



โครงการ  
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การคัดแยกและระบุลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต  
พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตจากดิน

ชื่อนิสิต นางสาวปวันรัตน์ ชัยศรี เลขประจำตัว 5832335723

ภาควิชา จุลชีววิทยา  
ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด  
The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the senior project authors' files submitted through the faculty.



# โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

การคัดแยกและระบุลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต

พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตจากดิน

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร

นิสิตหัวหน้าโครงการ

นางสาว ปวีณรัตน์ ชัยศรี

รหัสประจำตัว 583 23357 23

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	การคัดแยกและระบุลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตจากดิน
นิสิตเสนอโครงการ	นางสาววันรัตน์ ชัยศรี รหัสประจำตัวนิสิต 5832335723
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	รองศาสตราจารย์ ดร. สุชาติา จันทร์ประทีป นภาธร
ภาควิชา	จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2561

---

#### บทคัดย่อ

ปัจจุบันได้เกิดปัญหามลภาวะขยะพลาสติกเพิ่มมากขึ้น ทำให้เริ่มมีการสนใจพลาสติกชีวภาพทดแทนพลาสติกจากพลังงานปิโตรเลียม เนื่องจากพลาสติกชีวภาพสามารถย่อยสลายได้เร็วเมื่อเทียบกับพลาสติกจากพลังงานปิโตรเลียม Polyhydroxyalkanoate (PHAs) เป็นพลาสติกชีวภาพทางเลือกหนึ่งที่กำลังมีการสนใจมากขึ้น ซึ่ง PHAs เป็นพอลิเอสเทอร์ที่มีคุณสมบัติคล้ายพลาสติกจากแหล่งปิโตรเลียมและเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพจากจุลินทรีย์ที่ผลิตได้โดยจุลินทรีย์หลายชนิดและเมื่อเกิดการย่อยสลายในธรรมชาติได้ผลิตภัณท์สุดท้ายเป็นน้ำและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะไร้อากาศ ซึ่งสามารถช่วยลดปริมาณขยะตกค้างหลังจากนำไปฝังกลบได้ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อคัดแยกหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PHAs จากดินที่ได้ทำการฝังแผ่น PHB ลงไป แล้วพบว่าน้ำหนักของแผ่นพลาสติกมีน้ำหนักที่ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งสามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 8 ไอโซเลต โดยใช้อาหารคัดเลือกว่าทำการผสม Nile Blue A ลงไป เพื่อเป็นการตรวจหาแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ผลการวิเคราะห์ยีนบริเวณ 16S rRNA ของทั้ง 8 ไอโซเลต แสดงให้เห็นว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Chryseobacterium daecheongense* DSM 15235 98.84 เปอร์เซ็นต์ *Pseudomonas tianjinensis* 68 98.70 เปอร์เซ็นต์ *Lysinibacillus boronitolerans* T-10a 98.93 เปอร์เซ็นต์ *Enterobacter hormaechei* subsp. *Xiangfangensis* 10-7 99.86 เปอร์เซ็นต์ *Sphingopyxis indica* DS15 99.47 เปอร์เซ็นต์ *Gordonia bronchialis* DSM 43247 98.57 เปอร์เซ็นต์ *Mesorhizobium soli* NHI-8 96.53 เปอร์เซ็นต์ และ *Pseudomonas citronellolis* NBRC 103043 99.64 เปอร์เซ็นต์

Project title	Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoate producing bacteria from soil
Name of student	Miss Pawanrat Chaisri ID 5832335723
Advisor	Assoc Prof Dr. Suchada Chanprateep Napathorn
Department	Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

---

### Abstract

The current problem of plastic waste pollution has been increasing. There is interest in using biodegradable plastic instead of plastic synthetic because biodegradable plastics can be decomposed faster than plastic synthetic.

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are one of the most recognised bioplastics. PHAs are polyester having similar properties with petrochemical plastics. Moreover, PHAs are microbial biopolymers produced by various types of microorganisms. Biodegradation of PHAs, compounds commonly occurring in the natural environment, such as CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> and biomass are produced. Which can reduce the amount of residual waste to landfill.

Sinsukudomchai P. has studied by burying PHA film in soil and found that weight of PHA film decreased in 1 month. Thus, we expected in this soil has PHA - degrading microorganisms and may have PHA – producing microorganisms. The goal of this study was to isolate the PHA – producing bacteria from soil, as well as to identify microbial producer of PHA polymer. Isolated all 8 isolates by selective medium that mix Nile Blue A for checking bacteria that can produce PHAs. Base on 16S rRNA gene analysis of these 8 isolates were identified as species belonging to *Chryseobacterium daecheongense* DSM 15235 (98.84%), *Pseudomonas tianjinensis* 68 (98.70%), *Lysinibacillus boronitolerans* T-10a (98.93), *Enterobacter hormaechei* subsp. Xiangfangensis 10-7 (99.86%), *Sphingopyxis indica* DS15 (99.47%), *Gordonia bronchialis* DSM 43247 (98.57%), *Mesorhizobium soli* NHI-8 (96.53%) and *Pseudomonas citronellolis* NBRC 103043 (99.64%).

### กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้สำเร็จด้วยดี ต้องขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา งานวิจัย รองผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาติา จันทร์ประทีป นภทร ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ ชี้แนวทาง ให้ คำปรึกษาในการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และให้กำลังใจในการวิจัยแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความความรู้ และอบรมสั่งสอน ขอขอบคุณพี่ๆเจ้าหน้าที่ ภาควิชาจุลชีววิทยาที่ช่วยเหลือข้าพเจ้าด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณพี่ๆห้อง 1904/16 พี่โตม พี่อม พี่เนซ พี่บุลู พี่ฝ้าย และ พี่ป๊อป ที่คอยให้คำปรึกษา ให้ กำลังใจและสอนภาคปฏิบัติในการทำงานวิจัยแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด รวมทั้งเพื่อนๆภาควิชาจุลชีววิทยาที่ให้ กำลังใจและคอยช่วยเหลือ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัวที่ให้การสนับสนุนในทุกๆด้าน เป็นแรงผลักดันและกำลังใจสำคัญ ของข้าพเจ้า

ปวันรัตน์ ชัยศรี

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1. บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	9
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
บทที่ 2. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย	11
อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	11
เคมีภัณฑ์	12
2.1 คัดแยกแบคทีเรียจากดินตัวอย่าง	13
2.1.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์	13
2.2 คัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PHA	13
2.2.1 การย้อมแกรม Gram's stain ตามวิธีของ Gram (1884)	13
2.2.2 การย้อมแกรนูล PHA ด้วย Sudan Black B	14
ตามวิธีของ Jenkins และคณะ (1993)	
2.3 คัดแยกลักษณะความต้องการออกซิเจน	14

	หน้า
2.4 จำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PHAs สายพันธุ์บริสุทธิ์	14
2.4.1 การสกัด DNA จากแบคทีเรียด้วยวิธี PCR colony	14
2.4.2 เพิ่มจำนวน DNA บริเวณ 16S rRNA	14
2.4.3. การทำกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)	15
2.4.4 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA	15
บทที่ 3. ผลการทดลอง	17
3.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากดินตัวอย่าง	17
3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PHA	17
3.3 คัดแยกลักษณะความต้องการออกซิเจน	21
3.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal RNA (16S rRNA)	23
บทที่ 4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	25
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยง	30
ภาคผนวก ข สารเคมีและวิธีการเตรียมที่ใช้ในการทดลอง	31



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย	15
ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของสารในปฏิกิริยาลูโกโซฟอติเมอเรส	15
ตารางที่ 3.1 ลักษณะของโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ของแบคทีเรีย SG1 SG2 SG3 SG4 SG5 SG6 SG7 และ SG8	21
ตารางที่ 3.2 ลักษณะความต้องการออกซิเจน ของ SG1 SG2 SG3 SG4 SG5 SG6 SG7 และ SG8	23

## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 แสดงการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพภายในเวลา 50 วัน	2
รูปที่ 1.2 ประเภทของพลาสติก จำแนกตามวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตและ ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพ	2
รูปที่ 1.3 ภาพถ่ายแกรนูลที่มีการสะสม PHA ของ <i>Cupriavidus necator</i> DSM 545 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 30,000 เท่า (Martin Koller, 2017)	5
รูปที่ 1.4 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Tan G. และคณะ, 2014)	6
รูปที่ 1.5 แสดงวิธีการสังเคราะห์ P(3HB)/MCL-PHA ภายในเซลล์ ( <i>PhaA</i> , $\beta$ -ketothiolase; <i>PhaB</i> , NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase; <i>PhaC</i> , PHA synthase; <i>PhaZ</i> , PHA depolymerase)	7
รูปที่ 1.6 แกรนูลของแบคทีเรียที่ย้อมด้วย (A) Sudan Black B (B) Nile Blue A (Taku N. และคณะ, 2012) และ (C) ลักษณะการเรืองแสงของโคโลนี บนอาหารที่ผสม Nile Blue A เมื่อส่องภายใต้ลำแสง UV (Al-Keddo K. และคณะ, 2016)	8
รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะโคโลนีของแต่ละไอโซเลตที่คัดแยกจากดิน	17
รูปที่ 3.2 แสดงลักษณะการเรืองแสงของโคโลนีที่ผ่านการส่องภายใต้แสง UV ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร (a) : SG6, SG2 (b.) : SG1, SG8 (c.) : SG3, SG4, SG5, SG7 และ (d.) : <i>Cupriavidus necator</i> strain A-04 เป็น positive control	18
รูปที่ 3.3 แสดงผลการย้อม Gram's stain (a.) และ Sudan Black B (b.) ของทั้ง 8 ไอโซเลต ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า	19
รูปที่ 3.4 แสดงผลการคัดแยกลักษณะความต้องการออกซิเจนของทั้ง 8 ไอโซเลต	22
รูปที่ 3.5 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของปฏิกิริยาลูโกโซฟอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R ของทั้ง 8 ไอโซเลต	24

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

มีการผลิตพลาสติกในปี 2015 ถึง 322 ล้านตัน และมีแนวโน้มในการผลิตมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในปี 2016 มีการรายงานการผลิตพลาสติกมากขึ้นถึง 335 ล้านตัน (PlasticsEurope, 2017) และพลาสติกจำนวนมากเหล่านี้ถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลายทั้งในชีวิตประจำวันและในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมยานยนต์ อุตสาหกรรมการเกษตร (Uchida et al., 2000) แต่อย่างไรก็ตามวัสดุพลาสติกมีข้อเสียบางประการที่สำคัญคือ เป็นวัสดุที่ย่อยสลายได้ยากในสิ่งแวดล้อมธรรมชาติ เนื่องจากมีความทนทานและต้านทานการเสื่อมสภาพ ด้วยเหตุนี้ส่งผลให้อุตสาหกรรมส่วนใหญ่สนใจที่จะใช้พลาสติกชีวภาพทดแทนพลาสติกจากแหล่งพลังงานปิโตรเลียม

พลาสติกชีวภาพ กำลังก้าวเข้ามามีบทบาทมากขึ้นในตลาดพลาสติกโลก เนื่องจากคุณสมบัติในการผลิตที่ใช้วัตถุดิบธรรมชาติซึ่งมีส่วนช่วยลดการพึ่งพาน้ำมันหรือคุณสมบัติด้านการย่อยสลายได้ตามธรรมชาติที่ช่วยบรรเทาปัญหาการกำจัดขยะและสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม คุณสมบัติดังกล่าวล้วนแล้วแต่เป็นปัจจัยสำคัญที่ผลักดันให้ทั่วโลกหันมาสนใจใช้พลาสติกชีวภาพมากขึ้น ดังกรณีของประเทศในกลุ่มยุโรปที่เผชิญกับปัญหาการกำจัดขยะพลาสติกที่นับวันจะทวีความรุนแรง จนกระทั่งทั้งภาครัฐ ภาคธุรกิจ และภาคครัวเรือนตระหนักถึงปัญหาดังกล่าวและหันมาให้ความร่วมมือในการใช้ผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพมากขึ้น เช่น ประเทศในสหภาพยุโรปที่มีการกำหนดให้ผู้ผลิตรถยนต์เพิ่มสัดส่วนชิ้นส่วนพลาสติกที่ย่อยสลายได้ในการประกอบรถยนต์ให้มากขึ้น หรือประเทศอิตาลีที่รัฐบาลได้ออกมาตรการสนับสนุนให้ใช้ถุงพลาสติกที่ย่อยสลายได้สำหรับการใช้งานครั้งเดียว (single use) รวมถึงประเทศในแถบเอเชียเช่น ญี่ปุ่น ที่บริษัทยักษ์ใหญ่ด้านเครื่องใช้ไฟฟ้าและอิเล็กทรอนิกส์อย่าง โซนี่ พานาโซนิค และโตชิบา ต่างเปลี่ยนมาใช้บรรจุภัณฑ์ที่เป็นพลาสติกชีวภาพ และยังใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตวัสดุอุปกรณ์คอมพิวเตอร์ต่างๆ มากขึ้นด้วย ขณะเดียวกัน การศึกษาวิจัยของบริษัท Samsung Fine Chemicals ก็พบว่าประชาชนส่วนใหญ่มีแนวโน้มจะปรับเปลี่ยนพฤติกรรมมาใช้ผลิตภัณฑ์พลาสติกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้นหากสินค้ามีคุณภาพใกล้เคียงกันแม้จะต้องเสียค่าใช้จ่ายมากขึ้นก็ตาม (ที่มา: <https://www.scbeic.com/th/detail/product/332>, accessed on April 14, 2019)

การย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพ จะสามารถย่อยสลายได้รวดเร็วกว่าพลาสติกสังเคราะห์จากแหล่งพลังงานปิโตรเลียม เมื่อเทียบในสภาวะที่เหมือนกัน เนื่องจากพลาสติกชีวภาพผลิตมาจากแหล่งวัตถุดิบจากธรรมชาติและยังย่อยสลายได้ในสภาวะที่สมบูรณ์ไม่เหลือสารตกค้างในสิ่งแวดล้อม



รูปที่ 1.1 แสดงการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพภายในเวลา 50 วัน

(ที่มา : [https://en.wikipedia.org/wiki/Biodegradable\\_plastic/bio\\_de\\_pass.html](https://en.wikipedia.org/wiki/Biodegradable_plastic/bio_de_pass.html), accessed on April 14, 2019)

ประเภทของพลาสติกสามารถจำแนกได้ตามวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตและความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพได้ดังแสดงในรูปที่ 1.2

	ไม่สลายตัวทางชีวภาพ (Nonbiodegradable)	สลายตัวทางชีวภาพ (Biodegradable)
ผลิตจากวัตถุดิบทางธรรมชาติ (Biobased)	<p><b>A</b></p> <p>พลาสติกชีวภาพ (Bioplastics) เช่น Bio-PE (PP, PVC), biobased PET</p>	<p><b>B</b> ★</p> <p>พลาสติกชีวภาพ (Bioplastics) เช่น PLA (แอ็บซอง), PHA</p>
ผลิตจากแหล่งปิโตรเลียม (Petroleumbased)	<p><b>D</b></p> <p>พลาสติกทั่วไป (Conventional plastics) เช่น PE, PP, PET</p>	<p><b>C</b></p> <p>พลาสติกชีวภาพ (Bioplastics) เช่น PBAT, PBS (ยัดหยุ่น), PCL</p>

รูปที่ 1.2 ประเภทของพลาสติก จำแนกตามวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตและความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (ที่มา: <https://www.scbeic.com/th/detail/product/332>, accessed on April 14, 2019)

กลไกการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพแบ่งได้เป็น 4 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

1. การย่อยสลายได้โดยแสง (Photodegradation) การย่อยสลายโดยแสงมักเกิดจากการเติมสารเติมแต่งที่มีความไวต่อแสงลงในพลาสติกหรือสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ให้มีหมู่ฟังก์ชันหรือพันธะเคมีที่ไม่แข็งแรง แตกหักง่ายภายใต้รังสี (UV) เช่น หมู่คีโตน (Ketone group) อยู่ในโครงสร้าง เมื่อสารหรือหมู่ฟังก์ชันดังกล่าวสัมผัสกับรังสียูวีจะเกิดการแตกของพันธะกลายเป็นอนุมูลอิสระ (Free radical) ซึ่งไม่เสถียร จึงเข้าทำปฏิกิริยาต่ออย่างรวดเร็วที่พันธะเคมีบนตำแหน่งคาร์บอนในสายโซ่พอลิเมอร์ ทำให้เกิดการขาดของสายโซ่ แต่การย่อยสลายนี้จะไม่เกิดขึ้นภายในบ่อฝังกลบขยะ กองคอมโพสท์ หรือสภาวะแวดล้อมอื่นที่มีมืด หรือแม้กระทั่งชั้นพลาสติกที่มีการด้วยหมึกที่หนาмаกบนพื้นผิว เนื่องจากพลาสติกจะไม่ได้สัมผัสกับรังสียูวีโดยตรง

2. การย่อยสลายทางกล (Mechanical Degradation) โดยการให้แรงกระทำแก่ชิ้นพลาสติก ทำให้ชิ้นส่วนพลาสติกแตกออกเป็นชิ้น ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้โดยทั่วไปในการทำให้พลาสติกแตกเป็นชิ้นเล็กๆ

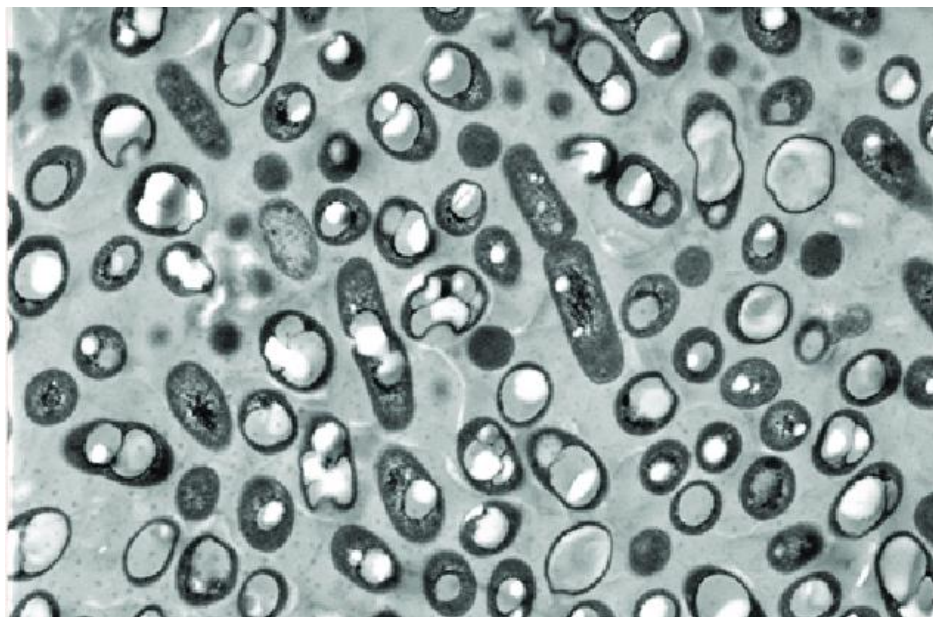
3. การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative Degradation) การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันของพลาสติก เป็นปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนลงในโมเลกุลของพอลิเมอร์ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติอย่างช้าๆ โดยมีออกซิเจน และความชื้น แสงยูวี หรือแรงทางกลเป็นปัจจัยสำคัญ เกิดเป็นสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide, ROOH) ในพลาสติกที่ไม่มีการเติม สารเติมแต่งที่ทำหน้าที่เพิ่มความเสถียร (stabilizing additive) แสงและความชื้นจะทำให้ ROOH แตกตัวกลายเป็นอนุมูลอิสระ RO และ OH) ที่ไม่เสถียรและเข้าทำปฏิกิริยาต่อที่พันธะเคมีบนตำแหน่งคาร์บอนในสายโซ่พอลิเมอร์ ทำให้เกิดการแตกหักและสูญเสียสมบัติเชิงกลอย่างรวดเร็ว แต่ด้วยเทคโนโลยีการผลิตที่ได้รับการวิจัยและพัฒนาขึ้นในปัจจุบันทำให้พอลิโอเลฟินเกิดการย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนได้เร็วขึ้นภายในเวลาที่กำหนด โดยการเติมสารเติมแต่งที่เป็นเกลือของโลหะทรานซิลิคอน ซึ่งทำหน้าที่คะตะลิสต์เร่งการแตกตัวของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (Hydroperoxide, ROOH) เป็นอนุมูลอิสระ (Free radical) ทำให้สายโซ่พอลิเมอร์เกิดการแตกหักและสูญเสียสมบัติเชิงกลรวดเร็วยิ่งขึ้น

4. การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolytic Degradation) การย่อยสลายของพอลิเมอร์ที่มีหมู่เอสเทอร์ หรือเอไมด์ เช่น แป้ง พอลิเอสเทอร์ พอลิแอนไฮดราต พอลิคาร์บอเนต และพอลิยูรีเทน ผ่านปฏิกิริยาก่อให้เกิดการแตกหักของสายโซ่พอลิเมอร์ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เกิดขึ้น โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ประเภทที่ใช้คะตะลิสต์ (Catalytic hydrolysis) และไม่ใช่คะตะลิสต์ (Non-Catalytic Hydrolysis) ซึ่งประเภทแรกยังแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ แบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายนอกโมเลกุลของพอลิเมอร์เร่งให้เกิดการย่อยสลาย (External Catalytic Degradation) และแบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์เองในการเร่งให้เกิดการย่อยสลาย (Internal catalytic degradation) โดยคะตะลิสต์จากภายนอกมี 2 ชนิด คือ คะตะลิสต์ที่เป็นเอนไซม์ต่างๆ (Enzyme) เช่น Depolymerase lipase esterase และ glycohydrolase ในกรณีนี้จัดเป็นการย่อยสลายทางชีวภาพ และคะตะลิสต์ที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Non-

enzyme) เช่น โลหะแอลคาไลด์ (alkaline metal) เบส (base) และกรด(acid) ที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมในธรรมชาติ ในกรณีนี้จัดเป็นการย่อยสลายทางเคมี สำหรับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์นั้นใช้หมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl Group) ของหมู่เอสเทอร์ หรือเอไมด์บริเวณปลายของสายโซ่พอลิเมอร์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

5. การย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation) การย่อยสลายของพอลิเมอร์จากการทำงานของจุลินทรีย์โดยทั่วไปมีกระบวนการ 2 ขั้นตอน เนื่องจากขนาดของสายพอลิเมอร์ยังมีขนาดใหญ่และไม่ละลายน้ำ ในขั้นตอนแรกของการย่อยสลายจึงเกิดขึ้นภายนอกเซลล์โดยการปลดปล่อยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ซึ่งเกิดได้ทั้งทั้งแบบใช้ endo-enzyme หรือ เอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกตัวของพันธะภายในสายโซ่พอลิเมอร์อย่างไม่เป็นระเบียบ และแบบ exo-enzyme หรือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกหักของพันธะที่ละหน่วยจากหน่วยซ้ำที่เล็กที่สุดที่อยู่ด้านปลายของสายโซ่พอลิเมอร์ เมื่อพอลิเมอร์แตกตัวจนมีขนาดเล็กพอจะแพร่ผ่านผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์ และเกิดการย่อยสลายต่อในขั้นตอนที่ 2 ได้ผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนนี้สุดท้าย (ultimate biodegradation) คือ พลังงาน และสารประกอบขนาดเล็กที่เสถียรในธรรมชาติ (Mineralization) เช่น แก๊ส คาร์บอนไดออกไซด์ แก๊สมีเทน น้ำ เกลือ แร่ธาตุต่างๆ และมวลชีวภาพ (biomass) (ที่มา : [http://www2.mtec.or.th/th/special/biodegradable\\_plastic/type\\_de\\_plas.html](http://www2.mtec.or.th/th/special/biodegradable_plastic/type_de_plas.html), accessed on April 14, 2019)

พลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates, PHAs) จัดเป็นพลาสติกทางชีวภาพที่ผลิตจากวัตถุดิบทางธรรมชาติและมีการบวนการผลิตและย่อยสลายที่ไม่ก่อสารอันตรายผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป แต่สารอาหารชนิดอื่น เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือซัลเฟอร์ มีปริมาณจำกัด โดยสะสมพอลิเมอร์ไว้ภายในเซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน (Chanprateep, 2010) ในรูปของแกรนูล โดยจำนวนและขนาดของแกรนูลในหนึ่งเซลล์จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ จากการรายงานของ Byrom (1994) พบว่า *Cupriavidus necator* ในหนึ่งเซลล์จะมีจำนวนแกรนูล 8 - 13 แกรนูล มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.2 - 0.5 ไมโครเมตร ซึ่งจะดูได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ดังแสดงในรูปที่ 1.3 PHA สามารถถูกย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ดังนั้นจึงถูกพิจารณาว่ามีศักยภาพเหมาะสมสำหรับใช้เป็นพลาสติกทางเลือกเพื่อทดแทนการใช้พลาสติกจากปิโตรเลียม เนื่องจาก PHAs นั้นมีคุณสมบัติย่อยสลายได้ในธรรมชาติโดยใช้เอนไซม์ของจุลินทรีย์ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะไร้อากาศและได้แก๊สมีเทนเพิ่มขึ้นในสภาวะไร้อากาศ (Muhammadi และคณะ, 2015) ซึ่งสามารถช่วยลดปริมาณขยะตกค้างหลังจากนำไปฝังกลบได้



รูปที่ 1.3 ภาพถ่ายแกรนูลที่มีการสะสม PHA ของ *Cupriavidus necator* DSM 545 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 30,000 เท่า (Martin Koller, 2017)

โครงสร้างของ PHAs จัดเป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง ประกอบด้วยคาร์บอน ออกซิเจน และไฮโดรเจน สูตรโครงสร้างทั่วไปแสดงดังรูปที่ 1.4 มอนอเมอร์ของสายพอลิเมอร์ต่อกันแบบหัวต่อหางโดยมอนอเมอร์ในกลุ่มไฮดรอกซีเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของมอนอเมอร์ตัวที่หนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซีของมอนอเมอร์ตัวถัดไป (Madison และ Huisman, 1999)

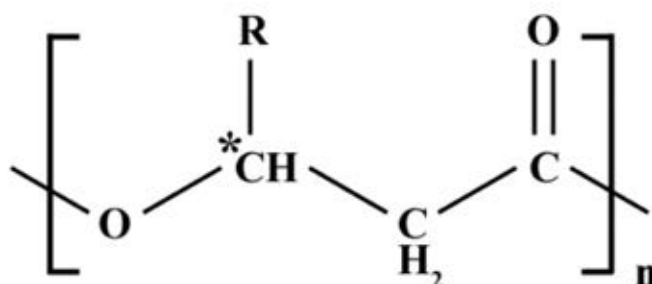
การจัดจำแนกชนิด PHA ตามองค์ประกอบทางเคมีของมอนอเมอร์ (Luengo และคณะ, 2003)

1. พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีอนุพันธ์ของกรดไขมันแบบอะโรมาติก
2. พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีอนุพันธ์ของกรดไขมันทั้งแบบอะลิฟาติกและแบบอะโรมาติก
3. พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีสารประกอบอื่น เช่น พอลิ-แกมมา-กลูตามิก-แอซิด (poly- $\gamma$ -glutamic-acid)

การจัดจำแนกชนิด PHA ตามจำนวนคาร์บอนอะตอมในหน่วยมอนอเมอร์ (Lee และคณะ, 1996)

1. Short-chain-length (SCL) PHA คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยมอนอเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 3-5 อะตอม
2. Medium-chain-length (MCL) PHA คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยมอนอเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 6-14 อะตอม

3. Long-chain-length (LCL) PHA คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยมอนอเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมมากกว่า 14 อะตอม



**Poly(3-hydroxyalkanoate)**

<i>R</i> group	Carbon no.	PHA polymer
methyl	C <sub>4</sub>	Poly(3-hydroxybutyrate)
ethyl	C <sub>5</sub>	Poly(3-hydroxyvalerate)
propyl	C <sub>6</sub>	Poly(3-hydroxyhexanoate)
butyl	C <sub>7</sub>	Poly(3-hydroxyheptanoate)
pentyl	C <sub>8</sub>	Poly(3-hydroxyoctanoate)
hexyl	C <sub>9</sub>	Poly(3-hydroxynonanoate)
heptyl	C <sub>10</sub>	Poly(3-hydroxydecanoate)
octyl	C <sub>11</sub>	Poly(3-hydroxyundecanoate)
nonyl	C <sub>12</sub>	Poly(3-hydroxydodecanoate)
decyl	C <sub>13</sub>	Poly(3-hydroxytridecanoate)
undecyl	C <sub>14</sub>	Poly(3-hydroxytetradecanoate)
dodecyl	C <sub>15</sub>	Poly(3-hydroxypentadecanoate)
tridecyl	C <sub>16</sub>	Poly(3-hydroxyhexadecanoate)

**รูปที่ 1.4** สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Tan G. และคณะ, 2014)

การผลิต PHA เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ

#### 1. การประยุกต์ใช้ทางการเกษตรและปศุสัตว์

ผลิตเป็นแคปซูลสำหรับบรรจุยาฆ่าวัชพืช ยาฆ่าแมลงหรือผลิตเป็นแคปซูลสำหรับบรรจุยารักษาโรคของสัตว์และบรรจุยาประเภทที่มีกลไกการออกฤทธิ์นาน (Raddy และคณะ, 2003)

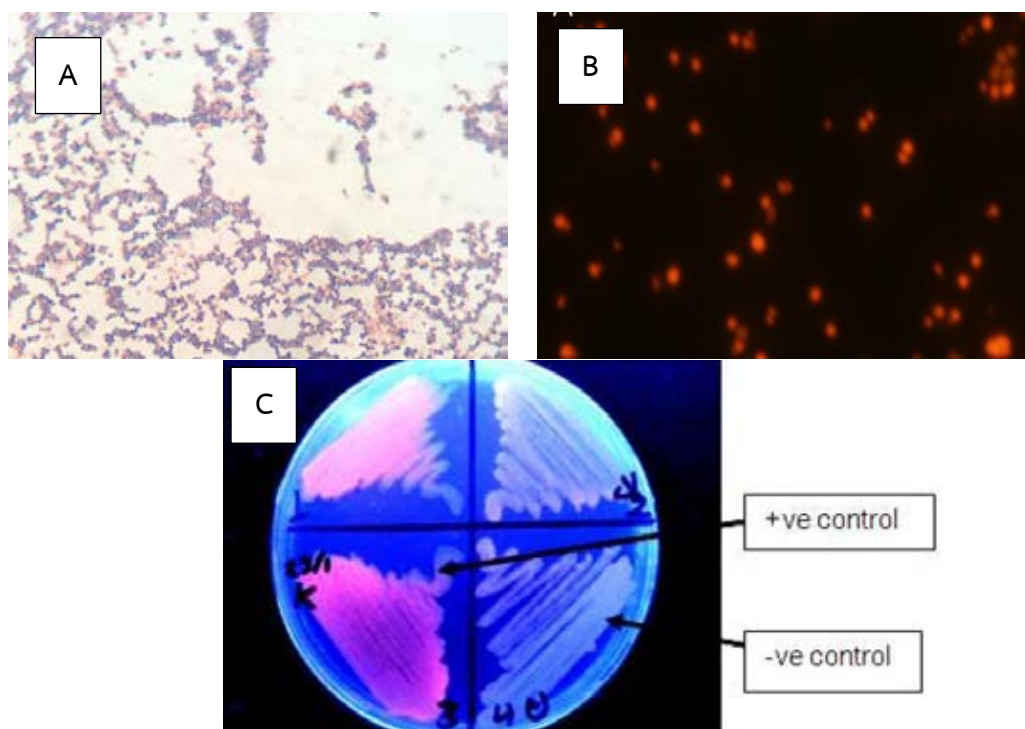




เอนไซม์ PHA depolymerase สามารถจัดเป็น intracellular และ extracellular โดยขึ้นอยู่กับชนิดของปฏิกิริยาต่อ PHAs ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานให้กับจุลินทรีย์ในการเจริญเติบโต ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะสามารถสร้าง PHAs ด้วยเอนไซม์ PHA synthase ที่ถูกถอดรหัสจากยีน *phaC* เพื่อเก็บเป็นแหล่งพลังงาน จากนั้นจึงมีการสังเคราะห์ PHA depolymerase ที่ถอดรหัสจากยีน *phaZ* เพื่อย่อย PHAs ที่สะสมภายในแกรนูลที่อยู่ในเซลล์และนำไปใช้เป็นพลังงานต่อไป

โดย PHA depolymerase จะไปไฮโดรไลซ์ ในส่วนของ amorphouse จากนั้นจึงเข้าจับกับส่วน crystalline (Organ และ Barham, 1988) เอนไซม์จะไปทำลายพันธะเอสเทอร์ของพอลิเมอร์ทำให้คุณสมบัติของพอลิเมอร์เปลี่ยนไป ซึ่งคุณสมบัติที่เปลี่ยนไปนี้ส่งผลถึงความสามารถในการย่อยสลายของ PHA

การตรวจสอบจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHA สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคการย้อมสีของสารไขมันที่อยู่ภายในเซลล์เนื่องจากแกรนูลที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ได้สารประเภทไขมันชนิดหนึ่ง เช่น การย้อมด้วย Sudan Black B และ Nile Blue A การย้อมด้วย Sudan Black B เป็นการทดสอบเบื้องต้นซึ่งสามารถส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทั่วไปได้โดยจะเห็นแกรนูลเป็นจุดสีดำภายในเซลล์ ส่วนการย้อม Nile Blue A จะเห็นเป็นแกรนูลเป็นจุดสีแดงหรือสีส้มภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ (Song และคณะ, 2008) และสามารถใช้ผสมกับอาหารที่จะนำมาคัดเลือกหาแบคทีเรียที่ผลิต PHA ได้โดยตรง ในปริมาณที่เหมาะสม คือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และตรวจสอบโดยเห็นการเรืองแสงสีส้มเมื่อทำการส่องภายใต้ลำแสง UV ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร (Spiekermann, 1999)



รูปที่ 1.6 แกรนูลของแบคทีเรียที่ย้อมด้วย (A) Sudan Black B (B) Nile Blue A (Taku N. และคณะ, 2012) และ (C) ลักษณะการเรืองแสงของโคโลนีบนอาหารที่ผสม Nile Blue A เมื่อส่องภายใต้ลำแสง UV (Al-Keddo K. และคณะ, 2016)

ได้มีการรายงานว่า อัมมทิกา เมืองวงษ์และคณะ (2016) สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต polyhydroxyalkanoate จากกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล และพบว่าไอโซเลตที่คัดแยกมาได้อยู่ในสกุล *Acinetobacter* sp. *Pseudomonas* sp. และ *Enterobacter* sp. และเมื่อทำการศึกษาในระดับขวดเขย่า พบว่าสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต เช่นเดียวกับ Bhuwal A. และคณะ (2013) ที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB ในสกุล *Enterococcus* sp. และ *Brevundimonas* sp. จากน้ำเสียที่ได้จากโรงงานผลิตกระดาษ และในปี 2014 Ciesielski S. และคณะ สามารถคัดแยก *Pseudomonas* sp. และ *Janthinobacterium* sp. ที่ได้จากน้ำจืด Glacier เมือง King George ประเทศไอซ์แลนด์ ในทวีปแอนตาร์กติค จากรายงานทั้งหมดดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตสามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไปและมีความหลากหลายมากในระบบนิเวศ

ดินเป็นแหล่งธรรมชาติที่สำคัญเนื่องจากดินเป็นแหล่งที่อยู่ของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ รวมถึงมีความสำคัญต่อการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพและเป็นแหล่งจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PHA (Boyandin และคณะ, 2012) ซึ่งคาดว่าอาจมีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยต่อเนื่องจากการศึกษาการย่อยสลายของฟิล์มวัสดุเชิงประกอบทางชีวภาพระหว่างพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตจาก *Cuprividus necator* สายพันธุ์ A-04 และไมโครคริสตัลลีนเซลลูโลสจากใบสับปะรด (พิชญนันท์ ลินสุขอุดมชัย, 2018) ที่ได้นำแผ่น PHB ฝังลงในดินและเมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน น้ำหนักของแผ่น PHB มีน้ำหนักที่ลดลง จึงคาดว่าในดินจะมีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PHB ที่เป็นมอนอเมอร์ของ PHA เช่นเดียวกับคาดว่าจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต PHB

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและระบุลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตจากดิน

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

### ก. ในด้านความรู้และประสบการณ์

ทราบถึงขั้นตอนในการคัดแยกแบคทีเรียจากธรรมชาติเพื่อหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต เข้าใจกลไกในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต มีความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับพลาสติกชีวภาพฝักคืด และ วิเคราะห์ปัญหาโดยอาศัยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์เสริมประสบการณ์ในการทำงานในห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ และสามารถนำไปต่อยอดได้ในอนาคต

ข. ความรู้ ความเข้าใจที่นำไปสู่การแก้ไขปัญหาของสังคมหรือสภาพแวดล้อม

สามารถนำความรู้ที่ได้ใช้ในการคัดแยกมูลนทรีย์ในธรรมชาติที่มีความสามารถในการผลิตพลาสติกชีวภาพไปช่วยแก้ปัญหาขยะพลาสติกที่เป็นปัญหาอยู่ในปัจจุบัน เนื่องจากพลาสติกชีวภาพเมื่อมีการย่อยสลายจะไม่เหลือสารตกค้างซึ่งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

## บทที่ 2

### อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

#### อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระจกบอทวง (cylinder) ของบริษัท Pyrex, USA
2. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CH30RF200 ของบริษัท Olympus, Japan
3. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ของบริษัท Pyrex, USA
4. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Science Industries, USA
5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-215 ของบริษัท Tomy Seiko Ltd., Tokyo, Japan
6. เครื่องส่องยูวีแบบถือ (hand held UV) รุ่น VL – 6.LC ของบริษัท VILBER LOURMAT
7. เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น PG 2002-S และรุ่น PG 6002-S ของบริษัท Metter Toledo Co. Ltd., Switzerland
8. เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น AG 204 และรุ่น PG 285 ของบริษัท Metter Toledo Co. Ltd., Switzerland
9. เครื่องให้ความร้อน (stirring hot plate) รุ่น DS 201HS ของบริษัท DMC, Japan
10. เครื่อง PCR (PCR machine) รุ่น T100 ของบริษัท Bio-Rad, Japan
11. เครื่องให้กำเนิดแสง (BluPAD Dual LED Blue/White Light Transilluminator) ของบริษัท bio-helix, Taiwan
12. จานเลี้ยงเพาะเชื้อ (petri dish) ของบริษัท Pyrex, USA
13. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)
  - Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Bio-Rad, USA
  - Electrophoresis complete system ของบริษัท Bio-Rad, USA
14. ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow ISSO รุ่น BV-124 ของบริษัท International Scientific Supply Co. Ltd., Thailand

15. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo electric, Japan
16. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ของบริษัท Forma Scientific, USA
17. ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น D06062 ของบริษัท Kubota, Japan
18. ตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท Mitsubishi Electric, Japan
19. ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Memmert Co. Ltd., Germany
20. ปีกเกอร์ (beaker) ของบริษัท Pyrex, USA
21. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P2, P20, P200 และ P1000 ของบริษัท Gilson, France
22. ปิเปตแก้ว (graduated pipette) ของบริษัท Pyrex, USA
23. หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
24. หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท Pyrex, USA
25. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Biorad, Thailand
26. หลอดทดลองฝาเกลียว (screw-cap tube) ของบริษัท Pyrex, USA
27. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WC14 และรุ่น W760 ของบริษัท Memmert Co., Ltd., Germany

#### เคมีภัณฑ์

1. กลูโคส (glucose;  $C_6H_{12}O_6$ ) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA
2. กลีเซอรอล ( $C_3H_8O_3$ ) ของบริษัท Merck, Germany
3. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
4. ทริปโทน (tryptone) ของบริษัท Merck, Germany
5. วุ้นผง (agar) ของบริษัท Productora de agar S.A., Chile
6. ผงสีไนล์บลูเอ (nile blue A dye) ของบริษัท The Matheson Company

7. สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) ของบริษัท Lavscan Asia Co., Ltd., Ireland
8. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Spinger, France
9. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท ABgene, UK
10. แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>) ของบริษัท Merck, Germany
11. Kod One™ taq polymerase ของบริษัท Toyobo

## 2.1 คัดแยกแบคทีเรียจากดินตัวอย่าง

นำแผ่น PHB ที่มีดินติดอยู่มาชะดินออกด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางที่ความเข้มข้น  $10^{-3} - 10^{-6}$  จากนั้นนำมากระจายบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (ภาคผนวก ก1) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน จากนั้น จึงมาคัดแยกโคโลนีเดี่ยวบนอาหารเดิมเพื่อให้ได้เป็นไอโซเลตเดี่ยวๆออกมา ดัดแปลงจาก Urbanek A และคณะ (2017)

### 2.1.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

เช็ยเชื้อไอโซเลตที่บริสุทธิ์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 1-2 วัน จากนั้นนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำโคโลนีเดี่ยวเชื้อลงอาหารใหม่ทุกๆ 1-2 สัปดาห์

## 2.2 คัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PHA

เช็ยเชื้อไอโซเลตที่บริสุทธิ์มากระจายลงบนอาหารตามสูตร Mizuno K. และคณะ (2010) (ภาคผนวก ก2) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำโคโลนีมาส่องภายใต้ลำแสง UV ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร คัดเลือกไอโซเลตที่มีการเรืองแสง จากนั้นนำไปย้อม Gram's stain และ Sudan Black B ตามวิธีข้อ 2.2.1 และ 2.2.2 ตรวจสอบลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

### 2.2.1 การย้อมแกรม Gram's stain ตามวิธีของ Gram (1884)

นำแบคทีเรียที่บริสุทธิ์แล้วมากระจายบนสไลด์ รอให้แห้งและทำการตรึงเชื้อด้วยการนำสไลด์ไปผ่านไฟ ย้อมด้วย crystal violet (ภาคผนวก ข1) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น และหยดสารละลายไอโอดีน (ภาคผนวก ข2) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างสีออกด้วย 95% ethanol และหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยด safranin O (ภาคผนวก ข3) เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ถ้าเซลล์ติดสีม่วงน้ำเงินแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกและถ้าติดสีแดงแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ

## 2.2.2 การย้อมแกรนูล PHA ด้วย Sudan Black B ตามวิธีของ Jenkins และคณะ (1993)

นำแบคทีเรียที่บริสุทธิ์แล้วมากระจายบนสไลด์ รอให้แห้ง และทำการตรึงเชื้อด้วยการนำสไลด์ไปผ่านไฟ ย้อมด้วย Sudan Black B (ภาคผนวก ข4) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น ย้อมด้วยสี Safranin O เป็นเวลา 5 - 10 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้ามี PHA ซึ่งสะสมอยู่ในรูปของแกรนูลจะติดสีเทาและอยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย

## 2.3 คัดแยกลักษณะความต้องการออกซิเจน

ใช้ปิเปตต์ดูดเชื้อ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงใน LB agar tall ที่หอมเหลวไว้ที่อุณหภูมิ 42 – 45 องศาเซลเซียส ค่อยๆ หมุนหลอดให้เชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อกระจายเข้ากัน โดยไม่เขย่าเพื่อไม่ให้ออกซิเจนจากอากาศละลายเข้าไป จากนั้น ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นำมาดูผลการเจริญและบริเวณที่เชื้อเจริญภายในหลอด (Benson, 2002)

## 2.4 จำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PHAs สายพันธุ์บริสุทธิ์

### 2.4.1 การสกัด DNA จากแบคทีเรียด้วยวิธี Colony PCR

นำโคโลนีที่บริสุทธิ์จำนวน 1 ลูบ ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ที่มี Tris-EDTA (TE) buffer 30 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 10 นาที

### 2.4.2 เพิ่มจำนวน DNA บริเวณ 16S rRNA

เพิ่มจำนวน DNA บริเวณ 16S rRNA ด้วยวิธี PCR ในหลอดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส โดย ใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R (ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 2.1) เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 1,500 bp องค์ประกอบของสารต่างๆ ในปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 2.2 ดำเนินปฏิกิริยาด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA ตามสภาวะดังนี้

1. denaturation	อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส	10 วินาที
2. annealing	อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส	30 วินาที
3. extension	อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส	12 วินาที
4. ทำขั้นตอนที่ 1-3 จำนวน 35 รอบ		
5. final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	3 นาที



## ตารางที่ 2.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR (bp)	อ้างอิง
ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA			
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	~1,500	Lane, 1991
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT		

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) ที่ความเข้มข้นเจล 0.6 เปอร์เซ็นต์ ตามที่ระบุใน 2.4.3 และผลิตภัณฑ์ PCR 3 ไมโครลิตร ที่ผสมสีติดตาม 1 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับสารละลาย DNA มาตรฐาน VC 1kb DNA Ladder

## ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของสารในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (ปริมาตรสุดท้าย 30 ไมโครลิตร)

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้ายของสาร
น้ำปลอดปราศจากเชื้อ	14.04	
KOD One™ PCR Master Mix	15	1 เท่า
10 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์	0.9 (ชนิดละ)	0.3 ไมโครโมลาร์ (ชนิดละ)
DNA แม่แบบ	0.06	

### 2.4.3. การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

เตรียมเจลโดยชั่งผงอะกาโรส 0.6 กรัม ใส่ลงในขวดสำหรับเตรียมเจล เดิมบัฟเฟอร์ 1X TAE ปริมาตร 100 มิลลิตร ละลายเจลด้วยไมโครเวฟจนกระทั่งผงเจลละลายหมด เทลงในภาตสำหรับขึ้นรูปเจล รอจนกระทั่งเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที จากนั้นวางอะกาโรสเจลลงในแชมเบอร์ของเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส เทบัฟเฟอร์ 1X loading buffer และใช้ VC 1kb DNA Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที และนำเจลไปส่องในเครื่องให้กำเนิดแสง

### 2.4.4 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA

นำผลิตภัณฑ์จากข้อ 2.4.2 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA โดยส่งบริษัท U2bio ประเทศเกาหลี เพื่อทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R (ดังที่แสดงในตารางที่ 2.1) เมื่อได้รับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแล้ว เชื่อมลำดับ

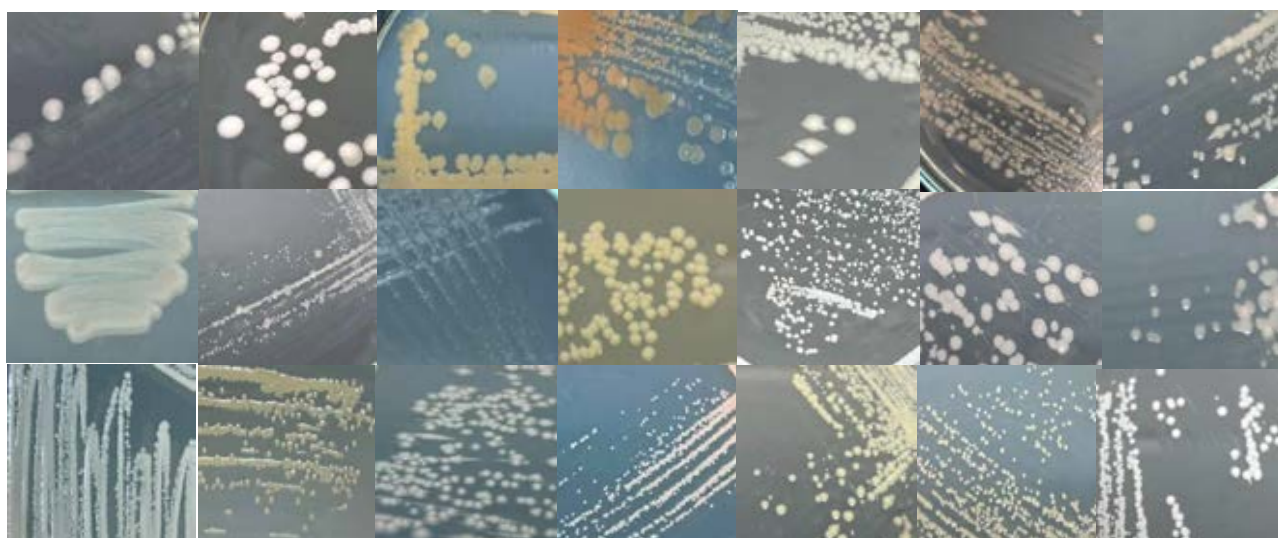
นิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNA Baser Version 3 (Heracle BioSoft S.R.L., Romania) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) และเปรียบเทียบใน Ezbiocloud ด้วยโปรแกรม 16S-based ID (<https://www.ezbiocloud.net/identify>) ดัดแปลงจาก Muangwong และคณะ (2016)

## บทที่ 3

### ผลการทดลอง

#### 3.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากดินตัวอย่าง

ผลจากการการคัดแยกแบคทีเรียจากดินตัวอย่างที่ทำการฝังแผ่น PHB ลงไป โดยคัดแยกบนอาหาร LB และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-4 วัน พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียเบื้องต้นได้ทั้งหมด 21 ไอโซเลต ดังแสดงในรูปที่ 3.1

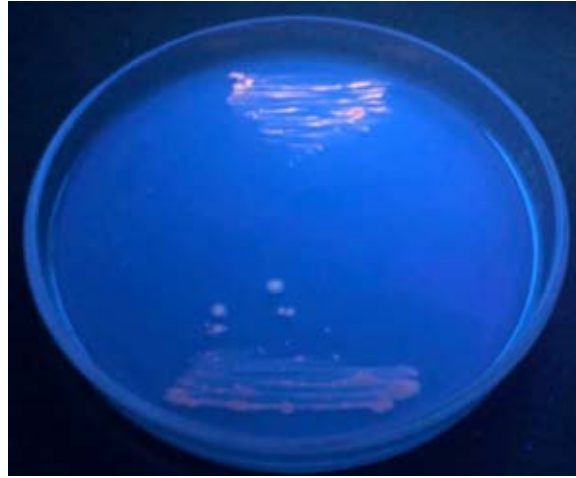


รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะโคโลนีของแต่ทั้ง 21 ไอโซเลตที่คัดแยกจากดิน

#### 3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PHA

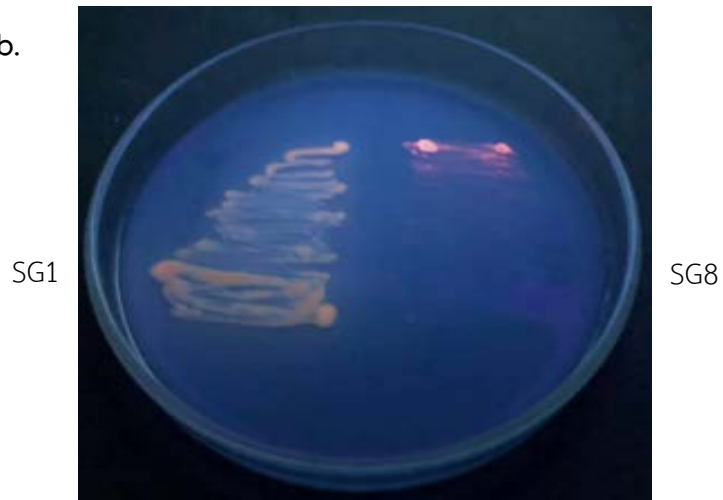
จากการคัดเลือกหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PHA จากทั้งหมด 21 ไอโซเลตโดยคัดเลือกบนอาหารตามสูตร Kouhei M และคณะ (2010) ที่ทำการผสมผงสีไนล์บลู และนำมาส่องภายใต้ลำแสง UV ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร พบว่า มี 8 ไอโซเลตที่ให้การเรืองแสง โดยทั้ง 8 ไอโซเลตนี้จะให้รหัสเป็น SG1 - SG8 จึงคาดว่ามีความสามารถในการผลิต PHA โดยลักษณะการเรืองแสงดังแสดงในรูปที่ 3.2

a.



SG2

b.



SG1

SG8

c.



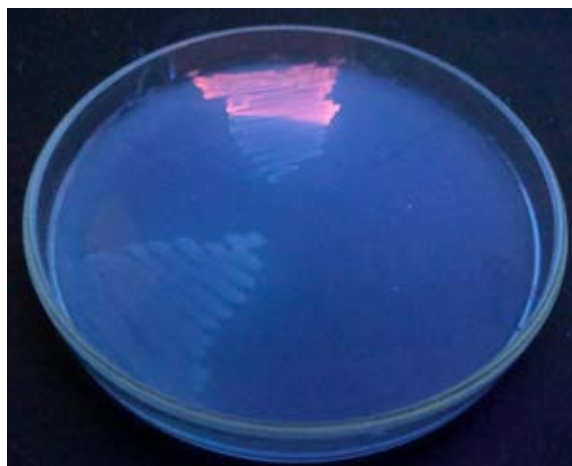
SG4

SG7

SG3

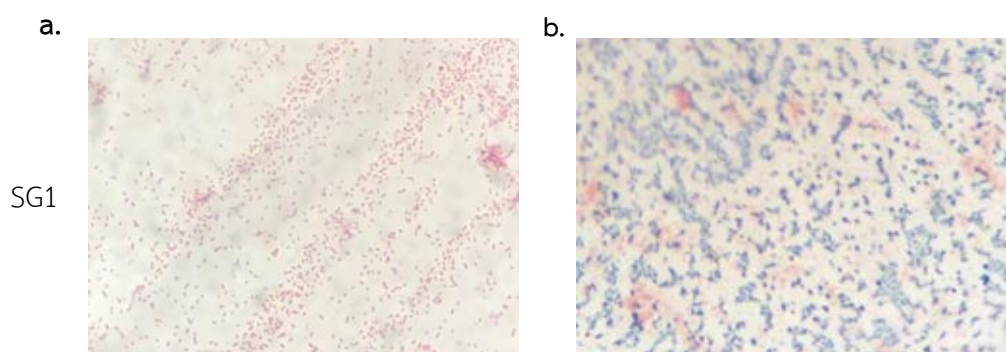
SG5

d. *Cupriavidus necator* strain A-04



รูปที่ 3.2 แสดงลักษณะการเรืองแสงของโคโลนีที่ผ่านการส่องภายใต้แสง UV ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร (a) : SG6, SG2 (b.) : SG1, SG8 (c.) : SG3, SG4, SG5, SG7 และ (d.) : *Cupriavidus necator* strain A-04 เป็น positive control

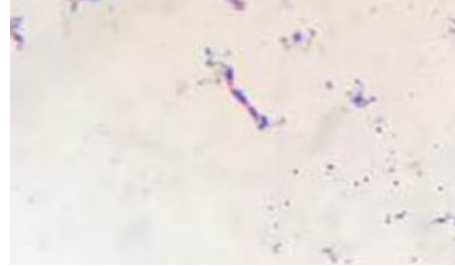
ผลจากการย้อมแกรมในทั้ง 8 ไอโซเลตพบว่า มี 7 ไอโซเลต ที่จัดว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ คือ SG1 SG2 SG3 SG4 SG5 SG7 และ SG8 และมีเพียง SG8 ที่จัดว่าเป็นแกรมบวก ผลจากการย้อม Sudan Black B พบว่า ทั้ง 8 ไอโซเลตแสดงให้เห็นการย้อมติดน้ำเงินภายในเซลล์ ซึ่งคาดว่ามีการสะสมของไขมันภายในเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 3.3 ลักษณะของโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของทั้ง 8 ไอโซเลต ดังแสดงตารางที่ 3.1



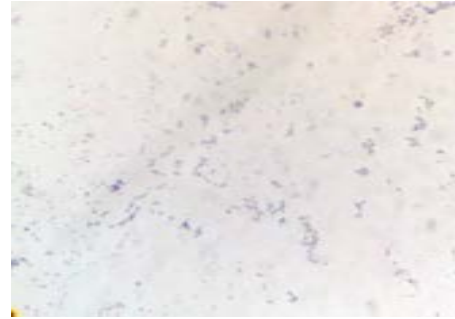
SG2



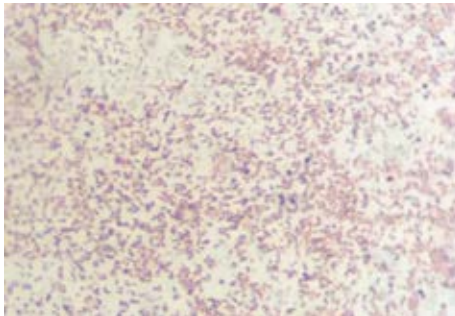
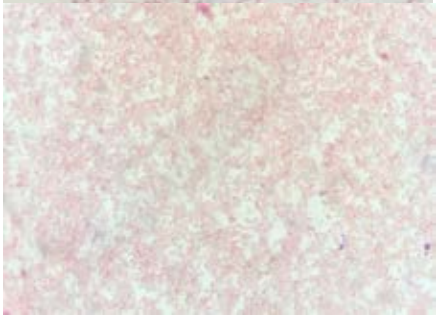
SG3



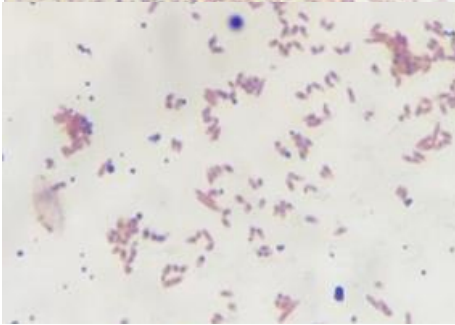
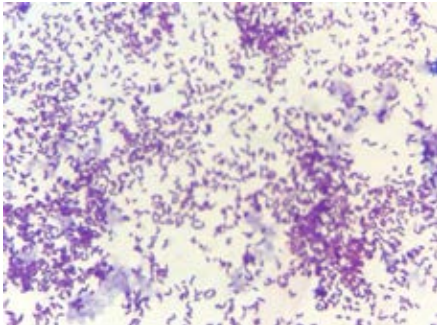
SG4



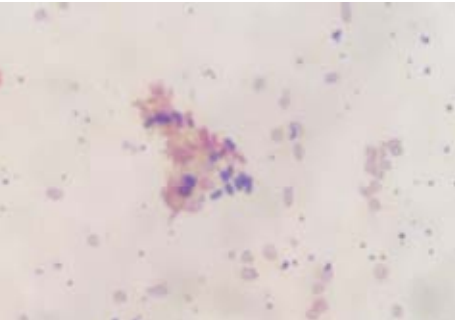
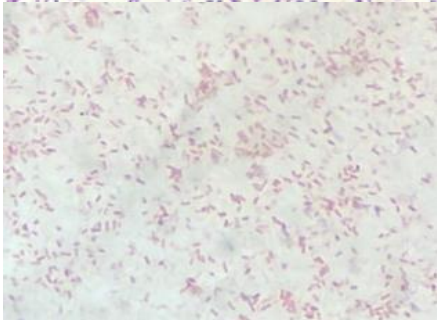
SG5

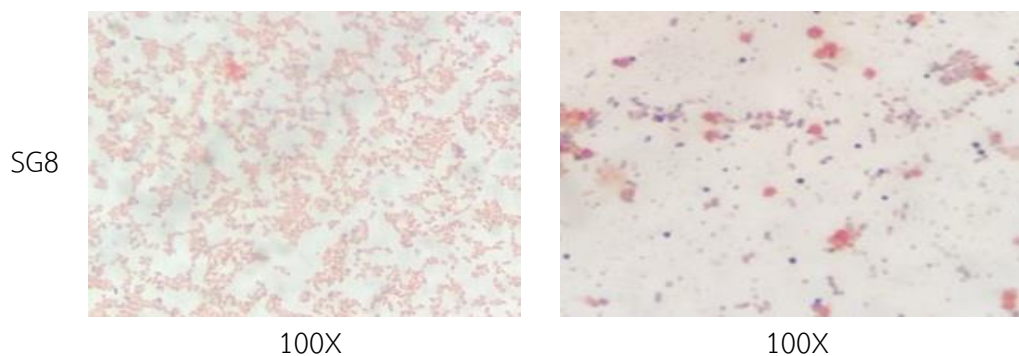


SG6



SG7





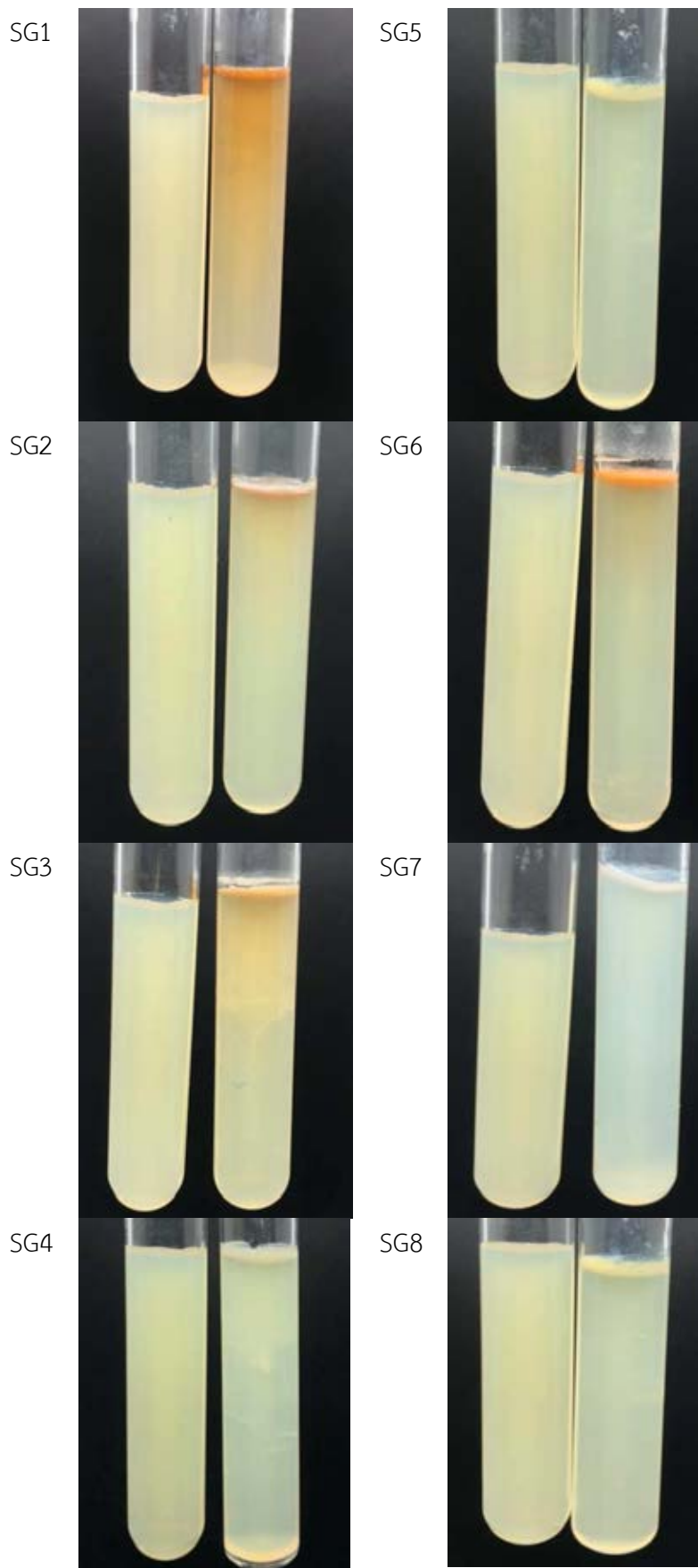
รูปที่ 3.3 แสดงผลการย้อม Gram's stain (a.) และ Sudan Black B (b.) ของทั้ง 8 ไอโซเลต ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า

ตารางที่ 3.1 ลักษณะของโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรีย SG1 SG2 SG3 SG4 SG5 SG6 SG7 และ SG8

ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
SG1	มีลักษณะกลม ขนาดเล็ก สีเหลือง ขอบเรียบ	เซลล์มีรูปร่างกลม ติดสีแกรมลบ
SG2	มีลักษณะกลม ขนาดปานกลาง สีขาว ขอบเรียบ	เซลล์มีรูปร่างแท่งสั้น ติดสีแกรมลบ
SG3	มีลักษณะกลม ขนาดใหญ่ สีขาว ขอบเรียบ	เซลล์มีรูปร่างแท่งยาว ติดสีแกรมลบ
SG4	มีลักษณะกลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	เซลล์มีรูปร่างกลม ติดสีแกรมลบ
SG5	มีลักษณะกลม ขนาดเล็ก สีเหลือง ขอบเรียบ	เซลล์มีรูปร่างแท่งสั้น ติดสีแกรมลบ
SG6	มีลักษณะกลม ขนาดเล็ก สีชมพู ขอบเรียบ	เซลล์มีรูปร่างแท่งสั้น ติดสีแกรมบวก
SG7	มีลักษณะกลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	เซลล์มีรูปร่างแท่งสั้น ติดสีแกรมลบ
SG8	มีลักษณะกลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	เซลล์มีรูปร่างแท่งสั้น ติดสีแกรมลบ

### 3.3 คัดแยกลักษณะความต้องการออกซิเจน

ผลจากการคัดแยกลักษณะความต้องการออกซิเจนของทั้ง 8 ไอโซเลต พบว่า มี 3 ไอโซเลตจัดว่าเป็น facultative anaerobic bacteria คือ SG1 SG3 และ SG4 โดยสังเกตจากการเจริญตั้งแต่ผิวหน้าอาหาร จนถึงช่วงกลางหลอด และมี 5 ไอโซเลต ที่จัดว่าเป็น aerobic bacteria โดยสังเกตจากการเจริญเฉพาะ บริเวณผิวหน้าอาหาร ดังแสดงในรูปที่ 3.4 และ ตารางที่ 3.2



รูปที่ 3.4 แสดงผลการตัดแยกลักษณะความต้องการออกซิเจนของทั้ง 8 ไอโซเลต



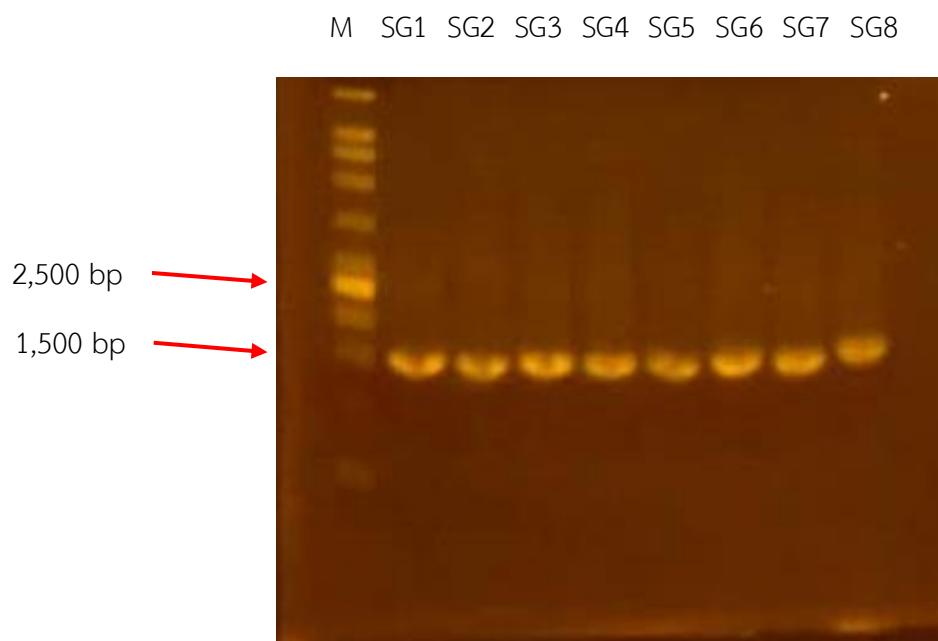
ตารางที่ 3.2 ลักษณะความต้องการออกซิเจน ของ SG1 SG2 SG3 SG4 SG5 SG6 SG7 และ SG8

ไอโซเลต	ลักษณะความต้องการออกซิเจน
SG1	facultative anaerobic bacteria
SG2	aerobic bacteria
SG3	facultative anaerobic bacteria
SG4	facultative anaerobic bacteria
SG5	aerobic bacteria
SG6	aerobic bacteria
SG7	aerobic bacteria
SG8	aerobic bacteria

### 3.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal RNA (16S rRNA)

จากการตรวจหายีนบริเวณ 16S rRNA ในปฏิบัติการลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันโดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R จากนั้น นำมาทำอะกาโรสเจลและผลิตภัณท์ที่ได้ มีขนาดประมาณ 1,500 bp ดังแสดงในรูปที่ 3.5 จากนั้น นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ตามวิธีในข้อ 2.4 ของไอโซเลต SG1 SG2 SG3 SG4 SG5 SG6 SG7 และ SG8 มีความยาว 1,381 1,384 1,402 1,386 1,333 1,333 1,358 และ 1,408 bp ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่มีบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN และเปรียบเทียบใน Ezbiocloud ด้วยโปรแกรม 16S-based ID พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของไอโซเลต SG1 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *Chryseobacterium daecheongense* สายพันธุ์ DSM 15235 เท่ากับ 98.84 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต SG2 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *Pseudomonas tianjinensis* สายพันธุ์ 68 เท่ากับ 98.70 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต SG3 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *Lysinibacillus boronitolerans* สายพันธุ์ T-10a เท่ากับ 98.93 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต SG4 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *Enterobacter hormaechei* subsp. xiangfangensis สายพันธุ์ 10-7 เท่ากับ 99.86 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต SG5 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *Sphingopyxis indica* สายพันธุ์ DS15 เท่ากับ 99.47 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต SG6 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *Gordonia bronchialis* สายพันธุ์ DSM 43247 เท่ากับ 98.57 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต SG7 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *Mesorhizobium soli* สายพันธุ์ NHI-

8 เท่ากับ 96.53 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลต SG8 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *Pseudomonas citronellolis* สายพันธุ์ NBRC 103043 เท่ากับ 99.64 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 3.5 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R ของทั้ง 8 ไอโซเลต

## บทที่ 4

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ปัจจุบันจากปัญหาภาวะขยะพลาสติกที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงทำให้ผู้คนตระหนักและสนใจพลาสติกชีวภาพมากขึ้น PHAs เป็นพลาสติกชีวภาพอีกทางเลือกหนึ่งที่เป็นที่รู้จักและมีการศึกษามายาวนาน แต่เนื่องด้วยต้นทุนการผลิตที่ค่อนข้างสูงจึงยังไม่ถูกนำมาใช้เชิงพาณิชย์อย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตาม PHAs ได้รับความสนใจในปัจจุบันมากขึ้น ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตและย่อยสลาย PHAs ได้ จึงยังคงเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้และพัฒนาการผลิตพลาสติกชีวภาพพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต

จากงานวิจัยของนางสาวพิชญ์นันท์ สีนสุชอุดมชัย (2018) ที่ฝังตัวอย่างแผ่น PHB ในดิน และตรวจพบการย่อยสลายของพลาสติกภายใน 63 วัน สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 21 ไอโซเลต และเมื่อนำไปโซเลตที่บริสุทธิ์ทั้ง 21 ไอโซเลตมาคัดเลือกบนอาหารตามสูตร Kouhei M. และคณะ (2010) ที่มีส่วนประกอบของ Nile Blue A และนำไปส่องภายใต้ลำแสง UV ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร จะเห็นลักษณะโคโลนีที่เรืองแสงสีส้ม แสดงให้เห็นถึงการสะสมไขมันอยู่ภายในเซลล์ จึงอาจเป็นไปได้ว่ามีการสะสม PHAs ที่เป็นไขมันชนิดหนึ่ง พบว่ามีทั้งหมด 8 ไอโซเลต ที่ให้ลักษณะการเรืองแสงสีส้ม จึงตั้งชื่อไอโซเลตทั้ง 8 ไอโซเลตว่า SG1 SG2 SG3 SG4 SG5 SG6 SG7 และ SG8

จากการค้นคว้าหาข้อมูลเบื้องต้น พบว่าได้มีการรายงานเกี่ยวกับ *Sphingopyxis* sp. ว่ามีความสามารถในการผลิต PHAs ตามการรายงานของ Tobella L. และคณะ (2005) โดยพอลิเมอร์ที่ได้เป็น โคพอลิเมอร์ของ SCL-PHAs และ MCL-PHAs เช่นเดียวกับใน *Lysinibacillus* sp. ที่รายงานถึงความสามารถในการผลิตโคพอลิเมอร์ PHAs ทั้ง 2 ชนิด ตามรายงานของ Mohapatra S. และคณะ (2016) ใน *Enterobacter* sp. มีรายงานว่ามีความสามารถในการผลิต SCL-PHAs จากงานวิจัยของ Arshad A. และคณะ (2017) และ *Pseudomonas* sp. เป็นสกุลแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต MCL-PHAs อย่างแพร่หลาย ส่วนในสกุล *Chryseobacterium* sp. และ *Gordonia* sp. ยังไม่พบการรายงานถึงความสามารถในการผลิต PHAs

จากผลการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าดินที่ทำการฝังแผ่นพลาสติก PHB ลงไปเป็นระยะเวลาหนึ่งจะช่วยให้สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตได้และงานวิจัยนี้เป็นการคัดเลือกหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PHAs เบื้องต้น อาจต้องมีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมในระดับโมเลกุล รวมถึงการศึกษาในระดับการผลิต PHAs เพื่อเป็นการยืนยันถึงความสามารถในการผลิต PHAs ในทั้ง 8 ไอโซเลต

## เอกสารอ้างอิง

### ภาษาไทย

- สิริรัตน์ วิเศษคุปต์. 2552. การโคลนและการแสดงออกของยีนชีวสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตจาก *Ralsotonia eutropha* สายพันธุ์ A-04 ใน *Escherichia coli* วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- อัมทิกา เมืองวงษ์. 2553. การผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตโดยใช้ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### ภาษาอังกฤษ

- Al-Kaddo K., Sudesh K. and Samian M., **Screening of bacteria for PHA production using waste glycerol as carbon source and the ability of new strain to produce P(3HB-co-3HV) copolymer.** Malaysian Journal of Microbiology (2016); 12(3): 245-253.
- Arshad A., Ashraf B., Ali I. and Jamil N., **Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from styrene by *Enterobacter* spp. isolated from polluted environment.** Frontiers in Biology (2017); 12(3):210-218.
- Boyandin A., Prudnikova S., Filipenko M., Khrapov E., Vasil'ev A., Volova T., **Biodegradation of polyhydroxyalkanoates by soil microbial communities of different structures and detection of PHA degrading microorganisms.** Applied Biochemistry and Microbiology (2012); 48(1): 28-36.
- Bhuwal A., Singh G., Aggarwal N., Goyal V. and Yadav A. **Isolation and Screening of Polyhydroxyalkanoates Producing Bacteria from Pulp, Paper, and Cardboard Industry Wastes.** International Journal Biomaterials. (2013); 2013.
- Chaprteep S., **Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates,** Journal of Bioscience and Bioengineering. (2010); 110(6): 621-632.
- Ciesielski S., Górnica D., Mozejko J., Swiatecki A, Grzesiak J. and Zdanowski M. **The Diversity of Bacteria Isolated from Antarctic Freshwater Reservoirs Possessing the Ability to Produce Polyhydroxyalkanoates.** Current Microbiology (2014); 69(5): 594–603.

- Gajendiran A., Krishnamoorthy S., Abraham J., **Microbial degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Aspergillus clavatus* strain JASK1 isolated from landfill soil.** *Biotech* (2016); 6(1): 52.
- Gohlrene Y. and Tan I. **Polyhydroxyalkanoate production by antarctic soil bacteria isolated from Casey Station and Signy Island.** *Elsevier* (2012); 167(4): 211-219.
- Marcos-García M., P. García-Fraile, A. Filipová, E. Menéndez, P.F. Mateos, E. Velázquez, T. Cajthaml and R. Rivas. ***Mesorhizobium* bacterial strains isolated from the legume *Lotus corniculatus* are an alternative source for the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) to obtain bioplastics.** *Environmental Science and Pollution Research* (2017); 24(21):17436-17445.
- Martin Koller. **Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters by Extremophiles.** *MOJ Polymer Science* (2017); 1(2).
- Mizuno K., Ohta A., Hyakutake M., Ichinomiya Y., Tsuge T., **Isolation of Polyhydroxyalkanoate - producing bacteria from a polluted soil and characterization of the isolated strain *Bacillus cereus* YB-4.** *Elsevier* (2010); 1335-1339.
- Mohapatra, S., Samantaray D., Samantaray S., Mishra B., Das S., Majumdar S., Pradhan S., Rath S., Rath C., Akthar J. and Achary K. **Structural and thermal characterization of PHAs produced by *Lysinibacillus* sp. through submerged fermentation process.** *International Journal of Biological Macromolecules* (2016); 93: 1161-1167.
- Muhammadi I., Shabina M., Afzal M. and Hameed S., **Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications.** *Green Chemistry Letters and Reviews* (2015); 8: 56-77.
- Naheed N., Jamil N., **Optimization of biodegradable plastic production on sugar cane molasses in *Enterobacter* sp. SEL2.** *Braz J Microbiol* (2014); 45(2): 417-426.
- Phanse N., Chincholikar A., Patel B., Rathore P., Vyas P. and Patel M. **Screening of PHA producing bacteria from diverse sources.** *International Journal of Biosciences* (2011); 1(6): 27-32.
- Razaa Z., Abid S. and Banatb I., **Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications.** *Elsevier* (2018); 126: 45-56.

- Sudesh K, Abe H, Doi Y.. **Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters.** Progress in Polymer Science (2000); 1503–1555.
- Spiekermann P., Rehm BH., Kalscheuer., Baumeister D., Steinbuchel A., **A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoicacids and other lipid storage compounds.** Arch Microbiol (1999); 171: 73-80.
- Takeuchi M., Morisaki K. and Numata K., **A Screening Method for the Isolation of Polyhydroxyalkanoate-Producing Purple Non-sulfur Photosynthetic Bacteria from Natural Seawater.** Frontiers Microbiology (2016); 7: 1509.
- Tan G., Chen C., Li L., Ge L., Wang L., Razaad I., Li Y., Zhao L., Mo Y., and Wang J., **Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA).** Polymers (2014); 6(3): 706-754.
- Tatiana G., Svetlana V., Olga N., Darya A., Ekaterina I., **Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates with Different Chemical Compositions and Their Biodegradability.** Microbial Ecology (2017); 73(2).
- Tobella L., Bunster M., Pooley A., Becerra J., Godey F., Matinez M. **Biosynthesis of poly-beta-hydroxyalkanoate by *Sphingopyxis chilensis* S37 and *Wautersia* sp. PZK cultured in cellulose pulp mill effluents containing 2,4,6-trichlorophenol.** J Ind Microbiol Biotechnol (2005); 32: 397-401.
- Verlinden R, Hill D, Kenward M, Williams C, Radecka I. **Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates.** Journal of applied microbiology (2007); 102(6): 1437-1449.
- Uchida H., Nakajima-Kambe T., Shigeno-Akutsu Y., Nomura N., Tokiwa Y., Nakahara T., **Properties of a bacterium which degrades solid poly(tetramethylene succinate)-co-adipate, a biodegradable plastic.** FEMS Microbiol Lett (2000); 189(1): 25–29.
- Urbanek K., Rymowicz W., Strzelecki C., Kociuba W., Franczak L., M Aleksandra. **Isolation and characterization of Arctic microorganisms decomposing bioplastics.** AMB express (2017); 7: 148-158.

### เอกสารอ้างอิงออนไลน์

PlasticsEurope. 2560. <https://www.plasticseurope.org>. เข้าถึงเมื่อ 12 มกราคม 2562.

จุลินทรีย์ผู้สร้างและผู้ทำลายพลาสติก. 2560. <https://www.tistr.or.th/tistrblog/?p=3435>. เข้าถึงเมื่อ 14 เมษายน 2562.

ประเภทของพลาสติกย่อยสลายได้. 2549. [http://www.mtec.or.th/th/special/biodegradable\\_plastic](http://www.mtec.or.th/th/special/biodegradable_plastic). เข้าถึงเมื่อ 20 เมษายน 2562.

มองอนาคตพลาสติกชีวภาพ. 2557. <https://www.scbeic.com/th/detail/product/332>. เข้าถึงเมื่อ 14 เมษายน 2562.

## ภาคผนวก ก

## สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani

อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Tryptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5 กรัม
Agar	20 กรัม

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอล 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตามสูตร Mizuno K. และคณะ (2010)

อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Yeast extract	0.5 กรัม
Peptone	1 กรัม
Glucose	10 กรัม
Nile blue A	0.5 มิลลิกรัม
Agar	20 กรัม

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอล 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



## ภาคผนวก ข

### สารเคมีและวิธีการเตรียมที่ใช้ในการทดลอง

#### 1. Crystal violet

เตรียมโดยละลายผง crystal violet 20 กรัม ใน 95% v/v เอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บไว้ในขวดสีชา

#### 2. สารละลาย Gram iodine

เตรียมโดยบด iodine crystal จำนวน 1 กรัม และ potassium iodine จำนวน 2 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ละลายจนหมด แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 240 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม สารละลาย 5% sodium bicarbonate ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ในขวดสีชา

#### 3. Safranin O

เตรียมโดยละลาย safranin O จำนวน 2.5 กรัม ใน 95% ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ใช้เป็น stock solution โดยเก็บไว้ในขวดสีชา และเตรียม working solution โดยเจือจาง stock solution จำนวน ส่วนในน้ำกลั่น 9 ส่วน (1:10)

#### 4. Sudan Black B

เตรียมโดยละลายผง Sudan Black B 0.3 กรัม ใน 70% v/v เอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บไว้ในขวดสีชา