การพัฒนาปรับปรุงการสร้างทองระดับนาโนด้วยการใช้จุลินทรีย์ท้องถิ่น ในประเทศไทย

The Development and Study of Nanogold Particle Biosynthesis using Local Microorganisms in Thailand

ดร. ดวงฤทัย นิคมรัฐ (หัวหน้าโครงการ)

นายจีระศักดิ์ ธาระจักร์

ดร. ไพศาล การถาง

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายจ่าย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

สนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ *(วช.)*

ชื่องานวิจัย การพัฒนาปรับปรุงการสร้างทองระดับนาโนด้วยการใช้จุลินทรีย์ท้องถิ่นในประเทศไทย

ชื่อ สกุล ดร. ดวงฤทัย นิคมรัฐ (หัวหน้าโครงการ)
อ. จีระศักดิ์ ธาระจักร์
ดร. ไพศาล การถาง

คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ปี 2557-2558

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยนี้เป็นงานการพัฒนาชีววิธีในการดึงทองกลับมาจากน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตทอง และสกัดทองในภาคอุตสาหกรรม ที่มีความเป็นกรดสูง (pH 0-4) ซึ่งเป็นวิธีที่ควรนำมาทดแทนกระบวนทางไฟฟ้าเคมี และวิธีทางเคมี ที่ก่อให้เกิดมลพิษของสารพิษ ควันพิษของกรด และโลหะหนักของทองแดง ไซยาไนด์ต่อผู้ใช้ และต่อสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้เริ่มที่การศึกษาคัดแยกและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปที่อยู่ในน้ำสกัดทองที่มีความเป็นกรดสูง (pH 2-4) ที่สามารถสร้างทองนาโน จากแหล่งธรรมชาติที่มีทองในประเทศไทย ซึ่งพบว่า *Bacillus* sp. E201 มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของ 16S rDNA ของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* Accession no. FJ755916 อยู่ 95% เชื้อนี้มีคุณสมบัติการสร้างทองของเชื้อจุลินทรีย์ ในสารละลายนอกเซลล์ได้ดีภายใน 3 วัน และสามารถสังเคราะห์ทองนาโนจากสารละลายทอง 1 mM $HAuCl_4{\cdot}3H_2O$ ได้น้ำหนักทองแห้ง yield สูงสุดที่ 75.3% คือปริมาณ 0.5115 กรัม และมีศักยภาพทนสภาวะความเป็นกรด โดยสามารถดึงทองจากน้ำสารละลายที่ใช้สกัดทองได้หลังจากการปั่นแยกและกรอง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าชีววิธีที่ได้สามารถนำไปพัฒนาในอุตสาหกรรมการผลิตทอง และอุตสาหกรรมเครื่องประดับ

คำสำคัญ : ทองนาโน, *Bacillus* sp., ขบวนการคัดแยกทอง

Research title **The Development and Study of Nanogold Particle Biosynthesis using Local Microorganisms in Thailand**

Author Dr. Duongruitai Nicomrat

Mr. Jirasak Tharajak

Dr. Paisan Kanthang

Faculty Science and Technology

Year 2014-2015

ABSTRACT

The study is the development of biological methods for extracting gold from the effluents of the gold processing and gold extraction in the industries where has a very high acidity (pH 0-4). This method should be used to replace the electrochemical process and chemical method which cause the pollution of toxic substances, acid fumes and heavy metals of copper cyanide to the environments. The research started at the characterization and identification of microorganisms presented in gold contaminated water in natural source where is highly acidic (pH 2-4) and it could synthesize nanogold particles. The bacteria *Bacillus* sp. E201 were identified from this source and it showed its 16S rDNA gene with similarity of 95% to bacteria *Bacillus thuringiensis* accession no. FJ755916. It could create gold in the solution outside the cells within three days Form 1 mM $HAuCl_4 \bullet 3H_2O$ solution, the bacterial dry weight could yield 75.3% with the amount of 0.5115 grams. It could be able to withstand acidic conditions and harvest gold from the gold extraction solution after centrifugation and filtration. So this developed biological method could be developed to apply in the industrial production of gold and jewelry industry.

Keywords : Nanogold particles, *Bacillus* sp., Gold extraction process

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการพัฒนาปรับปรุงการสร้างทองระดับนาโน ด้วยการใช้จุลินทรีย์ท้องถิ่น เป็นงานที่ได้จัดทำโดยทีมงานวิจัยที่มีความมุ่งหมายที่ต้องการพัฒนากระบวนการารดึงทองกลับจากสิ่งแวดล้อมในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตทองโดยเน้นใช้วิธีของชีววิธี ซึ่งเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อย่างประหยัด ไม่เป็นพิษ อย่างง่าย และสามารถนำไปใช้ในภาคอุตสาหกรรมได้จริง โดยการเลือกคัดเชื้อจากในธรรมชาติของน้ำเสียที่มีทองละลายอยู่ในสิ่งแวดล้อมค่อนข้างเป็นกรดสูง

งานวิจัยโดยได้รับการสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณรายจ่ายของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร ผ่านหน่วยงานสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

งานนี้สามารถสำเร็จได้จากการช่วยเหลือจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว) และ ดร.สิริภัทร ชมัฒพงษ์ ผู้ให้เชื้อจุลินทรีย์ในการใช้ทดสอบเป็นตัวควบคุม ทั้งชนิดที่ให้ผลบวกและลบ

ขอขอบคุณ นายณัฐพล สัตถาผล นายกรกฎ หาญธัญกรรม นางสาวอภิญญาภรณ์ สายทอง และ นางสาวธนัชชา วงค์แจ้ง ที่ได้ให้ความช่วยในระหว่างการจัดทำ จัดการผลงานวิจัย ติดต่อประสานงานและนำเสนอผลงานของงานวิจัยนี้เป็นอย่างดี

ท้ายสุดทีมผู้วิจัยมีความหวังว่างานวิจัยที่ได้นำเสนอนี้จะสามารถเป็นประโยชน์ต่อนักวิจัย ผู้อ่านที่สามารถได้แนวคิด แนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการผลิตทองนาโน หรือใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหากรรมต่อไป

ทีมผู้วิจัย

สารบัญ

เรื่อง	**หน้า**
บทคัดย่อ	(ก)
Abstract	(ข)
กิตติกรรมประกาศ	(ค)
สารบัญ	(ง-ช)
สารบัญตาราง	(ซ)
สารบัญภาพ	(ญ)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	4
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	4-5
1.4 สมมุติฐานของโครงการวิจัย	6
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
1.6 ระยะเวลาการดำเนินงาน	7-8
1.7 กรอบการดำเนินงาน	8
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ความสำคัญของอนุภาคนาโนทอง (AuNPs)	9-11
2.2 ชนิดและประเภทจุลินทรีย์ที่สร้างทองนาโน AuNPs	15
2.3 อัลลอยด์ทองนาโน	15
2.4. คุณสมบัติและลักษณะของอนุภาคทองนาโน	15-16
2.5. กลไกการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของจุลินทรีย์	16-17
2.6. การประยุกต์ใช้ microbe ในการสังเคราะห์อนุภาคทองนาโน	17
2.7. การจดสิทธิบัตรของการสังเคราะห์อนุภาคทองนาโน	17
2.8 การดึงทองกลับจากของเหลือทิ้งในอุตสาหกรรมด้วยหลักการสังเคราะห์อนุภาคทองนาโน	17-21
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	21-22

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการ 23

3.1. การคัดเลือกเชื้อจุลินรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิดทองนาโน 24

3.2. การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างทองนาโนได้ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล ของ 16S rDNA genes 24

3.3. อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างทองนาโน 24

3.4. การสังเคราะห์ การทดสอบความสามารถในการสร้าง และการคัดแยกทองนาโนจากจุลินทรีย์ 24

3.5. การพัฒนากระบวนการแยกทองนาโนออกจากสิ่งแวดล้อม 25-26

บทที่ 4 สรุปผลและข้อเสนอแนะ

4.1. ศึกษาและ คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างทอง จากแหล่งธรรมชาติ 27-29

4.2. พัฒนาเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติสามารถสร้างทองในระดับนาโนให้มีศักยภาพทนต่อสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษได้ และสร้างอนุภาคทองระดับนาโนที่ผิวนอกเซลล์ 29-33

4.3. จำแนก ชนิดของสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างทองในระดับนาโนที่ได้คัดเลือกมา ด้วยวิธีทางชีวเคมี และด้วยหลักการของความเกี่ยวเนื่องของสารพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธีของชีวโมเลกุล 33-34

4.4. พัฒนาขั้นตอนการเพิ่มผลผลิตการสร้างทองของเชื้อจุลินทรีย์ ที่สร้างทองในระดับนาโนที่ได้ ให้มีประสิทธิภาพ ให้ได้จำนวนมาก สม่ำเสมอ ด้วยการปรับปรุงขั้นตอนการเลี้ยง การเก็บคัดแยกอนุภาคทองระดับนาโน 34-35

4.5. พัฒนาทดลองใช้จุลินทรีย์ที่ได้ในการดึงทองกลับจากน้ำที่เหลือทิ้งจากขบวนการทำทองในระบบอุตสาหกรรมการสกัดทอง ดึงทองกลับคืน 35-37

บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากน้ำเสียเหลือทิ้งจากโรงงานทำทอง 38

5.2 การพัฒนากระบวนการผลิตทองนาโนให้มีประสิทธิภาพ 38

5.3 การพัฒนากระบวนการผลิตทองนาโนจากน้ำทิ้งของโรงงานทำทอง 38-39

5.4 ความเป็นไปได้ในการพัฒนากระบวนการผลิตทองนาโนด้วยชีววิธีของเชื้อ *Bacillus* sp. E201 ในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการดึงทองกลับจากสิ่งแวดล้อม 39

5.5 ข้อเสนอแนะในการพัฒนากระบวนการผลิตทองนาโนด้วยชีววิธีของเชื้อ *Bacillus* sp. E201 39

บรรนาณุกรม (ซ-ฎ)

ภาคผนวก (ฎ)

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

2.1 ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียหลากหลายที่ได้มีการศึกษาด้านศักยภาพในการสร้างทองนาโน 13

2.2 ตัวอย่างเชื้อราที่มีศักยภาพในการสร้างทองนาโน 14

2.3 แผนผังขั้นตอนการดึงทองกลับมาจากของเหลือทิ้งในขบวนการอุตสาหกรรมสกัดทอง 28

4.1 ชนิดของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสร้างทองนาโน ที่คัดแยกได้จากน้ำเหลือทิ้งจากกระบวนการสกัดทองที่โรงงาน จังหวัดฉะเชิงเทรา 35

4.2 ผลและขนาดการเกิดผลึกทองจากกล้องจุลทรรศน์ 100 X ที่ขึ้นอยู่กับการปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง 35

4.3 การสร้างทองโลหะจากกระบวนการสร้างทองนาโนของเชื้อ *Bacillus* sp. E201 ในน้ำเสียจากกระบวนการสกัดทองและตะกอนน้ำทิ้ง 36

สารบัญภาพ

ภาพ **หน้า**

1.1 แผนผังขั้นตอนการดึงทองกลับมาจากของเหลือทิ้งในขบวนการอุตสาหกรรมสกัดทอง 3

1.2 ขั้นตอนกระบวนการทำในการผลิตทองระดับนาโน 5

3.1 ขั้นตอนกระบวนการทำในการผลิตทองระดับนาโนในโครงการวิจัยนี้ 23

4.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* และความสามารถในการสร้างทองนาโน 29

4.2 การคัดแยกเชื้อกลุ่มแบคทีเรียมาจากน้ำเหลือทิ้งจากกระบวนการสกัดทองในโรงงาน (ก) และน้ำสกัดทอง (ข) 30

4.3 เชื้อแบคทีเรียนในกลุ่ม *Bacillli* ที่สามารถเจริญได้ในสารละลาย Au^{2+} 31

4.4 ตัวอย่างเชื้อยีสต์ (ก) Saccharomyces cerevisiae (ข) ผลบวก (positive control ของเชื้อนี้ 31

4.5 ภาพการเกิดกระบวนตะกอนของทองนาโน ในสภาวะของความเป็นกรดและด่าง 32-33

4.6 ความสามารถในการสร้างทองนาโนจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้คัดแยกจากจากน้ำสกัดทอง ด้วยวิธี spectrophotometry 34

4.7 ความสามารถในการคงตัวของทองนาโนที่ผ่านการเก็บไว้นาน 15 วันที่อุณหภูมิห้อง 35

4.8 การสร้างทองของเชื้อ *Bacillus* sp. E201 จากน้ำทองสังเคราะห์ 1 mM $HAuCl_4$ 36

4.9 ความสามารถในการคัดแยกทองจากน้ำเสียจากโรงงานสกัดและขัดทอง ของเชื้อ *Bacillus* sp. E201 ในระยะเวลานาน 15 วัน 37

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การสร้างโมเลกุลทองในระดับนาโนจากชีวโมเลกุลซึ่งเป็นแนวทางใหม่ที่น่าสนใจ พบว่ามีความสำคัญและเป็นประโยชน์ต่อสิ่งชีวิตเนื่องจากขนาดของทองที่ได้มีขนาดเล็ก สามารถประยุกต์นำไปใช้งานได้ในระดับเซลล์ และด้วยคุณสมบัติการกระเจิงของแสงของอนุภาคทองที่มีขนาดเล็ก ที่จะเปลี่ยนไปจากอนุภาคทองที่มีขนาดใหญ่ ทำให้ทองระดับนาโนที่ได้มีสีสรรที่หลากหลาย ทำให้เป็นจุดสนใจของงานอุตสาหกรรมด้านเครื่องประดับที่มีการใช้ทอง และ ด้วยคุณสมบัติที่มีขนาดเล็ก ความเป็นพิษ หรือโทษน้อยของทองระดับนาโนยังได้มีการทดลองนำไปใช้วงการแพทย์ และชีวโมเลกุลอีกมากมาย ทั้งนี้ทองระดับนาโนในรูปแบบผลึกต่างๆกันยังมีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้า กระเจิงแสงที่แตกต่างกัน ยังถูกนำไปใช้ในวงการทางอิเล็กทรอนิกส์เพื่อการเหนี่ยวนำกระแสไฟฟ้า เพื่อความเร็วในการประมวลผลมากขึ้น

เมื่อเร็วนี้มีหลายงานวิจัยในต่างประเทศออกมา ที่เน้นการค้นพบ การพัฒนาการสร้างโมเลกุลสารในระดับนาโนด้วยชีววิธีเป็นที่ได้รับความสนใจกันมากขึ้น ซึ่งนำไปสู่ความสนใจในด้านการค้นหาจุลินทรีย์ต่างๆมากมาย ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา และรวมทั้งพืชต่างๆ ที่มีความสามารถที่แตกต่างกันไปที่จะสามารถสร้างทองได้ในระดับนาโน โลหะเหล่านี้จะสะสมอยู่ในเซลล์ และอาจอยู่ผิวนอกของเซลล์ (1) ประโยชน์ที่ได้คือ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดการปนเปื้อนโลหะหนักในธรรมชาติได้ สามารถประยุกต์การนำทองกลับมาใหม่ ที่สามารถใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องประดับ เพื่อการลดการสูญเสียทองไปในสารละลาย ให้ได้อนุภาคทองโดยเฉพาทองระดับนาโนที่ดี มีคุณภาพเพิ่มมากขึ้น ด้วยการผ่านกระบวนการรีดักชัน (reduction of metal ions) จุลินทรีย์เหล่านี้จะต้องมีการถูกทดสอบคัดเลือก เพื่อหาเชื้อที่มีความสามารถในการปรับตัว สามารถทนในสิ่งแวดล้อมที่รุนแรง หลากหลายได้ เช่น ในสิ่งแวดล้อมที่มีโลหะหนักเป็นพิษปนเปื้อนในปริมาณมาก หรือ อยู่ในที่มีอุณหภูมิ ความเป็นกรดด่างที่สูง หรือต่ำมากได้ด้วย

ในปัจจุบันแม้ว่ามีงานวิจัยเกี่ยวกับการพบจุลินทรีย์เหล่านี้มากมายที่สามารถสร้างเงิน หรือทองระดับนาโน แต่ยังขาดงานวิจัยที่แสดงถึงกระบวนการรีดิวซ์โลหะหนักที่ชัดเจน ทั้งนี้การไม่ทราบแน่ชัดถึงหลักการกลไก กระบวนการสร้างทองระดับนาโนทางชีววิทยาของจุลินทรีย์ต่างๆ อันจะส่งผลถึงต่อการลดประสิทธิภาพของขบวนการผลิตสร้างอนุภาคทองระดับนาโนที่ได้ ซึ่งโดยปรกติก็จะแตกต่างกันไป ทั้งปริมาณ คุณภาพ ความบริสุทธิ์ โครงสร้างรายละเอียดระดับเล็กในแต่ละชนิดของจุลินทรีย์ ทั้งนี้แม้กระทั่งเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มจีนัสเดียวกัน แต่ต่างสปีชีส์ ก็พบว่าอาจมีความสามารถในการสร้างทองแตกต่างกันไปในแต่ละกลุ่ม และในแต่ละชนิด ด้วยความหลากหลายในระดับการสร้างทองในระดับนาโนและคุณภาพ และลักษณะโครงสร้าง

ของทองระดับนาโนจึงทำให้ต้องมีงานวิจัยด้านการคัดแยก คัดเลือกหาเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการสร้างทองในระดับนาโนใน เพื่อประยุกต์ใช้ในงานเฉพาะต่างๆขึ้น

ในระบบอุตสาหกรรมเกี่ยวกับทองพบว่า มีงานศึกษาทดสอบ พัฒนาทุกขั้นตอนในการดึงทองกลับมาจากของเหลือทิ้งในอุตสาหกรรม การสกัดทอง และขบวนการของการทำเครื่องประดับทองที่ได้รับความสนใจมานาน ทั้งนี้พบว่ามีการสูญเสียทองในปริมาณมากไปกับของเสีย และการดึงทองกลับมาให้ได้ปริมาณมากทำได้ยาก เนื่องจากองค์ประกอบในรูปทางกายภาพและทางเคมีของทองเจือที่ปนอยู่แตกต่างกัน ตัวอย่างขบวนการสกัดเอาทองกลับคืนมาที่ได้พัฒนามาใช้กันในปัจจุบัน ที่เน้นการสกัดด้วยตัวทำละลายเคมี มีขั้นตอนการทำดังภาพที่ 1.1 (2) ประกอบด้วยหลักการที่เรียกว่า low temperature carbonization และการอบแห้ง แล้วตามด้วยการ leaching ด้วยกรดไนตริก เพื่อกำจัดเงินและโลหะอื่นๆออกไป และในขั้นการ leach อีกครั้ง ด้วย nitro-hydrochloric acid ก่อนที่จะทำการสกัดทองออกมาด้วยตัวทำละลาย diethyl malonate แล้วจึงทำการแยกทองออกจากชั้นส่วนที่เป็น organic phase ด้วยการ reduction ในสารละลายกรด ferrous sulfate solution จะทำให้ได้ตะกอนทองที่มีความบริสุทธิ์ถึง 99.99% วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย ได้มีการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการดึงทองในอุตสาหกรรมอื่นๆ อีก เช่น อุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์ แต่วิธีนี้สามารถดึงทองได้เพียง 97% และในขั้นตอนการทำทั้งหมดไม่เป็นการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม เพราะใช้สารเคมีอันตราย มีสารพิษโลหะหนักปนเปื้อนแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อม และค่าใช้จ่ายในการดึงทองนั้นกลับมามีราคาสูง

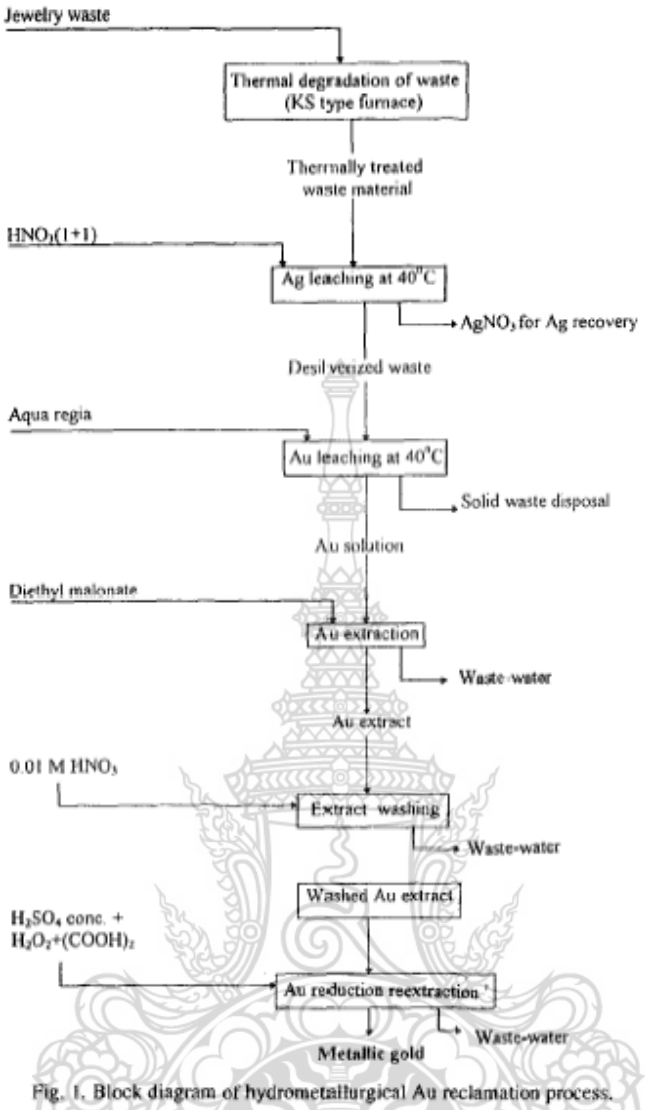


Fig. 1. Block diagram of hydrometallurgical Au reclamation process.

ภาพที่ 1.1 แผนผังขั้นตอนการดึงทองกลับมาจากของเหลือทิ้งในขบวนการอุตสาหกรรมสกัดทอง (1)

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นเหล่านี้จึงเป็นที่มาของการศึกษาวิจัยนี้ซึ่งจะเป็นจุดเริ่มต้นของงานการพัฒนาชีววิธีในการดึงทองกลับมาจากของเหลือทิ้งในอุตสาหกรรมโดยเฉพาะจากน้ำเหลือในขบวนการผลิตทองที่มีความเป็นกรดสูง (pH 0-4) หากใช้กระบวนทางไฟฟ้าเคมีปรกติ ก่อให้เกิดมลพิษของสารพิษ ควันพิษของกรด และโลหะหนักของทองแดง ไซยาไนด์ต่อผู้ใช้ และต่อสิ่งแวดล้อม เมื่อทิ้งลงสู่สิ่งแวดล้อม ดังนั้นเนื่องด้วยมูลค่าสูงของทอง เราจะเน้นที่การศึกษาการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในด้านการสร้างทองในระดับนาโนด้วยการค้นหาเชื้อที่พบทั่วไปในน้ำสกัดทองนั้นมาใช้ในการดึงทองกลับมา เพื่อประยุกต์ช่วยในอุตสาหกรรมด้านเครื่องประดับทองที่ต้องการดึงทองกลับมา งานวิจัยเริ่มตั้งแต่การศึกษาด้านเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปที่อยู่ในน้ำสกัดทองที่มีความเป็นกรดสูง (pH 2-4) ที่สามารถสร้างทองนาโน แล้วทำการคัดแยก และจำแนกเชื้อ

จุลินทรีย์ที่ได้มาจากแหล่งธรรมชาติที่มีทองในประเทศไทย แล้วคัดเลือก พัฒนาคุณสมบัติการสร้างทองของเชื้อจุลินทรีย์ให้ได้ดี มีประสิทธิภาพ การพัฒนาจะเน้นให้ได้จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพที่ทนในสภาวะที่เกี่ยวข้องกับการสกัดทอง เช่น กรด และมีสารพิษ โลหะหนัก เพื่องานการประยุกต์ นำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตทอง อุตสาหกรรมเครื่องประดับ อุตสาหกรรมการสกัดทอง งานการนำทองกลับมาใช้ใหม่ เน้นเพื่อเป็นการปรับปรุงคุณภาพทองที่ได้ ซึ่งเป็นทองระดับนาโนให้ดีขึ้น มีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนั้นงานวิจัยยังมีข้อเด่นคือ จะตรงตามจุดยุทธศาสตร์ของชาติ เพราะสามารถจัดเป็นขบวนการแบบชีววิธีเพราะใช้จุลินทรีย์ไม่ใช่สารเคมี ซึ่งจัดได้ว่าเป็น green technology ซึ่งเป็นการสนับสนุนการอนุรักษ์ธรรมชาติ ช่วยลดปัญหาการก่อพิษของโลหะหนัก และสารเคมีที่ใช้ปนเปื้อนในธรรมชาติ จะเป็นแนวทางของงานที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมที่ทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทยต้องการรณรงค์ให้ใช้

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1. เพื่อคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการสร้างทองในระดับนาโน จากน้ำลกัดทองจากร้านทำทองภายในประเทศไทย

2.2. เพื่อการพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติสามารถสร้างทองในระดับนาโน ให้มีศักยภาพทนต่อสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษได้ โดยจะเลือกตัวที่สร้างอนุภาคทองระดับนาโนที่ผิวนอกเซลล์ โดยทำการเปรียบเทียบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่มีใช้ในปัจจุบัน

2.3. เพื่อจำแนก ชนิดของสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างทองในระดับนาโนที่ได้คัดเลือกมาด้วยวิธีทางชีวเคมี และด้วยหลักการของความเกี่ยวเนื่องของสารพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ของชีวโมเลกุลของ 16S ribosomal Ribonucleic acid (rRNA)

2.4. เพื่อพัฒนาการขั้นตอนการเพิ่มผลผลิตการสร้างทองของเชื้อจุลินทรีย์ ที่สร้างทองในระดับนาโนที่ได้ ให้มีประสิทธิภาพ ให้ได้จำนวนมาก สม่ำเสมอ ด้วยการปรับปรุงขั้นตอนการเลี้ยง การเก็บคัดแยกอนุภาคทองระดับนาโน

2.5. เพื่อการเก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่ได้ให้คงคุณภาพในการสร้างทองในระดับนาโนได้นาน

2.6. เพื่อการทดสอบและนำไปใช้ในการดึงทองกลับจากขบวนการผลิดทอง ด้วยการใช้จุลินทรีย์ที่ได้ไปจัดการกับน้ำทิ้งจากขบวนการสกัดทอง นั่นที่ทองที่ได้คือเป็นทองในระดับนาโน

1.3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้ประกอบด้วยสองส่วน ส่วนที่หนึ่งเน้นการเลือก คัดแยก และจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถทนในสภาพแวดล้อมธรรมชาติที่มีสารโลหะต่างๆ ในธรรมชาติ เช่นจากเหมือง โดยทำการคัดแยกจากน้ำทิ้งจากขบวนการสกัด/ ขัดทอง และการพัฒนาให้เชื้อมีศักยภาพในการผลิตทองนาโน โดยเน้นความสามารถที่จะ

สร้างทองออกมาและสามารถคัดแยกทองออกจากสิ่งแวดล้อมได้ง่าย โดยมีขอบเขตของการทำงานดังนี้ (แสดงในภาพที่ 1.2)

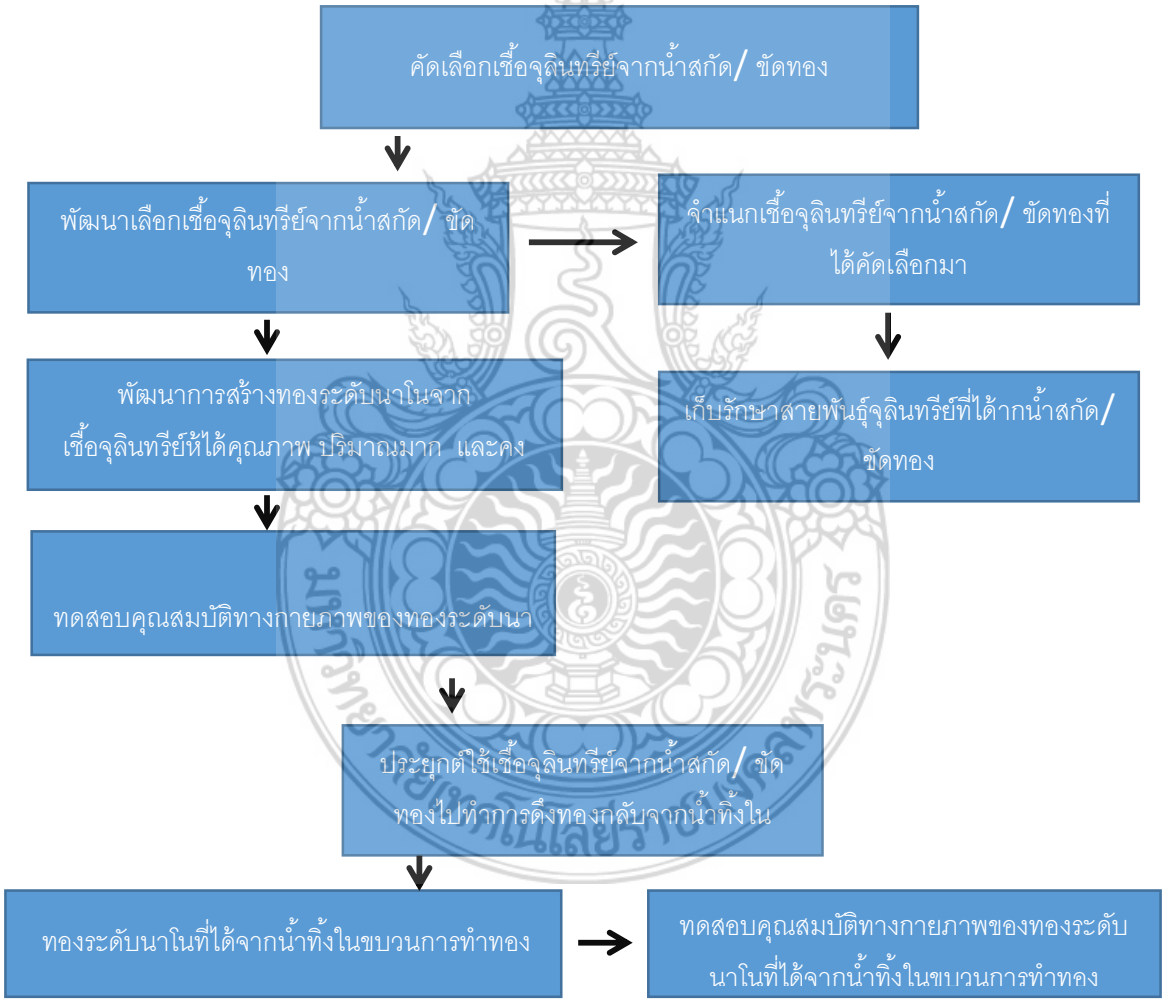
เชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาจากแหล่งน้ำทิ้งของร้านทำทองรูปพรรณ ที่มีการสกัด คัดแยกทอง เชื้อเหล่านี้มีคุณสมบัติในการสังเคราะห์ทองในระดับนาโนนอกเซลล์ เพื่อง่ายในการคัดแยก เซลล์ไม่เกิดการกลายพันธุ์ไม่เปลี่ยนคุณสมบัติในการสร้างทองระดับนาโนเมื่อเลี้ยงไปในหลายช่วงอายุสามารถเลี้ยง เก็บรักษาไว้ได้นาน สร้างทองได้ในปริมาณมาก

การหาแนวทางปรับปรุงคุณภาพของทองที่ได้ให้มีปริมาณมาก มีสภาพคงตัว

การหาทางในการรักษาคงคุณภาพของเชื้อจุลินทรีย์ในการเก็บรักษาไว้เพื่อการนำไปใช้

ความสามารถในการสังเคราะห์สร้างทองระดับนาโนจากน้ำทิ้งในขบวนการสกัดทองในเครือข่ายของร้านทำทองจนได้ทองขนาดใหญ่ มองเห็นได้จากกล้องจุลทรรศน์

การแยกทองออกจากเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการขั้นตอนที่ง่าย สะดวก เพื่อประโยชน์การนำไปใช้ต่อไป



ภาพที่ 1.2 ขั้นตอนกระบวนการทำในการผลิตทองระดับนาโน

1.4. สมมุติฐานของโครงการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ทีมผู้วิจัยได้มีการตั้งสมมุติฐานไว้ดังนี้คือ

4.1 ในทำการคัดเลือกจุลินทรีย์จากธรรมชาติ ให้มีคุณสมบัติในการผลิตอนุภาคทองนาโน เชื้อจุลินทรีย์ต่างๆเหล่านี้ เชื้อมีความทนทาน สามารถก่อสร้างผลึกโลหะนาโนภายในเซลล์ และบ้างที่สร้างนอกเซลล์ในสารละลายโลหะ ในปริมาณ ขนาดที่ต่างกันไป แต่ทองนาโนที่เกิดขึ้นเหล่านี้สามารถรวมตัวกัน ก่อให้เกิดการ

4.2 หากทำการปรับปรุงสภาวะในระหว่างการเลี้ยง และ หรือระยะเวลาการเลี้ยง ทำให้เกิดผลต่อกระบวนการสร้างและการก่อตัวอนุภาคทองนาโนที่แตกต่างกันไป สามารถก่อทำให้เกิดนิวเคลียสของอนุภาคนาโนและขนาดผลึกของอนุภาคโลหะนาโนที่ต่างกันไป ทำให้สามารถจัดการขนาดผลึกได้ตามที่ต้องการ

4.3 การประยุกต์ใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษ ที่มีสภาวะกรดสูงจะได้เชื้อที่มีศักยภาพทนต่อสภาวะที่ต้องการนำไปใช้ ในที่นี้การได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มาจากน้ำสกัดทองจะมีสารโลหะหนักที่เป็นพิษ และมีความเป็นกรดสูง ไม่เกิดปฏิกิริยาเคมีทำให้เกิดความเป็นพิษของสารโลหะเหล่านี้เพิ่มมากขึ้น

1.5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

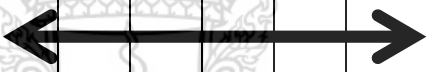
ทีมวิจัยสามารถหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการสร้างทองนาโนที่สามารถประยุกต์นำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ เช่นในอุตสาหกรรมเครื่องประดับ อุจสาหกรรมการสกัดทอง เอาทองกลับคืนมา หรือแม้แต่ในขบวนการปรับปรุงคุณภาพทองเพื่อเป็นเพิ่มมูลค่าของเงินในทางการค้า ความรู้ที่ได้ยังจัดได้ว่าสามารถเป็นองค์ความรู้ เพื่อการพัฒนา ปรับปรุงให้ได้ทองในระดับนาโน ที่มีขนาด รูปร่าง ลักษณะต่างๆกันไป นอกจากนี้ยังก่อให้เข้าใจถึงหลักการ กระบวนการสร้างโลหะระดับนาโนของเชื้อจุลินทรีย์ ขบวนการทางชีวเคมีของเชื้อที่สามารถทนในสภาวะที่โลหะเป็นพิษ ซึ่งจะสามารถนำไปสู่ใน ความเข้าใจกลไก การทำงานของเอนไซม์ในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ เพื่อการพัฒนาให้ได้ปริมาณทองในระดับนาโนเพิ่มมากขึ้น และมีคุณภาพดี

ในขณะเดียวกันที่เชื้อจุลินทรีย์นี้สามารถทนในสภาวะที่เป็นพิษได้ดี เพื่อการต่อยอดของงานวิจัยที่ก่อประโยชน์ต่อสิ่งแวดล้อมในขณะเดียวกัน ที่สามารถประยุกต์ไปใช้ในการทำเหมืองทองในประเทศในขบวนการสกัดเอาทอง โดยเลือกใช้วิธีทางชีววิทยานี้มาช่วย จะสามารถช่วยลดปัญหาของสภาวะเป็นพิษของการใช้สารเคมี โดยเฉพาะการเกิดการไหลของสารละลายโลหะที่ก่อพิษไปสู่สิ่งแวดล้อมได้ (bioleaching) ได้ในอนาคต

นอกจากนี้ผลสัมฤทธิ์ของงานวิจัยเบื้องต้นจะถูกเผยแพร่เป็นบทความทางวิชาการในระดับนานาชาติ เฉพาะที่ตีพิมพ์ในฐานข้อมูลสากล (ISI) อย่างน้อย 1 บทความ และการนำเสนอผลงานผ่าน การ

ประชุมทางวิชาการ จำนวน 2 เรื่องในการประชุมทางวิชาการ ระดับชาติ พร้อมทั้งยังได้ตัวเชื้อจุลินทรีย์อย่างน้อย 2 สายพันธุ์และทราบรายละเอียดของเชื้อเหล่านี้ที่พร้อมจะนำไปใช้ในการพัฒนางานวิจัยโดยการประยุกต์ใช้ในขบวนการดึงทองกลับจากน้ำทิ้งในขบวนการสกัด/ ขัดทองขั้นต่อไป

1.6. ระยะเวลาการดำเนินงาน

กิจกรรม	ระยะเวลาดำเนินการวิจัย (เดือนที่)												นักวิจัยที่รับผิดชอบ
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1. ศึกษาและ คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างทองจากแหล่งธรรมชาติ													อ.ดร.ดวงฤทัย อ.ดร.ไพศาล อ. จีรศักดิ์
2. พัฒนาเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติสามารถสร้างทองในระดับนาโน ให้มีศักยภาพทนต่อสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษได้ และสร้างอนุภาคทองระดับนาโนที่ผิวนอกเซลล์													อ.ดร.ดวงฤทัย อ.ดร.ไพศาล อ. จีรศักดิ์
3. จำแนก ชนิดของสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างทองในระดับนาโนที่ได้คัดเลือกมา ด้วยวิธีทางชีวเคมี และด้วยหลักการของความเกี่ยวเนื่องของสารพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ ของชีวโมเลกุล													อ.ดร.ดวงฤทัย อ.ดร.ไพศาล อ. จีรศักดิ์

4. พัฒนาขั้นตอนการเพิ่มผลผลิตการสร้างทองของเชื้อจุลินทรีย์ ที่สร้างทองในระดับนาโนที่ได้ ให้มีประสิทธิภาพ ให้ได้จำนวนมาก สม่ำเสมอ และทดสอบการทำงานด้วยการนำไปใช้ดึงทองกลับคืนจากน้ำสกัดทอง												อ.ดร.ดวงฤทัย อ.ดร.ไพศาล อ. จีรศักดิ์
5. เขียนผลงานวิจัยเพื่อตีพิมพ์ใน วารสารนานาชาติ และ จัดทำรายงานสรุปผลโครงการวิจัย												อ.ดร.ดวงฤทัย อ.ดร.ไพศาล อ. จีรศักดิ์

1.7 กรอบการดำเนินงาน

ในการศึกษาวิจัยนี้มีขั้นตอนการทำดังนี้

1.71. ศึกษาและ คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างทอง จากแหล่งธรรมชาติ

1.7.2. พัฒนาเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติสามารถสร้างทองในระดับนาโน ให้มีศักยภาพทนต่อสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษได้ และสร้างอนุภาคทองระดับนาโนที่ผิวนอกเซลล์

1.7.3. จำแนก ชนิดของสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างทองในระดับนาโนที่ได้คัดเลือกมา ด้วยวิธีทางชีวเคมี และด้วยหลักการของความเกี่ยวเนื่องของสารพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ ของชีวโมเลกุล

1.7.4. พัฒนาขั้นตอนการเพิ่มผลผลิตการสร้างทองของเชื้อจุลินทรีย์ ที่สร้างทองในระดับนาโนที่ได้ ให้มีประสิทธิภาพ ให้ได้จำนวนมาก สม่ำเสมอ ด้วยการปรับปรุงขั้นตอนการเลี้ยง การเก็บคัดแยกอนุภาคทองระดับนาโน

5. พัฒนาทดลองใช้จุลินทรีย์ที่ได้ในการดึงทองกลับจากน้ำที่เหลือทิ้งจากขบวนการทำทองในระบบอุตสาหกรรมการสกัดทอง ดึงทองกลับคืน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยเรื่องการพัฒนาปรับปรุงการสร้างทองระดับนาโนด้วยการใช้จุลินทรีย์ท้องถิ่นในประเทศ ได้มีงานวิจัยและเอกสารที่เกี่ยวข้อง ที่สามารถแยกตามหัวข้อได้ดังต่อไปนี้

2.1 ความสำคัญของอนุภาคนาโนทอง (AuNPs)

2.2 ชนิดและประเภทจุลินทรีย์ที่สร้างทองนาโน AuNPs

2.3 อัลลอยด์ทองนาโน

2.4. คุณสมบัติและลักษณะของอนุภาคทองนาโน

2.5. กลไกการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของจุลินทรีย์

2.6. การประยุกต์ใช้ microbe ในการสังเคราะห์อนุภาคทองนาโน

2.7. การจดสิทธิบัตรของการสังเคราะห์อนุภาคทองนาโน

2.8 **การดึงทองกลับจากของเหลือทิ้งในอุตสาหกรรมด้วยหลักการสังเคราะห์อนุภาคทองนาโน**

2.9 **งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**

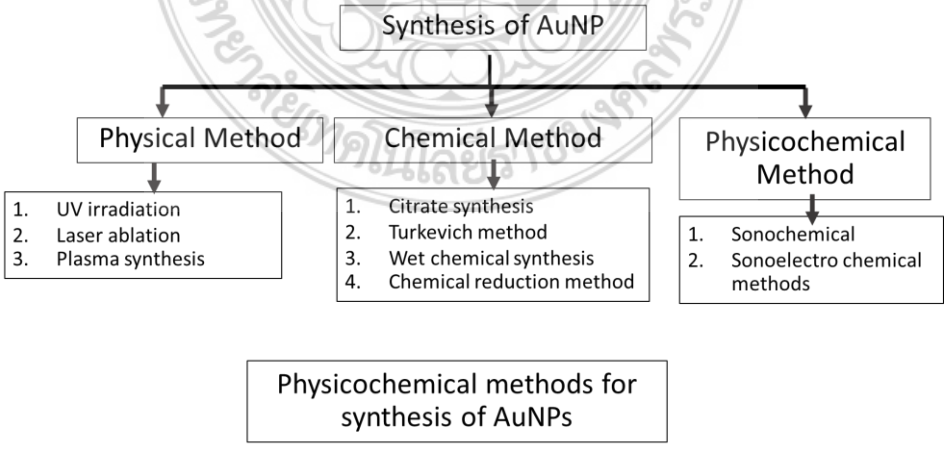
2.1 ความสำคัญของอนุภาคนาโนทอง (AuNPs)

อนุภาคนาโน ได้มีความสำคัญได้มีบทบาทในการทำหน้าที่เป็นวัสดุเสริมแรง โดยมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการปรับปรุงสมบัติทางกลของวัสดุผสม ซึ่งอนุภาคนาโนจะช่วยกระจายและรับภาระทางกลต่างๆ ที่กระทำกับวัสดุผสมที่มีวัสดุโครงสร้างพื้น (Matrix) ที่มีสมบัติทางกลต่ำกว่า และนอกจากนี้อนุภาคของแข็งนาโนยังทำหน้าที่เป็น Grain refiner เป็นนิวเคลียสเทียมในระยะเริ่มต้นของการแข็งตัวของโลหะ ซึ่งอะตอมของวัสดุโครงสร้างพื้นจะเกาะตัวกับนิวเคลียสเทียมและก่อตัวเป็นโครงผลึกก่อนที่จะขยายอาณาเขตการแข็งตัวเป็นของแข็ง

อนุภาคทองในระดับนาโนพบว่าสามารถถูกสังเคราะห์ได้ด้วยวิธีทางกายภาพ เคมี และชีววิทยา โดยมีขนาดที่ได้เล็กและแตกต่างกันไป ได้มีการประยุกต์นำไปใช้ได้ในระดับเซลล์ ใช้ในการตรวจ รักษา และบำบัด

โรค เช่น นำส่งยา การถ่ายยีนส์ การเป็นตัวตรวจสอบติดตามทางชีวภาพในเซลล์เพื่อการมองเห็นสารโมเลกุลในระดับไมโคร และนาโน หรือแม้แต่เพื่อการศึกษาด้านชีววิทยาของขบวนการทำงานต่างๆ ในระดับเซลล์ (3-7) แต่ทั้งนี้ขนาดและปริมาณของการสร้างเป็นทองในระดับนาโนที่แตกต่างกันไปนั้น ยังขึ้นอยู่กับกระบวนการสร้าง ทั้งนี้การก่อตัวขึ้นกับสภาวะขั้นตอนในการเริ่มเกิดนิวเคลียสเป็นสำคัญ และการก่อตัวผลึกโลหะนาโนขนาดใหญ่ในขั้นต่อมา(8-13) การศึกษาเพื่อการปรับปรุงให้เหมาะสมตามที่ต้องการให้ได้ผลึกที่มีขนาดเล็กมารวมตัวกันเป็นสิ่งสำคัญ เพราะความสามารถในการรับภาระทางกลต่างๆ ที่เพิ่มขึ้นของวัสดุที่มีโครงสร้างมาจากระดับนาโนนี้ขึ้นอยู่กับการกระจายตัวของอนุภาคของแข็งนาโน ที่มารวมตัวเป็นโครงสร้างมีโมเลกุลการเรียงตัวที่แตกต่างกันไปในวัสดุโครงสร้างพื้นต่างๆเป็นหลักใหญ่ (26)

AuNPs ได้ถูกพัฒนาขึ้นเป็นโลหะชนิดหนึ่งซึ่งแปลกและน่าสนใจอย่างยิ่ง เมื่อเทียบในกลุ่มของโลหะนาโนต่างๆที่มีอยู่ อันเนื่องด้วยคุณสมบัติการนำไปใช้ที่หลากหลายของการนำไปใช้งานที่มีศักยภาพ เช่น ในการเร่งปฏิกิริยา, ใน optoelectronic ในอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และแม่เหล็ก ในการทำ Bioimaging และการส่งถ่ายยีนต์ โดยจะถูกใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและเป็นเซ็นเซอร์ ในการประยุกต์ใช้ AuNPs ต้องขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่างผลึก และโครงสร้าง [5] ได้มีงานวิจัยหลายกลุ่มได้พยายามผลิต ให้ได้หลายขนาดและรูปร่างโดยการใช้วิธีทางกายภาพและเคมีต่างๆ ด้วยวิธีการ หลากหลายของรูปทรง เช่นแท่งนาโน[6], นาโนทรงกลม เส้นลวดนาโน แผ่นนาโน ทรงลูกบาศก์นาโน แถบนาโน nanobelts และ ขั้วนาโน nanopoles วิธีการเหล่านี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการใช้สารเคมีที่เป็นพิษสูง ใช้อุณหภูมิและความกดดันและที่สำคัญที่สุดอาจทำให้เกิดอนุภาคจะไม่เสถียร หรือเกิดการรวมตัวกัน ทั้งนี้ขึ้นกับการทำปฏิกิริยากับตัวกลางทางชีวภาพหรือทำกับสารชีวโมเลกุล นอกจากนี้วิธีการทางเคมียังก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมอันเนื่องมาจากความเป็นพิษของน้ำยา (รีดิวซ์เช่น borohydrates และอะเซทิลีน) ตัวอย่างวิธีการจำแนกทองนาโนที่ใช้กันในปัจจุบันสามารถแสดงได้ในแผนภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 ขบวนการสร้างทองนาโนที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน (1)

มีงานจากกลุ่มวิจัยหลากหลายได้ใช้ระบบชีวภาพสำหรับการสังเคราะห์ AuNPs เพื่อทดแทนการใช้วิธีทางเคมีและสภาวะที่รุนแรงของพลังงาน ที่ให้ผลผลิตในปริมาณที่น้อย ได้ขนาดไม่สม่ำเสมอตามที่ต้องการ จำเป็นต้องมีการแยก ทำให้ได้ขนาดที่ต้องการที่ยุ่งยาก ด้วยเหตุที่สารเคมีสารละลายที่เหลือและสาร additives สารพิษที่เหลือเหล่านี้จะก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ด้วยวิธีการที่สะอาด เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมได้เข้ามาแทนที่ เพื่อการผลิตอย่างยั่งยืน เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มาก ในราคาที่ถูก สำหรับการผลิตทองนาโนจึงเป็นเรื่องที่ท้าทาย ด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (Biological synthesis) ได้ถูกศึกษาด้วยการศึกษาในสิ่งมีชีวิตหลากหลายเพื่อดูความสามารถในการสร้างทองนาโน (38, 39a) ซึ่งด้วยระบบชีวภาพ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา แอคติโนมัย พบว่ามีความสามารถในการสังเคราะห์ทองนาโนที่ จากขนาดเล็กให้เป็นอนุภาคขนาดใหญ่ [40,41] โดยสามารถควบคุมได้ดีกว่า สามารถได้รูปทรงของทองนาโนที่ได้แน่นอน [44-48] โดยที่จุลินทรีย์สามารถผลิตทองนาโฯภายในและภายนอกเซลล์ แต่ทั้งนี้การสังเคราะห์แบบภายในเซลล์โดยทั่วไปเป็นเรื่องยากเพราะ จำเป็นต้องมีขั้นตอนเพิ่มขึ้น เช่น ultrasonication และการใช้สารละลายที่เหมาะสม ดังนั้นจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์นาโนออกนอกเซลล์จึงเป็นที่นิยมในการศึกษา ค้นหากันอย่างกว้างขวาง มากมาย โดยมีความสนใจมากในการทำเป็นระบบbiofactories ในการสร้างทองนาโนขนาดใหญ่ การใช้จุลินทรีย์ได้รับการยอมรับมากขึ้น เพราะด้วยที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เศรษฐกิจ ประหยัดเวลาและสามารถปรับขนาดได้อย่างง่ายดาย

2.2 ชนิดและประเภทจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างทองนาโน AuNPs

การสร้างทองในระดับนาโนจากเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกคัดแยกจากแหลงน้ำในธรรมชาติที่มี ทองเป็นองค์ประกอบ เช่น ดิน และ แหล่งน้ำต่างๆ เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการสร้างทอง ส่วนมากควรเจริญอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีทองอยู่ด้วย ในการทดลองจะมีการเลี้ยงเชื้อในของเหลวที่มีสารละลาย $HAuCl_4$ เพื่อเป็นแหล่งของทอง ที่จะสามารถเกิดขบวนการรีดักชันของทองในระดับนาโนขึ้นทองที่อาจเกิดในเซลล์หรือนอกเซลล์ขึ้นอยู่กับสภาวะที่เลี้ยง ดังนั้นเพื่อให้เกิดอนุภาคทองได้ปริมาณมาก มีโครงสร้างทางเคมีและขนาดที่หลากหลายตามที่ต้องการ จำเป็นต้องมีการทดลองปรับปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ให้เหมาะสม เช่น ปรับ pH ตั้งแต่สภาวะที่เป็นกรด จนถึง กลาง ทำการเพิ่มหรือลดระยะการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ และเชื้อบางชนิดยังต้องการแสงแดดเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน ต้องปรับอุณหภูมิขึ้นหรือลง และท้ายสุดคือทดลองปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของสารอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ในขบวนการสร้างขนาด และ รูปร่างของทองในระดับนาโนด้วยเชื้อแบคทีเรีย ที่ pH ต่ำ หรือ กลาง จะก่อให้เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจน เช่นใช้ pH1 แทนที่การใช้ pH 7

เชื้อจุลินทรีย์อาจจะมีการสร้างทองขนาดใหญ่ขึ้น และอาจมีการสะสมของทองนอกเซลล์แทนที่จะเกิดในส่วนช่องว่างของ periplasmic membrane กลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างทองนาได้ สามารถแบ่งออกได้ดังต่อไปนี้

2.2.1 แบคทีเรีย

ในบรรดาจุลินทรีย์ prokaryotes ได้รับความสนใจมากที่สุด ในการสังเคราะห์ AuNP [60] ครั้งแรกที่พบว่าจุลินทรีย์เชื้อ Bacillus subtilis 168 สามารถสังเคราะห์ AuNPs ขนาด 5-25 นาโนเมตร รูปทรงแปดด้าน (octahedral) ที่อยู่ภายในผนังเซลล์ และ *Rhodopseudomonas capsulata* สร้าง AuNPs ที่มีรูปทรงกลม ขนาด 10-20 นาโนเมตร ที่มีสารละลายทองเข้มข้นต่ำกว่าและสร้างเส้นลวดนาโน เมื่อมีความเข้มข้น ยังพบรายงานการผลิต AuNPs จาก cyanobacteria, *Plectonema* sp. *Anabaena* sp. *Calothrix* sp. และ *Leptolyngbya* sp. สำหรับภาพรวมของการสังเคราะห์ทองนาโนสามารถแสดงตัวอย่างได้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียหลากหลายที่ได้มีการศึกษาด้านศักยภาพในการสร้างทองนาโน

Table 1
Synthesis of gold nanoparticles by bacteria.

Bacteria	Size (nm)	Shape	Localization
Cyanobacteria			
Plectonema boryanum UTEX 485	–	Cubic	Membrane vesicles
Anabaena sp.	–	–	Intracellular
Calothrix sp.			
Leptolyngbya sp.			
Spirulina platensis	6–10	–	Extracellular
Lyngbya majuscula	<20 nm	Spherical	Intracellular and extracellular
Other glidobacteria			
Sulfate reducing bacteria	<10	–	Cell envelope
Alpha proteobacteria			
Rhodobacter capsulatus	–	–	Plasma membrane
Rhodopseudomonas capsulata	10–20	Spherical	Extracellular
	50–400[a]	Triangular nanoplates	
	50–60	Spherical nanowires	
Gamma proteobacteria			
Escherichia coli	20		
Escherichia coli DH5α	–	Spherical	Cell surface
Pseudomonas aeruginosa	15–30	–	Extracellular
	10–20	Spherical	––
Pseudomonas denitrificans	25–30	Face centered cubic	Cell bound
Shewanella algae	10–20	–	Periplasmic space, bacterial envelope
Shewanella oneidensis	12 ± 5	Spheres	–
Stenotrophomonas maltophilia	40	–	Intracellular
Marinobacter pelagius	10	Triangle, spherical, polygonal	Cell wall bound
Stenotrophomonas sp.	10–50	Multi-shaped	Extracellular
Delta proteobacteria			
Desulfovibrio desulfuricans	20–50	–	Periplasmic space over the cell surface
Gram positive bacteria			
Firmicutes			
Bacillus subtilis 168	5–25	Octahedral	Inside cell wall
Bacillus subtilis	20	–	–
Bacillus licheniformis	10–100	Cubes	–
Bacillus licheniformis			
Bacillus megaterium DO1	1.9 ± 0.8	Spherical	Extracellular
Lactobacillus sp.	20–50	Hexagonal	Intracellular
Geobacillus stearothermophilus	12	Polydispersed, circular	Extracellular
Jeotgalibacillus sp.	5–35		Intracellular cell bound
Actinobacteria			
Rhodococcus	–	–	–
Brevibacterium casei	10–50	–	–
Thermonospora sp.	7–12	Spherical	Extracellular
	8	Spherical	
Rhodococcus sp.	5–15	–	Intracellular on cytoplasmic membrane rather than cell wall.
Arthrobacter sp. 61B	8–40	Spherical	Cell wall bound
Arthrobacter globiformis 151B			

– Not reported.
[a] Sizes of these NPs are mentioned >100 nm as per previous reports.

ที่มา (30)

2.2.2 เชื้อรา

เชื้อรามีแนวโน้มได้รับความสนใจในการนำมาใช้สำหรับการผลิตทองนาโนขนาดใหญ่ เนื่องจากง่ายต่อการเติบโตทั้งในห้องปฏิบัติการและในอุตสาหกรรม เพราะมีการสร้าง หลั่งโปรตีนจำนวนมาก [34,89,90] นอกจากนี้ เชื้อราสามรถสังเคราะห์ ได้แบบชนิดจำเพาะ ได้ดี [34,89] เช่น เชื้อรา *Fusarium oxysporum*,

Verticillium sp. สามารถสังเคราะห์ ทั้งภายในหรือภายนอกเซลล์ [89,91,92] [44] ยีสต์ เช่น *Pichia jadinii* และ *Yarrowia lipolytica* แสดงให้เห็นว่ามีศักยภาพที่ดีสำหรับการสังเคราะห์ AuNPs [93114] ยีสต์มีข้อดีกว่าแบคทีเรียในการผลิตขนาดใหญ่ เพราะง่ายในการจัดการในห้องปฏิบัติการ สามารถสร้างเอน" ไซม์ในปริมาณมาก และเติบโตขึ้นอย่างรวดเร็ว ใช้สารอาหารอย่างง่าย [95] ตัวอย่างเชื้อราที่สามารถสร้างทองนาโนแสดงในตารางที่ 2.2

Fungus	Size (nm)	Shape	Localization
Zygomycetes			
Rhizopus oryzae	10	–	Cell free extract Cell surface
Rhizopus stolonifer	1–5	–	–
Ascomycetes			
Aspergillus niger	10–20	Polydispersed	Extracellular
Aspergillus niger	12.79 ± 5.61	–	Extracellular
Aureobasidium pullulans	29 ± 6	Spherical	Intracellular
Colletotrichum sp.	20–40	Decahedral and icosahedral	–
Fusarium semitectum	25	–	–
Fusarium oxysporum	2–50	–	–
Fusarium oxysporum	128 ± 70[a]	Aggregates	Intracellular
Helminthosporum solani	2–70	Polydispersed	Extracellular
Neurospora crassa	32	Spherical	–
Penicillium brevicompactum	10 ~ 50	Spherical	–
Trichoderma koningii	30–40	Small spheres to polygons	–
Trichoderma koningii	10–14	Spheres	Cell free filtrate
Verticillium sp.	20 ± 8	Spherical Quasihexagonal	Cell wall Cytoplsmic membrane
Verticillium luteoalbum	<10	Spherical Spheres and rods	Intracellular
Cylindrocladium floridanum	19.05	Spherical	Extracellular
Basidiomycetes			
Phanerochaete chrysosporium	10–100	Spherical	Extracellular
Volvariella volvacea	20–150[a]	Spherical,	–
Sclerotium rolfsii	25	Triangles, decahedrals, hexagonals and rods	Extracellular
Yeasts			
Schizosaccharomyces cerevisiae	>100[a]	–	Cell wall
Pichia jadinii	<100	Spherical	Cytoplasm
Yarrowia lipolytica NCIM 3589	15	Hexagonal, triangular	Associated with cell wall
Yarrowia lipolytica	9–27	Spherical	Cell associated
Hansenula anomala	14	–	–
Candida albicans	20–40	Spherical	–
Candida albicans	5	Monodispersed spherical	Cell free extract
Extremophilic yeasts (isolated from acid mine drainage)	30–100	–	On cell surface, extracellular

– Not reported.
[a] Sizes of these NPs are mentioned >100 nm as per previous reports.

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างเชื้อราที่มีศักยภาพในการสร้างทองนาโน ที่มา (30)

2.2.3 ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์เพื่อใช้สังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ

ด้วยความรู้ด้านเทคโนโลยีทางชีวภาพที่ได้รับความสนใจมากขึ้นในขณะนี้ ทำให้ได้มีการพัฒนานำกระบวนการผลิตทองด้วยระบบแบบชีววิธี ที่มีความเป็น มิตรในการสังเคราะห์ AuNPs มาร่วมใช้ในการทำงานที่ละเอียดอ่อน ในการเป็น probe sensor เช่น นำมาผสมรวมกับดีเอ็นเอ, ชั้นของ biolipid, แคปซูลไวรอยด์,

rapidosomes ของแบคทีเรีย, เอนไซม์ของแบคทีเรีย โดยเน้นที่ทองที่สังเคราะห์ได้สามารถใช้เป็นตัวตั้งต้นในการสังเคราะห์ทองนาโน

2.3 Gold nanoalloys

Nanoalloys เป็นกลุ่มที่เกิดขึ้นของธาตุโลหะตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป nanoalloys ที่มีคุณสมบัติที่ไม่โดดเด่น ไม่ซ้ำ มีคุณสมบัติเร่งปฏิกิริยาและสนามแม่เหล็กเพิ่มขึ้น การรวมกันของโลหะสองเกิดขึ้นทั้งโดยการรวมตนเอง หรือการสังเคราะห์ เช่นใช้ fabrication methods ที่แตกต่างกัน การก่อตัวของอนุภาคนาโน bimetallic ที่นำไปสู่ความเสถียรทางกายภาพที่สูงขึ้นและคุณสมบัติที่โดดเด่นเมื่อเทียบกับอนุภาค monometallic การสังเคราะห์ NPS bimetallic ได้รับความสนใจมากในด้านการแพทย์และเซ็นเซอร์ [129,132] ตัวอย่างของเชื้อรา *F. oxysporum* พบว่าสามารถสังเคราะห์ Au-Ag nanoalloy ที่มีขนาด 8-14 นาโนเมตรโดยมีการสังเคราะห์ที่ถูกควบคุมโดย NADH ขึ้นอยู่กับโปรตีนที่ปล่อยออกมาจากเชื้อรา นอกจากนี้ยังได้รับ สาหร่ายสไปรูไลนาสร้าง Ag-Au ขนาด 17-25 นาโนเมตร [67] เชื้อรา *Neurospora crassa* ผลิต Au-Ag อัลลอย bimetallic ที่ผนังเซลล์ด้านนอกเมื่อสัมผัสกับไอออนเงินและทอง [133] *Escherichia coli* สามารถตกตะกอนแพลเลเดียม (Pd) ไอออนที่นำไปสู่การเกิดรีดักชั่นของ Au (III) ให้เกิดในแกนของ Au-Pd [134] แลคโตบาซิลลัสซึ่งจะพบในบัตเตอร์ก็สามารถที่จะสังเคราะห์ Au-Ag alloys ที่เป็นโลหะผสมมีรูปทรงสัณฐานพิเศษ

2.4. คุณสมบัติและลักษณะของอนุภาคนาโนทองคำ (Mohanpuria **et al., 2008)**

2.4.1 คุณสมบัติและลักษณะของทองนาโน

AuNPs มีคุณสมบัติที่น่าสนใจกว่าทองโลหะที่สามารถนำไปใช้ในการแพทย์ ดังนี้คือ เป็นสารเคมีที่ดีและ มั่นคงในทาง mechanochemical

(i) มีคุณสมบัติทางแสงและอิเล็กทรอนิกส์ที่ยอดเยี่ยม

(ii) มีพื้นผิวที่มี functionalization ทำปฏิกิริยาได้ง่าย

(iii) มีพื้นผิว plasmonที่มีผลสะท้อน

(iv) มีกิจกรรมในการเร่งปฏิกิริยาที่แปลกใหม่

(v) มีความ biocompatibility ทนต่อการเกิดออกซิเดชันเป็น crystallizable มี controllable morphology และคุณสมบัติการกระจายตัวของขนาดที่ดี ด้วยวิธีการใหม่ในการปรับปรุงคุณสมบัติของ AuNPs แสดงเฉดสีที่แตกต่างจากสีเหลือง (อนุภาคขนาดใหญ่) เช่น สีแดง (อนุภาคขนาดเล็ก) และแม้กระทั่งสีม่วงขึ้นอยู่กับขนาดของรูปร่างและ monodispersity

เมื่ออยู่ในน้ำ รูปทรงต่างๆ ของ AuNPs สามารถมีความแตกต่างกันโดยสิ้นเชิงทางกายภาพและทางอุณหพลศาสตร์

2.4.2 ความคงตัวของทองนาโน

แม้ว่า AuNPs มีความเสถียรทางกลและเคมีที่ดีเยี่ยม แต่จะรวมตัวของโครงสร้างนาโนในการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่มีสารลดแรงตึงผิว AuNPs สามารถถูกรีดิวซ์ และ มีความเสถียรโดยการใช้สารเคมี เช่น วิตามินซี ซิเตรต ฯลฯ AuNPs ที่มีความเสถียร ได้จากการทำ surface modification ด้วยสารประกอบ thiol [150] และ cysteine และการเคลือบ AuNPsด้วย polyvinylเครื่องดื่มแอลกอฮอล์โพลีไวนิล [152] ยังพบว่าการเก็บ AuNPs ในที่มืดที่ 4°C สามารถทำให้เสถียร อนุภาคสามารถมีความเสถียรสูงถึง 1 เดือน ในที่มีเกลือสูง และที่มีค่า pH 2-11

2.4.3 คุณสมบัติของเลนส์และอิเล็กทรอนิกส์

AuNPs สามารถให้สีสดใส โดย การทำปฏิกิริยากับ แสงในช่วงที่มองเห็น AuNP ทำปฏิกิริยากับแสง ทั้งนี้ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ขนาด และมิติทางกายภาพ เมื่อเร็ว ๆ นี้ ด้วยคุณสมบัติทางเลนส์อิเล็กทรอนิกส์ที่ไม่ซ้ำกัน ได้ถูกนำมาใช้ในการประยุกต์ใช้เทคโนโลยี เช่นตัวนำอิเล็กทรอนิกส์ ตัวเร่งปฏิกิริยา ตัวตรวจสอบปฏิกิริยาพลังแสงอาทิตย์พลังอินทรีย์ คุณสมบัติข อง AuNPด้านนี้จะขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงโดยการเปลี่ยนขนาด รูปร่างเคมีพื้นผิว หรือการรวมตัว

2.5. กลไกการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของจุลินทรีย์

AuNPs เกิดได้จากหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการรีดิวซ์ของไอออน Au^{+3} ไอออน ให้เกิด AuNPs มีสมมติฐานได้ตั้งไว้ว่าเอนไซม์ที่หลั่งมาจากจุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญในการรีดิวซ์ไอออนของโลหะที่นำไปสู่นิวเคลียส NP และการเจริญเติบโตของทองนาโน ในทั้งๆที่มีจำนวนมากของรายงานเกี่ยวกับจุลินทรีย์พึ่ง AuNP ด้วยพารามิเตอร์ทางเคมีกายภาพ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง และสารตั้งต้น พบว่ามีผลต่อการสังเคราะห์ AuNP ภายในเซลล์ ด้วยลักษณะทางกายภาพ ของ AuNPs ที่ถูกรายงาน ว่าพารามิเตอร์เหล่านี้และการเลือกสภาวะการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ มีผลต่อโปรตีนและกรดอะมิโน ในโปรตีน เช่น cysteine, ไทโรซีน และทริปโตเฟน ช่วยสร้าง และรักษาความเสถียรของ AuNPs ยังพบว่ากลุ่มอะมิโน cysteine หรือโปรตีนสามารถผูกกับ AuNPs และทำให้ผิวโปรตีนผูกพันสามารถรักษาเสถียรภาพของพวกเขา มีการพัฒนาในหลอดทดลอง ที่มีAuNPs รูปทรงแปดด้านของขนาด 5-25 นาโน

เมตรเกิดขึ้นในผนังเซลล์ของ *B. subtilis* สาหร่าย Shewanellaสามารถลด Au^{+3} ไอออนในสภาพแวดล้อมที่ไม่ใช้ออกซิเจน ในเชื้อ E. coli และ *Desulfovibrio desulfuricans* โดยการรีดิวซ์ไฮโดรเจน

ก๊าซ (H_2) และใช้ hydrogenases ที่ periplasmic membrane ในการรีดิวซ์ Au^{+3} ไอออนและการสะสมของ AuNPs *E. coli* ใช้ cysteine หรือ thiol ที่ปนในโปรตีน ช่วยเพิ่มทองนาโน ใน *Trichothecium* sp. การสังเคราะห์ AuNPs ให้ได้รูปร่างต่างๆกัน ถูกควบคุมโดยการเขย่า หรือการแช่นิ่งระหว่างการเลี้ยงให้สร้างทองนาโน

2.6. การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ

AuNPs ที่ผลิตมาจากเชื้อจุลินทรีย์ Candida albicans ใช้สำหรับการใช้งานในการแพทย์ เช่น ในการตรวจสอบของโรคมะเร็งตับ และที่ได้จาก *Penicillium brevicompactum* ที่มีประโยชน์ใช้ในการศึกษาผลกระทบพิษของพวกเขากับโรคมะเร็ง

นอกจากนั้นได้มีการพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์หลายกลุ่มที่สามารถสร้างทองในระดับนาโนได้มาในด้านสิ่งแวดล้อม โดยได้มีการทดลองไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมด้านการดึงทองกลับจากน้ำเหลือทิ้ง แทนการใช้วิธีทางเคมีที่เป็นพิษ ส่วนใหญ่ได้มีการเลือกใช้เชื้อรา เพราะสามารถให้ผลผลิตของทองในปริมาณมาก สามารถเจริญเติบโตได้ดี ทนสภาวะความเป็นพิษของโลหะได้ดีมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ที่สามารถให้ปริมาณการเกาะของทองนาโนได้ในปริมาณสูง และอยู่ในระหว่างผนังเซลล์ การจัดการเก็บเซลล์สามารถทำได้ง่ายกว่าชนิดอื่นๆ และไม่มีปัญหาของการดูแลรักษา เพราะทนในสภาวะที่เป็นพิษได้สูง สามารถทำการควบคุมคุณภาพ และขนาดของทองระดับนาโนที่ได้ให้คงที่สม่ำเสมอได้ และเชื้อราเหล่านี้ที่สำคัญต้องม่นใจว่าไม่ก่อพิษต่อสิ่งแวดล้อม แต่สดปัญหามลภาวะพิษของโลหะอื่นๆที่ปนเปื้อนต่อสิ่งแวดล้อมได้ (nonpathogenic fungi)

2.7. การจดสิทธิบัตรของการสังเคราะห์อนุภาคทองนาโน

ได้มีงานด้านการสังเคราะห์ โลหะทองนาโน เช่น การใช้เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*, เชื้อรา *Trichoderma atroviride* และ *Streptomyces* sp. ที่แยกได้จากใบชา แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการสังเคราะห์ AuNPs อนุภาคเหล่านี้ได้ถูกนำมาใช้เพื่อรักษา ควบคุมทางชีวภาพและ biofertilizers เป็นยาต้านจุลชีพ ใช้ควบคุมทางชีวภาพ และรวมถึงการสังเคราะห์ AuNPs คอลลอยด์โดยใช้แบคทีเรียชนิดโปรไบโอติก

2.8. การดึงทองกลับมาจากของเหลือทิ้งในอุตสาหกรรม

เมื่อเร็วนี้มีหลายงานวิจัยในต่างประเทศออกมา ที่เน้นการค้นพบ การพัฒนาการสร้างโมเลกุลสารในระดับนาโนด้วยชีววิธีเป็นที่ได้รับความสนใจกันมากขึ้น ซึ่งนำไปสู่ความสนใจในด้านการค้นหาจุลินทรีย์ต่างๆ มากมาย ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา และรวมทั้งพืชต่างๆ ที่มีความสามารถที่แตกต่างกันไปที่จะสามารถสร้างทองได้ในระดับนาโน โลหะเหล่านี้จะสะสมอยู่ในเซลล์ และอาจอยู่ผิวนอกของเซลล์ ประโยชน์ที่ได้คือ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดการปนเปื้อนโลหะหนักในธรรมชาติได้ สามารถประยุกต์การนำทองกลับมาใหม่ ที่สามารถใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องประดับ เพื่อการลดการสูญเสียทองไปในสารละลาย ให้ได้อนุภาคทองโดยเฉพาทองระดับนาโนที่ดี มีคุณภาพเพิ่มมากขึ้น ด้วยการผ่านกระบวนการรีดักชัน (reduction of metal ions) จุลินทรีย์เหล่านี้จะต้องมีการถูกทดสอบคัดเลือก เพื่อหาเชื้อที่มีความสามารถในการปรับตัว สามารถทนในสิ่งแวดล้อมที่รุนแรง หลากหลายได้ เช่น ในสิ่งแวดล้อมที่มีโลหะหนักเป็นพิษปนเปื้อนในปริมาณมาก หรือ อยู่ในที่มีอุณหภูมิ ความเป็นกรดด่างที่สูง หรือต่ำมากได้ด้วย

ในปัจจุบันแม้ว่ามีงานวิจัยเกี่ยวกับการพบจุลินทรีย์เหล่านี้มากมายที่สามารถสร้างเงิน หรือทองระดับนาโน แต่ยังขาดงานวิจัยที่แสดงถึงกระบวนการรีดิวซ์โลหะหนักที่ชัดเจน ทั้งนี้การไม่ทราบแน่ชัดถึงหลักการกลไก กระบวนการสร้างทองระดับนาโนทางชีววิทยาของจุลินทรีย์ต่างๆ อันจะส่งผลถึงต่อการลดประสิทธิภาพของขบวนการผลิตสร้างอนุภาคทองระดับนาโนที่ได้ ซึ่งโดยปรกติก็จะแตกต่างกันไป ทั้งปริมาณ คุณภาพ ความบริสุทธิ์ โครงสร้างรายละเอียดระดับเล็กในแต่ละชนิดของจุลินทรีย์ ทั้งนี้แม้กระทั่งเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มจีนัสเดียวกัน แต่ต่างสปีชีส์ ก็พบว่าอาจมีความสามารถในการสร้างทองแตกต่างกันไปในแต่ละกลุ่มและในแต่ละชนิด ด้วยความหลากหลายในระดับการสร้างทองในระดับนาโนและคุณภาพ และลักษณะโครงสร้างของทองระดับนาโนจึงทำให้ต้องมีงานวิจัยด้านการคัดแยก คัดเลือกหาเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการสร้างทองในระดับนาโนใน เพื่อประยุกต์ใช้ในงานเฉพาะต่างๆขึ้น

ในระบบอุตสาหกรรมเกี่ยวกับทองพบว่า มีงานศึกษาทดสอบ พัฒนาทุกขั้นตอนในการดึงทองกลับมาจากของเหลือทิ้งในอุตสาหกรรม การสกัดทอง และขบวนการของการทำเครื่องประดับทองที่ได้รับความสนใจมานาน ทั้งนี้พบว่ามีการสูญเสียทองในปริมาณมากไปกับของเสีย และการดึงทองกลับมาให้ได้ปริมาณมากทำได้ยาก เนื่องจากองค์ประกอบในรูปทางกายภาพและทางเคมีของทองเจือที่ปนอยู่แตกต่างกัน ตัวอย่างขบวนการสกัดเอาทองกลับคืนมาที่ได้พัฒนามาใช้กันในปัจจุบัน ที่เน้นการสกัดด้วยตัวทำละลายเคมี มีขั้นตอนการทำ ประกอบด้วยหลักการที่เรียกว่า low temperature carbonization และการอบแห้ง แล้วตามด้วยการ leaching ด้วยกรดไนตริก เพื่อกำจัดเงินและโลหะอื่นๆออกไป และในขั้นการ leach อีกครั้งด้วย nitro-hydrochloric acid ก่อนที่จะทำการสกัดทองออกมาด้วยตัวทำละลาย diethyl malonate แล้วจึงทำการแยกทองออกจากชั้นส่วนที่เป็น organic phase ด้วยการ reduction ในสารละลายกรด

ferrous sulfate solution จะทำให้ได้ตะกอนทองที่มีความบริสุทธิ์ถึง 99.99% วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย ได้มีการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการดึงทองในอุตสาหกรรมอื่นๆ อีก เช่น อุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์ แต่วิธีนี้สามารถดึงทองได้เพียง 97% และในขั้นตอนการทำทั้งหมดไม่เป็นการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม เพราะใช้สารเคมีอันตราย มีสารพิษโลหะหนักปนเปื้อนแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อม และค่าใช้จ่ายในการดึงทองนั้นกลับมามีราคาสูง

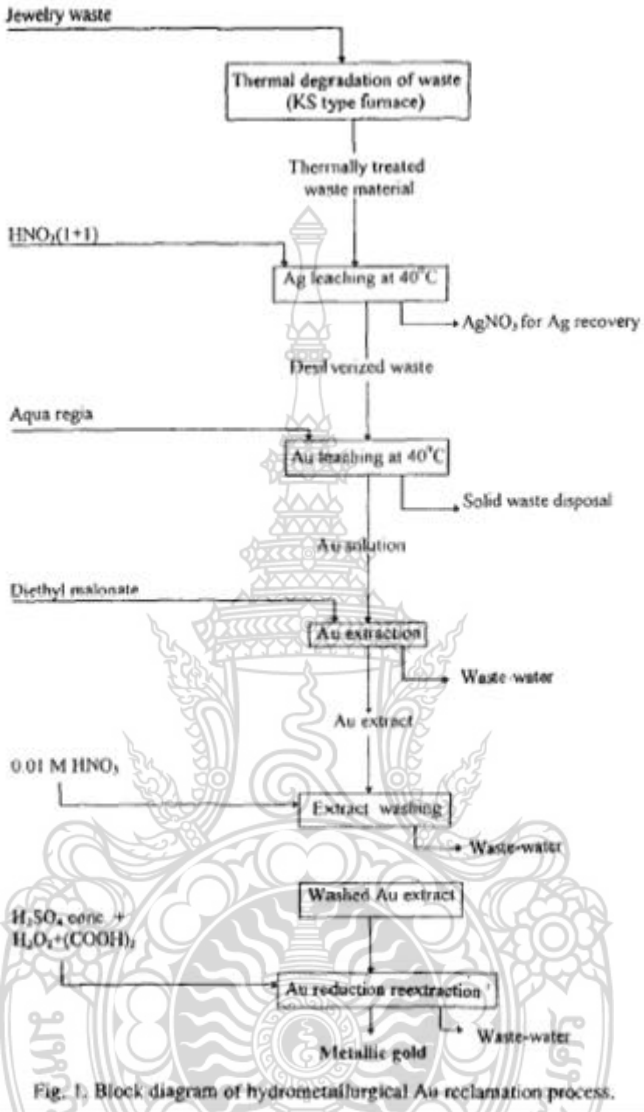


Fig. 1. Block diagram of hydrometallurgical Au reclamation process.

ภาพที่ 2.3 แผนผังขั้นตอนการดึงทองกลับมาจากของเหลือทิ้งในขบวนการอุตสาหกรรมสกัดทอง (1)

ที่มา Mohanpuria et al., 2008

จุดเริ่มต้นของงานการพัฒนาชีววิธีในการดึงทองกลับมาจากของเหลือทิ้งในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะจากน้ำเหลือในขบวนการผลิตทองที่มีความเป็นกรดสูง (pH 0-4) ได้รับความสนใจ เนื่องจากหากใช้กระบวนทางไฟฟ้าเคมีปรกติ ก่อให้เกิดมลพิษของสารพิษ ควันพิษของกรด และโลหะหนักของทองแดง ไซยาไนด์ต่อผู้ใช้และต่อสิ่งแวดล้อม เมื่อทิ้งลงสู่สิ่งแวดล้อม (ภาพที่ 2.3) ดังนั้นเนื่องด้วยมูลค่าสูงของทอง เราจะเน้นที่การศึกษาการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในด้านการสร้างทองในระดับนาโนด้วยการค้นหาเชื้อที่พบทั่วไปในน้ำสกัดทองนั้นมาใช้ในการดึงทองกลับมา เพื่อประยุกต์ช่วยในอุตสาหกรรมด้านเครื่องประดับทองที่ต้องการดึงทองกลับมา งานวิจัยเริ่มตั้งแต่การศึกษาด้านเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปที่อยู่ในน้ำสกัดทองที่มีความเป็นกรดสูง (pH 2-4) ที่สามารถสร้างทองนาโน แล้วทำการคัดแยก และจำแนกเชื่อจุลินทรีย์ที่ได้มาจากแหล่งธรรมชาติที่มีทองในประเทศไทย แล้วคัดเลือก พัฒนาคุณสมบัติการสร้างทองของเชื้อจุลินทรีย์ให้ได้ดี มีประสิทธิภาพ การพัฒนาจะเน้นให้ได้จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพที่ทนในสภาวะที่เกี่ยวข้องกับการสกัดทอง เช่น กรด และมีสารพิษ โลหะหนัก เพื่องานการประยุกต์ นำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตทอง อุตสาหกรรมเครื่องประดับ อุตสาหกรรมการสกัดทอง งานการนำทองกลับมาใช้ใหม่ เน้นเพื่อเป็นการปรับปรุงคุณภาพทองที่ได้ ซึ่งเป็นทองระดับนาโนให้ดีขึ้น มีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนั้นงานวิจัยยังมีข้อเด่นคือ จะตรงตามจุดยุทธศาสตร์ของชาติ เพราะสามารถจัดเป็นขบวนการแบบชีววิธีเพราะใช้จุลินทรีย์ ไม่ใช่สารเคมี ซึ่งจัดได้ว่าเป็น green technology ซึ่งเป็นการสนับสนุนการอนุรักษ์ธรรมชาติ ช่วยลดปัญหาการก่อพิษของโลหะหนักและสารเคมีที่ใช้ปนเปื้อนในธรรมชาติ จะเป็นแนวทางของงานที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมที่ทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทยต้องการรณรงค์ให้ใช้

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แม้ว่าในปัจจุบันมีการพบจุลินทรีย์เหล่านี้มากมายที่สามารถสร้างทองระดับนาโนได้ แต่ยังไม่มีการพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตทองให้มีประสิทธิภาพ เพื่อการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดถึงกลไก กระบวนการสร้างทองระดับนาโนทางชีววิทยาของจุลินทรีย์ต่างๆ ได้แน่ชัด ซึ่งอาจแตกต่างกันไปในแต่ละกลุ่ม และในแต่ละชนิด แต่หลักการโดยรวมอาจเป็นไปได้ว่ากระบวนการสร้างทางชีววิทยาของโลหะทองในระดับนาโนเกี่ยวข้องกับการรีดักชันของอิออนเงินของขบวนการรีดักชันของระบบเอนไซม์ในที่เกี่ยวข้องกับโลหะประเภท electron shuttle enzymatic metal reduction ซึ่งอาจเป็นเอนไซม์ชนิด nitrate reductase ที่สามารถรีดิวซ์ อิออนเงิน (silver ions, Ag+) ไปเป็นโลหะเงิน (metallic silver, Ag^0) ด้วยไนเตรทอิออน (nitrate ions) (14) โดยที่ทีมวิจัยของ Duran เสนอว่ากลไกการสร้างเงินในระดับนาโนทางชีววิทยาจากเชื้อรา Fusarium oxysporum ว่าเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ประเภท enzymatic electron shuttle system ที่สามารถสร้างเงินอิออนและสามารถสร้างโลหะเงินระดับนาโนในที่สุด (15)

และพบว่าเชื้อนี้ปล่อยเอนไซม์ NADH dependent reductase มาในสารละลายอาหารที่ใช้เลี้ยงและพบอนุภาคทองระดับนาโนแบบนอกเซลล์ของเชื้อราชนิดนี้ นอกจากนี้มีงานที่สนับสนุนการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับกลไกการสร้างโลหะระดับนาโนจากเชื้อราโดยเฉพาะโลหะเงิน และ ทองระดับนาโนในที่คล้ายลึงกันอีกมากมาย (16-17) โดยที่เชื้อราสามารถสร้างโลหะนาโนได้ในปริมาณมาก เพราะเซลล์มีปริมาณมาก และสามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในระดับห้องทดลองและในระดับอุตสาหกรรม เชื้อราและ actinomycete ในกลุ่มนี้ เช่น *Fusarium oxysporum*, *Verticillium* sp., *Thermomonospora* sp., *Rhodococcus* sp. พบว่าสามารถสร้างสารโลหะนาโนทั้งใน และ นอกเซลล์ (8-10).

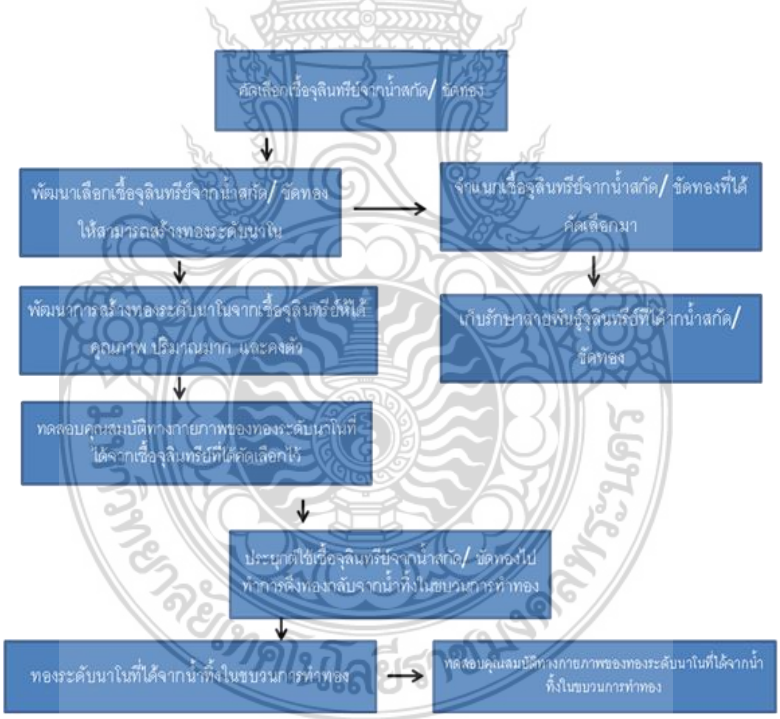
ยังมีการพบว่าระบบการทำงานของเอนไซม์รีดักชันคล้ายๆ กันในแบคทีเรียที่มีกลไกในการสร้างโลหะเงิน และทองระดับนาโน เช่น ทีมพบว่า *Enterobacteria* สร้างเงินระดับนาโน จากงานวิจัยของ Shahverdi (18) และ *Rhodopseudomonas capsulata* ที่สามารถรีดิวซ์สารละลายทองให้เป็นทองระดับนาโนได้จากทีมวิจัยของ He (18) และทีม Husseiny ที่ใช้ *Psuedomonas aeruginosa* ในการสร้างทองระดับนาโน (20) และเมื่อเร็วนี้ที่ทีมวิจัยของ Yogesh ได้เสนองานวิจัยรายละเอียดของกลไกการรีดักชันของทองนาโน จากเชื้อแบคทีเรีย *Stenotrophomanas maltophilia* โดยพบว่ามีโดยการทำงานของเอ็นไซม์ NADPH-dependent reductase ที่สามารถรีดิวซ์ Au^{3+} ไปเป็น Au^{0} ด้วยการใช้ ฟอสเฟตอิออน (phosphate ions) ผ่านกระบวนการรีดักชันของโลหะ (electron shuttle enzymatic metal reduction process) (21)

โครงสร้างของทองในระดับนาโนพบว่ามีความแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ การค้นพบว่า *Bacillus licheniformis* มีโครงสร้างของทองในระดับนาโนเป็นรูป nanocubes ด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบ Scanning electron microscope ประกอบกับ การใช้ UV–Vis spectra และ XRD ในการช่วยยืนยันโครงสร้างของทองในระดับนาโน (22) อย่างไรก็ตามจากการวิจัยของทีมวิจัยของ Lovely ได้แสดงให้เห็นว่า อนุภาคการสร้างทองระดับนาโนจากจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับชนิดจุลินทรีย์โดยเฉพาะ แต่ไม่พบในสายพันธุ์ที่แม้ว่าจะมีเกี่ยวข้องกันทางพันธุกรรม เพราะ *P. islandicum* สามารถรีดิวซ์ Au3+ อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน คือ *P. aerophilum* ที่ไม่สามารถทำได้ (23)

บทที่ 3

ขั้นตอนการทดลอง

ในการศึกษาเรื่องการพัฒนาปรับปรุงการสร้างทองระดับนาโน ด้วยการใช้จุลินทรีย์ท้องถิ่นในประเทศ ทีมผู้วิจัยได้มีขั้นตอนวิธีการดำเนินงาน โดยอาศัยหลักการ ที่ประกอบด้วยการศึกษาและ คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างทอง จากแหล่งธรรมชาติ การพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติสามารถสร้างทองในระดับนาโน ให้มีศักยภาพทนต่อสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษได้ และสร้างอนุภาคทองระดับนาโนที่ผิวนอกเซลล์ การจำแนก ชนิดของสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างทองในระดับนาโนที่ได้คัดเลือกมา ด้วยวิธีทางชีวเคมีและด้วยหลักการของความเกี่ยวเนื่องของสารพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ ของชีวโมเลกุล การพัฒนาขั้นตอนการเพิ่มผลผลิตการสร้างทองของเชื้อจุลินทรีย์ ที่สร้างทองในระดับนาโนที่ได้ ให้มีประสิทธิภาพ ให้ได้จำนวนมาก สม่ำเสมอ ด้วยการปรับปรุงขั้นตอนการเลี้ยง การเก็บคัดแยกอนุภาคทองระดับนาโน และท้ายสุดคือการพัฒนาทดลองใช้จุลินทรีย์ที่ได้ในการดึงทองกลับจากน้ำที่เหลือทิ้งจากขบวนการทำทองในระบบอุตสาหกรรมการสกัดทอง ดึงทองกลับคืน ซึ่งสามารถแสดงได้ในแผนภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนกระบวนการทำในการผลิตทองระดับนาโนในโครงการวิจัยนี้

3.1. การคัดเลือกเชื้อจุลินรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตทองนาโน

ในการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการสร้างทองนาโน (AuNPs) ตัวอย่างน้ำตะกอนที่ได้จากน้ำทิ้งในโรงงานทำทอง จากขั้นตอนการผลิตทองได้ถูกเก็บไว้ในหลอดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากจำนวนตัวอย่าง 1 mL ละลายใน 50 mM สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7.0 และเจือจางลดลงไปเรื่อยๆใน 50 มิลลิฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) และลงใน plate agar ชนิด Luria-Bertani ที่มี tryptone 10 กรัม Yeast extract 5 กรัม NaCl 10 g/L agar 15 g/L โดยถูกบ่มไว้ที่ 37°C นาน 2-3 วัน หลังจากนั้นเมื่อเห็นโคโลนีของแบคทีเรีย จึงทำการ subculture ในอาหารเหลวเดิม เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ จากการคัดเลือกได้ 20 สายพันธุ์ที่สามารถสังเคราะห์ AuNPs โดยพบว่า 3 สายพันธุ์ของBacillus คือ E2, E154, E201 ที่ผลิต AuNPs ออกนอกเซลล์ (extracellular) ภายในระยะเวลาสั้นๆ สายพันธุ์แบคทีเรียดังกล่าวจะถูกตรวจสอบสายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลของยีนต์ 16S rDNA

3.2. การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างทองนาโนได้ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลของ 16S rDNA genes

ในการศึกษาจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล และคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาได้ถูกดำเนินการตามหลักการจำแนกของเชื้อแบคทีเรีย ตามคู่มือของ Bergey และของเทคนิค 16s rRNA และลำดับดีเอนเอ จากการเทียบลำดับของบางส่วนของ 16S rDNA เทียบกับ 16S rDNA database ที่มี Genebank accession no. FJ755916 ด้วยการดูความคล้าย homology ของลำดับดีเอเอที่มีมากตั้งแต่ 90 ถึง 99% แต่อย่างไรก็ตามเนื่องด้วยชิ้นส่วนนี้ได้ความยาวประมาณ 700 bp ทำให้ไม่สามารถระบุได้อย่างแม่นยำ จึงใช้คร่าวๆของกลุ่ม genus ในที่นี้ได้ *Bacilllus* sp. clone ที่ 201

3.3. อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างทองนาโน

อาหารและวิธีการเลี้ยงเพื่อให้เชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตและการเตรียมอาหารได้ถูกดำเนินการตามวิธีการที่ใช้คัดแยกแบคทีเรีย มีรายละเอียดดังนี้ อาหารที่เตรียมเพื่อการเลี้ยงแบบ aerobic condition ที่ 37°C ใน Luria- Broth (LB) เป็นเวลา 2 วัน เซลล์ที่ถูกเก็บเกี่ยวโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (pH 7.3) สองครั้ง และละลาย pellet ของเซลล์ ด้วยสารลละลายเดิม เจือจางจำนวนเซลล์ตามที่ต้องการด้วยการวัดค่าการดูดกลืนของแสงที่ 600 nm ปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ 10^7-10^8 cell/mL ตามที่ต้องการด้วยการดูการดูดกลืนของแสงด้วย spectrophotometer ที่ 600 nm แล้วทำการแยกด้วยการปั่นที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ในขวด 250 มล ที่ 37°C การนับการเจริญเติบโตด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ระยะของการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ตัวเชื้อแบคทีเรียหลังจากการแยกแล้วถูกเตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB slants และส่วนหนึ่งเก็บรักษา

ไว้ในสารละลาย glycerol ที่ผ่านการ sterile ในอัตราส่วน 2 ใน 3 เก็บไว้ที่ตู้เย็น -70°C แล้วถูกดึงมาเพื่อใช้ในการศึกษานี้

3.4. การสังเคราะห์ การทดสอบความสามารถในการสร้าง และการคัดแยกทองนาโนจากจุลินทรีย์

ในการสังเคราะห์สารของ AuNPs ของเชื้อ *Bacillus* sp. E201 ด้วยการใส่เชื้อที่ความเข้มข้นช่วง 10^8-10^9 Log Unit ในขวดที่มี LB broth ผ่านการฆ่าเชื้อและขวดถูกบ่มที่ 37°C เป็น เวลา 24 ชั่วโมง เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที แล้วนำ broth มาผ่านการหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 rpm และสารละลายถูกใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโน AuNPs โดยมีการเตรียม 3 ขวด โดยขวดที่ 1 มีสารละลาย 50 uM และ 1 mM $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ และขวดที่ 2 และ 3 ใส่แต่สารละลายที่แยกเซลล์แบคทีเรียออกแล้ว และ ใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่สารละลายทอง1 mM $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ $\cdot 3H_2O$ แล้วทำการบ่มตามระยะเวลาที่ทดสอบ เช่น 15, 30 นาที และ นานจนถึง 15 วัน ที่อุณหภูมิต่างๆกัน การตรวจสอบดูการสังเคราะห์สารของ AuNPs โดยการดูด้วยสายตาสำหรับการเปลี่ยนแปลงสีของกลาง จนเปลี่ยนสีที่ชัดเจน จากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลและโดยการวัดของการดูดกลืนของแสง โดย AuNPs ในสเปกตรัม UV-Vis ด้วยหลักการหยดแบบ nanodrop และการใช้ cuvetter quart ที่มี 10 mm-optical-path-length ขนาดบรรจุ 2 mL ตัวอย่างแล้วดู peak ของการดูดกลืนของแสงที่อยู่ในช่วง 450-600 nm เพื่อเป็นการยืนยันการสังเคราะห์อนุภาคนาโนได้รับการยืนยัน ที่มี peak การดูดกลืนของแสงสูงสุดที่ 520-525 nm ทั้งยังใช้ในการตรวจสอบดูความคงตัวของทองนาโนในสารละลาย Ascorbic acid และตรวจสอบยืนยันด้วยการดูทองนาโนจากกล้องจุลทรรศน์ (Light Microscope) ด้วยหัว 100X

3.5. การพัฒนากระบวนการแยกทองนาโนออกจากสิ่งแวดล้อม

3.5.1 การพัฒนากระบวนการแยกทองนาโนจากน้ำทองสังเคราะห์

เชื้อ *Bacillus* sp. E201 ที่มาจาก stock เก็บไว้ถูกนำมาเลี้ยงให้ได้ระยะ log phase 24 ชั่วโมง เขย่าที่ ในอาหารเลี้ยง LB broth จำนวน 5 ขวดใน Erynmeryer flask ปริมาตร 500 mL ต่อขวด แล้วนำทั้งเซลล์ใน broth เติมด้วย 1 mM $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ แล้วทำการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 15 วัน โดยเก็บตัวอย่างตามระยะเวลา 0.5, 1, 3, 5, 10, และ15 วัน ในปริมาณ 200 mL มาทำการศึกษาดูปริมาณน้ำหนักแห้งโดยการนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูง 9,000 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วทำการ Vacuum dry ชั่งน้ำหนักที่ได้เทียบกับน้ำหนักคำนวณจากความเข้มข้นตั้งต้น แล้วทำการ plot กราฟ ดูการเปลี่ยนแปลงและ % yield ที่ได้

3.5.2 การพัฒนากระบวนการแยกทองนาโนจากน้ำเสียจากส่วนการสกัดและขัดทองในโรงงานทำทองน้ำเลี้ยง brothที่มีเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus* sp. E201 ที่ได้จากขบวนการเลี้ยงเหมือนในหัวข้อ 2.5.1 ในปริมาณ 500 mL ต่อตัวอย่างถูกเติมลงในน้ำเสียอัตราส่วน 1:1 แล้วเขย่าเบาๆให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลานาน 5 วัน แล้วนำตัวอย่างมาทำการปั่นแล้วทำแห้งให้ได้น้ำหนัก เหมือนขั้นตอนที่ผ่านมาของ 2.5.1 แล้วทำการ plot กราฟ ดูการเปลี่ยนแปลงและ % yield ที่ได้

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล

ผลการศึกษาวิจัย เรื่องการพัฒนาปรับปรุงการสร้างทองระดับนาโน ด้วยการใช้จุลินทรีย์ท้องถิ่นในประเทศไทย เป็นวิธีการศึกษาวิจัยที่ต้องการค้นหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการสร้างทองนาโน โดยเน้นการสร้างนอกเซลล์ ให้ได้ทองกลับมาจากระบบน้ำทิ้งของโรงงานทำทอง โดยทองที่ได้อยู่ในรูปของทองนาโน หรือสามารถ รวมตัวกันในรูปของทองขนาดใหญ่ปริมาณมาก จะยิ่งทำให้ง่ายต่อการคัดแยกออกจากน้ำทิ้ง โดยงานวิจัยนี้มีขั้นตอนผลการทดลองที่สามารถแยกออกได้ดังนี้

4.1. ศึกษาและ คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างทอง จากแหล่งธรรมชาติ

4.2. พัฒนาเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติสามารถสร้างทองในระดับนาโน ให้มีศักยภาพทนต่อสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษได้ และสร้างอนุภาคทองระดับนาโนที่ผิวนอกเซลล์

4.3. จำแนก ชนิดของสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างทองในระดับนาโนที่ได้คัดเลือกมา ด้วยวิธีทางชีวเคมี และด้วยหลักการของความเกี่ยวเนื่องของสารพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธีของชีวโมเลกุล

4.4. พัฒนาขั้นตอนการเพิ่มผลผลิตการสร้างทองของเชื้อจุลินทรีย์ ที่สร้างทองในระดับนาโนที่ได้ ให้มีประสิทธิภาพ ให้ได้จำนวนมาก สม่ำเสมอ ด้วยการปรับปรุงขั้นตอนการเลี้ยง การเก็บคัดแยกอนุภาคทองระดับนาโน

4.5. พัฒนาทดลองใช้จุลินทรีย์ที่ได้ในการดึงทองกลับจากน้ำที่เหลือทิ้งจากขบวนการทำทองในระบบอุตสาหกรรมการสกัดทอง ดึงทองกลับคืน

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผลมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

4.1. ศึกษาและ คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างทอง จากแหล่งธรรมชาติ

4.1.1 การเตรียมเชื้อที่ได้จากน้ำสกัดทองและตะกอนน้ำทิ้งจากโรงงานทำทอง

1) คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์และศึกษาคุณลักษณะของเชื้อที่ได้

จากการที่ได้เริ่มทำการแยกและคัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากน้ำสกัดทอง และตะกอนจากน้ำทิ้งจากโรงงานทำทองที่จังหวัดฉะเทริงเซา เปรียบเทียบกับเชื้อที่พบว่าสามารถสร้างทองนาโนได้ มีลักษณะดังนี้

ตารางที่ **4.1** ชนิดของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสร้างทองนาโน ที่คัดแยกได้จากน้ำเหลือทิ้งจากกระบวนการสกัดทองที่โรงงาน จังหวัดฉะเชิงเทรา

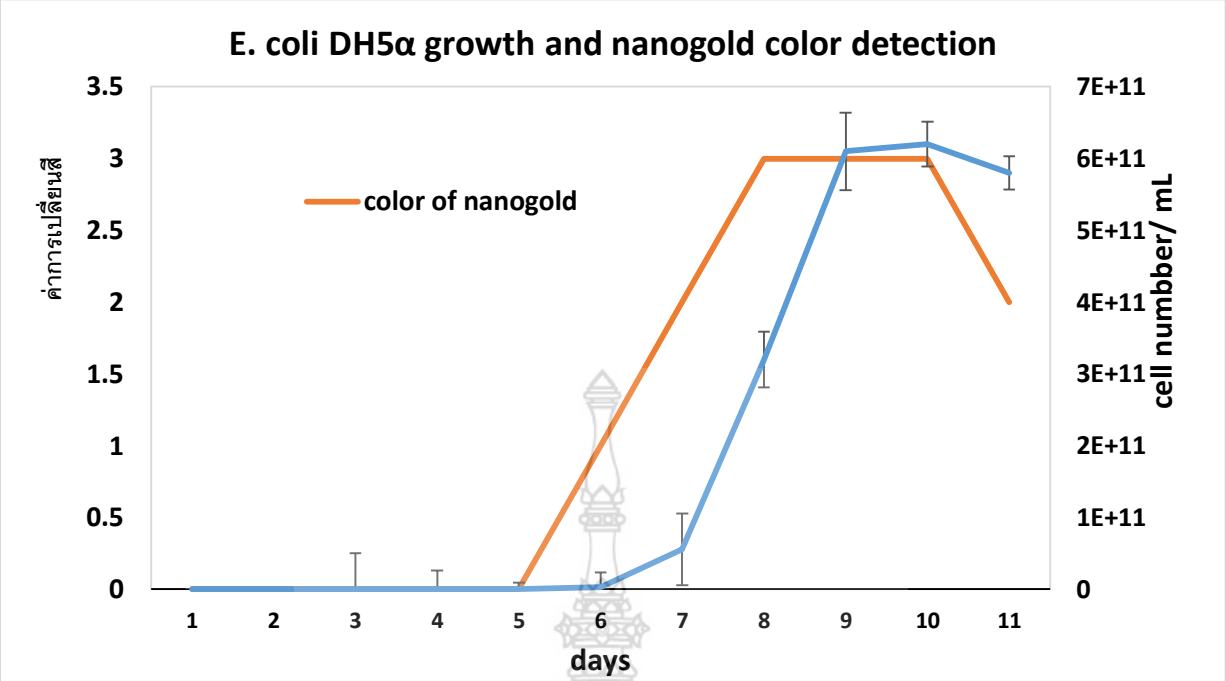
แหล่งเชื้อ	ชนิดและลักษณะของเชื้อแบคทีเรียจากกล้องจุลทรรศน์	เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ระยะเวลา	คุณลักษณะเฉพาะของแบคทีเรีย
น้ำสกัดทอง	6-7 ชนิด กลม (++) ท่อน (++++) และเกลียว (+)	ชนิดท่อน (BE1—เลี้ยงโตได้ 30 วัน[1])	Gram +/ สร้างทองนาโน ได้แต่ช้า
น้ำสกัดทอง ตะกอนน้ำทิ้งจากโรงงานทำทอง	4-5 ชนิด กลม (+) ท่อน (+++++) และเกลียว (++)	ชนิดท่อน (BW 1—เลี้ยงโตได้ใน 45 วัน[2]) ชนิดท่อน (BW 2—เลี้ยงโตได้ใน 30 วัน[2]) ชนิดกลม (CW1—เลี้ยงโตได้ใน 20 วัน[1]) ชนิดกลม (CW2—เลี้ยงโตได้ใน 45 วัน[1])	Gram +/สร้างทองนาโน ได้แต่ช้า Gram -/สร้างทองนาโน ได้แต่ช้า Gram +/สร้างทองนาโน ได้แต่ช้า Gram -/สร้างทองนาโน ได้แต่ช้า

[1] อาหารเหลวเพื่อเลี้ยงเชื้อกลุ่ม Chemolitrotroph plus Au^{2+} ที่อุณหภูมิ 25°C เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

[2] อาหารเหลวเพื่อเลี้ยงเชื้อกลุ่ม Heterotroph plus Au^{2+} ที่อุณหภูมิ 25°C เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

4.1.2. เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้เพื่อใช้ทดสอบดูความสามารถในการสร้างทองนาโน

จากเชื้อทั้งหมดอยู่ในระยะการเลี้ยงปริมาณมากขึ้น (150 mL) เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* control DH5α ที่มีความสามารถสร้างทองนาโนได้ เพื่อใช้เปรียบเทียบคุณสมบัติการสร้างทองนาโน ใน LB medium containing 50 µM $HAuCl_4$ (Au^{3+}) ผลการเลี้ยง *E. coli* ที่มีสารละลายทอง และไม่มีสารละลายทอง เพื่อทดสอบการสร้างทองนาโน โดยการดูสีที่เกิดขึ้น โดยให้สีมากสุด +++ สีปานกลาง ++ พอมองเห็นสี + และไม่เห็นการเปลี่ยนแปลง 0 ดังแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* และความสามารถในการสร้างทองนาโน โดยดูระดับการให้สีแดงของสารละลายทอง โดยมีสารละลายทองเป็นตัวเปรียบเทียบ

4.2. พัฒนาเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติสามารถสร้างทองในระดับนาโน ให้มีศักยภาพทนต่อสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษได้ และสร้างอนุภาคทองระดับนาโนที่ผิวนอกเซลล์

จากการคัดแยกพบว่า 3 สายพันธุ์ของ คือ E2, E154, E201 ที่สามารถผลิต AuNPs ออกนอกเซลล์ (extracellular) ภายในระยะเวลาสั้นๆ พบว่ามีเพียงสายพันธุ์ E201 ที่สามารถทนสารละลายทองที่มีในช่วง pH 2.5-5.0 โดยที่สายพันธุ์อื่นพบว่าตาย (ภาพที่ 4.2) โดยทั้งนี้สามารถนำทั้งเซลล์สในสารละลายทองได้เลย ไม่จำเป็นต้องมีการแยกเอาสารละลายออกก่อน เชื้อ E201 สามารถสังเคราะห์อย่างรวดเร็วของ AuNPs และทน pH ต่ำได้ดี, แบคทีเรียนี้ได้ทำการจำแนกด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลของการเปรียบเทียบ 16S rDNA sequences และดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการย้อมติดสี และการสร้างสปอร์ว่าเป็น *Bacillus* sp. E201 (ภาพที่ 4.3)

ผลจากการศึกษาเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสร้างทองและทนสภาวะกรดได้ โดยมีตัวทดลองควบคุมที่สามารถสร้างทองนาโน ได้ถูกแสดงดังต่อไปนี้

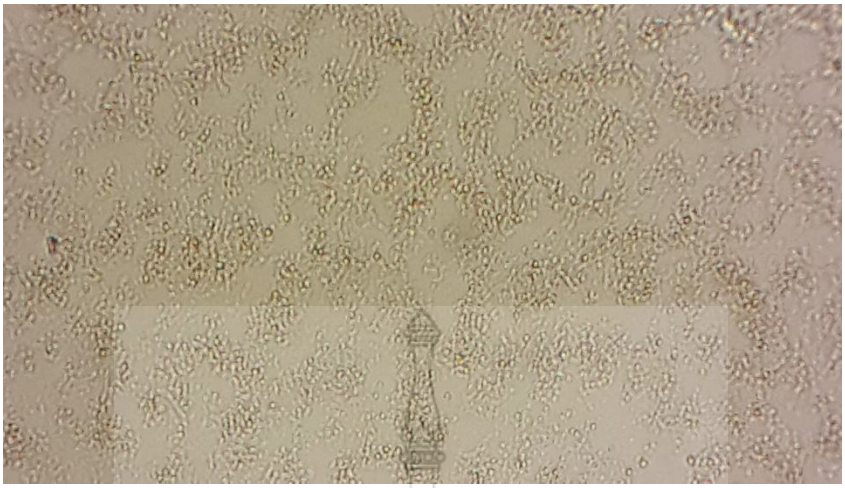
4.2.1 จากการคัดแยกและเลี้ยงเชื้อ bacteria culture จากน้ำสกัดทอง (ภาพที่ 4.2 ก.) และน้ำทิ้งจากโรงงานขึ้นทองรูปพรรณ (ภาพที่ 4.2 ข.) ให้ได้ปริมาณที่มากพอ 30 mL ด้วยการเติมสารละลาย AU^{2+} และ Fe^{2+} ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ Autotrophic Fe-Au oxidizing bacteria culture และ heterotrophic Fe-Au oxidizing bacteria culture พบว่ามีการoxidation เปลี่ยนจากสารละลายใสสีเขียวเป็นตะกอนแดง (ภาพที่ 1 ค.)เมื่อเลี้ยงป็นเวลานาน 1 เดือน และเมื่อทำการ subculture ได้เชื้อที่โตไว สามารถเห็นได้จากกล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 4.2)

ก.

ข.

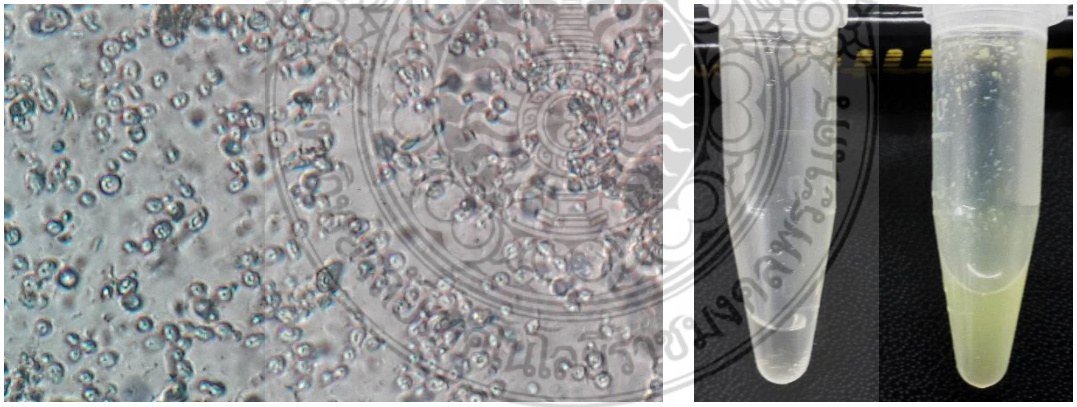
ค.

ภาพที่ 4.2 การคัดแยกเชื้อกลุ่มแบคทีเรียมาจากน้ำเหลือทิ้งจากกระบวนการสกัดทองในโรงงาน (ก) และน้ำสกัดทอง (ข) โดยได้เชื้อเจริญเติบโตได้ดี จากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เป็นเวลานาน 1-2 เดือน (ค)



ภาพที่ 4.3 เชื้อแบคทีเรียนในกลุ่ม *Bacillli* ที่สามารถเจริญได้ในสารละลาย Au^{2+} โดยมีกระบวนการรีดักชั่นของ Au^{2+} กลายเป็น Au^{3+} สารละลายที่แสดงถึงการเจริญของเชื้อคือ การเปลี่ยนสารละลายใส สีเขียวเป็นสารละลายขุ่น สีแดง

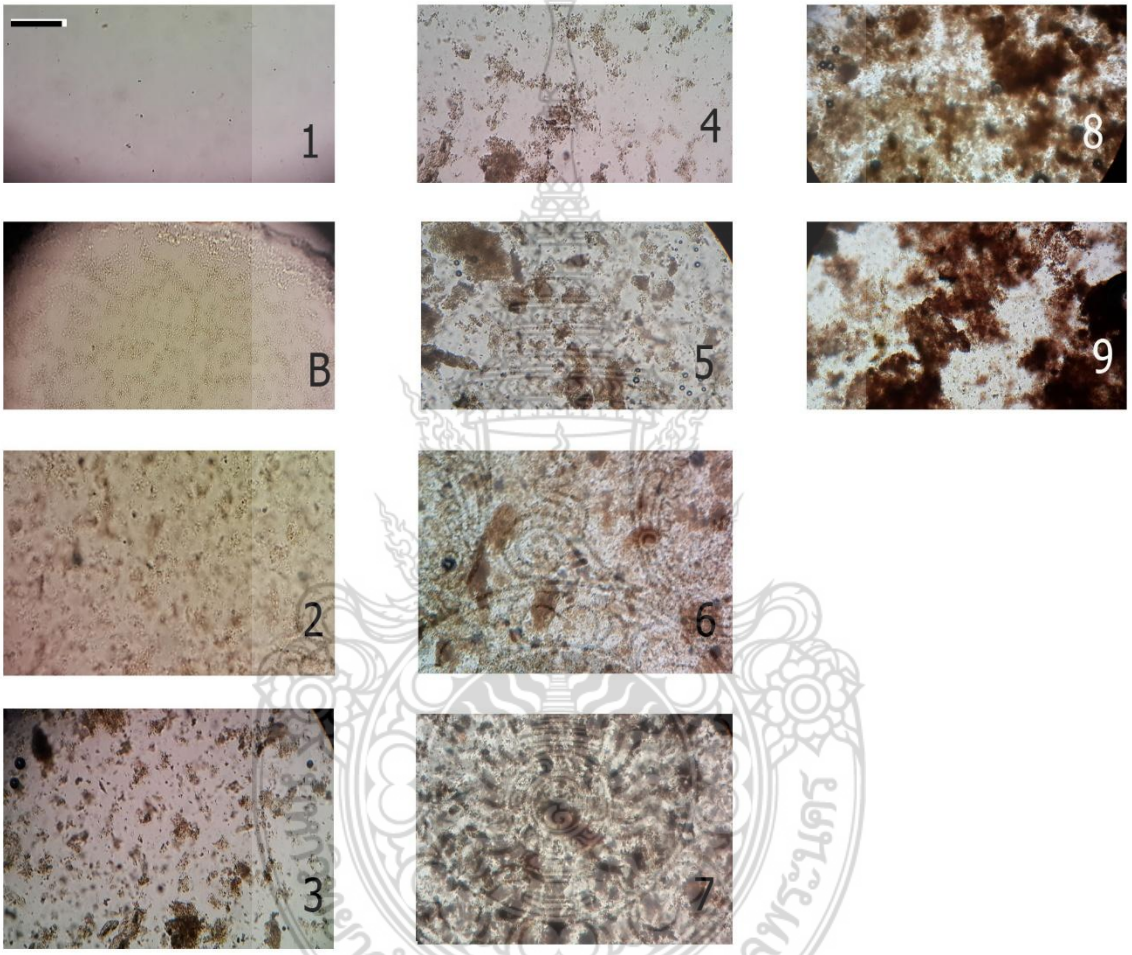
ในการบ่งบอกสภาวะการเกิดทองนาโนเพื่อการเปรียบเทียบ และใช้บ่งบอกสภาวะขนาดของทองนาโน ได้เลือกตัวควบคุมให้ผลบวก (positive control) ที่มาจากการเตรียม culture ของเชื้อ*ยีสต์ Saccharomyces cerevisiae* ที่เลี้ยงในอาหาร PDB เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ 25°C (ภาพที่ 4.4 ก.) แล้วใช้ทดสอบการเกิดทองนาโน ดูการเปลี่ยนแปลงจากสารละลายใสไม่มีสีของ 25 μM $HAuCl_4$ จนได้สารละลายสีเหลือง (ภาพที่ 4.4 ข.)



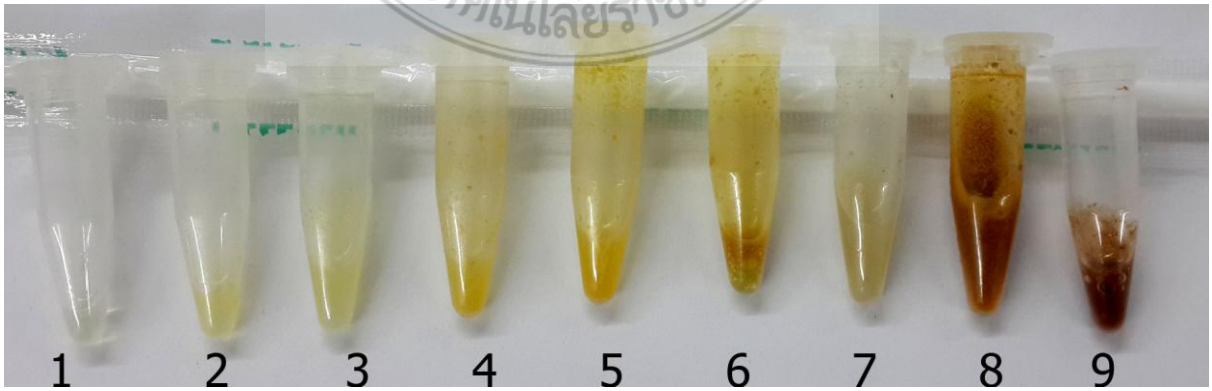
ก. ข.

ภาพที่ 4.4 ตัวอย่างเชื้อยีสต์ (ก) Saccharomyces cerevisiae (ข) ผลบวก (positive control) ของเชื้อนี้ เมื่อถูกนำมาใช้ในเป็นตัวควบคุม ในการก่อให้เกิดทองนาโนสีเหลือง (ขวา) โดยเทียบกับสารละลายทองก่อนการทำปฏิกิริยา(ซ้าย)

ในการเปรียบเทียบดูสภาวะในการสร้างผลึกทองจากจุลินทรีย์ (ภาพที่ 4.5 (ก)) ที่เกิดขึ้นหลังจากการเติมสารละลายทอง แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยเปรียบเทียบผลที่ได้กับตัวควบคุมให้ผลบวกของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* เชื้อเหล่านี้ปริมาณ 50 µL ได้เติมลงใน สารละลายทอง 25 µM $HAuCl_4$ ปริมาณ 100-200 µL (ภาพที่ 4.5 (1)) และเชื้อแบคทีเรีย (ภาพที่ 4.5 (B)) โดยที่ปล่อยให้สารละลายทองเกิดการรวมตัวกันเองที่อุณหภูมิห้องหลังจากการทดสอบนาน 2 ชั่วโมง ก่อนการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Light Microscope)



ก.



ข.

ภาพที่ 4.5 ภาพการเกิดกระบวนตะกอนของทองนาโน ในสภาวะของความเป็นกรดและด่าง โดย (ก.) ขนาดของทองนาโนที่เกิดการจับตัวกันในสภาวะต่างๆกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขนาด 100 X โดย (1) เป็นสารละลายทอง และ (B) เชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มา ทำการบ่มในสารละลายทองแล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงให้ขนาดและสีต่างๆกันขนาดที่ใช้ ขีดสีดำแสดงความยาว 20 μm (ข.) แสดงสีที่เกิดขึ้นจากกระบวนการสร้างตะกอนทองจากการสภาพที่เป็นกรดที่ 6, 5.5, 5, 4.5, 4, 3.5, 3, 2.5 จาก (ข.2) ถึง (ข.9)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงการสร้างผลึกทองนาโนเปลี่ยนแปลงตามการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง จาก pH 2.5- pH 6 พบว่ามีการเปลี่ยนสีจากแดง →น้ำตาลอมม่วง → ส้ม →เหลือง และมีการเปลี่ยนขนาดเล็กลงจากขนาดระดับ μm ไปเป็น nm ดังแสดในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลและขนาดการเกิดผลึกทองจากกล้องจุลทรรศน์ 100 X ที่ขึ้นอยู่กับการปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง

สี	**ขนาดและลักษณะของการเกิดผลึกทอง**
ใส ไม่มีสี (negative control)	น้ำค่อนข้างใส แต่อาจมีเศษทองเล็กๆปน
ใส สีเหลืองอ่อนจางมาก	เล็กมาก อาจต่ำกว่า 100 nm
เหลืองสดขึ้น	100-200 nm
เหลืองมาก	มากกว่า 20 μm
ส้ม	ส่วนใหญ่มากกว่า 100 μm
น้ำตาลอ่อน	ส่วนใหญ่มากกว่า 200 μm
แดงเข้ม	ส่วนใหญ่มากกว่า 500 μm

4.3 จำแนก ชนิดของสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างทองในระดับนาโนที่ได้คัดเลือกมา ด้วยวิธีทางชีวเคมี และด้วยหลักการของความเกี่ยวเนื่องของสารพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ ของชีวโมเลกุล

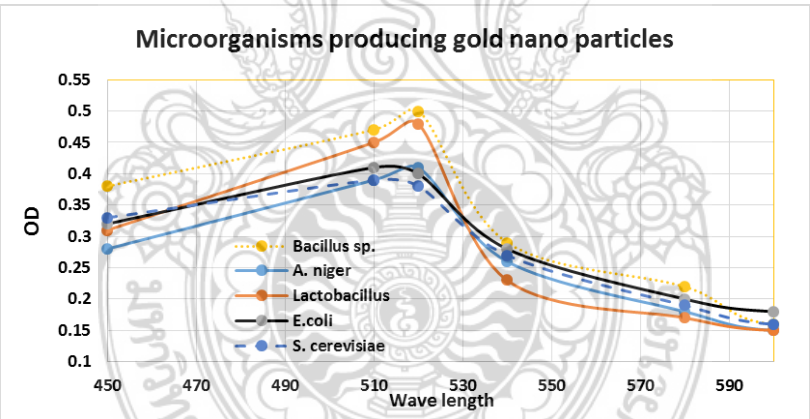
ในการจำแนก ชนิดของสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างทองในระดับนาโน พบว่าเชื้อชนิดแอโรบิกตามคู่มือของ Bergey และของเทคนิค 16s rRNA และลำดับดีเอนเอ จากการเทียบลำดับของบางส่วนของ 16S

rDNA พบว่ามีความคล้ายกับของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* (Bt) ที่มี Genebank Accession no. FJ755916 ด้วยความคล้าย homology ถึง 99% แต่อย่างไรก็ตามเนื่องด้วยชิ้นส่วนนี้ได้ความยาวประมาณ 700 bp ทำให้ไม่สามารถระบุได้อย่างแม่นยำ จึงใช้ชื่อ *Bacilllus* sp. E201

4.4. พัฒนาขั้นตอนการเพิ่มผลผลิตการสร้างทองของเชื้อจุลินทรีย์ ที่สร้างทองในระดับนาโนที่ได้ ให้มีประสิทธิภาพ ให้ได้จำนวนมาก สม่ำเสมอ ด้วยการปรับปรุงขั้นตอนการเลี้ยง การเก็บคัดแยกอนุภาคทองระดับนาโน

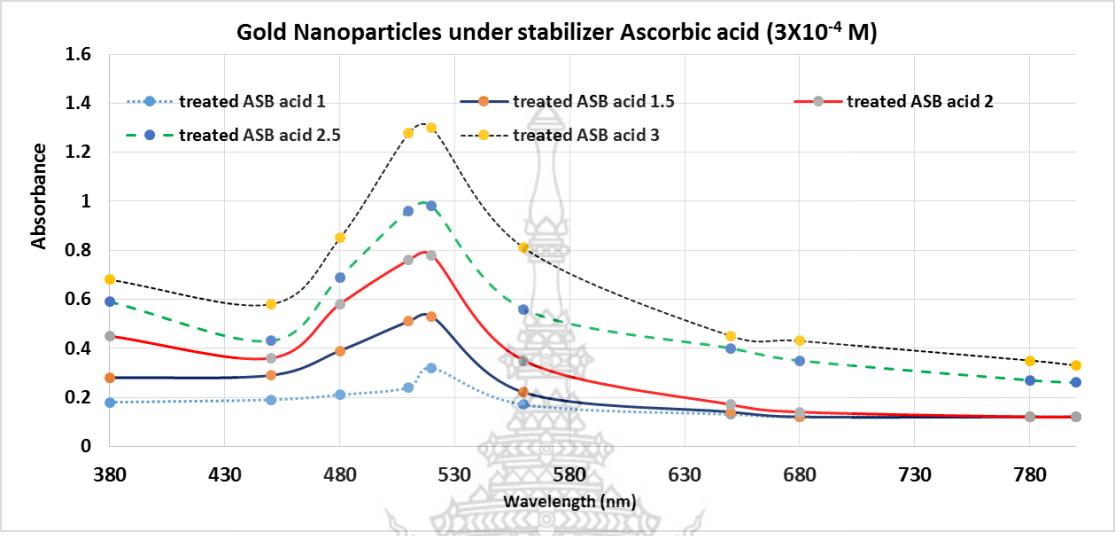
4.4.1 จากการคัดแยกทองนาโนที่ได้ จากกระบวนการผลิตด้วยจุลินทรีย์ชนิด Bacillus sp. E201 สามารถสร้างทองนาโนสีส้มสดได้ดีในช่วย pH 5-6 แต่ทองนาที่ได้ไม่เสถียร มีการจับตัวกันเองตกตะกอนจนได้ทองขนาดใหญ่สีเหลืองทองหลังจากการตั้งทิ้งไว้นาน 7 วัน *Lactobacillus* sp. และ *Bacillus* sp. E201 สามารถสร้างทองนาโนได้ดีสูงสุด เมื่อใช้ปริมาณเซลล์และน้ำเลี่ยงเซลล์ที่ได้มาทำการทดสอบการสร้างทองนาโนจากสารละลายทอง 1 mM $HAuCl_4$ (ดังแสดงในภาพที่ 4.6)

(1) จากการดูการดูดกลืนของแสงในช่วง 450-590 พบว่าทองนาโนจะมีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดในช่วง 510-520 nm



ภาพที่ 4.6 ความสามารถในการสร้างทองนาโนจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้คัดแยกจากจากน้ำสกัดทองด้วยวิธี spectrophotometry การทดสอบประสิทธิภาพด้านความเข้มข้นและขนาดในช่วงนาโนของทองนาโนที่มีสีในช่วงสีส้มอ่อนจนถึงเหลืองเข้ม ด้วยการดูการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 450 ถึง 590 นาโนเมตร

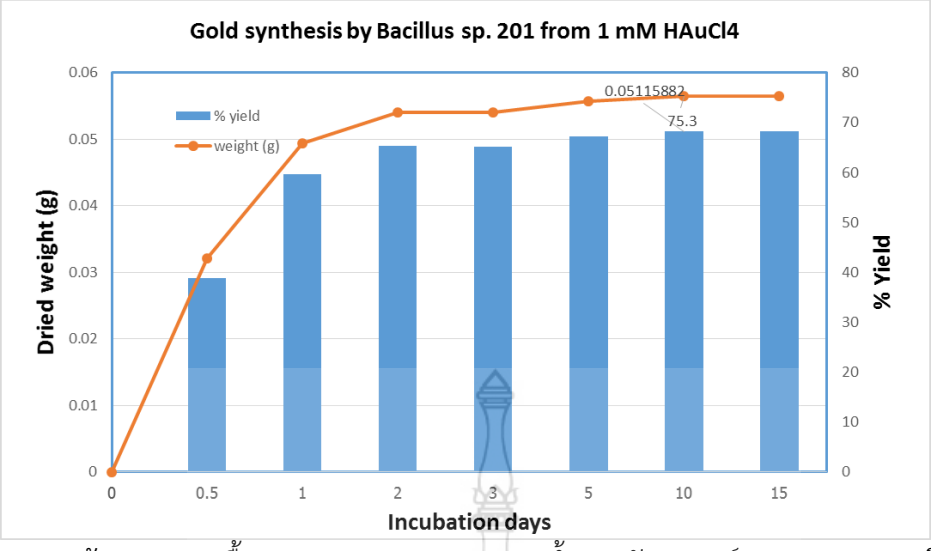
(2) จากการทดสอบดูความสามารถการคงตัวของทองนาโนหลังจากการตั้งทิ้งไว้นาน 7 วัน ด้วยการใส่สารรีดิวซ์เพื่อให้คงตัวคือ Ascorbic acid ที่ความเข้มข้น $3X10^{-4}$ M พบว่า Ascorbic acid อย่างน้อย 2.5 ml ที่ความเข้มข้น $3X10^{-4}$ M ต่อปริมาณทองนาโน 5 ml ที่ความเข้มข้น 1 mM สามารถช่วยรักษาสภาพของทองนาโนได้นานอย่างน้อย15 วัน (ภาพที่ 4.7)



ภาพที่ 4.7 ความสามารถในการคงตัวของทองนาโนที่ผ่านการเก็บไว้นาน 15 วันที่อุณหภูมิห้อง ด้วยการใส่ ascorbic acid ที่ความเข้มข้น $3X10^{-4}$ M ในปริมาณ 1, 1.5, 2, 2.5 ml ต่อทองนาโน 1mM ที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus* sp. E201 ปริมาณ 5 ml

4.5. พัฒนาทดลองใช้จุลินทรีย์ที่ได้ในการดึงทองกลับจากน้ำที่เหลือทิ้งจากขบวนการทำทองในระบบอุตสาหกรรมการสกัดทอง ดึงทองกลับคืน

4.5.1 จากการทดลองนำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. E201 ไปทำการเลี้ยงเพิ่มจำนวนจนได้เซลล์ในระยะ log phase แล้วปั่นแยก ละลายเซลล์ใน phosphate buffer pH 7.2 แล้วทำการเติมลงในสารละลายทองที่pH 2.5-3.5 พบว่าเซลล์สามารถมีชีวิตรอดได้ พร้อมทั้งมีการสร้างทองก้อนที่สามารถมองเห็นได้ชัดเจน และเมื่อทำการแยกทองออกมา ทำให้แห้ง พบว่าเมื่อทำการแช่เชื้อนี้ในสารละลายทองนานมากขึ้นจาก 30 นาทีจนถึง 3 วัน พบว่า การสร้างทองที่อุณหภูมิห้องจะเกิดได้เร็วในช่วงวันแรก และเริ่มช้าลงจนถึงวันที่ 3 ดังแสดงในภาพที่ 4.8 โดยได้% yield สูงสุดที่ 75.3 เป็นปริมาณ 0.5115 กรัม จากสารละลายที่มีทองอยู่ตั้งต้น 0.0679 กรัม



ภาพที่ 4.8 การสร้างทองของเชื้อ *Bacillus* sp. E201 จากน้ำทองสังเคราะห์ 1 mM $HAuCl_4$ ในระยะเวลานาน 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

4.5.2 เมื่อทำการนำเชื้อ *Bacillus* sp. E201 มาทำการแยกทองที่อยู่ในน้ำเสียที่มาจากโรงงานสกัดและขัดทอง ปริมาณ 20 L ที่ pH 2.3 โดยเอาเชื้อนี้ในระยะ log phase ในน้ำเสีย โดยทำการแช่เป็นเวลานาน 15 วัน ดังแสดงผลในตารางที่ 4.3 พบว่าสามารถได้ทองปริมาณมากขึ้น โดยมีอัตราการสร้างทองได้เร็วในช่วง 2-3 วันแรก และคงที่ ได้มากสุดที่ 0.0411 กรัม (ภาพที่ 4.9)

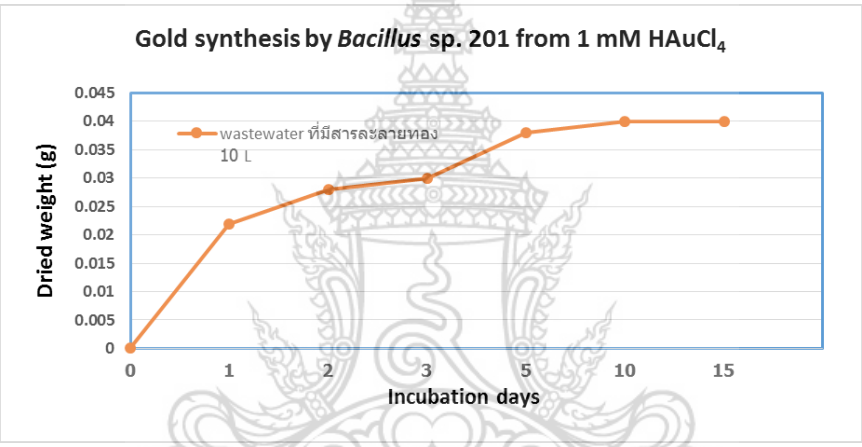
ตารางที่ 4.3 การสร้างทองโลหะจากกระบวนการสร้างทองนาโนของเชื้อ *Bacillus* sp. E201 ในน้ำเสียจากกระบวนการสกัดทองและตะกอนน้ำทิ้ง จำนวน 10 L pH 2.3 โดยนำเซลล์เปียก ที่มีความเข้มข้น 3.7 $X10^9$ cells/mL บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 3 วัน

days	weight (g)
1	0.022
2	0.028
3	0.03

4.6 การคัดแยกทองที่ได้จากการสังเคราะห์ทองนาโน ด้วย *Bacillus* sp. E201จากน้ำเสียที่มีสารละลายทอง

จากการศึกษาเพื่อการคัดแยกทองจากน้ำทิ้งที่มีทองละลายออกด้วยการใช้วิธีทางชีวภาพของการใช้แบคทีเรียที่สามารถสร้างทองนาโนนอกเซลล์ โดยในขบวนการศึกษาคุณภาพของทองที่ได้พบว่า ไม่จำเป็นต้องเติมสาร Acorbic acid เพื่อช่วยรักษาสภาพการเป็นทองนาโน เพราะในการเกิดทอง nucleation ที่จะเกิดขนาดใหญ่

ขึ้นตามระยะเวลาที่แช่อยู่ จะยิ่งช่วยให้ได้ทองที่มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยสังเกตจากทองที่ได้จะมีการเปลี่ยนแปลงสีจากสีส้ม แดงที่ได้เป็นสีทองเหลือง มีขนาดตะกอนใหญ่จนสามารถใช้วิธีการปั่นแยกได้ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลานาน 30 นาที ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าทองที่ได้มีสารอื่นๆปน ในการรวมตัวกันเองเป็นก้อน และสามารถนำไปทำการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป



รูปที่ 4.9 ความสามารถในการคัดแยกทองจากน้ำเสียจากโรงงานสกัดและขัดทอง ของเชื้อ *Bacillus* sp. E201 ในระยะเวลานาน 15 วัน

บทที่ 5

สรุปการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองในการศึกษาเรื่องการพัฒนาปรับปรุงการสร้างทองระดับนาโนด้วยการใช้จุลินทรีย์ท้องถิ่นในประเทศ ทีมผู้วิจัยสามารถสรุปผลการทดลองได้โดนมีรายละเอียดดังนี้

5.1 การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากน้ำเสียเหลือทิ้งจากโรงงานทำทอง

5.2 การพัฒนากระบวนการผลิตทองนาโนให้มีประสิทธิภาพ

5.3 การพัฒนากระบวนการผลิตทองนาโนจากน้ำทิ้งของโรงงานทำทอง

5.4 ความเป็นไปได้ในการพัฒนากระบวนการผลิตทองนาโนด้วยชีววิธีของเชื้อ *Bacillus* sp. E201 ในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการดึงทองกลับจากสิ่งแวดล้อม

5.5 ข้อเสนอแนะในการพัฒนากระบวนการผลิตทองนาโนด้วยชีววิธีของเชื้อ *Bacillus* sp. E201

5.1 การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากน้ำเสียเหลือทิ้งจากโรงงานทำทอง

จากกระบวนการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย Bacillus sp. E201 ที่ได้จากน้ำทิ้งจากกระบวนการขัดทองให้เชื้อแบคทีเรียหลายชนิด แต่มีเพียง 1 สายพันธุ์คือ Bacillus sp. E201 ที่มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (Bt) ที่มี Genebank Accession no. FJ755916 ด้วยความคล้าย homology ถึง 99% ที่เหมาะสมในการพัฒนานำไปใช้ในการคัดแยกทองออกจากน้ำทิ้งที่มีความเป็นกรดสูง ทั้งนี้เพื่อเป็นการง่ายในการนำไปใช้จริง ที่ไม่ต้องการแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยง broth ก่อนการเติมลงในน้ำทิ้ง

5.2 การพัฒนากระบวนการผลิตทองนาโนให้มีประสิทธิภาพ

น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. E201 ที่ถูกเตรียมใน 50 mM phosphate buffer pH 7.2 สามารถช่วยให้เกิดการสังเคราะห์ทองนาโน ที่เกิดการเกาะรวมตัวเป็นผลึกที่สามารถปั่นแยก ชั่งน้ำหนักได้ % yield สูงสุดที่ 75.3 เป็นปริมาณ 0.5115 กรัม แต่ทั้งนี้น้ำหนักที่ได้อาจมีรวมทั้งส่วนน้ำหนักที่มาจากผลึกการรวมตัวกับ สารอาหารและเศษเซลล์ด้วยเพราะผลึกที่ได้มีสีเหลืองปนขุ่นขาว ไม่บริสุทธิ์เท่าที่ควรเป็น

5.3 การพัฒนากระบวนการผลิตทองนาโนจากน้ำทิ้งของโรงงานทำทอง

ในกระบวนการสร้างทองนาโนของเชื้อ*Bacillus* sp. E201 ในน้ำเสีย (waste water) มาจากกระบวนการสกัดทองและตะกอนน้ำทิ้ง ที่มีสภาวะเป็นกรดสูง ของpH 2. น้ำเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์แบคทีเรียด้วย สามารถช่วยสังเคราะห์ทองนาโนและเกิดการรวมตัวกันเป็นก้อนผลึกใหญ่ที่สามารถมองได้ด้วยตาเปล่าและเห็นได้ชัดจาก

กล้องจุลทรรศน์ ภายใน 3 วัน โดยสามารถได้น้ำหนักมากที่สุด 0.0411 กรัมต่อปริมาณน้ำทิ้งที่มาจากกระบวนการขัดทอง 10 L

5.4 ความเป็นไปได้ในการพัฒนากระบวนการผลิตทองนาโนด้วยชีววิธีของเชื้อ *Bacillus* sp. E201 ในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการดึงทองกลับจากสิ่งแวดล้อม

การพัฒนากระบวนการผลิตทองด้วยวิธีชีวภาพของการใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสร้างทองนาโนนอกเซลล์ ด้วยอาศัยการสร้างเอนไซม์รีดักชั่นของเชื้อออกมานอกเซลล์ (Extracellular enzyme) เชื้อนี้ยังมีคุณสมบัติที่ทนในสิ่งแวดล้อมได้ดี สามารถสร้างสปอร์และทนความเป็นกรดได้สูง เหมาะในการนำไปประยุกต์ใช้ในระบบอุตสาหกรรมเพื่อการคัดแยกทองออกจากน้ำสารละลายทองที่ปนเปื้อนหรือมีสารพิษอื่นๆ ด้วย โดยที่การสะสมของทองนาโนที่ได้จะมีการเพิ่มมากขึ้น แต่อาจรวมทั้งโลหะอื่นๆ ที่เข้ามารวมตัวเกิดเป็น alloys หรือ โลหะปนเปื้อนในก้อนทอง แต่อย่างไรก็ตามกสามารถตกตะกอน กรอง คัดแยกเพื่อให้บริสุทธิ์ต่อไปได้ง่าย ไม่ต้องใช้สารเคมี ที่ก่อพิษต่อสิ่งแวดล้อม

5.5 ข้อเสนอแนะในการพัฒนากระบวนการผลิตทองนาโนด้วยชีววิธีของเชื้อ *Bacillus* sp. E201

ในการพัฒนาการนำเชื้อ *Bacillus* sp. E201 เพื่อมาใช้ในการคัดแยกทองออกจากสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษของโลหะหนัก และความเป็นกรดสูง จำเป็นต้องมีการทดสอบขั้นต่อไป เช่น การทดสอบความเป็นพิษและโทษของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. E201 นี้ และจำเป็นต้องทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม ในการเพิ่มผลผลิตการสังเคราะห์ทองนาโนในสภาวะที่นำไปใช้จริง เพื่อการให้เชื้อนี้ทำงานได้อย่างต่อเนื่อง (Continuous culturing and gold nano particle synthesis) เพื่อลดต้นทุนในการเตรียมคัดแยกเชื้อ และการแยกทองนาโนออกจากสิ่งแวดล้อม

บรรณานุกรม

1. Mohanpuria P, Rana NK, Yadav SK. **Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications**. J Nanopart Res 2008;10:507–17.

2. Chmielewski AG, Urbanski TS, Migdal W: **Separation technologies for metals recovery from industrial wastes.** *Hydrometallyrgy.* 1997, 45:333-344.

3..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.

4. Jana NR, Gearheart C, Murphy CJ: **Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Cylindrical Gold Nanorods.** *J Phys Chem B* 2001, **105:**4065-4067.

5. 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.

6. 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.

7. Salata OV: **Application of nanoparticles in biology and medicine.** *J Nanobiotechnol* 2004, **2:**3-9.

8. 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.

9. Senapati S, Ahmad A, Khan MI, Sastry M, Kumar R: **Extracellular Biosynthesis of Bimetallic Au-Ag Alloy Nanoparticles.** *Small* 2005, **1:**517-520.

10. 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.

11. Pum D, Sleytr UB: **The application of bacterial S-layers in molecular nanotechnology.** *Trends Biotechnology* 1999, **17:**8-12.

12. Silver S: **Bacterial resistances to toxic metal ions.** *Gene* 1996, **179:**9-19.

13. Klaus T, Joerger R, Olsson E, Granqvist CG: **Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96:**13611-13614.

14. Kalimuthu K, Babu RS, Venkataraman D, Bilal M, Gurunathan S: **Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*.** *Colloids and surfaces B* 2008, **65:**150-153.

15. 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.

16. 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.

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

18. 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.

19. 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.

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

21. 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.

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

23. 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.

24. 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.

25. Avci H, Ziyadanogullari B, Guzel F, Ziyadanogulla R: **Gold recovery by way of extraction and adsorption from jeweller's residues.** *Commun. Fac. Sci. Univ. Ank. Series B.* 1996. **42**:23-31.

26. Devika, B., Ghazani, AA., Chan, WCW: **Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells**. *Nano Letters*. 2006. **6**(4): 662-668.

27. ปราโมท ภูพานทอง. **การทำทองให้บริสุทธิ์ด้วยกรดกัดทองและสารประกอบซัลไฟด์**, กองโลหกรรม กรมทัพยากรธรณี, 2540.

28. Roland Loewen. **Small scale gold refining, The worshipful company of goldsmiths** Project Report No. 44/1, ISSN: 01400541.

29. Murphy, CJ., Gole, AM., Stone, JW., Sisco, PN., Alkilany, AM., Goldsmith, EC., Baxter, SC. **Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging**. *Accounts of Chem. Res*. 2008. **41** (12): 1721-1730.

30. Shedbalkar, U., Singh, R., Wadhwani, S., Gaidhani, S., Chopade, B. A. **Microbial synthesis of gold nanoparticles: Current status and future prospects**. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2014. **209:** 40–48.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

การสกัด DNA จากเชื้อ Bacillus sp. E201 เพื่อใช้ในการทำ PCR amplification แล้วทำการเปรียบเทียบศึกษาดู 16S rDNA sequence กับ GENBANK Database

DNA Extraction Procedure (Cited from manufacturer's manual)

1) In the biosafety cabinet, pipette 1 ml of bacterial culture into a 1.5 ml micro centrifuge tube, and centrifuge for 5 min at 5000 x g (7500 rpm).

2) Remove 910 µL supernatant, then add Buffer ATL 90 µL(supplied in the QIAamp DNA Mini Kit), to a total volume of 180 µL.

3) Add 20 µL Proteinase K, mix by shaking, and take it out from biosafety cabinet. Incubate and shake in hybridization oven at 56°C until the tissue is completely lyses. Vortex occasionally during incubation to disperse the sample.

4) Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube for 1 min to remove drops from the inside of the lid. Add 200 µL Buffer AL to the sample, mix by pulse-vortexing for 15 s, and incubate in hybridization oven at 70°C for 10 min.

5) Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube for 1 min to remove drops from inside the lid. Add 200 µL ethanol (96–100%) to the sample, and mix by pulse-vortexing for 15 s.

6) After mixing, briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid. Carefully apply the mixture (including the precipitate) to the QIAamp Spin Column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min.

7) Place the QIAamp Spin Column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.

8) Carefully open the QIAamp Spin Column and add 500 µL Buffer AW1 without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min.

9) Place the QIAamp Spin Column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the

collection tube containing the filtrate.

10) Carefully open the QIAamp Spin Column and add 500 µL Buffer AW2 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min.

11) Place the QIAamp Spin Column in a new 2 ml collection tube (not provided) and discard the collection tube containing the filtrate. Centrifuge at 20,000 x g (14,000 rpm) for 1 min.

12) Place the QIAamp Spin Column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate.

ภาคผนวก ข

การเตรียม 16S rDNA เพื่อการศึกษาเปรียบเทียบลำดับดีเอนเอที่ได้

PCR Amplification (Cited from manufacturer's manual)

1) Thaw the PCR Master Mix at room temperature. Vortex the Master Mix and then spin it briefly in a microcentrifuge to collect the material in the bottom of the tube.

2) Prepare one of the following reaction mixes on ice:

Component	Volume	Final Conc.
PCR Master Mix, 2X	50µl	1X
Reverse primer, 10µM	1.0–10.0µl	0.1–1.0µM
Forward primer, 10µM	1.0–10.0µl	0.1–1.0µM
DNA template	1–5µl	<250ng
Nuclease-Free Water **to**	100µl	N.A.

3) Put the PCR tube into the thermocycler.

4) Choose the program name "SALMO" and start PCR amplification.

Denaturation :	94℃	5 min
	94℃	30 sec
Annealing:	59℃	30 sec
Extension:	72℃	45 sec
Cycle Number:	30	
Final extension:	72℃	10 min
Refrigeration:	4℃	

After PCR, run the electrophoresis gel or store under -20℃ freezer.

ภาคผนวก ค

ตารางที่ 1 การเตรียมสารละลาย buffer เพื่อใช้เตรียมสารละลายทองที่ใช้ในการศึกษา

Buffer	Na_2HPO_4 (g)	NaH_2PO_4 (g)	NaCl (g)	SDS (g)	Pure water (ml)	pH
Coupling buffer	4.392	2.291	5.884		500	7.2
Disulfide cleavage buffer	11.468	0.509			500	8.0
Storage buffer	0.570	0.118	5.884		500	7.4
Passivation buffer	10.119	0.449	4.383		500	8.0
Salting buffer	0.0562	0.0125	5.844		50	7.0
Phosphate adjustment buffer	0.562	0.125			50	7.0
Assay buffer	0.562	0.125	4.383	0.500	500	7.4
Surfactant solution				10.000	90	

Na_2HPO_4	Disodium hydrogen phosphate
NaH_2PO_4	Sodium dihydrogen phosphate
NaCl	Sodium chloride

ประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติคณะผู้วิจัย (หัวหน้าโครงการ)

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวดวงฤทัย นิคมรัฐ

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Ms. Duongruitai Nicomrat
2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 1014 00887 31 7
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ สาขาวิชาวิทยาการสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรธรรมชาติ
4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

   สาขาวิชาวิทยาการสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรธรรมชาติ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร กระทรวงศึกษาธิการ

   เลขที่ 1381 ถ. พิบูลสงคราม บางซื่อ กรุงเทพฯ 10800

   โทรศัพท์ 02 282 9009 ext 6171 โทรศัพท์มือถือ 0 86 905 4366

   e-mail duongruitai@yahoo.com
5. ประวัติการศึกษา

   M.Sc. (Biochemistry) The Ohio State University, USA

   M.Sc. (Biochemistry) Mahidol University

   Ph.D. (Environmental Science, specialty in Molecular Biology of bacteria) The Ohio State University, USA
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

   Molecular Systematics of bacteria and fungi, Enzyme Kinetics, Environmental and food microbiology

ผู้ร่วมโครงการวิจัยลำดับที่ 1

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) นาย ไพศาล การถาง

   ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Paisan Kanthang
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 4-1006-00024-96-4
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
   - คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

โทรศัพท์ 0-2913-2424 โทรสาร 0-2913-2424 ต่อ 105

E-mail: pk_quantum2000@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

- 2543 วิทยาศาสตรบัณฑิต (ฟิสิกส์) มหาวิทยาลัยนเรศวร
- 2548 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ฟิสิกส์) มหาวิทยาลัยมหิดล
- 2552 วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ฟิสิกส์) มหาวิทยาลัยมหิดล

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- Computational Biophysics, Image processing for Biophysical studies, Non-extensive statistical mechanics, Fractional dynamics

ผู้ร่วมโครงการวิจัยลำดับที่ 2

ชื่อ – 1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) นาย จิระศักดิ์ ธาระจักร์

ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Jirasak Tharajak

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-1615-00485-62-2

3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

- คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

โทรศัพท์ 0-2913-2424 โทรสาร 0-2913-2424 ต่อ 105

E-mail: jirasak.t@hotmail.co.uk

5. ประวัติการศึกษา

- 2543 วิทยาศาสตรบัณฑิต (ฟิสิกส์)
  มหาวิทยาลัยนเรศวร
- 2549 วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีวัสดุ)
  มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- การพ่นเคลือบพอลิเมอร์ด้วยเปลวความร้อน