รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาและพัฒนาจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการปรับปรุงคุณภาพเงินในระดับนาโน
The Study and Development of Certain Microorganisms with High Capability in Nanosilver Particle Biosynthesis

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ
ดร.ไพศาล การถาง
สาขาวิชาวิทยาสาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ผู้ร่วมวิจัย
ดร. ดวงฤทัย นิคมรัฐ
ดร. สุพรรณ ยอดยิ่งยง

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร ปีงบประมาณ 2556
กันยายน 2556

หัวข้อวิจัย การศึกษาและพัฒนาจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการปรับปรุงคุณภาพเงินในระดับนาโน
ชื่อผู้วิจัย ดร.ไพศาล การถาง ดร. ดวงฤทัย นิคมรัฐ และ ดร. สุพรรณ ยอดยิ่งยง
หน่วยงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร
ปีงบประมาณ 2556

บทคัดย่อ

รายงานสรุปผลการวิจัยฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อนำเสนอบทสรุปของ การดำเนินงานของโครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาและพัฒนาจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการปรับปรุงคุณภาพเงินในระดับนาโน โดยคณะผู้วิจัย ได้ดำเนินการตลอดช่วงระยะเวลาสิบสองเดือนที่ผ่านมา โดยมุ่งประเด็นไปที่การคัดแยกเชื้อ จากของเสียในกระบวนการผลิตและการขึ้นรูป ในอุตสาหกรรมอัญมณีและเครื่องประดับ จากผลการศึกษาพบว่า เชื้อที่มีศักยภาพในการสกัดโลหะเงินเบื้องต้นที่คัดแยกได้ พบว่ามีเชื้อในกลุ่ม Pseudomonas เท่านั้นที่สามารถแสดงประสิทธิภาพในการสังเคราะห์โลหะเงิน โดยเฉพาะในรูปของสารละลายเงิน $AgNO_3$ ได้ ในขณะที่เชื้อในกลุ่ม Bacillus ไม่สามารถแสดงการสังเคราะห์ได้อย่างชัดเจน ผลการศึกษาตามโครงการวิจัยนี้สามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานในการสร้างและพัฒนาระบบ การสกัดโลหะเงินและ/หรือการปรับปรุงคุณภาพ โลหะเงินด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยเฉพาะทางด้านจุลินทรีย์ได้ในอนาคต

คำสำคัญ: เงินระดับนาโน จุลินทรีย์ การสังเคราะห์เชิงชีวภาพ

Title The Study and Development of Certain Microorganisms with High Capability in Nanosilver Particle Biosynthesis
Researcher Dr. Paisan Kanthang, Dr. Duongruitai Nicomrat and Dr. Supan Yodyingyong
Year 2013

Abstract

This research report is manipulated that summarized the moment of research project in the subject of “The Study and Development of Certain Microorganisms with High Capability in Nanosilver Particle Biosynthesis”. This project had been take time in 12 mounts. We focused on the isolation of microorganism that from manufacturing process and forming in gems and jewelry industry. Results showed that the initial silver refinery microorganism performed only in terms of Pseudomonas genus especially in $AgNO_3$ solution. In contrast, Bacillus genus was not clearly effective silver refinery. These results could be the basis information for establish and develop system for silver refinery and/or silver quality improvement with biological process especially microorganisms in future.

Keywords: Silver nanoparticles, Microorganisms, Biosynthesis

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี คณะผู้วิจัยต้องขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัย ทำให้งานวิจัยสามารถเกิดขึ้นและดำเนินจนเสร็จสมบรูณ์

ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่เอื้อเฟื้อ สถานที่และเครื่องมือในการทำงานวิจัย

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	8
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล	11
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	17
บรรณานุกรม	19

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างการสร้างโลหะขนาดนาโน จากจุลินทรีย์ต่างๆ (ที่มา Kaushik N. et. al., 2010 (22)) 6

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 4.1 ภาพของเชื้อที่ได้จากการคัดแยกให้บริสุทธิ์ **(A, B)** แสดงรูปของเชื้อที่คัดแยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย x100 **(A', B')** แสดงผลการทดสอบ Gram-stain 11

รูปที่ 4.2 แสดงตัวอย่างผลของการสังเคราะห์โลหะเงินเบื้องต้นของเชื้อตามรูปที่4.1B **(A)** แสดง โลหะเงินที่ได้จากการสังเคราะห์ในรูปของสารละลาย **(B)** ภาพของโลหะเงินที่ได้จากการสังเคราะห์ **(C)** แสดงผลการวิเคราะห์รูปแบบการเลี้ยวเบนของอิเล็กตรอนของโลหะเงินใน(B) 12

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

อนุภาคเงินนาโนมีประโยชน์อย่างกว้างขวางในการพัฒนาเทคโนโลยีใหม่โดยเฉพาะในวงการอิเล็กทรอนิกส์ วิทยาศาสตร์การแพทย์และวิทยาศาสตร์เชิงวัสดุ ทั้งนี้ เนื่องจากคุณสมบัติด้านการนำไฟฟ้าที่ดีและมีเสถียรภาพทางเคมี จึงทำให้เกิดการประยุกต์ใช้อนุภาคเงินนาโนในหลากหลายรูปแบบตัวอย่าง เช่น สารเคลือบผิวสำหรับการดูดกลืนพลังงานแสงอาทิตย์ ตัวเร่งปฏิกิริยาในปฏิกิริยาทางเคมี ฉลากชีวภาพ และ ยาปฏิชีวนะ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันการสังเคราะห์เพื่อนำเข้าสู่การใช้ประโยชน์ ดังที่กล่าวมาส่วนใหญ่จะใช้ การสังเคราะห์เชิงเคมีและฟิสิกส์ ซึ่งมักจะเกิดความเป็นพิษและผลกระทบทางสิ่งแวดล้อม ดังนั้น การพัฒนากระบวนการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนในเชิงชีวภาพ จึงเกิดขึ้น ด้วยคุณสมบัติที่ ค่อนข้างปลอดความเป็นพิษและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมทั้งในแง่ของกระบวนการผลิตและการนำไปใช้

ปัจจุบันการศึกษาวิจัยด้านการสังเคราะห์โมเลกุลสารในระดับนาโนด้วยชีววิธีเป็นที่ได้รับความสนใจ และนำไปสู่การค้นพบจุลินทรีย์ต่างๆ ทั้งที่เป็น แบคทีเรีย ยีสต์ และรา ที่มีความสามารถในการสังเคราะห์อนุภาคในระดับนาโนได้แตกต่างกันโดยอนุภาคเหล่านี้จะสะสมอยู่ในเซลล์ และ/หรือ ผิวนอกของเซลล์ ด้วยคุณลักษณะนี้จึงมีประโยชน์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดการปนเปื้อนโลหะหนักในธรรมชาติได้

สำหรับโครงการวิจัยนี้ ได้มุ่งประเด็นไปที่ การศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคเงินในระดับนาโนด้วยชีววิธี เพื่อนำเข้าสู่การประยุกต์ใช้ในกระบวนการนำโลหะเงินกลับมาใช้ใหม่ในอุตสาหกรรมเครื่องประดับ ซึ่งระหว่างกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมดังกล่าวมีการใช้โลหะเงินในปริมาณสูง จึงเกิดการสูญเสียโลหะเงินในปริมาณที่มากเช่นเดียวกัน โดยปัจจุบัน กระบวนการนำเงินกลับมาใช้ใหม่เป็นการนำเอาของเสียจากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมเครื่องประดับมาผ่านการกัดกร่อนด้วยกรดไนตริก (Nitric acid) ซึ่งอันตรายและมีความเป็นพิษสูง นอกจากนี้ทั้งปริมาณและคุณภาพของโลหะเงินที่ได้ต่ำ การเจือปนสูง ขนาดของอนุภาคมีความหลากหลาย ซึ่งในการสังเคราะห์ทางชีวภาพการเจือปนน้อยมาก ส่วนการปรับปรุงขนาดและคุณภาพสามารถทำได้ด้วยการผ่านกระบวนการรีดักชัน (Reduction of metal ions) ผลที่ได้จากการศึกษานี้ จะช่วยทำให้ลดต้นทุนในการนำเข้าโลหะเงินของประเทศ ในขณะเดียวกันโลหะเงินที่มีคุณภาพยังสามารถส่งออกได้

ในปัจจุบันถึงแม้ว่าจะมีการพบจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์เงินหรือทองระดับนาโนได้ แต่ยังขาดงานวิจัยที่แสดงถึงกระบวนการรีดิวซ์โลหะหนักที่ชัดเจนโดยเฉพาะในประเทศ ทั้งนี้การไม่ทราบแน่ชัดถึงหลักการ กลไกและ กระบวนการสร้างเงินระดับนาโนทางชีววิทยาของจุลินทรีย์ต่างๆ จะทำให้เกิดความยากลำบากต่อการพัฒนาประสิทธิภาพของขบวนการสังเคราะห์อนุภาค

เงินระดับนาโนได้ โดยเฉพาะ ในเชิงปริมาณ เชิงคุณภาพ และความบริสุทธิ์ ทั้งนี้เชื้อจุลินทรีย์อยู่ในกลุ่มจีนัสเดียวกันแต่ต่างสปีชีส์ก็พบว่าอาจมีความสามารถในการสร้างเงินแตกต่างกันไปในแต่ละกลุ่ม และในแต่ละชนิด ด้วยความหลากหลายในการสังเคราะห์เงินในระดับนาโน ตลอดจนคุณภาพ และลักษณะโครงสร้างของเงินระดับนาโนทำให้ต้องมีการคัดแยก จำแนก และ คัดเลือกหาเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการสร้างเงินในระดับนาโนได้มากที่สุด

ดังนั้นการศึกษาตามโครงการวิจัยนี้ จะเริ่มตั้งแต่การศึกษาเพื่อคัดแยกและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากของเสียในกระบวนการผลิตของกลุ่มอุตสาหกรรมเครื่องประดับและแหล่งธรรมชาติต่างๆในประเทศไทย และทำการพัฒนาคุณสมบัติการสังเคราะห์เงินของเชื้อจุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ โดยมุ่งเน้นเพื่อการประยุกต์ใช้ในกระบวนการนำเงินกลับมาใช้ใหม่ การปรับปรุงคุณภาพเงินให้ดีขึ้น และ การกำจัดของเสียในกระบวนการผลิตของกลุ่มอุตสาหกรรมเครื่องประดับ ซึ่งงานวิจัยนี้ตรงตามจุดยุทธศาสตร์ของชาติ ด้านการอนุรักษ์ธรรมชาติและลดปัญหาการก่อมลพิษในสิ่งแวดล้อมด้วยเทคโนโลยีเพื่อสิ่งแวดล้อม (green technology)

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อคัดแยก และ จำแนก เชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการสร้างเงินในระดับนาโน จากของเสียจากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมเครื่องประดับและแหล่งธรรมชาติต่างๆในประเทศที่มีเงินสะสมอยู่
2. เพื่อพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติสามารถสร้างเงินในระดับนาโน ให้มีศักยภาพทนต่อสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษ และสร้างอนุภาคเงินระดับนาโนได้
3. เพื่อพัฒนาขั้นตอนการเพิ่มผลผลิตการสร้างเงินในระดับนาโนของเชื้อจุลินทรีย์ ให้มีประสิทธิภาพ โดยให้ได้ปริมาณมากขึ้นและสม่ำเสมอ

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้ประกอบด้วยสองส่วน โดยส่วนแรกจะเน้นการ คัดแยก และจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถทนในสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติที่มีสารโลหะต่างๆ ในธรรมชาติ เช่นจากเหมือง จากกระบวนการสกัดเงิน จากการทำเครื่องประดับ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จะต้องมีความสามารถในการสังเคราะห์เงินในระดับนาโน สำหรับส่วนที่สองจะเน้นการปรับปรุงคุณภาพของเงินที่ได้ให้มีปริมาณมาก และ มีความสม่ำเสมอ ตลอดจนการรักษาคุณภาพของเชื้อจุลินทรีย์ไม่ให้เกิดการกลายพันธุ์ และ/หรือ เปลี่ยนคุณสมบัติในการสร้างเงินระดับนาโนเมื่อเลี้ยงไปในหลายช่วงอายุ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ทีมวิจัยสามารถหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการสร้างเงินนาโนที่สามารถประยุกต์นำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ เช่นในอุตสาหกรรมเครื่องประดับ อุจสาหกรรมการสกัดเงิน เอาเงินกลับคืนมา หรือแม้แต่ในขบวนการปรับปรุงคุณภาพเงินเพื่อเป็นเพิ่มมูลค่าของเงินในทางการค้า ความรู้ที่ได้ยังจัดได้ว่าสามารถเป็นองค์ความรู้ เพื่อการพัฒนา ปรับปรุงให้ได้เงินในระดับนาโน ที่มีขนาด รูปร่าง ลักษณะต่างๆกันไป นอกจากนี้ยังก่อให้เข้าใจถึงหลักการ กระบวนการสร้างโลหะระดับนาโนของเชื้อจุลินทรีย์ ขบวนการทางชีวเคมีของเชื้อที่สามารถทนในสภาวะที่โลหะเป็นพิษ ซึ่งจะสามารถนำไปสู่ใน ความเข้าใจกลไก การทำงานของเอนไซม์ในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ เพื่อการพัฒนาให้ได้ปริมาณเงินในระดับนาโนเพิ่มมากขึ้น และมีคุณภาพดี

ในขณะเดียวกันที่เชื้อจุลินทรีย์นี้สามารถทนในสภาวะที่เป็นพิษได้ดี เพื่อการต่อยอดของงานวิจัยที่ก่อประโยชน์ต่อสิ่งแวดล้อมในขณะเดียวกัน ที่สามารถประยุกต์ไปใช้ในการทำเหมืองเงินในประเทศ ในขบวนการสกัดเอาเงิน โดยเลือกใช้วิธีทางชีววิทยานี้มาช่วย จะสามารถช่วยลดปัญหาของสภาวะเป็นพิษของการใช้สารเคมี โดยเฉพาะการเกิดการไหลของสารละลายโลหะที่ก่อพิษไปสู่สิ่งแวดล้อมได้ (bioleaching) ได้ในอนาคต

นอกจากนี้ผลสัมฤทธิ์ของงานวิจัยเบื้องต้นจะถูกเผยแพร่เป็นบทความทางวิชาการในระดับนานาชาติ เฉพาะที่ตีพิมพ์ในฐานข้อมูลสากล อย่างน้อย 1 บทความ และการนำเสนอผลงานผ่าน การประชุมทางวิชาการ จำนวน 1 เรื่องในการประชุมทางวิชาการ ระดับชาติ พร้อมทั้งยังได้ตัวเชื้อจุลินทรีย์อย่างน้อย 2 สายพันธุ์และทราบรายละเอียดของเชื้อเหล่านี้ที่พร้อมจะนำไปใช้ในการพัฒนางานวิจัยขั้นต่อไป

บทที่ 2
ทฤษฎีและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อนุภาคเงินในระดับนาโนจากชีวโมเลกุล มีขนาดที่ได้เล็ก ได้มีการประยุกต์นำไปใช้ได้ในระดับเซลล์ ใช้ในการตรวจ รักษา และบำบัดโรค เช่น นำส่งยา การถ่ายยีนส์ การเป็นตัวตรวจสอบติดตามทางชีวภาพในเซลล์เพื่อการมองเห็นสารโมเลกุลในระดับไมโคร และนาโน หรือแม้แต่เพื่อการศึกษาด้านชีววิทยาของขบวนการทำงานต่างๆ ในระดับเซลล์ (1-5)

เมื่อเร็วนี้ได้การค้นพบพัฒนาการสร้างโมเลกุลสารในระดับนาโนด้วยชีววิธีเป็นที่ได้รับความสนใจ ซึ่งนำไปสู่ความสนใจในด้านการค้นหาจาก พืช เอนไซม์ สารสกัดจากพืช และจุลินทรีย์ต่างๆมากมาย เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และรา ซึ่งพบว่ามีความสามารถแตกต่างกันไป ในความสามารถสร้างสารสำคัญต่างๆ ระดับนาโน ทั้งในเซลล์ และ นอกเซลล์ (6-9) จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดการปนเปื้อนโลหะหนักในธรรมชาติได้ ผ่านกระบวนการรีดักชัน (reduction of metal ions) ด้วยคุณสมบัติ กลไกการทำงานในระดับชีวโมเลกุลของที่จุลินทรีย์เหล่านี้จะปรับตัว สามารถทนในสิ่งแวดล้อมได้หลากหลาย เช่น อยู่รอด เจริญเติบโตในสิ่งแวดล้อมที่มีโลหะหนักเป็นพิษ ปนเปื้อนในปริมาณมาก หรือ อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่แย่ เช่น มีอุณหภูมิ ความเป็นกรดด่างที่สูง หรือต่ำมากได้ ทั้งนี้ด้วยกระบวนการรีดิวซ์โลหะหนัก หรือการเปลี่ยนขั้นระดับรีดอกซ์ (rdeox state) ของโลหะ หรือแม้แต่ตกตะกอนของโลหะเหล่านี้ในเซลล์ของจุลินทรีย์ (10) ด้วยขบวนการเหล่านี้ของจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงของโลหะอิออนจึงเป็นขบวนการหลักในการสร้างสารโมเลกุลในระดับนาโน (11)

แม้ว่าในปัจจุบันมีการพบจุลินทรีย์จำนวนมากที่สามารถสร้างเงิน หรือทองระดับนาโนได้ แต่ยังไม่มีการพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเงินให้มีประสิทธิภาพ เพื่อรองรับการประยุกต์ใช้ในกระบวนการนำเงินกลับมาใช้ใหม่ การปรับปรุงคุณภาพเงินให้ดีขึ้น และ การกำจัดของเสียในกระบวนการผลิตของกลุ่มอุตสาหกรรมเครื่องประดับ เนื่องจากยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดถึงกลไกตลอดจนกระบวนการสังเคราะห์เงินระดับนาโนทางชีววิทยาของจุลินทรีย์ต่างๆอย่างแน่ชัด ซึ่งอาจแตกต่างกันไปในแต่ละกลุ่ม และในแต่ละชนิด แต่หลักการโดยรวมอาจเป็นไปได้ว่ากระบวนการสร้างทางชีววิทยาของโลหะเงินในระดับนาโนเกี่ยวข้องกับการรีดักชันของอิออนเงินของขบวนการรีดักชันของระบบเอนไซม์ในที่เกี่ยวข้องกับโลหะประเภท electron shuttle enzymatic metal reduction ซึ่งอาจเป็น เอนไซม์ชนิด nitrate reductase ที่สามารถรีดิวซ์ อิออนเงิน (silver ions, Ag+) ไปเป็นโลหะเงิน (metallic silver, Ag^0) ด้วยไนเตรทอิออน (nitrate ions) (12) โดยที่ทีมวิจัยของ Duran เสนอว่ากลไกการสร้างเงินในระดับนาโนทางชีววิทยาจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ว่าเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ประเภท enzymatic electron shuttle system ที่สามารถสร้างเงินอิออนและสามารถสร้างโลหะเงินระดับนาโนในที่สุด (13) และพบว่าเชื้อนี้ปล่อยเอนไซม์ NADH dependent reductase มาในสารละลายอาหารที่ใช้เลี้ยงและพบอนุภาคเงินระดับนาโนแบบนอกเซลล์ของเชื้อราชนิดนี้ นอกจากนี้มีงานที่สนับสนุนการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับกลไกการสร้างโลหะระดับนาโนจากเชื้อราโดยเฉพาะโลหะเงิน และ ทองระดับนาโนในที่คล้ายลึงกันอีกมากมาย (14-15) และยังมีการพบว่าระบบการทำงานของเอนไซม์รีดักชันคล้ายๆ กันในแบคทีเรียที่มีกลไกในการสร้างโลหะเงิน และทองระดับนาโน เช่น ทีมพบว่า *Enterobacteria* สร้างเงินระดับนาโน จากงานวิจัยของ Shahverdi (16) และ *Rhodopseudomonas capsulata* ที่สามารถรีดิวซ์สารละลายทองให้เป็นทองระดับนาโนได้

จากทีมวิจัยของ He (17) และทีม Husseiny ที่ใช้ *Psuedomonas aeruginosa* ในการสร้างทองระดับนาโน (18) และเมื่อเร็วนี้ที่ทีมวิจัยของ Yogesh ได้เสนองานวิจัยรายละเอียดของกลไกการรีดักชันของทองนาโน จากเชื้อแบคทีเรีย *Stenotrophomanas maltophilia* โดยพบว่ามีโดยการทำงานของเอ็นไซม์ NADPH-dependent reductase ที่สามารถรีดิวซ์ Au3+ ไปเป็น Auo ด้วยการใช้ ฟอสเฟตอิออน (phosphate ions) ผ่านกระบวนการรีดักชันของโลหะ (electron shuttle enzymatic metal reduction process) (19) โครงสร้างของทองในระดับนาโนพบว่ามีความแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ การค้นพบว่า *Bacillus licheniformis* มีโครงสร้างของทองในระดับนาโนเป็นรูป nanocubes ด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบ Scanning electron microscope ประกอบกับ การใช้ UV–Vis spectra และ XRD ในการช่วยยืนยันโครงสร้างของทองในระดับนาโน (20) อย่างไรก็ตามจากการวิจัยของทีมวิจัยของ Lovely ได้แสดงให้เห็นว่า อนุภาคการสร้างทองระดับนาโนจากจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับชนิดจุลินทรีย์โดยเฉพาะ แต่ไม่พบในสายพันธุ์ที่แม้ว่าจะมีเกี่ยวข้องกันทางพันธุกรรม เพราะ *P. islandicum* สามารถรีดิวซ์ Au3+ อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน คือ *P. aerophilum* ที่ไม่สามารถทำได้ (21) ตัวอย่างของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการสร้างโลหะในระดับนาโนต่างๆ สามารถแสดงได้ในตารางที่ 1 ดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างการสร้างโลหะขนาดนาโน จากจุลินทรีย์ต่างๆ (ทีมา Kaushik N. et. al., 2010 (22))

Synthesis of metallic nanoparticles by different microorganisms

Microorganism	Type of nanoparticle	Location	Size range (nm)
(A) Bacteria			
Pseudomonas stutzeri	Ag	Intracellular	~200
Morganella sp.	Ag	Extracellular	20–30
Lactobacillus strains	Ag and Au	Intracellular	—
Plectonema boryanum (Cyanobacteria)	Ag	Intracellular	1–10 1–100
Escherichia coli	CdS	Intracellular	2–5
Clostridium thermoaceticum	CdS	Intracellular and extracellular	—
Actinobacter spp.	Magnetite	Extracellular	10–40
Shewanella algae	Au	Intracellular, pH = 7 Extracellular, pH = 1	10–20 50–500
Rhodopseudomonas capsulata	Au	Extracellular, pH = 7 Extracellular, pH = 4	10–20 50–400
Escherichia coli DH5α	Au	Intracellular	25–33
Thermomonospora sp.	Au	Extracellular	8
Rhodococcus sp.	Au	Intracellular	5–15
Klebsiella pneumoniae	Ag	Extracellular	5–32
Pseudomonas aeruginosa	Au	Extracellular	15–30
Shewanella oneidensis	Uranium (IV)	Extracellular	—
(B) Yeast			
MKY3	Ag	Extracellular	2–5
Candida glabrata and *Schizosaccharomyces pombe*	CdS	Intracellular	200
(C) Fungi			
Phoma sp. 3.2883	Ag	Extracellular	71.06–74.46
Fusarium oxysporum	Au	Extracellular	20–40
Verticillium	Ag	Intracellular	25 ± 12
Aspergillus fumigatus	Ag	Extracellular	5–25
Trichoderma asperellum	Ag	Extracellular	13–18
Phaenerochaete chrysosporium	Ag	Extracellular	50–200
Fusarium oxysporum and *Verticillium* sp.	Magnetite	Extracellular	20–50
(D) Plant and plant extracts			
Azadirachta indica(Neem)	Ag, Au, and Ag/Au bimetallic	Extracellular	50–100
Geranium leaves plant extract	Ag	—	16–40
Lemongrass plant extract	Au	—	200–500
Avena sativa (Oat)	Au	Extracellular	5–85
Alfalfa sprouts	Ag	Intracellular	2–20
Aloe vera	Au	Extracellular	50–350
Cinnamomum camphora	Au and Ag	Extracellular	55–80
(E) Algae			
Sargassum wightii	Au	Extracellular	8–12
Chlorella vulgaris	Au	—	9–20

กรอบแนวคิดของการวิจัย

กระบวนการสร้างเงินในระดับนาโนจากเชื้อจุลินทรีย์

ในการศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคโลหะในระดับนาโน มีกระบวนการที่คล้ายกัน โดยการเริ่มจาก การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ ที่ได้จากของเสียจากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมเครื่องประดับ และ/หรือ แหล่งทางธรรมชาติ อาทิเช่น เหมือง หลังจากนั้น จึงเข้าสู่ขั้นตอนการเตรียมอาหารเหลว และโลหะที่สนใจโดยในการศึกษานี้จะมุ่งที่เงิน ซึ่งเงินที่จะเตรียมมาใช้ในขั้นตอนนี้โดยจะอยู่ในรูปของสารละลาย $AgNO_3$ หลังจากเตรียมเงินในรูปของอาหารเหลวแล้วจึงเข้าสู่ขั้นตอน การเลือกเชื้อจุลินทรีย์ สำหรับศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคเงินในระดับนาโน โดยอนุภาคเงินที่ได้จากการสังเคราะห์ อาจอยู่ภายใน หรือ ภายนอกเซลล์

ชนิด และประเภทของเชื้อจุลินทรีย์ในการศึกษา

เนื่องจากเป็นที่ทราบกันว่ามีเชื้อจุลินทรีย์หลายกลุ่มที่สามารถสังเคราะห์เงินในระดับนาโนได้ แต่ในการทดลองนี้จะพยายามไม่เลือกเชื้อรา ถึงแม้ว่าราจะให้ผลผลิตของเงินในปริมาณมาก และสามารถเจริญเติบโตได้ดี ตลอดจนทนต่อสภาวะความเป็นพิษของโลหะได้มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นก็ตาม แต่สำหรับการทดลองนี้จะเลือกใช้แบคทีเรีย เนื่องจากสามารถทำการ เลี้ยงได้ง่าย และไม่มีปัญหาการกลายพันธุ์ ทำให้สามารถควบคุมทั้งคุณภาพและปริมาณของเงินระดับนาโนให้คงที่และสม่ำเสมอได้ โดยในขั้นตอนสุดท้ายจะทำการคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียชนิดที่ไม่ก่อปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมและไม่ก่อโรค (nonpathogenic bacteria) เพื่อการประยุกต์ทดลองไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับเงินต่อไป

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

สำหรับการศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการสกัดเงินเพื่อการนำกลับมาใช้ใหม่ คณะผู้วิจัย ได้ทำการเก็บตัวอย่างของเสียจากกระบวนการผลิตและการขึ้นรูปทั้งในลักษณะของตะกอนแห้ง ตะกอนเปียก และ ของเหลว โดยตัวอย่างทั้งหมด ถูกจัดเก็บแบบผนึกสุญญากาศ และเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนเข้าสู่กระบวนการคัดแยกเชื้อ

3.1 สูตรอาหารที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อ

ในกระบวนการคัดแยกเชื้อในโครงการนี้ คณะผู้วิจัยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสอง สูตร ประกอบด้วย **Nutrient Broth (NB)** และ **Nutrient Agar (NA)**

3.1.1 การเตรียม Nutrient Broth (NB)

1. ชั่งส่วนประกอบต่าง ๆ ตามสูตรอาหารดังต่อไปนี้

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

2. สารละลายส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำกลั่น คนด้วยแท่งแก้ว ให้ส่วนประกอบของอาหาร
ละลาย โดยใช้ความร้อนช่วย แล้วปรับปริมาตรให้ครบตามสูตรด้วยน้ำกลั่น

3. วัดความเป็นกรดด่างด้วยกระดาษวัด pH ถ้าอาหารเป็นกรด หรือด่างมากเกินไป ให้ปรับด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1นอร์มอล จนได้ pH ประมาณ 7.0

4. ในกรณีทีอาหารมีตะกอนหรือเศษผงให้กรองผ่านผ้าขาวบาง

3.1.2 การเตรียม Nutrient Agar (NA)

1. ใช้ส่วนประกอบเช่นเดียวกับ NB แล้วเติมผงวุ้น 15 กรัม

2. ต้มพร้อมกับคนด้วยแท่งแก้ว จนวุ้นละลายหมด (อุณหภูมิประมาณ 97 – 100 องศาเซลเซียส)

3. ปรับปริมาตรให้ครบตามสูตรด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7.0

3.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

โดยปกติในแหล่งธรรมชาติจะมีเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตอยู่รวมกันหลายๆสายพันธุ์ เพื่อการคัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะต้องมีขั้นตอนการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture)

3.2.1 Spread-Plate Technique

Spread-Plate Technique เทคนิคนี้คือการทำให้แบคทีเรียเจือจางให้มีจำนวนประมาณ 100-200 เซลล์หรือน้อยกว่าจะถูกนำไปวางตำแหน่งตรงกลางของจานเพาะเชื้อ (petri dish/plate) แล้วทำการเกลี่ยให้เชื้อกระจายทั่วด้วยแท่งแก้วรูปตัว L หลังจากบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมและมีระยะเวลาเพียงพอ จะปรากฏโคโลนี (colony) ของเชื้อแบคทีเรียขึ้น โดยแต่ละโคโลนีจะมีจำนวนแบคทีเรียอยู่จำนวนมาก และแต่ละโคโลนีจะถือว่ามาจากแบคทีเรียสายพันธุ์เดียว ดังนั้นจะทำให้เกิดการแยกจุลินทรีย์ออกมาเป็นเชื้อบริสุทธิ์ขึ้น เมื่อมองด้วยตาเปล่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์โคโลนีจะมีลักษณะแตกต่างกัน นอกจากนั้นยังสามารถทำให้เชื้อมีความบริสุทธิ์มากขึ้นโดยการนำโคโลนีที่ต้องการไปเพาะเลี้ยงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารใหม่ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า Streak-Plate Technique

ขั้นตอนการ Spread plate

1. ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงที่ตำแหน่งตรงกลางจานเพาะเชื้อ

2. จุ่มแท่งแก้วรูปตัวแอล (spreader) ในแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 แล้วเอียง spreader ที่ขอบของบีกเกอร์เพื่อแยกแอลกอฮอล์ส่วนเกินออก

3. นำแท่งแก้วเกลี่ย spreader ที่ผ่านการจุ่มแอลกอฮอล์ไปเผาไฟจนแอลกอฮอล์ไหม้หมด และปล่อยให้ spreader เย็น

4. นำ spreader เกลี่ยเชื้อให้ทั่วจานจานเพาะเชื้อ และระมัดระวังไม่ให้มือสัมผัสกับขอบด้านในของจานเพาะเชื้อ

5. จุ่ม spreader ในแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 และกำจัดแอลกอฮอล์ส่วนเกินโดยให้แท่งแก้วสัมผัสกับของบีกเกอร์ นำเผาไฟจนแอลกอฮอล์ไหม้หมด ปล่อยให้เย็น และนำไปเกลี่ยเชื้อแบคทีเรียจานในจานเพาะเชื้อที่เหลือ โดยขั้นตอนการ Spread plate

6. กลับจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารเพาะเชื้ออยู่ด้านบน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 24-48 ชั่วโมง

7. สังเกตลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏ

3.2.2 Streak-Plate Technique

Streak-Plate Technique เป็นการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) แตะตัวอย่างหรือสิ่งส่งตรวจแล้วลากหรือขีด (streak)ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง (agar plate) อยู่ให้ได้แนวระนาบติดต่อกัน 4-5 เส้น หลังจากเสร็จในระนาบแรกซึ่งมีเชื้อจุลินทรีย์อยู่หนาแน่นที่สุด ให้นำห่วงเขี่ยเชื้อมาเผาไฟให้ลวดที่ปลายร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อที่ติดให้หมด จากนั้นจึงขีดเชื้อจากส่วนของรอยลากในระนาบแรกออกมาเพียงหนึ่งครั้งแล้วลากเป็นระนาบที่สอง 4-5 เส้น ติดกันโดยรอยขีดของเชื้อจะไม่ทับกับระนาบแรกอีก หลังจากนั้นก็ทำเช่นเดียวกันกับระนาบที่สองจนครบทั่วทั้งจานเพาะเชื้อซึ่งมีประมาณสี่ระนาบ เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วจะมีการศึกษาเชื้อต่อไปในด้านต่างๆ ซึ่งจะต้องมีการถ่ายเชื้อจากอาหารเดิมไปยังอาหารใหม่ หรือมีการเพาะเชื้อลงในอาหารเพื่อการทดสอบและการวิเคราะห์ต่างๆ

การทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Streak plate

เริ่มจากใช้ลูบเขี่ยเชื้อ (Loop) เขี่ยเอาเชื้อออกจากหลอดที่มีเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) แล้วทำการ Streak เชื้อที่อยู่ปลาย loop ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เตรียมไว้แล้ว ด้วยความระมัดระวัง ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1 เปิดฝาจานเพาะเชื้อให้มีช่องว่างเพียงพอที่จะสอด loop เข้าไปได้ง่าย แล้วสอด Loop ที่มีเชื้อแบคทีเรียอยู่ทำการ streak ที่พื้นที่หมายเลข 1 โดยในระหว่างการ streak จะต้องไม่ทำให้ผิวของอาหารแตก

2 เมื่อ streak ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 1 แล้วให้นำ Loop ออกมาฆ่าเชื้อโดยการเผาไฟ หลังจากนั้นทำให้ loop เย็นลงโดยการแตะที่ขอบของอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้ๆ กับบริเวณหมายเลข 1

3 หมุนจานเพาะเชื้อให้อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับการ streak บริเวณพื้นที่หมายเลข 2 แล้วทำการ cross streak โดยจุดเริ่มต้นจะอยู่ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 1 แล้วทำการ Streak ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 2

4 เมื่อ streak ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 2 แล้วให้นำ Loop ออกมาฆ่าเชื้อโดยการเผาไฟ หลังจากนั้นทำให้ loop เย็นลงโดยการแตะที่ขอบของอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้ๆ กับบริเวณหมายเลข 2

5 หมุนจานเพาะเชื้อให้อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับการ streak บริเวณพื้นที่หมายเลข 3 แล้วทำการ cross streak โดยจุดเริ่มต้นจะอยู่ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 2 แล้วทำการ Streak ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 3 ถ้าหากจำเป็นสามารถทำการ streak ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 4 ได้

6 กลับจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมงแล้วสังเกตการเจริญของเชื้อ

3.3 การพัฒนาและคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถสกัดเงินได้

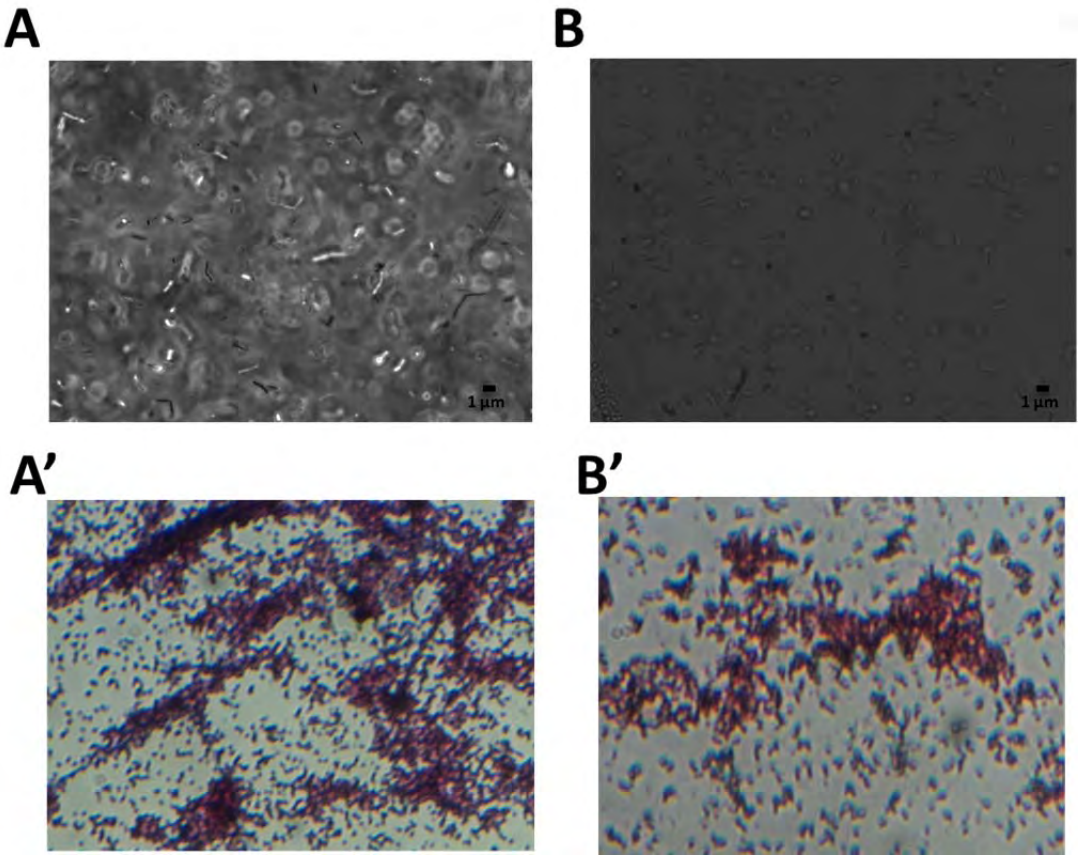
หลังจากได้เชื้อสายพันธุ์บริสุทธิ์ ตามกระบวนการตามข้อ 3.1 และ 3.2 แล้ว นำเชื้อทั้งหมดมาเลี้ยงใน NB ที่มีส่วนผสมของ $AgNO_3$ โดยทำการเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้ว เข้าสู่กระบวนการตามข้อที่ 3.2 อีกครั้ง สำหรับปริมาณและประสิทธิภาพในการสังเคราะห์โลหะเงิน สามารถดูได้จากสีของ NB ในเบื้องต้น หรือ ใช้ UV–visible spectrometry

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ในโครงการศึกษาวิจัยนี้คณะผู้วิจัย ได้มุ่งประเด็นไปที่การค้นหาและคัดแยกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสกัดโลหะเงินเพื่อการนำกลับมาใช้ใหม่ ซึ่งเป็นกลุ่มที่อยู่ใน ของเสียจากกระบวนการผลิตและการขึ้นรูป เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้น ในการประเมินความเป็นไปได้ในการสร้างและพัฒนากระบวนการแยกสกัดโลหะเงินด้วยจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรีย

4.1 กลุ่มเชื้อที่ได้จากกระบวนการแยกเชื้อบริสุทธิ์

ผลจากการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ พบว่า มีเชื้อที่อยู่ในระบบการผลิตอยู่จำนวนสองเชื้อ ดังแสดงตาม**รูปที่ 4.1**

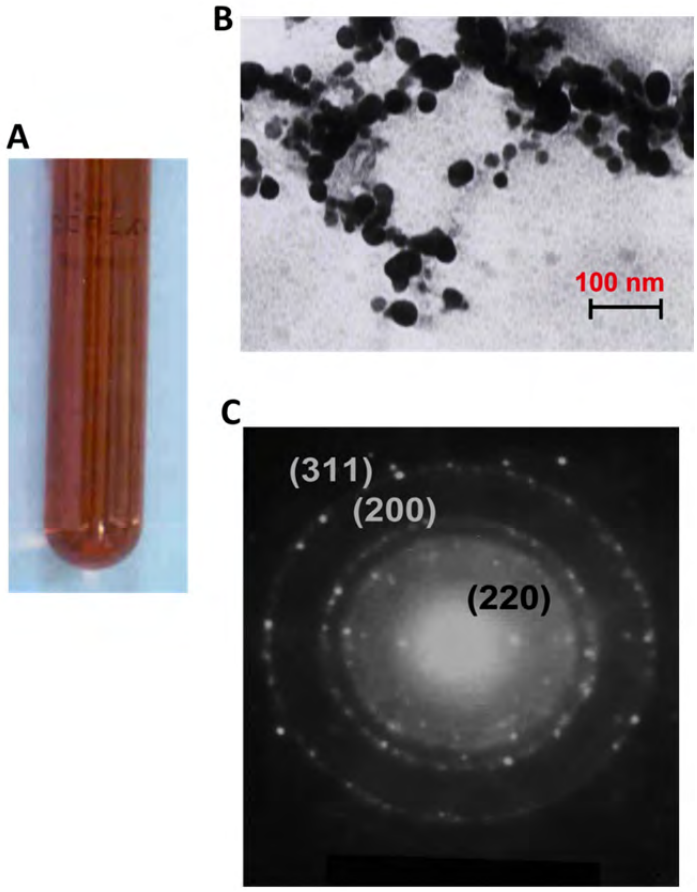


รูปที่ 4.1 ภาพของเชื้อที่ได้จากการคัดแยกให้บริสุทธิ์ **(A, B)** แสดงรูปของเชื้อที่คัดแยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย x100 **(A', B')** แสดงผลการทดสอบ Gram-stain

โดยที่เชื้อทั้งสอง ที่ได้จากการคัดแยกเป็นรูปท่อน นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อทำการตรวจสอบ Gram-stain ของเชื้อทั้งสอง เชื้อ ตาม**รูปที่ 4.1A** เป็น Gram-positive ส่วน**รูปที่ 4.1B** เป็น Gram-negative สำหรับในด้านของอัตราการเจริญเติบโตพบว่า เชื้อทั้งสองมีความ สามารถเจริญเติบโต ได้ในช่วง 18-24 ชั่วโมง

4.2 กลุ่มเชื้อที่ได้จากการพัฒนาและคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถสกัดโลหะเงินได้

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อใน อาหารเหลวที่มีสารละลายเงิน $AgNO_3$ พบว่า เชื้อตาม**รูปที่ 4.1B** ที่สามารถสังเคราะห์โลหะเงินได้ โดยผลของการสังเคราะห์เบื้องต้นแสดงตาม**รูปที่ 4.2**



รูปที่ 4.2 แสดงตัวอย่างผลของการสังเคราะห์โลหะเงินเบื้องต้นของเชื้อตามรูปที่4.1B **(A)** แสดง โลหะเงินที่ได้จากการสังเคราะห์ในรูปของสารละลาย **(B)** ภาพของโลหะเงินที่ได้จากการสังเคราะห์ **(C)** แสดงผลการวิเคราะห์รูปแบบการเลี้ยวเบนของอิเล็กตรอนของโลหะเงินใน(B)

นอกจากนี้ เมื่อทำการตรวจสอบ ชนิดของสายพันธุ์แบคทีเรียด้วย 16S ribosomal Ribonucleic acid (rRNA) พบว่า เชื้อตามรูปที่4.1B เป็นเชื้อในกลุ่ม Pseudomonas ส่วน รูปที่4.1A เป็นเชื้อในกลุ่ม Bacillus เมื่อพิจารณาผลของการสังเคราะห์โลหะเงินของเชื้อที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา (Rammohanet. al., 2011) ซึ่งได้มีการศึกษาการสังเคราะห์โลหะเงินของเชื้อในกลุ่ม Pseudomonas อย่างไรก็ตาม เมื่อเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาในต่างประเทศ เชื้อที่ได้เป็นเชื้อประจำถิ่น จึงมีศักยภาพในการปรับแต่งและพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในประเทศได้ง่าย

เชื้อตามรูปที่4.1A

Bacillus 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1508
Score = 2556 bits (1384), Expect = 0.0
Identities = 1393/1397 (99%), Gaps = 1/1397 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1     TGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  113   TGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAC  172

Query  61    ATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACC  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  173   ATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACC  232

Query  121   CGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGAC  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  233   CGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGAC  292

Query  181   CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  293   CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  352

Query  241   CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  353   CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA  412

Query  301   AGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTG  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  413   AGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTG  472

Query  361   GCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  420
```

```
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  473   GCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
532

Query  421   TACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCT
480
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  533   TACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCT
592

Query  481   TAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
540
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  593   TAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
652

Query  541   GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAG
600
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  653   GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAG
712

Query  601   GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTG
660
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  713   GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTG
772

Query  661   GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT
720
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  773   GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT
832


Query  721   TAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA
780
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  833   TAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA
892

Query  781   CGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT
840
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  893   CGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT
952

Query  841   GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTA
900
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  953   GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTA
1012

Query  901   GAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG
960
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1013  GAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG
1072

Query  961   TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATC
1020
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1073  TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATC
1132

Query  1021  ATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACG
1080
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
```

```
Sbjct  1133  ATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACG
1192

Query  1081  TCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAG
1140
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1193  TCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAG
1252

Query  1141  AGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGG
1200
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1253  AGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGG
1312

Query  1201  CTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG
1260
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1313  CTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG
1372

Query  1261  AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGA
1320
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1373  AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGA
1432

Query  1321  AGTCGGTGGGGTAACCTTTTTGAAGCCAGCCGCCTAAGGGGGGACAAATGATTGGGGTGA
1380
             |||||||||||||||||||||| |||||||||||||||| |||||| ||||||||||||
Sbjct  1433  AGTCGGTGGGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGA
1492

Query  1381  AGTCGTAAACAAGGTAA  1397
             |||||||| ||||||||
Sbjct  1493  AGTCGTAA-CAAGGTAA  1508
```

เชื้อตามรูปที่ 4.1B

Pseudomonas 16S ribosomal RNA gene,

partial sequence

Length=1361

Score = 924 bits (500), Expect = 0.0

Identities = 500/500 (100%), Gaps = 0/500 (0%)

Strand=Plus/Plus

```
Query  1    AATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  64   AATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTA
123

Query  61   CGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGC
120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  124  CGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGC
183

Query  121  TAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATC
180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  184  TAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATC
243

Query  181  AGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  244  AGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
303

Query  241  GGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTG
300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  304  GGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTG
363

Query  301  TAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTAC
360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  364  TAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTAC
423

Query  361  CAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAG
420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  424  CAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAG
483

Query  421  CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAA
480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  484  CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAA
543

Query  481  AGCCCCGGGCTCAACCTGGG  500
            ||||||||||||||||||||
Sbjct  544  AGCCCCGGGCTCAACCTGGG  563
```

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ผลจากการศึกษาวิจัย เพื่อค้นหาและคัดแยกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสกัดเงินเพื่อการนำกลับมาใช้ใหม่ คณะผู้วิจัยสามารถ สรุปผลการศึกษาวิจัยได้ดังนี้

1. ผลจากการคัดแยกเชื้อ จากตัวอย่างของเสียในกระบวนการผลิตและการขึ้นรูปทั้งในลักษณะของตะกอนแห้ง ตะกอนเปียก และ ของเหลว พบว่ามีเชื้อเดียวเท่านั้นที่มีศักยภาพในการสกัดโลหะเงินเบื้องต้นได้ ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Pseudomonas ส่วนเชื้อที่ได้อีกหนึ่งเชื้อพบว่าอยู่ใน กลุ่ม Bacillus โดยเชื้อที่กล่าวมานี้ สามารถเจริญเติบโตได้ดี ภายใน 18-24 ชั่วโมง
2. เชื้อที่อยู่ในกลุ่ม Pseudomonas เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการสังเคราะห์โลหะเงิน ในรูปของสารละลายเงิน $AgNO_3$ สามารถสังเคราะห์โลหะเงินขนาดประมาณ 5-15 นาโนเมตรได้

เมื่อพิจารณาผลการศึกษาวิจัยข้างต้น จะพบว่าความหลากหลายของเชื้อที่สามารถสังเคราะห์โลหะเงินได้นั้น มีน้อยมาก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะคุณสมบัติของเงินที่เป็น anti-bacterial จึงทำให้มีเชื้อที่จำเพาะเท่านั้นที่สามารถใช้ประโยชน์จากโลหะเงินได้ สำหรับการใช้แบคทีเรียเพื่อใช้ในการสร้างและพัฒนากระบวนการแยกสกัดเงินนั้น อาจมีความเหมาะสมกับการสกัดโลหะเงินเพื่อให้เกิดความบริสุทธิ์สูงมากกว่าการสกัดเงินแบบเชิงปริมาณ ด้วยวิธีการนี้สามารถลดผลกระทบทางสิ่งแวดล้อมได้ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเชื้อที่ได้มีเพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้นที่มีศักยภาพ ดังนั้น จึงจำเป็นที่จะต้องทำการค้นหา และคัดแยกเชื้อเพิ่มเติมในแหล่งอื่นๆ เพื่อให้ได้ฐานข้อมูลของเชื้อที่จะง่ายต่อการพัฒนากระบวนการแยกสกัดเงินต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

1. Mirkin CA, Letsinger RL, Mucic RC, Storhoff JJ: **A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials.** *Nature (London)* 1996, **382:**607-609.
2. Jana NR, Gearheart C, Murphy CJ: **Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Cylindrical Gold Nanorods.** *J Phys Chem B* 2001, **105:**4065-4067.
3. Xiao Y, Patolsky F, Katz E, Hainfeld JF, Willner I: **Plugging into Enzymes": Nanowiring of Redox Enzymes by a Gold Nanoparticle.** *Science* 2003, **99:**1877-1881.
4. Thomas M, Klibanov AM: **Conjugation of gold nanoparticles enhances poly ethylenimine's tranfer of plasmid DNA into mamalian cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100:**9138-9143.
5. Salata OV: **Application of nanoparticles in biology and medicine.** *J Nanobiotechnol* 2004, **2:**3-9.
6. Ahmad A, Senapati S, Khan MI, Ramani R, Sriniwas V, Sastry M: **Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete *Rhodococcus* species.** *Nanotechnology* 2003, **14:**824-828.
7. Senapati S, Ahmad A, Khan MI, Sastry M, Kumar R: **Extracellular Biosynthesis of Bimetallic Au-Ag Alloy Nanoparticles.** *Small* 2005, **1:**517-520.
8. Mukherjee P, Roy M, Mandal BP, Dey GK, Mukherjee PK, Ghatak J, Tyagi AK, Kale SP: **Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a non-pathogenic and agriculturally important fungus T. asperellum.** *Nanotechnology* 2008, **19:**75103.
9. Pum D, Sleytr UB: **The application of bacterial S-layers in molecular nanotechnology.** *Trends Biotechnology* 1999, **17:**8-12.
10. Silver S: **Bacterial resistances to toxic metal ions.** *Gene* 1996, **179:**9-19.
11. Klaus T, Joerger R, Olsson E, Granqvist CG: **Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96:**13611-13614.
12. Kalimuthu K, Babu RS, Venkataraman D, Bilal M, Gurunathan S: **Biosynthesisof silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*.** *Colloids and surfaces B* 2008, **65:**150-153.

13. Duran N, Marcato PD, Alves OL, Souza G, Esposito E: **Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains.** *J Nanotechnology* 2005, **3:**8.

14. Mukherjee P, Ahmad A, Mandal D, Senapati S, Sainkar SR, Khan MI, Ramani R, Parischa R, Ajayakumar PV, Alam M, Kumar R, Sastry M:**Fungus-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Immobilization in the Mycelial Matrix: A Novel Biological Approach to anoparticle Synthesis.** *Nano Lett* 2001, **1:**515-519.

15. Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Ahmad A, Khan MI, Kumar R, SastryM: **Extracellular ynthesis of Gold Nanoparticles by the Fungus *Fusarium oxysporum*.** *ChemBioChem* 2002, **3:**461-463.

16. Shahverdi AR, Minaeian S, Shahverdi HR, Jamlifar H, Nohi AA: **Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of *Enterobacteria*: A novel biological approach.** *Process Biochem* 2007, **42:**919-923.

17. He S, Guo Z, Zhang Y, Zhang S, Wang J, Gu N: **Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodopseudomonas capsulata*.** *Materials Letters* 2007, **61:**3984-3987.

18. Husseiny MI, Abd El-Aziz M, Badr Y, Mahmoud MA: **Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*.** *Spectrochimica acta A* 2007, **67:**1003-1006.

19. Yogesh N, Nishima W, Nisha G, Shekhawat G Suri CR: **A novel bacterial isolate *Stenotrophomonas maltophilia* as living factory for synthesis of gold nanoparticles.** *Microbial Cell Factories* 2009, **8:**39.

20. Kalishwaralal K, Deepak V, Sureshbabu RKP, Gurunathan S: **Biological synthesis of gold nanocubes from *Bacillus licheniformis.*** *Bioresource Technology* 2009, 5356-5359.

21. Lovley DR, Giovannoni SJ., White DC, Champine JE, Phillips EJP, Gorby YA, Goodwin S: ***Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals.** *Arch. Microbiol*. **159**, 336 1993.

22. Kaushik N, Thakkar MS, Snehit S, Mhatre MS, Rasesh Y, Parikh MS: **Biological synthesis of metallic nanoparticles.** .*Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2010, **6:**257–262