การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียผลิตพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต จากดินบริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมันในจังหวัดสงขลา

Screening and Isolation of Polyhydroxyalkanoate Producing Bacteria from Oil-Contaminated Soil in Songkhla Province

สิริมาภรณ์ วัชรกุล [1]
สโรชา จันทรพรม [2]
รัตติญา จะนะจินา [2]
กมลธรรม อ่ำสกุล [3]

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates: PHAs) จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันในจังหวัดสงขลาโดยใช้น้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดปอเปี๊ยะเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญและสร้างพลังงานสะสมในรูปแกรนูลของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต จากการคัดแยกแบคทีเรียโดยวิธี Sensitive, Viable-Colony Staining Method พบแบคทีเรียที่สร้าง PHAs จำนวน 120 ไอโซเลท เมื่อคัดแยกจากลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันพบเพียง 10 ไอโซเลทที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 7 ไอโซเลทและเป็นแบคทีเรียแกรมลบ 3 ไอโซเลท เมื่อทดสอบความสามารถในการเจริญในอาหาร Mineral Salts Mediun (MSM) ที่มีน้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดปอเปี๊ยะโดยการวัดน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่า 3 ไอโซเลท SR 11 SR12 และ SR22 มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดโดยไอโซเลท SR22 ให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดถึง 10.40±0.23 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังยืนยันผลการสร้างเม็ดแกรนูลของ PHAs ด้วยการย้อมสี Sudan Black B พบว่าทุกไอโซเลทมีการสร้าง PHAs เมื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลท SR11 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียจีนัส *Bacillus* spp. ในขณะที่ ไอโซเลท SR12 และ SR22 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียจีนัส *Pseudomonas* spp.

คำสำคัญ : พลาสติกชีวภาพจากจุลินทรีย์ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต แบคทีเรียผลิตพลาสติก

---

1 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
2 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
3 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Abstract

The aim of this research is isolation and screening of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from soil contaminated with oil in Songkhla province. The isolation process using the sensitive, viable-colony staining method. It was found 120 isolates of PHAs-producing bacteria which were able to classify into 10 different morphological isolates. Seven of them are Gram positive bacteria and the other three are Gram negative bacteria. The growth of bacteria in wasted-oil from spring roll cooking process as a carbon source was determined via cell dry weight. Three isolates of bacteria showed high amount of cell dry weight, isolate SR11, SR12 and SR22 which isolate SR22 represented the highest value of cell dry weight 10.40±0.23 g/L. In addition, all isolates showed PHAs granules producing which was confirm by Sudan Black B staining. Biochemical test of selected bacteria was performed and the results revealed that isolate SR10 belong to Genus *Bacillus* spp. while, isolate SR12 and SR22 similar to Genus *Pseudomas* spp.

Keyword: Bioplastics from Microorganisms, Polyhydroxyalkanoates, Plastic Producing Bacteria

บทนำ

พลาสติกเป็นวัสดุสังเคราะห์ที่มีบทบาทในชีวิตประจำวัน ซึ่งมีคุณสมบัติดีในด้านราคาถูก น้ำหนักเบา แข็งแรงและทนทาน ทำให้พลาสติกกลายเป็นที่นิยมและมีปริมาณการใช้งานเพิ่มมากขึ้น ถึงแม้พลาสติกจะมีความสะดวกในการใช้งานและมีข้อดีมากกว่าวัสดุอื่น ๆ แต่สารเคมีที่ใช้การผลิตพลาสติกหลายชนิดก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ นอกจากนี้ปริมาณการใช้พลาสติกที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดปัญหาขยะสะสมซึ่งย่อยสลายได้ยากทั้งยังเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมีเหล่านี้ไม่สามารถย่อยสลายได้ด้วยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ดังนั้นจึงมีการศึกษาและพัฒนาพลาสติกชีวภาพ (Bioplastics) ขึ้นมาเพื่อเป็นพลาสติกทางเลือกใหม่ทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมีโดยเฉพาะโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates; PHAs) ซึ่งได้รับความนิยมและเป็นพลาสติกที่ผลิตโดยจุลินทรีย์มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ชนิดพอลิโพรพิลีน นำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง ที่สำคัญสามารถย่อยสลายได้ด้วยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ (ประดิษนันท์ เอี่ยมสะอาด. 2560)

พอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเป็นพอลิเอสเทอร์ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ซึ่งอยู่ในรูปเม็ดแกรนูล พอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ 3-Hydroxy-Acid (HA) เช่น poly-3-Hydroxybutyric Acid (PHB) พอลิเมอร์ชนิดนี้เป็นอาหารสะสมของเซลล์จุลินทรีย์เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีอาหารอุดมสมบูรณ์เพื่อเป็นพลังงานสำรองสำหรับจุลินทรีย์ สารประกอบของพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สะสมภายในเซลล์จุลินทรีย์นั้นมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับสารอาหารที่จุลินทรีย์ได้รับ (Bhuwal and others. 2013) โพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต จัดเป็นพอลิเมอร์ประเภทอะลิฟาติกโพลีเอสเตอร์ (Aliphatic Polyester) มีการสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยจะพบมากในแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น *Cupriavidus necator, Alcaligenes latus, Azotobacter vinelandii, Ralstonia eutropha, Rhodobacter shaeroides* และ *Pseudomas putida* แบคทีเรียในสกุล *Methylotrophs* sp. และ *Pseudomonas* sp. (ประดิษนันท์ เอี่ยมสะอาด. 2560) มีงานวิจัยมากมายที่พยายามผลิตพลาสติกชีวภาพเหล่านี้จากจุลินทรีย์ ทั้งได้มีการศึกษาการสะสมสารประกอบคาร์บอนกลุ่มพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในเซลล์ของจุลินทรีย์กลุ่ม *Azobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Alcaligenes eutrophus* โดยใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์เพื่อผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต แต่ต้นทุนในการผลิตสูงกว่าการผลิตพอลิเมอร์จากปิโตรเคมี ทำให้พอลิเมอร์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดนี้ยังไม่ได้รับความนิยม (Barham and others. 1984) ปัจจุบันแหล่งอาหารในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตยังคงเป็นปัญหาสำคัญ ดังนั้นการหาวัตถุดิบที่มีราคาถูกหรือเป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งมาทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาแพงจะสามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตได้ และทำให้พลาสติกชีวภาพชนิดนี้มีราคาถูกลง ทั้งยังช่วยรักษาสภาพแวดล้อมจากการนำวัสดุเหลือทิ้งมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด นอกจากนี้ความสำเร็จในการพัฒนาและวิจัยด้านการผลิตพลาสติกชีวภาพนั้นส่วนหนึ่งขึ้นอยู่กับการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและการหาแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกเพื่อลดต้นทุนในการผลิตทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ผลิตโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตให้ได้ปริมาณมากที่สุดและคุ้มทุนในการผลิต

ในปัจจุบันนี้มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกและผลิตโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากจุลินทรีย์ในแหล่งต่าง ๆ มากมาย แต่อย่างไรก็ตามสารอาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อการผลิตยังคงมีราคาแพง ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้ทางผู้วิจัยจึงสนใจที่จะคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการผลิตโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากดินบริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมันในแถบพื้นที่จังหวัดสงขลาโดยใช้น้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดปอเปี๊ยะที่มีอยู่เป็นจำนวนมากในพื้นที่มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย เพื่อเป็นแนวทางในการใช้น้ำมันเหลือทิ้งมาใช้ให้เกิดประโยชน์และเพิ่มคุณค่ามากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตแกรนูลของโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากดินบริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมันในบริเวณจังหวัดสงขลา
2. เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตแกรนูลของโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยใช้น้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดปอเปี๊ยะเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

สมมติฐานในการวิจัย

สามารถคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างแกรนูลของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดยใช้น้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดปอดปี๊ยะเป็นแหล่งอาหารในการเจริญและสะสมแกรนูล

ขอบเขตการวิจัย

คัดแยก คัดเลือกและศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการผลิตพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดยใช้น้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดปอเปี๊ยะเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและสะสมแกรนูล โดยนำดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันในบริเวณจังหวัดสงขลามาคัดแยกและคัดเลือกโดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral Salts Medium ที่ผสมด้วยน้ำมันที่เหลือทิ้งจากการทอดปอเปี๊ยะ คัดเลือกโคโลนีที่เกิดการเรืองแสงภายใต้ยูวีบนอาหาร Nutrient Agar ที่ผสมสี Nile Red นำมาดูการสร้างแกรนูลภายในเซลล์ย้อมสี Sudan Black B วิเคราะห์ความสามารถในการเจริญในอาหารที่ผสมน้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดปอเปี๊ยะเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งและทดสอบคุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้นเพื่อบ่งชี้ชนิด

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันในจังหวัดสงขลาได้แก่ บริเวณสวนปาล์มน้ำมันดิน บริเวณร้านขายไก่ทอด ร้านขายหมูทอด ร้านขายลูกชิ้นทอด ร้านปอเปี๊ยะทอด และร้านขายข้าวไข่เจียว ทำการเก็บตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันในพื้นที่ดังกล่าวโดยใช้ช้อนปราศจากเชื้อ (Sterile) ตักดินปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในถุง Polythene (Polythene Bag) ที่ทำการฆ่าเชื้อ แล้วนำใส่กล่องโฟมจากนั้น นำไปทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการทดลองต่อไป (Sasikumar. 2014)

2. การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตแกรนูลของพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

นำตัวอย่างดิน 10 กรัมใส่ลงในฟลาสก์ที่มีอาหาร Mineral Salts Medium (MSM) 90 มิลลิลิตรที่ผสมน้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดปอเปี๊ยะ (ความเข้มข้น 1% w/v) (Gomaa. 2014) จากนั้นนำฟลาสก์ที่มีตัวอย่างดินและอาหารไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำมันเป็นแหล่งอาหารและกระตุ้นให้มีการสร้างอาหารสะสมในรูปแกรนูลภายในเซลล์แบคทีเรีย เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำตัวอย่างมาเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85% Normal Saline Solution; 0.85% NSS) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นเพาะเลี้ยงลงบนอาหาร Nutrient Agar (NA) และ Nutrient Agar ที่ผสมสี Nile Red (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหาร NA ส่วนแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NA ผสมสี Nile Red นำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตเพื่อดูการเรืองแสงของโคโลนีแบคทีเรีย เนื่องจากสี Nile Red ที่ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไปจับกับแกรนูลของ PHAs ในเซลล์แบคทีเรีย ทำให้มองเห็นโคโลนีเรืองแสงสีส้มเมื่อส่องดูภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียโคโลนีที่มีการเรืองแสงมาทำให้บริสุทธิ์บนอาหารแข็ง NA บันทึกลักษณะของแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพื่อศึกษาต่อไป (Spiekermann and others. 1999)

3. การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เพื่อสะสมแกรนูลของพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว MSM ที่ผสมน้ำมันเหลือทิ้ง (1%) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเจือจางซัสเพนชั่นของเซลล์ (Cell Suspension) ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85% normal saline solution; 0.85% NSS) ให้มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^8 Cfu/mL

เพื่อเป็นกล้าเชื้อตั้งต้น ถ่ายเชื้อ (10% v/v) ลงในอาหารเหลว MSM ที่ผสมน้ำมันเหลือทิ้งปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30±1 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้แบคทีเรียผลิตอาหารสะสมในรูปของแกรนูลของพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Spiekermann and others. 1999)

4. วิเคราะห์การเจริญโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell Dry Weight Assay)

หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว MSM ที่ผสมน้ำมันเหลือทิ้ง (1%v/v) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำซัสเพนชั่นของเซลล์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ความเร็วรอบ 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 1 รอบปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นเทลงในถ้วยอลูมีเนียมที่ชั่งน้ำหนักแล้วจากนั้นอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บในตู้ดูดความชื้นให้น้ำหนักคงที่ และชั่งน้ำหนักคำนวณหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร (Gomaa. 2014)

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักเซลล์} \times 1000}{50}$$

5. การบ่งชี้ชนิดและศึกษาสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรีย (Ludwig and others. 1989)

5.1 การตรวจสอบการสร้างอาหารสะสมในรูปแกรนูลของ PHA ภายในเซลล์แบคทีเรีย โดยนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพาะเลี้ยงลงบนอาหาร Nutrient Agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมาย้อมสี Sudan Black B เพื่อยืนยันผลการสร้างพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

5.2 บ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีและสัณฐานวิทยา

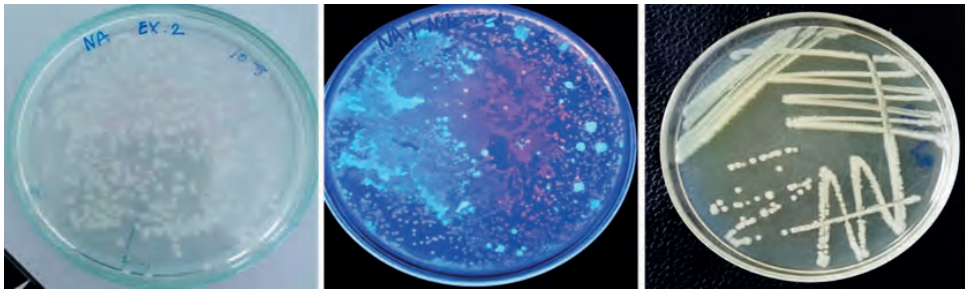
บ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัยข้อมูลการจัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานวิทยาของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาย้อมสีแกรม (Gram Stain) ดูลักษณะของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ การจัดเรียงตัวของเซลล์ และรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยเชื้อที่ย้อมติดสีม่วงแดง จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram Positive Bacteria) เชื้อที่ย้อมติดสีแดงจัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram Negative Bacteria) ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์คาตาเลส (Catalase Test) โดยการหยด 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนสไลด์ จากนั้นเขี่ยเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท ลงบนแผ่นสไลด์ดูการเกิดฟององอากาศ หากมีฟองอากาศเกิดขึ้นแสดงว่า

เชื้อจุลินทรีย์นั้นสามารถผลิตเอนไซม์คาตาเลสได้ (ผลบวก) แต่หากไม่มีฟองอากาศเกิดขึ้น แสดงว่าแบคทีเรียไม่สามารถผลิตเอนไซม์คาตาเลสได้ (ผลลบ) ศึกษาการสร้างเอนโดสปอร์ (Endospore Staining) โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาย้อมสี Malachite Green เพื่อดูการสร้างเอนโดสปอร์โดยส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยเอนโดสปอร์จะติดสีเขียวและตัวเซลล์จะติดสีแดง ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกโดยการทดสอบ Starch-Hydrolysis, VP-Test, Citrate Test, Oxidase Test, Nitrate Test, Glucose Fermentation และ Mennitol Fermentation

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

1. การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

จากการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเป็นอาหารสะสมในตัวเซลล์จากตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันในพื้นที่จังหวัดสงขลาด้วยวิธี Sensitive, Viable-Colony Staining Method (Spiekerman and others. 1999) โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียลงบนอาหาร Nutrient Agar (NA) และ Nutrient Agar ที่ผสม Nile Red บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นส่องดูภายใต้ Ultraviolet Box (UV-Box) ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร พบว่าลักษณะโคโลนีบนจานอาหาร Nutrient Agar ที่ผสม Nile Red แตกต่างกันโดย พบแบคทีเรียบางโคโลนีที่มีการเรืองแสงสีส้มและสีฟ้าบนจานอาหาร เนื่องจากสี Nile Red ซึ่งอยู่ในรูปของ Fluorescent Oxazone Form ซึ่งผสมลงในอาหาร NA จะเข้าไปจับกับ PHAs ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญและสะสม PHAs ภายในเซลล์โดยสี Nile Red ที่ผสมลงไปในอาหารจะไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย เมื่อสี Nile Red จับกับ PHAs จะเกิดการเรืองแสงสีส้ม เมื่อส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ส่วนโคโลนีที่ไม่มีการสะสม PHAs แกรนูลจะมีการเรืองแสงสีฟ้า ซึ่งเกิดมาจากการดูดกลืนแสงยูวีในส่วนของลิปิดที่อยู่บริเวณเซลล์เมมเบรนด์ (Al-Kaddo and others. 2016)



ภาพประกอบ 1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร Nutrient Agar (A) โคโลนีของแบคทีเรียบนอาหาร Nutrient Agar ผสมสี Nile Red ส่องดูภายใต้ Ultraviolet Box (UV-Box) ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร (B) โคโลนีของแบคทีเรียที่เรืองแสงสีส้มภายใต้ Ultraviolet Box นำมา Streak ลงบนอาหาร Nutrient Agar (C)

จากการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs จากดินบริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมันในจังหวัดสงขลาด้วยวิธี Sensitive, Viable-Colony Staining Method พบแบคทีเรียที่สามารถสร้างแกรนูลของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต จำนวน 120 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินบริเวณร้านขายลูกชิ้นทอดที่มีการหกกระจายและปนเปื้อนของน้ำมันสูงมีจำนวนพบจุลินทรีย์ที่สร้าง PHAs มากสุด 56 ไอโซเลท รองลงมาเป็นดินจากบริเวณสวนปาล์ม อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา และที่พบน้อยที่สุดคือดินจากร้านขายข้าวไข่เจียว อำเภอเมืองสงขลา จังหวัดสงขลา จำนวน 26 และ 5 ไอโซเลทตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหาร NA จากตัวอย่างเดียวกันจำนวนทั้งหมด 1,009 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างแกรนูลมีประมาณ 10% ของแบคทีเรียทั้งหมดในธรรมชาติที่พบ คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน โดยดูลักษณะโคโลนีที่แตกต่าง สี รูปร่าง การจัดเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งสามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท ได้แก่ SR1, SR6, SR8, SR10, SR12, SR16, SR19, SR22, SR29 และ SR60

2. วิเคราะห์การเจริญโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell Dry Weight Assay)

จากการนำแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้มาวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยใช้น้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดปอเปี๊ยะเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าแต่ละไอโซเลท ที่คัดเลือกได้มีการเจริญที่แตกต่างกัน โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซล์แห้งมากที่สุดสามลำดับแรกของไอโซเลท SR 22 SR12 และ SR60 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 10.40±0.23 กรัมต่อลิตร 6.6±0.11 กรัมต่อลิตร และ 6.6±0.11 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลท SR60 มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งน้อยที่สุดเท่ากับ 0.20±0.20 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับ

ชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ SR Control ดังแสดงในตารางที่ 1 จากการวิเคราะห์การเจริญโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งสามไอโซเลท SR22, SR12 และ SR10 สามารถเจริญได้ดีมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้สูงในอาหารที่มีการผสมน้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดปอเปี๊ยะ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทั้งสามไอโซเลทมีกระบวนการเมทาบอลิซึมของน้ำมันที่ผสมลงในอาหารเกิดกระบวนการย่อยสลายน้ำมันและนำไปสร้างเป็นองค์ประกอบของเซลล์และเป็นอาหารสะสมในรูปแกรนูลของ PHAs ได้ดี จากรายงานการวิจัยด้านการผลิต PHAs พบว่าอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งวิเคราะห์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณการผลิต PHAs (Anbreen and others. 2016) แต่อย่างไรก็ตามควรมีการสกัด PHAs ออกมาจากตัวเซลล์เพื่อทำการวิเคราะห์หาสัดส่วนของแกรนูล PHAs ที่แบคทีเรียสร้างเพื่อเทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย

ตารางที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์น้ำหนักของเซลล์แห้งของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)
SR1	2.50±0.14
SR6	5.80±0.21
SR8	4.33±0.12
SR10	6.10±0.10
SR12	6.60±0.11
SR16	4.90±0.20
SR19	5.60±0.12
SR22	10.40±0.23
SR29	4.90±0.20
SR60	0.20±0.20
control	0.11±0.14

* ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งทำการทดสอบซ้ำโดยหาค่าเฉลี่ยและนำค่าที่ได้มาหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Derivation: SD)

3. ผลการบ่งชี้ชนิดและศึกษาสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรีย

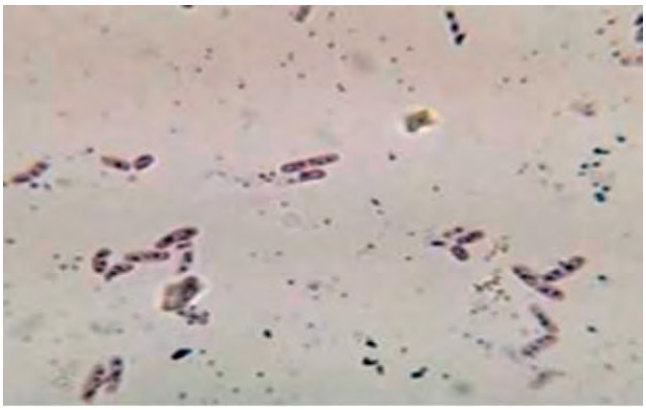
แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 10 สายพันธุ์นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการสร้าง PHAs ดูน้ำหนักเซลล์แห้งจากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียมาจำนวน 3 ไอโซเลทที่สามารถสร้าง PHAs แกรนูลได้และเจริญได้ดีในอาหารที่ผสมน้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดปอเปี๊ยะ จากการศึกษาสัณฐานวิทยาเบื้องต้นและยืนยันความสามารถในการสร้าง PHAs โดยการย้อมสีแกรนูลโดยใช้ Sudan Black B (ภาพประกอบ 1) พบการสร้างแกรนูลซึ่งติดสีดำของ Sudan Black B ในทุกไอโซเลท จากการย้อมสีแกรม (Gram Stain) และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง 7 ไอโซเลท ได้แก่ SR1, SR6, SR8, SR10, SR16, SR29 และ SR60 แบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ SR12, SR19 และ SR22 จากผลการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างแกรนูลของ PHAs พบแบคทีเรียแกรมบวกจำนวนมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ แม้ว่าการผลิต PHAs โดยเชื้อแบคทีเรียแกรมลบจะสามารถทำได้ง่ายกว่ารวมทั้งมีการสะสมภายในเซลล์ที่มากกว่า แต่การผลิต PHAs โดยแบคทีเรียแกรมลบ มักมีการปนเปื้อนของ Lipo Poly Saccharide (LPS) ซึ่งอยู่บริเวณ Outer Membrane ของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบที่ทนต่อความร้อนได้ดีและกำจัดได้ยากมากแม้จะใช้วิธีการให้ความร้อนหรือใช้รังสี แต่อย่างไรก็ตามสารเคมี เช่น Hydrogen Peroxide และ Benzoyl Peroxide สามารถทำลาย LPS ได้แต่อาจจะส่งผลทำให้คุณสมบัติของ PHAs เปลี่ยนแปลงไปได้ (Tan and others. 2014) ส่งผลให้ PHAs ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมลบไม่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้เป็นพลาสติกที่ต้องการความบริสุทธิ์สูง เช่น วัสดุอุปกรณ์ในด้านการแพทย์ ขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกไม่มี Outer Membrane จึงเหมาะสำหรับการผลิตพลาสติกชีวภาพที่มีความบริสุทธิ์ จึงทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย แกรมบวกที่สามารถสร้าง PHAs ได้และใช้น้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดปอเปี๊ยะ ในการเจริญได้ดี ได้แก่ ไอโซเลท SR22, SR12 และ SR10 โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด

จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อบ่งชี้ชนิดพบว่า ไอโซเลท SR10 เป็นแกรมบวกรูปท่อน มีความสามารถในการสร้างเอมไซม์คะตะเลส สร้างเอนโดสปอร์ จากการทดสอบ Starch Hydrolysis บนอาหาร Starch Agar พบว่าเชื้อสามารถสร้างเอ็นไซม์ย่อยแป้งได้ นอกจากนี้ยังพบว่า VP Test ให้ผลเป็นบวกเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SR10 มีความสามารถในการสร้างสาร Acetylmethylcarbinol (Acetoin) จาก Glucose ซึ่งสารนี้จะมีฤทธิ์เป็นกลางและจะถูก Oxidise โดย KOH และอากาศได้เป็น Diacetyl ซึ่งเมื่อมีการหยด Alpha-Naphthol และ KOH พบว่ามีวงแหวนสีชมพูเกิดขึ้นบนผิวหน้าอาหาร เมื่อทดสอบความสามารถในการใช้ Citrate เป็นแหล่ง คาร์บอนในกระบวนการ Metabolism พบว่าไอโซเลท SR10 มีการใช้ Citrate ในการเจริญและเปลี่ยน Citrate ไปเป็น Oxaloacetate และ Acetrate และมีการสังเคราะห์เอ็นไซม์ Oxaloacetate Decarboxylase มาเปลี่ยน Oxaloacetate ไปเป็นไพรูเวตและคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้เมื่อทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ Nitrate ไปเป็น Nitrite

พบว่าอาหารเปลี่ยนเป็นสีแดงซึ่งให้ผลเป็นบวก และยังสามารถหมักน้ำตาล Glucose ได้แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาล Mennitol ได้ จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีดังกล่าวพบว่าไอโวเลท SR10 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียจีนัส *Bacillus* sp. (Ludwig and others. 1989) ในขณะที่ไอโซเลท SR12 และ SR22 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ไม่สร้างเอนโดสปอร์ และยังพบว่าแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลท มีความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ Catalase โดยเมื่อเขี่ยเชื้อลงบน H_2O_2 ที่หยดไว้บนสไลด์มีฟองก๊าซเกิดขึ้น นอกจากนี้เมื่อทดสอบ Oxidase Test พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลท มีการสร้างเอ็นไซม์ Cytochrome C Oxidase ซึ่งจะออกซิไดซ์ Tetramethyl-P-Phenylenediamine Dihydrochloride ที่หยดไว้บนกระดาษกรองให้เป็นสีม่วงหรือน้ำเงิน จากการทดสอบคุณสมบัติทางเคมีโดยใช้ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ในการบ่งชี้ชนิดพบว่าไอโซเลท SR12 และ SR22 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในจีนัส *Pseudomonas* spp. (Ludwig and others. 1989)

ตารางที่ 2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือก

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี	**ไอโซเลท SR10**	**ไอโซเลท SR12**	**ไอโซเลท SR22**
การติดสีแกรม	+	-	-
รูปร่าง	แท่ง	แท่ง	แท่ง
การสร้างสปอร์	+	-	-
catalase test	+	+	+
oxidase test	-	+	+
starch Hydrolysis	+	-	-
VP-test	+	-	-
citrate	+	-	-
nitrate	+	-	-
glucose fermentation	+	-	-
mannitol fermentation	-	-	-
Genus	*Bacillus* spp.	*Pseudomonas* spp.	*Pseudomonas* spp.



ภาพประกอบ 2 การติดสี Sudan Black B ของแกรนูลพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในแบคทีเรียไอโซเลท SR12

สรุปผลการวิจัย

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันในจังหวัดสงขลา โดยใช้น้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดปอเปี๊ยะเป็นแหล่งอาหารในการเจริญ สามารถคัดแยกแบคทีเรีย ได้ทั้งหมดจำนวน 120 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินทั้งหมด 6 แหล่ง ทำการคัดเลือกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้าง PHAs ได้จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ SR1, SR6, SR8, SR10, SR12, SR16, SR19, SR22, SR29 และ SR60 จากนั้นทดสอบความสามารถในการเจริญและใช้น้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดปอเปี๊ยะเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้าง PHAs โดยการวัดน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่าไอโซเลท SR22 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงถึง 10.40 กรัม ต่อลิตร จากนั้นทำการยืนยันผลการสร้างแกรนูลในรูป PHAs โดยการย้อมสี Sudan Black B พบว่าทั้งสามไอโซเลทมีการสร้างแกรนูล และเมื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าไอโซเลท SR10 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียจีนัส *Bacillus* spp. ในขณะที่ไอโซเลท SR12 และ SR22 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียจีนัส *Pseudomonas* spp.

ข้อเสนอแนะเพื่อนำผลการวิจัยไปใช้

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอทของแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยใช้น้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดปอเปี๊ยะเป็นแหล่งอาหารในการเจริญของแบคทีเรีย ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะว่าควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอทของแบคทีเรียเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิต PHAs นอกจากนี้ควรมีการวิเคราะห์หา PHAs ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพและศึกษาคุณสมบัติของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอทของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เพื่อสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตพลาสติกชีวภาพและเป็นแนวทางในการผลิตเม็ดพลาสติกชีวภาพได้เองภายในประเทศ และเพื่อผลิตเป็นวัสดุทางเลือกที่ใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ซึ่งเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ทั้งยังเป็นแนวทางในการเลือกวัตถุดิบสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียซึ่งช่วยลดต้นทุนการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เพื่อแข่งขันกับการผลิตพลาสติกสังเคราะห์ได้ และยังช่วยลดปัญหามลพิษที่เกิดจากขยะพลาสติกที่ย่อยสลายยากในสิ่งแวดล้อม

เอกสารอ้างอิง

ประดิษนันท์ เอี่ยมสะอาด. (2560). “โพลีไฮดรอกซีอัลคาเอต พลาสติกชีวภาพจากแบคทีเรีย,” **วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ**. 27 (1) : 147-158.

Al-Kaddo, K.B., Kumar, S. and Mohd, Razip S. (2016). “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**. 12 (3) : 245-253.

Anbreen, A., Mohammad, Z., Khalid, M.Z., Aqdas, N., Muhammad, N. A. and Shazia, T. (2016). “Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements,” **International Journal of Biological Macromolecules**. 89 (1) : 161–174.

Barham, P.J., Keller, A., Otun, E.L. and Holmes, P.A. (1984). “Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: Poly-3-hydroxybutyrate,” **Journal of Materials Science**. 19 (9) : 2781-2794.

Bhuwal, A.K., Gulab, Singh, N., Kumar, A., Varsha, G. and Anita, Y. (2013). "Isolation and screening of polyhydroxyalkanoates producing bacteria from pulp, paper, and cardboard industry wastes,"**International Journal of Biomaterials**. 2013 : 1-10.

Gomaa, E.Z. (2014). "Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) By Bacillus subtilis and Escherichia coli grown on cane molasses fortified with ethanol," **Brazillian Archives of Biology and Technology**. 57(1) : 145-154.

Ludwig, W, Schleifer, K.H., and Whitman, W.B. (1989). **Bergey's Manual of systematic bacteriology**. USA : Springer.

Sasikumar, V., Priya, C., Shiv, S. and Sathish, S. (2014). "Isolation and preliminary screening of lignin degrading microbes,"**Journal of Academia and Industrial Research**. 3 (6) : 291-294.

Spiekermann, P., Rehm, B.H., Kalscheuer, R., Baumeister, D. and Steinbüchel, A. (1999). "A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds," **Archives of Microbiology**. 171 (2) : 73-80.

Tan, G.M., Chia-Lung, C., Ling, L., Liya, G., Lin, W., Indah M.N.R., Yanhong, L., Lei, Z., Yu, M. and Jing-Yuan, W. (2014). "Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review," **Polymers**. 6 (1) : 706-754.