การแยกและการคัดกรองจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ Polyhydroxybutyrate P(3HB) จากตัวอย่างดินและน้ำในประเทศไทยโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

Isolation of Microorganisms Capable of Producing Polyhydroxybutyrate P(3HB) from Soil and Water Samples Obtained in Thailand by Using Glucose as Carbon Source

วิมล ชอบชื่นชม[1*] ลุกมาน สีอรี[2] และ ณัฐพล ถนัดช่างแสง[3]

Wimol Chobchuenchom[1*] Lukman Seeroe[2] and Nuttapol Thanadchangsaeng[3]

[1]คณะเทคนิคการแพทย์, [2]คณะเภสัชศาสตร์, [3]วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000*

[1]Faculty of Medical Technology, [2] Faculty of Pharmacy, [3]College of Oriental Medicine, Rangsit University, Phahonyothin Rd., Lak-hok, Patumtanee, Thailand 12000*

**Corresponding author, Email: aj.nong1@gmail.com*

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีความสนใจศึกษาการผลิตพลาสติกชีวภาพที่ย่อยสลายได้และมีความเข้ากันกับเนื้อเยื่อได้ดีเพื่อการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดกรองจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ Polyhydroxybutyrate P(3HB) โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จากตัวอย่างดินและน้ำจากประเทศไทยจำนวนทั้งสิ้น 94 ตัวอย่าง (เป็นดิน 76 ตัวอย่าง และน้ำจำนวน 18 ตัวอย่าง) ซึ่งเก็บจากแหล่งที่ทิ้งขยะ แหล่งชุมชนและแหล่งโรงงานอุตสาหกรรม นำตัวอย่างดินมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อในอัตราส่วนตัวอย่าง 1 กรัมต่อน้ำ 1 มิลลิลิตรทำการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยการ streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด minimal salt agar (MSA) และ nutrient agar (NA) ที่ผสมน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทำการตรวจคัดกรองเพื่อหาเชื้อจุลชีพที่สร้าง PHB โดยการย้อมสี Sudan black B จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่ให้ผลบวกสูงประเมินจากร้อยละของเซลที่ติดสี Sudan black B มาทำการตรวจยืนยันความสามารถในการสังเคราะห์ P(3HB) ด้วยวิธี gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) เทียบกับสารมาตรฐาน P(3HB) ทำการจำแนกชนิดของเชื้อดังกล่าวโดยการตรวจการติดสีแกรม การย้อมสปอร์และการทดสอบ mass spectrometry based proteomics จากผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ที่ให้ผลบวกกับการย้อมสี Sudan Black B มีจำนวน 71 ไอโซเลต (isolate) จากตัวอย่างดินและน้ำ จำนวน 57 ตัวอย่าง พบเชื้อจำนวน 2 ไอโซเลตที่มีศักยภาพสูงในการผลิต P(3HB) จากอาหารเลี้ยงเชื้อ MSA+1% กลูโคส ได้แก่ 25.1 M และ16.2 M เมื่อทำการสกัดสารไบโอโพลิเมอร์จากเซลแห้งของ 25.1 M และ16.2 M ด้วยคลอโรฟอร์ม และตรวจยืนยันด้วยวิธี GC-MS เทียบกับสาร P(3HB) มาตรฐาน พบว่าไอโซเลต 25.1 M และ16.2 M สามารถสร้าง P(3HB) ได้โดย mass spectrum ของสารสกัด

คลอโรฟอร์มของ C042 ตรงกับสาร P(3HB) มาตรฐาน เมื่อทำการทดสอบโดยการย้อมสีแกรม และการย้อมสปอร์ พบว่าทั้งสองไอโซเลต เป็น แบคทีเรียชนิดแกมลบและสร้างสปอร์ และเมื่อทำการทดสอบจำแนกชนิดของเชื้อด้วยวิธี mass spectrometry based proteomics สรุปในเบื้องต้นได้ว่าเป็น Genus *Bacillus* ดังนั้นจึงให้ชื่อเป็น *Bacillus* sp. 25.1 M และ *Bacillus* sp. 16.2 M

คำสำคัญ: *โพลิไฮดรอกซีคาโนเอท โพลิไฮดรอกซิลบิวไทเรต บาซิลลัส*

Abstract

Biodegradable plastic produced from microorganisms have been studied widely because of their biodegradability and compatibility properties which can be applied for medical approaches. This research aimed to isolate microorganisms capable of producing polyhydroxybutyrate P(3HB) using glucose as carbon source from a total of 94 samples (76 soil samples and 18 water samples) obtained from various locations in Thailand including refuse sites, community area and industrial areas. Each sample was diluted in sterilized distilled water at a ratio 1 gram sample per 1 ml of distilled water. The sample suspension was then streaked on minimal salt agar (MSA) and nutrient agar (NA) supplemented with 1 % glucose (w/v). The polyhydroxybutyrate P(3HB) production was screened by using Sudan Black B staining and was confirmed by using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and compared with P(3HB) standards. High potential of the isolates that could produce P(3HB) were evaluated by positive cells after Sudan Black B staining and were used for further studies. Identification of bacteria was performed by using gram staining, spore staining and using mass spectrometry based proteomics. It was found that 71 isolates from 57 soil and water samples showed positive for Sudan Black B staining. Among them two isolates showed high potential for P(3HB) production when cultured on MSA+1% glucose. They were isolates 25.1 M and 16.2 M. Biopolymer was extracted from 25.1 M and 16.2 M dried cells by using chloroform technique and the capability of the isolate for P(3HB) production was confirmed by using GC-MS. It was found that, by comparing the mass spectrum to standard P(3HB), the biopolymer was P(3HB) . The isolates were both gram positive bacilli with spore forming which was further identified by using mass spectrometry based proteomics. Preliminarily, the result indicated that the isolates were classified as the Genus *Bacillus*, therefore the isolates were designed as *Bacillus* sp. 25.1 M and *Bacillus* sp. 16.2M.

Keywords: *polyhydroxyalkanoates, polyhydroxybutyrate, bacillus*

1. บทนำ

การใช้พลาสติกได้เติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงไม่กี่ทศวรรษที่ผ่านมา คาดว่ามีวัสดุพลาสติกที่มีการใช้เป็นประจำทั่วโลก ประมาณ 150 ล้านตัน อย่างน้อยครึ่งหนึ่งของจำนวนนี้เป็นการประยุกต์ใช้ในระยะสั้น เช่น วัสดุบรรจุภัณฑ์ พลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากปิโตรเลียมเหล่านี้สามารถคงอยู่ในสภาพแวดล้อม คาดว่าต้องใช้เวลาอย่างน้อยเป็น100 ปีสำหรับการย่อยสลาย ส่งผลให้เกิดปัญหามลพิษร้ายแรง การสะสมของพลาสติกในสภาพแวดล้อมได้กลายเป็นปัญหาทั่วโลก นอกจากนี้ยังมีปัญหาเกี่ยวกับวิธีการกำจัดพลาสติกในลักษณะต่างๆ เช่น ในหลุมฝังกลบอัตราการย่อยสลายของพลาสติกจะช้ามาก การเผามีราคาแพงและอาจสร้างผลิตภัณฑ์ที่เป็นพิษ (Leda et al., 2009) การรีไซเคิลสามารถทำได้ แต่ใช้เวลานานในการแยกชนิดของพลาสติกก่อนนำไปรีไซเคิล (Shilpi & Ashok, 2005) ความพยายามที่จะลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมของพลาสติก คือการทดแทนพลาสติกที่ผลิตจากปิโตรเลียมมาเป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ (biodegradable plastics)

polyhydroxyalkanoates (PHAs) เป็นกลุ่มของโพลีเอสเตอร์ย่อยสลายได้ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์และได้รับความสนใจในหลายปีที่ผ่านมา เพื่อใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ (Mamtesh et al., 2009) ในกลุ่ม PHAs นั้นพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิต polyhydroxybutyrate P(3HB) ได้ดี P(3HB) จัดเป็นไบโอพลาสติกที่เป็นเทอร์โมพลาสติกสามารถนำมาใช้เป็นวัสดุที่ย่อยสลายทางชีวภาพ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติพิเศษ คือ biocompatibility ซึ่งจะไม่สร้างสารพิษใดๆ จากการย่อยสลาย นอกจากนี้พบว่า P(3HB) เป็นองค์ประกอบปกติที่พบในเลือดและชั้นผิวเซลล์ของยูคาริโอต (Wiggam et al., 1997)จึงเหมาะสำหรับนำมาใช้ในอุปกรณ์ทางการแพทย์ (Chen et al., 2005) และบรรจุภัณฑ์อาหาร จากการศึกษาพบว่าเชื้อหลายชนิด เช่น *Ralstonia, Alcaligenes latus* และ recombinant *E. coli* มีความสามารถในการผลิต P(3HB) รวมถึงโคโพลิเมอร์อื่นๆในกลุ่ม PHAs ได้โดยใช้น้ำตาลต่างๆ เช่น กลูโคส แลคโตส เป็นแหล่งคาร์บอน (Shilpi & Ashok, 2005)

แต่การผลิตเชิงพาณิชย์ของ PHAs ถูกจำกัดด้วยต้นทุนการผลิตสูงเมื่อเทียบกับพลาสติกสังเคราะห์ (Okwuobi & Ogunjobi, 2012) เนื่องจากผลกระทบของราคาของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิต PHAs ซึ่งมีต้นทุนสูง หนึ่งในวิธีการที่สำคัญในการลดค่าใช้จ่าย คือการใช้ของเหลือทิ้งและผลิตภัณฑ์อื่นที่สร้างขึ้น จากอุตสาหกรรมเกษตรเป็นวัสดุสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (Choi & Lee, 1999; Wagus et al., 2011)

ในประเทศไทยมีของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรจำนวนมาก เช่น กากอ้อย โมลาส เปลือกผลไม้ ฯลฯ ซึ่งน่าจะได้มีการศึกษาถึงการนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป งานวิจัยนี้จึงเป็นการทดลองศึกษาเบื้องต้นเพื่อแยกจุลชีพที่มีความสามารถในการสังเคราะห์ P(3HB) ได้ จากตัวอย่างดินและน้ำที่เก็บจากแหล่งขยะ แหล่งชุมชนและแหล่งอุตสาหกรรมภายในประเทศไทย โดยเริ่มต้นจากการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

2. วัตถุประสงค์

ศึกษาเบื้องต้นเพื่อแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสังเคราะห์ P(3HB) ได้โดยการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จากตัวอย่างดินและน้ำที่เก็บจากแหล่งขยะ แหล่งชุมชนและแหล่งอุตสาหกรรมภายในประเทศไทย หลังจากแยกได้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถสังเคราะห์ P(3HB) แล้วมีการคัดกรองสายพันธุ์ที่สังเคราะห์ P(3HB)ได้ปริมาณ P(3HB) สูงพอที่เหมาะสมจะศึกษาต่อไป

3. อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การเก็บตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างดิน เลือกเก็บบริเวณที่ชุ่มและร่วน โดยขุดลึกลงจากพื้นดินประมาณ 0.5 – 1.0 ฟุต เพื่อให้ได้ดินที่มีความชุ่มชื้นและจุลชีพที่อาศัยในดินไม่ตายจากแสงแดดหรือถูกชะล้างไปจากหน้าดิน เก็บให้ได้ปริมาณ 100 กรัม บรรจุในภาชนะปิดฝาให้เรียบร้อยเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสและทำการทดสอบขั้นต่อไปโดยเก็บไว้ไม่เกิน 24 ชั่วโมง สำหรับตัวอย่างน้ำ เลือกเก็บบริเวณที่เป็นแหล่งน้ำทิ้งชุมชน โดยจ้วงลึกจากผิวน้ำประมาณ 1 ฟุต เก็บให้ได้ปริมาณ 100 มิลลิลิตร บรรจุในภาชนะปราศจากเชื้อ ปิดฝาให้เรียบร้อย เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส และทำการทดสอบขั้นต่อไปโดยเก็บไว้ไม่เกิน 24 ชั่วโมง สถานที่เก็บตัวอย่างได้แก่ ดินจากกองขยะ น้ำจากแหล่งชุมชน แหล่งโรงงานอุตสาหกรรม จากพื้นที่ในบริเวณจังหวัดกรุงเทพมหานครและเขตปริมณฑล เป็นจำนวนทั้งสิ้น 94 ตัวอย่าง

3.2 การเพาะเลี้ยงจุลชีพ นำตัวอย่างจำนวน 1 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ว streak บน NA และ MSA ที่มี 1% glucose เป็นแหล่งคาร์บอนและมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน นำไป อบที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน โดยพิจารณาจาก สี ขนาด ความวาว และอื่นๆ ทำการ subculture ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิมให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้น subculture เชื้อบริสุทธิ์โดยการ streak ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม อบที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจกรองการสร้าง P(3HB) ด้วยการย้อมสี Sudan Black B ต่อไป

3.3 การย้อมสี Sudan Black B ด้วยวิธีสไลด์ ทำการป้ายเชื้อบริสุทธิ์ลงบนแผ่นแก้วสไลด์ เกลี่ยและทิ้งให้แห้ง ตรึงโดยผ่านความร้อน จากนั้นทำการย้อมด้วยสี Sudan Black B ด้วยวิธีที่ประยุกต์จากวิธีดั้งเดิม (Okwuobi และ Ogunjobi, 2012) คือ หยด 0.3% Sudan black B ใน 95% Ethanol (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทิ้งไว้ 10 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปาที่กำลังไหล ย้อมทับด้วย 0.5% aqueous safranine เป็นเวลา 5 วินาที ล้างออกด้วยน้ำประปาที่กำลังไหล ปล่อยให้สไลด์แห้งแล้วตรวจสอบการติดสีด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000x อ่านผลบวกเมื่อ granule ภายในเซล ติดสีน้ำเงินดำ อ่านผลลบเมื่อเซลติดสีแดงของ safranine

3.4 การจำแนกชนิดของจุลชีพที่สามารถสร้าง P(3HB) ทำโดยการย้อมสีแกรม การย้อมสปอร์ด้วยสี malachite green และการทดสอบ mass spectrometry-based proteomics สำหรับการทดสอบ mass spectrometry-based proteomics ดำเนินการโดยห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลนพรัตน์ราชธานี กรุงเทพ

3.5 การสกัดไบโอโพลิเมอร์จากเซลแห้งของ *Bacillus* sp. 25.1M และ *Bacillus* sp. 16.2M ด้วยวิธี chloroform ทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. 25.1M และ *Bacillus* sp. 16.2M บน MSA ที่มี 1%น้ำตาลกลูโคสผสมอยู่ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นขูดเชื้อและล้างเซลหนึ่งครั้งด้วยน้ำกลั่น โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 500 *g* เป็นเวลา 30 นาที อบในตู้อบ (Memmert) ที่ 105 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ ชั่งเซลแห้ง 20 มิลลิกรัมใส่ในหลอดฝาเกลียว เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตรและ 3% H_2SO_4 (ปริมาตร/ปริมาตร) ใน methanol 2 มิลลิลิตรที่มี benzoic internal standard ผสมอยู่ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร อบที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

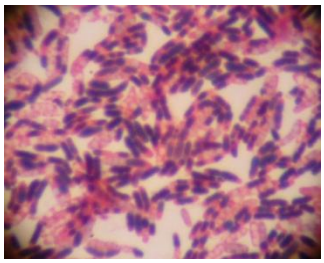
3.5 ชั่วโมง โดยนำออกมาเขย่าทุกๆ 30 นาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็งให้เย็น เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 5 นาที ตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน ดูดชั้นคลอโรฟอร์ม ใส่หลอด vial สำหรับการตรวจสอบ GC-MS ต่อไป โดยทำลักษณะเดียวกันกับสารมาตรฐาน P(3HB)

3.6 การตรวจยืนยันการสร้าง P(3HB) ด้วย Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) นำสารสกัดคลอโรฟอร์ม จากเซลแห้งของ *Bacillus* sp. 25.1M และ *Bacillus* sp. 16.2M และของสารมาตรฐาน P(3HB) จำนวน 1 ไมโครลิตรฉีดเข้าเครื่อง GC-MS (Perkin Elmer Clarus 500 GC/MS 17) โดยใช้ capillary column (MS) ขนาด 30 เมตร x 0.25 มิลลิเมตร เคลือบด้วย DB-5 ที่มีความหนา 0.25 ไมโครเมตร อุณหภูมิคอลัมม์เป็น 80 องศาเซลเซียส และเพิ่มเป็น 150 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียส /นาที อุณหภูมิ injection port เป็น 230 องศาเซลเซียส ความดันของ carrier gas (helium) คงที่มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที

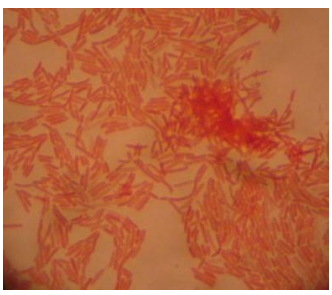
4. ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์

4.1 การคัดกรองจุลชีพที่สามารถสร้าง P(3HB) ที่เจริญบน MSA และ NA ที่มี 1%น้ำตาลกลูโคสผสมอยู่ จากตัวอย่างทั้งสิ้นจำนวน 94 ตัวอย่าง โดยจำแนกเป็นตัวอย่างดินจำนวน 76 ตัวอย่าง (80.85%) โดยแบ่งเป็นตัวอย่างดินจากแหล่งชุมชน 66 ตัวอย่างและจากโรงงานอุตสาหกรรม 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ได้จากน้ำจำนวน 18 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นตัวอย่างน้ำจากแหล่งชุมชน 12 ตัวอย่าง และจากโรงงานอุตสาหกรรม 6 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดได้ทำการเก็บตัวอย่างจากจังหวัดนครนายก 51 ตัวอย่าง (54.26%) จากจังหวัดกรุงเทพมหานคร 43 ตัวอย่าง (45.75%)

จากการตรวจกรองการสร้าง P(3HB) โดยนำตัวอย่างมาเพาะเลี้ยงเชื้อบน MSA และ NA และได้จุลินทรีย์ที่บริสุทธิ์ นำไปตรวจคัดกรองเชื้อที่มีการสร้าง P(3HB) โดยการย้อมด้วยสี Sudan Black B ด้วยวิธีสไลด์ พบว่าจากตัวอย่างทั้งหมด 94 ตัวอย่าง มีแบคทีเรียที่ให้ผลการตรวจกรองเป็นผลบวก จำนวนทั้งสิ้น 71 ไอโซเลต จาก 54 ตัวอย่าง โดยพบเชื้อที่ให้ผลบวกในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NA ที่มี 1%น้ำตาลกลูโคสผสมอยู่ จำนวน 28 ไอโซเลต (39.44%) และในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MSA ที่มี 1%น้ำตาลกลูโคสผสมอยู่ จำนวน 43 ไอโซเลต (60.56%) ผู้วิจัยได้คัดเลือกไอโซเลต ที่มีศักยภาพในการสร้าง P(3HB) สูง จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ 25.1M และ16.2M สำหรับการทดลองขั้นต่อไป ตัวอย่างของผลบวกและผลลบในการย้อมด้วยสี Sudan black B ดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2 ตามลำดับ



รูปที่ 1 แสดงภาพการติดสี Sudan black B ของจุลชีพที่แยกได้และให้ผลบวกโดยพบการติดสีน้ำเงินดำของแกรนูลภายในเซล



รูปที่ 2 แสดงภาพการติดสี Sudan black B ของ*E. coli* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่สร้าง P(3HB) จะแสดงเป็นผลลบโดยเซลติดสีแดงของ safranine และไม่พบการติดสีน้ำเงินดำของแกรนูลภายในเซล

4.2 การจำแนกชนิดของไอโซเลต 25.1M และ16.2M ดำเนินการจำแนกชนิดของไอโซเลต 25.1M และ 16.2M พบว่าทั้งสองเชื้อให้ผลการย้อมสีแกรมเป็น positive bacilli เมื่อย้อมสปอร์พบว่าเป็น endospore ดังแสดงในตารางที่ 1 และเมื่อทำการทดสอบจำแนกชนิดของเชื้อด้วยวิธี mass spectrometry based proteomics พบว่าจากข้อมูลเปรียบเทียบที่มีสรุปในเบื้องต้นได้เพียงว่าเป็น Genus *Bacillus* ดังนั้นจึงให้ชื่อเป็น *Bacillus sp.* 25.1 M และ *Bacillus sp.* 16.2 M

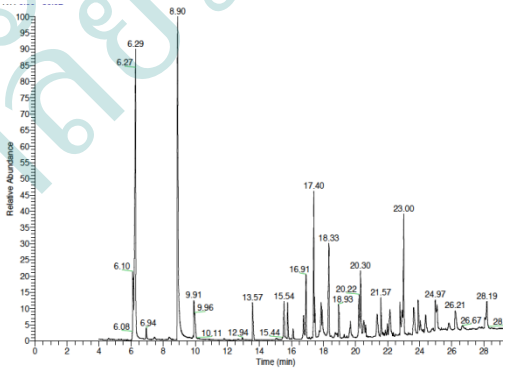
ตารางที่ 1 แสดงผลการย้อมสีแกรมและการย้อมสปอร์ของไอโซเลต 25.1 M และ 16.2 M

ไอโซเลต	Cell morphology	ผลการย้อมสปอร์
25.1M	Gram positive bacilli	endospore
16.2M	Gram positive bacilli	endospore

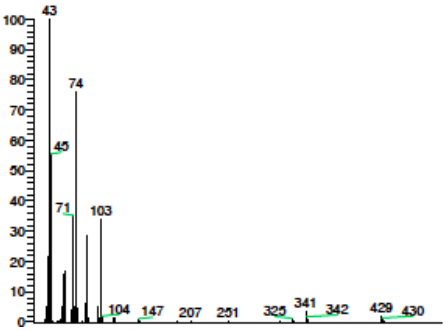
4.3 ผลการตรวจการสร้าง PHB ด้วยวิธี GC-MS เมื่อนำสารสกัดคลอโรฟอร์มจากเซลแห้งของ *Bacillus* sp. 25.1 M และ *Bacillus* sp. 16.2 M ไปตรวจสอบเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน P(3HB) ด้วยวิธี GC-MS โดยพบ P(3HB) peak (นาทีที่ 6) ในสารสกัดคลอโรฟอร์ม จากเซลแห้งของ *Bacillus* sp. 25.1 M และ *Bacillus* sp. 16.2 M ตรงกับ P(3HB) peak ของสารมาตรฐาน และ benzoic internal standard peak ณ ตำแหน่งที่ 8 ดังตารางที่ 2 ตัวอย่างของ GC chromatogram ของสารสกัดคลอโรฟอร์ม จากเซลแห้งของ *Bacillus* sp. 16.2 M ดังรูป 3 (ก) เมื่อตรวจสอบ mass spectrum ของ P(3HB) peak จากสารสกัดchloroform จากเซลแห้งของ *Bacillus* sp. 25.1 M และ *Bacillus* sp. 16.2 M เปรียบเทียบกับ mass spectrum ของสารมาตรฐาน P(3HB) พบว่าสอดคล้องกัน ดังแสดงในรูปที่ 3ข, 3ค และ 3ง ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แสดงตำแหน่งของ PHA peak และ benzoic acid internal standard peak จาก GC chromatogram จากการตรวจยืนยันด้วย GC-MS

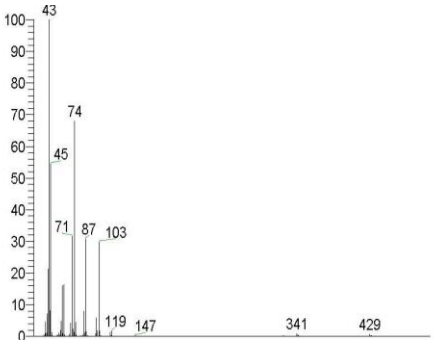
สารสกัดคลอโรฟอร์ม	ตำแหน่ง PHA peak (นาที)	ตำแหน่ง benzoic acid peak (นาที)
P(3HB) มาตรฐาน	6.33	8.97
Bacillus sp. 25.1 M	6.26	8.93
Bacillus sp. 16.2M	6.29	8.90



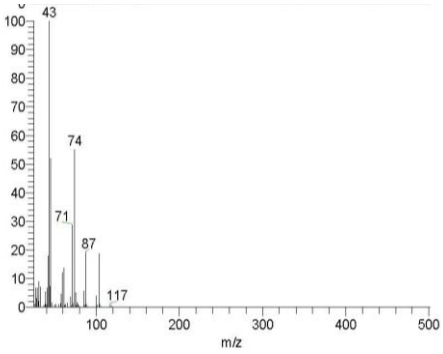
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

รูปที่ 3 แสดงตัวอย่างของ GC chromatogram ของสารสกัดคลอโรฟอร์ม จากเซลแห้งของ *Bacillus* sp. 16.2 M (ก) และ mass spectrum ของ PHA peak ของสารสกัดคลอโรฟอร์มจากเซลแห้งของ *Bacillus sp.* 25.1 M (ข) *Bacillus* sp. 16.2 M (ค) และสารมาตรฐาน P(3HB) (ง)

5. การอภิปรายผล

5.1 การศึกษาตรวจกรองจุลชีพที่มีการสร้าง P(3HB) จากตัวอย่างดินและน้ำทั้งหมด 94 ตัวอย่างพบ เชื้อ 60.56% ที่ผลบวกเมื่อเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MSA ซึ่งมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NA (39.44%) แสดงว่าสามารถพบแบคทีเรียที่มีการสร้าง PHAs บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งชนิด MSA และบน NA โดยในงานวิจัยนี้พบว่า MSA สามารถใช้แยกเชื้อที่สร้าง P(3HB) ได้ดีกว่าซึ่งสอดคล้องกับจากงานวิจัยของ Lee S.Y. (1996) ได้ศึกษาปัจจัยด้านอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการสร้าง PHAs ของเชื้อแบคทีเรีย และได้แบ่งแบคทีเรียที่สามารถสร้าง PHAs เป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 แบคทีเรียที่ใช้สารอาหารในปริมาณจำกัด คือ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียมโปแทสเซียม ออกซิเจน หรือซัลเฟอร์ แต่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งอาหารในการสังเคราะห์ PHAs ได้แก่ *Ralstonia eutrophus, Protomonas extorquens, Pseudomonas oleovorans* และกลุ่มที่ 2 แบคทีเรียที่ไม่ต้องจำกัดปริมาณสารอาหารในการสังเคราะห์ PHAs และสามารถเพิ่มปริมาณพอลิเมอร์ในระหว่างการเติบโต ได้แก่ *Alcaligenes latus, Azotobacter vinelandi* ที่ผ่านการทำให้กลายพันธุ์ และรีคอมบิแนนต์ของเชื้อ *E.coli* ที่ได้รับยีนจาก *Ralstonia eutrophus*

5.2 ด้วยข้อจำกัดของข้อมูลในการจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธี mass spectrometry based proteomics ทำให้สามารถระบุได้เพียง genus ของไอโซเลต 25.1M และ16.2M ซึ่งในการศึกษาต่อไปอาจต้องอาศัยเทคนิคอื่นๆ เช่น เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ศึกษายีนของ 16S rDNA โดยการทำ DNA sequencing ซึ่งจะสามารถช่วยในการจำแนกชนิดเชื้อให้ชัดเจนยิ่งขึ้น

5.3 จากการตรวจยืนยันการสร้างสารกลุ่ม PHAs ของ *Bacillus* sp. 25.1 M และ *Bacillus* sp. 16.2 M พบว่าจุลชีพทั้งสองที่แยกได้นั้นสามารถสร้าง PHB ได้เนื่องจากตรวจพบสารอย่างน้อยหนึ่งชนิดในสารสกัดคลอโรฟอร์ม ที่ให้ mass spectrum สอดคล้องกับ mass spectrum ของสารมาตรฐาน P(3HB) (รูปที่ 3)

6. บทสรุป

จากการศึกษาเพื่อแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินในประเทศไทยที่สามารถสร้าง P(3HB) ได้ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบน MSA ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในครั้งนี้ สามารถคัดเลือก *Bacillus* sp. 25.1M

และ *Bacillus* sp. 16.2M ที่มีศักยภาพสูงเพื่อทำการศึกษาในขั้นต่อไป ซึ่งจะเป็นการศึกษาเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB ให้มีปริมาณสูงและศึกษาความสามารถของจุลชีพดังกล่าวในการใช้ของเหลือทิ้งในอุตสาหกรรมเกษตรต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน รวมถึงความสามารถในการผลิตโพลิเมอร์อื่นๆ ในกลุ่ม PHAs นอกเหนือจาก P(3HB)

7. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลนพรัตน์ราชธานี ที่เอื้อเฟื้อการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อ ขอขอบคุณคุณจิตสุภา ใช้ช้าง คุณชัญญา รอดหมาน คุณนุชนาถ เส้งชู คุณรัชฎาภรณ์ ชาภักดีและคุณวรางรัตน์ หมั่นการ สำหรับการเก็บตัวอย่างและตรวจกรองเชื้อเบื้องต้น

8. เอกสารอ้างอิง

Chen, G.Q., Wu, Q., Wang, Y.& Zheng, Z,. (2005). Application of microbial polyesters-polyhydroxyaldanoates as tissue engineering materials. *Key Eng. Mater.,* 437- 440: *288-289*

Choi, J. & Lee, S.Y. (1999) Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol,51*,13-21.

Okwuobi, P.N. & Ogunjobi, A.(2012). Characterization of polyhydroxyalkanoate (PHA) produced by *Bacillus species* isolated from garden soil. *New York Sci J. 5*(912): 159-163.

Lee S.Y.(1996).Plastic bacteria? progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends Biotechnol. 14*: 431-8.

Leda R.C., David A.M.& Denise M.G.F. (2009). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresource Technol. 1005*: 996-6009.

Mamtesh, S., Danjay K.S.P.& Vipin C.K. (2009). *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microb Cell Fact. 8*: 38-49.

Shilpi, K., & Ashok K.S. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochem. 40*: 607-619.

Waqas, N. C., Nazia, J., Iftikhar, A., Mian, H.& Ayaz, S.H.(2011).Screening for polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacterial strains and comparison of PHA production from various inexpensive carbon sources. *Ann Microbiol. 61*(3): 623-629.

Wiggam, M.I., O'Kane, M.J., Harper, R., Atkinson, A.B., Hadden, D.R.& Trimble, E.R. (1997). Treatment of diabetic ketoacidosis using normalization of blood 3-hydroxy-butyrate concentration as the endpoint of emergency management. *Diabetes Care. 20*: 1347-1352.