



การย่อยสลายถุงมือยางโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนยาง  
**Degradation of Rubber Gloves by Bacteria Isolated from Soil Contaminated  
with Latex**

ชัยรัฐ นะวงศ์  
**Chairat Nawong**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the  
Degree of Master of Science in Microbiology  
Prince of Songkla University**

**2560**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การย่อยสลายถุงมือยางโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนยาง  
**Degradation of Rubber Gloves by Bacteria Isolated from Soil Contaminated  
with Latex**

ชัยรัฐ นะวงศ์  
**Chairat Nawong**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the  
Degree of Master of Science in Microbiology  
Prince of Songkla University**

**2560**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การย่อยสลายถุงมือยางโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนยาง  
ผู้เขียน นายชัยรัฐ นะวงศ์  
สาขาวิชา จุลชีววิทยา

---

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
..... (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กมลธรรม อ่ำสกุล)	.....ประธานกรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาทร)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....	.....กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กมลธรรม อ่ำสกุล)
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐวรรณ เสริมวิทยวงศ์)	.....กรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณทัย ภิญญาคง)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณ  
บุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กมลธรรม อ่ำสกุล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐวรรณ เสริมวิทย์วงศ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ.....

(นายชัยรัฐ นะวงศ์)

นักศึกษา



ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน  
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นายชัยรัฐ นะวงศ์)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การย่อยสลายถุงมือยางโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนยาง

ผู้เขียน นายชัยรัฐ นะวงศ์

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2559

### บทคัดย่อ

ผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ มีการผลิตและใช้เพิ่มขึ้นในทุกวัน ก่อให้เกิดปัญหาในการจัดการขยะ โดยการทำจัดขยะยางธรรมชาติโดยใช้จุลินทรีย์นั้น เป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม แต่เป็นวิธีที่ใช้เวลานาน จึงต้องมีการศึกษาเพื่อลดเวลาในการย่อยสลายลง ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายยางธรรมชาติ จากดินตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนยางธรรมชาติทั้งหมด 80 ตัวอย่าง จากบริเวณต่างๆ ในภาคใต้ คัดแยกได้ 120 ไอโซเลท การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายถุงมือยางพบว่า เชื้อ pn 12.1 มีความสามารถในการย่อยสลายสูงสุดทำให้น้ำหนักถึงมือยางลดลง 8.53 % ที่ 30 องศาเซลเซียส ใน 30 วัน เปรียบเทียบกับเชื้อ 10 ไอโซเลท (F1-F10) ที่แยกได้จากเชื้อกลุ่ม (natural consortium) จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าเชื้อ F 5 มีความสามารถในการย่อย 9.36 % และทำให้ถุงมือยางเปลี่ยนแปลงลักษณะมากที่สุด จึงนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบลักษณะพื้นผิวเป็นรูพรุน และมีเชื้อเกาะติดจำนวนมาก วัดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายได้ 4.89% ที่ 30 องศาเซลเซียส ใน 30 วัน เมื่อทำการวิเคราะห์โดยวิธี FTIR พบมีการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย จากการบ่งชี้ชนิดของเชื้อโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16s rRNA พบว่าเชื้อ F5 เป็นเชื้อสายพันธุ์ *Rhodococcus pyridinivorans* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ที่ 99% และการทดสอบหายีน *Icp* พบว่าเชื้อ F5 มียีน *Icp* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายยางธรรมชาติ เมื่อนำเชื้อ F1-F10 มาผสมกัน โดยแบ่งเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่ผสมเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลท และผสมเชื้อ 5 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการย่อยสลายได้มากกว่า 5% พบว่าการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเป็น 18.38 % และ 18.82 % ที่ 30 องศาเซลเซียส ใน 30 วัน ตามลำดับซึ่งมากกว่าการใช้เชื้อ F5 เพียงตัวเดียว พบการเจริญของเชื้อเมื่อใช้ถุงมือยางเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว และพบรูพรุนบนแผ่นยางภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

<b>Thesis Title</b>	Degradation of rubber gloves by bacteria isolated from soil contaminated with latex
<b>Author</b>	Mr. Chairat Nawong
<b>Major Program</b>	Microbiology
<b>Academic Year</b>	2016

### ABSTRACT

An increasing production and demand of natural rubber products has caused problems in waste management. Biodegradation is environmentally friendly but normally extremely slow. Therefore there is a need to reduce the time for decomposing. In this study, natural rubber degrading bacteria were isolated from 80 latex-contaminated soil samples in the southern Thailand. 120 of possible rubber degrading bacteria were isolated and tested for their abilities to degrade rubber gloves in a mineral salt medium (MSM). Isolate pn 12.1 gave 8.53 % weight loss of the rubber gloves. Ten isolates were also isolated from a soil consortium from previous study (F1-F10). Isolate F5 gave 9.36% weight loss of the rubber gloves and produced 4.89% of CO<sub>2</sub> evolution in the degradation process. Changes in appearance were observed by scanning electron microscopy (SEM), rubber gloves seemed to undergo degradation which resulted in the deterioration of glove's surface. FTIR method was also performed to confirm the degradation. Isolate F5 was then identified as *Rhodococcus pyridinivorans* with 99% similarity by 16S rRNA analysis. The presence of a gene encoding a latex clearing protein (*lcp* gene) was determined to confirm the latex degradation ability. Consortium and the mixed culture gave the highest percentage weight losses of rubber gloves of 18.38% and 18.82% respectively, which were more effective than using single strain of isolate F5. Consortium and mixed culture could use rubber gloves as the sole carbon source as can be seen by growth and many deteriorated holes on rubber surfaces.

### กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กมลธรรม อ่ำสกุล อาจารย์ที่ปรึกษา  
วิทยานิพนธ์หลักและผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณีจวรรณ เสริมวิทยวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษา  
วิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำและเสียสละเวลาให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนในการทำ  
วิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิมลศรี มิตรภาพอาทร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และ  
รองศาสตราจารย์ ดร. อรฤทัย ภิญญาคง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำและ  
ตรวจสอบแก้ไขจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอขอบคุณอาจารย์ภาคจุฬชีวิตวิทยาทุก  
ท่านที่ให้คำแนะนำและสอนความรู้ทางวิชาการ พร้อมทั้งกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนงบประมาณเพื่อการ  
วิจัย ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนทุนสนับสนุนนักศึกษา  
ระดับบัณฑิตศึกษาเป็นผู้ช่วยนักวิจัย (Research Assistant)

ขอขอบคุณภาคจุฬชีวิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อนุเคราะห์  
ด้านวัสดุและอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการวิจัย ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ธุรการ เจ้าหน้าที่  
ห้องปฏิบัติการ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่คอยให้กำลังใจ และความ  
ช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ มาโดยตลอด

ชัยรัฐ นะวงศ์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อไทย	(5)
บทคัดย่ออังกฤษ	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพประกอบ	(11)
สัญลักษณ์และคำย่อ	(14)
รายการผลงานที่ตีพิมพ์และการประชุมวิชาการ	(15)
สำเนาต้นฉบับที่ได้รับยินยอมจากผู้พิมพ์ผลงาน	(16)
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของหัวข้อวิจัย	1
ทฤษฎีและหลักการ	2
ยางธรรมชาติ	2
ขยะยางธรรมชาติ	3
การย่อยสลายทางชีวภาพของยางธรรมชาติ	3
จุลินทรีย์ย่อยสลายยางธรรมชาติ	4
อัตราการย่อยสลายยางธรรมชาติ	8
เอนไซม์และยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายยางธรรมชาติ	11
วัตถุประสงค์	16

ผลการทดลอง	17
สรุปผลการทดลอง	32
บรรณานุกรม	33
ภาคผนวก	37
ประวัติผู้วิจัย	43

รายการตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ในการย่อยสลายยางธรรมชาติ	5
ตารางที่ 2 อัตราการย่อยสลายยางธรรมชาติโดยเชื้อจุลินทรีย์	10

## รายการภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างของยางธรรมชาติ (polyisoprene rubber)	2
รูปที่ 2 ขั้นตอนการย่อยสลายผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์	11
รูปที่ 3 แผนภาพแสดงผลผลิตที่เกิดจากการย่อยสลายยางโดยเชื้อ <i>Nocardia</i> sp. 835A และ <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y โดยเส้นขีดสีดำเป็นตำแหน่งพันธะคู่ที่ถูกตัดในโครงสร้างยางธรรมชาติ	12
รูปที่ 4 กลไกการย่อยสลายยางโดยจุลินทรีย์ ด้วยวิธีสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์จากโมเลกุลขนาดใหญ่ให้มีขนาดเล็กลง	12
รูปที่ 5 กลไกการย่อยสลายยางโดยเอนไซม์ RoxA	13
รูปที่ 6 กลไกการย่อยสลายยางโดยเอนไซม์ Lcp	14
รูปที่ 7 แผนผังแสดงยีน <i>lcp oxiA</i> และ <i>oxiB</i>	15
รูปที่ 8 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่หายไปของแผ่นถุงมือยางที่บ่มร่วมกับเชื้อที่คัดแยกได้ 10 อันดับแรก เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน	18
รูปที่ 9 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่หายไปของแผ่นถุงมือยางที่บ่มร่วมกับเชื้อที่คัดแยกจากกลุ่มเชื้อ F เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน	19
รูปที่ 10 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นและสุดท้ายหลังจากการบ่มร่วมกับแผ่นถุงมือยางเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแผ่นถุงมือยางและชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน	20
รูปที่ 11 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นและสุดท้ายหลังจากการบ่มร่วมกับแผ่นถุงมือยางเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแผ่นถุงมือยางและชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน โดยเชื้อที่แยกจากกลุ่มเชื้อ F	20
รูปที่ 12 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่หายไปของแผ่นถุงมือยางที่บ่มร่วมกับเชื้อต่างๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน	21



### รายการภาพประกอบ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 13 ปริมาณเชื้อตั้งต้นและหลังกระบวนการย่อยสลายแผ่นถุงมือยางเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อและชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมถุงมือยาง บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน	22
รูปที่ 14 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายถุงมือยางของชุดทดสอบและชุดควบคุม ที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน	23
รูปที่ 15 เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการย่อยสลายถุงมือยางเมื่อนำเชื้อที่แยกได้จากแหล่งเดียวกันมาผสมกับเชื้อ F5 เปรียบเทียบกับเชื้อเดี่ยว F5 และชุดควบคุม บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน	24
รูปที่ 16 ปริมาณเชื้อตั้งต้นและหลังกระบวนการย่อยสลายแผ่นถุงมือยางโดยเชื้อที่แยกได้จากแหล่งเดียวกันมาผสมกับเชื้อ F5 เปรียบเทียบกับเชื้อเดี่ยว F5 และชุดควบคุม บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน	24
รูปที่ 17 เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการย่อยสลายถุงมือยางเมื่อนำเชื้อที่แยกได้จากแหล่งต่างกันมาผสมกับเชื้อ F5 เปรียบเทียบกับเชื้อเดี่ยว F5 และชุดควบคุม บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน	25
รูปที่ 18 ปริมาณเชื้อตั้งต้นและหลังกระบวนการย่อยสลายแผ่นถุงมือยางโดยเชื้อที่แยกได้จากแหล่งต่างกันมาผสมกับเชื้อ F5 เปรียบเทียบกับเชื้อเดี่ยว F5 และชุดควบคุม บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน	26
รูปที่ 19 ลักษณะของแผ่นยางหลังผ่านการย่อยสลายที่ถ่ายจากกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 5000 เท่า a) ชุดควบคุม b) ชุดทดสอบบ่มร่วมกับเชื้อ F5 ที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน	27
รูปที่ 20 FTIR สเปกตรัมของชิ้นถุงมือยาง a) ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ b) ชุดถุงมือยางที่ผ่านการบ่มร่วมกับเชื้อ F5 ที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน	28

## รายการภาพประกอบ (ต่อ)

	หน้า
<b>รูปที่ 21</b> การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA ของเชื้อไอโซเลท F5 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้ออื่น ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล NCBI แผนภาพแสดงความสัมพันธ์สร้างโดยวิธี neighbor-joining จากโปรแกรม MEGA ตัวเลขแสดงบนกิ่ง (% bootstrap) มาจากการคำนวณ 1000 ซ้ำ	29
<b>รูปที่ 22</b> การปรากฏของยีน <i>lcp</i> ใน <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> F5 ที่แยกได้	30

## สัญลักษณ์และคำย่อ

พ.ศ.	=	พุทธศักราช
%	=	Percentage
°C	=	Degree Celsius
OD	=	Optical density
A	=	adenine
T	=	thymine
C	=	cytocine
G	=	guanine
bp	=	base pair
kb	=	kilobase
PCR	=	Polymerase chain reaction
MSM	=	Minimal salt medium
NR	=	Natural rubber
CFU	=	Colony forming units
M	=	molar
μM	=	micromolar
μL	=	microliter
min	=	minute
s	=	second

## รายงานตีพิมพ์และประชุมวิชาการ

### รายงานตีพิมพ์

1. ชื่อภาษาอังกฤษ Rubber gloves biodegradation by a consortium, mixed culture and pure culture isolated from the soil samples

ชื่อภาษาไทย การย่อยสลายถุงมือยางโดย กลุ่มเชื้อ เชื้อผสมและเชื้อเดี่ยวที่แยกได้จากตัวอย่างดิน

### ประชุมวิชาการ

1. ชื่อภาษาไทย จุลินทรีย์ย่อยสลายยางธรรมชาติ

ชื่อภาษาอังกฤษ Microbial degradation of natural rubbers

2. ชื่อภาษาไทย การเปรียบเทียบการย่อยสลายยางธรรมชาติ โดย กลุ่มเชื้อและเชื้อเดี่ยวที่แยกได้จากตัวอย่างดิน

ชื่อภาษาอังกฤษ Comparative studies on rubber biodegradation by mixed culture and pure culture isolated from the soil samples

สำเนาต้นฉบับที่ได้รับยินยอมจากผู้พิมพ์ผลงาน



ชัยรัฐ นะวงศ์ &lt;charanara@gmail.com&gt;

**FW: Submission Confirmation**

1 ข้อความ

kamontam.u &lt;kamontam.u@psu.ac.th&gt;

25 มกราคม 2560 14:04

ถึง: ชัยรัฐ นะวงศ์ &lt;charanara@gmail.com&gt;

-----Original Message-----

From: [em.ijer.0.50c95f.0075d8b4@editorialmanager.com](mailto:em.ijer.0.50c95f.0075d8b4@editorialmanager.com) [mailto:[em.ijer.0.50c95f.0075d8b4@editorialmanager.com](mailto:em.ijer.0.50c95f.0075d8b4@editorialmanager.com)] On Behalf Of International Journal of Environmental Research (IJER)"

Sent: Wednesday, January 25, 2017 2:01 PM

To: kamontam umsakul

Subject: Submission Confirmation

Dear Dr umsakul,

Thank you for submitting your manuscript, "Rubber gloves biodegradation by a consortium, mixed culture and pure culture isolated from the soil samples", to International Journal of Environmental Research

The submission id is: IJER-D-17-00081

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<http://ijer.edmgr.com/>

Your username is: kamontam

Your password is: available at this link [http://ijer.edmgr.com/Default.aspx?pg=accountFinder.aspx&firstname=kamontam&lastname=umsakul&email\\_address=kamontam.u@psu.ac.th](http://ijer.edmgr.com/Default.aspx?pg=accountFinder.aspx&firstname=kamontam&lastname=umsakul&email_address=kamontam.u@psu.ac.th)

With kind regards,

Journals Editorial Office IJER  
Springer-----  
PSU Security Policy:  
-----

Prince of Songkla University will never ask for your user's password.

If you receive an email that either:

- Asks for your password, or
- Tells you to click a link that redirects to a website outside [psu.ac.th](http://psu.ac.th) domain and ask for password confirmation/reset.

It is definitely a dangerous phishing/scam email.

If you get such an email, please contact [report-phish@psu.ac.th](mailto:report-phish@psu.ac.th) or dial ext. 2121.



ชัยรัล นะวงศ์ &lt;charanara@gmail.com&gt;

---

**IJER-D-17-00081 - Submission Notification to co-author**

1 ข้อความ

---

**International Journal of Environmental Research (IJER)** <em@editorialmanager.com> 25 มกราคม 2560 14:01

ตอบกลับไปยัง: "International Journal of Environmental Research (IJER)" &lt;sudharshan.shrikanth@springer.com&gt;

ถึง: Chairat Nawong &lt;charanara@gmail.com&gt;

Re: "Rubber gloves biodegradation by a consortium, mixed culture and pure culture isolated from the soil samples"  
Full author list: Chairat Nawong; Natthawan Sermwittayawong; kamontam umsakul

Dear Mr Nawong,

We have received the submission entitled: "Rubber gloves biodegradation by a consortium, mixed culture and pure culture isolated from the soil samples" for possible publication in International Journal of Environmental Research, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr kamontam umsakul who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,  
Springer Journals Editorial Office  
International Journal of Environmental Research

# International Journal of Environmental Research

## Rubber gloves biodegradation by a consortium, mixed culture and pure culture isolated from the soil samples

Asynch.CoverPage.ManuscriptDraft

Common.Text.ManuscriptNumber:	IJER-D-17-00081
Common.SubmissionDetails.FullTitle:	Rubber gloves biodegradation by a consortium, mixed culture and pure culture isolated from the soil samples
Common.Labels.ArticleType	Research paper
Common.EditSubmissionSteps.FundingInformation:	Prince of Songkla University Mr Chairat Nawong
Common.SubmissionDetails.Abstract:	An increasing production of natural rubber (NR) products has led to major challenges in waste management. The degradation of NR is normally extremely slow. In this study, the degradation of rubber latex gloves in a mineral salt medium (MSM) using a bacterial consortium, a mixed culture of the selected bacteria and a pure culture were studied. About 9-18% weight loss of the rubber gloves were detected after incubated with the consortium, the mixed culture, and the pure culture. The increased viable cell counts over incubation time indicated that cells used rubber gloves as sole carbon source leading to the degradation of the polymer. The growth behavior of NR-degrading bacteria on the latex gloves surface was investigated using the scanning electron microscope (SEM). <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> strain F5 gave the highest weight loss of rubber gloves and posses latex clearing protein encoded by <i>lcp</i> gene. The mixed culture of the selected strains showed the potential in degrading rubber within 30 days and is considered to be used efficiently for rubber product degradation. This is the first report to demonstrate a strong ability to degrade rubber by <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> .
Common.SubmissionDetails.CorrespondingAuthor:	kamontam umsakul Prince of Songkla University Faculty of Science THAILAND
Common.SubmissionDetails.SecondaryCorrespondingAuthor:	
Common.SubmissionDetails.CorrespondingAuthorInstitution:	Prince of Songkla University Faculty of Science
Common.SubmissionDetails.SecondaryCorrespondingAuthorInstitution:	
Common.SubmissionDetails.FirstAuthor:	Chairat Nawong
Common.SubmissionDetails.SecondaryFirstAuthor:	
Common.SubmissionDetails.OrderOfAuthors:	Chairat Nawong Natthawan Sermwittayawong kamontam umsakul
Common.SubmissionDetails.SecondaryOrderOfAuthors:	
Common.SubmissionDetails.AuthorComments:	We do hope that you will consider this report to be published in this journal. This is the first report about using the consortium in rubber degradation and aslo the first report to show the rubber derading ability of this <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> .
Common.SubmissionDetails.SuggestedReviewers:	masao fukuda masao@vos.nagaokaut.ac.jp expert in this field  Claudia Gallert claudia.gallert@hs-emden-leer.de She is an expert in rubber degradation



## บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของหัวข้อวิจัย

ยางธรรมชาติจัดเป็นวัสดุที่สำคัญในทางเศรษฐกิจ โดยจะใช้ในการผลิต ยางรถยนต์, ถุงมือยาง, สายยาง และอื่นๆ โดยยางธรรมชาตินั้นจัดเป็นพอลิเมอร์ทางชีวภาพ ที่ประกอบด้วย poly(cis-1,4-isoprene) เป็นส่วนประกอบหลัก ซึ่งจากการที่มีการใช้ผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติมากขึ้นในทุกปี ก่อให้เกิดปัญหาขยะจากยางธรรมชาติ โดยการกำจัดนั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเผา การฝัง แต่การกำจัดโดยวิธีเหล่านี้ล้วนก่อให้เกิดมลพิษ จึงมีการศึกษาวิธีการกำจัดขยะยางธรรมชาติ โดยการย่อยสลายทางชีวภาพ โดยใช้จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ย่อยสลายยางธรรมชาติ แบ่งได้เป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มแรกคือ กลุ่มที่สร้างโซโนไลสบนอาหารที่ผสมยางธรรมชาติ ซึ่งจะเป็นกลุ่ม actinomycetes ที่สร้าง mycelium เช่น *Actinoplanes*, *Streptomyces* และ *Micromonospora* ส่วนกลุ่มที่สองคือกลุ่ม nocardioform actinomycetes เช่น *Gordonia*, *Mycobacterium* และ *Nocardia* ซึ่งกลุ่มนี้จะไม่สร้างโซโนไลสบนอาหารที่ผสมยางธรรมชาติ

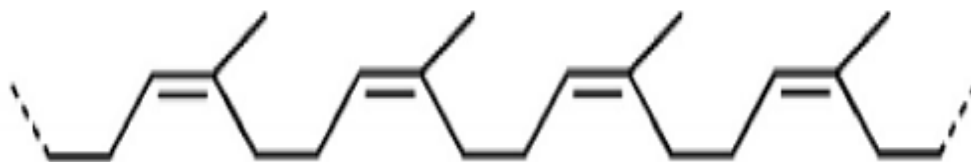
ปัจจุบันพบว่า มีเอนไซม์เพียง 2 ชนิดที่มีรายงานว่าเอนไซม์สำคัญในการย่อยสลายยางธรรมชาติ ได้แก่ latex-clearing protein (Lcp) เป็นเอนไซม์ตัวสำคัญในกระบวนการย่อยสลายยางธรรมชาติในเชื้อแกรมบวก โดยมียีน *lcp* เป็นตัวควบคุมการสร้าง Lcp ซึ่งยีน *lcp* ถูกค้นพบครั้งแรกในเชื้อ *Streptomyces* sp. strain K30 (Rose et al., 2005) ซึ่งจะย่อยสลาย poly(cis-1,4-isoprene) ไปอยู่ในรูปของ oligo (cis-1,4-isoprene) สายสั้นที่มีหมู่คีโตนหรือแอลดีไฮด์เป็นส่วนประกอบ ส่วนในแกรมลบนั้นพบ Rubber oxygenase (RoxA) เป็นเอนไซม์สำคัญในการย่อยสลายยางธรรมชาติ ซึ่งพบในเชื้อ *Xanthomonas* sp. strain 35Y (Dieter and Simone, 2003) โดยรายงานเรื่องการย่อยสลายยางธรรมชาตินั้นมีข้อมูลน้อยมาก ไม่ว่าจะเป็นชนิดของเชื้อที่พบการย่อยสลายเพียงไม่กี่ชนิด ประสิทธิภาพในการย่อยสลายที่ค่อนข้างต่ำ ชนิดของเอนไซม์ในกระบวนการย่อยที่พบ รวมถึงยีนที่พบในเชื้อย่อยสลายยางธรรมชาติ เช่น ยีน *lcp* นั้นมีการศึกษาอยู่น้อยมาก รวมถึงเชื้อที่พบยีนนี้ก็ยังมีจำนวนน้อยเมื่อเทียบกับจำนวนเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายยางธรรมชาติได้ ซึ่งการที่มีข้อมูลเรื่องยีนมากขึ้นจะสามารถนำไปใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ เช่น การปรับปรุงสายพันธุ์หรือการโคลนยีนเข้าเชื้อตัวอื่นเพื่อใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายยางธรรมชาติแทนเชื้อตัวเดิม

ซึ่งในการวิจัยนี้ได้ทำการตรวจหาหินที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายยาง จากเชื้อที่คัดเลือกและแยกได้จากดิน ที่มีความสามารถในการย่อยสลายยางธรรมชาติ และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายยางธรรมชาติระหว่าง กลุ่มเชื้อผสม (consortium) และ เชื้อเดี่ยวที่แยกได้จากดิน

## ทฤษฎีและหลักการ

### 1. ยางธรรมชาติ (Natural Rubber)

ยางธรรมชาติมีชื่อทางเคมีคือ cis-1,4-polyisoprene (รูปที่ 1) เป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจน ทำให้มีสมบัติไม่ทนต่อน้ำมัน แต่เป็นฉนวนไฟฟ้าได้ดี โดยใน 1 โมเลกุลประกอบด้วยหน่วยของไอโซพรีน ( $C_5H_8$ ) มาต่อกันเป็นสายโซ่ยาวแบบเส้นตรง และใน 1 หน่วยไอโซพรีนมีพันธะคู่และหมู่แอลฟาเมทิลีนที่วงเว้าต่อการเกิดปฏิกิริยา ทำให้สามารถวัลคาไนซ์ได้ด้วยกำมะถัน และทำให้ยางทำปฏิกิริยาได้ง่ายด้วยออกซิเจนและโอโซน ทำให้ยางเกิดการเสื่อมสภาพได้ง่ายเช่นเดียวกัน ดังนั้นการออกแบบสูตรการผสมยางจำเป็นจะต้องมีแอนตี้ออกซิแดนท์และแอนตีโอโซนเนทร่วมด้วยเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพจากออกซิเจนและโอโซน ยางธรรมชาติมีสายโซ่ที่เคลื่อนไหวหยุกไปมาได้ง่าย ทำให้ยางธรรมชาติคงสภาพยืดหยุ่นได้ดี มีอุณหภูมิของการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว ประมาณ  $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$  สามารถใช้งานได้ที่อุณหภูมิต่ำมาก สำหรับความสม่ำเสมอในโครงสร้างโมเลกุล ทำให้ยางธรรมชาติสามารถตกผลึกได้เมื่อยืด การเกิดผลึกเนื่องจากการยืดตัวยังทำให้ยางคงรูปมีสมบัติเชิงกลดีขึ้น ส่งผลให้ ยางมีความทนทานต่อแรงดึง ความทนทานต่อการฉีกขาด และความต้านทานต่อการขูดถูสูงขึ้น ยางธรรมชาติมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยสูง อยู่ในช่วง 200,000 ถึง 400,000 และมีการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลกว้างมาก ทำให้ยางแข็งเกินไปที่จะนำไปแปรรูปโดยตรง จะต้องมีการบดยาง ก่อนที่จะนำไปใช้ในกระบวนการผลิต ซึ่งเครื่องมือที่ใช้ในการบดยางโดยทั่วไปจะใช้เครื่องบดยางสองลูกกลิ้ง (John, 2012)



รูปที่ 1 โครงสร้างของยางธรรมชาติ (polyisoprene rubber) (Yikmis and Steinbuchel, 2012)

## 2. ขยะยางธรรมชาติ

การกำจัดขยะถือเป็นปัญหาสำคัญในยุคปัจจุบัน โดยเฉพาะวัสดุทางพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ยาก จนก่อให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อม ในปี 2015 ปริมาณการใช้ผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติทั่วโลกสูงถึง 12.1 ล้านตัน หรือเพิ่มขึ้น 11.57 % จาก 10.7 ล้านตัน ในปี 2010 (IRSG, 2016) ซึ่งผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่คือ ยางล้อของพาหนะต่างๆ เช่น เครื่องบิน รถยนต์ และรถบรรทุก เป็นต้น ซึ่งเมื่อยางเหล่านี้หมดอายุการใช้งาน กลายเป็นขยะที่ต้องใช้เวลานานในการย่อยสลายตามธรรมชาติ เนื่องจากโครงสร้างของยาง การเติมสารเพิ่มความคงตัว และสารอื่นๆ ลงไปในการผลิต ซึ่งขยะยางเหล่านี้จะก่อให้เกิดปัญหา คือ การสูญเสียมูลค่าของยาง และการเกิดมลพิษในสิ่งแวดล้อม

สารต่างๆที่มีการเติมในกระบวนการผลิต เช่น สารหน่วงปฏิกิริยา สารเร่งปฏิกิริยา และสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งการเลือกใช้ขึ้นอยู่กับการนำไปใช้งาน โดยสารเหล่านี้จะมีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ทำให้การย่อยสลายทางธรรมชาติเกิดได้ช้าลง รวมถึงการนำยางไปใช้นั้นจำเป็นต้องมีการวัลคาไนซ์ หรือปรับปรุงคุณสมบัติของยางส่งผลให้ย่อยสลายได้ช้าลงเช่นเดียวกัน ล้อยางที่ถูกทิ้งกว่าพันล้านชิ้นทั่วโลก และเพิ่มขึ้นกว่าร้อยล้านชิ้นต่อปี ซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้การกำจัดโดยการฝังจะมีข้อจำกัดในด้านความปลอดภัย เพราะเป็นสาเหตุของปัญหามลพิษในดินและน้ำ ส่วนการเผาจะก่อให้เกิดความร้อนและควัน ซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุของสภาวะโลกร้อน รวมทั้งก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ แต่มีอีกวิธีในการกำจัดขยะยาง ซึ่งก่อมลพิษน้อยที่สุด คือ การย่อยสลายทางชีวภาพ

## 3. การย่อยสลายทางชีวภาพของยางธรรมชาติ

นักวิจัยได้ศึกษาจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายยางได้ แล้ววิเคราะห์การย่อยสลายผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติและยางสังเคราะห์ โดยคัดแยกแบคทีเรียมาจากหลากหลายแหล่งแล้วนำมาเพาะเลี้ยงโดยใช้เอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นในการย่อยสลาย ซึ่งจากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์สามารถสลายพันธะคู่ในพอลิเมอร์สายหลักได้ โดยกระบวนการออกซิเดชัน ซึ่งเมื่อย่อยสลายสมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น น้ำ มวลชีวภาพ ก๊าซมีเทน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสิ่งเหล่านี้สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและดำรงชีวิตของพืช (Rose and Steinbuchel, 2005)

การย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation) ของพอลิเมอร์โดยใช้จุลินทรีย์ โดยทั่วไปมีกระบวนการ 2 ขั้นตอน เนื่องจากขนาดของสายพอลิเมอร์มีขนาดใหญ่และไม่ละลายน้ำ ในขั้นตอนแรกของการย่อยสลายจึงเกิดขึ้นภายนอกเซลล์ โดยการปลดปล่อยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ซึ่งเกิดได้

ทั้งแบบใช้ Endo-enzyme หรือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกตัวของพันธะภายในสายโซ่พอลิเมอร์อย่างไม่เป็นระเบียบ และแบบ Exo-enzyme หรือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกหักของพันธะที่ละหน่วยจากหน่วยซ้ำที่เล็กที่สุดที่อยู่ด้านปลายของสายโซ่พอลิเมอร์ เมื่อพอลิเมอร์แตกตัวจนมีขนาดเล็กพอที่จะแพร่ผ่านผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์ และเกิดการย่อยสลายต่อในขั้นที่ 2 เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ โดยปล่อยผลิตภัณฑ์ขั้นตอนสุดท้ายออกมา (Mineralization) เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซมีเทน น้ำ เกลือ แร่ธาตุต่าง ๆ และมวลชีวภาพ (Biomass) (Lenz, 1993)

สำหรับกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพนั้น มีผลดี คือ การย่อยสลายเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ เพราะถูกจุลินทรีย์ในธรรมชาติใช้เป็นอาหารและย่อยสลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ ซึ่งพืชสามารถนำกลับไปใช้ในการสังเคราะห์แสงได้ เพื่อหมุนเวียนกลับมาผลิตแป้งหรือน้ำตาลในพืชต่อไปได้ ซึ่งทั้งหมดนี้ต้องย่อยสลายภายใต้สภาวะที่เหมาะสม และการย่อยสลายโดยวิธีนี้ยังเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

#### 4. จุลินทรีย์ย่อยสลายทางธรรมชาติ

การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ เป็นการย่อยที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ซึ่งมีจุลินทรีย์มาเกี่ยวข้อง โดยที่จุลินทรีย์ในกลุ่มแอกติโนมัยซิส เป็นกลุ่มหลักที่สามารถย่อยทางธรรมชาติได้ โดยส่วนใหญ่จะพบเชื้อ *Streptomyces* sp., *Nocardia* sp., *Rhodococcus* sp. และ *Gordonia* sp. ส่วนกลุ่มแกรมลบนั้นพบได้ยากกว่า โดยจะพบเชื้อ *Xanthomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Methylibium* sp. และ *Actinobacter* sp. ซึ่งอาจเกิดจากการขาดปัจจัยในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดแยก (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ในการย่อยสลายยางธรรมชาติ

Gram positive	Type of rubber degraded	References
<b>Bacterial strains</b>		
<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	Natural and synthetic rubber	Linós <i>et al.</i> , 1999
<i>Gordonia westfalica</i>	Natural and synthetic rubber, natural latex	Linós <i>et al.</i> , 2002
<i>Gordonia polyisoprenivorans</i> VH2 and Y2K	Natural and synthetic rubber	Arenskotter <i>et al.</i> , 2001
<i>Streptomyces coelicolor</i> and <i>S. griseus</i> 18a, <i>Nocardia</i> SMZ43191	Vulcanized rubber (glove)	Bode <i>et al.</i> , 2001
<i>Streptomyces</i> sp. La7	Latex, unvulcanized natural rubber	Gallert, 2000
<i>Nocardia</i> sp. 835A	Unvulcanized natural and synthetic rubber, vulcanized natural rubber (latex gloves, bands, tubing)	Tsuchii <i>et al.</i> , 1985
<i>Gordonia</i> sp. Kb2, Kd2 and VH2; <i>Micromonospora aurantiaca</i> W2b; <i>Mycobacterium fortuitum</i> NF4	Natural and synthetic rubber (following antioxidant removal), natural latex	Berekaa <i>et al.</i> , 2000
<i>Streptomyces</i> sp. S1G, S3D, S4C, S4E, S4F and S4G; <i>Amycolatopsis</i> sp.S1A and S1D; <i>Nocardia</i> sp. SF3	Vulcanized rubber (glove)	Heisey and Papadatos, 1995

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ในการย่อยสลายยางธรรมชาติ (ต่อ)

Gram positive	Type of rubber degraded	References
<b>Bacterial strains</b>		
<i>Nocardia</i> 835A mutant strains Wh, Rw and Rc	Vulcanized rubber (tire)	Tsuchii and Tokiwa, 1999
<i>Streptomyces</i> sp.; <i>Micromonospora</i> sp.; <i>Microtetraspora</i> sp.; <i>Actinoplanes</i> sp.; <i>Nocardia</i> sp.; <i>Actinomadura</i> sp.; <i>Dactylisporangium</i> sp.	Natural rubber latex	Jendrossek <i>et al.</i> , 1997b
<i>Streptomyces coelicolor</i> 1A	Synthetic rubber	Bode <i>et al.</i> , 2000
<i>Gordonia</i> sp. VH2 and Kb2, <i>Mycobacterium fortuitum</i> NF4	Vulcanized rubber (glove)	Linos <i>et al.</i> , 2000b
<i>Micromonospora aurantiaca</i> W2b	Latex dispersed in agar	Linos <i>et al.</i> , 2000a
<i>Actinomadura</i> sp. E6, <i>Nocardia farcinica</i> E1, <i>Thermomonospora curvata</i> E4 and E5	Latex dispersed in agar, synthetic rubber	Ibrahim <i>et al.</i> , 2006
<i>Streptomyces</i> sp. LCIC4, <i>Actinoplanes</i> sp. OR16,	Latex dispersed in agar	Imai <i>et al.</i> , 2011
<i>Streptomyces</i> sp., <i>Amycolatopsis orientalis</i> SY6, <i>Pseudonocardia</i> sp.	Latex dispersed in agar	Chengalroyen <i>et al.</i> , 2013
<i>Bacillus</i> sp. SBS	Natural latex rubber	Cherian <i>et al.</i> , 2009

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ในการย่อยสลายยางธรรมชาติ (ต่อ)

Gram negative	Type of rubber degraded	References
<b>Bacterial strains</b>		
<i>Actinobacter calcoaceticus</i> , <i>Xanthomonas</i> sp.	Vulcanized rubber (glove)	Bode <i>et al.</i> , 2001
<i>Methylibium</i> sp. NS21	Latex dispersed in agar	Imai <i>et al.</i> , 2011
<i>Methylibium fulvum</i> HZ	Latex dispersed in agar	Chengalroyen <i>et al.</i> , 2013
<i>Xanthomonas</i> sp.	Purified natural latex, synthetic rubber	Jendrossek <i>et al.</i> , 2003
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	Synthetic rubber	Bode <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas</i> sp.	Natural and vulcanized rubber (glove)	Roy <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	Synthetic rubber	Bode <i>et al.</i> , 2000

(Chengalroyen and Dabbs, 2013)

#### 4.1 จุลินทรีย์ย่อยสลายยางธรรมชาติโดยการหลั่งเอนไซม์

จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีความสามารถในการปล่อยเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์เพื่อย่อยสลายยางธรรมชาติที่อยู่รอบ ๆ เซลล์ให้มีขนาดโครงสร้างที่เล็กลงเพื่อดูดซึมมาใช้ในเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน ซึ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้สามารถสร้างวงใส บนอาหาร MSM agar ที่เททับด้วยน้ำยางได้ ซึ่งเกิดจากการที่จุลินทรีย์หลั่งเอนไซม์ออกมาเพื่อย่อยสลายยางธรรมชาติ ซึ่งยางธรรมชาติมีสีขาวขุ่นจะเสียสภาพเป็นสีใส โดยเชื้อในกลุ่มนี้ประกอบด้วย *Streptomyces* sp., *Actinoplanes* sp. และ *Micromonospora* sp. (Chengalroyen and Dabbs, 2013)

#### 4.2 จุลินทรีย์ย่อยสลายยางธรรมชาติโดยการยึดเกาะ

จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ทำลายพื้นผิวของยางโดยตรง โดยการยึดเกาะกับผิวยาง จากนั้นจึงสร้าง biofilm ขึ้นมาเพื่อเริ่มการย่อยสลายบริเวณผิวเซลล์โดยตรงทำให้ไม่เกิดวงใสบนอาหาร MSM agar ที่เททับด้วยน้ำยาง เนื่องจากจุลินทรีย์ปล่อยเอนไซม์ออกมาบริเวณพื้นผิวที่ยึดเกาะเท่านั้น ซึ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ประกอบด้วย *Mycobacterium* sp., *Gordonia* sp. และ *Nocardia* sp. นอกจากนี้ พบว่า เชื้อในกลุ่มที่ย่อยสลายยางธรรมชาติโดยการยึดเกาะมีประสิทธิภาพสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ยึดเกาะ ทำให้ได้รับความสนใจในการศึกษามากขึ้นในช่วงที่ผ่านมา (Chengalroyen and Dabbs, 2013)

### 5. อัตราการย่อยสลายยางธรรมชาติโดยจุลินทรีย์

อัตราการย่อยสลายของยางธรรมชาตินั้น ขึ้นอยู่กับ 2 ปัจจัยคือ ลักษณะการย่อยของจุลินทรีย์ และ ธรรมชาติของสารตั้งต้น โดยผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาตินั้น มักมีการใช้สารเติมแต่งต่างๆ เช่น สารตัวเร่ง สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านการกัดกร่อน และสารตัวเติมต่างๆ ซึ่งจะทำให้สารตั้งต้นมีความแตกต่างกันไปในแต่ละผลิตภัณฑ์

ในส่วนของจุลินทรีย์นั้น จากรายงานก่อนหน้านี้นี้พบว่า *Nocardia* sp. 835A strain Rc และ *Gordonia* sp. strains VH2 มีความสามารถในการย่อยสลายยางธรรมชาติได้สูง (ตารางที่ 2) โดย *Nocardia* sp. 835A strain Rc สามารถย่อยสลาย ยางวัลคาไนท์ ยางไมวัลคาไนท์ และยางสังเคราะห์ได้ นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายถุงมือยาง ได้กว่า 90 % ใน 3 สัปดาห์ (Tsuchii and Tokiwa, 2001) ส่วนในกลุ่มของ *Gordonia* นั้นพบมีสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายยางธรรมชาติได้ดี ได้แก่ *G.*



*westfalica* Kb2 และ *G. polyisoprenivorans* สายพันธุ์ VH2 Kd2 และ Y2K นอกจากนี้มีหลักฐานว่าการเติมสารเคมีในผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติทำให้การย่อยสลายลดลง เช่น ในถุงมือยาง ที่มีการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ หรือสารต้านจุลชีพ แต่เมื่อสกัดสารเหล่านี้ออกโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่า จุลินทรีย์ *Gordonia* sp. Kb2 และ *Micromonospora* sp. W2b สามารถที่จะเพิ่มจำนวนและย่อยสลายยางธรรมชาติได้ดีขึ้น แม้ว่าจะให้ผลที่ไม่แตกต่างใน *Gordonia* sp. VH2 และ *Mycobacterium* sp. NF4 (Linos et al., 2000)

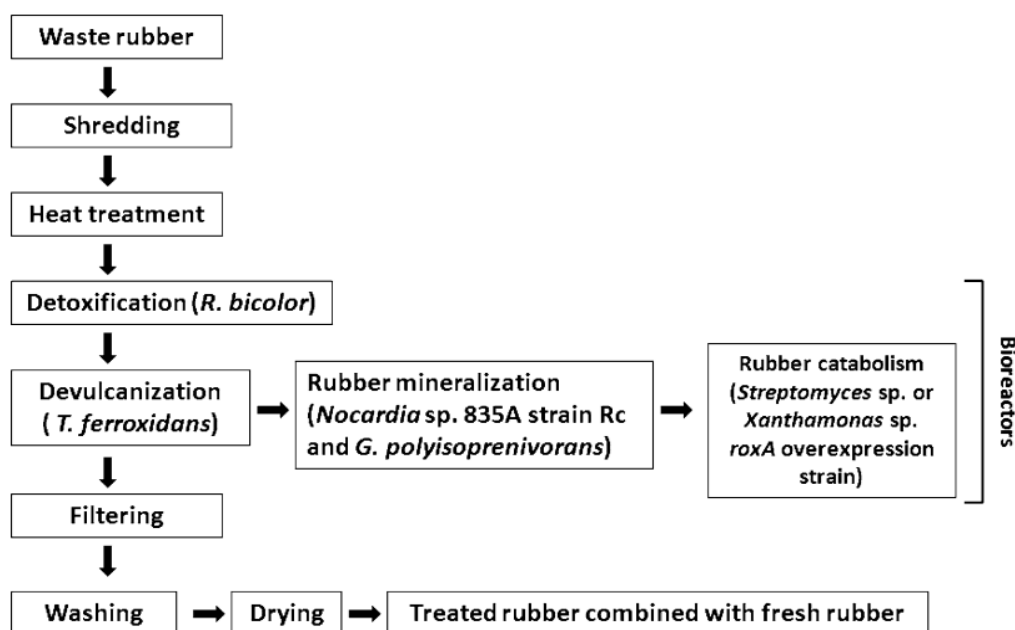
จากการศึกษานี้พบว่า การปรับสภาพทางเคมีของยางก่อนนำมาย่อยสลายจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดีขึ้น (รูปที่ 2) แต่อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีปริมาณมากในการปรับสภาพทางเคมีจะก่อให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อมได้เช่นกัน จึงทำให้มีการศึกษาการใช้จุลินทรีย์ในการปรับสภาพทางเคมีของผลิตภัณฑ์ยางให้เป็นพิษน้อยลง (รูปที่ 2) โดยใช้เชื้อในกลุ่ม เชื้อรา Wood rotting ซึ่งพบว่า เชื้อ *Resinicium bicolor* ที่ก่อให้เกิด white-rot สามารถที่จะลดความเป็นพิษของสารเติมแต่งในผลิตภัณฑ์ยางได้ โดยสามารถกำจัดซัลเฟอร์ในผลิตภัณฑ์ยางที่ผ่านการวัลคาไนท์ได้ และสามารถเจริญได้บนยางธรรมชาติอีกด้วย และมีรายงานว่าเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดซัลเฟอร์ของเชื้อรา *T. peromatabolis* เทียบกับวิธีทางเคมี พบว่า เชื้อราสามารถกำจัดซัลเฟอร์ได้ถึง 30 % ส่วนวิธีทางเคมีได้เพียง 8 % (Kim and Park, 1999) ซึ่งการกำจัดซัลเฟอร์จะช่วยให้จุลินทรีย์ที่เข้ามาย่อยสลายยางในขั้นต่อไปทำงานได้ง่ายขึ้น จากการศึกษาที่มีลักษณะใกล้เคียงกับยางธรรมชาติมากขึ้น และนอกจากนี้สภาวะในการย่อยสลายยางธรรมชาติก็มีผลต่ออัตราการย่อยสลาย ไม่ว่าจะเป็น อุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง รวมทั้งปริมาณอากาศ ซึ่งแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์

ตารางที่ 2 : อัตราการย่อยสลายยางธรรมชาติโดยเชื้อจุลินทรีย์

(A = ย่อยสลายยางธรรมชาติโดยการหลั่งเอนไซม์ B = ย่อยสลายยางธรรมชาติโดยการยึดเกาะ)

Organisms	Degradative strategy	Rubber reduction (%)	Incubation (week)	References
<i>Nocardia</i> sp. 835A strain Rc	B	80	8	Tsuchii and Tokiwa, 1999
<i>Nocardia</i> sp. 835A	B	>90	3	Tsuchii and Tokiwa, 1999
<i>Gordonia</i> sp. VH2	B	>50	4	Linos <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	B	13	10	Bode <i>et al.</i> , 2000
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	B	12	10	Bode <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas</i> sp.	B	10.38, 43.11	6	Roy <i>et al.</i> , 2006
<i>Xanthomonas</i> sp. 35Y	A	60	1	Tsuchii and Takeda, 1990
<i>Xanthomonas</i> sp.	A	12	10	Bode <i>et al.</i> , 2000
<i>Streptomyces griseus</i> 1D	A	18	10	Bode <i>et al.</i> , 2000
<i>Streptomyces coelicolor</i> 1A	A	10 – 18	6	Bode <i>et al.</i> , 2000
<i>Streptomyces</i> sp. K30	A	13.4	12	Rose <i>et al.</i> , 2005
<i>Streptomyces</i> sp. S1G, S3D, S4C, S4E, S4F, S4G	A	>10	6	Heisey and Papadatos, 1995

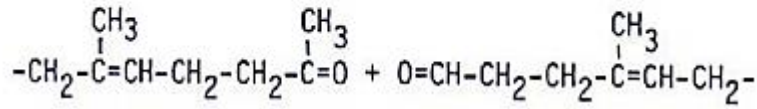
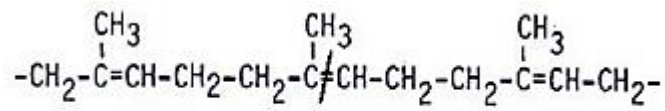
(Chengalroyen and Dabbs, 2013)



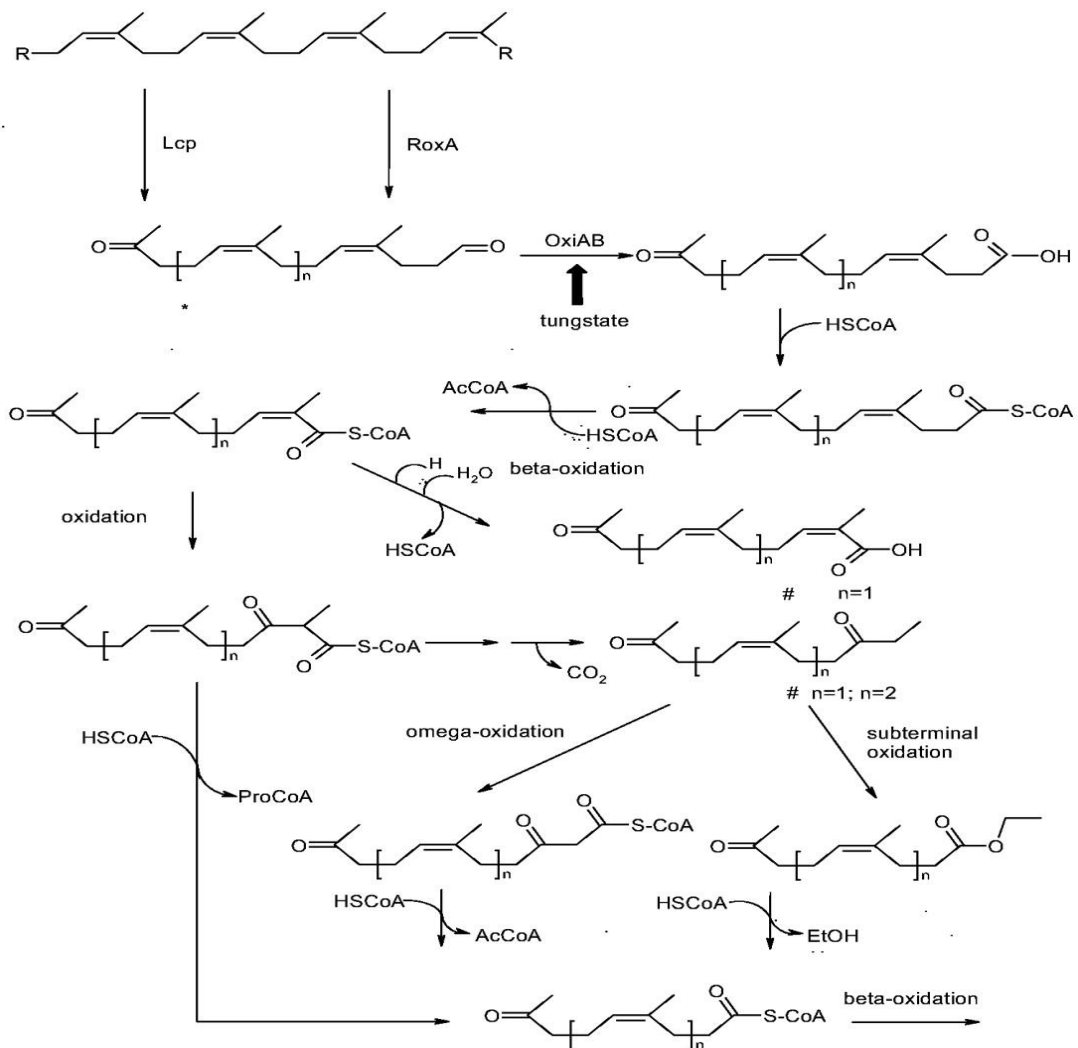
รูปที่ 2 ขั้นตอนการย่อยสลายผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ (Chengalroyen and Dabbs, 2013)

## 6. เอนไซม์และยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายยางธรรมชาติ

ในการย่อยสลายยางธรรมชาติโดยจุลินทรีย์นั้น จากรายงานพบว่ามี เอนไซม์สองชนิดที่ทำหน้าที่ทำลายพันธะในโครงสร้างของยางธรรมชาติ (รูปที่ 3) คือ Latex clearing protein (Lcp) ที่พบใน *Streptomyces* sp. strain K30 (Rose *et al.*, 2005) ใน *Streptomyces lividans* และ *Saccharopolyspora erythraea* (Yikmis and Steinbüchel, 2012) และ Rubber oxygenase A (RoxA) ที่พบใน *Xanthomonas* sp. (Jendrossek and Reinhardt, 2003) โดย Lcp และ RoxA มีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน แบบที่เรียทั้งสองกลุ่มหลังเอนไซม์ออกมาในอาหารเพื่อย่อยสลาย poly (cis-1, 4-isoprene) โดยใช้ปฏิกิริยา oxidative reaction (Braaz *et al.*, 2004) (Jendrossek and Reinhardt, 2003)



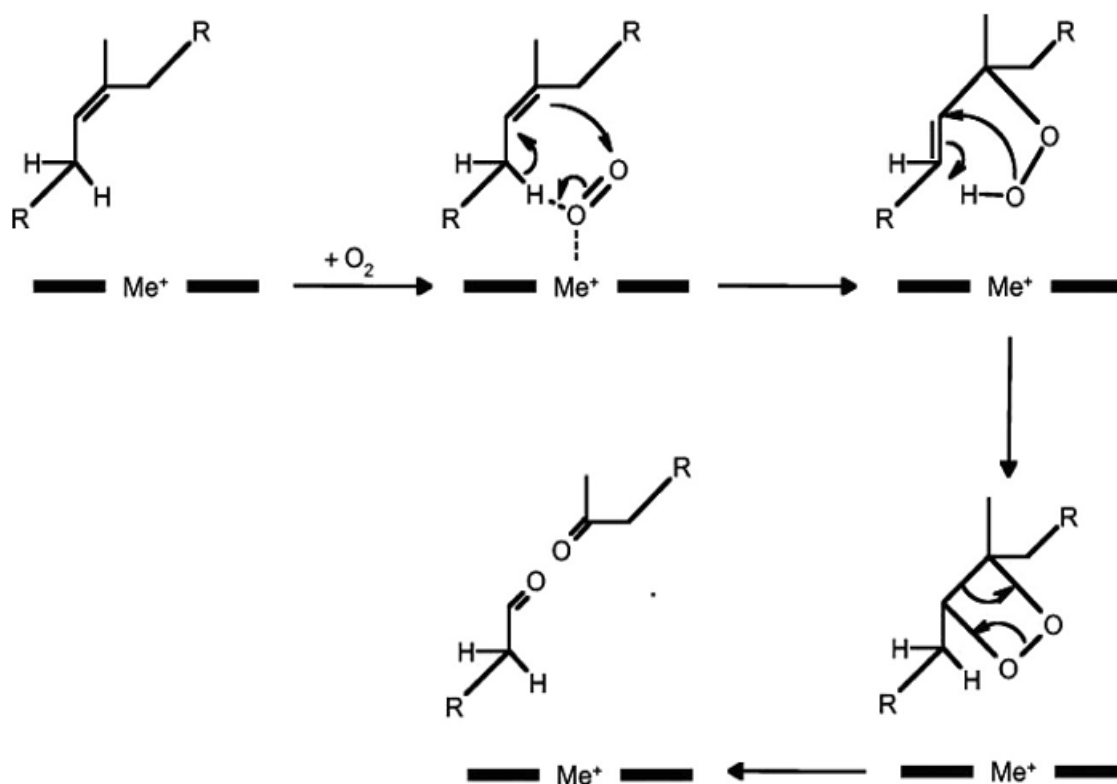
รูปที่ 3 แผนภาพแสดงผลผลิตที่เกิดจากการย่อยสลายยางโดยเชื้อ *Nocardia* sp. 835A และ *Xanthomonas* sp. 35Y โดยเส้นขีดสีดำเป็นตำแหน่งพันธะคู่ที่ถูกตัดในโครงสร้างยางธรรมชาติ (Tsuchii et al., 1985) (Tsuchii and Takeda, 1990)



รูปที่ 4 กลไกการย่อยสลายยางโดยจุลินทรีย์ ด้วยวิธีสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์จากโมเลกุลขนาดใหญ่ให้มีขนาดเล็กลง (Rose and Steinbüchel, 2005)

### 6.1 RoxA

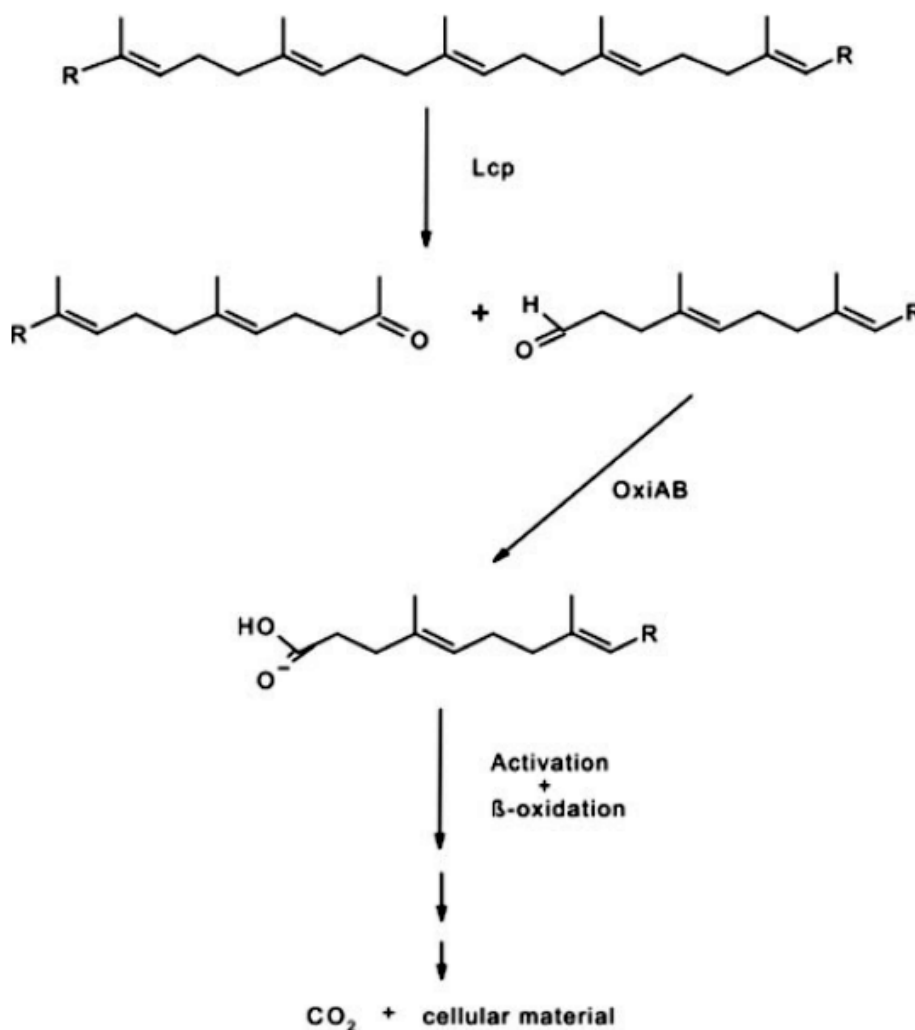
ในเชื้อแกรมลบที่มีรายงานว่ามีความสามารถในการย่อยสลายยางธรรมชาติ คือ *Xanthomonas* sp. strain 35Y ที่เจริญบน ยางธรรมชาติ poly(cis-1,4-isoprene) พบว่าเชื้อหลังโปรตีน RoxA เพื่อทำปฏิกิริยากับยางโดยการตัดพันธะบนโครงสร้างของยางธรรมชาติ เกิดเป็นสารที่มีโครงสร้างเล็กกล คือ CHO-CH<sub>2</sub>- และ -CH<sub>2</sub>-COCH<sub>3</sub> (รูปที่ 5) ซึ่งเอนไซม์ RoxA ถูกควบคุมโดยยีน *roxA* ที่รายงานพบใน *Xanthomonas* sp. strain 35Y (Jendrossek and Reinhardt, 2003) ซึ่งมีการทดลองโคลนยีนเข้าสู่เชื้อ *E.coli* พบว่ายีน *roxA* ไม่สามารถแสดงออกได้ (Hambusch *et al.*, 2010)



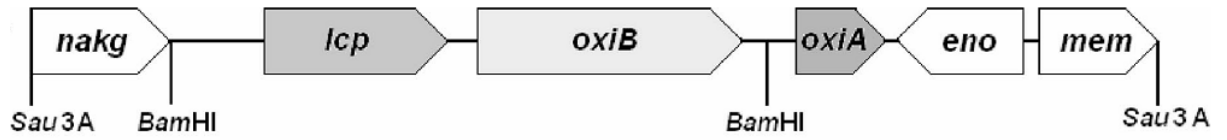
รูปที่ 5 กลไกการย่อยสลายยางโดยเอนไซม์ RoxA (Braaz *et al.*, 2004)

## 6.2 Lcp

ในการย่อยสลายอย่างธรรมชาติของเชื้อแกรมบวกมีรายงานว่าเอนไซม์ Lcp ของ *Streptomyces* sp. strain K30 นั้นสามารถตัดพันธะของอย่างธรรมชาติเช่นเดียวกับเอนไซม์ RoxA เกิดเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำลงคือ isoprenoid aldehydes จากนั้นเกิดการย่อยต่อไปจนได้เป็น CO<sub>2</sub> และสารชีวมวลอื่นๆ (รูปที่ 6) โดยเอนไซม์ Lcp นี้ถูกควบคุมโดยยีน *lcp* มีรายงานว่าพบใน *Streptomyces* sp. strain K30 (Rose *et al.*, 2005) ซึ่งมียีน *oxiB* และ *oxiA* อยู่ใน operon เดียวกัน ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของยีน *lcp* (รูปที่ 7) โดยในการทดลองการโคลนยีนเข้าสู่ *E.coli* พบว่า ยีน *lcp* สามารถแสดงออกได้ (Yikmis *et al.*, 2008)



รูปที่ 6 กลไกการย่อยสลายอย่างโดยเอนไซม์ Lcp (Yikmis and Steinbüchel, 2012)



รูปที่ 7 แผนผังแสดงยีน *lcp* *oxIA* และ *oxkB* (Rose *et al.*, 2005)

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายยางจากตัวอย่างดิน
2. เพื่อทดสอบความสามารถของการย่อยสลายยางของเชื้อที่แยกได้
3. เพื่อตรวจหายีน *lcp* ของเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายยางธรรมชาติ
4. เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายยางธรรมชาติร่วมกันของเชื้อที่คัดแยกได้



## ผลการทดลองและการวิเคราะห์

### 1. การแยกเชื้อแบคทีเรียย่อยสลายยวธรรมชาติจากดินและกลุ่มเชื้อ

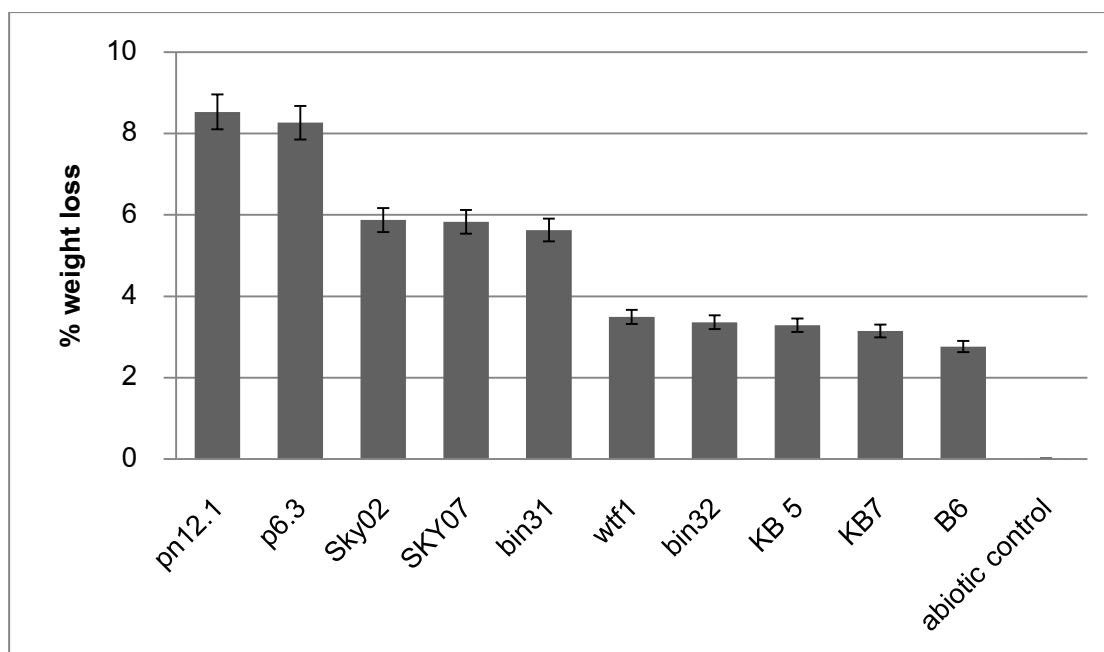
จากตัวอย่างดิน 80 ตัวอย่างจากหลายพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนยวธรรมชาติในภาคใต้ และกลุ่มเชื้อ F ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อยวธรรมชาติที่มีการศึกษาโดยนายปราชญ์ปริญญา จันวดี ว่าสามารถย่อยสลายยวมืออย่างได้ดีถึง 59 % ใน 15 วัน โดยสามารถคัดแยกเชื้อที่คาดว่าจะมีความสามารถในการย่อยสลายยวธรรมชาติได้ทั้งหมด 422 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญบนอาหาร MSM+NR agar และเมื่อคัดแยกอีกครั้งโดยนำไปเลี้ยงบนอาหาร MSM latex overlay agar พบว่ามี 130 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญได้ โดยเชื้อ 130 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญได้บนอาหาร MSM overlay agar ที่มีความเข้มข้นของน้ำยวมือมากกว่า MSM+NR agar ทำให้เชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำยวมือได้ดีไม่สามารถเจริญได้ และพบมีเชื้อ 20 ไอโซเลท ที่มีวงใสเกิดขึ้นบนอาหาร MSM latex overlay agar ในเวลา 5 วัน โดยมีขนาด 0.1 ถึง 12.5 มิลลิเมตร เชื้อที่มีขนาดวงใสสูงที่สุดคือเชื้อ KB 37 ที่ได้จากตัวอย่างดินจากจังหวัดสตูล รองลงมาคือ cp2.1 และ cp2.2 จากจังหวัดชุมพร ที่มีขนาดวงใสอยู่ที่ 5.9 และ 5.8 มิลลิเมตรตามลำดับ ส่วนเชื้อที่แยกจากกลุ่มเชื้อ F ทั้ง 10 ไอโซเลทไม่มีการสร้างวงใสขึ้นและในการศึกษาของ Imai และคณะพบว่าเชื้อในกลุ่มของ actinomycetes ได้แก่ *Actinoplanes*, *Streptomyces*, และ *Micromonospora* สามารถสร้างวงใสได้ ซึ่งวงใสแสดงถึงลักษณะการย่อยสลายยวมือของเชื่อนั้นว่าเป็นแบบปล่อยเอนไซม์มาย่อยสลายน้ำยวมือภายนอกเซลล์ ซึ่งเมื่อโครงสร้างของน้ำยวมือที่มีสีขาวขุ่นถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ของเชื้อจะเปลี่ยนจากสีขาวขุ่นไปเป็นสารละลายไม่มีสี (Imai *et al.*, 2011) ซึ่งเชื้อ KB 37 ที่มีขนาดวงใสใหญ่ที่สุดแสดงถึงความสามารถในการปล่อยเอนไซม์ออกไปนอกเซลล์ได้มากกว่าเชื้อไอโซเลทอื่น

### 2. การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายยวมือของเชื้อเดี่ยวที่คัดแยกได้

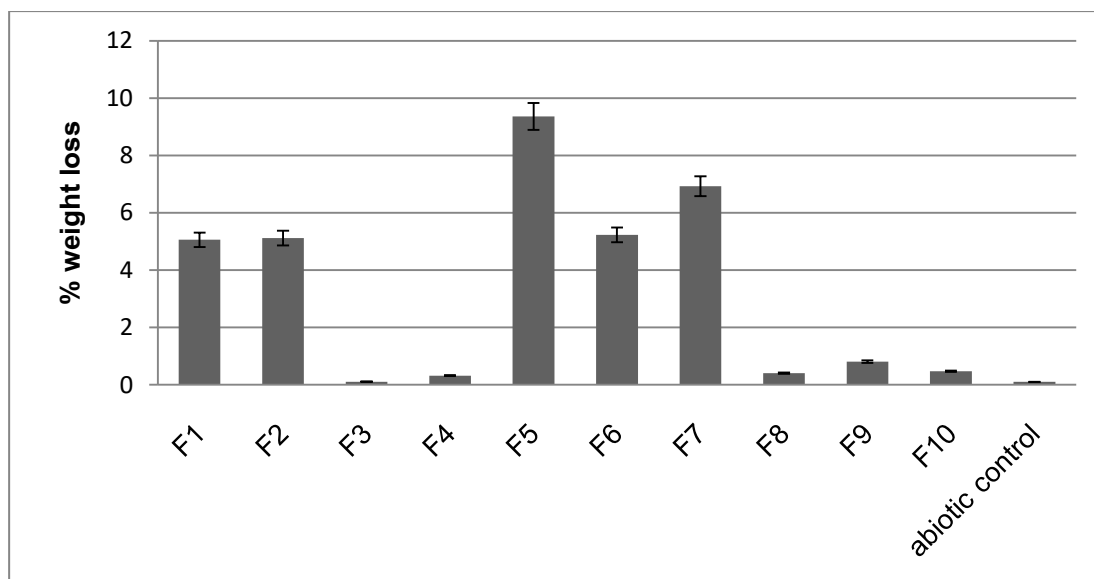
#### 2.1 ศึกษาหน้าหน้กของแผ่นยวมือหลังจากบ่มกับเชื้อที่คัดเลือกได้

จากการใช้เชื้อทั้งหมด 130 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญได้บนอาหาร MSM latex overlay agar ทั้งที่สร้างวงใสและไม่สร้างวงใส บ่มร่วมกับแผ่นยวมือยวมือในอาหาร MSM broth เป็นเวลา 30 วัน แล้วนำไปหาหน้าหน้กแห่งหลังการบ่มเทียบกับชุดควบคุม พบว่าเชื้อ F5 ที่แยกจากกลุ่มเชื้อ F เชื้อ pn12.1 และเชื้อ pn6.3 ที่แยกได้จากดิน มีความสามารถในการย่อยสลายยวมือสูงสุดทำให้น้ำหน้กยวมือยวมือหายไปที่ 9.36 % 8.53 % และ 8.26 % ในเวลา 30 วันตามลำดับ (รูปที่ 8) (รูปที่ 9) ซึ่งเชื้อในกลุ่มนี้ทำให้น้ำหน้กยวมือยวมือเปลี่ยนจากสีขาวไปเป็นสีเหลืองขุ่น บาง เปื่อยยุ่ย และอาหารขุ่นมาก ส่วนเชื้อในกลุ่ม sky02 sky07 และ bin31 สามารถย่อยได้ 5.88 % 5.83 % และ 5.63 % ตามลำดับ โดยเชื้อในกลุ่มนี้ทำให้น้ำหน้กยวมือยวมือมีลักษณะบางลง เปลี่ยนสีเล็กน้อย ขาดง่าย

อาหารขุนปานกลาง ส่วนเชื้อที่เหลือย่อยสลายลงมื่ออย่างได้ต่ำกว่า 5 % ลักษณะอาหารขุนเล็กน้อยถึงใส และมีเชื้อบางไอโซเลทที่ทำให้ถูงมื่ออย่างเปลี่ยนสี ได้แก่ เชื้อ 11.1 และ cp 2.1 ที่เปลี่ยนจากสีขาวไปเป็นสีชมพู และเชื้อ bin 32 ที่เปลี่ยนสีถูงมื่ออย่างจากสีขาวเป็นสีดำ ซึ่งความสามารถในการย่อยสลายของเชื้อกลุ่มนี้ค่อนข้างต่ำกว่าที่มีการศึกษามา โดย Bode และคณะได้บ่มถูงมื่ออย่างร่วมกับเชื้อ *Pseudomonas citronellolis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Xanthomonas* sp., *Streptomyces griseus* 1D และ *Streptomyces coelicolor* 1A พบว่ามีความสามารถในการย่อยสลายอยู่ที่ 10-18 % แต่ใช้เวลาในการบ่ม 6-10 สัปดาห์ (Bode *et al.*, 2000) และพบว่าการมีไซนไฮเบนอาหาร MSM latex overlay agar ไม่ได้สัมพันธ์กับความสามารถในการย่อยสลายโดยเชื้อ KB 37 ที่มีขนาดวงใสใหญ่ที่สุด กลับมีความสามารถในการย่อยสลายที่ต่ำกว่าเชื้อที่ไม่สร้างวงใส โดยจากการศึกษาของ Chengalroyen และ Dabbs พบว่าเชื้อ *Nocardia* sp. 835A ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่มที่ไม่สร้างวงใส มีความสามารถในการย่อยสลายถึง มากกว่า 90 % ใน 3 สัปดาห์ ซึ่งสูงกว่า *Streptomyces* sp. K30 ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่มที่สร้างวงใส ที่ความสามารถในการย่อยสลาย 13.4 % ใน 12 สัปดาห์ (Chengalroyen and Dabbs, 2013) ซึ่งจากเชื้อ 120 ไอโซเลท มีเชื้อที่มีไซนไฮ 43 ไอโซเลท เป็นแกรมบวก 40 ไอโซเลท แกรมลบ 3 ไอโซเลท และ เชื้อที่ไม่มีไซนไฮ 87 ไอโซเลท เป็นแกรมบวก 65 ไอโซเลท แกรมลบ 22 ไอโซเลท



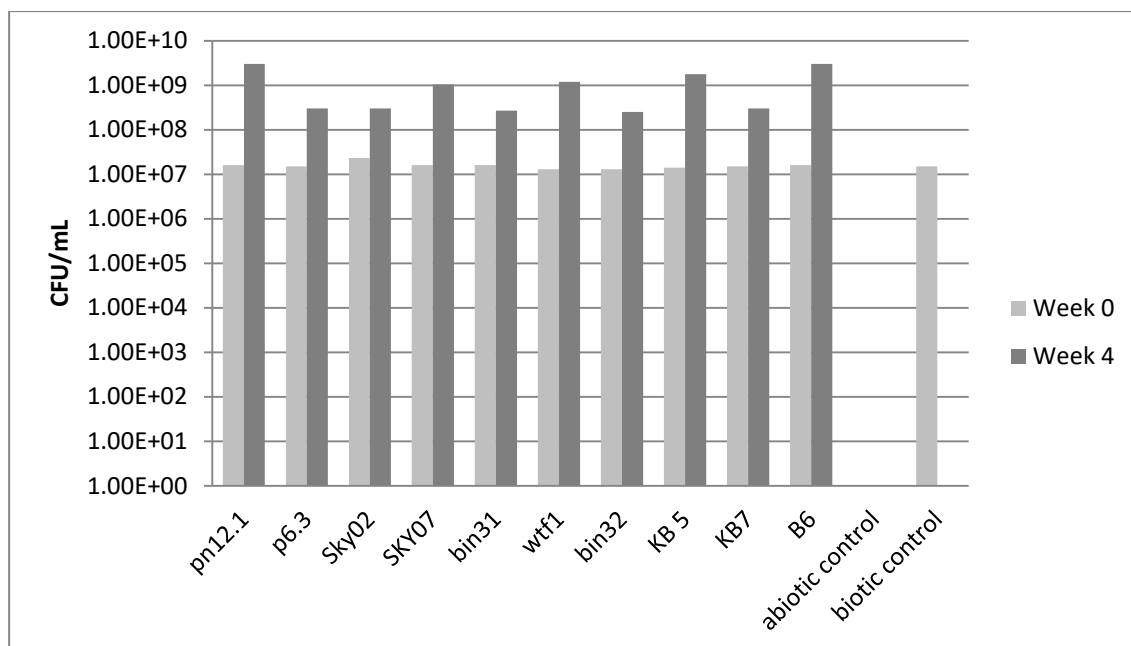
รูปที่ 8 เปอร์เซนต์น้ำหนักที่หายไปของแผ่นถูงมื่ออย่างที่บ่มร่วมกับเชื้อที่คัดแยกได้ 10 อันดับแรก เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน



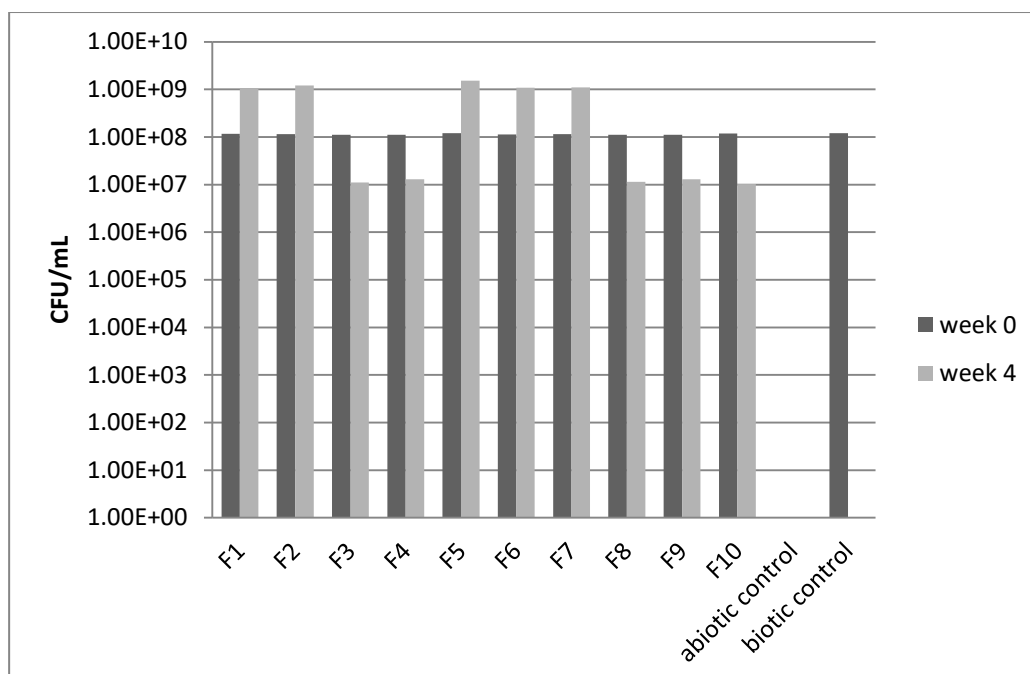
รูปที่ 9 เปอร์เซนต์น้ำหนักที่หายไปของแผ่นถุ้มืออย่างทีบ่มร่วมกับเชื้อทีคัดแยกจากกลุ่มเชื้อ F เปรียบเทียบกับชุดควบคุมทีไม่มีการเติมเชื้อ บ่มที 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน

## 2.2 ศึกษากการอยู่รอดของจุลินทรีย์โดยวิธีการ spread plate จากการย่อยสลายถุ้มืออย่าง

จากผลการทดลองบ่มเชื้อทีคัดแยกได้ร่วมกับแผ่นถุ้มืออย่างในอาหาร MSM broth เป็นเวลา 30 วัน และนับจำนวนเชื้อทีเหลืออยู่ โดยวิธี spread plate พบว่าเชื้อทีมีความสามารถในการย่อยสลายได้ดี 10 อันดับแรกจากผลการทดลองที 2.1 นั้นมีปริมาณเชื้อทีเพิ่มขึ้น ซึ่งปริมาณเชื้อทีเพิ่มขึ้นแสดงถึงการทีเชื้อสามารถใช้ยงธรรมชาติเป็นแหล่งคาร์บอนได้ แต่ปริมาณของเชื้อทีเพิ่มขึ้นมีปริมาณทีใกล้เคียงกัน จึงไม่ได้มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการย่อยสลาย ซึ่งเป็นไปได้ว่าจำนวนเชื้อทีเกาะติดแผ่นยงมีผลต่อการนับเชื้อใน broth culture ส่วนชุดควบคุมทีเติมเชื้อแต่ไม่มีการเติมแผ่นถุ้มืออย่าง (biotic control) พบว่าไม่มีเชื้อเหลือรอดหลังผ่านการบ่มเป็นเวลา 30 วัน (รูปที 10) (รูปที 11) ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าเชื้อทีคัดแยกได้มีความสามารถในการย่อยสลายค่อนข้างต่ำ จึงทำการศึกษากการย่อยสลายถุ้มืออย่างร่วมกันโดยใช้เชื้อทีแยกได้จากเชื้อกลุ่ม F ทีมีการศึกษาว่าย่อยสลายถุ้มืออย่างได้ดี



รูปที่ 10 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นและสุดท้ายหลังจากการบ่มรวมกับแผ่นถุงมืออย่างเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแผ่นถุงมืออย่างและชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน

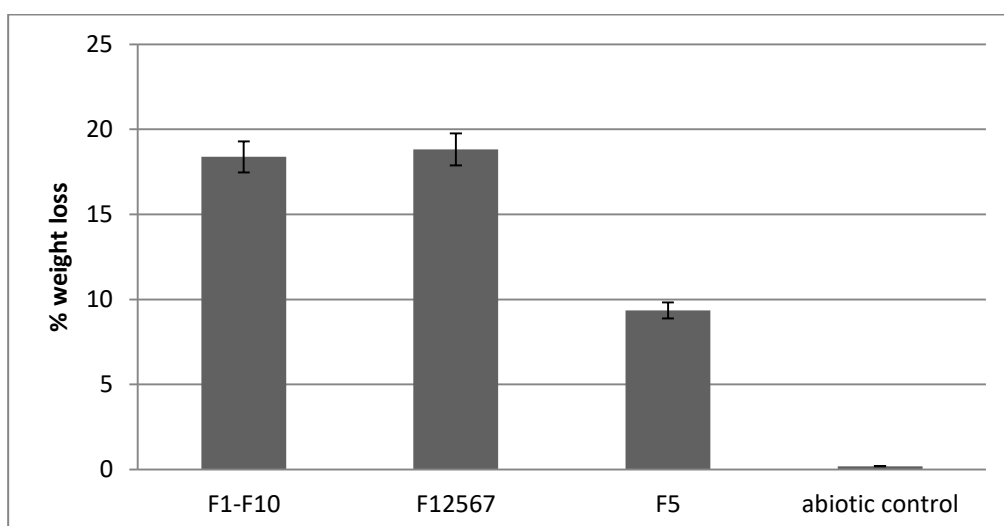


รูปที่ 11 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นและสุดท้ายหลังจากการบ่มร่วมกับแผ่นถุงมืออย่างเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแผ่นถุงมืออย่างและชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน โดยเชื้อที่แยกจากกลุ่มเชื้อ F

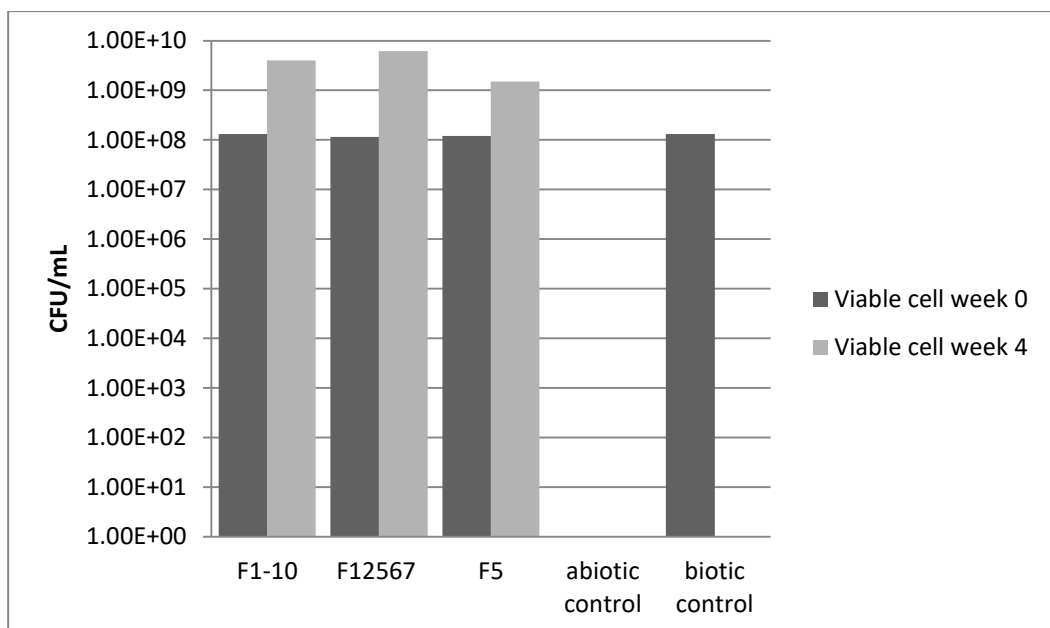
### 3. ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายของกลุ่มแบคทีเรียเทียบกับเชื้อเดี่ยว F5 ที่คัดแยกมาจากตัวอย่างเดียวกัน

จากการศึกษาข้างต้นเชื้อ F5 นั้นมีความสามารถในการย่อยสลายอย่างธรรมชาติโดยทำให้น้ำหนักยางลดลง 9.36 % ในเวลา 30 วันซึ่งเป็นความสามารถในการย่อยสลายที่ใกล้เคียงกับการศึกษาอื่น ที่พบว่ามีความสามารถในการย่อยสลายอยู่ที่ 10-18 % แต่ ใช้เวลาในการบ่ม 6-10 สัปดาห์ (Bode *et al.*, 2000) ทางผู้ทดลองจึงทำการผสมเชื้อที่คัดแยกได้ เพื่อสังเกตว่าการผสมเชื้อเข้าด้วยกันมีผลในการเพิ่ม หรือลดประสิทธิภาพในการย่อยสลายอย่างธรรมชาติหรือไม่

โดยใช้ชุดการทดสอบดังนี้ กลุ่มเชื้อทั้งหมดที่คัดแยกได้จากเชื้อกลุ่ม F (F1-F10) กลุ่มเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายสูงกว่า 5 % (F1 F2 F5 F6 F7) และเชื้อเดี่ยวที่มีความสามารถในการย่อยสลายสูงที่สุด (F5) มาทำการย่อยสลายถุงมือยางพบว่า กลุ่มเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายสูงกว่า 5 % (F1 F2 F5 F6 F7) มีความสามารถในการย่อยสลายสูงที่สุด ที่ 18.82% รองลงมาคือ เชื้อผสมจาก กลุ่มเชื้อทั้งหมดที่คัดแยกได้จากเชื้อกลุ่ม F (F1-F10) ที่ 18.38% และเชื้อเดี่ยวที่มีความสามารถในการย่อยสลายสูงที่สุด (F5) ที่ 9.36% ตามลำดับ (รูปที่ 12) ซึ่งความสามารถในการย่อยสลายที่เพิ่มขึ้น อาจเป็นผลจากการที่เชื้อตัวอื่นสามารถช่วยในการย่อยสลายโครงสร้างส่วนอื่นของถุงมือยางทำให้เกิดการย่อยสลายดีขึ้น (Chengalroyen and Dabbs, 2013) และนอกจากนี้พบว่าเชื้อทั้งสามกลุ่มมีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังบ่มร่วมกับถุงมือยาง บ่งชี้ถึงการย่อยสลายอย่างธรรมชาติไปเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (รูปที่ 13)



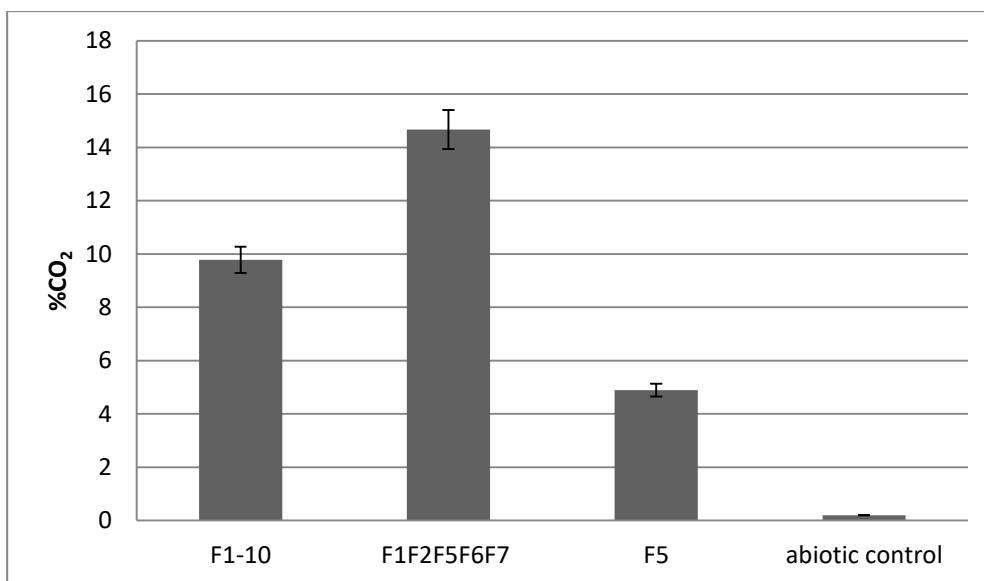
รูปที่ 12 เปรอ์เซ็นต์น้ำหนักที่หายไปของแผ่นถุงมือยางที่บ่มร่วมกับเชื้อต่าง ๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน



รูปที่ 13 ปริมาณเชื้อตั้งต้นและหลังกระบวนการย่อยสลายแผ่นถุงมือยางเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อและชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมถุงมือยาง บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน

4. การทดสอบการย่อยสลายของถุงมือยางโดยการวัดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นของเชื้อ F5 เทียบกับกลุ่มเชื้อที่คัดแยกมาจากตัวอย่างเดียวกัน

จากการวัดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น พบว่ากลุ่มเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายสูงกว่า 5 % (F1 F2 F5 F6 F7) มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์สูงสุดที่ 14.67 % รองลงมาคือกลุ่มเชื้อที่ผสมระหว่าง กลุ่มเชื้อทั้งหมดที่คัดแยกได้จากเชื้อกลุ่ม F(F1-F10) มีปริมาณ 9.78 % และ เชื้อเดี่ยวที่มีความสามารถในการย่อยสลายสูงที่สุด (F5) มีปริมาณ 4.89 % ส่วนชุดควบคุมมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 1.2 % ซึ่งผลการทดลองสัมพันธ์กับความสามารถในการย่อยสลายที่ทดสอบโดยการหาน้ำหนักที่เปลี่ยนไปที่กลุ่มเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายสูงกว่า 5 % (F1 F2 F5 F6 F7) ย่อยสลายถุงมือยางมีน้ำหนักลดลงมากที่สุด (รูปที่ 14)

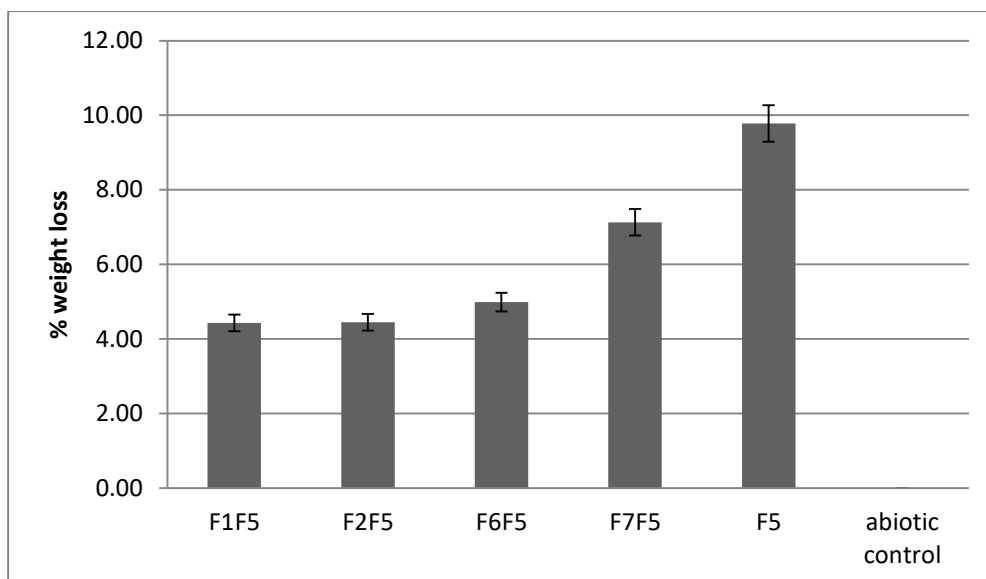


รูปที่ 14 เปอร์เซนต์คาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายถุงมียางของชุดทดสอบและชุดควบคุม ที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน

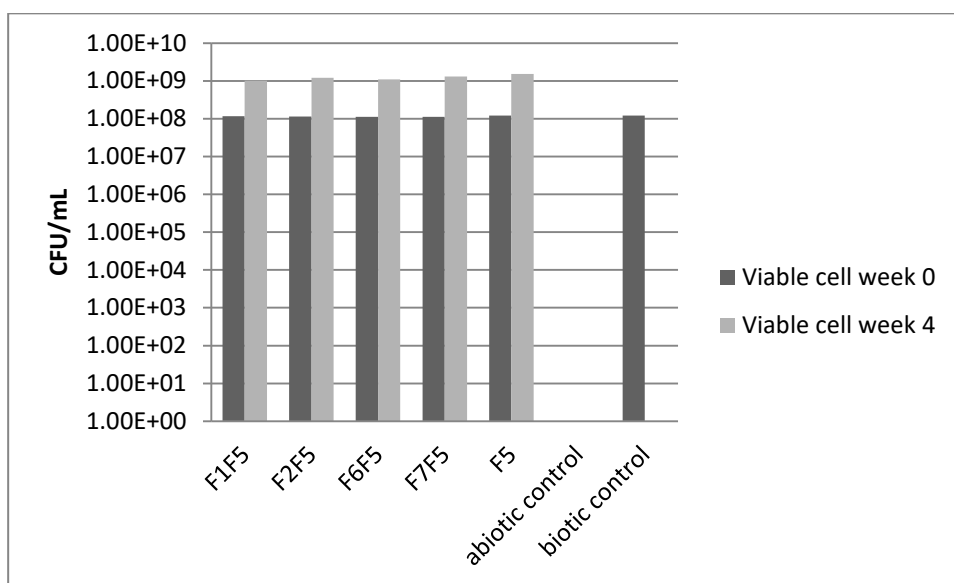
#### 5.ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแผ่นถุงมียางโดยการจับคู่เชื้อที่คัดแยกได้จากตัวอย่างเดียวกัน

จากการทดลองข้างต้น พบว่าการผสมเชื้อที่คัดแยกได้นั้นทำให้ประสิทธิภาพของการย่อยสลายสูงขึ้น แต่การใช้เชื้อ 5 – 10 ตัวในการย่อยสลายนั้นจะควบคุมปริมาณเชื้อที่เปลี่ยนไปในกระบวนการย่อยได้ยาก จึงลดชนิดของเชื้อเหลือเพียงสองชนิดมาผสมกันโดยใช้เชื้อเดียวที่มีความสามารถในการย่อยสลายสูงที่สุด (F5) เป็นฐานในการผสมกับเชื้อตัวอื่นที่มีความสามารถในการย่อยสลายมากกว่า 5 % ที่คัดแยกมาจากตัวอย่างเดียวกัน

จากผลการทดลองโดยใช้ การจับคู่เชื้อ F5 กับเชื้อตัวอื่นที่แยกจากตัวอย่างเดียวกันได้แก่เชื้อ F1 F2 F6 และ F7 พบว่าเชื้อ F5 คู่กับ F7 มีความสามารถในการย่อยสลายสูงสุดที่ 7.13 % ส่วนคู่อื่นๆจะอยู่ที่ประมาณ 5 % (รูปที่ 15) ซึ่งการผสมเพียง 2 ชนิดที่แยกจากตัวอย่างเดียวกันนั้นทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายทางธรรมชาติลดลง ซึ่งเกิดจากปริมาณเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ F5 ที่ลดลง และการที่เชื้อที่จับคู่กันไม่ได้ทำงานส่งเสริมซึ่งกันและกัน แม้ว่าปริมาณเชื้อที่เหลือใน 30 วันของการบ่มมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นในทุกเชื้อ (รูปที่ 16) แสดงถึงความสามารถในการใช้ถุงมียางเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้



รูปที่ 15 เปอร์เซนต์ความสามารถในการย่อยสลายถุงมีอย่างเมื่อนำเชื้อที่แยกได้จากแหล่งเดียวกันมาผสมกับเชื้อ F5 เปรียบเทียบกับเชื้อเดี่ยว F5 และชุดควบคุม บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน



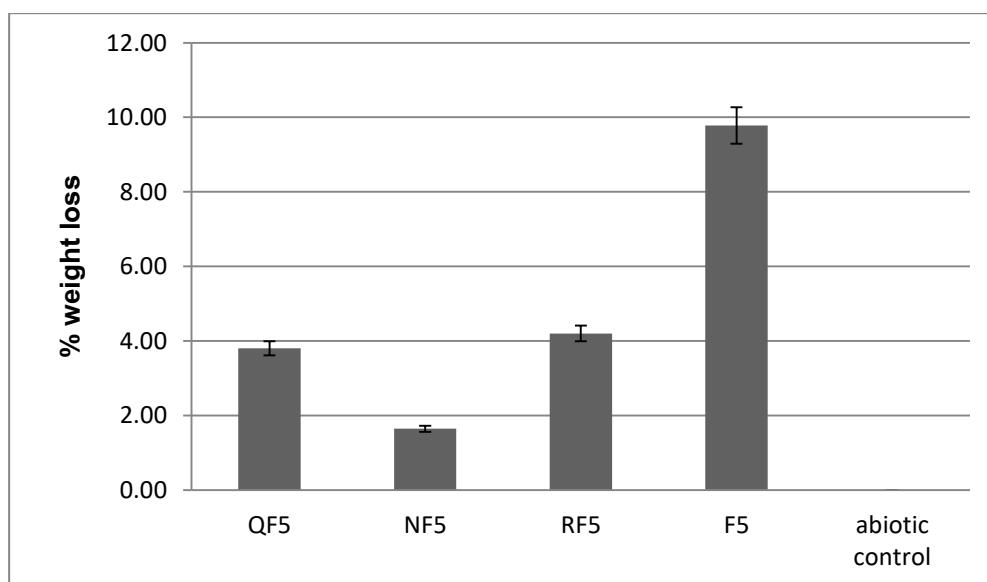
รูปที่ 16 ปริมาณเชื้อตั้งต้นและหลังกระบวนการย่อยสลายแผ่นถุงมีอย่างโดยเชื้อที่แยกได้จากแหล่งเดียวกันมาผสมกับเชื้อ F5 เปรียบเทียบกับเชื้อเดี่ยว F5 และชุดควบคุม บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน



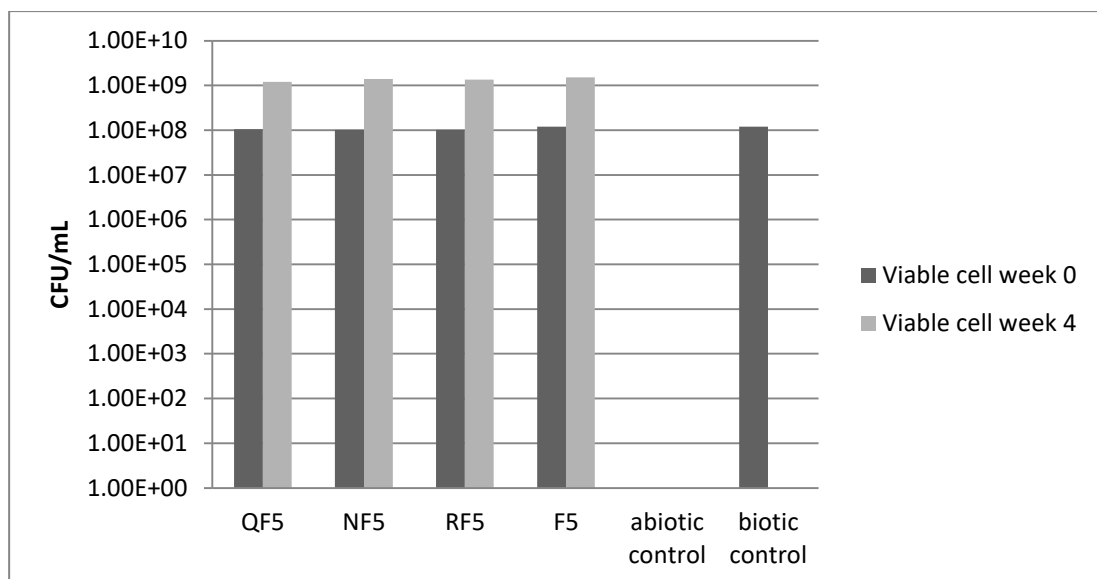
## 6.ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแผ่นถุงมือยางโดยการจับคู่กับเชื้อที่แยกจากตัวอย่างต่างกัน

จากการทดลองผสมเชื้อที่คัดแยกได้จากตัวอย่างเดียวกันกับเชื้อ F5 พบว่าประสิทธิภาพที่ได้กลับลดลง ทางผู้ทดลองจึงนำเชื้อ F5 ผสมกับเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายได้ดีแต่คัดแยกได้จากตัวอย่างอื่นแทน โดยได้เลือกเชื้อมาสามชนิดได้แก่ เชื้อ Q N และ R ที่การศึกษาโดยนางสาวเยาวลักษณ์ มีสุข และนางสาวฟาชีละ ดาโอะ ที่พบว่าเชื้อทั้งสามไอโซเลทย่อยสลายยางธรรมชาติได้ดีมาผสมกับเชื้อ F5

จากผลการทดลองโดยใช้ การจับคู่เชื้อ F5 กับเชื้อตัวอื่นที่แยกจากตัวอย่างต่างกันได้แก่เชื้อ Q N และ R พบว่าเชื้อ F5 คู่กับ R มีความสามารถในการย่อยสลายสูงสุดที่ 4.20 % ส่วนคู่ Q อยู่ที่ 4.20 % และเชื้อ N ที่ 1.64 % (รูปที่ 17) ซึ่งลดประสิทธิภาพในการย่อยสลายลงเช่นเดียวกับเชื้อที่แยกจากตัวอย่างเดียวกัน บ่งชี้ถึงเชื้อที่นำมาผสมกับเชื้อ F5 ไม่สามารถสนับสนุนการย่อยสลายยางธรรมชาติของเชื้อ F5 แม้ว่าปริมาณเชื้อที่เหลือรอดมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นในทุกเชื้อเช่นเดียวกันการทดลองก่อนหน้านี้ (รูปที่ 18) แสดงถึงความสามารถในการใช้ยางธรรมชาติเป็นแหล่งคาร์บอนได้ของเชื้อผสม



รูปที่ 17 เปอร์เซนต์ความสามารถในการย่อยสลายถุงมือยางเมื่อนำเชื้อที่แยกได้จากแหล่งต่างกันมาผสมกับเชื้อ F5 เปรียบเทียบกับเชื้อเดี่ยว F5 และชุดควบคุม บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน

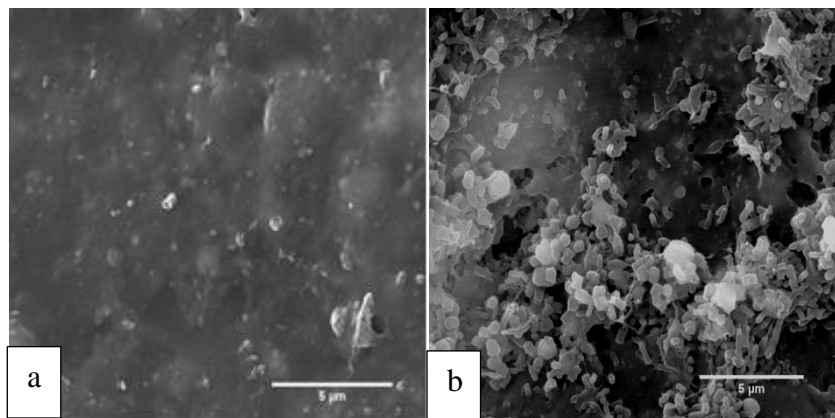


รูปที่ 18 ปริมาณเชื้อตั้งต้นและหลังกระบวนการย่อยสลายแผ่นถุงมือยางโดยเชื้อที่แยกได้จากแหล่งต่างกันมาผสมกับเชื้อ F5 เปรียบเทียบกับเชื้อเดี่ยว F5 และชุดควบคุม บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน

จากการศึกษาการใช้เชื้อร่วมกันในการย่อยสลายยางธรรมชาติ พบว่ากลุ่มเชื้อ F12567 ที่แยกได้จากเชื้อกลุ่ม F โดยผสมเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายยางธรรมชาติมากกว่า 5% มีความสามารถในการย่อยสลายได้สูงที่สุด และเกิดคาร์บอนไดออกไซด์มากที่สุด แสดงถึงความสามารถในการย่อยสลายที่สูงกว่าเชื้อกลุ่มอื่น จึงสนใจนำเชื้อกลุ่มนี้ไปศึกษาต่อ โดยจากการย้อมสีแกรม เชื้อในกลุ่มนี้เป็นเชื้อแกรมลบ 4 ไอโซเลท และเป็นเชื้อแกรมบวก 1 ไอโซเลท คือ เชื้อ F5 ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายยางธรรมชาติได้ดีที่สุด จึงเลือกเชื้อตัวนี้ไปทำการศึกษาต่อไป

## 7. ศึกษาลักษณะการเกาะติดของเชื้อโดยส่องภายใต้กล้อง SEM

จากการส่องกล้อง SEM เพื่อดูลักษณะพื้นผิวและการเกาะติดของเชื้อพบว่าในชุดควบคุมแผ่นถุงมือยางมีลักษณะเรียบไม่มีรูพรุนหรือร่องรอยการแตกหัก ส่วนแผ่นยางที่บ่มร่วมกับเชื้อ F5 มีการเกิดรูพรุนจากการย่อยสลายของเชื้อบนแผ่นยาง และมีการเกาะติดของเชื้อทั่วบริเวณแผ่นยาง รวมถึงในรูพรุนที่เกิดขึ้น (รูปที่ 19)

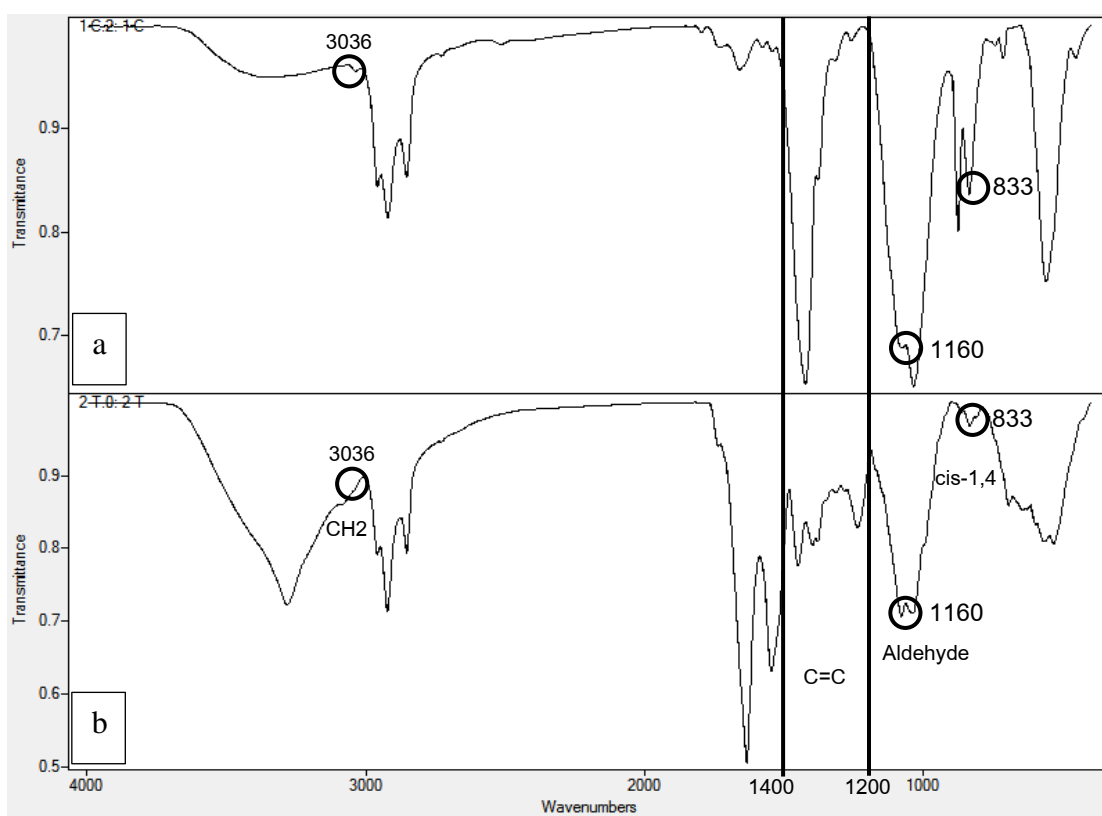


รูปที่ 19 ลักษณะของแผ่นยางหลังผ่านการย่อยสลายที่ถ่ายจากกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 5000 เท่า a) ชุดควบคุม b) ชุดทดสอบบ่มร่วมกับเชื้อ F5 ที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 30 วัน

#### 8.ทดสอบการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันหลังจากกระบวนการย่อยโดยวิธี FTIR ของเชื้อสายพันธุ์ F5

จากการนำแผ่นยางมือยางที่ผ่านการบ่มร่วมกับเชื้อ F5 ไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง FTIR เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันพบว่าการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ โดยเทียบกับชุดทดสอบดังนี้ มีการลดลงของพีคที่ 1200-1400 ต่อเซนติเมตร ในชุดทดสอบเมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยเป็นตัวบ่งชี้ว่าการแตกหักของพันธะคู่ระหว่างคาร์บอน หมู่เมทิล และพันธะเอสเทอร์ เกิดหมู่คาร์บอนิลขึ้นเป็นผลผลิตของการย่อยสลาย การเปลี่ยนแปลงพีคที่ 3036 ต่อเซนติเมตรที่หายไปหลังผ่านการย่อยสลายในชุดทดสอบ แสดงถึงการยึดของพันธะใน  $\text{CH}_2$  และการเปลี่ยนของพีค 835 ต่อเซนติเมตร ไปเป็นพีคที่ 833 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงพันธะ cis-1,4 ที่มีการลดลงหลังการบ่มร่วมกับเชื้อ F5 และการเปลี่ยนแปลงของพีคที่ 1160 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงการเกิดแอลดีไฮด์ในชั้นตัวอย่างทดสอบ (รูปที่ 20) โดยในการทดลองของ Berekaa และคณะ (Berekaa *et al.*, 2000) ในการวิเคราะห์ชิ้นส่วนยางมือยางที่ผ่านการบ่มร่วมกับเชื้อ *Gordonia* sp. ด้วยวิธี FTIR พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันคือ การลดลงของพันธะคู่ใน cis-1,4 และการเกิดขึ้น

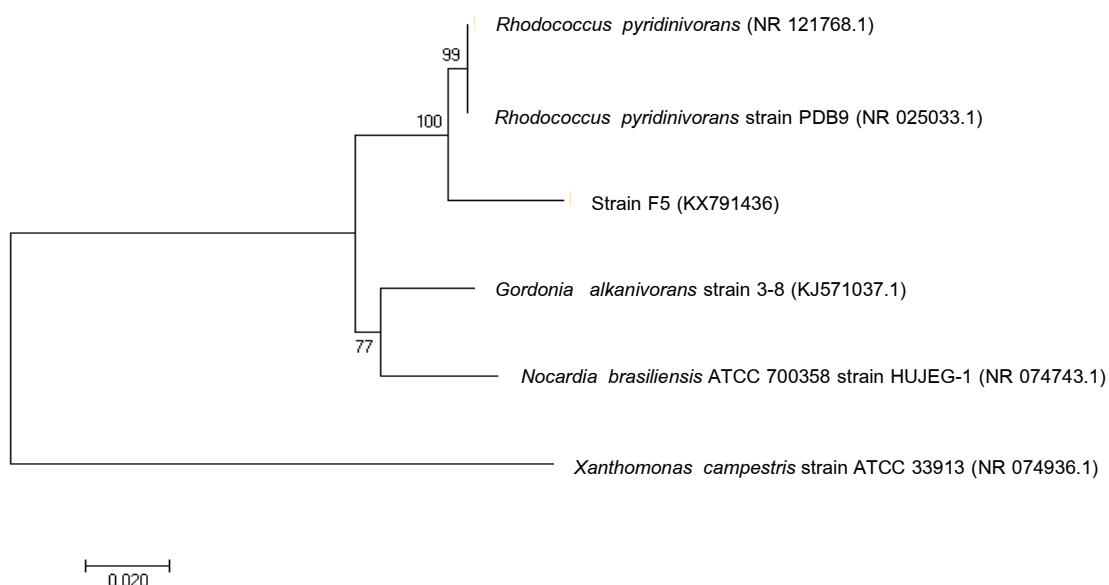
ของคีโตน และแอลดีไฮด์ นอกจากนี้ในการศึกษาโดย Linos และคณะ (Linos *et al.*, 2000) ที่ศึกษาการย่อยสลายถุงมือยางที่ปนร่วมกับเชื้อ *Norcardia* sp. 835A โดยวิธี FTIR แสดงให้เห็นถึงการลดลงของพันธะคู่ในโครงสร้าง และการเกิดขึ้นของหมู่แอลดีไฮด์เช่นเดียวกัน ซึ่งทั้งสองอย่างเป็นตัวยืนยันถึงการย่อยสลายทางธรรมชาติที่เกิดขึ้นโดยเชื้อ F5



รูปที่ 20 FTIR สเปกตรัมของชั้นถุงมือยาง a) ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ b) ชุดถุงมือยางที่ผ่านการปนร่วมกับเชื้อ F5 ที่ 30 องศาเซลเซียส 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน

### 9. บ่งชี้ชนิดของเชื้อ F5 โดยวิธีการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

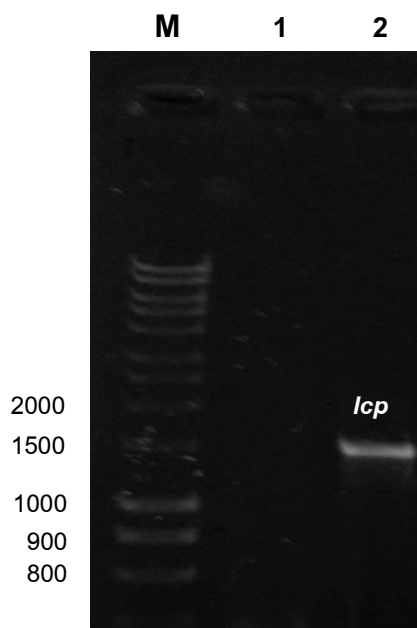
จากการนำเชื้อ F5 มาทำการบ่งชี้ชนิดของเชื้อโดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ขนาด 1470 เบส โดยใช้ 16S rRNA gene primer (8F, 1492R) พบว่าเชื้อ F5 เป็นเชื้อสายพันธุ์ *Rhodococcus* sp. ซึ่งมีลำดับยีน 16S rRNA ใกล้เคียงกับ เชื้อ *Rhodococcus pyridinivorans* 99% (accession number KX791436) (รูปที่ 21) ซึ่งมีรายงานการศึกษาเชื้อ *Rhodococcus rhodochrous* โดย Watcharakul และคณะ (Watcharakul *et al.*, 2016) พบว่าเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายทางธรรมชาติได้



รูปที่ 21 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA ของเชื้อไอโซเลท F5 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้ออื่น ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล NCBI แผนภาพแสดงความสัมพันธ์สร้างโดยวิธี neighbor-joining จากโปรแกรม MEGA ตัวเลขแสดงบ่งชี้ (% bootstrap) มาจากการคำนวณ 1000 ซ้ำ

#### 10. ตรวจหายีน *lcp* ของเชื้อที่ตัดแยกได้ที่มีความสามารถในการย่อยสลายยางโดยวิธี PCR

ในเชื้อแกรมบวกที่มีความสามารถในการย่อยสลายยางธรรมชาติ นั้น มีรายงานว่ามีการพบยีน *lcp* ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Lcp (latex clearing protein) ที่มีหน้าที่ในการย่อยสลายยางธรรมชาติ (Chengalroyen and Dabbs, 2013) ซึ่งเชื้อ F5 ที่ตัดแยกได้นั้นเป็นเชื้อแกรมบวก จึงนำมาทดสอบหายีน *lcp* พบว่าจากการนำเชื้อ F5 มาทำการหายีน *lcp* โดยวิธี PCR ออกแบบ primer จากเชื้อ *Rhodococcus* sp. ซึ่งพบว่าเชื้อ F5 มีลำดับกรดอะมิโนของยีน *lcp* (รูปที่ 22) ใกล้เคียงกับ ลำดับกรดอะมิโนของยีน *lcp* ของ เชื้อ *Rhodococcus pyridinivorans* 99% นอกจากนี้ มีการพบยีน *lcp* ในเชื้อ *Rhodococcus rhodochrous* (Watcharakul et al., 2016) และ *Streptomyces* sp. strain K30 (Rose et al., 2005) ซึ่งเป็นเชื้อแกรมบวกเช่นเดียวกัน และการที่เชื้อ F5 มียีน *lcp* ซึ่งให้เห็นถึงความสามารถในการย่อยสลายยางมียาง แต่คงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อศึกษาความเหมือนหรือแตกต่างกับยีน *lcp* ของเชื้อชนิดอื่นๆ



รูปที่ 22 การปรากฏของยีน *lcp* ใน *Rhodococcus pyridinivorans* F5 ที่แยกได้

Lane M : 100 bp DNA Ladder

Lane 1 : *Enterobacter* sp. (Negative control)

Lane 2 : *Rhodococcus pyridinivorans* F5

#### ข้อเสนอแนะ

1. การแยกเชื้อย่อยสลายอย่างธรรมชาติโดยการแยกมาเป็นกลุ่มเชื้อก่อน แล้วแยกเป็นเชื้อเดี่ยวจะได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า
2. ควรศึกษา FTIR ของเชื้อกลุ่มเทียบกับเชื้อเดี่ยว เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างที่เกิดขึ้น ซึ่งอาจจะทำให้ทำนายได้ว่าเชื้อแต่ละตัวมีบทบาทสำคัญอย่างไรในกระบวนการย่อยสลาย
3. ควรศึกษาความเป็นปฏิกิริยาของเชื้อกลุ่มแต่ละตัว

## สรุปผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายยางธรรมชาติจากตัวอย่างดิน 80 ตัวอย่าง และเชื้อกลุ่มที่คัดแยกโดยนายปราชญ์ปริญญา จันวดี ได้เชื้อที่สามารถเจริญบนอาหาร MSM+NR agar 422 ไอโซเลท และพบว่ามีเพียง 130 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญได้ บนอาหาร MSM latex overlay agar โดยเชื้อที่มีขนาดวงใสใหญ่ที่สุดคือ เชื้อ KB 37 ที่ 12.5 มิลลิเมตร

2. เชื้อ F5 ที่แยกจากเชื้อกลุ่มที่คัดแยกโดยนายปราชญ์ปริญญา จันวดี มีความสามารถในการย่อยสลายสูงสุดที่ 9.36 % ในเวลา 30 วัน โดยลักษณะของแผ่นยางจะเปื่อย บางลง และมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อหลังการบ่มร่วมกับถุงมือยาง และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) แสดงถึงการเกาะติดของเชื้อและการย่อยสลายจนเกิดเป็นหลุมบนแผ่นยาง และเห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันของแผ่นยางจากการทดสอบด้วยวิธี FTIR รวมถึงปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในการย่อยสลายยางธรรมชาติ 4.89 % ใน 30 วัน

3. การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ F5 พบว่าเป็นเชื้อ *Rhodococcus pyridinivorans* และตรวจพบยีน *lcp* ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Latex clearing protein (Lcp) ที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายยางธรรมชาติ

4. การทดสอบการย่อยสลายโดยใช้กลุ่มแบคทีเรียเทียบกับเชื้อเดี่ยว F5 พบว่ากลุ่มเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายสูงกว่า 5 % (F1 F2 F5 F6 F7) มีความสามารถในการย่อยสลายสูงที่สุด ที่ 18.82% ใน 30 วัน มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นและมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 14.67 % ใน 30 วัน ซึ่งมากกว่าเชื้อ *Rhodococcus pyridinivorans* F5

5. กลุ่มเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายสูงกว่า 5 % (F1 F2 F5 F6 F7) เป็นกลุ่มที่มีความสามารถในการย่อยสลายสูงที่สุดเหมาะจะนำไปใช้ในการย่อยสลายขยะจากผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติ

### บรรณานุกรม

- ปราชญ์ปริญญา จันทดี. 2556. การศึกษาการย่อยสลายถุงมือยางโดยเชื้อจุลินทรีย์. โครงการทางจุลชีววิทยา, สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- Arenskötter, M., Baumeister, D., Berekaa, M.M., Pötter, G., Kroppenstedt, R.M., Linos, A. and Steinbüchel, A. 2001. Taxonomic characterization of two rubber degrading bacteria belonging to the species *Gordonia polyisoprenivorans* and analysis of hyper variable regions of 16S rDNA sequences. FEMS Microbiology Letters. 205(2): 277-282
- Berekaa, M. M., Linos, A., Reichelt, R., Keller, U. and Steinbüchel, A. 2000. Effect of pretreatment of rubber material on its biodegradability by various rubber degrading bacteria. FEMS Microbiology Letters. 184(2): 199-206
- Berekaa, M. M. 2006. Colonization and microbial degradation of polyisoprene rubber by nocardioform actinomycete *Nocardia* sp. strain-MBR. Biotechnology. 5(3): 234-239.
- Bode, H. B., A. Zeeck, Plückhahn, K., and Jendrossek, D. 2000. Physiological and chemical investigations into microbial degradation of synthetic poly(cis-1,4-isoprene). Applied and Environmental Microbiology. 66: 3680-3685.
- Bode, HB., Kerkhoff, K., and Jendrossek, D. 2001. Bacterial degradation of natural and synthetic rubber. Biomacromolecules 2:295–303.
- Braaz, R., Fischer, P., and Jendrossek, D. 2004. Novel type of heme-dependent oxygenase catalyzes oxidative cleavage of rubber (poly-cis-1,4-isoprene). Applied and Environmental Microbiology. 70(12): 7388-7395.
- Chengalroyen, M.D. and Dabbs, E.R. 2013. The biodegradation of latex rubber: a minireview. Journal of Polymers and the Environment. 21(3): 874–880
- Cherian, E. and Jayachandran, K. 2009. Microbial degradation of natural rubber latex by a novel species of *Bacillus* sp. SBS25 isolated from soil. International Journal of Environmental Research. 3: 599-604.
- Dieter, J. and Simone, R. 2003. Sequence analysis of a gene product synthesized by *Xanthomonas* sp. during growth on natural rubber latex. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters. 224: 61-65
- Fatta, D., Papadopoulos, A., Loizidou, M. 1999. A study on the landfill leachate and its impact on the groundwater quality of the greater area. Environmental Geochemistry and Health. 21:175–190.



- Gallert, C. 2000. Degradation of latex and of natural rubber by *streptomyces* strain La 7. *Systematic and Applied Microbiology*. 23(3): 433–441.
- Heisey, R.M. and Papadatos, S., 1995. Isolation of microorganisms able to metabolize purified natural rubber. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(8): 3092-3097.
- Hamsch, N., Schmitt, G. and Jendrossek, D. 2010. Development of a homologous expression system for rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp. *Journal of Applied Microbiology*. 109(3): 1067-1075.
- Ibrahim, E. M. A., Arenskotter, M., Luftmann, H., and Steinbüchel, A. 2006. Identification of poly(cis-1,4-isoprene) degradation intermediates during growth of moderately thermophilic actinomycetes on rubber and cloning of a functional lcp homologue from *Nocardia farcinica* strain E1. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(5): 3375-3382.
- Imai, S., Ichikawa, K., Muramatsu, Y., Kasai, D., Masai, E. and Fukuda, M. 2011. Isolation and characterization of *Streptomyces*, *Actinoplanes*, and *Methylibium* strains that are involved in degradation of natural rubber and synthetic poly(cis-1,4-isoprene). *Enzyme and Microbial Technology*. 49(6-7): 526–531
- IRSG. 2016. Statistical summary of world rubber situation. Rubber statistical bulletin. International rubber study group.  
<http://www.rubberstudy.com/statistics.aspx> (accessed June 30, 2016)
- Jendrossek, D., Tomasi, G. and Kroppenstedt, R.M. 1997a. Bacterial degradation of natural rubber: A privilege of actinomycetes?. *FEMS Microbiology Letter*. 150: 179-188.
- Jendrossek, D., Tomasi, G. and Schlegel, H.G. 1997b. Mikrobieller abbau vonkautschuk. *Vandenhoeck & Ruprecht in Gottingen*. 9.
- Jendrossek, D. and Reinhardt, S. 2003. Sequence analysis of a gene product synthesized by *Xanthomonas* sp. during growth on natural rubber latex. *FEMS Microbiology Letters*. 224: 61-65
- John, W. Rowe. 2012. Natural Products of Woody Plants Chemicals Extraneous to the Lignocellulosic Cell Wall. *Springer Science & Business Media* 10: 1038-1039.
- Kim, J.K. and Park, J.W. 1999. The biological and chemical desulphurization of crumb rubber for rubber compounding. *Journal of Applied Polymer Science*. 72: 1543-1549
- Lenz, R. 1993. *Advances in polymer Series*. Springer-Vierlanger. 107: 1-40.

- Linos, A. and Steinbuchel, A. 1999. Microbial degradation of natural and synthetic rubbers by novel bacteria belonging to the genus *Gordona*. *Kautsch Gummi Kunstst.* 51: 498-499.
- Linos, A., Rudolf, R., Keller, U. and Steinbüchel, A. 2000a. A gram negative bacterium, identified as *Pseudomonas aeruginosa* AL98, is a potent degrader of natural rubber and synthetic cis-1,4-polyisoprene. *FEMS Microbiology Letters.* 182: 155-161
- Linos, A. Berekaa, M.M., Reichelt, R., Keller U., Schmitt, J., Flemming H.C., Kroppenstedt, R.M. and Steinbüchel, A., 2000b. Biodegradation of cis-1,4- polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed surface analysis. *Applied and Environmental Microbiology.* 66(4): 1639-1645
- Linos, A., Berekaa, M. M., Steinbüchel, A., Kim, K. K., Spröer, C. and Kroppenstedt, R. M. 2002. *Gordonia westfalica* sp. nov., a novel rubber-degrading actinomycete. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 52: 1133-1139.
- Nayanashree, G. and Thippeswamy, B. 2015. Natural rubber degradation by laccase and manganese peroxidase enzymes of *Penicillium chrysogenum*. *International Journal of Environmental Science and Technology* 12:2665–2672.
- Robert, W. L. 2005. Biodegradable polymers. *Advances in Polymer Science.* 107: 1-40
- Rose, K. and Steinbuchel, A. 2005. Biodegradation of natural rubber and related compounds: recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology.* 71: 2803-2812.
- Roy, R.V., Das, M., Banerjee, R. and Bhowmick, A.K. 2006. Comparative studies on crosslinked and uncrosslinked natural rubber biodegradation by *Pseudomonas* sp. *Bioresource Technology.* 97: 2485-2488
- Shah, A., Hasan, F., Mutiullah, Z. and Hameed, A. 2010. Degradation of polyisoprene rubber by newly isolated *Bacillus* sp. af-666 from soil. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 48(1): 37–42.
- Tsuchii, A. and Takeda, K. 1990. Rubber degrading enzyme from bacterial culture. *Applied and Environmental Microbiology.* 56(1): 269-274.
- Tsuchii, A., Suzuki, T. and Takeda, K. 1985. Microbial degradation of natural rubber vulcanisates. *Applied and Environmental Microbiology.* 50: 965-970.

- Tsuchii, A. and Tokiwa, Y. 1999. Colonization and disintegration of tire rubber by a colonial mutant of *Nocardia*. *Journal of BioScience and Bioengineering*. 87(4): 542-544
- Tsuchii, A. and Tokiwa, Y. 2001. Microbial degradation of tyre rubber particles. *Biotechnology Letters*. 23: 963.
- Watcharakul, S., Röther, W., Birke, J., Umsakul, K., Hodgson, B. and Jendrossek, D. 2016. Biochemical and spectroscopic characterization of purified Latex Clearing Protein (Lcp) from newly isolated rubber degrading *Rhodococcus rhodochrous* strain RPK1 reveals novel properties of Lcp. *BioMed Central Microbiology*. 16: 92
- Yikmis, M., Arenskötter, M., Rose, K., Lange, N., Wernsmann, H., Wiefel, L. and Steinbüchel, A. 2008. Secretion and transcriptional regulation of the latex-clearing protein, Lcp, by the rubber-degrading bacterium *Streptomyces* sp. strain K30. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(17): 5373-5382.
- Yikmis M. and Steinbüchel A. 2012. Historical and recent achievements in the field of microbial degradation of natural and synthetic rubber. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(13): 4543–4551

ภาคผนวก



SEPTEMBER 29-30  
**IBSC 2014**  
The International Bioscience Conference  
PHUKET THAILAND

The International  
Bioscience Conference and  
the 5<sup>th</sup> Joint International  
PSU-UNS Bioscience  
Conference 2014

*ACHIEVING SUSTAINABILITY  
THROUGH INTEGRATED SCIENCES*

**29-30 September 2014**  
PHUKET GRACELAND RESORT & SPA, Phuket, Thailand



## **Microbial degradation of natural rubbers**

**Chairat Nawong\***, Kamontam Umsakul

*Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai district, Songkhla province, 90112.*

*\*Corresponding author: charanara@gmail.com*

### **Abstract**

The increasing production of natural rubber compounds has led to major challenges in waste management. The degradation of natural rubber is normally extremely slow. We have investigated the degradation of rubber latex gloves in a mineral salt medium (MSM) by a consortium, a mixed culture of selected bacteria and a pure culture using weight loss, scanning electron microscopy (SEM) and viable cell counts. Weight losses of the latex gloves of 9-18% and an increase in viable cell counts after incubation occurred with the consortium, the mixed culture and even the pure culture so this indicated that degradation of the polymer had occurred. Degradation was also confirmed by observing the growth of bacteria on the surface of the gloves and the formation of aldehyde or keto groups using (SEM) and shiff's reagent, respectively.

**Keywords:** biodegradation, natural rubber

# Int'l Conference Proceedings

4th International Conference on Image Processing, Production and Computer Science (ICIPCS'16)  
International Conference on Substantial Environmental Engineering and Renewable Energy (SEERE-2016)  
International Conference on Innovations in Civil and Structural Engineering (ICICSE'16)  
International Conference on "Modern Trends in Engineering and Technology" (MTET-16)  
3rd International Conference on Civil, Biological and Environmental Engineering (CBEE-2016)  
&  
International Conference on Research & Innovation in Food, Agriculture and Biological Sciences (RIFABS-16)



Dec. 12-13, 2016 Phuket (Thailand)

Editors:

Prof. HASSINI Nouredine  
Prof. Dr. Valentina Mihaela Pomazan

ISBN : 978-93-84468-85-9

ORGANISED BY :





# Comparative Studies on Rubber Biodegradation by Mixed Culture and Pure Culture Isolated From the Soil Samples

Chairat Nawong, Natthawan Sermwittayawong, and Kamontam Umsakul

**Abstract**— An increasing production of natural rubber (NR) compounds has led to major challenges in waste management. The degradation of NR is normally extremely slow. In this study, the degradation of rubber latex gloves in a mineral salt medium (MSM) using a mixed culture of the selected bacteria and a pure culture was investigated by monitoring weight loss, scanning electron microscopy (SEM) and viable cell counts. About 18% weight loss of the rubber gloves were detected after incubated with the mixed culture and the pure culture. The increased viable cell counts over incubation time indicated that cells used rubber gloves as a carbon source leading to the degradation of the polymer. The degradation of NR gloves was also determined by observing the growth of NR-degrading bacteria on the glove surface using SEM.

**Keywords**— Biodegradation, natural rubber, latex glove.

## I. INTRODUCTION

Natural rubber is a polymer that is produced from several plant species. The main composition of natural rubber latex is poly-1, 4 isoprene that consists of isoprene as a monomer. In nature, poly isoprene can be divided into two groups, poly-cis isoprene and poly tran isoprene. Natural rubber is mainly produced from the *Hevea brasiliensis*. However, not only *Hevea brasiliensis* but also many plants can produce latex [16]. In addition, they are an alternative rubber such as *Ficus elastica*, *Ficus nitida* and *Euphorbia pulcherrima* [9]. The latex from the *Hevea brasiliensis* contains a polymer of cis-1, 4-polyisoprene units. Up to 90% of the dry weight of the latex is cis-1, 4-polyisoprene and less than 10% is non-rubber constituents such as protein, and carbohydrates [17].

Global natural rubber production increased to 12.2 million metric tons in 2013, a rise of 79.4 % from 6.8 million metric tons in 2000 [18]. These polymers can be used in thousands of ways i.e. in the fabrics, mining, power generation, agriculture, transportation, paper industries, insulation of cables, wires, and various equipments, in addition, it is the major component in rubber tires [16]. However, billions of discarded tires are currently stockpiled around the world and these are increasing exponentially and causing important environmental problems.

At present, much rubber waste is eliminated by either burned or used as landfills, but this process can cause serious pollution [6].

Biodegradation is the degrading process by microorganisms. Roles of microbes in degradation process are releasing of an extracellular enzyme to cleave polymer chain into small molecules and these products are absorbed into the cell for use as carbon and energy source. Final process, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O and other metabolic products are released and they can be used for photosynthesis by the plants. Therefore, the biodegradation is an alternative way to degrade the rubber waste and could overcome these environmental problems [2], [3].

However, microbial degradation of polyisoprene rubber is a very slow process that is taking months or even years. Microbial degradation of poly (cis-1, 4-isoprene) rubber is currently being intensively investigated. So far rubber-degrading organisms have been classified into two different groups; the first group is rubber-degrading organisms producing clear zones on natural rubber latex agar plates. Members of these groups generally belong to the mycelium-forming actinomycetes such as *Actinoplanes*, *Streptomyces*, and *Micromonospora*. In contrast, the second group of rubber-degrading organisms is the organisms which cannot produce any clear zone, therefore they require the direct contact with the rubber substrates. The example of this group is nocardioform, actinomycetes i.e. *Gordonia*, *Mycobacterium* and *Nocardia*. *Xanthomonas* sp. strain 35Y is the only known gram-negative rubber degrading bacterium which does not belong to the actinomycetes [13].

In this study, the degradation of rubber latex gloves in a mineral salt medium (MSM) by a mixed culture of the selected bacteria and a pure culture was compared. The weight loss, scanning electron microscopy (SEM) of the rubber glove substrate and viable cell counts were determined.

## II. METHODS

### A. Isolation of rubber degrading microorganisms from soil samples by enrichment culture technique

The rubber-degrading microorganisms were isolated from soil samples collected from various contaminated rubber sites in Songkhla, Thailand. Approximate ten grams of the soils mixed with pieces of natural rubber (NR) glove were added to



100 mL of sterile mineral salt medium (MSM) in each Erlenmeyer flask and were then incubated at 30°C at 150 rpm. Mineral salt medium is composed of (g/L): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> 1.0, MgSO<sub>4</sub> 0.2, CaCl<sub>2</sub> 0.02, and Fe(II)NH<sub>4</sub> 0.0012. The medium was adjusted to an initial pH of 7.0 before sterilization. After a month of incubation, 0.5 mL of each culture broth was transferred into a new flask containing fresh MSM with NR glove and further incubated under the same conditions as described above for another month to encourage the rubber degrading bacteria to grow. The developed culture broth was then assigned as the natural soil consortia and stored in 15% glycerol at -80°C. The rubber degrading bacteria were also screened and isolated from the culture broth using NR latex agar plates.

### B. Screening of NR-degrading bacteria

The degradation of the rubber gloves by the selected strains was investigated through plate assay. Latex overlay plates were prepared by spreading 5 mL of solubilized latex concentrate as a thin film on MSM agar plates and then left it to evaporate until dried. All tested strains that grew well on the latex overlay agar were picked for further study.

### C. Rubber glove degradation of the individual tested bacteria and the mixed culture

Latex glove pieces were washed once with distilled water prior to drying in an oven at 60 °C until obtained a constant weight before being used as a carbon source. Two experiments were designed to test the microbial activities for degrading rubber gloves. The first experiment was testing each individual isolated strain and the second experiment was the randomly mixed cultures of isolated strain. Each culture was incubated in MSM supplemented with dried latex glove piece (0.6% w/v) as a sole carbon source and were incubated at 30 °C, 150 rpm for 4 weeks. This experiment was performed in triplicate. The inoculated MSM without any latex glove pieces and the non-inoculated MSM with latex glove pieces were used as control experiments. Viable cell counts of each culture were determined throughout the incubation time. Weight loss of incubated latex gloves at the end of incubation period was measured and calculated in gram unit.

### D. Scanning Electron Microscope (SEM)

The surface of the latex glove film pieces from the inoculated samples and the control were analyzed by scanning electron microscopy (SEM) to investigate the surface changes after the degradation. The samples were washed with sterilized distilled water and then were mounted on aluminum stubs. Gold coating was carried out in vacuum by evaporation to make the samples conducting. SEM images of the tested and control samples were compared.

## III. RESULT AND DISCUSSION

### A. Isolation of rubber-degrading microorganisms from soil samples

Ten bacterial isolates, F1 to F10, obtained from soil samples were capable of growing on MSM agar containing NR. Isolate F5 and F7 were identified as Gram-positive and others were

Gram-negative bacteria. All ten isolates did not produce clearing zone around the colonies indicated that they could degrade the latex concentrate by a production of an intracellular enzyme [16].

### B. Weight loss of degraded latex glove

The weight loss of latex glove pieces after one month incubation was around 0.1-18%. The highest weight loss of 18.82% received from the mixed cultures (Fig. 1) and 9.36% from the pure culture of isolate F5 compared to only 0.2% of the control samples (see Table I). Moreover, NR glove had been broken down into little pieces (Fig. 2) indicated that the bacteria had the ability to degrade natural rubber

TABLE I  
WEIGHT LOSS IN LATEX GLOVE AND VIABLE CELL COUNTS OF PURE CULTURE

Isolate	Weight loss of latex glove	Viable cell counts (CFU/mL)	
		Day 0	Day 30
F1	5.06%	1.22×10 <sup>8</sup>	3.20×10 <sup>8</sup>
F2	5.12%	1.15×10 <sup>8</sup>	4.30×10 <sup>8</sup>
F3	0.11%	1.21×10 <sup>8</sup>	3.00×10 <sup>8</sup>
F4	0.32%	1.20×10 <sup>8</sup>	1.40×10 <sup>8</sup>
F5	9.36%	1.21×10 <sup>8</sup>	1.50×10 <sup>9</sup>
F6	5.23%	1.20×10 <sup>8</sup>	4.50×10 <sup>8</sup>
F7	6.93%	1.26×10 <sup>8</sup>	3.40×10 <sup>8</sup>
F8	0.41%	1.23×10 <sup>8</sup>	2.40×10 <sup>8</sup>
F9	0.81%	1.25×10 <sup>8</sup>	1.31×10 <sup>8</sup>
F10	0.47%	1.19×10 <sup>8</sup>	2.10×10 <sup>8</sup>
Control	0.20%	0.00	0.00

### C. Viable cell counts

Mixed culture grew well with the highest viable cell count of 6.20×10<sup>9</sup> CFU/mL (see Table II). The best growth related to the highest weight loss of latex glove pieces among selected strains. The increased viable cell counts through the end of the incubation time indicated that the bacteria had the ability to degrade natural rubber and used rubber gloves as the sole carbon source.

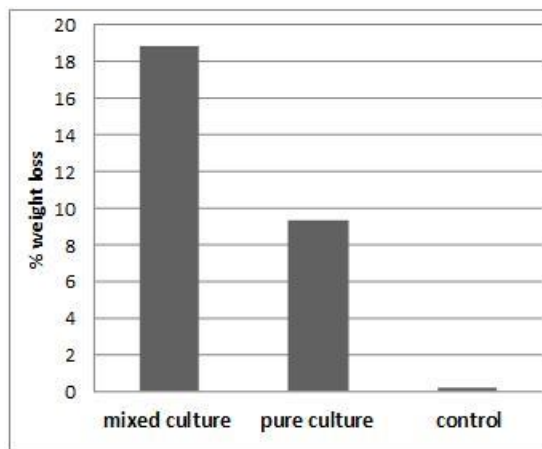


Fig. 1 Percentage weight loss of rubber gloves after incubation with various inocula.

TABLE II  
WEIGHT LOSS IN LATEX GLOVE AND VIABLE CELL COUNTS OF VARIOUS INOCULA

Isolate	Weight loss of latex glove	Viable cell counts (CFU/mL)	
		Day 0	Day 30
mixed culture	18.82%	$1.15 \times 10^8$	$6.20 \times 10^9$
pure culture (F5)	9.36%	$1.21 \times 10^8$	$1.50 \times 10^9$
pure culture (other strains)	>5.00%	$1.20 \times 10^8$	$>1.00 \times 10^9$
control	0.20%	0.00	0.00

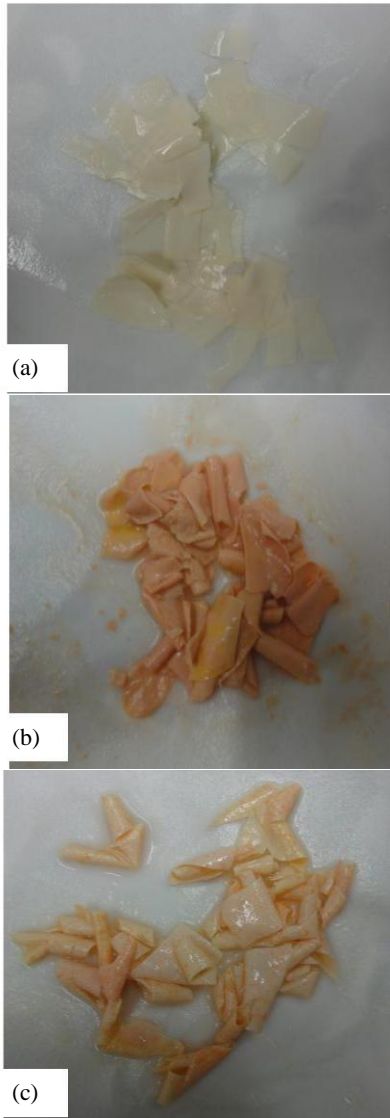


Fig. 2 Image of the latex glove pieces after incubation for 30 days: (a) control, (b) mixed culture and (c) pure culture (isolate F5).

D. SEM

Fig. 3a shows the surface of the control piece of NR glove (uninoculated). They were smooth without any pits whereas the glove pieces that were exposed to mixed culture for 30 days showed a rough appearance i.e. there were numerous irregular cracks, surface erosions, and pits in various sizes on

the surface of polymer films (Fig. 3b). This is a similar situation to some other species e.g. *Bacillus* sp. AF-666 [13] and *Streptomyces* strain La 7 [7]. Interestingly, isolate F5 colonized not only on the surface but also deeply inside the polymer holes (Fig. 3c). The colonization and growth on the NR glove surface were confirmed by SEM and showed that there were numerous small holes on latex glove degraded by F5 than in mixed culture.

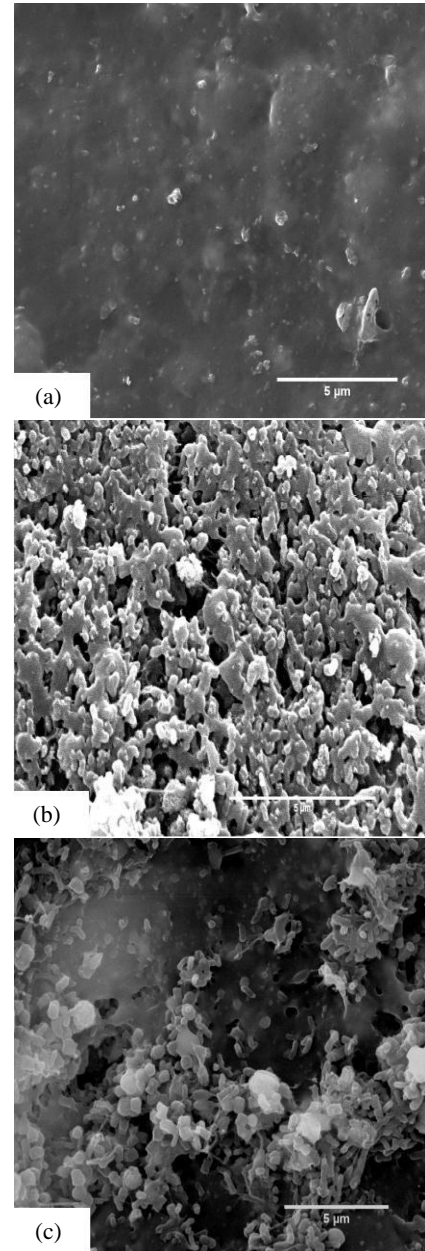


Fig. 3 Scanning electron micrographs of the latex glove pieces after incubation for 30 days: (a) control, (b) mixed culture and (c) pure culture (isolate F5).

IV. CONCLUSIONS

In the present study, a mixed culture and pure culture were able to degrade poly (cis-1, 4-isoprene) which is the monomer compositions of rubber. The weight loss of rubber, the increase in viable cell counts and the appearance changes and the microbial growth of the NR glove surface after one-month

incubation confirmed the biodegradation of natural rubber by these isolates. Mixed culture of the selected strains reached the highest rubber degradation with the percentage of weight loss of 18.82 % after one-month incubation (Fig. 1). This mixed culture has shown the potential to be used efficiently for rubber degradation.

#### ACKNOWLEDGMENT

This work is financially supported by Research assistant scholarships, Faculty of Science, Prince of Songkla University the Faculty of Science.

#### REFERENCES

- [1] M. M. Berekaa, "Colonization and microbial degradation of polyisoprene rubber by nocardioform actinomycete *Nocardia* sp. strain-MBR," *Biotechnology*, vol. 5, 2006, pp. 234-239.
- [2] H. B. Bode, A. Zeeck, K. Plückhahn, and D. Jendrossek, "Physiological and chemical investigations into microbial degradation of synthetic poly (cis-1, 4-isoprene)," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, 2000, pp.3680-3685.
- [3] HB. Bode, K. Kerkhoff, and D. Jendrossek, "Bacterial degradation of natural and synthetic rubber," *Biomacromolecules*, vol. 2, 2001, pp. 295-303.
- [4] R. Braaz , P. Fischer, and D. Jendrossek, "Novel type of heme-dependent oxygenase catalyzes oxidative cleavage of rubber (poly-cis-1,4-isoprene)," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, 2004, pp.7388-7395.
- [5] E. Cherian, and K. Jayachandran, "Microbial degradation of natural rubber latex by a novel species of *Bacillus* sp. SBS25 isolated from soil," *International Journal of Environmental Research*, vol. 3, 2009, pp. 599-604.
- [6] D. Fatta, A. Papadopoulos, and M. Loizidou, "A study on the landfill leachate and its impact on the groundwater quality of the greater area," *Environmental Geochemistry and Health*, vol. 21, 1999, pp.175-190.
- [7] C. Gallert, "Degradation of Latex and of Natural Rubber by *Streptomyces* Strain La 7," *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 23, 2000, pp. 433-441.
- [8] E. M. A. Ibrahim, M. Arenskotter, H. Luftmann, and A. Steinbüchel, "Identification of poly (cis-1, 4-isoprene) degradation intermediates during growth of moderately thermophilic actinomycetes on rubber and cloning of a functional lcp homologue from *Nocardia farcinica* strain E1," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, 2006, pp. 3375-3382.
- [9] A. M. Ismail, H. N. Mohamed, and M. A. Shoreit, "Degradation of *Ficus elastica* rubber latex by *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus* and *Myceliophthora thermophila*," *International biodeterioration & biodegradation*, vol. 78, 2013, pp. 82-88.
- [10] A. Linos, and A. Steinbuchel, "Microbial degradation of natural and synthetic rubbers by novel bacteria belonging to the genus *Gordona*," *Kautschuk Gummi Kunststoffe*, vol. 51, 1998, pp. 498-499.
- [11] A. Linos, M. M. Berekaa, A. Steinbüchel, K. K.Kim, C. Spröer, and R. M. Kroppenstedt, "*Gordonia westfalica* sp. nov., a novel rubber-degrading actinomycete," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 52, 2002, pp. 1133-1139.
- [12] K. Rose, and A. Steinbuchel, "Biodegradation of natural rubber and related compounds: recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, 2005, pp. 2803-2812.
- [13] A. Shah, F. Hasan, Z. S. Mutiullah, and A. Hameed, "Degradation of polyisoprene rubber by newly isolated *Bacillus* sp.AF-666 from soil," *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 48, 2012, pp. 37-42.
- [14] A. Tsuchii, T. Suzuki, and K. Takeda, "Microbial degradation of natural rubber vulcanisates," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 50, 1985, pp. 965-970.
- [15] A. Tsuchii, and K. Takeda, "Rubber degrading enzyme from bacterial culture," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 56, 1990, pp. 269-274.

- [16] M. Yikmis, and A. Steinbüchel, "Historical and Recent Achievements in the Field of Microbial Degradation of Natural and Synthetic Rubber," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 78, 2012, pp. 4543-4551.
- [17] G. Nayanashree, and B. Thippeswamy, "Natural rubber degradation by laccase and manganese peroxidase enzymes of *Penicillium chrysogenum*," *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 12, 2015, pp. 2665-2672
- [18] International Rubber Study Group, "STATISTICAL SUMMARY OF WORLD RUBBER SITUATION," *Rubber Statistical Bulletin*, 2016.

About Author (s):



Isolation of rubber degradation bacteria from soils for complete natural rubber degradation

## Rubber gloves biodegradation by a consortium, mixed culture and pure culture isolated from the soil samples

Chairat Nawong, Natthawan Sermwittayawong, Kamontam Umsakul\*

Prince of Songkla University, Faculty of Science, Department of Microbiology, Hat-Yai, Songkhla, Thailand

\*Corresponding author: Kamontam.u@psu.ac.th

**Abstract:** An increasing production of natural rubber (NR) products has led to major challenges in waste management. The degradation of NR is normally extremely slow. In this study, the degradation of rubber latex gloves in a mineral salt medium (MSM) using a bacterial consortium, a mixed culture of the selected bacteria and a pure culture were studied. About 9-18% weight loss of the rubber gloves were detected after incubated with the consortium, the mixed culture, and the pure culture. The increased viable cell counts over incubation time indicated that cells used rubber gloves as sole carbon source leading to the degradation of the polymer. The growth behavior of NR-degrading bacteria on the latex gloves surface was investigated using the scanning electron microscope (SEM). *Rhodococcus pyridinivorans* strain F5 gave the highest weight loss of rubber gloves and posses latex clearing protein encoded by *lcp* gene. The mixed culture of the selected strains showed the potential in degrading rubber within 30 days and is considered to be used efficiently for rubber product degradation. This is the first report to demonstrate a strong ability to degrade rubber by *Rhodococcus pyridinivorans*.

**Keywords:** Degradation, Natural rubber, Rubber glove, *Rhodococcus*.

### 1. Introduction

Natural Rubber (NR) is a biopolymer that is produced from some plant species. The key composition of natural rubber latex is poly-1,4 isoprene that consists of isoprene as a monomer. In nature, polyisoprene can be divided into two groups e.g. poly-cis isoprene and poly-tran isoprene. The major source of natural rubber was produced from the *Hevea brasiliensis*. However, not only *Hevea brasiliensis* but also many plants can produce latex (Yikmis and Steinbüchel 2012) such as *Ficus elastica*, *Ficus nitida* and *Euphorbia pulcherrima* (Ismail et al. 2013). The latex from the *Hevea brasiliensis* contains a polymer of cis-1, 4-polyisoprene units and up to 90% of the dry weight of the latex is cis-1,4-polyisoprene and less than 10% is non-rubber constituents such as protein and carbohydrates (Nayanashree and Thippeswamy 2014).

Global natural rubber production increased 79.4 % from 6.8 million metric tons in 2000 to 12.2 million metric tons in 2013 (IRSG 2016). Natural Rubber is utilized daily in numerous applications such as



1  
2  
3  
4 agriculture, transportation, and various farming equipment, in addition, it is the major component in rubber  
5 tires (Yikmis and Steinbüchel 2012). However, billions of discarded tires are currently stockpiled around  
6 the world and these are increasing exponentially and causing important environmental problems. At  
7 present, most rubber waste is eliminated by either burned or used as landfills but this process can cause  
8 serious pollution (Fatta et al. 1999). Biodegradation of rubber wastes has been much of interest. Roles of  
9 microbes in degradation process are releasing of extracellular enzymes to cleave polymer chains into  
10 small molecules and these products are absorbed into the cell for use as carbon and energy source. Final  
11 process, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O and other metabolic products are released and they can be used by other living  
12 organisms. Therefore, the biodegradation is an alternative way to degrade the rubber waste and could  
13 overcome the environmental problems (Bode et al. 2001).  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21

22 However, microbial degradation of polyisoprene rubber is a very slow process that taking months or  
23 even years. Microbial degradation of poly (cis-1,4-isoprene) rubber is currently being intensively  
24 investigated. Rubber-degrading organisms can be classified into two different groups; the first group is  
25 rubber-degrading organisms producing clear zones on natural rubber latex agar plates. Members of these  
26 groups generally belong to the mycelium-forming actinomycetes such as *Actinoplanes*, *Streptomyces*,  
27 *Micromonospora* (Chengalroyen and Dabbs 2013) and *Rhodococcus* (Watcharakul et al. 2016). In  
28 contrast, the second group of rubber-degrading organisms is the microorganisms, which do not produce  
29 any clear zone, therefore, they require the direct contact with the rubber substrates. The examples of this  
30 group are nocardioform, actinomycetes i.e. *Gordonia* sp., *Mycobacterium* sp. and *Nocardia* sp.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37

38 Lcp (latex-clearing protein) encoded by *lcp* gene has been considered a key enzyme in NR degradation  
39 by clearing-zone-forming gram-positive bacteria. While RoxA (rubber oxygenase) is a key enzyme in NR  
40 degradation found in the gram-negative bacterium *Xanthomonas* sp. strain 35Y. RoxA controlled by *roxA*  
41 gene is an extracellular protein secreted by this strain during growth on NR. Purified RoxA degraded  
42 poly(cis-1,4-isoprene) by oxidative cleavage at the double bonds, yielding 12-oxo-4,8-dimethyltrideca-4,8-  
43 diene-1-al as the main cleavage product; other minor cleavage products differed only in the number of  
44 repetitive isoprene units. In vitro experiments also revealed occurrence of two 18 O atoms in the reduced  
45 degradation product 12-hydroxy-4, 8-dimethyltrideca-4, 8-diene-1-ol, thereby disclosing a dioxygenase  
46 mechanism (Rose and Steinbuchel 2005).  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53

54 Most efforts on the study of rubber biodegradation have been directed to using single bacterial strain  
55 which still gave poor results. It was hypothesized that the synergistic interaction among various  
56 microorganisms should accelerate the rubber degradation process. So in this study, the degradation of  
57 rubber latex gloves in a mineral salt medium (MSM) by a consortium, a mixed culture of the selected  
58 bacteria and a pure culture were compared. The weight loss, scanning electron microscopy (SEM) of the  
59 rubber glove substrate and viable cell counts were determined.  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## 2. Materials and methods

### 2.1 Isolation of rubber degrading microorganisms from soil samples by enrichment culture technique

The rubber-degrading microorganisms were isolated from soil samples collected from rubber contaminated in Songkhla province, Thailand. Soil samples were mixed with pieces of natural rubber (NR) glove incubated in sterile mineral salt medium (MSM) and incubated at 30°C at 150 rpm. Mineral salt medium is composed of (g/L): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> 1.0, MgSO<sub>4</sub> 0.2, CaCl<sub>2</sub> 0.02, and Fe (III) NH<sub>4</sub> 0.0012. The medium was adjusted to an initial pH of 7.0 before sterilization (Jendrossek et al. 1997). After a month of incubation, 0.5 mL of those culture broths was transferred into MSM with latex and further incubated under the same conditions as described above for another month to encourage the growth of rubber degrading bacteria. The developed culture broth was then assigned as the natural soil consortium. The rubber degrading bacteria were also screened and isolated from the culture broth using NR latex agar plates.

### 2.2 Screening of NR-degrading bacteria

The degradation of the rubber gloves by the selected strains was investigated through plate assay. Latex overlay plates were prepared by spreading 5 mL of solubilized latex concentrate as a thin film on MSM agar plates and then left to dry. All tested strains that grew well on the latex overlay agar were picked for further study.

### 2.3 Rubber glove degradation investigation of the individual tested bacteria, the mixed culture, and the natural soil consortium

Latex glove pieces were washed once with distilled water prior to drying in an oven at 60 °C until obtained a constant weight before being used as a carbon source. Three experiments were designed to test the microbial activities for degrading rubber gloves. The first experiment was testing each individual isolated strain. The second experiment was testing the mixed cultures of high effective isolated strains (mixed cultures) and the third experiment was the mixed cultures of all isolated strain (consortium). Each culture was incubated in MSM supplemented with dried latex glove pieces (0.6% w/v) as a sole carbon source at 30°C, 150 rpm for 4 weeks. Each experiment was performed in triplicate. The inoculated MSM without any latex glove pieces and the uninoculated MSM with latex glove pieces were used as biotic and abiotic control experiments respectively. Viable cell counts of each culture were determined throughout the incubation time. Weight loss of incubated latex gloves at the end of incubation period was measured and calculated in gram unit.

## 2.4 Scanning Electron Microscope (SEM)

The surfaces of the NR glove film pieces were analyzed by scanning electron microscopy (SEM) to investigate the appearance changes after the degradation. The samples were washed with sterilized distilled water and then were fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.3). After washing with PBS and dehydrated in graded ethanol (50, 60, 70, 80, and 90% and absolute ethanol). The dehydrated samples were subjected to critical point drying with liquid CO<sub>2</sub> according to the standard procedure. The samples were then mounted on aluminum specimen stubs by using electrically conducting carbon (PLANO, Wetzlar, Germany) and coated with a gold layer. Micrographs were recorded using scanning electron microscope (SEM-JSM5800LV; JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

## 2.5 Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy

The FTIR (VERTEX 70; Bruker, Germany) analysis was done to detect the degradation of NR latex glove on the basis of changes in the functional groups. The correlation of absorption bands in the spectrum of an unknown compound with the known absorption frequencies was analyzed. The polymer pieces were mixed with KBr and made into a pellet, which was fixed to the FTIR sample plate. Spectra were taken in triplicate at 400 to 4000 wavenumbers cm<sup>-1</sup> for each sample.

## 2.6 16S RNA gene analysis

The genomic DNA of isolate F5 was extracted using Power Soil DNA isolation kit (MO BIO Laboratories, a QIAGEN Company, USA). Molecular genetic identification was performed by amplification of 16S rRNA gene with bacterial universal primers 27F (5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) and 1492R (5-CGGCTACCTTGTACGACTT-3) (Weisburg et al. 1991). PCR reaction was carried out in a final volume of 50 µL containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, each dNTP at a concentration of 0.2 mM, 1.25 IU of Taq polymerase, each primer at a concentration of 0.2 mM and 1 µL of the DNA template. PCR was performed according to the following program: 2 min denaturation at 95 °C, followed by 30 cycles of 1 min denaturation at 95 °C; 1 min annealing at 55 °C; 1 min extension at 72 °C; and a final extension step of 10 min at 72 °C. The PCR product was then analyzed and purified using an agarose Gel DNA Purification Kit (E.Z.N.A. Gel Extraction Kit; Omegabiotek, USA). The 16S rDNA gene was sequenced. A phylogenetic tree was constructed by means of MEGA version 7.0 using a neighbor-joining algorithm, and the Jukes-Cantor distance estimation method with bootstrap analyses for 1,000 replicates was performed.

## 2.7 Amplification of the *lcp* gene

The coding region of *lcp* from *Rhodococcus pyridinivorans* was amplified by using primers *lcp*F (5-ATAATCCGAGCAGGCGCGA-3) and *lcp*R (5-TCGGGGATCTCGATGCTGA-3). PCR reaction contained 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, each dNTP at a concentration of 0.2 mM, 1.25 IU of Taq polymerase, each primer at a concentration of 0.2 mM, and 1 µL of the DNA template. PCR was

1  
2  
3  
4 performed according to the following program: 2 min denaturation at 95 °C, followed by 30 cycles of 1 min  
5 denaturation at 95 °C; 1 min annealing at 55 °C; 1 min extension at 72 °C; and a final extension step of 10  
6 min at 72 °C.  
7  
8

### 9 10 **2.8 CO<sub>2</sub> emission test**

11 Biodegradation of latex glove was also determined by CO<sub>2</sub> emission test. The released CO<sub>2</sub> during the  
12 cultivation of cells in MSM in which contained rubber gloves as the sole carbon source was trapped in a  
13 solution of 1N Ba(OH)<sub>2</sub> and was quantified by titrating of the remaining Ba(OH)<sub>2</sub> with 0.1 N HCl (Shah et  
14 al. 2012).  
15  
16  
17  
18

## 19 20 **3. RESULTS AND DISCUSSION**

### 21 22 **3.1 Isolation of rubber-degrading microorganisms from soil samples**

23 In order to enrich the growth of rubber degrading bacteria, soil sample was incubated with rubber glove  
24 pieces for a month. The developed culture which was assigned as a natural soil consortium was grown on  
25 NR agar to isolate rubber degrading bacteria. Ten bacterial isolates, F1 to F10, obtained from a natural  
26 soil consortium were capable of growing on MSM agar containing NR as the sole carbon source. Isolate  
27 F5 was identified as Gram-positive and others were Gram-negative bacteria. All ten isolates did not  
28 produce clearing zone around the colonies indicated that they could degrade the latex concentrate by a  
29 direct contact with the rubber substrate (Yikmis and Steinbüchel 2012). The degradation of rubber gloves  
30 were tested using each isolated strain compared with the mixed cultures of top 5 effective strains (F1, F2,  
31 F5, F6, F7) and the consortium of all 10 bacterial isolates (F1-F10).  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

### 41 **3.2 Weight loss of latex glove pieces**

42 The weight loss of latex glove pieces after one-month incubation was around 0.5-9% when using  
43 individual culture of F1-F10 (data not shown) and among 10 isolates, F5 gave the best weight loss of  
44 9.36%. The highest weight loss of 18.82% was obtained from the mixed culture of top 5 effective strains  
45 (F1, F2, F5, F6, F7), while 18.38% was obtained from the consortium (F1-F10) compared to only 0.2% of  
46 the abiotic control (Fig.1). It was clearly shown that using mixed culture and the consortium gave the better  
47 degradation results. This result confirmed the existence of synergetic interaction between microorganisms.  
48 However, the decrease of rubber degrading property of the consortium after successive transfer in NR  
49 medium was observed. The instability of degrading ability might due to the loss of any bacterial population  
50 in the consortium during transfer. The rubber degrading property could be re-stored again after a long  
51 incubation time which allows microorganisms to adapt.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59

### 60 **3.3 Viable cell counts**

61 The increased viable cell counts through the end of the incubation time in all tested bacterial group  
62  
63  
64  
65



1  
2  
3  
4 indicated that the bacteria had the ability to degrade natural rubber and used rubber gloves as the sole  
5 carbon source (Fig.2). The bacterial population of the mixed cultures showed the biggest increase from  
6  $1.2 \times 10^8$  CFU/mL to  $6.2 \times 10^9$  CFU/mL after 1 month incubation with rubber gloves, the bacterial population  
7 in the consortium had increased from  $1.2 \times 10^8$  CFU/mL to  $4.0 \times 10^9$  CFU/mL while pure culture showed the  
8 smallest bacterial population increase from  $1.2 \times 10^8$  CFU/mL to  $1.5 \times 10^9$  CFU/mL. Production of biomass  
9 from rubber also implies the presence of oxidative degradation of rubber polymer.  
10  
11  
12  
13  
14

### 15 3.4 SEM

16  
17 The biodegradation of rubber gloves was also observed by SEM. After 4 weeks of incubation with the  
18 consortium, mixed culture and F5, the surfaces of rubber gloves were covered with bacterial colonization  
19 compared to control (Fig. 3a-d). Significant changes were irregular crashes, surface erosions, and holes in  
20 variable sizes on the surface of latex glove pieces. Interestingly, isolate F5 (Fig. 3d) cells embedded and  
21 colonized into the rubber matrix. The adhesive growth attachment of consortium and mix culture on rubber  
22 surfaces can be detected as early as 7 days of incubation while when using single strain of F5, bacterial  
23 colonization occurred after 10 days of incubation. A direct contact via a biofilm and embedding of cells into  
24 rubber gloves may be a possible mechanism, as similar to a report of *Gordonia* and some other  
25 actinomycetes (Linos et al. 2000).  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

### 33 3.5 Fourier Transform Infrared Spectroscopy test

34  
35 FTIR analysis of the rubber glove pieces after incubated with F5 showed various spectra changes  
36 compared to the control (Fig. 4). In the transmittance area corresponding to the cis-1,4 double bonds in  
37 the polyisoprene chain, a relative decrease of the ( $=CH_2$ ) band at  $833\text{ cm}^{-1}$  was observed for the tested  
38 sample compared to that of the abiotic control. Peaks  $1423\text{ cm}^{-1}$  was decreased in latex glove pieces  
39 treated with isolate F-5 culture as compared to control, indicating the break of functional groups like C=C,  
40 methyl and ester bonds. Moreover an increase in the intensity of the peak at  $1634\text{ cm}^{-1}$  showed the  
41 presence of aldehydes (C=O) groups in the case of test pieces as compared to control. These indicated  
42 that F5 used latex gloves as a carbon source during cultivation. The decreased spectra of cis-1,4 double  
43 bonds, methyl and ester bonds in the polyisoprene chains and appearance of ketone and aldehyde groups  
44 indicated that an oxidative attack at the double bonds might be the first metabolic steps of the  
45 biodegradation process (Tsuchii et al. 1985, Rose and Steinbuchel 2005).  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53

### 54 3.6 Molecular identification using 16S rRNA gene sequence comparison

55  
56 The sequencing result of 1.470 kb nucleotides of 16S rRNA gene of strain F5 was aligned and  
57 compared with other bacteria available in the NCBI GeneBank. The phylogenetic analysis of the 16S  
58 rRNA sequence showed that the strain F5 belongs to genus *Rhodococcus* sp. having 99% similarities with  
59 *Rhodococcus pyridinivorans* and was submitted to GenBank under accession number KX791436 (Fig. 5).  
60 Genus *Rhodococcus* has been proved to be a promising option for the bioremediation of many xenobiotic  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 compounds (Larkin et al 2006; Ludmila et al. 2009; Kundu et al. 2016; Zsolt et al. 2017). This is the first  
5  
6 report to demonstrate an ability to degrade rubber by *Rhodococcus pyridinivorans*.

### 7 8 **3.7 Molecular identification and phylogenetic analysis using *lcp* gene sequence comparison**

9  
10 The PCR product of *lcp* gene was sequenced retrieving 1.293 kb nucleotides. The sequences were then  
11 aligned and compared to the database of the NCBI GeneBank. The phylogenetic analysis of the *lcp*  
12 sequences showed that 99% similarities with an *lcp* gene from *Rhodococcus pyridinivorans*. The presence  
13 of *lcp* gene confirmed the biodegradation process in this species. Further investigation is required to  
14 confirm the reaction mechanism of this enzyme.  
15  
16  
17

### 18 19 **3.8 CO<sub>2</sub> emission test**

20  
21 The CO<sub>2</sub> evolved from the biodegradation was measured to compare the ability to degrade rubber  
22 gloves of tested bacteria. The mixed culture released 14.67 % CO<sub>2</sub>, 9.78% from the consortium and 4.89%  
23 from the pure culture F5 (Fig.6). The highest CO<sub>2</sub> release was related to the highest weight loss of latex  
24 glove experiment and confirmed the best degradation occurred when the mixed culture was incubated with  
25 rubber gloves.  
26  
27  
28

## 29 30 **4. Conclusions**

31  
32 In the present study the consortium, mixed culture and pure culture were able to degrade rubber  
33 gloves in which significant changes can be detected within 30 days. Determination of the weight loss, the  
34 increase in viable cell counts, FTIR, CO<sub>2</sub> evolution test and the SEM has confirmed that the natural rubber  
35 degradation process occurred. *Rhodococcus pyridinivorans* strain F5 demonstrated the highest rubber  
36 degrading activity among all single strains used. The presence of *lcp* gene encode for latex degrading  
37 enzyme in *Rhodococcus pyridinivorans* F5 supports the essential function of *lcp* in poly(cis-1,4 isoprene)  
38 degradation. Mixed culture of the selected strains reached the highest rubber degradation after one-month  
39 incubation and showed the potential to be used as an efficiently for rubber degradation.  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

### 47 48 **Financial support**

49  
50 This Project was funded by Research assistant scholarships, Faculty of Science, Prince of Songkla  
51 University the Faculty of Science and also the Research grant from Prince of Songkla University.  
52  
53

### 54 55 **References**

56  
57 Berekaa MM (2006) Colonization and microbial degradation of polyisoprene rubber by nocardioform  
58 actinomycete *Nocardia* sp. strain-MBR. *Biotechnology* 5:234-239.

59  
60 doi: <http://dx.doi.org/10.3923/biotech.2006.234.239>  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 Bode HB, Zeeck A, Plückhahn K, Jendrossek D (2000) Physiological and chemical investigations into  
5 microbial degradation of synthetic poly (cis-1, 4-isoprene). Applied and Environmental Microbiology  
6 66:3680-3685.

7  
8  
9  
10 doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.9.3680-3685.2000>

11  
12 Bode HB, Kerkhoff K, Jendrossek D (2001) Bacterial degradation of natural and synthetic rubber.  
13 Biomacromolecules 2:295–303.

14  
15  
16  
17 doi: <http://dx.doi.org/10.1021/bm005638h>

18  
19 Braaz R, Fischer P, Jendrossek D (2004) Novel type of heme-dependent oxygenase catalyzes  
20 oxidative cleavage of rubber (poly-cis-1,4-isoprene). Applied and Environmental Microbiology 70:7388-  
21 7395.

22  
23  
24  
25 doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.12.7388-7395.2004>

26  
27  
28 Chengalroyen M, Dabbs E (2013) The biodegradation of latex rubber: a minireview. Journal of  
29 Polymers and the Environment 21(3):874–880.

30  
31  
32 Cherian E, Jayachandran K (2009) Microbial degradation of natural rubber latex by a novel species of  
33 *Bacillus* sp. SBS25 isolated from soil. International Journal of Environmental Research 3:599-604.

34  
35  
36 Fatta D, Papadopoulos A, Loizidou M (1999) A study on the landfill leachate and its impact on the  
37 groundwater quality of the greater area. Environmental Geochemistry and Health 21:175–190.

38  
39  
40  
41 doi: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006613530137>

42  
43 Gallert C (2000) Degradation of Latex and of Natural Rubber by *Streptomyces* Strain La 7. Systematic  
44 and Applied Microbiology 23:433–441.

45  
46  
47  
48 doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020\(00\)80075-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020(00)80075-2)

49  
50 Kundu D, Hazra C, Chaudhari A (2016) Enhanced degradation of 4-nitrotoluene by *Rhodococcus*  
51 *pyridinivorans* NT2: multivariate optimization of process parameters and evaluation of biokinetic  
52 parameters. Environmental Engineering Science. 33(9): 705-718.

53  
54  
55  
56 doi:10.1089/ees.2015.0523.

57  
58 Hesham A, Wang Z, Zhang Y, Zhang J, Lv W, Yang M (2006) Isolation and identification of a yeast  
59 strain capable of degrading four and five ring aromatic hydrocarbons. Annals of Microbiology 56:109–  
60 112.  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 doi: <http://dx.doi.org/10.1007/BF03174990>  
5

6  
7 Ibrahim EMA, Arenskotter M, Luftmann H, Steinbüchel A (2006) Identification of poly (cis-1, 4-  
8 isoprene) degradation intermediates during growth of moderately thermophilic actinomycetes on  
9 rubber and cloning of a functional lcp homologue from *Nocardia farcinica* strain E1. Applied and  
10 Environmental Microbiology 72:3375-3382.  
11  
12

13  
14 doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.5.3375-3382.2006>  
15

16  
17 Ismail AM, Mohamed HN, Shoreit M A (2013) Degradation of *Ficus elastica* rubber latex by *Aspergillus*  
18 *terreus*, *Aspergillus flavus*, and *Myceliophthora thermophile*. International Biodeterioration &  
19 Biodegradation 78:82-88.  
20  
21

22  
23 doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.12.009>  
24

25  
26 International Rubber Study Group, "STATISTICAL SUMMARY OF WORLD RUBBER SITUATION,"  
27 Rubber Statistical Bulletin, 2016.  
28

29  
30 Jendrossek D, Tomasi G, Kroppenstedt RM (1997) Bacterial degradation of natural rubber: A privilege  
31 of actinomycetes?. FEMS Microbiology Letter 150:179-188.  
32

33  
34 doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10368.x>  
35

36  
37 Larkin MJ, Kulakov LA, Allen CCR (2006) Biodegradation by members of the genus *Rhodococcus*:  
38 biochemistry, physiology, and genetic adaptation. Advances in Applied Microbiology. 59:1–29.  
39

40  
41 doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164\(06\)59001-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164(06)59001-X)  
42

43  
44 Ludmila Martínková, Bronislava Uhnáková, Miroslav Pátek, Jan Nešvera, Vladimír Křen (2009)  
45 Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. Environment International. 35(1):162-177.  
46

47  
48 doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2008.07.018>  
49

50  
51 Linos A, Steinbüchel A (1998) Microbial degradation of natural and synthetic rubbers by novel bacteria  
52 belonging to the genus *Gordona*. Kautschuk Gummi Kunststoffe 51:498-499.  
53

54  
55 Linos A, Berekaa MM, Steinbüchel A, Kim KK, Spröer C, Kroppenstedt RM (2002) *Gordonia westfalica*  
56 sp. nov., a novel rubber-degrading actinomycete. International Journal of Systematic and Evolutionary  
57 Microbiology 52:1133-1139.  
58

59  
60 doi: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-52-4-1133>  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 Nayanashree G, Thippeswamy B (2015) Natural rubber degradation by laccase and manganese  
5 peroxidase enzymes of *Penicillium chrysogenum*. International Journal of Environmental Science and  
6 Technology 12:2665–2672  
7  
8

9  
10 doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s13762-014-0636-6>  
11

12  
13 Rose K, Steinbüchel A (2005) Biodegradation of natural rubber and related compounds: recent  
14 insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms. Applied and Environmental  
15 Microbiology 71: 2803-2812.  
16

17  
18 doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.6.2803-2812.2005>  
19  
20

21  
22 Shah A, Hasan F, Mutiullah ZS, Hameed A (2012) Degradation of polyisoprene rubber by newly  
23 isolated *Bacillus* sp. AF-666 from the soil. Applied Biochemistry and Microbiology 48:37-42.  
24

25  
26 doi: <http://dx.doi.org/10.1134/S0003683812010140>  
27

28  
29 Rose K, Steinbüchel A (2005) Biodegradation of natural rubber and related compounds: recent  
30 insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms. Applied and Environmental  
31 Microbiology. 71(6):2803-12.  
32

33  
34 doi:10.1128/AEM.71.6.2803-2812.2005  
35

36  
37 Tsuchii A, Suzuki T, Takeda K (1985) Microbial degradation of natural rubber vulcanisates. Applied  
38 and Environmental Microbiology 50:965-970.  
39

40  
41 Tsuchii A, Takeda K (1990) Rubber degrading enzyme from bacterial culture. Applied and  
42 Environmental Microbiology 56:269-274.  
43

44  
45 Watcharakul S, Röther W, Birke J, Umsakul K, Hodgson B, Jendrossek D (2016) Biochemical and  
46 spectroscopic characterization of purified Latex Clearing Protein (Lcp) from newly isolated rubber  
47 degrading *Rhodococcus rhodochrous* strain RPK1 reveals novel properties of Lcp. BioMed Central  
48 Microbiology 16:92.  
49  
50

51  
52  
53 Weisburg G, Barns M, Pelletier A, Lane J (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic  
54 study. Journal of Bacteriology 173(2):697-703.  
55

56  
57 Yikmis M, Steinbüchel A (2012) Historical and recent achievements in the field of microbial  
58 degradation of natural and synthetic rubber. Applied and Environmental Microbiology 78:4543–4551.  
59

60  
61 doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00001-12>  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 Zsolt P, Eszter D, Anita L, Balázs K, József K, Endre N (2017) Biological degradation of aflatoxin B 1  
5 by a *Rhodococcus pyridinivorans* strain in by-product of bioethanol. Animal Feed Science and  
6 Technology. 224:104-114.  
7  
8

9  
10 doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.12.011>  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



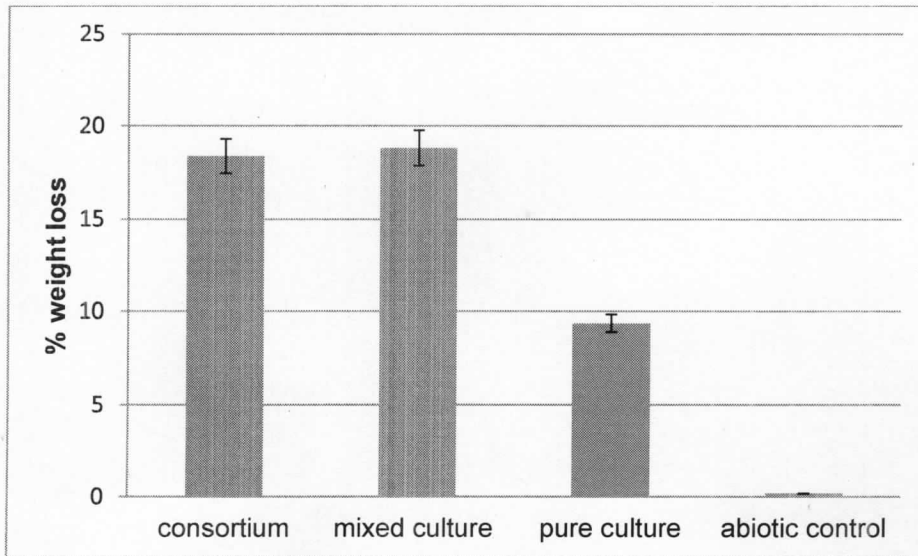


Fig. 1 Percentage of latex glove weight loss after incubation with the consortium, the mixed culture and the pure culture F5 at 30 °C for 30 days.

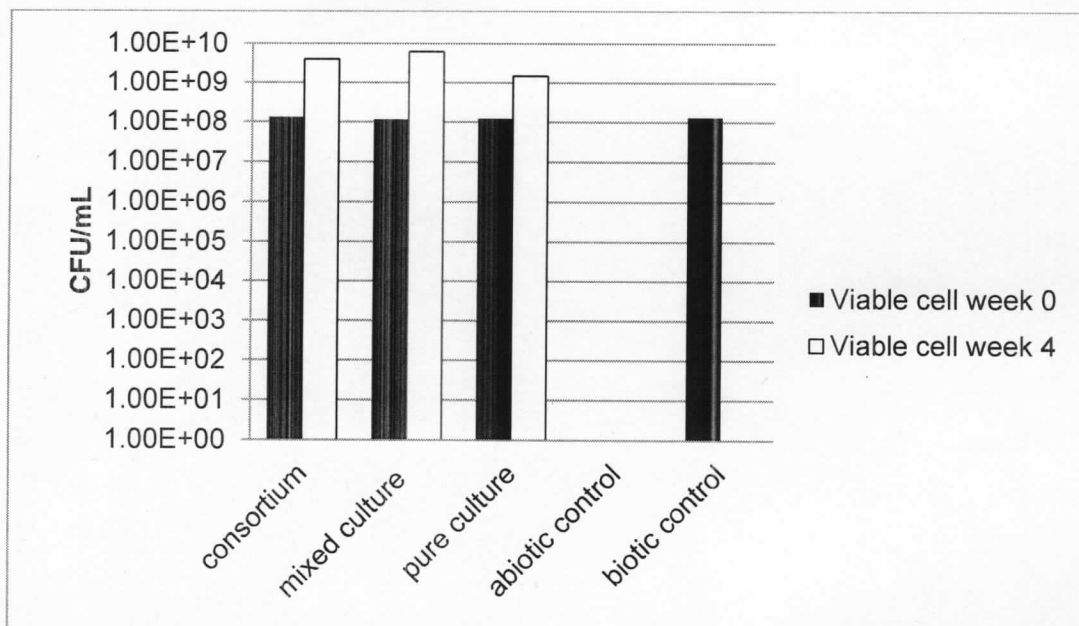
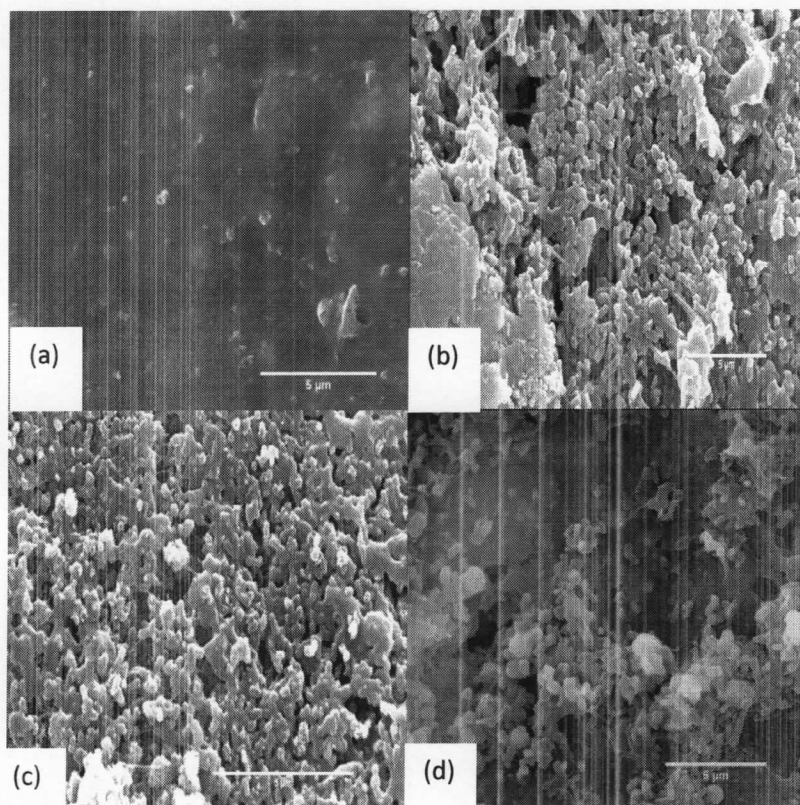
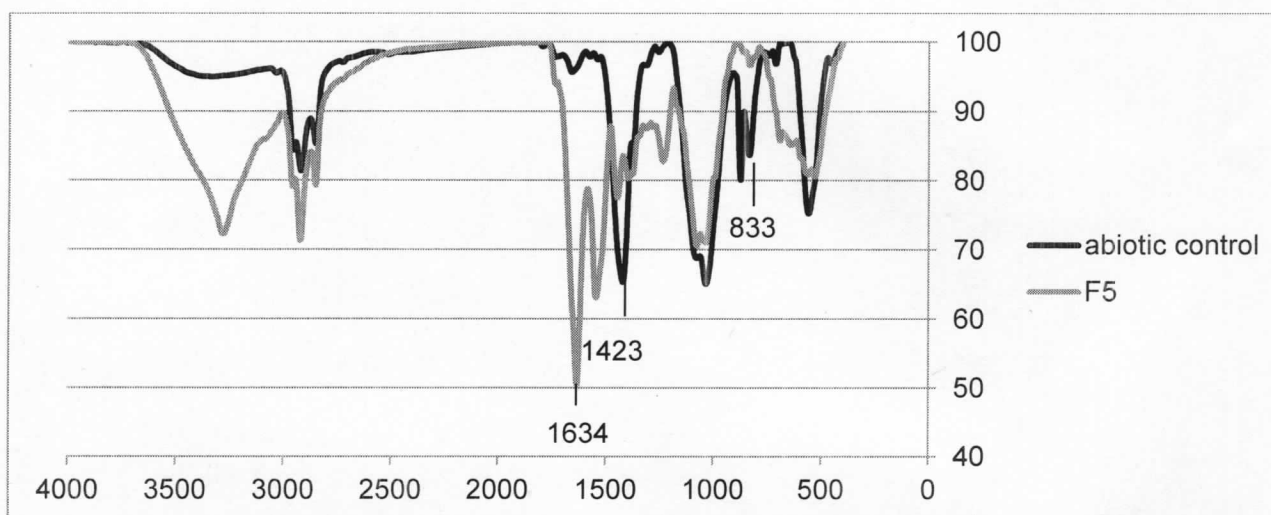


Fig. 2 Viable cell counts after incubation of the consortium, the mixed culture and the pure culture F5 with rubber gloves in MSM at 30 °C for 30 days.



**Fig.3. Scanning electron micrographs of the latex glove pieces after incubated with consortium (b) mixed culture (c) and pure culture, F5 (d) for 30 days at 30 °C compared to abiotic control (a).**



**Fig. 4. FTIR spectra of latex glove pieces after incubation with F5 in mineral salt medium for 1 month. Abiotic control (thick black line), Sample treated with F5 (grey line).**



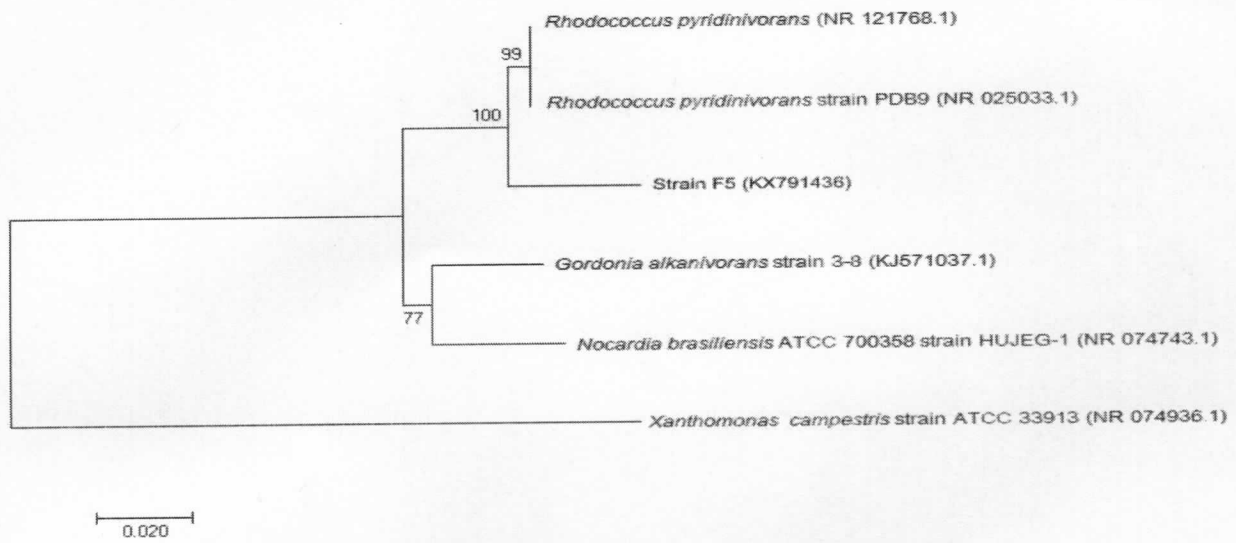


Fig. 5. Phylogenetic of strain F5 among the neighboring species. The phylogenetic tree was constructed by the method of neighbor joining, based on pairwise comparisons of 16S rRNA sequences with bootstrap analyses for 1,000 replicates.

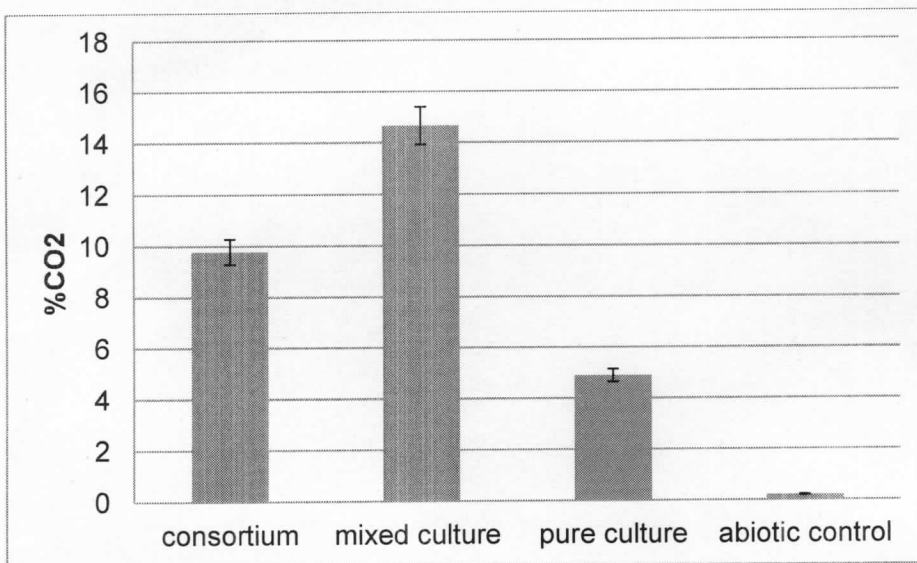


Fig. 6 CO<sub>2</sub> evolved during the incubation of the consortium, the mixed culture and the pure culture F5 with rubber gloves at 30 °C for 30 days.

### 1.อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM agar with latex

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	9.0	กรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.5	กรัม
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1.0	กรัม
$\text{MgSO}_4$	0.2	กรัม
$\text{CaCl}_2$	0.02	กรัม
$\text{Fe(III)NH}_4$	0.0012	กรัม
Natural rubber	6.0	มิลลิลิตร
Trace element	0.1	มิลลิลิตร
Agar	15.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ให้เข้ากันโดยเติมสารเคมีตามลำดับ โดยละลายสารเคมีทีละตัวแล้วเติม latex ลงไป แล้วนำไปละลายให้เข้ากัน นำเข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 2. วิธีคำนวณปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายถุงมือยาง

### 1. CO<sub>2</sub> หน่วยกรัม

$$\frac{(\text{ปริมาตร HCl หลังการบ่ม} - \text{ปริมาตร HCl ก่อนการบ่ม}) \text{ mL} \times 0.1 \text{ mole} \times 2}{1000 \text{ mL}} = X \text{ mole}$$

$$\text{กรัมของ CO}_2 = X \text{ mole} \times 44 \text{ g/mole} = 44X \text{ g}$$

### 2. หาเปอร์เซ็นต์ CO<sub>2</sub>

$$\text{ปริมาณคาร์บอนในตัวอย่าง} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่าง} \times 88.2}{100}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์คาร์บอนที่เกิดขึ้น} = \frac{100}{\text{ปริมาณคาร์บอนในตัวอย่าง}} \times \text{กรัมของ CO}_2$$

## 3. การบ่งชี้ชนิดของเชื้อโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16s rRNA

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

Cycling condition	Temperature (°C)	Time (minutes)	
Pre Denaturation	95	2	
Denaturation	95	1	} 30 cycles
Annealing	55	1	
Extension	72	1	
Final extension	72	10	

## Primer ที่ใช้

Primer Name	Amplicon size (bp)	Primer Sequence ( 5' to 3' )
<b>8F 1492R</b>	1484	F:AGAGTTTGATCCTGGCTCAG R:GGTACCTTGTTACGACTT
<b>Rodo41470</b>	1464	F:CAGGACGAACGCTGGCGGCG R:CGACTTCGTCCCAATCGCCG
<b>Rhodo591450</b>	1391	F:CAGCTTGCTGGGTGGATTAG R:GATCCCACCTTCGACGGCT
<b>16s1563FR</b>	1563	F:TGTCCTCCTCGAAGTCCAGA R:ACAGATGATGGTGCAGGTCG
<b>16s1451FR</b>	1451	F:AGAGTTTACCGTTCCGGTCC R:CGGATACGGCACAGAACTGA
<b>16sRho20</b>	1502	F:ACGGAGAGTTTGATCCTGGC R:AGAAAGGAGGTGATCCAGCC

## ลำดับเบสที่ได้

```
>GTGGCGATCTGGCGGCGTGCTTACCCATGCAAGTCGACGATGAAGCCCAGCTTGCTGGGT
GGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCC
TGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTCGGGATGCATGTCCTGGGGTGGAAAGTTT
TTCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGC
GACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCG
ACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGC
AAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGGTGCAGCGTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTTGTCCG
GTCGTCTGTGAAATCCCGCAGCTCAACTGCGGGCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTCGAGT
ACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACA
CCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAG
CGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTT
```

CCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCCAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCC  
 GCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGGCGGAGCATGTGGATT  
 AATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGTACCGGACGACTGCAGAGAT  
 GTGGTTTCCCTTGTGGCCGGTAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTCTGTGAG  
 ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCACGTGATGGT  
 GGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTC  
 ATCATGCCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGTTCGGTACAGAGGGCTGCGA  
 TACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTC  
 GACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTC  
 CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGG  
 CCTAACCCCTCGTGGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGAAGTCGTA  
 ACAAGGAGCCTTCCCGGGGT

#### 4.การตรวจหายีน *Icp* โดยวิธี PCR

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

Cycling condition	Temperature (°C)	Time (minutes)	
Pre Denaturation	95	2	
Denaturation	95	1	} 30 cycles
Annealing	55	1	
Extension	72	1	
Final extension	72	10	

## Primer ที่ใช้

Primer	Amplicon size (bp)	Primer Sequence (5' to 3')
<b>109FR-lcp</b>	415	F: GAGGCMGAYSMGSTVVTTCGC R: GTCTTSASGSMBGTBACGA
<b>LcpfSt143</b>	560	F: TCGGTGGCSGGYWCSGG R: AGRCTGTGCCAGGTGACCA
<b>lcpR23FR</b>	1109	F: ACGTTCTGAAAACCGGTGGC R: CGAACGTCCAGTAGGCATCC
<b>lcpR5FR</b>	1197	F: ATAATCCGAGCAGGCGCGA R: TCGGGGATCTCGATGCTGA

## ลำดับเบสที่ได้

>ATGCCGAGCAGTGACATTTACGATTCATCGTGACCCGAGCCACGGTGTGGTTCCATGTTCAGAGAAACTCCAGATGTTTCATTGCTACATCCACGAGTCGTATGGGAGTGACAGTATGGATAATCCGAGCAGGCGCGACGTTCTGAAAACCGGTGGCCTCCTCGGTGCACTGGGCGCGTTCGCGGTGGCGACACCGGCACAGGCCCGACCCTGGAGGTGGTCGCCCCGAGGATCGATACCGGGTACGGGGAGCGGTGCCGATCCGCGACAGGTATGGGACAACGAGGCCGACCCGCTCGTCGCCTCGTTGCTCGAGCGCGGCGACGTACCGAGGGTCAACGAGCTGCTGCGCACCTGGAAGAAGAACTCCCAGCCGCTGCCCGAAGGGCTTCCGAACGACCTGCGCGACTTCATGGAACAACGCCCCGGCAGCTTCCGACCTGGGCCGATCCGGCGAAACTCGAGACGGCCGTCCGCTTCAACGAGAAGCGCGGGCTGTACCTCGGTGTGCTGTACGGATTCTGTGAGCGGGATGATGAGCACGGTCATCCCGAAAGAGGCGCTGGCCGTCTACTACTCCAAGGGCGGCGCGAACATGAAGGCCGCATCTCGAAGACCGCAAATTGGGCTACGACATCGGTTCTCGCAATGCGTATCTGGACGACGGTGAAATGATCGTCACGTCCGTCAAGACCAGGCTCGTCCATGCCGCCGTGCGCCATCTGCTCCCGCAATCGTCGCACTGGTCCAACATGGCGCCCCGAGGATGTGCCGATCAGCCAGCACGACATGATGGTCACCTGGCACAGCCTGCCACCAGCGTGATGCGCACGTTGAAGGAGTGGAAGGTTCCGATCCCGGCTGCGGAGGCCGACGGATTCTGCACTCGTGGCAGGTCAGCGCGCACATGCTCGGTATCGAGGATCAGTACATCCCGGCCACCTGGGACGACGCCGAATCCCAAGCGCAGGAAGCGCTCGATCCGATCCTCGCGCCCACGCCCGAGGGTGTGAAGCTCGCCGATATGCTGCTCGACCTCGGTAAGGGTCTCGACTTCACGCTCCTGACCCGCCCCATCCTCGGG

GCGCTGACACGGTTCGCGCTCGGGCAGGAGATCGCCGACTGGCTCAACATTCCACGCGAA  
ACCCGTCTGGGGGCACACTGGTTCGACGTCCCCGTGGGGGCCCGTTTCATCCCGGGTACG  
CGAAAGGCCTGCTGGCCGCTTTCGCTGGGGCCCGGATGCTATCGGGGGACTTTTTTCGAAA  
AGCAAAACCTCCCCCCCCCAT

ลำดับกรดอะมิโนที่ได้

MDNPSRRDVLKTGGLLGALGAFVATPAQARPWRWSPAGSIPGTGSGADPRQVWDNEADPLV  
ASLLERGDVPRVNELLRTWKNSQPLPEGLPNDLRDFMEHARQLPSWADPAKLETAVRFNEKR  
GLYLGVLVYGFVSGMMSTVIPKEALAVYYSKGGANMKGRISK TAKLGYDIGSRNAYLDDGEMIVTS  
VKTRLVHAAVRHLLPQSSHWANMAPEDVPISQHDMMVTWHS LPTSVMRTLKEWKVPIAAEAD  
GFLHSWQVSAHMLGIEDQYIPATWDDAESQAQESLDPILAPTPEGVKLADMLLDLGKGLDFTLLT  
RPILGALTRFALGNEIADWLNIPREPVWGTLLDVAWGPFIAVREGLLPLPLAPDAYWTFDELLRQF  
VLLYMAELRPISIEIPEFNPNYP

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นายชัยรัฐ นะวงศ์	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5510220141	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2554

## ทุนการศึกษา

ทุนผู้ช่วยวิจัยคณะวิทยาศาสตร์

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ประจำปีงบประมาณ 2556

## การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

**Nawong C.**, Umsakul K. and Sermwittayawong N., 2016. Comparative studies on rubber biodegradation by mixed culture and pure culture isolated from the soil Samples. International Conference on Research & Innovation in Food, Agriculture and Biological Sciences (RIFABS-16), at Phuket, Thailand.

**Nawong C.** and Umsakul K., 2014. Microbial degradation of natural rubbers. The International Bioscience Conference 2014 and the 5th Joint International PSU-UNS Bioscience Conference 2014 (IBSC 2014), at Phuket, Thailand.

**Nawong C.**, Umsakul K. and Sermwittayawong N., 2016. Rubber gloves biodegradation by a consortium, mixed culture and pure culture isolated from the soil samples International Journal of Environmental Research (IJER). (submitted)