

การคัดแยกและระบุเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตพลาสติก  
ชีวภาพประเภทพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (พีเอชบี)  
Screening and Identification of Polyhydroxybutyrate  
(PHB) producing bacteria



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานปีการศึกษา 2565 อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# Screening and Identification of Polyhydroxybutyrate (PHB) producing bacteria

The seal of King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang is a circular emblem. It features a central five-tiered umbrella (parasol) with a sunburst above it. The emblem is surrounded by Thai script. The text inside the seal includes 'สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง' (King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang) and 'กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม' (Ministry of Higher Education, Science, Research and Innovation).

Artittaya Tipbumrab  
Arporn Aunkham

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE  
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY) DEPARTMENT OF BIOLOGY  
SCHOOL OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
ACADEMIC YEAR 2022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดแยกและระบุเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพประเภทพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (พีเอชบี) Screening and Identification of Polyhydroxybutyrate (PHB) producing bacteria
ชื่อนักศึกษา	นางสาวอาทิตย์ดา ทิพย์บำรุง รหัสนักศึกษา 62050666 นางสาวอาภรณ์ อุ่นคำ รหัสนักศึกษา 62050667
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. ธิพย์ วัฒนวิจารณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ ประธานกรรมการ	
ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการ	
ผศ.ดร.ธิพย์ วัฒนวิจารณ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

#### ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดแยกและระบุเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพประเภทพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (พีเอชบี)
ชื่อนักศึกษา	นางสาวอาทิตตยา ทิพย์บำรุง รหัสนักศึกษา 62050666 นางสาวอาภรณ์ อุ่นคำ รหัสนักศึกษา 62050667
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

### บทคัดย่อ

โครงการพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (Polyhydroxybutyrate: PHB) จากตัวอย่างในแหล่งธรรมชาติ ได้แก่ ดินเพาะปลูก น้ำคลองจากแหล่งชุมชน ดินป่าชายเลน และน้ำผุ จากการคัดแยกแบคทีเรียโดยวิธีการย้อมสี Sudan Black B และตรวจสอบยืนยันด้วย Nile Blue A ผลการทดลองพบแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดเลือกได้ 102 ไอโซเลท และพบการติดสีของ Sudan Black B ทั้งหมด 27 ไอโซเลท หลังจากทำการยืนยันด้วย Nile Blue A พบไอโซเลทที่มีการเรืองแสงมากที่สุด ได้แก่ CW12, MS4, RW7 และ RW13 จากการศึกษาการเจริญและการผลิตพีเอชบี ของแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชบีได้สูงสุด คือ ไอโซเลท CW12 คือ 0.26 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.61 กรัมต่อลิตร และคิดเป็น %PHB content เท่ากับ 43.17% โดยเมื่อตรวจสอบคุณสมบัติของพีเอชบีที่แบคทีเรียไอโซเลท CW12 ผลิตได้เปรียบเทียบกับพีเอชบีมาตรฐาน ด้วยวิธี FT-IR พบว่า พอลิเมอร์ชนิดนี้เป็นพีเอชบี จากการวิเคราะห์ลักษณะสัญญาณวิทยาโดยการย้อมสีแกรมพบว่าไอโซเลท CW12 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ

**คำสำคัญ :** พลาสติกชีวภาพ, พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>The Title</b>	Screening and Identification of Polyhydroxybutyrate (PHB) producing bacteria
<b>Student Name</b>	Ms.Artittaya Tipbumrab Student ID 62050666 Ms.Arporn Aunkham Student ID 62050667
<b>Degree</b>	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
<b>Department</b>	Biology
<b>School</b>	Science
<b>University</b>	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
<b>Academic Year</b>	2022
<b>Advisor</b>	Asst. Prof. Tipachai Vatanavicharn

### Abstract

The objective of the special project is to screen and identify bacteria that produce polyhydroxybutyrate (PHB) from various natural samples such as cultivation soil, canal water, mangrove soil, and rotted wood. In this project, the bacteria were isolated using Sudan Black B staining and further confirmed using Nile Blue A staining. A total of 102 bacterial isolates were identified, and out of these, 27 isolates were stained with Sudan Black B after Nile Blue A confirmation. Among these stained isolates, the most fluorescent ones were CW12, MS4, RW7, and RW13. Further investigation was conducted on these four isolates to study bacterial growth and PHB production. The results showed that CW12 had the highest number of PHB-producing bacteria. The isolate CW12 exhibited a dry cell weight of 0.26 g/l and a PHB content of 0.61 g/l, equivalent to 43.17% PHB content. To determine the nature of the PHB produced by CW12, a comparison was made with standard PHB using the FT-IR method. The analysis confirmed that the polymer produced by CW12 was indeed PHB. In addition, morphological characterization using Gram staining revealed that the CW12 isolate belongs to the group of Gram-negative bacteria.

**Key words :** Bioplastic, Polyhydroxybutyrate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งมอบสิทธิ์การใช้งานเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจาก ได้รับความช่วยเหลือและได้รับความอนุเคราะห์จากบุคลากรหลายฝ่ายด้วยกัน ทำให้ผู้วิจัยสามารถดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงได้ ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ อาจารย์ประจำภาควิชา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และกรรมการ ที่ให้ความช่วยเหลืออีกทั้งยังให้ข้อเสนอแนะ ช่วยแก้ไขปัญหาและปรับปรุงให้โครงการพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ และดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการ และกรรมการที่ให้ข้อเสนอแนะให้แก่โครงการพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับการใช้เครื่องมือในงานวิจัย อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ และสารเคมีในการทดลอง

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ วิสันต์ เชื้อวงศ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ แก้ไขปัญหา อีกทั้งให้ข้อเสนอแนะจนโครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จ

และขอขอบพระคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้อง ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้การสนับสนุน และให้กำลังใจแก่ผู้ทำการวิจัย ให้โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จได้อย่างสมบูรณ์

อาทิตตยา ทิพย์บำรุง  
อาภรณ์ อุ่นคำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	(ข)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	(ค)
สารบัญ.....	(จ)
สารบัญตาราง.....	(ช)
สารบัญรูปภาพ.....	(ณ)
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	(ญ)
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขต.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>3</b>
2.1 พลาสติกชีวภาพ (Bioplastics).....	3
2.1.1 พลาสติกสลายตัวได้ทางชีวภาพ (compostable plastics).....	4
2.1.2 พลาสติกที่ผลิตจากชีวมวล (biobased-plastics).....	4
2.2 อุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ.....	4
2.3 พอลิไฮดรอกซีอัลคานอเอต (Polyhydroxyalkanoate, PHA).....	5
2.4 พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB).....	5
2.4.1 โครงสร้างทางเคมีของ PHB.....	6
2.4.2 ลักษณะ และคุณสมบัติทั่วไปของ PHB.....	6
2.5 การประยุกต์ใช้ PHB ในอุตสาหกรรม.....	7
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
<b>บทที่ 3 วิธีการทดลอง.....</b>	<b>9</b>
3.1 เครื่องมือ.....	9
3.2 อุปกรณ์.....	9
3.3 สารเคมี.....	10
3.4 สถานที่เก็บตัวอย่าง.....	10
3.5 การเก็บตัวอย่าง.....	10
3.6 การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตพีเอชบี.....	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นกรณีที่มีเหตุจำเป็นและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
3.7 การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์.....	11
3.8 การย้อมสี Sudan Black B.....	11
3.8.1 การย้อมสี Sudan Black B ในเพลท.....	11
3.8.2 ตรวจสอบยีนโดยย้อมสี Sudan Black B บนสไลด์.....	11
3.9 การตรวจสอบสัณฐานวิทยาโดยการย้อมแกรม.....	12
3.10 การตรวจยีนยีนด้วย Nile Blue A.....	12
3.11 ศึกษาการสกัดพีเอชบีจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ.....	12
3.11.1 การเตรียมหัวเชื้อ.....	12
3.11.2 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง.....	13
3.11.3 การสกัดพอลิไฮดรอกซีบีวทิเรต.....	13
3.12 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย.....	13
3.12.1 การจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ที่บริเวณยีน <i>16s rDNA</i> .....	14
3.13 การตรวจยีนยีนการสร้างพีเอชบีด้วย Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).....	15
3.14 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	15
<b>บทที่ 4 ผลและวิจารณ์การทดลอง.....</b>	<b>16</b>
4.1 การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชบี.....	16
4.1.1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียโดยการย้อมสี Sudan Black B.....	16
4.1.2 การคัดเลือกเชื้อที่ยืนยันจากการติดสี Sudan Black B บนสไลด์ และ การเรืองแสงของ Nile Blue A.....	18
4.2 ผลการสกัดน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพีเอชบีของเชื้อแบคทีเรีย.....	19
4.3 ผลการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ที่บริเวณยีน <i>16s DNA</i> .....	21
4.4 ผลการตรวจยีนยีนการสร้างพีเอชบีด้วย Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).....	23
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>25</b>
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	25
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นหากมีเหตุตบแต่งเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
เอกสารอ้างอิง.....	27
<b>ภาคผนวก.....</b>	<b>30</b>
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....	31
ภาคผนวก ข สถานที่เก็บตัวอย่าง.....	32
ภาคผนวก ค ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย.....	33
ภาคผนวก ง ผลการสกัดน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพีเอชบีของเชื้อแบคทีเรีย.....	41
ภาคผนวก จ การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	44
ภาคผนวก ฉ ผังงานวิธีการดำเนินการ.....	50



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 3.1	14
ตารางที่ 4.1	17
ตารางที่ 4.2	18
ตารางที่ 4.3	19

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน *16s rDNA*.....14

ตารางที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีที่คัดแยกได้จากการยีสันจากการติดสี Sudan Black B.....17

ตารางที่ 4.2 ผลการยีสันจากการติดสี Sudan Black B บนสไลด์ และการเรืองแสง  
ของ Nile Blue A.....18

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร), น้ำหนักพีเอชบี (กรัมต่อลิตร)  
และ %PHB content ที่ได้จากการผลิตพีเอชบีในอาหาร nutrient broth ของ  
แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ CW12, MS4, RW7 และ RW13 ตาม  
ลำดับ โดยเปรียบเทียบกับ *B.megaterium* SWU01 (TISTR10144).....19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
รูปที่ 2.1 การสลายตัวกลายเป็นปุ๋ยของพลาสติกสลายตัวได้ทางชีวภาพ (compostable plastics).....	3
รูปที่ 2.2 โครงสร้างทั่วไปของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate, PHA).....	5
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต.....	6
รูปที่ 4.1 แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักพีเอชบี (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการผลิตพีเอชบีในอาหาร nutrient broth ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ CW12, MS4, RW7 และ RW13 ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับ <i>B.megaterium</i> SWU01 (TISTR10144).....	20
รูปที่ 4.2 แสดง %PHB content ที่ได้จากการผลิตพีเอชบีในอาหาร nutrient broth ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ CW12, MS4, RW7 และ RW13 ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับ <i>B.megaterium</i> SWU01 (TISTR10144).....	21
รูปที่ 4.3 เลนที่ 1-4 ใช้ไพรเมอร์ P085_16sNEW-F และ P086_16sNEW-R เลนที่ 5-8 ใช้ไพรเมอร์ P021-16s-F และ P021-16s-R และเลนที่ 9 คือ Marker ซึ่งเลนที่ 1,5 = CW12, เลนที่ 2,6 = MS4, เลนที่ 3,7 = RW7, เลนที่ 4,8 = RW13.....	22
รูปที่ 4.4 (ก) FTIR-Spectra ของพีเอชบีมาตรฐาน.....	24
(ข) FTIR-Spectra ของพีเอชบีที่สกัดได้จากไอโซเลท CW12.....	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
DCW	dry cell weight
FT-IR	Fourier-transform infrared spectroscopy
KBr	Potassium Bromide
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
PCR	Polymerase Chain reaction
PHB	polyhydroxybutyrate



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันขยะพลาสติกเป็นปัญหาที่หลายประเทศทั่วโลกกำลังเผชิญอยู่โดยเฉพาะประเทศไทย ในปี 2565 มีการสร้างขยะพลาสติกต่อประชากรสูงเป็นอันดับที่ 5 ของโลก โดยมีปริมาณขยะพลาสติก 4,796,494 ตัน/ปี (หรือราว 69.54 กิโลกรัม/ปี/คน) และมีสัดส่วนขยะพลาสติกในขยะทั่วไปมากเป็นอันดับที่ 3 ของโลก ปริมาณพลาสติกในประเทศไทย แบ่งเป็นประเภทถุงพลาสติก 1.11 ล้านตัน ขวดพลาสติก 0.40 ล้านตัน แก้ว ก่อ่ง และภาชนะพลาสติก 0.23 ล้านตัน โดยส่วนใหญ่จะถูกทิ้งเป็นขยะมูลฝอยในปริมาณและสัดส่วนที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เพราะขยะพลาสติกมีความคงทน และสามารถทนต่อแรงอัดได้สูง จึงใช้พื้นที่ในการฝังกลบมากกว่าขยะประเภทอื่น อีกทั้งยังใช้เวลาในการย่อยสลายนับร้อยปี ทำให้ต้องสิ้นเปลืองงบประมาณและพื้นที่ฝังกลบ (สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2565) ด้วยเหตุนี้นักวิทยาศาสตร์จึงได้ศึกษาค้นคว้า และผลิตพลาสติกชีวภาพขึ้นมาทดแทนเพื่อช่วยลดปัญหามลพิษในสิ่งแวดล้อม (สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553) เนื่องจากพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้ง่ายกว่าเมื่อเทียบกับพลาสติกสังเคราะห์ ซึ่งพลาสติกชีวภาพมีกลไกการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และแบคทีเรียในธรรมชาติ เมื่อย่อยสลายแล้วจะได้น้ำ มวลชีวภาพ ก๊าซมีเทน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช และไม่ก่อให้เกิดผลเสียเหมือนพลาสติกทั่วไป เพราะพลาสติกชีวภาพมีกระบวนการย่อยสลายที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากกว่า (Srisawat Inter Color, 2021) จึงได้รับความสนใจในปัจจุบันทั้งในงานวิจัย ในทางการแพทย์ และเกษตรกรรม เช่น พอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid ; PLA), พอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ (Polyhydroxyalkanoates ; PHAs) และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate ; PHB) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของพลาสติกชีวภาพในตระกูล PHAs แต่เนื่องจากพลาสติกชีวภาพยังมีต้นทุนที่สูงอยู่จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยม แต่อย่างไรก็ตาม ปัญหาพลาสติกสังเคราะห์ที่มีเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ และยากต่อการกำจัดเพราะจุลินทรีย์ในธรรมชาติย่อยสลายได้ยาก และก่อให้เกิดปัญหามลพิษตามมามากมาย จึงทำให้พลาสติกชีวภาพหรือพลาสติกที่ย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์เข้ามามีบทบาทมากขึ้นเพื่อที่จะทดแทนการใช้พลาสติกสังเคราะห์ (สมคิด และคณะ, 2553)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาคัดแยกและระบุหาเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพประเภทพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยงานวิจัยนี้ได้เลือกแหล่งธรรมชาติในการคัดแยกแบคทีเรีย ได้แก่ ดินจากแหล่งเพาะปลูก ดินจากป่ายชายเลน น้ำจากคลอง และไม้ผุ เพราะพื้นที่เหล่านี้อุดมไปด้วยเอ็กสตรันต์และสารอาหารที่จำเป็นสำหรับแบคทีเรีย เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการช่วยส่งเสริมความยั่งยืนของสิ่งแวดล้อม ซึ่งสิ่งนี้เองก็สอดคล้องกับเป้าหมายการพัฒนาที่ยั่งยืนของประเทศไทย 2030 ที่มุ่งเน้นการพัฒนาที่ยั่งยืนโดยไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม (ประเทศไทย, 2018) อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตพลาสติกชีวภาพ ให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น การผลิตพลาสติกชีวภาพในระดับอุตสาหกรรมอีกด้วย

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อหาเชื้อที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพประเภท Polyhydroxybutyrate (PHB) ได้
- 2) เพื่อสามารถจำแนกและระบุเชื้อที่ผลิตพลาสติกชีวภาพประเภท Polyhydroxybutyrate (PHB) ได้

## 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

- 1) คัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติ ที่คาดว่าจะพบแบคทีเรีย 4 แหล่ง
- 2) คัดแยกแบคทีเรียทั้งหมด 20 ตัว จากแหล่งธรรมชาติ ที่คาดว่าจะพบแบคทีเรีย 4 แหล่ง
- 3) ระบุเชื้อที่สามารถผลิตพีเอชบี ได้ดีที่สุด 1 ตัว

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ได้แบคทีเรียที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพประเภทพีเอชบี อย่างน้อย 1 ตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 พลาสติกชีวภาพ (Bioplastics)

พลาสติกชีวภาพ หมายถึง พลาสติกที่ผลิตจากวัตถุดิบทางการเกษตรหรือจากธรรมชาติ สามารถปลูกหมุนเวียนและทดแทนกันได้โดยใช้ระยะเวลาอันสั้น เช่น ข้าวโพด อ้อย มันสำปะหลัง โดยมีคุณสมบัติทั้งสามารถย่อยสลายตัวได้และย่อยสลายตัวไม่ได้ทางชีวภาพ (บริษัทไปโออีโค, 2564) โดยความสามารถในการสลายตัวทางชีวภาพที่เกิดจากกระบวนการทางเคมี ซึ่งอาจเป็นจุลินทรีย์หรือทางชีวภาพอื่น ๆ ที่เปลี่ยนรูปแบบของวัสดุประเภทหนึ่งไปเป็นสารอินทรีย์ เช่น น้ำ หรือ คาร์บอนไดออกไซด์ และการย่อยสลายทางชีวภาพนี้จะมีตัวแปรอื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น อุณหภูมิ ความดัน ความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น (ภิเชก, 2563) ปัจจุบันมีการใช้ศัพท์ที่เกี่ยวข้อง 2 คำ คือ พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastics) หมายถึง การที่พลาสติกแตกออกโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิต ต้องอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจึงจะเกิดการย่อยได้อย่างสมบูรณ์ และพลาสติกสลายตัวได้ทางชีวภาพ (compostable plastics) หมายถึง พลาสติกที่สามารถสลายตัวได้เป็นแร่ธาตุและสารประกอบในธรรมชาติ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ รวมถึงชีวมวล โดยพลาสติกชนิดนี้สามารถสลายตัวทางชีวภาพในสภาวะควบคุมที่เหมาะสมในการหมักปุ๋ยระดับอุตสาหกรรมหรือเครื่องหมักปุ๋ยจากเศษอินทรีย์ (สถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม, 2562)



รูปที่ 2.1 การสลายตัวกลายเป็นปุ๋ยของพลาสติกสลายตัวได้ทางชีวภาพ (compostable plastics)

ที่มา : สถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม (2562)

โดยพลาสติกชีวภาพยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.1 พลาสติกสลายตัวได้ทางชีวภาพ (compostable plastics)

เป็นพลาสติกที่อาจผลิตจากวัตถุดิบชีวมวล หรือปิโตรเคมีก็ได้ เช่น พอลิแล็กติกแอซิด (Polylactic Acid, PLA) พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตส์ (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (Polybutylene Succinate, PBS) พลาสติกกลุ่มนี้ เมื่อผ่านกระบวนการหมักทางชีวภาพจะย่อยสลายจนไม่หลงเหลือสิ่งที่ยังมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า สิ่งแปลกปลอมหรือสารพิษ (สถาบันพลาสติก, 2556)

### 2.1.2 พลาสติกที่ผลิตจากชีวมวล (biobased-plastics)

เป็นพลาสติกที่ผลิตจากวัตถุดิบทางการเกษตร เช่น น้ำตาล แป้ง น้ำมัน หรือเซลลูโลสที่ได้จากพืช ซึ่งเป็นทรัพยากรที่ใช้แล้วไม่หมดไป สามารถปลูกขึ้นมาทดแทนใหม่ได้ (renewable resources) ตัวอย่างพลาสติกชีวภาพกลุ่มนี้ เช่น โพลีเอสเตอร์ที่ใช้วัตถุดิบจากโพรเพนไดออลจากพืช (bio-propanediol, bio-PDO) พอลิเอทิลีน (bio-polyethylene, bio-PE) พีวีซี (bio-polyvinylchloride, bio-PVC) และเพท (bio-PET) เป็นต้น (สถาบันพลาสติก, 2556)

## 2.2 อุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ

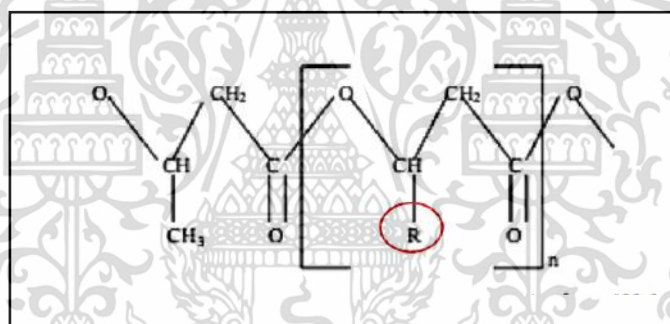
พลาสติกชีวภาพในตลาดโลกมีการเติบโตอย่างรวดเร็วในระหว่างปี 2003-2007 ประมาณปีละ 38% การผลิตพลาสติกชีวภาพทั่วโลกมีเพียงประมาณ 1 ล้านตันต่อปีเท่านั้น ส่วนใหญ่อยู่ในทวีปอเมริกาประมาณ 46%, เอเชีย 35%, และยุโรป 19% ซึ่งสัดส่วนของพลาสติกชีวภาพเมื่อเทียบกับพลาสติกทั่วไป มีเพียง 1% และเพิ่มขึ้น 2-3% ในปี 2020 จากปริมาณการใช้พลาสติกชีวภาพจากทั่วโลก มากกว่า 300 ล้านตัน มูลค่าของ Green chemicals อย่างไรก็ตามเนื่องจากพลาสติกชีวภาพนั้นมีราคาสูงกว่าพลาสติกทั่วไป จึงทำให้การใช้พลาสติกชีวภาพเป็นเพียงทางเลือกหนึ่งของผู้บริโภคเท่านั้น และเติบโตในตลาดที่มีความเฉพาะเจาะจง โดยพลาสติกชีวภาพตอบสนองความต้องการในอุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์มากที่สุด รองลงมาเป็นอุตสาหกรรมเส้นใย และในอนาคตคาดว่าพลาสติกชีวภาพจะมีการเติบโตมากขึ้น โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร และนวัตกรรมใหม่ ๆ ในด้านการแพทย์ เป็นต้น พลาสติกชีวภาพถือเป็นพลาสติกทางเลือกชนิดหนึ่ง ที่มีคุณสมบัติทั้งเหมือนและแตกต่างไปจากพลาสติกทั่วไป ขึ้นกับว่าเป็นพลาสติกประเภทอะไรและจะนำไปใช้งานอย่างไร โดยพลาสติกชีวภาพเป็นอุตสาหกรรมหนึ่งซึ่งนับได้ว่าเป็นอุตสาหกรรมใหม่ และเป็นแนวโน้มของโลกที่มีการเริ่มวิจัยและผลิตเป็นการค้าในทวีปอเมริกา และมีการใช้ในกลุ่มประเทศยุโรป สำหรับประเทศในเอเชียที่เริ่มเริ่มพัฒนาผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพ ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น เป็นต้น ซึ่งสำหรับประเทศไทยนั้นมียุทธศาสตร์พลาสติก รวมทั้งบุคลากรด้านการวิจัยและพัฒนา ที่มีศักยภาพในการสร้าง

เทคโนโลยี หรือสามารถรองรับการถ่ายทอดเทคโนโลยีจากต่างประเทศ ประกอบกับการที่ประเทศไทย เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า เป็นประเทศเกษตรกรรม หากมีอุตสาหกรรมผลิตเม็ดพลาสติกชีวภาพจากวัตถุดิบการเกษตร ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผู้ประกอบการสามารถนำไปสร้างคอมพาวด์ และขึ้นรูปผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพได้ (สถาบันพลาสติก, 2556)

### 2.3 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate, PHA)

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHA) เป็นสารพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติของเทอร์โมพลาสติกซึ่งใกล้เคียงกับพลาสติกที่ใช้ในปัจจุบัน โดยโครงสร้างทั่วไปของพีเอชเอ เป็นดังรูปที่ 2.4 พีเอชเอถูกสังเคราะห์และสะสมในเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน ภายใต้ภาวะปกติ (normal condition) หรือภายใต้ภาวะการเจริญที่ไม่สมดุล สามารถย่อยสลายทางชีวภาพโดยไม่มีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย (พรทิพพา, 2564) โดยแบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่นำมาใช้ประโยชน์ในการผลิต PHAs ในระดับอุตสาหกรรม เช่น *Azotobacter vinelandii*, *Ralstonia eutropha* (ฉันทชนก และวุดนิษฐ์, 2559) ซึ่ง PHA ที่เชื้อแบคทีเรียผลิตขึ้นที่มีการศึกษากันมากที่สุด คือ พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB) เนื่องจากมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกที่กันทั่วไปมากที่สุด (ดุขฎฐิ และคณะ, 2560)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างทั่วไปของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate, PHA)  
ที่มา : ประดิษฐ์ เอี่ยมสะอาด (2560)

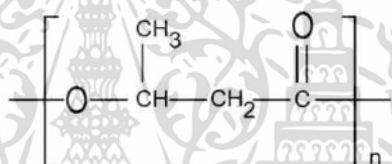
### 2.4 พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB)

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ถูกค้นพบครั้งแรก โดย Maurice Lemoigne ในปี ค.ศ. 1926 ณ สถาบันปาสเตอร์ ประเทศฝรั่งเศส โดยพีเอชบีที่ค้นพบ คือ เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus megaterium* (Luengo et al., 2003) ซึ่ง พีเอชบีเป็นสารชีวโมเลกุลเชิงซ้อนในกลุ่มไขมันที่สะสมได้ในสิ่งมีชีวิตและเป็นส่วนหนึ่งของสารประกอบที่พบมากที่สุดในกลุ่มพีเอชเอ ซึ่งเป็นพลาสติกที่ย่อยสลายตัวได้ทางชีวภาพ ที่เกิดจากการสะสมของคาร์บอนในเซลล์จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์เป็นพอลิเมอร์ได้ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพีเอชบีได้ เช่น *Alcaligenes*, *Azobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* และ *Alcaligenes eutrophus* (Barham, 1984) ในขั้นตอนแรกจะใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับว่าเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์สำหรับผลิตพีเอชบี ซึ่งมีต้นทุนในการผลิตสูงกว่าการผลิตพอลิไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมอร์จากปิโตรเคมี ซึ่งปัจจุบัน พีเอชบียังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนัก แต่ก็ได้มีการพัฒนาโดยใช้แหล่งสารประกอบคาร์บอนจากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ข้าว อ้อย มัน ลำปะหลัง และทำให้ผลผลิตที่ได้ในอุตสาหกรรม เช่น กากน้ำตาล กลีเซอรอล คาร์บอนไดออกไซด์ มาใช้ในการสังเคราะห์พีเอชบี จึงส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตลดลง ทำให้พีเอชบีถูกนำมาใช้มากขึ้น เช่น ภาชนะบรรจุอาหาร, ชิ้นส่วนรถยนต์, พลาสติกคลุมดิน, อุปกรณ์ทางการแพทย์ เป็นต้น

#### 2.4.1 โครงสร้างทางเคมีของพีเอชบี

พีเอชบีจัดเป็นพอลิเมอร์ สายสั้นที่อยู่ในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีแอลคานอยด์ (PHA) ที่มีโครงสร้างทางเคมี ที่ประกอบด้วย หมู่เอสเทอร์ (Ester) หมู่คาร์บอนิล (Carbonyl) และหมู่เมทิล (Methyl) จัดเป็นสารประเภท อะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ (Aliphatic polyester) โดยสะสมอยู่ในเซลล์ของจุลินทรีย์ พีเอชบีได้รับความสนใจในวงการอุตสาหกรรมพลาสติกอย่างมาก เนื่องจากมีคุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพใกล้เคียงกับพอลิเมอร์สังเคราะห์



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต  
ที่มา : material selection (2023)

#### 2.4.2 ลักษณะ และคุณสมบัติทั่วไปของพีเอชบี

พีเอชบีเป็นสารที่มีลักษณะคล้ายไขมัน ลอยตัวเป็นก้อนอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์แบคทีเรีย ทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานให้แก่เซลล์ โดยลักษณะทางกายภาพของพีเอชบี จะมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว (สมคิด, 2553) และคุณสมบัติทั่วไปของพีเอชบี มีดังนี้

1. พีเอชบีไม่สามารถละลายน้ำได้ และต้านทานต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส
2. พีเอชบีสามารถต้านทานต่อรังสีอัลตราไวโอเล็ต และออกซิเจนสามารถซึมผ่านได้ดี
3. พีเอชบีละลายได้ในคลอโรฟอร์ม และสารประกอบคลอริเนตไฮโดรคาร์บอน อื่น ๆ
4. พีเอชบีมีความสามารถเข้ากันได้กับเซลล์ หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต จึงทำให้สามารถนำไปใช้ผลิตพลาสติกชีวภาพที่ใช้ในทางการแพทย์ได้
5. พีเอชบีสามารถทนความร้อนได้ถึง 175 องศาเซลเซียส
6. พีเอชบีสามารถจมน้ำได้ดี ทำให้ถูกย่อยสลายในสถานะที่ไม่ใช้อากาศได้ (ศิริวรรณ, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.5 การประยุกต์ใช้พลาสติกชีวภาพในอุตสาหกรรม

จากปัญหาการสะสมของพลาสติกสังเคราะห์ที่ไม่ย่อยสลาย ส่งผลให้มีการหาแนวทางในการแก้ปัญหาของพลาสติกสังเคราะห์ แต่ต้นทุนในการผลิตพลาสติกชีวภาพมีราคาสูง ในระดับอุตสาหกรรมจึงต้องการสายพันธุ์จุลินทรีย์ ที่สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว ใช้สารอาหารราคาถูกได้ และต้องมีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ ซึ่งจุลินทรีย์ในธรรมชาติมีความหลากหลาย และอาจจะยังไม่เคยถูกคัดเลือกมาใช้ประโยชน์ ดังนั้นการคัดเลือกจุลินทรีย์จึงมีความสำคัญ เพื่อที่จะนำไปเป็นแนวทางการพัฒนาการผลิตพลาสติกชีวภาพในระดับอุตสาหกรรมได้ (วรัญญา และคณะ, 2553) เช่น

1. อุตสาหกรรมทางการแพทย์ เช่น เป็นวัสดุในงานศัลยกรรม, ใช้ทำหลอดเลือดเทียม กระจกเทียม ผ้าซับเลือด ไหมละลาย เป็นต้น (วาสนา, 2565)
2. อุตสาหกรรมทางการเกษตร เช่น วัสดุคลุมหน้าดิน เมื่อเกิดการย่อยสลายจะไม่ส่งผลเสียต่อพืชทางการเกษตร (สมคิด และคณะ, 2553) และภาชนะปลูกพืช, วัสดุห่อหุ้ม และปลดปล่อยยาฆ่าแมลงถูกเพาะชำ, ถังห่อผลไม้ เป็นต้น ดังนั้นจึงเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่ผลผลิตทางการเกษตร
3. อุตสาหกรรมสิ่งทอ มีการพัฒนาเส้นใยจากพลาสติกชีวภาพเพื่อทดแทนการใช้เส้นใยราคาแพง เช่น ผ้าอ้อมสำเร็จรูป เครื่องนุ่งห่ม เส้นใยสำหรับบรรจุในเครื่องนอน เป็นต้น
4. อุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ เพื่อทดแทนการใช้พลาสติกสังเคราะห์ ดังนั้นพลาสติกชีวภาพที่ได้จากธรรมชาติ มีความปลอดภัย ย่อยสลายทางชีวภาพได้ โดยพีเอชบี สามารถผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์ได้หลายรูปแบบ เช่น การทำหลอด, แก้ว, ถัง, ถ้วย เป็นต้น (มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, มปป)

## 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตพีเอชบีได้ โดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติมีความหลากหลาย ซึ่งอาจจะมีจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ที่ยังไม่ถูกคัดเลือกนำมาใช้ประโยชน์ เพราะฉะนั้นการคัดเลือกจุลินทรีย์ จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก โดยงานวิจัยของ มาริสา และคณะ ได้เก็บตัวอย่างดินจากสถานที่ต่าง ๆ 5 แห่งในประเทศไทย โดยคัดแยกแบคทีเรียทั้งหมด 85 ไอโซเลท ซึ่งมาจากดินในอำเภอวังสะพุง จังหวัดเลย ที่ปนเปื้อนโลหะหนัก และไม่มีการปนเปื้อน ได้แก่ ดินที่ไม่ปนเปื้อนตะกั่ว 20 ไอโซเลท, ดินที่ปนเปื้อนตะกั่ว 36 ไอโซเลท, ดินใต้กองฟางในอำเภอโพหนอง จังหวัดร้อยเอ็ด 19 ไอโซเลท, ดินที่ปนเปื้อนขยะ ในจังหวัดกาฬสินธุ์ 10 ไอโซเลท และปนเปื้อนแคดเมียม 24 ไอโซเลท ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า คัดเลือกแบคทีเรียได้ 109 ไอโซเลท (ศิริพร, 2013) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก 35 ไอโซเลท เป็นแกรมลบ 74 ไอโซเลท และการย้อมสี Sudan Black B ให้ผลบวก 65 ไอโซเลท คิดเป็น 59.63% จากทั้งหมด 109 ไอโซเลท มีทั้งที่ติดสีน้ำเงินอ่อนจนถึงเข้ม และตรวจหาพีเอชบีโดยใช้ UV Spectrophotometer-based พบว่าที่ 14 ไอโซเลทที่ผลิตพีเอชบีได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้จัดทำขึ้นเพื่อวัตถุประสงค์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่า พีเอชบี มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2-0.7 ไมโครเมตร และสายพันธุ์ที่ผลิตพีเอชบีได้มีประสิทธิภาพ คือ *Priestia megaterium* KKR5 พบปริมาณน้ำหนักรวมพีเอชบี  $1.36 \pm 0.07$  กรัมต่อลิตร (มาริสสา และคณะ, 2566)

และนอกจากตัวอย่างดินในงานวิจัยที่กล่าวข้างต้น พัทธกรพิมล และคณะ ทำการศึกษาการผลิตโพลีไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) จากเชื้อแบคทีเรีย ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินจากโรงงานไบโอดีเซล จังหวัดสมุทรสาคร ของประเทศไทย โดยมีการใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน ในการศึกษาพบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ C5 ที่เลี้ยงบนอาหาร NA ที่มีส่วนประกอบของ Nile red และกลีเซอรอลดิบ เมื่อนำเชื้อไปส่องภายใต้ยิวพบว่ามีการเรืองแสงของพีเอชบี จากเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ที่คัดแยกได้ 8 ไอโซเลท ซึ่งสายพันธุ์ C5 มีการสะสมพีเอชบีสูงสุด 75.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 23.59% ของน้ำหนักแห้งที่กลีเซอรอลดิบ ปริมาตร 10 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 1:0:4 เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางชีวเคมี พบว่า คือ *Bacillus* sp. (พัทธกรพิมล และคณะ, 2559)

แต่เนื่องจากจุลินทรีย์ในธรรมชาติมีหลากหลายสายพันธุ์ที่ยังไม่ถูกคัดแยก และคัดเลือกนำมาใช้ประโยชน์ นอกจากตัวอย่างดินแล้ว ยังสามารถพบจุลินทรีย์ในน้ำหลากหลายสายพันธุ์ โดยงานวิจัยของ Mukesh, Konka and Rahul จึงได้ทำการคัดแยกแบคทีเรีย ที่สามารถผลิตพีเอชบีได้จากตัวอย่างน้ำจืดในทะเลสาบ Varaldevi, Bhiwandi, Thane, Maharashtra ผลการศึกษา สามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลท เมื่อทำการย้อมด้วยสี Sudan black B พบว่า มีแบคทีเรีย 9 ไอโซเลทที่แสดงผลเป็นบวก เกิดการติดสีน้ำเงินดำของสีย้อมชูดาน และ พบว่าใน 9 ไอโซเลท มีแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท ที่แสดงความสามารถในการผลิตพีเอชบีได้ดีที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท 2, 5 และ 9 มีการสะสมพีเอชบีสูงสุด คือ 7.79%, 7.53% และ 9.00% ตามลำดับ เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และวิเคราะห์ลักษณะทางชีวเคมี พบว่า คือ แบคทีเรีย *Bacillus* sp. (Mukesh, Konka and Rahul, 2020)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการทดลอง

#### 3.1 เครื่องมือ

- 3.1.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow)
- 3.1.2 เครื่องชั่งน้ำหนัก
- 3.1.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centifuge) รุ่น MIKRO 200/200R/220R, Universal 320/320R
- 3.1.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centifuge) รุ่น CF-10
- 3.1.5 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่น UV-1200
- 3.1.6 กล้องจุลทรรศน์ถ่ายภาพ
- 3.1.7 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- 3.1.8 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
- 3.1.9 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
- 3.1.10 ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส
- 3.1.11 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Spin-down centrifuge)

#### 3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 รูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร
- 3.2.2 ขวดดูแรน (Duran) ขนาด 250 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.2.3 ปีกอร์ (Beaker) ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.2.4 ปิปette แก้ว (Pipette)
- 3.2.5 ไมโครปิปette (Micropipette)
- 3.2.6 ทิป ( Tip)
- 3.2.7 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.2.8 Loop
- 3.2.9 แผ่นสไลด์
- 3.2.10 แท่งแก้วคนสาร
- 3.2.11 Rack
- 3.2.12 หลอดเซนติฟิวก์ ขนาด 1.5 และ 50 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3 สารเคมี

- 3.3.1 น้ำกลั่น (Distilled water)
- 3.3.2 Crystal Violet
- 3.3.3 Safranin O
- 3.3.4 Iodine
- 3.3.5 Sudan Black B
- 3.3.6 Glycerol
- 3.3.7 Sodium hypochlorite (NaOCl)
- 3.3.8 Acetone(C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O)
- 3.3.9 Ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O)
- 3.3.10 Absolute Ethanol
- 3.3.11 Nutrient agar (NA)
- 3.3.12 Nutrient broth (NB)

### 3.4 สถานที่เก็บตัวอย่าง

1. ดินจากแหล่งเพาะปลูก บริเวณ หมู่บ้านหนองแดง ต. กุดโบสถ์ อ. เลิงสาจ จ. นครราชสีมา
2. ดินจากป่าชายเลน แขวง ท่าข้าม เขต บางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร
3. น้ำคลองจากแหล่งชุมชน วัดหนามแดง ต. บางแก้ว อ. บางพลี จ. สมุทรปราการ
4. ไม้ผุ บริเวณ หมู่บ้านหนองแดง ต. กุดโบสถ์ อ. เลิงสาจ จ. นครราชสีมา

### 3.5 การเก็บตัวอย่าง

1. ตัวอย่างดินจากแหล่งเพาะปลูก เก็บโดยใช้พลั่วสแตนเลสขุดดินลึก ประมาณ 10 เซนติเมตร จากนั้นดินที่ได้เก็บรวบรวมใส่ถุงพลาสติก หรือขวดพลาสติก
2. ตัวอย่างดินจากป่าชายเลน เก็บโดยใช้พลั่วสแตนเลสขุดดินลึก ประมาณ 10 เซนติเมตร จากนั้นดินที่ได้เก็บรวบรวมใส่ถุงพลาสติก หรือขวดพลาสติก
3. ตัวอย่างน้ำคลองจากแหล่งชุมชน เก็บโดยตักน้ำในระดับลึกพอประมาณ จากนั้นนำน้ำที่ได้เก็บรวบรวมใส่ขวดพลาสติกสะอาด
4. ตัวอย่างไม้ผุ เก็บโดยใช้พลั่วสแตนเลสแฉะเอาเนื้อไม้ด้านนอก ขนาดหนา 2-3 เซนติเมตร จากนั้นไม้ผุที่ได้เก็บรวบรวมใส่ถุงพลาสติก และเก็บรักษาตัวอย่างทั้งหมดไว้ในกล่องเก็บอุณหภูมิหรือกระติก โดยใช้เจลเย็นเพื่อเก็บรักษาสภาพของตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.6 การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตพีเอชบี

ตัวอย่างดินจากแหล่งเพาะปลูก ดินป่าชายเลน และไม้ฝู ซึ่งตัวอย่าง ปริมาณ 1 กรัม และตัวอย่างน้ำคลองจากแหล่งชุมชน ทำการดูดตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำตัวอย่างทั้งหมด มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ โดยการเจือจาง 10 เท่า ดูดตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้ว ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มากระจายบนผิวหน้าอาหาร Nutrient Agar (NA) ที่ความเจือจาง  $10^{-3}$  -  $10^{-6}$  และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง

### 3.7 การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) โดยนำเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จำนวน 1 โคลน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแช่ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน หรือจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีความขุ่น คือ มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย และนำมาใส่ในหลอดฝาเกลียว ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยใส่ 50% กลีเซอรอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ตู้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

### 3.8 การย้อมสี Sudan Black B

#### 3.8.1 การย้อมสี Sudan Black B ในเพลท

ลากหรือขีดเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหาร NA โดยเตรียม 0.5% (W/V) Sudan Black B ปริมาณ 0.05 กรัม ใน 95% Ethanol (V/V) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที และล้างออกด้วย 95% Ethanol (V/V) และสังเกตการติดสีน้ำเงินดำของ Sudan Black B

#### 3.8.2 ตรวจยืนยันโดยการย้อมสี Sudan Black B บนสไลด์

ทำการเชยเชื้อบริสุทธิ์ลงบนแผ่นสไลด์ที่หยด 0.85% (W/V) NaCl จากนั้นเกลี่ยและทิ้งให้แห้ง ตรึงโดยผ่านความร้อน และทำการย้อมด้วยสี Sudan Black B โดยวิธี หยด 0.3% (V/V) Sudan Black B ใน 70% (V/V) Ethanol ทิ้งไว้ 10 นาที และล้างออกด้วย Xylene จากนั้นย้อมทับด้วย 0.25% (W/V) safranin O เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำกลั่น ปล่อยให้สไลด์แห้ง ตรวจสอบการติดสีด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า อ่านผลบวก เมื่อแกรนูลภายในเซลล์ติดสีน้ำเงินดำ อ่านผลลบ เมื่อเซลล์ติดสีแดงของ 0.25% (W/V) safranin O (วิสันต์, 2561)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.9 การตรวจสอบสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรม

บ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัยข้อมูลการจัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานวิทยาของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ด้วยการนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาย้อมสีแกรม ดูลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยเชื้อที่ย้อมติดสีม่วงของสีย้อม Crystal violet จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เชื้อที่ย้อมติดสีแดงของ Safranin O จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ

### 3.10 การตรวจยืนยันด้วย Nile blue A

ทำการตรวจยืนยันหาพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) โดยดูการเรืองแสงของเชื้อแบคทีเรียผ่านเครื่อง Mini Blue LED Transilluminator เตรียมสีย้อม Nile blue A ปริมาณ 5 มิลลิกรัม ละลายใน Absolute Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อทำการปิเปต ลงในอาหาร NA ปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยใส่ Nile blue A ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นขีดเชื้อลงบนอาหาร NA ที่มีสีย้อม Nile blue A ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 (TISTR10144) เป็นเชื้อควบคุมที่ให้ผลบวก คือมีการเรืองแสงเป็นสีเหลืองส้ม และเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* เป็นเชื้อควบคุมที่ให้ผลลบ คือไม่มีการเรืองแสง รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกจากการติดสีน้ำเงินดำของ Sudan Black B บนสไลด์ เพื่อเปรียบเทียบความเรืองแสงของเชื้อแบคทีเรีย

### 3.11 ศึกษาการสกัดพีเอชบีจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ

#### 3.11.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการยืนยัน จากการติดสี Sudan Black B บนสไลด์ และการเรืองแสงของ Nile blue A จากเพลท ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีจำนวน 3-4 โคโลนี ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทำการเขย่าโดยเครื่อง ZHWY-100H ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยเครื่อง UV-1200 Spectrophotometer ใช้อาหาร NB เป็นแบลนด์ และเจือจางเชื้อแบคทีเรีย ให้ได้ค่า OD<sub>600</sub> ที่ 0.5 จากนั้นเติมหัวเชื้อ 10% inoculum ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ทำการเขย่า 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแบ่งเชื้อแบคทีเรียจากขวดรูปชมพู่ ใส่ในหลอดเซนติฟิวจ์ ขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาตรหลอดละ 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง โดยเครื่อง Universal 320R ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที ไม่ต่ำกว่า 5 นาที ทุกสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีกรนำไปใช้

เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 20 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำการแบ่งใส่หลอดเซนติฟิวก์ ขนาด 50 มิลลิลิตร เพื่อนำไปหาหน้าหนักเซลล์แห้ง และสกัดหาพีเอชบี หลอดละ 5 มิลลิลิตร ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

### 3.11.2 วิเคราะห์หาหน้าหนักเซลล์แห้ง

นำเชื้อแบคทีเรียใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ครั้งละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้งจนครบ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน และนำไปชั่งเพื่อหาหน้าหนักเซลล์แห้ง

### 3.11.3 การสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB)

นำเชื้อแบคทีเรียมาเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 10 % (V/V) ในอัตราส่วน 1:1 ในหลอดเซนติฟิวก์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง และเปลี่ยนใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงจนครบ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมอะซิโตน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และเติม 95% (V/V) ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเทส่วนใสทิ้ง จากนั้นนำพีเอชบีที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน และนำไปชั่งเพื่อหาหน้าหนักพีเอชบี (วิสันต์, 2561)

$$\text{สูตร} \quad \text{PHB\%} = \frac{\text{น้ำหนักพีเอชบี}}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง}} \times 100$$

### 3.12 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย แต่ละไอโซเลท ทำตามวิธีของชุดสกัด FavorPrep Tissue Genomic DNA extraction Mini Kit โดยนำหัวเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นใส่สารละลายโลโซโซม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที จากนั้นเติม Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ FATG 2 Buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยระหว่างการบ่มต้องทำการผสมด้วยการวอร์เทกซ์เป็นครั้งคราว และบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรอให้เย็น แล้วเติม Absolute Ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปหมุนด้วยความเร็วเพื่อเอาหยดน้ำที่เกาะผาออก จากนั้นเตรียมคอลัมน์ โดยวาง FATG mini column ลงใน Collection tube นำสารละลายที่ได้ เติมลงใน FATG mini column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และย้าย FATG mini column ลงใน Collection tube อันใหม่ และเติม W1 Buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใน FATG mini column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใส่ทิ้ง แล้วเติม Wash Buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้งจากนั้นเติมน้ำ (ddH<sub>2</sub>O) pH 7.5-9.0 ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงตรงกลาง FATG mini column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาค่าจีโนมิกดีเอ็นเอ

### 3.12.1 การจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ที่บริเวณยีน 16s rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA

ลำดับ	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ใช้เพิ่มปริมาณยีน
1	P021-16s-F	5' CCCGGGAACGTATTCACCG 3'	16s rDNA
2	P022-16s-R	5' GCTTAAYACATGCAAGTCGA 3'	16s rDNA
3	P085 16sNEW-F	5' GCTGGCGGCATGCTTAACACAT 3'	16s rDNA
4	P086 16sNEW-R	5' GGAGGTGATCCAGCCGCAGGT 3'	16s rDNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยใช้จำนวน 2 คู่ ไพรเมอร์ลำดับที่ 1 และ 2 และไพรเมอร์ลำดับที่ 3 และ 4 ปฏิกริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย 10X Standard Taq Reaction Buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, dNTPs ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, Forward Primer และ Reverse Primer อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร, Taq DNA Polymerase ปริมาตร 0.125 ไมโครลิตร และจีโนมคอดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 20 นาโนกรัม ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และปรับปริมาตร ด้วยน้ำ DI ปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ คือ initial denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที, denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, annealing อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, extension อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ final extension อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอได้แสงยูวี เพื่อนำไปหาไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

### 3.13 การตรวจยืนยันการสร้างพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) ด้วย Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

วิเคราะห์ด้วย FTIR โดยใช้เป็นการยืนยันเกี่ยวกับโครงสร้างพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยเปรียบเทียบกับพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตมาตรฐาน ทำการบดโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) เพื่ออัดเม็ดใช้ในการวัดค่าพื้นหลัง จากนั้นเตรียมตัวอย่าง โดยนำตัวอย่าง ปริมาณ 2 มิลลิกรัม และ KBr ปริมาณ 200 มิลลิกรัม ผสมกันในอัตราส่วน 1:9 แล้วนำไปอัดเป็นแผ่นด้วยเครื่องอัดไฮดรอลิก และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-IR ที่เลขคลื่น 4000-400  $\text{cm}^{-1}$

### 3.14 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักพีเอชบี มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 25 โดย One Way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เพื่อพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชบี

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างธรรมชาติ 4 แหล่ง คัดเลือกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 102 ไอโซเลท ได้แก่ ดินจากแหล่งเพาะปลูกพบแบคทีเรีย 30 ไอโซเลท น้ำคลองจากแหล่งชุมชนพบแบคทีเรีย 38 ไอโซเลท ดินป่าชายเลนพบแบคทีเรีย 32 ไอโซเลท และไม้ผุพบแบคทีเรีย 28 ไอโซเลท ซึ่งแหล่งที่พบแบคทีเรียมากที่สุด คือ น้ำคลองจากแหล่งชุมชน เพราะเนื่องจากน้ำที่มาจากชุมชนจะมีพวกสารอินทรีย์, เศษอาหาร, ไขมัน รวมถึงสิ่งโสโครกจากครัวเรือน (ณรงค์, 2525) และสิ่งปฏิกลจากแหล่งชุมชน เช่น น้ำที่ใช้ซักฟอกทำความสะอาดส่วนใหญ่มักจะมีสารอินทรีย์ปะปนมากับน้ำที่เหล่านั้ (สาเหตุและผลกระทบจากมลพิษทางน้ำ, 2558) โดยสารอินทรีย์มีความจำเป็นอย่างมากต่อการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิด ซึ่งงานวิจัยของสาธิตา มีการนำตัวอย่างดินเลน ทั้งหมด 5 แหล่ง พบทั้งหมด 44 ไอโซเลท ได้แก่ อ่าวบ่อทองหลาง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์, หาดบ้านกรูด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์, บ่อมพระจุลจอมเกล้า จังหวัดสมุทรปราการ, นาทุ่ง ตำบลสาขลา จังหวัดสมุทรปราการ และทางเดินใน ตำบลสาขลา จังหวัดสมุทรปราการ พบว่า มีไอโซเลท 2, 5, 11, 11 และ 14 ไอโซเลท ตามลำดับ (สาธิตา, 2554)

##### 4.1.1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียโดยการย้อมสี Sudan Black B

จากการนำตัวอย่างที่มีความหลากหลาย ได้แก่ ดินจากแหล่งเพาะปลูก น้ำคลองจากแหล่งชุมชน ดินป่าชายเลน และไม้ผุ มาเพาะเลี้ยงในอาหาร NA โดยการขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง และคัดเลือกโดยสังเกตโคโลนีที่แตกต่างกัน 102 ไอโซเลท นำมาย้อมด้วยสี Sudan Black B พบว่า มีการติดสีน้ำเงินดำของ Sudan Black B ทั้งหมด 27 ไอโซเลท ดังตารางที่ 4.1 ซึ่งงานวิจัยของ Mohamed *et al.* ได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินเหนียวจากประเทศอินเดีย, ตัวอย่างดินทรายร่วนจากฟาร์ม National Research Centre (NRC) และตัวอย่างดินอื่น ๆ จากประเทศอียิปต์ พบแบคทีเรียทั้งหมด 180 ไอโซเลท เมื่อนำมาย้อมด้วยสี Sudan Black B ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า มี 45 ไอโซเลทที่ติดสีดำของ Sudan Black B (Mohamed *et al.*, 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีที่คัดแยกได้จากการยืนยันจากการติดสี Sudan Black B

รหัส	ลักษณะ	สี	ผิวขอบ	ผิวโคโลนี	Gram stain
ดินจากแหล่งเพาะปลูก (จังหวัด นครราชสีมา)					
CS1	กลม	ขาวเหลือง	เรียบ	มัน, นูน	ลบ
CS2	กลม	ขาวเหลืองขุ่น	หยัก	ด้าน, นูน	บวก
CS3	กลม	เหลืองขุ่น	เรียบ	ด้าน, นูน	ลบ
CS4	กลม	เหลืองขุ่น	เรียบ	มัน, นูน	บวก
CS5	กลม	ขาวเหลือง	เรียบ	ด้าน, แบน	ลบ
CS6	กลม	เหลืองขุ่น	เรียบ	มัน, นูน	ลบ
CS7	กลม	ขาวปนชมพู	หยัก	ด้าน, นูน	บวก
น้ำคลองจากแหล่งชุมชน (จังหวัด สมุทรปราการ)					
CW3	กลม	ขาวขุ่น	เรียบ	มัน, นูน	ลบ
CW4	กลม	ขาวขุ่น	หยัก	มัน, นูน	ลบ
CW12	กลม	เหลือง	เรียบ	มัน, นูน	ลบ
CW14	กลม	เหลือง	เรียบ	ด้าน, เรียบ	บวก
CW16	กลม	ขาวปนแดง	เรียบ	มัน, นูน	บวก
ดินป่าชายเลน บางขุนเทียน (กรุงเทพมหานคร)					
MS1	กลม	ขาวปนชมพู	หยัก	มัน, นูน	บวก
MS4	กลม	เหลืองใส	เรียบ	มัน, นูน	บวก
MS9	กลม	ขาวปนชมพู	หยัก	มัน, แบน	บวก
MS12	กลม	ขาวขุ่น	เรียบ	ด้าน, นูน	บวก
MS14	กลม	ขาวขุ่น	หยัก	ด้าน, ขรุขระ	ลบ
MS15	กลม	ขาวขุ่น	หยัก	ด้าน, นูน	บวก
MS16	กลม	ขาวปนส้ม	เรียบ	ด้าน, นูน	บวก
ไม้ฝู (จังหวัดนครราชสีมา)					
RW1	กลม	ขาวเหลืองขุ่น	เรียบ	ด้าน, แบน	บวก
RW4	กลม	ขาวขุ่น	หยัก	มัน, นูน	บวก
RW5	กลม	ขาวขุ่น	เรียบ	ด้าน, นูน	บวก
RW7	กลม	ขาวขุ่น	เรียบ	ด้าน, นูน	บวก
RW8	กลม	ขาวเหลือง	เรียบ	ด้าน, นูน	บวก
RW9	กลม	เหลืองใส	เรียบ	มัน, นูน	บวก
RW10	กลม	ขาวขุ่น	เรียบ	มัน, นูน	บวก
RW13	กลม	เหลืองขุ่น	หยัก	ด้าน, นูน	ลบ

หมายเหตุ : CS : ดินจากแหล่งเพาะปลูก, CW : น้ำคลองจากแหล่งชุมชน, MS : ดินป่าชายเลน, RW : ไม้ฝู  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่งานไม้ฝูให้บริการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากการยืนยันการติดสี Sudan Black B บน สไลด์ และการเรืองแสงของ Nile Blue A

ตารางที่ 4.2 ผลการยืนยันจากการติดสี Sudan Black B บนสไลด์ และการเรืองแสงของ Nile Blue A

รหัส/ชื่อเชื้อ	Sudan Black B สไลด์ (1000x)	Nile Blue A
เชื้อควบคุม		
<i>Escherichia coli</i>	0	0
<i>B.megaterium</i> SWU01 (TISTR10144)	+++	+++
ดินจากแหล่งเพาะปลูก (จังหวัด นครราชสีมา)		
CS2	+++	0
CS4	+	+
CS6	+	+
น้ำคลองจากแหล่งชุมชน (จังหวัด สมุทรปราการ)		
CW3	+	0
CW12	+++	+++
ดินป่าชายเลน บางขุนเทียน (กรุงเทพมหานคร)		
MS4	++	++
MS12	+	0
ไม้ผุ (จังหวัดนครราชสีมา)		
RW7	++	++
RW13	+++	+++

หมายเหตุ :

- +++ ติดสี Sudan Black B เข้มมากที่สุด และมีการเรืองแสงของ Nile Blue A มากที่สุด
- ++ ติดสี Sudan Black B เข้มปานกลาง และมีการเรืองแสงของ Nile Blue A ปานกลาง
- + ติดสี Sudan Black B เข้มน้อยที่สุด และมีการเรืองแสงของ Nile Blue A น้อยที่สุด
- 0 ไม่ติดสี Sudan Black B และไม่มีการเรืองแสงของ Nile Blue A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียที่มีการติดสีของ Sudan Black B ได้แก่ CS2, CW12, RW13 ติดสีดำเข้มที่สุด และ CS4, CS6, CW3, MS4, MS12, RW7 ติดสีดำน้อยที่สุด จากงานวิจัยของประดินันท์ มีการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ PHAs เบื้องต้นจากน้ำทิ้งโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง โดยการย้อมสี Sudan Black B บนสไลด์ พบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต ได้แก่ KR\_M4, KR\_M5, KR\_M6, KR\_M8, KR\_M9, KR\_M10, KR\_P1, KR\_P5, KR\_P7 และ KR\_P10 (ประดินันท์, 2561) และนำมาตรวจยืนยันอีกครั้งด้วย Nile blue A พบว่า CW12, RW13 มีการเรืองแสงมากที่สุด MS4, RW7 มีการเรืองแสงปานกลาง และ CS4, CS6 มีการเรืองแสงน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับ *B.megaterium* SWU01 (TISTR10144) ซึ่งเป็นเชื้อควบคุมที่ให้ผลบวก และ *E.coli* เป็นเชื้อควบคุมที่ให้ผลลบ จากงานวิจัยของสาธิตา พบว่ามีการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตพีเอชบี มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มี Nile red ปริมาณ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร โดยการการสังเกตจากการเรืองแสงที่เกิดขึ้นเมื่อส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต มี 8 ไอโซเลตที่มีการเรืองแสง จากทั้งหมด 44 ไอโซเลต ได้แก่ M26, M27, M28, M36, M38, M40, M43 และ M44 (สาธิตา, 2554) ดังนั้นจึงได้ทำการคัดเลือกเพียง 4 ไอโซเลต คือ CW12, MS4, RW7, RW13 และ *B.megaterium* SWU01 (TISTR10144) เป็นเชื้อควบคุม ไปทำการสกัดหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และสกัดหาปริมาณพีเอชบี

#### 4.2 ผลการสกัดหาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพีเอชบีของเชื้อแบคทีเรีย

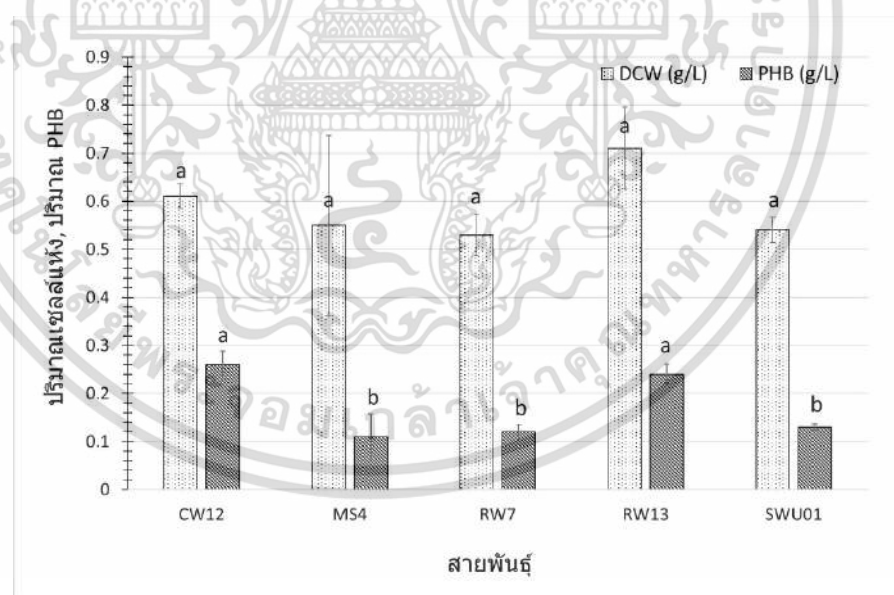
ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร), น้ำหนักพีเอชบี (กรัมต่อลิตร) และ %PHB content ที่ได้จากการผลิตพีเอชบีในอาหาร nutrient broth ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ CW12, MS4, RW7 และ RW13 ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับ *B.megaterium* SWU01 (TISTR10144)

ไอโซเลต	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักพีเอชบี (กรัมต่อลิตร)	%PHB content
CW12	0.61 ± 0.025 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.029 <sup>a</sup>	43.17 ± 4.734 <sup>a</sup>
MS4	0.55 ± 0.187 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.047 <sup>b</sup>	19.36 ± 8.591 <sup>c</sup>
RW7	0.53 ± 0.044 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.015 <sup>b</sup>	23.27 ± 2.887 <sup>c</sup>
RW13	0.71 ± 0.085 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.021 <sup>a</sup>	33.33 ± 2.931 <sup>b</sup>
SWU01	0.54 ± 0.026 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.006 <sup>b</sup>	23.45 ± 1.068 <sup>c</sup>

\*มีระดับนัยสำคัญ เท่ากับ 0.05

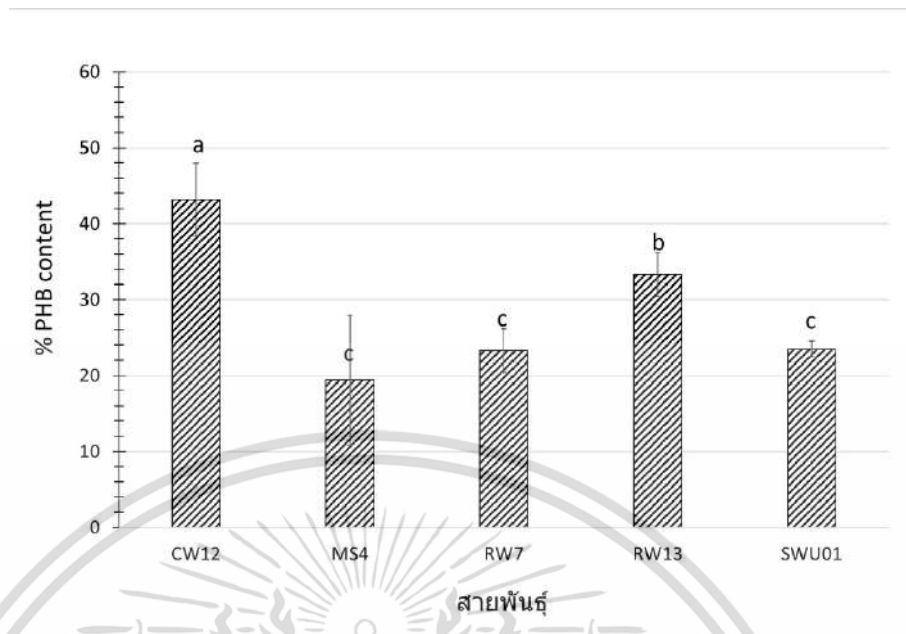
เอกสารนี้เป็นเอกสารทสวงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ได้แก่ CW12, MS4, RW7 และ RW13 รวมทั้ง *B.megaterium* SWU01 (TISTR10144) ในอาหาร NB ปริมาตร 70 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้ง คือ 0.61, 0.55, 0.53, 0.71 และ 0.54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักพีเอชบี 0.26, 0.11, 0.12, 0.24 และ 0.13 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ *B.megaterium* SWU01 (TISTR10144) ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 0.54 กรัมต่อลิตร มีปริมาณพีเอชบี เท่ากับ 0.13 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.3 จากการศึกษาพบว่า เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตพีเอชบีได้ปริมาณมากที่สุด และใกล้เคียงกัน 2 ไอโซเลท คือ CW12 และ RW13 คิดเป็น %PHB Content เท่ากับ 43.17% และ 33.33% ตามลำดับ ซึ่งจากงานวิจัยของสาธิตา พบว่า เชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท ได้แก่ M26, M27, M28, M36, M38, M40, M43 และ M44 มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.57, 2.30, 2.39, 2.11, 1.75, 2.63, 2.62 และ 2.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณพีเอชบี 0.065, 0.066, 0.052, 0.004, 0.002, 0.003, 0.031 และ 0.040 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพีเอชบี มากที่สุด 5 ไอโซเลท คือ M26, M27, M28, M43, M44 คิดเป็น %PHB content เท่ากับ 2.53%, 2.88%, 2.16%, 1.17% และ 1.45% ตามลำดับ (สาธิตา, 2554)



**รูปที่ 4.1** แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักพีเอชบี (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการผลิตพีเอชบีในอาหาร nutrient broth ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ CW12, MS4, RW7 และ RW13 ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับ *B.megaterium* SWU01 (TISTR10144)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



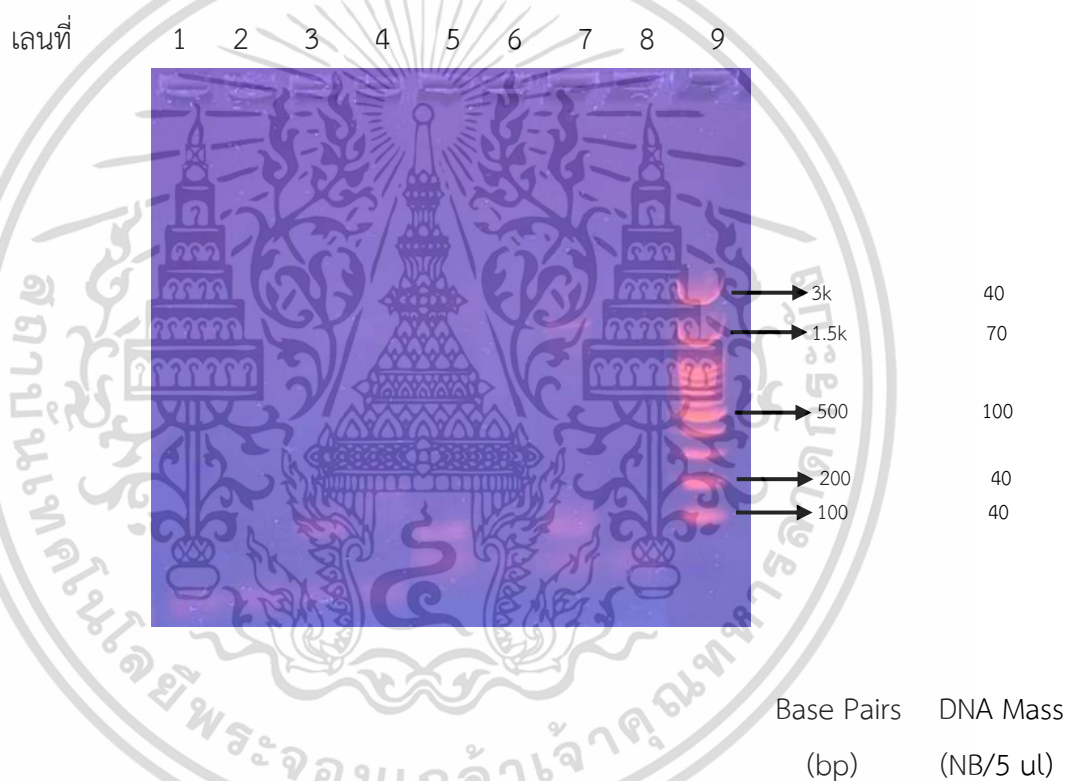
รูปที่ 4.2 แสดง %PHB content ที่ได้จากการผลิตพีเอชบีในอาหาร nutrient broth ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ CW12, MS4, RW7 และ RW13 ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับ *B.megaterium* SWU01 (TISTR10144)

#### 4.3 ผลการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ที่บริเวณยีน *16s rDNA*

จากการเพิ่มปริมาณยีน *16s DNA* ของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ได้แก่ CW12, MS4, RW7 และ RW13 โดยการวิเคราะห์แถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ซึ่งมีการใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ P021-16s-F, P021-16s-R และ P085\_16sNEW-F และ P086\_16sNEW-R พบว่า ผลที่ได้ปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 4 แถบ ได้แก่ เลขที่ 3, 4, 5 และ 7 โดยเลขที่ 3 และ 4 คือ RW7 และ RW13 ที่ใช้คู่ไพรเมอร์ P085\_16sNEW-F และ P086\_16sNEW-R มีผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาดประมาณ 100 และ 200 คู่เบส ตามลำดับ โดยเลขที่ 5 และ 7 คือ CW12 และ RW7 ที่ใช้คู่ไพรเมอร์ P021-16s-F และ P021-16s-R มีผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาดประมาณ 100 และ 100, 1500 คู่เบส ตามลำดับ และเลขที่ 1, 2, 6, 8 ที่ไม่ปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ และ เลขที่ 3, 4, 5, 8 ถึงแม้จะปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แต่มีความไม่ชัดเจน อาจมีสาเหตุเนื่องจากในขั้นตอน Denaturation ซึ่งเป็นขั้นตอนในการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ โดยการใช้อุณหภูมิสูง เนื่องจากอุณหภูมิและเวลาที่มีผลต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ หากใช้อุณหภูมิสูงเป็นเวลานาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จะทำให้ดีเอ็นเอและไอโซมเสียสภาพ และหากใช้อุณหภูมิต่ำอาจจะทำให้เกิดดีเอ็นเอซ้ำๆ ไม่ว่ากรณีใดๆ ที่แยกออกจากกันไม่ได้ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์น้อยลง (ไลโพมิกส์, 2563) จึงที่มีการนำไปใช้

ในขั้นตอน Annealing เป็นการลดอุณหภูมิลงให้ไพรเมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอ ถ้าอุณหภูมิต่ำจะทำให้ไพรเมอร์จับดีเอ็นเอผิดตำแหน่ง และถ้าใช้อุณหภูมิสูงเป็นเวลานานอาจจะทำให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (อรัทัย และจิรภาส, 2554) ซึ่งการทดลองของผู้วิจัยใช้ชุดคิต *Taq* DNA Polymerase with Standard *Taq* Buffer ของบริษัท NEW ENGLAND BioLabs for a Routine PCR ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ในขั้นตอน Denaturation ซึ่งเป็นการใช้เวลาสูงสุดตามชุดคิต จึงคิดว่าเลือกใช้เวลาไม่เหมาะสมจึงส่งผลในดีเอ็นเอ และเอนไซม์เสียสภาพได้ และในขั้นตอน Annealing ใช้อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ซึ่งเป็นการใช้เวลาสูงสุดตามชุดคิตเช่นกัน อาจส่งผลให้ไพรเมอร์ไม่จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ



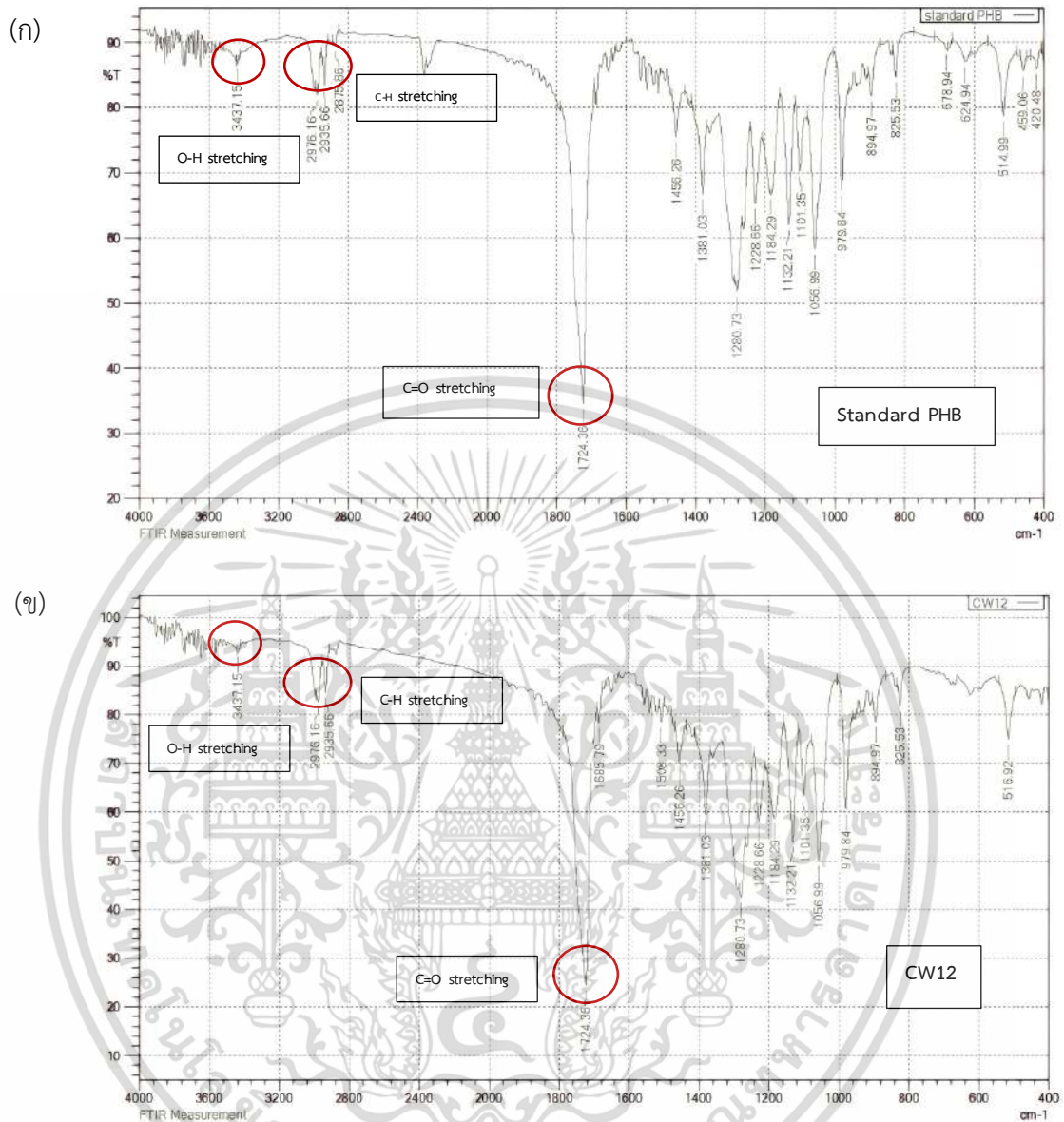
**รูปที่ 4.3** เลขที่ 1-4 ใช้ไพรเมอร์ P085\_16sNEW-F และ P086\_16sNEW-R เลขที่ 5-8 ใช้ไพรเมอร์ P021-16s-F และ P021-16s-R และเลขที่ 9 คือ Marker ซึ่งเลขที่ 1,5 = CW12, เลขที่ 2,6 = MS4, เลขที่ 3,7 = RW7, เลขที่ 4,8 = RW13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4 ผลการตรวจยืนยันการสร้าง พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) ด้วย Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

จากการนำไปวิเคราะห์ด้วย FTIR ที่ช่วงการวิเคราะห์ 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$  โดยทำการเปรียบเทียบกับพีเอชบีมาตรฐาน จากการวิเคราะห์พบว่า พีเอชบีที่สกัดได้ ดังรูปที่ 4.4 ข. พบพีกที่แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันของ C=O Stretching ปรากฏที่เลขคลื่น 1724.36  $\text{cm}^{-1}$  พีกที่แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันของ O-H Stretching ปรากฏที่เลขคลื่น 3437.15  $\text{cm}^{-1}$  และพีกที่แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันของ C-H Stretching ปรากฏที่เลขคลื่น 2976.16 และ 2935.66  $\text{cm}^{-1}$  จากการศึกษพบว่าพีกของหมู่ฟังก์ชันของพีเอชบีมาตรฐาน ปรากฏเลขคลื่นที่ตรงกันกับพีเอชบีของไอโซเลท CW12 ที่สกัดได้ ดังรูปที่ 4.4 ก. ซึ่งจากงานวิจัยของอนุตรา และคณะ ได้ทำการเปรียบเทียบ พีเอชบีบริสุทธิ์ ที่สกัดจาก *B.megaterrium* SWU01 (TISTR10144) กับพีเอชบีมาตรฐาน พบหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญ คือ C=O Stretching, O-H Stretching พบพีกปรากฏที่เลขคลื่น 1730.15  $\text{cm}^{-1}$ , 3439.08  $\text{cm}^{-1}$  ตามลำดับ และ C-H Stretching พบพีกปรากฏที่เลขคลื่น 2981.95  $\text{cm}^{-1}$  และ 2935.66  $\text{cm}^{-1}$  (อนุตรา และคณะ, 2560) ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่าพีเอชบีที่สกัดได้จากไอโซเลท CW12 คือ พีเอชบี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 FTIR-Spectra ของพีเอชบีมาตรฐาน (ก) เปรียบเทียบกับพีเอชบีที่สกัดได้จากไอโซเลท CW12 (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

การทดลองการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติ 4 แหล่ง ได้แก่ ดินเพาะปลูก และไม้ผุ บริเวณอำเภอลำปาง จังหวัดนครราชสีมา บริเวณดินป่าชายเลน ที่เขตบางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร และน้ำจากคลองสำโรง อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ พบว่ามีเชื้อแบคทีเรีย 6 ไอโซเลท จากทั้งหมด 27 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการสะสมพีเอชบีภายในเซลล์แบคทีเรีย จากการย้อมสี Sudan Black B พีเอชบีจะติดสีน้ำเงินดำภายในแกรนูลของเซลล์แบคทีเรีย และมีการตรวดยืนยันด้วย Nile Blue A ที่มีความจำเพาะเจาะจงมากกว่า Sudan Black B โดยเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตพีเอชบี จะเรืองแสงสีส้มเหลืองเมื่อส่องผ่านแสงสีฟ้า โดยเปรียบเทียบกับเชื้อควบคุมที่เป็นผลบวกและผลลบ จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรีย 4 ไอโซเลทจาก 6 ไอโซเลทที่เรืองแสงมากที่สุด ได้แก่ CW12, MS4, RW7 และ RW13 มาทำการสกัดหาปริมาณพีเอชบี พบว่า สามารถผลิตพีเอชบีได้สูงสุด 0.26 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.61 กรัมต่อลิตร, 0.11 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.55 กรัมต่อลิตร, 0.12 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.53 กรัมต่อลิตร และ 0.24 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.71 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสามารถคิดเป็น %PHB content ได้เท่ากับ 43.17%, 19.36%, 23.27% และ 33.33% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ *B.megaterium* SWU01 (TISTR10144) ซึ่งสามารถผลิตพีเอชบีได้สูงสุด 0.13 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.54 กรัมต่อลิตร คิดเป็น %PHB content เท่ากับ 23.45% และจากการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ที่บริเวณยีน *16s rDNA* ผลที่ได้ปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 4 แถบ ได้แก่ เลนที่ 3, 4, 5 และ 7 โดยเลนที่ 3 และ 4 คือ RW7 และ RW13 ที่ใช้ไพรเมอร์ P085\_16sNEW-F และ P086\_16sNEW-R มีผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาดประมาณ 100 และ 200 คู่เบส ตามลำดับ โดยเลนที่ 5 และ 7 คือ CW12 และ RW7 ที่ใช้ไพรเมอร์ P021-16s-F และ P021-16s-R มีผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาดประมาณ 100 และ 100, 1500 คู่เบส ตามลำดับ จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชบีได้สูงสุด คือ CW12 จากตัวอย่างน้ำคลองจากแหล่งชุมชน มาทำการวิเคราะห์โครงสร้างของพอลิเมอร์ด้วย FT-IR ที่ทำการเปรียบเทียบพีเอชบีที่สกัดได้และพีเอชบีมาตรฐาน พบว่าพีคของหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญของพีเอชบีมีค่าเลขคลื่นเท่ากัน ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลท CW12 คือพีเอชบี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

- 1) ควรใช้อาหาร NB ที่มีแหล่งคาร์บอนเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตพีเอชบีของเชื้อแบคทีเรียก่อนการสกัดพีเอชบี
- 2) ศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียเจริญได้ดี



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- แพรวสุภา เหล่าศิริ, ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ, ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ และศิริขวัญ พลประทีป. 2563. การพัฒนากระบวนการผลิตพอลิไฮดรอกซีลิวทิกที่เรตด้วยกระบวนการหมักบนอาหารแข็งโดยแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพมหานคร
- มหาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. 2566. รายละเอียดข้อมูลพลาสติกชีวภาพประเภทพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate). เข้าถึงได้จาก [http://asp.plastics.or.th:8001/files/article\\_file/20180624234918u.pdf](http://asp.plastics.or.th:8001/files/article_file/20180624234918u.pdf)
- ไลโพลิมิกส์. 2563. Amplification. [online]. เข้าถึงได้จาก <https://www.scispec.co.th/learning/index.php/blog/genomics/patiya-prasertsilp>.
- วรัญญา สุวรรณสิงห์ และผกาวดี แก้วกันเนตร. 2553. การคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารไบโอพอลิเมอร์จากธรรมชาติ. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- วาสนา เป็นเครือ. 2565. ความหลากหลายของแบคทีเรียบริเวณรอบรากพืชที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (พีเอชเอ) เพื่อการประยุกต์ใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ. สาขาวิชาปรีคลินิก. สำนักวิชาวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- วิมล ขอบชื่นชม, สุกมาน สือรี และณัฐพล ถนัดช่างแสง. 2558. การแยกและการคัดกรองจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ Polyhydroxybutyrate P(3HB) จากจ๊วอย่างดินและน้ำในประเทศไทย โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน. คณะเทคนิคการแพทย์. คณะเภสัชศาสตร์. วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก. มหาวิทยาลัยรังสิต
- วิสันต์ เชื้อวงศ์. 2561. การคัดแยกและการระบุชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชบีจากกากตะกอนโรงงานท่อน้ำกรอง และการเพิ่มการผลิตพีเอชบีโดยใช้ของเสียชีวภาพ. คณะวิทยาศาสตร์. สาขาเคมี. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- สมคิด ตีจริง, พีรกานต์ บรรเจิดกิจ และอรุณี คงดี. 2553. การคัดแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเพื่อผลิตพลาสติกชีวภาพ. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยแม่โจ้
- สาธิตา ผลอินทร์. 2554. การคัดแยกและการผลิต พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยจุลินทรีย์จากทะเล. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยศิลปากร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการสงวนเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาเหตุและผลกระทบ จากมลพิษทางน้ำ. 2558. [Online]. เข้าถึงได้จาก

[https://lux.co.th/cpt\\_blog/cause-and-impact-of-water-pollution/](https://lux.co.th/cpt_blog/cause-and-impact-of-water-pollution/)

อนุตรา แสนนอก, อภิลิทธิ์ วารินทร์ และอาภาภรณ์ คำบุปผา. 2560. การผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อ *Bacillus megaterium* บนอาหารแข็ง. คณะวิทยาศาสตร์. สาขาเคมี. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อรรถัย ตั้งวรสิทธิ์ชัย และจิรภาส จงจิตวิมล. 2554. การคงตัวของเลือดแห้งสำหรับตรวจ alpha-thalassemia (SEA type). วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์. มหาวิทยาลัยนเรศวร

Almansour, N.A. and Albureikan, M. O. 2019. Isolation, characterization and Molecular identification of polyhydroxybutyrate producing bacterium grown on cooking oil wastes. 17-25.

Attapong, M., Chatgasem, C., Siripornadulsil, W. and Siripornadulsil, S. 2023. Ability of converting sugarcane bagasse hydrolysate into polyhydroxybutyrate (PHB) by bacteria isolated from stressed environmental soils.

Chuavong, W., Ponprateep, S., Ajawatanawong, P and Vatanavicharn, T. 2022. Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by Novel *Bacillus megaterium* SWU01 Isolated from Activated Sludge. *Journal of Science*. 49(6): 1483-1499.

Desai, N., Pawar, U., Aparadh, V. and Patil, M. 2020. Research international and advancements in plant sciences. 978-93-88901-14-7.

Karim, F., Mumtaz, T., Fakhruddin, A.N.M. and Khan, M. R. 2018. Isolation and screening of biopolyester (poly- beta- hydroxybutyrate) bacteria from compost Bangladesh. 7(1):23-29.

Narayanan, M., Kandasamy, S., Kumarasamy, S., Gnanavel. K., Ranganathan, M. and Kandasamy, G. 2020. Screening of polyhydroxybutyrate producing indigenous bacteria from polluted lake soil.

Piwpan, P., Jaturapiree, A. and Jaturapiree, P. 2016. Isolation strain *Bacillus* sp. Using crude glycerol as a carbon source. 21(2): 376-384.

Mohamed, T., Shaaban, M., Azza, T. and Mowafy, E.I. (2012). Production of some biopolymers By some selective Egyptian soil bacterial isolates. *Journal of Applied Sciences Research*, 8(1), 94-105.

Musa, H. and Kasim, F. 2016. Screening and production of polyhydroxybutyrate (PHB) by bacteria strains isolated from rhizosphere soil of groundnut plants

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่เป็นเชิงพาณิชย์ขึ้นด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Shakya, S. and Shakya, R. 2021. Optimization of Polyhydroxybutyrate Production by Bacteria Isolated from Solid Waste Transfer Station, Teku, Nepal. 5308-5324
- Thapa, C., Shakya, P., Shrestha, R., Pal, S. and Manandhar, P. 2018. Isolation of polyhydroxybutyrate (PHB) Producing Bacteria, Optimization of Culture Conditions for PHB production, Extraction and Characterization of PHB. 62-68.
- Trakunjae, C., Boondaeng, A., Apiwatanapipat, W., Kosugi, A., Arai, T., Sudes, K., et al. 2021. Enhanced polyhydroxybutyrate (PHB) production by newly isolated rare actinomycetes *Rhodococcus* sp. Strain. BSRT1-1 using response surface methodology. 11:1896



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



## ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

#### ก.1 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

##### ก.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar

ประกอบด้วย สารสกัดยีสต์ 3 กรัม เปปโตน 5 กรัม ผงวุ้น 15 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

##### ก.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth

ประกอบด้วย สารสกัดยีสต์ 3 กรัม เปปโตน 5 กรัม ผงวุ้น ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### ก.2 การเตรียมสารเคมี

##### ก.2.1 กลีเซอรอล 50%

ความเข้มข้นเริ่มต้น 100% นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50% นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติ ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

##### ก.2.2 Safranin O

ชั่ง Safranin O 2.5 กรัม ละลายใน 95% เอทานอล 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บสารละลายในขวดสีชา

##### ก.2.3 สารละลาย Sudan Black B 0.5%

ชั่งสีย้อม Sudan Black B 0.5 กรัม ละลายใน 95% เอทานอล 100 มิลลิลิตร

##### ก.2.4 Nile blue A 0.5 ug/ml

เตรียม Nile Blue A 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสีย้อม Nile Blue A 5 มิลลิกรัม ละลายใน Absolute Ethanol ปริมาตร 1 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### สถานที่เก็บตัวอย่าง

#### ข.1 แหล่งที่ 1 ดินจากแหล่งเพาะปลูก

ต.กุดโบสถ์ อ.เสิงสาง จ.นครราชสีมา



#### ข.2 แหล่งที่ 2 น้ำคลองจาก

แหล่งชุมชน

ต.บางแก้ว อ.บางพลี จ.สมุทรปราการ



#### ข.3 แหล่งที่ 3 ดินป่าชายเลน

แขวง ท่าข้าม เขต บางขุนเทียน



#### ข.4 แหล่งที่ 4 ไม้ผุ




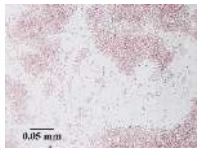




ต.กุดโบสถ์ อ.เสิงสาง จ.นครราชสีมา



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ภาคผนวก ค**  
**ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย**

**ตารางที่ ค.1** เชื้อควบคุม



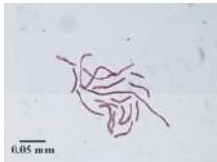



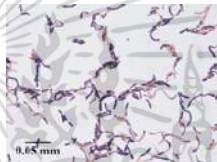
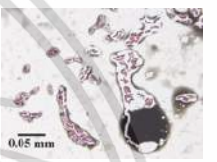
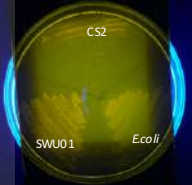


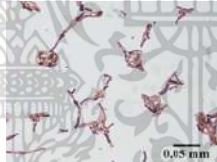
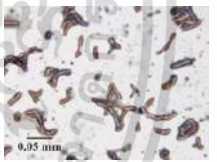

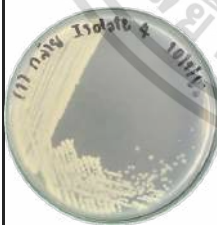





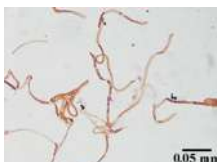

ชื่อเชื้อ	ผลก่อนย้อม Sudan Black B	ผลหลังย้อม Sudan Black B	Gram Stain (1000X)	Sudan Black B สไลด์ (1000X)	Nile Blue A
<i>Escherichia coli</i> (Negative)			 Gram negative	 0	0
<i>B.megaterium</i> SWU01 (TISTR10144) (Positive)			 Gram positive	 +++	+++

หมายเหตุ :

- +++ ติดสี Sudan Black B เข้มมากที่สุด และมีการเรืองแสงของ Nile Blue A มากที่สุด
- ++ ติดสี Sudan Black B เข้มปานกลาง และมีการเรืองแสงของ Nile Blue A ปานกลาง
- + ติดสี Sudan Black B เข้มน้อยที่สุด และมีการเรืองแสงของ Nile Blue A น้อยที่สุด
- 0 ไม่ติดสี Sudan Black B และไม่มีการเรืองแสงของ Nile Blue A


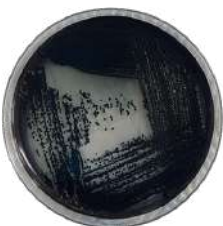

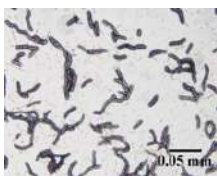
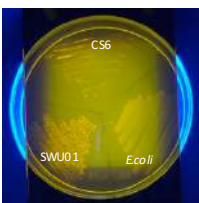


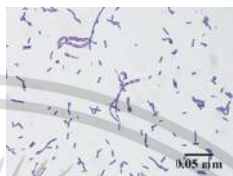
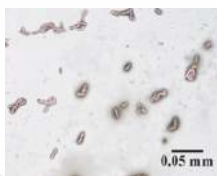
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ติดสีของ Sudan Black B และการเรืองแสงของ Nile blue ของตัวอย่างดินจากแหล่งเพาะปลูก

ที่มา / ชื่อเชื้อ	ผลก่อนย้อม Sudan Black B	ผลหลังย้อม Sudan Black B	Gram Stain (1000X)	Sudan Black B สไลด์ (1000X)	Nile Blue A
CS1			 Gram negative	 0	-
CS2			 Gram positive	 +++	 0
CS3			 Gram negative	 +	 0
CS4			 Gram positive	 +	-
CS5			 Gram negative	 0	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า


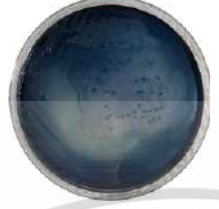
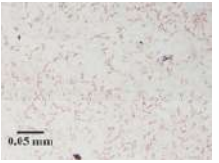
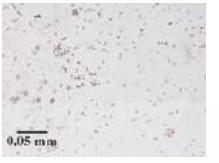


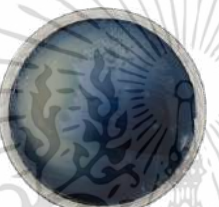

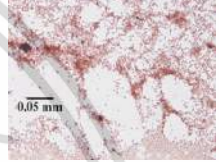




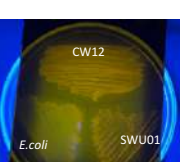



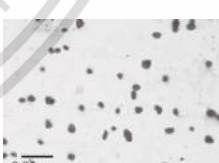


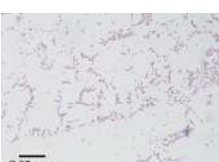
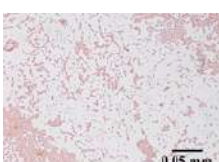
ไม่มีการเผยแพร่ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเด็ดขาดเผยแพร่ และต้องยื่นจนถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีกรณีเปิดเผย

CS6			 <p>Gram negative</p>	 <p>+</p>	 <p>CS6 SWU01 E.coli +</p>
CS7			 <p>Gram positive</p>	 <p>0</p>	-

หมายเหตุ : CS คือ ดินบริเวณแหล่งเพาะปลูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



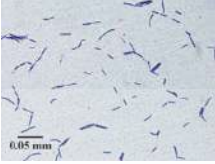
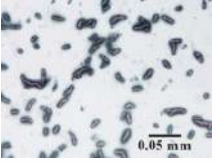



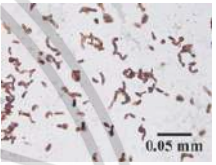
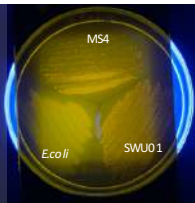



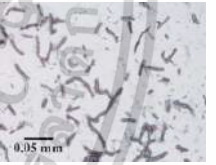


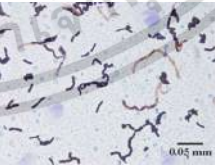
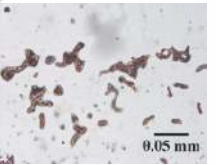
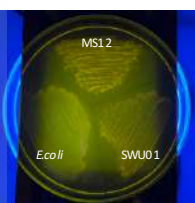
ตารางที่ ค.3 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ติดสีของ Sudan Black B และการเรืองแสงของ Nile blue ของตัวอย่างน้ำคลองจากแหล่งชุมชน

ที่มา / ชื่อเชื้อ	ผลก่อนย้อม Sudan Black B	ผลหลังย้อม Sudan Black B	Gram Stain (1000X)	Sudan Black B สไลด์ (1000X)	Nile Blue A
CW3			 Gram negative	 +	 0
CW6			 Gram negative	 0	-
CW12			 Gram negative	 +++	 +++
CW14			 Gram positive	 0	-
CW16			 Gram positive	 0	-




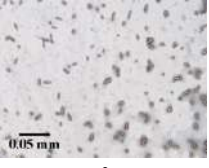







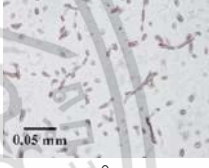
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ การค้า

หมายเหตุ: CW คือ น้ำคลองจากแหล่งชุมชน  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ที่สิ้น ยกเว้นที่มีเหตุแบบสงวนเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ติดสีของ Sudan Black B และการเรืองแสงของ Nile blue ของตัวอย่างดินป่าชายเลน

ที่มา / ชื่อเชื้อ	ผลก่อนย้อม Sudan Black B	ผลหลังย้อม Sudan Black B	Gram Stain (1000X)	Sudan Black B สไลด์ (1000X)	Nile Blue A
MS1			 Gram positive	 0	-
MS4			 Gram positive	 ++	 ++
MS9			 Gram positive	 0	-
MS12			 Gram positive	 +	 +



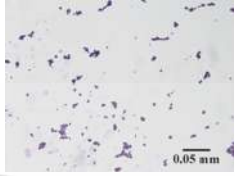
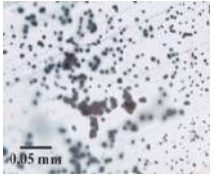


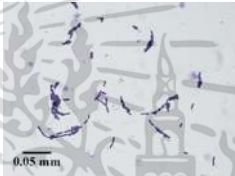
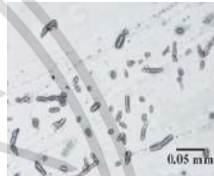



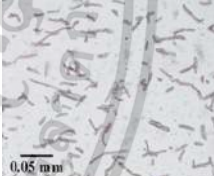



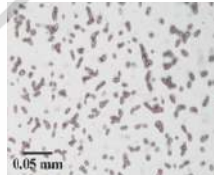
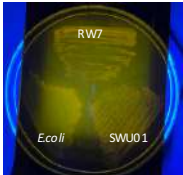



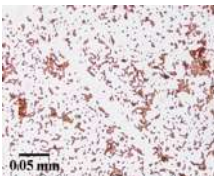
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MS14			 <p>0.05 mm</p> <p>Gram negative</p>	 <p>0.05 mm</p> <p>0</p>	-
MS15			 <p>0.05 mm</p> <p>Gram positive</p>	 <p>0.05 mm</p> <p>0</p>	-
MS16			 <p>0.05 mm</p> <p>Gram positive</p>	 <p>0.05 mm</p> <p>0</p>	-



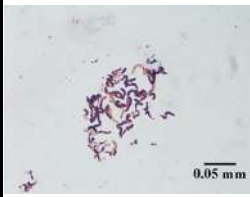
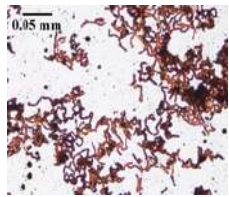


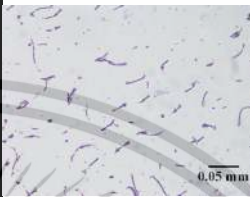

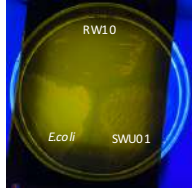


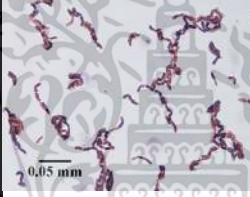
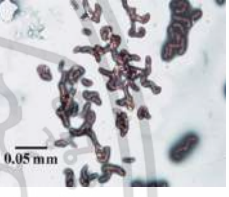
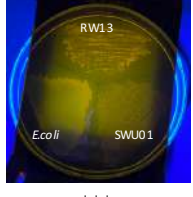
หมายเหตุ : MS คือ ดินป่าชายเลน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.5 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ติดสีย้อมของ Sudan Black B และการเรืองแสงของ Nile blue ของตัวอย่างไม้ผุ

ที่มา / ชื่อเชื้อ	ผลก่อนย้อม Sudan Black B	ผลหลังย้อม Sudan Black B	Gram Stain (1000X)	Sudan Black B สไลด์ (1000X)	Nile Blue A
RW1			 Gram positive	 0	-
RW4			 Gram positive	 0	-
RW5			 Gram positive	 0	-
RW7			 Gram positive	 ++	 E. coli SWU01 ++
RW8			 Gram positive	 0	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ลงนามไว้สำหรับการใช้เฉพาะในการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถให้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

RW9					-
RW10					
RW13					

หมายเหตุ : RW คือ ไม้ผู้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ง

## ผลการสกัดน้ำหนัเซลล์แห้งและปริมาณฟิเอชปีของเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ ง.1 ผลการสกัดน้ำหนัเซลล์แห้ง

เชื้อ	น้ำหนักหลอด ก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลอด + เซลล์ (กรัม)	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (กรัม/ มิลลิลิตร)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	OD หัวเชื้อ (10x)	OD ก่อนสกัด
CW12						
ซ้ำที่ 1	0.9889	0.9951	0.0062	10	0.208	1.225
ซ้ำที่ 2	0.9938	1.0003	0.0065	10	0.208	1.218
ซ้ำที่ 3	0.9797	0.9854	0.0057	10	0.207	1.216
ค่าเฉลี่ย			0.0061	10	0.208	1.220
MS4						
ซ้ำที่ 1	0.9786	0.9827	0.0041	10	0.173	0.940
ซ้ำที่ 2	0.9825	0.9872	0.0047	10	0.171	0.934
ซ้ำที่ 3	0.9741	0.9817	0.0076	10	0.170	0.932
ค่าเฉลี่ย			0.0055	10	0.171	0.935
RW7						
ซ้ำที่ 1	0.9881	0.9937	0.0056	10	0.184	1.371
ซ้ำที่ 2	0.9885	0.9933	0.0048	10	0.183	1.365
ซ้ำที่ 3	0.9758	0.9813	0.0055	10	0.183	1.360
ค่าเฉลี่ย			0.0053	10	0.183	1.365
RW13						
ซ้ำที่ 1	0.9871	0.9851	0.0080	10	0.280	1.213
ซ้ำที่ 2	0.9837	0.9900	0.0063	10	0.288	1.210
ซ้ำที่ 3	0.980	0.9876	0.0070	10	0.285	1.211
ค่าเฉลี่ย			0.0071	10	0.284	1.211
SWU01 (TISTR10144)						
ซ้ำที่ 1	0.9784	0.9837	0.0053	10	0.202	1.118
ซ้ำที่ 2	0.9765	0.9817	0.0052	10	0.198	1.114
ซ้ำที่ 3	0.9888	0.9945	0.0057	10	0.200	1.109
ค่าเฉลี่ย			0.0054	10	0.200	1.114

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและดัดแปลงข้อมูลถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.2 ผลการสกัดน้ำหนักรูเอซีบี

เชื้อ	น้ำหนัก หลอดก่อน อบ (กรัม)	น้ำหนัก หลอด + พี เอซีบี (กรัม)	น้ำหนักพี เอซีบี (กรัม/ มิลลิลิตร)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	OD หัวเชื้อ (10x)	OD ก่อน สกัด
CW12						
ซ้ำที่ 1	0.9934	0.9962	0.0028	10	0.208	1.225
ซ้ำที่ 2	0.9946	0.9974	0.0028	10	0.208	1.218
ซ้ำที่ 3	0.9851	0.9874	0.0023	10	0.207	1.216
ค่าเฉลี่ย			0.0026	10	0.208	1.220
MS4						
ซ้ำที่ 1	0.9938	0.9945	0.0007	10	0.173	0.940
ซ้ำที่ 2	0.9903	0.9919	0.0016	10	0.171	0.934
ซ้ำที่ 3	0.9998	1.0007	0.0009	10	0.170	0.932
ค่าเฉลี่ย			0.0011	10	0.171	0.935
RW7						
ซ้ำที่ 1	0.8872	0.8886	0.0014	10	0.184	1.371
ซ้ำที่ 2	0.9914	0.9926	0.0012	10	0.183	1.365
ซ้ำที่ 3	0.9898	0.9909	0.0011	10	0.183	1.360
ค่าเฉลี่ย			0.0012	10	0.183	1.365
RW13						
ซ้ำที่ 1	0.9929	0.9955	0.0026	10	0.280	1.213
ซ้ำที่ 2	0.9927	0.9950	0.0023	10	0.288	1.210
ซ้ำที่ 3	0.9934	0.9956	0.0022	10	0.285	1.211
ค่าเฉลี่ย			0.0024	10	0.284	1.211
SWU01 (TISTR10144)						
ซ้ำที่ 1	0.9849	0.9861	0.0012	10	0.202	1.118
ซ้ำที่ 2	0.9978	0.9991	0.0013	10	0.198	1.114
ซ้ำที่ 3	0.9966	0.9979	0.0013	10	0.200	1.109
ค่าเฉลี่ย			0.0013	10	0.200	1.114

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๓.3 การเปรียบเทียบปริมาณ PHB และน้ำหนักเซลล์แห้ง

เชื้อ	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	พีเอชบี (กรัมต่อลิตร)	%พีเอชบี (%W/W)
CW12			
ซ้้าที่ 1	0.62	0.28	45.16
ซ้้าที่ 2	0.65	0.28	43.03
ซ้้าที่ 3	0.57	0.23	40.35
ค่าเฉลี่ย	0.61	0.26	42.86
MS4			
ซ้้าที่ 1	0.41	0.07	17.07
ซ้้าที่ 2	0.47	0.16	34.04
ซ้้าที่ 3	0.76	0.09	11.84
ค่าเฉลี่ย	0.55	0.11	20.99
RW7			
ซ้้าที่ 1	0.56	0.14	25
ซ้้าที่ 2	0.48	0.12	25
ซ้้าที่ 3	0.55	0.11	20
ค่าเฉลี่ย	0.53	0.12	23.33
RW13			
ซ้้าที่ 1	0.80	0.26	32.50
ซ้้าที่ 2	0.63	0.23	36.51
ซ้้าที่ 3	0.70	0.22	31.43
ค่าเฉลี่ย	0.71	0.24	33.48
SWU01 (TISTR10144)			
ซ้้าที่ 1	0.53	0.12	22.64
ซ้้าที่ 2	0.52	0.13	25.00
ซ้้าที่ 3	0.57	0.13	22.81
ค่าเฉลี่ย	0.54	0.13	23.48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก จ

### การวิเคราะห์ทางสถิติ

**ตารางที่ จ.1** การวิเคราะห์ทางสถิติและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลน้ำหนักรเซลล์แห้ง  
ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนักรเซลล์แห้ง

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: DCW

	(I) isolates	(J) isolates	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	CW12	MS4	.10000	.07795	.707	-.1565	.3565
		RW7	.11667	.07795	.586	-.1399	.3732
		RW13	-.06333	.07795	.921	-.3199	.1932
		SWU01	.10667	.07795	.659	-.1499	.3632
	MS4	CW12	-.10000	.07795	.707	-.3565	.1565
		RW7	.01667	.07795	.999	-.2399	.2732
		RW13	-.16333	.07795	.293	-.4199	.0932
		SWU01	.00667	.07795	1.000	-.2499	.2632
	RW7	CW12	-.11667	.07795	.586	-.3732	.1399
		MS4	-.01667	.07795	.999	-.2732	.2399
		RW13	-.18000	.07795	.219	-.4365	.0765
		SWU01	-.01000	.07795	1.000	-.2665	.2465
	RW13	CW12	.06333	.07795	.921	-.1932	.3199
		MS4	.16333	.07795	.293	-.0932	.4199
		RW7	.18000	.07795	.219	-.0765	.4365
		SWU01	.17000	.07795	.261	-.0865	.4265
	SWU01	CW12	-.10667	.07795	.659	-.3632	.1499
		MS4	-.00667	.07795	1.000	-.2632	.2499
		RW7	.01000	.07795	1.000	-.2465	.2665
		RW13	-.17000	.07795	.261	-.4265	.0865
LSD	CW12	MS4	.10000	.07795	.228	-.0737	.2737
		RW7	.11667	.07795	.165	-.0570	.2903
		RW13	-.06333	.07795	.435	-.2370	.1103
		SWU01	.10667	.07795	.201	-.0670	.2803
	MS4	CW12	-.10000	.07795	.228	-.2737	.0737
		RW7	.01667	.07795	.835	-.1570	.1903
		RW13	-.16333	.07795	.063	-.3370	.0103
		SWU01	.00667	.07795	.934	-.1670	.1803
	RW7	CW12	-.11667	.07795	.165	-.2903	.0570
		MS4	-.01667	.07795	.835	-.1903	.1570
		RW13	-.18000*	.07795	.044	-.3537	-.0063
		SWU01	-.01000	.07795	.900	-.1837	.1637
	RW13	CW12	.06333	.07795	.435	-.1103	.2370
		MS4	.16333	.07795	.063	-.0103	.3370
		RW7	.18000*	.07795	.044	.0063	.3537
		SWU01	.17000	.07795	.054	-.0037	.3437
	SWU01	CW12	-.10667	.07795	.201	-.2803	.0670
		MS4	-.00667	.07795	.934	-.1803	.1670
		RW7	.01000	.07795	.900	-.1637	.1837
		RW13	-.17000	.07795	.054	-.3437	.0037

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
 \*The mean difference is significant at the 0.05 level. \*หมายถึงค่าเฉลี่ยของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้  
 ไม่ว่าการค้นพบ

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA

**ANOVA**

DCW

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.076	4	.019	2.097	.156
Within Groups	.091	10	.009		
Total	.168	14			

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลน้ำหนักเซลล์แห้ง

DCW			
	isolates	N	Subset for alpha = 0.05
			1
Student-Newman-Keuls <sup>a</sup>	RW7	3	.5300
	SWU01	3	.5400
	MS4	3	.5467
	CW12	3	.6467
	RW13	3	.7100
	Sig.		.219
Tukey HSD <sup>a</sup>	RW7	3	.5300
	SWU01	3	.5400
	MS4	3	.5467
	CW12	3	.6467
	RW13	3	.7100
	Sig.		.219
Duncan <sup>a</sup>	RW7	3	.5300
	SWU01	3	.5400
	MS4	3	.5467
	CW12	3	.6467
	RW13	3	.7100
	Sig.		.060

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.2 การวิเคราะห์ทางสถิติและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลน้ำหนักรูทพีเอชบี  
ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนักรูทพีเอชบี

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: PHB

	(I) isolate	(J) isolate	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	CW12	MS4	.15667*	.02241	.000	.0829	.2304
		RW7	.14000*	.02241	.001	.0662	.2138
		RW13	.02667	.02241	.757	-.0471	.1004
		SWU01	.13667*	.02241	.001	.0629	.2104
	MS4	CW12	-.15667*	.02241	.000	-.2304	-.0829
		RW7	-.01667	.02241	.941	-.0904	.0571
		RW13	-.13000*	.02241	.001	-.2038	-.0562
		SWU01	-.02000	.02241	.893	-.0938	.0538
	RW7	CW12	-.14000*	.02241	.001	-.2138	-.0662
		MS4	.01667	.02241	.941	-.0571	.0904
		RW13	-.11333*	.02241	.003	-.1871	-.0396
		SWU01	-.00333	.02241	1.000	-.0771	.0704
	RW13	CW12	-.02667	.02241	.757	-.1004	.0471
		MS4	.13000*	.02241	.001	.0562	.2038
		RW7	.11333*	.02241	.003	.0396	.1871
		SWU01	.11000*	.02241	.004	.0362	.1838
SWU01	CW12	-.13667*	.02241	.001	-.2104	-.0629	
	MS4	.02000	.02241	.893	-.0538	.0938	
	RW7	.00333	.02241	1.000	-.0704	.0771	
	RW13	-.11000*	.02241	.004	-.1838	-.0362	
LSD	CW12	MS4	.15667*	.02241	.000	.1067	.2066
		RW7	.14000*	.02241	.000	.0901	.1899
		RW13	.02667	.02241	.262	-.0233	.0766
		SWU01	.13667*	.02241	.000	.0867	.1866
	MS4	CW12	-.15667*	.02241	.000	-.2066	-.1067
		RW7	-.01667	.02241	.474	-.0666	.0333
		RW13	-.13000*	.02241	.000	-.1799	-.0801
		SWU01	-.02000	.02241	.393	-.0699	.0299
	RW7	CW12	-.14000*	.02241	.000	-.1899	-.0901
		MS4	.01667	.02241	.474	-.0333	.0666
		RW13	-.11333*	.02241	.000	-.1633	-.0634
		SWU01	-.00333	.02241	.885	-.0533	.0466
	RW13	CW12	-.02667	.02241	.262	-.0766	.0233
		MS4	.13000*	.02241	.000	.0801	.1799
		RW7	.11333*	.02241	.000	.0634	.1633
		SWU01	.11000*	.02241	.001	.0601	.1599
SWU01	CW12	-.13667*	.02241	.000	-.1866	-.0867	
	MS4	.02000	.02241	.393	-.0299	.0699	
	RW7	.00333	.02241	.885	-.0466	.0533	
	RW13	-.11000*	.02241	.001	-.1599	-.0601	

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA

**ANOVA**

PHB

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.064	4	.016	21.119	.000
Within Groups	.008	10	.001		
Total	.071	14			

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลน้ำหนักรูทไฟเอชบี

**PHB**

		Subset for alpha = 0.05	
	isolate	N	1 2
Student-Newman-Keuls <sup>a</sup>	MS4	3	.1067
	RW7	3	.1233
	SWU01	3	.1267
	RW13	3	.2367
	CW12	3	.2633
	Sig.		.657
Tukey HSD <sup>a</sup>	MS4	3	.1067
	RW7	3	.1233
	SWU01	3	.1267
	RW13	3	.2367
	CW12	3	.2633
	Sig.		.893
Duncan <sup>a</sup>	MS4	3	.1067
	RW7	3	.1233
	SWU01	3	.1267
	RW13	3	.2367
	CW12	3	.2633
	Sig.		.414

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.3 การวิเคราะห์ทางสถิติและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล %PHB content  
 ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ %PHB content

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: PHBcontent

	(I) isolates	(J) isolates	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	CW12	MS4	23.77333*	3.90374	.001	10.9258	36.6209
		RW7	19.89667*	3.90374	.003	7.0491	32.7442
		RW13	9.83333	3.90374	.162	-3.0142	22.6809
		SWU01	19.71333*	3.90374	.004	6.8658	32.5609
	MS4	CW12	-23.77333*	3.90374	.001	-36.6209	-10.9258
		RW7	-3.87667	3.90374	.853	-16.7242	8.9709
		RW13	-13.94000*	3.90374	.032	-26.7875	-1.0925
		SWU01	-4.06000	3.90374	.832	-16.9075	8.7875
	RW7	CW12	-19.89667*	3.90374	.003	-32.7442	-7.0491
		MS4	3.87667	3.90374	.853	-8.9709	16.7242
		RW13	-10.06333	3.90374	.148	-22.9109	2.7842
		SWU01	-.18333	3.90374	1.000	-13.0309	12.6642
	RW13	CW12	-9.83333	3.90374	.162	-22.6809	3.0142
		MS4	13.94000*	3.90374	.032	1.0925	26.7875
		RW7	10.06333	3.90374	.148	-2.7842	22.9109
		SWU01	9.88000	3.90374	.159	-2.9675	22.7275
SWU01	CW12	-19.71333*	3.90374	.004	-32.5609	-6.8658	
	MS4	4.06000	3.90374	.832	-8.7875	16.9075	
	RW7	.18333	3.90374	1.000	-12.6642	13.0309	
	RW13	-9.88000	3.90374	.159	-22.7275	2.9675	
LSD	CW12	MS4	23.77333*	3.90374	.000	15.0753	32.4714
		RW7	19.89667*	3.90374	.000	11.1986	28.5947
		RW13	9.83333*	3.90374	.030	1.1353	18.5314
		SWU01	19.71333*	3.90374	.000	11.0153	28.4114
	MS4	CW12	-23.77333*	3.90374	.000	-32.4714	-15.0753
		RW7	-3.87667	3.90374	.344	-12.5747	4.8214
		RW13	-13.94000*	3.90374	.005	-22.6381	-5.2419
		SWU01	-4.06000	3.90374	.323	-12.7581	4.6381
	RW7	CW12	-19.89667*	3.90374	.000	-28.5947	-11.1986
		MS4	3.87667	3.90374	.344	-4.8214	12.5747
		RW13	-10.06333*	3.90374	.028	-18.7614	-1.3653
		SWU01	-.18333	3.90374	.963	-8.8814	8.5147
	RW13	CW12	-9.83333*	3.90374	.030	-18.5314	-1.1353
		MS4	13.94000*	3.90374	.005	5.2419	22.6381
		RW7	10.06333*	3.90374	.028	1.3653	18.7614
		SWU01	9.88000*	3.90374	.030	1.1819	18.5781
SWU01	CW12	-19.71333*	3.90374	.000	-28.4114	-11.0153	
	MS4	4.06000	3.90374	.323	-4.6381	12.7581	
	RW7	.18333	3.90374	.963	-8.5147	8.8814	
	RW13	-9.88000*	3.90374	.030	-18.5781	-1.1819	

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA

**ANOVA**

PHBcontent

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1122.668	4	280.667	12.278	.001
Within Groups	228.588	10	22.859		
Total	1351.256	14			

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล %PHB content

		PHBcontent			
		Subset for alpha = 0.05			
	isolates	N	1	2	3
Student-Newman-Keuls <sup>a</sup>	MS4	3	19.3933		
	RW7	3	23.2700	23.2700	
	SWU01	3	23.4533	23.4533	
	RW13	3		33.3333	
	CW12	3			43.1667
	Sig.			.570	.065
Tukey HSD <sup>a</sup>	MS4	3	19.3933		
	RW7	3	23.2700	23.2700	
	SWU01	3	23.4533	23.4533	
	RW13	3		33.3333	33.3333
	CW12	3			43.1667
	Sig.			.832	.148
Duncan <sup>a</sup>	MS4	3	19.3933		
	RW7	3	23.2700		
	SWU01	3	23.4533		
	RW13	3		33.3333	
	CW12	3			43.1667
	Sig.			.344	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

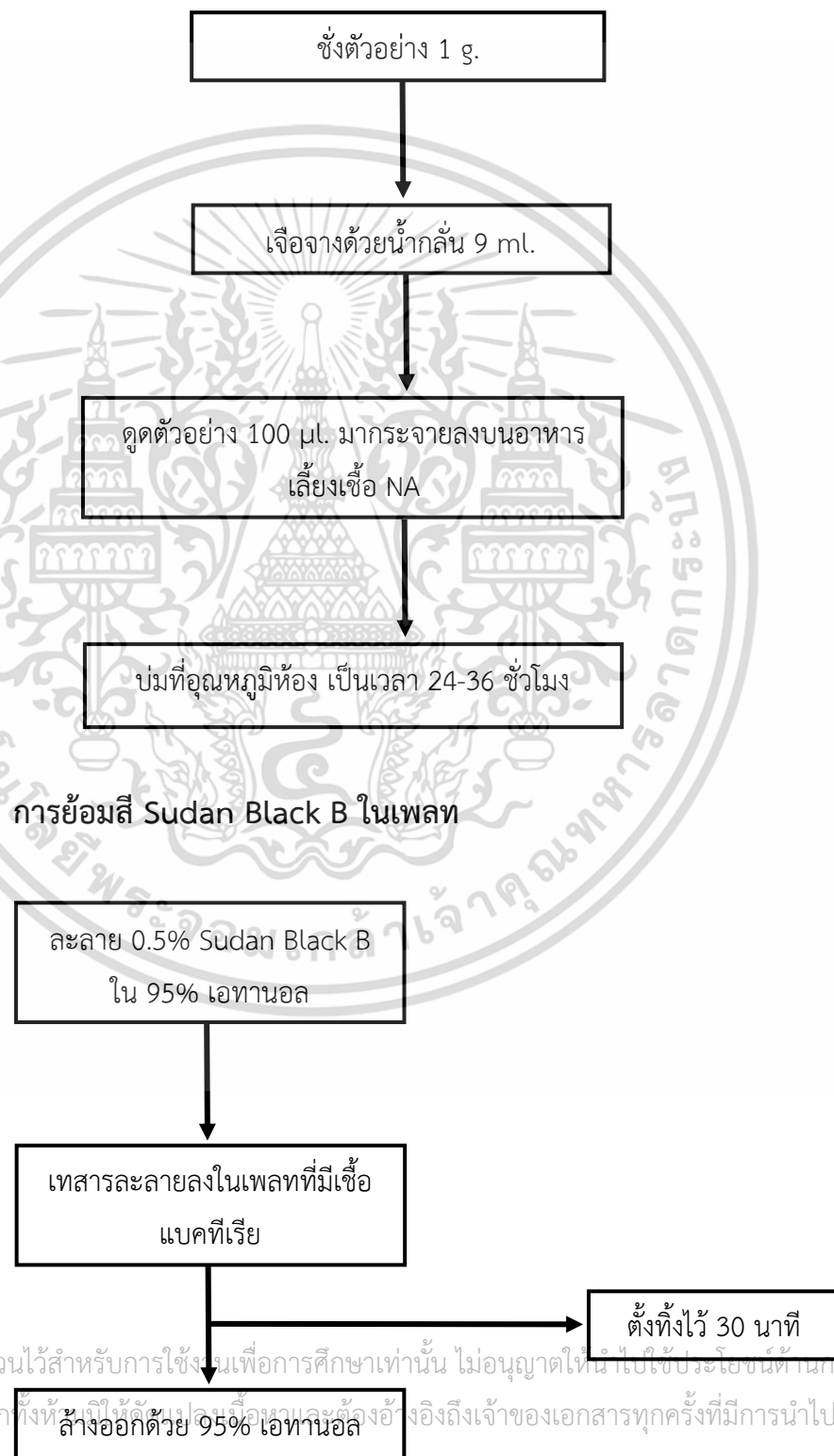
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ฉ

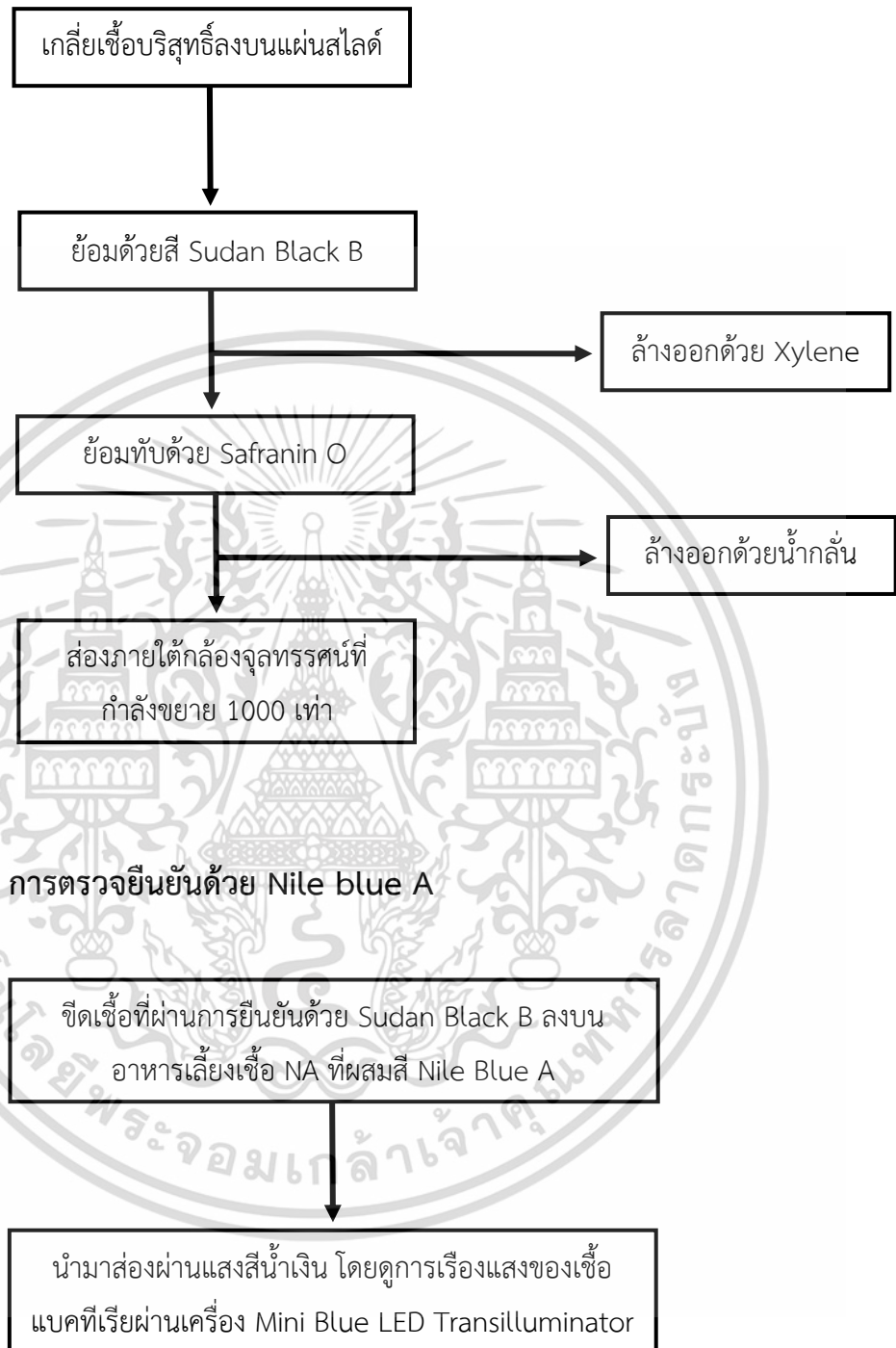
### ผังงานวิธีการดำเนินการ

#### การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตพีเอชบี



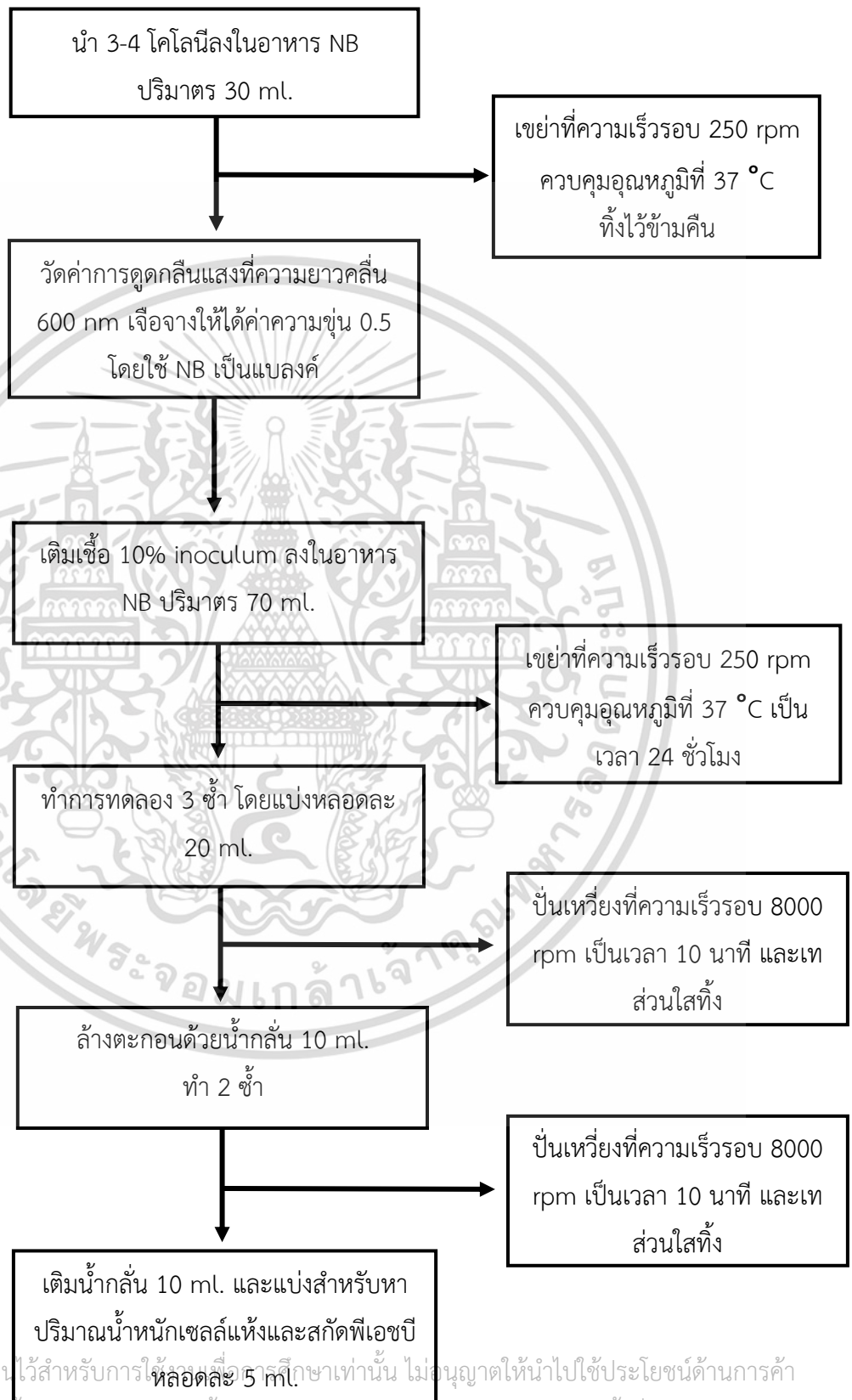
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ข้อมูลและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### การตรวจยืนยันโดยการย้อมสี Sudan Black B บนสไลด์



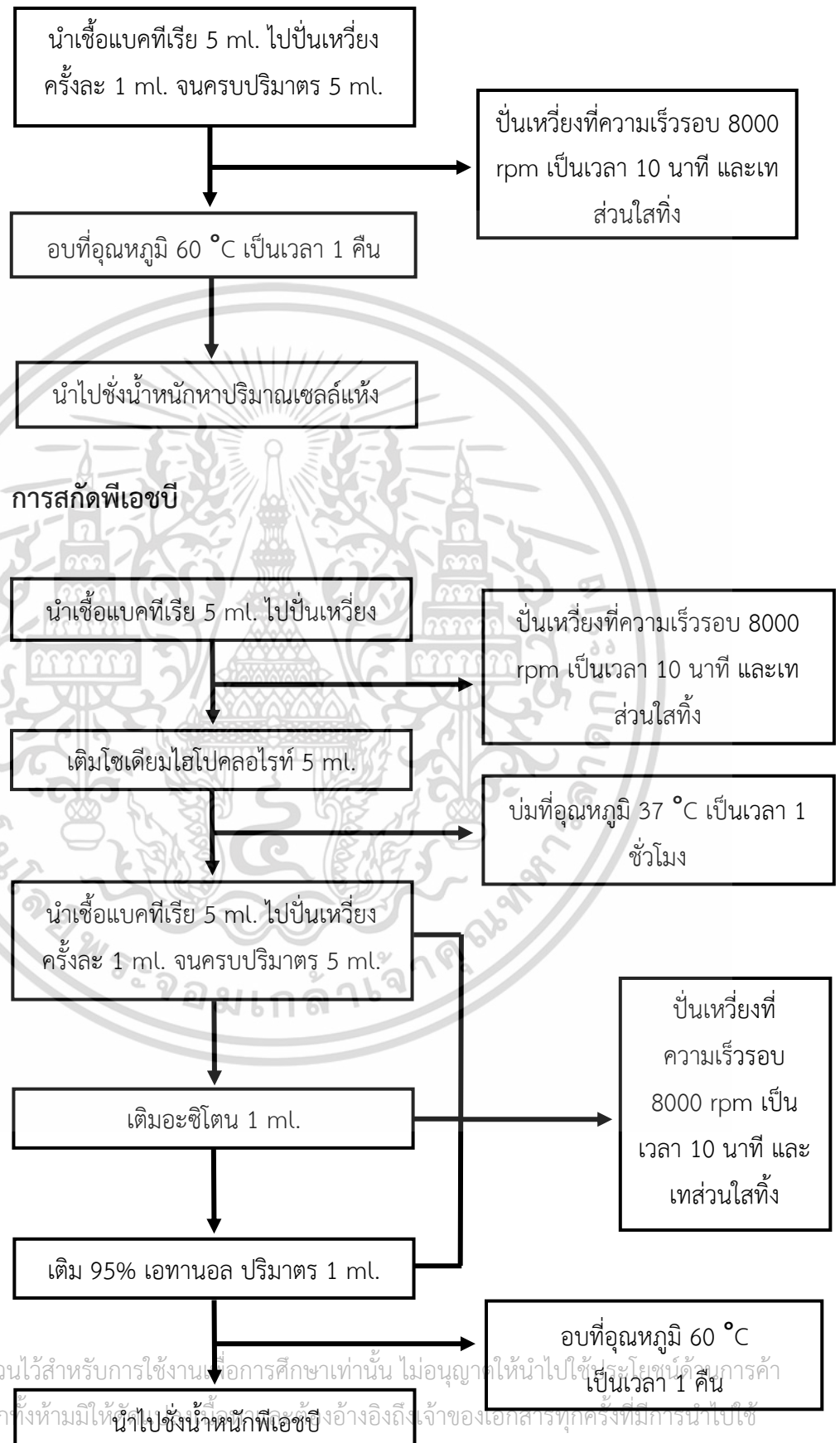
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสกัดพีเอชบีจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ  
การเตรียมหัวเชื้อ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ส่วนตัวในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## การหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้นำไปเผยแพร่หรืออ้างถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 23 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2565

ข้าพเจ้า นางสาวอาทิตตยา ทิพย์บำรุง รหัสประจำตัว 62050666

นางสาวอาภรณ์ อุ่นคำ รหัสประจำตัว 62050667

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์  
ขอรับรองว่าโครงการพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การคัดแยกและระบุเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพประเภท  
พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (พีเอชบี)

ชื่อภาษาอังกฤษ Screening and Identification of Polyhydroxybutyrate (PHB) producing  
bacteria

ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยที่ได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความ  
ซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจาก  
เล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ 0.88%

ลงชื่อ ทัก ทักทัก ทัก บำรุง

ลงชื่อ อาภรณ์ อุ่นคำ

(นางสาวอาทิตตยา ทิพย์บำรุง)

(นางสาวอาภรณ์ อุ่นคำ)

นักศึกษา

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงการ  
พิเศษของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์  
จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

(ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและข้อมูลของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้