

อรอุมา จันท์เสถียร : ความหลากหลายของแบคทีเรียที่สร้างพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต ซึ่งแยกได้จากกากมันสำปะหลัง (DIVERSITY OF POLYHYDROXYALKANOATES-PRODUCING BACTERIA ISOLATED FROM CASSAVA PULP) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรสิทธิ์ รอดทอง, 200 หน้า.

พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (พีเอชเอ) เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพกลุ่มหนึ่งที่เซลล์จุลินทรีย์ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำรอง พีเอชเอบางอนุพันธ์สามารถใช้เป็นพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เนื่องจากมีสมบัติคล้ายคลึงกับปิโตรเคมีพอลิเมอร์ในอุตสาหกรรมพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ และคาดว่าจะสามารถใช้ทดแทนปิโตรเคมีพอลิเมอร์เหล่านั้นได้ แบคทีเรียหลายชนิดสามารถสังเคราะห์พีเอชเอในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนในปริมาณมากเกินพอในอาหารเลี้ยงเชื้อและมีสารอาหารที่จำเป็นในปริมาณจำกัด การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความหลากหลายของแบคทีเรียที่สร้างพีเอชเอซึ่งแยกได้จากกากมันสำปะหลัง โดยตรวจหาสารพีเอชเอที่สะสมภายในเซลล์ และเปรียบเทียบเพื่อจัดกลุ่มของแบคทีเรียตามระดับการสะสมพีเอชเอ พร้อมทั้งศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ จากการศึกษาพีเอชเอที่สะสมภายในเซลล์แบคทีเรียด้วยเทคนิค Nile blue A และติดตามการสะสมสารด้วยวิธี Nile red ของแบคทีเรียจำนวน 772 ไอโซเลต พบแบคทีเรีย 82 ไอโซเลต ที่สามารถสะสมสารพีเอชเอในระดับโดยเฉลี่ยร้อยละ 3.3 ถึง 85.77 ของพื้นที่ทั้งหมดภายในเซลล์เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อบนอาหารสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และย้ายลงเลี้ยงบนอาหารที่มีสารอาหารขั้นต่ำสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอีก 48 ชั่วโมง จากนั้นระบุชนิดของแบคทีเรียที่สะสมพีเอชเอเหล่านี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal RNA gene จากสัณฐานวิทยาของเซลล์สามารถแบ่งแบคทีเรียได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างเซลล์เป็นท่อนไม่สร้างเอนโดสปอร์ กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเซลล์เป็นท่อน กลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างเซลล์เป็นท่อนสร้างเอนโดสปอร์ และกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างเซลล์กลม ซึ่งมีจำนวน 15 3 59 และ 5 ไอโซเลต ที่สามารถสะสมสารพีเอชเอคิดเป็นร้อยละ 3.3-70.72 5.1-21.01 8.3-85.77 และ 51.9-74.99 ของพื้นที่ทั้งหมดภายในเซลล์ตามลำดับ เมื่อศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียทั้ง 82 ไอโซเลต พบความหลากหลายของสกุลของแบคทีเรีย จำนวน 8 สกุล คือ *Bacillus* *Chryseobacterium* *Enterobacter* *Klebsiella* *Listeria* (ชนิดที่ไม่เป็นเชื้อก่อโรค) *Micrococcus* *Pseudomonas* และ *Staphylococcus* จากนั้นได้เลือกไอโซเลตตัวแทนของแบคทีเรียมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal RNA gene ซึ่งได้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 1,381-1,439 คู่เบส ที่เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนกับข้อมูลจาก

ฐานข้อมูล GenBank แล้วพบว่าแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเซลล์เป็นท่อนจำนวน 3 ไอโซเลต มีความเหมือนกับ *Pseudomonas aeruginosa* PAON 2 *Klebsiella oxytoca* SB 9 *Enterobacter hormaechei* CIP 103441<sup>T</sup> ร้อยละ 96.7 99.1 และ 99.5 ตามลำดับ แบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างเซลล์เป็นท่อนสร้างเอนโดสปอร์จำนวน 8 ไอโซเลต มีความเหมือนกับ *Bacillus megaterium* ATCC 14581<sup>T</sup> *Bacillus cereus* ATCC 21281<sup>T</sup> *Bacillus* sp. NCCP-158<sup>T</sup> *B. cereus* ATCC 43881<sup>T</sup> *B. subtilis* KQC 85 *Bacillus* sp. IMT 21<sup>T</sup> *B. cereus* JS-33 และ *Bacillus* sp. PBCC 10<sup>T</sup> ร้อยละ 99.9 99.2 99.7 98.0 99.6 99.2 89.8 และ 99.9 ตามลำดับ และตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกรูปร่างเซลล์กลม 1 ไอโซเลต มีความเหมือนกับ *Staphylococcus cohnii* ATCC 29974<sup>T</sup> ร้อยละ 99.3 แบคทีเรียที่แยกได้จากกากมันสำปะหลังที่ย่อยแป็งได้ดีและสะสมสารพีเอชเอได้มากกว่าร้อยละ 80 ของพื้นที่ทั้งหมดภายในเซลล์ 2 ไอโซเลต ที่ระบุชนิดได้ว่าเป็น *Bacillus megaterium* มีศักยภาพในการใช้ประโยชน์เพื่อผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ



สาขาวิชาชีววิทยา

ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนักศึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ONUMA CHANSATEIN : DIVERSITY OF  
POLYHYDROXYALKANOATES-PRODUCING BACTERIA ISOLATED  
FROM CASSAVA PULP. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUREELAK  
RODTONG, Ph.D. 200 PP.

DIVERSITY/POLYHYDROXYALKANOATES/BACTERIAL IDENTIFICATION/  
POLYHYDROXYALKANOATES-PRODUCING BACTERIA

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) is a group of biopolymers functioning as carbon and energy reserves in microbial cells. Some PHA derivatives can be served as biodegradable plastics that have properties similar to petrochemical polymers, non-degradable plastics, and are expected as the replacement for these petrochemical polymers. A wide range of bacterial species synthesize the polymers when a carbon source is provided in excess and essential growth nutrients are limited. The aim of this study was to determine the diversity of PHAs-producing bacteria isolated from cassava pulp samples. Seven hundred and seventy two bacterial isolates were investigated for PHA accumulation in their cells using Nile blue A technique as well as monitoring by Nile red method. Eighty two isolates could accumulate PHAs between 3.3 and 85.77% of their cell areas, which were observed under fluorescent microscope after cultivating on modified complex agar medium at 30°C for 48 h, then transferred to modified minimal medium with incubating at the same condition and duration as the complex medium. These PHAs-producing bacteria were identified by their morphological and physiological characteristics, and 16S ribosomal RNA gene sequence. From cell morphology, the bacteria could be divided into 4 groups: regular,

non-sporing Gram-positive rod, Gram-negative rod, endospore-forming Gram-positive rod, and Gram-positive coccus groups comprising 15, 3, 59, and 5 isolates; and accumulating PHAs in the range of 3.3-70.72%, 5.1-21.01%, 8.3-85.77%, and 51.9-74.99% of their cell areas, respectively. From physiological characterization, 8 genera: *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Listeria* (non-pathogenic species), *Micrococcus*, *Pseudomonas*, and *Staphylococcus* were classified. Then, representative isolates of these bacteria were selected for 16S ribosomal RNA gene analysis. Nucleotide sequences of 1,381-1,439 base pairs of the gene were obtained. When compared these sequences to sequences from GenBank database, it was found that 3 isolates of Gram-negative rods had 96.7, 99.1, and 99.5% similarity to *Pseudomonas aeruginosa* PAON 2, *Klebsiella oxytoca* SB 9, and *Enterobacter hormaechei* CIP 103441<sup>T</sup>, respectively. Eight isolates of endospore-forming Gram-positive rods had 99.9, 99.2, 99.7, 98.0, 99.6, 99.2, 89.8, and 99.9% similarity to *Bacillus megaterium* ATCC 14581<sup>T</sup>, *Bacillus cereus* ATCC 21281<sup>T</sup>, *Bacillus* sp. NCCP-158<sup>T</sup>, *B. cereus* ATCC 43881<sup>T</sup>, *B. subtilis* KQC 85, *Bacillus* sp. IMT 21<sup>T</sup>, *B. cereus* JS-33, and *Bacillus* sp. PBCC 10<sup>T</sup>, respectively. And a representative strain of Gram-positive cocci had 99.3% similarity to *Staphylococcus cohnii* ATCC 29974<sup>T</sup>. Two starch-hydrolysis strains isolated from cassava pulp sample, identified as belonging to *Bacillus megaterium*, and accumulating PHAs more than 80% of their cell areas, could have potential for biopolymer production.

School of Biology

Academic Year 2010

Student's Signature *Oruma Chansatein*

Advisor's Signature *Sureelak Rodtong*

Co-advisor's Signature *Dr. P. P. P.*