโดยผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์เป็นกลไกแรกในกระบวนการย่อยสลาย” (Leja and Lewandowicz, 2010) โดยวัตถุประสงค์ที่ใช้ในการผลิตพอลิเมอร์กลุ่มนี้มักใช้พอลิเมอร์ธรรมชาติ (natural polymers) เป็นสารตั้งต้นในการผลิต เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ ยางธรรมชาติ พอลิแลคติกแอซิด พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต เซลลูโลส เป็นต้น พอลิเมอร์เหล่านี้สามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยจุลินทรีย์ในธรรมชาติโดยผ่านกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) กระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) และมีเอนไซม์หลายชนิดเข้ามาเกี่ยวข้อง (Kirikou and Briassoulis, 2007)

4.1 ยางธรรมชาติ

ยางธรรมชาติ (natural rubber) จัดอยู่ในกลุ่มพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ยางธรรมชาติได้มาจากพืชมากกว่า 2,000 สปีชีส์ในวงศ์ *Euphorbiaceae* หรือ *Compositaceae* และเชื้อราบางชนิด ต้นยางสายพันธุ์ *Hevea brasiliensis* สามารถผลิตน้ำยางธรรมชาติที่ประกอบด้วยไฮโดรคาร์บอนร้อยละ 94 โดยน้ำหนัก ส่วนประกอบที่เหลือเป็นโปรตีน ไขมัน และเกลืออนินทรีย์อื่นๆ (เช่น ชี้เถ้า และอนุพลของโลหะ เป็นต้น) โครงสร้างทางเคมีของยางธรรมชาติมีหน่วยย่อยที่ซ้ำกันเป็นไอโซพรีน (C₅H₈) มาต่อกันเป็นโมเลกุลยาว เรียกว่า พอลิไอโซพรีน (C₅H₈)_n โดย n มีค่าตั้งแต่ 5,000 – 15,000 (ชัยวัฒน์, 2526) โครงสร้างของยางธรรมชาติมีลักษณะเป็นไอโซเมอร์ชนิด *cis-isomer* ดังนั้นจึงมักจะเรียวยางธรรมชาติว่า *cis*-1,4-พอลิไอโซพรีน เพราะมีตำแหน่งพันธะคู่

(*cis*-1,4 double bond) ในโครงสร้าง (รูปที่ 2) ตำแหน่งพันธะคู่นี้มีรายงานว่าไวต่อเอนไซม์ในกลุ่มออกซิเดชันที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายอย่างธรรมชาติได้ ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ (Jendrossek *et al.*, 1997; Rose and Steinbüchel, 2005)



รูปที่ 2 โครงสร้างของยางธรรมชาติ (*cis*-1,4 polyisoprene)

4.2 พอลิเอสเทอร์

พอลิเอสเทอร์เป็นชื่อที่ใช้สำหรับเรียกกลุ่มของพอลิยูรีเทนที่มีการเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของมอนอเมอร์ด้วยพันธะเอสเทอร์ (ester linkages) เช่น พอลิแลกติกแอซิด (poly-L-lactide) พอลิไฮดรอกซีแอลคานอเอต (polyhydroxyalkanoate) พอลิยูรีเทน (polyurethanes) พอลิคาร์โพรแลคโตน (poly-caprolactone) พอลิเอสเทอร์เอไมด์ (polyesteramide) อะลิฟาติกโคพอลิเอสเทอร์ (aliphatic copolyester) และอะโรมาติกโคพอลิเอสเทอร์ (aromatic copolyester) เป็นต้น ซึ่งพันธะเอสเทอร์ดังกล่าวมีสมบัติที่สามารถถูกย่อยสลายได้โดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นพอลิเอสเทอร์จึงจัดเป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable polymer) อีกชนิดหนึ่ง ปัจจัยที่สำคัญของการย่อยสลายพอลิเอสเทอร์โดยจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลและความเป็นผลึกของพอลิเมอร์ (Nishida and Tokiwa, 1993)

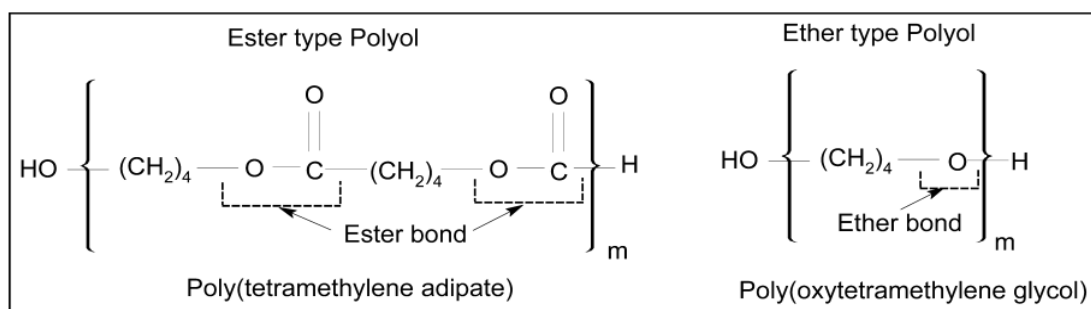
4.3 พอลิยูรีเทน

การผลิตพอลิยูรีเทนเกิดขึ้นครั้งแรกโดย Dr. Otto Bayer ในปี ค.ศ. 1937 พอลิยูรีเทนเป็นพอลิเมอร์ที่มีการใช้งานอย่างแพร่หลายทางการแพทย์ อุตสาหกรรมการผลิตรถยนต์ และอุตสาหกรรมอื่นๆ ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากพอลิยูรีเทนที่ใช้งานในปัจจุบัน เช่น เฟอร์นิเจอร์ สารเคลือบ สารยึดเกาะ อุปกรณ์ก่อสร้าง เส้นใยต่างๆ เบาะรองนั่ง สีทาบ้าน สสารที่ต้องการความยืดหยุ่น เป็นต้น อีกทั้งความต้องการของผู้บริโภคในการใช้งานพอลิยูรีเทนมีมากขึ้นในหลายประเทศ เมื่อสังเกตโครงสร้างของสายโซ่พอลิยูรีเทน พบว่าภายในสายโซ่ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอน ออกซิเจน ไนโตรเจน (Bayer, 1947) และมีพันธะยูรีเทนเป็นพันธะหลักภายในโครงสร้าง มีรายงานก่อนหน้านี้กล่าวว่าพอลิเอสเทอร์พอลิยูรีเทนมีความไวต่อกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพโดยแบคทีเรีย เชื้อรา และเอนไซม์ ขณะที่พอลิเอเทอร์พอลิยูรีเทนมีสมบัติทนต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ (Howard, 2012)

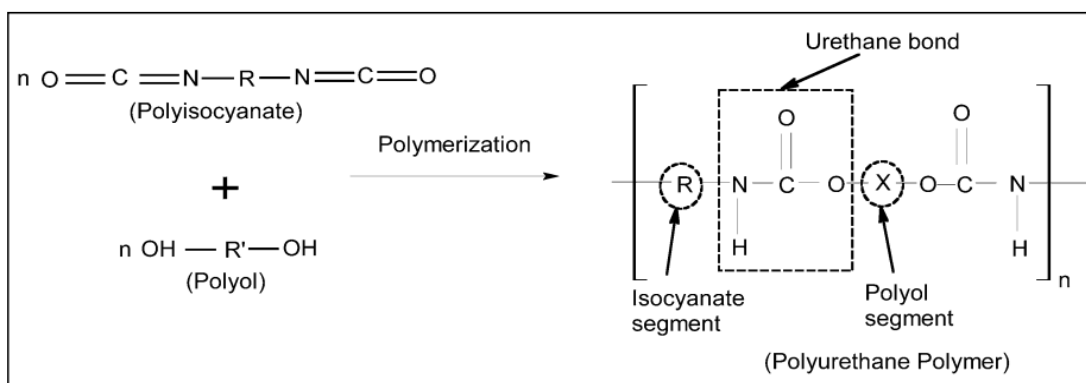
4.3.1 องค์ประกอบและการสังเคราะห์โฟมพอลิยูรีเทน

โฟมพอลิยูรีเทนเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้น 4 ชนิด คือ พอลิออล (polyols) พอลิไอโซไซยาเนต (polyisocyanates) ตัวเร่ง (catalysts) และสารอื่นๆ (auxiliary materials) โครงสร้างสายโซ่พอลิยูรีเทนประกอบด้วย ส่วนแข็ง (hard segments) ได้แก่ พอลิไอโซไซยาเนต และส่วนอ่อน (soft segment) ได้แก่ พอลิออลและตัวขยายสายโซ่ (chain extender) พอลิออลแบ่งออกเป็น 2 ประเภทตามลักษณะของพันธะภายในโครงสร้าง ได้แก่ พอลิออลที่มีพันธะเอสเทอร์ (พอลิเอสเทอร์) และพอลิออลที่มีพันธะอีเทอร์ (พอลิอีเทอร์) (รูปที่ 3) โครงสร้างทางเคมีของพอลิออลประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ปลายเป็นหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl groups) อย่างน้อย 2 หมู่ต่อโมเลกุล เมื่อทำปฏิกิริยากับพอลิไอโซไซยาเนตเป็นสารที่มีหมู่ไอโซไซยาเนต (NCO-R) มากกว่าหรือเท่ากับ 2 หมู่ฟังก์ชันต่อโมเลกุล ทำให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันแบบควบแน่นในสถานะที่มีตัวเร่ง (catalyst) เกิดเป็นพันธะยูรีเทน (R-COONH) เชื่อมระหว่างหมู่ไอโซไซยาเนต (NCO-R) และหมู่ไฮดรอกซิล (R-OH) ภายในสายโซ่จำนวนมาก (รูปที่ 4) โดย X แสดงถึงตำแหน่งของพันธะเอสเทอร์หรือพันธะอีเทอร์ จากนั้นเติมสารที่ทำให้เกิดฟอง (blowing agent) เช่น เพนเทน ไอโซเพนเทน ไสโคลเพนเทน คาร์บอนไดออกไซด์เหลว และน้ำ เป็นต้น เมื่อสารที่ทำให้เกิดฟองระเหยและทำปฏิกิริยากับหมู่ไอโซไซยาเนต ทำให้เกิดฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ภายในเนื้อของพอลิเมอร์ ทำให้เนื้อของพอลิเมอร์มีความหนาแน่นน้อยลง และเกิดโพรงอากาศภายในเนื้อของพอลิเมอร์ เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะได้โฟมพอลิยูรีเทนที่มีรูพรุนตามลักษณะที่บรรจุ (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999)

การปรับอัตราส่วนของสารตั้งต้นระหว่างพอลิไอโซไซยาเนตและพอลิออล ทำให้ได้โฟมพอลิยูรีเทนที่มีสมบัติแตกต่างกัน ตั้งแต่โฟมที่มีความยืดหยุ่นสูงจนถึงพอลิยูรีเทนที่มีความยืดหยุ่นต่ำ การเติมไอโซไซยาเนตในปริมาณที่สูงกว่าพอลิออลจะทำให้พอลิยูรีเทนมีลักษณะแข็ง เรียกว่า โฟมชนิดแข็ง (rigid foam) ถ้าเติมพอลิออลในปริมาณที่สูงกว่าไอโซไซยาเนต จะทำให้ได้พอลิยูรีเทนที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม เรียกว่า โฟมชนิดนุ่ม (soft foam)



รูปที่ 3 ตำแหน่งของพันธะเอสเทอร์และพันธะอีเทอร์ภายในโครงสร้างของพอลิออล (Gautam and Bassi, 2007)



รูปที่ 4 การสังเคราะห์พอลิยูรีเทนโดยการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน (Gautam and Bassi, 2007)

4.3.2 การย่อยสลายของพอลิยูรีเทนและเมตาบอไลต์ที่เกิดขึ้น

Kanavel *et al.* (1966) กล่าวว่า การเติมสารตัวเติม (additives) ในโครงสร้างของพอลิยูรีเทนส่งผลให้การย่อยสลายทางชีวภาพลดลง เช่น การเติมสารประกอบซัลเฟอร์ สารประกอบเปอร์ออกไซด์ สารฆ่าเชื้อรา ซึ่งสารเหล่านี้เป็นอันตรายต่อเชื้อราที่มีบทบาทในการย่อยสลายพอลิยูรีเทน แม้ว่าพอลิยูรีเทนจะมีพันธะยูรีเทนหรือพันธะเอสเทอร์ที่ไวต่อกระบวนการไฮโดรไลซิส แต่ประสิทธิภาพการย่อยสลายพอลิยูรีเทนที่เกิดจากเอนไซม์ของจุลินทรีย์ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ อัตราส่วนของส่วนแข็งและส่วนอ่อนภายในสายโซ่ ถ้ามีส่วนแข็งในอัตราส่วนที่มากกว่า จะส่งผลให้หมู่คาร์บอนิลที่เกิดจากการย่อยสลายด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิสจะไปเชื่อมพันธะกับส่วนของส่วนแข็งในสายโซ่อื่นโดยใช้พันธะไฮโดรเจน ทำให้สายโซ่ไม่สามารถเคลื่อนที่ภายในสายโซ่ได้ จึงทำให้การย่อยสลายเกิดขึ้นได้ยาก (Santerre *et al.*, 1994) นักวิทยาศาสตร์จึงศึกษาโครงสร้างทางเคมีของพอลิยูรีเทนให้มีสมบัติที่สามารถย่อยสลายได้ทางกายภาพและทางชีวภาพมากขึ้น (Schnabel, 1981) เมื่อศึกษาตำแหน่งของพันธะยูรีเทนในสายโซ่ของพอลิเอสเทอร์พอลิยูรีเทน จึงพบว่าพันธะดังกล่าวสามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้ด้วยเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส ได้แก่ เอสเทอร์เรส ยูรีเอส โปรติเอส และไลเปส ด้วยสมบัตินี้จึงทำให้พอลิเอสเทอร์พอลิยูรีเทนจัดอยู่ในกลุ่มพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (Howard, 2012)

การย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิยูรีเทนโดยจุลินทรีย์สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ตามโครงสร้างทางเคมีของพอลิยูรีเทนที่ถูกย่อยสลาย ประเภทแรก คือ จุลินทรีย์ทำหน้าที่ย่อยสลายตรงตำแหน่งของพันธะยูรีเทนในโครงสร้างของสายโซ่พอลิยูรีเทน และส่งผลให้เกิดเมตาบอไลต์เป็นกลุ่มอนุพันธ์ของกรดคาร์บอกซิลิกและแอมโมเนีย การย่อยสลายพอลิยูรีเทนอีกประเภทหนึ่ง คือ จุลินทรีย์ทำหน้าที่ย่อยตรงส่วนพอลิออลภายในสายโซ่พอลิยูรีเทน ซึ่งการย่อยสลายประเภทนี้จะขึ้นอยู่กับสมบัติและโครงสร้างทางเคมีของพอลิออลดังกล่าว (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999)

การศึกษาสารตัวกลางและผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายพอลิยูรีเทนโดยเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลสที่ผลิตจากกลุ่มแบคทีเรียธรรมชาติ (bacterial consortia) ด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) พบว่า ในชุดควบคุมปรากฏเลขคลื่นตำแหน่ง 2963 เซนติเมตร⁻¹ เมื่อพิจารณาในชุดทดสอบตำแหน่งดังกล่าวเปลี่ยนไปเป็นเลขคลื่นตำแหน่ง 2957 เซนติเมตร⁻¹ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการตัดพันธะระหว่างอะตอมของคาร์บอนและไฮโดรเจน (C-H) และยังพบความสูงของกราฟที่ตำแหน่งเลขคลื่นช่วง 1400-1600 เซนติเมตร⁻¹ เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่งเดียวกันในชุดควบคุม ซึ่ง Shah *et al.* (2008) ได้อธิบายว่ามีเมตาบอลิซึมชนิดใหม่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายพอลิยูรีเทน อีกทั้งเลขคลื่นตำแหน่งที่ 1613 เซนติเมตร⁻¹ ในชุดทดสอบมีความสูงเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเป็นตำแหน่งของหมู่ยูเรียที่เพิ่มขึ้นเกิดจากแอมโมเนียที่เป็นเมตาบอลิซึมภายหลังการตัดพันธะยูรีเทนในสายพอลิยูรีเทน

5. วิธีการตรวจสอบและติดตามกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิเมอร์

วิธีที่นิยมใช้ในการตรวจสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิเมอร์ ได้แก่ การศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ (respirometric methods) การศึกษาปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปลดปล่อยออกมาจากเชื้อรา แบคทีเรีย ภายหลังการย่อยสลายพอลิเมอร์ในตะกอนน้ำเสีย ดิน หรือปุ๋ยหมัก (ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน) ส่วนการทดสอบทางกายภาพ (physical methods) ได้แก่ การศึกษาน้ำหนักที่หายไปของพอลิเมอร์ภายหลังกระบวนการย่อยสลาย การศึกษาความสามารถในการทนต่อแรงดึงของพอลิเมอร์ (tensile strength) ภายหลังการย่อยสลายเปรียบเทียบกับก่อนการย่อยสลาย การศึกษาพื้นผิวของพอลิเมอร์โดยพิจารณาจากเกาะติดของจุลินทรีย์บนพื้นผิวของพอลิเมอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning electron microscope) และการศึกษาข้อมูลการย่อยสลายของพอลิเมอร์โดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของพอลิเมอร์โดยการใช้รังสีชนิดต่างๆ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันที่เป็นองค์ประกอบโดยเปรียบเทียบก่อนและหลังการย่อยสลาย เช่น Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) Differential scanning calorimetry (DSC) Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) Atomic force microscopy (AFM) และ X-ray diffraction (XRD) สำหรับพอลิเมอร์บางชนิดที่สามารถละลายในตัวทำละลายบางชนิดได้สามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักโมเลกุลอันเนื่องมาจากการย่อยสลายของพอลิเมอร์ได้โดยใช้เทคนิค Gel permeation chromatography (GPC) เป็นต้น และนอกจากการศึกษการย่อยสลายทางชีวภาพและกายภาพแล้ว ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายทางชีวภาพโดยตรง (Jayasekara *et al.*, 2005)

6. เอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายพอลิยูรีเทน

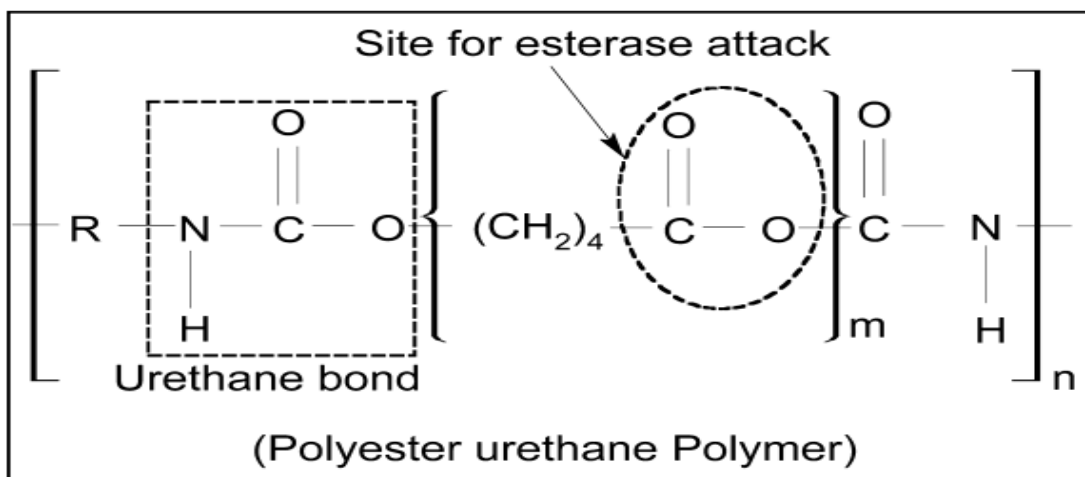
การศึกษาการย่อยสลายพอลิยูรีเทนในช่วงแรกมีการศึกษาโดยใช้เอนไซม์ปาเปน (papain enzyme) และเอนไซม์ยูรีเอส (urease enzyme) ในการทดสอบ (Kaplan *et al.*, 1968) โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้สามารถทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับพันธะยูรีเทนภายในโครงสร้างของพอลิเมอร์ หลังจากนั้นปรากฏหมู่เอมีนอิสระและหมู่ไฮดรอกซิลเป็นผลิตภัณฑ์ภายหลังจากการย่อยสลาย และยังพบว่าขนาดโมเลกุลของเอนไซม์มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายพอลิยูรีเทนได้แตกต่างกัน ด้วย ต่อมานักวิทยาศาสตร์พัฒนาพอลิยูรีเทนที่สามารถย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพมากขึ้น เช่น พอลิยูรีเทนที่มีพันธะซึ่งไวต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ การปรับปรุงโครงสร้างเชิงโมเลกุลของพอลิเมอร์ การลดความเป็นผลึก การปรับตำแหน่งเชื่อมขวางของพันธะระหว่างสายโซ่ และหมู่แทนที่ภายในสายโซ่ให้เหมาะกับการทำงานเอนไซม์มากขึ้น (Pathirana and Seal, 1983) การศึกษาเกี่ยวกับการย่อยสลายพอลิยูรีเทนโดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ เอนไซม์กลุ่มที่มีบทบาทในการย่อยสลายพอลิยูรีเทนเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส (Hydrolase enzymes) ได้แก่ กลุ่มของเอนไซม์ยูรีเอส โปรติเอส ไลเปส และเอสเทอร์เรส ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้สามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ในโครงสร้างพอลิออลของพอลิยูรีเทนได้ (รูปที่ 5) (Evans and Levisohn, 1968; Hole, 1972; Griffin, 1980)

เอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มหลักที่มีบทบาทสำคัญ ได้แก่

กลุ่มเอสเทอร์เรสแท้ (EC3.1.1.1) เป็นชนิดคาร์บอกซิลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (carboxyl ester hydrolases) เอนไซม์กลุ่มเอสเทอร์เรสมีบทบาทในกระบวนการไฮโดรไลซิสแบบง่ายกับพันธะเอสเทอร์ และมีบทบาทกับไตรกลีเซอไรด์ที่มีสายโซ่ของกรดไขมันที่มีอะตอมของคาร์บอนน้อยกว่า 6 (Helistö and Korpela, 1998; Kulkarni and Gadre, 2002)

กลุ่มเอนไซม์ไลเปส (EC3.1.1.3) เป็นชนิดไตรเอซิลกลีเซอรอลไฮโดรเลส (triacylglycerol hydrolase) (Bornscheuer, 2002) เอนไซม์กลุ่มไลเปสทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่มีสมบัติไม่ละลายน้ำ (water-insoluble substrates) เช่น ไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) ที่ประกอบด้วยกรดไขมัน (fatty acids)

ความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์เอสเทอร์เรสแท้ คือ สารตั้งต้นที่สามารถดูดกลืนแสงได้ (substrate spectra) สารตั้งต้นที่ใช้สำหรับทดสอบเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ พารา-ไนโตรฟีนิลปาล์มิเตต ในขณะที่สารตั้งต้นของเอนไซม์เอสเทอร์เรส ได้แก่ พารา-ไนโตรฟีนิลบิวทีเรต เอนไซม์ทั้งสองชนิดจะทำหน้าที่ตัดพันธะภายในของสารตั้งต้นที่จำเพาะได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารชนิดใหม่ คือ พารา-ไนโตรฟีนอล ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ประมาณ 410 นาโนเมตร (Lopes *et al.*, 2011)



รูปที่ 5 ตำแหน่งพันธะเอสเทอร์ในส่วนพอลิเอสเตอร์พอลิยูรีเทนที่มีความไวต่อเอนไซม์เอสเทอร์เรส (Gautam and Bassi, 2007)

7. จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายพอลิยูรีเทน

ในการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ามียีสต์เชื้อราและแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่มีความสามารถในการย่อยสลายพอลิยูรีเทน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายพอลิยูรีเทนได้กระจายตัวอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะในดิน

7.1 เชื้อรา

เชื้อราที่มีบทบาทในการย่อยพอลิยูรีเทน ได้แก่ *Curvularia senegalensis* *Fusarium solani* *Aureobasidium pullulans* และ *Cladosporium* sp. (Crabbe et al., 1994) ต่อมามีการค้นพบเชื้อราในกลุ่มเอนโดไฟท์ ได้แก่ *Pestalotiopsis microspora* ซึ่งสามารถย่อยสลายพอลิเอสเตอร์พอลิยูรีเทนสังเคราะห์ได้ทั้งในรูปของแข็งและของเหลว (Russell et al., 2011) นอกจากนี้ *Trichoderma* DIA-T sp. เป็นเชื้อราที่คัดแยกได้จากกองขยะพอลิยูรีเทน ซึ่งสามารถเจริญได้รวดเร็วบนอาหารแข็งที่ผสมพอลิยูรีเทนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน (Trevino et al., 2011)

7.2 แบคทีเรีย

แบคทีเรียแกรมลบ *Comamonas acidovorans* สายพันธุ์ TB-35 พบว่าสามารถใช้พอลิยูรีเทนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนได้ (Nakajima-Kambe et al., 1995) (Akutsu et al., 1998) และแบคทีเรียอื่นๆ อีก 16 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายพอลิยูรีเทนได้ (Kay et al., 1991) ส่วนแบคทีเรียที่ค้นพบล่าสุด ได้แก่ *Acinetobacter gernerii* สายพันธุ์ P7 คัดแยกได้จากดิน (Howard et al., 2012) และมีการศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ตามธรรมชาติเพื่อย่อยสลายพลาสติกพอลิยูรีเทน สมาชิกของกลุ่มจุลินทรีย์นี้พบว่าเป็นแบคทีเรียในจีส Bacillus sp. AF8 Pseudomonas sp. AF9 Micrococcus sp. AF10 Arthrobacter sp. AF11 และ Corynebacterium sp. AF12 แบคทีเรียกลุ่มนี้มีแนวโน้มใช้สำหรับกำจัดขยะพลาสติก (Shah et al., 2008)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายโพลีเมอร์จากตัวอย่างดินและน้ำเสีย
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโพลีเมอร์ทางชีวภาพและกายภาพก่อนและหลังกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพโดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้
3. เพื่อศึกษาเอนไซม์กลุ่มไลเปสในกระบวนการย่อยสลายชีวภาพของโพลีเมอร์
4. เพื่อบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ย่อยสลายโพลีเมอร์ที่คัดแยกได้

วิธีการวิจัย

1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1 แหล่งจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

- 1.1.1 ตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำเสียได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักงานกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง (สกย.) จังหวัดสงขลา ได้แก่ สกย.ยูงทอง สกย.แหลมยาง สกย.ยางงาม สกย.ป่ายาง และ สกย.คลองช้าง

1.2 พอลิเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

- 1.2.1 โฟมพอลิยูรีเทนที่ผลิตจากยางธรรมชาติ (ยางอีพอกไซด์ 4.76% อุณหภูมิที่ใช้ผลิตโฟมพอลิยูรีเทน 31.3 องศาเซลเซียส ความชื้น 47% ค่ามวลโมเลกุลเฉลี่ย 1464 กรัม/โมล)
- 1.2.2 ยางอีพอกไซด์ (ENR)
- 1.2.3 ถู่มือยาง ผลิตโดยบริษัทศรีตรัง แอโกรอินดัสทรี จำกัด (มหาชน)

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

- 1.3.1 Minimal Salts Medium (MSM) เติมน้ำยางธรรมชาติ (Natural Rubber Latex : NRL) 0.6 % (v/v) (MSM+NRL)
- 1.3.2 MSM เติมห่วงคาร์บอนด้วยพอลิเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง (ข้อ 1.2)
- 1.3.3 Luria Bertani Agar (LB agar)
- 1.3.4 Plate Count Agar (PCA)
- 1.3.5 Potato Dextrose Agar (PDA)
- 1.3.6 Actinomycete Agar (ACT)

2 วิธีทดลอง

2.1 การคัดแยกและเพิ่มจำนวนกลุ่มจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินและน้ำเสีย

เตรียมอาหารเหลว MSM ปริมาตร 225 มิลลิลิตร และเติมน้ำยางธรรมชาติ 0.6 % (v/v) ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำโพลียูรีเทนจำนวน 1 กรัม นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เวลา 15 นาที เติมตัวอย่างดิน 25 กรัม และนำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นนำส่วนของเหลวปริมาตร 25 มิลลิลิตรถ่ายลงฟลาสก์อาหารเหลว MSM ซึ่งเติมน้ำโพลียูรีเทนจำนวน 1 กรัมเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานแก่จุลินทรีย์ แต่ไม่เติมน้ำยางธรรมชาติ บ่มแบบเขย่าเป็นเวลา 15 วัน และทำซ้ำอีกครั้งเป็นเวลา 15 วัน เพื่อต้องการคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถใช้โฟมพอลิยูรีเทนที่ผลิตจากยางธรรมชาติเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้

2.2 การจัดกลุ่มจุลินทรีย์โดยใช้โพรบพอลิยูรีเทนเป็นแหล่งคาร์บอน

นำส่วนของเหลวจากขั้นตอน 2.1 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ถ่ายลงพลาสติกอาหารเหลว MSM ซึ่งเติมขึ้นโพรบพอลิยูรีเทนจำนวน 1 กรัม เมื่อครบระยะเวลาที่สัปดาห์ที่ 0 2 และ 4 นำส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์มาเกลี่ยเชื้อบนอาหารแข็ง 4 ชนิด ได้แก่ PCA PDA ACT และ MSM+NRL เพื่อจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยสังเขป และเก็บโคโลนีที่สามารถเจริญได้บนอาหารแข็ง MSM+NRL ที่ช่วงเวลาสัปดาห์ที่ 0 2 และ 4 เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

2.3 การทดสอบการย่อยสลายโพรบพอลิยูรีเทนโดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

ไอโซเลทในแต่ละช่วงเวลาที่ถูกแยกจากตัวอย่างดินหรือน้ำเสียตัวอย่างเดียวกัน นำมาจัดกลุ่มเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) จำนวน 2-5 โคโลนี ปรับความขุ่นให้มีความขุ่นประมาณ 0.5 McF (จำนวนเชื้อเริ่มต้น 1.5×10^7 CFU/mL) ปริมาตรรวม 15 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเหลว MSM ที่เตรียมไว้ปริมาตร 135 มิลลิลิตร และเติมแหล่งคาร์บอน 0.3 % (w/v) ได้แก่ โพรบพอลิยูรีเทน ยางอีพอกไซด์ ถุงมือยาง โดยทำควบคู่กับชุดควบคุมแบบไม่มีชีวิตของพอลิเมอร์แต่ละชนิด นำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วัน

2.4 การจัดกลุ่มจุลินทรีย์ผสมและทดสอบการย่อยสลายโพรบพอลิยูรีเทน

สมาชิกแต่ละไอโซเลทของกลุ่มจุลินทรีย์ในขั้นตอน 2.3 ที่สามารถรอดชีวิตภายหลังทดสอบการย่อยสลายพอลิเมอร์ในพลาสติกอาหารเหลวเป็นเวลา 30 วัน ถูกนำมาจัดกลุ่มอีกครั้งโดยแต่ละกลุ่มมีจำนวน 3 ไอโซเลท แบ่งเป็น 6 กลุ่ม (โดยใช้เกณฑ์การถูกคัดแยกจากตัวอย่างดิน/น้ำเสียแหล่งเดียวกัน หรือมีลักษณะโคโลนีต่างกันในการถูกคัดแยกจากคนละตัวอย่าง)

2.5 การทดสอบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายพอลิยูรีเทนด้วยวิธีทางชีวเคมี

นำไอโซเลทที่คัดแยกได้จากขั้นตอนที่ 2.4 ทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ เอสเทอร์เรส ไลเปส และเจลาติเนส ซึ่งเป็นสมาชิกของเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส เพื่อตรวจสอบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายพอลิยูรีเทน

2.6 การศึกษาจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต

จากขั้นตอนที่ 2.4 นับเชื้อในส่วนของเหลว โดยเจือจางด้วย 0.85% (w/v) น้ำเกลือปราศจากเชื้อ และนำมาเกลี่ยเชื้อบนอาหารแข็ง PCA เพื่อสังเกตชนิดและนับจำนวนไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ ภายหลังจากบ่มร่วมกับพอลิเมอร์ทั้งสามชนิดเป็นเวลา 30 วัน

2.7 การศึกษาน้ำหนักแห้งของพอลิเมอร์ที่หายไป

จากขั้นตอนที่ 2.4 กรองชิ้นส่วนพอลิเมอร์ภายหลังทดสอบการย่อยสลายโดยกลุ่มจุลินทรีย์ผสมแต่ละกลุ่มโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No. 1 นำชิ้นพอลิเมอร์อบให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใส่ในโถดูดความชื้นจนกระทั่งน้ำหนักแห้งคงที่ บันทึกน้ำหนักแห้งของพอลิเมอร์ที่เหลือ และคำนวณหาน้ำหนักแห้งที่หายไปหลังการย่อยสลาย (Pan *et al.*, 2009)

2.8 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างพอลิเมอร์โดยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR analysis)

จากผลการทดลองขั้นตอนที่ 2.7 พิจารณาจากชุดการทดลองที่ผลการทดลองน้ำหนักโพลีเมอร์หายไปมากที่สุด นำชิ้นพอลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ โพลีเมอร์ที่ 1, 2 และ 3 ก่อนและหลังทดสอบการย่อยสลายด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ผสม ล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง อบให้แห้งที่ 60 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทดสอบด้วยเครื่อง ATR-FTIR spectrometer from Bruker Tensor 27 ซึ่งให้เลขคลื่นในช่วง 4000-400 เซนติเมตร⁻¹ (Roy *et al.*, 2005)

2.9 การศึกษาการเกาะติดของจุลินทรีย์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

จากผลการทดลองขั้นตอนที่ 2.8 นำส่วนพอลิเมอร์ทั้งสามชนิดก่อนและหลังการย่อยสลายด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ผสมเป็นเวลา 30 วัน นำมาจุ่มใน 2.5 % กลูตาราลดีไฮด์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ และเอทิลแอลกอฮอล์ที่ระดับความเจือจาง 50% - 99.5% (v/v) เพื่อตรึงตัวเซลล์จุลินทรีย์บนผิวของพอลิเมอร์ จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการทำแห้ง และเคลือบด้วยทองคำนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด รุ่น Jeol JSM-5800LV Scanning Microscope (JEOL, Tokyo, Japan)

2.10 การศึกษาโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Bradford assay

เตรียมชุดการทดลองเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 2.3 โดยใช้กลุ่มจุลินทรีย์ผสมที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ เก็บส่วนของเหลวในชุดทดสอบและชุดควบคุมในช่วงเวลาสี่ปดาร์ที่ 0 1 2 3 และ 4 เพื่อนำมาศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์โดยการศึกษาโปรตีนทั้งหมด

2.10.1 การศึกษาโปรตีนทั้งหมดในส่วนของเหลวด้วยวิธี Bradford

นำส่วนของเหลวในพลาสติกที่ช่วงเวลาต่าง ๆ กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 เพื่อกำจัดเศษชิ้นส่วนพอลิเมอร์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์จุลินทรีย์ นำส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากตัวเซลล์ทดสอบด้วยสารละลาย Bradford เพื่อวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดในการทำปฏิกิริยานำส่วนของน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Bradford ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้สารละลายทั้งหมดเข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้

ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (Bradford, 1976) ใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องมือ Thermo scientific Genesys 10S UV-Vis spectrophotometer

2.10.2 การศึกษาการเกาะติดของจุลินทรีย์บนชั้นพอลิเมอร์ด้วยวิธี Bradford

นำชิ้นส่วนของพอลิเมอร์ที่ช่วงเวลาสัปดาห์ที่ 4 ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Bradford เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตลักษณะพื้นผิวของชั้นพอลิเมอร์ในชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

2.11 การศึกษาเอนไซม์ไลเปส

นำส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ 2.10.1 ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่จำเพาะกับเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ สารละลายพารา-ไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตต (*p*-NPP) โดยใช้ส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายสารตั้งต้นของเอนไซม์ไลเปส ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องมือ Thermo scientific Genesys 10S UV-Vis spectrophotometer (Winkler and Stuckmann, 1979) และใช้สารละลายพารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นสารละลายมาตรฐาน โดยให้ค่านิยามของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารตั้งต้น คือ พารา-ไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตต ได้เป็น พารา-ไนโตรฟีนอล 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

2.12 การศึกษากระบวนการย่อยสลายพอลิเมอร์โดยการตรวจปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

การทดลองแบ่งเป็น 4 ชุดการทดสอบในการทดสอบพอลิเมอร์แต่ละชนิด การทดลองนี้ใช้อุณหภูมิห้อง ประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน (รูปที่ 6) โดยแบ่งเป็นชุดการทดสอบ A B C และ D ได้แก่ ชุดควบคุมไม่มีชีวิต (abiotic control) 1 ชุด ชุดทดสอบ 2 ชุด และชุดควบคุมแบบมีชีวิต (biotic control) 1 ชุด ตามลำดับ อากาศที่ใช้ในการทดลองเป็นก๊าซออกซิเจนบริสุทธิ์ (a) ถูกปล่อยเข้าสู่ระบบโดยผ่านทางท่อทนความดันแก๊ส ปริมาตร 50-100 มิลลิลิตร/นาที เข้าสู่ภาชนะ (b) บรรจุสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นตัวจับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศก่อนเข้าฟลาสก์ทดสอบ ตำแหน่งภาชนะ (c) บรรจุสารละลาย MSM และ พอลิเมอร์ (A) สารละลาย MSM พอลิเมอร์ และกลุ่มจุลินทรีย์ (B และ C) สารละลาย MSM และกลุ่มจุลินทรีย์ (D) ตามลำดับ วางบนเครื่องกวนสารตลอดเวลา ตำแหน่งภาชนะ (d และ e) บรรจุสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นตัวจับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ถูกปล่อยจากภาชนะ (c) โดยกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ ตำแหน่ง

2.13 การบ่งชี้เอกลักษณ์ของแบคทีเรียโดยใช้ยีน 16S rRNA

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้เลี้ยงบนอาหารแข็ง Luria-Bertani เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขูดโคโลนีของแบคทีเรียนำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดทดสอบ PowerSoil[®] DNA Isolation Kit (Carlsbad, CA, USA) นำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ของแต่ละไอโซเลทมาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ ดังนี้

27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')

1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')

และดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส MyTaq[™] DNA Polymerase, Bioline เพื่อเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA จากนั้นวิเคราะห์ยีนที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยใช้เทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตัดแถบยีนของ 16S rRNA ที่ตำแหน่ง 1,500 คู่เบส นำชิ้นส่วนยีนที่ได้ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kits, Omega Bio-tek จากนั้นส่งวิเคราะห์หาลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแต่ละไอโซเลทโดยบริษัท Ward Medic Ltd. นำมาวิเคราะห์โดยนำลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และสามารถเปรียบเทียบ % similarity ของเชื้อที่คัดแยกได้กับเชื้อในฐานข้อมูล ทำให้สามารถบ่งชี้เอกลักษณ์ของเชื้อแต่ละไอโซเลทได้ชัดเจน รวมถึงสร้างความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของจุลินทรีย์ด้วยโปรแกรม MEGA6 (Warneke *et al.*, 2007)

ผลและวิเคราะห์ผลการทดลอง

1. การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายโพลีเอทิลีน

จากขั้นตอนการคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายโพลีเอทิลีนที่ผลิตจากยางธรรมชาติ โดยใช้อาหารเหลว Mineral Salts Medium (MSM) ผสมน้ำยางธรรมชาติ (Natural Rubber Latex : NRL) 0.6 % (v/v) และโพลีเอทิลีน 1 กรัม เติมห่วงยางดินและน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำยางธรรมชาติที่เก็บตัวอย่างจากบริเวณสำนักงานกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง (สกย.) จำนวน 5 แห่ง ในจังหวัดสงขลา ได้แก่ สกย.ยูงทอง สกย.แหลมยาง สกย.ยางงาม สกย.ป่ายาง และสกย.คลองช้าง ประกอบด้วยตัวอย่างดิน 6 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำเสีย 6 ตัวอย่าง เบื้องต้นได้คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 40 ไอโซเลทที่คาดว่าจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโพลีเอทิลีนและย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำยางธรรมชาติได้โดยใช้อาหารแข็ง MSM+NRL เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ทั้ง 40 ไอโซเลท โดยจัดกลุ่มตามแหล่งตัวอย่างดินและน้ำเสียที่ใช้คัดแยก บ่มแบบเขย่าร่วมกับวัสดุโพลีเอทิลีน (polyurethane foam, PU foam) และวัสดุอ้างอิงที่มียางธรรมชาติเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ถุงมือยาง (rubber glove) และยางอีพอกไซด์ (epoxidized natural rubber, ENR) เป็นเวลา 30 วัน ที่สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที พบว่าจำนวนไอโซเลทในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่สามารถเจริญได้บนอาหารแข็ง Plate Count Agar (PCA) ภายหลัง 30 วันของการทดสอบการย่อยสลายถุงมือยางจำนวน 26 ไอโซเลท ยางอีพอกไซด์ จำนวน 26 ไอโซเลท และโพลีเอทิลีน จำนวน 18 ไอโซเลท จุลินทรีย์ทั้ง 18 ไอโซเลทจากชุดทดสอบการย่อยสลายโพลีเอทิลีนถูกแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มจุลินทรีย์ กลุ่มละ 3 ไอโซเลท แบ่งตามการคัดแยกจากตัวอย่างดินหรือน้ำเสียเดียวกัน เพื่อให้ใกล้เคียงกับกลุ่มจุลินทรีย์ตามธรรมชาติมากที่สุด หรือลักษณะของโคโลนีต่างกัน เพื่อหลีกเลี่ยงจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวกัน และทดสอบการย่อยสลายวัสดุโพลีเอทิลีนและวัสดุอ้างอิงในอาหารเหลว MSM เป็นเวลา 30 วัน ที่สภาวะการบ่มเดิม นับจำนวนบนอาหาร PCA ภายหลังการบ่ม 30 วัน จากการจัดกลุ่มพบว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย 3 ไอโซเลทที่คัดแยกมาจากตัวอย่างดินเดียวกัน แต่กลุ่มจุลินทรีย์อื่นๆ ประกอบด้วยไอโซเลทจากตัวอย่างดินและน้ำเสียคนละแหล่ง เมื่อนำกลุ่มจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มบ่มร่วมกับโพลีเอทิลีนในอาหารเหลว MSM เป็นเวลา 30 วัน และนับจำนวนเซลล์ภายหลังการทดสอบการย่อยสลายจากนับจำนวนบนอาหาร PCA พบว่าจำนวนเซลล์ในส่วนของเหลวของชุดทดสอบโพลีเอทิลีนมีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญจากจำนวนเริ่มต้น 1.5×10^7 CFU/mL และไม่ปรากฏการเกาะติดของจุลินทรีย์บนผิวของโพลีเอทิลีน เมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้น ในขณะที่ในชุดทดสอบถุงมือยางและยางอีพอกไซด์มีจำนวนลดลงเล็กน้อย เนื่องจากเซลล์จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เกาะติดบนชิ้นของพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 1) และพิจารณาจากกลุ่มจุลินทรีย์ที่ทำให้น้ำหนักแห้งของโพลีเอทิลีนที่หายไปมากที่สุดภายหลังการย่อยสลายทางชีวภาพเป็นเวลา 30 วัน เพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ และใช้เป็นตัวแทนกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อทดสอบการย่อยสลายโพลีเอทิลีนในการทดลองต่อไป (รูปที่ 7)

ตารางที่ 1 จำนวนเซลล์ของเชื้อแต่ละไอโซเลท (CFU/mL) ในแต่ละกลุ่มจุลินทรีย์ภายหลังทดสอบการย่อยสลายกับวัสดุโพลีเอทิลีนและวัสดุอ้างอิง ได้แก่ ถุงมียางและยางอีพอกไซค์ เป็นเวลา 30 วัน ที่สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที

กลุ่ม จุลินทรีย์	รหัสเชื้อ	จำนวนเซลล์หลังทดสอบการย่อยสลายกับพอลิเมอร์ 30 วัน (CFU/mL)		
		วัสดุทดสอบ		วัสดุอ้างอิง
		โพลีเอทิลีน	ถุงมียาง	ยางอีพอกไซค์
1	1P (1)	2.8×10^4	2.6×10^6	1.8×10^6
	5P (1)	8.0×10^4	1.5×10^6	6.5×10^6
	6P (3)	1.0×10^4	1.0×10^4	1.5×10^5
2	5P (2)	1.0×10^5	1.7×10^5	1.5×10^5
	6P (2)	9.0×10^4	2.8×10^7	2.6×10^9
	6P (4)	1.5×10^6	2.5×10^8	2.0×10^7
3	6P (1)	1.8×10^6	1.2×10^6	1.5×10^6
	7P (1)	2.2×10^5	1.0×10^8	1.8×10^6
	8P (1)	2.9×10^6	3.9×10^8	1.0×10^5
4	10P (1)	4.6×10^4	4.0×10^5	1.2×10^6
	10P (2)	6.3×10^5	1.6×10^7	1.5×10^7
	10P (5)	6.1×10^5	1.4×10^8	4.3×10^6
5	9P (1)	1.1×10^2	1.0×10^3	1.2×10^3
	11P (2)	2.5×10^8	6.0×10^8	3.7×10^8
	11P (4)	1.0×10^2	1.6×10^2	1.1×10^2
6	11P (1)	1.7×10^6	3.8×10^7	1.7×10^7
	11P (3)	1.0×10^3	4.5×10^6	2.1×10^6
	12P (1)	2.0×10^6	8.5×10^5	3.0×10^5

2. การทดสอบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายพอลิเอทิลีนทางชีวเคมี

จุลินทรีย์จากชุดทดสอบการย่อยสลายโพลีเอทิลีนทั้ง 18 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบทางชีวเคมีเกี่ยวกับเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลสที่มีบทบาทในกระบวนการย่อยสลายพอลิเอทิลีน ได้แก่ ยูรีเอส ไลเปส และเจลาติเนส โดยใช้อาหารแข็งยูเรีย อาหารแข็งไทรบิวทีริน และอาหารเหลวเจลาติน ผลการทดลองพบว่า จุลินทรีย์ทั้ง 18 ไอโซเลทสามารถผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายพอลิเอทิลีนได้อย่างน้อย 1 ชนิด (ตารางที่ 2) จากการพิจารณาการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายพอลิเอทิลีนทางชีวเคมี พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่ 3 4 5 และ 6 สามารถผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้ในปริมาณสูง ในขณะที่จุลินทรีย์กลุ่มที่ 1 และ 2 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ใน

ปริมาณต่ำ จากผลการทดลองเบื้องต้นคาดว่าปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตได้โดยจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลท อาจมีความสัมพันธ์กับการย่อยสลายโพลีเมอร์ที่ผลิตจากยางธรรมชาติด้วย จากการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับเอนไซม์ที่มีบทบาทในกระบวนการย่อยสลายโพลีเมอร์ ได้แก่ เอนไซม์กลุ่มโปรติเอส ยูรีเอส และเอสเทอร์เรส จากเชื้อราและแบคทีเรียหลายชนิด เอนไซม์ โปรติเอสที่มีบทบาทในการย่อยสลายโพลีเมอร์ มีรายงานพบใน *Pseudomonas fluorescens* และ *Pseudomonas chlororaphis* (Howard and Blake, 1999; Howard *et al.*, 1999) เอนไซม์ไลเปส มีรายงานพบใน *Bacillus subtilis* (Rowe and Howard, 2002) *Bacillus* sp. AF8 *Pseudomonas* sp. AF9 *Arthrobacter* sp. AF11 และ *Corynebacterium* sp. AF12 (Shah *et al.*, 2008) และเอนไซม์ไลเปสทางการค้าที่ได้จาก *Candida rugosa* ถูกนำมาทดสอบในกระบวนการย่อยสลายโพลีเมอร์ (Gautam and Bassi, 2007) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์เอสเทอร์เรส ค้นพบใน *Corynebacterium* sp. *Comamonas acidovorans* TB-35 และ *P. chlororaphis* (Kay *et al.*, 1993; Nakajima-Kambe *et al.*, 1997; Howard *et al.*, 1999) และเอนไซม์เจลาติเนส พบใน *Bacillus* sp. AF8 *Pseudomonas* sp. AF9 และ *Arthrobacter* sp. AF11 (Shah *et al.*, 2008)

3. การหำร้อยละของน้ำหนักร้างที่หายไปจากการย่อยสลายทางชีวภาพ

จากผลการทดลองพบว่า จุลินทรีย์กลุ่มที่ 2 และจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 สามารถย่อยสลายโพลีเมอร์ได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มจุลินทรีย์กลุ่มอื่น โดยพิจารณาจากน้ำหนักร้างที่หายไปภายหลังจากทดสอบการย่อยสลายโพลีเมอร์ในอาหารเหลวเป็นเวลา 30 วัน คิดเป็นร้อยละ 7.78 และ 5.32 ตามลำดับ นอกจากนี้กลุ่มจุลินทรีย์ทั้งสองยังสามารถย่อยสลายวัสดุอ้างอิงได้ดี คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักร้างที่หายไปของถุงมือยาง ได้แก่ 7.38 และ 18.29 ตามลำดับ และร้อยละของน้ำหนักร้างที่หายไปของยางอิพอกไซด์ ได้แก่ 3.21 และ 1.54 ตามลำดับ (รูปที่ 7) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับน้ำหนักร้างที่หายไปของถุงมือยางและแผ่นฟิล์มโพลีเมอร์ทางการค้า (ตารางที่ 3) พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายถุงมือยางได้ดีกว่าเชื้อเดี่ยว *Streptomyces griseus* 1D หรือ *Streptomyces coelicolor* 1A เนื่องจากใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายน้อยกว่าประมาณ 6 สัปดาห์ แต่น้ำหนักร้างที่หายไปของถุงมือยางมีค่าใกล้เคียงกันประมาณร้อยละ 18 ของน้ำหนักร้างเริ่มต้น (Bode *et al.*, 2001) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกรย่อยสลายถุงมือยางโดยใช้เชื้อ *Nocardia* sp. strain 835A ปรากฏค่าร้อยละของน้ำหนักร้างที่หายไปมากถึงร้อยละ 90 ของน้ำหนักร้างเริ่มต้นภายในระยะเวลา 17 วัน (Tsuchii *et al.*, 1985) เมื่อเปรียบเทียบการย่อยสลายโพลีเมอร์ด้วยจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 กับการย่อยสลายแผ่นฟิล์มโพลีเอสเตอร์โพลีเมอร์ทางการค้าโดยใช้กลุ่มจุลินทรีย์ในปุ๋ยคอก โดยมีเชื้อรา *Fusarium solani* และ *Candida ethanolica* เป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่ตรวจพบภายหลังจากฝังแผ่นฟิล์มในปุ๋ยคอกเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าน้ำหนักร้างที่หายไปของแผ่นฟิล์มมีค่าน้อยกว่าร้อยละ 1 ของน้ำหนักร้างเริ่มต้น (Zafar *et al.*, 2013) ในขณะที่จุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 สามารถย่อยสลายโพลีเมอร์ที่ผลิตจากยางธรรมชาติได้ และให้ค่าร้อยละของน้ำหนักร้างที่หายไป คิดเป็นร้อยละ 5.32 จากน้ำหนักร้างเริ่มต้น ภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อพิจารณาโดยรวมจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 จัดเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายยางธรรมชาติได้ดีและย่อยสลาย

วัสดุยางได้หลากหลายชนิด ได้แก่ กล้วยมียาง ยางอพิพอกซีไดซ์ และโพนพอลิยูรีเทนที่ผลิตจากยางธรรมชาติ จุลินทรีย์กลุ่มนี้อาจเป็นจุลินทรีย์ทางเลือกที่ใช้สำหรับกำจัดขยะยางชนิดอื่นๆ ในอนาคตได้

ตารางที่ 2 การทดสอบเอนไซม์ของเชื้อแต่ละไอโซเลทเมื่อทดสอบด้วยอาหารแข็งยูเรีย อาหารแข็งไทรบิวทีริน และอาหารเหลวเจลาติน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน

กลุ่มจุลินทรีย์	รหัสเชื้อ	อาหารแข็งยูเรีย			อาหารแข็งไทรบิวทีริน			อาหารเหลวเจลาติน		
		2 วัน	3 วัน	6 วัน	2 วัน	3 วัน	6 วัน	2 วัน	3 วัน	6 วัน
1	6P (3)	-	+	+	-	2.30	2.50	-	-	-
	1P (1)	-	+	+	-	1.30	1.75	-	-	-
	5P (1)	-	-	-	1.50	1.70	3.00	-	-	-
2	6P (4)	-	+	+	-	-	2.25	-	-	-
	6P (2)	+++	+++	+++	-	-	1.00	-	-	-
	5P (2)	-	-	-	-	-	1.00	-	-	-
3	7P (1)	+	++	+++	0.55	1.25	3.80	-	-	-
	6P (1)	++	++	+++	1.35	1.25	5.60	-	-	-
	8P (1)	+	++	+++	1.10	2.25	6.10	+	+	+
4	10P (5)	+++	+++	+++	0.75	1.35	3.55	-	-	-
	10P (2)	+	++	++	1.55	3.70	6.80	+	+	+
	10P (1)	+++	+++	+++	0.60	2.20	2.45	-	-	-
5	11P (2)	+	++	++	3.20	5.35	8.00	-	-	-
	11P (4)	+++	+++	+++	0.75	1.80	2.45	-	-	-
	9P (1)	+++	+++	+++	-	-	1.00	-	-	-
6	11P (1)	+++	+++	+++	-	1.55	2.85	-	-	-
	11P (3)	+++	+++	+++	-	2.85	4.40	-	-	-
	12P (1)	++	+++	+++	0.80	1.60	5.00	-	-	-

หมายเหตุ :

อาหารแข็งยูเรีย

การแปลผล : ไม่สร้างเอนไซม์ยูรีเอส เป็นผลลบ (อาหารไม่เปลี่ยนสี) สร้างเอนไซม์ยูรีเอส เป็นผลบวก (เปลี่ยนเป็นสีชมพูบานเย็น)
โดยมี 3 ระดับ (+) ผลิตเอนไซม์ได้น้อย (++) ปานกลาง (+++) มาก

อาหารแข็งไทรบิวทีริน

การแปลผล : ไม่สร้างเอนไซม์ไลเปส เป็นผลลบ (ไม่เกิดวงใสรอบโคโลนี)
สร้างเอนไซม์ไลเปส เป็นผลบวก (เกิดวงใสรอบโคโลนี) หน่วยเป็นมิลลิเมตร

อาหารเหลวเจลาติน

การแปลผล : ไม่สร้างเอนไซม์เจลาติเนส เป็นผลลบ (เจลาตินแข็งหลังแช่เย็น 1 ชั่วโมง)
สร้างเอนไซม์เจลาติเนส เป็นผลบวก (เจลาตินเหลวหลังแช่เย็น 1 ชั่วโมง)

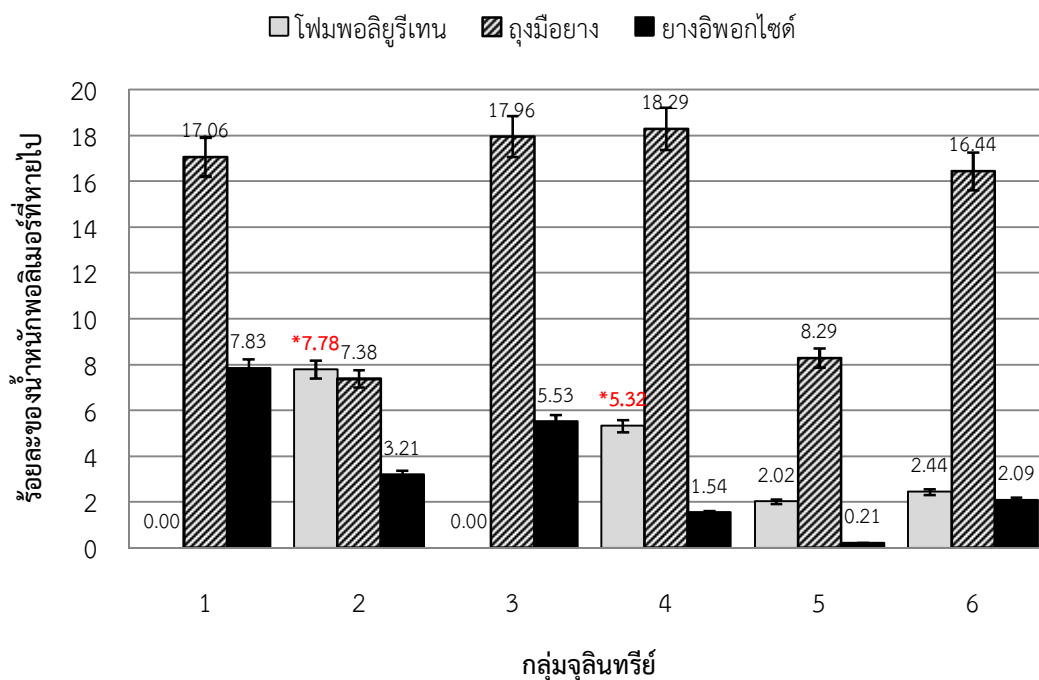
ตารางที่ 3 ร้อยละของน้ำหนักแห้งที่หายไปภายหลังการย่อยสลายถุงมือยาง เสื่อยาง และแผ่นฟิล์ม พอลิยูรีเทนทางการค้า

ชนิดของวัสดุ	จุลินทรีย์	% น้ำหนักแห้งที่หายไป	ระยะเวลาทดสอบ	อ้างอิง
ถุงมือยาง	<i>Streptomyces lividans</i> 1326	< 3	10 สัปดาห์	[1]
	<i>Nocardia</i> sp. strain 835A	90	17 วัน	[2]
	<i>Bacillus pumilus</i>	24	2 เดือน	[3]
	<i>Streptomyces griseus</i> 1D	18	10 สัปดาห์	[1]
	<i>Streptomyces coelicolor</i> 1A	18	10 สัปดาห์	[1]
	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	13	10 สัปดาห์	[1]
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	12	10 สัปดาห์	[1]
	<i>Xanthomonas</i> sp. <i>Nocardia</i> sp. DSMZ43191	12 11	10 สัปดาห์ 10 สัปดาห์	[1] [1]
เสื่อยาง	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> T2	2	70 วัน	[4]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GP10	4	70 วัน	[4]
	<i>Nocardia corynebacterioides</i> S3	5.3	70 วัน	[4]
แผ่นฟิล์มพอลิยูรีเทน	<i>Aspergillus flavus</i> (ITCC no. 6051)	60.6	30 วัน	[5]
	<i>Alternaria solani</i>	65.8	3 สัปดาห์	[5]
พอลิเอสเตอร์พอลิยูรีเทน	กลุ่มจุลินทรีย์ในปุ๋ย	< 1	12 สัปดาห์	[6]

หมายเหตุ

[1] Bode *et al.*, 2001 [2] Tsuchii *et al.*, 1985 [3] Nayanashree *et al.*, 2014

[4] Pan *et al.*, 2009 [5] Mathur and Prasad, 2012 [6] Zafar *et al.*, 2013

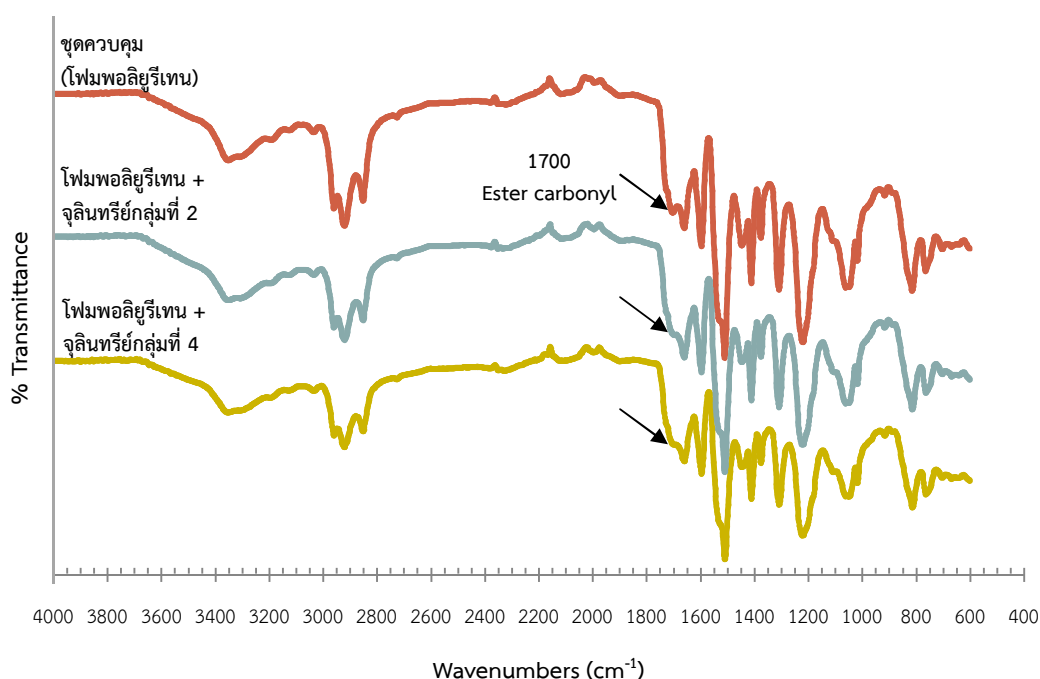


รูปที่ 7 ร้อยละของน้ำหนักพอลิเมอร์ที่หายไป ประกอบด้วยพอลิเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ ฤงมือยาง ยางอียอกไซด์ และโฟมพอลิยูรีเทน ภายหลังจากทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพโดยกลุ่มจุลินทรีย์ 6 กลุ่ม เป็นเวลา 30 วัน ที่สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที สัญลักษณ์ (*) แสดงถึงร้อยละของน้ำหนักแห้งโฟมพอลิยูรีเทนที่หายไปมากที่สุด 2 ลำดับแรก โดยที่น้ำหนักพอลิเมอร์ในชุดควบคุมของพอลิเมอร์แต่ละชนิดไม่พบการเปลี่ยนแปลง

4. การวิเคราะห์โครงสร้างของพอลิเมอร์ด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (FT-IR analysis)

จากผลการทดลองการหาร้อยละของน้ำหนักแห้งที่หายไปของโฟมพอลิยูรีเทน เพื่อใช้เป็นเกณฑ์คัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโฟมพอลิยูรีเทน พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 4 ได้รับคัดเลือกเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ตัวแทน ขึ้นต่อมาจึงใช้การวิเคราะห์โครงสร้างของพอลิเมอร์ด้วยเครื่องมือฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (FT-IR spectroscopy) เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโฟมพอลิยูรีเทนและวัสดุอ้างอิงได้ดีที่สุด โดยพิจารณาจากกลุ่มจุลินทรีย์ที่ทำให้โครงสร้างของพอลิเมอร์เปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน ผลปรากฏว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่ 2 และ 4 สามารถทำลายพันธะยูรีเทน (R-COONH-R') ซึ่งประกอบด้วยหมู่เอสเทอร์คาร์บอนิล (R-COO) และยูรีเทน (R-NH) ส่งผลให้พีคที่ตำแหน่งเลขคลื่นที่ 1700 เซนติเมตร⁻¹ ที่แสดงถึงหมู่เอสเทอร์คาร์บอนิลในโครงสร้างลดลง (รูปที่ 8) เป็นหลักฐานหนึ่ง que แสดงว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่ 2 และ 4 สามารถย่อยสลายตำแหน่งพันธะยูรีเทนของพอลิยูรีเทนได้ ซึ่งตำแหน่งพันธะดังกล่าวมีรายงานก่อนหน้านี้ว่ามีความไวต่อเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส ได้แก่ ยูรีเอส ไลเปส โปรติเอส จากรูปที่ 8 สังเกตได้ว่าโฟมพอลิยูรีเทนที่ผลิตจากยางธรรมชาติชนิดนี้ ไม่ปรากฏตำแหน่งพีคที่ 835 เซนติเมตร⁻¹ ซึ่งแสดงถึง *cis*-1,4 double bonds ภายในโครงสร้างของยางธรรมชาติ พันธะดังกล่าวอาจหายไป

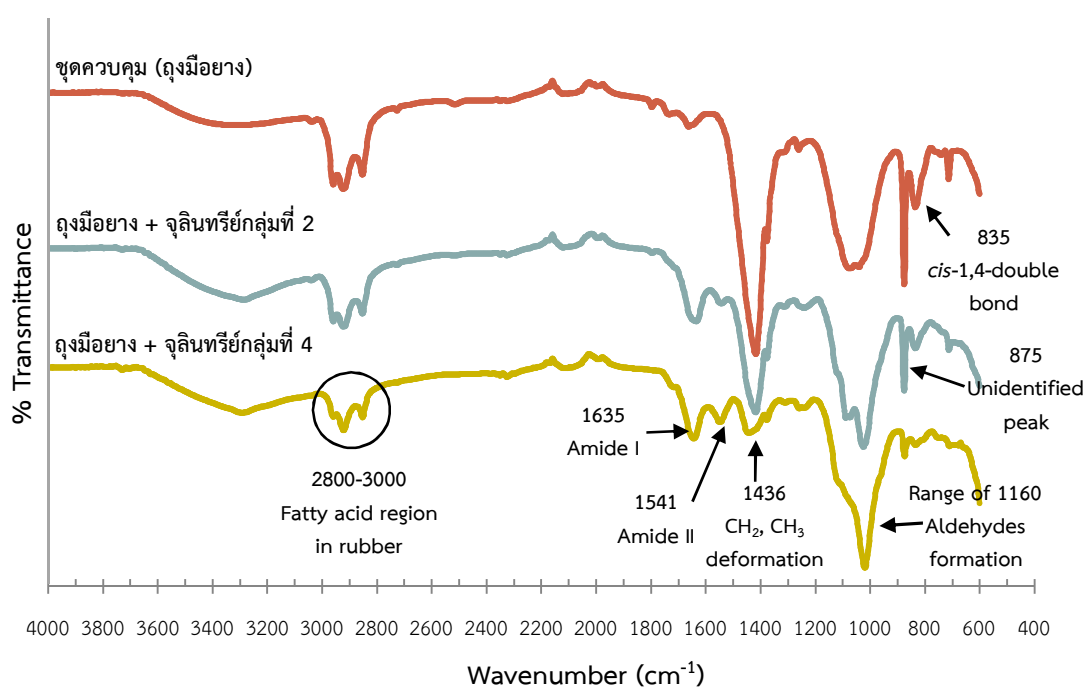
จากกระบวนการสังเคราะห์โฟมพอลิยูรีเทน จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายอย่างธรรมชาติเข้ามามีบทบาทได้ยาก การศึกษาการย่อยสลายพอลิยูรีเทนโดยใช้จุลินทรีย์ก่อนหน้านี้ โดยส่วนใหญ่พอลิยูรีเทนเหลว (Impranil DLN) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าถูกนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำหรับจุลินทรีย์ เช่น *Pseudomonas putida* สามารถย่อยสลายหมู่คาร์บอนิลได้ที่ตำแหน่งเลขคลื่น 1735 เซนติเมตร⁻¹ และปรากฏ R-NH stretching และ O-H stretching ที่ตำแหน่ง 3230-3400 และ 3404 เซนติเมตร⁻¹ เป็นสารตัวกลางที่เกิดจากการแตกตัวของพันธะยูรีเทน (Huei Peng *et al.*, 2014) การศึกษา *Pestalotiopsis microspora* เป็นเชื้อรากลุ่มเอนโดไฟท์ที่สามารถย่อยสลายพันธะยูรีเทนใน Impranil DLN ที่ตำแหน่งเลขคลื่น 1735 เซนติเมตร⁻¹ ได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 6 วัน โดยใช้เอนไซม์กลุ่มพอลิยูรีเทนเนส (Russell *et al.*, 2011)



รูปที่ 8 โครงสร้างของโฟมพอลิยูรีเทนในชุดควบคุมและชุดทดสอบที่ผ่านการทดสอบด้วยจุลินทรีย์กลุ่มที่ 2 และ 4 เป็นเวลา 30 วัน ในอาหารเหลว MSM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที

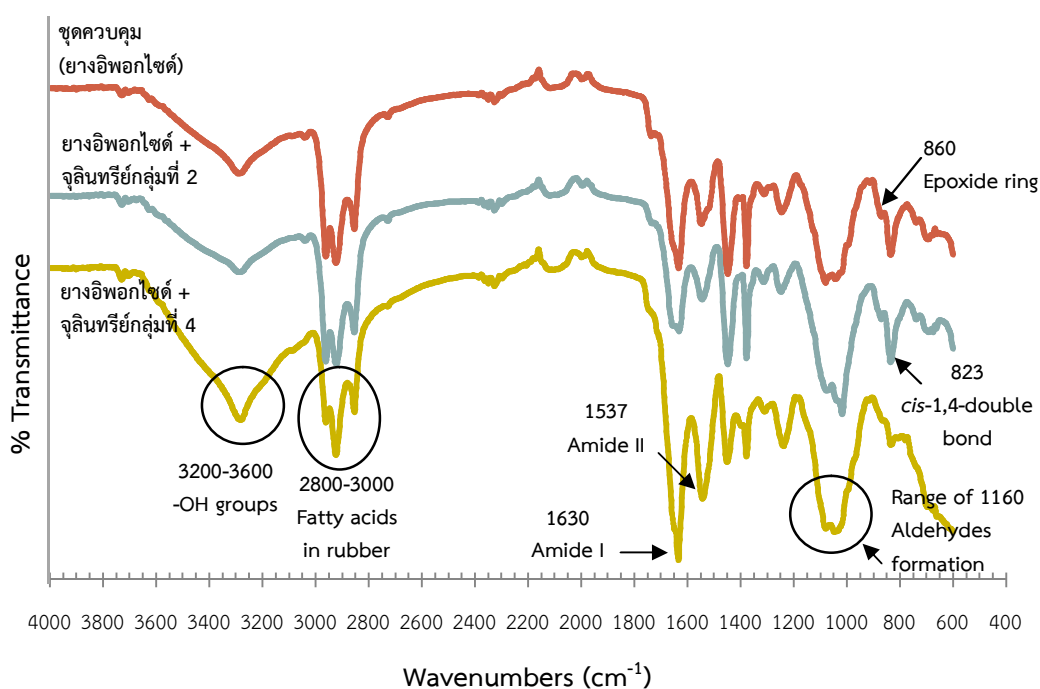
ถูงมื่ออย่างและยางอืพอกไซด์เป็นวัสดุอ้างอิงในการศึกษานี้ เมื่อผ่านการทดสอบการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์กลุ่มที่ 2 และ 4 พบว่ามีลักษณะการเปลี่ยนแปลงภายในโครงสร้างของพอลิเมอร์ที่แตกต่างกัน สังเกตได้จากลักษณะเส้นสเปกตรัมของ FT-IR แสดงถึงจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มมีกลไกการย่อยสลายที่แตกต่างกัน จากรูปที่ 9 พิจารณาเส้นสเปกตรัมในชุดทดสอบถูงมื่ออย่าง พบว่าที่ตำแหน่ง 835 เซนติเมตร⁻¹ เป็นตำแหน่งพันธะสำคัญในการพิจารณาการย่อยสลายอย่างธรรมชาติ ที่แสดงถึง *cis*-1,4 double bonds (Shah *et al.*, 2012) ในชุดทดสอบด้วยจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มพบว่าที่ตำแหน่งดังกล่าวความสูงของพีคมีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับชุดทดสอบ แต่ความสูงของพีคลดลง

มากกว่าในชุดทดสอบด้วยจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 และตำแหน่ง 1436 เซนติเมตร⁻¹ แสดงถึง CH₂ และ CH₃ ภายในโครงสร้างของยางธรรมชาติ พบว่ามีปริมาณลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และบริเวณตำแหน่งเลขคลื่นช่วง 2800-3000 เซนติเมตร⁻¹ ที่แสดงถึงกรดไขมันในองค์ประกอบของน้ำยางธรรมชาติ พบว่าในชุดทดสอบด้วยจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 มีปริมาณลดลง ในขณะที่ชุดทดสอบด้วยจุลินทรีย์กลุ่มที่ 2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง และอีกตำแหน่งของเลขคลื่นที่สำคัญในการพิจารณาการย่อยสลายยางธรรมชาติ คือ ช่วงเลขคลื่น 1160 เซนติเมตร⁻¹ แสดงถึงการปรากฏของหมู่แอลดีไฮด์และคีโตนในโครงสร้างของยางธรรมชาติ (Shah *et al.*, 2012) ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชันในการทำลายพันธะคู่ในโครงสร้างของยางธรรมชาติ เห็นได้ว่าลักษณะของพีคในช่วงเลขคลื่น 1160 เซนติเมตร⁻¹ มีลักษณะต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดทดสอบสองชุด อาจเกิดจากกลไกการย่อยสลายยางที่เชื่อทั้งสองกลุ่มใช้มีกลไกต่างกัน นอกจากนี้ที่ตำแหน่ง 1635 และ 1541 เซนติเมตร⁻¹ ในชุดทดสอบทั้งสองมีปริมาณเพิ่มขึ้น แสดงถึงส่วนประกอบของโปรตีน ได้แก่ amide I และ amide II ตามลำดับ (Linos *et al.*, 2000) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของตัวเซลล์ที่เกาะติดบนผิวของแผ่นถุ้มือยาง จากหลักฐานที่ปรากฏในผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายถุ้มือยางที่ผลิตจากธรรมชาติได้ดีกว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่ 2



รูปที่ 9 โครงสร้างของถุ้มือยางในชุดควบคุม และชุดทดสอบที่ผ่านการทดสอบด้วยจุลินทรีย์กลุ่มที่ 2 และ 4 เป็นเวลา 30 วัน ในอาหารเหลว MSM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที

เมื่อศึกษาขงยางอีพอกไซด์ซึ่งเป็นวัสดุอ้างอิงอีกชนิดหนึ่งด้วยเครื่องมือ FT-IR (รูปที่ 10) พบว่า จุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 มีประสิทธิภาพในการทำลายพันธะ *cis*-1,4 double bonds ในโครงสร้างของยางอีพอกไซด์ได้ดีกว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่ 2 สังเกตได้ความสูงของพีคที่ตำแหน่งเลขคลื่น 823 เซนติเมตร⁻¹ การทำลายพันธะคู่ดังกล่าวส่งผลให้เกิดหมู่แอลดีไฮด์เพิ่มขึ้นในโครงสร้าง ในช่วงเลขคลื่น 1160 เซนติเมตร⁻¹ ทำนองเดียวกับกลไกการย่อยสลายยางมูยอง (Shah *et al.*, 2012) นอกจากนี้ ตำแหน่งเลขคลื่น 860 เซนติเมตร⁻¹ เป็นตำแหน่งที่แสดงถึงวงแหวนอีพอกไซด์ (Hamzah *et al.*, 2012) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของยางอีพอกไซด์ (ENR) พบว่าในชุดทดสอบด้วยจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 ความสูงของพีคลดลง อาจเกิดจากจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 สามารถทำลายวงแหวนอีพอกไซด์ภายในโครงสร้างของยางอีพอกไซด์ได้ ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดสารตัวกลางเพิ่มขึ้น ได้แก่ หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3200-3600 เซนติเมตร⁻¹ (Phinyocheep *et al.*, 2004) นอกจากนั้นองค์ประกอบของเซลล์จุลินทรีย์ เช่น ส่วนประกอบของโปรตีนและพอลิแซคคาไรด์มีปริมาณเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเกิดไบโอฟิล์มปกคลุมบนผิวของวัสดุ ได้แก่ amide I และ amide II ที่ตำแหน่ง 1630 1537 ส่วนพอลิแซคคาไรด์แสดงที่ตำแหน่งเลขคลื่น 1016 เซนติเมตร⁻¹ ซึ่งซ้อนทับกับช่วง 1160 เซนติเมตร⁻¹ ที่แสดงถึงการเกิดหมู่แอลดีไฮด์ (Linos *et al.*, 2000)



รูปที่ 10 โครงสร้างของยางอีพอกไซด์ในชุดควบคุม และชุดทดสอบที่ผ่านการทดสอบด้วยจุลินทรีย์กลุ่มที่ 2 และ 4 เป็นเวลา 30 วัน ในอาหารเหลว MSM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที

5. การศึกษาการเกาะติดของจุลินทรีย์บนผิววัสดุโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

การศึกษากระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของโฟมพอลิยูรีเทน (วัสดุทดสอบ) ถูงมื่อยาง และยางอิพอกไซด์ (วัสดุอ้างอิง) โดยใช้จุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 ในอาหารเหลว MSM เป็นเวลา 30 วัน เมื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพของชิ้นวัสดุทั้งสามชนิด ได้แก่ ถูงมื่อยาง ยางอิพอกไซด์ และโฟมพอลิยูรีเทนที่ระยะเวลา 0 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ การเกาะติดของกลุ่มจุลินทรีย์บนผิวของวัสดุอ้างอิง (ถูงมื่อยางและยางอิพอกไซด์) มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นจนสังเกตได้ด้วยตาเปล่า เมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้น ในทางกลับกันไม่ปรากฏการเกาะติดของตัวเซลล์จุลินทรีย์บนชิ้นส่วนโฟมพอลิยูรีเทน แม้ว่าระยะของการบ่มนานขึ้น (รูปที่ 11)

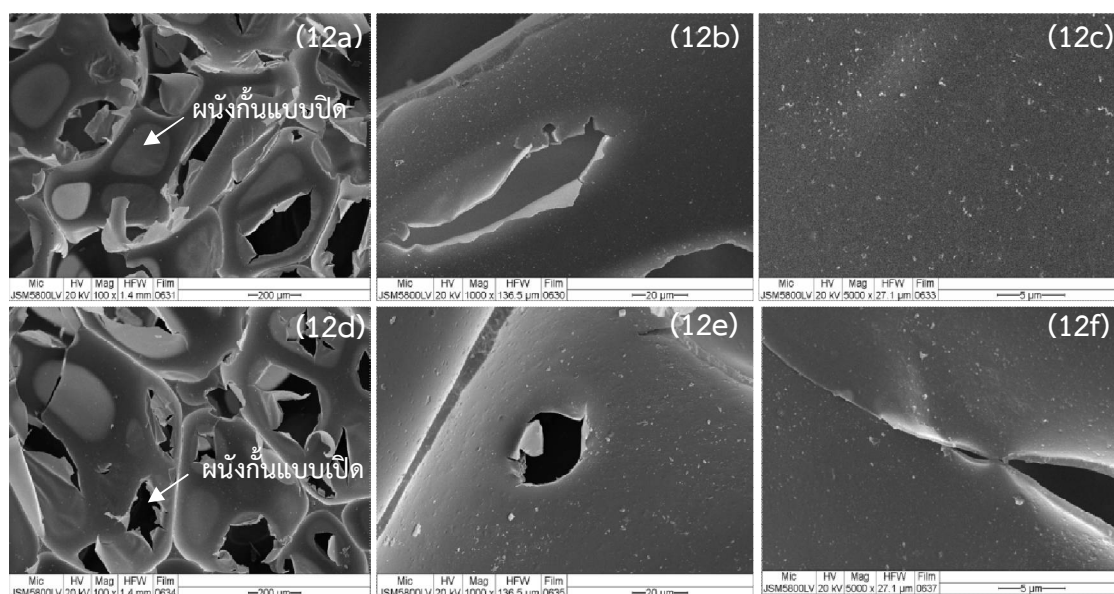


รูปที่ 11 การเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์บนผิวของวัสดุต่างชนิดกัน (ถูงมื่อยาง ยางอิพอกไซด์ และโฟมพอลิยูรีเทน) เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าภายหลังการบ่มในอาหารเหลว MSM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ที่ระยะเวลา 0 1 2 3 และ 4 สัปดาห์

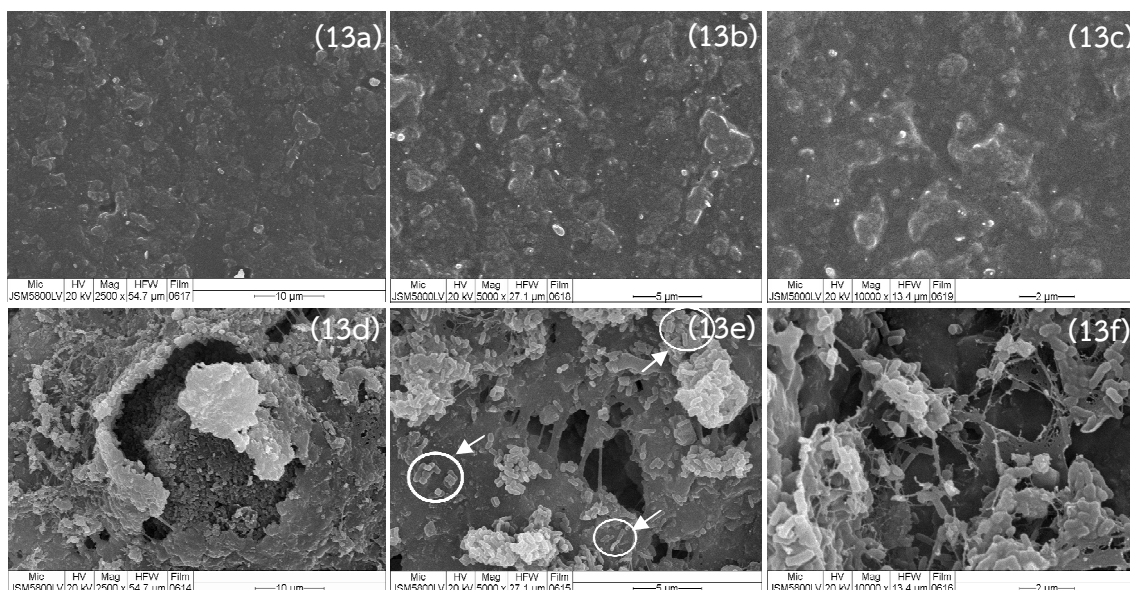
เมื่อศึกษาชิ้นพอลิเมอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด ลักษณะผนังกันโครงสร้างของโฟมพอลิยูรีเทนมีลักษณะเป็นผนังกันแบบกึ่งเปิดกึ่งปิด (semi open-cell foam) (รูปที่ 12a และ 12d) ผนังกันของชิ้นโฟมมีลักษณะเป็นรูอย่างเห็นได้ชัดในชุดควบคุมและชุดทดสอบ อาจเกิดจากแรงเหวี่ยงที่เกิดจากการเขย่าในอาหารเหลวเป็นเวลานาน จึงทำให้ชิ้นส่วนของผนังกันที่มีความบางกว่าส่วนอื่นฉีกขาดและกระจายเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ ในอาหารเหลว เมื่อพิจารณาพื้นผิวของชิ้นโฟมพอลิยูรีเทนในชุดทดสอบ กลับไม่พบการเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์ (รูปที่ 12) นอกจากนี้พบว่าวัสดุอ้างอิงได้ที่ผลิตจากยางธรรมชาติ ได้แก่ ถูงมื่อยางและยางอิพอกไซด์ หลังจากผ่านกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 กลับให้ผลลัพธ์ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน เมื่อพิจารณาพื้นผิวของถูงมื่อยางในชุดทดสอบ สังเกตเห็นการเจริญของจุลินทรีย์รูปแท่ง 3 ลักษณะที่แตกต่างกัน (วงกลมและลูกศรสีขาวรูปที่ 13) ซึ่งแสดงถึงจุลินทรีย์รูปแท่ง 3 ไอโซเลทที่เป็นสมาชิกของจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 สามารถเจริญครอบคลุมพื้นที่ผิวของถูงมื่อยางอย่างหนาแน่น และมีการผลิตสารลักษณะคล้ายไบโอฟิล์มปกคลุมบน

ผิวของถุงมือยาง เพื่อช่วยยึดติดกับผิววัสดุและเกิดการย่อยสลายได้ดีขึ้น จึงทำให้พื้นผิวของถุงมือยาง บริเวณรอบกลุ่มจุลินทรีย์เกิดรอยแตก ลักษณะเป็นโพรงลึกคล้ายปล่องภูเขาไฟ แสดงให้เห็นว่าทุกไอโซเลทที่เป็นสมาชิกในจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 มีคุณสมบัติในการย่อยสลาย ถุงมือยางที่ผลิตจากยางธรรมชาติได้ทุกไอโซเลท เมื่อพิจารณาพื้นผิวของยางอีพอกไซด์ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตโฟมพอลิยูรีเทนชนิดนี้ ภายหลังจากทดสอบกระบวนการย่อยสลายเป็นเวลา 30 วัน พบลักษณะจุลินทรีย์รูปร่างที่มีเพียงลักษณะเดียวจำนวนมากเกาะอย่างหนาแน่นเป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่ และมีสารลักษณะคล้ายไบโอฟิล์มห่อหุ้มพื้นผิวของชิ้นยางอีพอกไซด์ ซึ่งจุลินทรีย์ไอโซเลทนี้อาจเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทย่อยสลายในระยะท้ายของการบ่ม (รูปที่ 14)

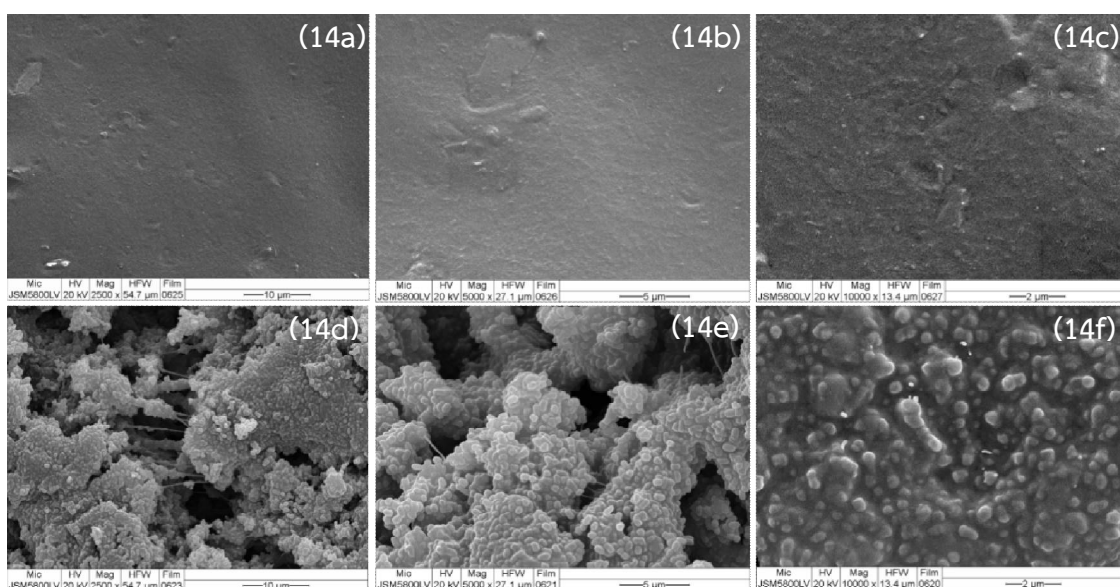
จากผลการทดลองนี้จึงสันนิษฐานได้ว่ากระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของโฟมพอลิยูรีเทนโดยกลุ่มจุลินทรีย์นี้ ไม่ปรากฏตัวเซลล์จุลินทรีย์บนผิวของชิ้นโฟม แต่ปรากฏจำนวนเซลล์จุลินทรีย์บางส่วนบนชิ้นส่วนเล็กๆ ที่กระจายในอาหารเหลว ด้วยเหตุนี้แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ไม่สามารถเกาะบนพื้นผิวของโฟมชนิดนี้ได้ อาจเพราะลักษณะของผนังกันโครงสร้างของชิ้นโฟมมีลักษณะที่เรียบลื่นคล้ายพลาสติกและฉีกขาดได้ง่ายจากแรงเหวี่ยง จึงทำให้การเกาะติดของจุลินทรีย์เกิดขึ้นได้ยาก หรืออาจเกิดจากโครงสร้างของโฟมพอลิยูรีเทนที่ผ่านกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีหลายขั้นตอน จึงอาจมีสารเคมีที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ตกค้างอยู่ ด้วยเหตุนี้จึงไม่ปรากฏตัวเซลล์จุลินทรีย์บนพื้นผิวของโฟมพอลิยูรีเทน



รูปที่ 12 ลักษณะพื้นผิวโฟมพอลิยูรีเทนที่ผลิตจากยางธรรมชาติ (วัสดุทดสอบ) ในชุดควบคุม (12a–12c) และชุดทดสอบ (12d–12f) หลังบ่มในอาหารเหลว MSM เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด ที่กำลังขยาย 100X 1000X และ 5000X



รูปที่ 13 ลักษณะพื้นผิวถุงมือยาง (วัสดุอ้างอิง) ในชุดควบคุม (13a-13c) และชุดทดสอบ (13d-13f) หลังบ่มในอาหารเหลว MSM เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด ที่กำลังขยาย 2500X 5000X และ 10000X



รูปที่ 14 ลักษณะพื้นผิวยางอีพอกไซด์ (วัสดุอ้างอิง) ในชุดควบคุม (14a-14c) และชุดทดสอบ (14d-14f) หลังบ่มในอาหารเหลว MSM เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด ที่กำลังขยาย 2500X 5000X และ 10000X

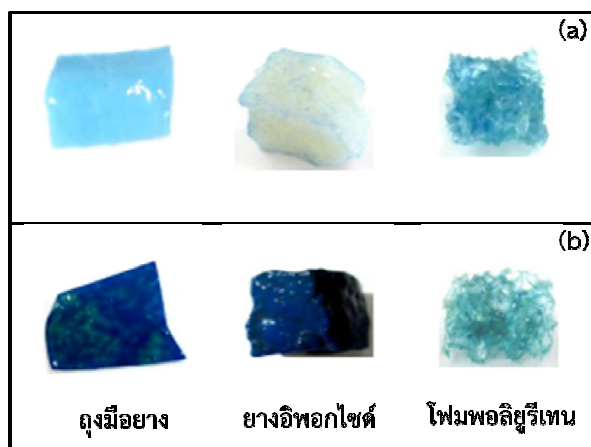
6. การศึกษาโปรตีนทั้งหมดและกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดและกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการศึกษานี้ เพื่อศึกษาปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตออกนอกตัวเซลล์ (extracellular enzyme) จากจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 ที่คัดแยกได้ โดยเอนไซม์ไลเปสใช้เป็นตัวแทนของเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลสที่มีบทบาทในกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิยูรีเทน และใช้โพรพอลิยูรีเทนที่ผลิตจากยางธรรมชาติ (วัสดุทดสอบ) ถูมือยางและยางอิพอกซีไดซ์ (วัสดุอ้างอิง) เป็นวัสดุเหนียวนำเอนไซม์ไลเปสในการทดลองนี้ โดยนำส่วนของน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากตัวเซลล์จุลินทรีย์หลังจากบ่มร่วมกับพอลิเมอร์ทั้งสามชนิด ได้แก่ โพรพอลิยูรีเทน ถูมือยาง และยางอิพอกซีไดซ์หลังจากบ่มด้วยจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 ที่เวลา 0 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ในอาหารเหลว MSM เปรียบเทียบกับชุดควบคุมแบบมีชีวิต นำมาทดสอบวัดค่าโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Bradford และวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้สารตั้งต้นของเอนไซม์ไลเปส คือ พารา-ไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตต ผลปรากฏว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในชุดทดสอบโพรพอลิยูรีเทนสามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้มากที่สุดที่สัปดาห์ที่ 2 วัดค่าได้ 0.018 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน เปรียบเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในชุดทดสอบถูมือยางและยางอิพอกซีไดซ์ซึ่งใช้เป็นวัสดุอ้างอิงในการทดลองนี้ พบว่าชุดทดสอบของถูมือยางวัดค่าได้มากที่สุดที่สัปดาห์ที่ 1 มีค่า 0.006 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และชุดทดสอบของยางอิพอกซีไดซ์วัดค่าได้มากที่สุดที่สัปดาห์ที่ 4 มีค่า 0.115 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในชุดทดสอบทั้งหมดนำมาเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในชุดควบคุมมีชีวิต วัดค่าได้มากที่สุดที่สัปดาห์ที่ 1 มีค่า 0.0126 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีนเปรียบเทียบกับชุดควบคุมมีชีวิตระยะเวลาการบ่ม 0 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ ในอาหารเหลว MSM โดยตัวเลขที่แสดงบนแท่งกราฟแสดงถึงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดในแต่ละชุดการทดสอบ

จากผลการทดลองข้างต้นสามารถวิเคราะห์ได้ว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 มีบทบาทในการย่อยสลายโพรพอลิยูรีเทนโดยใช้เอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส (ในการทดลองนี้ศึกษาเฉพาะบทบาทของเอนไซม์ไลเปส) แต่มีการย่อยสลายทางชีวภาพโดยใช้เอนไซม์ปริมาณต่ำมาก เนื่องจากข้อจำกัดทางกายภาพและทางเคมีของโพรพอลิยูรีเทนชนิดนี้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองการศึกษาโครงสร้างของโพรพอลิยูรีเทนที่เปลี่ยนแปลงหลังจากการทดสอบการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์กลุ่ม 4 ส่งผลให้ตำแหน่งพันธะยูรีเทนในโครงสร้างของโพรพอลิยูรีเทนชนิดนี้ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมไม่มีชีวิต (abiotic control) ดังแสดงในรูปที่ 8 สำหรับการศึกษเอนไซม์ไลเปสในชุดทดสอบที่ใช้วัสดุอ้างอิงและจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 พบว่าในชุดทดสอบถูมือยาง มีปริมาณเอนไซม์ไลเปสน้อยมากเนื่องจากเอนไซม์หลักที่มีบทบาทในการย่อยสลายยางธรรมชาติจากการศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่าเป็นเอนไซม์ Latex clearing protien (Lcp) หรือเอนไซม์ Rubber oxygenase (RoxA) ซึ่งมีบทบาทในการตัดพันธะที่ตำแหน่ง *cis*-1,4 double bond ภายในโครงสร้างของยางธรรมชาติ ส่วนค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในชุดทดสอบยางอิพอกซีไดซ์พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น เมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารตัวกลางบางชนิดที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายยางอิพอกซีไดซ์ ทำหน้าที่เป็นตัวเหนียวทำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไลเปส

มีการศึกษาเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลสเกี่ยวกับกระบวนการย่อยสลายพอลิยูรีเทนก่อนหน้านี้ เช่น การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอร์เรสโดยใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* และใช้ Impranil DLNTM เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำหรับจุลินทรีย์ และใช้สารตั้งต้นของเอนไซม์ คือ พารา-ไนโตรฟีนอลอะซีเตต วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอร์เรสได้ 45 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ภายในระยะเวลา 3-4 วันของการบ่ม (Rowe and Howard, 2002) การศึกษาเกี่ยวกับการย่อยสลายพอลิยูรีเทนโดยใช้พอลิยูรีเทนเหลว (Impranil DLN) เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์ โดยวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์เอสเทอร์เรสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายพอลิยูรีเทน พบเอนไซม์เอสเทอร์เรสปริมาณ 12 ยูนิต/มิลลิลิตรในส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากตัวเซลล์ภายหลังจากทดสอบการย่อยสลายเป็นเวลา 28 วัน (Shah *et al.*, 2008) และการศึกษาเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* เพื่อศึกษาการย่อยสลายพอลิยูรีเทนทางการค้า (Impranil DLNTM) หลังการย่อยสลายพบไดเอทิลีนไกลคอลซึ่งเป็นสารตัวกลางที่เกิดจากการย่อยสลาย Impranil DLNTM (Guatam and Bassi, 2007) ศึกษาโดยใช้เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้า (Nakajima-Kambe, 1999) จึงยืนยันได้ว่าเอนไซม์ไลเปสมีบทบาทการย่อยสลายพอลิยูรีเทน

เมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากการศึกษานี้กับค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพอลิยูรีเทนจากการศึกษาอื่นๆ พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่วัดได้จากส่วนของเหลวที่ปราศจากตัวเซลล์หลังจากบ่มร่วมกับโพรพอลิยูรีเทนเป็นเวลา 0 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ตรวจวัดได้น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่น เนื่องจากพื้นผิวของโพรพอลิยูรีเทนมีสมบัติที่ไม่เหมาะสมต่อการเกาะติดของจุลินทรีย์ ทำให้กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพโดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์เกิดขึ้นในปริมาณน้อยมาก โดยทั่วไปในกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพในกรณีที่จุลินทรีย์สามารถใช้วัสดุนั้นๆ เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ดี กลไกการเกาะติดจะเป็นกลไกแรกที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ เมื่อจุลินทรีย์เริ่มกระบวนการเกาะติดบนพื้นผิวของวัสดุแล้ว จุลินทรีย์จะปลดปล่อยเอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายออกมามากขึ้น ในกรณีที่จุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ สามารถหลั่งเอนไซม์ชนิดหลั่งออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายโครงสร้างของวัสดุให้เป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กและง่ายต่อการดูดซึมเข้าสู่ตัวเซลล์ได้มากขึ้นด้วย แต่ในกรณีที่จุลินทรีย์ไม่สามารถใช้วัสดุนั้นๆ เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพจึงเกิดขึ้นไม่ได้หรือเกิดขึ้นได้น้อยมาก ส่งผลให้ปริมาณเอนไซม์ที่ตรวจพบในส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์มีปริมาณที่น้อยตามไปด้วย



รูปที่ 15 ชิ้นถุงมือยาง ยางอีพอกไซด์ และโพลีอิมิดีในชุดควบคุม (a) และชุดทดสอบ (b) ที่สัปดาห์ที่ 4 ของการบ่มด้วยจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 ในอาหารเหลว MSM เมื่อจุ่มในสารละลาย Bradford เป็นเวลา 10 นาที

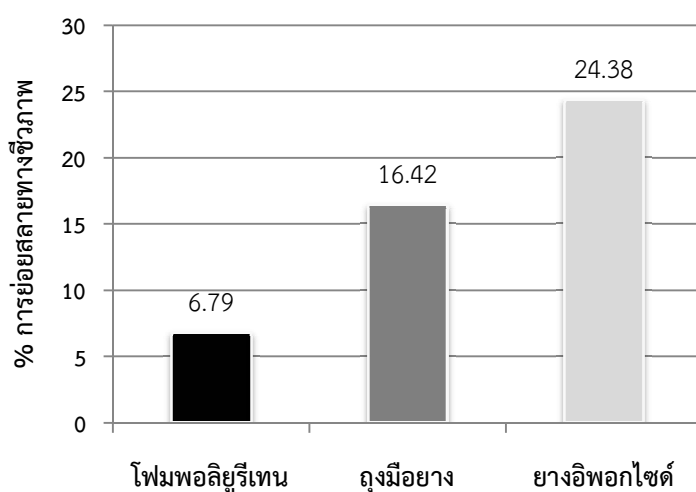
ชิ้นพอลิเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ โพลีอิมิดี ยางอีพอกไซด์ และถุงมือยางที่ สัปดาห์ที่ 4 ในชุดควบคุมและชุดทดสอบ เมื่อนำมาจุ่มในสารละลาย Bradford เป็นเวลา 10 นาที มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ในชุดทดสอบของถุงมือยางและยางอีพอกไซด์ที่มีเซลล์จุลินทรีย์เกาะ บนพื้นผิวอย่างหนาแน่น ภายหลังจากทำปฏิกิริยากับสารละลาย Bradford ปรากฏเป็นพื้นที่สี น้ำเงิน เข้มทั่วพื้นที่ผิว การปรากฏสีน้ำเงินเข้มของสารละลาย Bradford แสดงให้เห็นถึงปริมาณโปรตีน ทั้งหมด ในขณะที่โพลีอิมิดีไม่มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 15) เกาะติดบนผิวของจุลินทรีย์บนผิวของวัสดุจัดเป็นขั้นตอนแรกของกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพโดย จุลินทรีย์ และจุลินทรีย์เหล่านี้จะปล่อยเอนไซม์เพื่อย่อยสลายสารตั้งต้น ทำให้โครงสร้างของสารตั้งต้น เปลี่ยนไปและทำให้เกิดสารตัวกลางในน้ำเลี้ยงเซลล์

7. การวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

การวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปลดปล่อยจากกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ โดยใช้จุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 ทดสอบร่วมกับโพลีอิมิดีและวัสดุอ้างอิง (ถุงมือยางและยางอีพอกไซด์) ในอาหารเหลว MSM เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 35 องศาเซลเซียส) พบว่า ร้อยละของการย่อยสลายทางชีวภาพ (% biodegradation) ที่วัดได้จากการย่อยสลายโพลีอิมิดี คิดเป็นร้อยละ 6.79 เปรียบเทียบกับร้อยละของการย่อยสลายทางชีวภาพของวัสดุอ้างอิง ได้แก่ ถุงมือยาง และยางอีพอกไซด์ คิดเป็นร้อยละ 16.42 และ 24.38 ตามลำดับ (รูปที่ 16)

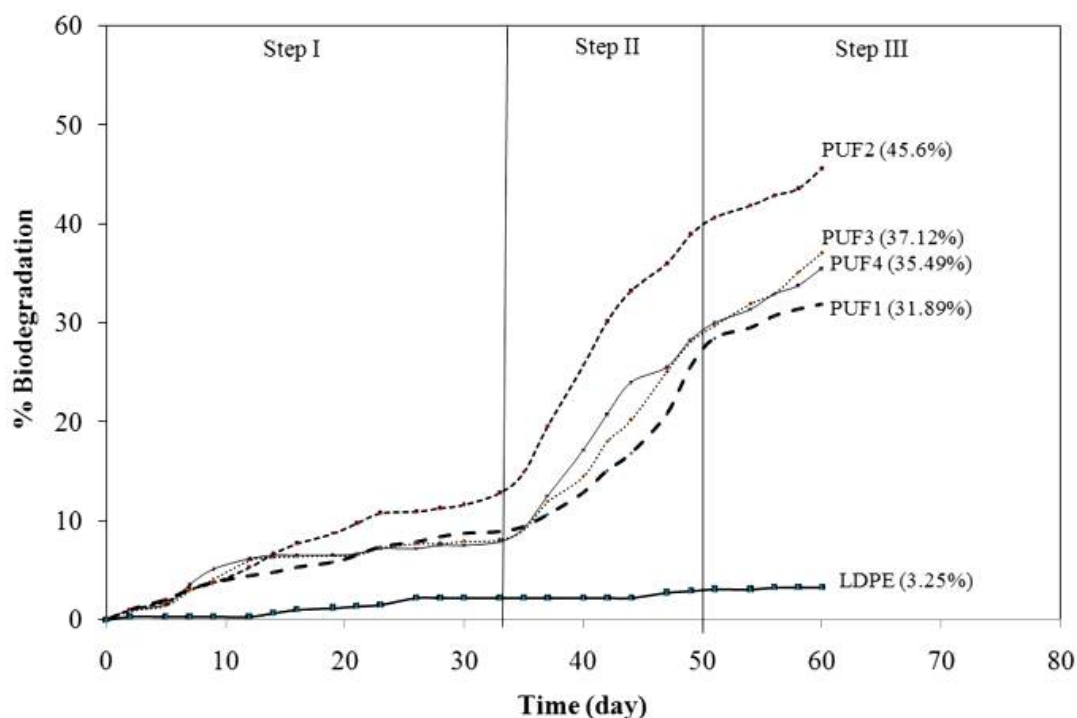
จากผลการทดลองนำมาวิเคราะห์ได้ว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย วัสดุที่ผลิตจากยางธรรมชาติได้หลากหลาย เมื่อพิจารณาการย่อยสลายทางชีวภาพของวัสดุอ้างอิงทั้งสองชนิด ยางอีพอกไซด์ที่มีลักษณะโครงสร้างใกล้เคียงกับยางธรรมชาติ *cis*-1,4 พอลิไอโซพรีนและมี โครงสร้างซับซ้อนน้อยที่สุด มีร้อยละของการย่อยสลายทางชีวภาพสูงที่สุด ส่วนวัสดุอ้างอิงอีกชนิด คือ ถุงมือยางที่ผ่านกระบวนการวัลคาไนเซชัน และมีพันธะไดซัลไฟด์ทำหน้าที่เชื่อมโยงภายใน

โครงสร้าง พบว่ามีร้อยละของการย่อยสลายทางชีวภาพได้ดีเป็นอันดับสอง และโคมพอลิยูรีเทนพบ ร้อยละการย่อยสลายทางชีวภาพต่ำที่สุด อาจเกิดจากลักษณะโครงสร้างทางเคมีของวัสดุ พื้นผิวของ วัสดุ การเกาะติดของจุลินทรีย์บนผิวของวัสดุ การตกค้างของสารเคมีที่เกิดจากกระบวนการเตรียม โฟมในห้องปฏิบัติการ เป็นต้น



รูปที่ 16 ร้อยละการย่อยสลายทางชีวภาพของโคมพอลิยูรีเทน (วัสดุทดสอบ) ถุงมีอยางและยาง อืพอกไชด์ (วัสดุอ้างอิง) หลังบ่มร่วมกับจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 ในอาหารเหลว MSM เป็นเวลา 28 วัน ที่ อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส)

เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Rattanapan *et al.* (2016) เกี่ยวกับร้อยละของการย่อย สลายทางชีวภาพของโคมพอลิยูรีเทนที่ผลิตจากยางธรรมชาติ เปรียบเทียบกับโคมพอลิยูรีเทนที่ผลิต จากยางธรรมชาติผสมกับพอลิคาร์โพรแลคโตนในอัตราส่วนต่างๆ โดยใช้กลุ่มจุลินทรีย์ธรรมชาติ (natural consortium) ที่ได้จากน้ำเสียของโรงงานยางพารา บ่มเป็นระยะเวลา 60 วัน ที่ อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส) (รูปที่ 17) พบว่าร้อยละของการย่อยสลายทางชีวภาพ ของ โคมพอลิยูรีเทนทุกชนิดที่ระยะเวลา 30 วัน มีร้อยละของการย่อยสลายทางชีวภาพไม่เกิน ร้อยละ 10 (Rattanapan *et al.*, 2016) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันกับร้อยละของการย่อยสลายทางชีวภาพ โดยจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 คิดเป็นร้อยละ 6.78 แต่เมื่อโคมพอลิยูรีเทนในการทดลองของ Rattanapan *et al.* (2016) ถูกบ่มเป็นระยะเวลานานขึ้นจนครบระยะเวลา 60 วันของการย่อยสลาย พบว่าโคม พอลิยูรีเทนที่ผลิตจากยางธรรมชาติมีร้อยละของการย่อยสลายทางชีวภาพต่ำที่สุด คิดเป็นร้อยละ 31.89 ในขณะที่โคมพอลิยูรีเทนที่ผลิตจากยางธรรมชาติและพอลิคาร์โพรแลคโตนในอัตราส่วน (70:30) มีร้อยละของการย่อยสลายทางชีวภาพสูงที่สุด คิดเป็นร้อยละ 45.6 โดยเปรียบเทียบกับวัสดุ ในชุดควบคุม (negative control) คือ พอลิเอทิลีนความหนาแน่นต่ำ (Low density polyethylene: LDPE) ปรากฏร้อยละของการย่อยสลายทางชีวภาพเพียงร้อยละ 3.25 ที่ระยะเวลา การทดสอบ 60 วัน



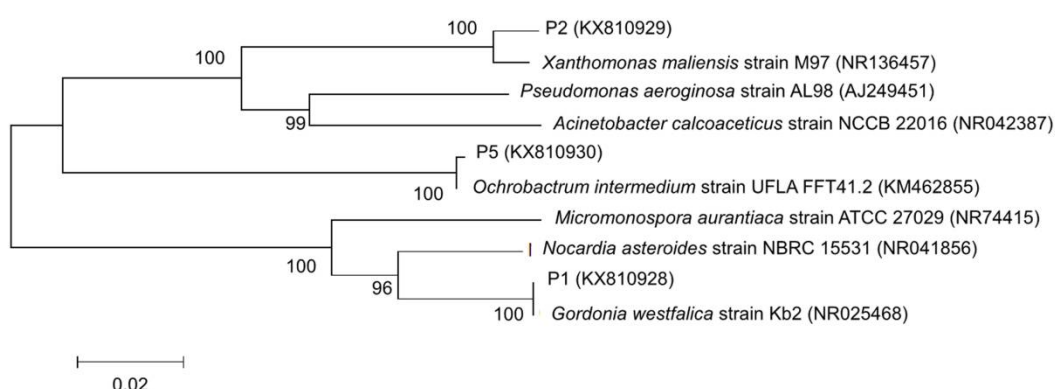
รูปที่ 17 ร้อยละของการย่อยสลายทางชีวภาพของโพลีเอทิลีนที่ผลิตจากยางธรรมชาติ (PUF1) ซึ่งเป็นโพลีเอทิลีนเดียวกับโพลีเอทิลีนที่ใช้ในการศึกษานี้ เปรียบเทียบกับโพลีเอทิลีนที่ผลิตจากยางธรรมชาติและพอลิคาร์โพรแลกโตนในอัตราส่วนต่างๆ ได้แก่ อัตราส่วน 1:0.5 (PUF2) อัตราส่วน 1:1 (PUF3) และอัตราส่วน 0.5:1 (PUF4) (Rattanapan *et al.*, 2016)

8. การบ่งชี้เอกลักษณ์ของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA

กลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้และใช้ในการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของโพลีเอทิลีนและวัสดุอ้างอิง (จุลินทรีย์กลุ่มที่ 4) ประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท P1 ไอโซเลท P2 และไอโซเลท P5 เมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ที่มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อแต่ละไอโซเลทมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกันในฐานข้อมูล National center for biotechnology information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLAST (blastn) เมื่อพิจารณา ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแต่ละไอโซเลท พบว่าไอโซเลท P1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Gordonia westfalica* strain Kb2 (99% similarity) เชื้อไอโซเลท P2 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Xanthomonas maliensis* strain M97 (99% similarity) และไอโซเลท P5 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Ochrobactrum intermedium* strain FLA FFT 41.2 (99% similarity) โดยความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้แสดงดังรูปที่ 18

จากการศึกษาก่อนหน้านี้มีรายงานเกี่ยวกับจีโนมและสปีชีส์ของเชื้อทุกไอโซเลทที่เป็นสมาชิกของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากการศึกษานี้ โดยทุกไอโซเลทมีการศึกษาเกี่ยวกับการย่อยสลายวัสดุที่ย่อยสลายยากในสิ่งแวดล้อมหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น *G. westfalica* มีรายงานว่า เป็นแอกซิโนไมยสีที่มีบทบาทในการย่อยสลายยางธรรมชาติได้ (Linos *et al.*, 2002) *Gordonia* sp.

JAAS1 สามารถย่อยสลาย chlorpyrifos ปริมาณ 110 มิลลิกรัม/ลิตร ภายใน 24 ชั่วโมง (Abraham *et al.*, 2013) *G. alkanivorans* CC-JG39 สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้ (Young *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการย่อยสลายทางธรรมชาติโดยใช้ *Xanthomonas* sp. strain 35Y เพื่อใช้เป็นต้นแบบจุลินทรีย์ในการศึกษาเอนไซม์ RoxA ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายทางธรรมชาติในแบคทีเรียแกรมลบ (Tsuchii and Takeda, 1990) และมีการศึกษาเกี่ยวกับ *Ochrobactrum lupini* เกี่ยวกับการย่อยสลายน้ำมันดิบในอาหารเหลวและดิน (Eraky *et al.*, 2015) มีการศึกษาการย่อยสลายนิโคตินโดยใช้เชื้อ *O. intermedium* DN2 พบว่าสามารถย่อยสลายนิโคตินได้ 95.55% ภายในเวลา 10 ชั่วโมง (Yuan *et al.*, 2006)



รูปที่ 18 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA ของเชื้อไอโซเลท P1 P2 และ P5 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้ออื่น ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้จากฐานข้อมูล NCBI แผนภาพแสดงความสัมพันธ์สร้างโดยวิธี neighbor-joining จากโปรแกรม MEGA ตัวเลขแสดงบนกิ่ง (% bootstrap) มาจากการคำนวณ 1,000 ซ้ำ

สรุปผลการทดลอง

กลุ่มจุลินทรีย์ผสมที่ใช้ในการศึกษาการย่อยสลายโพลีพอลิยูรีเทนที่ผลิตจากยางธรรมชาติ ถูกคัดแยกมาจากตัวอย่างดินและน้ำเสียที่คัดแยกจากโรงงานยางพาราในจังหวัดสงขลา โดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโพลีพอลิยูรีเทน (วัสดุทดสอบ) ง่ายมีอย่างและยางอีพอกไซด์ (วัสดุอ้างอิง) คือ จุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย 3 ไอโซเลท ได้แก่ *Gordonia westfalica* สายพันธุ์ P1 *Xanthomonas maliensis* สายพันธุ์ P2 และ *Ochrobactrum intermedium* สายพันธุ์ P5 และการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าจีโนส *Ochrobactrum* มีความสามารถในการย่อยสลายยางธรรมชาติเป็นครั้งแรก เมื่อศึกษาร้อยละของน้ำหนักแห้งของโพลีพอลิยูรีเทนที่หายไปเมื่อบ่มร่วมกับจุลินทรีย์กลุ่มนี้ คิดเป็นร้อยละ 5.32 ของน้ำหนักแห้งเริ่มต้น และเมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันภายในโครงสร้างของโพลีพอลิยูรีเทน พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถทำลายหมู่ฟังก์ชันหลักของโพลีพอลิยูรีเทน คือ หมู่เอสเทอร์คาร์บอนิล (ตำแหน่งเลขคลื่น 1700 เซนติเมตร⁻¹) ลดลงอย่างสังเกตเห็น นอกจากนี้จุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวสามารถย่อยสลายง่ายมีอย่างและยางอีพอกไซด์ที่ใช้เป็นวัสดุอ้างอิงในการศึกษานี้โดยกระบวนการเกาะติดบนผิวของวัสดุได้ดี แต่กลุ่มจุลินทรีย์นี้ไม่สามารถเกาะติดบนผิวของโพลีพอลิยูรีเทนได้ อาจเนื่องจากโครงสร้างทางกายภาพและโครงสร้างทางเคมีที่ไม่เหมาะสม หรือมีสารเคมีบางชนิดที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ตกค้างอยู่ในเนื้อโพลีเมอร์ เมื่อศึกษาค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากตัวเซลล์ (ยูนิต์/มิลลิกรัมโปรตีน) พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในชุดทดสอบโพลีพอลิยูรีเทนมีปริมาณต่ำมาก และเมื่อทดสอบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายโพลีพอลิยูรีเทนทางชีวเคมี พบว่าจุลินทรีย์ทั้งสามไอโซเลทสามารถผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโพลีพอลิยูรีเทนได้ การศึกษาร้อยละของการย่อยสลายทางชีวภาพในอาหารเหลว MSM ของยางอีพอกไซด์ > ง่ายมีอย่าง > โพลีพอลิยูรีเทน เมื่อบ่มร่วมกับจุลินทรีย์กลุ่มนี้เป็นเวลา 28 วัน จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่าจุลินทรีย์กลุ่มนี้มีความสามารถย่อยสลายวัสดุที่ผลิตจากยางธรรมชาติได้หลากหลาย แต่ร้อยละของการย่อยสลายทางชีวภาพและประสิทธิภาพของการย่อยสลายขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางกายภาพและโครงสร้างทางเคมีของวัสดุต่างๆ โครงสร้างทางเคมี และสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการผลิตโพลีพอลิยูรีเทนชนิดนี้เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลโดยตรงต่อกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพในการทดลองนี้

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ในหัวข้อ “การเตรียมและสมบัติของโฟมพอลิยูรีเทนที่มียางธรรมชาติเป็นส่วนประกอบ เพื่อการใช้งานด้านปูปลดปล่อยช้า” โดย น.ส. ศิววรรณ คงหนู ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีวัสดุ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มีจุดประสงค์มุ่งเน้นการผลิตโฟมพอลิยูรีเทนสูตรต่างๆ เพื่อใช้เป็นวัสดุสำหรับปลดปล่อยปุ๋ยทางการเกษตรในดินและน้ำ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นเฉพาะในส่วนของ การย่อยสลายทางชีวภาพของโฟมพอลิยูรีเทนที่ผลิตจากยางธรรมชาติ โดยเน้นการคัดแยกจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการย่อยสลายโฟมชนิดนี้ และนำจุลินทรีย์มาจัดกลุ่มเพื่อทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพในห้องทดลอง งานวิจัยที่ควรศึกษาต่อเนื่องจากงานวิจัยนี้เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าวัสดุโฟมพอลิยูรีเทนชนิดนี้จะไม่กลายเป็นสิ่งตกค้างในธรรมชาติต่อไปในอนาคต คือ ควรปรับปรุงลักษณะทางกายภาพของชิ้นโฟมเพื่อให้จุลินทรีย์สามารถเกาะติดบนผิวของโฟมได้ง่าย เป็นกระบวนการสำคัญในการย่อยสลายทางชีวภาพ หรืออาจเติมสารอาหารบางอย่างลงไปในช่วงตอน การผลิตโฟม เพื่อสนับสนุนการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และช่วยเหนี่ยวนำเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายพอลิยูรีเทนและยางธรรมชาติให้สามารถผลิตออกมามากขึ้น หรืออาจทดสอบการย่อยสลาย โฟมพอลิยูรีเทนร่วมกันระหว่างเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งเอนไซม์จากเชื้อราอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ การย่อยสลายโฟมชนิดนี้ได้ดีขึ้น รวมถึงการพัฒนาเทคนิคการจับกลุ่มเชื้อโดยอาจเริ่มจากการรวมเชื้อ ทุกไอโซเลทที่คัดแยกได้เป็นกลุ่มเชื้อเดียวกันและทดสอบย่อยสลายโฟมเปรียบเทียบกับชุดทดสอบอื่น ที่จับกลุ่มโดยตัดเชื้อออกทีละไอโซเลท และตรวจสอบสารตัวกลางที่เกิดขึ้นในแต่ละชุดทดสอบ เพื่อหาความสัมพันธ์ของบทบาทเชื้อแต่ละไอโซเลทในกลไกการย่อยสลายโฟมพอลิยูรีเทนและการเกิดสาร ตัวกลางแต่ละชนิด และควรทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของแต่ละไอโซเลทในกลุ่มของจุลินทรีย์ใน กลไกการย่อยสลายโฟมพอลิยูรีเทนเบื้องต้น อาจทำได้โดยการทดสอบแบบ cross-check โดยการฉีด เชื้อลงบนอาหารที่ผสมน้ำยางธรรมชาติกับพอลิยูรีเทนเหลวทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอนแก่จุลินทรีย์ และดูการเจริญของเชื้อแต่ละไอโซเลท ทั้งนี้เพื่อให้ได้กลุ่มเชื้อที่สนับสนุนการทำงานและมีโอกาสทำให ร้อยละของการย่อยสลายทางชีวภาพเกิดได้เร็วขึ้น ควบคู่กับการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพใน สภาวะจริงร่วมกับการใช้งานวัสดุด้านปูปลดปล่อยช้า ซึ่งต้องใช้เวลาานานมากในการทดสอบและ ไม่ได้อยู่ในขอบเขตของการทดลองในครั้งนี้

บรรณานุกรม

- ชัยวัฒน์ เจนวาณิชย์. 2526. โพลีเมอร์เชิงพาณิชย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์
- Abraham, J., Shanker A. and Silambarasan, S. 2013. Role of *Gordonia* sp JAAS1 in biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol. Letters in Applied Microbiology. 57:510-516.
- Akutsu, Y., Nakajima-Kambe, T., Nomura, N. and Nakahara, T. 1998. Purification and properties of a polyester polyurethane-degrading enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35. Applied and Environmental Microbiology. 64:62-67.
- Bayer, O. 1947. Polyurethanes. Modern Plastics. 24: 149-152.
- Bode, H. B., Kerkhoff, K. and Jendrossek, D. 2001. Bacterial degradation of natural and synthetic rubber. Biomacromolecules. 2: 295-303.
- Bornscheuer, U. T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. FEMS Microbiology Reviews. 26(1): 73-81.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of portien-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.
- Crabbe, J. R., Campbell, J. R., Thomson, L., Walz, S. L. and Schultz, W. W. 1994. Biodegradation of a colloidal ester-based polyurethane by soil fungi. International Biodeterioration & Biodegradation. 33: 103-113.
- Eraky, M., Abou-Shanab, R. A. I., Salem, A. M. and Abdelgaffer, A. R. B. 2015. Petroleum hydrocarbon degradation potential of *Ochrobactrum lupini* isolated from BTEX enrichment soil. International Journal of Environmental. 4:204-209.
- Evans, D. M. and Levisohn, I. 1968. Biodeterioration of polyester-based polyurethane. International Biodeterioration Bulletin. 4: 89-92.
- Fritz, H. G., Seidenstucker, T., Bolz, U., Juza, M., Schroeter, J. and Enders, H. J. 1994. Study on production of thermoplastics and fibers based mainly on biological materials. In: Strategic analysis in science and technology. Luxembourg., Vol. 392.

- Gautam, R. and Bassi, A. S. 2007. *Candida rugosa* lipase-catalyzed polyurethane degradation in aqueous medium. *Biotechnology Letters*. 29:1081-1086.
- Griffin, G. J. L. 1980. Synthetic polymers and the living environment. *Pure and Applied Chemistry*. 52: 389-407.
- Guo, W., Tao, J., Yang, C., Song, C., Geng, W., Li, Q., Wang, Y., Kong, M. and Wang, S. 2012. Introduction of environmentally degradation parameters to evaluate the biodegradability of biodegradable polymers. *PLOS ONE*. 7:1-6.
- Hamzah, R., Bakar, M. A., Khairuddean, M., Mohammed, I. A. and Adnan, R. 2012. A structural study of epoxidized natural rubber (ENR-50) and its cyclic dithiocarbonate derivative using NMR spectroscopy techniques. *Molecules*. 17:10974-10993.
- Helistö, P. and Korpela, T. 1998. Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the paranitrophenyl alkanoate esters method. *Enzyme and Microbial Technology*. 23: 113-117.
- Hole, L. G. 1972. Artificial leathers. *Report on the Progress of Applied Chemistry*. 57: 181-206.
- Howard, G. T. 2012. Chapter 14 Polyurethane Biodegradation. In: *Microbial Degradation of Xenobiotics*. ©Spring-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 371-394.
- Howard, G. T. and Blake, R. C. 1999. Growth of *Pseudomonas fluorescens* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-protease enzyme. *International Biodeterioration & Biodegradation*.. 42: 213-220.
- Howard, G. T., Norton, W. N. and Burks, T. 2012. Growth of *Acinetobacter gernerii* P7 on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase enzyme. *Biodegradation*. 23: 561-573.
- Howard, G. T., Ruiz, C. and Hilliard, N. P. 1999. Growth of *Pseudomonas chlororaphis* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-esterase enzyme. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 43: 7-12.

- Huei Peng, Y., Shih, Y. H., Lai, Y. C., Liu, Y. Z., Liu, Y. T. and Lin, N. C. 2014. Degradation of polyurethane by bacterium isolated from soil and assessment of polyurethanolytic activity of a *Pseudomonas putida* strain. *Environmental Science and Pollution Research*. 21: 9529-9537.
- Jayasekara, R., Harding, I., Bowater, I. and Lonergan, G. 2005. Biodegradability of a selected range of polymers and polymer blends and standard methods for assessment of biodegradation. *Journal of Polymers and the Environment*. 13: 231-251.
- Jendrossek, D., Tomasi, G. and Kroppenstedt, R. M. 1997. Bacterial degradation of natural rubber: a privilege of actinomycetes?. *FEMS Microbiology Letters*. 150: 179-188.
- Kanavel, G. A., Koons P. A. and Lauer R. E. 1966. Fungus resistance of millable urethanes. *Rubber World*. 154: 80-86.
- Kaplan, A. M., Darby, R. T., Greenberger, M. and Rodgers, M. R. 1968. Microbial deterioration of polyurethane systems. *Developments in Industrial Microbiology*. 82: 362-371.
- Kay, M. J., McCabe, R. W. and Morton, L. H. G. 1993. Chemical and physical changes occurring in polyester polyurethane during biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 31: 209-225.
- Kay, M. J., Morton, L. H. G. and Prince, E. L. 1991. Bacterial degradation of polyester polyurethane. *International Biodeterioration. Bulletin*. 27: 205-222.
- Kirikou, J. and Briassoulis, D. 2007. Biodegradation of agricultural plastic films: a critical review. *Journal of Polymers and the Environment*. 15: 125-150.
- Kulkarni, N. and Gadre, R. V. 2002. Production and properties of alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 28: 344-348.
- Leja, K. and Lewandowicz, G. 2010. Polymer biodegradation and biodegradable polymers – a review. *Polish Journal of Environmental Studies*. 19: 255-266.

- Linos, A., Berakaa, M. M., Steinbüchel, A., Kim, K. K., Spröer, C. and Kroppenstedt, R. M. 2002. *Gordonia westfalica* sp. nov., a novel rubber-degrading actinomycete. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52:1133-1139.
- Linos, A., Berekaa, M. M., Reichelt, R., Keller, U., Schmitt, J., Flemming, H. C., Kroppenstedt, R. M. and Steinbüchel, A. 2000. Biodegradation of *cis*-1,4-Polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed surface analysis. Applied and Environmental Microbiology. 66:1639–1645.
- Lopes, D. B., Fraga, L. P., Fleuri, L. F. and Macedo, G. A. 2011. Lipase and esterase – to what extent can this classification be applied accurately?. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 31(3): 608-613.
- Mathur, G. and Prasad, R. 2012. Degradation of polyurethane by *Aspergillus flavus* (ITCC 6051) isolated from soil. Applied Biochemistry and Biotechnology. 167: 1595-1602.
- Müller, R. J. 2003. Biodegradability of Polymers: Regulations and Methods for Testing, in Biopolymers Online, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Nakajima-Kambe, T., Shigeno-Akutsu, Y., Nomura, N., Onuma, F. and Nakahara, T. 1995. Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. FEMS Microbiology Letters. 129: 39-42.
- Nakajima-Kambe, T., Onuma, F., Akutsu, Y. and Nakahara, T. 1997. Determination of the polyester polyurethane breakdown products and distribution of the polyurethane degrading enzyme of *Comamonas acidovorans* strain TB-35. Journal of Fermentation and Bioengineering. 83:456-460.
- Nakajima-Kambe, T., Shigeno-Akutsu, Y., Nomura, N., Onuma, F. and Nakahara, T. 1999. Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. Applied Microbiology and Biotechnology. 51: 134-140.

- Nishida, H. and Tokiwa, Y. 1993. Distribution of poly(beta-hydroxy-butyrate) and poly(carprolactone) aerobic degrading microorganisms in different environments. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. 1: 227-231.
- Pan, L., Gu, J. G., Yin, B. and Cheng, S. P. 2009. Contribution to deterioration of polymeric materials by a slow-growing bacterium *Nocardia corynebacterioides*. *International Biodeterioration Biodegradation*. 24-29.
- Pathirana, R. A. and Seal, K. J. 1983. *Gliocladium roseum* (Bainier) a potential biodeteriogen of polyester polyurethane elastomers. *International Biodeterioration*. 5: 679-689.
- Phinyocheep, P., Phetphaisit, C. W., Derouet, D., Campistron, I. and Brosse, J. C. 2004. Chemical degradation of epoxidized natural rubber using periodic acid: preparation of epoxidized liquid natural rubber. *Journal of Applied Polymer Science*. 95: 6-15.
- Rattanapan, S. Pasetto, P., Pilard, J. F. and Tanrattanakul, V. 2016. Preparation and properties of bio-based polyurethane foams from natural rubber and polycaprolactone diol. *Journal of Polymer Research*. 23: 1-12.
- Rose, K. and Steinbüchel, A. 2005. Biodegradation of natural rubber and related compounds: recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 2803-2812.
- Rowe, L. and Howard, G. T. 2002. Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 50: 33-40.
- Roy, R. V., Das, M., Banerjee, R. and Bhowmick, A. K. 2006. Comparative studies on crosslinked and uncrosslinked natural rubber biodegradation by *Pseudomonas* sp. *Bioresource Technology*. 97:2485-2488.
- Russell, R. J., Huang, J., Anand, P., Kucera, K., Sandoval, G. A., Dantzler, W. K., Hickman, D., Jee, J., Kimovec, M. F., Koppstein, D., Marks, H. D., Mittermiller, A. P., Nunez, J. S., Santiago, M., Townes, A. M., Vishnevetsky, M., Williams, E. N., Vargas, N. P. M., Boulanger, A. L., Slack, B. C. and Strobel, A. S. 2011. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(17): 6076-6084.

- Santerre, J. P., Labow, R. S., Duguat, D. G., Erfle, D. and Adams, G. A. 1994. Biodegradation evaluation of polyether and polyester-urethanes with oxidative and hydrolytic enzymes. *Journal of Biomedical Materials Research*. 28: 1187-1199.
- Schnabel, W. 1981. Principles and potential applications. In: *Polymer degradation*. Macmillan Publishing Co. Inc, New York. Pp 179-215.
- Shah, A. A., Hasan, F., Akhter, I. J., Hameed, A. and Ahmed, S. 2008. Degradation of polyurethane by novel bacterial consortium isolated from soil. *Annals of Microbiology*. 58(3): 381-386.
- Shah, A. A., Hasan, F., Shah, Z., Mutiullah and Hameed, A., 2012. Degradation of polyisoprene rubber by newly isolated *Bacillus* sp. AF-666 from soil. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 48: 45-50.
- Shah, Z., Krumholz, L., Aktas, F. D., Hasan, F., Khattak, M. and Shah, A. A. 2013. Degradation of polyester polyurethane by a newly isolated soil bacterium, *Bacillus subtilis* strain MZA-75. *Biodegradation*. 24: 865-877.
- Shimao, M. 2001. Biodegradation of plastics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 242-247. Structure-biodegradability relationships of polymeric materials. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. 1: 1-20.
- Trevino, L. A., Garcia, G., Tellez, V. A., Herrera, R. R. and Aguilar, N. C. 2011. Polyurethane foam as substrate for fungal strains. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2: 52-58.
- Tsuchii, A. and Takeda, K. 1990. Rubber-degrading enzyme from a bacterial culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 56:269-274.
- Tsuchii, A., Suzuki, T. and Takeda, K. 1985. Microbial degradation of natural rubber vulcanizates. *Applied and Environmental Microbiology*. 50: 965-970.
- Warneke, S., Arenskotter, M., Tenberge, K. B. and Steinbuchel, A. 2007. Bacterial degradation of poly(trans-1,4-isoprene)(gutta percha). *Microbiology*. 153: 347-356.

- Winkler, U. K. and Stuckmann, M. 1979. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*. 138: 663-670.
- Young, C. C., Lin, T. C., Yeh, M. S., Shen, F. T. and Chang, J. S. 2005. Identification and kinetic characteristics of an indigenous diesel-degrading *Gordonia alkanivorans* strain. *World Journal of Microbiology Biotechnology*. 21: 1409-1414.
- Yuan, Y. J., Lu, Z. X., Huang, L. J., Bie, X. M., Lü, F. X. and Li, Y. 2006. Optimization of a medium for enhancing nicotine biodegradation by *Ochrobactrum intermedium* DN2. *Journal of Applied Microbiology*. 101: 691-697.
- Zafar, U., Houlden, A. and Robson, G. D. 2013. Fungal communities associated with the biodegradation of polyester polyurethane buried under compost at different temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*. 79: 7313-7324.

ภาคผนวก

Hosted by:



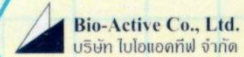
Sponsored by:



SEPTEMBER 29-30

IBSC 2014

The International Bioscience Conference
PHUKET THAILAND



The International
Bioscience Conference and
the 5th Joint International
PSU-UNS Bioscience
Conference 2014

ACHIEVING SUSTAINABILITY
THROUGH INTEGRATED SCIENCES

29-30 September 2014
PHUKET GRACELAND RESORT & SPA, Phuket, Thailand



The investigation of biodegradation of polyurethane made from polylactic acid and natural rubber

Vilasinee Akkharabunditsakul¹, Kamontam Umsakul^{2,*}

¹*Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai district, Songkhla province, 90112.*

²*Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai district, Songkhla province, 90112.*

**Corresponding author: vilasinee.akk@gmail.com*

Abstract

Biodegradation is one of the effective methods that can reduce many kinds of pollutions in the environments. Soils are the plentiful microorganisms source. Especially, the rubber contaminated soils were collected and screened to isolate bacteria which can degrade the polyurethane (PUR) film that made from polylactic acid (PLA) and natural rubber (NR). NR-degrading bacteria were isolated on Minimal Salts Medium (MSM) supplemented latex plates and rubber gloves degradation in MSM broth. The best isolates of rubber glove degradation are NR1 and NR2 because each isolate can decrease weight loss of gloves highly about 10% after incubation in MSM broth for 30 days. Whereas, PLA-degrading bacteria were screened on PLA-emulsified agar by clear zone method. Two inoculums were investigated the PUR biodegradation in liquid medium at 30^oC. The mixed culture is the NR-degrading bacteria and PLA-degrading bacterium were used as inoculum. The other one is natural consortium from soil. The results showed the colonies on the films incubated with both of inoculums and pH value of mixed culture and consortia had changed from initial pH (pH 7.0) into 6.38 and 5.47, respectively after 50 days of incubation. While the weight loss decreased slightly. These results suggest that the PUR film can be attached by microorganisms on the surface. This is the initial mechanism of synthetic polymer biodegradation.

Keywords: polyurethane, biodegradation, natural rubber, polylactic acid, microorganisms

Int'l Conference Proceedings

4th International Conference on Image Processing, Production and Computer Science (ICIPCS'16)
International Conference on Substantial Environmental Engineering and Renewable Energy (SEERE-2016)
International Conference on Innovations in Civil and Structural Engineering (ICICSE'16)
International Conference on "Modern Trends in Engineering and Technology" (MTET-16)
3rd International Conference on Civil, Biological and Environmental Engineering (CBEE-2016)
&
International Conference on Research & Innovation in Food, Agriculture and Biological Sciences (RIFABS-16)



Dec. 12-13, 2016 Phuket (Thailand)

Editors:
Prof. HASSINI Nouredine
Prof. Dr. Valentina Mihaela Pomazan

ISBN : 978-93-84468-85-9

ORGANISED BY :



Biodegradation of Synthetic Rubbers by a Mixed Culture Isolated from Various Rubber Factory Soils in Songkhla, Thailand

Vilasinee Akkharabunditsakul, Varaporn Tanrattanakul, Kamontam Umsakul

Abstract—Mixed cultures of rubber degrading bacteria were isolated from soils of rubber factories in Songkhla province, Thailand. Mixed culture B could utilize latex as the sole carbon source on agar plate and over 30 days, a maximum of 7.38 % and 7.78 % weight loss was obtained respectively utilizing rubber gloves and polyurethane foam made from natural rubber. The FT-IR results confirmed the reduction that associated with double bonds in *cis*-1,4-polyisoprene, CH₂ and CH₃ in aliphatic compounds. The formation of aldehyde groups increased as an intermediate during rubber biodegradation. Moreover, the urethane bond in polyurethane foam also was broken down by microbial enzymes. The Mixed culture B was then identified to Gram positive bacterium (B1) and Gram negative bacteria (B2 and B3). All the results in this study have been promising an alternative choice to eliminate the solid waste of rubber synthetic materials.

Keywords—Biodegradation, synthetic rubber, mixed culture.

I. INTRODUCTION

Natural rubber in latex form is a biopolymer consisting of isoprene units in *cis*-configuration. The *cis*-polyisoprene has been found in over 2,000 species of higher plants and fungi [1]. “*Hevea brasiliensis*” is a typical example of natural rubber producing plants which produce *cis*-1,4-polyisoprene. Rubber has high elasticity then it was used globally as a raw material for many rubber products such as belts, gaskets, matting, flooring, gloves, rubber bands, erasers, tires, etc [2]. The total rubber world consumption is estimated to be 26.8 million metric tons including 12.3 tons of natural rubber products and 14.5 million tons of synthetic rubber in 2015. All rubber products have become a huge problem with solid wastes accumulating in the environment causing severe pollution because of improper recycling management. Biodegradation of polymeric materials has been studied and this is proven to be eco-friendly because of its non-toxic end products such as CO₂, H₂O [3].

There are many reports of rubber degradation by various microorganisms e.g. bacteria, fungi and actinomycetes. The carbon atoms in *cis*-1,4-polyisoprene backbone can be utilized as the sole carbon and energy source for these microorganisms [4], [5].

In the environment, many kinds of microorganisms are associated in the form of consortia. Previous studies have shown that the microbial consortia are able to degrade the polymeric compounds and utilize different intermediates during each step of the degradation process [6], [7]. However, all strains of microorganisms in consortia cannot be cultured on medium. This is a limitation of using consortia as an inoculum for biodegrading solid waste disposals.

Thus, this study aims to isolate a culturable mixed culture to use as an effective inoculum to degrade the rubber materials including rubber gloves and polyurethane foam made from natural rubber.

II. MATERIALS AND METHODS

A. Materials

Soil samples were collected from rubber factories in Songkhla, Thailand. Rubber gloves were purchased from Sri Trang Agro-Industry Public Company Limited, Songkhla, Thailand and polyurethane foam (PU foam) obtained from Department of Materials Science and Technology, Prince of Songkla University, Hatyai, Thailand. Luria-Bertani agar (LB agar), Plate count agar (PCA) was purchased from Sigma-Aldrich. Mineral salts medium (MSM) containing as followed: Na₂HPO₄ 9 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, NH₄NO₃ 1 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L, CaCl₂·2H₂O 0.02 g/L, Fe(III)[NH₄] citrate 0.0012 g/L supplemented with natural rubber latex 0.6% (v/v) [8].

B. Screening of Rubber Degrading Bacteria

Twenty five grams of soil sample were incubated in 225 mL of MSM broth supplemented with 0.6% (v/v) natural rubber latex (NRL) at 30 °C, 150 rpm for 30 days. 25 mL of culture broth was then transferred to a new sterile flask containing fresh MSM+NRL, and after shaking incubated for 15 days in the same conditions as described before. After 15 days, the culture was enriched again. Culture broth was then diluted in 0.85% NaCl solution and spread on PCA and MSM+NRL plates according to standard method [9]. Different colonies on

MSM+NRL plates were picked and re-streaked for single colonies, and 3 different colonies were grouped randomly as mixed cultures.

C. Biodegradation of Rubber Materials by Mixed Cultures

Each mixed culture containing equal amounts of each isolate was used as an inoculum (10% v/v) in a shake flask containing MSM and 0.1% (w/v) polymer samples (rubber glove, PU foam). All tested flasks were incubated at 30 °C, 150 rpm for 30 days.

D. Weight Loss of Polymer Materials

After 30 days of incubation, polymer samples were filtrated by Whatman No.1 filter paper. The dry weight of polymers was determined and the percentage weight loss was calculated according to the following equation.

$$\% \text{ weight loss} = \frac{\text{original weight (g)} - \text{remaining weight (g)}}{\text{original weight (g)}} \times 100$$

E. Viable Cells Count

The culture media after incubation with the different polymers were diluted and spread on PCA plates. Numbers of colonies were counted and were recorded as CFU/mL.

F. Determination of Rubber Degradation by FT-IR Analysis

The pieces of rubber glove and PU foam in treated and untreated shake flasks after 30 days of incubation with the mixed culture were taken for FT-IR analysis. The sample pieces were washed with distilled water 2-3 times and dried before analysis. The transmittance spectra were detected in the IR range from 4000 to 400 nm by ATR-FTIR spectrometer, Bruker Tensor 27.

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Screening of Rubber Degrading Bacteria and Mixed Cultures

The soil samples provided 9 isolates of rubber degrading bacteria on MSM+NRL plates. Three different isolates were picked and grouped to use as the mixed cultures A, B and C. The visual observation of polymers in untreated and those treated with those mixed cultures is presented in Fig. 1. For the rubber glove pieces the color surface changes in the treated samples were clearly observed due to microbial pigment production see Fig. 1 (a-c) whereas, PU foam's surface showed only slightly changes see Fig. 1 (e-g) when compared with control pieces Fig. 1 (d and h). The physical changes, for example, color and shape could be explained in term of microbial colonization and degradation. The steps of biodegradation of any polymer usually start with the microbial attachment on the surface. Then, the microorganisms release some involved degrading enzymes and the long polymer chains can be degraded into shorter chains, dimers and

monomers. After that, those intermediates are then absorbed into cells and are utilized as carbon and energy sources. The end products from mineralization are CO₂, H₂O and CH₄ [3].

B. Weight Loss of Polymer Measurement

The results of weight loss after incubation with the mixed cultures for 30 days are shown in TABLE I. The Mixed culture B could effectively reduce the weight of both rubber glove and PU foam revealing about 7.38% and 7.78% weight loss, respectively, whereas the Mixed culture A could degrade only rubber glove. Rubber glove treated with the Mixed culture A showed about 17.06 % of weight loss. This culture gave the highest percentage of rubber glove weight loss. In contrast, the Mixed cultures B and C could degrade both of the rubber substrates. In this study, we aim to isolate a group of mixed culture which is able to degrade various types of rubber materials, therefore the Mixed culture B was considered as the most appropriate representative for using in the next experiments. The basic Gram staining indicated that the Mixed culture B contained a Gram positive rod, non-spore forming (isolate B1), a Gram negative rod (isolate B2), and a Gram negative short rod (isolate B3).

TABLE I
THE PERCENTAGES OF WEIGHT LOSS OF RUBBER GLOVE AND PU FOAM AFTER TREATED WITH THREE MIXED CULTURES AT 30 °C, 150 RPM FOR 30 DAYS

Mixed culture	% Weight loss of polymer	
	Rubber glove	PU foam
A	17.06	0.00
B	7.38	7.78
C	8.29	2.02

C. Viable Cells Count

The viable cells count is presented in TABLE II. The initial microbial population was 1.5×10^7 CFU/mL. After 30 days of incubation, the numbers of viable cells of each isolate decreased significantly. These results could be explained in that bacteria were able to attach on the material's surface, so that the available cells in culture broth then decreased. Because for a long period of incubation in a closed system some intermediates during biodegradation were released into the culture broth, this may have caused undesirable conditions for bacterial growth. The cell viability is also dependent on the ability of each isolate to utilize specific materials as a carbon and energy source as seen in all tested PU foam flasks thus the survival of cells was very low. Reference [10] explains about additives addition, chemical structure and how the material surface are all important factors to reducing the effects of biodegradation.

D. Determination of Structural Changes Using FT-IR Analysis

FT-IR analysis was used to determine the change of functional groups of polymer structures. The new formation peaks or disappeared peaks were detected. These changes in

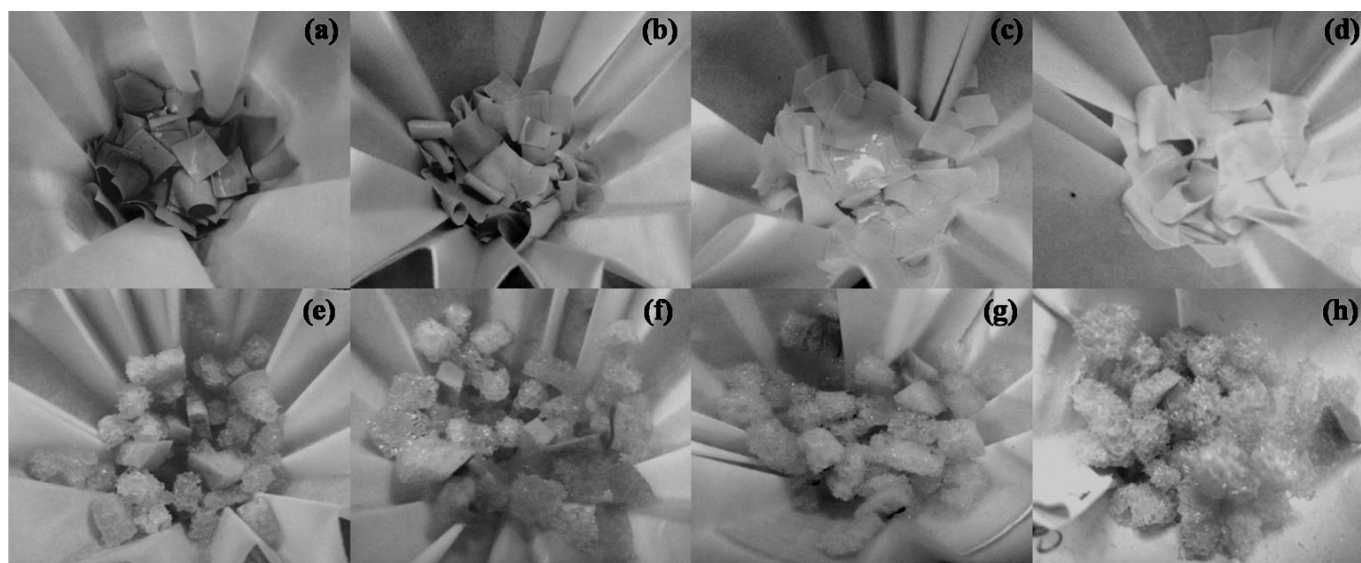


Fig. 1 Visual observation of rubber glove (a-d) and PU foam (e-h) treated with the Mixed culture A (a, e), the Mixed culture B (b, f), Mixed culture C (c, g) and abiotic control (d, h) at 30 °C, 150 rpm for 30 days of incubation.

structure are a useful method to confirm the biodegradability of materials. The results of FT-IR spectra showed the changes of rubber glove structure after being incubated with the Mixed culture B in Fig. 2. The wavenumber in the range of 1660 cm^{-1} indicated the stronger formation of aldehyde groups in treated sample than in the control [11]. This range also overlapped the wavenumbers at 1652 and 1543 cm^{-1} which were identified as the protein regions with amide I and II according to microbial cell components on material's surface because of microbial attachment [12]. Moreover, the new unidentified peak in the range of $1000\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ was found after treated with the Mixed culture B. A broadening signal of the range at $1300\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ of treated sample was lower than that of the control which was identified as $\delta(\text{CH}_x)$ deformation vibrations and the decrease of CH_2 and CH_3 in aliphatic compounds considerably [13]. In addition, a peak at 835 cm^{-1} referring to double bonds in *cis*-1,4-polyisoprene has slightly changed. The mechanism involved in the rubber biodegradation may be the oxidative cleavage, which is indicated as the reduction of double bond character and the presence of aldehyde groups and the formation of acids as intermediates [14]. In Gram positive and Gram negative bacteria, they are able to utilize different key enzymes of oxygenases in rubber degradation but can also release similar intermediates during biodegradation containing aldehyde and keto groups [13].

In addition, the degradation of the treated and untreated PU foams was analyzed by FT-IR. In the treated sample, IR spectra mostly overlapped with the IR spectra of control, but at the wavenumber of urethane bond ($\text{R-COONH-R}'$), there was a slight decrease at the wavenumbers 1720 and 1660 cm^{-1} referring to ester carbonyl group (C=O) and urethane (NH) in Fig. 3 [15]. The urethane bond in polyurethane foam may be broken down due to the microbial enzymes, whereas the selected microorganisms could not degrade the rubber structure which is used as a raw material in PU foam

production. Several previous studies have been reported that the polyurethanases which are a group of hydrolases playing an important role in cleaving the ester or peptide bonds in PU structure [13] but the PU foam may have some limitations about its chemical structure and surface characteristic which may affect the capacity of microorganisms to biodegrade.

TABLE II
NUMBERS OF VIABLE CELLS COUNT OF EACH MIXED CULTURE (CFU/ML)
AFTER 30 DAYS OF INCUBATION WITH RUBBER GLOVE AND PU FOAM
AT 30 °C, 150 RPM

Mixed culture	Isolates	Viable cells (CFU/mL)	
		Rubber Glove	PU foam
A	A1	2.6×10^6	2.8×10^4
	A2	1.5×10^6	8.0×10^4
	A3	1.0×10^4	1.0×10^4
B	B1	1.7×10^5	1.0×10^5
	B2	2.8×10^7	9.0×10^4
	B3	2.5×10^8	1.5×10^6
C	C1	1.0×10^3	1.1×10^2
	C2	6.0×10^8	2.5×10^8
	C3	1.6×10^2	1.0×10^2

IV. CONCLUSIONS

The objective of this study was to isolate a culturable mixed culture from soils in rubber factories in Songkhla province, Thailand capable of degrading two different kinds of synthetic rubber materials namely rubber gloves and PU foam. Nine selected isolates were grouped as the three mixed cultures and then tested for rubber biodegradability in liquid medium for 30 days. Weight loss was measured to identify the mixed culture which had the capacity to maximize the weight loss of both rubber materials. The Mixed culture B containing isolate B1 (Gram positive rod non-spore forming), B2 (Gram negative rod) and B3 (Gram negative short rod) gave between 7 and 8% weight loss for both the rubber gloves and the PU foam.

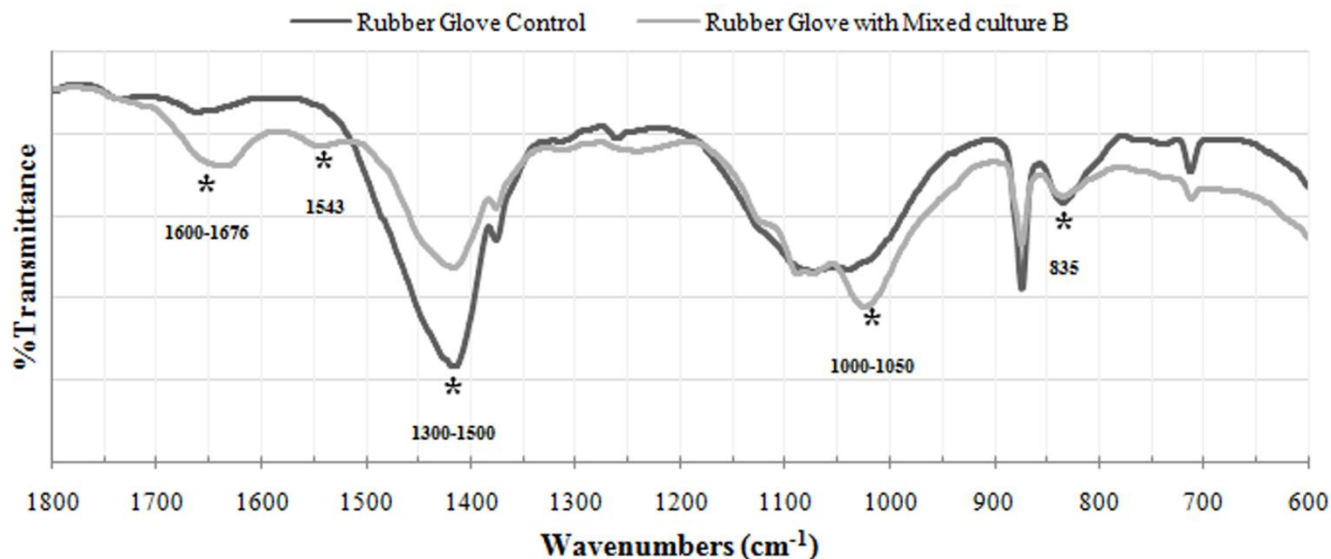


Fig. 2 FT-IR spectra of untreated and treated rubber gloves with the Mixed culture B at 30 °C, 150 rpm for 30 days

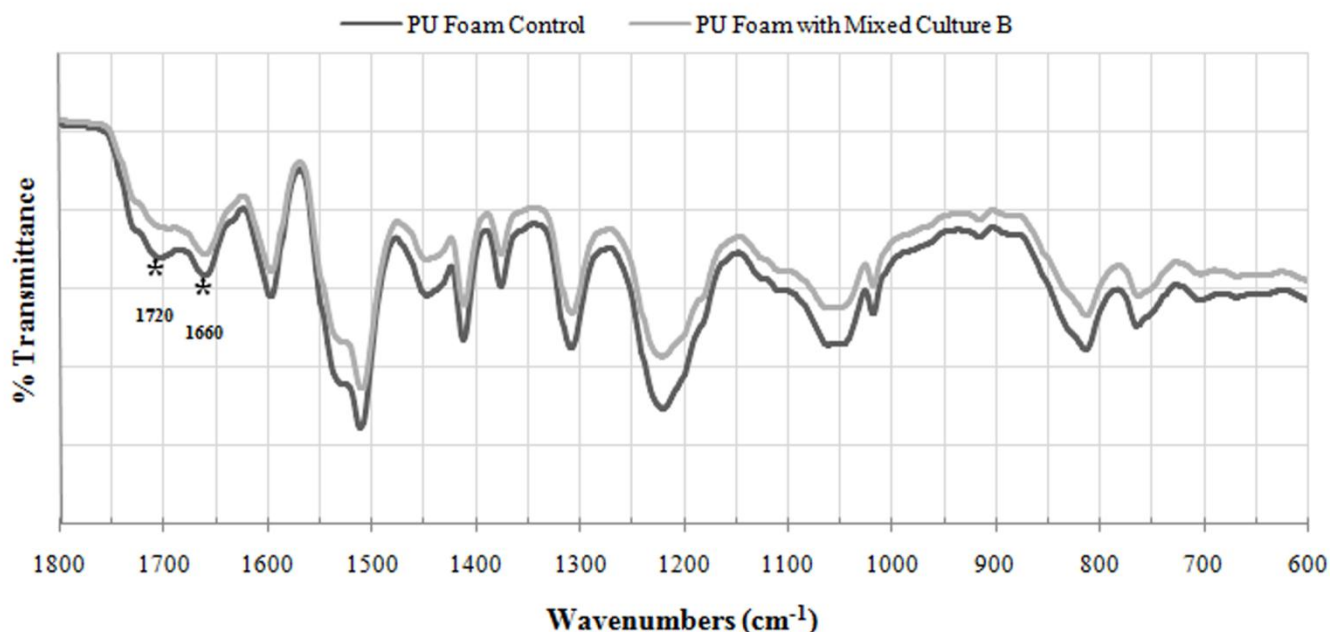


Fig. 3. FT-IR spectra of untreated and treated PU foam with the Mixed culture B at 30 °C, 150 rpm for 30 days

FT-IR analysis confirmed that the Mixed culture B was able to degrade both the rubber gloves and the PU foam in 30 days of incubation. These mixed cultures should be studied further for their ability to be utilized with the other rubber waste products.

ACKNOWLEDGMENT

We would like to gratefully thank the Department of Materials Science and Technology, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand for supplying the PU foam and for advising on FT-IR analysis. The work was financially

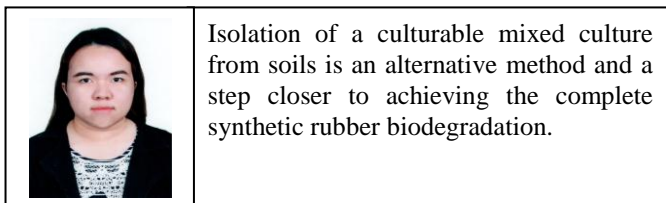
supported by the Department of Microbiology and graduate school of Prince of Songkla University. Finally regarding the English language version we really appreciate the help and advice of Mr. Christopher Howell.

REFERENCES

[1] T. Koyama, A. Steinbüchel, "Chemical structure and occurrence of natural polyisoprenes (Book style with paper title and editor)," in *Biopolymers*, vol. 2, A. Steinbüchel, Ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH, 2001, pp. 1-25.
 [2] B. L. Archer, B. G. Audley, "Rubber, gutta percha and chicle, in: *Phytochemistry*, vol. 2, F. F. Nord, L. P. Miller, Eds. New York: Van Nostrand Reinhold, 1973, pp. 310-343.

- [3] D. M. Abou-Zeid, R. J. Müller, W. D. Deckwer, "Degradation of natural and synthetic polyester under anaerobic condition," *J. Biotechnol.*, vol. 86, pp. 113-126, Aug. 2000.
- [4] J. Birke, W. Röther, G. Schmitt, and D. Jendrossek, "Functional identification of rubber oxygenase (RoxA) in soil and marine myxobacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 79, pp. 6391- 6399, Oct. 2013.
- [5] S. Imai, K. Ichikawa, Y. Muramatsu, D. Kasai, E. Masai, and M. Fukuda, "Isolation and characterization of *Streptomyces*, *Actinoplanes*, and *Methylibium* strains that are involved in degradation of natural rubber and synthetic poly(*cis*-1,4-isoprene)," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 49, pp. 526-531, May. 2011.
- [6] S. Skariyachan, M. Megha, M. N. Kini, K. M. Mukund, A. Rizvi, and K. Vasist, "Selection and screening of microbial consortia for efficient and ecofriendly degradation of plastic garbage collected from urban and rural areas of Bangalore, India," *Environ. Monit. Assess.*, vol. 187, pp. 1-14, Jan. 2015.
- [7] A.A. Shah, F. Hasan, J. I. Akhter, A. Hameed, S. Ahmed, "Degradation of polyurethane by novel bacterium isolated from soil," *Ann. Microbiol.*, vol. 58, pp. 381-386, Jun. 2008.
- [8] D. Jendrossek, G. Tomasi, and R. M. Kroppenstedt, "Bacterial degradation of natural rubber: a privilege of actinomycetes?," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 150, pp. 179-188, Feb. 1997.
- [9] P. Li, G. Ji-Guang, Y. Bo, and C. Shu-Pei, "Contribution to deterioration of polymeric materials by a slow- growing bacterium *Nocardia corynebacterioides*," *Int. Biodeterior. Biodegr.*, vol. 63, pp. 24-29, Jul. 2009.
- [10] G. T. Howard., "Biodegradation of polyurethane: a review," *Int. Biodeter. Biodegr.*, vol. 49, pp. 245-252, Jun. 2002.
- [11] S. N. S. Hapuarachchi, S. R. Kariyapper, M. B. D. M. D. Gunawardana, S. Egodage, and T. U. Ariyadasa, "Biodegradation of natural rubber latex by a novel bacterial species isolated from soil," in *Conf. Rec. 2016 IEEE MERCon.*, pp. 1-4.
- [12] A. Linos, M. M. Berekaa, R. Reichelt, U. Keller, J. Schmitt, H. Flemming, R. M. Kroppenstedt, and A. Steinbüchel, "Biodegradation of *cis*-1,4-polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed surface analysis," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 4, pp. 1639-1645, Apr. 2000.
- [13] A. A. Shah, F. Hasan, Z. Shah, N. Kanwal, and S. Zeb., "Biodegradation of natural and synthetic rubbers: A review." *Int. Biodeter. Biodegr.*, vol. 83, pp. 145-157, Jun. 2013.
- [14] E. Cherian, and K. Jayachandran., "Microbial degradation of natural rubber latex by a novel species of *Bacillus* sp. SBS²⁵ isolated from soil." *Int. J. Environ. Res.*, vol. 3, no. 4, pp. 599-604, Apr. 2009.
- [15] M. Urgun-Demirtas, D. Singh, and K. Pagilla., "Laboratory investigation of biodegradability of a polyurethane foam under anaerobic conditions." *Polym. Degrad. Stabil.* vol. 92, pp. 1599-1610, May, 2007.

About Author (s):



วิธีการทดลองเพิ่มเติม

สูตรอาหาร Minimal salts medium (MSM) (กรัม/ลิตร)

NaHPO₄·12H₂O (9 กรัม) KH₂PO₄ (1.5 กรัม) NH₄NO₃ (1.0 กรัม) MgSO₄·7H₂O (0.2 กรัม) CaCl₂·2H₂O (0.02 กรัม) Fe(III)[NH₄] citrate (0.0012 กรัม) ปรับ pH เป็น 7.0 (Jendrossek *et al.*, 1997)

การเตรียมสารละลาย Bradford

เติม 100 มิลลิกรัม ของ Coomassie Brilliant Blue G50 ละลายใน 50 มิลลิลิตรของ 95% เอทานอล เติม 100 มิลลิลิตร ของ 85% กรดฟอสฟอริก (H₃PO₄) ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

การเตรียมสารตั้งต้นของเอนไซม์ไลเปส

ซังสารพารา-ไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตต (*p*-NPP) ปริมาณ 30 มิลลิกรัม ละลายด้วย isopropanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl (50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0) ซึ่งเตรียมโดยเติม sodium deoxycholate 207 มิลลิกรัม และ gum Arabic 100 มิลลิกรัม ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน ควรเตรียมสารละลายและใช้งานทันทีและแช่หลอดในความเย็นตลอดเวลา

การคำนวณร้อยละของอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพ (% biodegradation rate)

คำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\begin{aligned} \Sigma(\text{CO}_2)_{\text{material (test)}} &= \frac{\Delta V}{10} \times 250 \times 0.05 \times 44 \quad (\text{สมการ 1}) \\ \Sigma(\text{CO}_2)_{\text{blank (abiotic control)}} &= \frac{\Delta V}{10} \times 250 \times 0.05 \times 44 \quad (\text{สมการ 2}) \end{aligned}$$

ความหมายของตัวแปร

ΔV	คือ	ผลต่างของปริมาตรสารละลายไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่ใช้ไทเทรตสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ก่อนใช้งานและหลังใช้งานแต่ละครั้ง
10	คือ	ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต (มิลลิลิตร)
250	คือ	ปริมาตรทั้งหมดของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่อยู่ในภาชนะ d และ e
0.05	คือ	ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้เป็นตัวจับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากการย่อยสลาย
44	คือ	มวลโมเลกุลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

การคำนวณค่า ThCO₂ ของยางธรรมชาติ (C₅H₈)

ThCO₂ หมายถึง ค่าที่บ่งบอกถึงปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากวัสดุทดสอบ ในทางทฤษฎี (theoretical amount of carbon dioxide, ThCO₂) ในหน่วยกรัมต่อภาชนะ ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\text{ThCO}_2 = m \times X_c \times \frac{44}{12} \quad (\text{สมการ 3})$$

โดยที่

m คือ ของแข็งแห้งทั้งหมดของวัสดุทดสอบที่ใส่ลงไป ณ จุดเริ่มต้นของการทดสอบ ในหน่วยกรัม

X_c คือ สัดส่วนคาร์บอนอินทรีย์ทั้งหมดในของแข็งแห้งทั้งหมดของวัสดุทดสอบ ในหน่วย กรัมต่อกรัม

44 คือ มวลโมเลกุลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

12 คือ มวลอะตอมของคาร์บอน

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายทางชีวภาพ

จากการวัดปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ถูกปล่อยออกมา เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายทางชีวภาพของวัสดุทดสอบสำหรับแต่ละช่วงของการวัด สามารถคำนวณได้จากสมการ ดังนี้

$$\% \text{ การย่อยสลายทางชีวภาพ} = \left[\frac{\sum(\text{CO}_2) \text{ material (test)} - \sum(\text{CO}_2) \text{ blank (control)}}{\text{ThCO}_2} \right] \times 100$$

สภาวะการเพิ่มจำนวน 16S rRNA gene โดยวิธี Polymerase Chain Reaction

ขั้นตอนการทำ PCR	อุณหภูมิที่ใช้ (°C)	เวลาที่ใช้ (นาที)
1. Initial denaturation	95	5:00
2. Denaturation	95	0:30
3. Annealing	57	0:30
4. Primer extension	73	1:00
5. จำนวนรอบที่ใช้	29 รอบ	
6. Final extension	73	5:00
7. Storage	4	

ต้นฉบับที่ส่งไปยังวารสารวิชาการ

1 **Investigation of biodegradation of polyurethane foam made from natural**
2 **rubber**

3 Vilasinee Akkharabunditsakul ^a, Varaporn Tanrattanakul ^b, Kamontam Umsakul ^{a*},

4

5 ^a Department of Microbiology, Prince of Songkla University, Songkhla 90112,

6 Thailand

7

8 ^b Department of Materials Science and Technology, Prince of Songkla University,

9 Songkhla 90112, Thailand

10

11 * Corresponding author

12 E-mail address: kamontam.u@psu.ac.th

13 **Abstract**

14 **Background:** A new polyurethane foam made from natural rubber has been
15 formulated to use in agricultural fields however, its biodegradable properties should
16 be considered and further investigated before releasing this product. This study
17 focused on the isolation of a polyurethane foam-degrading mixed culture from
18 various soil and wastewater samples that has the ability to degrade this new
19 polyurethane in broth within 30 days.

20 **Results:** An effective mixed culture including 3 isolates was able to degrade
21 polyurethane foam. *Gordonia westfalica* strain P1, *Xanthomonas maliensis* strain P2
22 and *Ochrobactrum intermedium* strain P5 were identified based on a 16S rRNA gene
23 analysis. This mixed culture used polyurethane foam as a carbon source and gave
24 5.32% dried weight loss of the polyurethane foam, 18.29% of the rubber glove and
25 1.54% of the epoxidized natural rubber within 30 days. A FT-IR analysis revealed
26 that the urethane bonds in the polyurethane structure were broken down. No
27 microbial cells on the polyurethane's surface were found, while the surfaces of the
28 reference rubber materials (rubber glove and epoxidized natural rubber) were
29 abundantly covered by microbial cells. The highest lipase activity of 0.018 Units/mg
30 protein in a cell-free supernatant was obtained from the polyurethane foam
31 degradation test at week 2. The biodegradation rates of the polyurethane foam, the
32 rubber glove and the epoxidized natural rubber revealed 6.79%, 16.42% and
33 24.38%, respectively.

34 **Conclusions:** The biodegradation of polyurethane foam was confirmed, but at a
35 slow rate after 30 days of treatment with the mixed culture containing *Gordonia*
36 *westfalica* strain P1, *Xanthomonas maliensis* strain P2 and *Ochrobactrum*
37 *intermedium* strain P5. A gram negative bacterium, *Ochrobactrum* sp. was first
38 reported in this study as playing an important role in rubber biodegradation.

39 **Keywords:** Mixed culture, *Gordonia* sp., *Xanthomonas* sp., *Ochrobactrum* sp.,
40 rubber glove, natural rubber, polyurethane

41

42 **1. Introduction**

43 Many commercial products used in our daily life are made from polymers,
44 mainly synthetic polymers derived from petroleum or chemically synthesized
45 materials that are extremely stable and almost impossible to naturally degrade
46 completely within the environment. Important application usages are found in almost
47 every sector, such as house wares, industrial fields, agricultural fields and medical
48 fields. However, after their use-by date policy, in many cases, are discarded and
49 then compiled to huge mountains of accumulating solid waste. About 140 million
50 tons of synthetic polymers become solid waste each year [1]. This waste material
51 becomes dispersed in the environment where they directly and indirectly affect the

52 ecology of human, animals and living organisms. The main management methods
53 for the disposal of solid wastes involve landfills, combustion, and recycling; however,
54 these methods have serious limitations and most importantly, do not completely
55 remove them. Therefore, over the last two decades extensive attempts are being
56 made to develop new polymers with similar properties to their synthetic counterparts
57 but are completely biodegradable. Hence, biodegradation has become a key
58 motivational word especially for developing alternative methods for an eco-friendly
59 management of polymer waste. Efforts to find alternatives for non-biodegradable
60 synthetic polymers have become a number one target for many research groups
61 trying to solve the problem of accumulating these non-biodegradable polymers to
62 improve the earth's environment

63 Polyurethane (PU) is a member of synthetic polyesters that are used as a
64 base material in many applications [2]. The global consumption of PU foams
65 amounts to only a small percentage of plastic production. In addition, these products
66 are designed to have extensive lifetimes. On the other hand, responsibility for their
67 disposal must be considered therefore, mechanisms for biodegradation of these
68 materials should be investigated. Improvements to the functional commercial
69 properties of these materials should also include side by side attempts to improve
70 their biodegradability. Nowadays, several studies are being focused on using
71 biodegradable polymers as a suitable alternative to synthetic non-degradable
72 polymers.

73 Para rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is a natural rubber producing plant that
74 has become a major economic crop in Southern Thailand. There is much incentive to
75 add value to natural rubber latex (NRL) in Thailand, and a new PU-like foam made
76 from natural rubber is one such product. A team of researchers from the Department
77 of Materials Science and Technology, Faculty of Science, Prince of Songkla
78 University, Thailand has attempted to develop a biodegradable PU-like foam made
79 from NRL. Because the NRL is the raw material used in its production, it is possible
80 that being natural in theory, it would be fully expected to be a biodegradable product
81 and could replace some of the polyurethanes deriving from non-biodegradable
82 materials in the future. Poly (cis-1,4-isoprene) chains will be used as a main raw
83 material in the PU-like foam production in this study. The terminal chains of the
84 poly(cis-1,4-isoprene) were modified as polyols, then they were reacted with
85 polyisocyanate to synthesize the PU-like foam that form ester linkages inside the
86 PU-like structure (Fig. 1). Ester linkages are relatively easily hydrolyzed [1] as
87 hydrolytic enzymes, such as esterases, lipases, proteases and ureases, are
88 ubiquitous in living microorganisms. These enzymes can break down ester linkages;
89 consequently, intermediates can be produced and released into the culture broth [4].
90 The PU-like chains are composed of carbon, nitrogen, oxygen and hydrogen atoms.
91 So, the PU-like foam degrading microorganism can utilize carbon and nitrogen
92 atoms as the sole of carbon and nitrogen sources after uptake by cells, respectively
93 [3]. Therefore, the biodegradation of PU goods depends on the chemical structures

94 and additives which may be harmful to microbial cells. There have been many
95 reports about the biodegradation of polyester polyurethanes. Both bacteria and fungi
96 are the key microorganisms, such as *Comamonas acidovorans* [5], *Corynebacterium*
97 *sp.*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia rubidaea*, *Pseudomonas aeruginosa* [6]. In
98 addition, some fungi such as *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. vesicolor*,
99 *Aureobasidium pullulans* [7], *Alternaria solani* [8] also have that ability.

100 **2. Materials and methods**

101 2.1 Polymer samples

102 Polyurethane foam (PU foam) and epoxidized natural rubber (ENR) were
103 made from natural rubber obtained from the Department of Materials Science and
104 Technology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Thailand. Natural
105 rubber glove was a product of SriTrang™ Gloves.

106 2.2 Soil samples

107 Twelve rubber contaminated soil samples were collected from 5 rubber
108 factory properties in Songkhla province, Thailand.

109 2.3 Preparation and screening for PU-degrading natural soil consortia

110 First, PU foam was cut into cubic shape sizes of 0.5 cm³, and washed by
111 distilled water and dried overnight. Second, a Minimal Salts Medium (MSM) which
112 consisted of (g/L): Na₂HPO₄ (9), KH₂PO₄ (1.5), NH₄NO₃ (1), MgSO₄·7H₂O (0.2),
113 CaCl₂·2H₂O (0.02), Fe(III)[NH₄] citrate (0.0012) [9] supplemented with 0.6% (v/v)
114 NRL was prepared. One gram of the dried PU foam was added before autoclaving.
115 Third, the sample was added (10% w/v) and shaking incubated at 30 °C, 150 rpm for
116 30 days. Then, 10% (v/v) of the culture broth was transferred to a fresh MSM without
117 a latex supplementation. One gram of the PU foam was added as a carbon substrate
118 for selection and enrichment of PU-degrading microorganisms. All flasks were
119 incubated at 30 °C, 150 rpm for 15 days. This step was repeated for another 15
120 days. Finally, the culture broth defined as soil consortia broth was collected, and kept
121 at -80 °C in 20% (v/v) glycerol.

122 2.4 The primary screening of PU-degrading consortium from soil

123 10% (v/v) of the consortia broth was inoculated into a MSM which was added
124 with 1 g of PU foam. The broth cultures at 0, 2 and 4 weeks were spread on different
125 media to briefly separate the groups of microorganisms. This media included Plate
126 count agar (PCA), Potato dextrose agar (PDA), Actinomycetes agar (ACT) and MSM
127 supplemented with 0.6% (v/v) NRL agar (MSM+NRL agar). Different morphological
128 colonies on MSM+NRL agar were picked, and retained as stock cultures at -80 °C in
129 20% (v/v) glycerol.

130 2.5 The second screening of PU-degrading bacteria

131 Two to five colonies with different morphologies isolated from each
132 consortium were mixed randomly and tested for their ability to degrade the PU. Each
133 group was inoculated into a MSM containing 0.3% (w/v) of PU foam; in addition,
134 other carbon substrates were used as reference materials, such as ENR and rubber
135 gloves. These were incubated in a shaker for 30 days at 30 °C, at 150 rpm. The
136 broth culture was then spread on PCA plates to determine the viable cells (CFU/mL)
137 and the number of microbial members in each constructed PU-degrading group.

138 2.6 The third screening of PU-degrading bacteria

139 The surviving isolates with 3 different morphologies that grew on the PCA
140 plates were then grouped to form a test mixed culture. The PU foam, rubber glove
141 and ENR were tested with each test mixed culture for 30 days.

142 2.7 Biochemical tests

143 All 18 isolates of the six mixed cultures were analyzed for possible PU-
144 degrading enzymes, such as urease, lipase and proteolytic enzymes by using Urea
145 agar, Tributyrin agar and Nutrient gelatin broth, respectively

146 2.8 Weight loss determination method

147 Each mixed culture was inoculated into the MSM broths containing 0.3% (w/v)
148 PU foam as a sole carbon source. The ENR and rubber glove were used as
149 reference materials. After 30 days of incubation, the polymer pieces were filtered
150 through a Whatman No.1 filter paper and dried at 60 °C before being weighed [10].
151 The percentage of weight loss after degradation was then calculated.

152 2.9 Confirmation of PU biodegradation by Fourier Transform Infrared (FT-IR) 153 spectroscopy

154 The PU foam and reference materials were tested on biodegradation by the
155 effective mixed cultures for 30 days in a MSM broth. Then, pieces of the polymer
156 were removed for a FT-IR analysis. The ATR-FTIR spectrometer from Bruker Tensor
157 27 gave transmittance spectra in the IR range from 4000 to 400 nm [11].

158 2.10 Determination of PU foam degradation by Scanning Electron Microscopy (SEM)

159 The PU foam, rubber glove and ENR incubated with and without the mixed
160 culture after 30 days were investigated for appearance changes using a Jeol JSM-
161 5800LV Scanning Microscope (JEOL, Tokyo, Japan).

162 2.11 Total protein assay

163 Broth cultures of the PU foam, ENR and rubber glove flasks at week 0, 1, 2, 3
164 and 4 were filtered through a Whatman No.1 filter paper and centrifuged at 8,000
165 rpm for 20 minutes at 4 °C. Total protein in the supernatant including total enzymes
166 was determined by the Bradford method [12]. Bovine serum albumin (BSA) was

167 used as the standard protein. The absorbance was recorded at 595 nm using a
168 spectrophotometer. The treated and untreated materials at 4 weeks incubation were
169 dipped in the Bradford solution for 10 minutes to observe the microbial colonization
170 on the surface of the rubber materials.

171 2.12 Lipase activity

172 The extracellular lipase activity in the cell-free supernatant was measured
173 spectrophotometrically using p-nitrophenyl palmitate (p-NPP) as an enzyme
174 substrate [13]. p-nitrophenol was used as the standard. One International Unit (IU) of
175 lipase activity was defined as the amount of lipase enzyme which catalyzed the
176 enzyme substrate (p-NPP) and required to liberate 1 μmol of p-nitrophenol per min
177 under the standard assay conditions.

178 2.13 CO₂ evolution

179 The CO₂ evolution was carried out in a closed system. The tested flask
180 contained MSM, each rubber material as carbon substrates and 10% (v/v) of the
181 mixed culture broth. All flasks were incubated at room temperature (30-35 °C) for 28
182 days. The released CO₂ was trapped by a Strum test [14]. A titration method was
183 applied to measure the CO₂ evolution [15]. The percentage of the biodegradation
184 rate was then calculated as the following equation [14].

$$185 \quad \% \text{ Biodegradation rate} = [\sum(\text{CO}_2)\text{material (test)} - \sum(\text{CO}_2)\text{blank(control)}] / \text{ThCO}_2 \times 100$$

186 2.14 Identification of PU-degrading strains

187 Genomic DNA of selected strains was extracted by the PowerSoil® DNA
188 Isolation Kit (Carlsbad, CA, USA). For the 16S ribosomal RNA (rRNA) gene analysis,
189 genomic DNA was amplified using following primers 27F (5'-
190 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')
191 and MyTaq™ DNA Polymerase from Biorline was used. Sequences of the purified
192 PCR product were identified by Ward Medic Ltd. The obtained sequences were
193 analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) from The National
194 Center for Biotechnology [15].

195

196 3. Results and Discussion

197 3.1. Isolation of PU-degrading population in consortia

198 The twelve broth cultures obtained from the primary screening step at week 0,
199 2 and 4 weeks of incubation were spread on PCA, PDA, ACT and MSM+NRL agar.
200 The results showed the diversity of the rubber-degrading microorganisms in each
201 sample including bacteria, fungi, and actinomycetes on the PCA, PDA and ACT
202 agar, respectively. 40 different colonies grown on the MSM+NRL agar were
203 collected. 2-5 different colonies from each sample were grouped to form mixed

204 cultures. The secondary screening from the 2-5 colonies grouping was incubated
205 with the PU foam, ENR and rubber glove for 30 days and then the broth culture was
206 spread on PCA to obtain the polymer-degrading bacteria. 18, 26 and 26 colonies
207 were isolated from the PU foam, ENR and rubber glove degradation. Eighteen
208 isolates of the PU-degrading microorganism were grouped again into 6 mixed
209 cultures based on the same originated sample and different morphologies. The six
210 groups of mixed culture (mixed culture 1 - 6) were tested for their rubber
211 biodegradability by using the different kinds of rubber materials as the sole carbon
212 source. The rubber materials appeared to undergo dramatic physical changes,
213 especially, those from the rubber glove cultures. The color of the rubber glove sheets
214 and the ENR cubes completely changed into an old rose color, and some pores
215 appeared on the surface of the ENR cubes were clearly observed (data not shown).

216 3.2 Identification of PU-degrading enzymes using biochemical tests

217 The involved PU-degrading enzymes such as urease, lipase and proteolytic
218 enzyme (gelatinase) were investigated using biochemical tests. The majority of
219 isolates produced urease and lipase while the proteolytic enzyme was produced
220 from 2 isolates only. The results confirmed the hydrolytic ability of isolates which
221 have been previously described for their important roles in PU biodegradation.

222 3.3 Weight loss determination

223 Mixed culture 4 could degrade PU foam as the foam weight decreased by
224 5.32% after 30 days of incubation. The mixed culture 4 also caused biodegradation
225 of the rubber gloves and the ENR with a weight loss of 18.29% and 1.54%,
226 respectively (Fig. 2). The mixed culture 4 was then taken as a representative culture
227 to test for PU foam biodegradation.

228 3.4 Analysis of PU foam biodegradation by FT-IR spectroscopy

229 After three kinds of rubber materials were incubated with the 6 groups of the
230 mixed cultures in a MSM broth. The results indicated that the mixed culture 4
231 showed some peaks that indicated significant chemical structural changes when
232 compared with the abiotic control of each material.

233 The tested material in this study, PU foam, was biodegraded by the mixed
234 culture 4 for 30 days (Fig. 3). The vital functionality of polyurethane is the urethane
235 bond at the wavenumber of 1700 cm^{-1} that is specific to the carbonyl C=O stretch
236 (ester carbonyl functional group). After treatment, the peak at 1700 cm^{-1} decreased
237 slightly because of the ester hydrolysis. Impranil DLN was used as the carbon
238 substrate in polyurethane biodegradation in other studies [20][21]. They found that
239 the absorption peak at 1735 cm^{-1} was characterized by the ester carbonyl functional
240 group of DLN. After *Pseudomonas putida* was inoculated, the peak at 1735 cm^{-1}
241 disappeared because of ester hydrolysis. Then, the hydrogen bond N-H stretching
242 and O-H stretching presented at $3230\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ and 3404 cm^{-1} , respectively. These

243 might be the possible degradation products of the urethane cleavage. Interestingly,
244 the wavenumber at 835 cm^{-1} did not appear in the spectra of both treated and
245 untreated PU foam. This might be an important factor why this PU foam was hardly
246 biodegraded by the effective rubber degrading bacteria because, most of them
247 directly attacked at cis-1,4-double bonds in the polyisoprene structure. These bonds
248 might be absented during the PU foam synthesized process.

249 The FT-IR spectra of the treated rubber glove with mixed cultures 4 (Fig. 4)
250 showed that the peak in the region of 835 cm^{-1} were diminished after biodegradation
251 and this corresponded to the loss of C=C and cis-1,4 double bond. The range of
252 1160 cm^{-1} was increased referring to the formation of aldehydes [16]. The biofilm
253 component including the protein peak at 1635 and 1541 cm^{-1} were identified as
254 amide I and II while, the fatty acid region in the rubber component at $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$
255 was decreased due to microbial degradation [17]. Interestingly, the peak at 1436 cm^{-1}
256 was decreased considerably presenting the deformation of CH_2 and CH_3 in aliphatic
257 compounds. Moreover, the peak at 875 cm^{-1} which is an unidentified peak, had
258 diminished obviously after treatment with the mixed culture 4.

259 Similarly, the biodegradation of ENR that was used as a reference material by
260 the mixed culture 4 also showed changes to the FT-IR spectra (Fig. 5). This is the
261 first time to investigate ENR as a reference substrate for a biodegradation test. The
262 wavenumber at 860 cm^{-1} was associated with the decrease of the epoxide
263 functionality in the ENR structure [18]; which might assume that the mixed culture 4
264 was effectively able to open the epoxide ring. After that, oxidative degradation
265 reactions might play a role resulting in the changes to the FT-IR spectrum at the
266 region of $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ which was identified as hydroxyl groups [19] presented a
267 stronger signal compared with the spectrum of ENR in abiotic control. Those spectra
268 might be associated with some intermediates in the ENR biodegradation by the
269 mixed culture 4. In addition, the wavenumber band at 823 cm^{-1} obviously decreased.
270 The fatty acid in rubber at the region of $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ was utilized during rubber
271 degradation [17]. This indicated that the mixed culture 4 could degrade cis-1,4
272 double bonds which is the main component of ENR. The peaks at 1630 and 1537
273 cm^{-1} were increased considerably which showed amide I and II corresponding to the
274 biofilm formation. Moreover, the range of 1160 cm^{-1} increased after treatment
275 referring to the aldehyde formation [16].

276 3.5 SEM observation

277 In this study, the scanning of electron micrographs of the PU foam surface
278 was compared with the surfaces of the rubber glove and the ENR (reference
279 materials) after 30 days of incubation with mixed culture 4 (Fig. 6). The
280 biodegradation of the rubber gloves showed clear evidences of biofilm formation, a
281 rough surface, crater and disintegration. In addition, the microbial cells embedded
282 greatly on the surface (Fig. 6b, 6c); furthermore, the ENR was totally covered with a
283 biofilm of mixed culture 4 (Fig. 6e, 6f). In contrast, there was no clear evidence of

284 any microbial cells on the tested PU foam's surface (Fig. h6, i6). The microbial
285 population presented on each material's surface was clearly different. The density of
286 the population on the ENR was more plentiful than the population on the rubber
287 glove and only a few microbial cells attached to the PU foam's surface. These results
288 indicated that the factors of biodegradability of solid polymers depend on their
289 chemical and physical properties. Porosity and pore size of polymer can affect the
290 degradation rate. In other words, not only the natural structure of material but also
291 the modified structure plays an important role in biodegradation. Moreover, the
292 surface properties of solid polymers also are mentioned, such as the surface area,
293 hydrophilic, hydrophobic properties because these also influence the mechanisms of
294 polymer biodegradation [22]. The more cells coated with polymer the more polymers
295 that are degraded.

296 3.6 Total protein and lipase activity

297 The surface of the rubber glove and ENR clearly showed pigments produced
298 from the mixed culture 4, while pigments and microbial colonization were not
299 observed on the PU foam after a much longer incubation time (Fig. 7a). In the same
300 case, the Bradford method provided a dark blue area on the surface presumably due
301 to the microbial colonization on the rubber glove and ENR's surface, but a dark blue
302 spot on the PU foam's surface was not found (Fig. 7b). These results related to a
303 SEM observation that there was no microbial colonization on the PU foam's surface,
304 while other material's surfaces found a crowded microbial population.

305 Previous studies have proven that proteases, esterases, ureases and lipases
306 are the key enzymes in polyurethane biodegradation but they are mainly non-specific
307 enzyme [2]. In some cases, they act as an indiscriminative bond-breaking
308 mechanism which acts on position of ester or amide. Thus it is acceptable to
309 correlate the lipase activity to confirm the ester bond hydrolysis [8]. The specific
310 lipase activities in the cell-free supernatants at week 0, 1, 2, 3 and 4 were shown
311 (Fig. 8). With tested PU, the highest specific lipase activity was 0.018 Units/mg
312 protein, while in biotic control was 0.009 Units/mg protein at week 2 of incubation.
313 The results of biochemical tests revealed that the mixed culture 4 can produce
314 enzymes that play an important role in PU biodegradation spontaneously, such as
315 urease, lipase and proteolytic enzyme (gelatinase). Hence, PU foam was
316 investigated for being an inducing enzyme substrate in liquid medium. The mixed
317 culture 4 was capable of using the PU foam as substrate with a slow rate of
318 degradation due to limitations and undesirable characteristics of the PU foam,
319 especially its complex structure, smooth surface and semi open-cell foam property
320 which did not provide for microbial attachment. The ENR, another reference rubber,
321 showed the highest activity of lipase in the cell free supernatant after treatment. The
322 possible hypothesis was proposed that some intermediates during ENR
323 biodegradation might induce the lipase enzyme and support lipase production. In
324 contrast, the smallest amount of lipase activity was detected in the cell free
325 supernatant of the rubber glove test, this might be due to the lipase enzyme is not a

326 key enzyme for rubber degradation. This evidence revealed that the rubber glove did
327 not act as an inducing lipase enzyme substrate during the rubber degradation. With
328 other PU-degrading enzymes, esterase activity in *Bacillus subtilis* was determined by
329 using Impranil DLNTM as substrate. The esterase activity was 45 Units/mg protein
330 for 3-4 days of incubation at 30 °C [23]. *Candida rugosa* also produced lipase
331 enzyme in degrading Impranil. They also found diethylene glycol as a byproduct [24].
332 The result from this study supported the key role of lipase enzyme in polyurethane
333 biodegradation [5].

334 3.7 CO₂ evolution

335 After 28 days of degradation, CO₂ mineralization was determined in term of %
336 biodegradation rate of PU foam, rubber glove and ENR showing 6.79%, 16.42%,
337 24.38%, respectively. The results correspond to viable cell count after 4 weeks of
338 incubation. The initial viable cell count of mixed culture was 3.0x10⁸ CFU/mL. After
339 incubation, the viable cell count in the culture broth of the PU foam, rubber glove and
340 ENR tests were 1.2x10⁴, 1.5x10⁸, 2.0x10⁷ CFU/mL respectively. The significant
341 reduction of viable cells in the PU foam test flask indicated that microbial cells might
342 not be able to use PU foam as a carbon source effectively.

343 3.8 Identification of the 16S rRNA genes of the PU-degrading bacteria

344 Three strains of the mixed culture 4 were identified by a 16S rRNA gene
345 analysis. The phylogenetic tree of PU-degrading bacteria demonstrated that strain
346 P1 was mostly matched to *Gordonia westfalica* Kb2 (99%). Strain P2 showed the
347 highest similarity with *Xanthomonas maliensis* strain M97 (99%). Strain P5 was
348 closely similar to *Ochrobactrum intermedium* strain UFLA FFT41.2 (99%). The 16S
349 rRNA genes have been deposited under the GenBank accession numbers
350 KX810928, KX810929 and KX810930, respectively. All isolates have been reviewed
351 about their abilities to biodegrade some of the recalcitrant pollutants in the
352 environment. *Gordonia westfalica* has been reported to be a rubber degrading
353 actinomycete [25] and this genus can degrade many xenobiotic materials in the
354 environment [26, 27]. *Xanthomonas* sp. strain 35Y grew on NRL can produce the
355 extracellular rubber oxygenase RoxA [28]. Finally, *Ochrobacter* sp. has been studied
356 about crude oil degradation [29], nicotine biodegradation [30], and benzo[a]pyrene
357 (BaP) [31]. Interestingly, *Ochrobacter intermedium* strain P5 (GenBank accession
358 no.KX810930) first showed the ability of rubber glove biodegradation in this study.
359 This gram negative rubber-degrading strain was a slow rubber degrading bacterium
360 which was isolated from waste water of rubber industries in Hatyai, Thailand.

361 4 Conclusions

362 This is the first study about the biodegradation of a new polyurethane foam
363 made from natural rubber by using a mixed culture isolated from soil and waste
364 water. The effective mixed culture included 3 strains, *Gordonia westfalica* strain P1,
365 *Xanthomonas maliensis* strain P2 and *Ochrobactrum intermedium* strain P5. This

366 study confirmed that the mixed culture could degrade a PU foam sample and other
367 kinds of rubber materials such as rubber glove and epoxidized natural rubber. In
368 addition, this is the first report about a gram negative rubber degrading bacteria,
369 *Ochrobactrum intermedium* strain P5. The natural imitation of the mixed culture
370 including the actinomycetes which is the majority of gram positive rubber degrader
371 (*G. westfalica*), model of gram negative rubber degrader (*Xanthomonas* sp.) and
372 novel species of gram negative rubber degrading bacteria (*Ochrobactrum*
373 *intermedium* P5) may be an interesting choice for rubber solid waste elimination due
374 to those microorganisms that have different rubber cleaving enzymes, thus they may
375 share the capacity to decompose hardly accessible molecules [32].

376

377 **Acknowledgments**

378 We would like to gratefully thank the Department of Materials Science and
379 Technology, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand for supplying the PU
380 foam and advices on FT-IR analysis. We would like to express special gratitude and
381 thank to Dr. Brian Hodgson for his valuable comments and guidance throughout the
382 study.

383

384 **Financial support**

385 This work was financially supported by the Department of Microbiology and
386 Graduate School of Prince of Songkla University and also the research grant of
387 Prince Songkla University (SCI560399S).

388

389 **References**

390 [1] Shima M. Biodegradation of plastics. *Curr Opin Biotech* 2001;12:242-7. DOI:
391 [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00206-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00206-8).

392

393 [2] Howard GT. Biodegradation of polyurethane: a review. *Int Biodeter Biodegr*
394 2002;245-52. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00051-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00051-3).

395

396 [3] Nakajima-Kambe T, Shigeno-Akutsu Y, Nomura N, Onuma F, Nakahara T.
397 Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether
398 polyurethanes. *Appl Microbiol Biot* 1999;51:134-40.
399 DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s002530051373>.

400

401 [4] Shah AA, Hasan F, Akhter JI, Hameed A, Ahmed S. Degradation of polyurethane
402 by novel bacterial consortium isolated from soil. *Ann Microbiol* 2008;58:381-86. DOI:
403 <http://dx.doi.org/10.1007/BF03175532>.

- 404 [5] Nakajima-Kambe T, Onuma F, Akutsu Y, Nakahara T. Determination of the
405 polyester polyurethane breakdown products and distribution of the polyurethane
406 degrading enzyme of *Comamonas acidovorans* strain TB-35. J Ferment Bioengineer
407 1997;83:456-60. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)83000-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0922-338X(97)83000-0).
408
- 409 [6] Kay MJ, Morton LHG, Prince EL. Bacterial degradation of polyester polyurethane.
410 Int Biodeterior 1991;27:205-22. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0265-3036\(91\)90012-](http://dx.doi.org/10.1016/0265-3036(91)90012-G)
411 G.
412
- 413 [7] Darby RT, Kaplan AM. Fungal susceptibility of polyurethanes. Appl Microbiol
414 1968;16: 900-05.
415
- 416 [8] Ibrahim IN, Maraqa A, Hameed KM. Polyester-polyurethane biodegradation by
417 *Alternaria solani*, isolated from Northern Jordan. Adv Environ Biol 2009;3:162-70.
418
- 419 [9] Jendrossek D, Tomasi G, Kroppenstedt M. Bacterial degradation of natural
420 rubber: a privilege of actinomycetes?. FEMS Microbiol Lett 1997;150:179-88. DOI:
421 [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00072-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00072-4).
422
- 423 [10] Pan L, Gu JG, Yin B, Cheng SP. Contribution to deterioration of polymeric
424 materials by a slow-growing bacterium *Nocardia corynebacterioides*. Int Biodeter
425 Biodegr 2009;24-29. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.06.003>.
426
- 427 [11] Roy RV, Das M, Banerjee R, Bhowmick AK. Comparative studies on crosslinked
428 and uncrosslinked natural rubber biodegradation by *Pseudomonas* sp. Bioresource
429 Technol 2006;97:2485-88. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.09.024>.
430
- 431 [12] Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
432 quantities of protein utilizing the principle of portien-dye binding. Anal Biochem
433 1976;248-54. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
434
- 435 [13] Winkler UK, Stuckmann M. Glycogen, hyaluronate, and some other
436 polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*.
437 J Bacteriol 1979;138:663-70.
438
- 439 [14] Guo W, Tao J, Yang C, Song C, Geng W, Li Q, Wang Y, Kong M, Wang S.
440 Introduction of environmentally degradation parameters to evaluate the
441 biodegradability of biodegradable polymers. PLoS ONE 2012;7:1-6. DOI:
442 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0038341>.
443
- 444 [15] Warneke S, Arenskötter M, Tenberge KB, Steinbüchel A. Bacterial degradation
445 of poly(trans-1,4-isoprene) (*Gutta percha*). Microbiology 2007;153:347-56. DOI:
446 <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2006/000109-0>.

- 447 [16] Shah AA, Hasan F, Shah Z, Kanwal N, Zeb S. Biodegradation of natural and
448 synthetic rubber: A review. *Int Biodeter Biodegr* 2013;83:145-57. DOI:
449 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.05.004>.
450
- 451 [17] Linos A, Berekaa MM, Reichelt R, Keller U, Schmitt J, Flemming HC,
452 Kroppenstedt RM, Steinbüchel A. Biodegradation of cis-1,4-polyisoprene rubbers by
453 distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed surface analysis. *Appl*
454 *Environ Microb* 2000;66:1639–45. DOI: [http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.4.1639-](http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.4.1639-1645.2000)
455 [1645.2000](http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.4.1639-1645.2000).
456
- 457 [18] Hamzah R, Bakar MA, Khairuddean M, Mohammed IA, Adnan R. A structural
458 study of epoxidized natural rubber (ENR-50) and its cyclic dithiocarbonate derivative
459 using NMR spectroscopy techniques. *Molecules* 2012;17:10974-93. DOI:
460 <http://dx.doi.org/10.3390/molecules170910974>.
461
- 462 [19] Phinyocheep P, Phetphaisit CW, Derouet D, Campistron I, Brosse JC. Chemical
463 degradation of epoxidized natural rubber using periodic acid: preparation of
464 epoxidized liquid natural rubber. *J Appl Polym Sci* 2005;95:6-15. DOI:
465 <http://dx.doi.org/10.1002/app.20812>.
466
- 467 [20] Peng YH, Shih YH, Lai YC, Liu YZ, Liu YT, Lin NC. Degradation of polyurethane
468 by bacterium isolated from soil and assessment of polyurethanolytic activity of a
469 *Pseudomonas putida* strain. *Environ Sci Pollut Res* 2014;21:9529-37.
470
- 471 [21] Russell JR, Huang J, Anand P, Kucera K, Sandoval AG, Dantzler KW.
472 Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *Appl Environ*
473 *Microbiol* 2011;77:6076-84. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00521-11>.
474
- 475 [22] Tokiwa Y, Calabia BP, Ugwu CU, Aiba S. Biodegradability of plastics. *Int J Mol*
476 *Sci* 2009;10:3722-42. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms10093722>.
477
- 478 [23] Rowe L, Howard GT. Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the
479 purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme. *Int Biodeter*
480 *Biodegr* 2002;50:33-40. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00047-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00047-1).
481
- 482 [24] Gautam R, Bassi AS. *Candida rugosa* lipase-catalyzed polyurethane
483 degradation in aqueous medium. *Biotechnol Lett* 2007;29:1081-86. DOI:
484 <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-007-9354-1>.
485
- 486 [25] Linos A, Berakaa MM, Steinbüchel A, Kim KK, Spröer C, Kroppenstedt RM.
487 *Gordonia westfalica* sp. nov., a novel rubber-degrading actinomycete. *Int J Syst Evol*
488 *Micr* 2002;52:1133-39. DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.02107-0>.

- 489 [26] Abraham J, Shanker A, Silambarasan S. Role of *Gordonia* sp JAAS1 in
490 biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite 3,5,6-trichloro-2-
491 pyridinol. *Lett Appl Microbiol* 2013;57:510-516. DOI:
492 <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12141>.
493
- 494 [27] Jin D, Bai Z, Chang D, Hoefel D, Jin B, Wang P, Wei D, Zhuang G.
495 Biodegradation of di-n-butyl phthalate by an isolated *Gordonia* sp. strain QH-11:
496 genetic identification and degradation kinetics. *J Hazard Mater* 2012;221-222:80-85.
497 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.010>.
498
- 499 [28] Tsuchii A, Takeda K. Rubber-degrading enzyme from a bacterial culture. *Appl*
500 *Environ Microbiol* 1990;56:269-74. PMC183308.
501
- 502 [29] Eraky M, Abou-Shanab RAI, Salem AM, Abdelgaffer ARB. Petroleum
503 hydrocarbon degradation potential of *Ochrobactrum lupini* isolated from BTEX
504 enrichment soil. *Int J Environ* 2015;4:204-9.
505
- 506 [30] Yuan YJ, Lu ZX, Huang LJ, Bie XM, Lü FX, Li Y. Optimization of a medium for
507 enhancing nicotine biodegradation by *Ochrobactrum intermedium* DN2. *J Appl*
508 *Microbiol* 2006;101:691-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02929.x>
509
- 510 [31] Yirui W, Tengting H, Mingqi Z, Yueling Z, Enmin L, Tongwang H, Zhong H.
511 Isolation of marine benzo[a]pyrene-degrading *Ochrobactrum* sp. BAP5 and proteins
512 characterization. *J Environ Sci* 2009;21:1446-51. DOI:
513 [http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62438-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62438-9).
514
- 515 [32] Birke J, Röther W, Schmitt G, Jendrosseck D. Functional Identification of rubber
516 oxygenase (RoxA) in soil and marine myxobacteria. *Appl Environ Microbiol*
517 2013;79:6391-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02194-13>

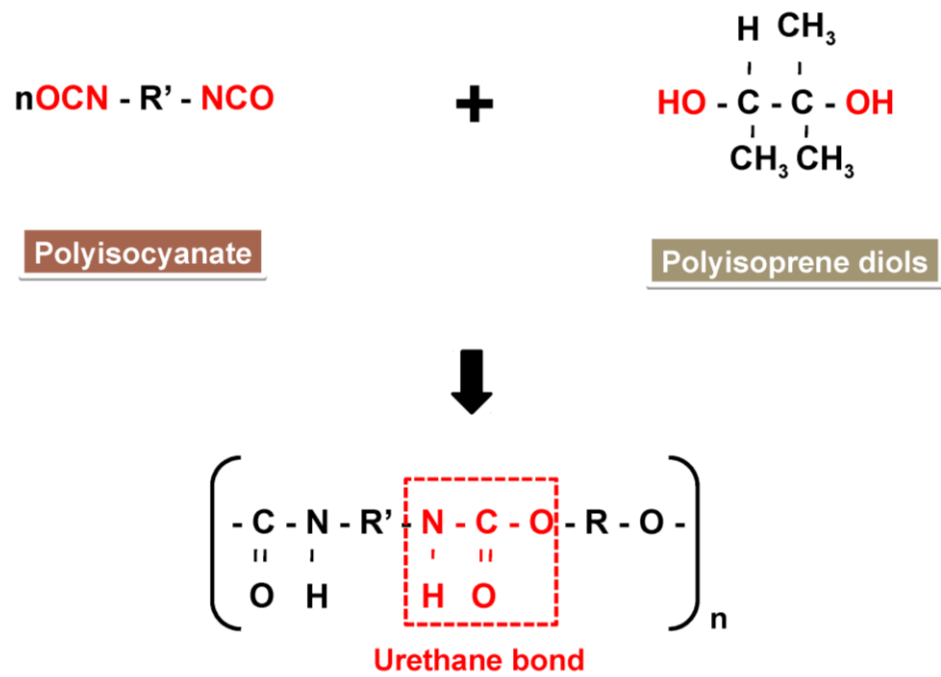


Fig. 1 Chemical structure of natural rubber polyurethane foam

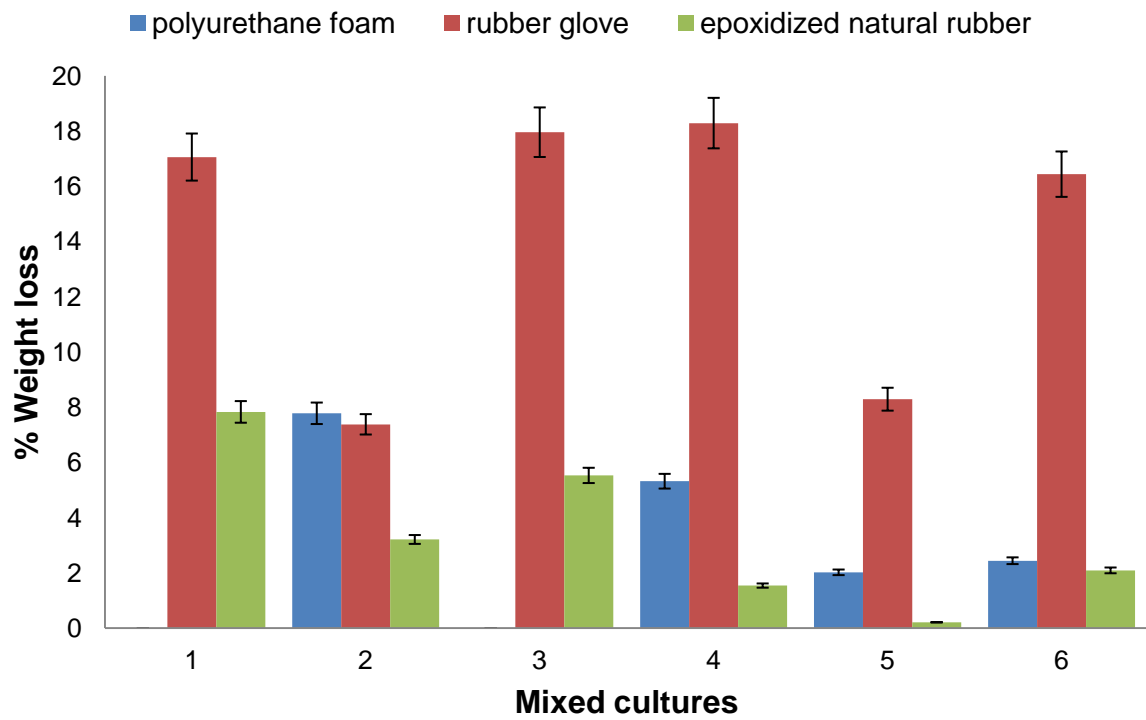


Fig. 2 Percentages of weight loss of three kinds of polymers that were treated by each mixed culture at 30 °C 150 rpm for 30 days

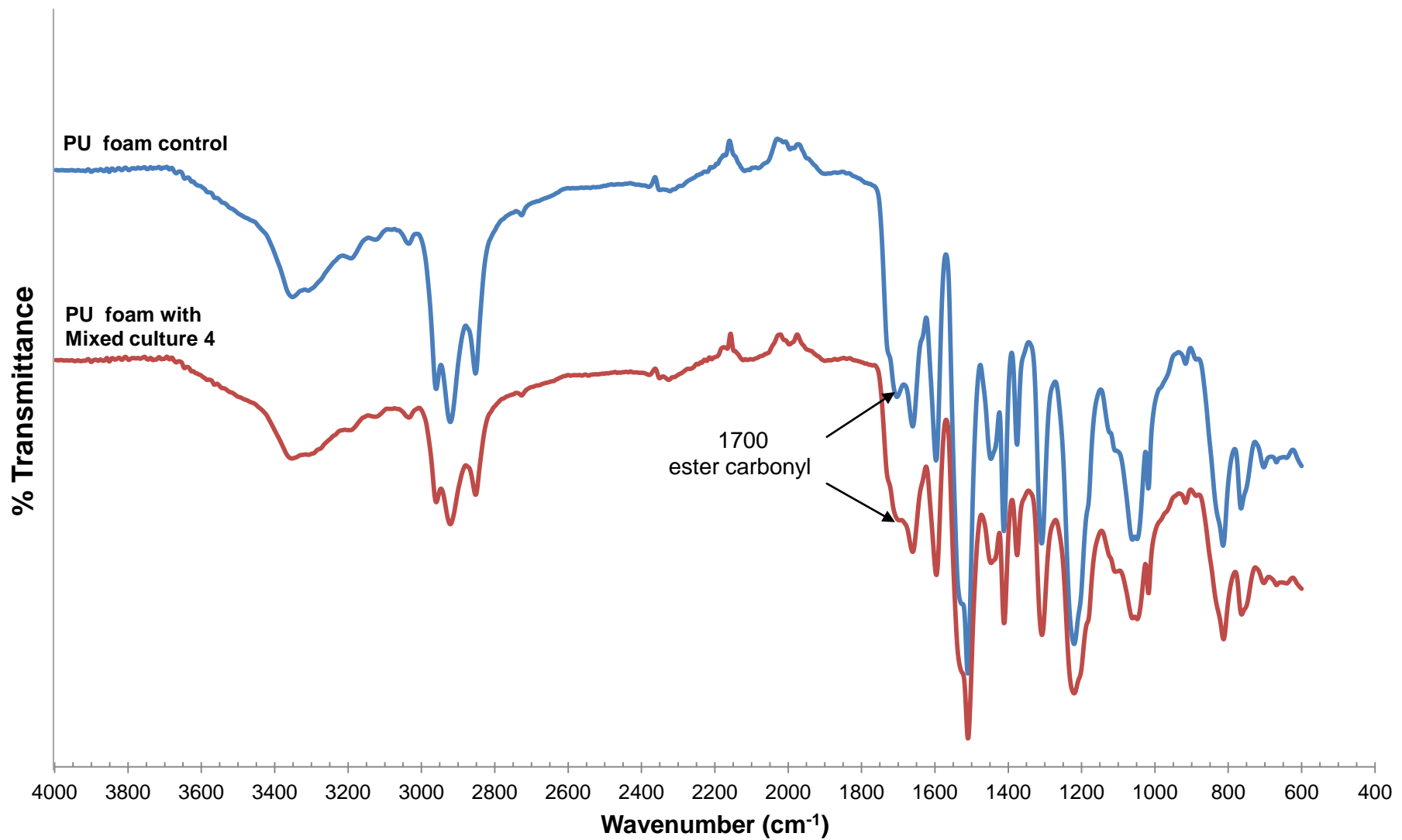


Fig. 3 FT-IR spectrum of PU foam in abiotic control and after treatment with the Mixed culture 4 in MSM broth at 30 °C for 30 days

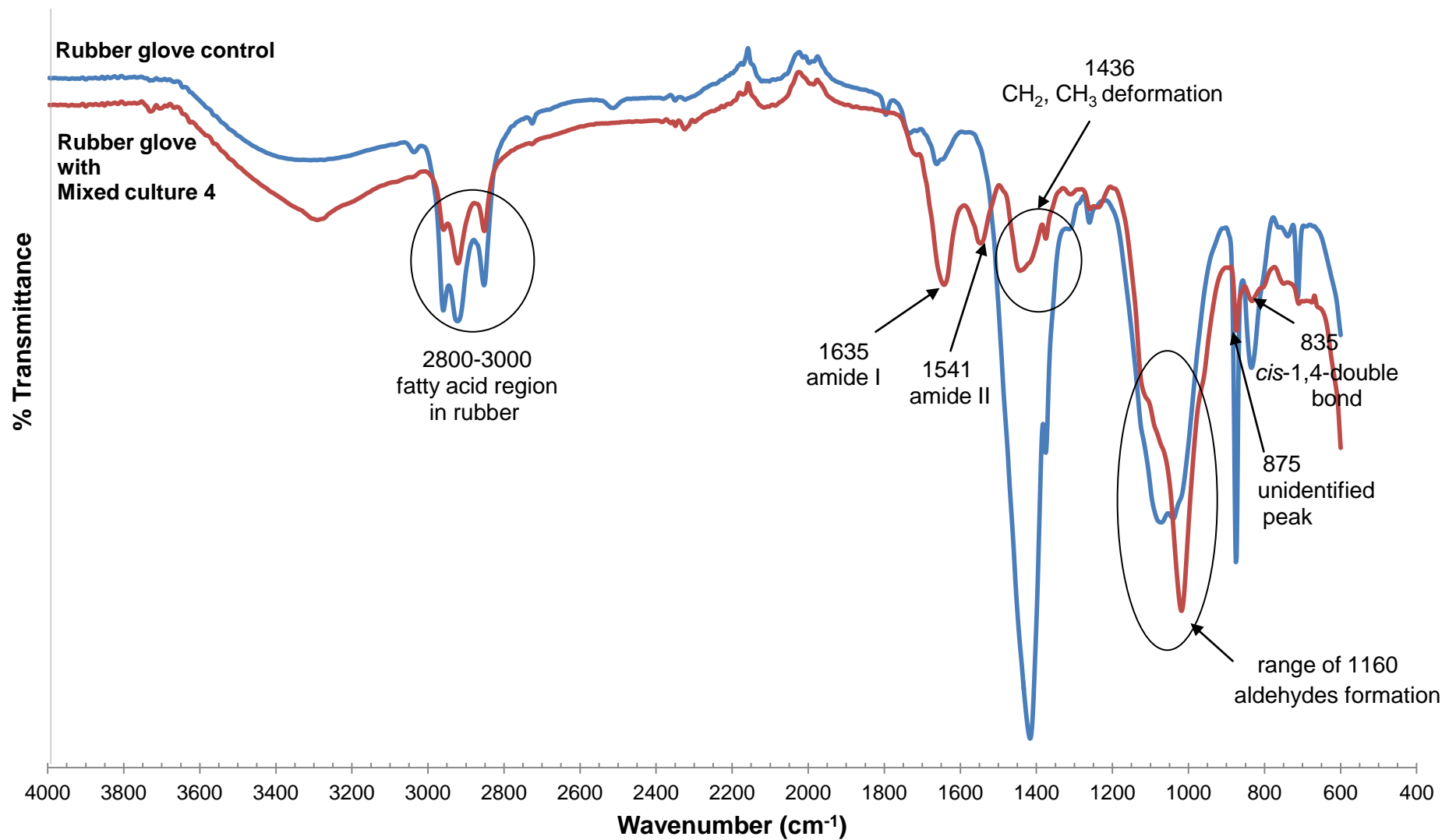


Fig. 4 FT-IR spectrum of rubber glove in abiotic control and after treatment with the mixed culture 4 in MSM broth at 30 °C for 30 days

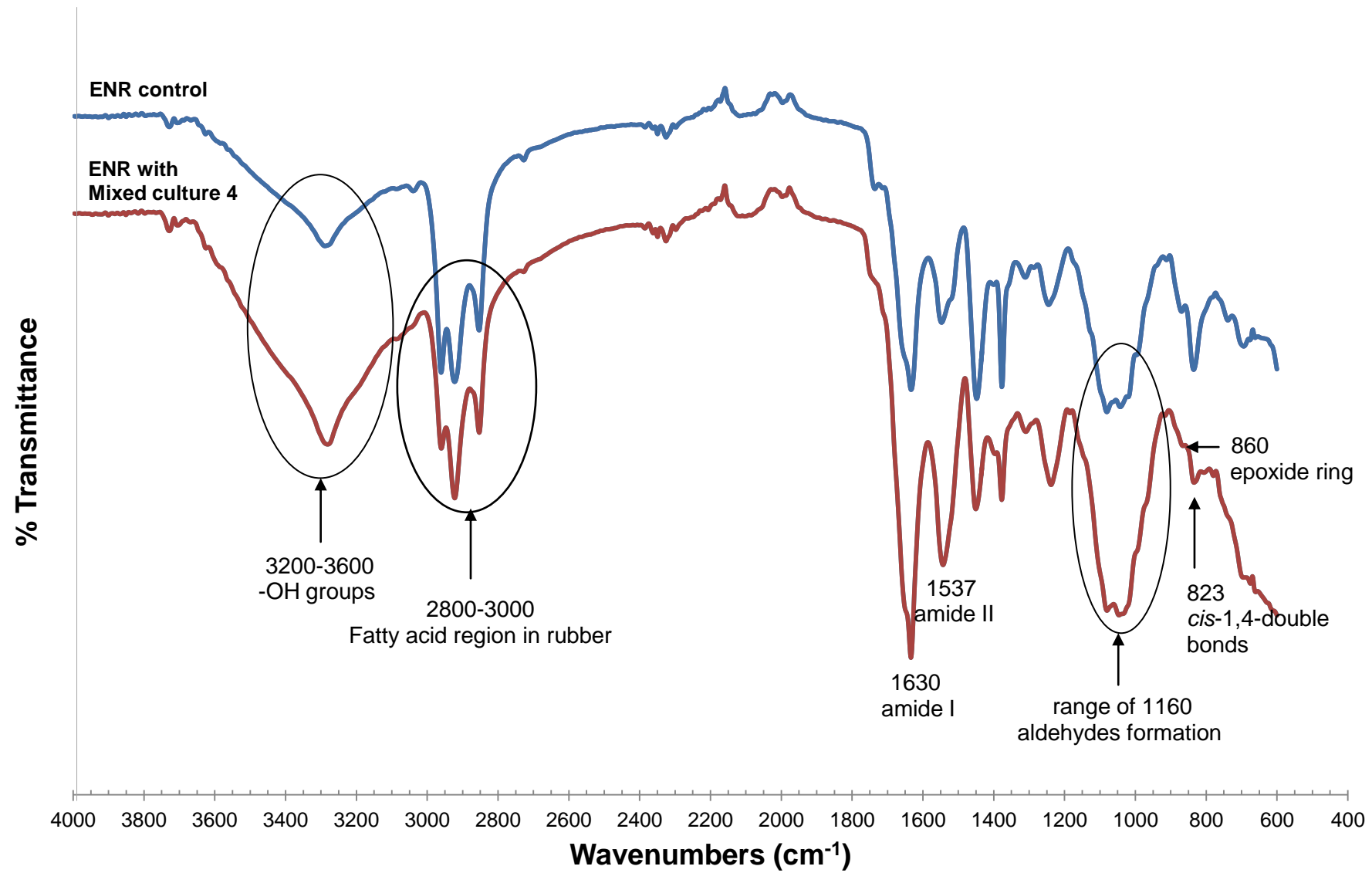


Fig. 5 FT-IR spectrum of ENR in abiotic control and after treatment with the mixed culture 4 in MSM broth at 30 °C for 30 days

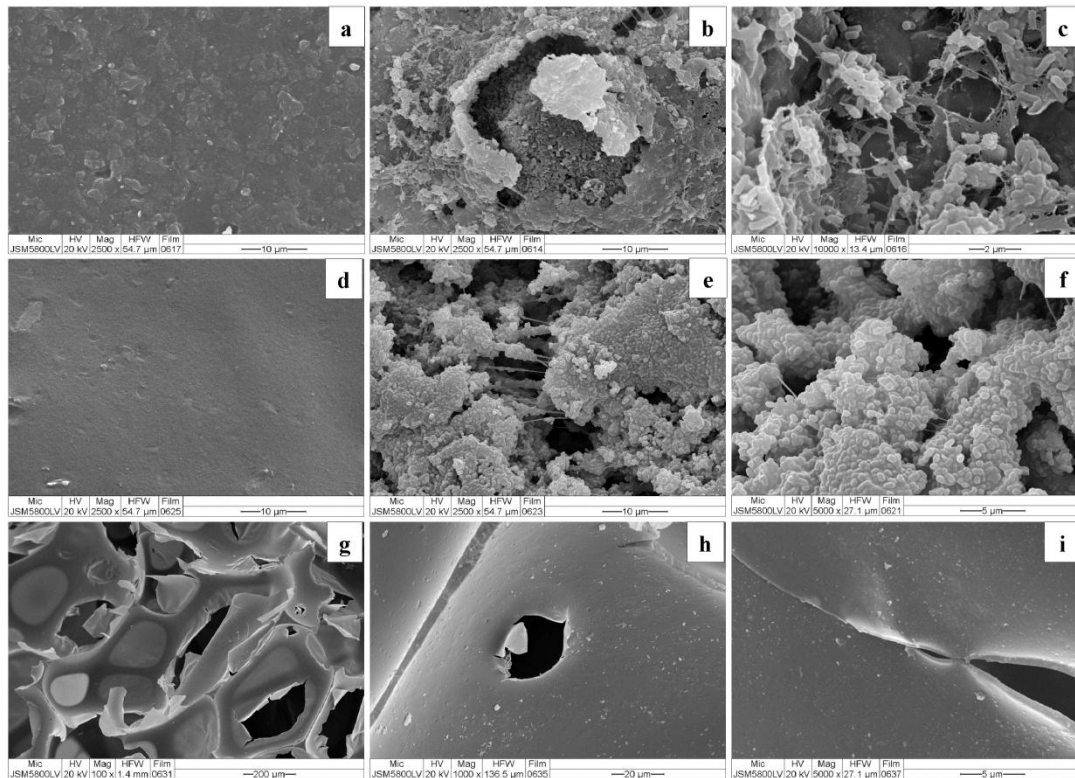


Fig. 6 Scanning electron microscopy of the surface of control and inoculated test with mixed culture 4; rubber glove control (a), rubber glove test (b, c), epoxidized natural rubber control (d), epoxidized natural rubber test (e, f), PU foam control (g), PU foam test (h, i) after incubation in MSM broth for 30 days at 30 °C 150 rpm.







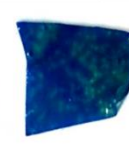














Materials \ Week	Week					a	Control	Test	b
	0	1	2	3	4				
Glove									
ENR									
PU foam									

Fig. 7 Visual observation of PU foam, rubber glove and ENR at week 0 to week 4 at 30 °C 150 rpm for 30 days (a) and total protein determination on surface of a piece of PU foam, rubber glove and ENR in abiotic control and test after dipped in Bradford's reagent (b).

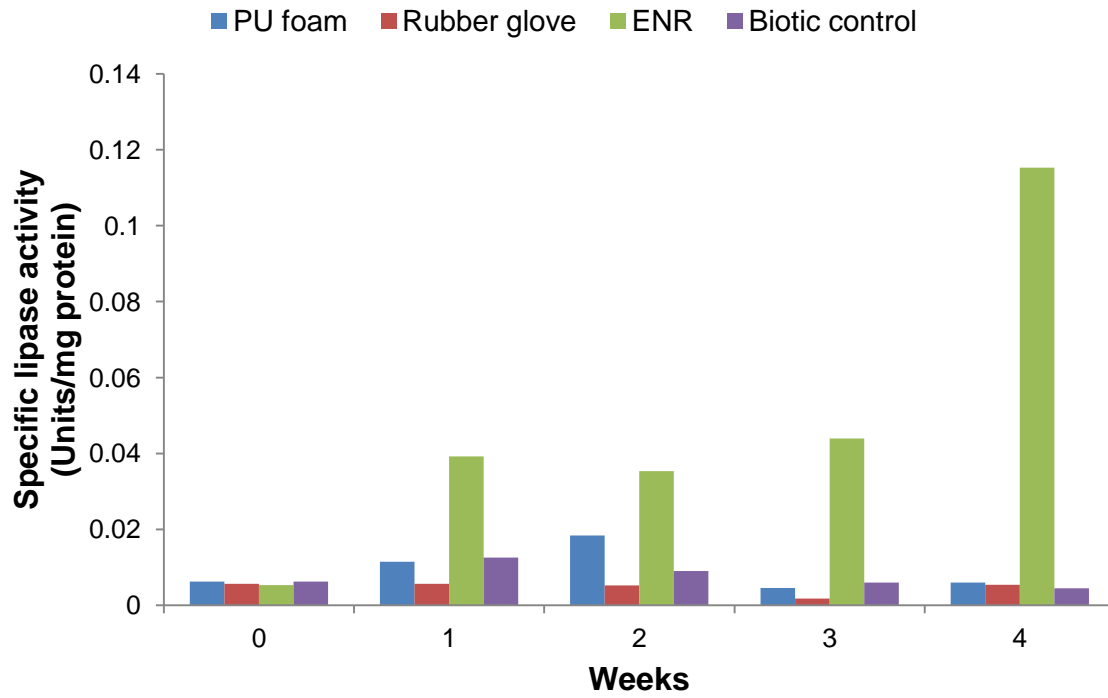


Fig. 8 Specific lipase activity (Units/mg protein) in cell-free supernatant after incubated with the mixed culture 4 at 30 °C 150 rpm for 30 days

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาววิลาสินี อัครบัณฑิตสกุล
รหัสประจำตัวนักศึกษา 5510220099

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2554

ทุนการศึกษา

ทุนค่าเล่าเรียนโครงการสร้างความเข้มแข็งให้กับงานวิจัยและการเรียนการสอนในระดับบัณฑิตศึกษา
ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ประจำปีงบประมาณ 2556
ทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปี 2556 สัญญาเลขที่
SCI560399S

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Akkharabunditsakul V., Umsakul K., Tanrattanakul V., 2014. The Investigation of biodegradation of polyurethane film made from polylactic acid and natural rubber. International BioScience Conference 2014 and 5th Joint PSU-UNS International BioScience Conference (IBSC2014), at Phuket, Thailand.

Akkharabunditsakul V., Umsakul K., Tanrattanakul V., 2016. Biodegradation of Synthetic Rubbers by a Mixed Culture Isolated from Various Rubber Factory Soils in Songkhla, Thailand. International Conference on Research & Innovation in Food, Agriculture and Biological Sciences (RIFABS-16), at Phuket, Thailand.

Akkharabunditsakul V., Umsakul K., Tanrattanakul V., 2016. Investigation of Biodegradation of Polyurethane Foam Made from Natural Rubber. Electronic Journal of Biotechnology. (submitted)