



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การศึกษาและพัฒนาสารถนอมน้ำยางธรรมชาติ
ชนิดใหม่”

“Research on A Study and Development of the New
Preservative for Natural Rubber Latex”

โดยรศ.ดร.จิตต์ลัดดา ศักดาภิพาณิชย์ และคณะ

ตุลาคม พ.ศ. 2548

สัญญาเลขที่ RDG4650042

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การศึกษาและพัฒนาสารถนอมน้ำยางธรรมชาติ ชนิดใหม่”

“Research on A Study and Development of the New
Preservative for Natural Rubber Latex”

คณะผู้วิจัย

- รศ.ดร. จิตต์ลัดดา ศักดาภิพาณีย์
- นางสาวลัดดาวัลย์ บุญคุ้ม
- นางสาวกัญจน์ นวมะวัณณ์
- นายณัฐพนธ์ ภูผิวก้าว

สังกัด

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ชุดโครงการยางพารา

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สัญญาเลขที่ RDG4650042

โครงการ การศึกษาและพัฒนาสารสนเทศนํ้าอย่างธรรมชาติชนิดใหม่

ส่วนที่ 1 ข้อมูลโครงการ

ชื่อโครงการ การศึกษาและพัฒนาสารสนเทศนํ้าอย่างธรรมชาติชนิดใหม่

สัญญาโครงการเลขที่ RDG4650042

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุนวิจัย รศ.ดร.จิตต์ลัดดา ศักดาภิพาณิษฐ์

โครงการเริ่มเมื่อวันที่ 1 สิงหาคม 2546

รายงานความก้าวหน้าครั้งที่ .7.. รวมเวลาที่ทำวิจัยทั้งสิ้น .27.. เดือน

ส่วนที่ 2 รายงานกระบวนการทำวิจัย

1. ในรอบ 27 เดือนที่ผ่านมาท่านได้

✓ ติดต่อทางโทรศัพท์/โทรสารกับ user...20..ครั้ง

✓ ประชุมร่วมกับ user..5...ครั้ง เมื่อวันที่ 31 มี.ค., 27 พ.ค., 25 มิ.ย. 47, 21 พ.ค., 30 มิ.ย. 48

✓ ไปพบ user ณ.สถานที่ ...16... ครั้ง เมื่อวันที่ 14 ม.ค., 24 มี.ค., 19 เม.ย., 29 เม.ย., 19 พ.ค., 28 มิ.ย., 17 ส.ค., 6 ก.ย., 7 ต.ค., 6 พ.ย. 47, 13 ม.ค., 28 เม.ย., 18 พ.ค., 27 มิ.ย., 25 ก.ค., 19 ส.ค. 48

ติดต่อ สกว.หรือ สปว.ครั้ง

ประชุมทีมวิจัย..17...ครั้ง เป็นเรื่อง ✓ ทบทวน / ✓ วางแผนงาน ..5.. ครั้ง

✓ หรือปัญหาการทำวิจัย ..4... ครั้ง

✓ วิเคราะห์ผล..5... ครั้ง

✓ มอบหมายงาน ..3... ครั้ง

☐ การจัดหาจัดจ้าง..... ครั้ง

2. ในรอบ 27 เดือน ที่ผ่านมามีท่านได้ติดตามข้อมูลงานวิจัยโดย

✓ บันทึกการทำวิจัย (สมุดเล่มดำ) จำนวน...43.. หน้า

✓ อ่าน paper ที่เกี่ยวข้อง...15..ชิ้น

✓ ค้นข้อมูลทาง internet...20.. ครั้ง

3. ในกรณีที่มึ้นักศึกษาบัณฑิตศึกษาหรือผู้ช่วยวิจัยในโครงการ ในรอบ 27 เดือนที่ผ่านมาท่านได้

✓ ให้นักศึกษานำเสนอความก้าวหน้า ...12.. ครั้ง

✓ ประชุมกับนักศึกษา/ผู้ช่วยวิจัย หรือนักศึกษาขอพบเพื่อหารือการทำวิจัย..10..ครั้ง

✓ ตรวจสอบแก้มผลงานวิจัยที่ทำโดยนักศึกษา หรือผู้ช่วยวิจัย

สารบัญ

	หน้า
Executive summary	1
บทคัดย่อ	2
เป้าหมายของโครงการวิจัย	4
วัตถุประสงค์ในการวิจัย	4
หลักการและที่มาของโครงการ	4
วิธีการทดลอง	
ตอนที่ 1 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการบูดเน่า ของน้ำยางธรรมชาติ	13
ตอนที่ 2 การศึกษาสารลดกลิ่นน้ำยางชนิดใหม่ในน้ำยางสด	
2.1 หาสารลดกลิ่นน้ำยางชนิดใหม่ที่ใช้แทน TMTD/ZnO โดยยังคงมีการเติม 0.3%NH ₃ ร่วมด้วย	30
2.2 การทดสอบสมบัติพื้นฐานของน้ำยางสดที่รักษาสภาพด้วย สารลดกลิ่นน้ำยางชนิดใหม่เปรียบเทียบกับสารลดกลิ่นน้ำยางที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน	32
ตอนที่ 3 การศึกษาหาสารลดกลิ่นน้ำยางชนิดใหม่ในน้ำยางข้น ที่ผ่านการรักษาสภาพแล้ว	32
ตอนที่ 4 การศึกษาสมบัติพื้นฐานของยางแห้งที่เตรียมได้จากน้ำยางข้น ที่ใช้สารลดกลิ่นน้ำยางชนิดใหม่โดยการทำให้ฟิล์ม	33
ผลการทดลอง	
ตอนที่ 1 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการบูดเน่า ของน้ำยางธรรมชาติ	35
ตอนที่ 2 การศึกษาสารลดกลิ่นน้ำยางชนิดใหม่ในน้ำยางสด	
2.1 หาสารลดกลิ่นน้ำยางชนิดใหม่ที่ใช้แทน TMTD/ZnO โดยยังคงมีการเติม 0.3%NH ₃ ร่วมด้วย	48
2.2 การทดสอบสมบัติพื้นฐานของน้ำยางสดที่รักษาสภาพด้วย สารลดกลิ่นน้ำยางชนิดใหม่เปรียบเทียบกับสารลดกลิ่นน้ำยางที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน	65

สารบัญ

	หน้า
ผลการทดลอง	
ตอนที่ 3 การศึกษาหาสารอนม่น้ำยางชนิดใหม่ในน้ำยางชั้น ที่ผ่านการรักษาสภาพแล้ว	67
ตอนที่ 4 การศึกษาสมบัติพื้นฐานของยางแห้งที่เตรียมได้จากน้ำยางชั้น ที่ใช้สารอนม่น้ำยางชนิดใหม่โดยการทำให้ฟิล์ม	70
สรุปผลการทดลอง	73
ภาคผนวก	
- บทความสำหรับการเผยแพร่	75
- กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์	75
- ผลการทดสอบแบคทีเรียทางชีวเคมีในน้ำยางธรรมชาติโดยใช้ API kit test	76
- สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความเสถียรของน้ำยาง	82
- ข้อมูลเบื้องต้นของ Preservative A หรือ 1,2- Benzisothiazolin-3-one ที่ทำหน้าที่เป็นสาร Bactericide ในน้ำยางธรรมชาติทดแทนการใช้ TMTD/ZnO	86
- ตาราง Output	90
- แบบสรุปข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะจากผู้ทรงคุณวุฒิ ผู้ร่วมให้ทุน (ฉบับร่าง)	
- แบบสรุปข้อคิดเห็นของผู้อำนวยการโครงการวิจัยแห่งชาติ (ฉบับสมบูรณ์)	

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 คุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำยางสด	35
ตารางที่ 2 การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำยางธรรมชาติ	40
ตารางที่ 3 VFA number ของน้ำยางสดที่ระยะเวลาต่างๆ (เมื่อวันที่ 7 ตุลาคม 2547)	43
ตารางที่ 4 VFA number ของน้ำยางสดที่ระยะเวลาต่างๆ (เมื่อวันที่ 14 ธันวาคม 2547)	44
ตารางที่ 5 ชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำยางสดที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้วิธี test Kit (เมื่อวันที่ 28 เมษายน 2548)	46
ตารางที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของน้ำยางสดเมื่อเติมแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ระยะเวลาต่างๆ (เมื่อวันที่ 28 เมษายน 2548)	47
ตารางที่ 7 การเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของน้ำยางสดเมื่อเติมแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ระยะเวลาต่างๆ (เมื่อวันที่ 25 กรกฎาคม 2548)	47
ตารางที่ 8 ลักษณะทางกายภาพของน้ำยางที่เติมสารถนอมน้ำยางชนิดต่างๆ และการเกิดแบคทีเรีย	49
ตารางที่ 9 ลักษณะทางกายภาพของน้ำยางที่เติม Preservative A 0.05% v/v ผสมกับสารรักษาความเสถียร ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับการเกิดแบคทีเรีย	61
ตารางที่ 10 ลักษณะทางกายภาพของน้ำยางที่เติม NH_3 0.3 %v/v ผสมกับสารรักษาความเสถียรและ Bactericide ที่ความเข้มข้นต่างๆ และการเกิดแบคทีเรีย	63
ตารางที่ 11 สมบัติพื้นฐานของน้ำยางสดเมื่อเติม 0.3% NH_3 + 0.05% TZ (control) เปรียบเทียบกับ 0.3% NH_3 + 0.05% Preservative A (อายุน้ำยางสดประมาณ 1 เดือน)	65
ตารางที่ 12 สมบัติพื้นฐานของน้ำยางสดเมื่อเติม 0.3% NH_3 + 0.05% TZ (control) เปรียบเทียบกับ 0.3% NH_3 + 0.05% Preservative A (อายุน้ำยางสดประมาณ 1 เดือน)	66
ตารางที่ 13 สมบัติพื้นฐานของน้ำยางข้นเมื่อเติมสารถนอมชนิดใหม่ที่ได้รับการรักษาสภาพน้ำยางสดด้วย 0.3% NH_3 + 0.05% Preservative A (อายุน้ำยางข้นประมาณ 4 เดือน)	68
ตารางที่ 14 สมบัติพื้นฐานของน้ำยางข้นเมื่อเติมสารถนอมชนิดใหม่ที่ได้รับการรักษาสภาพน้ำยางสดด้วย 0.3% NH_3 + 0.05% Preservative A (อายุน้ำยางข้นประมาณ 4 เดือน)	69

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 15 ค่า Tensile strength ของน้ำยางคอมปาวด์ (น้ำยางชั้นผลิตวันที่ 19 พฤษภาคม 2548)	71
ตารางที่ 16 ค่า Tensile strength ของน้ำยางคอมปาวด์ (น้ำยางชั้นผลิตวันที่ 28 มิถุนายน 2548)	72
ตารางที่ 17 การทดสอบการแยกสายพันธุ์ของแบคทีเรียทางด้านชีวเคมีโดยใช้ API kit test สำหรับแบคทีเรียแกรมลบ	76
ตารางที่ 18 การทดสอบการแยกสายพันธุ์ของแบคทีเรียทางด้านชีวเคมีโดยใช้ API kit test สำหรับแบคทีเรียแกรมบวก	78
ตารางที่ 19 โครงสร้างของสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความเสถียรของน้ำยาง	82

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 (A) น้ำยางสดที่กรีดได้จากต้น (B) น้ำยางสดหลังจากทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเวลา 2 วัน	7
รูปที่ 2 ลักษณะการทำ Streak plate	14
รูปที่ 3 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียตามความต้องการออกซิเจน	17
รูปที่ 4 การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเหลว	19
รูปที่ 5 ลักษณะของโคโลนีแบคทีเรียบนอาหาร Nutrient agar	19
รูปที่ 6 ลักษณะการเจริญของ Stroke culture	20
รูปที่ 7 ลักษณะเซลล์แบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำยางสด (A คือลักษณะของเซลล์ก่อน ทำ gram strain B คือลักษณะของเซลล์หลังทำ gram strain)	36
รูปที่ 8 ลำดับ DNA ของแบคทีเรียที่พบในน้ำยางสด	37
รูปที่ 9 DNA sequence ของแบคทีเรียในน้ำยางสดที่ตรวจสอบได้เปรียบเทียบกับ data base ของ <i>Enterobacter aerogenes</i>	38
รูปที่ 10 DNA sequence ของแบคทีเรียในน้ำยางสดที่ตรวจสอบได้เปรียบเทียบกับ data base ของ <i>Klebsiella trevisanii</i>	39
รูปที่ 11 ลักษณะของแบคทีเรียที่พบช่วงระยะเวลาต่างๆ	42
รูปที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า VFA number เมื่อเวลาในการเก็บ น้ำยางเปลี่ยนไป (เมื่อวันที่ 7 ตุลาคม 2547)	43
รูปที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า VFA number เมื่อเวลาในการเก็บ น้ำยางเปลี่ยนไป (เมื่อวันที่ 14 ธันวาคม 2547)	44
รูปที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการทนต่อแรงดึงที่ระยะยืดต่างๆ	71
รูปที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการทนต่อแรงดึงที่ระยะยืดต่างๆ	72

Executive summary

น้ำยางสดที่กรีดได้จากต้นยางจะเกิดการเสียสภาพความเป็นคอลลอยด์น้ำยาง โดยเกิดปรากฏการณ์ 2 อย่าง คือความเสถียรของน้ำยางลดลงโดยยางจะจับตัวแข็งเป็นก้อนลอยอยู่ในชั้นซีรัมและการบดเน่าของน้ำยางโดยสังเกตได้จากกลิ่นของน้ำยางที่เปลี่ยนไปจากเดิมที่มีกลิ่นหอมหวานเป็นกลิ่นบูดเน่า เพื่อป้องกันสาเหตุดังกล่าวจึงจำเป็นต้องมีการเติมสารถนอมน้ำยางเพื่อรักษาสภาพของน้ำยางให้สามารถนำไปใช้งานได้ ซึ่งโดยปกติแล้วมักจะทำการเติมทันทีภายหลังทำการกรีดต้นยาง ในปัจจุบันสารเคมีที่สามารถทำหน้าที่ดังกล่าวได้ดีมีเฉพาะแอมโมเนียซึ่งมักจะเติมในปริมาณ 0.3 – 0.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ขึ้นกับระยะเวลาที่ต้องการใช้รักษาสภาพ และนิยมใช้ร่วมกับสารที่ใช้ฆ่าเชื้อแบคทีเรียชนิดเตตระเมทิลไดซัลไฟด์ไทยูแรมและซิงค์ออกไซด์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพด้วย อย่างไรก็ตามการรักษาสภาพน้ำยางดังกล่าวมีข้อเสียที่สำคัญมาก คือเป็นสารก่อมะเร็งประเภทไนโตรซามีน ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้คือเพื่อพัฒนาสารถนอมน้ำยางชนิดใหม่ทดแทนสารที่ใช้ในปัจจุบันที่ทำให้เกิดอันตรายต่อผู้ใช้งาน โดยเฉพาะซิงค์ออกไซด์และเตตระเมทิลไดซัลไฟด์ไทยูแรม โดยไม่ทำให้คุณภาพน้ำยางขึ้นและผลิตภัณฑ์เสีย นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่เป็นต้นเหตุทำให้น้ำยางธรรมชาติเกิดการบดเน่าด้วย

โดยได้ทำการทดลองเติมสารเคมีชนิดต่าง ๆ ลงไปในน้ำยางสด ซึ่งแบ่งออกเป็นสารเคมีที่ป้องกันการจับตัวของน้ำยาง ได้แก่ สารเคมีจำพวกอะลิฟาติกเอมีนชนิดปฐมภูมิ สารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบ สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ สารลดแรงตึงผิวชนิดประจุบวก สารเคมีที่เป็นเบสและสารเคมีที่ป้องกันไม่ให้น้ำยางมีกลิ่นเหม็นที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของแบคทีเรีย ได้แก่ สารเคมีพวกยาปฏิชีวนะ สารที่ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันที่ใช้ในเครื่องสำอาง และสารประกอบซัลเฟอร์ โดยเติมสารเคมีดังกล่าวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เมื่อเติมสารเคมีกลุ่มต่าง ๆ ข้างต้น ในปริมาณที่เหมาะสมคือ 0.01-1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วทำการเก็บน้ำยางไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตลักษณะทางกายภาพของน้ำยาง เช่น การจับตัวของน้ำยาง กลิ่นของน้ำยาง และการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ระยะเวลาการเก็บต่าง ๆ ภายหลังจากที่ได้สภาวะของสารถนอมน้ำยางที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการรักษาเสถียรภาพน้ำยาง นำสภาวะดังกล่าวเติมลงในน้ำยางที่ใช้ปริมาณของน้ำยางที่มากขึ้นและนำน้ำยางดังกล่าวมาทดสอบสมบัติพื้นฐานของน้ำยางเปรียบเทียบกับสภาวะของน้ำยางที่เติมสารถนอมน้ำยางที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน พบว่าสารถนอมน้ำยางชนิดใหม่ที่ใช้แทนซิงค์ออกไซด์/เตตระเมทิลไดซัลไฟด์ไทยูแรม โดยไม่มีความอันตรายและไม่ทำให้คุณสมบัติของน้ำยางเปลี่ยนแปลง คือ Preservative A โดยมีการใช้ร่วมกับแอมโมเนีย ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันการจับตัวของน้ำยาง นอกจากนี้พบว่าชนิดของแบคทีเรียที่เป็นต้นเหตุทำให้น้ำยางธรรมชาติเกิดการบดเน่าได้แก่ *Bacillus coagulans*, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia ficaria*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Brevibacillus brevis*, *Enterobacter aerogenes*

บทคัดย่อ

น้ำยางธรรมชาติที่ได้จากการกรีดต้นยางจัดว่าเป็นคอลลอยด์ประเภทหนึ่ง ดังนั้นจะเกิดการจับตัวและเกิดการบดเน่าหลังการกรีดภายในเวลา 2-3 ชั่วโมง จึงต้องมีการเติมสารถนอมน้ำยางเพื่อช่วยป้องกันการเกิดปรากฏการณ์ทั้งสองในน้ำยางธรรมชาติ ซึ่งโดยปกติต้องเติมทันทีภายหลังจากการกรีด ในปัจจุบันสารถนอมน้ำยางที่ใช้รักษาสภาพน้ำยางเพื่อป้องกันน้ำยางเสียสภาพและบดเน่าได้แก่ 0.3% แอมโมเนีย ร่วมกับ 0.05% TMTD/ZnO แต่การใช้ TMTD มีข้อเสียคือทำให้ผลิตภัณฑ์จากน้ำยางเกิดการเปลี่ยนสีและเป็นสารก่อมะเร็ง ในขณะที่ ZnO ทำให้น้ำยางเสียสภาพได้ง่าย ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาและวิจัยสารถนอมน้ำยางชนิดใหม่มาใช้ทดแทน TMTD/ZnO ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษานิสัยของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้น้ำยางธรรมชาติเสียสภาพโดยใช้ชุดตรวจสอบชนิดของแบคทีเรีย เพื่อเป็นแนวทางในการหาสารถนอมน้ำยางชนิดใหม่ที่สามารถรักษาเสถียรภาพของน้ำยางและป้องกันการบดเน่าได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่ทำให้สมบัติพื้นฐานของน้ำยางสดและน้ำยางข้นที่ได้จากการถนอมน้ำยางด้วยสารถนอมน้ำยางชนิดใหม่นั้นไม่แตกต่างกับน้ำยางที่รักษาสภาพด้วยสารถนอมน้ำยางในปัจจุบัน

จากผลการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียพบว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่ในน้ำยางสดประกอบด้วย *Bacillus coagulans*, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia ficaria*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Brevibacillus brevis*, *Enterobacter aerogenes* โดยสารถนอมน้ำยางชนิดใหม่ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำยางสดได้อย่างมีประสิทธิภาพคือ Preservative A ความเข้มข้น 0.05% โดยน้ำหนัก ร่วมกับ แอมโมเนียความเข้มข้น 0.3% โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ยังสามารถเตรียมเป็นน้ำยางข้นได้โดยการเติม Preservative A ความเข้มข้น 0.025% โดยน้ำหนัก ร่วมกับแอมโมเนียความเข้มข้น 0.3% โดยน้ำหนัก ซึ่งจากการวิเคราะห์สมบัติพื้นฐานของน้ำยางสดและน้ำยางข้นที่รักษาสภาพด้วยสารถนอมน้ำยางชนิดใหม่และค่าการทนแรงดึง ณ จุดขาดพบว่าไม่แตกต่างจากน้ำยางที่รักษาสภาพด้วยสารถนอมน้ำยางที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

Abstract

Natural rubber latex is a colloidal material. After tapping from rubber tree, coagulation and putrefaction are occurred within 2-3 hours, so an additional of preservative into the freshly tapped natural rubber latex is necessary to prevent such the phenomena. At the present, the most commonly preservative substance used to prevent putrefaction and destabilization of natural rubber latex is 0.3% w/w ammonia in combination with 0.05% w/w TMTD/ZnO. However, the use of TMTD has drawback problem about latex discoloring, and can generate carcinogen nitrosamines. Moreover, ZnO also affect to the rubber latex by reducing the stability of the latex. Based on these problems, the development of new preservative substance in order to replace TMTD/ZnO was thus studied. In this work, types of bacteria in fresh natural rubber latex, causing destabilization of natural rubber latex, were characterized and identified by bacterial test kit. This information is a guidance for finding new preservative, which effective preventing the putrefaction and destabilization of natural rubber latex with no change of basic properties of both fresh latex and concentrated latex compare with those preserved with the present preservative latex.

From the obtained results, it was found that the main types of bacteria consisting in natural rubber latex is *Bacillus coagulans*, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia ficaria*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Brevibacillus brevis*, *Enterobacter aerogenes*. New preservative, which can inhibit the bacteria growth in natural rubber latex is the use of 0.05% w/w preservative A and 0.3% w/w NH₃. Besides, the concentrated latex can be prepared by the further addition of 0.025% w/w preservative A and 0.3% w/w NH₃ into centrifuged fresh latex. In addition, the basic properties of both fresh latex and concentrated latex including tensile strength of concentrated latex, preserved with new preservative system, were not different as comparing with those of latex with the present preservative system.

เป้าหมายของโครงการวิจัย

สามารถศึกษาวิจัยได้วิธีการในการพัฒนาสารอนม่น้ำยางชนิดใหม่แทนการใช้ ซิงค์ออกไซด์ (ZnO) และ เตตระเมทิลไดซัลไฟด์ไทยูแรม (Tetra methyl disulfide Thiuram (TMTD)) ทั้งในกรณีของ น้ำยางสดและน้ำยางข้นเพื่อพัฒนาใช้ในระดับอุตสาหกรรม

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดการบูดเน่าของน้ำยางธรรมชาติ
2. เพื่อพัฒนาให้ได้สารอนม่น้ำยางธรรมชาติที่ไม่เป็นพิษต่อผู้ใช้และไม่ทำให้คุณภาพน้ำยางข้นและผลิตภัณฑ์ยางเสียไป และให้สามารถนำไปพัฒนาใช้กับในระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้

หลักการและที่มาของโครงการ

สถานการณ์ของการวิจัยในเรื่องที่เกี่ยวข้องกับโครงการที่เสนอมาทั้งในประเทศและต่างประเทศ รวมถึงความจำเป็นของโครงการที่เสนอ

ในด้านชีวเคมีน้ำยางธรรมชาติจัดว่าเป็นไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) ซึ่งมีองค์ประกอบมากมาย เช่น luteoids, vacuolysosomal compartment, plastids, Fre-Wyssling particles, ribosomes โดยหน้าที่ของแต่ละองค์ประกอบดังกล่าวที่เกี่ยวข้องในกลไกและเมตาบอลิซึมต่าง ๆ ในต้นยาง สามารถศึกษาได้โดยการศึกษาในหลอดทดลอง (*In vitro study*)

น้ำยางธรรมชาติได้จากการที่ท่อน้ำยาง (lactiferous vessels) ถูกตัด โดยปกติน้ำยางที่ไหลออกจากต้นยางต่อการกรีดหนึ่งครั้งมีประมาณ 300-500 ml ขึ้นอยู่กับฤดูกาล ภูมิประเทศและอื่น ๆ ซึ่งจะหยุดไหลภายใน 2-3 ชั่วโมง โดยจะมีน้ำยางที่เกิดการแข็งตัวปิดที่บริเวณรอยกรีดเรียกว่าการแข็งตัวของน้ำยางนี้ว่า spontaneous coagulations สำหรับเวลาที่น้ำยางจะแข็งตัวนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อม ความเสถียรของน้ำยางและอาจจะมีตัวแปรอื่นอีก

กรณีของน้ำยางธรรมชาติเมื่อเก็บน้ำยางสดที่กรีดได้จากต้นในอุณหภูมิห้อง น้ำยางจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปจากเดิมโดยเกิดปรากฏการณ์ 2 อย่าง คือความเสถียรของน้ำยางลดลงโดยยางจะจับตัวแข็งเป็นก้อนลอยอยู่ในชั้นซีรัมและการบูดเน่าของน้ำยางโดยสังเกตได้จากกลิ่นของน้ำยางที่เปลี่ยนไปจากเดิมที่มีกลิ่นหอมหวาน สาเหตุที่ทำให้น้ำยางเสียสภาพเกิดจากสิ่งมีชีวิตเล็กๆ ที่ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าหรือที่เรียกว่า “แบคทีเรีย” ที่มีอยู่ตามธรรมชาติที่สามารถเจริญเติบโตโดยการย่อยสลายสารพวกโปรตีน กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต กรดไขมัน และสารอินทรีย์ อนินทรีย์ ที่

อยู่ในส่วนของซีรัมในน้ำยางซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสารเมตาบอริซึมเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ สารเมตาบอริซึมที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมานั้นเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้น้ำยางเกิดการเสียสภาพ เพื่อเป็นการป้องกันการเสียสภาพของน้ำยางจึงได้มีการศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดปรากฏการณ์บูดเน่าดังกล่าว

มีการรายงานถึงกลไกที่ทำให้เกิด spontaneous coagulation ไว้ 2 แบบ ดังนี้

- กลไกที่ 1 เป็นกลไกที่เกิดจากผลของความเป็นกรด (acidity) ของน้ำยางที่เปลี่ยนแปลงเมื่อสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กละเอียดต่าง ๆ ทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากส่วนที่ไม่ใช่ยางในน้ำยาง (non-rubber components) เช่น แบคทีเรียหายใจใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในน้ำยางแล้วเปลี่ยนน้ำตาลเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเมื่อละลายน้ำแล้วมีฤทธิ์เป็นกรดจึงทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำยางลดลงไปด้วย

- กลไกที่ 2 เป็นกลไกที่เกิดจากการไฮโดรไลซิสของไขมันต่าง ๆ ที่มีอยู่ในน้ำยางธรรมชาติทำให้ปริมาณของกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้น จึงส่งผลให้ความเสถียรของน้ำยางลดลง อันเนื่องมาจากความเป็นกรดของน้ำยางเพิ่มขึ้น

ชนิดของแบคทีเรียโดยทั่วไปสามารถจำแนกออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ดังนี้

1. แบคทีเรียชั้นต่ำ

แบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular) ซึ่งจะแบ่งออกได้เป็นกลุ่มย่อย ๆ ตามลักษณะรูปร่างดังนี้

1.1 Cocci : เซลล์จะมีลักษณะเป็นทรงกลม (spherical) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 μm

1.2 Bacilli : เซลล์จะมีลักษณะเป็นแท่ง (rod)

1.3 Vibrios : เซลล์มีลักษณะที่เรียกว่า curved – rod

1.4 Spirilla : ลักษณะเซลล์จะเป็นแบบเกลียวไม่ยืดหยุ่น

1.5 Spirochaetes : จะมีลักษณะเป็น filament ที่ยืดหยุ่นและบาง และอาจมีลักษณะเป็นเกลียว

2. แบคทีเรียชั้นสูง

แบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีส่วนที่เรียกว่า filament และสามารถเติบโตจนเป็น mycelium และจะมีเซลล์เฉพาะสำหรับการสืบพันธุ์

ในปัจจุบันนี้วิธีการจำแนกชนิดของแบคทีเรียนั้นสามารถทำได้หลายวิธีเช่น

1. การจำแนกโดยใช้ความแตกต่างในเรื่องของ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) และปฏิกิริยการติดสี (Staining Reaction) วิธีนี้มักใช้ในการจำแนกแบคทีเรียในขั้นเริ่มต้น โดยจะสามารถจำแนกได้คร่าว ๆ ตามกลุ่มทางชีวภาพซึ่งวิธีการย้อมติดสีหรือที่เรียกว่า Gram-Stained ก็เป็นวิธีหนึ่งที่จะทำให้ทราบถึงลักษณะขนาด รูปร่าง และกลุ่มของแบคทีเรียได้ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ใช้บอกลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ไม่แน่ชัดนัก ดังนั้นจึงมีการปรับเปลี่ยนวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวต่อไป

2. วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (cultural characters) หลักการของวิธีนี้คือ อาศัยการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่แตกต่างกันในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ซึ่งเชื้อที่เจริญเติบโตจะสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดยอาหารเลี้ยงเชื่อนั้นมีอยู่หลายชนิดและในการเลี้ยงเชื้อจะทำได้ในหลายสภาวะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ ซึ่งเชื้อแต่ละชนิดก็ต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตต่างกันและหลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อแล้ว แบคทีเรียแต่ละชนิดก็จะเจริญเติบโตได้เป็นโคโลนีในอัตราที่ต่างกันและลักษณะภายนอกที่มองเห็นก็จะแตกต่างกัน

3. การจำแนกโดยอาศัย Biochemical Reaction การจำแนกวิธีนี้ใช้กับแบคทีเรียที่ไม่สามารถทำการจำแนกด้วย 2 วิธีแรกได้ โดยอาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมี ยกตัวอย่างเช่น การหมักเชื้อโดยใช้แหล่งของคาร์โบไฮเดรตที่แตกต่างกัน โดยวิธีนี้จะอาศัยหลักการ การเกิดกรดขึ้นระหว่างแบคทีเรียกับน้ำตาลและใช้การเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์เป็นตัวจับการเปลี่ยนแปลง อีกกรณีหนึ่งที่สามารถใช้ตรวจจับการเกิด Biochemical reaction ได้คือการติดตามก๊าซที่เกิดขึ้นโดยการวัดด้วยฟองอากาศ เป็นต้น

4. Antigenic characters วิธีนี้จะเป็นวิธีที่สามารถบอกสปีชีส์และชนิดของแบคทีเรียได้โดยอาศัยปฏิกิริยาที่เรียกว่า antibody reaction โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นปฏิกิริยาเฉพาะเนื่องจากแบคทีเรียแต่ละ species จะมี antibody ที่แตกต่างกันทำให้เกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน

5. Typing of Bacteria : Bacteriophage Sensitivity วิธีนี้ใช้กับแบคทีเรียเฉพาะกลุ่มที่เป็น pathogenic เท่านั้น

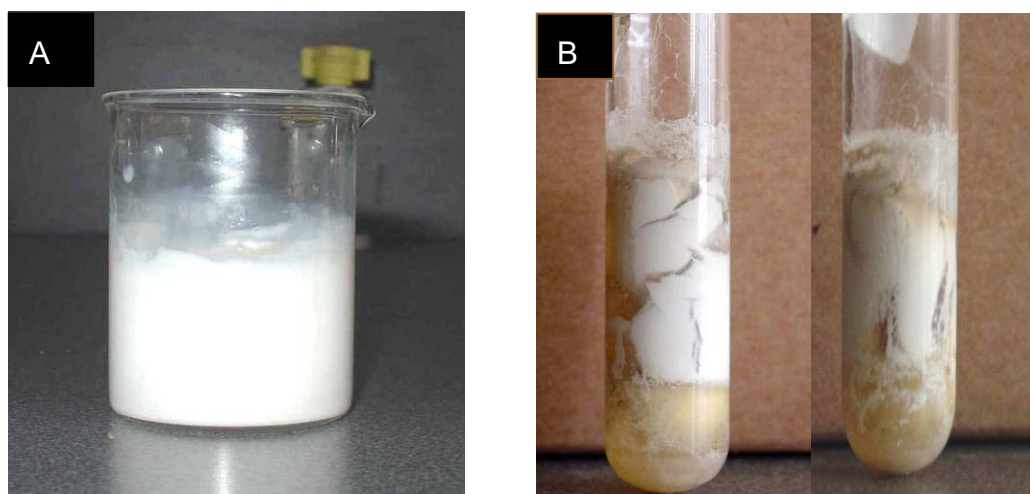
6. Animal Pathogenicity วิธีนี้จะใช้กับแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคหรือเจริญเติบโตได้ในเนื้อเยื่อของสัตว์

7. Antibiotic sensitivity วิธีนี้เป็นการทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในสารอาหารที่มี antibiotic และ chemotherapeutic agents ในปริมาณต่าง ๆ กันผสมอยู่

จากวิธีการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่กล่าวมาทั้งหมด แต่ละวิธีจะจำแนกแบคทีเรียได้ต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ที่ต้องการศึกษา วิธีที่สมควรเลือกใช้ในกรณีที่ต้องการทราบชนิดของแบคทีเรียคร่าว ๆ คือวิธีที่ 2 เพราะเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากและสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการโดยเสียค่าใช้จ่ายน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีอื่น ๆ

จากงานวิจัยอื่น ๆ ทางจุลชีวเคมีที่ผ่านมามีการค้นพบเชื้อแบคทีเรียในน้ำยางซึ่งอยู่ในกลุ่มของ *Micrococcus luteus* และ *Aerobacter aerogenes* ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด nutrient agar

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับสาเหตุของการก่อให้เกิดการบูดเน่าของน้ำยางธรรมชาติว่าเกิดจากแบคทีเรียกลุ่มใด ดังนั้นจึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการศึกษากลุ่มของแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำยางว่าเป็นชนิดใด เพื่อนำมาพัฒนาประยุกต์ใช้สารเคมีที่เป็น Bactericide ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการบูดเน่าของน้ำยางธรรมชาติ



รูปที่ 1 A น้ำยางสดที่กรีดได้จากต้น B น้ำยางสดหลังจากทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเวลา 2 วัน

ในปัจจุบันการกรีดน้ำยางของชาวสวนจะมีการเติมสารนอมน้ำยาง คือ แอมโมเนียร่วมกับของผสมระหว่างซิงค์ออกไซด์และเตตระเมทิลไดซัลไฟด์ไทยูแรม เพื่อรักษาสุขภาพของน้ำยางสด โดยมีผลทำให้น้ำยางไม่เกิดการจับตัวและป้องกันกลิ่นเหม็นก่อนที่จะส่งไปยังโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำยางข้น แต่อย่างไรก็ตามสารเคมีที่ใช้ยังมีข้อเสียเกี่ยวกับความเป็นพิษที่เป็นอันตรายต่อผู้ใช้

สำหรับสารทนนมน้ำยาที่ดีควรมีสมบัติดังนี้

1. ควรมีความสามารถในการทำละลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กต่าง ๆ ได้
 2. ควรมีความสามารถเพิ่มความเสถียรของน้ำยาได้โดย
 - เพิ่มประจุไฟฟ้าที่ผิวหน้าที่อยู่ระหว่างผิวอนุภาคยากกับชั้นซีรัม
 - เพิ่มความสามารถในการจับติดของโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ชอบน้ำ (Hydrophilic macromolecules) บนผิวอนุภาคยาก เพื่อให้เกิดความเสถียรเนื่องจากความเกะกะ (steric stabilization)
 - เพิ่มความสามารถในการไฮเดรชันของโมเลกุลน้ำที่ผิวอนุภาคยากได้
 3. ควรมีความสามารถในการลดความว่องไวของไอออนของโลหะบางชนิดที่มีเพียงเล็กน้อยในน้ำยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งไอออนที่มีประจุบวกมาก โดยอาจจะช่วยให้เกิดการกำจัดหรือตกตะกอนโลหะต่าง ๆ ให้อยู่ในรูปของเกลือที่ไม่ละลายน้ำ โดยมีข้อมูลว่า
 - ไอออนของโลหะบางชนิดมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กในน้ำยา ซึ่งทำให้น้ำยาจับตัวและเกิดการบูดเน่ามีกลิ่นเหม็น
 - ไอออนของโลหะบางชนิดมีผลต่อความเสถียรของน้ำยา โดยเฉพาะไอออนของแมกนีเซียม
 4. ต้องไม่เป็นสารที่เป็นอันตรายต่อทั้งน้ำยาและผู้ใช้ยา
 5. ต้องไม่ทำให้น้ำยาหรือฟิล์มยางเกิดการเปลี่ยนสี
 6. ต้องไม่ทำให้น้ำยามีกลิ่น
 7. ต้องไม่มีสารที่รบกวนกระบวนการผลิตน้ำยาและผลิตภัณฑ์ทางน้ำยา
 8. ควรมีราคาไม่แพงและอยู่ในรูปที่ง่ายต่อการใช้งาน
- สำหรับหน้าที่ที่สำคัญของแอมโมเนียที่เติมลงไปในน้ำยามีดังนี้

1. ทำลายแบคทีเรีย (bactericide)

จากการศึกษาของโลวี (Lowe พบว่าปริมาณแอมโมเนียที่มากกว่า 0.35% โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักจะทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโต แต่ถ้าใช้ปริมาณแอมโมเนียที่น้อยกว่า 0.05% โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก กลับเป็นการส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและความเข้มข้น 0.1% โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก พบว่าอัตราการเพิ่มและการลดลงของแบคทีเรียเท่ากัน

2. ทำหน้าที่เป็นด่างรักษาระดับความเป็นกรด-ด่างของน้ำยา

3. ช่วยในการตกตะกอนไอออนของโลหะบางชนิด เช่น แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) โดยทำปฏิกิริยาร่วมกับออร์โทฟอสเฟตแอนไอออน (orthophosphate anion) ได้เป็น แมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟต (magnesium ammonium phosphate) ที่ตกตะกอนลงมาพร้อมกับพวกดินทรายที่ปะปนมาในน้ำยา

นอกจากนี้แอมโมเนียยังเป็นสารเคมีที่ระเหยได้ง่าย จึงกำจัดได้ง่ายและไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์มากนักถ้าไม่สูดดมเข้าไปในปริมาณที่มากหรือสัมผัสสารละลายแอมโมเนียที่เข้มข้น สำหรับน้ำยางหรือฟิล์มยางจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสี

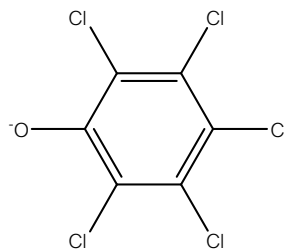
สำหรับข้อเสียของแอมโมเนียที่ใช้เป็นสารนอมน้ำยางที่สำคัญ ได้แก่

1. ทำให้น้ำยางมีกลิ่นฉุนแรงมาก
2. แอมโมเนียมีผลกระทบต่อกระบวนการผลิตน้ำยางข้นคือ ทำให้น้ำยางหนืดขึ้น

เนื่องจากไฮดรอกไซด์ไอออน (OH^-) จากแอมโมเนียทำปฏิกิริยากับสารประกอบซิงค์ในน้ำยาง โดยเฉพาะซิงค์ออกไซด์ กลายเป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้ความหนืดของน้ำยางเพิ่มขึ้น

นอกจากแอมโมเนียแล้วยังมีสารนอมน้ำยางอีกหลายชนิดได้แก่

1) Pentachlorophenate



Pentachlorophenate ถูกใช้เป็นสารนอมน้ำยางตั้งแต่ปี ค.ศ. 1938 โดยใช้ร่วมกับแอมโมเนีย เนื่องจากเป็น bactericide ที่ดีมาก โดยปริมาณที่ใช้คือ 0.2% w/w sodium pentachlorophenate ร่วมกับ 0.2% แอมโมเนีย แต่ในปัจจุบันสารตัวนี้จัดว่าเป็นสารที่เป็นพิษ น้ำยางที่รักษาสภาพด้วยสารตัวคู่นี้จะมีสีที่เปลี่ยนไป เมื่อเก็บน้ำยางไว้เป็นเวลานาน

2) Zinc dialkyldithiocarbamate

มักใช้ร่วมกับ 0.2% w/w แอมโมเนีย, 0.1-0.2% w/w Zinc dialkyldithiocarbamate และ 0.2% w/w lauric acid

3) Aminophenol เช่น ethylenediamine tetraacetate

สารชนิดนี้มีหน้าที่หลักคือเป็น bactericide เมื่อใช้ร่วมกับ 0.2% w/w แอมโมเนีย แต่มีข้อเสียคือ ทำให้น้ำยางเปลี่ยนแปลงสีเมื่อเก็บไว้ ถึงแม้จะมีรายงานบางฉบับอ้างว่าการเติม ZnO ก็จะสามารถช่วยลดปัญหาเรื่องนี้ได้ก็ตาม แต่ก็ไม่นิยมใช้กันมากนัก

4) Boric acid

เริ่มมีการใช้ boric acid ในปี 1960 โดย Sekaran และ Morris โดยใช้ร่วมกันกับ 0.2% w/w แอมโมเนีย 0.2% w/w boric acid และ 0.5% w/w lauric acid ข้อดีของ boric acid คือ เป็น bactericide ที่ดี ไม่ทำให้น้ำยางเปลี่ยนสี ไม่มีผลต่ออัตราการวัลคาไนซ์ยาง นอกจากนี้ boric acid ยังมีราคาถูก อยู่ในรูปที่สะดวกต่อการใช้งานและยังจัดว่าเป็นสารเคมีที่เป็นอันตรายน้อยมากต่อมนุษย์ แต่ในทางปฏิบัติไม่มีการใช้ boric acid แต่ก็ยังไม่มีเหตุผลใดที่ยืนยัน

5) Tetraalkylthiuram Sulphide

ชนิดที่ใช้กันมากที่สุดคือ tetramethylthiuram disulphide (TMTD) โดยมีสิทธิบัตรฉบับแรกที่สำคัญของ Ten Brock เมื่อปี ค.ศ. 1959 ที่อ้างถึงการใช้ TMTD ในปริมาณที่น้อยกว่า 0.5% w/w และ ZnO ไม่มากกว่า 0.02% w/w ร่วมกับ 0.2% w/w แอมโมเนีย ในการรักษาน้ำยางชั้นชนิดแอมโมเนียต่ำ (Low-ammonium latex) หรือ LATZ

ต่อมา Calvert ได้พยายามเสนอวิธีการผลิตน้ำยางที่มีปริมาณแอมโมเนียที่ต่ำมากหรือที่เรียกว่า Ultra low-ammonia latex ซึ่งได้เสนอไว้ 2 วิธี คือ

- ULAZN latex โดยใช้ 0.10% w/w แอมโมเนีย ร่วมกับ 0.08% w/w TMTD และ 0.02% ZnO
- KLAZN latex โดยใช้ 0.05% w/w แอมโมเนีย ร่วมกับ 0.10% w/w TMTD และ 0.02% ZnO และ 0.10% w/w KOH

เหตุผลที่ยังต้องเติมแอมโมเนียเนื่องจากต้องใช้ในการตกตะกอน Mg^{2+}

6) ฟอर्मาลดีไฮด์และแอมโมเนีย

ฟอर्मาลดีไฮด์จัดว่าเป็น bactericide ที่ดีมากและถือว่าดีกว่าแอมโมเนียด้วย การใช้ฟอर्मาลดีไฮด์เพื่อสเตรอไลซ์น้ำยางก่อนเติมแอมโมเนียเรียกว่า McGavack system of preservation

โดยปกติจะมีการเติมฟอर्मาลดีไฮด์ 0.15-0.2% w/w ในน้ำยางที่กรีดได้ทันทีเพื่อทำลายแบคทีเรียให้เร็วที่สุด พบว่าน้ำยางสามารถเก็บไว้ได้นานถึง 15-30 ชั่วโมง โดยไม่เติมสารใด ๆ ก่อนถูกนำมาส่งโรงงานผลิตน้ำยางชั้น ในขณะที่ฟอर्मาลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับโปรตีนในน้ำยาง ทำให้ pH ของน้ำยางลดลง จึงต้องอาจต้องทำการเติมแอมโมเนียเพื่อปรับ pH ให้เพิ่มเป็นประมาณ 6 แล้วทำการปั่นน้ำยางให้ได้เป็นน้ำยางชั้น แล้วทำการปรับปริมาณแอมโมเนีย เชื่อกันว่าน้ำยางชนิดนี้มี colloidal stability ที่ดีมาก และยังทนต่อความเย็นได้ดีมากด้วย แต่ยังไม่เห็นเหตุผลอธิบายว่าทำไมอย่างไรก็ตามน้ำยางชนิดนี้ไม่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมผลิตโฟมยาง เนื่องจากว่าโปรตีนถูกทำลาย (denaturation) โดยฟอर्मาลดีไฮด์แล้ว จึงมีผลให้ foaming characteristics ของน้ำยางเสียไป

7) โซเดียมซัลไฟด์

มักใช้โซเดียมซัลไฟด์เป็นสารป้องกันการแข็งตัว หรือ anticoagulant โดยเติมลงไปในถ้วยหรือภาชนะเก็บน้ำยางหลังการกรีดใหม่ ๆ วิธีการนี้นิยมมากในกรณีที่จะนำน้ำยางดังกล่าวมาทำเป็นยางแผ่นแห้งแบบ pale crepe เนื่องจากจะทำให้ยางที่มีสีสวຍไม่คล้ำ เนื่องจากโซเดียมซัลไฟด์ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยปริมาณที่ใช้คือประมาณ 0.05% w/w

8) โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์

โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นสารเคมีที่สำคัญในการใช้ทดแทนแอมโมเนียได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะน้ำยางชั้นที่เตรียมได้จากวิธี Evaporation ให้เป็นน้ำยางชั้น 75% เนื่องจากต้องใช้ความร้อนช่วยในการระเหยน้ำในกระบวนการผลิตน้ำยางชั้น จึงต้องใช้โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์แทนแอมโมเนีย เนื่องจากแอมโมเนียสามารถระเหยไปได้ระหว่างการผลิตโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์จัดว่าเป็น bactericide ที่ดี เนื่องจากสมบัติความเป็นด่างที่แรง นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยรักษาคอลลอยด์น้ำยางได้ดีมากด้วยและปัญหาเรื่อง thickening ของน้ำยางก็ไม่มีเมื่อใช้โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์

9) สารชนิดอื่น ๆ

- Thiobis halogenaphenols เช่น 2,2-thiobis-(4,6-dichlorophenol) จัดว่าเป็น antibiotics ที่ดี สารชนิดนี้ได้รับการจดสิทธิบัตรในปี ค.ศ. 1962 โดย Graham และ Taysum โดยใช้เพียง 0.001% w/w น้ำยางที่เติมสารชนิดนี้จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีถึงแม้เก็บไว้นานก็ตาม

- cis-1-(3-chloroallyl)-3,5,7-triaza-1-azoniaadamantane chloride สารชนิดนี้จะมีความประสิทธิภาพดีมากถึงแม้จะไม่ต้องใช้ร่วมกับแอมโมเนียก็ตาม แต่เป็นสารที่อันตรายมากจึงไม่นิยมใช้

อย่างไรก็ตามยังมีงานวิจัยที่ได้จดสิทธิบัตรเกี่ยวกับการรักษาสภาพน้ำยางโดยใช้สารเคมีชนิดต่าง ๆ อยู่มากมาย ดังจะกล่าวต่อไป

- ปี ค.ศ. 1976 Palcher; Joseph john ได้จดสิทธิบัตรการใช้สารประกอบซิลิโคนในการใช้เป็นสารรักษาความเสถียรน้ำยางธรรมชาติและน้ำยางสังเคราะห์
- ปี ค.ศ. 1978 Malaysia Rubber Research Institute ได้จดสิทธิบัตรการใช้สารประกอบไดซัลไฟด์ ร่วมกับซิงค์ออกไซด์ในน้ำยางที่เติมอัลคาไลประมาณ 0.05% ถึง 1.0% โดยน้ำหนัก
- ปี ค.ศ. 1979 โดย Malaysia Rubber Research Institute ได้จดสิทธิบัตรการใช้ nonionic surfactant ร่วมกับแอมโมเนีย
- ปี ค.ศ. 1998 โดย Ong, C.O. ได้จดสิทธิบัตรการใช้สารประกอบเอมีนร่วมกับน้ำยางที่เติม TMTD และซิงค์ออกไซด์

จากที่กล่าวมาทั้งหมด จะเห็นว่ามีปัจจัยเกี่ยวกับการรักษาสภาพน้ำยางด้วยวิธีใหม่มาเป็นเวลานานแล้ว แต่อย่างไรก็ตามสารเคมีที่ใช้อย่างมีข้อเสียเกี่ยวกับความเป็นพิษที่เป็นอันตรายต่อผู้ใช้นั้นในสภาพการณ์ปัจจุบันของการใช้งานจริงมีเฉพาะแอมโมเนียที่ใช้ในการรักษาสภาพน้ำยางซึ่งมักจะเติมในปริมาณ 0.3 – 0.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ขึ้นกับระยะเวลาที่ต้องการใช้รักษาสภาพ โดยถ้าใช้ร่วมกับสารที่ใช้ฆ่าเชื้อแบคทีเรียชนิดเตตระเมทิลไดซัลไฟด์ไทยูแรมและซิงค์ออกไซด์ จะสามารถลดแอมโมเนียลงได้เป็น 0.2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

อย่างไรก็ตามวิธีรักษาสภาพดังกล่าวยังมีข้อเสีย คือ แอมโมเนียสามารถระเหยได้ง่ายซึ่งมีความเป็นพิษต่อทั้งมนุษย์และสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังทำให้อุปกรณ์หรือส่วนต่าง ๆ ของเครื่องจักรในโรงงานเกิดการสึกกร่อนได้ง่าย

สำหรับเตตระเมทิลไดซัลไฟด์ไทยูแรมนั้น จัดว่าเป็นสารก่อมะเร็งประเภทไนโตรซามีน (carcinogen nitrosamines) ชนิดหนึ่งที่สำคัญมากซึ่งนับว่าเป็นปัญหาที่สำคัญต่อผู้บริโภคน้ำยางเป็นอย่างมาก โดยมักจะถูกนำมาเป็นสาเหตุให้มีการใช้น้ำยางธรรมชาติลดลง นอกจากนี้ยังทำให้ผลิตภัณฑ์จากน้ำยางเกิดการเปลี่ยนสีด้วย สำหรับซิงค์ออกไซด์นั้นทำให้ความเสถียรของน้ำยางเสียได้ง่ายเนื่องจากทำให้น้ำยางเหนียวขึ้น โดยเฉพาะน้ำยางที่มีการเติมแอมโมเนีย อย่างไรก็ตามได้มีการวิจัยของที่ปรึกษาทางด้านเทคนิคของ บริษัทที่แนะนำเกี่ยวกับการรักษาสภาพโดยใช้สารชนิดใหม่ทดแทน TMTD ในน้ำยาง เช่น Struktol LB 219 ซึ่งทำให้ปริมาณ carcinogen nitrosamines ที่น้อยมากและยังช่วยรักษาความเสถียรของน้ำยางได้ค่อนข้างดีมาก และสมบัติต่าง ๆ ของยางก็ไม่ต่างไปจากที่ใช้การรักษาสภาพด้วย TMTD แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่แพร่หลายในอุตสาหกรรมยางเพราะเป็นสารเคมีที่ใช้เฉพาะบริษัทเท่านั้น ในปัจจุบันน้ำยางที่มีการเติมเตตระเมทิลไดซัลไฟด์ไทยูแรมและซิงค์ออกไซด์ที่ส่งออกมามีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมที่จะนำน้ำยางไปใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ที่ผู้ซื้อต้องมีการสัมผัสโดยตรงขณะใช้ เช่น จุกนมยางเด็ก ของเล่นเด็ก เป็นต้น เนื่องจากเชื่อว่าจะเป็นสาเหตุให้เกิดโรคมะเร็งในผู้ใช้งาน

ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาหาสารทดแทนน้ำยางชนิดใหม่ทดแทนการใช้ TMTD/ZnO ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน เพื่อให้แพร่หลายในอุตสาหกรรมและลดความเป็นอันตรายที่มีต่อผู้ผลิตและผู้บริโภคผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ สำหรับงานวิจัยนี้ยังคงมีการใช้แอมโมเนียในปริมาณเท่ากับที่ใช้อยู่ในปัจจุบันร่วมกับสารทดแทนน้ำยางชนิดใหม่ เนื่องจากแอมโมเนียเป็นสารที่ระเหยได้ง่ายไม่ตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์

วิธีการทดลอง

ตอนที่ 1 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการบูดเน่าของน้ำยางธรรมชาติ วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้น้ำยางสดเสียสภาพ

วิธีทดลอง

- แยกเชื้อจากน้ำยางธรรมชาติโดยวิธี pour plate ที่ระยะเวลาต่างๆ จนกระทั่งน้ำยางบูดเน่า
- แยกเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดโดยวิธี streak plate เพื่อทำการแยกให้เป็น colony เดี่ยวๆ
- บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 วัน
- นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาศึกษาลักษณะของแบคทีเรียโดยวิธี Wet mount ^(*)
- ตรวจสอบคุณสมบัติในการติดสีของแบคทีเรียโดยการย้อมสีแบบแกรม (gram stain) ^(*)
- ศึกษาความต้องการออกซิเจนของแบคทีเรียโดยวิธี Agar shake method ^(*)
- ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและแบบแผนการเจริญของแบคทีเรีย ^(*)
- Identify แบคทีเรียที่แยกได้โดยการวิเคราะห์จากลำดับ DNA ด้วยเทคนิค DNA sequences และเทคนิค test Kit

หมายเหตุ ^(*) เป็นวิธีการตรวจสอบลักษณะของแบคทีเรียเบื้องต้นก่อนที่จะใช้วิธีการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียโดยเทคนิค DNA sequences และเทคนิค test kit จากคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ

วิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำยางธรรมชาติโดยวิธี Pour plate

- นำน้ำยางธรรมชาติมาทำ serial dilution ที่ระยะเวลาต่างๆ จนกระทั่งน้ำยางบูดเน่า
- นำแต่ละ dilution (ความเข้มข้น 10^{-5} - 10^{-6} ของปริมาตรน้ำยางเริ่มต้น) เทลงใน petridish
- เท nutrient agar (อุณหภูมิประมาณ 45°C) ผสมกับ dilution ข้างต้นโดยการหมุนจานไปมาให้ส่วนผสมเข้ากันดีกับอาหาร ระวังอย่าให้กระฉอกไปติดฝาจาน
- ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งวันแข็งตัวแล้วจึงกลับจานเพื่อป้องกันมิให้น้ำที่ติดฝาจานหยดลงบนวัน
- บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 วัน

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar โดยชั่ง Meat extract 3 g, peptone 5 g ผสมในน้ำกลั่น 1,000 ml คนให้ละลายเข้ากันดีเติม agar 15 g ตั้งไฟจนเดือดและ agar หลอมละลายหมด บรรจุลงในขวด screw cap medium bottle นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและมีอุณหภูมิลดลงจนถึงประมาณ 45°C มาเทใส่จานเพาะเชื้อ (Petri dish) ที่ปราศจากเชื้อจานละ 15-20 ml ทิ้งไว้ให้แข็งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

วิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Streak plate technique

1. ใช้ห้วงถ่ายเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อไปป้ายบนผิวอาหารวุ้น (Nutrient agar) ในจานที่เตรียมไว้ที่ตำแหน่งแรก
2. ลากเชื้อตามแนวที่ 1 (First streak)
3. นำห้วงถ่ายเชื้อไปลงไฟ
4. นำห้วงถ่ายเชื้อไปลากเชื้อจากแนวที่ 1 (First streak) ไปตามแนวที่ 2 (Second streak) นำห้วงถ่ายเชื้อไปลงไฟ
5. นำห้วงถ่ายเชื้อไปลากเชื้อจากแนวที่ 2 (Second streak) ไปตามแนวที่ 3 (Third streak)
6. เอาห้วงถ่ายเชื้อไปลงไฟฆ่าเชื้อปล่อยให้เย็นลง
7. เก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อในตู้เพาะเชื้ออุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2-3 วัน



รูปที่ 2 ลักษณะการทำ Streak plate

การเตรียมสไลด์โดยวิธี Wet mount

1. ใช้ห้วงถ่ายเชื้อและน้ำมาแตะลงบนสไลด์ที่สะอาด 1 หยด
2. ใช้ห้วงถ่ายเชื้อและเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อโดยวิธี Aseptic technique มาผสมกับหยดน้ำบนสไลด์แล้วฆ่าเชื้อบนห้วงถ่ายเชื้อก่อนที่จะวางห้วงถ่ายเชื้อลง
3. ปิดแผ่นปิดสไลด์ลงบนหยดน้ำ
4. ใช้กระดาษซับน้ำที่มากเกินไปออก
5. นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยายต่างๆ
6. สังเกตลักษณะของแบคทีเรียที่แยกได้

การนำเชื้อออกจากหลอดทดลองโดยวิธี Aseptic technique

1. ถือห้วงถ่ายเชื้อระหว่างนิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้ของมือขวา
2. ทำให้ห้วงปราศจากเชื้อโดยนำไปเผาด้วยเปลวไฟจากตะเกียงให้ร้อนแดงประมาณ $\frac{3}{4}$ ของความยาว
3. ทิ้งไว้ให้เย็นสักครู่ (ประมาณ 10-15 วินาที)
4. ใช้นิ้วก้อยของมือขวายึดจุดสำคัญของหลอดทดลองไว้พร้อมๆ กับถือนหลอดทดลองในมือซ้าย
5. ดึงจุดสำคัญออกโดยการบิดไม่ให้ดึงออกโดยตรง ถ้าเป็นขวดฝาเกลียวให้เปิดฝาดึงออกโดยใช้ นิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้ของมือซ้าย
6. ลนปากหลอดทดลองอย่างรวดเร็วบนเปลวไฟ
7. สอดห้วงถ่ายเชื้อลงไปในหลอดและแตะเชื้อที่ขึ้นอยู่เบาๆ
8. ดึงห้วงถ่ายเชื้อออกจากหลอดโดยไม่ให้สัมผัสกับผิวในหลอดและเอาปากหลอดลนไฟอย่างรวดเร็ว
9. ใส่จุดสำคัญลงไปพร้อมทั้งปิดฝาให้แน่น ถ้าเป็นขวดฝาเกลียวให้ใช้นิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้ที่ถือฝาขวดไว้ปิดฝาขวดให้แน่นอย่างเดิม

การย้อมสีแบบแกรม

วิธีเตรียมสไลด์

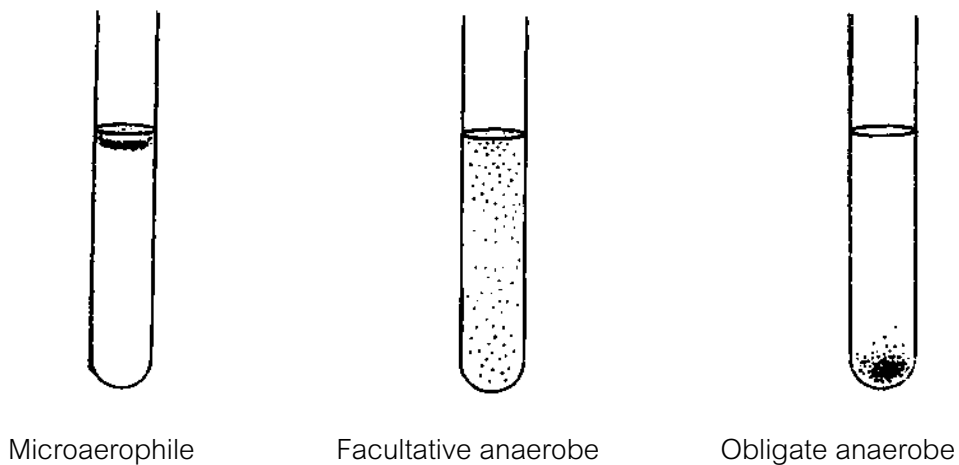
1. ใช้ห่วงถ่ายเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วโดยการลนกับเปลวไฟจากตะเกียงนำไปแตะเชื้อผสมกับหยดน้ำบนสไลด์ที่สะอาด
2. ละเลงเชื้อที่อยู่บนสไลด์ให้กระจายออกเป็นบริเวณบางๆ
3. ปล่อยสไลด์ทิ้งไว้ในอากาศให้แห้ง (Air dry)
4. ทำให้แบคทีเรียติดแน่นบนสไลด์โดยความร้อน (Heat-fixed) คือนำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟอ่อนๆ จากตะเกียง ถ้าลนไฟนานเกินไปจะทำให้เซลล์ไหม้ ลองเอาสไลด์ตะบับหลังมือถาสไลด์อุ่นๆ แสดงว่าใช้ได้
5. ปล่อยให้สไลด์เย็นลงแล้วนำไปย้อมสีแบบแกรม

วิธีย้อมสี

1. นำสไลด์มาวางบนที่ย้อม หยดน้ำยา Crystal violet ปล่อยทิ้งไว้นาน 1 นาที
2. เทสีออก ล้างด้วยน้ำก็อกที่ไหลอ่อนๆ แล้วหยดน้ำยาไอโอดีนทิ้งไว้นาน 1 นาที เพื่อให้สีติดดีขึ้น
3. ล้างด้วยน้ำก็อกที่ไหลอ่อนๆ สลัดน้ำออกจากสไลด์จนหมด
4. ใช้น้ำยาล้างสี (Decolorize) หยดให้ไหลผ่านสไลด์จนน้ำยาที่หยดผ่านไม่มีสีติดออกมาด้วย ขั้นนี้ใช้เวลา 3-10 วินาที ขึ้นอยู่กับความหนาบางของเชื้อที่ทาบนสไลด์ ระวังอย่าล้างสีออกมากเกินไปเพราะจะทำให้ผลที่ได้ผิดพลาด
5. ล้างด้วยน้ำอย่างรวดเร็ว สลัดน้ำออกจากสไลด์จนหมด
6. ย้อมด้วยสีย้อมควบคู่ (Counter stain) โดยใช้สี safranin O นาน 30-60 วินาที
7. ล้างออกด้วยน้ำ
8. ซับน้ำออกโดยใช้กระดาษทิชชูและปล่อยให้สไลด์แห้งสนิท ดูลักษณะการติดสีของแบคทีเรียด้วยหัวน้ำมันของกล้องจุลทรรศน์ แบคทีเรียที่เป็นแกรมบวกจะติดสีม่วงหรือสีน้ำเงินของ Crystal violet ส่วนพวกที่เป็นแกรมลบจะติดสีแดงหรือสีชมพูของ safranin O

การศึกษาความต้องการออกซิเจนของแบคทีเรียโดยวิธี Agar shake method

1. ใช้ห่วงถ่ายเชื้อจาก Nutrient agar นำไปใส่ลงในหลอดอาหารรุ้นที่หลอมเหลว
2. ปั่นหลอดโดยใช้ฝ่ามือทั้งสองข้างเพื่อผสมอาหารกับเชื้อให้เข้ากัน
3. ทำให้อาหารรุ้นแข็งตัวอย่างรวดเร็วโดยเปิดก๊อกให้น้ำไหลผ่านผิวนอกของหลอด
4. เช็ดหลอดให้แห้งแล้วนำไปใส่ตู้เพาะเชื้อ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
5. ตรวจสอบบริเวณที่มีการเจริญของเชื้อในแต่ละหลอดแล้วตรวจสอบว่าเชื้อที่ทดสอบจัดอยู่ในประเภทใดตามความต้องการออกซิเจน ดังแสดงในไดอะแกรม



รูปที่ 3 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียตามความต้องการออกซิเจน

การตรวจสอบลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย

ทำการเพาะแบคทีเรีย Unknown โดยวิธี streak plate technique บน nutrient agar plate ให้ได้โคโลนีที่แยกจากกัน นำจานไปใส่ตู้เพาะเชื้ออุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำเชื้อที่ขึ้นบนจานมาตรวจสอบดูลักษณะต่างๆ ของโคโลนี ดังต่อไปนี้

1. ขนาด (Size) ใช้ไม้บรรทัดวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี
2. สี (Pigmentation) ตรวจสอบสีของโคโลนี สีเกิดจากรงควัตถุที่แบคทีเรียผลิตขึ้นส่วนใหญ่มักไม่ละลายน้ำ ถ้าเป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำจะแพร่ไปตามเนื้ออาหารรุ้น

3. รูปร่าง (Form) ตรวจสอบรูปร่างโคโลนีว่าเป็นแบบใดต่อไปนี้

Circular	-โคโลนีที่มีรูปร่างกลม
Punctiform	-โคโลนีที่มีขนาดเล็ก แต่ยังเห็นได้ด้วยตาเปล่า
Irregular	-โคโลนีที่มีรูปร่างไม่แน่นอน
Spindle	-โคโลนีที่มีรูปร่างคล้ายกระสวย
Rhizoid	-โคโลนีที่แตกแขนงออกคล้ายราก

4. ขอบ (Margin) ตรวจสอบขอบของโคโลนีว่าเป็นแบบใดต่อไปนี้

Entire	-ขอบเรียบไม่มีรอยหยัก
Undulate	-ขอบเป็นคลื่นที่โค้งหรือเว้าเพียงเล็กน้อย
Lobate	-ขอบเป็นคลื่นที่โค้งหรือเว้ามาก
Serrate	-ขอบหยักคล้ายฟันเลื่อย
Filamentous	-ขอบเป็นเส้นๆ ยื่นออกจากโคโลนี

5. การยกของผิวหน้า (elevation) ตรวจสอบการยกตัวของผิวโคโลนีว่าเป็นแบบใดต่อไปนี้

Flat	-แบนไปตามผิวหน้าอาหาร
Raised	-เจริญขึ้นสูงจากผิวหน้าอาหารเล็กน้อย
Convex	-นูนโค้งจากผิวหน้าอาหาร
Umbonate	-นูนโค้งจากผิวหน้าอาหารและนูนโค้งเป็นปุ่มตรงกลาง

6. ผิวหน้า (Surface) ตรวจสอบผิวของโคโลนีว่าเป็นแบบใดต่อไปนี้

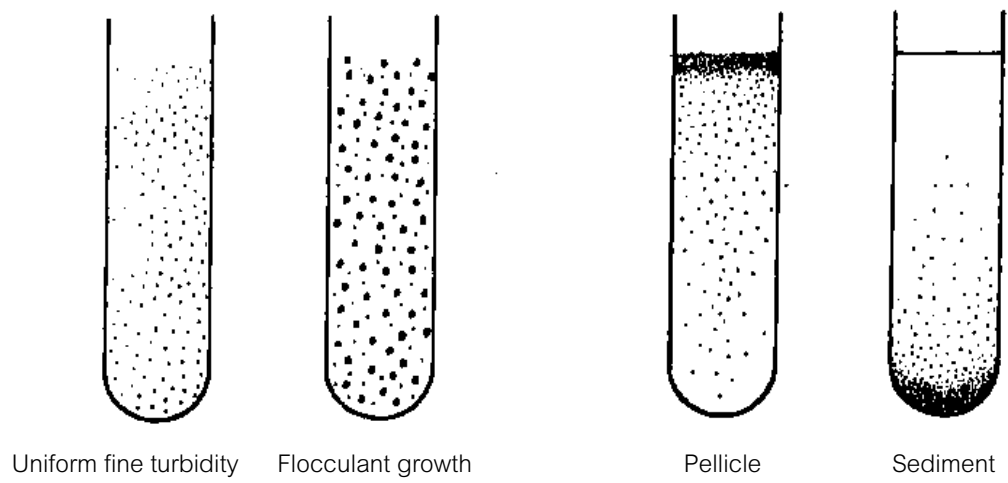
เรียบ (Smooth)	
ขรุขระ (Rough)	
ย่น (Rugose)	
เป็นวงแหวนซ้อนกันหลายชั้น (Concentrically ringed)	

การตรวจสอบลักษณะการเจริญของ Stroke culture

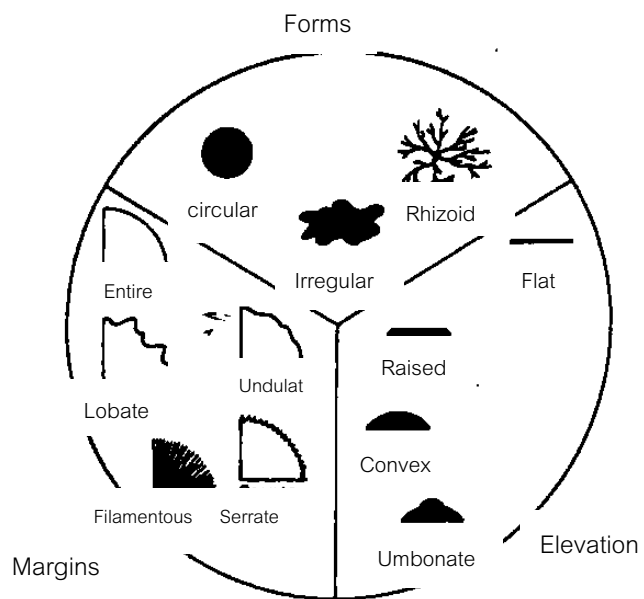
ใช้หัวหยดเชื้อเชิ้วเชื้อมาเพาะบน Nutrient agar slant โดยการลากเส้นตรงเพียงเส้นเดียว

นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อว่าเป็นแบบใดต่อไปนี้

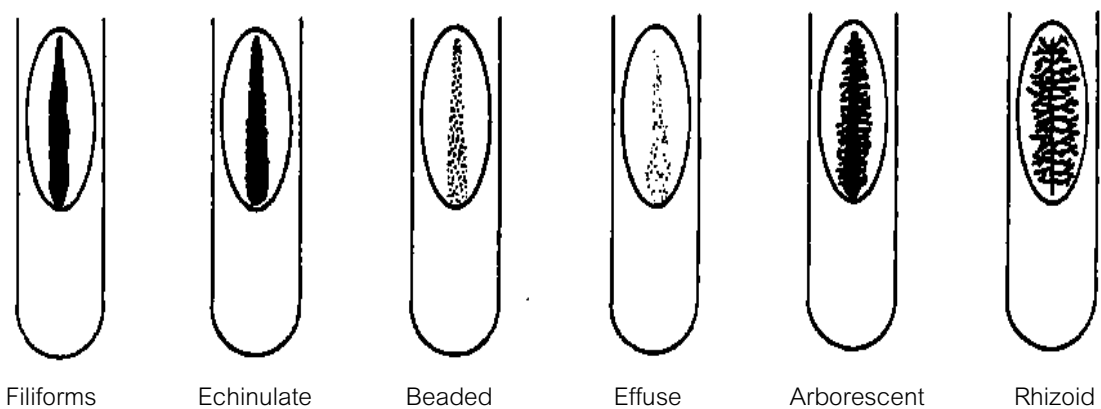
Filiform	-เจริญสม่ำเสมอตามแนวที่เพาะ ขอบเรียบ
Echinulate	-เจริญสม่ำเสมอตามแนวที่เพาะ ขอบไม่เรียบ
Beaded	-เจริญไม่สม่ำเสมอตามแนวที่เพาะแต่เป็นหย่อมคล้ายลูกบิด
Effuse	-มีการเจริญน้อยเป็นจุดๆ ตามแนวที่เพาะ
Arborescent	-เจริญแตกแขนงคล้ายต้นไม้
Rhizoid	-เจริญแตกแขนงคล้ายราก



รูปที่ 4 การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเหลว



รูปที่ 5 ลักษณะของโคโลนีแบคทีเรียบนอาหาร Nutrient agar



รูปที่ 6 ลักษณะการเจริญของ Stroke culture

วิธีการสกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรีย

1. ปั่นเก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียใส่ลงใน Micro centrifuge tubes ขนาด 1.5 มล. เติม DNAzol reagent จำนวน 0.3 มล. ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา
2. ปั่นเพื่อแยกเศษเซลล์ออกไปที่ความเร็วรอบ 10,000xg นาน 5 นาที
3. ย้ายส่วนใสใส่หลอด 1.5 มล. ใหม่ และตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 100% ethanol จำนวน 0.2 มล. (ประมาณ 1/2 ของปริมาตร DNAzol reagent) ผสมสารในหลอดให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
4. ปั่นเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็ว 12,000xg นาน 2 นาที
5. หลังจากปั่นแล้ว เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนดีเอ็นเอให้ทั่วด้วย 75% ethanol จำนวน 0.8 มล. นำไปปั่นที่ 12,000xg นาน 2 นาที
6. เทส่วนใสทิ้ง อบตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งพอประมาณและละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นหรือ 8mM NaOH จำนวน 20 μ l

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียโดยเทคนิค PCR

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย Tag DNA polymerase

1. เตรียมหลอดทดลองขนาด 0.5 มล. เพื่อเตรียมเป็น master mix โดยผสมสารต่างๆ ลงในหลอดตามตารางดังต่อไปนี้

ชนิดสาร	1 Reaction (μl)	3 Reaction (μl)	final concentration
น้ำกลั่นไร้เชื้อ	35	105	-
10X PCR buffer	5.0	15.0	1X
10 mM Dntp mix	1.0	3.0	0.2 mM each
50 mM MgCl ₂	1.5	4.5	1.5 mM
10 μM primer 1	1.0	3.0	0.2 μM
10 μM primer 2	1.0	3.0	0.2 μM
Tag DNA polymerase	0.25	0.75	1.25 units
ปริมาตรรวม	45.0	135.0	

2. เตรียมหลอดทดลองขนาด 0.2 มล. จำนวน 2 หลอด label ที่ฝาหลอดเป็นหมายเลข 1-2 และเติมสารต่างๆ ลงในหลอดทดลองดังนี้

ชนิดของสาร	หลอดที่ 1 (μl)	หลอดที่ 2 (μl)
Master Mix	45.0	45.0
ดีเอ็นเอแม่แบบ	-	5.0
น้ำกลั่น	5.0	-
ปริมาตรรวม	50.0	50.0

3. ผสมสารต่างๆ ให้เข้ากันและปั่นที่ความเร็วประมาณ 1,000xg ประมาณ 3 วินาที
4. นำหลอดทดลองใส่ในเครื่อง PCR ปิดฝาเครื่องและตั้งโปรแกรมดังต่อไปนี้

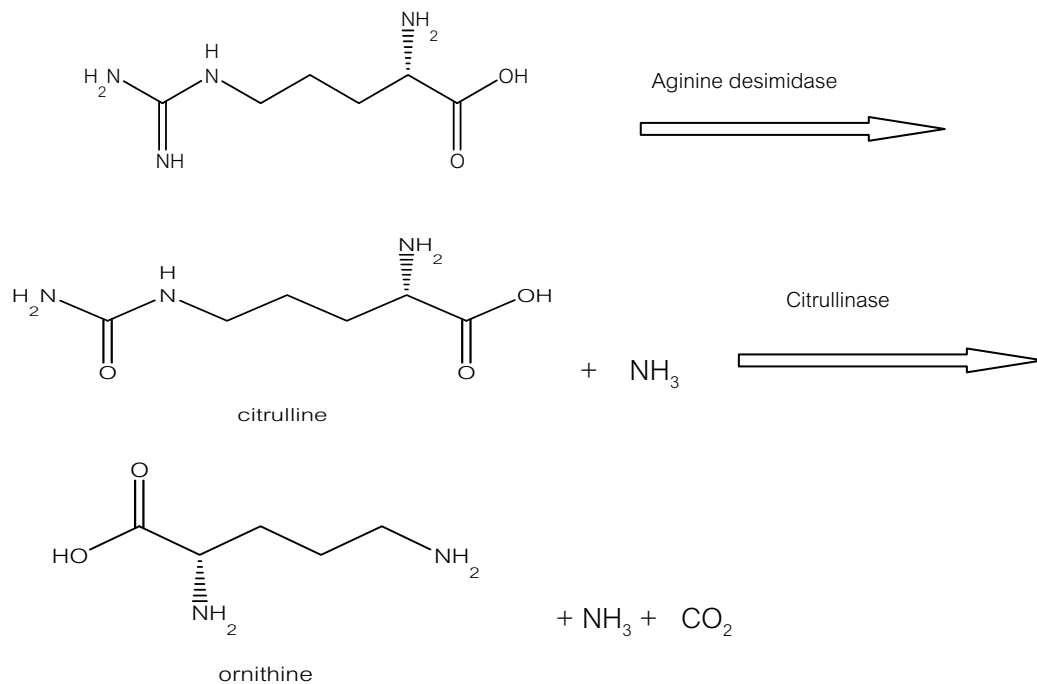
Pre-denaturation	94 องศาเซลเซียส	นาน 1 นาที	} 30 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	นาน 30 วินาที	
Annealing	55 องศาเซลเซียส	นาน 30 วินาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	นาน 1 นาที	
Final – extension	72 องศาเซลเซียส	นาน 10 นาที	

5. เมื่อปฏิกิริยา PCR สิ้นสุดแล้ว หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 10X loading dye (0.25% Bromophenol blue, 25% glycerol, 60 mM EDTA, pH 8.0) จำนวน 2 μ l ผสมกับ PCR product จำนวน 10 μ l ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis
6. เมื่อได้ปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการ นำไปหาลำดับดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องมือในการหาลำดับดีเอ็นเอ

วิธีการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียทางชีวเคมี

1. การทดสอบการย่อยอาร์จินิน (Arginine dihydrolase Test)

การทดสอบ arginine dihydrolase ของแบคทีเรียช่วยในการแยกแยะแบคทีเรียพวก pseudomonas enterobacter และ beta hemolytic streptococci การย่อยสลาย arginine ดังสมการ



วิธีทดสอบ

Moeller's Method

เตรียมอาหาร Moeller Decarboxylase broth base แล้วเติม 1 % L-arginine monohydrochloride และเตรียมอาหาร Moeller Decarboxylase broth base โดยไม่เติม L-arginine ไว้เป็นอาหารเปรียบเทียบ

1. ป้ายเชื้อลงในอาหารที่เติม Arginine และไม่เติม
2. เท Mineral oil ทับให้หนาประมาณ 4-5 มม. ลงในแต่ละหลอด
3. บ่มเชื้อที่ 35° C ตรวจผลภายใน 4 วัน

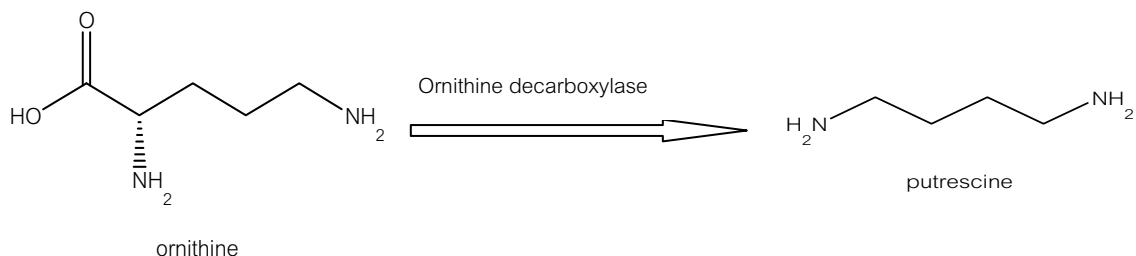
ผลบวก สีม่วงหรือสีแดง (หลอดเปรียบเทียบสีเหลือง)

ผลลบ สีเหลืองทั้ง 2 หลอด

2. การทดสอบดีคาร์บอกซิเลส (Decarboxylase Test)

เชื้อแบคทีเรียจะทำให้เกิด Decarboxylation ของกรดอะมิโน ซึ่งจะใช้คุณสมบัตินี้ในการแยกความแตกต่างระดับสกุลหรือชนิด เอนไซม์ decarboxylase จะย่อยสลายกรดอะมิโนได้ เอมีน และ CO₂ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้

ปฏิกิริยา Decarboxylation ของกรดอะมิโน ornithine ซึ่งใช้ในการแยกแบคทีเรียกลุ่ม enterobacteriaceae



วิธีทดสอบ

1. ป้ายเชื้อลงในอาหารที่มีกรดอะมิโน ornithine
2. ทำหลอดเปรียบเทียบโดยใช้อาหาร decarboxylase base ป้ายเชื้อลงไป
3. ถ้าเป็นอาหารเหลว เทพาราฟินทับทุกหลอด แล้วปิดจุกฝาเกลียวให้แน่น
4. บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง
5. ตรวจผลโดยดูการเปลี่ยนสีของอาหาร

ผลบวก หลอดที่มีกรดอะมิโนมีสีม่วง (หลอดเปรียบเทียบเป็นสีเหลือง)

ผลลบ สีเหลืองทั้ง 2 หลอด

3. การทดสอบการใช้ซิเตรท (Citrate Utilization Test)

การทดสอบการใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน นิยมใช้ในการแยกแบคทีเรียพวก gram negative bacilli ออกจากกัน

วิธีทดสอบ

1. ปักเชื้อลงบนอาหารวุ้นเคียง (Simmons' Citrate agar) โดยใช้เข็มเย็บทำเชื้อให้เป็นจุด (point inoculate)

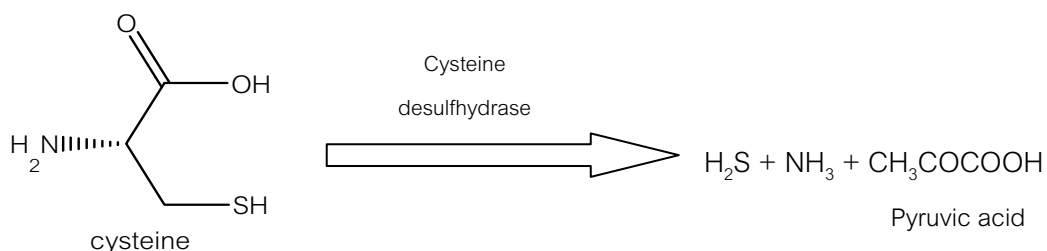
2. บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (สูงสุด 7 วัน)

ผลบวก มีการเจริญอาหารเปลี่ยนสีจากเขียวเป็นน้ำเงิน

ผลลบ ไม่มีการเจริญ สีของอาหารไม่เปลี่ยน

4. การทดสอบการสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide (H₂S) production Test)

แบคทีเรียบางชนิดอาจสร้าง H₂S จากสารอินทรีย์ที่มีอยู่ใน peptone หรือจากสารอินทรีย์ซัลเฟอร์ที่มีอยู่ในอาหาร การสร้าง H₂S จากสารอินทรีย์ใช้เอ็นไซม์ cysteine desulfhydrase จะย่อย cysteine ที่มีอยู่ใน peptone ดังสมการ



วิธีทดสอบ

1. ใช้เข็มเย็บเชื้อแต่ละเชื้อลงใน triple sugar iron agar slant โดยขีดไปมา (streak) ที่ผิวของอาหารพื้นเคียง (slant) แล้วแทงลง (stab) ลงไปที่ส่วนก้นหลอดเรียกว่า butt

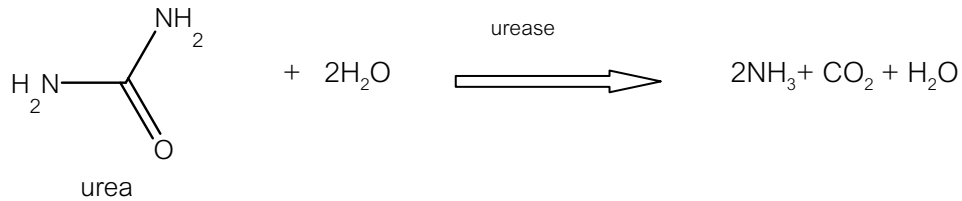
2. บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลทุกวันจนครบ 5 วัน สังเกตดูการเปลี่ยนสีของอาหารและดูการเกิดแก๊ส

ผลบวก เกิดสีดำตามรอยที่ปักเชื้อ

ผลลบ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

5. การทดสอบยูรีเอส (Urease Test)

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ urease โดยแบคทีเรียที่ใช้ในการจำแนกชนิดของ *Proteus* sp. แต่ก็ใช้กับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ด้วย ปฏิกริยาดังสมการ



วิธีทดสอบ

1. ปลุกเชื้อเป็นจุดลงบนอาหารอุ่นเอียงที่ใช้ทดสอบโดยใช้เชื้อที่มีอายุน้อย (18-24 ชม.) ด้วยปริมาณเล็กน้อย
2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ตรวจผลการทดสอบทุก ๆ วันเป็นเวลา 7 วัน บันทึกระยะเวลาการเปลี่ยนสีของอาหาร

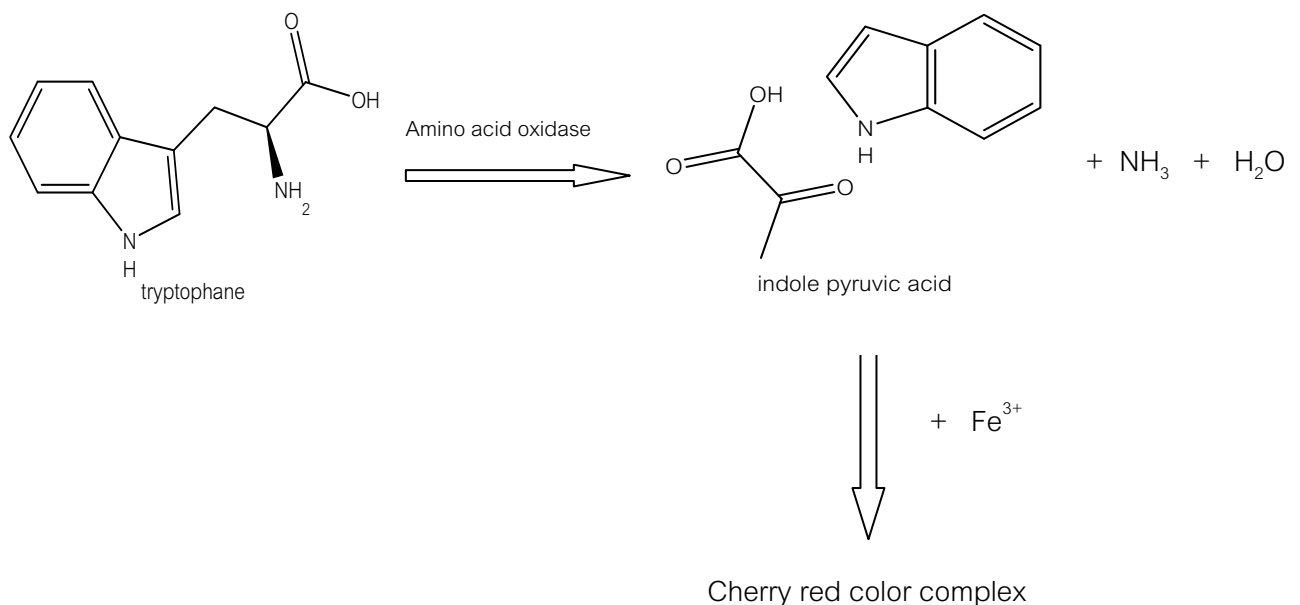
ผลบวก อาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีบานเย็น

ผลลบ อาหารเป็นสีเหลือง

6. การทดสอบดีเอมีเนส (Deaminase Test)

ความสามารถของเชื้อ *Proteus* sp. และ *Providencia* sp. ในการ deaminate กรดอะมิโน
ต่างๆ จะใช้ในการแยกความแตกต่างของสกุลเหล่านี้ออกจากสมาชิกอื่นๆ ของแฟมิลี
Enterobacteriaceae

ในการทดลองนี้จะเป็นการศึกษาการ deaminate tryptophan เป็นดังสมการ



วิธีทดสอบ

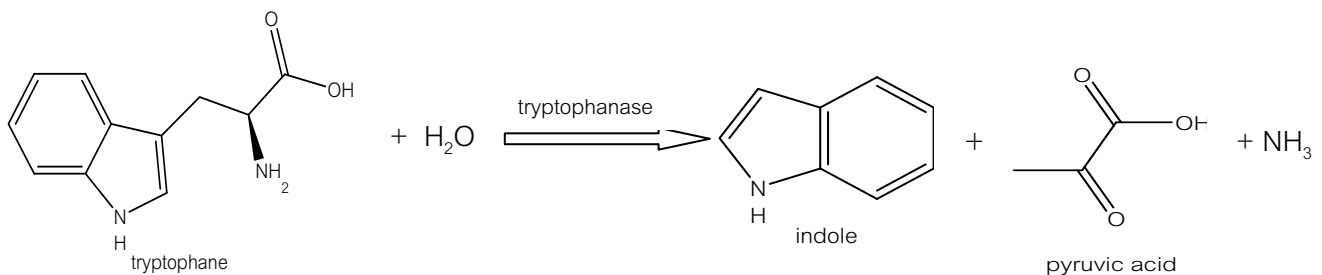
1. เลี้ยงเชื้อในอาหารวุ้นเยือก Tryptophan อายุประมาณ 18-24 ชั่วโมง และทำหลอดเปรียบเทียบกับคือ ไม่มีเชื้อ
2. เติม 10% ferric chloride ลงไปหลอดละ 5 หยด
3. เขย่าหลอดเบาๆ เพื่อให้เชื้อหลุดจากอาหาร
4. สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร และสารตรวจสอบที่หยดลงไปภายใน 5 นาที เพราะสีที่เกิดขึ้นไม่เสถียร

ผลบวก จะพบสีแดงเขรือในอาหารและสารตรวจสอบโดยเปรียบเทียบกับหลอดเปรียบเทียบกับ

ผลลบ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารและสารตรวจสอบ ยังคงเป็นสีเหลืองของ ferric chloride

7. การทดสอบอินโดล (Indole Test)

การทดสอบความสามารถในการสร้างอินโดลจะใช้แยกแบคทีเรีย *Escherichia* ออกจาก *Klebsiella* – *Enterobacter* สิ่งมีชีวิตจะสร้างสารอินโดลจากกรดอะมิโน Tryptophane ดังสมการ



วิธีทดสอบ

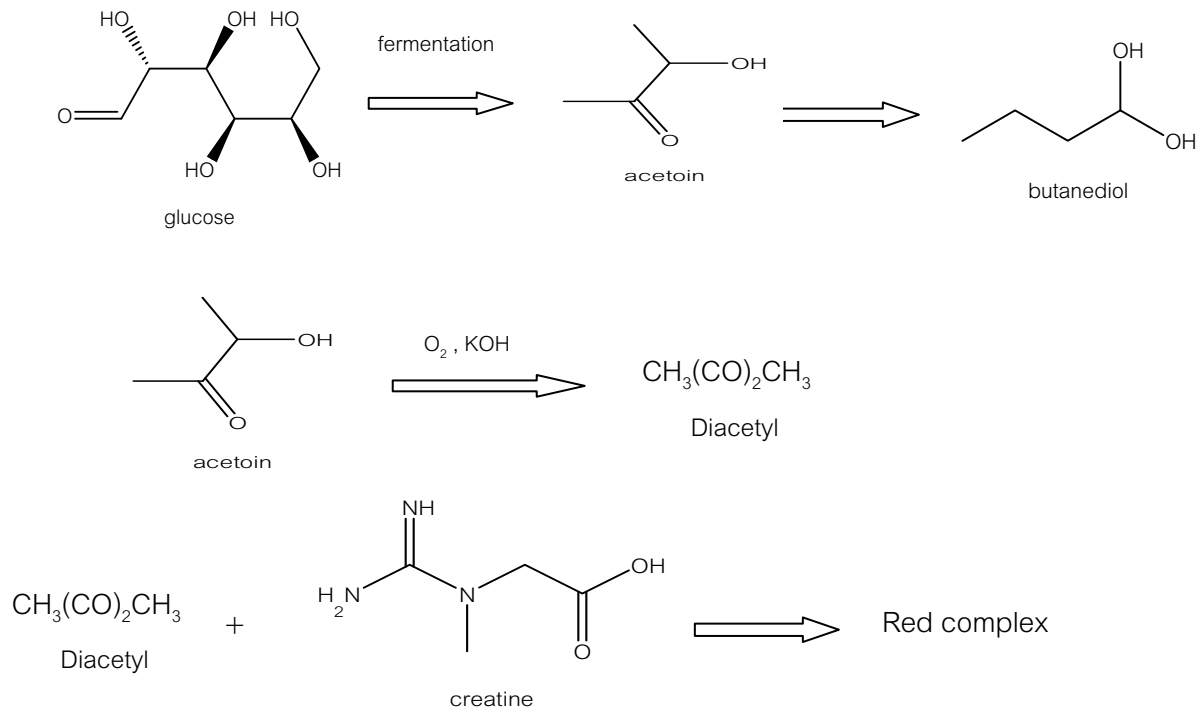
1. ปลุกเชื้อลงในอาหารเหลว tryptone
2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชม. แล้วเติม Kovacs' reagent 0.5 มล. ลงไป

ผลบวก เกิดสีแดงที่ผิวชั้นบน

ผลลบ ไม่เปลี่ยนสี

8. การทดสอบ VP (Voges – Proskauer (VP) Test)

การทดสอบ VP นิยมใช้ในการแยกแบคทีเรียพวก Enterobacteriaceae ซึ่งมีความสามารถในการหมักน้ำตาล glucose ได้ ดังสมการ



วิธีทดสอบ

1. แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส่หลอดทดสอบที่สะอาด
2. เติม creatine ลงในหลอดปริมาณเล็กน้อย
3. เติม NaOH 40% ลงไปประมาณ 5 มล. เขย่าให้เข้ากัน

ผลบวก เกิดสีชมพูภายใน 2 นาที หรือช้ากว่านี้ก็ได้

ผลลบ เกิดสีเหลือง

9. การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate fermentation test)

การหมักเป็นกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาพไม่มีอากาศและใช้สารอินทรีย์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักมีอยู่ทั้งในสภาพรีดิวซ์และออกซิไดส์

วิธีทดสอบ

1. ปักเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหาร Fermentation carbohydrate medium
2. บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 18-24 ชั่วโมง
3. ตรวจสอบผลโดยการเปลี่ยนสีของอาหาร และดูการเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส

ผลบวก

1. อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แต่ไม่มีแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงว่า เชื้อหมักคาร์โบไฮเดรตแล้วได้เฉพาะกรด
2. อาหารมีสีเหลืองและแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงว่า เชื้อหมักคาร์โบไฮเดรตแล้วได้กรดและแก๊ส

ผลลบ อาหารไม่เปลี่ยนสี

10. การทดสอบการออกซิไดส์และการหมัก (Oxidation – Fermentation Test)

ปกติแบคทีเรียจะย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโดยกรรมวิธี 2 ชนิดด้วยกันคือ การหมักและการออกซิไดส์ สำหรับการออกซิไดส์คาร์โบไฮเดรตเป็นกระบวนการที่ใช้อากาศ โดยแบคทีเรียพวก obligate และ strictly aerobe จะใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน

วิธีทดสอบ

1. ปักเชื้อลงในอาหาร Hugh and Leifson' O-F medium ชนิดละ 2 หลอด โดยการแทงตรงลงไป
2. หลอดหนึ่งทำให้อยู่ในสภาพขาดออกซิเจนโดยเทพาราฟินเหลวปิดผิวหน้า ประมาณ 2 เซนติเมตร
3. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง
4. ดูการเปรียบเทียบสีของอาหารและการเกิดแก๊ส

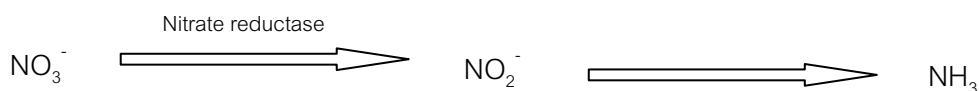
ผลการทดสอบ

อาหารเปลี่ยนสีจากเขียวเป็นเหลือง เฉพาะหลอดที่ไม่ได้เทพาราฟิน แสดงว่าเป็น Oxidation แต่ถ้าเกิดเปลี่ยนสีทั้ง 2 หลอด แสดงว่าเป็น Fermentation

11. การทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรท (Nitrate reduction Test)

แบคทีเรียมีการรีดิวซ์ NO_3^- ได้หลายแบบ เช่นแบบ assimilation โดย NO_3^- ถูกรีดิวซ์เป็น NH_3 ถ้าเป็นแบบ dissimilation / respiration NO_3^- หรือ NO_2^- เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ทำให้สามารถเจริญในสภาพที่ไม่มีอากาศได้

การรีดิวซ์ NO_3^- ไม่ว่าจะเป็นแบบ assimilate หรือ dissimilate จะเป็น nitrate reductase (nitratase) ดังสมการ



วิธีทดสอบ

1. เชื้อเชื้ออายุ 24 ชม. ลงในอาหาร nitrate broth
2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชม.
3. หยด sulfanilic acid และ α -naphthylamine
4. ถ้าเกิดสีแดงปนตะกอน แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก
5. ถ้าไม่เกิดสีแดงเติมผงสังกะสีลงไป

ผลบวก ไม่เกิดสีแดงเนื่องจาก NO_3^- ถูกรีดิวซ์เป็น NO_2^- และ N_2

ผลลบ ถ้าเกิดสีแดงผลเป็นลบ

ตอนที่ 2 การศึกษาสารอนม่น้ำยางชนิดใหม่ในน้ำยางสด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาและวิจัยสารเคมีที่มีสมบัติเป็น bactericide
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพสาร bactericide ชนิดต่างๆ ต่อสมบัติพื้นฐานและการรักษาสภาพของน้ำยางสด

วิธีทดลอง

2.1 หาสารอนม่น้ำยางชนิดใหม่ที่ใช้แทน TMTD/ZnO โดยยังคงมีการเติม 0.3%NH₃ ร่วมด้วย

- เก็บน้ำยางสดจากต้นที่มาจากสายพันธุ์ RRIM 600
- กรองน้ำยางสดที่เก็บได้จากต้น 30 มิลลิตร เทลงในขวดที่มีสารอนม่น้ำยางชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5 และ 1.0%w/w ปิดฝาขวดให้แน่น โดยทดลองซ้ำตัวอย่างละ 2 ครั้ง
- ผสมน้ำยางกับสารอนม่น้ำยางให้เข้ากันโดยการเขย่าขวด
- เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- สังเกตการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำยาง เช่น กลิ่น สี ลักษณะของน้ำยาง ทุกๆ วันจนกระทั่งน้ำยางเสียสภาพ
- ตรวจสอบการเกิดแบคทีเรียในสารอนม่น้ำยางแต่ละชนิดที่เติมลงน้ำยาง

สารอนม่น้ำยางที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้แบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ได้ 8 กลุ่มดังนี้ (อักษรในวงเล็บแสดงสถานะของสารเคมี โดยที่ l และ s หมายถึงของเหลวและของแข็ง ตามลำดับ)

1. Primary aliphatic amine

- Ethylamine (l)

2. Anionic surfactant

- | | |
|------------------|--|
| - Demol RN-L (l) | - Neopelex F-24 (l) |
| - Levenol WX (l) | - PELEX SS-H (l) |
| - Emul E 70C (l) | - Monolaurylphosphate Potassium Salt (l) |
| - EMAL 10P (s) | |

3. Nonionic surfactant

- | | |
|--------------------|----------------------|
| - Emasol O-10V (l) | - Emasol P10F (s) |
| - Emasol L-10F (l) | - Emasol S-30F (s) |
| - Emulgen 105 (l) | - Emasol S-10F (s) |
| - Emulgen 108 (l) | - Homotex PS-200 (s) |

- Emulgen 408 (l)
- Emulgen 707 (l)
- Emulgen 920 (l)
- Excel O-95R (l)
- Levenol V-500 (l)
- Emulgen 123P (s)
- Excel VS-95 (s)
- Emulgen X-70 (l)
- Rheodol SP-O10 (l)
- Rheodol AO-15 (l)

4. Cationic surfactant

- LEVENOL RC (l)

5. Sulfur compound

- Preservative A (l)
- Preservative B (l)
- Preservative C (l)
- Preservative D (l)

6. Cosmetic antioxidant

- methyl *p* – hydroxybenzoate (methyl paraben) (s)
- ethyl *p* – hydroxybenzoate (ethyl paraben) (s)
- propyl *p* – hydroxybenzoate (propyl paraben) (s)

7. Antibiotic drug

- Chloramphenical (l)
- Penicillin (s)
- Norfloxacin (s)
- Amoxicillin (s)
- Ampicillin (s)
- Kanamycin acid (s)
- Cloxacillin (s)

8. Other

- KOH (s)
- NH₃ (l)

** สารเคมีประเภท surfactant ที่ใช้ในการทดลองได้รับความร่วมมือจาก Dr. Kishimoto, Manager of R&D, บริษัท KaO Corporation (Thailand)

การเตรียม Stock solution

- สารลดแรงตึงผิวที่เป็นของเหลว (l) จะมีลักษณะข้นหนืดเมื่อนำไปเติมในน้ำอย่างการผสมจะไม่ทั่วถึง ดังนั้นจึงลดความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 50%w/w

- สารลดแรงตึงผิวที่เป็นของแข็ง (s) จะละลายด้วยน้ำกลั่น ความเข้มข้นขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารแต่ละชนิด

- สารลดแรงตึงผิวพวก Cosmetic antioxidant ทั้ง 3 ชนิด ไม่สามารถละลายในน้ำกลั่นได้หรือละลายได้เพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงใช้ surfactant ช่วยในการละลาย โดยใช้ Emul E : H₂O : cosmetic antioxidant อัตราส่วน 2.5 : 100 : 0.15

2.2 การทดสอบสมบัติพื้นฐานของน้ำยางสดที่รักษาสภาพด้วยสารถนอมน้ำยางชนิดใหม่เปรียบเทียบกับสารถนอมน้ำยางที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

- นำน้ำยางสดมาเติมสารถนอมน้ำยางชนิดใหม่ ($0.3\% \text{NH}_3$ + 0.05% Preservative A) และสารถนอมน้ำยางที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ($0.3\% \text{NH}_3$ + $0.05\% \text{TZ}$) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28°C)
- ตรวจสอบสมบัติพื้นฐานของน้ำยางสด (%TSC, %DRC, %NRC, $\% \text{NH}_3$, Mg^{2+} , VFA no.)

ตอนที่ 3 การศึกษาหาสารถนอมน้ำยางชนิดใหม่ในน้ำยางชั้นที่ผ่านการรักษาสภาพมาแล้ว **วัตถุประสงค์**

เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณของสารถนอมน้ำยางที่เหมาะสมที่ช่วยรักษาสภาพของน้ำยางชั้นที่ได้จากน้ำยางสดที่ผ่านการรักษาสภาพมาแล้ว

วิธีทดลอง

- นำน้ำยางสดจำนวน 150 ลิตรที่เติม $0.3\% \text{NH}_3$ และ 0.05% Preservative A มาปั่นให้เป็นน้ำยางชั้น (60% DRC) ก่อนการปั่นมีการปรับค่า Mg^{2+} ให้อยู่ในช่วง 170 – 190 ppm โดยใช้ $7.5\% \text{w/v}$ DAHP (diammonium hydrogen phosphate) และเจือจางน้ำยางสดให้เป็น 30% DRC
- เติมสารถนอมน้ำยางตัวอื่นเพิ่มตามความเหมาะสม แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28°C) เป็นระยะเวลาประมาณ 3 – 6 เดือน
- ตรวจสอบสมบัติพื้นฐานของน้ำยางชั้น (%TSC, %DRC, %NRC, $\% \text{NH}_3$, Mg^{2+} , VFA no., pH, KOH no., MST, Coagulum content, S.G., Viscosity)

สารถนอมน้ำยางตัวใหม่ที่ใช้ในการรักษาสภาพของน้ำยางชั้นมีดังนี้

- เติม NH_3 ให้เป็น 0.7%
- $\text{NH}_4^+ \text{-L}$ 0.075% + เติม NH_3 ให้เป็น 0.3%
- $\text{NH}_4^+ \text{-L}$ 0.075% + 0.025% preservative A + เติม NH_3 ให้เป็น 0.3%
- $\text{NH}_4^+ \text{-L}$ 0.075% + 0.05% preservative A + เติม NH_3 ให้เป็น 0.3%

ตอนที่ 4 การศึกษาสมบัติพื้นฐานของยางแห้งที่เตรียมได้จากน้ำยางชั้นที่ใช้สารถนอมน้ำยางชนิดใหม่โดยการทำฟิล์ม

วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบและพัฒนาสมบัติของน้ำยางชั้นที่เติมสารถนอมน้ำยางชนิดใหม่มาใช้งานด้านการจุ่มให้มีความเหมาะสมมากที่สุด

วิธีทดลอง

นำน้ำยางชั้นที่เตรียมได้จากตอนที่ 2.2 มาทำการคอมปาวด์กับสารเคมีต่าง ๆ ตามสูตรการผลิตถูงมือ แล้วทำการศึกษาค่า tensile strength เปรียบเทียบกับวิธีการใช้น้ำยางชั้นปกติในการผลิตถูงมือ

สูตรสารเคมีที่ใช้ในการทำคอมปาวด์

สารเคมี	phr*
น้ำยางชั้น	100
โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์	0.1
โพแทสเซียมลอลเลต	0.1
ซิงค์ เอน ไดเอทิล ไดไฮโอคาร์บาเมต	0.7
ซิงค์ออกไซด์	0.5
ซัลเฟอร์	0.7
แอนติออกซิแดนท์	1.0

phr* = part per hundred rubber

การทดสอบน้ำยางคอมปาวด์

1. การทดสอบคลอโรฟอร์มของน้ำยางคอมปาวด์

จุดประสงค์ : เพื่อหาระดับการ cure ของน้ำยางคอมปาวด์และใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบการทดสอบ % swelling

วิธีการ

- นำน้ำยางคอมปาวด์และคลอโรฟอร์มอย่างละ 10 มิลลิลิตร ใส่ในปิ๊กเกอร์
- ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากันจนกระทั่งยางจับตัวเป็นก้อน
- บั่นก้อนยางให้เป็นก้อนเดียวกันแล้วใช้มือทั้งสองข้างดึงให้ก้อนยางขาดออกจากกัน
- แปลผลระดับการ cure ของน้ำยางคอมปาวด์ตามตาราง

ลักษณะของก้อนยาง	ระดับการ cure	หมายเลขแสดงผล
ยางจับตัวเป็นก้อนเหนียว ดึงแล้วยืด ไม่ขาดจากกัน	ไม่ cure	1
ยางจับตัวเป็นก้อนเหนียว ดึงแล้วยืดเล็กน้อยจึงขาด	cure เล็กน้อย	1+
ยางจับตัวเป็นก้อนเหนียว ดึงแล้วเนื้อยางขาด ไม่ยืด	cure น้อย	2
ยางจับเป็นก้อนไม่เหนียว ดึงแล้วเนื้อยางขาด ไม่ยืด	cure น้อย	2+
ดึงแล้วเนื้อยางขาดจากกัน บี้แล้วแตกเป็นก้อนใหญ่	cure ปานกลาง	3
ดึงแล้วเนื้อยางขาดจากกัน บี้แล้วแตกเป็นก้อนเล็ก	cure ปานกลาง	3+
ยางไม่จับเป็นก้อนใหญ่ ร่วนซุย	cure มาก	4

หมายเหตุ : คลอโรฟอร์มเป็นสารเคมีอันตรายในการทดสอบต้องสวมถุงมือพลาสติกทุกครั้ง

2. การทดสอบ % swelling ของน้ำยางคอมปาวด์

จุดประสงค์ : เพื่อหาระดับการ cure ของน้ำยางคอมปาวด์ และใช้เป็นข้อมูลในการเปรียบเทียบการทดสอบคลอโรฟอร์ม

วิธีการ

- ชั่งน้ำยางคอมปาวด์ลงบนแผ่นกระเบื้องเคลือบประมาณ 0.4 กรัม
- เติมหก 1 หยด ใช้ช้อนตักสารเกลี่ยให้เข้ากันและให้น้ำยางแผ่เป็นวงกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-6 เซนติเมตร
- นำไปอบในตู้อบที่ 140-150 องศาเซลเซียส 15 นาที
- ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วทาด้วยแปรงข้าวโพดเพื่อให้ลอกยางออกมาง่าย
- ตัดยางเป็นวงกลมด้วย die cutter
- นำไปแช่ในจานแก้ว ซึ่งมีไธลูอิน ประมาณ 10-15 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที
- วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของตัวอย่างที่ขยายออก โดยวางจานแก้วบนกระดาษกราฟ

การคำนวณ

$$\% \text{swelling} = \frac{(\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของตัวอย่างที่ขยายออกมา} - \text{เส้นผ่าศูนย์กลางของตัวอย่างเริ่มต้น}) \times 100}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

การแปลผล

% swelling	ระดับการ cure
> 160 %	ยังไม่ cure
100-160 %	cure น้อย
80 – 100 %	cure ปานกลาง
< 80 %	cure มาก

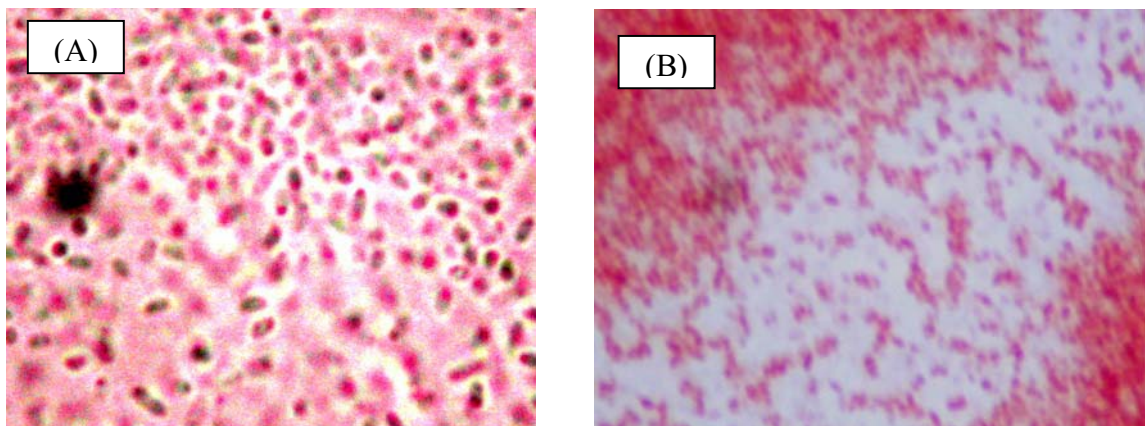
ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการบูดเน่าของน้ำยางธรรมชาติ

การศึกษาแบคทีเรียจากน้ำยางสดในช่วง 6 เดือนแรก ทางผู้วิจัยได้แยกแบคทีเรียจากน้ำยางธรรมชาติที่กรีดจากต้นโดยใช้วิธี streak plate technique และทำแยกแบคทีเรียในช่วงที่เก็บน้ำยางมาจากต้นในช่วงเริ่มต้นเพียงครั้งเดียวเท่านั้นการทดลองนี้ได้ทำซ้ำ 4 ครั้ง พบแบคทีเรียที่มีลักษณะโดดเด่นเพียงชนิดเดียว นำแบคทีเรียที่พบดังกล่าวมาศึกษาลักษณะพื้นฐานดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำยางสด

คุณสมบัติเบื้องต้น	ลักษณะของแบคทีเรีย
สีของโคโลนี	สีขาว
ขนาดของโคโลนี	0.7 ซม.
การย้อมสีแกรม	Gram negative
ลักษณะของเซลล์	Cocci
รูปร่างโคโลนี	Circular
ขอบของโคโลนี	Undulate
การยกตัวของโคโลนี	Raised
ผิวหน้าของโคโลนี	Smooth
การเจริญของ Stroke culture	Echinulate
ความต้องการออกซิเจน	Aerobe



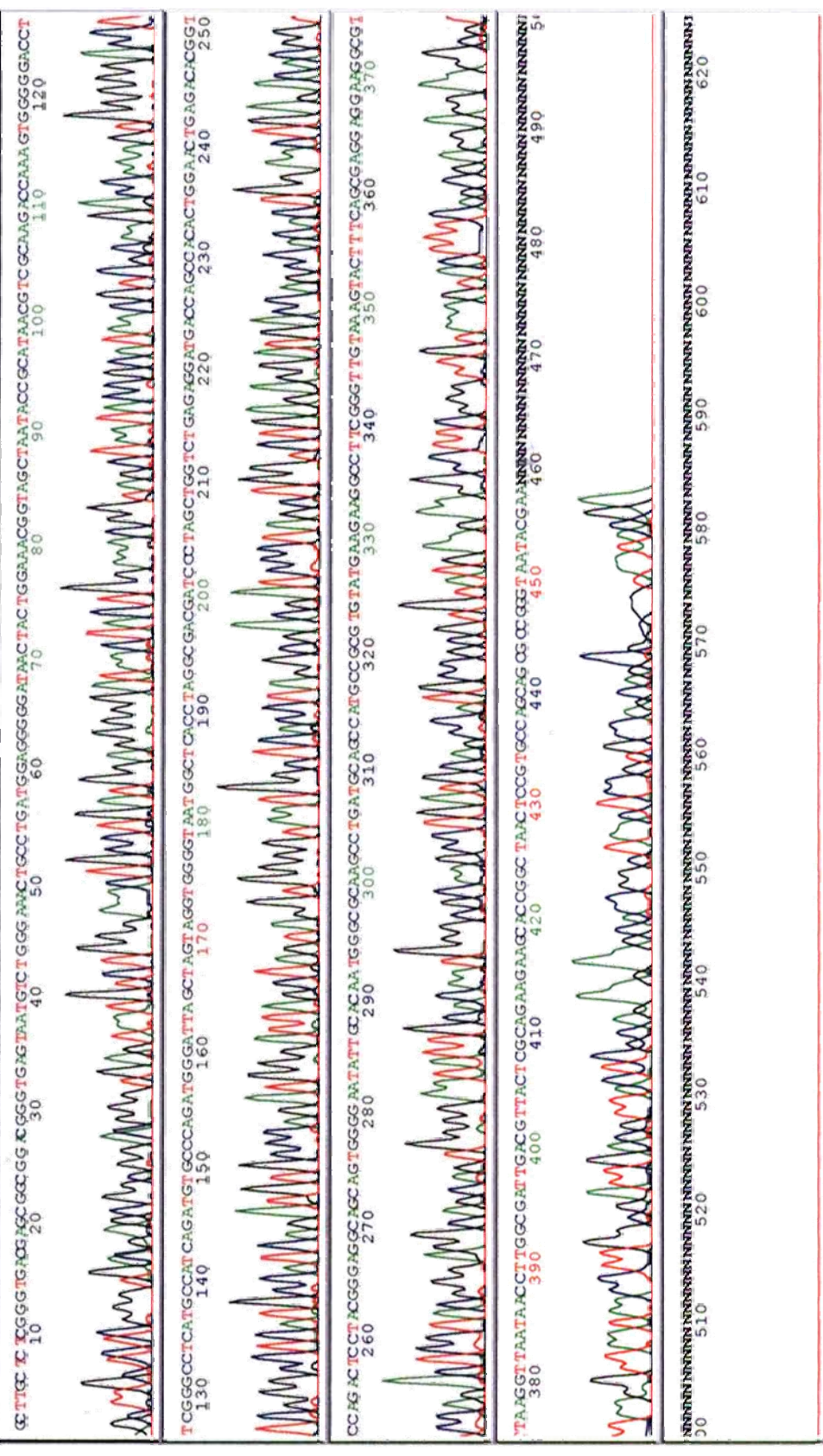
รูปที่ 7 ลักษณะเซลล์แบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำยางสด (A คือลักษณะของเซลล์ก่อน
ทำ gram stain B คือลักษณะของเซลล์หลังทำ gram stain)

จากตารางที่ 1 สมบัติเบื้องต้นที่ใช้ในการทดสอบแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำยางสดยังไม่สามารถจำแนกแบคทีเรียที่แยกได้ว่าอยู่ในกลุ่มไหน ต้องมีการทดสอบสมบัติของแบคทีเรียในขั้นตอนที่สูงขึ้น จากสมมุติฐานขั้นต้นเชื่อว่าแบคทีเรียที่พบในน้ำยางสดน่าจะจัดอยู่ในกลุ่ม acidic bacteria เพราะจากการทดลองวัดค่า pH ของน้ำยางสดหลังจากน้ำยางเสียสภาพพบว่าค่า pH ของน้ำยางลดลงอยู่ในช่วง pH 5 – 6

จากสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียที่ได้ไม่สามารถจัดกลุ่มของแบคทีเรียได้จึงนำแบคทีเรียดังกล่าวมาศึกษาชนิดแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค DNA sequence ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 8

รูปที่ 8 แสดงลำดับของแบคทีเรียที่พบในน้ำยางสดที่เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง จากลำดับ DNA ที่ได้นำไปทำ matching กับ Database ของแบคทีเรีย พบว่าตรงกับชนิด *Enterobacter aerogenes* และ *Klebsiella trevisanii* มากที่สุด ซึ่งสามารถยืนยันได้ดังรูปที่ 9 และ รูปที่ 10 ซึ่งจะพบลำดับเบสของ DNA ตรงกันมากถึง 452 ลำดับเบสของ 455 ซึ่งคิดเป็น 99.34 % ดังนั้นจึงไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใดได้ด้วยการใช้วิธีการอ่านลำดับเบสของ DNA เพียงอย่างเดียว

ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียทางด้านชีวเคมี โดยใช้ kit ชื่อว่า lapi 20E ซึ่งเป็น kit ที่ใช้สำหรับตรวจสอบแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียในกลุ่มของ Enterobacteriaceae ผลการทดสอบดัง ตารางที่ 2



รูปที่ 8 ลำดับ DNA ของแบคทีเรียที่พบในน้ำยางสด