



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นในกระบวนการผลิตยางก้อนถ้วยและวิธีการกำจัด

โดย

รศ.ดร.เกียรติทิวิ ชูวงศ์โกมล และคณะ

มกราคม 2562

(งานวิจัยยังไม่เสร็จสมบูรณ์ โปรดอย่านำไปใช้อ้างอิง)

สัญญาเลขที่ RDG60T0131

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นในกระบวนการผลิตยางก้อนถ้วยและวิธีการกำจัด

คณะผู้วิจัย

รศ.ดร.เกียรติทวี ชวงค์โกมล	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผศ.ดร.นันทิยา หาญสุลักษณ์	ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
อาจารย์วิมลรัตน์ อินศวร	ภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิค- การสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย วช.-สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Executive Summary

การดำเนินการวิจัยนี้ได้เก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์และตัวอย่างอากาศจากสวนยางพาราและโรงงานผลิตยางแท่ง บมจ.ศรีตรังแอมโอรอินดัสทรี ที่ตั้งอยู่ในจ.อุบลราชธานี โดยตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้นี้จะนำไปคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ ระบุชนิดเชื้อ และคัดเลือกเชื้อที่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นในลักษณะที่คล้ายกับกลิ่นจากโรงงานผลิตยางแท่งโดยนำตัวอย่างมาทำ Serial dilution เพื่อหาความเข้มข้นเชื้อที่เหมาะสมของแต่ละตัวอย่างเพื่อให้มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 cfu/ml จากนั้นนำมาเลี้ยงบน Nutrient Agar Plate ปริมาตร 1 ml เลี้ยงเชื้อไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นับจำนวนโคโลนีที่ 30-300 cfu/ml เลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างจากนั้นนำมา Streak บน Nutrient Agar Plate เลี้ยงเชื้อข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เลือก 1 โคโลนีทำการ Streak plate และทำ Gram stain เพื่อดูชนิดของแบคทีเรียผลการทดลองพบทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ จากนั้นเก็บเชื้อในสารละลาย 40%Glycerol เมื่อได้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ จะนำมาทำการสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณคือ 16s rRNA จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณกับฐานข้อมูล และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) เพื่อระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรีย จากการวิเคราะห์ได้พบเชื้อแบคทีเรียที่มีความแตกต่างทั้งหมด 39 ชนิด จากตัวอย่างในสวนยางพารา และโรงงาน นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 39 ชนิด มาคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตบนอาหารที่เตรียมจากน้ำยางพารา (Selective Media) โดยเตรียม Selective media ซึ่งประกอบด้วย น้ำยางพาราและ Agar ในอัตราส่วนน้ำยางพารา : Agar เท่ากับ 1 : 5 ทำการเท Selective media ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (สภาวะที่ใช้ฆ่าเชื้อคือ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที) ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ทราบชนิดแล้ว มาทำการ Streak plate บน Selective media ที่อยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ทิ้งไว้ข้ามคืน ผลจากการนำเชื้อทั้ง 39 ชนิดที่ได้ในการศึกษาก่อนหน้ามาคัดแยกเพื่อหาเชื้อที่สามารถเติบโตได้ดีโดยใช้เพียงสารอาหารที่อยู่ภายในน้ำยางและก้อนยาง ก็พบว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้เหลือเพียง 18 ชนิด ดังนี้ *Acinetobacter pittii*, *Bacillus thuringiensis*, *Cedecea davisae*, *Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumonia*, *Kurthia gibsonii*, *Lactococcus lactis*, *Lysinibacillus xylanilyticus*, *Myroides injeensis*, *Pantoea wallisii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus sciuri*,

Stenotrophomonas maltophilia การทดสอบกลิ่นจากเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ เตรียมยางก้อนที่ผลิตโดยสวนยางแห่งหนึ่ง (ไม่ทราบชนิดกรดที่ใช้จับตัวเนื้อยาง) มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆขนาด 0.5 cm³ ซั่งก้อนยางนี้ใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 3 กรัม นำไปฆ่าเชื้อ (สภาวะที่ใช้ฆ่าเชื้อคือ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที) จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดแยก 18 ชนิดข้างต้น โดยทำการดมกลิ่นเมื่อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องครบ 1 วัน 3 วัน และ 5 วัน พบว่า สามารถจัดกลุ่มของเชื้อตามความเหม็นของกลิ่นที่ได้จากการดม (นักวิจัย 5 คน) ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเชื้อที่ให้กลิ่นเหม็นมาก ปานกลาง และน้อย

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกลิ่นในยางก้อนถ้วยเพื่อตรวจสอบองค์ประกอบของกลิ่นซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของกลิ่นอันไม่พึงประสงค์ในกระบวนการผลิตยางก้อนถ้วย โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค static headspace ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ตัดตัวอย่างยางก้อนถ้วยให้มีขนาดเล็กน้ำหนัก 5 กรัมบรรจุลงในขวดแก้วขนาด 60 มล. แล้วให้ความร้อนเพื่อให้สารระเหยเป็นไอ แล้วจึงดูดอากาศบริเวณช่องว่างเหนือตัวอย่างไปฉีดเข้าวิเคราะห์โดยเทคนิค GC-MS ตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่นำมาทดสอบคือยางก้อนถ้วยที่จับตัวด้วยกรดฟอร์มิกและกรดซัลฟิวริก ยางก้อนถ้วยจากสวนยางพาราตัวด้วยกรดฟอร์มิกและกรดซัลฟิวริก และยางก้อนถ้วยจากโรงงานผลิตยางก้อนถ้วย ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกลิ่นจากยางก้อนถ้วยพบว่าสารระเหยจากยางก้อนถ้วยมีกรดไขมันระเหยง่ายเป็นองค์ประกอบคือ acetic acid, propanoic acid, butanoic acid, 2-methylpropanoic acid, pentanoic acid, และ isovaleric acid การจับตัวอย่างด้วยกรดฟอร์มิกและซัลฟิวริกพบองค์ประกอบเหมือนกันและการใช้กรดฟอร์มิกเพื่อให้ยางจับตัวมีปริมาณของ Acetic ที่สูงกว่าการจับตัวด้วยกรดซัลฟิวริกและปริมาณของกรด Acetic, 2-methyl-Propanoic, Butanoic, และ Pentanoic มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ยางก้อนถ้วยจากสวนยางพบปริมาณกรด butyric สูงกว่ากรดชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะยางก้อนถ้วยซึ่งจับตัวกรดซัลฟิวริกที่เตรียมใหม่และปริมาณของกรด butyric ลดลงเมื่อระยะเวลาอายุยางเพิ่มขึ้น ปริมาณการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของกรดไขมันระเหยง่ายทั้ง 6 ชนิดจะมีการเปลี่ยนแปลงตามอายุของยางซึ่งคาดว่าเป็นผลจากการย่อยโปรตีน ไขมันคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบในน้ำยางเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจึงเกิดผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นสารที่มีกลิ่นทำให้ลักษณะของโปรไฟล์กลิ่นที่ต่างกันในแต่ละอายุของยางก้อนถ้วย จากผลการทดลองโดยเทคนิค GC-MS จะใช้ในการสนับสนุนผลจากการศึกษาการคัดแยกจุลินทรีย์เพื่อหาสายพันธุ์ที่ผลิตกลิ่นจากการย่อยน้ำยางในกระบวนการตกตะกอนเป็นยางก้อนถ้วยในระดับห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างอากาศที่เก็บในถุงเก็บอากาศและบนตัวดูดซับชนิด coconut shell charcoal มีลักษณะโปรไฟล์ที่ต่างกัน ผลจากการ

ดูดซับแก๊สด้วยตัวดูดซับชนิดคาร์บอนให้โปรไฟล์ของกลิ่นที่มีลักษณะที่ใกล้เคียงกับที่ได้จากตัวอย่างยางก้อนถ้วยคือพบกรดไขมันระเหยง่ายเป็นองค์ประกอบ เมื่อเปรียบเทียบโปรไฟล์ของกลิ่นที่คาดว่าจะไม่ก่อให้เกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์โดยการเปรียบเทียบระหว่างแก๊สที่บริเวณทางเข้าและทางออกของดีไอโรเซอร์พบว่าองค์ประกอบของแก๊สที่ทางเข้าและทางออกของดีไอโรเซอร์มีองค์ประกอบที่เป็นสารในกลุ่มกรดไขมันระเหยง่าย กลิ่นไม่พึงประสงค์ภายในบริเวณโรงงานผลิตเกิดจากหลายสาเหตุหนึ่งมาจากวัตถุดิบยางก้อนถ้วยและน้ำเซรุ่มพบว่าโปรไฟล์กลิ่นที่ได้และมีปริมาณที่แตกต่างกันตามอายุของตัวอย่าง ดังนั้นองค์ประกอบของกลิ่นและปริมาณกรดไขมันระเหยง่ายจะขึ้นอยู่กับชนิดของกรดและอายุของยางก้อนถ้วย โดยปัจจัยจากกรดแต่ละชนิดและอายุของยาง การเติมสารช่วยลดกลิ่น และกระบวนการล้าง จะทำให้ลักษณะของโปรไฟล์กลิ่นมีการเปลี่ยนแปลงโดยการเพิ่มขึ้นหรือลดลงขององค์ประกอบของกรดไขมันแต่ละชนิดที่ต่างกัน

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้เก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์และตัวอย่างอากาศจากสวนยางพาราและโรงงานผลิตยางแท่ง บมจ.ศรีตรังแอโกรอินดัสทรี ที่ตั้งอยู่ในจ.อุบลราชธานี โดยตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้นี้จะนำไปคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ ระบุชนิดเชื้อ โดยนำตัวอย่างมาทำ Serial dilution จากนั้นนำมา Streak บน Nutrient Agar Plate เลี้ยงเชื้อข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เลือก 1 โคโลนีทำการ Streak plate และทำ Gram stain เพื่อดูชนิดของแบคทีเรีย เมื่อได้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ จะนำมาทำการสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณคือ 16s rRNA จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณกับฐานข้อมูล และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) เพื่อระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรีย จากการทดลองพบแบคทีเรียทั้งหมด 39 ชนิด และมีเชื้อแบคทีเรียเพียง 18 ชนิด ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารสำหรับคัดเลือกเชื้อ (Selective media) ที่เตรียมจากน้ำยาง เมื่อทำการทดสอบกลิ่นจากเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ เตรียมยางก้อนที่ผลิตโดยสวนยางมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆขนาด 0.5 cm³ ซ้ำกันยางนี้ใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 3 กรัม นำไปฆ่าเชื้อ (สภาวะที่ใช้ฆ่าเชื้อคือ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที) จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดแยก 18 ชนิดข้างต้น โดยทำการดมกลิ่นเมื่อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องครบ 1 วัน 3 วัน และ 5 วัน พบว่า สามารถจัดกลุ่มของเชื้อตามความเข้มข้นของกลิ่นที่ได้จากการดม (นักวิจัย 5 คน) ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเชื้อที่ให้กลิ่นเหม็นมาก ปานกลาง และน้อย โดยเชื้อแบคทีเรียที่ให้กลิ่นเหม็นมากได้แก่ *Cedecea davisea*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumonia*, *Kurthia gibsonii*, *Lysinibacillus xylanilyticus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Stenotrophomonas maltophilia* เป็นต้น การวิเคราะห์องค์ประกอบของกลิ่นในยางก้อนถ้วยเพื่อตรวจสอบองค์ประกอบของกลิ่นซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของกลิ่นอันไม่พึงประสงค์ในกระบวนการผลิตยางก้อนถ้วย โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค static headspace ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ตัดตัวอย่างยางก้อนถ้วยให้มีขนาดเล็กน้ำหนัก 5 กรัมบรรจุลงในขวดแก้วขนาด 60 มล. แล้วให้ความร้อนเพื่อให้สารระเหยเป็นไอ แล้วจึงดูดอากาศบริเวณช่องว่างเหนือตัวอย่างไปฉีดเข้าวิเคราะห์โดยเทคนิค GC-MS ตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่นำมาทดสอบคือยางก้อนถ้วยที่จับตัวด้วยกรดฟอร์มิกและกรดซัลฟิวริก ยางก้อนถ้วยจากสวนยางพาราตัวด้วยกรดฟอร์มิกและกรดซัลฟิวริก และยางก้อนถ้วยจากโรงงานผลิตยางก้อนถ้วย ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกลิ่นจากยางก้อนถ้วยพบว่าสารระเหยจากยางก้อนถ้วยมีกรดไขมันระเหยง่ายเป็นองค์ประกอบคือ acetic acid,

propanoic acid, butanoic acid, 2-methylpropanoic acid, pentanoic acid, และ isovaleric acid โดยการจับตัวด้วยกรดฟอร์มิกและซัลฟิวริกมีองค์ประกอบที่พบเหมือนกันและพบว่าการใช้กรดฟอร์มิกเพื่อให้ยางจับตัวมีปริมาณของ Acetic ที่สูงกว่าการจับตัวด้วยกรดซัลฟิวริกและปริมาณของกรด acetic, 2-methylpropanoic, butanoic, และ pentanoic มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ยางก้อนถ้วยจากสวนยางพบกรด butyric ปริมาณสูงกว่ากรดชนิดอื่นๆ และลดลงเมื่อระยะเวลาอายุยางเพิ่มขึ้น ลักษณะของโปรไฟล์กลิ่นมีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของกรดอินทรีย์ระเหยง่ายแต่ละชนิดที่ต่างกันในแต่ละอายุของยางก้อนถ้วย จากการทดลองโดยเทคนิค GC-MS จะใช้ในการสนับสนุนผลจากการศึกษาการคัดแยกจุลินทรีย์เพื่อหาสายพันธุ์ที่ผลิตกลิ่นจากการย่อยน้ำยางในกระบวนการตกตะกอนเป็นยางก้อนถ้วยในระดับห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างอากาศที่เก็บในถุงเก็บอากาศและบนตัวดูดซับชนิด coconut shell charcoal มีลักษณะโปรไฟล์ที่ต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบโปรไฟล์ของกลิ่นที่คาดว่าจะไม่ก่อให้เกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์โดยการเปรียบเทียบระหว่างแก๊สที่บริเวณทางเข้าและทางออกของดีไอโรเซอร์พบว่าองค์ประกอบของแก๊สที่ทางเข้าและทางออกของดีไอโรเซอร์มีองค์ประกอบที่เป็นสารในกลุ่มกรดไขมันระเหยง่าย กลิ่นไม่พึงประสงค์ภายในบริเวณโรงงานผลิตเกิดจากหลายสาเหตุหนึ่งมาจากวัตถุดิบยางก้อนถ้วยและน้ำเซรุ่ม

Abstract

This research collected microbial samples and air samples from rubber plantations and block rubber production plants. Sri Trang Agro-Industry Plc. Located in Ubon Ratchathani Province. This sample of microorganisms will be used to separate the pure bacteria. Identify the type by using serial dilution, then bring Streak on the Nutrient Agar Plate to feed the bacteria overnight at a temperature of 37 ° C. Choose 1 colony. Perform Streak plate and make Gram stain to see the type of bacteria. When obtained pure bacteria will be used to extract DNA and increasing DNA by Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The DNA fragments that increase the volume are 16s rRNA. And analysis of evolutionary (phylogenetic analysis) to identify the type of bacteria. The result shown that 39 species of bacteria were found and only 18 species of bacteria were able to grow in selective media prepared from latex. When testing the odor from pure bacteria in the laboratory prepare the rubber that is produced by rubber plantations, cut into small pieces of 0.5 cm³, weighing in this rubber tube, put in a test tube of 3 grams each and then autoclave samples, Add the bacteria that have been sorted by 18 types above by sniffing when left at room temperature for 1 day, 3 days and 5 days. Found that the group of bacteria can be classified according to the smell of the smell from the inhalation (5 researchers) into 3 groups: a group of bacteria that give a very foul odor, moderate and low by bacteria that give a very bad smell, including *Cedecea davisea*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumonia*, *Kurthia gibsonii*, *Lysinibacillus xylanilyticus*, *Proteus mirabillis*, *Proteus vulgaris*, *Stenotrophomonas maltophilia* etc. Analysis of the composition of unpleasant odor from cup lumps by static headspace couple to GC-MS. The optimal condition for sample preparation of static headspace technique was studied. Cup lumps were cut into small pieces, weighed 5 grams into a 60 ml glass bottle, heated to allow the evaporate and then sampling the gas phase from the headspace of the bottle injected to the GC. The cup lump samples in this study were obtained from laboratory preparation that control the acid as formic and sulfuric acid for coagulation, from the plantation and from the

rubber factory. The results showed that the volatile compounds from the cup lump were volatile fatty acids (VFAs), namely acetic acid, propanoic acid, butanoic acid, 2-methylpropanoic acid, pentanoic acid, and isovaleric acid. The coagulated cup lump from sulfuric and formic acid showed the same VFA compositions however the quantity of acetic acid from using formic acid as coagulant has a higher than the other and the amount of acetic acid, 2-methylpropanoic, butanoic, and pentanoic are significantly different at the p-value of 0.05. The results of VFAs from cup lump plantation showed higher butyric acid than other and decreases when the age increases. The odor profile of VFAs of the cup lump is different depending on acid as formic and sulfuric including to age of cup lump and the serum as waste water that released from the cup lumps. From the experiment, static headspace-GC-MS is used to support the study of production of malodor for the microbial study in the next study. Air samples were collected in the bag and absorbed on the coconut shell charcoal tube and analysis by GC-MS, that showed different profiles and the profile between the inlet-outlet of deoriser was found that the VFAs are major compounds.

สารบัญ

	หน้า
Executive summary	ก
บทคัดย่อ	ง
Abstract	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญตารางภาคผนวก	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	11
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย	19
บทที่ 5 สรุปผลการดำเนินการวิจัย	53
บทที่ 6 เอกสารอ้างอิง	56
ภาคผนวก	59

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทั่วไปของน้ำยางพาราสด	6
ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของอนุภาคยาง	6
ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของยางแท่งเกรดต่าง ๆ ที่ผลิตจากยางก้อนถ้วย	8
ตารางที่ 2.4 ลักษณะของยางก้อนถ้วย	8
ตารางที่ 3.1.1 ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างเชื้อ	12
ตารางที่ 4.1.1 แสดงเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกจากสวนยางพาราและโรงงาน	21
ตารางที่ 4.1.2 ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตบนอาหารที่เตรียมจากน้ำยางพารา (Selective media)	23
ตารางที่ 4.1.3 ผลการทดสอบกลืนจากเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ	30
ตารางที่ 4.2.1 แสดงปริมาณ VFAs เพื่อศึกษาอิทธิพลของปริมาณภาชนะขวดแก้วสำหรับใช้บรรจุ ตัวอย่าง	34
ตารางที่ 4.2.2 แสดงปริมาณ VFAs เพื่อศึกษาอิทธิพลของปริมาณภาชนะขวดแก้วสำหรับใช้บรรจุ ตัวอย่าง	36
ตารางที่ 4.2.3 แสดงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ VFAs ในตัวอย่างยางก้อนถ้วย	37
ตารางที่ 4.2.4 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทดสอบโดยการวิเคราะห์ด้วย GC-MS สวนยาง	38
ตารางที่ 4.2.5 แสดงผลการทดลองวิเคราะห์ VFAs ในกลืนจากตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่เตรียมโดยนักวิจัย ภายในห้องปฏิบัติการ	39
ตารางที่ 4.2.6 ผลการทดลองวิเคราะห์ VFAs ในกลืนจากตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่เก็บจากสวนยางพาราที่ เตรียมโดยเกษตรกรโดยแยกระหว่างยางที่จับตัวด้วยกรดซัลฟิวริกและกรดฟอร์มิก	41
ตารางที่ 4.2.7 เปรียบเทียบปริมาณของกรดไขมันระเหยง่ายทั้ง 6 ชนิดที่ศึกษาโดยเปรียบเทียบยี่ห้อ ละชนิด	42
ตารางที่ 4.2.8 ผลการทดลองวิเคราะห์ VFAs ในแก๊สจากตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่เก็บบริเวณจุดพักยาง ของบริษัทโรงงานเป็นยางก้อนถ้วยที่รับซื้อจากเกษตรกรมีอายุแตกต่างกัน	44
ตารางที่ 4.2.9 วิเคราะห์แก๊สจากตัวอย่างของเหลวที่บีบจากยางก้อนถ้วย (น้ำเซรุ่ม) กับน้ำบริเวณรอบ ๆ กองยางที่มีอายุต่างกัน	46
ตารางที่ 4.2.10 แสดงปริมาณเป็นร้อยละของพื้นที่ของกรดระเหยทั้งหมดที่พบในแก๊สที่ดูดซับบนตัวดูด ซับชนิดคาร์บอนชาร์โคลบริเวณทางเข้าดีไอโรเซอร์	51
ตารางที่ 4.2.11 แสดงปริมาณเป็นร้อยละของพื้นที่ของกรดระเหยทั้งหมดที่พบในแก๊สที่ดูดซับบนตัวดูด ซับชนิดคาร์บอนบริเวณทางออกดีไอโรเซอร์	51

สารบัญตารางภาคผนวก

	หน้า
ภาคผนวก ก บทความสำหรับเผยแพร่	60
ภาคผนวก ข ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ	61
ภาคผนวก ค การคำนวณความเข้มข้นของกรดฟอร์มิก และซัลฟิวริก ภายในห้องปฏิบัติการ สำหรับใช้ในการจับตัวยางก้อนถ้วยและการเตรียมยางก้อนถ้วยที่จับตัวด้วยกรดฟอร์มิกและซัลฟิวริกภายในห้องปฏิบัติการ	62
ภาคผนวก ง แสดงโครมาโทแกรมของยางที่จับตัวด้วยกรดฟอร์มิก (A) และกรดซัลฟิวริก (B) ซึ่งเตรียมในห้องปฏิบัติการ	63
ภาคผนวก จ แสดงโครมาโทแกรมเปรียบเทียบอิทธิพลของการจับตัวน้ำยางด้วยกรดฟอร์มิก และซัลฟิวริก ภายในสวนยางพาราซึ่งเป็นตัวอย่างจริงที่เกษตรกรกรีดเพื่อผลิตเป็นยางก้อนถ้วย โดย(A) คือน้ำยางที่ไม่เติมกรดในการจับตัว (B) คือน้ำยางที่จับตัวด้วยกรดฟอร์มิกโดยเตรียมใหม่ (C) คือน้ำยางที่จับตัวด้วยกรดฟอร์มิกเตรียมไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ (D) คือน้ำยางที่จับตัวด้วยกรดซัลฟิวริกโดยเตรียมใหม่ และ(E) คือน้ำยางที่จับตัวด้วยกรดซัลฟิวริกเตรียมไว้ประมาณ 5 วัน โดยพืชหมายเลข 1 คือ propanoic acid, หมายเลข 2 คือ butanoic acid, หมายเลข 3 คือ 3-methyl pentanoic acid และ หมายเลข 4 คือ pentanoic acid	64
ภาคผนวก ฉ แสดงโครมาโทแกรมขององค์ประกอบของกลิ่นที่ได้จากการวิเคราะห์ยางก้อนถ้วยที่เก็บจากบริเวณจุดพักยางก้อนที่รับซื้อจากเกษตรกรโดยหมายเลข 1 คือ Acetic acid, หมายเลข 2 คือ Propanoic acid, หมายเลข 3 คือ 2-methyl-Propanoic acid, หมายเลข 4 คือ Butanoic acid, หมายเลข 5 คือ 3-methyl-Butanoic acid, หมายเลข 6 คือ Pentanoic acid	65
ภาคผนวก ช แสดงโครมาโทแกรมของแก๊สที่เป็นองค์ประกอบในยางก้อนถ้วยอายุต่างกัน (A) อายุที่โรงงาน 1 วัน (B) อายุ 15-20 วัน และ (C) อายุ 30 วัน โดยหมายเลข 1 คือ Acetic acid, หมายเลข 2 คือ Propanoic acid, หมายเลข 3 คือ 2-methyl-Propanoic acid, หมายเลข 4 คือ Butanoic acid, หมายเลข 5 คือ 3-methyl-Butanoic acid, หมายเลข 6 คือ Pentanoic acid และหมายเลข 7 คือ Hexanoic acid (Internal standard)	66

สารบัญตารางภาคผนวก (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ซ แสดงโครมาโทแกรมของแก๊สที่เป็นองค์ประกอบในของเหลว จากยางก้อนถ้วย (น้ำเซรุ่ม) อายุการเก็บรักษาที่โรงงาน (A) 1 วัน (B) 15 วัน และ (C) 30 วัน โดยหมายเลข 1 คือ Acetic acid, หมายเลข 2 คือ Propanoic acid,หมายเลข 3 คือ 2-methyl-Propanoic acid, หมายเลข 4 คือ Butanoic acid, หมายเลข 5 คือ 3 - methyl - Butanoic acid, หมายเลข 6 คือ Pentanoic acid และหมายเลข 7 คือ Hexanoic acid (Internal standard)	67
ภาคผนวก ฌ แสดงโครมาโทแกรมของแก๊สที่เป็นองค์ประกอบในของเหลวที่อยู่ในบริเวณกองยางก้อนถ้วยอายุการเก็บรักษาที่โรงงาน (A) 1 วัน, (B) 15 วัน, และ (C) 30 วัน โดยหมายเลข 1 คือ Acetic acid, หมายเลข 2 คือ Propanoic acid, หมายเลข 3 คือ 2 – methyl - Propanoic acid, หมายเลข 4 คือ Butanoic acid, หมายเลข 5 คือ 3 – methyl - Butanoic acid, หมายเลข 6 คือ Pentanoic acid และหมายเลข 7 คือ Hexanoic acid (Internal standard)	68
ภาคผนวก ญ แสดงโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์แก๊สที่ดูดซับ บนตัวดูดซับบริเวณจุดล่างและอบยาง หมายเลข 1 คือ acetic acid	69
ภาคผนวก ฎ แสดงโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์แก๊สที่ดูดซับบนตัวดูดซับบริเวณชนิดคาร์บอนชาร์โคล บริเวณปล่องทางเข้าดีไอโรเซอร์ (A) โดยหมายเลข 1 คือ Acetic acid หมายเลข 2 คือ Propanoic acid หมายเลข 3 คือ 2- methyl - Propanoic acid หมายเลข 4 คือ Butanoic acid และหมายเลข 5 คือ 2 - methyl- Butanoic acid และโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์แก๊สที่ดูดซับบนตัวดูดซับบริเวณชนิดคาร์บอนบริเวณปล่องทางออกดีไอโรเซอร์ (B) โดยหมายเลข 1 คือ Acetic acid หมายเลข 2 คือ Butanoic acid	70

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1.1 Supply Chain Model ที่มาของปัญหาเรื่องกลิ่นจากห่วงโซ่อุปทานของอุตสาหกรรมยางพารา จากต้นทางถึงปลายทาง (ที่มา: Credit tangible.com)	1
ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของยางธรรมชาติ (หรือ ยางพารา) มีชื่อเรียกว่า poly-cis-isoprene	5
ภาพที่ 3.1.1 ภาพรวมของวิธีวิจัย	11
ภาพที่ 3.2.1 แสดงการเตรียมตัวอย่าง โดยบรรจุในหลอดขนาดเล็ก จากนั้นดูอากาศที่อยู่ในช่องว่างเหนือตัวอย่าง (Static Headspace) ไปวิเคราะห์ด้วย GC	16
ภาพที่ 4.1.1 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 1,465 bp ตรวจสอบด้วยวิธี Gel Electrophoresis โดยใช้ 1.5% Agarose Lane M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน (1kb DNA Ladder marker), Lane Neg คือ Negative control, Lane ที่ 1-13 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ตัวอย่างจากดินบริเวณสวนยางพารา	19
ภาพที่ 4.1.2 แสดงผลการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของตัวอย่างแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากสวนยางพารา (ดินบริเวณสวนยาง) กับฐานข้อมูล NCBI ด้วยการนำ phylogenetic tree พบว่าตัวอย่างดังกล่าวมีความเหมือนกับ <i>Klebsiella pneumonia</i> strain ABZ11 มากที่สุด	19
ภาพที่ 4.1.3 แสดงตัวอย่างของแบคทีเรียชนิดแกรมบวก (<i>Enterococcus faecalis</i> , A) และชนิดแกรมลบ (<i>Cedecea davisae</i> , B)	20
ภาพที่ 4.1.4 การแบ่งกลุ่มตาม Family ของเชื้อแบคทีเรีย 18 ชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ด้วยสารที่อยู่ในน้ำยางพารา (Selective media)	22
ภาพที่ 4.1.5 แสดงเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ด้วยอาหารที่อยู่ในน้ำยางพารา (Selective media) ทั้งหมด 18 ชนิด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X	27
ภาพที่ 4.1.6 (A) ยางที่ผ่านการฆ่าเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว (B) ยางที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว	29
ภาพที่ 4.2.1 แสดงโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสม VFAs 6 ชนิด คือ acetic acid, propanoic acid, butanoic acid, 2 - methylpropanoic acid, pentanoic acid, isovaleric acid โดย (A) เป็นโครมาโทแกรมที่แยกโดยคอลัมน์ชนิด HP - 5 และ (B) เป็นโครมาโทแกรมที่แยกโดยคอลัมน์ชนิด Carbowax	32
ภาพที่ 4.2.2 แสดงโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานที่เติมลงไปในการกวนถ้วย	32
ภาพที่ 4.2.3 โครมาโทแกรมแสดงอิทธิพลของน้ำหนักตัวอย่างต่อปริมาณของสารที่สนใจ	33

สารบัญภาพ(ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 4.2.4 แสดงอิทธิพลของ static time ต่อปริมาณ VFAs ที่วิเคราะห์โดยวิธี static headspace-GC	36
ภาพที่ 4.2.5 เปรียบเทียบปริมาณของกรดอินทรีย์ระเหยง่าย 6 ชนิดโดยเปรียบเทียบเป็นสัดส่วนของพื้นที่พีค (Area ratio) ของกรดแต่ละชนิดกับพื้นที่พีคของ Internal standard เทียบกับอายุอย่างก่อกวนที่ต่างกัน	44
ภาพที่ 4.2.6 แสดงโครมาโทแกรมของแก๊สที่บรรจุในถุงเก็บจากบริเวณกองยางก้อนถ้วยภายในโรงงานที่ไม่มีการใช้น้ำส้มควันไม้ในการลดกลิ่น หมายเลข 1 คือ N,N-Dimethylacetamide, 2 คือ Butanoic acid, (tetrahydro-2-furanyl)methyl ester, 3 คือ Phenol , 4 คือ Isopropyl myristate , 5 คือ 2-Thiopheneacetonitrile , 6 คือ Benzoic acid, 4-(4-butylcyclohexyl)-, 2,3-dicyano-4-(pentyloxy)phenyl ester , 7 คือ Pentanoic acid, 5-hydroxy-, 2,4-di-t-butylphenyl esters, 8 คือ Hexadecanoic acid, butyl ester, และ 9 คือ Octadecanoic acid, butyl ester	47
ภาพที่ 4.2.7 แสดงโครมาโทแกรมของแก๊สที่บรรจุในถุงเก็บจากบริเวณกองยางก้อนถ้วยในโรงงานที่มีการใช้น้ำส้มควันไม้ในการลดกลิ่น หมายเลข 1 คือ N,N-Dimethylacetamide, 2 คือ Phenol, 3 คือ Isopropyl myristate, 4 คือ Benzoic acid, 4-(4-butylcyclohexyl)-, 2,3-dicyano-4-(pentyloxy)phenyl ester , 5 คือ 2-Ethylhexyl salicylate, 6 คือ Phenol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl), 7 คือ 2,6-Bis(4-azido-benzylidene)-4-methylcyclohexanone, 8 คือ Hexadecanoic acid, butyl ester, และ 9 คือ Di-n-octyl phthalate	48
ภาพที่ 4.2.8 แสดงโครมาโทแกรมของแก๊สที่เก็บตัวอย่างบริเวณบ้านพักพนักงาน พิคหมายเลข 1 คือ Pentanoic acid พิคหมายเลข 2 คือ Hexanoic acid	48
ภาพที่ 4.2.9 แสดงโครมาโทแกรมของแก๊สที่บรรจุในถุงเก็บจากบริเวณทางเข้าดีไอโรเซอร์ หมายเลข 1 คือ N,N-Dimethylacetamide, 2 คือ Butanoic acid, butyl ester , 3 คือ Phenol, 4 คือ Benzene, 1-cyclohexyl-2-methoxy-, 5 Benzoic acid, 4-(4-butylcyclohexyl)-, 2,3-dicyano-4-(pentyloxy)phenyl ester, 6 คือ Benzoic acid, 4-(4-butylcyclohexyl)-, 2,3-dicyano-4-(pentyloxy)phenyl ester, 7 คือ Hexadecanoic acid, butyl ester, 8 คือ methyl-Hydrazine	49

สารบัญภาพ(ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 4.2.10 แสดงโครมาโทแกรมของแก๊สที่บรรจุในถุงเก็บจากบริเวณทางออกดีไอโรเซอรัลหมาย	49
เลข 1 คือ N, N- Dimethylacetamide, 2 คือ Sulfurous acid, hexyl octyl ester, 3 คือ 2-Propanol, 1-butoxy-, 4 คือ Propanoic acid, 2-methyl -, 3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl ester, 5 คือ Phenol , 6 คือ Carbonic acid, isohexyl methyl ester, 7 คือ Benzoic acid, 4-(4-butylcyclohexyl)-, 2,3 - dicyano – 4 - (pentyloxy) phenyl ester , 8 คือ Phenol, 2,6 -bis (1,1 - dimethylethyl) -, 9 คือ Butyrolactone และ 10 คือ Hexadecanoic acid, butyl ester	

ไม่เกี่ยว

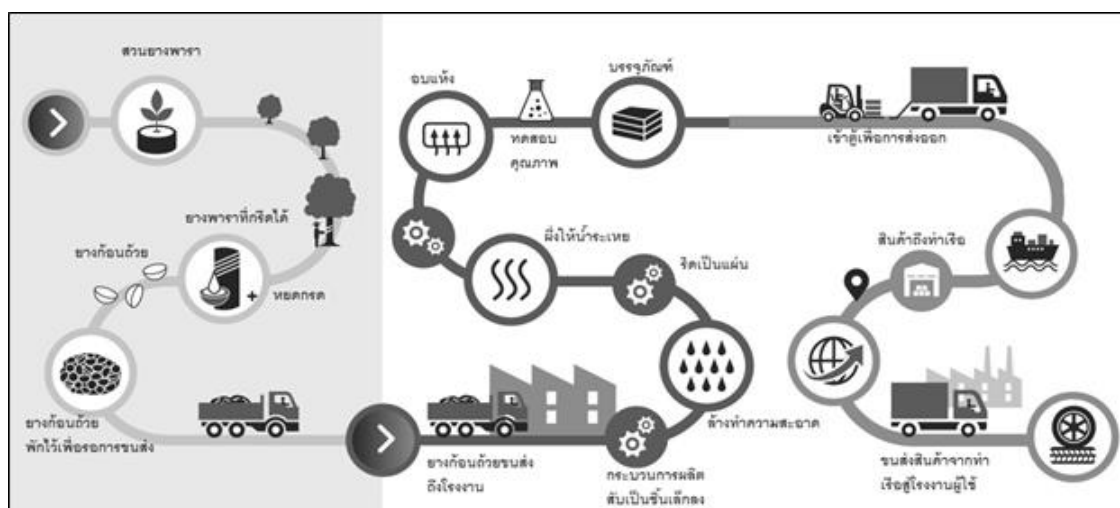
บทที่ 1

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

ปัญหาเรื่องกลิ่นจากอุตสาหกรรมผลิตยางแท่งจากยางพาราเป็นปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญต่อการพัฒนาและการเจริญเติบโตของภาคอุตสาหกรรม โดยเกิดขึ้นตลอดห่วงโซ่อุปทานของอุตสาหกรรมผลิตยางแท่ง ดังแสดงในภาพที่ 1 นับตั้งแต่การได้มาซึ่งวัตถุดิบจากสวนยาง (คือ ยางก้อนถ้วย หรือ Cup lump) การพักยางก้อนถ้วยเพื่อรอการขนส่งไปยังโรงงาน การขนส่งยางก้อนถ้วยมายังโรงงานอุตสาหกรรม การจัดเก็บยางก้อนถ้วยในโรงงาน และกระบวนการอบแห้งในโรงงานอุตสาหกรรม ส่วนกระบวนการหลังจากนี้แล้ว กลิ่นที่เกิดขึ้นจะไม่รุนแรงนัก (อ้างอิงจากขอบเขตการศึกษาในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและการศึกษาโมเดล supply chain) นั่นคือ สาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดกลิ่นอาจเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ที่อยู่ในยาง ซึ่งความสัมพันธ์ที่วุ่นนี้เกิดจากการมีน้ำเซรัม (serum) อันอุดมไปด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ฯลฯ ซึ่งเป็นอาหารอย่างดีของจุลินทรีย์ ดังนั้นกลิ่นที่เกิดขึ้นนี้จึงคาดว่าเกิดจากการย่อยสลายชีวโมเลกุลในยางของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงของกลิ่นกับชนิดของกรดที่ใช้ในการทำยางก้อนถ้วย ซึ่งปัจจุบันมีการใช้กรดฟอร์มิกและกรดซัลฟูริก โดยกรดชนิดหลังนี้จะทำให้เกิดซัลเฟตผสมในยางก้อนถ้วยซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้เกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์รุนแรงขึ้น ข้อมูลเพิ่มเติมที่ได้รับจากบริษัทศรีตรัง (มหาชน) คือกลิ่นที่เกิดจากยางก้อนถ้วยที่ผลิตในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะรุนแรงกว่าที่ผลิตจากภาคใต้



ภาพที่ 1.1 Supply Chain Model ที่มาของปัญหาเรื่องกลิ่นจากห่วงโซ่อุปทานของอุตสาหกรรมยางพารา จากต้นทางถึงปลายทาง (ที่มา: Credit tangible.com)

งานวิจัยก่อนหน้านี้ที่เกี่ยวข้องเป็นเพียงระดับห้องปฏิบัติการ ไม่ได้ต่อยอดถึงโรงงานอย่างเป็นรูปธรรมที่สามารถนำไปใช้จริงได้ (Hoven *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังสนใจเพียงการจัดเชื้อ โดยมีได้สนใจว่าส่งผลต่อการเกิดกลิ่นในยางก้อนถ้วยหรือกระบวนการที่เกี่ยวข้อง หรือสมบัติของยางแท่ง (Nornanysya *et al.*, 2013; Nornanysya *et al.*, 2012) จึงยังไม่มีวิธีแก้ไขที่มีประสิทธิภาพ ในปัจจุบันโรงงานผลิตยางแท่งนิยมใช้การดูดซับกลิ่นที่เกิดในช่วงการอบแห้ง เช่น ใช้ตัวดูดซับ น้ำ เป็นต้น แต่ก็ยังไม่เป็นที่น่าพอใจนักเพราะยังมีการร้องเรียนเรื่องกลิ่นจากชาวบ้าน นอกจากนี้กลิ่นที่เกิดในการผลิตยางในสวนยางและระหว่างการขนส่งก็ยังคงรบกวนชุมชนโดยรอบสวนยางและที่อยู่ระหว่างสวนยางกับโรงงานอุตสาหกรรมผลิตยางแท่งอย่างมาก

จากการลงพื้นที่จริงของทีมวิจัย พบว่าต้นน้ำ (ในสวน) และกลางน้ำ (กระบวนการผลิตยางแท่ง) เท่านั้นที่มีกลิ่น โดยปลายน้ำ (กระบวนการบรรจุ) ไม่มีกลิ่นเหม็น กลิ่นเหม็นที่เกิดขึ้นนี้เป็นส่วนผสมของกลิ่นที่เกิดจากจุลินทรีย์ กลิ่นกรด และอื่นๆ โดยกลิ่นจากจุลินทรีย์ชัดเจนมากที่สุด ทีมวิจัยจึงมีความเห็นว่าควรเริ่มต้นศึกษากลิ่นที่จากจุลินทรีย์ก่อน ซึ่งหากสามารถกำจัดจุลินทรีย์ได้ ก็จะช่วยลดความรุนแรงของกลิ่น ด้วยเหตุนี้วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยจึงเป็นการหาจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดกลิ่นในยางก้อนถ้วยและโรงงานผลิตยางแท่งที่ตั้งอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อิทธิพลของกรดที่ใช้จับเนื้อยาง และวิธีการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดกลิ่น โดยศึกษาหาสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดกลิ่น และอิทธิพลของสารดังกล่าวต่อสมบัติของยางแท่งที่เตรียมในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้มั่นใจในคุณภาพของยางแท่งที่ผลิตได้ว่าไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม โครงการวิจัยนี้ยังมุ่งวิเคราะห์องค์ประกอบของกลิ่นที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตยางก้อนถ้วย เพื่อจัดทำโปรไฟล์สำหรับใช้หาวิธีกำจัดกลิ่นที่เหมาะสม และเปรียบเทียบโปรไฟล์ของกลิ่นที่เกิดขึ้นในโรงงานในสภาพปัจจุบันกับโปรไฟล์ของกลิ่นที่ไม่รบกวนชุมชนใกล้เคียง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. หาจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของกลิ่นเหม็นในยางก้อนถ้วยและโรงงานผลิตยางแท่ง
2. อิทธิพลของชนิดกรดที่มีต่อกลิ่นเหม็น
3. หาสารหรือวิธีการที่ยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของกลิ่นเหม็นในช่วงต้นน้ำ
4. อิทธิพลของปริมาณสารที่ใช้กำจัดกลิ่นในยางก้อนถ้วยต่อสมบัติของยางแท่งที่เตรียมในห้องปฏิบัติการ
5. ทดสอบวิธีการกำจัดกลิ่นที่คัดเลือกจากระดับห้องทดลองในสวนยาง
6. สร้างโปรไฟล์ของกลิ่นที่เกิดขึ้นในการผลิตยางก้อนถ้วยและยางแท่ง รวมทั้งเปรียบเทียบโปรไฟล์ระหว่างกลิ่นที่เกิดขึ้นกับกลิ่นที่คาดว่าเป็นค่าที่ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะต่อชุมชน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. เปรียบเทียบจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดกลิ่นจาก 3 แหล่ง จากยางก้อนถ้วยในสวนยาง จากยางก้อนถ้วยที่פקเก็บในโรงงานและจากยางที่ผ่านการสับย่อยและรีดน้ำออกแล้วเพื่อเตรียมทำยางแท่ง (เฉพาะโรงงานในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ)
2. การทดลองหาสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของกลิ่นเหม็น
3. ทดลองใช้สารยับยั้งจุลินทรีย์ในระดับห้องปฏิบัติการ และวัดกลิ่นไม่พึงประสงค์
4. ทดลองใช้สารยับยั้งจุลินทรีย์ในสวนยาง และวัดกลิ่นไม่พึงประสงค์
5. ศึกษาอิทธิพลของปริมาณสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใส่ในยางก้อนถ้วย โดยวัดสมบัติของยางที่ผ่านการอบแห้ง รวมทั้งหาปริมาณสารในยางที่ผ่านการอบแห้งในระดับโมเลกุลด้วย FTIR หรือเทคนิคอื่นๆ ที่เหมาะสม
6. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกลิ่นเพื่อสร้างโปรไฟล์ของกลิ่นที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตยางก้อนถ้วยและยางแท่ง (สนใจเฉพาะสวนยางในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และโรงงานผลิตยางแท่งที่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเท่านั้น) และเปรียบเทียบโปรไฟล์ของกลิ่นกับกลิ่นที่คาดว่าจะไม่ก่อให้เกิดมลภาวะต่อชุมชน
7. เนื่องจากห้องปฏิบัติการไม่มีเครื่องอัดยางก้อน รวมทั้งได้ตั้งสมมติฐานว่าการอัดยางก้อนนั้นไม่ส่งผลต่อการเกิดกลิ่น ดังนั้นในการศึกษาเรื่ององค์ประกอบของกลิ่นและอิทธิพลของสารยับยั้งจุลินทรีย์นี้จึงสนใจทดสอบกับยางที่ผ่านการอบแห้งเท่านั้น (ยังไม่นำไปอัดเป็นยางก้อนหรือกระบวนการอื่นๆ)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จุดประสงค์หลักของงานวิจัยนี้ก็คือการได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดกลิ่น วิธีการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดกลิ่นที่ไม่ทำให้สมบัติของยางแท่งเปลี่ยน โปรไฟล์ของกลิ่นที่เกิดในสวน (บริเวณที่ทำยางก้อนถ้วย) และกลิ่นที่เกิดในโรงงาน (บริเวณพักเก็บยางก้อนถ้วยของโรงงานและบริเวณการอบแห้งยาง) ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับในด้านต่างๆ จึงเป็นดังนี้

ประโยชน์เชิงเศรษฐศาสตร์/เชิงพาณิชย์

1. ลดผลกระทบด้านสังคมและสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากกลิ่นของอุตสาหกรรมยางพารา ส่งผลให้ผู้ประกอบการมีศักยภาพในการแข่งขันทางธุรกิจมากยิ่งขึ้น นำไปสู่การเติบโตของเศรษฐกิจอย่างยั่งยืน
2. สามารถกำหนดค่ามาตรฐานและวิธีการตรวจวัดกลิ่นที่เหมาะสมสำหรับกลุ่มอุตสาหกรรมยางพารา
3. ใช้หาแนวทางการดำเนินงานและเทคโนโลยีที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดกลิ่นจากอุตสาหกรรมยางพารา

ประโยชน์เชิงวิชาการ/การศึกษา

1. ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการทำวิจัยของนิสิตในระดับปริญญาโทและเอก เพื่อต่อยอดงานวิจัยต่อไปในการปรับปรุงสิ่งแวดล้อมในสวนยางที่ผลิดยางก้อนถ้วย การขนส่งยางก้อนถ้วยไปยังโรงงาน และโรงงานที่ใช้ยางก้อนถ้วยเป็นวัตถุดิบ
2. ทราบลักษณะองค์ประกอบทางเคมีของยางจากแหล่งที่ศึกษา เพื่อใช้ประโยชน์ในการกำจัดกลิ่นในโรงงานต่อไป

ประโยชน์เชิงสังคม

1. ได้กระบวนการผลิตยางก้อนถ้วยและการผลิตยางแท่งที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ที่ไม่ส่งกลิ่นเหม็นรบกวนชุมชนใกล้เคียง
2. ลดผลกระทบด้านสุขภาพของคนในชุมชนบริเวณใกล้เคียง อันเกิดจากกลิ่นในกระบวนการผลิตยางก้อนถ้วย การขนส่ง และการแปรรูป ส่งผลให้คนในชุมชนมีสุขภาพแข็งแรงและอยู่ดีมีสุข
3. ป้องกันปัญหาข้อร้องเรียนอันเกิดจากกลิ่นจากอุตสาหกรรมยางพาราที่มีต่อชุมชน ทำให้ภาคอุตสาหกรรมสามารถอยู่ร่วมกับภาคประชาชนได้อย่างยั่งยืน

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ คือ คือ สภาอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย โดยจะนำข้อมูลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ไปใช้ในการลดกลิ่นจากอุตสาหกรรมยางพารา (การแปรรูปยางก้อนถ้วย) ตั้งแต่กระบวนการผลิต การขนส่ง และการแปรรูปภายในโรงงานอุตสาหกรรม พร้อมทั้งใช้เป็นข้อมูลสำหรับการกำหนดค่ามาตรฐานกลิ่นที่เหมาะสมสำหรับอุตสาหกรรมยางพาราต่อไป

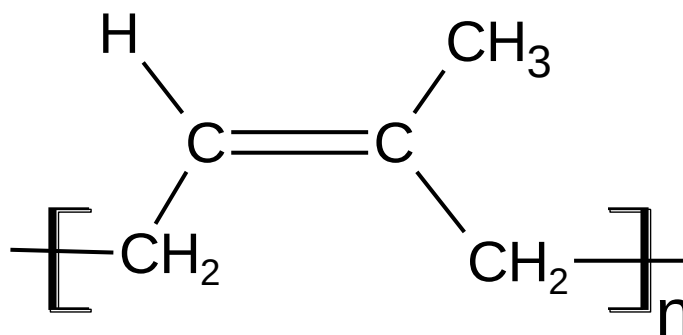
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 น้ำยางธรรมชาติหรือน้ำยางพารา

น้ำยางธรรมชาติสดที่เพิ่งได้จากต้นยาง *Havea Braziliensis* มีสีขาวขุ่นโดยมีค่าพีเอชอยู่ที่ประมาณ 6.5–7.0 ค่าความตึงผิว (Surface tension) อยู่ระหว่าง 40–45 มิลลิจูลต่อตารางเมตร (mJ/m^2) และมีความหนาแน่น (Density) เท่ากับ 0.97–0.98 กรัมต่อมิลลิลิตร (Blackley, 1997) เมื่อเจือจางน้ำยางธรรมชาติสดด้วยการเติมน้ำไปเรื่อยๆ นั้น จะพบว่าความหนืดมีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงจุดสูงสุดแล้วจึงลดลง ปรากฏการณ์นี้เกิดเนื่องมาจากการบวม (Swelling) ของอนุภาคลูทอยด์ (Lutoids) ในน้ำยางธรรมชาติสดที่บวมมากตามปริมาณน้ำที่เพิ่มขึ้น จนในที่สุดอนุภาคก็แตก (Bursting) อันเป็นผลของการรบกวนสมดุลระหว่างอนุภาคลูทอยด์ และซีรัม (Serum) (Verhaar, 1956) หมายเหตุ โดยปกติสมบัติเหล่านี้เปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาการเก็บ แต่การเติมสารเพิ่มความเสถียรของน้ำยางธรรมชาติจะช่วยชะลอการเปลี่ยนแปลงไว้ได้

น้ำยางธรรมชาติประกอบไปด้วยอนุภาคขนาดเล็กที่แขวนลอยอยู่ในเซรัม โดยเป็นสารไฮโดรคาร์บอนซึ่งเป็นพอลิไอโซพรีนเป็นส่วนใหญ่ (ภาพที่ 2.1) มีค่ามวลโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 10^6 กรัมต่อโมล (g/mol) (Gazeley, 1998) อนุภาคยางที่อยู่ในน้ำยางจะมีประมาณ 30–40 เพอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก นอกจากน้ำและอนุภาคยางยังมีสารอินทรีย์และแร่อนินทรีย์รวมอยู่ด้วย (Blackley, 1997) โดยองค์ประกอบโดยทั่วไปของน้ำยางสดแสดงในตารางที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของยางธรรมชาติ (หรือ ยางพารา) มีชื่อเรียกว่า poly-*cis*-isoprene

องค์ประกอบในน้ำยางธรรมชาติสด สามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วนประกอบใหญ่ๆ คือ ส่วนที่เป็นเนื้อยาง และส่วนที่ไม่ใช่เนื้อยาง (สมกิต และอดิศักดิ์, 2557) สารอื่นๆ เท่าที่ค้นพบในขณะนี้คือ อนุภาคฟรียูสลิ้ง ซึ่งเป็น

ตัวทำให้ยาง มีสีเหลือง ประกอบด้วยคาร์บอนน้อยและไขมัน โดยโปรตีนในน้ำยางพารานั้นจะแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ โปรตีนที่ละลายอยู่ในเฟสของเหลวโปรตีนที่ผิวอนุภาควาง และโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบในอนุภาคขนาดใหญ่เช่น ลูทอยด์ เป็นต้น (Blackley, 1997) เมื่อนำเฉพาะอนุภาควางมาทำการวิเคราะห์สารประกอบ จะพบว่าสารประกอบในอนุภาควางเป็นไปตามตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทั่วไปของน้ำยางพาราสด

ส่วนประกอบ	ร้อยละโดยน้ำหนักของน้ำยางพาราสดทั้งหมด
สารที่เป็นของแข็งทั้งหมด	36
เนื้อยางแห้ง	33
สารจำพวกโปรตีน	1–1.5
สารจำพวกเรซิน	1–2.5
ซีเ็ก	สูงถึง 1
น้ำตาล	1
น้ำ	ปริมาณส่วนที่เหลือ

ที่มา: Blackley (1997)

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของอนุภาควาง

ส่วนประกอบ	ร้อยละโดยน้ำหนักของเนื้อยางทั้งหมด
เนื้อยางไฮโดรคาร์บอน	86
น้ำ (กระจายในเนื้อยาง)	10
สารจำพวกโปรตีน	1
สารจำพวกไขมัน	3
พวกละหะ (Mg, P, Cu)	0.5

ที่มา: อติชัย (2546)

เนื่องจากยางที่ได้จากน้ำยางธรรมชาติเกิดจากการที่มี cis-1,4-polyisoprene เป็นส่วนประกอบหลัก (ภาพที่ 2.1) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์สายโซ่ยาวที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 10^6 กรัมต่อโมล (g/mol) (Gazeley, 1998) สายโซ่ที่ยาวทำให้ผลิตภัณฑ์ยางที่ได้มีสมบัติเชิงกลที่ดี เหมาะที่จะนำไปใช้เป็นยางล้อ ยางรองเครื่อง และอื่นๆ cis-1,4-polyisoprene เป็นสารที่ไม่มีขั้วจึงละลายได้ดีในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น เบนซีน

เฮกเซน เป็นต้นมีโครงสร้างการจัดเรียงตัวของโมเลกุลแบบอสัณฐาน (amorphous) แต่ในบางสภาวะโมเลกุลของยางสามารถจัดเรียงตัวค่อนข้างเป็นระเบียบที่อุณหภูมิต่ำหรือเมื่อถูกยืดจึงสามารถเกิดผลึก (crystallize) ได้ การเกิดผลึกเนื่องจากอุณหภูมิต่ำ (low temperature crystallization) จะทำให้ยางแข็งมากขึ้น แต่ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นยางก็จะอ่อนลงและกลับสู่สภาพเดิม การเกิดผลึกเนื่องจากการยืดตัว (strain induced crystallization) นี้ทำให้ยางทั้งสองมีสมบัติเชิงกลที่ตื้นันคือทนทานต่อแรงดึง (tensile strength) ต่อการฉีกขาด (tear resistance) และทนทานต่อการขัดสี (abrasion resistance) สูง ลักษณะเด่นอีกอย่างของยางธรรมชาติคือ ความยืดหยุ่น (elasticity) สามารถกลับคืนสู่รูปร่างและขนาดเดิม (หรือใกล้เคียง) อย่างรวดเร็วเมื่อแรงภายนอกที่มากระทำกับมันหมดไป

2.2 ยางแท่ง (Technically specified natural rubber, TSR)

ยางแท่งผลิตจากน้ำยางธรรมชาติสด ยางก้อนถ้วยยางแท่ง ยางแผ่นรมควัน และเศษยาง สมบัติของยางแท่งเป็นไปตามสมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมีของยางแท่งเอง ทำให้สามารถแบ่งยางแท่งได้หลายระดับ (เรียกว่า เกรด) โดยมาตรฐานยางแท่งของไทย คือ ยางแท่งเอสทีอาร์ (STR ย่อจาก Standard Thai Rubber) ทั้งนี้เกรดของยางแท่งนี้เปลี่ยนแปลงตามวัตถุดิบที่ใช้ ตารางที่ 2.3 แสดงเฉพาะมาตรฐานของยางแท่งที่ผลิตจากยางก้อนถ้วย (ไม่รวมน้ำยางเลเท็กซ์) และค่า CV ที่ต่อท้ายเกรด ย่อมาจาก Constant viscosity หมายถึงยางแท่งที่มีความหนืดคงที่

การยางแห่งประเทศไทย (อสย.เดิม) ฝ่ายโรงงาน 5 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2559) ได้แบ่งยางก้อนถ้วยเป็น 3 ประเภท ตามอายุ ซึ่งเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ในยาง คือ ยางก้อนถ้วยสด (อายุ 1-3 วัน) ยางก้อนถ้วยหมาด (อายุ 4-7 วัน) และยางก้อนถ้วยแห้ง (อายุ > 7 วัน) ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของยางแท่งเกรดต่างๆที่ผลิตจากยางก้อนถ้วย (Astlett Rubber, 2012)

เกรด	STR 5	STR 10	STR 20	STR5CV	STR 10CV	STR 20CV
ปริมาณสิ่งสกปรก (Dirt content, %wt max)	0.04	0.08	0.16	0.04	0.08	0.16
ปริมาณเถ้า (Ash content, %wt max)	0.6	0.6	0.8	0.6	0.6	0.8
ปริมาณไนโตรเจน (Nitrogen content, %wt max)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
ปริมาณสิ่งระเหย (Volatile matter, %wt max)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
ความอ่อนตัวเริ่มแรก (Initial plasticity, Po min)	30	30	30	30	-	-
ดัชนีความอ่อนตัว (Plasticity retention index, PRI min)	60	50	40	50	50	40
ความหนืดมูนนี่ (Mooney viscosity: ML, 1+4, 100°C)	-	-	-*	60 +7/-5	60 +7/-5	60 +7/-5

* ตลาดสินค้าเกษตรล่วงหน้า (www.afet.or.th) กำหนดให้ค่าความหนืดมูนนี่ (Mooney viscosity) ของยางแท่ง STR 20 เท่ากับ 80 ± 10 ML, 1+4, 100°C

ตารางที่ 2.4 ลักษณะของยางก้อนถ้วย

อายุ(วัน)	1-3	4-7	> 7
ลักษณะ	ยางก้อนเปียก นุ่ม มีรูปทรงใกล้เคียงกับถ้วย รับน้ำยาง	ไม่มีของเหลวไหลออก จากก้อนยาง และมีผิวนุ่ม จนถึงกึ่งแข็ง	ยางก้อนถ้วยแห้ง แข็ง
สีของยางก้อน	ขาว	ขาวขุ่น-น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลเข้ม
ความชื้น (%)	45-55	35-45	<35

ที่มา: (สำนักงานตลาดกลางยางพาราหนองคาย, 2561)

2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกลิ่น

เนื่องจากกลิ่นเกิดจากสารระเหย ทำให้สามารถใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography, GC) ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกลิ่นได้ จากการทบทวนวรรณกรรม (Idris *et al.*, 2012) พบว่ากลิ่นเหม็นที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตยางเกิดจากการที่จุลินทรีย์ย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในยาง เช่นโปรตีน คาร์โบไฮเดรต โดยมีการปลดปล่อยกลิ่นออกมาระหว่างการเก็บกักยางในสวนหรือโรงงาน และเมื่อได้รับความร้อนขณะอบแห้งในขั้นตอนการผลิต ผลการวิเคราะห์แก๊สที่เก็บมาด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (Gas chromatography-Mass spectrometry, GC-MS) แสดงให้เห็นว่า แก๊สนั้นเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) ในกลุ่มของกรดไขมันสายโซ่สั้น (short chain fatty acid) ที่สามารถระเหยได้ (volatile fatty acid, VFA) เป็นส่วนใหญ่ และมีองค์ประกอบอื่นๆ เพียงเล็กน้อย ตัวอย่างของกรดไขมันสายโซ่สั้น (เป็นสารที่มีคาร์บอนในโมเลกุลน้อยกว่า 6 อะตอม) ที่พบคือ acetic acid (C2) propionic acid (C3) isobutyric acid (C4) butyric acid (C4) isovaleric acid (C5) และ valeric acid (C5) ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสาเหตุของการเกิดกลิ่นระหว่างกระบวนการทำแห้งซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการผลิตยาง (Idris *et al.*, 2012) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแก๊สนั้นประกอบด้วยสารประกอบไนโตรเจนหรือกำมะถันที่มีโมเลกุลเล็กและสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) ซึ่งชนิดและปริมาณของสารระเหยที่พบจะขึ้นอยู่กับคุณภาพยางและกระบวนการทำแห้ง (Sakdapipanich and Insom, 2006; Hoven *et al.*, 2003)

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกลิ่นจากก้อนยางหรือชิ้นส่วนของยาง ยังสามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิค head space ซึ่งจะใช้การระเหยขององค์ประกอบที่ระเหยได้จากชิ้นงานตัวอย่างเมื่อให้ความร้อนและเก็บตัวอย่างแก๊สที่บริเวณส่วนบนของภาชนะเพื่อไปวิเคราะห์โดยเทคนิค GC (Sakdapipanich and Insom, 2006; Hoven *et al.*, 2003) ซึ่งวิธีนี้จะสามารถวิเคราะห์ได้ในห้องปฏิบัติการและมีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการวิเคราะห์องค์ประกอบกลิ่นของชิ้นยาง นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิธี solid phase microextraction (SPME) (Nornanysya *et al.*, 2012) ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ไม่มีการใช้ตัวทำละลายต่างๆ จึงจัดเป็นวิธีการสกัดที่สะอาด แต่มีข้อจำกัดที่ชนิดของตัวดูดซับที่ใช้มีราคาแพงและไม่มีความหลากหลาย รวมทั้งหากใช้ตัวดูดซับซ้ำจะเกิดการตกค้างของสารที่วิเคราะห์บนวัสดุดูดซับและทำให้ผลการวิเคราะห์ผิดพลาด

การเก็บตัวอย่างอากาศหรือแก๊สที่มีกลิ่นเพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกลิ่น สามารถทำได้หลายวิธี เช่นการเก็บตัวอย่างแก๊สด้วยถุงเก็บแก๊สแล้วเลือกตัวดูดซับที่เหมาะสมสำหรับการจับสารที่ต้องการวิเคราะห์ และชะสารที่ต้องการออกจากตัวดูดซับแล้วจึงวิเคราะห์สารโดยการฉีดของเหลวเข้าสู่ GC-FID หรือ

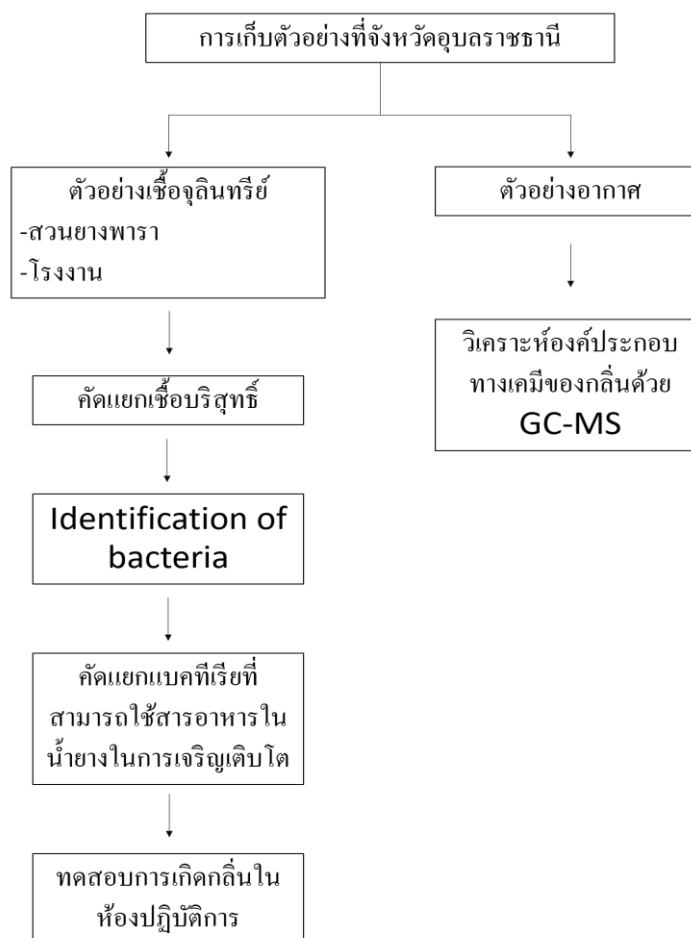
GC-MS หรือนำตัวดูดซับไปให้ความร้อนเพื่อให้สารที่ต้องการคลายการดูดซับ (thermal desorption) และวิเคราะห์โดย GC-FID หรือ GC-MS (Idris *et al.*, 2012)

อย่างไรก็ตามความถูกต้องของโปรไฟล์ของกลิ่นขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมในบริเวณที่เก็บตัวอย่างอากาศ เช่น ทิศทางลม กลิ่นจากกระบวนการอื่นๆ ที่เกิดขึ้นในบริเวณใกล้เคียง เป็นต้น

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

ในการดำเนินการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์และตัวอย่างอากาศจากสวนยางพาราและโรงงานผลิตยางแท่ง บมจ.ศรีตรังแอโกรอินดสทรี ที่ตั้งอยู่ในจ.อุบลราชธานี โดยตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้นี้จะนำไปคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ ระบุชนิดเชื้อ และคัดเลือกเชื้อที่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นในลักษณะที่คล้ายกับกลิ่นจากโรงงานผลิตยางแท่ง สำหรับตัวอย่างอากาศที่ได้จากสวนและตามจุดต่างๆ ของโรงงาน จะไปนำวิเคราะห์โดยตรง ภาพที่ 3.1.1 แสดงวิธีการดำเนินวิจัยโดยรวมของงานวิจัยนี้ รายละเอียดของแต่ละขั้นตอนเป็นดังนี้



ภาพที่ 3.1.1 ภาพรวมของวิธีวิจัย

3.1 การคัดเลือกเชื้อที่ทำให้เกิดกลิ่น

ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการคัดเลือกเชื้อนี้เก็บจากสวนและจุดต่างของโรงงานดังระบุในตารางที่

3.1.1 โดยวิธีการเก็บทำการ Swab

ตารางที่ 3.1.1 ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างเชื้อ

สวนยาง	โรงงานพักยาง
ดินบริเวณสวนยาง	น้ำบนรถบรรทุกก่อนยาง
ถ้วยรองน้ำยางที่จับตัวเป็นก้อนแบบไม่ใส่กรด	น้ำในบ่อล้างยาง
ถ้วยรองน้ำยางที่จับตัวเป็นก้อนแบบใส่กรดซัลฟูริก	กองยางก้อน (ฉีดน้ำสัปดาห์ไม่ ไม่ฉีดน้ำสัปดาห์ไม่ น้ำ ชั่ง)
ถ้วยรองน้ำยางที่จับตัวเป็นก้อนแบบใส่กรดฟอร์มิค	กองยางแผ่นอายุ 1 วัน
กองยางก้อนที่ฉีด Effective Microorganism (น้ำอีเอ็ม)	กองยางแผ่นอายุ 25 วัน
กองยางก้อนที่ไม่ได้ฉีดน้ำอีเอ็ม	กองยางแผ่นอายุ 50 วัน

3.1.1 การคัดเลือกเชื้อที่ทำให้เกิดกลิ่นโดยวิธีสตรีกเพลท (Streak Plate)

นำตัวอย่างมาทำ Serial dilution เพื่อหาความเข้มข้นเชื้อที่เหมาะสมของแต่ละตัวอย่างเพื่อให้มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 cfu/ml เริ่มต้นด้วยการนำตัวอย่างมาทำ dilution โดยใช้น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} จากนั้นนำมาเลี้ยงบน Nutrient Agar Plate ปริมาตร 1 ml เลี้ยงเชื้อไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นับจำนวนโคโลนีที่ 30-300 cfu/ml เลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง จากนั้นนำมา Streak บน Nutrient Agar Plate เลี้ยงเชื้อข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เลือก 1 โคโลนีทำการ Streak plate ซ้ำอีกครั้ง (Tassadaq *et al.*, 2013) จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงใน Nutrient Broth (NB) 3 ml เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ เลี้ยงเชื้อไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำมาทำ Gram stain (หัวข้อ 3.1.2) เพื่อดูชนิดของแบคทีเรีย และเก็บเชื้อในสารละลาย 40% Glycerol

3.1.2 การย้อมแกรมจุลินทรีย์ (Gram staining) เพื่อดูชนิดของแบคทีเรีย

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว NB มาทำการย้อมเซลล์โดยหยดเชื้อจุลินทรีย์บนแผ่นสไลด์ ใช้ Loop เชี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว Smear บนแผ่นสไลด์เพื่อให้เชื้อกระจายบนแผ่นสไลด์ จากนั้นตรึงเชื้อด้วยไฟโดยนำสไลด์ที่มีเชื้อมาผ่านไฟประมาณ 4-5 ครั้ง เมื่อเชื้อแห้งบนแผ่นสไลด์ทำการย้อมสี Crystal violet จนท่วมแผ่นสไลด์ทิ้งไว้ 1 นาที เมื่อครบเวลา นำมาล้างผ่านน้ำเบาๆ และหยดสารละลายไอโอดีนจนท่วมสไลด์ทิ้งไว้

30 วินาที เมื่อครบเวลา นำมาล้างด้วยสารละลาย Decolorize ล้างผ่านน้ำเบาๆ หยดสี Safranin o จนท่วมแผ่น สไลด์ทิ้งไว้ 30 วินาที เมื่อครบเวลา นำมาล้างผ่านน้ำเบา ซับสไลด์ให้แห้งนำไปตรวจสอบผ่านกล้องจุลทรรศน์ และบันทึกผล

3.1.3 การเพิ่มปริมาณ และการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วงยีน 16S rRNA

● การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

นำเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลว NB ที่ได้จากข้อ 3.1.1 มาทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยเริ่มต้นจากนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย TE buffer (100 mM Tris-HCl, 30 mM EDTA (pH 8.0)) ปริมาตร 400 ไมโครลิตรและไลโซไซม์ (lysozyme) 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง เติมโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันเบาๆ บ่มที่ 55 °C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เติมสารละลายฟีนอล:คลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิล-แอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 25:24:1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่า 5 นาที นำไปตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใส ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ถ่ายใส่หลอด eppendorf ใหม่ จากนั้นเติมโซเดียมอะซิเตท (CH_3COONa) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมไอโซโพรพานอล ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งไป ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมา 5-10 ครั้ง แล้วปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งไป แล้วตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตะกอนด้วย TE buffer (pH 8) [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA] ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร กำจัดอาร์เอ็นเอ (RNA) และโปรตีน ด้วยการเติมสารละลายเอนไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase Solution) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 6-12 ชั่วโมง และเอนไซม์โปรตีนเอส เค (Proteinase K) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 6-12 ชั่วโมง นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการทดลองถัดไป

● การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

เทคนิค PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายให้ได้ปริมาณมาก โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase สร้างดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจากดีเอ็นเอเป้าหมาย 1 โมเลกุล เพิ่มขึ้นเป็นล้านโมเลกุลในเวลาเพียง 3-4 ชั่วโมง โดยในการทดลองนี้จะใช้ universal primer โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

Forward primer: 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')

Reverse primer: 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')

ส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ 1 ไมโครลิตร, *Taq* polymerase 0.2 ไมโครลิตร, 10X reaction buffer 5 ไมโครลิตร, dNTP 5 ไมโครลิตร, primer forward ที่มีความเข้มข้น 5 μ M 1.5 ไมโครลิตร และ primer reward ที่มีความเข้มข้น 5 μ M 1.5 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 35.8 ไมโครลิตร โดยใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยา ดังนี้ pre-denature 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ, denature 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, annealing 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extensión 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และตามด้วย final extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1 kb DNA ladder เป็น standard marker

3.1.4 การทำบริสุทธิ์ผลผลิตพีซีอาร์

นำผลผลิตพีซีอาร์เติมเอทานอลเข้มข้น 100% 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด และ $\frac{1}{10}$ Sodium acetate incubate -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5-15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 2 รอบ นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5-15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ระเหยเอทานอลและละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 20 ไมโครลิตร จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์(PCR product) ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1 Kb DNA ladder เป็น standard marker วัดปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง nanodrop ส่งตรวจหาลำดับเบส (DNA sequencing) ของแบคทีเรียแต่ละชนิดเพื่อใช้ในการจำแนกขั้นต่อไป

3.1.5 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลออนไลน์ (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกจัดเรียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่เลือกมาจากฐานข้อมูลออนไลน์ (GenBank) โดยใช้ alignment software (CLUSTAL W) และสร้าง phylogenetic tree ขึ้น (MEGA V.7) โดยกำหนดค่า algorithm ดังนี้ Neighbor-Joining tree ,Bootstrap Replications 1000 ,Model/Method Kimura 2-parameter model

3.1.6 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตบนอาหารที่เตรียมจากน้ำยางพารา (Selective media)

ในการคัดเชื่อนี้ ได้ทำโดยเตรียม Selective media ซึ่งประกอบด้วย น้ำยางพาราและ Agar ในอัตราส่วนน้ำยางพารา : Agar เท่ากับ 1 : 5 ทำการเท Selective media ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (สภาวะที่ใช้ฆ่าเชื้อคือ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที) ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ทราบชนิดแล้ว (จากข้อ 3.1.5) มาทำการ Streak plate บน Selective media ที่อยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ทิ้งไว้ข้ามคืน ดำเนินการย้ายโคโลนีที่ได้จากแต่ละจานอาหารเลี้ยงเชื้อมาใส่ในหลอดเหวี่ยงขนาด 1.5 มล. ที่บรรจุของเหลวปริมาตร 1 มล. (ของเหลวนี้คือ กลีเซอรอลเข้มข้น 40% ในอาหารเหลว) เชื้อที่ได้นี้จะนำไปใช้ในข้อ 3.1.7 ต่อไป

3.1.7 การทดสอบกลั่นจากเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ

นำยางก้อนที่ผลิตโดยสวนยางแห่งหนึ่ง (ไม่ทราบชนิดกรดที่ใช้จับตัวเนืวยาง) มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆขนาด 0.5 cm^3 ซึ่งก้อนยางนี้ใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 3 กรัม นำไปฆ่าเชื้อ (สภาวะที่ใช้ฆ่าเชื้อคือ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที) จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดแยกดังที่ได้อธิบายใน 3.1.6 (ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 8 Mcfaland) ลงไปในหลอดที่มีก้อนยางผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยทำการดมกลั่นเมื่อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องครบ 1 วัน 3 วัน และ 5 วัน สำหรับชุดควบคุม จะเติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงไปหลอดทดลองที่มียางก้อน 3 กรัมและผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นดมกลั่นเมื่อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องครบ 1 วัน 3 วัน และ 5 วัน

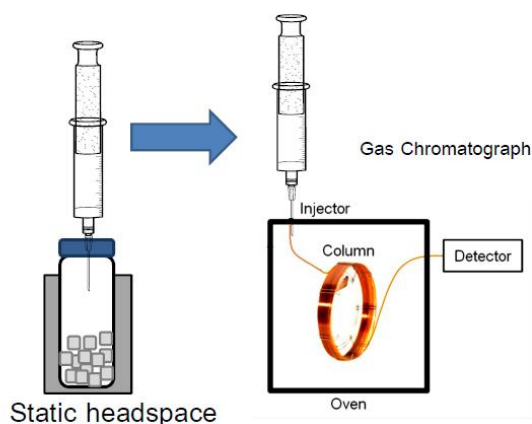
3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกลั่น

3.2.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารผสมโดยเทคนิค Gas Chromatography (GC)

ตัวอย่างยางก้อนถ้วยสำหรับทดลองหาสภาวะในการวิเคราะห์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทศรีตรัง โดยเตรียมตัวอย่างยางก้อนถ้วยดังนี้ นำยางก้อนถ้วยมาหั่น แล้วตัดให้เป็นชิ้นขนาดเล็กกว่า 5 มิลลิเมตรด้วยกรรไกร แล้วเก็บตัวอย่างที่หั่นเรียบร้อยแล้วบรรจุในขวดพลาสติกและเก็บในตู้เย็นเพื่อรอวิเคราะห์

ตัวอย่างที่ตัดเรียบร้อยแล้วจะนำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอนใส่ขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิทโดยฝาขวดจะเป็น septum ไว้สำหรับแทงไซริงค์เข้าไปเก็บแก๊สภายในขวดแก้วบริเวณช่องว่างส่วนบนของขวดแก้ว นำขวดแก้วที่บรรจุตัวอย่างไปให้ความร้อนในอุปกรณ์ให้ความร้อนเช่น ตู้อบลมร้อน เพื่อทำให้สารระเหยที่เป็นองค์ประกอบในยางก้อนถ้วยเกิดการระเหยกลายเป็นไอ (แก๊ส) แล้วใช้เข็มสำหรับดูดแก๊ส (gas tight syringe) ปริมาตรแก๊สที่แน่นอนที่บริเวณที่ว่างเหนือตัวอย่างภายในขวด (static headspace) เพื่อนำแก๊สที่เกิดขึ้นไปวิเคราะห์โดยเครื่อง GC ดังภาพที่ 3.2.1 การหาสภาวะสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกลั่นจากยาง

ก่อนด้วย การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกสารและการวิเคราะห์หาปริมาณสารผสมโดย GC ทำการทดลอง ดังนี้



ภาพที่ 3.2.1 แสดงการเตรียมตัวอย่าง โดยบรรจุในหลอดขนาดเล็ก จากนั้นดูดอากาศที่อยู่ในช่องว่างเหนือตัวอย่าง (Static Headspace) ไปวิเคราะห์ด้วย GC

3.2.1.1 การเลือกชนิดคอลัมน์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการแยกสารผสม VFAs

ประเมินประสิทธิภาพในการแยกสารในกลุ่ม VFAs โดยเปรียบเทียบระหว่างคอลัมน์ชนิด HP-5 และ Carbowax โดยการฉีดแก๊สของสารมาตรฐาน VFAs ปริมาตร 200 ไมโครลิตรเข้าสู่คอลัมน์ทั้ง 2 คอลัมน์ และดูความสามารถของการแยกสารในคอลัมน์ทั้ง 2 จากโครมาโทแกรม

3.2.1.2 อิทธิพลของอุณหภูมิ (temperature program) ต่อการแยกสารผสม

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งสำหรับการวิเคราะห์สารระเหยโดยเทคนิค GC ดังนั้น เพื่อให้การวิเคราะห์สารผสมกลุ่ม VFAs ที่เป็นองค์ประกอบในยางก้อนถ้วยเพื่อให้ได้โครมาโทแกรมที่สามารถแยกพีคของสารผสมทั้ง 6 ชนิดได้จากกันอย่างชัดเจน ระยะเวลาในการวิเคราะห์ที่เหมาะสม จึงเปรียบเทียบสภาวะการทดลองโดยการปรับอุณหภูมิเพื่อให้ได้พีคแยกจากกันและระยะเวลาในการวิเคราะห์สั้น

3.2.1.3 ปริมาณแก๊สที่ฉีดเข้าเครื่อง GC ที่ตำแหน่งฉีดสาร (injector)

ปริมาณแก๊สที่ฉีดเข้าเครื่อง GC ในรูปแบบการฉีดแบบ splitless เนื่องจากปริมาณขององค์ประกอบ VFAs ที่อยู่ในสถานะแก๊สมีความเข้มข้นต่ำไม่เหมาะกับการฉีดในโหมด split เพราะจะทำให้ได้องค์ประกอบไม่ครบทั้งหมด โดยเปรียบเทียบปริมาณการฉีดโดย gas tight syringe เพื่อให้ปริมาตรที่ฉีดแน่นอนในปริมาตร 200 และ 400 ไมโครลิตร ผลการเปรียบเทียบแสดงในโครมาโทแกรม

3.2.2 สภาวะในการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์แก๊สจากยางก้อนถ้วย

เตรียมตัวอย่างยางก้อนถ้วยดังนี้ นำยางก้อนถ้วยมาหั่น แล้วตัดให้เป็นชิ้นขนาดเล็กประมาณ 2-3 มิลลิเมตรด้วยกรรไกร แล้วเก็บตัวอย่างที่หั่นเรียบร้อยแล้วบรรจุในขวดพลาสติกและเก็บในตู้เย็นเพื่อรอวิเคราะห์ ตัวอย่างที่ตัดเรียบร้อยแล้วจะนำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอนใส่ขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิทโดยฝาขวดจะเป็น septum ไว้สำหรับแทงไซริงค์เข้าไปเก็บแก๊สภายในขวดแก้วบริเวณช่องว่างส่วนบนของขวดแก้ว นำขวดแก้วที่บรรจุตัวอย่างยางไปให้ความร้อนในอุปกรณ์ให้ความร้อนเช่น ตู้อบลมร้อน เพื่อทำให้สารระเหยที่เป็นองค์ประกอบในยางก้อนถ้วยเกิดการระเหยกลายเป็นไอ (แก๊ส) แล้วใช้เข็มสำหรับดูดแก๊ส (gas tight syringe) ปริมาตรแก๊สที่แน่นอนที่บริเวณที่ว่างเหนือตัวอย่างภายในขวด (static headspace) เพื่อนำแก๊สที่เกิดขึ้นไปวิเคราะห์โดยเครื่อง GC ดังภาพที่ 3.2.1 การหาสภาวะการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกลิ่นจากยางก้อนถ้วย โดยศึกษาอิทธิพลที่มีผลต่อการระเหยและปริมาณแก๊สของตัวอย่างยางก้อนถ้วยโดยศึกษาอิทธิพลของน้ำหนักตัวอย่างยางก้อนถ้วย ขนาดของภาชนะขวดแก้วที่ใช้บรรจุตัวอย่าง อุณหภูมิสำหรับทำให้องค์ประกอบเกิดการระเหยเป็นแก๊ส โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.2.2.1 ศึกษาอิทธิพลของน้ำหนักตัวอย่างยางก้อนถ้วย

ตัวอย่างที่ตัดจนมีขนาดเล็กจะถูกชั่งใส่ขวดแก้วแล้วให้ความร้อนเพื่อให้สารองค์ประกอบกลายเป็นไอ แล้วจึงดูดแก๊สบริเวณส่วนที่ว่างเหนือตัวอย่างไปวิเคราะห์ ซึ่งปริมาณแก๊สองค์ประกอบจะขึ้นอยู่กับปริมาณตัวอย่างเริ่มต้น ดังนั้นจึงทดลองเปรียบเทียบน้ำหนักของยางก้อนถ้วย 3, 5, 7 และ 10 กรัมบรรจุในขวด หลังจากให้ความร้อนจึงนำแก๊สปริมาตรที่แน่นอนไปวิเคราะห์ด้วย GC

3.2.2.2 ศึกษาอิทธิพลของปริมาตรภาชนะขวดแก้วสำหรับใช้บรรจุตัวอย่าง

ปริมาตรของขวดแก้วบรรจุตัวอย่างเพื่อให้เกิดแก๊สบริเวณที่ว่างเหนือตัวอย่างเพื่อจะนำแก๊สที่บริเวณนี้ไปวิเคราะห์ด้วย GC โดยเปรียบเทียบขนาดของขวดแก้ว 2 ขนาดคือ 40 และ 60 มล. เมื่อนำตัวอย่างที่หั่นให้มีขนาดเล็กบรรจุในขวดทั้ง 2 ขนาดในปริมาณขวดละ 5 กรัม ให้ความร้อนและดูดตัวอย่างแก๊สที่บริเวณที่ว่างเหนือตัวอย่างไปฉีด GC

3.2.2.3 อิทธิพลของระยะเวลาที่ให้ความร้อน (Static time) กับยางตัวอย่างที่บรรจุในขวด เพื่อให้เกิดแก๊สที่บริเวณเหนือตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์โดย GC

ตัวอย่างยางก้อนที่ตัดให้มีขนาดเล็ก 5 กรัม บรรจุอยู่ในขวดขนาด 40 มล. ถูกให้ความร้อนเพื่อให้ VFAs ระเหยกลายเป็นไอที่บริเวณที่ว่างเหนือตัวอย่างภายในขวดแก้วที่บรรจุตัวอย่าง โดยศึกษาระยะเวลาที่ให้ความร้อนระหว่าง 30, 60, 120 และ 150 นาทีแล้วนำไปวิเคราะห์โดย GC

3.2.3 การวิเคราะห์ VFAs ในตัวอย่างที่เก็บจากกระบวนการผลิตยาง

ตัวอย่างยางก้อนถ้วยได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทศรีตรัง และเก็บตัวอย่างอากาศในระหว่างกระบวนการการผลิตในโรงงานผลิตยางก้อนถ้วยบริษัทศรีตรัง จังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่นำมาวิเคราะห์แบ่งออก 3 กลุ่มดังนี้

1. ตัวอย่างที่เตรียมโดยนักวิจัยภายในห้องปฏิบัติการโดยการจับตัวอย่างด้วยกรดฟอร์มิกและกรดซัลฟิวริกเพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุมสำหรับกระบวนการจับตัวของยางก้อนถ้วย
2. ตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่เก็บจากสวนยางพาราที่เตรียมโดยเกษตรกรโดยแยกระหว่างยางที่จับตัวด้วยกรดซัลฟิวริกและกรดฟอร์มิก
3. ตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่เก็บบริเวณจุดพักยางของบริษัทผู้ผลิตซึ่งเป็นยางก้อนถ้วยที่รับซื้อจากเกษตรกร

3.2.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างอากาศที่เก็บภายในบริเวณโรงงานผลิตยาง

การเก็บตัวอย่างอากาศโดยการเปรียบเทียบระหว่างวิธีการเก็บตัวอย่างอากาศ 2 วิธีซึ่งอ้างอิงจากวิธีของ The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) และ NIOSH Manual of Analytical Methods โดยเก็บตัวอย่างอากาศใส่ถุงเก็บแก๊สขนาด 10 ลิตร และเก็บตัวอย่างอากาศโดยใช้ตัวดูดซับชนิด SOLID SORBENT TUBE (coconut shell charcoal, 100 mg/50 mg) ซึ่งเป็นตัวดูดซับที่ใช้สำหรับดูดซับกรดระเหยคือ acetic acid ในอากาศตามวิธีอ้างอิง METHOD: 1603, Issue 2:15 August 1994 และวิเคราะห์หองค์ประกอบของอากาศโดย GC-MS

3.2.4.1 ตัวอย่างอากาศที่บรรจุอยู่ในถุงเก็บแก๊ส

โดยเก็บตัวอย่างอากาศใส่ถุงเก็บแก๊สขนาด 10 ลิตรด้วยปั๊มเก็บอากาศ ดูดด้วยอัตราเร็ว 5 ลิตรต่อนาที โดยบรรจุแก๊สใส่ถุงปริมาณประมาณร้อยละ 90 ของปริมาณถุงเก็บแก๊ส สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างอากาศโดย GC-MS จะใช้เข็มสำหรับดูดแก๊ส (gas tight syringe) ตัวอย่างอากาศจากถุงเก็บแก๊สปริมาตร 200 ไมโครลิตรบริเวณวาล์วของถุงแล้วนำมาฉีดเข้าเครื่อง GC-MS เพื่อวิเคราะห์หองค์ประกอบของกลิ่น

3.2.4.2 ตัวอย่างอากาศที่ดูดซับบน coconut shell charcoal

ตัวอย่างอากาศเก็บบริเวณล้างและอบตัวอย่างในกระบวนการผลิต และทางเข้า-ทางออกของปล่องดีไอโรเซอร์บนตัวดูดซับชนิด coconut shell charcoal โดยปั๊มอากาศบริเวณจุดเก็บตัวอย่างผ่านไปยังตัวดูดซับด้วยอัตราเร็ว 1 ลิตรต่อนาที โดยดูดอากาศในแต่ละบริเวณที่เก็บตัวอย่าง 20 ลิตร เมื่อครบปริมาตรแล้วจะปิดปลายท่อของตัวดูดซับด้วยจุกปิด แล้วพันด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำมาเก็บในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอวิเคราะห์โดย GC-MS การวิเคราะห์สารที่ดูดซับบนตัวดูดซับ coconut shell charcoal จะชะสารที่ดูดซับบนตัวดูดซับด้วยเมทานอลเพื่อนำของเหลวที่ชะได้ไปวิเคราะห์หองค์ประกอบของกลิ่นโดย GC-MS

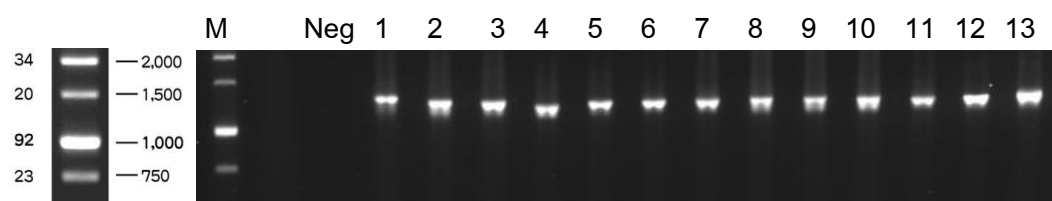
บทที่ 4

ผลการดำเนินการวิจัย

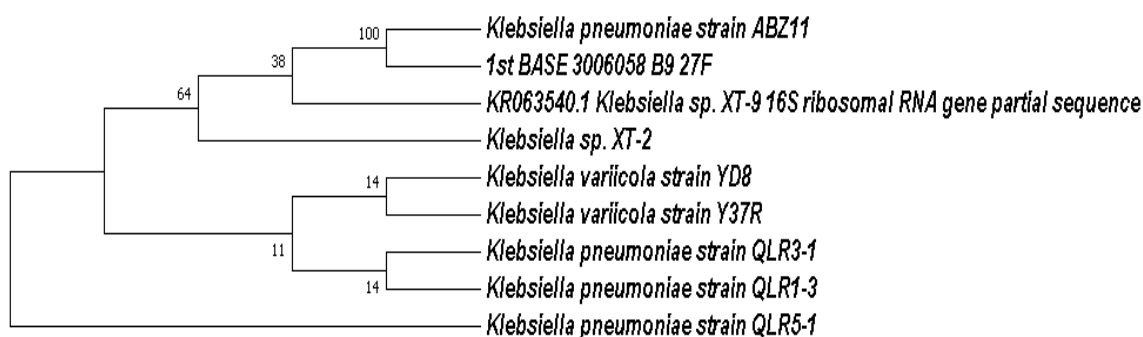
4.1 ผลการคัดเลือกเชื้อที่ทำให้เกิดกลิ่น

4.1.1 ผลการคัดเลือกเชื้อบริสุทธิ์จากสวนยางพาราและโรงงานผลิตยางแท่ง

จากการเก็บตัวอย่างที่สวนยางพาราและโรงงาน เพื่อคัดเลือกเชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นทำการเพิ่มสารพันธุกรรมยีน 16s rRNA ผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดประมาณ 1,465 basepair ในทุกตัวอย่างแบคทีเรีย ดังภาพที่ 4.1.1 และเทียบความสัมพันธ์กับฐานข้อมูลทางชีวภาพ NCBI (National Center for Biotechnology Information) ด้วยการทำแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) (ภาพที่ 4.1.2) เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรีย

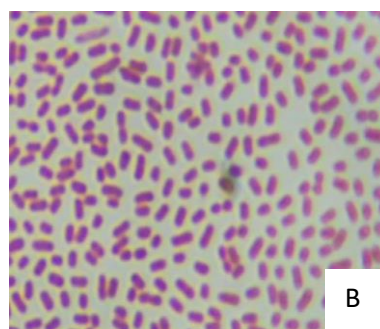
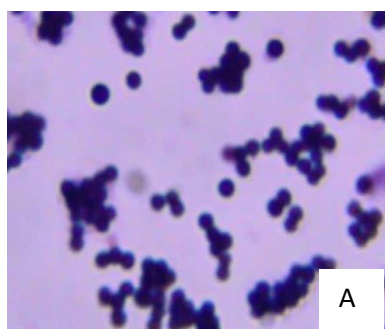


ภาพที่ 4.1.1 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 1,465 bp ตรวจสอบด้วยวิธี Gel Electrophoresis โดยใช้ 1.5% Agarose Lane M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน (1kb DNA Ladder marker), Lane Neg คือ Negative control, Lane ที่ 1-13 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ตัวอย่างจากดินบริเวณสวนยางพารา



ภาพที่ 4.1.2 แสดงผลการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของตัวอย่างแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากสวนยางพารา (ดินบริเวณสวนยาง) กับฐานข้อมูล NCBI ด้วยการทำ phylogenetic tree พบว่าตัวอย่างดังกล่าวมีความเหมือนกับ *Klebsiella pneumonia* strain ABZ11 มากที่สุด

จากการวิเคราะห์ได้พบเชื้อแบคทีเรียที่มีความแตกต่างทั้งหมด 39 ชนิด จากตัวอย่างในสวนยางพารา และโรงงาน (แสดงในตารางที่ 4.1.1) ในการวิเคราะห์ว่าเชื้อชนิดใดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกหรือแบคทีเรียแกรมลบ ก็ได้ทำโดยนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ไปย้อมแกรมแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียแกรมบวก จะมีชั้นของเมมเบรนเป็น peptidoglycan อยู่ชั้นนอกสุด ขณะย้อมตัวเซลล์ด้วย Crystal Violet จะเกิด Complex บนเมมเบรน เมื่อใช้ Alcohol เชะออกสีของ Crystal violet จะไม่หลุดออกจากตัวเซลล์ทำให้เห็นสีแบคทีเรียเป็นสีม่วงของ Crystal violet เรียกแบคทีเรียที่ติดสีย้อมของ Crystal violet ว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Positive gram) ดังภาพที่ 4.1.3(A) หลังจากนั้นใช้สี Safranin o ย้อมอีกครั้ง จะให้ผลของแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่ง ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวจะมีชั้น outer membrane ที่เป็น Phospholipid ขณะย้อมตัวเซลล์ด้วย Crystal Violet และชะออกด้วย Alcohol สีของ crystal violet จึงหลุดออก และเมื่อย้อมสีครั้งที่สองด้วย Safranin o แบคทีเรียกลุ่มนี้จะติดด้วยสีแดงของ Safranin o เรียกว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า แกรมลบ (Negative gram) ดังภาพที่ 4.1.3(B)



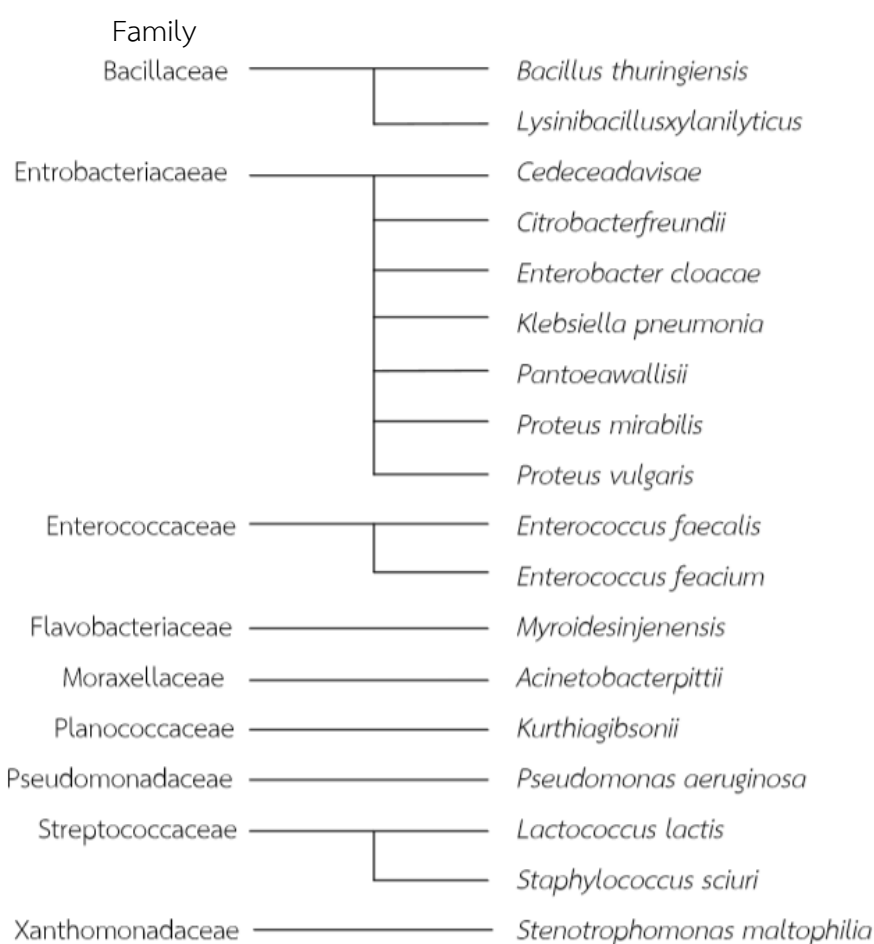
ภาพที่ 4.1.3 แสดงตัวอย่างของแบคทีเรียชนิดแกรมบวก (*Enterococcus faecalis*, A) และชนิดแกรมลบ (*Cedecea davisae*, B)

ตารางที่ 4.1.1 แสดงเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกจากสวนยางพาราและโรงงาน

ลำดับ	เชื้อแบคทีเรีย	ชนิดแบคทีเรีย	ลำดับ	เชื้อแบคทีเรีย	ชนิดแบคทีเรีย
1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Gram negative	21	<i>Klebsiella pneumonia</i>	Gram negative
2	<i>Acinetobacter baylyi</i>	Gram negative	21	<i>Kosakonia cowanii</i>	Gram negative
3	<i>Acinetobacter pittii</i>	Gram negative	23	<i>Kosakonia sacchari</i>	Gram negative
4	<i>Acinetobacter schindleri</i>	Gram negative	24	<i>Kurthia gibsonii</i>	Gram positive
5	<i>Bacillus aryabhattai</i>	Gram positive	25	<i>Lactococcus lactis</i>	Gram positive
6	<i>Bacillus cereus</i>	Gram positive	26	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	Gram positive
7	<i>Bacillus circulans</i>	Gram positive	27	<i>Myroides injenensis</i>	Gram negative
8	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Gram positive	28	<i>Pantoea ananatis</i>	Gram negative
9	<i>Cedecea davisae</i>	Gram negative	29	<i>Proteus mirabilis</i>	Gram negative
10	<i>Citrobacter freundii</i>	Gram negative	30	<i>Proteus vulgaris</i>	Gram negative
11	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Gram positive	31	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram negative
12	<i>Enterococcus faecalis</i>	Gram positive	32	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>	Gram negative
13	<i>Enterococcus faecium</i>	Gram positive	33	<i>Providencia rettgeri</i>	Gram negative
14	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Gram positive	34	<i>Shigella flexneri</i>	Gram negative
15	<i>Enterobacter cloacae</i>	Gram negative	35	<i>Staphylococcus arlettae</i>	Gram positive
16	<i>Enterobacter sacchari</i>	Gram negative	36	<i>Staphylococcus hominis</i>	Gram positive
17	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	Gram negative	37	<i>Staphylococcus sciuri</i>	Gram positive
18	<i>Escherichia coli</i>	Gram negative	38	<i>Staphylococcus xiangfangensis</i>	Gram positive
19	<i>Escherichia vulneris</i>	Gram negative	39	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Gram negative
20	<i>Exiguobacter iumindicum</i>	Gram negative			

4.1.2 ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตบนอาหารที่เตรียมจากน้ำยางพารา (Selective media)

เนื่องจากน้ำยางพารามีโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตเพียงร้อยละ 1-1.5 และ 1 ตามลำดับ ปริมาณที่จำกัดนี้จึงน่าจะเพียงพอสำหรับเชื้อจุลินทรีย์บางกลุ่มเท่านั้น ผลจากการนำเชื้อทั้ง 39 ชนิดที่ได้ในการศึกษาก่อนหน้ามาคัดแยกเพื่อหาเชื้อที่สามารถเติบโตได้ดีโดยใช้เพียงสารอาหารที่อยู่ภายในน้ำยางและก้อนยาง ก็พบว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้เหลือเพียง 18 ชนิด ดังสรุปไว้ในตารางที่ 4.1.2 และสามารถจัดแบ่งเชื้อ 18 ชนิดเหล่านี้ให้เป็นกลุ่มตาม family ได้ดังภาพที่ 4.1.4



ภาพที่ 4.1.4 การแบ่งกลุ่มตาม Family ของเชื้อแบคทีเรีย 18 ชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ด้วยสารที่อยู่ในน้ำยางพารา (Selective media)

ตารางที่ 4.1.2 ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตบนอาหารที่เตรียมจากน้ำยางพารา (Selective media)

ลำดับ	เชื้อแบคทีเรีย	แหล่งที่พบเชื้อ	
		สวนยางพารา	โรงงาน
1	<i>Acinetobacter pittii</i>	ดินบริเวณสวนยาง	-
2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ดินบริเวณสวนยาง	กองยางแผ่นอายุ 25 วัน
3	<i>Cedecea davisae</i>	-	กองยางก้อน (น้ำขัง)
4	<i>Citrobacter freundii</i>	ถ้วยรองน้ำยางจับตัวเป็นก้อนแบบไม่ใส่กรด	-
5	<i>Enterococcus faecalis</i>	ถ้วยรองน้ำยางจับตัวเป็นก้อนแบบไม่ใส่กรด	กองยางแผ่นอายุ 1 วัน
		ถ้วยรองน้ำยางจับตัวเป็นก้อนแบบใส่กรดซัลฟูริก	กองยางแผ่นอายุ 25 วัน
		ถ้วยรองน้ำยางจับตัวเป็นก้อนแบบใส่กรดฟอร์มิก	
6	<i>Enterococcus faecium</i>	กองยางก้อนที่ไม่ได้ฉีดยาอีเอ็ม	-
7	<i>Enterobacter cloacae</i>	ดินบริเวณสวนยาง	-
8	<i>Klebsiella pneumonia</i>	ดินบริเวณสวนยาง	น้ำบรณรทุกก้อนยาง กองยางก้อน (น้ำขัง)
9	<i>Kurthia gibsonii</i>	ดินบริเวณสวนยาง	น้ำบรณรทุกก้อนยาง กองยางก้อน (น้ำขัง)
10	<i>Lactococcus lactis</i>	ดินบริเวณสวนยาง ถ้วยรองน้ำยางจับตัวเป็นก้อนแบบไม่ใส่กรด	น้ำบรณรทุกก้อนยาง น้ำในบ่อล้างยาง
11	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	ดินบริเวณสวนยาง	-
12	<i>Myroides injeensis</i>	-	กองยางก้อนไม่ฉีดยาอีเอ็ม
13	<i>Pantoea wallisii</i>	-	กองยางก้อน (น้ำขัง)

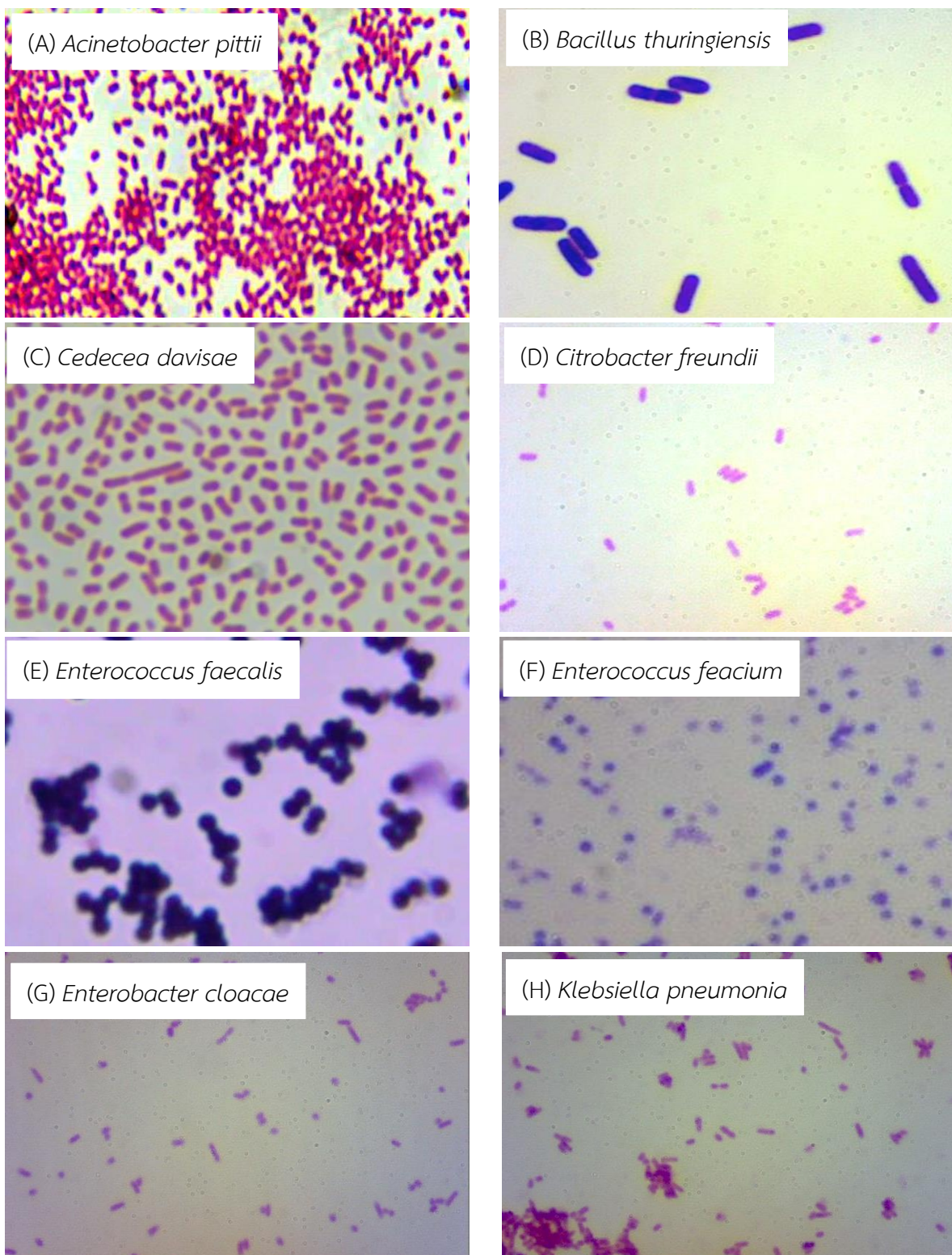
ตารางที่ 4.1.2 (ต่อ) ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตบนอาหารที่เตรียมจากน้ำยางพารา (Selective media)

ลำดับ	เชื้อแบคทีเรีย	แหล่งที่พบเชื้อ	
		สวนยางพารา	โรงงาน
14	<i>Proteus mirabilis</i>	ถ้วยรองน้ำยางจับตัวเป็นก้อนแบบไม่ใส่กรด กองยางก้อนที่ไม่ได้ฉีดยาอีเอ็ม	กองยางก้อน (น้ำขัง) กองยางแผ่นอายุ 25 วัน
15	<i>Proteus vulgaris</i>	ดินบริเวณสวนยาง	-
16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	กองยางก้อนที่ฉีดยาอีเอ็ม	-
17	<i>Staphylococcus sciuri</i>	-	กองยางแผ่นอายุ 1 วัน
18	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	กองยางแผ่นอายุ 50 วัน

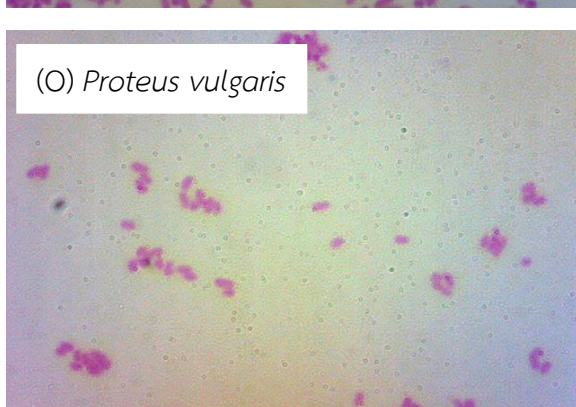
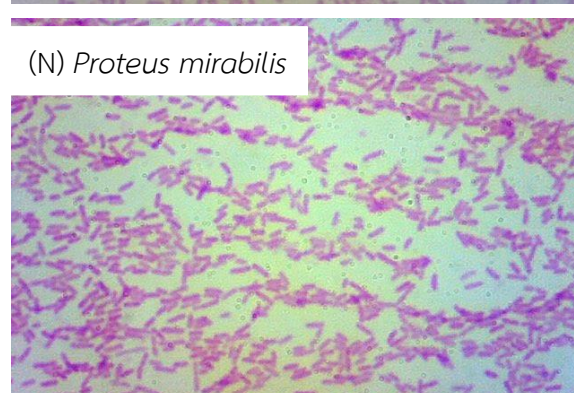
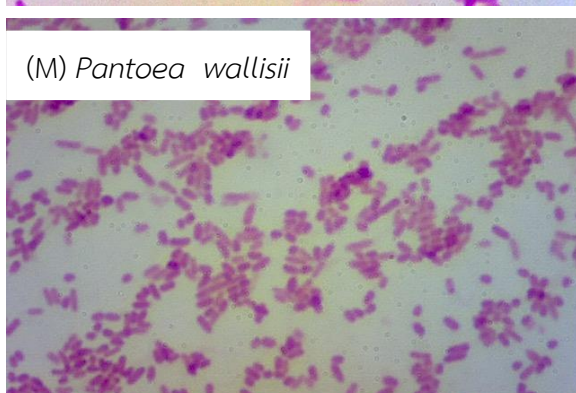
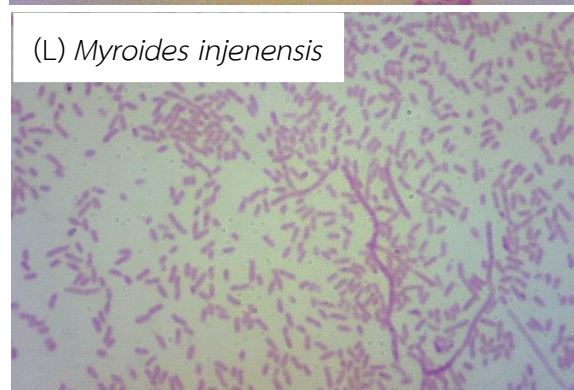
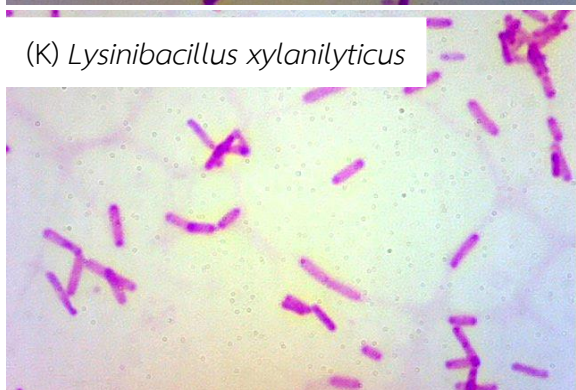
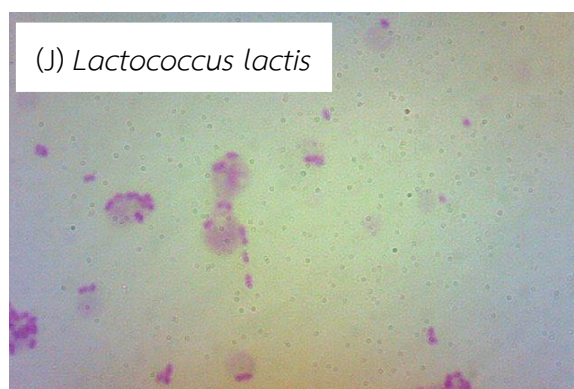
ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียทั้ง 18 ชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีโดยใช้เพียงสารอาหารที่อยู่ในน้ำยางพาราได้แสดงไว้ในภาพที่ 4.1.2 รายละเอียดสำหรับแต่ละชนิดเพิ่มเติมเป็นดังนี้

1. *Acinetobacter pittii* (ภาพที่ 4.1.4(A)) อยู่ใน Family Moraxellaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) มีลักษณะเป็นแท่ง
2. *Bacillus thuringiensis* (ภาพที่ 4.1.4(B)) อยู่ใน Family Bacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive) non-capsulated เคลื่อนที่ด้วย peritrichous flagella (Ibrahim *et al.*, 2010)
3. *Cedecea davisae* (ภาพที่ 4.1.4(C)) อยู่ใน Family Entrobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) มีลักษณะเป็นแท่ง เจริญเติบโตได้ดีที่ 37 องศาเซลเซียส pH 7-9 เป็น facultative anaerobe โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 มิลลิเมตร ต้องการ Thiamine สำหรับการเจริญเติบโต สามารถเคลื่อนที่ได้ (motile) ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีเอนแคปซูล ผลิตภัณฑ์จากการ Ferment ของกลูโคส
4. *Citrobacter freundii* (ภาพที่ 4.1.4(D)) อยู่ใน Family Entrobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) เคลื่อนที่โดย *peri-flagellum* มีลักษณะเป็นแท่ง เป็น facultative anaerobe (Hongguo *et al.*, 2017) สร้าง H₂S ใน the butt ของ Kligler iron agar และ triple-sugar iron agar ทนทานต่อ Antimicrobial Cephalothin (Wilhelm, 2015)
5. *Enterococcus faecalis* (ภาพที่ 4.1.4(E)) อยู่ใน family Enterococcaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive) รูปร่างกลม เป็น facultative anaerobe สามารถเจริญเติบโตได้ที่ pH 9.6 ใน 6.5%NaCl ไม่สร้างก๊าสจากกลูโคส (Yimin, 1999) Non-Motile ไม่สร้างสปอร์
6. *Enterococcus faecium* (ภาพที่ 4.1.4(F)) อยู่ใน family Enterococcaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive) รูปร่างกลม เป็น facultative anaerobe (Yimin, 1999)
7. *Enterobacter cloacae* (ภาพที่ 4.1.4(G)) อยู่ใน Family Entrobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) ลักษณะเป็นแท่ง เป็น facultative anaerobe
8. *Klebsiella pneumonia* (ภาพที่ 4.1.4(H)) อยู่ใน Family Entrobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) ลักษณะเป็นแท่ง สร้าง Lysine decarboxylase ,nonmotile สามารถสร้างก๊าสจาก Lactose ที่ อุณหภูมิ 44.5 องศาเซลเซียส *Klebsiella* เหมือน *Citrobacter* และ *Enterobacter* (Podshun and Ullmann, 1998)
9. *Kurthia gibsonii* (ภาพที่ 4.1.4(I)) อยู่ใน Family Planococcaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive) รูปร่างเป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์

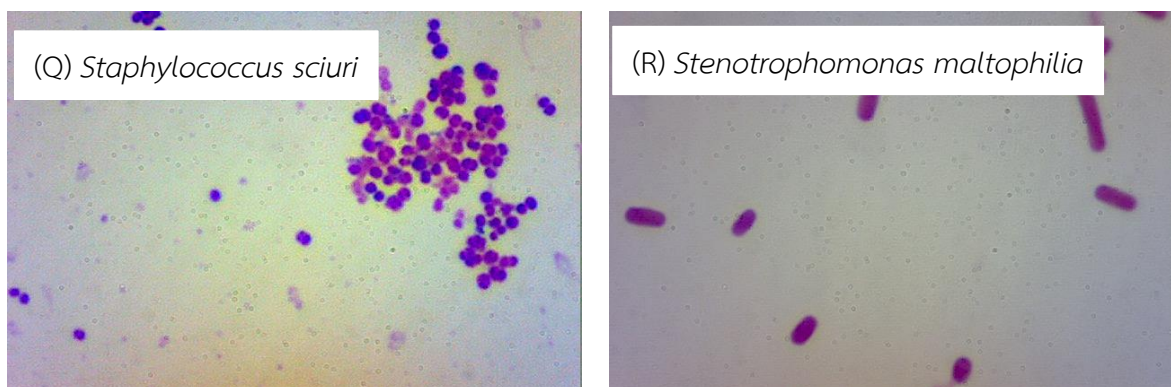
10. *Lactococcus lactis* (ภาพที่ 4.1.4(J)) อยู่ใน Family Streptococcaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive) รูปร่างกลม non motile ไม่สร้างสปอร์
11. *Lysinibacillus xylanilyticus* (ภาพที่ 4.1.4(K)) อยู่ใน family Bacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive) รูปร่างเป็นแท่ง motile สร้างสปอร์ เจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส มีความสามารถในการย่อย Xylan (Lee *et al.*, 2010)
12. *Myroides injenensis* (ภาพที่ 4.1.4(L)) อยู่ใน family Flavobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) ลักษณะเป็นแท่ง สร้าง non motile ,non ferment (Schröttner *et al.*, 2014)
13. *Pantoea wallisii* (ภาพที่ 4.1.4(M)) อยู่ใน Family Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) ลักษณะเป็นแท่ง motile ไม่สร้างสปอร์ สร้างกรดจากการหมัก Glycerol (Carrie, 2012)
14. *Proteus mirabilis* (ภาพที่ 4.1.4(N)) อยู่ใน family Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) มีรูปร่างเป็นท่อน (rod) และ เป็นพวก facultative anaerobe คือ เจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน อาจไม่เคลื่อนที่ หรือ เคลื่อนที่ด้วย peritrichous flagella เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสีย ผลิตและสะสมแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) มีกลิ่นเหม็นเน่าคล้ายอุจจาระ ถ้ามีปริมาณมากจะมีกลิ่นคล้ายแอมโมเนีย (Yong, 2014)
15. *Proteus vulgaris* (ภาพที่ 4.1.4(O)) อยู่ใน family Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) มีรูปร่างเป็นท่อน (rod) และ เป็นพวก facultative anaerobe คือ เจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ผลิต Hydrogen sulphide (Rustigian and Stuart, 1944; Wang and Pand, 2014)
16. *Pseudomonas aeruginosa* (ภาพที่ 4.1.4(P)) อยู่ใน family Pseudomonadaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) มีรูปร่างเป็นท่อน (rod) เป็นพวก facultative anaerobe คือ เจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน สามารถเจริญในแหล่งที่มี nitrate หรือ nitrite (Wu *et al.*, 2015; Toyofuku *et al.*, 2018)
17. *Staphylococcus sciuri* (ภาพที่ 4.1.4(Q)) อยู่ใน family Streptococcaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive) รูปร่างกลม
18. *Stenotrophomonas maltophilia* (ภาพที่ 4.1.4(R)) อยู่ใน family Xanthomonadaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) มีรูปร่างเป็นท่อน (rod) เจริญเติบโตโดยใช้ nitrate (Mukherjee and Roy, 2016)



ภาพที่ 4.1.5 แสดงเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ด้วยอาหารที่อยู่ในน้ำยางพารา (Selective media) ทั้งหมด 18 ชนิด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X



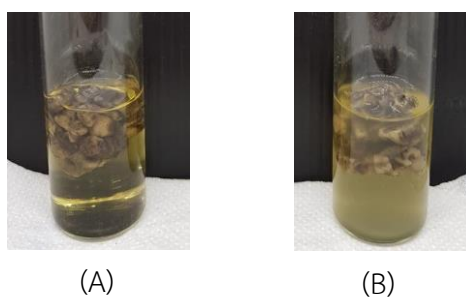
ภาพที่ 4.1.5 (ต่อ)



ภาพที่ 4.1.5 (ต่อ)

4.1.3 ผลการทดสอบกลั่นจากเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบนี้ได้ใช้ยางก้อนถ้วยจากโรงงาน หั่นให้มีขนาด 0.5 cm^3 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อนำตัวอย่างยางนี้มาใส่ลงในอาหารเหลว ก็ไม่พบว่ามีเชื้อเจริญเติบโตในอาหารเหลว ของเหลวที่ได้ก็ยังคงใสเหมือนก่อนใส่เชื้อลงไป (ภาพที่ 4.1.6(A)) ในขณะที่ชุดควบคุมคือ ยางที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ เมื่อนำมาใส่ในอาหารเหลวจะเห็นว่าของเหลวมีลักษณะขุ่น ดังแสดงในภาพที่ 4.1.6(B) ผลการเปรียบเทียบนี้บ่งบอกได้ว่าตัวอย่างยางที่ผ่านการฆ่าเชื้อมีเชื้อจุลินทรีย์เติบโต



ภาพที่ 4.1.6 (A) ยางที่ผ่านการฆ่าเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว (B) ยางที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว

การทดลองต่อมา เป็นการนำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตบนอาหารที่เตรียมจากน้ำยางพารา (Selective media) ทั้งหมด 18 ชนิด มาใส่ในตัวอย่างยางที่ผ่านฆ่าเชื้อด้วยวิธีข้างต้นที่อยู่ในอาหารเหลว ทำการเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 5 วัน โดยในระหว่างนี้ได้ทำการตรวจดูตัวอย่างยางก้อนที่มีเชื้อเจริญเติบโตครบ 1 วัน 3 วัน และ 5 วัน

ผลการดมกลิ่นพบว่า สามารถจัดกลุ่มของเชื้อตามความเข้มข้นของกลิ่นที่ได้จากการดม (นักวิจัย 5 คน) ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเชื้อที่ให้กลิ่นเหม็นมาก ปานกลาง และน้อย (ตารางที่ 4.1.3) โดยขณะทำการดมกลิ่น ผู้ดมจะเปรียบเทียบกลิ่นที่ได้กับชุดควบคุมซึ่งเป็นตัวอย่างยากล่อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเติมเพียงน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงไปเท่านั้น เฉพาะตัวอย่างที่มีเชื้อที่ให้กลิ่นเหม็นมากนี้จะนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกลิ่นด้วยเครื่อง GC ต่อไป

ตารางที่ 4.1.3 ผลการทดสอบกลิ่นจากเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ

เชื้อแบคทีเรียที่มีกลิ่นเหม็นมาก	เชื้อแบคทีเรียที่มีกลิ่นเหม็นปานกลาง	เชื้อแบคทีเรียที่มีกลิ่นเหม็นน้อย
<i>Cedecea davisea</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Acinetobacter pittii</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Myroides injenensis</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>
<i>Kurthia gibsonii</i>	<i>Pantoea wallisii</i>	
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>		
<i>Proteus mirabillis</i>		
<i>Proteus vulgaris</i>		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		

หมายเหตุ ผลจากการดมกลิ่นใช้จำนวนคนในการดมทั้งหมด 5 คน ซึ่งส่วนใหญ่ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน

4.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกลิ่น

เนื่องจากกลิ่นที่เกิดขึ้นในโรงงานผลิตยางแท่งนั้นจัดเป็นสารระเหย ทำให้สามารถใช้เทคนิค Gas Chromatography (GC) ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกลิ่นได้ ผลจากการนำตัวอย่างยากล่อนจากโรงงาน (ไม่ทราบชนิดของกรดที่ใช้จับตัวและอายุของยากล่อนด้วย) มาวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค GC และเปรียบเทียบโครมาโทแกรมที่ได้กับโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน ก็พบว่าพีคที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เป็นพีคของสารประกอบในกลุ่มของกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile fatty acids, VFAs) ผลที่ได้นี้จึงสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Hoven *et al.*, 2003) ที่ได้พบว่ากลิ่นในยางและยางแผ่นรวมทั้งกลิ่นในกระบวนการผลิตยางประกอบด้วยกลุ่มกรดไขมันระเหยง่ายต่อไปนี้ acetic acid, propanoic acid, butanoic acid, 2-methylpropanoic acid, pentanoic acid และ isovaleric acid

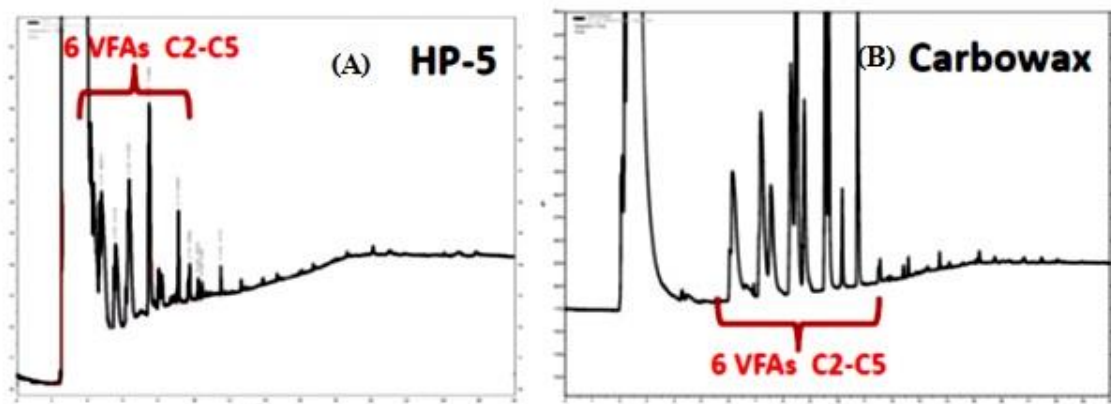
จากผลการศึกษาเบื้องต้นที่พบนี้ ทำให้นักวิจัยเริ่มต้นด้วยการหาสภาวะสำหรับการแยกสารที่เป็นองค์ประกอบในกลุ่มไขมันระเหยง่ายออกจากกันได้ (เพราะเป็นสารที่พบเป็นส่วนใหญ่) และจะใช้สภาวะที่เหมาะสมนี้สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบในกลุ่มของไขมันที่ยากต่อไป ปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์โดยเทคนิค GC ได้แก่ ชนิดของคอลัมน์และผลของอุณหภูมิคอลัมน์ต่อประสิทธิภาพการแยกสารผสมในแก๊ส รวมทั้ง ปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างแก๊สจากไขมันที่ยากเพื่อนำแก๊สมาวิเคราะห์โดยเทคนิค GC คือขนาดของภาชนะอุณหภูมิ และระยะเวลาในการให้ความร้อนเพื่อทำให้เกิดการแก๊สของไขมันที่ยาก

4.2.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารผสมโดยเทคนิค gas chromatography (GC)

นำตัวอย่างไขมันที่ยากจากโรงงาน (ไม่ทราบชนิดกรดที่ใช้จับตัวและอายุของไขมัน) ที่ใช้ศึกษาเบื้องต้นก่อนหน้านี้มาหั่นและตัดให้มีขนาดเล็ก จากนั้นบรรจุตัวอย่างในขวดแก้วปิดสนิท ให้ความร้อนเพื่อให้สารกลุ่ม VFAs ระเหยกลายเป็นไอแล้วใช้เข็มสำหรับดูดแก๊สโดยปริมาตรแก๊สที่แน่นอนที่บริเวณที่วางเหนือตัวอย่างภายในขวด (static headspace) เพื่อนำแก๊สที่เกิดขึ้นไปวิเคราะห์โดยเครื่อง GC ผลการศึกษาคือดังนี้

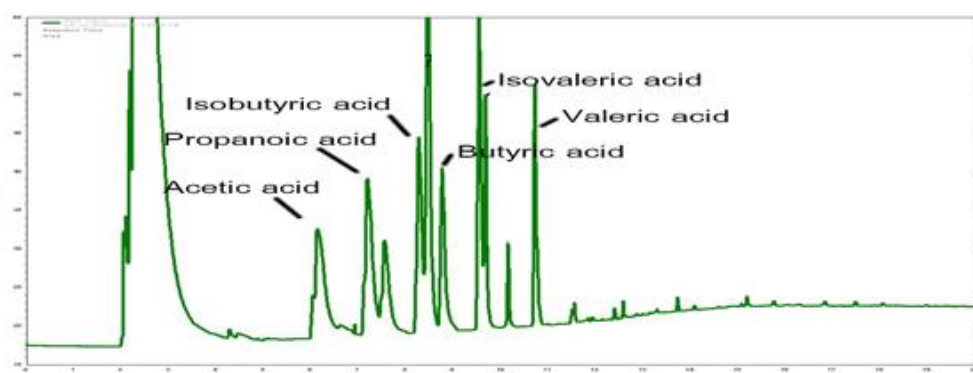
4.2.1.1 เปรียบเทียบชนิดคอลัมน์เพื่อใช้ในการแยกสารผสม VFAs

ในที่นี้ได้เลือกศึกษาคอลัมน์ 2 ชนิด คือ HP-5 และ Carbowax เพราะมีรายงานว่าสามารถแยกสารผสม VFAs ได้ ผลการทดลองเป็นดังภาพที่ 4.2.1 คอลัมน์ชนิด Carbowax ให้โครมาโทแกรมที่สามารถแยกสารผสมทั้ง 6 ชนิดออกจากกันได้ดีกว่าคอลัมน์ชนิด HP-5 โดยสังเกตจากผลของประสิทธิภาพในการแยกระหว่างพีคของกรดแต่ละชนิด คอลัมน์ชนิด HP-5 ไม่สามารถแยกกรด acetic acid, propanoic acid และ butanoic acid ได้ (ดังภาพที่ 4.2.1 (A)) เนื่องจากสารทั้ง 3 ชนิดเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และมีค่า retention time ที่น้อยกว่า 5 นาที พีคเหล่านี้ยังซ้อนทับกับพีคของตัวทำละลายที่ออกมาในช่วงต้นของโครมาโทแกรมด้วย แต่เมื่อทดลองด้วยสภาวะเดียวกันแต่ใช้คอลัมน์ Carbowax (ภาพที่ 4.2.1 (B)) ก็พบว่าสามารถแยกสารทั้ง 6 ชนิดได้ โดยมีค่า retention time อยู่ในช่วง 6-11 นาที รวมทั้งยังสามารถแยกพีคเหล่านี้จากพีคของตัวทำละลาย ซึ่งเป็นพีคขนาดใหญ่ที่เกิดขึ้นในช่วงเวลา 2-4 นาที



ภาพที่ 4.2.1 แสดงโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสม VFAs 6 ชนิด คือ acetic acid, propanoic acid, butanoic acid, 2-methylpropanoic acid, pentanoic acid, isovaleric acid โดย (A) เป็นโครมาโทแกรมที่แยกโดยคอลัมน์ชนิด HP-5 และ (B) เป็นโครมาโทแกรมที่แยกโดยคอลัมน์ชนิด Carbowax

เมื่อทดลองเติมสารมาตรฐานของ VFAs ทั้ง 6 ชนิดลงในอ่างกวนถ้วยแต่ละกวนในปริมาณที่เท่ากันแล้วนำอ่างกวนถ้วยเหล่านี้มาวิเคราะห์การแยกพีคและหาค่า retention time ที่พบพีค ก็พบว่าคอลัมน์ชนิด Carbowax สามารถแยกพีคได้ 6 พีค แต่ค่า retention time ที่พบพีคเหล่านี้ไม่ตรงกับค่าของสารมาตรฐาน (ภาพที่ 4.2.2) โดยมีสาเหตุจากการใช้ตัวตรวจวัดเป็นชนิด flame ionization detector ดังนั้นจึงไม่สามารถระบุชนิดของสารได้ อย่างไรก็ตามยังสามารถใช้ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเลือกคอลัมน์ได้ โดยบ่งบอกว่าคอลัมน์ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบของกลิ่นโดยเทคนิค Gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) คือ Carbowax



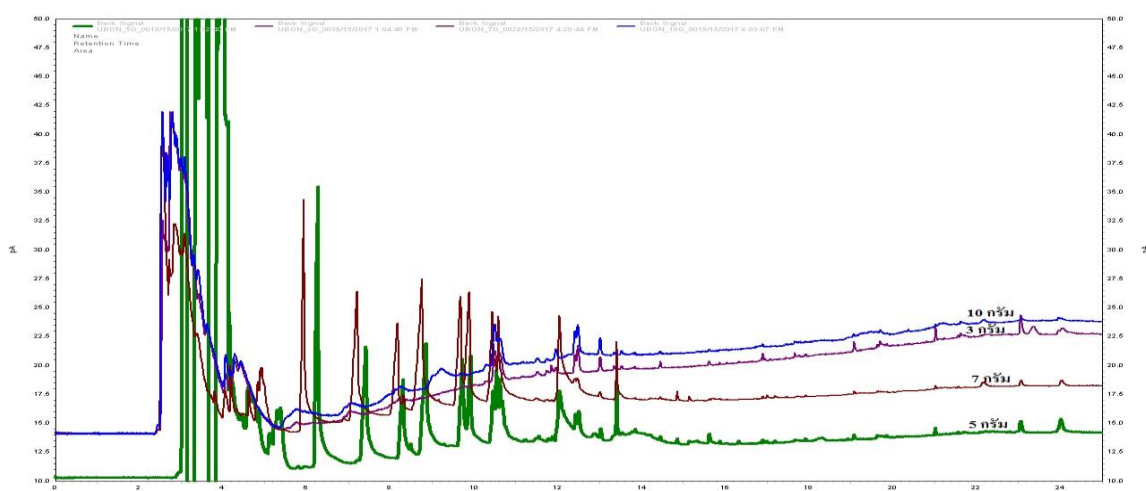
ภาพที่ 4.2.2 แสดงโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานที่เติมลงไปในอ่างกวนถ้วยโดยแกน x เป็นเวลาและแกน y เป็นพื้นที่ใต้พีค

4.2.2 สภาพะในการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์แก๊สจากยางก้อนถ้วย

ตัวอย่างยางก้อนถ้วยจากโรงงาน (ไม่ทราบชนิดกรดที่ใช้จับตัวและอายุของยางก้อน) จะถูกหั่นและตัดให้มีขนาดเล็กด้วยกรรไกร แล้วนำชิ้นตัวอย่างซึ่งให้น้ำหนักที่แน่นอน บรรจุตัวอย่างลงในขวดแก้วปิดสนิทที่มีฝาเป็น septum ไว้สำหรับเจาะเพื่อเก็บแก๊สบริเวณที่ว่างเหนือตัวอย่างภายในขวดหลังจากที่ให้ความร้อนกับยางก้อนถ้วยเพื่อให้สารกลุ่ม VFAs ระเหยกลายเป็นไอแล้วใช้เข็มสำหรับดูดแก๊สโดยมีปริมาตรแก๊สที่แน่นอนบริเวณที่ว่างเหนือตัวอย่างภายในขวดเพื่อนำแก๊สที่เกิดขึ้นไปวิเคราะห์โดยเครื่อง GC ได้

4.2.2.1 ศึกษาอิทธิพลของน้ำหนักตัวอย่างยางก้อนถ้วย

ตัวอย่างที่ตัดจนมีขนาดเล็กจะถูกชั่งให้น้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ใส่ขวดแก้วแล้วให้ความร้อนเพื่อให้สารองค์ประกอบกลายเป็นไอ แล้วจึงดูดแก๊สบริเวณส่วนที่ว่างเหนือตัวอย่างไปวิเคราะห์ซึ่งปริมาณแก๊สองค์ประกอบจะขึ้นอยู่กับปริมาณ (น้ำหนัก) ตัวอย่างเริ่มต้น ดังนั้นจึงทดลองเปรียบเทียบน้ำหนักของยางก้อนถ้วย 3, 5, 7 และ 10 กรัมบรรจุในขวด หลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จึงดูดแก๊สปริมาตร 200 ไมโครลิตรไปวิเคราะห์ด้วย GC โดยได้ผลการทดลอง ภาพที่ 4.2.3 เมื่อเปรียบเทียบความสูงหรือพื้นที่ใต้พีคของโครมาโทแกรมพบว่าน้ำหนักตัวอย่าง 5 กรัมให้พื้นที่พีคสูงกว่าเมื่อใช้ตัวอย่าง 3, 7 และ 10 กรัม ดังนั้นจึงเลือกใช้ตัวอย่างหนัก 5 กรัมเพื่อใช้สำหรับทดสอบในอิทธิพลอื่นๆ ต่อไป



ภาพที่ 4.2.3 โครมาโทแกรมแสดงอิทธิพลของน้ำหนักตัวอย่างต่อปริมาณของสารที่สนใจ

4.2.2.2 ศึกษาอิทธิพลของปริมาณภาชนะขวดแก้วสำหรับใช้บรรจุตัวอย่าง

ปริมาตรของขวดแก้วบรรจุตัวอย่างเป็นอิทธิพลต่อปริมาณของแก๊สที่เกิดขึ้นบริเวณที่ว่างเหนือตัวอย่างเพื่อจะนำแก๊สที่บริเวณนี้ไปวิเคราะห์ด้วย GC ดังนั้นเปรียบเทียบขนาดของขวดแก้ว 2 ขนาดคือ 40 และ 60 มล. เมื่อนำตัวอย่างที่หั่นให้มีขนาดเล็กบรรจุในขวดทั้ง 2 ขนาดโดยมีน้ำหนักของยางก้นที่หั่นแล้วขวดละ 5 กรัม นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียสให้ความร้อนและดูดตัวอย่างแก๊สที่บริเวณที่ว่างเหนือตัวอย่างปริมาตร 200 ไมโครลิตรไปฉีด GC พบว่าโครมาโทแกรมที่ได้จากขวดทั้ง 2 ขนาดมีพื้นที่พีคที่ต่างกันโดยเปรียบเทียบระหว่างพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน VFAs 6 ชนิดได้แก่ acetic acid, propanoic acid, butanoic acid, 2-methylpropanoic acid, pentanoic acid, isovaleric acid กับสาร internal standard แสดงค่าเป็นอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของสารแต่ละชนิดกับ internal standard แสดงดังตารางที่ 4.2.1 เปรียบเทียบผลการทดลองของขวดขนาด 40 และ 60 มล. โดยใช้ student t-test พบว่าขนาดของขวดมีอิทธิพลต่อปริมาณของ acetic acid, และ propanoic acid อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 แต่ปริมาตรของขวดไม่มีอิทธิพลต่อปริมาณของ butanoic acid, 2-methylpropanoic acid, pentanoic acid, และ isovaleric acid โดยแสดงผลของปริมาณที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกใช้ขวดขนาด 60 มล. ซึ่งจะทำให้มีช่องว่างบริเวณเหนือตัวอย่างมากกว่าขวดขนาด 40 มล. ทำให้มีปริมาณของแก๊สที่เพิ่มสูงขึ้นตามปริมาตรของขวดที่ต่างกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้ขวดขนาด 60 มล. สำหรับการทดสอบต่อไป

ตารางที่ 4.2.1 แสดงปริมาณ VFAs เพื่อศึกษาอิทธิพลของปริมาณภาชนะขวดแก้วสำหรับใช้บรรจุตัวอย่าง

VFAs	ค่าเฉลี่ยสัดส่วนพื้นที่ใต้พีค ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน,n=3		P-value
	ขนาดขวดบรรจุตัวอย่าง		
	40 มล.	60 มล.	
acetic acid	1.1 ± 0.78	7.4 ± 0.66	0.001***
propanoic acid	2.5 ± 1.69	11.1 ± 1.07	0.002**
2-methylpropanoic acid	5.1 ± 3.20	5.7 ± 1.36	0.777
butanoic acid,	1.9 ± 0.87	1.9 ± 0.39	0.995
isovaleric acid	3.5 ± 2.09	3.5 ± 0.87	0.967
pentanoic acid	1.4 ± 0.46	1.4 ± 0.30	0.945

หมายเหตุ * คือ P-value < 0.05, ** คือ P-value < 0.01, *** คือ P-value < 0.001

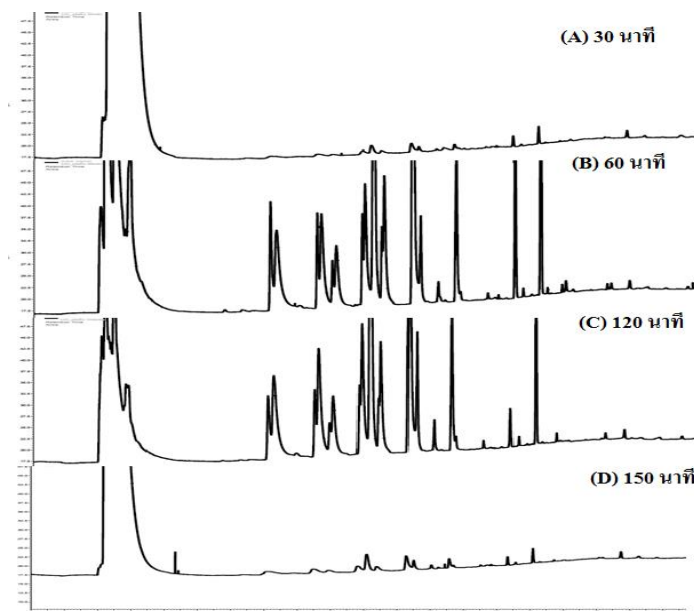
4.2.2.3 อิทธิพลของปริมาตรแก๊สที่เก็บจากบริเวณช่องว่างเหนือตัวอย่างเพื่อฉีดเข้าเครื่อง GC

ปริมาตรของแก๊สที่ระเหยจากตัวอย่างยางก้อนเป็นปัจจัยหนึ่งต่อการทดสอบโดย GC ดังนั้นจึงต้องศึกษาปัจจัยนี้เพื่อวิเคราะห์และแยกสารกลุ่ม VFAs โดย GC ซึ่งจะมีผลต่อการตรวจพบสัญญาณของพีค การแยกบนคอลัมน์ จึงเปรียบเทียบปริมาตรที่ฉีดระหว่าง 200 และ 400 ไมโครลิตรซึ่งพบว่าเมื่อฉีดตัวอย่างก๊าศที่ปริมาตรต่างกันแสดงผลดังตารางที่ 4.2.2 พบว่าปริมาตรของแก๊สตัวอย่าง 200 ไมโครลิตรและ 400 ไมโครลิตรไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 สำหรับกรด 3 ชนิด คือ butanoic acid, isovaleric acid และ pentanoic acid แต่พบว่าอิทธิพลของปริมาตรที่ฉีด GC มีอิทธิพลต่อกรด 3 ชนิด คือ acetic acid, propanoic acid, และ 2-methylpropanoic acid ซึ่งแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยสัดส่วนพื้นที่ใต้พีค อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 และที่ปริมาตร 400 ไมโครลิตรแสดงลักษณะของโครมาโทแกรมที่มีเส้นฐานที่สูงกว่าปริมาตร 200 ไมโครลิตรรวมทั้งลักษณะของพีคที่ไม่มีความสมมาตรและมีหางมากกว่าปริมาตร 200 ไมโครลิตร ดังนั้นจึงเลือกปริมาตร 200 ไมโครลิตร สำหรับการทดลองต่อไป

4.2.2.4 อิทธิพลของระยะเวลาที่ให้ความร้อน (Static time) กับยางตัวอย่างที่บรรจุในขวดเพื่อให้เกิดแก๊สที่บริเวณเหนือตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์โดย GC

ตัวอย่างยางก้อนที่ตัดให้มีขนาดเล็ก 5 กรัม บรรจุอยู่ในขวดขนาด 40 มล. ถูกให้ความร้อนเพื่อให้ VFAs ระเหยกลายเป็นไอที่บริเวณที่ว่างเหนือตัวอย่างภายในขวดแก้วที่บรรจุตัวอย่าง โดยศึกษาระยะเวลาที่ให้ความร้อนระหว่าง 30, 60, 120 และ 150 นาที ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.2.4

จากผลการทดลองที่แสดงดังภาพที่ 4.2.4 พบว่าเวลาที่สำหรับให้ความร้อนแก่ตัวอย่างในช่วง static time เป็นเวลา 120 นาทีให้ผลการทดลองที่ให้ผลการทดลองใกล้เคียงกับที่ระยะเวลา 60 นาที แต่จากการทดลองเลือกที่เวลา 120 นาที เพื่อให้ตัวอย่างสามารถกลายเป็นไอได้มากที่สุด และพบว่าที่เวลา 150 นาทีให้ผลการทดลองที่มีสัญญาณต่ำมากจึงไม่สามารถแยกความแตกต่างของสัญญาณของสารที่สนใจกับเส้นฐานได้สาเหตุหนึ่งเนื่องจากเกิดไอน้ำปริมาณมากในขวดบรรจุสารเนื่องจากตัวอย่างยางก้อนถ้วยมีน้ำเป็นส่วนประกอบจึงเกิดการควบแน่นขององค์ประกอบได้มากขึ้นทำให้มีที่ว่างในการเกิดเป็นแก๊สที่ลดลง



ภาพที่ 4.2.4 แสดงอิทธิพลของ static time ต่อปริมาณ VFAs ที่วิเคราะห์โดยวิธี static headspace-GC

ดังนั้นสามารถสรุปอิทธิพลที่ศึกษาที่เป็นปัจจัยต่อผลการวิเคราะห์ VFAs ที่เป็นองค์ประกอบในแก๊สตัวอย่างที่ได้จากการให้ความร้อนแกตัวอย่างยางก้อนถ้วย ดังตารางที่ 4.2.3

ตารางที่ 4.2.2 แสดงปริมาณ VFAs เพื่อศึกษาอิทธิพลของปริมาตรภาชนะขวดแก้วสำหรับใช้บรรจุตัวอย่าง

VFAs	ค่าเฉลี่ยสัดส่วนพื้นที่ใต้พีค ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน,n=3		P-value
	ปริมาตรแก๊สตัวอย่าง		
	200 ไมโครลิตร	400 ไมโครลิตร	
acetic acid	7.4 ± 0.66	0.71 ± 0.59	0.001***
propanoic acid	11.1 ± 1.07	0.80 ± 0.29	0.001***
2-methylpropanoic acid	5.7 ± 1.36	1.32 ± 1.15	0.012*
butanoic acid	1.9 ± 0.39	2.04 ±0.49	0.228
isovaleric acid	3.5 ± 0.87	3.13 ± 1.37	0.708
pentanoic acid	1.4 ± 0.30	1.55 ± 0.23	0.724

หมายเหตุ * คือ P-value < 0.05, ** คือ P-value < 0.01, *** คือ P-value < 0.001

ตารางที่ 4.2.3 แสดงสถานะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ VFAs ในตัวอย่างยางก้อนถ้วย

ปัจจัยที่ศึกษา	ช่วงที่ศึกษา	สถานะที่เหมาะสม
น้ำหนักยางตัวอย่าง (กรัม)	3, 5, 7	5
ขนาดของขวด (มล.)	40, 60	60
ปริมาตรแก๊สที่ฉีด (μL)	200, 400	200
ระยะเวลาในการให้ความร้อน (นาที)	30, 60, 120, 150	120

4.2.3 การวิเคราะห์ VFAs ในตัวอย่างที่เก็บจากกระบวนการผลิตยาง

เพื่อต้องการทดสอบว่าการจับตัวน้ำยางด้วยกรดที่ต่างชนิดกันคือกรดซัลฟิวริกและกรดฟอร์มิกจะมีอิทธิพลต่อกลิ่นที่เกิดขึ้นในยางก้อนถ้วยดังนั้นก็จะได้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างยางก้อนถ้วยจากบริษัทศรีตรัง รวมทั้งการเก็บตัวอย่างแก๊สในระหว่างกระบวนการผลิตในโรงงานผลิตยางก้อนถ้วยบริษัทศรีตรัง จังหวัดอุบลราชธานี โดยสามารถแบ่งตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่นำมาวิเคราะห์แบ่งออก 3 กลุ่มดังนี้

1. ตัวอย่างที่เตรียมโดยนักวิจัยภายในห้องปฏิบัติการโดยจับตัวยางน้ำยางด้วยกรดฟอร์มิกและกรดซัลฟิวริกเพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุมสำหรับกระบวนการจับตัวของน้ำยาง
2. ตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่เก็บจากสวนยางพาราที่เตรียมโดยเกษตรกรโดยแยกระหว่างยางที่จับตัวด้วยกรดซัลฟิวริกและกรดฟอร์มิก
3. ตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่เก็บบริเวณจุดพักยางของบริษัทผู้ผลิตซึ่งเป็นยางก้อนถ้วยที่รับซื้อจากเกษตรกร การทดลองเพื่อบ่งชี้ชนิดขององค์ประกอบของแก๊สในตัวอย่างจะวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค GC-MS โดยนำสถานะที่ได้จากการทดลองเบื้องต้นเพื่อหาสถานะที่เหมาะสมดังตารางที่ 4.2.3 มาใช้กับเทคนิค GC-MS ซึ่งสถานะของ MS จะทำในโหมด scan เพื่อสามารถระบุชนิดของสารได้โดยเทียบกับฐานข้อมูล NIST ที่มีความเหมือนระหว่างแมสสเปกตรัมของตัวอย่างกับฐานข้อมูล และสถานะที่ใช้ในการทดสอบโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) แสดงในตารางที่ 4.2.4

ตารางที่ 4.2.4 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทดสอบโดยการวิเคราะห์ด้วย GC-MS

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี(GC)	เครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์ (MS)
- อุณหภูมิที่ทางเข้า 200 °C - อัตราเร็วของแก๊ส He 1.2 มล./นาที - คอลัมน์ Carbowax ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มม. พิล์มหนา 0.25 มม. - ตั้งค่าเริ่มต้นอุณหภูมิของ GC oven 80 °C แล้วเพิ่มอุณหภูมิถึง 200 °C ด้วยอัตราเร็ว 10 °C/min และคงที่เป็นเวลา 5 นาที ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 21 นาที	- Ionisation mode: Electron impact (EI) - Scan mode : 40-500 amu - Solvent delay time: 3 นาที - Transfer line temperature: 200 °C

จากการทดลองเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบในแก๊สที่เกิดขึ้นจากยางก้อนถ้วยเมื่อนำตัวอย่างยางก้อนถ้วยมาทดลองภายในห้องปฏิบัติการโดยการเตรียมตัวอย่างและใช้สภาวะของการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เหมาะสมจากตารางที่ 4.2.3 ทำการวิเคราะห์เพื่อบ่งชี้ชนิดของสารโดย GC-MS โดยสภาวะการวิเคราะห์จากตารางที่ 4.2.4 ได้ผลการทดลองดังนี้

4.2.3.1 ผลการทดลองวิเคราะห์ VFAs ในกลิ่นจากตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่เตรียมโดยนักวิจัยภายในห้องปฏิบัติการ

เตรียมตัวอย่างยางก้อนถ้วยภายในห้องปฏิบัติการโดยนำน้ำยางมาจับตัวด้วยกรดฟอร์มิกและกรดซัลฟิวริกเพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุมสำหรับกระบวนการจับตัวของน้ำยางด้วยกรดทั้ง 2 ชนิดเพื่อผลิตเป็นยางก้อนถ้วย เนื่องจากสมมติฐานของการทดลองคิดว่ากลิ่นที่เกิดขึ้นในยางก้อนถ้วยเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นนักวิจัยจึงเตรียมตัวอย่างขึ้นเองในห้องปฏิบัติการโดยใช้กรดทั้ง 2 ชนิดในการจับตัวของน้ำยาง (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ก) เมื่อนำมายางก้อนถ้วยที่เตรียมในห้องปฏิบัติการโดยนักวิจัยมาวิเคราะห์พบว่าไม่พบพีคของ VFAs เป็นองค์ประกอบในกลิ่นของยางที่เตรียมขึ้นใหม่จากการจับตัวของน้ำยางด้วยกรดฟอร์มิกและซัลฟิวริกภายในห้องปฏิบัติการ (ดังโครมาโทแกรมรูปภาคผนวก ข) น้ำยางก้อนถ้วยซึ่งเตรียมในห้องปฏิบัติการ (เก็บไว้ในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส มีอายุประมาณ 2 เดือน) มาวิเคราะห์โดย GC-MS ใน SIM mode แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันระเหยง่ายปรากฏขึ้นในแก๊สที่ได้จากตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่เตรียมในห้องปฏิบัติการโดยการจับตัวด้วยกรดฟอร์มิก และซัลฟิวริกมีองค์ประกอบที่พบเหมือนกันและปริมาณ (สัดส่วนของพื้นที่) ใกล้เคียงกัน แต่พบว่าการใช้กรดฟอร์มิกเพื่อให้ยางจับตัวมีปริมาณของกรดอะซิติกที่สูงกว่าการจับตัวด้วยกรดซัลฟิวริก

ดังผลการทดลองในตารางที่ 4.2.5 เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณ VFAs ที่พบระหว่างยางก้อนถ้วยที่จับตัวด้วยกรดทั้ง 2 โดยใช้ student t-test พบว่าปริมาณของกรด Propanoic และ 3-methyl- Butanoic acid ไม่มีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 และปริมาณของกรด Acetic, 2-methyl- Propanoic, Butanoic, และ Pentanoic มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ 4.2.5 แสดงผลการทดลองวิเคราะห์ VFAs ในกลิ่นจากตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่เตรียมโดยนักวิจัยภายในห้องปฏิบัติการ

VFAs	ค่าเฉลี่ยสัดส่วนพื้นที่ใต้พีค $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, n=3		P-value
	ยางจับตัวด้วยกรดฟอร์มิก	ยางจับตัวด้วยกรดซัลฟิวริก	
Acetic acid	0.49 $\pm$ 0.04	0.003 $\pm$ 0.001	0.001***
Propanoic acid	0.017 $\pm$ 0.002	0.021 $\pm$ 0.039	0.064
2-methyl-Propanoic acid	0.003 $\pm$ 0.001	0.012 $\pm$ 0.003	0.004**
Butanoic acid	0.016 $\pm$ 0.002	0.092 $\pm$ 0.037	0.008**
3-methyl- Butanoic acid	0.007 $\pm$ 0.003	0.024 $\pm$ 0.012	0.026
Pentanoic acid	0.009 $\pm$ 0.001	0.090 $\pm$ 0.040	0.008**

หมายเหตุ * คือ P-value < 0.05, ** คือ P-value < 0.01, *** คือ P-value < 0.001

4.2.3.2 ผลการทดลองวิเคราะห์ VFAs ในกลิ่นจากตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่เก็บจากสวนยางพาราที่เตรียมโดยเกษตรกรโดยแยกระหว่างยางที่จับตัวด้วยกรดซัลฟิวริกและกรดฟอร์มิก

ผลการทดลองเปรียบเทียบองค์ประกอบของกลิ่นจากตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่เก็บจากสวนยางพบว่าโปรไฟล์ของแก๊สที่ได้จากยางก้อนแต่ละชนิดมีลักษณะคล้ายคลึงกันโดยไม่พบกรดไขมันระเหยง่ายที่ศึกษาในตัวอย่างยางก้อนที่ไม่เติมกรด และยางที่เตรียมขึ้นใหม่จากการจับตัวด้วยกรดทั้ง 2 ชนิด แต่พบว่ายางก้อนที่จับตัวด้วยกรดฟอร์มิกภายในสวนยางพาราซึ่งเกษตรกรเตรียมตัวอย่างตามการทำงานปกติซึ่งมีอายุของยางก้อนประมาณ 1 สัปดาห์มีองค์ประกอบของ VFAs ที่พบคือ propanoic acid, butanoic acid, 3-methyl pentanoic acid และ pentanoic acid (รูปภาพภาคผนวก ค) จากผลการทดลองพบลักษณะของโครมาโทแกรมของตัวอย่างที่จับตัวด้วยกรดฟอร์มิกและกรดซัลฟิวริกที่เตรียมใหม่ในวันนี้นักวิจัยไปเก็บตัวอย่าง มีโปรไฟล์ที่คล้ายกับตัวอย่างซึ่งเตรียมภายในห้องปฏิบัติการคือยังไม่พบพีคของสารที่เป็นองค์ประกอบในกลุ่ม VFAs และสอดคล้องกับสมมติฐานของงานวิจัยว่ากลิ่นเหม็นเกิดจากการย่อยโปรตีนหรือคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบในยางก้อนถ้วยซึ่งการเจริญเติบโตของเชื้อต้องใช้เวลาในการเจริญและย่อยอาหาร เมื่อนำตัวอย่างยางก้อนถ้วยมาวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (VFAs) GC-MS ในโหมด SIM ซึ่ง

เป็นโหมดของ GC-MS ที่ใช้เลือกใช้เพื่อเพิ่มความเฉพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดเฉพาะมวลไอออนที่สนใจของ กรดอินทรีย์ระเหยง่ายทั้ง 6 ชนิดโดยใช้กรดเฮกซานอิกเป็น internal standard และคำนวณปริมาณเป็น สัดส่วนของพื้นที่เทียบกับพื้นที่ของ internal standard โดยพบกรดอินทรีย์ระเหยง่าย 6 ชนิดคือ Acetic acid, Propanoic acid, isopropanoic acid (2-methyl propanoic acid), Butanoic acid, isobutanoic acid (3-methyl butanoic acid) และ Pentanoic acid มีปริมาณที่แตกต่างกันในยางก้อนถ้วยที่มีการจับตัว ด้วยกรดต่างชนิดกันดังตารางที่ 4.2.6

ผลจากตารางที่ 4.2.6 ยางก้อนที่ได้จากยางซึ่งเตรียมโดยเกษตรกรโดยเป็นตัวอย่างที่เก็บจาก สวนยาง พบว่ามีกรด butyric ปริมาณสูงกว่ากรดชนิดอื่นๆในทุกตัวอย่าง โดยเฉพาะซึ่งเป็นยางก้อนถ้วยซึ่งจับ ตัวกรดซัลฟิวริกที่เตรียมใหม่และปริมาณของกรด butyric ลดลงเมื่อระยะเวลาอายุยางเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ ยางที่จับตัวด้วยกรดฟอร์มิกภายในสวนยางก็พบ butyric acid เป็นองค์ประกอบเช่นกัน แต่ปริมาณการเพิ่มขึ้น หรือลดลงของกรดระเหยง่ายทั้ง 6 ชนิดก็จะมีการเปลี่ยนแปลงตามจำนวนวันของการกรีดยางด้วย เช่นยางก้อน ถ้วยที่จับตัวด้วยกรดฟอร์มิกอายุ 1 สัปดาห์จะมีปริมาณของกรด Butanoic, 3-methyl- Butanoic acid และ Pentanoic เพิ่มขึ้นกว่ายางที่จับตัวด้วยกรดชนิดเดียวกันแต่เป็นยางที่กรีดยางใหม่ ซึ่งคาดว่าเป็นผลจากการย่อย โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำยางเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจึงเกิดผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็น สารที่มีกลิ่นทำให้ลักษณะของโปรไฟล์กลิ่นจึงมีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของกรดอินทรีย์ระเหยง่าย จากผล การทดลองโดยเทคนิค GC-MS จะใช้ในการสนับสนุนผลจากการศึกษาการคัดแยกจุลินทรีย์เพื่อหาสายพันธุ์ที่ ผลิตกลิ่นจากการย่อยน้ำยางในกระบวนการตกตะกอนเป็นยางก้อนถ้วยในระดับห้องปฏิบัติการ เมื่อ เปรียบเทียบกับการใช้กรดชนิดเดียวกันในการจับตัวอย่างโดยการเตรียมขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 4.2.5) พบว่ายางก้อนถ้วยที่ได้จากสวนยางจะมีปริมาณของกรดทุกชนิดสูงกว่ายางก้อนซึ่งเตรียมภายใน ห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจากตัวอย่างยางก้อนที่เป็นตัวอย่างจากสวนยางและนำมาศึกษาในครั้งนี้พบว่า องค์ประกอบของกลิ่นและปริมาณ จะขึ้นอยู่กับชนิดของกรด และอายุของยางก้อนถ้วย

ตารางที่ 4.2.6 ผลการทดลองวิเคราะห์ VFAs ในกลิ่นจากตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่เก็บจากสวนยางพาราที่เตรียมโดยเกษตรกรโดยแยกระหว่างยางที่จับตัวด้วยกรดซัลฟิวริกและกรดฟอร์มิก

VFAs	ค่าเฉลี่ยสัดส่วนพื้นที่ใต้พีค $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, n=3				
	ยางไม่เติมกรด	ยางจับตัวด้วยกรดฟอร์มิกเตรียมใหม่	ยางจับตัวด้วยกรดฟอร์มิกอายุ 1 สัปดาห์	ยางจับตัวด้วยกรดซัลฟิวริกเตรียมใหม่	ยางจับตัวด้วยกรดซัลฟิวริกอายุ 1 สัปดาห์
Acetic acid	0.74 $\pm$ 0.4	2.05 $\pm$ 0.08	0.66 $\pm$ 0.35	1.51 $\pm$ 0.02	0.37 $\pm$ 0.30
Propanoic acid	0.81 $\pm$ 0.4	0.75 $\pm$ 0.07	1.03 $\pm$ 0.08	1.50 $\pm$ 0.04	0.73 $\pm$ 0.33
2-methyl-Propanoic acid	0.20 $\pm$ 0.2	-	-	-	0.25 $\pm$ 0.30
Butanoic acid	1.83 $\pm$ 0.6	2.14 $\pm$ 0.20	4.15 $\pm$ 0.33	9.57 $\pm$ 0.25	2.80 $\pm$ 0.25
3-methyl-Butanoic acid	0.61 $\pm$ 0.2	0.29 $\pm$ 0.02	1.19 $\pm$ 0.30	0.02 $\pm$ 0.01	0.86 $\pm$ 0.25
Pentanoic acid	0.51 $\pm$ 0.1	0.22 $\pm$ 0.05	1.03 $\pm$ 0.16	0.08 $\pm$ 0.01	0.64 $\pm$ 0.18

ดังนั้นจากการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อชนิดและปริมาณของกรดไขมันระเหยง่ายทั้ง 6 ชนิดพบว่าชนิดของกรดซึ่งใช้ในการจับตัวของยางระหว่างกรดฟอร์มิกและกรดซัลฟิวริกมีผลต่อชนิดขององค์ประกอบของกลิ่นที่ตรวจพบ สำหรับระยะเวลาในการกรีดยางและการเติมกรดในการจับตัวพบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการกรีดยางภายในสวนยางทำให้มีองค์ประกอบของกรดที่เพิ่มขึ้นมากกว่ายางที่กรีดใหม่หรือเตรียมขึ้นมาใหม่

4.2.3.3 ผลการทดลองวิเคราะห์ VFAs ในแก๊สจากตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่เก็บบริเวณจุดพักยางของบริษัทผู้ผลิตซึ่งเป็นยางก้อนถ้วยที่รับซื้อจากเกษตรกร

นำตัวอย่างยางที่เก็บจากโรงงานมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกลิ่น โดยแบ่งเป็นยางก้อนถ้วยที่เก็บจากกองยางของบริษัทผู้รับซื้อซึ่งเป็นตัวอย่างที่วางกองไว้ในโรงงานเป็นระยะเวลาประมาณ 1 เดือน ยางก้อนถ้วยที่มีการรดน้ำสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ยางที่ผ่านการหั่นและล้าง ยางที่ตากไว้บริเวณชั้นและยางก้อนเข้าสู่กระบวนการอบ จะมีองค์ประกอบและปริมาณของ VFAs ที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 4.2.7 ตัวอย่างยางที่ทดสอบเพื่อเปรียบเทียบปริมาณของกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (VFAs) โดยการศึกษาปริมาณของกรดแต่ละชนิดด้วย GC-MS ในโหมด SIM โดยใช้กรดเฮกซานอยิกเป็น internal standard และคำนวณปริมาณเป็นสัดส่วน

ของพื้นที่เทียบกับพื้นที่ของ internal standard โดยพบกรดไขมันระเหยง่ายที่ศึกษา 6 ชนิด (ดังรูปภาคผนวก ง) มีปริมาณที่แตกต่างกันในยางแต่ละชนิด

ตารางที่ 4.2.7 เปรียบเทียบปริมาณของกรดไขมันระเหยง่ายทั้ง 6 ชนิดที่ศึกษาโดยเปรียบเทียบยางแต่ละชนิด

VFAs	ค่าเฉลี่ยสัดส่วนพื้นที่ใต้พีค $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, n=3					
	ยางก้อน ถ้วยจาก กองยาง*	ยางก้อนถ้วย ราดน้ำส้ม ควันไม้	ยางก้อนถ้วยราด น้ำส้มควันไม้อายุ 1 เดือน	ยางล้าง ตาก 1 วัน	ยางล้าง ตาก 1 เดือน	ยางก้อนเข้า เตาอบ
Acetic acid	0.71	0.3 $\pm$ 0.16	0.04 $\pm$ 0.01	0.2 $\pm$ 0.06	0.8 $\pm$ 0.38	0.5 $\pm$ 0.02
Propanoic acid	1.07	0.8 $\pm$ 0.26	0.5 $\pm$ 0.02	0.2 $\pm$ 0.05	0.5 $\pm$ 0.25	0.1 $\pm$ 0.0
2-methyl- Propanoic acid	1.28	0.68 $\pm$ 0.08	0.9 $\pm$ 0.03	0.5 $\pm$ 0.11	-	-
Butanoic acid	2.15	3.4 $\pm$ 0.48	1.5 $\pm$ 0.06	0.8 $\pm$ 0.11	1.0 $\pm$ 0.53	0.7 $\pm$ 0.7
3-methyl- Butanoic acid	2.03	1.1 $\pm$ 0.06	1.7 $\pm$ 0.12	0.9 $\pm$ 0.14	0.4 $\pm$ 0.22	0.1 $\pm$ 0.02
Pentanoic acid	3.56	1.4 $\pm$ 0.15	2.4 $\pm$ 0.28	1.5 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.13	0.1 $\pm$ 0.07

หมายเหตุ * คือ n=1

จากตารางที่ 4.2.7 เปรียบเทียบปริมาณของกรดไขมันระเหยง่ายทั้ง 6 ชนิดที่ศึกษาโดยเปรียบเทียบยางแต่ละชนิดด้วยเครื่อง GC-MS ยางที่ได้จากโรงงานจะไม่สามารถระบุชนิดของกรดที่ใช้ในการจับตัวของยางได้ เนื่องจากภายในโรงงานมีการใช้น้ำส้มควันไม้เพื่อใช้ในการลดกลิ่นของยางก้อนถ้วยโดยจะราดน้ำส้มควันไม้บริเวณกองยางภายในโรงงานเมื่อเปรียบเทียบชนิดของกรดไขมันระเหยง่ายในตัวอย่างก้อนถ้วยที่ราดน้ำส้มควันไม้พบว่าการราดน้ำส้มควันไม้เป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถลดปริมาณของกรดไขมันระเหยลงได้โดยเปรียบเทียบปริมาณค่าเฉลี่ยสัดส่วนพื้นที่ใต้พีคของกรดไขมันระเหยง่ายระหว่างยางก้อนถ้วยที่ไม่ราดน้ำส้มควันไม้และราดน้ำส้มควันไม้ ดังเช่นของมีปริมาณของ butyric acid ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับยางก้อนถ้วยที่ไม่ราดน้ำส้มควันไม้ แต่ปริมาณของกรดไขมันระเหยได้ก็จะมีการเปลี่ยนแปลงเมื่ออายุของยางต่างกันเช่นเมื่อเปรียบเทียบระหว่างยางก้อนถ้วยที่ราดน้ำส้มควันไม้พบว่าตัวอย่างที่ราดน้ำส้มควันไม้ใหม่ๆ จะมีปริมาณกรด acetic มากกว่าตัวอย่างที่มีอายุ 1 เดือน เป็นต้น ปริมาณของกรดไขมันระเหยง่ายของตัวอย่างยางที่ผ่านกระบวนการสับและล้างพบว่าจะมีปริมาณกรดไขมันระเหยง่ายลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับยางก้อนถ้วยจากกอง

ยางและองค์ประกอบเกือบทุกชนิดจะมีปริมาณที่ลดลงเมื่อมีการสับ ล้างและผึ่งจนถึงกระบวนการก่อนเข้าเตาอบ

ดังนั้นจากตัวอย่างยางซึ่งนำมาจากโรงงานที่นำมาศึกษานี้ทำให้ทราบถึงการลดลงได้ขององค์ประกอบของกลิ่นที่สนใจคือกรดไขมันระเหยได้ทั้ง 6 ชนิดซึ่งเป็นองค์ประกอบหลัก ปริมาณขององค์ประกอบมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นหรือลดลงตามระยะเวลา การเติมสารช่วยลดกลิ่น กระบวนการล้าง เป็นต้น

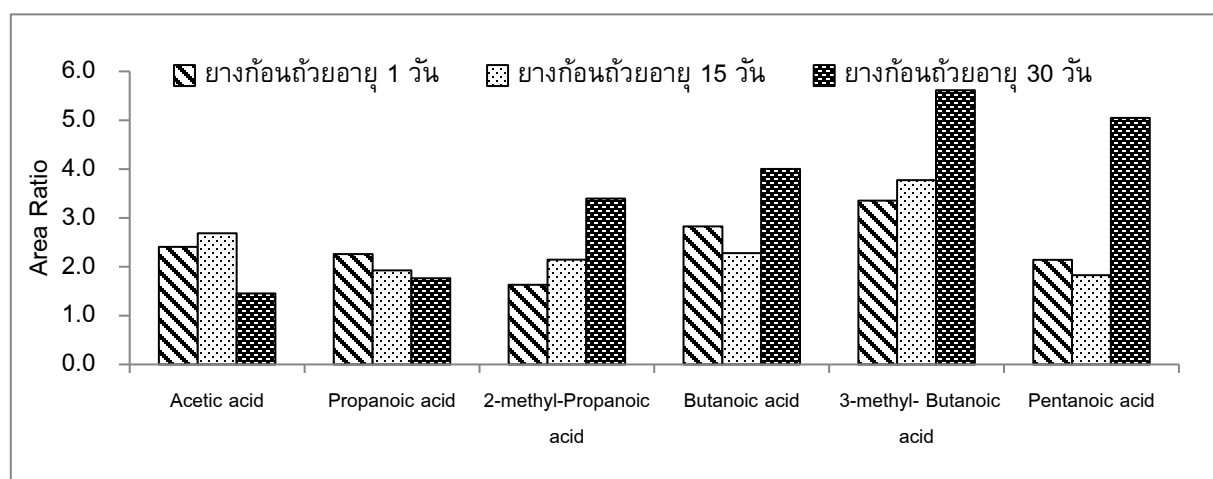
4.2.3.4 ผลการทดลองวิเคราะห์ VFAs ในแก๊สจากตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่เก็บบริเวณจุดพักยางของบริษัทโรงงานเป็นยางก้อนถ้วยที่รับซื้อจากเกษตรกรมีอายุแตกต่างกัน

ได้นำตัวอย่างยางก้อนที่กองไว้ภายในโรงงานโดยเก็บตามระยะเวลาที่ย่างก้อนถ้วยถูกนำมากองไว้ภายในโรงงานเป็นระยะเวลา 1 วัน 15-20 วัน และ 30 วัน เป็นตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่ได้จากโรงงานฯ ไม่ทราบชนิดกรดที่ใช้ในการจับตัวยาง เพื่อทดลองปัจจัยของอายุยางก้อนถ้วยกับองค์ประกอบของกลิ่นเหม็นวิเคราะห์ด้วย GC-MS ลักษณะของโครมาโทแกรมแสดงโปรไฟล์คล้ายคลึงกันในทุก 3 ตัวอย่าง(ดังรูปภาคผนวกจ) แต่มีปริมาณที่ต่างกันโดยเปรียบเทียบปริมาณของกรดไขมันระเหยง่าย 6 ชนิดเปรียบเทียบเป็นสัดส่วนของพื้นที่พีคของกรดแต่ละชนิดเทียบกับพื้นที่พีคของ Hexanoic acid ซึ่งใช้เป็น Internal standard ได้ผลดังตารางที่ 4.2.8 และภาพที่ 4.2.5 จากการวิเคราะห์ในเชิงคุณภาพจากโครมาโทแกรมที่ได้จากยางก้อนถ้วยโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อระบุชนิดขององค์ประกอบอื่นที่นอกเหนือจากกรดไขมันระเหยง่าย 6 ชนิดที่สนใจซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่พบ แล้วยังพบสารประกอบสารประกอบฟีนอล สารพาราครีซอลซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกปรากฏในโครมาโทแกรมซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดที่พบเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมทางน้ำ เนื่องจากการปล่อยน้ำที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลอย่างยิ่งในการทำลายคุณภาพของน้ำ และมีผลต่อสิ่งมีชีวิตต่อมนุษย์ ถ้าระดับความเข้มข้นน้อย ๆ จะทำให้รู้สึกคลื่นเหียน วิงเวียน เสียการทรงตัว หายใจไม่สม่ำเสมอ ถ้ามีความเข้มข้นมาก ๆ จะทำให้กล้ามเนื้อเกร็งอย่างรุนแรง และทำให้หัวใจล้มเหลวในที่สุด (siamchemi.com)

ตารางที่ 4.2.8 ผลการทดลองวิเคราะห์ VFAs ในแก๊สจากตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่เก็บบริเวณจุดพักยางของ บริษัทโรงงานเป็นยางก้อนถ้วยที่รับซื้อจากเกษตรกรมีอายุแตกต่างกัน

VFAs	ค่าเฉลี่ยสัดส่วนพื้นที่ใต้พีค $\pm$ %RPD, n=2		
	ยางก้อนถ้วยอายุ 1 วัน	ยางก้อนถ้วยอายุ 15 วัน	ยางก้อนถ้วยอายุ 30 วัน
Acetic acid	2.4 $\pm$ 8.5	2.7 $\pm$ 6.4	1.5 $\pm$ 7.5
Propanoic acid	2.3 $\pm$ 9.8	1.9 $\pm$ 8.0	1.8 $\pm$ 9.5
2-methyl-Propanoic acid	1.6 $\pm$ 10.1	2.1 $\pm$ 8.9	3.4 $\pm$ 5.7
Butanoic acid	2.8 $\pm$ 9.1	2.3 $\pm$ 8.8	4.0 $\pm$ 2.7
3-methyl- Butanoic acid	3.4 $\pm$ 9.3	3.8 $\pm$ 9.8	5.6 $\pm$ 9.5
Pentanoic acid	2.1 $\pm$ 8.6	1.8 $\pm$ 8.6	5.0 $\pm$ 3.8

หมายเหตุ %RPD คือ ค่า relative percent difference , สูตรในการคำนวณ คือ $RPD = (\text{ค่าสูงสุด} - \text{ค่าต่ำสุด}) \times 100 / \text{ค่าเฉลี่ย}$



ภาพที่ 4.2.5 เปรียบเทียบปริมาณของกรดอินทรีย์ระเหยง่าย 6 ชนิดโดยเปรียบเทียบเป็นสัดส่วนของพื้นที่พีค (Area ratio) ของกรดแต่ละชนิดกับพื้นที่พีคของ Internal standard เทียบกับอายุยางก้อนถ้วยที่ต่างกัน

จากตารางและภาพเปรียบเทียบปริมาณของกรดอินทรีย์ระเหยง่ายทั้ง 6 ชนิดพบว่าปริมาณของกรด acetic และ propanoic ลดลงเมื่ออายุของยางก้อนถ้วยเพิ่มขึ้นเป็น 30 วัน แต่ปริมาณของกรด 2-methyl-Propanoic acid, Butanoic acid, 3-methyl- Butanoic acid, และ Pentanoic acid เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาที่กองยางไว้นานขึ้น ลักษณะการเพิ่มขึ้นและลดลงของปริมาณ VFAs ในแต่ละช่วงอายุของยางอาจจะไม่สัมพันธ์กับกลิ่นที่สัมผัสได้จากการดมกลิ่นซึ่งเป็นกลิ่นที่มีสารระเหยรวมกัน เนื่องจากการวิเคราะห์โดยเครื่องมือ GC จะเป็นการแยกองค์ประกอบแต่ละชนิดและวิเคราะห์ปริมาณขององค์ประกอบแต่ละชนิดโดยปริมาณที่วัดได้ของสารบางชนิดที่มีปริมาณสูงอาจจะไม่บ่งชี้ถึงความเข้มข้นมากหรือน้อย แต่สารบางชนิดซึ่ง

วิเคราะห์ได้ปริมาณน้อยอาจจะมีกลิ่นที่รุนแรงกว่าซึ่งจะขึ้นอยู่กับปัจจัยร่วมอื่นๆ เช่นค่าการระเหย ความสามารถในการกลายเป็นไอ ค่า odor threshold ความเข้มข้นต่ำสุดที่คนเราสามารถจะได้กลิ่นเข้ามาเป็นส่วนประกอบด้วย

4.2.3.5 วิเคราะห์แก๊สจากตัวอย่างของเหลวที่บีบจากยางก้อนถ้วย (น้ำเซรุ่ม) กับน้ำบริเวณรอบๆ กองยางที่มีอายุต่างกัน

นำตัวอย่างน้ำเซรุ่มที่บีบได้จากก้อนยาง และน้ำเซรุ่มที่อยู่บริเวณกองยางภายในโรงงานโดยเก็บตามอายุของยางในแต่ละกองที่ถูกนำมากองไว้ภายในโรงงานเป็นระยะเวลา 1 วัน 15-20 วัน และ 30 วัน เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของกลิ่นเหม็นของยางก้อนถ้วยด้วย GC-MS และเปรียบเทียบปริมาณของกรดไขมันระเหยง่าย 6 ชนิด น้ำเซรุ่มที่ได้จากการบีบยางก้อนถ้วยที่อายุต่างกันและน้ำเซรุ่มบริเวณกองยางแสดงผลโครมาโทแกรมที่ได้คล้ายกัน(ดังรูปภาพภาคผนวก ฉ-ช) และคล้ายกับยางก้อนถ้วย เปรียบเทียบปริมาณเป็นสัดส่วนของพื้นที่พีคของกรดแต่ละชนิดเทียบกับพื้นที่พีคของ Hexanoic acid ซึ่งใช้เป็น Internal standard ได้ผลดังตารางที่ 4.2.9 เมื่อเปรียบเทียบพบว่าปริมาณของกรดทั้ง 6 ชนิดจะมีปริมาณสูงในของเหลวที่บีบจากยางก้อนถ้วย (น้ำเซรุ่ม) และน้ำบริเวณรอบๆ กองยางที่มีอายุน้อยที่สุด โดยเฉพาะกรด Acetic, Propanoic, Butanoic และ Pentanoic ซึ่งปริมาณ VFAs จะลดลงไปเมื่อน้ำเซรุ่มและน้ำรอบๆบริเวณกองยางมีอายุที่เพิ่มมากขึ้นตามอายุของยางในแต่ละช่วง และในตัวอย่างบริเวณรอบๆกองยางยังพบสารประกอบของกำมะถัน คือ dimethyl trisulfide ซึ่งสารชนิดนี้เป็นสารอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติมีกลิ่นเหม็นที่เกิดจากการย่อยสลายของแบคทีเรีย (Wikipedia, 2018)

ตารางที่ 4.2.9 วิเคราะห์แก๊สจากตัวอย่างของเหลวที่ปิบจากยางก้อนถ้วย (น้ำเซรุ่ม) กับน้ำบริเวณรอบๆ กองยางที่มีอายุต่างกัน

VFAs	สัดส่วนพื้นที่ใต้พีค					
	น้ำเซรุ่ม			น้ำบริเวณรอบๆ กองยาง		
	อายุ 1 วัน	อายุ 15-20 วัน	อายุ 30 วัน	อายุ 1 วัน	อายุ 15-20 วัน	อายุ 30 วัน
Acetic acid	20.1	0.3	1.1	2.0	0.7	0.1
Propanoic acid	65.2	3.6	2.7	5.9	2.0	0.3
2-methyl-Propanoic acid	6.3	1.9	1.6	1.0	1.2	0.3
Butanoic acid	41.3	5.6	4.1	4.6	3.5	0.6
3-methyl-Butanoic acid	13.7	4.6	3.4	2.5	3.1	0.8
Pentanoic acid	71.4	8.4	5.7	7.7	5.3	1.0

4.2.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างอากาศที่เก็บภายในบริเวณโรงงานผลิตยาง

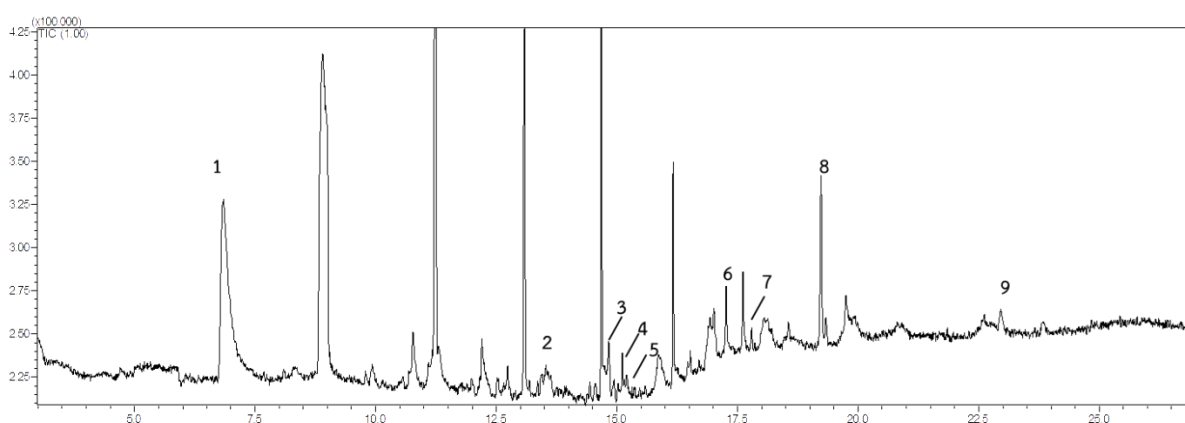
การเก็บตัวอย่างอากาศโดยการเปรียบเทียบระหว่างวิธีการเก็บตัวอย่างอากาศ 2 วิธีซึ่งอ้างอิงจากวิธีของ The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) และ NIOSH Manual of Analytical Methods โดยเก็บตัวอย่างอากาศใส่ถุงเก็บแก๊สขนาด 10 ลิตร และเก็บตัวอย่างอากาศโดยใช้ตัวดูดซับชนิด Solid Sorbent Tube (coconut shell charcoal, 100 mg/50 mg) ซึ่งเป็นตัวดูดซับที่ใช้สำหรับดูดซับกรดไขมันระเหยคือ acetic acid ในอากาศตามวิธีอ้างอิง METHOD: 1603, Issue 2:15 August 1994 แล้ววิเคราะห์แก๊สที่ถูกบรรจุไว้ในถุงมาวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วย GC-MS ในโหมด scan เพื่อระบุชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบในแก๊สที่เก็บจากพื้นที่จริงในการผลิตยางก้อนถ้วย

4.2.4.1 ตัวอย่างแก๊สที่บรรจุอยู่ในถุงเก็บแก๊ส

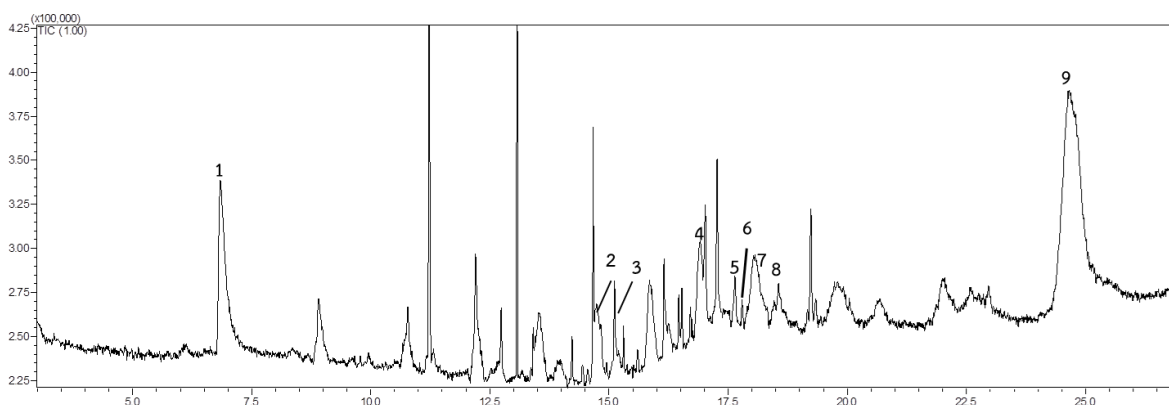
ในการทดลองต้องการเปรียบเทียบโปรไฟล์ของกลิ่นในกระบวนการผลิต ดังนั้นจึงเปรียบเทียบระหว่างแก๊สที่เก็บในบริเวณกองยางก้อนถ้วยภายในโรงงานกองที่ไม่ใช้น้ำส้มควันไม้ในการลดกลิ่นและแก๊สบริเวณกองยางที่มีการใช้น้ำส้มควันไม้ในการลดกลิ่น บริเวณพื้นที่ซึ่งเป็นบ้านพักของพนักงาน และบริเวณทางเข้าสู่ระบบกำจัดกลิ่น (Deorizer, ดีโอไรเซอร์) และแก๊สที่ทางออกของดีโอไรเซอร์

ผลการวิเคราะห์แสดงเป็นรูปโครมาโทแกรมเพื่อแสดงให้เห็นองค์ประกอบที่พบในอากาศจากแหล่งต่างๆ ในบริเวณผลิตยางก้อนถ้วยและระบุชนิดขององค์ประกอบนั้นๆเทียบกับฐานข้อมูลแมสสเปกตรัม

โดยภาพที่ 4.2.6 – 4.2.7 เป็นโปรไฟล์ของแก๊สที่เก็บจากบริเวณกองยางก้อนถ้วยที่ไม่มีการใช้น้ำส้มควันไม้ในการลดกลิ่นและบริเวณกองยางที่มีการใช้น้ำส้มควันไม้ในการลดกลิ่น และบริเวณบ้านพักคนงานตามลำดับ ผลการวิเคราะห์แก๊สจากทั้ง 3 แหล่งไม่พบกรดไขมันระเหยง่าย (VFAs) ที่สนใจศึกษาเป็นองค์ประกอบในแก๊สตัวอย่างที่เก็บมาวิเคราะห์ แต่พบสารเคมีอื่นๆ ที่เป็นองค์ประกอบในแก๊สที่เก็บเช่นสารประกอบเอสเทอร์ ดังเช่น Butanoic acid, (tetrahydro-2-furanyl)methyl ester และ Octadecanoic acid, butyl ester เป็นต้น และพบ phenol เป็นองค์ประกอบในแก๊สที่นำมาวิเคราะห์

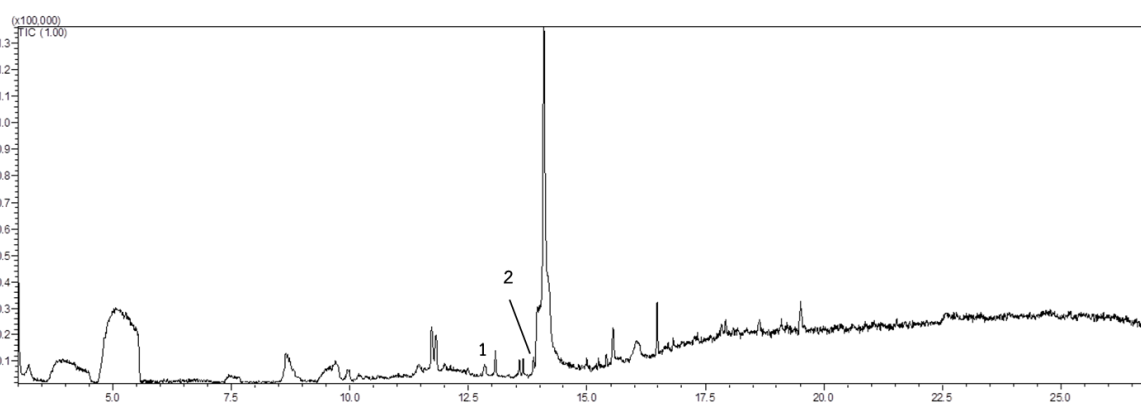


ภาพที่ 4.2.6 แสดงโครมาโทแกรมของแก๊สที่บรรจุในถุงเก็บจากบริเวณกองยางก้อนถ้วยภายในโรงงานที่ไม่มีการใช้น้ำส้มควันไม้ในการลดกลิ่น หมายเลข 1 คือ N,N-Dimethylacetamide, 2 คือ Butanoic acid, (tetrahydro-2-furanyl)methyl ester, 3 คือ Phenol , 4 คือ Isopropyl myristate , 5 คือ 2-Thiopheneacetonitrile , 6 คือ Benzoic acid, 4-(4-butylcyclohexyl)-, 2,3-dicyano-4-(pentyloxy)phenyl ester , 7 คือ Pentanoic acid, 5-hydroxy-, 2,4-di-t-butylphenyl esters, 8 คือ Hexadecanoic acid, butyl ester, และ 9 คือ Octadecanoic acid, butyl ester

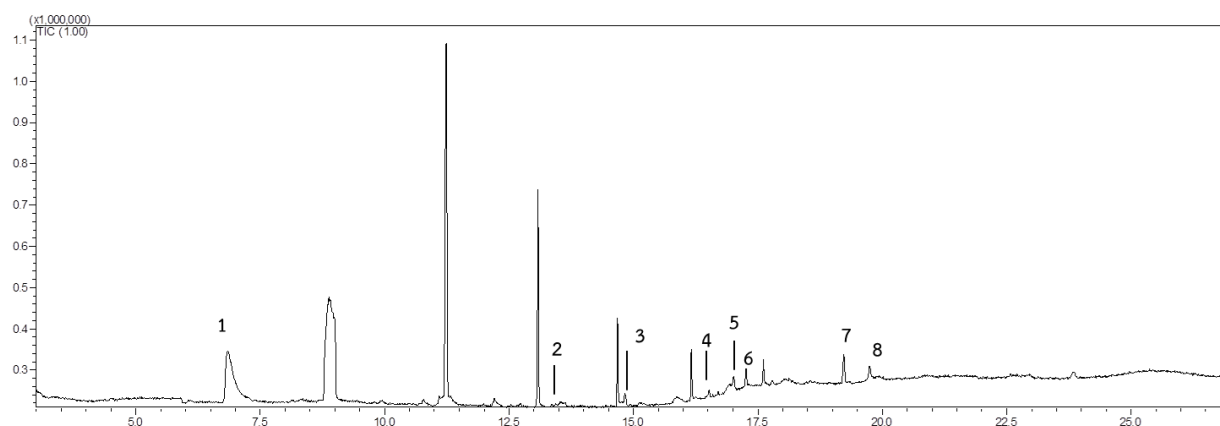


ภาพที่ 4.2.7 แสดงโครมาโทแกรมของแก๊สที่บรรจุในถุงเก็บจากบริเวณกองยางก้อนถ้วยในโรงงานที่มีการใช้น้ำส้มควันไม้ในการลดกลิ่น หมายเลข 1 คือ N,N-Dimethylacetamide, 2 คือ Phenol, 3 คือ Isopropyl myristate, 4 คือ Benzoic acid, 4-(4-butylcyclohexyl)-, 2,3-dicyano-4-(pentyloxy)phenyl ester, 5 คือ 2-Ethylhexyl salicylate, 6 คือ Phenol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-, 7 คือ 2,6-Bis(4-azidobenzylidene)-4-methylcyclohexanone, 8 คือ Hexadecanoic acid, butyl ester, และ 9 คือ Di-n-octyl phthalate

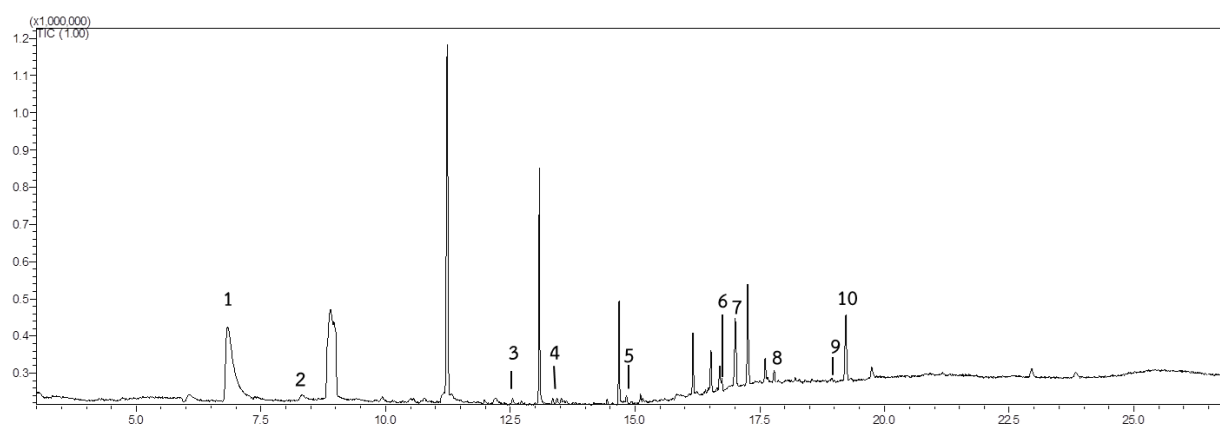
สำหรับแก๊สเก็บตัวอย่างได้จากบริเวณบ้านพักพนักงาน พบว่ามีโปรไฟล์เป็นดังภาพที่ 4.2.8 ซึ่งมีโปรไฟล์ต่างกับของแก๊สบริเวณกองยางโดยพบ Pentanoic acid และ Hexanoic acid ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของ VFAs ที่สนใจศึกษาเป็นองค์ประกอบ



ภาพที่ 4.2.8 แสดงโครมาโทแกรมของแก๊สที่เก็บตัวอย่างบริเวณบ้านพักพนักงาน พิกัดหมายเลข 1 คือ Pentanoic acid พิกัดหมายเลข 2 คือ Hexanoic acid



ภาพที่ 4.2.9 แสดงโครมาโทแกรมของแก๊สที่บรรจุในถุงเก็บจากบริเวณทางเข้าดีไอโรเซอร์ หมายเลข 1 คือ N,N-Dimethylacetamide, 2 คือ Butanoic acid, butyl ester , 3 คือ Phenol, 4 คือ Benzene, 1-cyclohexyl-2-methoxy-, 5 Benzoic acid, 4-(4-butylcyclohexyl)-, 2,3-dicyano-4-(pentyloxy)phenyl ester, 6 คือ Benzoic acid, 4-(4-butylcyclohexyl)-, 2,3-dicyano-4-(pentyloxy)phenyl ester, 7 คือ Hexadecanoic acid, butyl ester, 8 คือ methyl-Hydrazine



ภาพที่ 4.2.10 แสดงโครมาโทแกรมของแก๊สที่บรรจุในถุงเก็บจากบริเวณทางออกดีไอโรเซอร์ หมายเลข 1 คือ N,N-Dimethylacetamide, 2 คือ Sulfurous acid, hexyl octyl ester, 3 คือ 2-Propanol, 1-butoxy-, 4 คือ Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl ester, 5 คือ Phenol , 6 คือ Carbonic acid, isohexyl methyl ester, 7 คือ Benzoic acid, 4-(4-butylcyclohexyl)-, 2,3-dicyano-4-(pentyloxy)phenyl ester , 8 คือ Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-, 9 คือ Butyrolactone และ 10 คือ Hexadecanoic acid, butyl ester

การวิเคราะห์แก๊สที่บริเวณทางเข้า-ออกของดีไอโรเซอร์ซึ่งเป็นอุปกรณ์หนึ่งที่ถูกผลิตใช้เพื่อช่วยลดกลิ่นก่อนจะปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์แก๊สที่บริเวณทางเข้า-ออกของดีไอโรเซอร์ด้วย GC-MS เป็นดังภาพที่ 4.2.9 และ 4.2.10 ตามลำดับ ซึ่งการวิเคราะห์แก๊สที่บรรจุในถุงเก็บแก๊สไม่พบกรดระเหยง่ายเป็นองค์ประกอบในแก๊สตัวอย่างที่เก็บในบริเวณทั้งสอง แต่พบ N,N-Dimethylacetamide เป็นองค์ประกอบในปริมาณสูงที่สุด พบสารในกลุ่มเอสเทอร์เป็นองค์ประกอบเช่น Hexadecanoic acid, butyl ester และ Octadecanoic acid, butyl ester และ Sulfurous acid, hexyl octyl ester โดย Octadecanoic acid, butyl ester หรือ Palmitic acid และ Hexadecanoic acid, butyl ester หรือ Stearic acid เป็นสารประกอบในกลุ่มกรดไขมันซึ่งเป็นองค์ประกอบในยางธรรมชาติ (Jitladda,2012) องค์ประกอบของแก๊สที่บริเวณทางเข้าและทางออกของดีไอโรเซอร์มีความแตกต่างกัน แต่ยังคงพบสารประกอบในกลุ่มกรดไขมันและพบฟีนอลที่แก๊สบริเวณทางออกดีไอโรเซอร์

เนื่องจากจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของตัวอย่างอากาศที่เก็บใส่ถุงเก็บแก๊สด้วย GC-MS พบว่า แก๊สหรือตัวอย่างอากาศที่เก็บมานี้ไม่มีกรดระเหยเป็นองค์ประกอบ ซึ่งคาดว่าเป็นเพราะมีความเจือจางด้วยอากาศบริสุทธิ์มากและลักษณะของโครมาโทแกรมเห็นไม่ได้ชัดเจน ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทดลองเก็บตัวอย่างอากาศโดยใช้การดูดซับสารประกอบบนตัวดูดซับชนิด coconut shell charcoal ผลที่ได้เป็นดังแสดงในหัวข้อถัดไป

4.2.4.2 ตัวอย่างอากาศที่ดูดซับบน coconut shell charcoal

ตัวอย่างอากาศเก็บบริเวณล้างและอบตัวอย่างในกระบวนการผลิต และทางเข้า-ทางออกของปล่องดีไอโรเซอร์บนตัวดูดซับชนิด coconut shell charcoal โดยป้อนอากาศบริเวณจุดเก็บตัวอย่างผ่านไปยังตัวดูดซับด้วยอัตราเร็ว 1 ลิตรต่อนาที โดยดูดอากาศในแต่ละบริเวณที่เก็บตัวอย่าง 20 ลิตร วิเคราะห์องค์ประกอบของกลิ่นโดย GC-MS

การวิเคราะห์ตัวอย่างอากาศเก็บบริเวณล้างและอบในกระบวนการผลิตด้วย GC-MS ได้โครมาโทแกรมที่เหมือนกัน (รูปภาพภาคผนวก ข) โดยพบว่าบริเวณกระบวนการผลิตมี acetic acid เป็นองค์ประกอบซึ่งแสดงเด่นชัดเพียงองค์ประกอบเดียว เมื่อเปรียบเทียบกับโปรไฟล์กลิ่นบริเวณทางเข้า-ออกของดีไอโรเซอร์พบว่ามีจำนวนขององค์ประกอบของสารในกลุ่ม VFAs ที่แตกต่างกันโดยที่บริเวณทางเข้าของแก๊สจากกระบวนการอบเข้าสู่ดีไอโรเซอร์แก๊สดูดซับบนตัวดูดซับชนิดคาร์บอนที่ตรวจพบ VFAs 5 ชนิดคือ Acetic acid, Propanoic acid, 2-methyl-Propanoic acid, Butanoic acid, และ 2-methyl-Butanoic acid

(รูปภาพภาคผนวก ฅ) โดยปริมาณ acetic acid ที่พบบริเวณทางเข้าออกดีไอโรเซอร์มีปริมาณสูงสุด ดังตารางที่ 4.2.10 acetic acid เป็นองค์ประกอบหลักในกลุ่มที่ผ่านเข้าดีไอโรเซอร์โดยเปรียบเทียบเป็นร้อยละของพื้นที่ได้ฟิคของแต่ละองค์ประกอบที่พบกับพื้นที่รวมของฟิคทุกฟิคในโครมาโทแกรม บริเวณทางออกดีไอโรเซอร์ตรวจพบ acetic acid ในแก๊สดูดซับบนตัวดูดซับชนิดคาร์บอนชาร์โคลดังภาพที่ 4.2.17 โดยปริมาณ acetic acid ที่พบบริเวณทางออกดีไอโรเซอร์มีปริมาณสูงสุด ดังตารางที่ 4.2.11 acetic acid เป็นองค์ประกอบหลักในกลุ่มที่ผ่านออกดีไอโรเซอร์ (รูปภาพภาคผนวก ฅ)

ตารางที่ 4.2.10 แสดงปริมาณเป็นร้อยละของพื้นที่ของกรดระเหยทั้งหมดที่พบในแก๊สที่ดูดซับบนตัวดูดซับชนิดคาร์บอนชาร์โคลบริเวณทางเข้าดีไอโรเซอร์

ชนิดกรดระเหย	ร้อยละของพื้นที่ได้ฟิค				
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
1. Acetic acid	55.9	37.8	43.5	45.7	9.2
2. Propanoic acid	10.4	13.6	10.1	11.3	1.9
3. 2-methyl-Propanoic acid	11.9	11.8	11.3	11.7	0.3
4. Butanoic acid	9.1	16.9	13.4	13.1	3.9
5. 2-methyl-Butanoic acid	12.8	19.9	21.7	18.1	4.7

ตารางที่ 4.2.11 แสดงปริมาณเป็นร้อยละของพื้นที่ของกรดระเหยทั้งหมดที่พบในแก๊สที่ดูดซับบนตัวดูดซับชนิดคาร์บอนบริเวณทางออกดีไอโรเซอร์

ชนิดกรดระเหย	ร้อยละของพื้นที่ได้ฟิค				
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
1. Acetic acid	89.7	94.1	100.0	94.6	5.2
2. Butanoic acid	10.3	5.9	0.0	5.4	5.2

จากตัวอย่างแก๊สที่เก็บบนตัวดูดซับเมื่อเปรียบเทียบระหว่างแก๊สที่บริเวณทางเข้าและทางออกของดีไอโรเซอร์มีลักษณะโปรไฟล์ที่ต่างกันของจำนวนสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในกลุ่มที่วิเคราะห์ได้โดย GC-MS ซึ่งบริเวณทางเข้าดีไอโรเซอร์จะพบจำนวนของ VFAs ที่เป็นส่วนประกอบในตัวอย่างมากกว่าบริเวณ

ทางออกของดีไอโรเซอ์ซึ่งเป็นระบบที่ใช้ในการลดกลิ่นจากกระบวนการผลิตทำให้ปริมาณของกรดระเหยมีจำนวนลดลง จึงคาดว่ากลิ่นและลักษณะโปรไฟล์ที่บริเวณทางออกของดีไอโรเซอ์จะมีกลิ่นที่รบกวนลดลง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

5.1 ผลการคัดเลือกเชื้อที่ทำให้เกิดกลิ่น

การเก็บตัวอย่างเพื่อคัดเลือกเชื้อที่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นในกระบวนการผลิตยางก้อนถ้วย ตัวอย่างแบคทีเรียถูกเก็บจากสวนยางพารา และโรงงาน โดยจากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากแหล่งตัวอย่างจริงด้วยการทำ Serial dilution และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้อ พบเชื้อที่มีความแตกต่างกัน 39 ชนิด และเมื่อนำเชื้อดังกล่าวมาคัดแยกด้วยอาหารที่เตรียมจากน้ำยางพารา (Selective media) ที่อัตราส่วนน้ำยาง:Agar (1:5) พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียเพียง 18 ชนิด ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่เตรียมจากน้ำยางพารา (Selective media) ดังนี้ *Acinetobacter pittii*, *Bacillus thuringiensis*, *Cedecea davisae*, *Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumonia*, *Kurthia gibsonii*, *Lactococcus lactis*, *Lysinibacillus xylanilyticus*, *Myroides injeensis*, *Pantoea wallisii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus sciuri*, *Stenotrophomonas maltophilia* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีสมบัติในการใช้สารอาหาร เช่น โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตจากน้ำยางพารา และสามารถจัดกลุ่มของแบคทีเรียทั้ง 18 ชนิดที่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นที่ได้จากการดมกลิ่นเมื่อนำมาเลี้ยงในยางก้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาณ 3 กรัม ความเข้มข้นเชื้อ 8 Mcfaland ได้ทั้งหมด 3 กลุ่ม คือ แบคทีเรียที่ให้กลิ่นเหม็นมาก 9 ชนิด, แบคทีเรียที่ให้กลิ่นเหม็นปานกลาง 5 ชนิด และแบคทีเรียที่ให้กลิ่นเหม็นน้อย 4 ชนิด กลุ่มเชื้อดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตได้ในที่มีอากาศหรือที่มีอากาศน้อย (Facultative anaerobe) ซึ่งพบได้ทั้งบริเวณสวนยางพาราและโรงงาน

5.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกลิ่น

การทดลองเพื่อตรวจสอบองค์ประกอบของกลิ่นจากยางก้อนถ้วยโดยเทคนิค static headspace ซึ่งได้สถานะในการทดลองที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ร่วมกันระหว่าง static headspace และ GC-MS โดยหั่นตัวอย่างยางก้อนถ้วยให้มีขนาดเล็กและบรรจุน้ำหนัก 5 กรัมลงในขวดแก้วแล้วให้ความร้อนเพื่อให้สารระเหยเป็นไอ แล้วจึงดูดอากาศบริเวณช่องว่างเหนือตัวอย่างไปฉีดเข้าวิเคราะห์โดยเทคนิค GC-MS พบว่ายางก้อนมีองค์ประกอบของ VFAs คือ acetic acid, propanoic acid, butanoic acid และ pentanoic acid สอดคล้องกับรายงานของ Hoven และคณะ พบว่าเป็นกลุ่ม volatile fatty acids, VFAs ดังนี้ acetic acid, propanoic acid, butanoic acid, 2-methylpropanoic acid, pentanoic acid, isovaleric acid จากผลการทดลองวิเคราะห์องค์ประกอบของกลิ่นจากยางก้อนถ้วยโดยควบคุมสถานะการเตรียมตัวอย่างเพื่อเป็นตัวอย่างควบคุม

และควบคุมชนิดของกรดสำหรับการจับตัวน้ำยางพบว่าชนิดของกรดฟอร์มิกและซัลฟิวริกที่ใช้ในจับตัวน้ำยางไม่มีอิทธิพลต่อกลิ้นเมื่อเตรียมยางก้อนถ้วยใหม่ๆ แต่หากทิ้งระยะเวลาในการจับให้นานขึ้นจะมีปริมาณของ VFAs ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของกลิ่นไม่พึงประสงค์บางชนิดเพิ่มมากขึ้นซึ่งเป็นผลจากการที่เชื้อจุลินทรีย์ย่อยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำยางเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับการเจริญเติบโต จึงเกิดผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นสารที่มีกลิ่น และโดยการจับตัวยางด้วยกรดฟอร์มิกและซัลฟิวริกมีองค์ประกอบที่พบเหมือนกันและพบว่าการใช้กรดฟอร์มิกเพื่อให้ยางจับตัวมีปริมาณของ Acetic ที่สูงกว่าการจับตัวด้วยกรดซัลฟิวริกและปริมาณของกรด Acetic, 2-methyl-Propanoic, Butanoic, และ Pentanoic มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ซึ่งจากผลการทดลองโดยเทคนิค GC-MS จะใช้ในการสนับสนุนผลจากการศึกษาการคัดแยกจุลินทรีย์เพื่อหาสายพันธุ์ที่ผลิตกลิ่นจากการย่อยน้ำยางในกระบวนการตกตะกอนเป็นยางก้อนถ้วยในระดับห้องปฏิบัติการ

ยางก้อนถ้วยที่นำมาศึกษา (จากสวนยาง) พบกรด butyric ปริมาณสูงกว่ากรดชนิดอื่นๆ ในทุกตัวอย่าง โดยเฉพาะซึ่งเป็นยางก้อนถ้วยซึ่งจับตัวกรดซัลฟิวริกที่เตรียมใหม่และปริมาณของกรด butyric ลดลงเมื่อระยะเวลาอายุยางเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของกรดระเหยง่ายทั้ง 6 ชนิดจะมีการเปลี่ยนแปลงตามจำนวนวันของการกรีดยางด้วย ซึ่งคาดว่าเป็นผลจากการย่อยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำยางเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจึงเกิดผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นสารที่มีกลิ่นทำให้ลักษณะของโปรไฟล์กลิ่นจึงมีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของกรดอินทรีย์ระเหยง่ายแต่ละชนิดที่ต่างกันในแต่ละอายุของยางก้อนถ้วย ลักษณะการเพิ่มขึ้นและลดลงของปริมาณ VFAs ในแต่ละช่วงอายุของยางอาจจะไม่สัมพันธ์กับกลิ่นที่สัมผัสได้จากการดมกลิ่นซึ่งเป็นกลิ่นที่มีสารระเหยรวมกัน เนื่องจากการวิเคราะห์โดยเครื่องมือ GC จะเป็นการแยกองค์ประกอบแต่ละชนิดและวิเคราะห์ปริมาณขององค์ประกอบแต่ละชนิดโดยปริมาณที่วัดได้ของสารบางชนิดที่มีปริมาณสูงอาจจะไม่บ่งชี้ถึงความเข้มข้นมากหรือน้อยซึ่งจะขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ รวมด้วย เช่นค่าการระเหย ค่า odor threshold (ความเข้มข้นต่ำสุดที่คนเราสามารถจะได้กลิ่น) เป็นต้น

จากตัวอย่างอากาศที่เก็บในถุงเก็บอากาศและบนตัวดูดซับมีลักษณะโปรไฟล์ที่ต่างกันและพบว่าการเก็บตัวอย่างอากาศในถุงเก็บแก๊สไม่สามารถให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่ม VFAs ได้เนื่องจากลักษณะสถานที่ผลิตเป็นอาคารเปิดที่มีลมพัดผ่านตลอดกระบวนการผลิตจึงมีการเคลื่อนที่หรือเกิดเจือจางของกลิ่น และจากการดูดซับแก๊สด้วยตัวดูดซับชนิดคาร์บอนให้โปรไฟล์ของกลิ่นที่มีลักษณะที่ใกล้เคียงกับที่ได้จากตัวอย่างคือพบกรดไขมันระเหยง่ายเป็นองค์ประกอบ เมื่อเปรียบเทียบโปรไฟล์ของกลิ่นที่คาดว่าจะไม่ก่อให้เกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์โดยการเปรียบเทียบระหว่างแก๊สที่บริเวณทางเข้าและทางออกของดีไอโรเซอร์พบว่า

องค์ประกอบของแก๊สที่ทางเข้าและทางออกของดีไอโรเซอร์มีองค์ประกอบที่แตกต่างกันแต่ยังคงเป็นสารในกลุ่มกรดไขมันระเหยง่าย

กลิ่นไม่พึงประสงค์ภายในบริเวณโรงงานผลิตเกิดจากหลายสาเหตุหนึ่งมาจากวัตถุดิบยางก้อนถ้วยซึ่งเก็บรักษาไว้ในโรงงานในปริมาณมากเมื่อเปรียบเทียบกับชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ระเหยในตัวอย่างยางก้อนถ้วยที่มีอายุแตกต่างกันตามการเก็บรักษาในโรงงาน โดยร่วมกับตัวอย่างของเหลวที่ได้จากก้อนยาง (น้ำเซรุ่ม) ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของกลิ่นไม่พึงประสงค์ที่เกิดขึ้น พบว่ามีความคล้ายคลึงกันของลักษณะโปรไฟล์กลิ่นที่ได้และมีปริมาณที่แตกต่างกันตามอายุของการเก็บรักษาตัวอย่าง

ดังนั้นองค์ประกอบของกลิ่นและปริมาณขององค์ประกอบกรดไขมันระเหยง่ายจะขึ้นอยู่กับชนิดของกรดและอายุของยางก้อนถ้วย โดยปัจจัยจากกรดแต่ละชนิดและอายุของยาง การเติมสารช่วยลดกลิ่น และกระบวนการล้าง จะทำให้ลักษณะของโปรไฟล์กลิ่นมีการเปลี่ยนแปลงโดยการเพิ่มขึ้นหรือลดลงขององค์ประกอบของกรดไขมันแต่ละชนิดที่ต่างกัน

เอกสารอ้างอิง

- สำนักงานตลาดกลางยางพาราหนองคาย (2561) ลักษณะของยางก้อนถ้วย. แหล่งที่มา
http://www.rubbernongkhai.com/cuplump/index.php?option=com_content&view=article&id=5&Itemid=10, Accessed date 28 สิงหาคม 2561.
- อดิศักดิ์ รุ่งวิชานวิวัฒน์ (2546) ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับน้ำยาง และองค์ประกอบต่างๆ ในน้ำยาง. แหล่งที่มา:
http://km.rubber.co.th/index.php?option=com_content&view=article&id=82:2011-04-19-02-17-13&catid=23:2011-04-19-02-31-23&Itemid=33, Accessed date 28 สิงหาคม 2561.
- Astlett Rubber (2012) Standard Thai Rubber (STR) specification scheme. แหล่งที่มา:
<http://www.astletterubber.com/nr/str.html>, Accessed date 28 August 2018.
- Blackley, D.C. (1997) Polymer Latices: Science and technology Volume 2: Types of lattices. 2 ed. Vol. 2. Chapman & Hall, London.
- Cal, Y. (1999) Identification and characterization of Enterococcus Species isolated from forage crops and their influence on silage fermentation, Journal of Dairy Science. 82, 2466–2471.
- Gazeley, K.F., Gorton, A.D.T., Pendle, T.D. (1998) in Natural Rubber Science and Technology, A.D.Roberts (Ed.), Oxford University Press.
- Hoven, V.P., Rattanakarun, K., Tanaka, Y. (2003) Determination of chemical components that cause mal-odor from natural rubber, Rubber Chemistry And Technology. 76, 1128-1144.
- Idris, N.F., Kamarulzaman, N.H., Nor, Z.M. (2012) Determination of volatile fatty acids from raw natural rubber drying activity by thermal desorption-gas chromatography, Chemical Engineering Transactions. 30, 175-180.
- Ibrahim, M.A., Griko, N., Junker, M., A, L., Bulla, L.A. (2010) Bacillus thuringiensis a genomics and proteomics perspective, Bioengineered bugs. 1, 31-50.
- Jitladda T. S. and P. Rojruthai (2012). Molecular Structure of Natural Rubber and Its Characteristics Based on Recent Evidence, Biotechnology - Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life, Prof. Reda Sammour (Ed.), ISBN: 978-953-51-0151-2

- Lee, C.S., Jung, Y.T., Park, S., Oh, T. K., Yoon, J.H. (2010) *Lysinibacillus xylanilyticus* sp. nov., a xylandegrading bacterium isolated from forest humus, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60, 281–286.
- Mukherjee, P., Roy, P. (2016) Genomic potential of *Stenotrophomonas maltophilia* in bioremediation with an assessment of its multifaceted role in our environment, *Frontiers in Microbiology*. 7, 1-14.
- Nornanysya, F.K., Aminah, S.M.S., Azemi, S., Dzaraini, K., Fathil, W.Y.W.M. (2012) Treatment of odor from natural rubber by using selected antimicrobial agent, 559-564. Published in *Humanities, Science and Engineering Research (SHUSER)*, 2012 IEEE Symposium on 24–27 June 2012.
- Nornanysya, F.K., Aminah, S.M.S., Azemi, S. (2013) Odourless natural rubber (ONR), *Journal of Rubber Research*. 16, 15–35.
- Rustigian, R. and Stuart, C.A. (1944) The biochemical and serological relationships of the organisms of the *Genus Proteus*, *Journal of Bacteriology*. 49, 419-436.
- Sakdapipanich, J.T., Insom, K. (2006) High-resolution gas chromatography-mass spectrometry: Characterization and mechanism to generate the obnoxious odor in natural rubber, *Kautschuk Gummi Kunststoffe*. 7/8-06, 382-387.
- Schröttner, P., Rudolph, W.W., Eing, B.R., Bertram, S., Gunzer, F. (2014) Comparison of VITEK2, MALDI-TOF MS, and 16S rDNA sequencing for identification of *Myroides odoratus* and *Myroides odoratimimus*, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 79, 155–159.
- Siamchemi. ฟีนอล (Phenol). แหล่งที่มา <https://www.siamchemi.>, Accessed date 28 ธันวาคม 2561.
- Tassadaq, H., Aneela, R., Shehzad, M., Iftikhar, A., Khan, J., Edel-Hermann, V., Kim, K.Y., Anees, M. (2013) Biochemical characterization and identification of bacterial strains isolated from drinking water sources of Kohat, Pakistan, *African Journal of Microbiology Research*. 7, 1579-1590.
- Toyofuku, M., Yoon, S.S. (2018) Nitric oxide, an old molecule with noble functions in *pseudomonas aeruginosa* biology, *Advances in Microbial Physiology*. 72, 117–145.
- Verhaar, G. (1956) The structure of hevea latex and its viscosity. II, *Rubber Chemistry and Technology*. 29, 1484-1495.

- Wang, Y., Pan, X. (2014) Bacteria: *Proteus*, in Encyclopedia of Food Safety Volume 1, Y. Motarjemi (Ed.), Academic Press, pp. 486-489.
- Wu, W., Jin, Y., Bai, F., Jin, S. (2015) Chapter 41 - *Pseudomonas aeruginosa*, Molecular Medical Microbiology (2nd Edition), 2, 753-767.
- Zhang, H., Li, M., Yang, Z., Sun, Y., Yan, J., Chen, D. Chen, Y. (2017) Isolation of a non-traditional sulfate reducing-bacteria *Citrobacter freundii* sp. and bioremoval of thallium and sulfate, Ecological Engineering. 102, 397-403.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

บทความสำหรับเผยแพร่

Identify the bacteria cause bad odor in rubber industry

Choowongkomon K.¹, Hansupalak N.², Insuan W.³

¹*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand 10900*

²*Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand 10900*

³*Department of Veterinary Technology, Faculty of Veterinary Technology, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand 10900*

E-mail: kiattawee.c@ku.th

Abstract.

The problem of odor from the rubber latex industry is a major problem in the rubber industry. Due to complaints about odors from the people in the industry areas. One cause of odor may be associated with the biodegradation process by bacteria such as carbohydrates, proteins, etc., which are present in the serum. And gas generation. At present, industrial plants use water-absorbing odor to reduce the intensity of odor, but it is not very good. Therefore, if you can eliminate the microorganisms that cause odors. It may help reduce the intensity of the smell. This research was conducted to isolate microorganisms from rubber plantations and rubber plant for odor analyzed use in GC-MS technique. Comparing the gas composition with the gas data obtained from the actual air sampling. Odor composition analysis It found that the rubber and lump rubber composed with Acetic acid, propanoic acid, 2-methyl-propanoic acid, butanoic acid, 3-methyl-butanoic acid, pentanoic acid.

ภาคผนวก ข

**ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ดำเนินการมา
และผลที่ได้รับตลอดโครงการ**

ตารางภาคผนวกที่ ข วัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ดำเนินการมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ

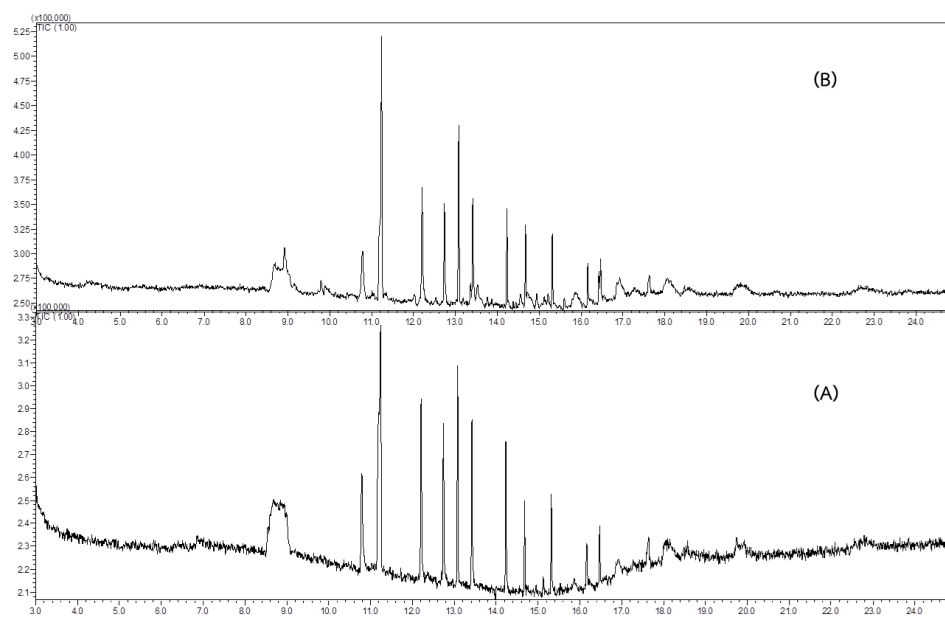
วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	ช่วงระยะเวลาตามแผนงาน	กิจกรรมที่ดำเนินการมา	ช่วงระยะเวลาที่ทำจริง	ผลที่ได้รับตลอดโครงการ
1. หาจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของกลิ่นเหม็นในยางก้อนถ้วยและโรงงานผลิตยางแท่ง	คัดเลือกจุลินทรีย์และทดลองการเกิดกลิ่นของจุลินทรีย์นั้นในห้องปฏิบัติการ และวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกลิ่น	ก.ย. 2560– ส.ค. 2561	ดำเนินการตามกิจกรรมที่วางแผนไว้ แต่ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกลิ่นเชื่อถือไม่ได้ เพราะมีความแปรปรวนของตัวอย่างที่ใช้	ก.ย. 2560– ส.ค. 2561	ทราบกลุ่มจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดกลิ่นด้วยการดมกลิ่น โดยยังต้องทำดำเนินการวิเคราะห์องค์ประกอบของกลิ่นเพิ่มเติม
2. อิทธิพลของชนิดกรดที่มีต่อกลิ่นเหม็น	วิเคราะห์องค์ประกอบกลิ่นเหม็นในตัวอย่างที่จับตัวด้วยกรดต่างชนิด (ซิลฟริกและฟอสฟอริก)	มิ.ย. 2560– ส.ค. 2561	ได้ดำเนินการ แต่ผลที่ได้ไม่น่าเชื่อถือ เพราะมีความแปรปรวนของตัวอย่างที่ใช้	มิ.ย. 2560– ส.ค. 2561	ได้ดำเนินการวิเคราะห์ และทราบข้อมูลเบื้องต้นและทราบสาเหตุที่ทำให้ผลขาดความน่าเชื่อถือ
3. สร้างโปรไฟล์ของกลิ่นที่เกิดขึ้นในการผลิตยางก้อนถ้วยและยางแท่ง รวมทั้งเปรียบเทียบโปรไฟล์ระหว่างกลิ่นที่เกิดขึ้นกับกลิ่นที่คาดว่าจะเกิดขึ้นกับกลิ่นที่ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะต่อชุมชน	เก็บตัวอย่างอากาศและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกลิ่นที่เกิดจาก 4 แหล่ง ในสภาพปัจจุบัน คือที่พักยางก้อนถ้วยในสวน ที่พักยางก้อนถ้วยในโรงงาน จุดปล่อยแก๊สเข้าปล่องบำบัดกลิ่น และจุดปล่อยแก๊สสู่บรรยากาศ (ออกจากปล่องบำบัดกลิ่น)	มิ.ย. 2560– ส.ค. 2561	ดำเนินการตามกิจกรรมที่วางแผนไว้ แต่โปรไฟล์ของกลิ่นที่ได้ไม่สามารถใช้เปรียบเทียบหรือสรุปว่าก่อให้เกิดมลภาวะต่อชุมชนหรือไม่	มิ.ย. 2560– ส.ค. 2561	ได้ดำเนินการวิเคราะห์ และต้องเพิ่มเติมการทดสอบกลิ่นเพื่อทราบโปรไฟล์ที่เกิดขึ้น

ภาคผนวก ค

การคำนวณความเข้มข้นของกรดฟอร์มิกและซัลฟิวริกภายในห้องปฏิบัติการสำหรับการจับตัวอย่าง
ก้อนถ้วยและการเตรียมน้ำยงก้อนถ้วยที่จับตัวด้วยกรดฟอร์มิกและซัลฟิวริกภายในห้องปฏิบัติการ

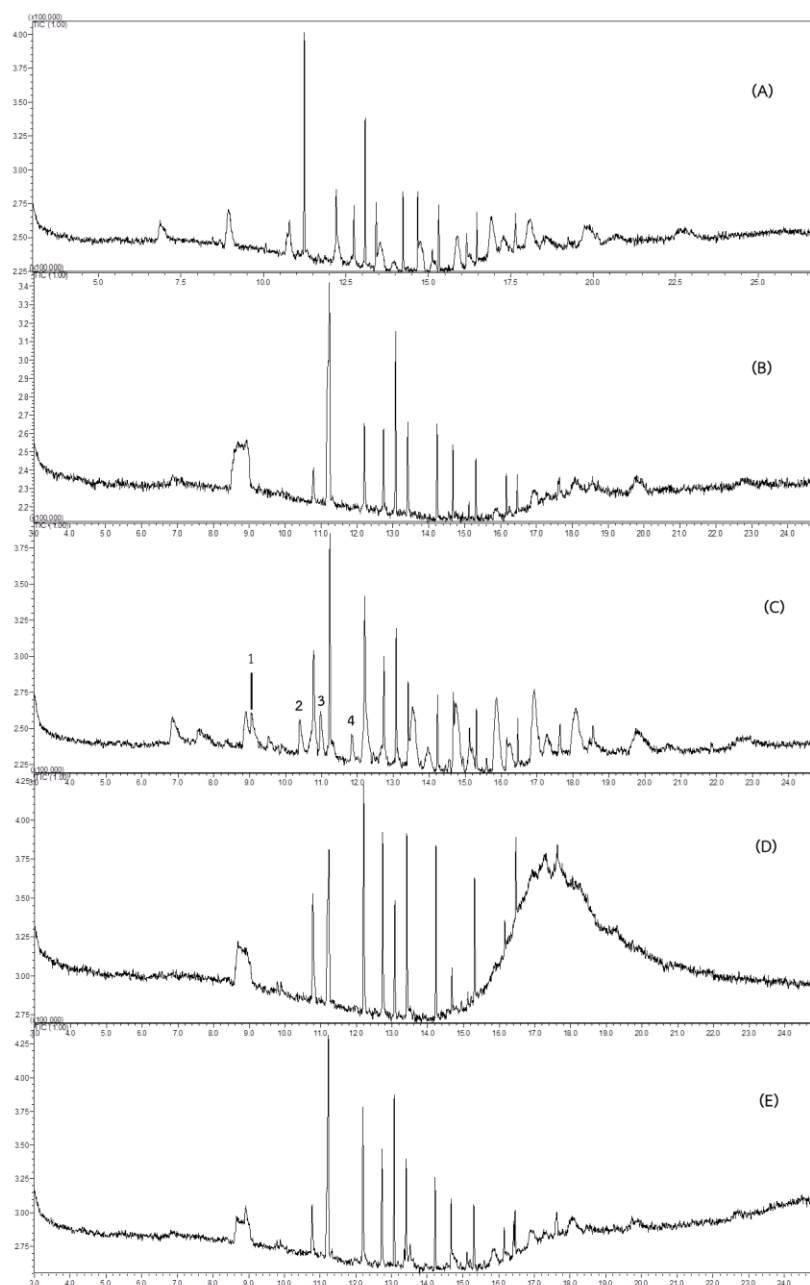
1. เตรียมสารละลายกรดซัลฟิวริกและสารละลายกรดฟอร์มิกเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ด้วยการผสมกรดเข้มข้นที่ซื้อมา (กรดซัลฟิวริกที่ใช้เข้มข้น 95% และกรดฟอร์มิกเข้มข้น 85%) กับน้ำกลั่น
2. นำสารละลายกรดแต่ละชนิดมาผสมน้ำยงสดจากส่วนที่มีปริมาณน้ำยง (%DRC) เท่ากับร้อยละ 37 ในสัดส่วน 0.8 กรัม เนื้อกรดต่อเนื้อยง 100 กรัม ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จึงนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กขนาดกว้างยาว และความหนาอย่างละ 1 เซนติเมตร แล้วบรรจุตัวอย่างในขวดพลาสติกที่ก่ด้วยน้ำกลั่น และตามด้วยของเหลวที่ออกมาจากตัวอย่างขณะตัดเป็นชิ้นเล็กๆ

ภาคผนวก ง



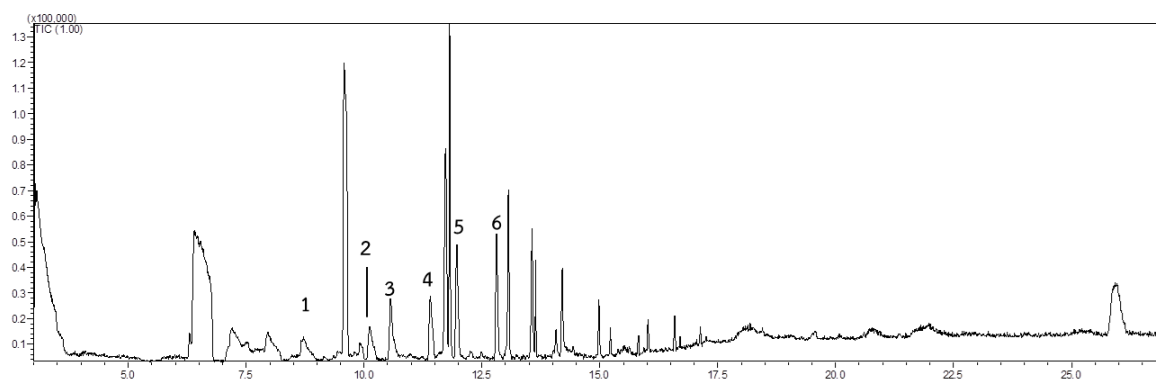
รูปภาพผนวก ง แสดงโครมาโทแกรมของยางที่จับตัวด้วยกรดฟอร์มิก (A) และกรดซัลฟิวริก (B) ซึ่งเตรียมในห้องปฏิบัติการ

ภาคผนวก จ



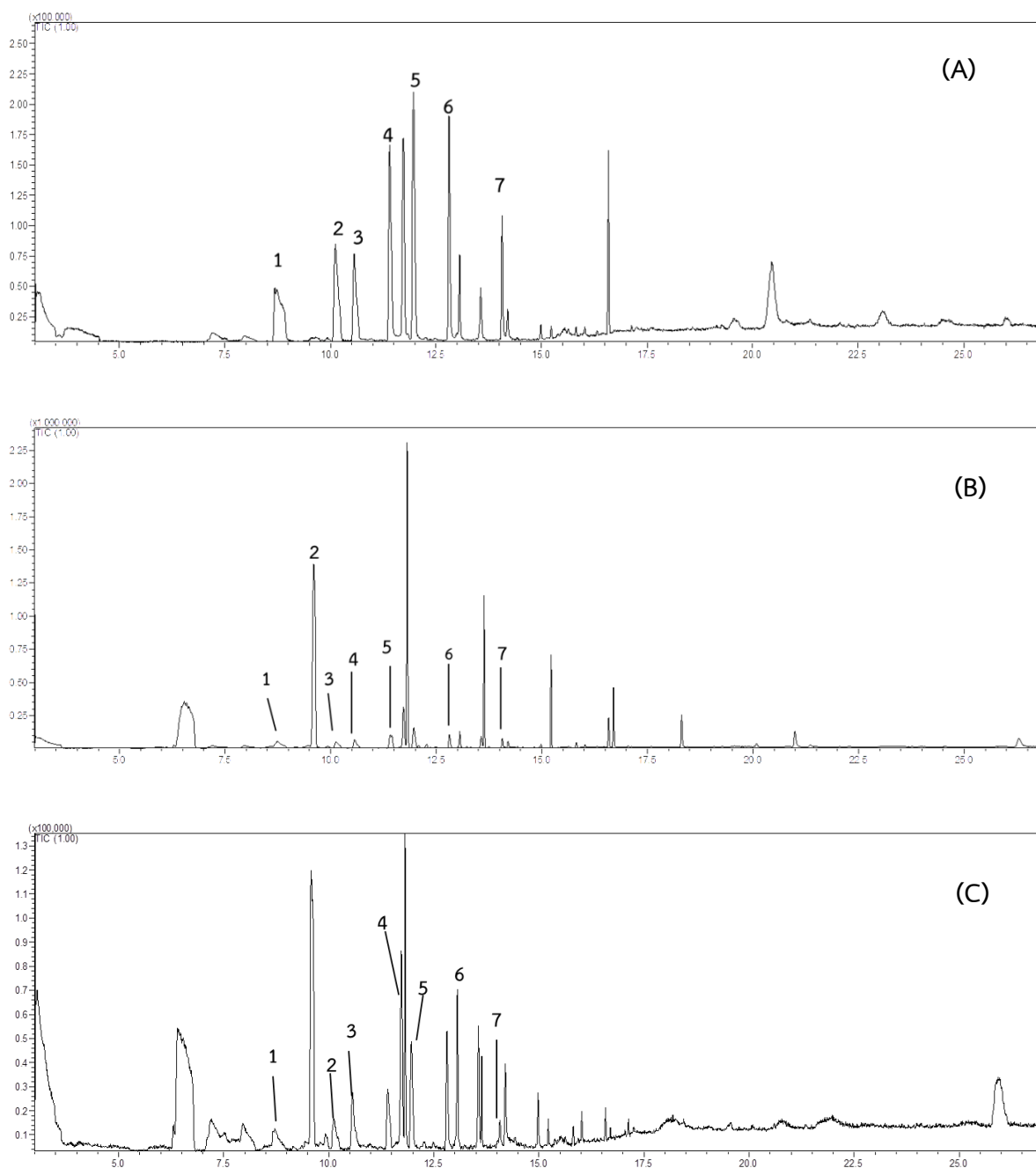
รูปภาพภาคผนวก จ แสดงโครมาโทแกรมเปรียบเทียบอิทธิพลของการจับตัวน้ำยางด้วยกรดฟอร์มิกและซัลฟิวริกภายในสวนยางพาราซึ่งเป็นตัวอย่างจริงที่เกษตรกรกรีดเพื่อผลิตเป็นยางก้อนถ้วย โดย(A) คือน้ำยางที่ไม่เติมกรดในการจับตัว (B) คือน้ำยางที่จับตัวด้วยกรดฟอร์มิกโดยเตรียมใหม่ (C) คือน้ำยางที่จับตัวด้วยกรดฟอร์มิกเตรียมไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ (D) คือน้ำยางที่จับตัวด้วยกรดซัลฟิวริกโดยเตรียมใหม่ และ(E) คือน้ำยางที่จับตัวด้วยกรดซัลฟิวริกเตรียมไว้ประมาณ 5 วัน โดยพีคหมายเลข 1 คือ propanoic acid, หมายเลข 2 คือ butanoic acid, หมายเลข 3 คือ 3-methyl pentanoic acid และ หมายเลข 4 คือ pentanoic acid

ภาคผนวก ฉ



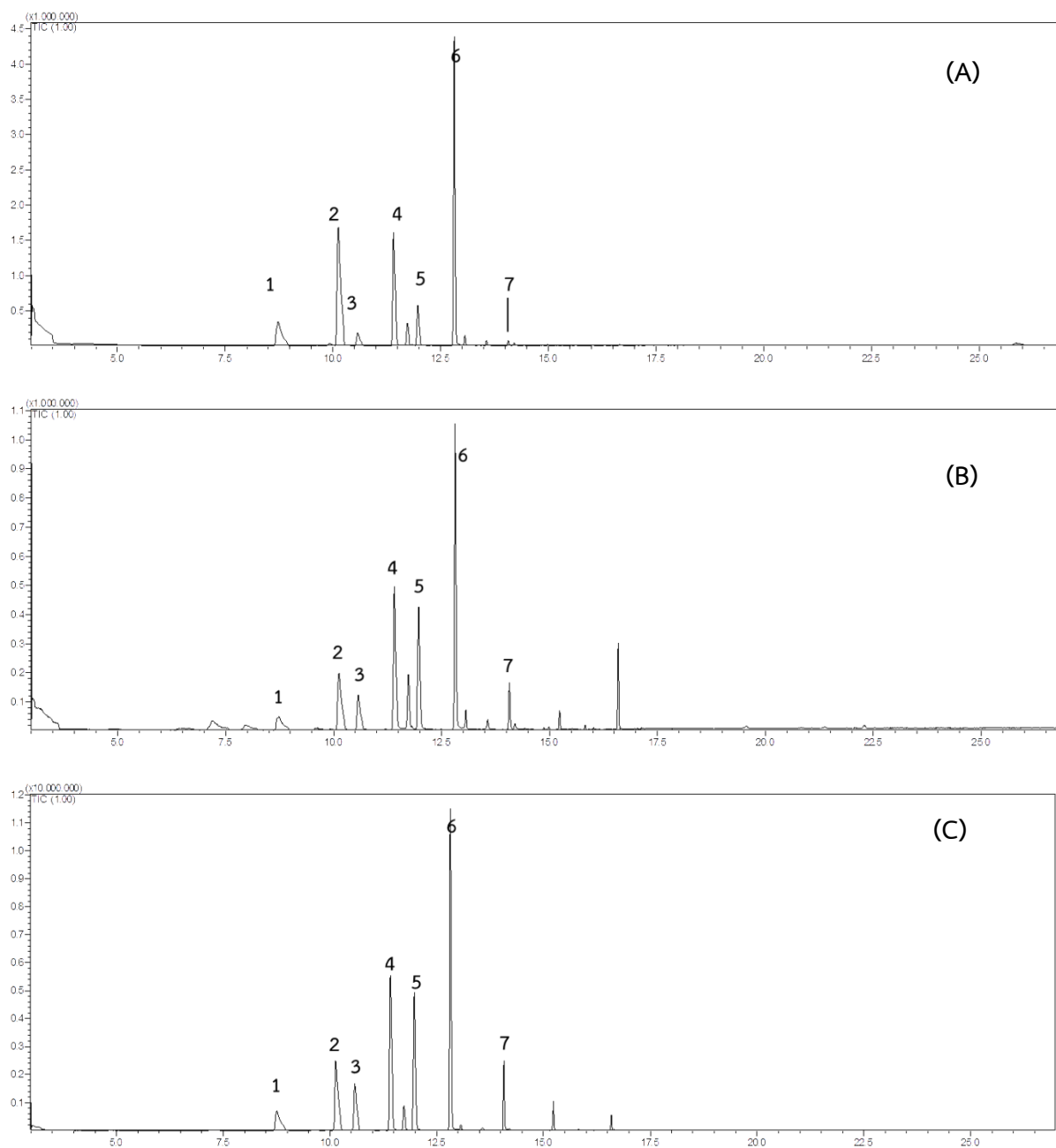
รูปภาพภาคผนวก ฉ แสดงโครมาโทแกรมขององค์ประกอบของกลิ่นที่ได้จากการวิเคราะห์อย่างกึ่งอัตโนมัติที่เก็บจากบริเวณจุดพักยางก้อนที่รับซื้อจากเกษตรกรโดยหมายเลข 1 คือ Acetic acid, หมายเลข 2 คือ Propanoic acid, หมายเลข 3 คือ 2-methyl-Propanoic acid, หมายเลข 4 คือ Butanoic acid, หมายเลข 5 คือ 3-methyl- Butanoic acid, หมายเลข 6 คือ Pentanoic acid

ภาคผนวก ข



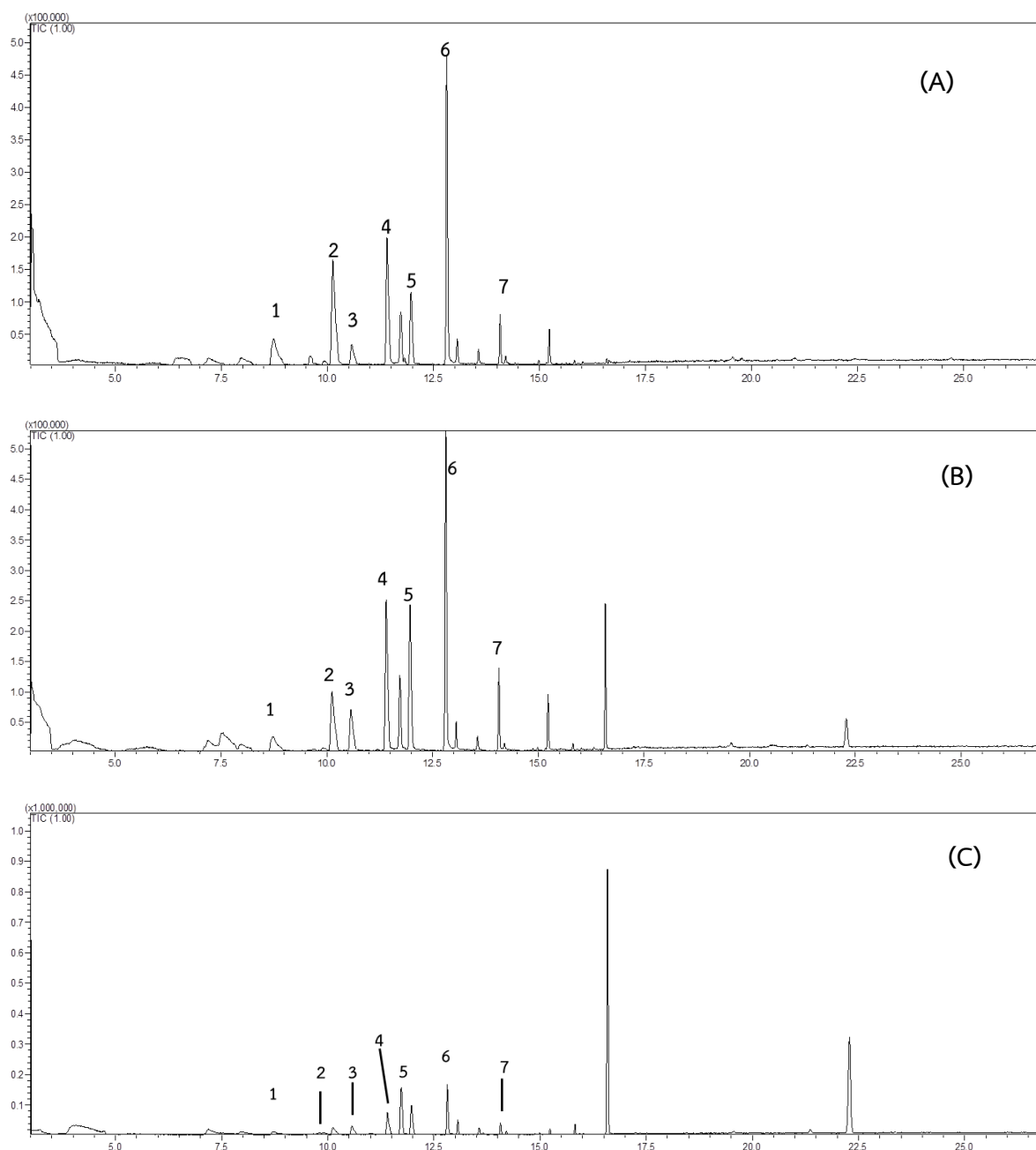
รูปภาพภาคผนวก ข แสดงโครมาโทแกรมของแก๊สที่เป็นองค์ประกอบในยางก้อนถ้วยอายุต่างกัน (A) อายุที่โรงงาน 1 วัน (B) อายุ 15-20 วัน และ (C) อายุ 30 วัน โดยหมายเลข 1 คือ Acetic acid, หมายเลข 2 คือ Propanoic acid, หมายเลข 3 คือ 2-methyl-Propanoic acid, หมายเลข 4 คือ Butanoic acid, หมายเลข 5 คือ 3-methyl- Butanoic acid, หมายเลข 6 คือ Pentanoic acid และหมายเลข 7 คือ Hexanoic acid (Internal standard)

ภาคผนวก ข



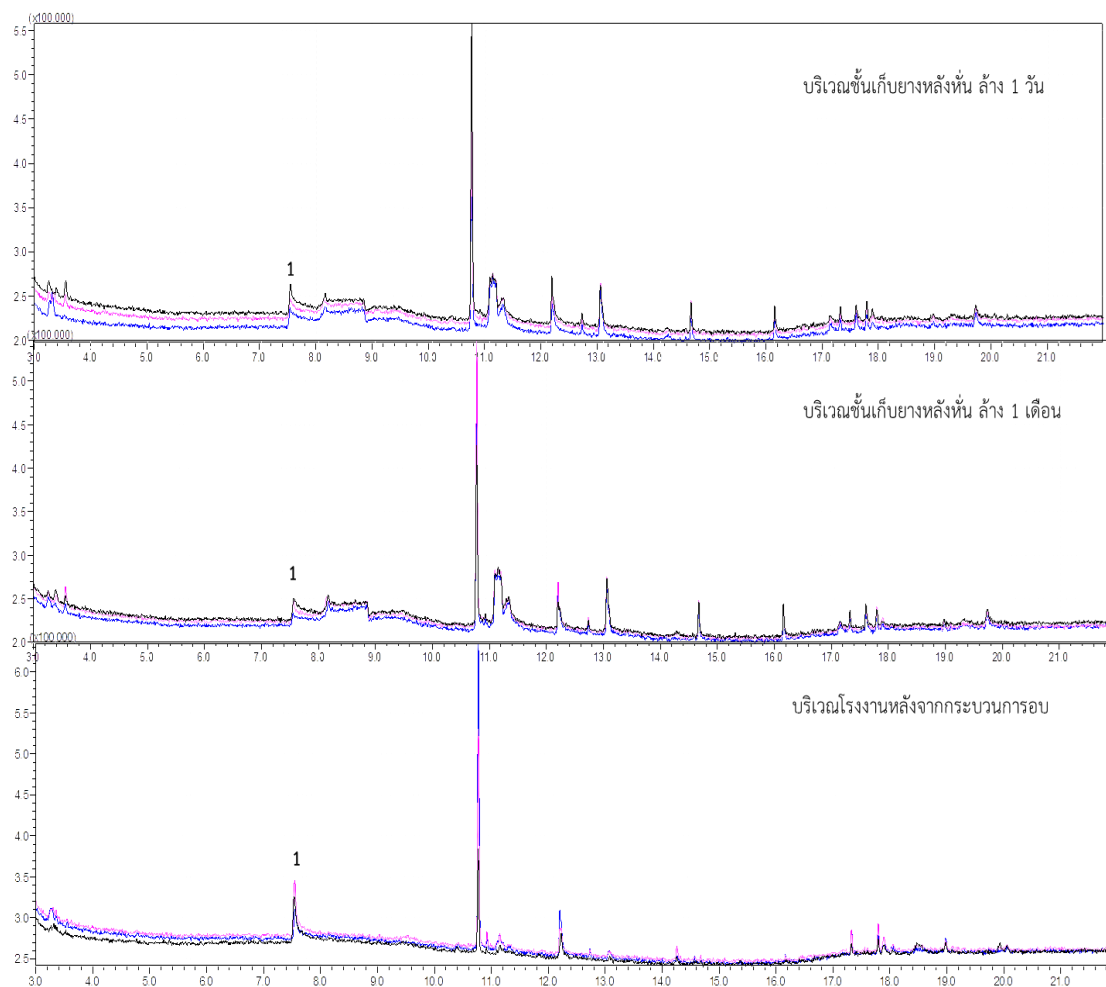
รูปภาพภาคผนวก ข แสดงโครมาโทแกรมของแก๊สที่เป็นองค์ประกอบในของเหลวจากยางก้อนถ้วย (น้ำเซรุ่ม) อายุการเก็บรักษาที่โรงงาน (A) 1 วัน (B) 15 วัน และ (C) 30 วัน โดยหมายเลข 1 คือ Acetic acid, หมายเลข 2 คือ Propanoic acid, หมายเลข 3 คือ 2-methyl-Propanoic acid, หมายเลข 4 คือ Butanoic acid, หมายเลข 5 คือ 3-methyl- Butanoic acid, หมายเลข 6 คือ Pentanoic acid และหมายเลข 7 คือ Hexanoic acid (Internal standard)

ภาคผนวก ฅ



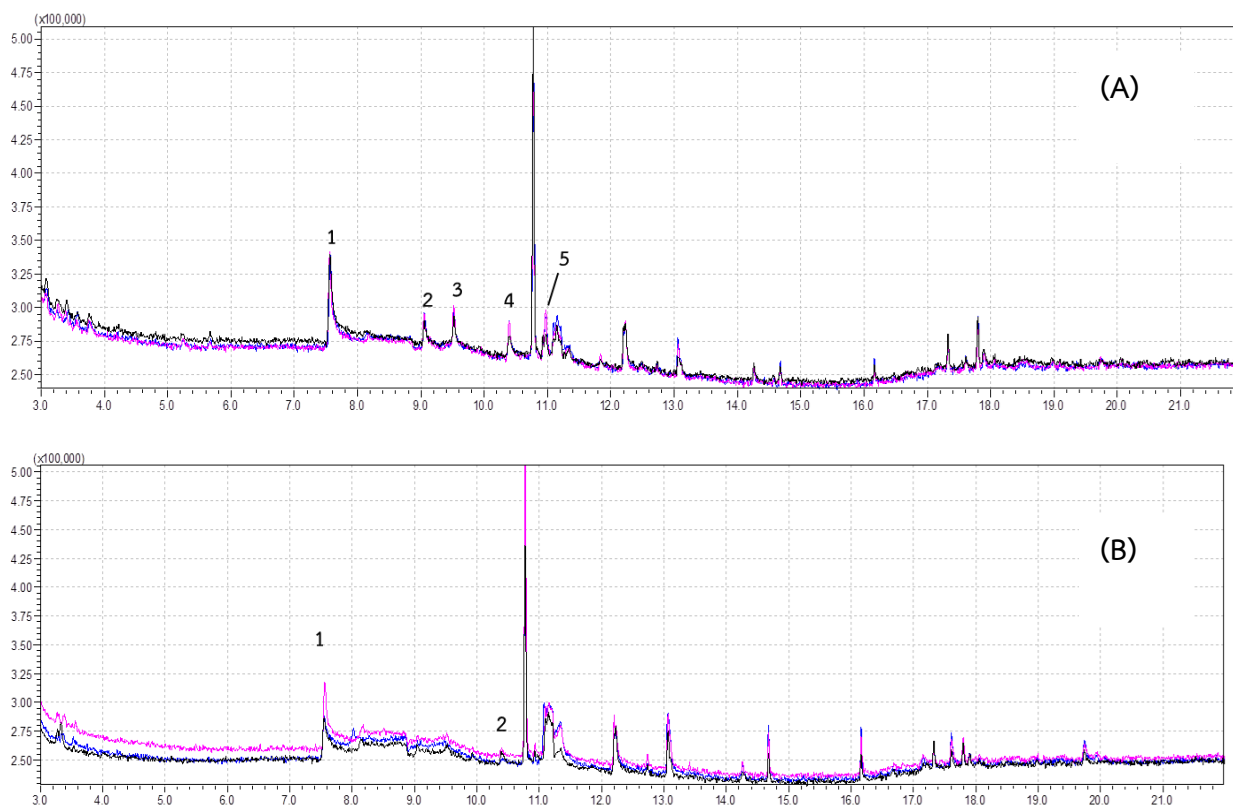
รูปภาพภาคผนวก ฅ แสดงโครมาโทแกรมของแก๊สที่เป็นองค์ประกอบในของเหลวที่อยู่ในบริเวณกองยางก้อนถ้วยอายุการเก็บรักษาที่โรงงาน (A) 1 วัน, (B) 15 วัน, และ (C) 30 วัน โดยหมายเลข 1 คือ Acetic acid, หมายเลข 2 คือ Propanoic acid, หมายเลข 3 คือ 2-methyl-Propanoic acid, หมายเลข 4 คือ Butanoic acid, หมายเลข 5 คือ 3-methyl- Butanoic acid, หมายเลข 6 คือ Pentanoic acid และหมายเลข 7 คือ Hexanoic acid (Internal standard)

ภาคผนวก ญ



รูปภาพภาคผนวก ญ แสดงโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์แก๊สที่ดูดซับบนตัวดูดซับบริเวณจุดล้างและ
 อบยาง หมายเลข 1 คือ acetic acid

ภาคผนวก ก



รูปภาพภาคผนวก ก แสดงโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์แก๊สที่ดูดซับบนตัวดูดซับบริเวณชนิดคาร์บอนชาร์โคลบริเวณปล่องทางเข้าดีไอโรเซอร์ (A) โดยหมายเลข 1 คือ Acetic acid หมายเลข 2 คือ Propanoic acid หมายเลข 3 คือ 2-methyl-Propanoic acid หมายเลข 4 คือ Butanoic acid และหมายเลข 5 คือ 2-methyl-Butanoic acid และโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์แก๊สที่ดูดซับบนตัวดูดซับบริเวณชนิดคาร์บอนบริเวณปล่องทางออกดีไอโรเซอร์ (B) โดยหมายเลข 1 คือ Acetic acid หมายเลข 2 คือ Butanoic acid