วารสารวิชาการเทคโนโลยีอุตสาหกรรม (The Journal of Industrial Technology)
ISSN (online): 2697-5548
DOI: 10.14416/j.ind.tech.2024.04.009

บทความวิจัย

การย่อยสลายพลาสติกพอลิโพรพิลีนโดย *Fictibacillus phosphorivorans* ที่แยกจากตะกอนดินน้ำจืด

ประดินันท์ เอี่ยมสะอาด*

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา
* ผู้ประสานงานเผยแพร่ (Corresponding Author), E-mail: pradinunt.e@aru.ac.th

วันที่รับบทความ: 10 ตุลาคม 2566; วันที่ทบทวนบทความ: 20 กุมภาพันธ์ 2567; วันที่ตอบรับบทความ: 28 กุมภาพันธ์ 2567
วันที่เผยแพร่ออนไลน์: 17 เมษายน 2567

บทคัดย่อ: พลาสติกที่สังเคราะห์ด้วยปิโตรเคมีได้รับความนิยมในการนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายทั้งในอุตสาหกรรมและการใช้ในชีวิตประจำวัน ซึ่งพอลิโพรพิลีนเป็นชนิดหนึ่งที่มีการใช้และตกค้างสะสมในระบบนิเวศปริมาณมาก เนื่องจากโครงสร้างพอลิเมอร์และการใช้สารเติมแต่งในกระบวนการผลิตจึงทำให้พอลิโพรพิลีนถูกย่อยสลายได้ยากโดยวิธีการทางชีวภาพ การศึกษาในครั้งนี้สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากตะกอนดินบ่อน้ำภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา และเมื่อทดสอบ Drop Collapse Test พบว่า ไอโซเลต T2 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้ จึงนำมาศึกษาการย่อยสลายพอลิโพรพิลีนโดยเพาะเลี้ยงในอาหาร Bushnell Haas (BH) ที่มีชิ้นส่วนพลาสติกเป็นเวลา 30 วัน พบว่า น้ำหนักของชิ้นส่วนพลาสติกหายไปคิดเป็น 10.25% นอกจากนี้ยังพบว่า พื้นผิวของพลาสติกมีลักษณะขรุขระเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายทางชีวภาพโดยแบคทีเรีย จากการศึกษาสายพันธุ์ของแบคทีเรียไอโซเลต T2 ด้วยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ร่วมกับการศึกษาความสัมพันธ์ทางลำดับวิวัฒนาการ พบว่ามีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Fictibacillus phosphorivorans* ซึ่งยังไม่พบรายงานการย่อยสลายพลาสติกพอลิโพรพิลีนมาก่อน ทั้งนี้พบว่า ผลจากการทดลองสามารถพัฒนาสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยกระบวนการและเทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่มีการสะสมปนเปื้อนของพลาสติกได้ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: พอลิโพรพิลีน; การย่อยสลายทางชีวภาพ; *Fictibacillus phosphorivorans*; สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

บทความวิจัย

วารสารวิชาการเทคโนโลยีอุตสาหกรรม (The Journal of Industrial Technology)
ISSN (online): 2697-5548
DOI: 10.14416/j.ind.tech.2024.04.009

Polypropylene Biodegradation by *Fictibacillus phosphorivorans* Isolated from Freshwater Sediment

Pradinunt Eiamsa-ard[*]

Department of Environmental Science, Faculty of Science and Technology,
Phranakorn Si Ayutthaya Rajabhat University
[*] Corresponding author, E-mail: pradinunt.e@aru.ac.th

Received: 10 October 2023; Revised: 20 February 2024; Accepted: 28 February 2024
Online Published: 25 April 2024

Abstract: Petroleum-based plastic is widely used either in extensive industrial or daily applications. Polypropylene is mostly used and accumulate in large quantities in the ecosystem. Due to the polymeric structure and supplemented additives in the production process, resulted in rare biodegradation of polypropylene. In this study, the total bacteria were isolated from freshwater sediment within Phranakorn Si Ayutthaya Rajabhat University. The biosurfactant production has been observed in the bacteria isolate T2 after the Drop collapse test procedure. Polypropylene biodegradation efficiency was then investigated through the cultivation of the isolate T2 in the Brushnell Haas (BH) media composed of plastic sample for 30 days, yielding the plastic weight loss of 10.25%. In addition, the roughness of the plastic surface was occurred during SEM analysis provided evidence of bacterial biodegradation proceeded. According to the 16S rRNA sequencing and phylogenetic analysis, the bacteria isolate T2 was closely related to *Fictibacillus phosphorivorans* which had not previously been reported to polypropylene plastics biodegradation. Hence, the result would be a considerable development of bacterial strain through an appropriate process and technology regarding to the further remediating environment contaminated with plastics.

Keywords: Polypropylene; Biodegradation; Fictibacillus phosphorivorans; Biosurfactant

1. บทนำ

พลาสติกเป็นวัสดุที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในชีวิตประจำวันและอุตสาหกรรมหลายภาคส่วน เช่น บรรจุภัณฑ์และวัสดุก่อสร้าง เป็นต้น เนื่องด้วยคุณสมบัติของพลาสติกที่เป็นวัสดุกันน้ำ น้ำหนักเบา มีความยืดหยุ่น คงทน และยังเป็นวัสดุที่มีราคาถูก [1] แต่อย่างไรก็ตามการใช้พลาสติกก่อให้เกิดมลพิษทางสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเป็นขยะที่มีความคงทนและสามารถตกค้างในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน [2] ถึงแม้ว่าเทคโนโลยีในปัจจุบันจะสามารถนำพลาสติกกลับไปใช้ประโยชน์ได้ แต่พบว่ามีเพียง 10% ของขยะพลาสติกที่ถูกนำไปรีไซเคิล นอกจากนี้ยังมีการจัดการในรูปแบบการเผาในเตาเผา (Incineration) ประมาณ 14% และส่วนใหญ่ใช้วิธีการกำจัดโดยวิธีการฝังกลบ [3] ก่อให้เกิดการสะสมของขยะพลาสติกจำนวนมากในระบบนิเวศ และเมื่อเกิดการแตกหักหรือสึกกร่อนด้วยปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมจนกลายเป็นไมโครพลาสติก ซึ่งเป็นชิ้นส่วนพลาสติกที่มีขนาดเล็ก (1 µm – 5 mm) สามารถแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมได้ในบริเวณกว้าง [4] ดังนั้นการพิจารณาวิธีการที่เหมาะสมในการจัดการขยะพลาสติกจึงเป็นสิ่งสำคัญ เช่น การควบคุมการใช้พลาสติก สนับสนุนการใช้พลาสติกประเภทย่อยสลายได้ทางชีวภาพ รวมทั้งการใช้เทคโนโลยีการย่อยสลายพลาสติกด้วยวิธีการทางชีวภาพ โดยอาศัยกิจกรรมการย่อยสลายจากจุลินทรีย์บางสายพันธุ์หรือกลุ่มของจุลินทรีย์ เป็นต้น [5]

การย่อยสลายพลาสติกด้วยวิธีการทางชีวภาพเกิดขึ้นจากกิจกรรมของจุลินทรีย์โดยการหลั่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลาย ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไลเปส (Lipase Enzymes) ไฮโดรเลส (Hydrolase) และ ดีไฮโดรจีเนส (Dehydrogenase) ทำให้โครงสร้างพอลิเมอร์ (Polymer) ของพลาสติกมีขนาดเล็กลงเป็นโอลิโกเมอร์ (Oligomer) โมโนเมอร์ (Monomer) หรือเกิดการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ (Mineralization) เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ และได้ผลิตภัณฑ์เป็น CO_2 และน้ำ [6, 7] แต่อย่างไรก็ตาม ในการย่อยสลายพลาสติกโดยจุลินทรีย์หรือกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น โครงสร้าง องค์ประกอบเคมี ลักษณะพื้นผิว และน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนพลาสติกตั้งต้น รวมทั้งยังพบว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ยังมีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของพันธะเคมีในสายยาวของพอลิเมอร์อีกด้วย [8]

พอลิโพรพิลีน (Polypropylene, PP) โครงสร้างหลักเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนสายยาว (C_nH_{2n}) ซึ่งเป็นพลาสติกที่มีการผลิตมากเป็นอันดับสองรองจากพอลิเอทิลีน (Polyethylene, PE) โดยทั่วไปพอลิโพรพิลีนนิยมใช้เป็นวัสดุสำหรับบรรจุภัณฑ์และฉลากสินค้า สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในหลายกิจกรรม เช่น อุตสาหกรรมอาหาร สิ่งทอ อุปกรณ์ห้องปฏิบัติการ รวมทั้งชิ้นส่วนยานยนต์ เป็นต้น เนื่องจากโครงสร้างหลักของพอลิโพรพิลีนเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนสายยาวที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (10,000 - 40,000 g/mol) และในกระบวนการผลิตยังมีการใช้สารที่ทำให้เกิดความคงตัวจึงทำให้การย่อยสลายพอลิโพรพิลีนด้วยวิธีการทางชีวภาพเกิดขึ้นได้ยาก [9, 10] แต่อย่างไรก็ตาม มีการรายงานถึงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายไมโครพลาสติก

วารสารวิชาการเทคโนโลยีอุตสาหกรรม (The Journal of Industrial Technology)
ISSN (online): 2697-5548
DOI: 10.14416/j.ind.tech.2024.04.009

ชนิดพอลิโพรพิลีน เช่น แบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* sp., *Rhodococcus* sp. และ *Phanerochaete chrysoporium* [11, 12] นอกจากนี้ ยังพบว่ามีการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย (Consortium) ระหว่างแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* และ *Pseudomonas aeruginosa* [13] ซึ่งพบว่ามีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่สายพันธุ์ที่มีรายงานการย่อยสลายพอลิโพรพิลีนอาจเนื่องมาจากข้อจำกัด เกี่ยวกับโครงสร้างหลักของพอลิเมอร์ รวมทั้งการใช้สารเติมแต่งที่ทำให้พลาสติกมีความยืดหยุ่นและคงทน สูง [14] ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจศึกษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายชิ้นส่วนพลาสติกชนิดพอลิโพรพิลีนได้ด้วยวิธีการทางชีวภาพ โดยเฉพาะการย่อยสลายพลาสติกที่ไม่ผ่านการปรับปรุงลักษณะพื้นผิว (Un-pretreated Polypropylene) โดยในการทดลองครั้งนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรีย *Fictibacillus phosphorivorans* จากตะกอนดินบ่อน้ำภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏ พระนครศรีอยุธยา ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับการศึกษาการย่อยสลายไมโครพลาสติกชนิดพอลิโพรพิลีน จึงเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพเพื่อนำไปสู่การพัฒนาสายพันธุ์เพื่อประยุกต์ใช้ในการจัดการขยะพลาสติกที่พบการสะสมปริมาณมากต่อไปในอนาคต

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมชิ้นส่วนพลาสติกชนิดพอลิโพรพิลีน

การศึกษาการย่อยสลายชิ้นส่วนพลาสติก ดำเนินการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการโดยพิจารณาเลือกใช้พลาสติกชนิดพอลิโพรพิลีน ทำได้โดยตัดถุงพลาสติกใสประเภทถุงร้อน (100% Polypropylene) ให้มีขนาด 3 x 3 mm ที่สอดคล้องกับขนาดของอนุภาคไมโครพลาสติก จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายเอทานอล 70% เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำให้แห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ปรับปรุงจาก [15])

2.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายชิ้นส่วนพลาสติกชนิดพอลิโพรพิลีนดำเนินการโดย เก็บตัวอย่างตะกอนดินจากบ่อน้ำภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา ที่ระดับความลึก 10 – 15 cm ซึ่งมีรายงานพบการสะสมของอนุภาคไมโครพลาสติก [16] นำตัวอย่างตะกอนดินน้ำหนัก 5 g เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB medium) ปริมาตร 50 ml เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร LB agar จนกระทั่งได้แบคทีเรียไอโซเลตที่บริสุทธิ์ก่อนนำไปทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (Biosurfactant) ด้วยวิธี Drop Collapse Test โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลตบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาตกตะกอนด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที (Sigma 3-16 KL, Germany) แล้วนำมาทดสอบโดยการหยดส่วนใสปริมาตร 10 µl ลงบนจานเพาะเชื้อพลาสติกที่เคลือบด้วยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ และน้ำมันพืชเปรียบเทียบกับน้ำกลั่นเป็นชุดการทดลองควบคุม พิจารณาเลือกไอโซเลตที่พบการกระจายตัวหรือการยุบตัว (collapse) ของหยดสารละลายส่วนใส ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ [17, 18]

2.3 การย่อยสลายชิ้นส่วนพลาสติกชนิดพอลิโพรพิลีน

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลตที่คัดเลือกได้จากการทดสอบ Drop Collapse Test ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell Haas (BH) ปริมาตร 50 ml ที่มีชิ้นส่วนพลาสติกชนิดพอลิโพรพิลีนที่เตรียมไว้น้ำหนักประมาณ 0.1 g ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันสูงที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 20 นาที เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 30 วัน โดยมีชุดการทดลองที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ BH ที่มีชิ้นส่วนพลาสติกโดยไม่ใช้เชื้อแบคทีเรียเป็นชุดควบคุม ดำเนินการทดลอง 3 ซ้ำ (ปรับปรุงจาก [15]) เมื่อครบระยะเวลาการเพาะเลี้ยงกรองแยกชิ้นส่วนพลาสติกออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยกระดาษกรอง ใยแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 mm (GF/C Glass Microfiber Filters, Whatman) ในระบบสุญญากาศแล้วนำชิ้นส่วนพลาสติกที่แยกได้มาแช่ในสารละลาย Sodium Dodecyl Sulfate 2% (v/v) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตามด้วยล้างในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวน 2 รอบ แล้วทำให้แห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักพลาสติก (0.0001 g) นำค่าที่ได้มาคำนวณประสิทธิภาพการย่อยสลายชิ้นส่วนพลาสติกด้วยวิธีการศึกษาน้ำหนักที่หายไป (Weight Loss Analysis) จากสมการ (ปรับปรุงจาก [5, 15])

$$\%\ \text{Weight Loss} = \frac{(W_0 - W) \times 100}{W_0}$$

เมื่อ W_0 = น้ำหนักเริ่มต้นชิ้นส่วนพลาสติก (g)
W = น้ำหนักของชิ้นส่วนพลาสติกวันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยง (g)

ศึกษาลักษณะพื้นผิวของชิ้นส่วนพลาสติกพอลิโพรพิลีนภายหลังจากครบระยะเวลาการทดลอง 30 วัน โดยนำชิ้นส่วนพลาสติกที่ต้องการศึกษามาล้างในสารละลาย Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 2% (v/v) ตามด้วยการล้างในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อทันที หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนพลาสติกไปล้างด้วยสารละลายเอทานอล 70% แล้วทำให้แห้งในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปวิเคราะห์รูปร่างและการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิวชิ้นส่วนพลาสติกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JEOL Scanning Electron Microscope, JSM-5410LV) (ปรับปรุงจาก [13])

2.4 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ย่อยสลายชิ้นส่วนพลาสติกชนิดพอลิโพรพิลีน

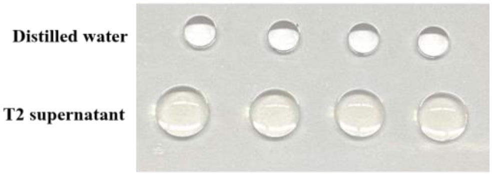
สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลตที่สามารถย่อยสลายชิ้นส่วนพลาสติกชนิดพอลิโพรพิลีนที่ต้องการศึกษาด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอทางการค้า (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit) ก่อนส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rRNA โดยบริษัท Macrogen Inc. (Seoul, Korea) ซึ่งมีขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีนบริเวณ 16S rRNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 27F’ และ 1492R’ ก่อนนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ข้อมูลนิวคลีโอไทด์ แล้วนำผลที่ได้เปรียบเทียบความเหมือนของสายพันธุ์กับฐานข้อมูล GenBank, EMBL และ DDBJ ด้วย BLAST program (The National Center for Biotechnological Information, NCBI) ศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับวิวัฒนาการโดยการสร้าง แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic Tree) ด้วยวิธี Neighbor-Joining (MEGA Version 11.10.13) ทดสอบความ

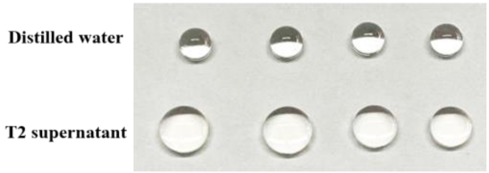
เชื่อมั่นด้วยค่า Bootstrap 1,000 ซ้ำ และคำนวณแผนภูมิทางสถิติด้วยวิธี Maximum Composite Likelihood [19]

3. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

การทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพด้วยวิธี Drop Collapse Test ของแบคทีเรียไอโซเลตที่คัดแยกได้จากตะกอนดินบ่อน้ำภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา โดยการทดสอบการยุบตัวหรือกระจายตัว (Collapse) ของหยดสารละลายส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบกับหยดน้ำกลั่นบนผิวหน้าจานเพาะเชื้อที่เคลือบด้วยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์และน้ำมันพืช ผลการทดลองพบว่าการยุบตัวของสารละลายส่วนใสของแบคทีเรียไอโซเลต T2 เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและเป็นวงกว้าง (รูปที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดสอบของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตะกอนดินไอโซเลตอื่น จากผลการทดลองเป็นการบ่งชี้ได้เบื้องต้นว่าแบคทีเรียไอโซเลต T2 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้จึงพิจารณาคัดเลือกไปศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายชิ้นส่วนพลาสติกชนิดพอลิโพรพิลีนในขั้นตอนต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากการหลั่งสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพช่วยให้แบคทีเรียสัมผัสพื้นผิวของชิ้นส่วนพลาสติก และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติความไม่ชอบน้ำที่ผิวเซลล์แบคทีเรีย (Cell Surface Hydrophobicity, CSH) ซึ่งเป็นกลไกหลักที่ช่วยส่งเสริมให้เกิดการย่อยสลายพลาสติกทางชีวภาพ [20, 21] ดังตัวอย่างรายงานวิจัยที่พบว่าคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพประเภท Lipopeptide ที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus* sp. ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีน โดยเฉพาะพอลิเอทิลีนความหนาแน่นต่ำ (Low Density Polyethylene, LDPE) [22] สอดคล้องกับการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายพลาสติกพอลิเอทิลีนโดยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PE3 พบว่าน้ำหนักพลาสติกหายไปสูงสุดคิดเป็น 6.68% ในระยะเวลาการทดลอง 30 วัน เป็นผลจากการที่เชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพประเภท Lipopeptide [21]


(a) Vegetable oil


(b) Engine oil

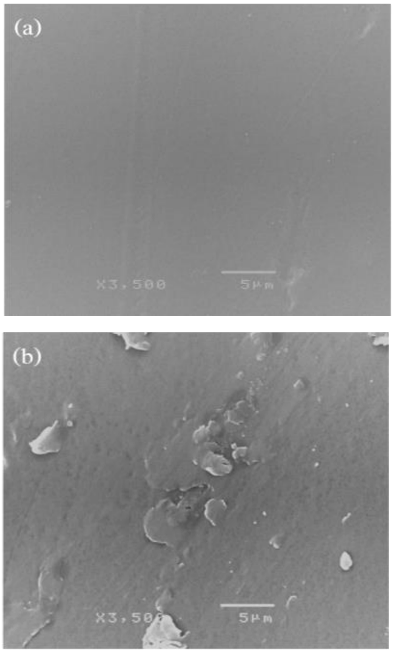
รูปที่ 1 Drop Collapse Test ของแบคทีเรียไอโซเลต T2 กับ (a) น้ำมันพืช และ (b) น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์

3.2 การย่อยสลายชิ้นส่วนพลาสติกชนิดพอลิโพรพิลีน

โดยทั่วไปการย่อยสลายชิ้นส่วนพลาสติกโดยจุลินทรีย์เกิดขึ้นเนื่องจากการใช้พลาสติกเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งการย่อยสลายของพอลิเมอร์สามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี เช่น การเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยา

หรือน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ เป็นต้น [15] ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ดำเนินการโดยการวิเคราะห์น้ำหนักที่หายไปของชิ้นส่วนพลาสติกภายหลังจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต T2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชิ้นส่วนพลาสติก เป็นระยะเวลา 30 วัน ผลการทดลองพบว่าน้ำหนักที่หายไปของชิ้นส่วนพลาสติกพอลิโพรพิลีนคิดเป็น 10.25% (± 0.006) ทั้งนี้อาจเนื่องจากกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่สังเคราะห์โดยแบคทีเรียไอโซเลต T2 ทำให้พอลิเมอร์ถูกย่อยสลายและมีผลให้น้ำหนักของชิ้นส่วนพลาสติกลดลง [23] ในขณะที่น้ำหนักของชิ้นส่วนพลาสติกในชุดควบคุมมีค่าคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้ยังพบรายงานวิจัยก่อนหน้าที่มีการศึกษาแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไมโครพลาสติกชนิดพอลิโพรพิลีนได้ จากการศึกษาน้ำหนักของพลาสติกที่หายไป ดังตัวอย่างเช่น น้ำหนักอนุภาคพลาสติกที่หายไปคิดเป็น 3.6% ภายหลังจากการเพาะเลี้ยง *Bacillus gottheilii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอนุภาคพลาสติกในระยะเวลา 40 วัน [24] นอกจากนี้ยังมีผลการศึกษาประสิทธิภาพการย่อย สลายไมโครพลาสติกพอลิโพรพิลีนโดย *Bacillus* sp. strain 27 และ *Rhodococcus* sp. strain 36 พบว่าน้ำหนักที่หายไปคิดเป็น 4.0% และ 6.4% ตามลำดับ [11] ทั้งนี้พบว่าการย่อยสลายพลาสติกของแบคทีเรียไอโซเลต T2 ในการทดลองครั้งนี้มีประสิทธิภาพสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาการย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยวก่อนหน้านี้ แต่อย่างไรก็ตามยังคงจำเป็นต้องมีการศึกษาสภาวะหรือปัจจัยที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายพลาสติกพอลิโพรพิลีน รวมทั้งการพิจารณาใช้กลุ่มของจุลินทรีย์ (Consortium) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายพลาสติกทางชีวภาพต่อไป

การศึกษาลักษณะพื้นผิวของชิ้นส่วนพลาสติกพอลิโพรพิลีนภายหลังจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต T2 เป็นระยะเวลา 30 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าพื้นผิวของชิ้นส่วนพลาสติกมีร่องรอยสึกกร่อน ไม่เรียบและขรุขระ ซึ่งมีความแตกต่างกับพลาสติกในการทดลองชุดควบคุมที่พบว่ายังคงมีความเรียบของพื้นผิว (รูปที่ 2) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการย่อยสลายชิ้นส่วนพลาสติกพอลิโพรพิลีนของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของพื้นผิวจากการทำลายโครงสร้างพอลิเมอร์โดยกิจกรรมของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะพื้นผิวของชิ้นส่วนพลาสติก [5, 25]

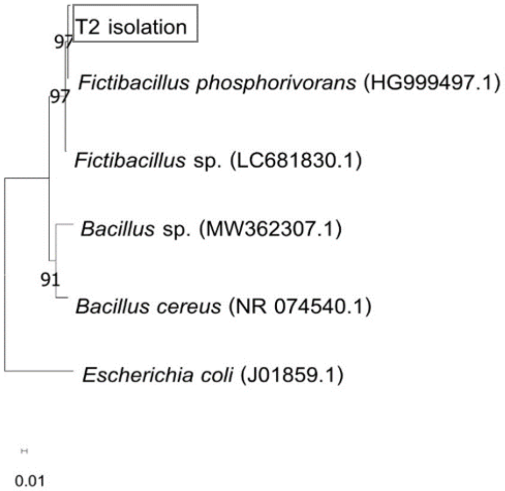


รูปที่ 2 ลักษณะพื้นผิวชิ้นส่วนพลาสติกพอลิโพรพิลีน (a) ชุดควบคุม และ (b) ชุดการทดลองที่มีแบคทีเรียไอโซเลตT2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BH ที่ระยะเวลา 30 วัน

3.3 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ย่อยสลายชิ้นส่วนพลาสติกชนิดพอลิโพรพิลีน

การคัดเลือกแบคทีเรียจากตัวอย่างตะกอนดินบ่อน้ำในมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต T2 แสดงประสิทธิภาพการย่อยสลายพลาสติกภายหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BH ที่มีชิ้นส่วนพลาสติกพอลิโพรพิลีนในระยะเวลา 30 วัน แบคทีเรียไอโซเลต T2 จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก (Gram Positive) รูปร่างท่อนขนาด 0.5-1.0 µm เซลล์มักเรียงต่อกันเป็นโซ่ การศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งพบว่าโคโลนีมีรูปร่างกลม ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบและมันวาว เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต T2 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Fictibacillus phosphorivorans* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับวิวัฒนาการที่พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต T2 มีลำดับทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับ *F. phosphorivoran*s โดยมีค่า Bootstrap เท่ากับ 97% (รูปที่ 3)

ผลจากการทดลองในครั้งนี้แสดงประสิทธิภาพการย่อยสลายชิ้นส่วนพลาสติกพอลิโพรพิลีนจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *F. phosphorivorans* เป็นครั้งแรก โดยพบว่ามีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่รายงานเกี่ยวกับประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของแบคทีเรีย *F. phosphorivorans* ที่พบว่าสามารถย่อยสลาย Kerosene และ Diesel ได้มากกว่า 90% เนื่องจากแบคทีเรียสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้ [26] จากผลการทดลองยังสามารถระบุได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลต T2 สามารถใช้พลาสติกพอลิโพรพิลีนเป็นแหล่งพลังงานได้จากการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 30 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BH ที่มีชิ้นส่วนพลาสติก ทั้งนี้เนื่องจากองค์ประกอบของอาหารที่จำกัดแหล่งคาร์บอน [15] ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลต T2 สามารถใช้พลาสติกพอลิโพรพิลีนในการเจริญได้


T2 isolation
97
Fictibacillus phosphorivorans (HG999497.1)
97
Fictibacillus sp. (LC681830.1)
Bacillus sp. (MW362307.1)
91
Bacillus cereus (NR 074540.1)
Escherichia coli (J01859.1)
0.01

รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียไอโซเลต T2 กับแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียง โดยมี *E. coli* (J01859.1) เป็น Outgroup

4. สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาในครั้งนี้เป็นการรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ *F. phosphorivorans* ที่แยกได้จากตะกอนดินบ่อน้ำภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยาในการย่อยสลายชิ้นส่วนพลาสติกชนิดพอลิโพรพิลีน พบว่าแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจากการศึกษาด้วยวิธี Drop Collapse Test ซึ่งเป็นการประเมินความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีคุณสมบัติ

ไม่ละลายน้ำ (Hdrophobic) ในระดับเบื้องต้น นอกจากนี้ยังได้ ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายชิ้นส่วนพลาสติกพอลิโพรพิลีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ BH ที่จำกัดแหล่งคาร์บอน พบว่าน้ำหนักที่หายไปของชิ้นส่วนพลาสติก คิดเป็น 10.25% (± 0.006) ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 วัน ผลการทดลองอาจนำไปสู่การใช้จุลินทรีย์ในการจัดการปัญหาการสะสมของขยะพลาสติกได้ แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาวิถีการย่อยสลายชิ้นส่วนพลาสติกหรือกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง นำไปสู่การพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงขึ้น

5. เอกสารอ้างอิง

[1] A.L. Andrady and M.A. Neal, Applications and societal benefits of plastics, Philosophical Transactions of the Royal Society B, 2009, 364(1526), 1955-1984.

[2] Z. Cai, M. Li, Z. Zhu, X. Wang, Y. Huang, T. Li, H. Gong and M. Yan, Biological degradation of plastics and microplastics: A recent perspective on associated mechanisms and influencing factors, Microorganisms, 2023, 11, 1661.

[3] G. Lear, J.M. Kingsbury, S. Franchini, V. Gambarini, S.D.M. Maday, J.A. Wallbank, L. Weaver, and O. Pantos, Plastics and the microbiome: impacts and solutions, Environmental Microbiome, 2021, 16(2), 1-19.

[4] A. Tareen, S. Saeed, A. Iqbal, R. Batool and N. Jamil, Biodeterioration of microplastics: A promising step towards plastics waste management, Polymers, 2022, 14(11), 2275.

[5] J.M. Jeon, S.J. Park, T.R. Choi, J.H. Park and Y.H. Yang, Biodegradation of polyethylene and polypropylene by *Lysinibacillus* species JJY0216 isolated from soil grove, Polymer Degradation and Stability, 2021, 191, 109662.

[6] Y. Tokiwa, B.P. Calabia, C.U. Ugwu and S. Aiba, Biodegradability of plastics, International Journal of Molecular Sciences, 2009, 10(9), 3722-3742.

[7] S.Y Ren. and H.G Ni, Biodeterioration of microplastics by bacteria isolated from mangrove sediment, Toxics, 2023, 11(5), 432.

[8] N. Mohanan, Z. Montazer, P.K. Sharma and D. B. Levin, Microbial and enzymatic degradation of synthetic plastics, Frontiers in Microbiology, 2020, 11, 580709.

[9] Y. Zheng, E.K. Yanful, and A.S. Bassi, A review of plastic waste biodegradation, Critical Reviews in Biotechnology, 2005, 25(4), 243-250.

[10] A.F. Samat, D. Carter and A. Abbas, Biodeterioration of pre-treated polypropylene by *Aspergillus terreus* and *Engyodontium album*, npj Materials Degradation, 2023, 7, 28.

[11] H.S. Auta, C.U. Emenike, B. Jayanthi and S.H. Fauziah, Growth kinetics and biodeterioration of polypropylene microplastics by *Bacillus* sp. and *Rhodococcus* sp. isolated from mangrove sediment, Marine Pollution Bulletin, 2018, 127, 15-21.

[12] N. Shimpi, M. Borane, S. Mishra, M. Kadam and S.S. Sonawane, Biodegradation of isotactic polypropylene (iPP)/poly(lactic acid) (PLA) and iPP/PLA/nano calcium carbonates using *Phanerochaete chrysoporium*, Advances in Polymer Technology, 2018, 37(2), 522-530.

[13] S. Skariyachan, N. Taskeen, A.P. Kishore, B.V. Krishna and G. Naidu, Novel consortia of *Enterobacter* and *Pseudomonas* formulated from cow dung exhibited enhanced biodegradation of polyethylene and polypropylene, Journal of Environmental Management, 2021, 284, 112030.

[14] A.S. Dey, H. Bose, B. Mohapatra and P. Sar, Biodegradation of unpretreated low-density polyethylene (LDPE) by *Stenotrophomonas* sp. and *Achromobacter* sp., isolated from waste dumpsite and drilling fluid, Frontiers in Microbiology, 2020, 11, 603210.

[15] S. Habib, A. Iruthayam, M.Y. Abd Shukor, S.A. Alias, J. Smykla and N.A. Yasid, Biodeterioration of untreated polypropylene microplastic particles by antarctic bacteria, Polymers, 2020, 12(11), 2616.

[16] N. Tabburee, W. Tantipanathip and P. Eiamsa-ard, Microplastic contamination in freshwater sediment within Phranakhon Si Ayutthaya Rajabhat Uneversity, ARU Journal Science and Technology, 2022, 4(1), 56-65. (in Thai).

[17] N. Panjiar, S.G. Sachan and A. Sachan, Screening of bioemulsifier-producing micro-organisms isolated from oil-contaminated sites. Annals of Microbiology, 2015, 65, 753-764.

[18] S.M. Shagufta and P.V. Dharani, Screening and isolation of bacteria producing biosurfactants from Waste, Journal of Pure and Applied Microbiology, 2022, 16(1), 567-577.

[19] S. Ali, A. Rehman, S.Z. Hussain and D.A. Bukhari, Characterization of plastic degrading bacteria isolated from sewage wastewater, Saudi Journal of Biological Sciences, 2023, 30(5), 103628.

[20] E. Kaczorek, A. Pacholak, A. Zdarta and W. Smulek, The impact of biosurfactants on microbial cell properties leading to hydrocarbon bioavailability increase, Colloids Interfaces, 2018, 2(3), 35.

[21] R. Kavitha and V. Bhuvaneswari, Assessment of polyethylene degradation by biosurfactant producing ligninolytic bacterium, Biodegradation, 2021, 32(5), 531-549.

[22] N. Nehal and P. Singh, Optimization of cultural condition of *Bacillus* sp. MZ540316: Improve biodegradation efficiency of lipopeptide biosurfactant against polyethylene, Biomass Conversion and Biorefinery, 2023, 13, 15471-15487.

[23] J. Ru, Y. Huo and Y. Yang, Microbial degradation and valorization of plastic wastes, Frontiers in Microbiology, 2020, 11, 442.

[24] H.S. Auta, C.U. Emenike and S.H. Fauziah, Screening of *Bacillus* strains isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia for microplastic degradation, Environmental Pollution, 2017, 231, 1552-1559.

[25] H. Nakatani, Y. Ohshima, T. Uchiyama and S. Motokucho, Degradation and fragmentation behavior of polypropylene and polystyrene in water, Scientifc Reports, 2022, 12(1), 18501.

[26] R. Pandey, P. Sharma, S. Rathee, H.P. Singh, D.R. Batish, B. Krishnamurthy and R.K. Kohli, Isolation and characterization of a novel hydrocarbonoclastic and biosurfactant producing bacterial strain: *Fictibacillus phosphorivorans* RP3, 3 Biotech, 2021, 11(2), 105.