



## รายงานการวิจัย

การศึกษาการผลิตและสมบัติของอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่ผลิตจากเชื้อ  
แบคทีเรียที่แยกได้ในประเทศไทย

(Investigation on production and properties of magnetic  
nanoparticles produced by isolated bacteria in Thailand)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



## รายงานการวิจัย

การศึกษาการผลิตและสมบัติของอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่ผลิตจากเชื้อ  
แบคทีเรียที่แยกได้ในประเทศไทย

(Investigation on production and properties of magnetic  
nanoparticles produced by isolated bacteria in Thailand)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.สินีนานู ศิริ

สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

นางสาวสุทธิลักษณ์ ขวัญไตรรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2556-2557

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กรกฎาคม 2560

ก

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องการศึกษาการผลิตและสมบัติของอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ในประเทศไทยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2556–2557 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และมหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และเครื่องมือในการทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณโรงงานอุตสาหกรรมเหล็กและเหมืองแร่ที่ให้ความอนุเคราะห์พื้นที่ในการเก็บตัวอย่างงานวิจัยครั้งนี้ด้วย

คณะผู้วิจัย

กรกฎาคม 2560

## บทคัดย่อภาษาไทย

นอกจากการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กด้วยวิธีทางเคมีและกายภาพแล้ว การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กด้วยวิธีทางชีวภาพโดยอาศัยเซลล์สิ่งมีชีวิตเป็นอีกวิธีหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจในการศึกษาวิจัย ทั้งนี้เซลล์แบคทีเรียบางชนิดสามารถนำอ็อกไซด์ของเหล็กจากสิ่งแวดล้อมมาเปลี่ยนเป็นอนุภาคนาโนแม่เหล็กภายในเซลล์หรือภายนอกเซลล์ได้ แต่ไม่มีการศึกษาดังกล่าวในประเทศไทย ดังนั้นในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อคัดเลือก ศึกษาลักษณะ และจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็ก ซึ่งแยกได้จากน้ำเสียที่ปนเปื้อนเหล็กในประเทศไทย ตลอดจนศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กของแบคทีเรียเหล่านี้ ในงานวิจัยนี้สามารถแยกแบคทีเรียได้ 6 ไอโซเลทได้แก่ HER\_I HER\_II KPI\_I L3\_5 SRL\_I และ TSB\_II ซึ่งสามารถระบุว่าเป็นแบคทีเรียที่ผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็ก (magnetic producing bacteria) โดยมีพฤติกรรมการตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กแบบอ่อน และมีโครงสร้างของแมกนีโตโซม (magnetosomes) บรรจุอนุภาคออกไซด์ของเหล็กในรูปแมกนีไทท์ (magnetite,  $Fe_3O_4$ ) ภายในเซลล์ ซึ่งวิเคราะห์จากภาพกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) การวิเคราะห์ธาตุด้วยเทคนิค TEM-energy dispersive X-ray spectroscopy และการวิเคราะห์การเลี้ยวเบนของอิเล็กตรอนแบบเลือกพื้นที่ด้วยเทคนิค TEM-selected area electron diffraction นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ทางชีวเคมีพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จัดเป็นพวกไมโครแอโรฟิลิกและแอนแอโรบิก ทั้งนี้จากลำดับเบสของ 16S rRNA สามารถจำแนกแบคทีเรียดังกล่าวได้ในระดับสกุล (genus) จากแบคทีเรีย 6 ไอโซเลทนี้ได้คัดเลือก *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ HER\_I เพื่อใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตออกไซด์ของเหล็ก ซึ่งผลการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ คือการเลี้ยงในอาหารชนิด Modified magnetotactic bacteria (MTB) ที่มีกรดอะซีติก ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.9 และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่สภาวะดังกล่าวไม่ส่งเสริมการสังเคราะห์อนุภาคนาโน  $Fe_3O_4$  ทั้งนี้การสังเคราะห์อนุภาคนาโน  $Fe_3O_4$  พบเฉพาะการเลี้ยงในอาหารชนิด Modified MTB ที่ไม่มีกรดอะซีติก จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค X-ray Absorption Near Edge Structure ที่ใช้แหล่งกำเนิดพลังงานจากแสงซินโครตรอน พบว่าปริมาณของอนุภาคนาโน  $Fe_3O_4$  ที่แบคทีเรียสังเคราะห์ได้เพิ่มขึ้นตามการเจริญของแบคทีเรียจากระยะเพิ่มจำนวนตอนต้น (early log phase) ไปยังระยะเพิ่มจำนวนตอนปลาย (late log phase) ทั้งนี้พบว่าแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. ไอโซเลท HER\_I สามารถเจริญในอาหาร Modified MTB ที่มีความเข้มข้นของเหล็กอ็อกไซด์สูงถึง 160 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการนำอ็อกไซด์ของเหล็กเข้าเซลล์สูงกว่าแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ความสามารถในการดูดซับอ็อกไซด์ของเหล็กมีความใกล้เคียงกับ *E. coli* แต่สูงกว่า *S. aureus* อย่างมีนัยสำคัญ ผลจากการศึกษานี้แสดงถึงการคัดเลือกแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. ไอโซเลท HER\_I ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กชนิดในประเทศไทย ซึ่งน่าจะเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพสำหรับการผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็ก และการชีวบำบัดน้ำที่มีเหล็กปนเปื้อนในปริมาณสูง

## บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

In addition to the syntheses of magnetic nanoparticles (MNPs) via chemical and physical approaches, a biosynthesis of MNPs via living cells has gained many research interests. Some bacterial cells were reported to uptake iron ions from an environment and transformed them to MNPs inside or outside the cells. Nevertheless, there is still no study of these bacteria in Thailand. Thus, this research aimed to screen, characterize, and classify the bacteria producing MNPs which were isolated from iron-contaminated wastewater in Thailand, as well as to study the optimized conditions for their growth and production of MNPs. In this work, six isolated bacterial strains, designated as HER\_I, HER\_II, KPI\_I, L3\_5, SRL\_I and TSB\_II, were isolated, which were characterized as the magnetic producing bacteria due to their exhibition of weak magnetotactic behavior and presence of magnetosomes that contained iron oxide particles in a form of magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) as determined by images of transmission electron microscope (TEM), the element analysis of TEM-energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX), and the analysis of TEM-selected area electron diffraction (SAED). In addition, the biochemical analyses identified these bacteria in the groups of microaerophilic and anaerobic bacteria. The nucleotide sequences of 16S rRNA analysis could identify them at the genus level. Among 6 strains of the isolated bacteria, *Acinetobacter* sp. strain HER\_I was chosen for further studies on its optimized growth condition and production of iron oxide particles. Results showed that its optimal growth condition was to use the modified MTB medium with 10 mM acetic acid, pH 6.9 at 25 °C, however, this condition did not support the formation of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles. Formation of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles was found only when they were cultured in the modified MTB medium without an acetic acid supplement. The amount of synthesized  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles was increased according to its growth from an early log phase to a late log phase as determined by the fluorescence mode of synchrotron X-ray Absorption Near Edge Structure analysis. *Acinetobacter* sp. strain HER\_I could grow in the modified MTB medium supplement with the iron ion solution as high as 160 mg/l. Also, its ability to uptake iron ions was significantly higher than those of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, while its capability to adsorb iron ions was similar to *E. coli* but significantly greater than *S. aureus*. The results of this work suggested that *Acinetobacter* sp. strain HER\_I, the first magnetic producing bacteria isolated in Thailand, could be a potential bacterial strain for a production of magnetic nanoparticles and a bioremediation of high iron-contaminated water.

ง  
สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ .....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ค
สารบัญเรื่อง .....	ง
บทที่ 1.....	1
บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย .....	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	2
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....	3
บทที่ 2.....	4
เอกสารที่เกี่ยวข้อง .....	4
2.1 อนุภาคนาโนแม่เหล็ก .....	4
2.2 การผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็ก .....	10
2.3 แมกนีโตแทกติกแบคทีเรีย .....	15
2.4 แมกนีโตโซม .....	16
2.5 ความหลากหลายของแมกนีโตแทกติกแบคทีเรีย.....	21
2.6 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญและการสร้างอนุภาคนาโนแม่เหล็ก .....	21
2.7 การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียที่ผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็ก.....	23
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	25
บทที่ 3.....	33
วิธีดำเนินการวิจัย .....	33
3.1 การแยกแบคทีเรียสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็ก.....	33
3.2 ศึกษาสมบัติเบื้องต้นทางชีวเคมีและกายภาพของแบคทีเรีย .....	35
3.3 การจำแนกหมวดหมู่ของแบคทีเรียด้วยลำดับสารพันธุกรรม 16S rRNA .....	36
3.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย .....	38
3.5 ศึกษาปัจจัยของแหล่งคาร์บอนต่อระยะการผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กของแบคทีเรีย .....	38
3.6 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก.....	39
3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	40
บทที่ 4.....	41

ผลการทดลองและอภิปราย.....	41
4.1 การสำรวจและศึกษาลักษณะของเซลล์แบคทีเรียที่สามารถผลิตอนุภาคนาโนของเหล็ก.....	41
4.2 ผลการจำแนกหมวดหมู่ของแบคทีเรียด้วยลำดับสารพันธุกรรม 16S rRNA.....	47
4.3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย.....	50
4.4 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็ก.....	54
4.5 สมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนแม่เหล็กภายในเซลล์แบคทีเรีย.....	57
4.6 การแยกอนุภาคนาโนแม่เหล็กจากเซลล์แบคทีเรีย <i>Acinetobacter</i> sp. HER_I ด้วยการทำให้เซลล์แตก.....	58
4.7 การแยกอนุภาคนาโนแม่เหล็กโดยการเผาเซลล์แบคทีเรีย.....	62
4.8 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่ได้.....	64
4.9 การศึกษาการดูดซับและการดูดซึมไอออนของเหล็กของแบคทีเรีย <i>Acinetobacter</i> sp. HER_I....	66
บทที่ 5.....	69
บทสรุป.....	69
<b>สรุปผลดำเนินการ.....</b>	<b>70</b>
บรรณานุกรม.....	71
ภาคผนวก.....	79
ภาคผนวก ก.....	80
1. สารเคมี.....	81
2. Modified MTB medium agar/broth.....	81
3. Wolfe's mineral solution.....	82
4. Gram stain solution.....	82
ภาคผนวก ข.....	86
1. ที่ตั้งแหล่งเก็บตัวอย่าง และรหัสตัวอย่าง.....	87
2. ลักษณะแหล่งเก็บตัวอย่าง.....	88
ภาคผนวก ค.....	89
1. ข้อมูล <i>d</i> -spacing และระนาบผลึกออกไซด์ของเหล็กของแบคทีเรียที่แยกได้ 6 ไอโซเลต เทียบกับ การวัดมาตรฐาน JCPDS No. 89-0951.....	90
3. ตารางเปรียบเทียบรูปร่างเซลล์และแมกนีโตโซมของแบคทีเรียที่แยกได้กับแบคทีเรีย MTB ที่มีรายงาน ก่อนหน้า.....	92
ภาคผนวก ง.....	93
ประวัตินักวิจัย.....	121



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ประเภทของสภาพแม่เหล็กตามการจัดเรียงตัวของอะตอมภายในโครงสร้าง .....	5
ตารางที่ 2.2 แบคทีเรียที่สังเคราะห์อนุภาคโลหะในระดับนาโนเมตร .....	12
ตารางที่ 2.3 แมกนีโตแทกติกแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ .....	24
ตารางที่ 2.4 แมกนีโตแทกติกแบคทีเรียที่ถูกศึกษาลำดับดีเอ็นเอแบ่งตามไฟลัม .....	25
ตารางที่ 2.5 แมกนีโตแทกติกแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในคลาส <i>Alphaproteobacteria</i> .....	26
ตารางที่ 2.6 แมกนีโตแทกติกแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในคลาส <i>Deltaproteobacteria</i> และ ไฟลัม Nitrospirae .....	32
ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีแบคทีเรียที่แยกได้ .....	42
ตารางที่ 4.2 พฤติกรรมการตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กและขนาดของเซลล์แบคทีเรียที่แยกได้ .....	43
ตารางที่ 4.3 สมบัติทางชีวเคมีของเซลล์แบคทีเรียที่แยกได้ .....	46
ตารางที่ 4.4 ค่า <i>d-spacing</i> และระนาบของโครงสร้างผลึกออกไซด์ของเหล็กของแบคทีเรีย <i>Acinetobacter</i> sp. HER_I .....	61
ตารางที่ 4.5 ค่า <i>d-spacing</i> และระนาบของโครงสร้างผลึกออกไซด์ของเหล็กของแบคทีเรีย <i>Acinetobacter</i> sp. HER_I ซึ่งเตรียมได้จากการผาเซลล์แบคทีเรีย .....	64

## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 การจำลองแมกนีติกไดโพลโมเมนต์.....	4
ภาพที่ 2.2 สมบัติทางแม่เหล็กของสารที่มีสภาพแม่เหล็กไดอะแมกนีติก .....	6
ภาพที่ 2.3 สมบัติทางแม่เหล็กของสารที่มีสภาพแม่เหล็กแบบพาราแมกนีติก.....	6
ภาพที่ 2.4 โดเมนแม่เหล็กและทิศทางของไดโพลโมเมนต์ในแม่เหล็กแบบเฟอร์โรแมกนีติก .....	7
ภาพที่ 2.5 การจัดเรียงทิศทางของไดโพลโมเมนต์แม่เหล็ก.....	7
ภาพที่ 2.6 สมบัติทางแม่เหล็กของสารที่มีสภาพแม่เหล็กแบบเฟอร์โรแมกนีติก.....	8
ภาพที่ 2.7 สมบัติทางแม่เหล็กของสารที่มีสภาพแม่เหล็กแบบแอนติเฟอร์โรแมกนีติก .....	9
ภาพที่ 2.8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแมกนีไทเซชันกับสนามแม่เหล็กภายนอก.....	10
ภาพที่ 2.9 Biologically Induced Mineralization ของ <i>Shewanella oneidensis</i> .....	14
ภาพที่ 2.10 Biological Control Magnetite (BCM) ในแมกนีโตแทกติกแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลสาบ Caspian.....	14
ภาพที่ 2.11 ลักษณะรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียแมกนีโตแทกติก .....	16
ภาพที่ 2.12 ลักษณะแมกนีโตโซมเรียงต่อเป็นสายตามแนวสนามแม่เหล็ก จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน .....	16
ภาพที่ 2.13 องค์ประกอบของแมกนีโตโซม.....	17
ภาพที่ 2.14 ความหลากหลายทางรูปร่างและขนาดของแมกนีโตโซมที่มีความจำเพาะในแมกนีติกแบคทีเรียแต่ละชนิด.....	17
ภาพที่ 2.15 การเกิดแมกนีโตโซมในแบคทีเรีย <i>Magnetospirillum</i> .....	19
ภาพที่ 2.16 ภาพจำลองกลไกการสังเคราะห์แมกนีโตโซม และโปรตีนที่เกี่ยวข้อง .....	20
ภาพที่ 2.17 ภาพจำลองโปรตีนที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนการจัดเรียงตัวของแมกนีโตโซมในกลไกการสังเคราะห์แมกนีโตโซมของแบคทีเรีย <i>M. gryphiswaldense</i> .....	20
ภาพที่ 2.18 การแยกแมกนีโตแทกติกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินตะกอนด้วยแม่เหล็ก.....	22
ภาพที่ 3.1 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียด้วยแม่เหล็ก .....	33
ภาพที่ 3.2 ชุดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กด้วยเทคนิค Trapping.....	34
ภาพที่ 3.3 ชุดแยกบริสุทธิ์แบคทีเรียที่สังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กด้วยเทคนิค Ractrack .....	35
ภาพที่ 3.4 การเตรียมสไลด์ด้วยเทคนิคสไลด์แขวน .....	35
ภาพที่ 3.5 การศึกษาการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ .....	36
ภาพที่ 4.1 รูปร่างของแมกนีโตโซมภายในเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต HER_I HER_II KPI_I L3_5 SRL1 TSB2 UDD1 และ SKN1 .....	44

ภาพที่ 4.2 การกระจายตัวของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแมกนีโตโซมที่พบภายในเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต HER_I HER_II KPI_I L3_5 SRL1 และ TSB2.....	45
ภาพที่ 4.3 การเจริญของแบคทีเรียไอโซเลต HER_I HER_II KPI_I L3_5 SRL1 และ TSB2 .....	47
ภาพที่ 4.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย <i>Acinetobacter</i> sp. HER_I แบคทีเรีย <i>Acinetobacter</i> sp. L3_5 แบคทีเรีย <i>Commamonas</i> sp. HER_II แบคทีเรีย <i>Pseudomonas</i> sp. KPI_I แบคทีเรีย <i>Pseudomonas</i> sp. SRL1 และแบคทีเรีย <i>Serratia</i> sp. TSB2 ด้วยโปรแกรม MEGA 6.06.....	49
ภาพที่ 4.5 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของแบคทีเรีย <i>Acinetobacter</i> sp. HER_I .....	50
ภาพที่ 4.6 ผลของพีเอชต่อการเจริญของแบคทีเรีย <i>Acinetobacter</i> sp. HER_I .....	51
ภาพที่ 4.7 ผลของแหล่งอาหารคาร์บอนต่อการเจริญของแบคทีเรีย <i>Acinetobacter</i> sp. HER_I .....	52
ภาพที่ 4.8 ผลของแหล่งคาร์บอนจากกรดอินทรีย์ ที่ขาดแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของแบคทีเรีย <i>Acinetobacter</i> sp. HER_I.....	53
ภาพที่ 4.9 ผลของความเข้มข้นของอิออนของเหล็ก ที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย <i>Acinetobacter</i> sp. HER_I ที่ .....	54
ภาพที่ 4.10 สเปกตรัมของสารเปรียบเทียบมาตรฐาน Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> และ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> จากเทคนิค XANS.....	55
ภาพที่ 4.11 สเปกตรัมออกไซด์ของเหล็ก จาก <i>Acinetobacter</i> sp. HER_I จากเทคนิค XANES .....	56
ภาพที่ 4.12 สเปกตรัมออกไซด์ของเหล็กจาก <i>Acinetobacter</i> sp. HER_I ที่เลี้ยงในอาหาร Modified MTB ที่เติมกรดแอสติค 10 มิลลิโมลาร์ จากการศึกษาด้วยเทคนิค XANES .....	57
ภาพที่ 4.13 องค์ประกอบแร่ธาตุและโครงสร้างผลึกของเหล็กออกไซด์ในแมกนีโตโซมของแบคทีเรีย <i>Acinetobacter</i> sp. HER_I.....	58
ภาพที่ 4.14 รูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย และลักษณะของถุงแมกนีโตโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	59
ภาพที่ 4.15 สภาวะการเจริญของแบคทีเรีย <i>Acinetobacter</i> sp. HER_I.....	60
ภาพที่ 4.16 องค์ประกอบของแร่ธาตุ และลักษณะโครงสร้างผลึกของอนุภาคที่ได้จากการสกัดแมกนีโตโซมจากเซลล์แบคทีเรีย <i>Acinetobacter</i> sp. ไอโซเลต HER_I.....	62
ภาพที่ 4.17 ลักษณะทางกายภาพและการกระจายตัวของขนาดของอนุภาคแมกนีไทท์ที่ได้จากการเผาเซลล์แบคทีเรีย .....	63
ภาพที่ 4.18 ลักษณะทางกายภาพ องค์ประกอบของแร่ธาตุ และโครงสร้างผลึกของออกไซด์ของเหล็กของอนุภาคหลังจากการเผาเซลล์แบคทีเรีย <i>Acinetobacter</i> sp. HER_I ที่อุณหภูมิสูง .....	63
ภาพที่ 4.19 ผลของสารละลายเหล็กต่อการเจริญของแบคทีเรีย <i>Acinetobacter</i> sp. HER_I.....	65
ภาพที่ 4.20 ความสามารถของแบคทีเรีย <i>Acinetobacter</i> sp. HER_I เมื่อเปรียบเทียบกับ <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i> ในการทนต่อสภาวะที่มีสารละลายเหล็กที่ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	66

ญ

ภาพที่ 4.21 ความสามารถในการการดูดซึมไอออนของเหล็กเข้าสู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I เมื่อเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* และ *S. aureus* ที่ความเข้มข้นของสารละลายไอออนของเหล็ก 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ..... 67

ภาพที่ 4.22 ความสามารถในการการดูดซึมไอออนของเหล็กเข้าสู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I เมื่อเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* และ *S. aureus* ที่ความเข้มข้นของสารละลายไอออนของเหล็ก 160 มิลลิกรัมต่อลิตร..... 67

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

อนุภาคนาโนแม่เหล็ก ได้รับความสนใจในการประยุกต์ใช้ในงานด้านอิเล็กทรอนิกส์ (เช่น การบันทึกในระบบแม่เหล็ก อุปกรณ์เก็บข้อมูลระบบแม่เหล็ก) ด้านชีวการแพทย์ (การสร้างภาพด้วยเรโซแนนซ์แม่เหล็ก การรักษาโรคด้วยความร้อน และระบบการให้ยาตรงเป้าหมาย) ด้านไบโอเทคโนโลยี (เช่น การแยกสารชีวโมเลกุล ได้แก่ การแยกโปรตีน การแยกดีเอ็นเอ การแยกอาร์เอ็นเอ) และด้านสิ่งแวดล้อม (Song et al., 2007) อนุภาคนาโนแม่เหล็กเหล่านี้ส่วนใหญ่ได้มาจากการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี เช่น การตกตะกอนร่วม (co-precipitation) เทอร์มอลดีคอมโพสิชัน (thermal decomposition หรือ sonolysis) ไมโครอิมัลชัน (microemulsion) ปฏิกริยาโซ-เจล (sol-gel reaction) วิธีโพลีออล (polyol method) วิธีอิเล็กโตรเคมีคอล (electrochemical method) และการสังเคราะห์แบบโพลีอินเจคชัน (flow injection syntheses) แม้ว่าวิธีดังกล่าวมีข้อดี คือ สามารถผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กได้ในปริมาณสูง แต่มีข้อจำกัดคือ มีต้นทุนสูงเนื่องจากต้องใช้เครื่องมือและพลังงานในการกระตุ้นปฏิกิริยาสูง ก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องจากสารตกค้างจากสารตั้งต้นและผลผลิตที่เกิดจากปฏิกิริยา และมีพื้นที่ผิวที่ต้องดัดแปลงให้เหมาะสมต่อการเชื่อมกับสารชีวโมเลกุลเพื่อนำไปใช้ประโยชน์เชิงชีวภาพ

นอกจากการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีแล้ว พบว่าแบคทีเรียในธรรมชาติบางชนิดสามารถผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กได้ และมีบางชนิดที่นอกจากจะผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กภายในเซลล์ได้แล้ว แบคทีเรียยังใช้อนุภาคนาโนแม่เหล็กเหล่านี้ในการเคลื่อนที่ตอบสนองต่อสนามแม่เหล็ก ซึ่งเรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า แมกนีโตแทกติกแบคทีเรีย (magnetotactic bacteria, MTB) ในธรรมชาติพบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มีแกนเหล็กเข้าเซลล์ และสามารถสะสมเหล็กในเซลล์สูงกว่าภายนอกเซลล์มากกว่า 4% ของน้ำหนักแห้ง ต่อมาภายหลังจะเกิดกระบวนการออกซิเดชัน และตกตะกอนในรูปออกไซด์ของเหล็กคือ แมกนีไทท์ (magnetite,  $Fe_3O_4$ ) หรือ ซัลไฟด์ของเหล็กคือ กรีไกท์ (greigite,  $Fe_3S_4$ ) ซึ่งมีสมบัติทางแม่เหล็กเป็น single domain magnetic ชนิดซูเปอร์พาราแมกนีติก (super paramagnetic) (Hergt et al., 2005; Schüler, 2008) ซึ่งมีขนาด 30–120 นาโนเมตร โดยถูกห่อหุ้มด้วยฟอสโฟลิปิด เรียกโครงสร้างนี้ว่า แมกนีโตโซม (magnetosome) (Perez-Gonzalez et al., 2010; Tanaka et al., 2010) ซึ่งอาจมีการเรียงตัวเป็นสาย (Hennebel et al., 2009) ที่พบในแบคทีเรีย เช่น *Magnetospirillum magnetotacticum* *Magnetospirillum gryphiswaldense* *Acidithiobacillus ferrooxidans* และ *Magnetobacterium bavaricus* ซึ่งสามารถออกซิไดซ์ Fe(II) และ Fe(III) เป็นแมกนีไทท์ และสะสมในแมกนีโตโซมภายในเซลล์ การสะสมอนุภาคนาโนแม่เหล็กนี้ทำให้แบคทีเรียสามารถตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กได้ (Liu et al., 2008; Liu et al., 2006; Philipse and Maas, 2002; Schüler et al., 1995) จากสมบัติดังกล่าวทำให้แมกนีโตแทกติกแบคทีเรียได้รับความสนใจในฐานะแหล่งของอนุภาคนาโนแม่เหล็กแหล่งใหม่ ที่สังเคราะห์ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ สนับสนุนกระแสของเทคโนโลยีสีเขียว

เขียว (green technologies) ซึ่งมุ่งลดสารพิษและสารตกค้างจากขบวนการผลิต อีกทั้งอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่ได้จากแบคทีเรียมีความเป็นพิษต่ำเมื่อเทียบกับวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี นอกจากนี้ยังมีขนาด และรูปร่างที่แน่นอนซึ่งจำเพาะต่อเชื้อแต่ละชนิด มีการกระจายตัวที่ดี และสามารถปรับเปลี่ยนพื้นผิวเพื่อประยุกต์ใช้ด้านการแพทย์ เทคโนโลยีชีวภาพ และอนุชีววิทยาได้ง่าย เนื่องจากถูกห่อหุ้มด้วยพอสโฟลิปิด (Pan et al., 2005) อย่างไรก็ตามสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ กลไกในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็ก และการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียเพื่อให้มีสมบัติที่ดี เพื่อการประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ ยังเป็นสิ่งสำคัญ แต่เป็นที่น่าเสียดายที่ยังไม่พบรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสายพันธุ์แบคทีเรียและการผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กโดยแบคทีเรียในประเทศไทย เมื่อเร็ว ๆ นี้ทีมนักวิจัยประสบความสำเร็จในการสำรวจและแยกบริสุทธิ์สายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กแมกนีไทท์เป็นครั้งแรกในประเทศไทย จากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเหล็ก และเหมืองแร่ ซึ่งมีความแตกต่างจากสายพันธุ์อื่นที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้จากต่างประเทศ ดังนั้นแบคทีเรียดังกล่าวจึงเป็นโมเดลที่ดีในการศึกษาการผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็ก และศึกษาสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่ได้ ทั้งนี้เพื่อเป็นพื้นฐานในการพัฒนาเพื่อการประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ต่อไป

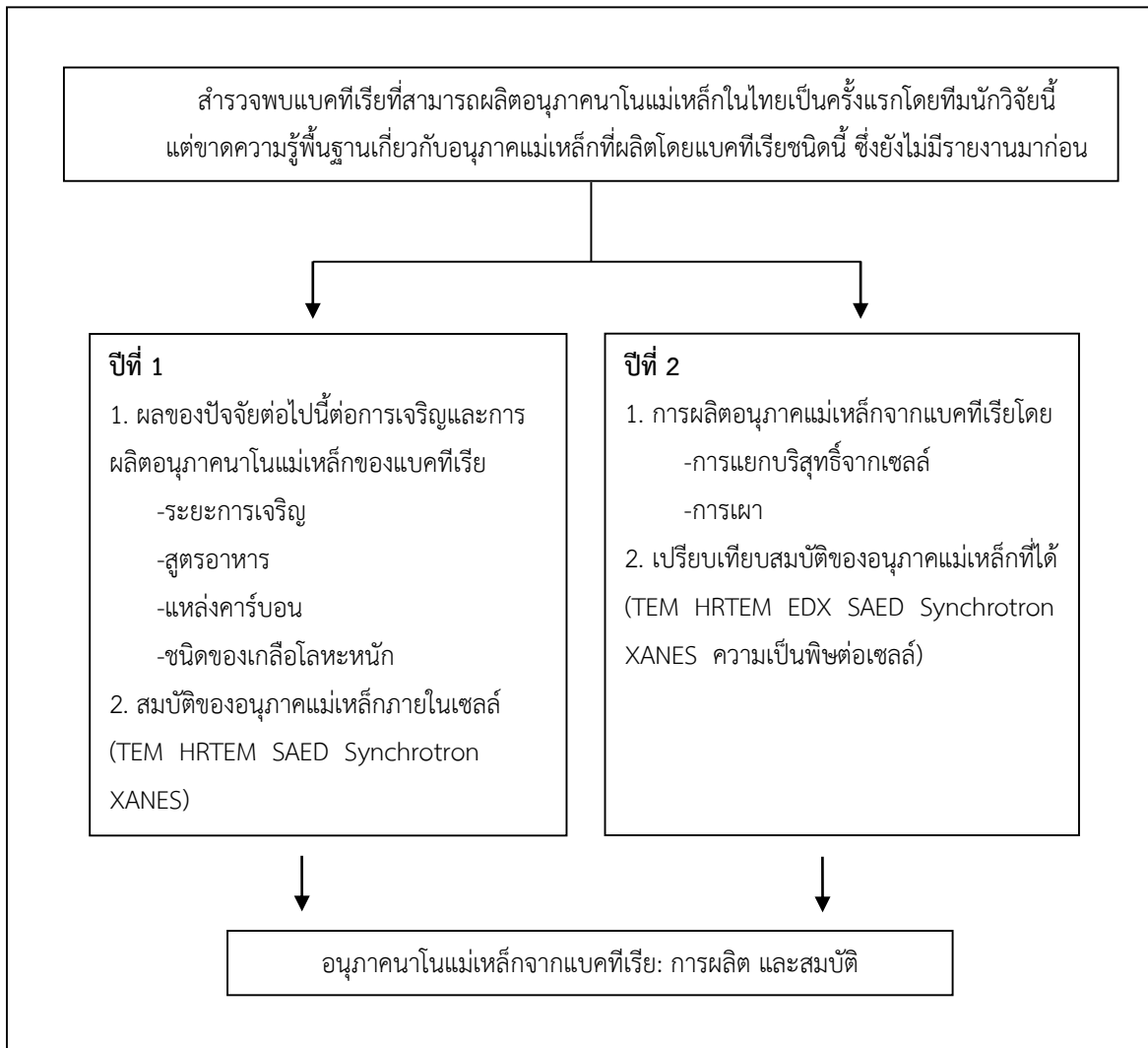
## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาผลของระยะการเจริญและสูตรอาหารต่อการเจริญของแบคทีเรีย การผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กของแบคทีเรีย และสมบัติบางประการของอนุภาคนาโนแม่เหล็กภายในเซลล์แบคทีเรีย
- 2) เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลักษณะและสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่ได้จากการทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกและจากการเผา

## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีขอบเขตครอบคลุมการศึกษาผลของระยะการเจริญและสูตรอาหาร ต่อการเจริญของแบคทีเรีย การผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กของแบคทีเรีย และสมบัติบางประการของอนุภาคนาโนแม่เหล็กภายในเซลล์แบคทีเรียที่แยกได้ในประเทศไทย โดยศึกษาชนิดและสัดส่วนของออกไซด์ของเหล็กชนิดต่างๆในระยะเวลาการเจริญของแบคทีเรีย สูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและโลหะหนักที่แตกต่างกันต่อการเจริญและการผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็ก การศึกษาลักษณะและสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่ได้จากการแยกออกจากเซลล์แบคทีเรียด้วยการทำให้เซลล์แตกและการเผา

#### 1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



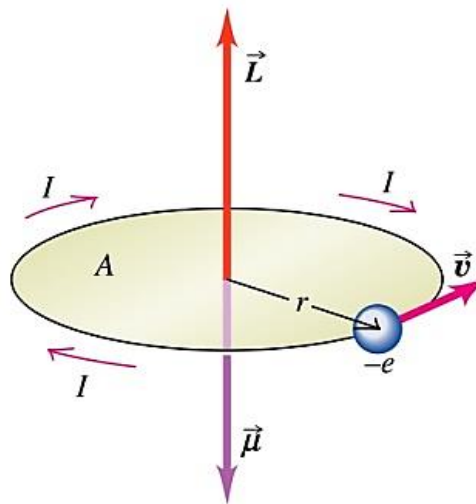
## บทที่ 2

### เอกสารที่เกี่ยวข้อง

แมกนีโตแทกติกแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่มีการสะสมอนุภาคนาโนแม่เหล็กอยู่ในเซลล์ แบคทีเรียดังกล่าวสามารถตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กโลกได้ ซึ่งเป็นผลมาจากสภาพความเป็นแม่เหล็กจากอนุภาคนาโนที่อยู่ในอแกนเนลล์ของแบคทีเรีย อนุภาคเหล่านี้ได้แก่ ออกไซด์ของเหล็กหรือซัลไฟด์ของเหล็ก ถึงแม้ว่าในปัจจุบันได้มีการให้ความสนใจเกี่ยวกับแมกนีโตแทกติกแบคทีเรียมากขึ้น แต่การเลี้ยงและการแยกแบคทีเรียที่ได้มาจากแหล่งน้ำปนเปื้อนของเหมืองแร่เหล็กที่อยู่บริเวณเขตร้อน โดยเฉพาะในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการศึกษา ดังนั้นจึงทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาการเลี้ยงและการแยกแมกนีโตแทกติกแบคทีเรียในเขตอุตสาหกรรมเหมืองแร่เหล็กในประเทศไทย

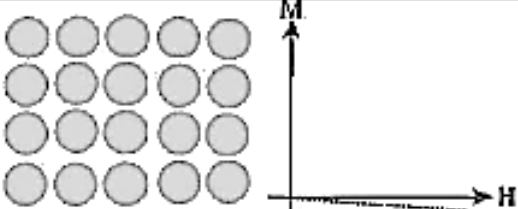
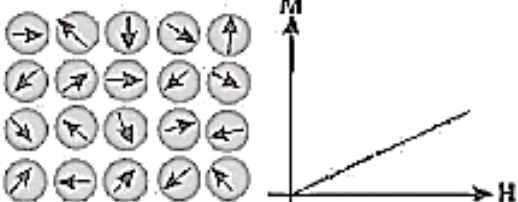
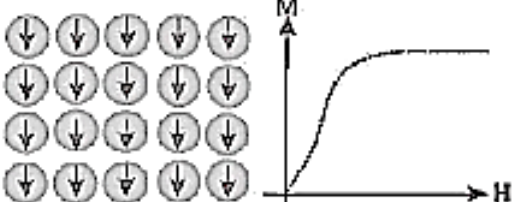
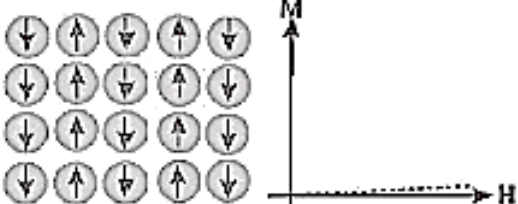
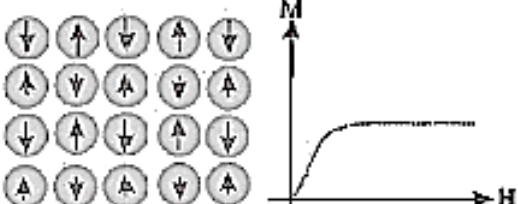
#### 2.1 อนุภาคนาโนแม่เหล็ก

อนุภาคนาโนแม่เหล็ก คือ อนุภาคของแม่เหล็กที่มีขนาด 1–100 นาโนเมตร สามารถตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กได้ โดยทั่วไปอนุภาคดังกล่าวที่สังเคราะห์ได้ เช่นเหล็ก (Fe) นิกเกิล (Ni) และโคบอลต์ (Co) มักอยู่ในรูปสารประกอบเกลือของโลหะได้แก่ เกลือคลอไรด์ เกลือไนเตรท และเกลือซัลเฟต การจัดเรียงตัวของอะตอมภายในโครงสร้างแต่ละโมเลกุลมีผลต่อขนาด และสมบัติทางแม่เหล็กของอนุภาค ซึ่งเกิดจากการหมุนของอิเล็กตรอนรอบ ๆ อะตอมและการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนรอบนิวเคลียส หรือที่เรียกกันว่า แมกนีติกไดโพลโมเมนต์ ดังภาพที่ 2.1 โดยแบ่งสภาวะความเป็นแม่เหล็กได้ 6 สภาวะ ดังตารางที่ 2.1

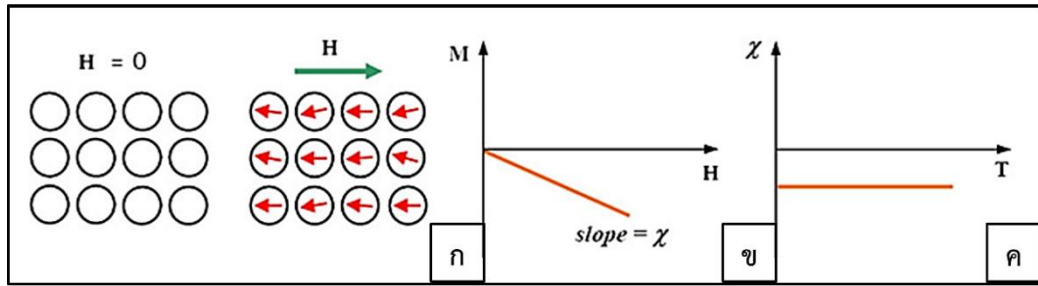


ภาพที่ 2.1 การจำลองแมกนีติกไดโพลโมเมนต์ (Callister and Rethwisch, 2011)

ตารางที่ 2.1 ประเภทของสภาพแม่เหล็กตามการจัดเรียงตัวของอะตอมภายในโครงสร้าง (Callister and Rethwisch, 2011)

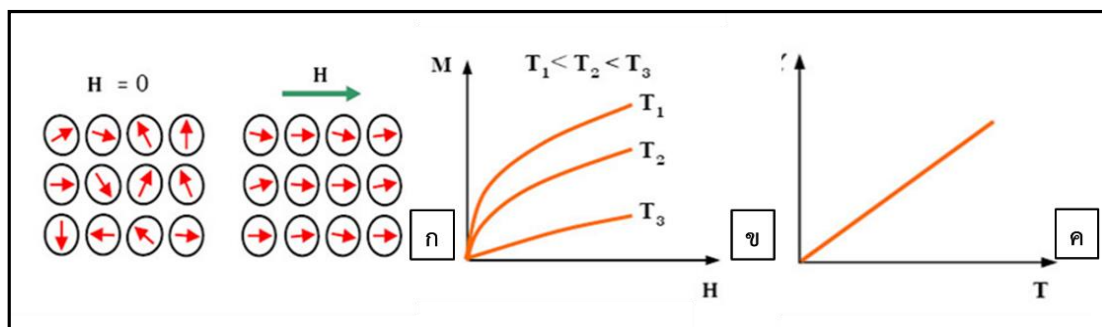
วัสดุจำพวก	สภาพรับไว้ได้ เชิงแม่เหล็ก	โมเมนต์แม่เหล็ก ภายในอะตอม	อะตอม/ทราบฟลักซ์และดาวภทที่่ยวนำเชิงแม่เหล็ก
ไดอะแมกเนติก (Diamagnetic)	มีค่าต่ำ และเป็นค่าลบ	ไม่มี	
พาราแมกเนติก (Paramagnetic)	มีค่าต่ำ และเป็นค่าบวก	มีและมีการเรียง ตัวระงะระกะ	
เฟอร์โรแมกเนติก (Ferromagnetic)	มีค่าสูงมาก และเป็นค่าบวก	มีและมีการเรียง ตัวอย่างเป็น ระเบียบในทิศทาง เดียวกัน	
แอนติเฟอร์โรแมก เนติก (Anti- ferromagnetic)	มีค่าต่ำ และเป็นค่าบวก	มีและมีการเรียง ตัวในทิศทาง ตรงกันข้ามกัน มี ขนาดเท่ากัน	
เฟอร์ริแมกเนติก (Ferrimagnetic)	มีค่าสูง และเป็นค่าบวก	มีและมีทิศ ทางการเรียงตัว ตรงกันข้ามกัน มี ขนาดแตกต่างกัน	

2.2.1 กลุ่มไดอะแมกเนติก (diamagnetic) คือ สารที่แสดงคุณสมบัติแม่เหล็กในเชิงต้านกับสนามแม่เหล็กภายนอก เมื่อมีสนามแม่เหล็กภายนอกกระทำต่ออะตอมของสาร จะทำให้อิเล็กตรอนที่เคลื่อนเป็นวงโคจรรอบนิวเคลียสของอะตอมเสียสมดุล เกิดเป็นขั้วแม่เหล็กขนาดเล็กขึ้นภายในอะตอม โดยขั้วแม่เหล็กนั้นจะเกิดการต้านกับสนามแม่เหล็กภายนอก (ภาพที่ 2.2ก) ทำให้เกิดค่าของสภาพรับไว้ได้เชิงแม่เหล็ก (magnetic susceptibility;  $X_m$ ) ในเชิงลบเล็กน้อย (ภาพที่ 2.2ข) ค่าสภาพรับไว้ได้เชิงแม่เหล็กนั้นจะถูกหักล้างด้วยผลสถานะแม่เหล็กเชิงบวก และไม่เปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิ (ภาพที่ 2.2ค) สมบัติทางแม่เหล็กลักษณะนี้พบได้ใน แร่ควอตซ์ แร่แกรไฟต์ หินอ่อน เกลือหิน เป็นต้น (Haering and Wallace, 1957; Narayanan and Sakthivel, 2010)



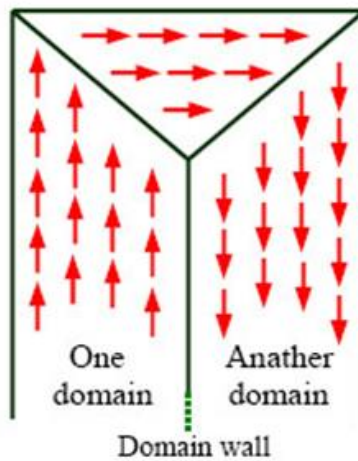
ภาพที่ 2.2 สมบัติทางแม่เหล็กของสารที่มีสภาพแม่เหล็กไดอะแมกเนติก โดย ภาพ ก คือการจัดเรียงโมเมนต์แม่เหล็กเนื่องจากอิเล็กตรอนในอะตอมที่มีและไม่มีสนามแม่เหล็กภายนอก ( $H$ ) มากกระทำ ภาพ ข คือการเปลี่ยนแปลงของแมกนีไทเซชัน ( $M$ ) เมื่อได้รับสนามแม่เหล็กจากภายนอก ( $H$ ) และภาพ ค คือค่าสภาพรับไว้เชิงแม่เหล็กที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิ (Perez-Gonzalez et al., 2010)

2.2.2 กลุ่มพาราแมกเนติก (paramagnetics) คือ สารที่เมื่ออยู่ในสถานะที่ไม่มีสนามแม่เหล็ก ( $H=0$ ) มากระตุ้น อิเล็กตรอนในอะตอมมีการจัดเรียงตัวแบบสุ่ม เกิดการหักล้างให้โมเมนต์แม่เหล็กมีค่าสุทธิเป็นศูนย์ เมื่อถูกกระตุ้นจากสนามแม่เหล็กภายนอก อิเล็กตรอนจะมีการจัดเรียงตัวในทิศทางเดียวกับสนามแม่เหล็ก เกิดโมเมนต์แม่เหล็กทางบวกซึ่งจะเปลี่ยนแปลงไปตามสนามแม่เหล็กภายนอก (ภาพที่ 2.3ก) โดยโมเมนต์แม่เหล็กนี้จะแปรผกผันกับอุณหภูมิ (ภาพที่ 2.3ข) และสภาพความเป็นแม่เหล็กจะหายไปเมื่อหยุดให้สนามแม่เหล็กภายนอก นอกจากนั้นวัตถุจำพวกนี้ยังมีค่าของสภาพรับไว้ได้เชิงแม่เหล็กของวัตถุเป็นค่าบวกและมีค่าอยู่ระหว่าง  $10^{-6}$ – $10^{-2}$  วัตถุที่มีคุณสมบัติแม่เหล็กจำพวกนี้ ได้แก่วัตถุทุกชนิดที่ไม่ใช่วัตถุจำพวกไดอะแมกเนติก (Havholm and Kocurek, 1988; Kotani, 1968)

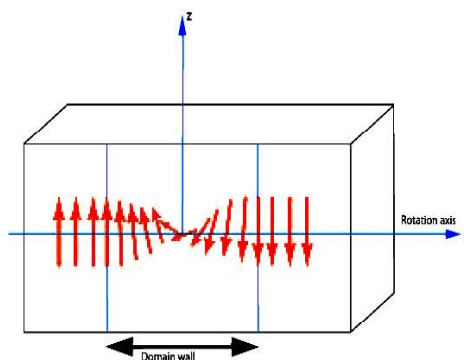


ภาพที่ 2.3 สมบัติทางแม่เหล็กของสารที่มีสภาพแม่เหล็กแบบพาราแมกเนติก เมื่อภาพ ก คือการจัดเรียงโมเมนต์แม่เหล็กเนื่องจากอิเล็กตรอนในอะตอมเมื่อมีและไม่มีสนามแม่เหล็กภายนอกมากกระทำ ภาพ ข คือการเปลี่ยนแปลงของแมกนีไทเซชัน ( $M$ ) เมื่อได้รับสนามแม่เหล็กจากภายนอก ( $H$ ) และ ค คือการเปลี่ยนแปลงของค่าสภาพรับไว้เชิงแม่เหล็ก เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (Zhang et al., 2011)

2.2.3 กลุ่มเฟอร์โรแมกเนติก (ferromagnetism) คือ เป็นสารที่มีสภาพความเป็นแม่เหล็กเมื่อถูกเหนี่ยวนำจากสนามแม่เหล็กภายนอก และเมื่อนำสนามแม่เหล็กภายนอกออกไปจะยังคงมีสภาพความเป็นแม่เหล็กอยู่ นั่นคือ สารมีโมเมนต์แม่เหล็กถาวรในโครงสร้างอะตอม สารจำพวกนี้มีสภาพรับไว้ได้เชิงแม่เหล็กเป็นค่าบวกและมีค่ามากกว่า 100 ขึ้นไป หรือกล่าวอีกนัยหนึ่ง คือเป็นวัสดุจำพวกพาราแมกเนติกที่มีค่าของสภาพรับไว้ได้เชิงแม่เหล็กมากกว่า 100 ขึ้นไป สารที่จัดอยู่ในกลุ่มเฟอร์โรแมกเนติก คือแร่ที่ประกอบด้วยธาตุ Fe Co Ni Gadolinium (Gd) และ Dysprosium (Dy) สารในกลุ่มเฟอร์โรแมกเนติกภายในจะประกอบด้วยอาณาบริเวณย่อยๆ เรียก โดเมนแม่เหล็ก (magnetic domain) แต่ละโดเมนถูกแบ่งด้วยผนังกัน เรียก ผนังโดเมน (domain wall) ภายในโดเมนแต่ละโดเมนมีไดโพลโมเมนต์แม่เหล็กในทิศทางเดียวกัน (ภาพที่ 2.4) โดยบริเวณขอบโดเมนมีทิศทางของโมเมนต์แม่เหล็กจะค่อย ๆ เปลี่ยนไปที่ละน้อย (ภาพที่ 2.5)

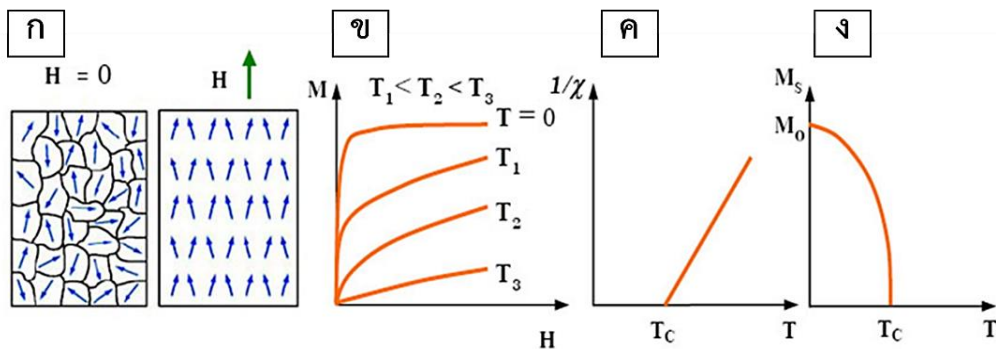


ภาพที่ 2.4 โดเมนแม่เหล็กและทิศทางของไดโพลโมเมนต์แม่เหล็กในแม่เหล็กแบบเฟอร์โรแมกเนติก (Chambers et al., 2006)



ภาพที่ 2.5 การจัดเรียงทิศทางของไดโพลโมเมนต์แม่เหล็ก ซึ่งจะค่อย ๆ เปลี่ยนทิศไปภายในผนังโดเมน (Farzan et al., 2010)

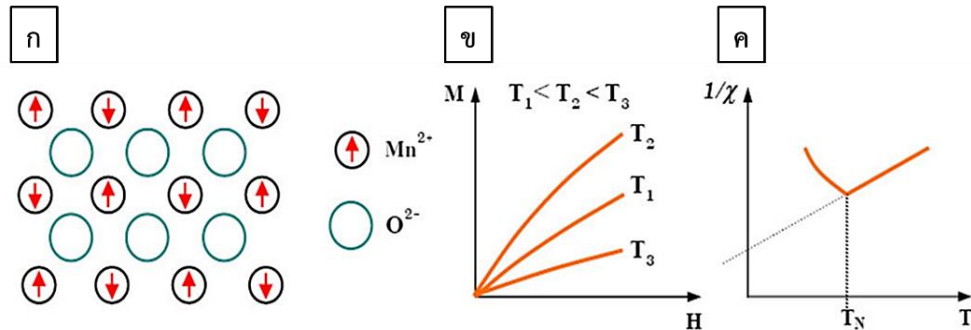
โดยทั่วไปโดเมนต่างๆ จะจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบเพื่อให้ระบบทั้งหมดเข้าสู่สภาวะพื้น (ground stage) ดังนั้นเฟอร์โรแมกเนติกที่ยังไม่ถูกกระตุ้นด้วยสนามแม่เหล็กภายนอกอาจไม่แสดงสภาพแม่เหล็ก เนื่องจากผลรวมของโมเมนต์แม่เหล็กของโดเมนทั้งหมดเป็นศูนย์ แต่เมื่อนำไปวางในสนามแม่เหล็ก โมเมนต์แม่เหล็กจะมีการจัดเรียงตัวของอิเล็กตรอนในทิศทางที่สอดคล้องกับทิศของสนามแม่เหล็ก (ภาพที่ 2.6 ก) ดังนั้น เมื่อมีสนามแม่เหล็กภายนอกมากกระทำ สารในกลุ่มเฟอร์โรแมกเนติกจะแสดงสภาพแม่เหล็กที่แรงมากกว่าสารแม่เหล็กแบบไดอะแมกเนติกและพาราแมกเนติก และคงสภาพแม่เหล็กได้แม้หยุดให้สนามแม่เหล็กภายนอก เนื่องจากสนามโมเลกุลภายในสารมีความแรงมากพอที่จะทำให้โมเมนต์แม่เหล็กที่เกิดจากการสปินของอิเล็กตรอนแต่ละตัวหันเรียงตัวขนานกันในทิศเดียวภายในโดเมน นอกจากนี้อุณหภูมิยังมีผลต่อค่าแมกนีไทเซชัน กล่าวคือ ค่าแมกนีไทเซชันรวมของสารจะลดลงขณะที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 2.6ข) จนถึงอุณหภูมิหนึ่งที่เรียกว่า อุณหภูมิคูรี หรือ  $T_C$  ค่าแมกนีไทเซชันของสารจะแปรผันโดยตรงกับขนาดความเข้มของสนามแม่เหล็กภายนอก จึงส่งผลให้ค่าสภาพรับไว้ทางแม่เหล็กมีการเปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น (ภาพที่ 2.6ค และ 2.6ง)



ภาพที่ 2.6 สมบัติทางแม่เหล็กของสารที่มีสภาพแม่เหล็กแบบเฟอร์โรแมกเนติก โดยภาพ ก คือการจัดเรียงตัวของโมเมนต์แม่เหล็กของสารที่มีสภาพแม่เหล็กแบบเฟอร์โรแมกเนติก เมื่อไม่มีและมีสนามแม่เหล็กกระทำจากภายนอก ภาพ ข คือ การเปลี่ยนแปลงค่าแมกนีไทเซชัน ( $M$ ) เมื่อมีสนามแม่เหล็กจากภายนอก ( $H$ ) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ภาพ ค คือ การเปลี่ยนแปลงค่าสภาพรับไว้ทางแม่เหล็ก ( $X_m$ ) เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเพิ่มขึ้นจากอุณหภูมิคูรี ( $T_C$ ) และภาพ ง คือ การเปลี่ยนแปลงของแมกนีไทเซชัน ( $M$ ) เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิจากต่ำไปถึงอุณหภูมิคูรี ( $T_C$ ) (Farzan et al., 2010)

2.2.4 กลุ่มแม่เหล็กแบบแอนติเฟอร์โรแมกเนติก (antiferromagnetic) เป็นสารที่ถึงแม้ว่าจะมีโมเมนต์แม่เหล็กถาวรประกอบอยู่ในวัตถุ แต่ทิศทางการเรียงตัวของโมเมนต์แม่เหล็กถาวรภายในโดเมนแต่ละโดเมนมีการเรียงในทิศทางตรงกันข้าม และมีขนาดเท่ากัน จึงหักล้างกันหมด ทำให้มีค่าสภาพรับไว้ได้เชิงแม่เหล็กเป็นศูนย์ (ภาพที่ 2.7ก) ตัวอย่างสารที่มีสภาพแม่เหล็กแบบแอนติเฟอร์โร และสภาพแม่เหล็กแบบนี้มีการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของสภาพแม่เหล็กตามอุณหภูมิเช่นเดียวกับในกรณีของเฟอร์โร (ภาพที่ 2.7ข) กล่าวคือ

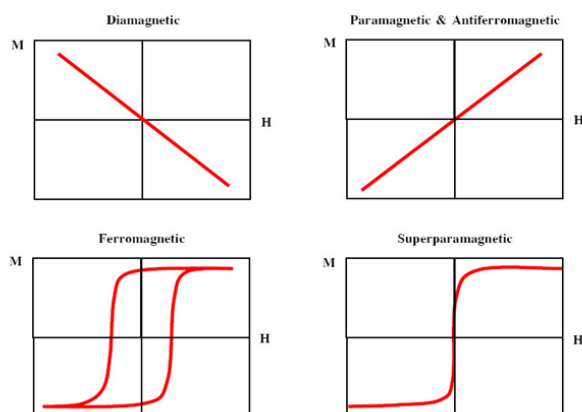
สารจะเปลี่ยนสภาพแม่เหล็กจากแบบแอนติเฟอร์โรเป็นสภาพแม่เหล็กแบบพาราเมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิเนล (Neel temperature) หรือ  $T_N$  (ภาพที่ 2.7) แร่ที่มีคุณสมบัติประเภทนี้ คือ ฮีมาไทต์



ภาพที่ 2.7 สมบัติทางแม่เหล็กของสารที่มีสภาพแม่เหล็กแบบแอนติเฟอร์โรแมกนีติก โดยภาพ ก คือการจัดเรียงแบบสวนทางกันของโมเมนต์แม่เหล็กอันเกิดจากการสปินของอิเล็กตรอนใน  $MnO$  ภาพ ข คือการเปลี่ยนแปลงของแมกนีไทเซชัน ( $M$ ) เมื่อมีสนามแม่เหล็กจากภายนอก ( $H$ ) ณ อุณหภูมิต่างๆ และภาพ ค คือการเปลี่ยนแปลงขอค่าสภาพรับไว้ทางแม่เหล็ก ( $X_m$ ) เมื่อถึงอุณหภูมิเนล (Sorop et al., 2004)

2.2.5 กลุ่มแม่เหล็กแบบเฟอร์ริ (Ferrimagnetisms) เป็นสารที่มีโมเมนต์แม่เหล็กถาวรประกอบอยู่ในภายใน และมีทิศทางการเรียงตัวของโมเมนต์แม่เหล็กถาวรภายในโดเมนมีการเรียงในทิศทางตรงกันข้าม แต่มีขนาดไม่เท่ากัน จึงทำให้มีอำนาจแม่เหล็ก และค่าของสภาพรับไว้ได้เชิงแม่เหล็กเป็นบวก วัสดุที่มีคุณสมบัติประเภทนี้ คือ สารประกอบจำพวกเฟอร์ไรต์ มีสูตรทางเคมีคือ  $XOFe_2O_3$  เมื่อ  $X$  คือ  $Mn$   $Co$   $Ni$   $Cu$   $Mg$  และ  $Zn$  เป็นต้น

2.2.6 กลุ่มซูเปอร์พาราแมกนีติก (superparamagnetic) คือ สารเฟอร์โรแมกนีติกที่มีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร พลังงานของผนังโดเมนจะเสถียรเมื่อถึงค่าวิกฤติค่าหนึ่ง ส่งผลทำให้อนุภาคนาโนแม่เหล็กแบบเฟอร์โรแมกนีติกกลายเป็นโดเมนแม่เหล็กเดี่ยว (single domain) เรียกว่า สภาพแม่เหล็กแบบซูเปอร์พาราแมกนีติก ซึ่งสมบัติทางแม่เหล็กจะแปรปรวนตามอุณหภูมิ และจะแสดงสมบัติทางแม่เหล็กเมื่อได้รับสนามแม่เหล็กภายนอกเท่านั้น โดยความสัมพันธ์ระหว่างสนามแม่เหล็กภายนอก ( $H$ ) กับค่าแมกนีไทเซชัน ( $M$ ) ที่เกิดขึ้นในสารที่มีสภาพแม่เหล็กแบบต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 2.8



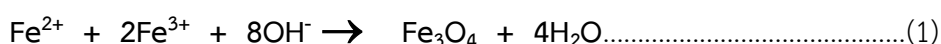
ภาพที่ 2.8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแมกนีไทเซชัน (M) กับสนามแม่เหล็กภายนอก (H) ของสารต่างๆ ที่มีสภาพแม่เหล็กแบบไดอะแมกเนติก พาราแมกเนติก เฟอร์โรแมกเนติก และซูเปอร์พาราแมกเนติก (Schüler, 2008)

## 2.2 การผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็ก

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กโดยทั่วไปประกอบด้วย 2 กระบวนการได้แก่ กระบวนการ top-down ซึ่งเป็นการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กจากการเปลี่ยนสสารที่มีขนาดใหญ่ให้เป็นอนุภาคในระดับนาโนเมตร กระบวนการ bottom-up เป็นการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กจากการรวมกันของอะตอมหรือโมเลกุลกลายเป็นอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาเคมีของสารตั้งต้น และวิธีทางชีวภาพ เช่น การอาศัยแบคทีเรียของจุลินทรีย์ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิกา และยีส้ม การใช้เชื้อรา *Fusarium oxysporum* เพื่อสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์ (Christine B Flies et al., 2005; Husseiny et al., 2015) เป็นต้น (ตารางที่ 2.2)

ปัจจุบันการผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กนิยมสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี เนื่องจากสามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กได้ในปริมาณมาก ให้ผลผลิตไว และอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่สังเคราะห์ได้ส่วนใหญ่มีขนาดใกล้เคียงกัน โดยการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กด้วยวิธีทางเคมี ได้แก่

2.1.1 วิธี co-precipitation เป็นปฏิกิริยาแบบตกตะกอนร่วมของสารประกอบโลหะ ดังแสดงในสมการที่ 1 โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างไอออนของเฟอร์รัสและเฟอร์ริกในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 โมล ภายใต้พีเอชระหว่าง 8 ถึง 14 และปราศจากออกซิเจน เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารตั้งต้นก่อนการฟอร์มรูปร่างเป็นอนุภาคนาโนแม่เหล็กได้สารประกอบแมกนีไทท์เป็นสารผลิตภัณฑ์ โดยวิธีนี้มีข้อดี คือ ประหยัดเวลา และขนาดอนุภาคที่ได้มีขนาดในระดับนาโนเมตร



2.2.2 วิธี sol-gel เป็นกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กโดยอาศัยปฏิกิริยา hydroxylation และ ปฏิกิริยา condensation ของสารตั้งต้นในสารละลาย เริ่มจากกระบวนการเปลี่ยนของเหลวที่เรียกว่า โซล ผ่านปฏิกิริยา condensation ทำให้เกิดการรวมตัวกัน (polymerization) ของสารอนินทรีย์ที่ใช้เป็นสาร

ตั้งต้น เกิดเป็นโครงสร้างสามมิติรูปตาข่ายของอออนโลหะมีลักษณะเป็นของแข็งที่เรียกว่า เจล จากนั้นเมื่อให้อุณหภูมิที่สูงขึ้นสารอินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบเหล่านั้นจะถูกเผาและสลายไป ทำให้เหลืออนุภาคนาโนแม่เหล็กเป็นสารผลิตภัณฑ์ การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กวิธีนี้เป็นที่นิยมมากในอุตสาหกรรมเซรามิก เนื่องจากสามารถควบคุมขนาดและรูปร่างของอนุภาคได้โดยอาศัยการควบคุมอุณหภูมิในการเผา

2.2.3 วิธี polyol เป็นกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กโดยใช้สาร polyol เช่น สารโพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethyleneglycol) ซึ่งสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เนื่องจากสารเหล่านี้มีค่าคงที่ไดอิเล็กทริกสูง (high dielectric constant) เมื่อเพิ่มความร้อนถึงจุดเดือดของสารในระหว่างการทำปฏิกิริยา สารตั้งต้นที่เป็นพวกอออนของโลหะจะเกิดการฟอร์มตัวกันเป็นสารสารมัธยันตร์ (intermediate) อยู่ในกลุ่มของไดออล (diol) แล้วถูกรีดิวซ์เป็น metal nuclei จากนั้นเกิด nucleate เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะได้อนุภาคนาโนโลหะเกิดขึ้นที่มีขนาดอนุภาคระดับ sub-micrometer

ตารางที่ 2.2 แบคทีเรียที่สังเคราะห์อนุภาคโลหะในระดับนาโนเมตร (Bazylinski and Frankel, 2003)

Microorganism	Nanoparticle	Localization/morphology	Size
<i>Bacterium-intracellular</i>			
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Au	Octahedral inside cell wall	5-25 nm
Sulfate-reducing bacteria	Au	Cell envelope	< 10 nm
<i>Shewanella algae</i>	Au	Periplasmic space, bacterial envelope	10-20 nm 15-200 nm
<i>Hectonema boryanum</i> UTEX485	Au	Membrane vesicles/Cubic	10 nm
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Au	Cell surface/Spherical	ND
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	Au	Plasma membrane	ND
<i>Pseudomonas stutzeri</i> AG259	Ag, Ag <sub>2</sub> S	Periplasmic space	< 200 nm
<i>Corynebacterium</i> sp. SH09	Ag	Cell wall	10- 15 nm
<i>Bacillus</i> sp.	Ag	Periplasmic space	5-15 nm
<i>Lactobacillus</i> sp.	Au, Ag, Au-Ag	Hexagonal/Contour	20-50 nm
<i>P. aeruginosa</i> SNT1	Se	Spherical/Contour	ND
<i>S. algae</i>	Pt	ND	~ 5 nm
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> NCIMB 8307	Pd	Cell surface	~ 50 nm
<i>S. oneidensis</i> MR-1	Pd	Periplasmic space	ND
<i>Aquaspirillum magnetotacticum</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Octahedral prism	40-50 nm
Magnetotactic bacterium MV-1	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Cell inside/Parallelepiped	40×40×60 nm
Magnetotactic bacterium	Fe <sub>3</sub> S <sub>4</sub> , FeS <sub>2</sub>	Octahedral/Cubo-octahedral	7.5 nm
Sulfate-reducing bacteria	FeS	Cell surface	2 nm
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Membrane-bound/Cubo-octahedrons	47.1 nm
<i>M. magnetotacticum</i> (MS-1)	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Inside the cell/Cuboctahedral	~ 50 nm
<i>M. gryphiswaldense</i>	Magnetite	Membrane-enclosed/Cubo-octahedral elongated hexagonal prismatic	35-120 nm
<i>Desulfosporosinus</i> sp.	UO <sub>2</sub>	Cell surface	1.5-2.5 nm
<i>Clostridium thermoaceticum</i>	CdS	Cell surface	ND
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CdS	Cell surface	5-200 nm
<i>Escherichia coli</i>	CdS	Spherical, elliptical	2-5 nm
<i>Desulfobacteriaceae</i>	ZnS	Spherical	2-5 nm
<i>Bacterium-extracellular</i>			
<i>Rhodospseudomonas capsulata</i>	Au	Spherical Triangular nanoplates Spherical nanowires	10-20 nm 50-400 nm 50-60 nm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Au	ND	15-30 nm
<i>B. megatherium</i> D01	Au	Spherical	1.9 ± 0.8 nm
<i>Aeromonas</i> sp. SH10	Ag	ND	6.4 nm
<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>E. coli</i>	Ag	ND	52.5 nm
<i>B. licheniformis</i>	Ag	ND	~ 50 nm
<i>Acetobacter xylinum</i>	Ag	Cellulose fibre	ND
<i>Morganella</i> sp.	Ag	Spherical	20 ± 5 nm
<i>Sulfurospirillum barmesii</i> , <i>B. selenitireducens</i> , <i>Selenihalanaerobacter shrijftii</i>	Se	Nanospheres	~ 300 nm
<i>B. selenitireducens</i>	Te	Nanorods	~ 10 nm
<i>Sulfurospirillum barmesii</i>	Te	Irregular Nanospheres	< 50 nm
<i>Lactobacillus</i> sp.	Ti	Spherical	40-60 nm
<i>P. boryanum</i> UTEX 485	Pt	Spherical, Chains, Dendritic	30 nm-0.3 $\mu$ m
<i>Geobacter metallireducens</i> GS-15	Magnetite	ND	10-50 nm
Thermophilic bacteria TOR-39	Magnetite	Octahedral	< 12 nm
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> (TOR-39)	Co, Cr, Ni-substituted-	Octahedral	ND
<i>Actinobacter</i> sp.	Magnetite	Quasi-spherical	10-40 nm
<i>S. oneidensis</i> MR-1	UO <sub>2</sub>	Extracellular (UO <sub>2</sub> -EPS)	1-5 nm
<i>Klebsiella aerogenes</i>	CdS	Spherical on cell wall	20-200 nm
<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	CdS	Spherical	8.01 ± 0.25 nm
<i>Gluconoacetobacter xylinus</i>	CdS	Cellulose fibre	30 nm
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	ZnS	Spherical	8 nm
<i>R. sphaeroides</i>	PbS	Spherical	10.5 ± 0.15 nm
<i>Brevibacterium casei</i>	Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	ND	5-7 nm

ND = not determined

2.2.4 วิธี Flow injection เป็นกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กที่มีการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในช่วง 2–7 นาโนเมตร ซึ่งวิธีนี้สามารถผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กได้ในปริมาณมาก โดยการฉีดพ่นสารผ่านเข้าไปยัง matrixes ชนิดต่างๆ ขณะที่ matrix เกิดการหมุน (confinement) เช่น emulsion เป็นต้น

2.2.5 วิธี Electrochemical เป็นกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กโดยการใช้กระแสไฟฟ้าเข้ามาช่วยในการควบคุมขนาดของอนุภาค โดยที่กระแสไฟฟ้าที่ปล่อยเข้ามาจะทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีกับไอออนของโลหะในสารละลายเกิดเป็นอนุภาคนาโนแม่เหล็ก การสังเคราะห์โดยวิธีนี้นิยมใช้เตรียมอนุภาคแม่เหล็กแมกนีไทท์และฮีมาไทท์

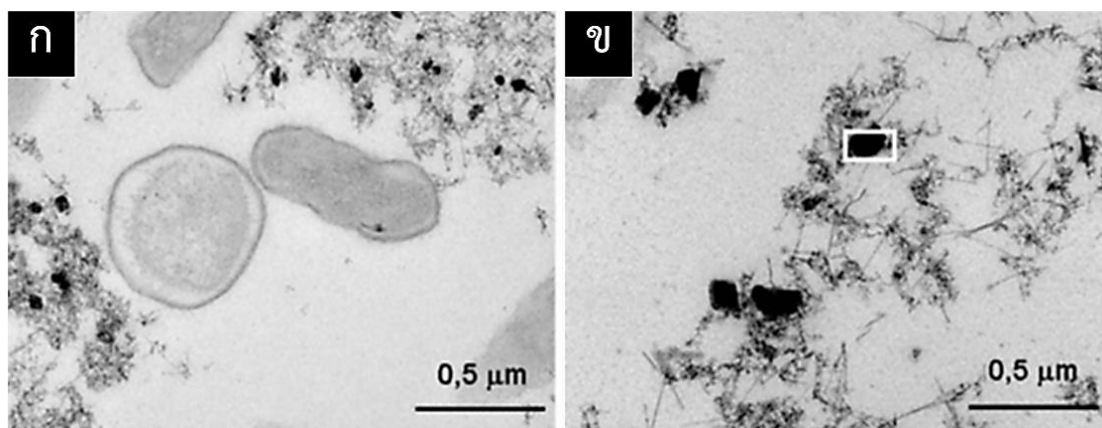
2.2.6 วิธี Aerosol/Vapor เป็นกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กโดยการพ่นสารละลายเกลือของโลหะ และตัวรีดิวซ์ ผ่านลงไปทำปฏิกิริยากันแล้วเกิดการควบแน่น จากนั้นระเหยสารตัวทำละลายออกให้แห้งแล้วเกิดผลึกอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่มีขนาดอนุภาคในช่วง 5–60 นาโนเมตร

2.2.7 วิธี Sonolysis เป็นกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กโดยการแยกสลายสารจำพวก organometallic ในสารละลายโดยใช้ความร้อน หรืออาศัยการสั่นของคลื่นเสียงความถี่สูงเพื่อเป็นการควบคุมขนาดของอนุภาค

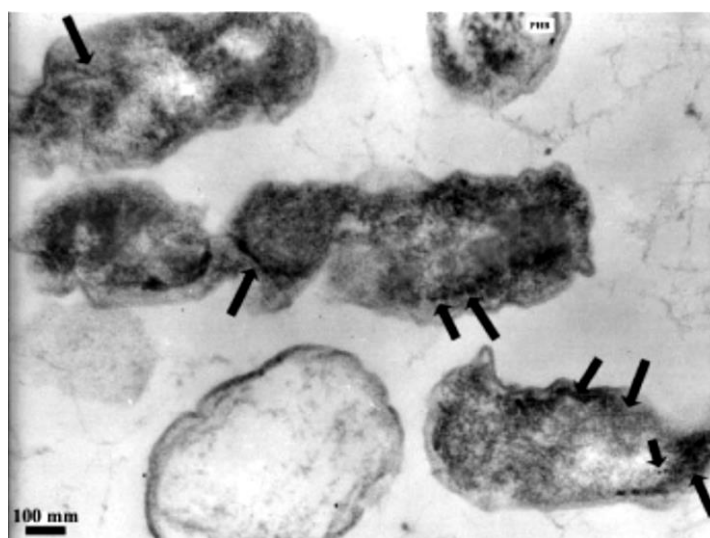
2.2.8 วิธี Hydrothermal เป็นกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ปฏิกิริยา oxidation หรือ ปฏิกิริยา neutralization ของสารตั้งต้นที่อุณหภูมิสูงถึง 200 องศาเซลเซียสและใช้ความดันสูง 2000 psi ในการเร่งปฏิกิริยาในระบบ

แม้การสังเคราะห์ทางเคมีจะให้ผลผลิตค่อนข้างสูง แต่ยังมีข้อจำกัดคือ ในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีจะได้อายุการใช้งานที่สั้น และยังมีการตั้งต้นเหลือจากปฏิกิริยา ซึ่งทำให้เกิดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ นอกจากนี้สมบัติของอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่ได้มีขนาด และรูปร่างไม่คงที่ การกระจายตัวไม่ดี หากนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์อาจเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ (Komeili, 2007) ดังนั้นการศึกษาในปัจจุบันจึงมุ่งศึกษาเกี่ยวกับแหล่งของอนุภาคนาโนแม่เหล็กทางชีวภาพที่ได้จากสังเคราะห์จากแบคทีเรีย เพื่อความปลอดภัยทั้งต่อสิ่งมีชีวิต สิ่งแวดล้อม และการพัฒนาสู่การประยุกต์ใช้ต่อไปในอนาคต (Han et al., 2007) โดยทั่วไปแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กได้ 2 วิธี คือ การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กภายนอกเซลล์ (extracellular synthesis) เรียกว่า biologically Induced Mineralization (BIM) เช่น แบคทีเรียสายพันธุ์ *Shewanella oneidensis* เกิดปฏิกิริยา co-precipitation ระหว่างไอออนของเฟอร์ริกกับ ไอออนของเฟอร์รัส ในสภาวะเป็นด่างรอบ ๆ เซลล์ ทำให้เกิดอนุภาคนาโนแม่เหล็กชนิดแมกนีไทท์ (Komeili, 2007) ดังภาพที่ 2.9 และการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กภายในเซลล์ (intracellular) หรือเรียกว่า biologically Control Mineralization (BCM) แบคทีเรียหลายชนิดสามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กชนิดแมกนีไทท์และกริโกไรต์ได้ (ตารางที่ 2.3) โดยบรรจุอยู่ในถุงแมกนีโตโซมซึ่งเป็นถุงที่มีเยื่อหุ้มอยู่ในออร์แกเนลล์ ซึ่งโดยทั่วไปมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7.5–120 นาโนเมตร (ดังแสดงในภาพที่ 2.10) (Komeili, 2007; Yan et al., 2017) โดยจะเรียกแบคทีเรียที่สังเคราะห์แมกนีโตโซมเรียงกันอย่างเป็นระเบียบ

ภายในเซลล์ และมีพฤติกรรมตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กได้ดีว่า แมกนีโตแทกติกแบคทีเรีย (magnetotactic bacteria) ส่วนแบคทีเรียที่สังเคราะห์แมกนีโตโซมภายในเซลล์ได้ แต่แมกนีโตโซมไม่มีการเรียงอย่างเป็นระเบียบ และไม่มี/มีการตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กต่ำ จะถูกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กได้ หรือเรียกว่า Magnetic producing bacteria (Atlas, 2010; Blakemore and Wolfe, 1984; Jacob and Suthindhiran, 2016; Lin et al., 2011)



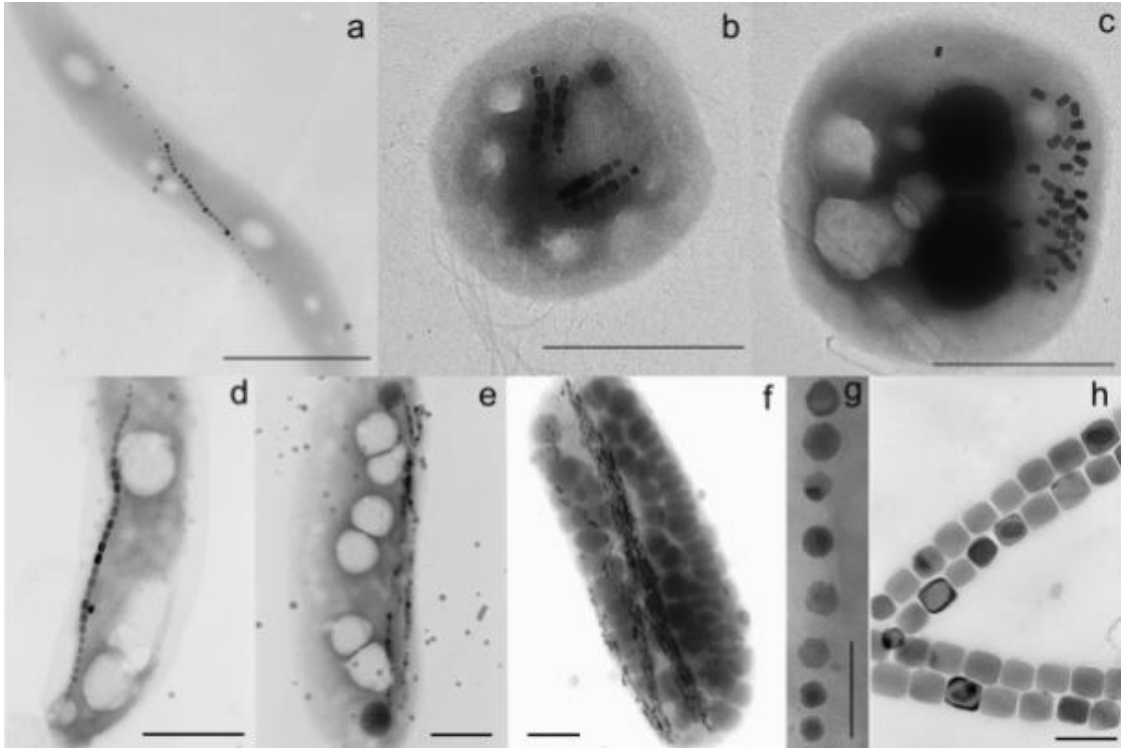
ภาพที่ 2.9 Biologically Induced Mineralization (BIM) ของ *Shewanella oneidensis* โดยภาพ ก คือลักษณะการตกตะกอนของแมกนีไทท์รอบ ๆ เซลล์ และภาพ ข คือภาพขยายของอนุภาคนาโนแม่เหล็กแบบแมกนีไทท์ ซึ่งศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Zablotskii et al., 2001)



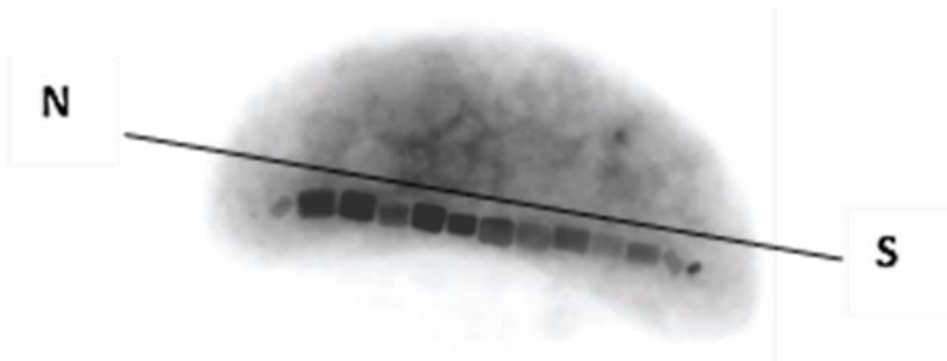
ภาพที่ 2.10 Biological Control Magnetite (BCM) ในแมกนีโตแทกติกแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลสาบ Caspian โดยลูกศรแสดงแมกนีโตโซมภายในเซลล์ ซึ่งศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Liu et al., 2006)

### 2.3 แมกนีโตแทกติกแบคทีเรีย

แมกนีโตแทกติกแบคทีเรีย คือ กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่มีขนาด 1–100 นาโนเมตร โดยจะถูกบรรจุอยู่ในถุงแมกนีโตโซม และมีการเคลื่อนที่ตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กภายนอก แบคทีเรียดังกล่าวส่วนใหญ่จัดอยู่ในอาณาจักรโปรคาริโอต เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลม (coccol) แบบท่อน (rodid) แบบท่อนโค้ง (vibrioid) และแบบเกลียว (spirillum) มีทั้งเซลล์เดี่ยว และหลายเซลล์ (ภาพที่ 2.11) (Liu et al., 2006; Peigneux et al., 2016) การเคลื่อนที่ของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะอาศัยแฟลกเจลลา (flagella) ที่ช่วยให้เซลล์เคลื่อนที่ไปข้างหน้าได้ ในปีคริสต์ทศวรรษ 1975 Richard Blakemore และคณะ ได้ค้นพบ แมกนีโตแทกติกแบคทีเรียชนิดแรกคือ *Magnetospirillum magnetotacticum* และ *Magnetospirillum Aquaspirillum* (Schüler et al., 1995) แบคทีเรียกลุ่มนี้มีสมบัติเฉพาะที่สำคัญ คือสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็ก ขนาด 30–120 นาโนเมตรอยู่ในแมกนีโตโซม ซึ่งมีจำนวน 1 ถึง 100 อนุภาคต่อเซลล์และมีการเรียงตัวทั้งแบบกระจายและเป็นสายในไซโตพลาสซึมตามแนวสนามแม่เหล็กโลก (ภาพที่ 2.12) การมีแมกนีโตโซมในเซลล์จะกระตุ้นให้แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเคลื่อนที่ตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กโลกได้ทั้งขั้วเหนือ (north seek) และ/หรือขั้วใต้ (south seek) ขึ้นอยู่กับแหล่งที่อาศัย โดยพฤติกรรมเคลื่อนที่ที่ตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กโลกนี้เรียกว่า แมกนีโตแทกซิส (magnetotaxis) (Lefèvre and Wu, 2013; Lins and Bazylinski, 2009) เนื่องจากข้อมูลเรื่องหน้าที่ของแมกนีโตโซมยังไม่ปรากฏชัดเจน แต่ปัจจุบันนี้เป็นที่ยอมรับว่าแมกนีโตโซมในเซลล์แบคทีเรียดังกล่าวทำหน้าที่ในการกระตุ้นให้แบคทีเรียเคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่มีสารอาหาร (chemotaxis) ออกซิเจน (aerotaxis) และแสง (phototaxis) ที่เหมาะสมต่อการเจริญ (Polyakova and Zablotskii, 2005) นอกจากแบคทีเรียที่สามารถเคลื่อนที่ได้แล้ว ปัจจุบันยังพบว่า มีแมกนีโตแทกติกแบคทีเรียอีกชนิดที่สามารถผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กภายในเซลล์ได้ แต่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ซึ่งเรียกว่า Magnetic bacteria (MB) (Elena et al., 2017)



ภาพที่ 2.11 ลักษณะรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียแมกนีโตแทกติก (Sakaguchi et al., 1996)

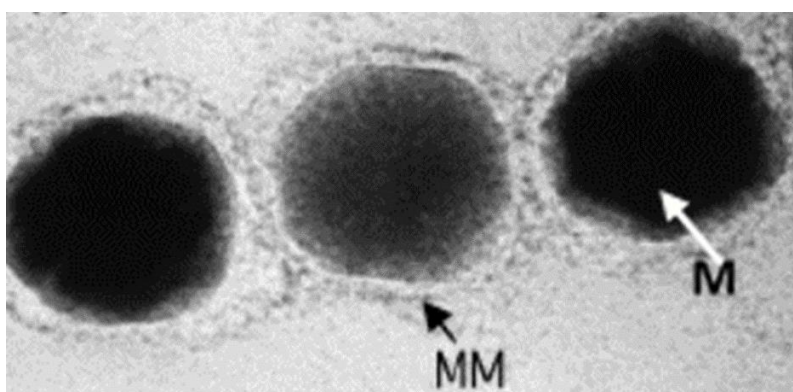


ภาพที่ 2.12 ลักษณะแมกนีโตโซมเรียงต่อเป็นสายตามแนวสนามแม่เหล็ก จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน โดย N = แม่เหล็กขั้วเหนือ S = แม่เหล็กขั้วใต้ (Molcan et al., 2017)

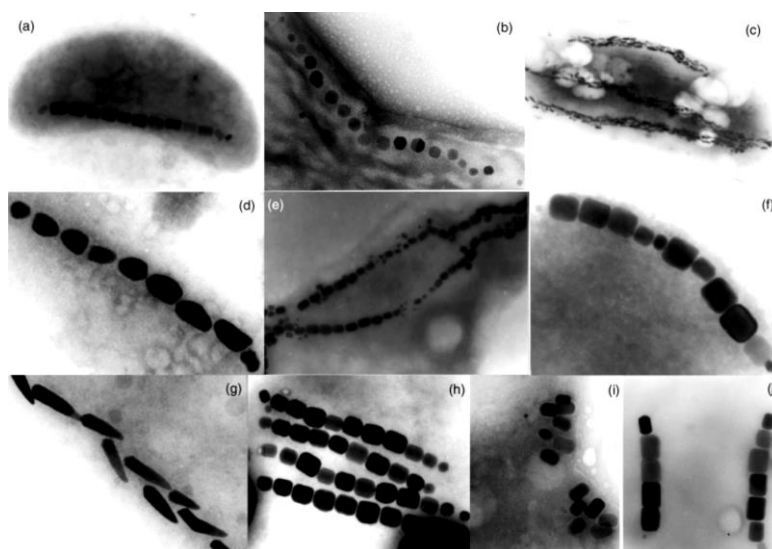
#### 2.4 แมกนีโตโซม

แมกนีโตโซมเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะเฉพาะและพบในแบคทีเรียจำพวกนี้เท่านั้น ซึ่งมีลักษณะเป็นถุงที่เกิดจากเยื่อหุ้มเซลล์ที่เว้าเข้ามาภายใน มีผลึกของเหล็กจัดเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบภายในเซลล์แบคทีเรีย (ภาพที่ 2.13) ผลึกดังกล่าวเป็นผลึกแม่เหล็กโดเมนเดี่ยว ซึ่งแม่เหล็กมีสมบัติเป็นซูเปอร์พาราแมกเน็ต เนื่องจากประกอบด้วยคริสตัลออกไซด์ของเหล็กที่มีขนาดเล็กประมาณ 30–120 นาโนเมตร โดยเรียกว่า

แมกนีไทท์ หรือ ซัลไฟด์ของเหล็ก เรียกว่า กริไกรท์ จากรายงานพบว่าแมกนีโตแทกติกแบคทีเรียทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงได้ในปัจจุบันสังเคราะห์ได้เพียงแมกนีไทท์ เท่านั้น ยังไม่พบรายงานถึงแบคทีเรียที่สังเคราะห์ กริไกรท์ ได้ (Wolfe et al., 1987) ลักษณะสำคัญของผลึกแมกนีไทท์ที่สังเคราะห์จากแมกนีโตแทกติกแบคทีเรียคือ รูปร่าง ขนาด และองค์ประกอบทางเคมีคงที่ และจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด (Prozorov, 2015) ดังภาพที่ 2.14 ขณะเดียวกันก็มีการกระจายตัวที่ดี เมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี (Song et al., 2008)



ภาพที่ 2.13 องค์ประกอบของแมกนีโตโซม โดย M = Magnetite, MM = magnetosome membrane (Blakemore et al., 1979)



ภาพที่ 2.14 ความหลากหลายทางรูปร่างและขนาดของแมกนีโตโซมที่มีความจำเพาะในแมกนีโตแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยภาพ a e f h i j คือแมกนีโตโซมผลึกรูปปริซึมยาว (elongated prisms) ภาพ b คือ ผลึกทรงลูกบาศก์แปดเหลี่ยม (cuboid-octahedral) และภาพ c d และ g คือ ผลึกรูปกระสุน (bullet-shape) การเรียงตัวของผลึกเป็นสายอาจมีตั้งแต่หนึ่งสายถึงหลายสายต่อเซลล์ (Jogler et al., 2009)

ถึงแม้ว่ากลไกการสังเคราะห์แมกนีโตโซมในเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ยังไม่มีการระบุชัดเจนเนื่องจากมีความซับซ้อนของกลุ่มยีนควบคุม แต่ก็มีการสันนิษฐานคร่าว ๆ ว่า การเกิดแมกนีโตโซมเกิดได้โดย 4 กระบวนการ ดังนี้

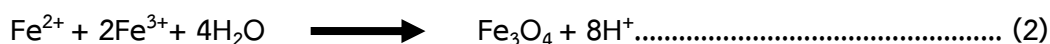
2.4.1 Membrane biogenesis คือ การสร้างเยื่อหุ้มแมกนีโตโซม โดยการม้วนของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (inner membrane) เป็นถุง

2.4.2 Magnetosomal iron uptake คือ การลำเลียงอออนของเหล็กเข้าสู่ถุงแมกนีโตโซม

2.4.3 Biomineralization คือ การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กภายในถุงแมกนีโตโซม

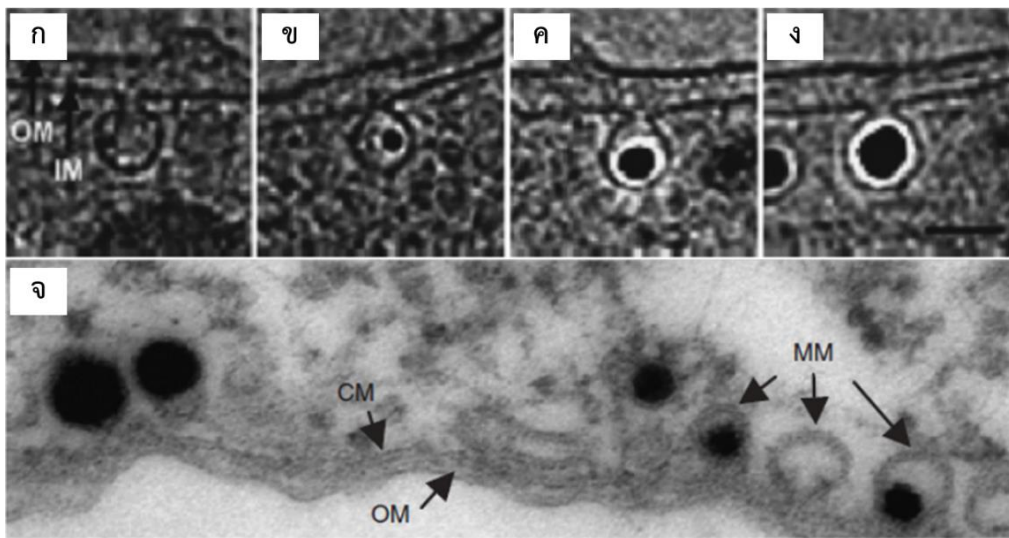
2.4.4 Chain formation คือ การเรียงตัวของแมกนีโตโซมเป็นสายภายในเซลล์

ทั้งนี้อออนของเฟอร์ริก และเฟอร์รัส จะถูกนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียและสะสมในถุงแมกนีโตโซม ด้วยวิธีการลำเลียงสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แบบใช้พลังงาน (Active transport) โดยอาศัยโปรตีน ferritin จนความเข้มข้นของอออนของเหล็กในเซลล์มีประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Faivre and Schuler, 2008; Mackenzie et al., 2008) ขณะเดียวกันได้มีการเว้าเข้าของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในกลายเป็นถุงแมกนีโตโซม ซึ่งเรียกขั้นตอนดังกล่าวว่าเป็นการเริ่มการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กชั้นที่ 1 ด้วยเหตุนี้เยื่อหุ้มแมกนีโตโซมจึงมีองค์ประกอบเป็นไขมันสองชั้นเหมือนเยื่อหุ้มเซลล์ (ภาพที่ 2.15ก-ง) กระบวนการที่ 2 เป็นการลำเลียงอออนของเหล็กผ่านเยื่อหุ้มแมกนีโตโซม (magnetosome membrane) เข้าสู่ถุงแมกนีโตโซม โดยการทำงานของ transmembrane protein ซึ่งในแบคทีเรีย *Magnetospirillum magneticum* มีโปรตีน MamA ในการทำหน้าที่ลำเลียงอออนของเหล็กเข้าสู่ถุงแมกนีโตโซม ส่วนในแบคทีเรีย *Magnetospirillum gryphiswaldense* มีโปรตีน cation diffusion facilitator (CDF) ที่ช่วยในการลำเลียงเหล็กเข้าสู่ถุงแมกนีโตโซม ซึ่งมี 2 ชนิด คือ MamB และ MamM กระบวนการที่ 3 เป็นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอออนของเหล็กชั้นในเยื่อหุ้มแมกนีโตโซมพร้อมกันในหลายจุด (ภาพที่ 2.15จ) ดังสมการที่ (2) อนุภาคนาโนแม่เหล็กโตเมนเดี่ยวที่ได้มีขนาดประมาณ 30–120 นาโนเมตร หากเล็กกว่า 30 นาโนเมตรจะไม่แสดงสมบัติการตอบสนองต่อขั้วแม่เหล็ก แต่หากใหญ่เกิน 120 นาโนเมตร จะมีสมบัติเป็นเฟอร์โรแมกนีติก ที่มีหลายโตเมน (Jun et al., 2006)

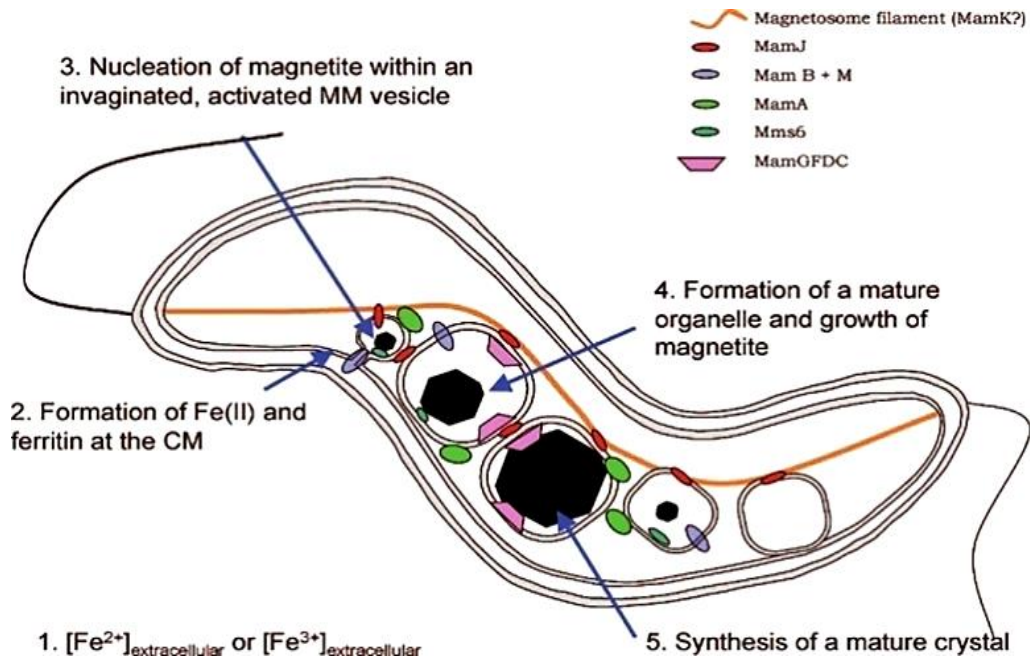


จากสมการ 2 โปรตีน Mms6 ทำหน้าที่ควบคุมการเกิดอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่จำเพาะต่อสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anoxic) หรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (microoxic) เนื่องจากออกซิเจนที่สูงเกิน 6 เปอร์เซ็นต์จะยับยั้งการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็ก ซึ่งอาจทำให้ขนาดของอนุภาคเล็ก หรือรูปร่างผิดปกติ นอกจากนั้นยังมีโปรตีน MamGFDC และโปรตีน MamN ที่ควบคุมขนาดของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก และควบคุมการส่งไฮโดรเจนอออนจากแมกนีโตโซมออกนอกเซลล์เพื่อป้องกันความเป็นพิษของสภาวะกรดที่สูงต่อเซลล์ เนื่องจากขบวนการออกซิเดชันทำให้อออนของไฮโดรเจน ( $\text{H}^+$ ) ออกมา 8 โมเลกุลต่อแมกนีไทท์ 1 โมเลกุล ดังนั้นในสภาวะแวดล้อมของการเจริญจำเป็นต้องมีบัฟเฟอร์ควบคุมค่า พีเอช ให้คงที่ ซึ่งทำให้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ กระบวนการที่ 4 เป็นการเรียงตัวของแมกนีโตโซมเป็นสาย ซึ่งสำคัญต่อพฤติกรรมตอบสนอง

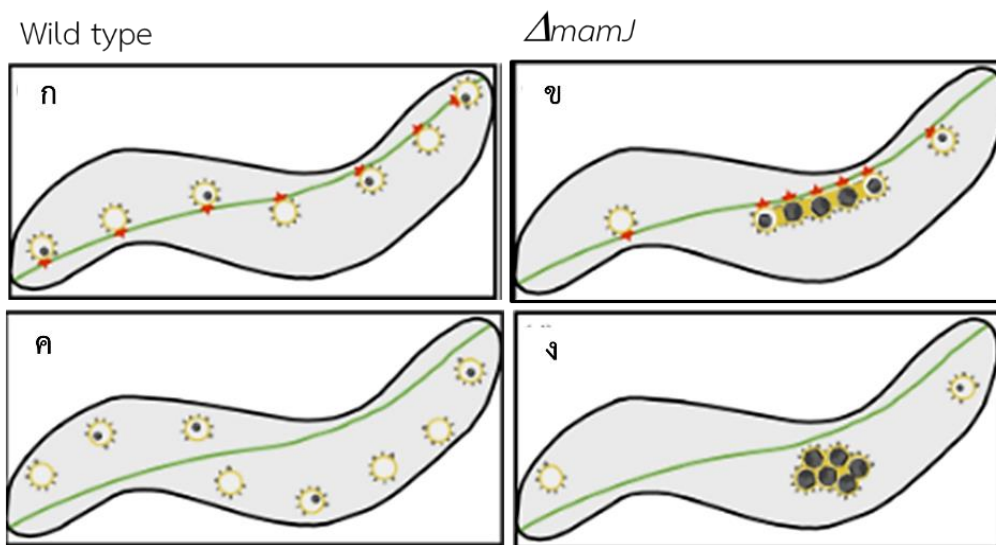
ต่อสนามแม่เหล็ก เนื่องจากช่วยให้มีความแรงแม่เหล็กมากพอที่จะควบคุมให้เซลล์ตอบสนองต่อทิศทางของสนามแม่เหล็ก โดยมีโปรตีนที่สำคัญ 2 ชนิด คือ โปรตีน MamK ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการเกิด แมกนีโตโซมฟิลาเมนต์ (magnetosome filament; MF) เป็นเส้นพาดยาวตามแนวเซลล์ (ดังภาพที่ 2.16) และโปรตีน MamJ ทำหน้าที่ยึดแมกนีโตโซมกับ MF (ภาพที่ 2.17)



ภาพที่ 2.15 การเกิดแมกนีโตโซมในแบคทีเรีย *Magnetospirillum* โดยภาพ ก เป็นการเว้าเข้าของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในเป็นถุงแมกนีโตโซม สำหรับภาพ ข และ ค เป็นการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กในถุงแมกนีโตโซม ภาพ ง เป็นแมกนีโตโซมที่สมบูรณ์ และภาพ จ แสดงตำแหน่งการสังเคราะห์แมกนีโตโซมสามารถเกิดขึ้นพร้อม ๆ กันในหลายตำแหน่ง (Komeili et al., 2006)



ภาพที่ 2.16 ภาพจำลองกลไกการสังเคราะห์แมกนีโตโซม และโปรตีนที่เกี่ยวข้อง (Arakaki et al., 2016)



ภาพที่ 2.17 ภาพจำลองโปรตีนที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนการจัดเรียงตัวของแมกนีโตโซมในกลไกการสังเคราะห์แมกนีโตโซมของแบคทีเรีย *M. gryphiswaldense* ซึ่งเกี่ยวข้องกับ MamJ (สีแดง), magnetosome vesicles (MV, สีเหลือง) และ magnetosome filaments (MF, สีเขียว) โดยภาพ ก คือผลึกแมกนีไทท์ (สีดำ) กำลังถูกสังเคราะห์ในถุงแมกนีโตโซมที่ยึดบน MF ภาพ ข คือแมกนีโตโซมที่สมบูรณ์ (mature magnetosome) เรียงตัวเป็นสายโดยการทำงานร่วมกันของ MamJ และ MF (โปรตีน MamK) และภาพ ค และ ง คือ *M. gryphiswaldense* สายพันธุ์ที่ขาดโปรตีน MamJ ทำให้ MV ไม่ยึดเป็นแนวกับ MF และเมื่อเกิดแมกนีโตโซมที่สมบูรณ์ จะจับกลุ่มกันซึ่งอาจขาดสมบัติ magnetism (Scheffel et al., 2006)

## 2.5 ความหลากหลายของแมกนีโตแทกติกแบคทีเรีย

โดยทั่วไปพบแมกนีโตแทกติกแบคทีเรียประมาณ  $10^5$ – $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิเมตร ในบริเวณรอยต่อของการมีและไม่มีออกซิเจน (oxic-anoxic transition zone, OATZ) เช่น รอยต่อระหว่างน้ำกับดินตะกอนในน้ำจืดและน้ำเค็ม (Bazylnski et al., 2012) แบคทีเรียกลุ่มนี้มีความหลากหลายทั้งรูปร่าง สรีรวิทยา และสายพันธุ์ โดยพบว่าทุกสายพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่ม Nitrospira และ Proteobacteria เช่น แบคทีเรียคลาส delta-Proteobacteria gamma-Proteobacteria และส่วนใหญ่จัดอยู่ในคลาส alpha-Proteobacteria ซึ่งใกล้เคียงกับแบคทีเรียในกลุ่ม Photosynthetic Nonsulfur purple bacteria ที่สามารถสร้าง intracytoplasmic membrane จากสมบัติข้อนี้จึงอาจเป็นไปได้ว่าหากเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่ม Non-magnetotactic Photosynthetic bacteria และ Nonsulfur purple bacteria ในสภาวะที่มีธาตุเหล็กปริมาณสูงเชื่อดังกล่าว อาจถูกกระตุ้นให้มีการสร้างแมกนีโตโซมในเซลล์แบคทีเรียได้ (Yan et al., 2013)

ปัจจัยการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กชนิดแมกนีไทท์ และ/หรือ กริโกไรท์ ของแมกนีโตแทกติกแบคทีเรีย ขึ้นอยู่กับตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในขบวนการหายใจ แบคทีเรียกลุ่มที่สังเคราะห์แมกนีไทท์ จะอยู่บริเวณ OATZ ซึ่งไม่มีออกซิเจน ส่วนกลุ่มที่สังเคราะห์กริโกไรท์ จะพบบริเวณที่มีธาตุซัลไฟด์และไม่มีออกซิเจน (anoxic sulfide zone) โดยซัลไฟด์จะถูกใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายพบในแบคทีเรียน้ำเค็ม (Wenbing et al., 2007) แต่อย่างไรก็ตาม นอกจากการสังเคราะห์อนุภาคนาโนที่ไม่อาศัยออกซิเจนแล้ว ยังพบว่าแมกนีโตแทกติกแบคทีเรียบางชนิดสามารถใช้ออกซิเจนและสารประกอบไนโตร เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในขบวนการหายใจ เช่น แบคทีเรียสายพันธุ์ *Desulfovibrio magneticus* ดังนั้นจึงมีความหลากหลายในสภาวะที่เหมาะสมของแมกนีโตแทกติกแบคทีเรีย ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับแมกนีโตแทกติกแบคทีเรียเพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ (ตารางที่ 2.3) ดังนั้นความหลากหลายของแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงศึกษาจากสารพันธุกรรม 16S rRNA โดยสกัดจากตัวอย่างดินตะกอนโดยตรง (Lefèvre et al., 2014)

## 2.6 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญและการสร้างอนุภาคนาโนแม่เหล็ก

ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการเจริญและการสร้างอนุภาคนาโนแม่เหล็กภายในเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ มีหลายปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าพีเอชของน้ำ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของแมกนีโตแทกติกแบคทีเรีย มักอยู่ในช่วงอยู่ในช่วง 18–35 องศาเซลเซียส โดยมีค่าพีเอชของน้ำประมาณ 5.2–7.5 มากไปกว่านั้นปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำควรอยู่ในช่วง 0.2–6 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่เจริญได้ในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำ (microaerophilic bacteria) และบางชนิดเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobic bacteria) อาหารที่ใช้ในห้องปฏิบัติการที่สามารถเพาะเลี้ยงแมกนีโตแทกติกแบคทีเรียได้สำเร็จนั้นส่วนใหญ่มักใช้อาหารที่ประกอบไปด้วยแหล่งพลังงานที่สำคัญจากสารเคมี (ปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร) ซึ่งประกอบไปด้วย

2.6.1 สารที่ใช้เป็นแหล่งธาตุเหล็ก ได้แก่ สารละลายเฟอร์ริกควิเนท (ferric quinate) โดยทั่วไปใช้ประมาณ 2–30 ไมโครโมลาร์

2.6.2 กรดอินทรีย์ในการเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กรดทาร์ทาริก (tartaric acid) กรดซัคซินิก (succinic acid) กรดฟูมาริก (fumaric acid) กรดมาลิก (malic acid) กรดแลคติก (lactic acid) กรดไพรูวิก (pyruvic acid) กรดออกซาลิก (oxaloacetic acid) กรดมาโลนิค (malonic acid) กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทีริก (beta-hydroxybutyric acid) และกรดมาลิก (maleic acid) ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ใช้อักขังอยู่ในช่วง 10–1000 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

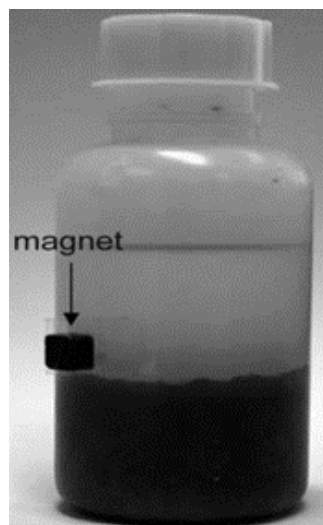
2.6.3 วิตามิน หรือ vitamin elixir ซึ่งเป็นจัดเป็นโคเฟกเตอร์ที่จำเป็นที่ช่วยให้แบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กภายในเซลล์ได้ โดยปริมาณของวิตามินส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 0.25–2 มิลลิลิตรต่อปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร

2.6.4 แร่ธาตุ หรือ mineral elixir ปริมาณ 0.25–2 มิลลิลิตรต่อปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร (Prozorov et al., 2013)

2.6.5 แหล่งไนโตรเจน ได้แก่แอมโมเนียมคลอไรด์ หรือ แอมโมเนียมไนเตรท ปริมาณ 1–100 มิลลิกรัมต่อปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร

2.6.6 ตัวให้อิเล็กตรอน (reducing agent) ได้แก่ กรดแอสซิดิก 2–100 มิลลิกรัม สารละลายโซเดียมไทโอไกลโคเลท (Sodium thioglycolate) 2.5–50 มิลลิกรัม และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1–5 มิลลิโมลาร์ เป็นบัฟเฟอร์เนื่องจากในกลไกการสังเคราะห์แมกนีโตโซมจะเกิด ไฮโดรเนียมไอออนซึ่งเป็นกรดอาจมีผลทำให้พีเอชของอาหารต่ำลงจนเป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรีย (Zhu et al., 2010)

สำหรับการแยกบริสุทธิ์แบคทีเรียกลุ่มแมกนีโตแทกติกเบื้องต้นนิยมแยกและเพิ่มจำนวนโดยการล่อด้วยแม่เหล็ก เนื่องจากแบคทีเรียมีสมบัติการตอบสนองต่อสนามแม่เหล็ก (ภาพที่ 2.18) จากนั้นจึงล้างตะกอนเซลล์บนกระดาษกรองแล้วเลี้ยงลงในอาหารโดยการฉีดผ่านจุกยาง และเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวมาข้างต้น (Bazylnski and Schübbe, 2007; Kimura, 1980; MEYER and JONES, 1973)



ภาพที่ 2.18 การแยกแมกนีโตแทกติกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินตะกอนด้วยแม่เหล็ก (Jogler et al., 2009)

## 2.7 การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียที่ผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็ก

เนื่องจากอนุภาคนาโนแม่เหล็กภายในแมกนีโตโซมมีขนาด 30–120 นาโนเมตร ช่วยให้ผิวสัมผัสต่อปริมาตรสูง อีกทั้งยังมีสมบัติความเป็นแม่เหล็กที่มีการกระจายตัวได้ดีในสารละลาย และสามารถเปลี่ยนแปลงพื้นผิวให้มีความจำเพาะต่อสารชีวโมเลกุลได้ง่ายเพราะอนุภาคถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มที่มีสมบัติเหมือนเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นอนุภาคนาโนแม่เหล็กจากแบคทีเรียจึงได้รับความสนใจนำมาพัฒนาเพื่อประยุกต์ในงานด้านต่าง ๆ ดังนี้

2.7.1 ด้านการแพทย์ ได้มีการนำแมกนีโตโซมมาพัฒนาเพื่อรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งด้วยวิธี magnetic particle hyperthermia (MPH) (Alphandéry, 2014; Xie et al., 2009) ซึ่งเป็นการใช้อนุภาคนาโนแม่เหล็กที่ถูกเคลือบด้วยสารชีวโมเลกุลหรือสารที่จำเพาะกับเซลล์มะเร็งแล้วนำเข้าสู่ร่างกาย และถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความร้อนเฉพาะจุด โดยมีอุณหภูมิประมาณ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที เพื่อทำลายเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมาย

2.7.2 ด้านสิ่งแวดล้อม เนื่องจากแมกนีโตแทกติกแบคทีเรียสามารถนำโลหะเหล็กเข้าสู่เซลล์ และเก็บสะสมในรูปแมกนีไทต์ หรืออนุภาคนาโนแม่เหล็กชนิดอื่นในแมกนีโตโซม แบคทีเรียดังกล่าวจึงได้รับความสนใจในการนำมาใช้ลดการปนเปื้อนโลหะในแหล่งน้ำ เนื่องจากสามารถแยกเซลล์ได้ง่าย ใช้ต้นทุนต่ำเมื่อเทียบกับวิธีบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพอื่น ๆ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเพราะในกระบวนการไม่มีการใช้สารเคมี เช่น การศึกษาสมดุลดการดูดซับอื้อออนของทอง และอื้อออนของทองแดง ด้วยเชื้อแมกนีโตแทกติกแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งน้ำ (Song et al., 2007) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถดูดซับอื้อออนของทอง และอื้อออนของทองแดง ได้ในช่วงพีเอชค่อนข้างกว้าง ประมาณ 1.0–5.5 และ 2.0–4.5 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิประมาณ 25–30 องศาเซลเซียส ประสิทธิภาพในการดูดซับอื้อออนดังกล่าวต่อน้ำหนักแห้งของแบคทีเรีย 1 กรัม มีค่าถึง 505.2 มิลลิกรัม และ 493.1 มิลลิกรัม ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดอื้อออนของทอง ของแบคทีเรีย *Stenotrophomonas sp.* ในน้ำทิ้งซึ่งมีค่าความสามารถดูดซับอื้อออนของทองและทองแดงเท่ากับ 506 369 และ 308 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Song et al., 2008) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาความสามารถในการกำจัด Tolilite (VI) จากน้ำทิ้งอุตสาหกรรมอัลลอยด์ด้วยแบคทีเรียแมกนีโตแทกติกชนิด *Magnetospirillum magneticum* (Lohße et al., 2011; Wang et al., 2013) พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถดูดซับ tellulite และสังเคราะห์เป็นอนุภาค tellulium เก็บไว้ภายในเซลล์ ควบคู่กับการสังเคราะห์แมกนีโตโซม และสามารถแยกเซลล์แบคทีเรียจากน้ำได้ง่ายด้วยแม่เหล็ก

ตารางที่ 2.3 แมกนีโตแทกติกแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (Bazylinski and Schübbe, 2007)

Magnetotactic bacteria	Sources	Morphology		Magnetosome distribution	particle types	Note
		Cells	Magnetosomes			
<i>Magnetospirillum magneticum</i> strain MS-1	Fresh water (pond)	spirillum	Cubo-octahedra	In chain	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Blakemore, 1975
<i>M. gryphiswaldense</i> MSR-1	Fresh water (lake)	spirillum	Hexahedral prism	In chain	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Schleifer et al., 1991
<i>M. magneticum</i> strain AMB-1	Fresh water (pond)	spirillum	Hexahedral prism	In chain	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Matsunaga et al., 1991
<i>Candidatus magnetobacterium bavaricum</i>	Fresh water	Rod-sharp	-	-		Lin et al., 2011
RS-1	Marine	Rod-shaped	Hexahedral prism	-	Fe <sub>3</sub> S <sub>4</sub>	Bazylinski et al., 1995; Mann et al., 1990
HM-1	Fresh water (pond)	Rod	Not known	In chain	Iron oxide	Wei et al., 1994
MV-4	Marine	spirillum	Hexahedral prism	In chain	Fe <sub>3</sub> S <sub>4</sub>	Mann et al., 1990
DMW-1	Dye mill wastewater	Rod	Spheroid	Irregular	Iron oxide	Goa et al., 2004
MC-1	Marine					
<i>Desulfovibrio magneticus</i> strain RS-1						
<i>Candidatus magnetoglobus multicellularis</i>	Marine					
DMW-1	Dye-mill wastewater	rod	Spheroid	Irregular	Iron oxide	Goa et al., 2004
HMB-1	Tieshan iron ore	Cocci, rod	Spheroid, rectangle or triangle	Irregular	Iron oxide	Liu et al., 2006

## 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาข้อมูลในฐานข้อมูลที่รวบรวมผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการจัดกลุ่มและการจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมกนีโตแทกติกแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ (Yan et al., 2012) และแบคทีเรียที่เจริญได้ตามธรรมชาติ ซึ่งงานวิจัยต่าง ๆ ได้จำแนกแบคทีเรียดังกล่าวออกโดยอาศัยการจัดลำดับหมวดหมู่ของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยความแตกต่างของข้อมูลจาก 16s rRNA (Lefèvre and Bazyliński, 2013) โดยอาศัยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนบริเวณ 16s rDNA เพื่อหาลำดับดีเอ็นเอ จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลใน NCBI nucleotide database ด้วยโปรแกรม BLAST algorithm พบแมกนีโตแทกติกแบคทีเรียทั้งสิ้น 268 ชนิด ซึ่งทราบลำดับดีเอ็นเอ และจำแนกไว้ใน GenBank ได้ทั้งหมด 6 กลุ่ม (ดังตารางที่ 2.3) โดยพบว่ากลุ่มใหญ่ที่สุดคือ แบคทีเรียที่อยู่ในไฟลัม *Proteobacterium* คลาส *Alphaproteobacteria* รองลงมา คือ ไฟลัม *Deltaproteobacteria* *Grammaproteobacteria* *Epsilonproteobacteria* *Betaproteobacteria* และไฟลัม *Nitrospirales* จากการศึกษพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ มีเพียง 53 ชนิด เท่านั้นที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ โดย 48 ชนิด อยู่ในคลาส *Alphaproteobacteria* อีก 5 ชนิด อยู่ในคลาส *Deltaproteobacteria* (ตารางที่ 2.4–2.6) ทำให้การศึกษาแบคทีเรียกลุ่มนี้ยังคงมีความจำเป็นทั้งในด้านการความหลากหลาย สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ สภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็ก กลไกในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็ก การปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อให้มีสมบัติที่ดีในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็ก และการประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ นอกจากนั้นยังไม่พบรายงานการศึกษาเกี่ยวกับแมกนีโตแทกติกในประเทศไทย

**ตารางที่ 2.4** แมกนีโตแทกติกแบคทีเรียที่ถูกศึกษาลำดับดีเอ็นเอแบ่งตามไฟลัม ที่มา: Database of Magnetotactic Bacteria (DMB), <http://database.biomnsl.com/phyloSort.html>

Phylogeny	Number of sequence
Proteobacteria; <i>Alphaproteobacteria</i>	166
Proteobacteria; <i>Betaproteobacteria</i>	2
Proteobacteria; <i>Grammaproteobacteria</i>	20
Proteobacteria; <i>Deltaproteobacteria</i>	65
Proteobacteria; <i>Epsilonproteobacteria</i>	3
Nitrospirae; <i>Nitrospirales</i>	12

ตารางที่ 2.5 แมกนีโตแทกติกแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในคลาส *Alphaproteobacteria* (Lefèvre and Bazylnski, 2013)

Sequence Name	GenBank		Sequence	
	Accession Number	GenBank Definition	Length (bp)	Reference
CS103	X61605	Magnetic coccus (CS103) for 16S rRNA	1495	Spring et al., 1992
CS310	X61606	Undescribed magnetotactic alpha proteobacterium (strain Cs310) 16S rRNA	715	Spring et al., 1992
CS308	X61607	Magnetic coccus (CS308) for 16S rRNA	1494	Spring et al., 1992
CS92	X81182	Magnetic rod 16S rRNA gene (CS92)	1498	Spring et al., 1994
CS81	X81184	Magnetic coccus 16S rRNA gene (CS81)	1497	Spring et al., 1994
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1	M58171	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1 16S ribosomal RNA gene	1407	Eden et al., 1991
<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1	D17514	<i>Magnetospirillum magneticum</i> gene for 16S rRNA, strain:AMB-1	1428	Kawaguchi et al., 1992
TB24	X81185	Magnetic coccus 16S rRNA gene (TB24)	1494	Spring et al., 1994
rj520	Y13207	Magnetic bacterium small subunit rRNA gene, strain rj520	1494	Spring et al., 1998
rj53	Y13208	Magnetic bacterium small subunit rRNA gene, strain rj53	1493	Spring et al., 1998
rj516	Y13209	Magnetic bacterium small subunit rRNA gene, strain rj516	1493	Spring et al., 1998

ตารางที่ 2.5 (ต่อ) แมกนีโตแทกติกแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในคลาส *Alphaproteobacteria* (Tajer Mohammad Ghazvini et al., 2014)

Sequence Name	GenBank		Sequence	
	Accession Number	GenBank Definition	Length (bp)	Reference
rj517	Y13210	Magnetic bacterium small subunit rRNA gene, strain rj517	1494	Spring et al., 1998
rj58	Y13211	Magnetic bacterium small subunit rRNA gene, strain rj58	1495	Spring et al., 1998
pa11	Y13212	Magnetic coccus small subunit rRNA gene, strain pa11	1498	Spring et al., 1998
pa19	Y13213	Magnetic coccus small subunit rRNA gene, strain pa19	1494	Spring et al., 1998
pa119	Y13214	Magnetic coccus small subunit rRNA gene, strain pa119	1496	Spring et al., 1998
rj12	Y13215	Magnetic bacterium small subunit rRNA gene, strain rj12	1493	Spring et al., 1998
<i>Magnetospirillum magneticum</i> MGT-1	D17515	<i>Magnetospirillum magneticum</i> gene for 16S rRNA, strain:MGT-1	1428	Burgess et al., 1993
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1	NR_026381	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> strain DSM 3856 16S ribosomal RNA, partial sequence	1443	Burgess et al., 1993
<i>Magnetococcus</i> sp. MC-1	CP000471	<i>Magnetococcus</i> sp. MC-1, 16S ribosomal RNA	1497	Schubbe et al., 2009
Magnetite-containing magnetic vibrio strain MV-1	L06455	Magnetite containing magnetic vibrio rRNA sequence	1361	DeLong et al., 1993

ตารางที่ 2.5 (ต่อ) แมกนีโตแทกติกแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในคลาส *Alphaproteobacteria* (Tajer Mohammad Ghazvini et al., 2014)

Sequence Name	GenBank Accession Number	GenBank Definition	Sequence Length (bp)	Reference
MSM-3	Y17389	<i>Magnetospirillum</i> sp. 16S rRNA gene, strain MSM-3	1444	Schüler et al., 1999
MSM-4	Y17390	<i>Magnetospirillum</i> sp. 16S rRNA gene, strain MSM-4	1444	Schüler et al., 1999
MSM-6	Y17391	<i>Magnetospirillum</i> sp. 16S rRNA gene, strain MSM-6	1443	Schüler et al., 1999
Marine magnetite-containing magnetic spirillum MMS-1	EU861390	Marine magnetite-containing magnetic spirillum MMS-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1417	Unpublished
<i>Magnetospirillum</i> sp. B9-1-22	FJ562216	<i>Magnetospirillum</i> sp. B9-1-22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1445	Jogler et al., 2009
<i>Magnetospirillum</i> sp. B9-5-1	FJ562217	<i>Magnetospirillum</i> sp. B9-5-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1445	Jogler et al., 2009
CF18	AJ863151	<i>Magnetospirillum</i> sp. CF18 partial 16S rRNA gene, strain CF18	1444	Flies et al., 2005
CF19	AJ863152	<i>Magnetospirillum</i> sp. CF19 partial 16S rRNA gene, strain CF19	1444	Flies et al., 2005

ตารางที่ 2.5 (ต่อ) แมกนีโตแทกติกแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในคลาส *Alphaproteobacteria*  
(Tajer Mohammad Ghazvini et al., 2014)

Sequence Name	GenBank		Sequence	
	Accession Number	GenBank Definition	Length (bp)	Reference
CF20	AJ863153	<i>Magnetospirillum</i> sp. CF20 partial 16S rRNA gene, strain CF20	1443	Flies et al., 2005
CF21	AJ863154	<i>Magnetospirillum</i> sp. CF21 partial 16S rRNA gene, strain CF21	1443	Flies et al., 2005
NKMC5	D38093	<i>Magnetic coccus</i> MP17 16S rRNA gene, partial sequence, clone NKMC5	267	Thornhill et al., 1995
NKMC6	D38094	<i>Magnetic coccus</i> MP17 16S rRNA gene, partial sequence, clone NKMC6	267	Thornhill et al., 1995
NKMC8	D38095	<i>Magnetic coccus</i> MP17 16S rRNA gene, partial sequence, clone NKMC8	268	Thornhill et al., 1995
NKMC9	D38096	<i>Magnetic coccus</i> MP17 16S rRNA gene, partial sequence, clone NKMC9	267	Thornhill et al., 1995
NKSE7	D38097	<i>Magnetic coccus</i> MP17 16S rRNA gene, partial sequence, clone NKSE7	268	Thornhill et al., 1995
NKSE9	D38098	<i>Magnetic coccus</i> MP17 16S rRNA gene, partial sequence, clone NKSE9	268	Thornhill et al., 1995

ตารางที่ 2.5 (ต่อ) แมกนีโตแทกติกแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในคลาส *Alphaproteobacteria* (Tajer Mohammad Ghazvini et al., 2014)

Sequence Name	GenBank Accession Number	GenBank Definition	Sequenc e Length (bp)	Reference
<i>Magnetospirillum</i> sp. CC-26	AB033746	<i>Magnetospirillum</i> sp. CC-26 gene for 16S ribosomal RNA	1455	Shinoda et al., 2000
<i>Magnetospirillum</i> sp. WM-1	DQ899734	<i>Magnetospirillum</i> sp. WM-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1458	Li et al., 2007
Magneto-ovoid bacterium MO-1	EF643520	Magneto-ovoid bacterium MO-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1495	Lefèvre et al., 2009
TS-6	AB167719	<i>Magnetospirillum</i> sp. TS-6 gene for 16S ribosomal RNA	1455	Unpublishe d
BM1232	AB167720	<i>Magnetospirillum</i> sp. BM1232 gene for 16S ribosomal RNA	1455	Unpublishe d
PM1331	AB167721	<i>Magnetospirillum</i> sp. PM1331 gene for 16S ribosomal RNA	1455	Unpublishe d
PM2411	AB167724	<i>Magnetospirillum</i> sp. PM2411 gene for 16S ribosomal RNA	1455	Unpublishe d
LB52	AJ223476	<i>Magnetotactic coccus</i> LB52 16S small subunit rRNA gene, strain LB52	539	Unpublishe d

ตารางที่ 2.5 (ต่อ) แมกนีโตแทกติกแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในคลาส *Alphaproteobacteria*  
(Tajer Mohammad Ghazvini et al., 2014)

Sequence Name	GenBank Accession Number	GenBank Definition	Sequence Length (bp)	Reference
LB52	AJ223476	<i>Magnetotactic coccus</i> LB52 16S small subunit rRNA gene, strain LB52	539	Unpublished
B16	FJ391521	<i>Magnetospirillum</i> sp. enrichment culture clone B16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	641	Unpublished
B17	FJ391522	<i>Magnetospirillum</i> sp. enrichment culture clone B17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	506	Unpublished

ตารางที่ 2.6 แมกนีโตแทกติกแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในคลาส *Deltaproteobacteria* และ ไฟลัม Nitrospirae\*\* (Araujo et al., 2015)

Sequence Name	GenBank	GenBank Definition	Sequence	
	Accession Number		Length (bp)	Reference
<i>Candidatus Magnetoglobus multicellularis</i>	EF014726	<i>Candidatus Magnetoglobus multicellularis</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1520	Abreu et al., 2007
Iron sulfide-containing magnetotactic bacterium	AY576052	Iron sulfide-containing magnetotactic bacterium 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	Keim et al., 2004
<i>Desulfovibrio magneticus</i> strain RS-1	NR_027575	<i>Desulfovibrio magneticus</i> strain RS-1 16S ribosomal RNA, complete sequence	1540	Sakaguchi et al., 2002
MMP1991	L06457	Iron sulfide containing magnetotactic bacterium rRNA sequence from clone MMP1991	1291	DeLong et al., 1993
<i>Magnetobacterium bavaricum</i> **	X71838	<i>Magnetobacterium bavaricum</i> 16S rRNA gene	1513	Spring et al., 1993

## บทที่ 3

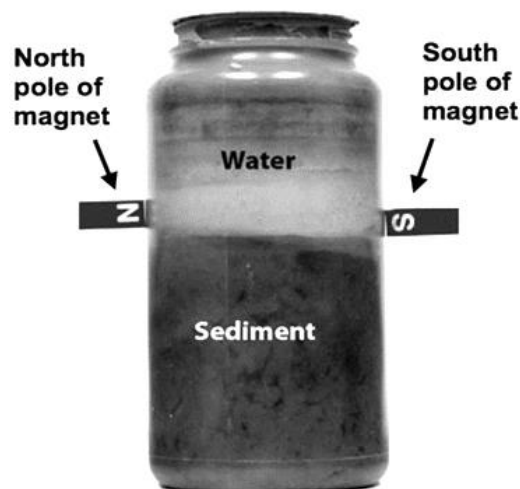
### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 การแยกแบคทีเรียสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็ก

เก็บตัวอย่างดินตะกอนและน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 ที่ระดับความลึกจากผิวหน้าดินตะกอน 5–10 เซนติเมตร จากแหล่งน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม และเหมืองแร่ที่มีการปนเปื้อนแม่เหล็ก 5 แหล่ง ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของประเทศไทย (ภาคผนวก ข) บรรจุตัวอย่างในขวดฝาเกลียว ปิดฝา หลวม ๆ นำกลับห้องปฏิบัติการเพื่อการแยกต่อไปดังนี้

##### 3.1.1 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียด้วยแม่เหล็ก (Magnetic enrichment)

กวนตัวอย่างน้ำและดินตะกอนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เมื่อเห็นระดับดินตะกอนชัดเจน แล้วทำการติดแผ่นแม่เหล็กทั้งสองด้านของภาชนะโดยให้แม่เหล็กอยู่เหนือระดับดินตะกอน 1 เซนติเมตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดังภาพที่ 3.1 เพื่อชักนำให้แบคทีเรียที่ตอบสนองต่อแม่เหล็กเคลื่อนที่มาบริเวณแผ่นแม่เหล็กดังกล่าว จากนั้นใช้ปิเปตดูดน้ำจากบริเวณแผ่นแม่เหล็กด้านละ 5 มิลลิลิตร ไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนที่ได้ไปแยกในขั้นตอนต่อไป

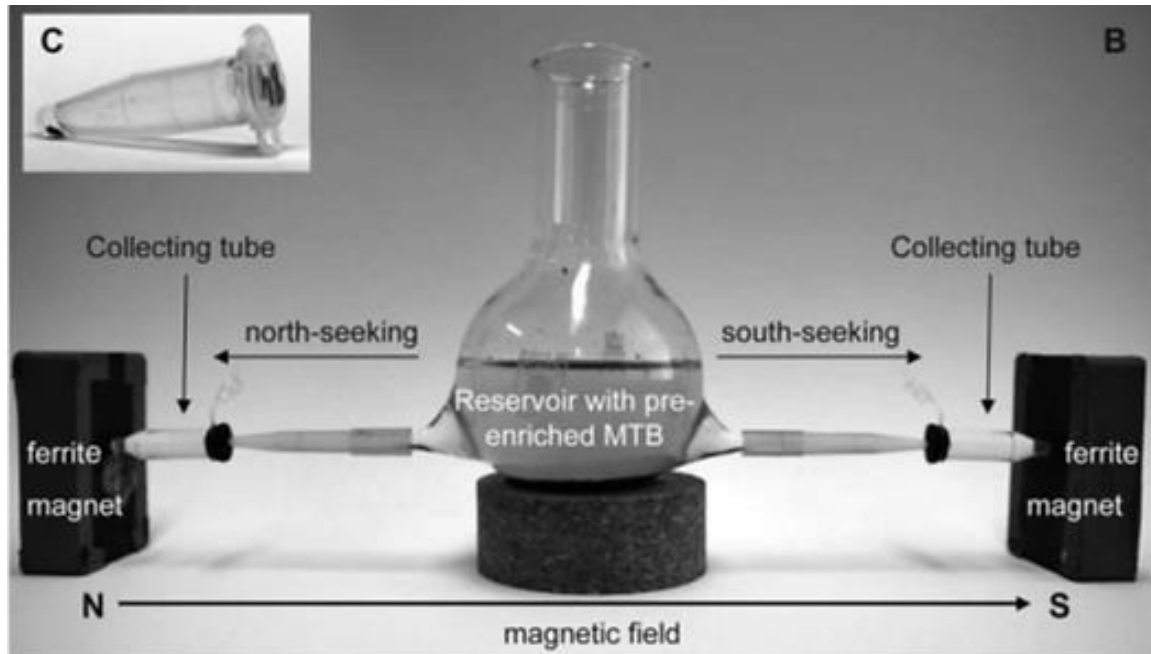


ภาพที่ 3.1 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียด้วยแม่เหล็ก (Jogler et al., 2009)

##### 3.1.2 แยกแบคทีเรียด้วยเทคนิค Trapping

นำตัวอย่างจากขั้นตอนที่ 3.1.1 มาละลายในอาหาร Modified MTB (Blakemore et al., 1979; Sakaguchi et al., 1996; Song et al., 2008) จากนั้นแยกบริสุทธิ์แบคทีเรียที่สนใจด้วยเทคนิค Trapping ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Jogler และคณะ (Jogler et al., 2009) ดังภาพที่ 3.2 โดยเติมตัวอย่างลงในภาชนะชุด Trapping ที่ทั้งสองด้านมีท่อเชื่อมต่อกับภาชนะเก็บตัวอย่าง ตอนปลายของแต่ละด้านต่อกับแม่เหล็กขั้ว

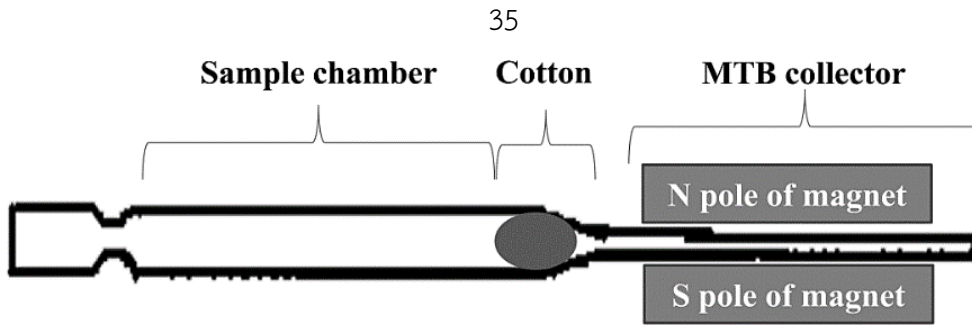
เหนือหรือขั้วใต้ ที่ไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียจากภาชนะเก็บตัวอย่างด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000xg ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกระจายตะกอนเซลล์แบคทีเรียกลับด้วยน้ำกลั่นและนำไปแยกบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไปด้วยวิธี Racetrack



ภาพที่ 3.2 ชุดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์หอนูภาคินาโนแม่เหล็กด้วยเทคนิค Trapping (Jogler et al., 2009)

### 3.1.3 การแยกบริสุทธิ์แบคทีเรียด้วยเทคนิค Racetrack

นำสารละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.1.2 มาแยกบริสุทธิ์ต่อด้วยเทคนิค Racetrack (Christine B. Flies et al., 2005) ดังภาพที่ 3.3 โดยเติมตัวอย่างลงด้านบนของพาสเจอร์ปีเปตที่มีสาลิกันระหว่างส่วนบนบริเวณที่เติมตัวอย่างกับส่วนปลายที่เก็บตัวอย่าง ซึ่งมีแม่เหล็กติดอยู่เพื่อชักนำให้แบคทีเรียที่ตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กเคลื่อนที่มายังบริเวณดังกล่าวได้ หลังจากทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างบริเวณปลายของพาสเจอร์ปีเปตมาแยกต่อด้วยเทคนิคการกระจายเชื้อ (spread plate) บนอาหารแข็ง Modified MTB (Blakemore et al., 1979; Sakaguchi et al., 1996; Song et al., 2008) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันมาทำการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ต่อไป



ภาพที่ 3.3 ชุดแยกบริสุทธิ์แบคทีเรียที่สังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กด้วยเทคนิค Ractrack

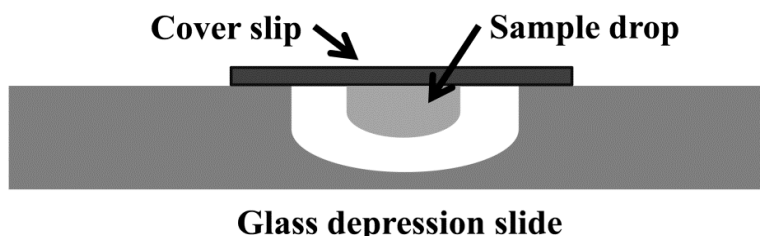
### 3.1.4 การศึกษาขนาด รูปร่างของเซลล์และลักษณะแมกนีโตโซมภายในเซลล์แบคทีเรีย

เตรียมตะกอนเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลว 1 มิลลิลิตร ที่มีค่า OD<sub>600</sub> ประมาณ 0.2 จากนั้น ตรีงเซลล์ด้วย สารละลาย fixative agent โดยละลายตะกอนแบคทีเรียด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเติม fixative reagent ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดสารละลายดังกล่าวลงบน formvar carbon coated-copper grids ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จำนวน 5 ครั้ง และล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 ไมโครลิตร 2 ครั้ง ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปศึกษา ขนาด รูปร่าง และจำนวนของแมกนีโตโซมภายในเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ที่ค่าแหล่งกำเนิดพลังงานที่ 200 กิโลโวลต์ โดยเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ซึ่งเป็นตัวควบคุมเชิงลบ

## 3.2 ศึกษาสมบัติเบื้องต้นทางชีวเคมีและกายภาพของแบคทีเรีย

3.2.1 ศึกษาสมบัติการตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กของแบคทีเรียด้วยเทคนิคสไลด์แขวน (Hanging drop technique)

หยดแบคทีเรียปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนจุดกึ่งกลางของกระจกปิดสไลด์ จากนั้นทาขอบทั้ง 4 ด้านทาด้วยวาสลินเพื่อป้องกันออกซิเจน นำแผ่นสไลด์หลุม (concaves slides) มาครอบ จากนั้นพลิกแผ่นสไลด์ให้หงายขึ้น ดังภาพที่ 3.4 เคลือบรอยต่อระหว่างกระจกปิดสไลด์และสไลด์ด้วยน้ำยาเคลือบ นำไปศึกษา การเคลื่อนที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Bright field microscope) ที่มีแม่เหล็กชักนำการเคลื่อนที่วางบนแท่นสไลด์ (W.-Y. Zhang et al., 2012) ดังภาพที่ 3.5



ภาพที่ 3.4 การเตรียมสไลด์ด้วยเทคนิคสไลด์แขวน (Hanging drop technique)



ภาพที่ 3.5 การศึกษาการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

### 3.2.2 ศึกษาสมบัติการติดสีแกรมและสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย

ศึกษาสมบัติการติดสีของผนังเซลล์แบคทีเรียเพื่อแยกกลุ่ม ด้วยเทคนิคย้อมแกรม (Gram staining) โดยเขี่ยแบคทีเรียจากโคลนเดี่ยว แล้วเกลี่ยบาง ๆ บนแผ่นสไลด์ รอให้แห้ง ทำการผนึกเซลล์ให้ติดแผ่นสไลด์โดยการผ่านเปลวไฟ 3-4 ครั้ง (Heat fixed) จากนั้นย้อมด้วยสีคริสตอลไวโอเลต (crystal violet) ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 วินาที แล้วล้างสีที่เหลือออกโดยการเปิดน้ำให้ไหลผ่านเบา ๆ เมื่อเสร็จแล้วเติมสารที่ทำให้เซลล์ติดสี gram's iodine ประมาณ 2 หยด ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีส่วนเกินออกโดยการชะล้างด้วย เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 วินาที หลังจากนั้นย้อมด้วยสี ซาฟรานิน (Safranin) เป็นเวลา 30 วินาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำ ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงต่อไป ในส่วนการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ออกซิเดสและคาตาเลส สามารถทดสอบด้วยวิธีมาตรฐานของ Bergey's manual (Jun et al., 2006) และสมบัติทางชีวเคมีอื่น ๆ สามารถวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบ Api 20E (BioMerieux, USA)

## 3.3 การจำแนกหมวดหมู่ของแบคทีเรียด้วยลำดับสารพันธุกรรม 16S rRNA

### 3.3.1 การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (Genomic DNA)

เลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ (Microaerobic condition) จนเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวนทวีคูณ (log phase) (24-48 ชั่วโมง) ในอาหารเหลว Modified MTB ปริมาตร 350 มิลลิลิตร (Blakemore et al., 1979; Sakaguchi et al., 1996; Song et al., 2008) จากนั้นเก็บตะกอนเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000xg เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอน 3 ครั้งด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หลังจากนั้นสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอของเซลล์แบคทีเรีย (Genomic DNA) ด้วยวิธีพี

นอล-คลอโรฟอร์ม (Phenol-chloroform) (Sambrook et al., 1989) ศึกษาแบบแผนของจีโนมคติเอ็นเอ ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gels ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1x tris-acetate-EDTA (1XTAE) จากนั้นตัดเจลในตำแหน่งจีโนมคติเอ็นเอ นำไปสกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากเจล Gel/PCR DNA fragment extraction kit (Geneaid, Taiwan) นำจีโนมคติเอ็นเอที่ได้จากสกัดไปเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

### 3.3.2 การเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ยีน 16S rRNA gene เป็นยีนลายเซ็น (signature gene) ที่มีรหัสสำหรับโมเลกุลไรโบโซม ซึ่งมีลำดับเบสจำเพาะและอนุรักษ์ (conserved sequence) โดยมีความจำเพาะในแบคทีเรียแต่ละชนิด และมีลำดับเบสช่วงสั้น ๆ ที่พบได้เหมือนกันในแบคทีเรียทุกชนิด ซึ่งตำแหน่งที่จำเพาะดังกล่าวจะถูกนำมาใช้ในการจำแนกหมวดหมู่และวิเคราะห์ลำดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ส่วนตำแหน่งยีนที่พบเหมือนกันในแบคทีเรียทุกชนิดจะถูกนำมาใช้ในการออกแบบดีเอ็นเอเริ่มต้น (primer) เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน 16S rRNA โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันหรือพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงสังเคราะห์ยีน 16S rRNA ด้วยเครื่อง Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems, USA) ให้มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส จากดีเอ็นเอต้นแบบ คือ จีโนมคติเอ็นเอที่สกัดได้ในขั้นตอนก่อนหน้า และใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้น คือ Universal bacterial primer เป็นสายไพร์เมอร์ฟอร์เวิร์ด (forward primer) คือ 27F (5'-AGAGTYTGATCMTGGCTCAG-3') และสายไพร์เมอร์รีเวิร์ด (reverse primer) คือ 1492R (5'-GGHTACCTGTTACGACTT-3') (Zhu et al., 2010) ในปฏิกิริยาประกอบด้วย 1x PCR buffer นิวคลีโอไทด์ (0.2 mM dNTP) แมกนีเซียมคลอไรด์ (2 mM MgCl<sub>2</sub>) ไพร์เมอร์ (250 นาโนกรัม แต่ละสาย) และเอนไซม์ Taq DNA polymerase (1.25 ยูนิต) โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ เริ่มต้นที่การแยกสายดีเอ็นเอ (pre-denaturing step) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบแรกของปฏิกิริยา คือ การแยกสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส (denaturing step) เป็นเวลา 45 วินาที ตามด้วยการเข้าจับของดีเอ็นเอเริ่มต้นและดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing step) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และต่อสายดีเอ็นเอ (extension step) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จนครบ 25 รอบ แล้วคงไว้ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (Final extension step) นำปฏิกิริยาดังกล่าวไปแยกด้วยโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) เพื่อตรวจสอบขนาดของ 16S rRNA จากนั้นนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง MegaBACE 1000 and ALF express sequencers (GE Healthcare, USA) เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Blastn (NCBI) และเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence alignment) ด้วยโปรแกรม clustalW multiple alignment โดยใช้โปรแกรม BioEdit จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี maximum likelihood โดยโมเดล Kimura 2-parameter โปรแกรม MEGA version 6.06 (Kimura, 1980; Tamura et al., 2013) และกำหนดการสุ่มข้อมูล (bootstrap) จำนวน 1,000 ครั้ง

### 3.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย

เตรียมแบคทีเรียตั้งต้น (starter) โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว Modified MTB ปริมาตร 350 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ จนเข้าสู่ระยะคงจำนวนเซลล์ (stationary phase) (24–48 ชั่วโมง) นำแบคทีเรียตั้งต้นไปศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญ ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช แหล่งคาร์บอน และความเข้มข้นของเหล็กไอออน ตามลำดับ วัดการเจริญทุก 6 ชั่วโมง จนเข้าสู่ระยะคงจำนวนเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-1 100 Spectrophotometer (Mapada, China) โดยทำการศึกษาสภาวะละ 3 ซ้ำ

ในการศึกษาปัจจัยของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ ทำโดยเลี้ยงแบคทีเรียตั้งต้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเหลว Modified MTB ปริมาตร 350 มิลลิลิตร แยกบ่มที่อุณหภูมิ 15 25 35 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ และวัดการเจริญทุก 6 ชั่วโมง จนกระทั่งเข้าสู่ระยะคงจำนวนเซลล์ ผลที่ได้นำไปเป็นตัวแปรควบคุมในการศึกษาเรื่องปัจจัยของพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญโดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว Modified MTB ที่ปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลลาร์ เท่ากับ 3.5 5.5 6.9 8.5 9.5 และ 11.5 ตามลำดับ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ และวัดการเจริญทุก 6 ชั่วโมง จนเข้าสู่ระยะคงจำนวนเซลล์ ผลที่ได้นำไปเป็นตัวแปรควบคุมในการศึกษาเรื่องแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยเลี้ยงแบคทีเรียลงในอาหารเหลว Modified MTB ที่ขาดแหล่งคาร์บอนตามสูตรปกติ แบ่งเป็น 4 สูตร ซึ่งแต่ละสูตรมีแหล่งคาร์บอนต่างกัน 4 ชนิด คือ กรดแอซิติค (acetic acid) กรดแลคติก (lactic acid) กรดฟูมาลิก (fumaric acid) และกาแลคโตส (galactose) ที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนแต่ละแหล่งเป็น 0 2 6 10 14 และ 18 มิลลิโมลลาร์ ตามลำดับ และมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.9 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นวัดการเจริญทุก 6 ชั่วโมง นำสูตรอาหารที่มีชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนมาศึกษาเปรียบเทียบผลการเจริญของแบคทีเรียระหว่างอาหารเหลว Modified MTB อาหารเหลว Modified MTB ที่เติมแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นที่เหมาะสมเพียงหนึ่งชนิด และอาหารเหลว Modified MTB ที่เติมแหล่งคาร์บอนทุกชนิดในความเข้มข้นที่เหมาะสม เลือกสภาวะที่เหมาะสมเพื่อมาศึกษาความเข้มข้นของไอออนของเหล็กที่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว Modified MTB ที่เพิ่มแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม พีเอช 6.9 และปรับความเข้มข้นของเหล็กไอออนจาก  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  เป็น 0 10 20 40 80 160 และ 320 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นเลือกความเข้มข้นของไอออนของเหล็กที่เหมาะสมต่อการเจริญไปใช้ในการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อระยะเวลาในการผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กต่อไป

### 3.5 ศึกษาปัจจัยของแหล่งคาร์บอนต่อระยะเวลาการผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กของแบคทีเรีย

ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อชนิดและสัดส่วนของอนุภาคออกไซด์ของเหล็กที่แบคทีเรียผลิตได้ในระยะพัก (lag phase) ระยะเพิ่มจำนวนทวีคูณ (log phase) และระยะคงจำนวนเซลล์ (stationary phase) โดยเลี้ยงแบคทีเรีย HER\_I ในอาหารเหลว Modified MTB พีเอช 6.9 และอาหารเหลว Modified MTB ที่มีความ

เข้มข้นกรดแอสติกเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.9 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะมีออกซิเจนน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับอาหารเหลว Modified MTB สูตรปกติ จากนั้นเก็บตะกอนของแบคทีเรียที่ระยะการเจริญดังกล่าวระยะละ 5 กรัม (น้ำหนักเปียก) มาทำให้แห้งโดยการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dehydration หรือ lyophilization) จากนั้นนำตะกอนของแบคทีเรียแต่ละระยะของการเจริญไปวิเคราะห์ชนิดออกไซด์ของเหล็กโดยการวิเคราะห์พลังงานชั้น  $K_{edge}$  ของธาตุเหล็กด้วยโหมด fluorescence ของเทคนิค X-ray absorption near edge structure (XANES) ที่สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (Siam Synchrotron Light Research Institute, Thailand) ในการวิเคราะห์กำหนดให้ค่าพารามิเตอร์ตั้งต้นต่างๆ ดังนี้  $E_0 = 7125.470$   $E_{shift} = 0.000$ ,  $R_{bkg} = 1.000$   $K_{weight} = 2.0$  และ Edge step = 0.003.b. และวิเคราะห์ผลของสเปกตรัมที่ได้ด้วยโปรแกรม Athena version 0.8.54 โดยมี  $Fe_2O_3$  (III) and  $Fe_3O_4$  (II, III) เป็นสารเปรียบเทียบมาตรฐาน

### 3.6 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก

#### 3.6.1 ศึกษาแมกนีโตโซมภายในเซลล์แบคทีเรีย

เตรียมตะกอนเซลล์จากแบคทีเรียในอาหารเหลวประมาณ 1 มิลลิลิตร ที่มีค่า  $OD_{600}$  ประมาณ 0.2 จากนั้น fixed เซลล์ด้วย สารละลาย fixative agent โดยละลายตะกอนแบคทีเรียด้วยน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร แล้วเติม 10 ไมโครลิตร ของ fixative reagent หยดสารละลายดังกล่าวครั้งละ 10 ไมโครลิตร จำนวน 5 ครั้ง ลงบน formvar carbon coated-copper grids ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 10 ไมโครลิตร รอให้แห้งนำไปศึกษารูปร่าง ขนาด และจำนวนของ magnetosome ภายในเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน โดยใช้แหล่งกำเนิดพลังงาน 200 กิโลโวลต์ เปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* เป็นตัวควบคุมเชิงลบ

#### 3.6.2 การศึกษาองค์ประกอบและโครงสร้างผลึกของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก

ในการศึกษาอนุภาคนาโนแม่เหล็กได้ทำการแยกแมกนีโตโซมจากเซลล์ด้วย 2 วิธี คือ การทำให้เซลล์แตกและสกัดแมกนีโตโซม และการเผาเซลล์ด้วยความร้อนสูง สำหรับวิธีแรก ได้เตรียมตะกอนเซลล์แบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง น้ำหนัก 2.5 กรัม นำไปสกัดแมกนีโตโซม โดยกระจายตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร เติมสารละลายไลโซไซม์ (lysozyme) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เซลล์แตกโดยการเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate; SDS) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) ที่ 40 แอมป์จูด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กำจัดเศษเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000xg เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสมาปั่นเหวี่ยงที่ 12000xg เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกเก็บแมกนีโตโซมจากส่วนใสและล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เตรียมสำหรับศึกษาต่อไป สำหรับการเตรียมตัวอย่างอีกวิธีเป็นการเผา โดยการนำตะกอนเซลล์ 5 กรัม นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเผาเพื่อกำจัดสารประกอบอินทรีย์ที่อุณหภูมิ 300 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่เตรียมได้จากการสกัดและการเผามาศึกษาด้วยเทคนิค TEM TEM-SAED และ TEM-EDX

### 3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณด้วยค่าเฉลี่ยเลขคณิต (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviations) เปรียบเทียบข้อมูลทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS 11.5 สำหรับซอฟต์แวร์ Windows (SPSS, สหรัฐอเมริกา) กำหนดให้ค่าความน่าจะเป็น (p-value) น้อยกว่า 0.05 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และ จำนวนในการวิเคราะห์เท่ากับ 5 ในทุกการทดลอง

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและอภิปราย

#### 4.1 การสำรวจและศึกษาลักษณะของเซลล์แบคทีเรียที่สามารถผลิตอนุภาคนาโนของเหล็ก

##### 4.1.1 ลักษณะโคโลนี

จากการสำรวจแหล่งน้ำทิ้งที่ปนเปื้อนเหล็กจากโรงงานอุตสาหกรรมในแถบภาคกลาง และเหมืองแร่ในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 5 แหล่ง พบแบคทีเรียที่สามารถผลิตอนุภาคนาโนทั้งหมด 6 ไอโซเลตประกอบด้วยไอโซเลต HER\_I HER\_II KPI\_I L3\_5 SRL\_1 และ TSB2 เมื่อทำการศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่ตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กของแบคทีเรียดังกล่าว พบว่าแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลตสามารถตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กอย่างอ่อน (weak magnetotaxis) โดยแบคทีเรียที่แยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ โคโลนีมีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในช่วง 0.1–1 มิลลิเมตร โคโลนีที่พบมีทั้งสีเขียวและขาวขุ่น เมื่อทำการศึกษารูปร่างเซลล์แบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าแบคทีเรียมีรูปร่างแบบท่อนและกลม ขนาดเซลล์ประมาณ 0.34–0.68 ไมโครเมตร (ตารางที่ 4.1)

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้สำรวจหากลุ่มแบคทีเรียที่สามารถผลิตอนุภาคนาโนจากแหล่งน้ำในธรรมชาติของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3 แหล่งประกอบด้วย บึงโขงหลง จังหวัดบึงกาฬ หนองบัวแดง จังหวัดอุดรธานี และบึงหนองหาร จังหวัดสกลนคร เมื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กด้วยวิธี magnetotactic separation และ Racetrack พบแบคทีเรียทั้งหมด 7 ไอโซเลต ได้แก่ UDD1 UDD2 BKL1 SKN1 SKN2 SKN3-1 และ SKN3-4 จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่สามารถผลิตอนุภาคนาโนทั้ง 7 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวเป็นแบคทีเรียแกรมลบ โคโลนีมีลักษณะกลม สีน้ำตาลอ่อน และขาวขุ่น มีลักษณะนูน ขอบเรียบ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 0.5–2.0 มิลลิเมตร เมื่อทำการศึกษารูปร่างของเซลล์แบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบว่าแบคทีเรียมีรูปร่างเป็นท่อนสั้น และกลม มีขนาดเซลล์ประมาณ 0.5–1 ไมโครเมตร ดังแสดงในตาราง 4.1 ซึ่งลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียดังกล่าวคล้ายคลึงกับกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่เคยรายงานก่อนหน้านี้ (Wolfe et al., 1987)

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีแบคทีเรียที่แยกได้

สถานที่สำรวจ	แบคทีเรีย	สภาวะการเจริญ	แกรม	ลักษณะโคโลนี	
				ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)	ลักษณะสัณฐานวิทยา รูปร่าง สี ความหนูน ขอบ
แหล่งน้ำปนเปื้อนจาก โรงงาน	HER_I	Microaerophiles	ลบ	0.15	กลม, เขียว, นูน, ขอบเรียบ
	HER_II	Microaerophiles	ลบ	0.2	กลม, เขียว, นูน, ขอบเรียบ
	KPI_I	Microaerophiles	ลบ	0.1	กลม, ขาวขุ่น, นูน, ขอบเรียบ
	L3_5	Microaerophiles	ลบ	1	กลม, ขาวขุ่น, นูน, ขอบเรียบ
	SRL_1	Microaerophiles	ลบ	<0.1	กลม, ขาวขุ่น, นูน, ขอบเรียบ
	TSB2	Microaerophiles	ลบ	0.1	กลม, ขาวขุ่น, นูน, ขอบเรียบ
แหล่งน้ำธรรมชาติ	UDD1	Microaerophiles	ลบ	0.5	กลม, น้ำตาลอ่อน, นูน, ขอบเรียบ
	UDD2	Microaerophiles	ลบ	1.0	กลม, ขาวขุ่น, นูน, ขอบเรียบ
	BKL1	Microaerophiles	ลบ	0.5	กลม, ขาวขุ่น, นูน, ขอบเรียบ
	SKN1	Microaerophiles	ลบ	1.1	กลม, ขาวขุ่น, นูน, ขอบเรียบ
	SKN2	Microaerophiles	ลบ	0.7	กลม, น้ำตาลอ่อน, นูน, ขอบเรียบ
	SKN3-1	Microaerophiles	ลบ	2	กลม, ขาวขุ่น, นูน, ขอบเรียบ
	SKN3-4	Microaerophiles	ลบ	1.7	กลม, ขาวขุ่น, นูน, ขอบเรียบ

#### 4.1.2 การตอบสนองต่อสนามแม่เหล็ก

เมื่อทำการศึกษาการตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กขั้วเหนือและขั้วใต้ของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยอาศัยเทคนิค magnetic trapping และเทคนิค capillary racetrack พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ส่วนใหญ่มีการตอบสนองต่อทั้งแม่เหล็กขั้วเหนือและขั้วใต้ ยกเว้นแบคทีเรียไอโซเลต L3\_5 (ตารางที่ 4.2) สำหรับแบคทีเรียไอโซเลตอื่น ๆ พบว่าสามารถตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กอย่างอ่อน (weak magnetotaxis) ซึ่งเมื่อตั้งแบคทีเรียภายใต้สนามแม่เหล็กเป็นเวลา 30 นาที พบว่าแบคทีเรียมีการเคลื่อนที่ไปที่ขั้วแม่เหล็ก การเคลื่อนที่ไปที่ขั้วแม่เหล็กเป็นสมบัติจำเพาะของแมกเนติกแบคทีเรีย (magnetic bacteria)

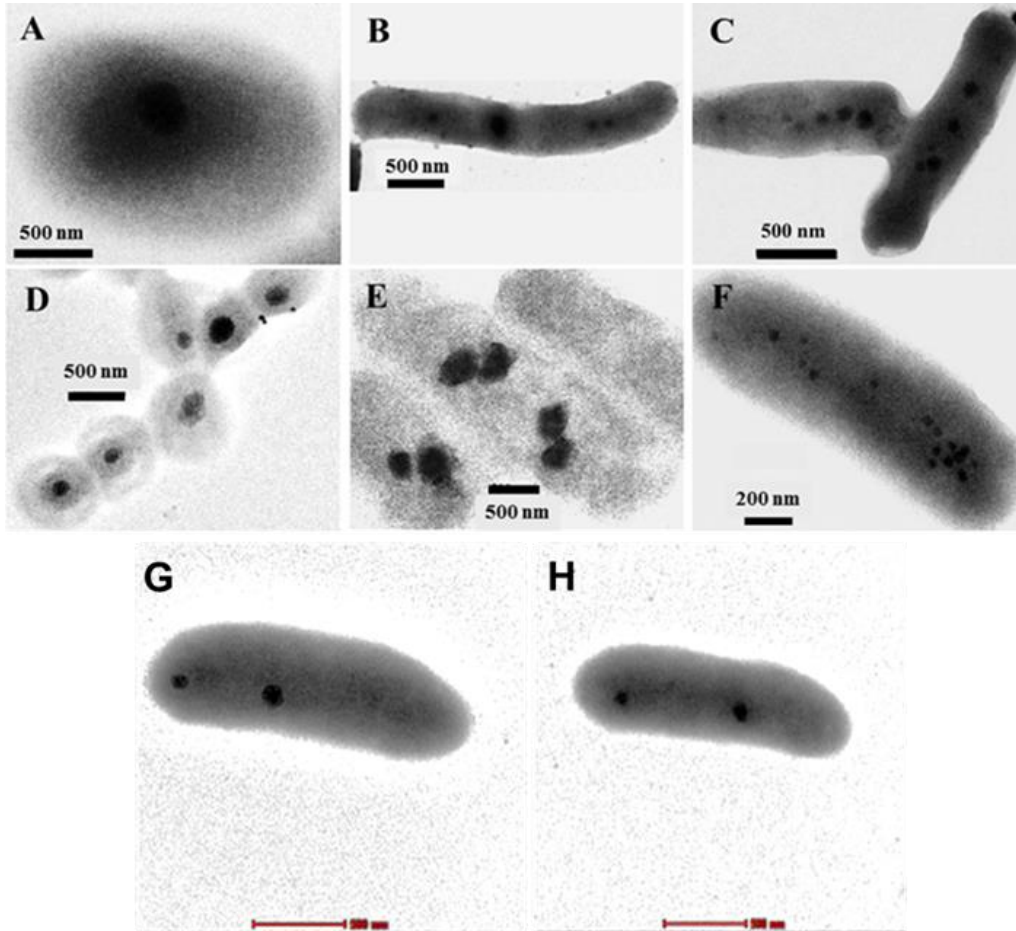
ตารางที่ 4.2 พฤติกรรมการตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กและขนาดของเซลล์แบคทีเรียที่แยกได้

สถานที่ สำรวจ	แบคทีเรีย	การเคลื่อนที่ได้สนามแม่เหล็ก	รูปร่าง แบคทีเรีย	ขนาดของเซลล์ ( $\mu\text{m}$ )	
				กว้าง	ยาว
แหล่งน้ำ ปนเปื้อนจาก โรงงาน	HER_I	เคลื่อนที่, ตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กอย่าง อ่อน	ท่อน	$0.36\pm 0.08$	$0.99\pm 0.21$
	HER_II	เคลื่อนที่, ตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กอย่าง อ่อน	ท่อน	$0.42\pm 0.06$	$1.30\pm 0.17$
	KPI_I	เคลื่อนที่, ตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กอย่าง อ่อน	ท่อน	$0.40\pm 0.05$	$1.81\pm 0.09$
	L3_5	เคลื่อนที่, ไม่สังเกตเห็นการตอบสนองต่อ สนามแม่เหล็ก	กลม	$0.68\pm 0.09$	-
	SRL1	เคลื่อนที่, ตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กอย่าง อ่อน	ท่อน	$0.34\pm 0.05$	$0.97\pm 0.21$
	TSB2	เคลื่อนที่, ตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กอย่าง อ่อน	ท่อน	$0.49\pm 0.05$	$1.64\pm 0.22$
	แหล่งน้ำ ธรรมชาติ	UDD1	เคลื่อนที่เร็ว, ตอบสนองต่อสนามแม่เหล็ก อย่างอ่อน	ท่อนสั้น	$0.50\pm 0.06$
UDD2		เคลื่อนที่เร็ว, ตอบสนองต่อสนามแม่เหล็ก อย่างอ่อน	ท่อนสั้น	$1.30\pm 0.02$	$1.00\pm 0.15$
BKL1		เคลื่อนที่ช้า, ตอบสนองต่อสนามแม่เหล็ก อย่างอ่อน	กลม	$1.00\pm 0.17$	-
SKN1		เคลื่อนที่ช้า, ตอบสนองต่อสนามแม่เหล็ก อย่างอ่อน	ท่อนสั้น	$0.65\pm 0.02$	$0.80\pm 0.05$
SKN2		เคลื่อนที่ช้า, ตอบสนองต่อสนามแม่เหล็ก อย่างอ่อน	กลม	$1.00\pm 0.08$	-
SKN3-1		เคลื่อนที่ช้า, ตอบสนองต่อสนามแม่เหล็ก อย่างอ่อน	ท่อนสั้น	$0.50\pm 0.03$	$1.50\pm 0.04$
SKN3-4		เคลื่อนที่ช้า, ตอบสนองต่อสนามแม่เหล็ก อย่างอ่อน	ท่อนสั้น	$1.60\pm 0.02$	$2.50\pm 0.02$

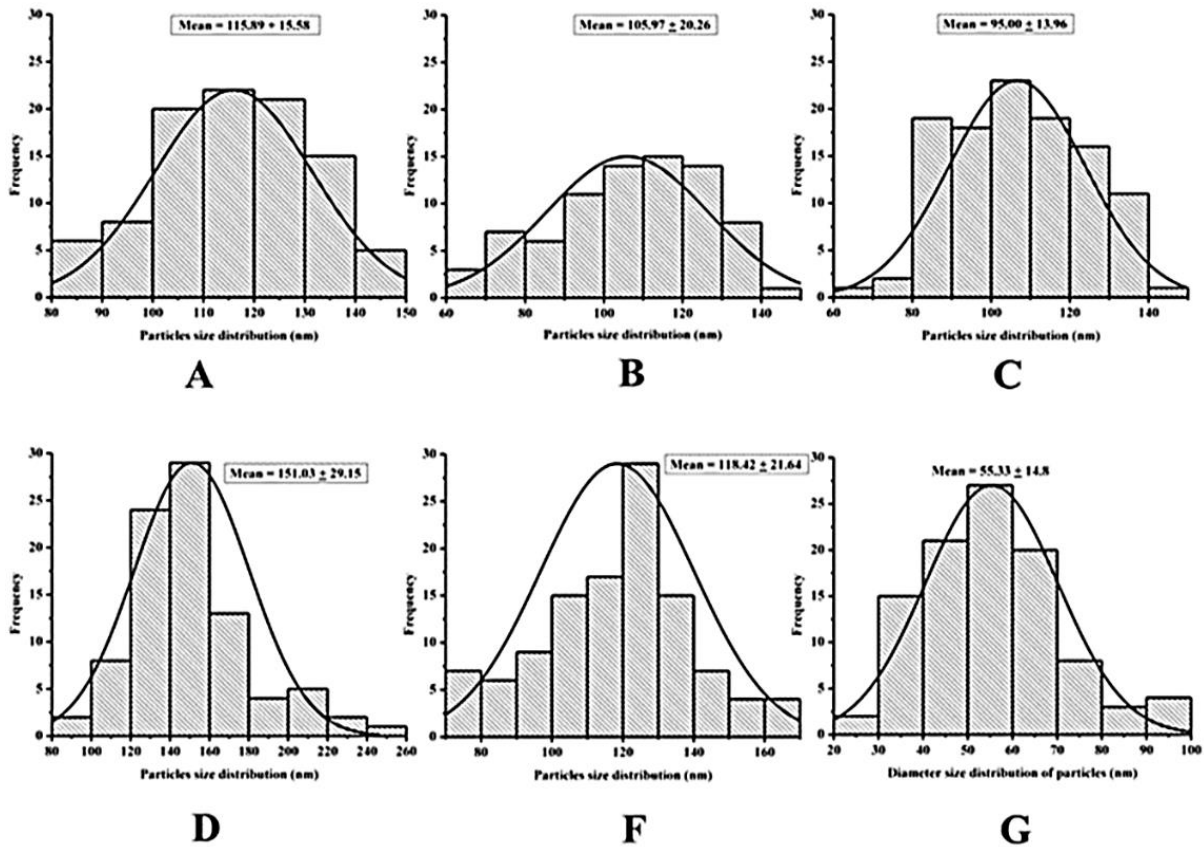
#### 4.1.3 แมกนีโตโซมภายในเซลล์แบคทีเรีย

เมื่อศึกษาขนาดและรูปร่างของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าแบคทีเรียที่ได้จากแหล่งน้ำที่ปนเปื้อนเหล็ก HER\_I HER\_II KPI\_I SRL1 และ TSB2 มีรูปร่างเป็นท่อน (bacillus) ส่วน L3\_5 มีรูปร่างเป็นทรงกลม (coccus) ดังแสดงในภาพที่ 4.1 แบคทีเรียเหล่านี้มีขนาดความกว้างในช่วง  $0.34-0.68$  ไมครอน และความยาวในช่วง  $0.97-1.81$  ไมครอน (ภาพที่ 4.2) ภายในเซลล์แบคทีเรียพบโครงสร้าง

แมกนีโตโซมส์ตำกระจายอยู่ โดยส่วนใหญ่มีจำนวน 1–3 อันต่อเซลล์ มีบางไอโซเลตที่พบจำนวนแมกนีโตโซมขนาดเล็กมากกว่า 3 อัน แมกนีโตโซมมีขนาดในช่วง 55–151 นาโนเมตร ลักษณะของแมกนีโตโซมในแบคทีเรียที่ได้มีความสอดคล้องกับลักษณะของแมกนีตริกแบคทีเรียที่มีรายงานมาก่อน เช่น *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Baeuerlein, 2004)



ภาพที่ 4.1 รูปร่างของแมกนีโตโซมภายในเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต HER\_I (A) HER\_II (B) KPI\_I (C) L3\_5 (D) SRL1 (E) TSB2 (F) UDD1 (G) และ SKN1 (H)



ภาพที่ 4.2 การกระจายตัวของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแมกนีโตโซมที่พบภายในเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต HER\_I (A) HER\_II (B) KPI\_I (C) L3\_5 (D) SRL1 (E) และ TSB2 (F)

#### 4.1.4 การตรวจสอบสมบัติทางชีวเคมีของเซลล์แบคทีเรีย

เมื่อตรวจสอบสมบัติทางชีวเคมี (biochemical tests) ด้วย Api 20E kits (BioMerieux, USA) ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า แบคทีเรียทั้งหมดสามารถใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานได้ (chemolithotrophs) แบคทีเรียส่วนใหญ่ให้ผลต่อเอนไซม์ catalase เป็นลบ (โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแบคทีเรียไอโซเลตที่แยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ) แสดงว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความต้องการใช้ออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญ (microaerophiles) สำหรับแบคทีเรียทั้งหมดสามารถแยกได้ 2 กลุ่มหลัก ได้แก่

1). ไอโซเลตที่ให้ผลการทดสอบเอนไซม์ cytochrome c oxidase และเอนไซม์ catalase เป็นลบ ทั้งคู่ (ได้แก่ HER\_I UDD1 UDD2 BKL1 SKN1 SKN2 SKN3-1 และ SKN3-4) แบคทีเรียดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่ม obligate microaerophilic ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยเกี่ยวกับแบคทีเรีย *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 (Wenbing et al., 2007)

2). ไอโซเลตที่ให้ผลการทดสอบเอนไซม์ cytochrome c oxidase เป็นบวก และเอนไซม์ catalase เป็นลบ (ได้แก่ HER\_II KPI\_I L3\_5 SRL1 และ TSB2) แบคทีเรียดังกล่าวถูกจัดอยู่ในกลุ่ม aerobic ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของแบคทีเรีย YSC-1 (Jun et al., 2006) แบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลตนี้จัดอยู่ในกลุ่ม aerobic ถึงแม้จะให้ผลเอนไซม์ cytochromes oxidase เป็นลบก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากการใช้สาร

ทดสอบเอนไซม์ oxidase มีความจำเพาะต่อ cytochrome c oxidase เท่านั้น ทั้งนี้ในแบคทีเรียมี cytochromes oxidase หลายชนิดนอกเหนือจาก cytochrome c oxidase (MEYER and JONES, 1973) ดังนั้นแม้ผลการทดสอบเอนไซม์ cytochromes oxidase เป็นลบ จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียเป็นกลุ่ม anaerobic

**ตารางที่ 4.3** สมบัติทางชีวเคมีของเซลล์แบคทีเรียที่แยกได้

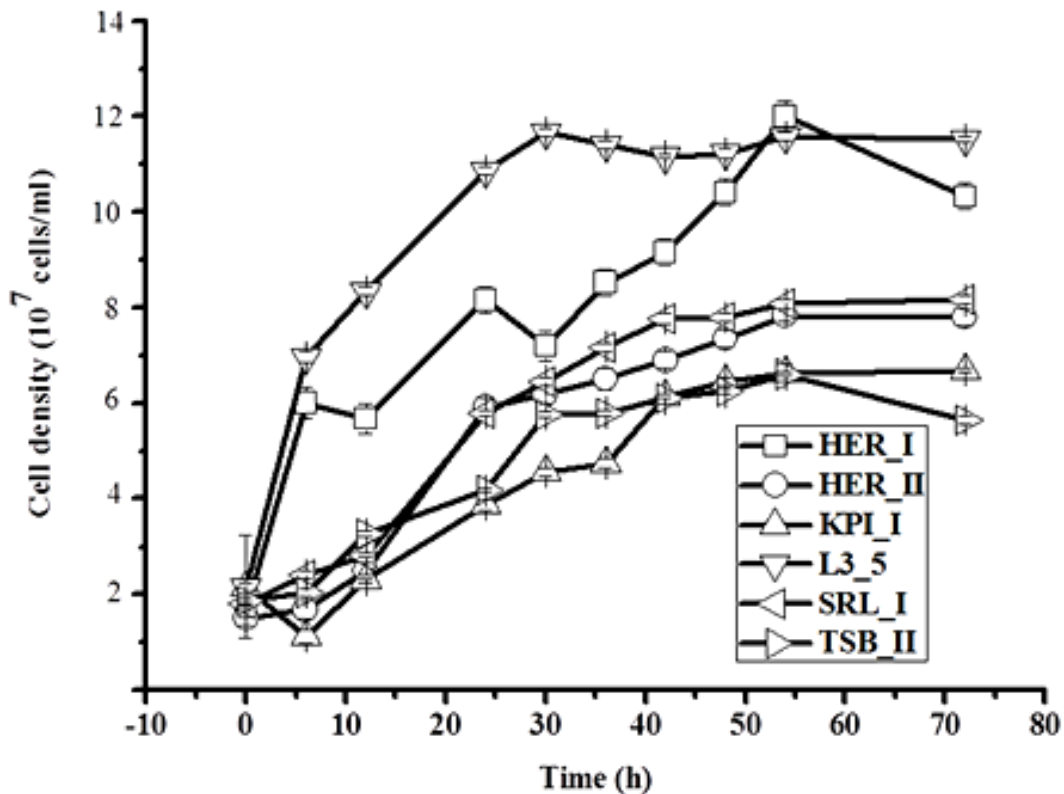
Biochemical Tests	แบคทีเรียไฮโซเลต												
	HER 1	HER 2	KPI 2	L 3-5	SRL 1	TSB 2	UDD 1	UDD 2	BKL 1	SKN 1	SKN 2	SKN 3-1	SKN 3-4
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Bata-galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lysine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate utilization	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea hydrolysis	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinase	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-
Glucose F/O	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
Mannital F/O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inosital F/O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbital F/O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose F/O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose F/O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arnygdalin F/O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose F/O	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose F/O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: “+” คือทำปฏิกิริยากับสารที่ทดสอบได้ และ “-” คือไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ทดสอบ

#### 4.1.5 การเจริญของแบคทีเรีย

เมื่อศึกษาการเจริญของแบคทีเรียไฮโซเลต HER\_I HER\_II KPI\_I L3\_5 SRL1 และ TSB2 (ภาพที่ 4.3) พบว่าระยะเวลาการเพิ่มจำนวน (doubling time) ของแบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 18.1 20.9 27.8 12.2

19.9 และ 22.0 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้นจึงจัดเป็นแบคทีเรียที่เจริญช้า สอดคล้องกับสมบัติทั่วไปของแมกนีติกแบคทีเรียที่มีรายงานว่า เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีการเจริญยาก (fastidious bacteria) เพราะต้องการสารอาหารสูตรเฉพาะต่อการเจริญ (Bazylnski and Schübbe, 2007) แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติยังไม่สามารถเลี้ยงต่อได้ อาจเนื่องมาจากสภาวะการเลี้ยงไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ซึ่งการทดลองนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสังเคราะห์แมกนีโตโซมของแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งน้ำปนเปื้อนเหล็กเป็นหลัก



ภาพที่ 4.3 การเจริญของแบคทีเรียไอโซเลต HER\_I HER\_II KPI\_I L3\_5 SRL1 และ TSB2

#### 4.2 ผลการจำแนกหมวดหมู่ของแบคทีเรียด้วยลำดับสารพันธุกรรม 16S rRNA

จากการจำแนกหมวดหมู่ของแบคทีเรียไอโซเลต HER\_I HER\_II KPI\_I L3\_5 SRL1 และ TSB2 โดยอาศัยลำดับเบสของ 16S rRNA เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยโปรแกรม Blastn ภายใต้อาณัติข้อมูล NCBI และใช้โปรแกรม ClustalW multiple alignment ใน BioEdit เพื่อจัดกลุ่มแบคทีเรียในแผนภูมิวิวัฒนาการ ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบส (sequence identity %) ของแบคทีเรียที่แยกได้กับแมกนีติกแบคทีเรียและแบคทีเรียชนิดอื่นในฐานข้อมูล มีค่าอยู่ในช่วง 81–97 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มหลักคือ

##### 4.2.1 Gammaproteobacteria ได้แก่

1). แบคทีเรียไอโซเลต HER\_I มีลำดับเบสเหมือนกับ *Acinetobacter* sp. 151 เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับ unculture gammaproteobacteria คือ *Acinetobacter* sp. clone MRT-87 (accession number EF371492.1) เท่ากับ 94 เปอร์เซ็นต์

2). แบคทีเรียไอโซเลต L3\_5 มีลำดับเบสเหมือนกับเหมือนกับ *Acinetobacter* sp. 159 เท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับ unculture gammaproteobacteria คือ *Acinetobacter* sp. clone MRT-87 (accession number EF371492.1) เท่ากับ 90.0 เปอร์เซ็นต์

3). แบคทีเรียไอโซเลต KPI\_I มีลำดับเบสเหมือนกับเหมือนกับ *Pseudomonas* sp. เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับ unculture gammaproteobacteria คือ *Acinetobacter* sp. clone MRT-87 (accession number EF371492.1) เท่ากับ 87.0 เปอร์เซ็นต์

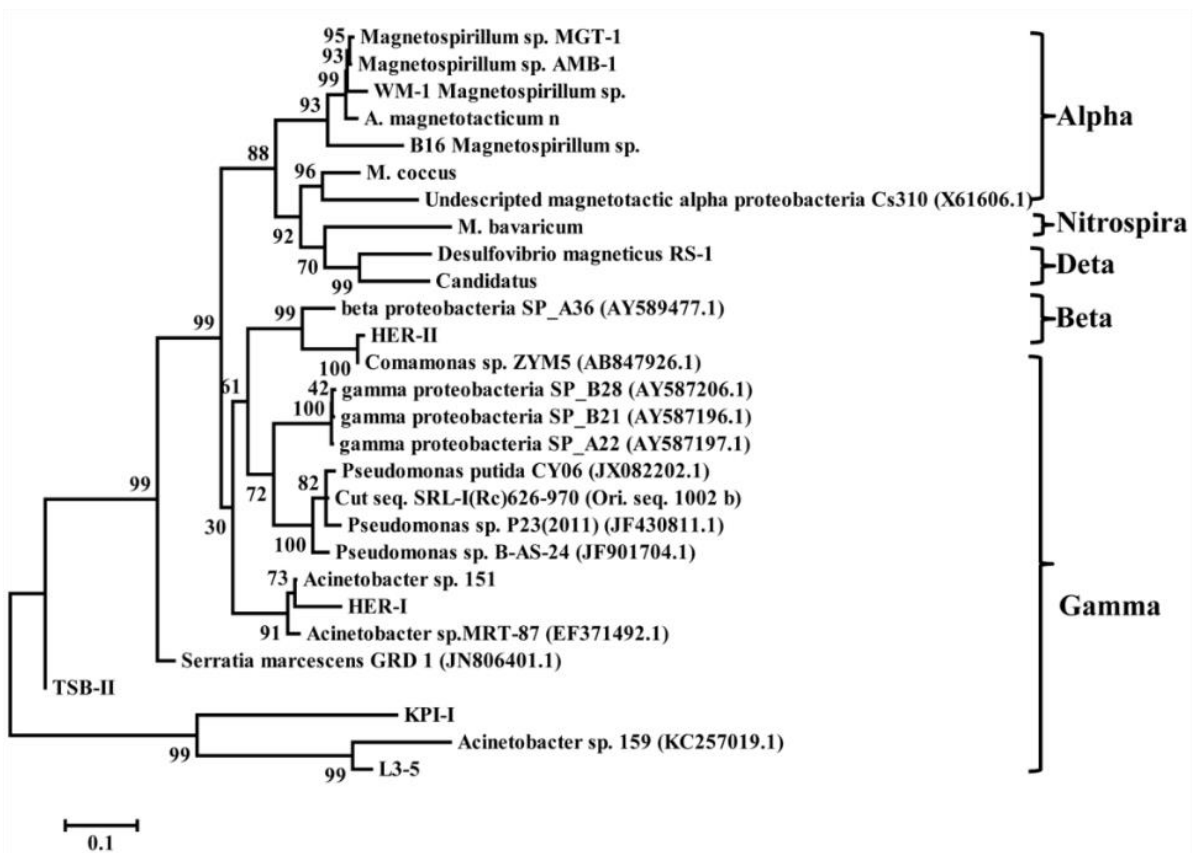
4). แบคทีเรียไอโซเลต TSB2 มีลำดับเบสเหมือนกับเหมือนกับ *Serratia* sp. เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับ unculture gammaproteobacteria คือ *Acinetobacter* sp. clone MRT-87 (accession number EF371492.1) เท่ากับ 81.0 เปอร์เซ็นต์

5) แบคทีเรียไอโซเลต SRL1 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ *Pseudomonas* sp. เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับ unculture gammaproteobacteria คือ clone SP\_B28 (AY587206.1) เท่ากับ 81.0 เปอร์เซ็นต์

4.2.2 Betaproteobacteria ได้แก่ แบคทีเรียไอโซเลต HER\_II มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ *Comamonas* sp. เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ และ เหมือนกับ uncultured betaproteobacteria คือ clone SP\_A36 (AY589477.1) เท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี maximum likelihood โดยโมเดล Kimura 2-parameter โปรแกรม MEGA version 6.06 (Kimura, 1980; Tamura et al., 2013) และกำหนดการสุ่มข้อมูล (bootstrap) จำนวน 1,000 ครั้ง พบว่า *Acinetobacter* sp. HER\_I *Acinetobacter* sp. L3\_5 *Pseudomonas* sp. KPI\_I *Serratia* sp. TSB2 และ *Pseudomonas* sp. SRL1 มีความสัมพันธ์กับลำดับชั้น Gamma proteobacteria ในขณะที่ *Comamonas* sp. HER\_II มีความสัมพันธ์กับลำดับชั้น Betaproteobacteria ดังแสดงในภาพที่ 4.4 จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า แมกนีติกแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่บางสายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับแมกนีติกแบคทีเรียต่ำกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เช่น HSMV-1 ในลำดับชั้น Nitrospirae (Bazyliński and Lefèvre, 2013) และแบคทีเรีย MMP ที่แยกจากทะเล Yellow Sea มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ *Candidatus Magnetomorum litorale* (EU717681) เพียง 88 เปอร์เซ็นต์ (Lin et al., 2012) อย่างไรก็ตาม แม้แบคทีเรียที่แยกได้จะมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับแมกนีติกแบคทีเรียสูง ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นสายพันธุ์เดียวกัน ดังรายงานของ Zhu และคณะ (2010) พบว่าแบคทีเรียรูปทรงเกลียวสายพันธุ์ AMB-1 ที่แยกได้จากบ่อน้ำในประเทศญี่ปุ่นมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับแบคทีเรียรูปทรงเกลียวสายพันธุ์ MW-1 ที่แยกได้จากน้ำจืดในประเทศจีนถึง 97.7 เปอร์เซ็นต์ (Zhu et al., 2010) ดังนั้นในการศึกษาจึงจำเป็นต้องอาศัยสมบัติอื่น ๆ ร่วมในการพิจารณาการจำแนก

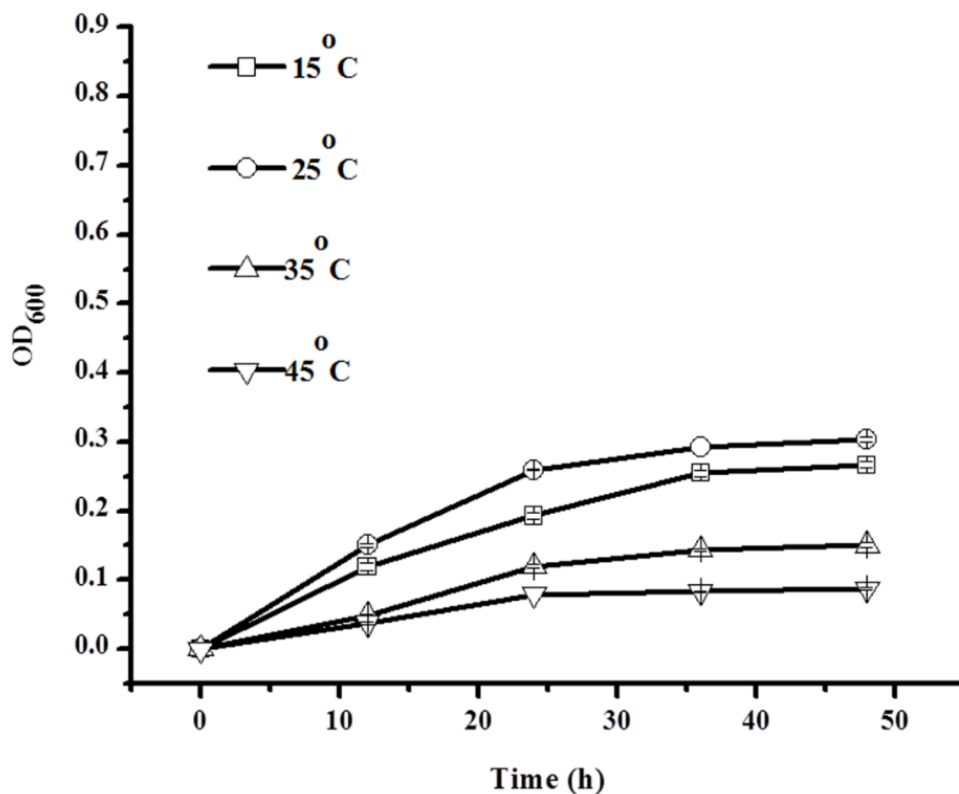
หมวดหมู่ของแบคทีเรีย จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ระบุว่าแมกนีติกแบคทีเรียส่วนใหญ่จัดอยู่ในลำดับชั้น *Alphaproteobacteria* (Bazylnski and Frankel, 2004) และพบบางส่วนในลำดับชั้น delta และ gamma ในไฟลัม *Proteobacteria* ไฟลัม *Nitrospirae* และชั้นไฟลัม *Planctomycetes-Verruconicrobia-Chlamydiae* (PVC) (Bazylnski and Lefèvre, 2013) ซึ่งในงานวิจัยนี้แบคทีเรียที่แยกได้ 6 ไอโซเลท จัดอยู่ในลำดับชั้น *Betaproteobacteria* และ *Gammaproteobacteria* ดังภาพที่ 4.4 จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อย สำหรับในขั้นต่อไปเป็นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสังเคราะห์แมกนีโตโซมของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I ทั้งนี้เพื่อความเป็นไปได้ของการเลี้ยงแมกนีติกแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เพื่อใช้ประโยชน์ในอนาคต



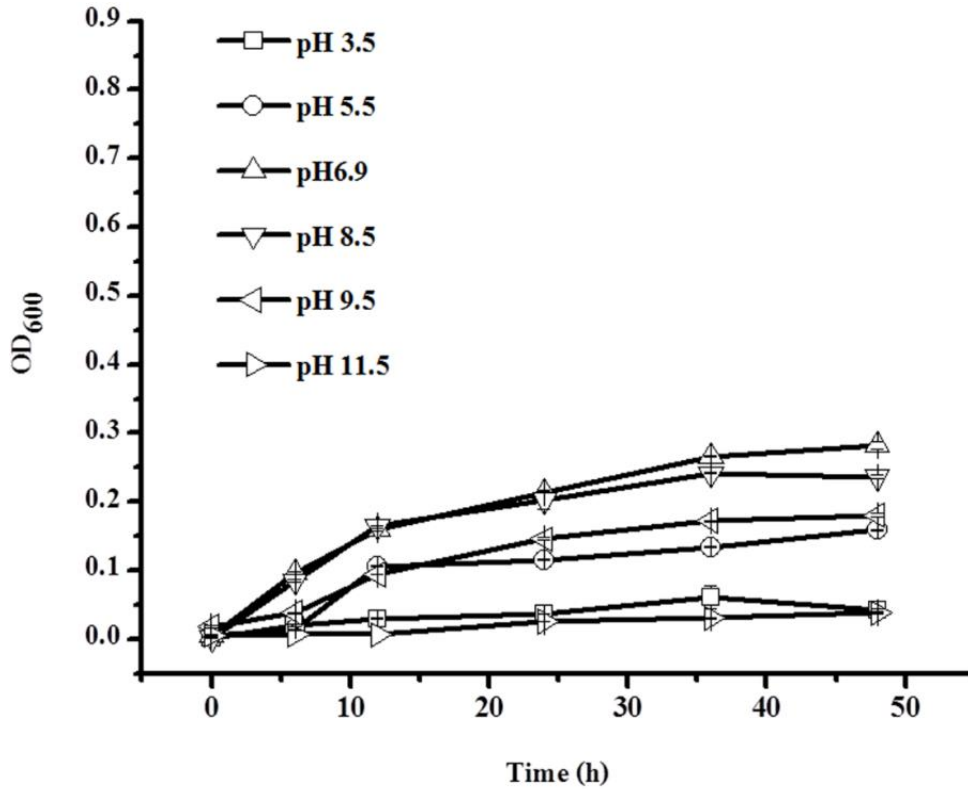
ภาพที่ 4.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I แบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. L3\_5 แบคทีเรีย *Commamonas* sp. HER\_II แบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. KPI\_I แบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. SRL1 และแบคทีเรีย *Serratia* sp. TSB2 ด้วยโปรแกรม MEGA 6.06

### 4.3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_1 ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช แหล่งคาร์บอน และความเข้มข้นของเหล็กอ็อกไซด์ จากการศึกษาดังกล่าวพบว่ามีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Acinetobacter* sp. HER\_1 คือ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.5) และพีเอช 6.9 (ภาพที่ 4.6) ขณะที่สภาพที่มีความเป็นกรดหรือเบสสูงจะทำให้ลดการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_1 จัดอยู่ในกลุ่ม mesophilic ซึ่งสอดคล้องกับ *Desulfovibriomagneticus* *Magnetococcusmarinus* *Magnetospirillum* sp. *Magnetospirathiophila* และ *Magnetovibrioblakemorei* และแมกนีติกแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่มีการรายงาน ซึ่งพบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียจัดอยู่ในกลุ่ม neutral pH (Bazylnski and Lefèvre, 2013)



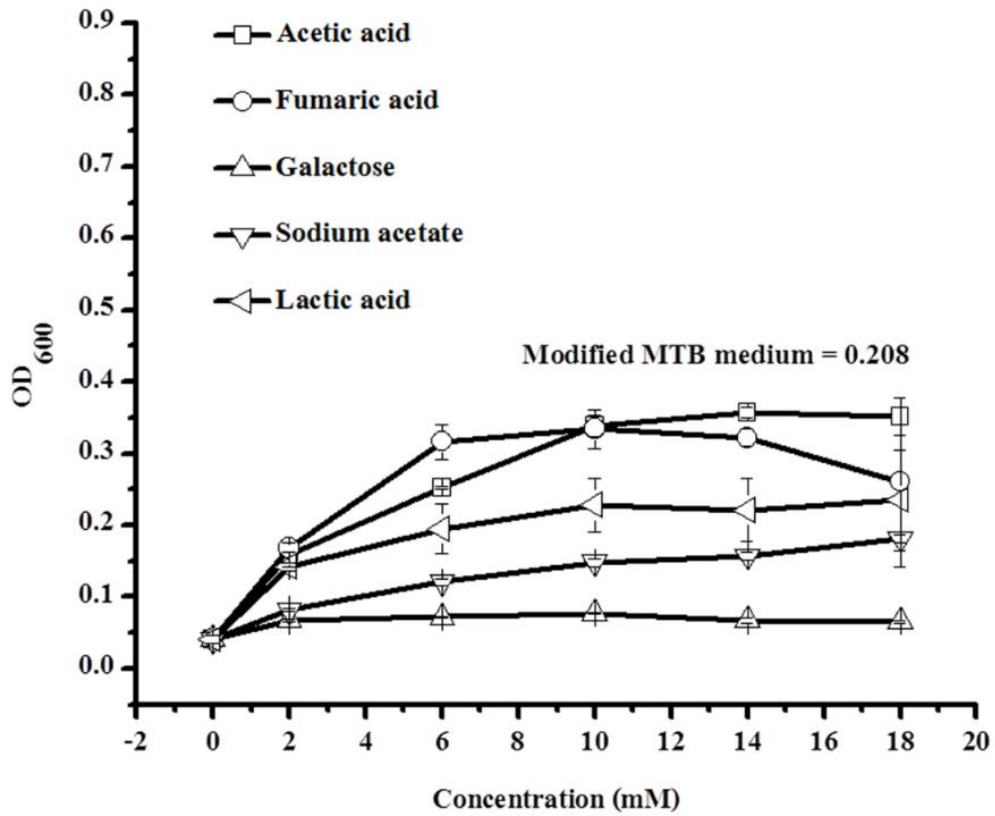
ภาพที่ 4.5 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_1 ในอาหาร Modified MTB พีเอช 6.9 ที่อุณหภูมิต่างๆ



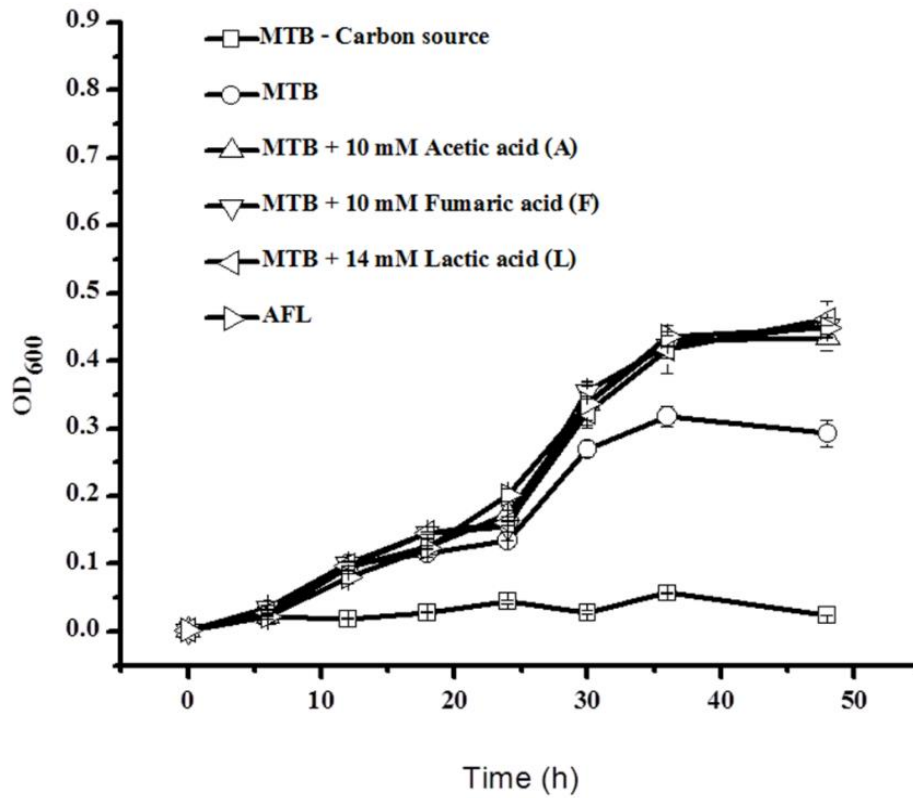
ภาพที่ 4.6 ผลของพีเอชต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I ในอาหาร Modified MTB ที่พีเอชต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I สามารถเจริญได้ดีในกรดอินทรีย์ 2 ชนิด คือกรดอะซิติกและกรดฟูมาริก โดยให้ค่า OD<sub>600</sub> สูงสุดที่ 24 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4.7 จากนั้นศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดอะซิติกและฟูมาริกในอาหาร Modified MTB medium พบว่าที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ของกรดอะซิติกและฟูมาริกทำให้ HER\_I มีการเจริญเพิ่มขึ้นและสูงกว่าในอาหาร Modified MTB สูตรปกติถึง 1.5 เท่า (ภาพที่ 4.8) แต่เนื่องจากกรดอะซิติกเป็นสารที่มีราคาถูกลงและหาง่าย จึงเลือกเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการศึกษาความเข้มข้นของอออนของเหล็กต่อไป

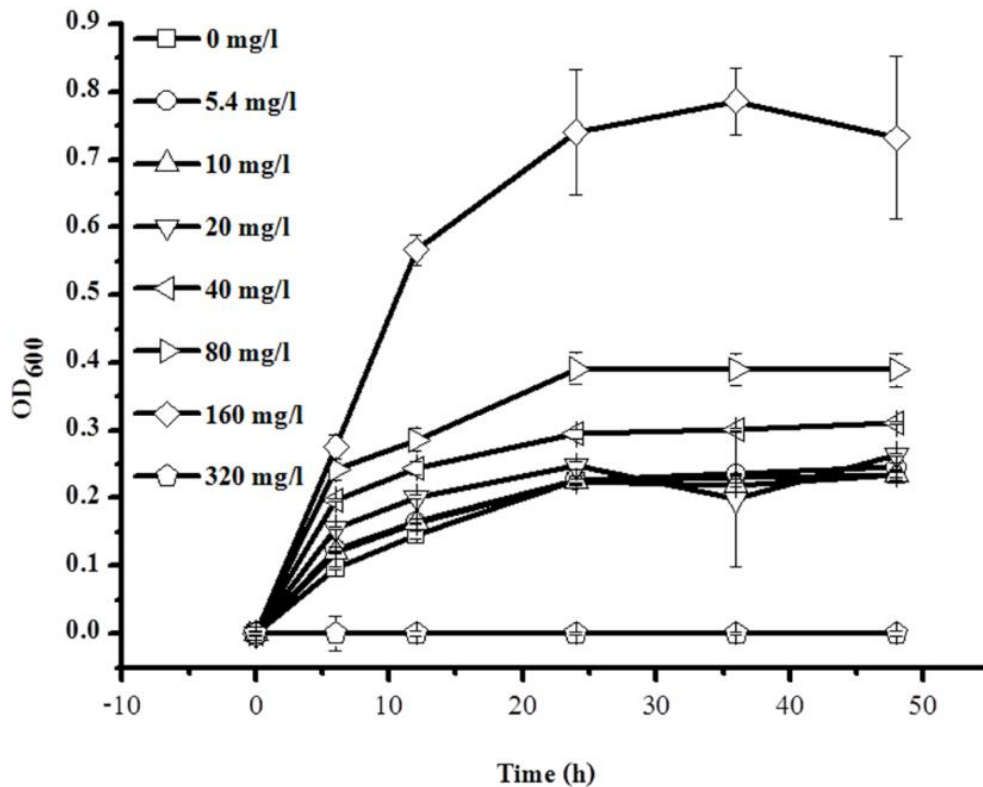
ผลการศึกษาความเข้มข้นของอออนของเหล็กแสดงในภาพที่ 4.9 พบว่าแบคทีเรีย HER\_I สามารถเจริญได้สูงสุดที่ความเข้มข้นของอออนของเหล็กเท่ากับ 160 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ 80 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้น 5.4 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าการเจริญแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่เนื่องจากที่ความเข้มข้นมากกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป พบการตกตะกอนของเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเนื่องจากความเข้มข้นของอออนของเหล็กที่ 5.4 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลต่อการเจริญใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกอออนของเหล็กที่ความเข้มข้น 5.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นค่าความเข้มข้นของอออนของเหล็กที่เหมาะสมในอาหาร



ภาพที่ 4.7 ผลของแหล่งอาหารคาร์บอนที่ความเข้มข้น 0 2 6 10 14 และ 18 มิลลิโมลาร์ ต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_1 ในอาหาร Modified MTB ที่ขาดแหล่งคาร์บอน พีเอช 6.9 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.8 ผลของแหล่งคาร์บอนจากกรดอินทรีย์ Acetic acid (A), Fumaric acid (F) และ Lactic acid (L) ความเข้มข้น 0 10 และ 14 มิลลิโมลาร์ ในอาหาร Modified MTB และ Cocktail ของกรดอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ในอาหาร Modified MTB พีเอช 6.9 ที่ขาดแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

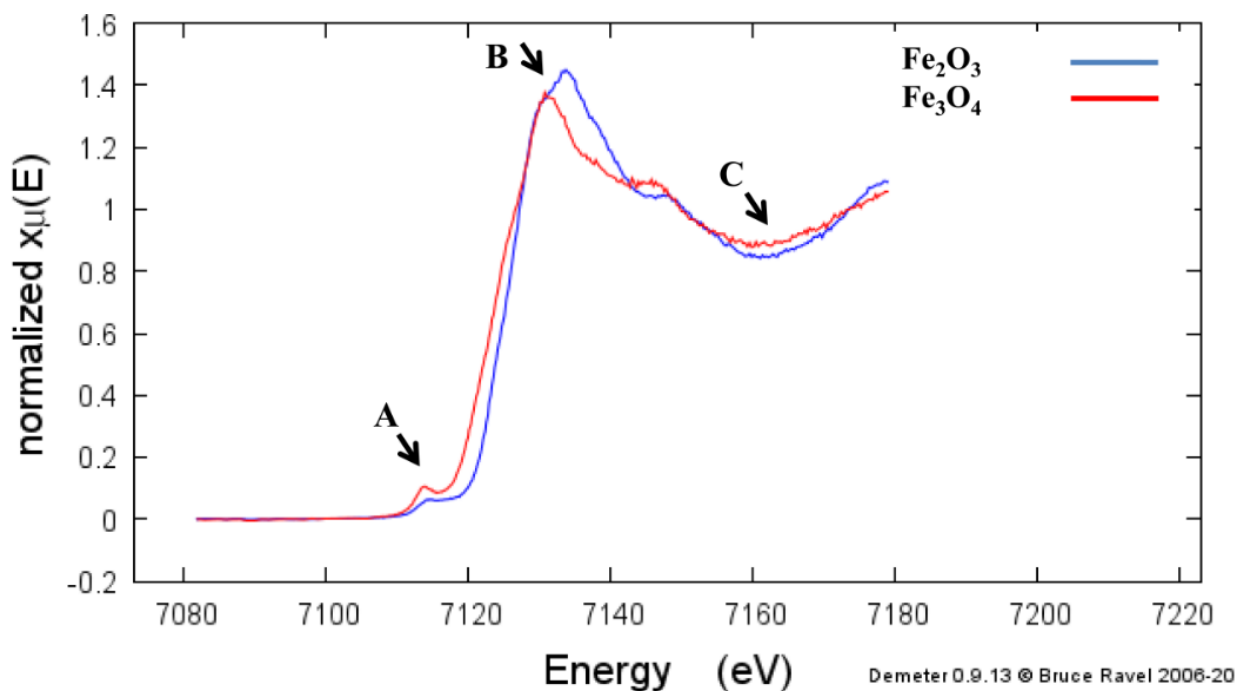


ภาพที่ 4.9 ผลของความเข้มข้นของไอออนของเหล็ก ที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I ที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

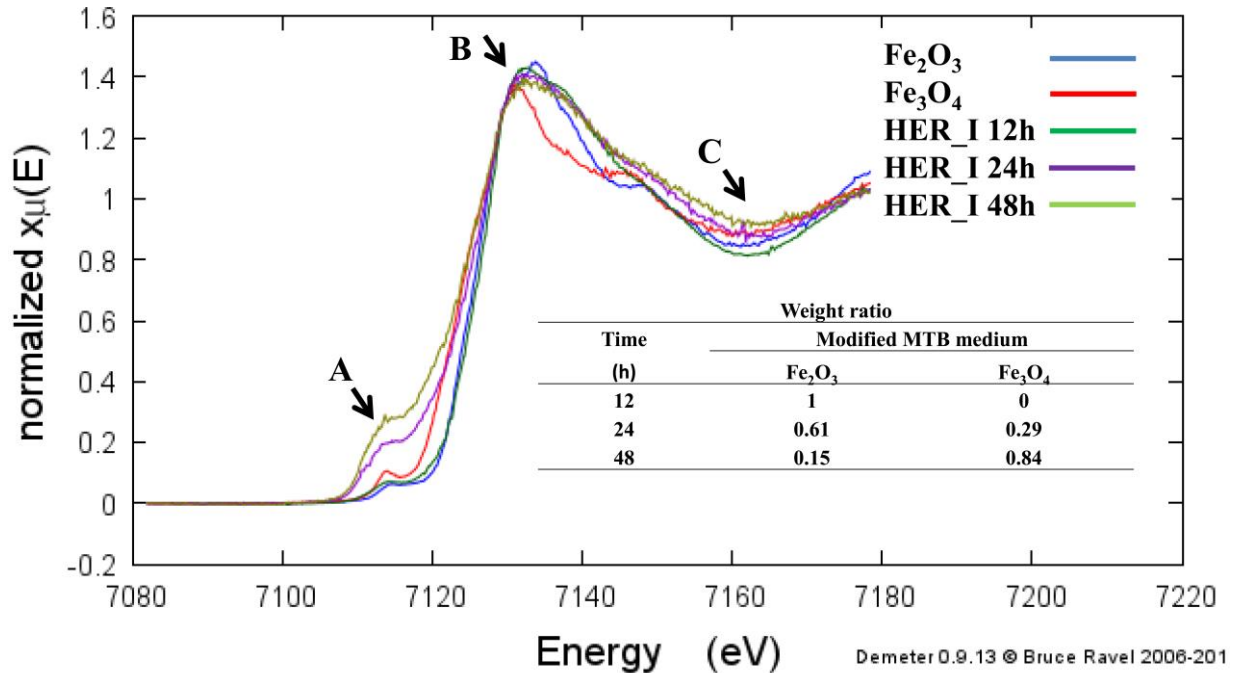
#### 4.4 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็ก

เพื่อให้เข้าใจผลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กในระยะเวลาที่แตกต่างกันของแบคทีเรียในกลุ่ม *Acinetobacter* sp. HER\_I โดยการทดลองนี้ได้เลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวในอาหาร Modified MTB ที่มีกรดแอสซิดิกความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอนเพิ่มเติม แบคทีเรียที่เจริญในระยะเวลาแตกต่างกันสามระยะได้แก่ ระยะพัก (lag phase; 0–12 ชั่วโมง) ระยะเพิ่มจำนวนทวีคูณ (mid log phase; 24 ชั่วโมง) และระยะคงจำนวนเซลล์ (stationary phase; 48 ชั่วโมง) ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารประกอบออกไซด์ของเหล็กโดยอาศัยหลักความจำเพาะของการดูดซับพลังงานในชั้น K ชั้น L2 และชั้น L3 ที่แตกต่างกัน ภายใต้โหมดฟลูออเรสเซนซ์ของเทคนิค x-ray absorption near edge structure (XANES) โดยสถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน องค์กรมหาชน (synchrotron light research institute public organization, Thailand) ซึ่งมีการกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังนี้  $E_0=7125.470$ ,  $E_{\text{shift}}=0.000$ ,  $R_{\text{bkg}}=1.000$ ,  $K_{\text{weight}}=2.0$  และ  $\text{Edge step}=0.003$ . จากนั้นศึกษาอัตราส่วนออกไซด์ของเหล็กในรูป  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  และ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  จากสเปกตรัมที่ได้ด้วยการทำ linear combination fit โดยใช้โปรแกรม Athena version 0.8.54 โดยเทียบกับสารมาตรฐาน  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (III) and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (II, III) (ภาพที่ 4.10) จากการวิเคราะห์พบว่า

แบคทีเรียในกลุ่ม *Acinetobacter* sp. HER\_I สามารถผลิตออกไซด์ของเหล็กในรูป  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  และ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  โดยเริ่มตั้งแต่ระยะพักถึงระยะคงจำนวนเซลล์ อัตราส่วนของ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ต่อ  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  เพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 0.84 ขณะที่  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  มีแนวโน้มลดลงจาก 1 ถึง 0.15 (ภาพที่ 4.11) จากผลการทดลองสรุปได้ว่าการสะสมของสารแม่เหล็กมีผลต่อการสังเคราะห์  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ซึ่งสอดคล้องกับกลไกการสังเคราะห์แมกนีไทท์ใน *Magnetospirillum magneticum* สายพันธุ์ AMB\_1 (Li et al., 2009) ที่จะไม่พบแมกนีไทท์ในระยะพัก (0–20 ชั่วโมง) แต่จะเริ่มพบในระยะเพิ่มจำนวนทวีคูณ (20–48 ชั่วโมง) และระยะคงจำนวนเซลล์ (52–96 ชั่วโมง) อย่างไรก็ตามในทางตรงกันข้ามสภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์แมกนีไทท์ของ *Acidithiobacillus ferrooxidans* เป็นเพียงแค่งลไกในการสะสมเหล็ก ซึ่งไม่มีผลส่งเสริมการเจริญของเซลล์ (S. Zhang et al., 2012)

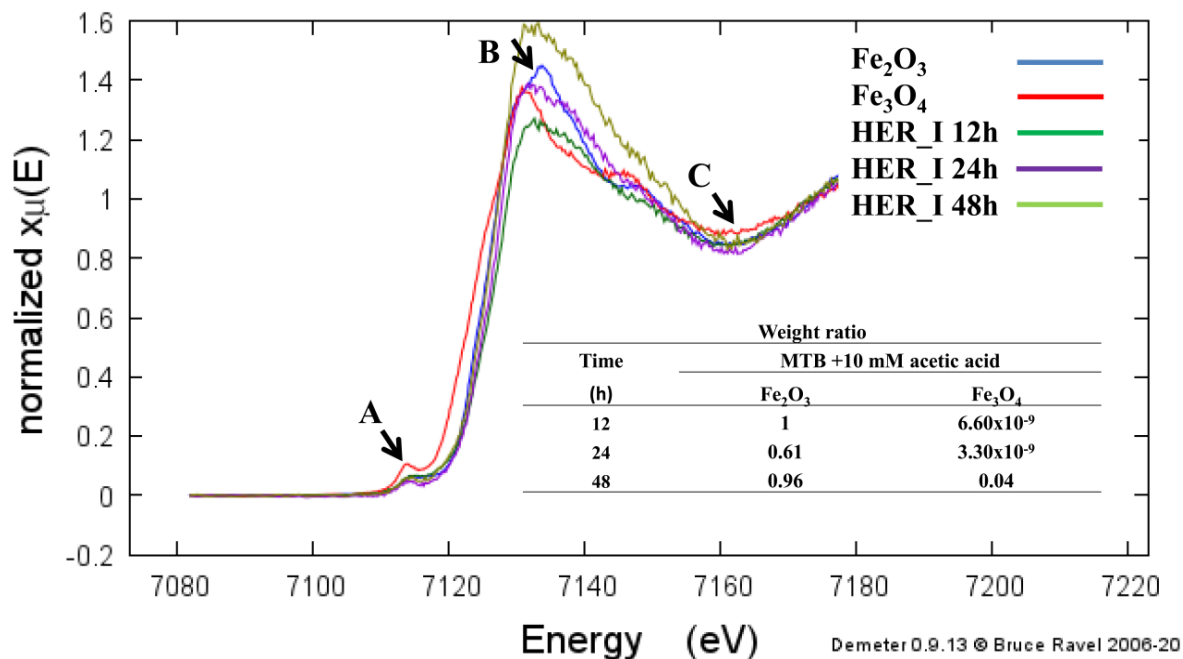


**ภาพที่ 4.10** สเปกตรัมของสารเปรียบเทียบมาตรฐาน  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  และ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  จากเทคนิค XANES มีรูปแบบที่คล้ายกันเนื่องจากแต่ละฟอร์มมีสูตรโครงสร้างเหมือนกัน แต่สามารถแยกความต่างจากกันที่จุด (A) ไหล่พลังงาน (shoulder intensity)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  แสดงลักษณะพีคที่ชัดเจนและความเข้มของพลังงานสูงกว่า  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , (B) พีคหลัก (main peak) ตำแหน่งพลังงาน  $\text{Fe}_2\text{O}_3=7133.70$  eV แตกต่างและมีความเข้มของพลังงานสูงกว่า  $\text{Fe}_3\text{O}_4=7130.84$  eV และ (C) ตำแหน่งหาง (Tail) ที่ต้องพิคแสดงตำแหน่งพลังงาน และความเข้มของพลังงานต่างกันระหว่าง  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  และ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  คือ 7114.3 และ 7113.5 eV, ตามลำดับ และ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  มีความเข้มของพลังงานสูงกว่า



ภาพที่ 4.11 สเปกตรัมออกไซด์ของเหล็ก จาก *Acinetobacter* sp. HER\_I ที่เลี้ยงในอาหาร Modified MTB จากเทคนิค XANES เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  และ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ที่ ลูกศร (A) แสดงไหล่พลังงานของแบคทีเรียเลี้ยงที่ 12 24 และ 48 ชั่วโมง มีแนวโน้มมีค่าความเข้มของพลังงานเพิ่มขึ้นตามลำดับ สอดคล้องกับพีคของ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ลูกศร (B) แสดงพีคหลักของตัวอย่างทั้ง 3 อยู่ระหว่างช่วงตำแหน่งพลังงานของ  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  และ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ระบุได้ว่าพบสารประกอบออกไซด์ทั้ง 2 ฟอรัมในตัวอย่าง และลูกศร (C) แสดงตำแหน่งพลังงานและรูปแบบของสเปกตรัมคล้ายสารมาตรฐาน โดยความเข้มของพลังงานมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นซึ่งโน้มเอียงไปทางสารมาตรฐาน  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

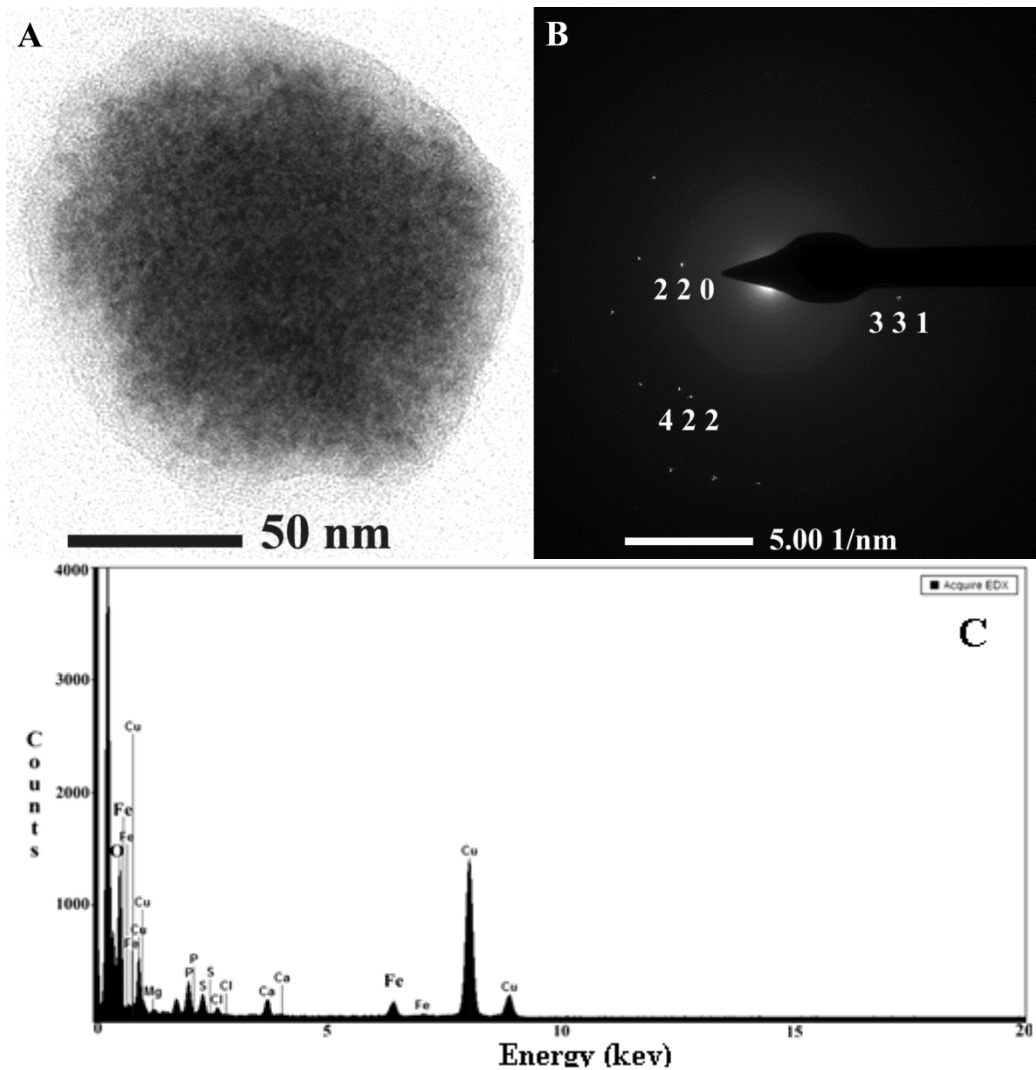
ในทางตรงกันข้ามเมื่อเลี้ยง HER\_I ในอาหาร Modified MTB ที่เติมกรดแอสซิติคความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งแม้จะส่งเสริมการเจริญให้มากกว่าอาหารสูตรปกติถึง 1.5 เท่า แต่การสังเคราะห์  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ลดลงขณะที่การสังเคราะห์  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  เพิ่มขึ้นแทน จากผลการทดลองดังกล่าวอาจกล่าวได้ว่ากรดแอสซิติคอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารเมแทบอลิโทในเซลล์แบคทีเรียที่ส่งผลให้การสังเคราะห์  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ลดลง ขณะที่ส่งเสริมการผลิต  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4.12)



ภาพที่ 4.12 สเปกตรัมของออกไซด์ของเหล็กจาก *Acinetobacter* sp. HER\_I ที่เลี้ยงในอาหาร Modified MTB ที่เติมกรดแอสติก 10 มิลลิโมลาร์ จากการศึกษาด้วยเทคนิค XANES เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> และ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> โดยสเปกตรัมที่ตำแหน่ง (A) (B) และ (C) ของตัวอย่างทั้ง 3 มีรูปแบบและแนวโน้มของความเข้มของพลังงานคล้ายคลึงกับ Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

#### 4.5 สมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนแม่เหล็กภายในเซลล์แบคทีเรีย

จากการศึกษาโครงสร้างผลึกในแมกนีโตโซมที่อยู่ภายในเซลล์แบคทีเรียด้วยเทคนิค TEM-SAED พบว่าค่า d-spacing ที่คำนวณได้เท่ากับ 3.00 1.95 และ 1.72 (ภาพที่ 4.13) เมื่อแปรผลตามการตีมาตรฐาน JCPDS เบอร์ 89-0951 (Wong-Ng et al., 2001) พบว่าตรงกับระนาบ 2 2 0 ระนาบ 3 3 1 และระนาบ 4 2 2 ของผลึก Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ตามลำดับ และเมื่อศึกษาองค์ประกอบแร่ธาตุด้วยเทคนิค TEM-EDX พบว่าโครงสร้างดังกล่าวประกอบด้วยธาตุออกซิเจน (O) เหล็ก (Fe) คาร์บอน (C) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) แมกนีเซียม (Mg) ซัลเฟอร์ (S) คลอไรด์ (Cl) และแคลเซียม (Ca) ซึ่งการพบธาตุเหล็กและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบภายในแมกนีโตโซมแสดงถึงแนวโน้มที่จะพบอนุภาคออกไซด์ของเหล็กภายใน ส่วนธาตุอื่น ๆ ที่พบน่าจะเกิดจากสารอินทรีย์ต่าง ๆ ภายในเซลล์แบคทีเรีย

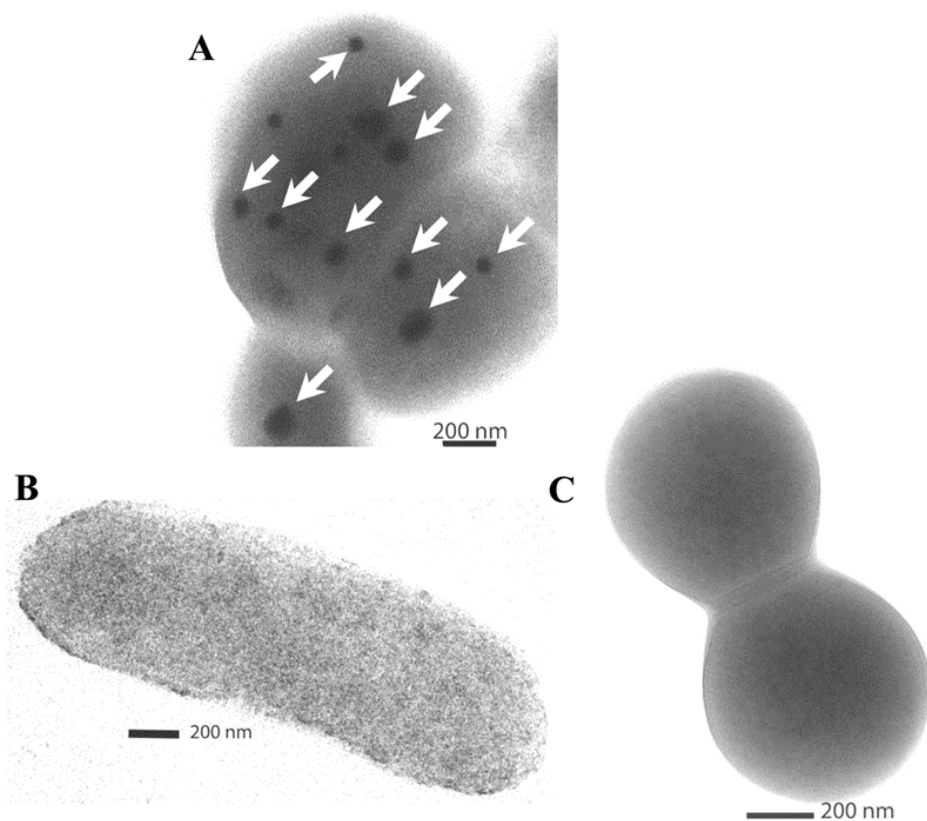


ภาพที่ 4.13 องค์ประกอบแร่ธาตุและโครงสร้างผลึกของออกไซด์ของเหล็กในแมกนีโตโซมของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I เมื่อ A คือ แมกนีโตโซม B คือโครงสร้างผลึกของเหล็กออกไซด์ภายในแมกนีโตโซมวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TEM-SAED และ C คือ แร่ธาตุองค์ประกอบของแมกนีโตโซมวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TEM-EDX

#### 4.6 การแยกอนุภาคนาโนแม่เหล็กจากเซลล์แบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I ด้วยการทำให้เซลล์แตก

แบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I แยกได้จากน้ำทิ้งที่ปนเปื้อนโลหะเหล็กในแหล่งน้ำของเหมืองแร่และโรงงานแปรรูปเหล็กในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย แบคทีเรียไอโซเลตดังกล่าวมีการผลิตถุงแมกนีโตโซโซม ซึ่งเป็นคุณลักษณะหนึ่งของแมกนีติกแบคทีเรีย ในการทดลองนี้ได้นำแบคทีเรียดังกล่าวไปศึกษาลักษณะของแมกนีโตโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ผลการศึกษาแสดงในภาพที่

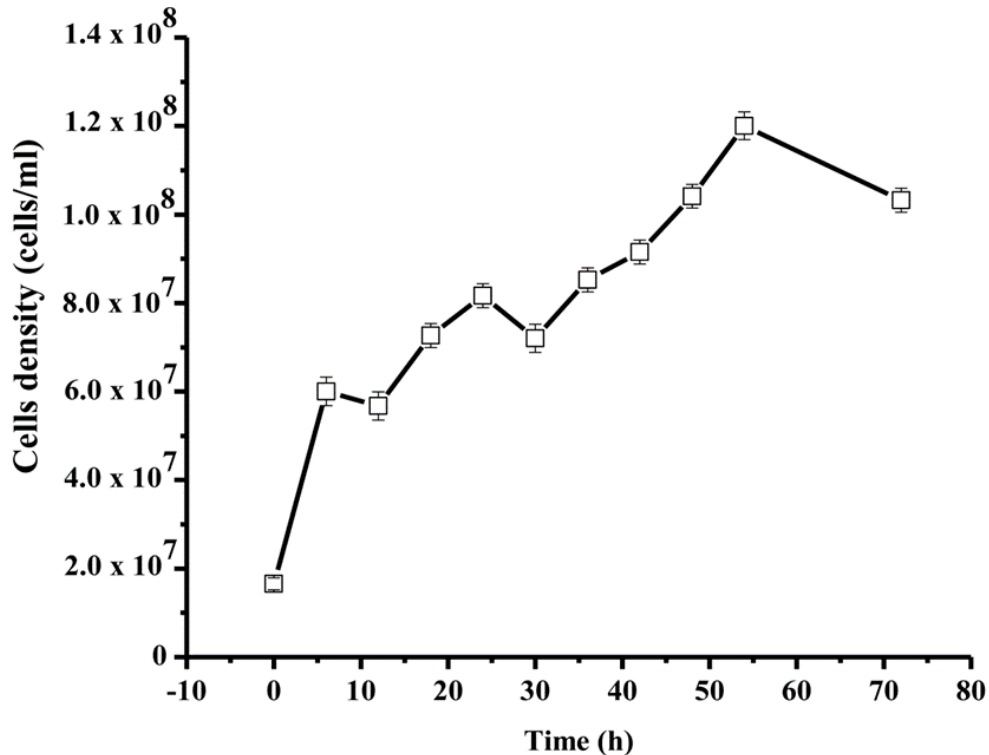
4.14 พบว่าแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. ไอโซเลต HER\_I มีรูปร่างแบบท่อน มีความกว้างเฉลี่ย 0.3 ไมโครเมตร และความยาวเฉลี่ย 0.9 ไมโครเมตร โดยพบถุงแมกนีโตโซมประมาณ 1–8 ถุงภายในเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ที่ไม่สังเกตเห็นถุงแมกนีโตโซมดังกล่าวอยู่ภายในเซลล์ จากการวัดขนาดถุงแมกนีโตโซมภายในเซลล์แบคทีเรียจากภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าถุงแมกนีโตโซมของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I มีขนาดอยู่ในช่วง 33.4–201.2 นาโนเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ  $100.0 \pm 44.1$  นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงใกล้เคียงกับถุงแมกนีโตโซมของแมกนิติกแบคทีเรียที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ ซึ่งมักพบว่ามีความยาวเฉลี่ยประมาณ 50–100 นาโนเมตร (Yang et al., 2001)



**ภาพที่ 4.14** รูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย และลักษณะของถุงแมกนีโตโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน โดยภาพ A คือแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I ภาพ B คือ แบคทีเรีย *E. coli* และภาพ C คือแบคทีเรีย *S. aureus*

สำหรับการเจริญของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I ได้จากการหาสภาวะการเจริญของแบคทีเรียในอาหาร Modified MTB ที่ พีเอช 6.9 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสดังภาพที่ 4.15 ซึ่งมีเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนประชากรจากเดิมเป็น 2 เท่า (doubling time) เท่ากับ 26.7 ชั่วโมง ซึ่งนับว่าเป็นอัตราการเจริญที่

ค่อนข้างช้ามีคล้ายคลึงกับแมกนีติกแบคทีเรียที่มีการศึกษาก่อนในหน้านี้ (Sharma and Balomajumder, 2011)



ภาพที่ 4.15 สถานะการเจริญของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I ที่เลี้ยงในอาหาร Modified MTB ที่พีเอช 6.9 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

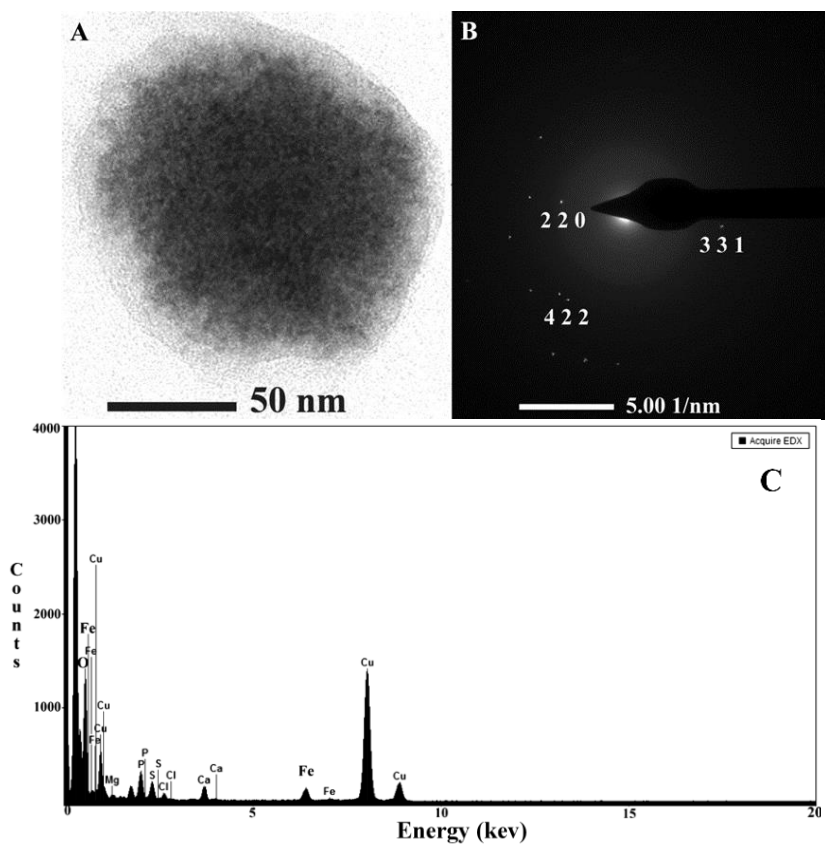
สำหรับการศึกษานอนุภาคนาโนแม่เหล็กโดยการแยกแมกนีโตโซมออกจากเซลล์ โดยการทำให้เซลล์แตกและปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ  $3000 \times g$  เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเศษเซลล์ ก่อนนำส่วนใสตอนบนไปปั่นเหวี่ยงที่  $12000 \times g$  เป็นเวลา 30 นาที เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่ามีความหนาในช่วง 83.7–147.1 นาโนเมตร และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย  $116.0 \pm 15.4$  นาโนเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของแมกนีโตโซมภายในเซลล์ที่วัดจากภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

เมื่อนำอนุภาคที่ได้จากการเผาไปศึกษาโครงสร้างผลึกด้วยเทคนิค TEM-SAED (ตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.16) พบว่ามีค่า  $d$ -spacing เท่ากับ 3.00 1.95 และ 1.72 อังสตรอม เมื่อแปรผลตามการ์ดมาตรฐาน JCPDS เบอร์ 89-0951 (Wong-Ng et al., 2001) พบว่าตรงกับระนาบ 2 2 0 ระนาบ 3 3 1 และระนาบ 4 2 2 ของผลึก  $Fe_3O_4$  (ตารางที่ 4.4) และเมื่อศึกษาองค์ประกอบของธาตุด้วยเทคนิค TEM-EDX (ภาพที่ 4.16) พบว่าโครงสร้างดังกล่าวมีธาตุเหล็กและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งชี้ถึงเอกลักษณ์ของออกไซด์ของเหล็ก ในขณะที่ธาตุอื่นที่ปรากฏคาดว่าป็นธาตุที่เป็นองค์ประกอบของสารอินทรีย์ของเซลล์แบคทีเรียที่เหลืออยู่ จาก

ผลการวิเคราะห์ข้างต้นจึงสรุปได้ว่าแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I สามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็ก และโครงสร้างอนุภาคแม่เหล็กชนิดหนึ่งที่สังเคราะห์ได้คือแมกนีไทท์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย XANES ก่อนหน้า

**ตารางที่ 4.4** ค่า  $d$ -spacing และระนาบของโครงสร้างผลึกออกไซด์ของเหล็กของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I ซึ่งเตรียมได้แมกนีไทท์ที่แยกจากเซลล์แบคทีเรีย โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของ JCPDS หมายเลข 890951

Sample preparation	Bacterial iron oxide		
	crystals	JCPDS No. 890951	
	$d$ [°Å]	$d$ [°Å]	h l k
Extraction	3.00	3.00	2 2 0
	1.95	1.95	3 3 1
	1.72	1.72	4 2 2

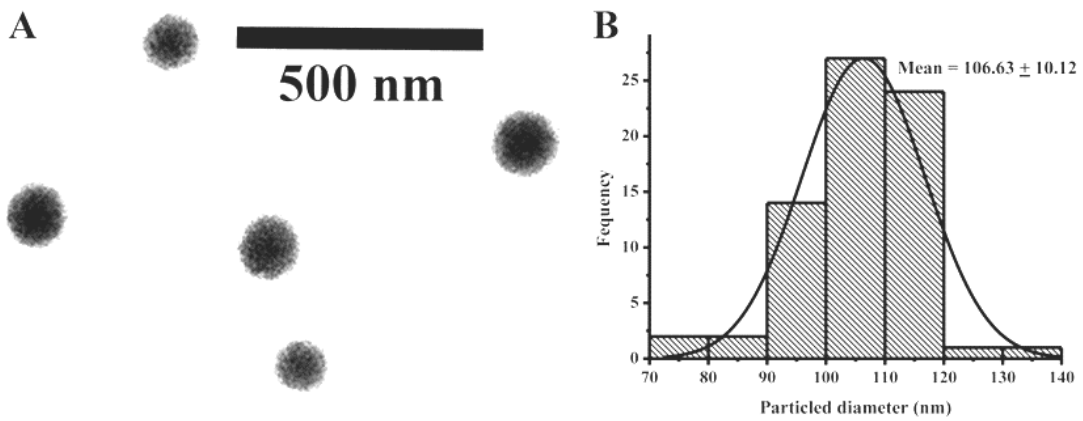


**ภาพที่ 4.16** องค์ประกอบของแร่ธาตุ และลักษณะโครงสร้างผลึกของอนุภาคที่ได้จากการสกัดแมกนีโตโซมจากเซลล์แบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. ไอโซเลต HER\_I โดยภาพ A คือ ภาพ TEM ของแมกนีโตโซมที่สกัดได้ ภาพ B คือผลการวิเคราะห์ด้วย TEM-SAED ของแมกนีโตโซมที่สกัดได้ และภาพ C คือผลการวิเคราะห์ด้วย TEM-EDX ของธาตุที่เป็นส่วนประกอบในแมกนีโตโซม

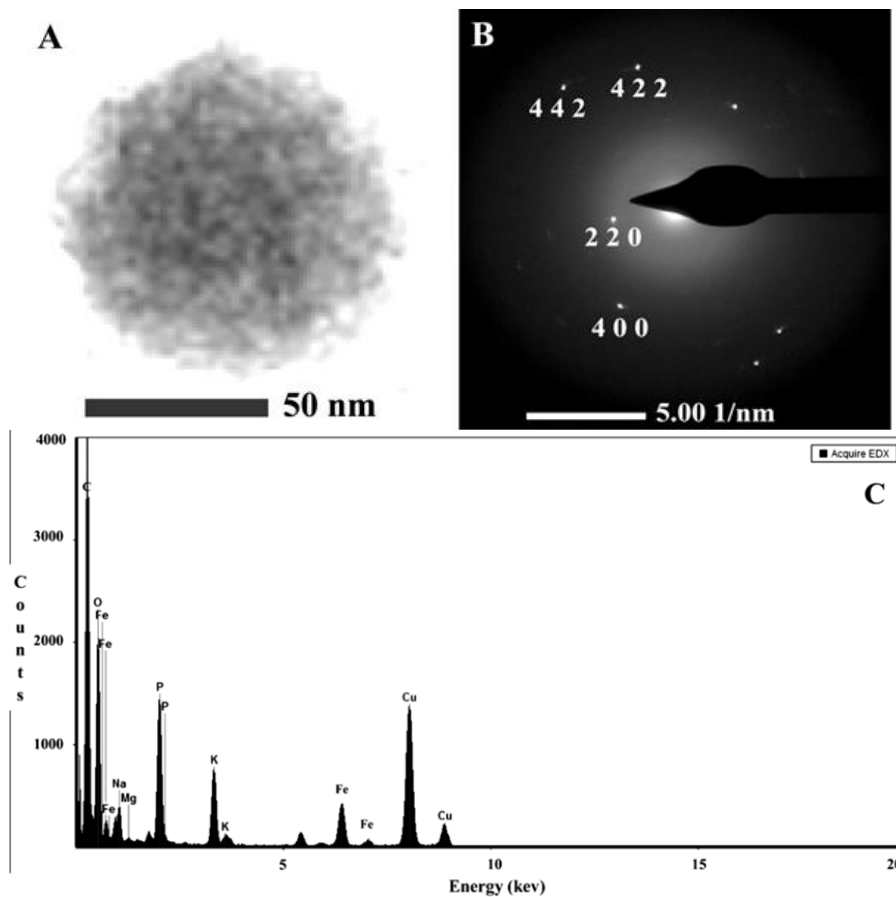
#### 4.7 การแยกอนุภาคนาโนแม่เหล็กโดยการเผาเซลล์แบคทีเรีย

นอกจากนี้ได้ทำการเผาเซลล์แบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I เพื่อแยกอนุภาคนาโนออกมา โดยเผาเซลล์แบคทีเรียดังกล่าว 6.8 กรัม ที่อุณหภูมิสูง 300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และเพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อ 1 นาทีจนกระทั่งถึงอุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ผลจากการศึกษาลักษณะโครงสร้างและการนับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคนาโนที่ได้จากภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าอนุภาคนาโนมีขนาดในช่วง 53.3–144.0 นาโนเมตร และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย  $106.6 \pm 10.1$  นาโนเมตร (ภาพที่ 4.17) ซึ่งขนาดของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก (ตามขนาดของถุงแมกนีโตโซมจากงานวิจัยที่มีการรายงานมาก่อนหน้า) พบว่าอยู่ในช่วงน้อยกว่า 20 นาโนเมตร ถึง 70 นาโนเมตร (Bazylnski and Frankel, 2004; Lins et al., 2006) ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคนาโนใหญ่กว่าที่มีรายงานเล็กน้อย อาจเป็นผลเนื่องมาจากการที่ใช้อุณหภูมิสูงในการเผาทำให้อนุภาคนาโนที่อยู่ในถุงแมกนีโตโซมใกล้เคียงกันอาจเกิดรวมตัวกันทำให้อนุภาคที่ได้มีขนาดใหญ่ขึ้น

เพื่อศึกษาเอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนที่ได้จากการเผาเซลล์แบคทีเรีย ได้ทำการวิเคราะห์อนุภาคนาดังกล่าวด้วยเทคนิค TEM-EDX และ TEM-SAED ซึ่งผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.18 และตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ด้วย TEM-EDX พบว่าอนุภาคที่ได้มีธาตุเหล็กและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบซึ่งแสดงถึงแนวโน้มของการเกิดออกไซด์ของเหล็ก ส่วนแร่ธาตุอื่น ๆ ที่ตรวจพบน่าจะเป็นแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของสารอินทรีย์ต่าง ๆ ในเซลล์แบคทีเรีย สำหรับการวิเคราะห์ด้วย TEM-SAED โดยการคำนวณจากค่า  $d$ -spacing พบว่ามีค่าเท่ากับ 3.00 2.72 1.72 และ 1.41 อังสตรอม ซึ่งสัมพันธ์กับค่าระนาบของผลึกในชั้น  $h\ k\ l$  คือ 2 2 0 4 0 0 4 2 2 และ 4 4 2 ของแมกนีไทท์ ตามลำดับ แสดงว่าอนุภาคนาโนที่ได้เป็นแมกนีไทท์ (Wong-Ng et al., 2001)



ภาพที่ 4.17 ลักษณะทางกายภาพและการกระจายตัวของขนาดของอนุภาคนาโนแมกนีไทต์ที่ได้จากการเผาเซลล์แบคทีเรีย โดยภาพ A คือ ลักษณะทางกายภาพของอนุภาคนาโนของแมกนีไทต์ และภาพ B คือ ขนาดการกระจายตัวของอนุภาคนาโนแมกนีไทต์



ภาพที่ 4.18 ลักษณะทางกายภาพ องค์ประกอบของแร่ธาตุ และโครงสร้างผลึกออกไซด์ของเหล็กของอนุภาคหลังจากการเผาเซลล์แบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I ที่อุณหภูมิสูง โดยภาพ A แสดงลักษณะทาง

กายภาพของอนุภาคเดี่ยวด้วย TEM ภาพ B แสดงผลการวิเคราะห์โครงสร้างผลึกออกไซด์ของเหล็ก ที่อยู่ในอนุภาคซึ่งศึกษาได้จาก TEM-SAED และภาพ C คือการวิเคราะห์ผลจาก TEM-EDX

**ตารางที่ 4.5** ค่า  $d$ -spacing และระนาบของโครงสร้างผลึกออกไซด์ของเหล็กของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I ซึ่งเตรียมได้จากการผาเซลล์แบคทีเรีย โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของ JCPDS หมายเลข 890951

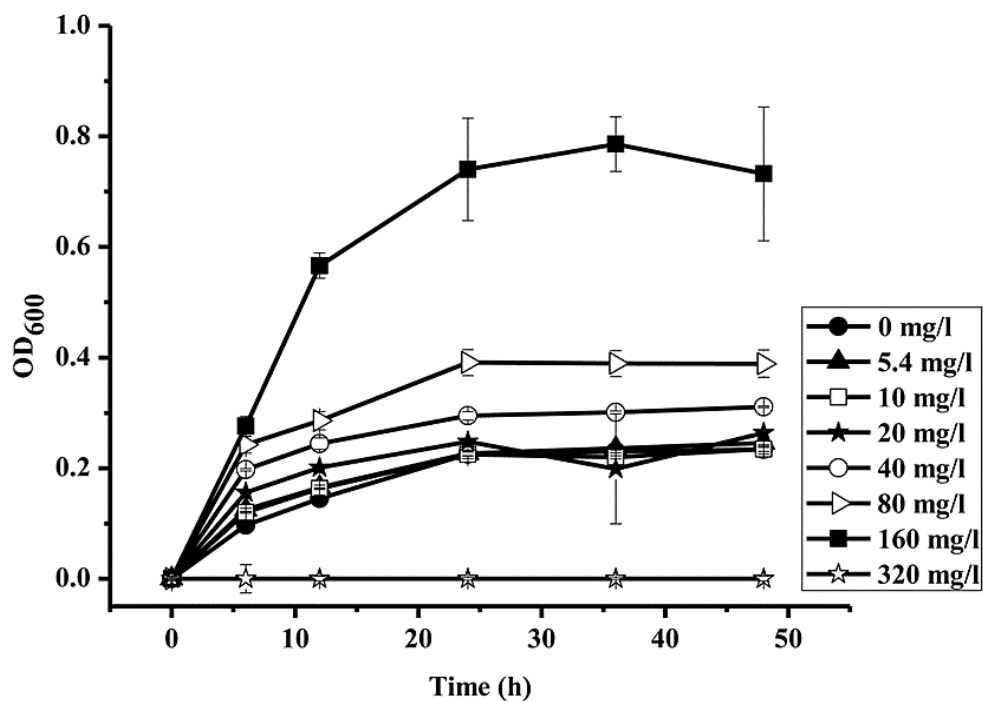
Sample preparation	Bacterial iron oxide		
	crystals	JCPDS No. 890951	
	$d$ [°Å]	$d$ [°Å]	h k l
Calcination	3.00	3.00	2 2 0
	2.12	2.12	4 0 0
	1.72	1.72	4 2 2
	1.41	1.42	4 4 2

#### 4.8 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่ได้

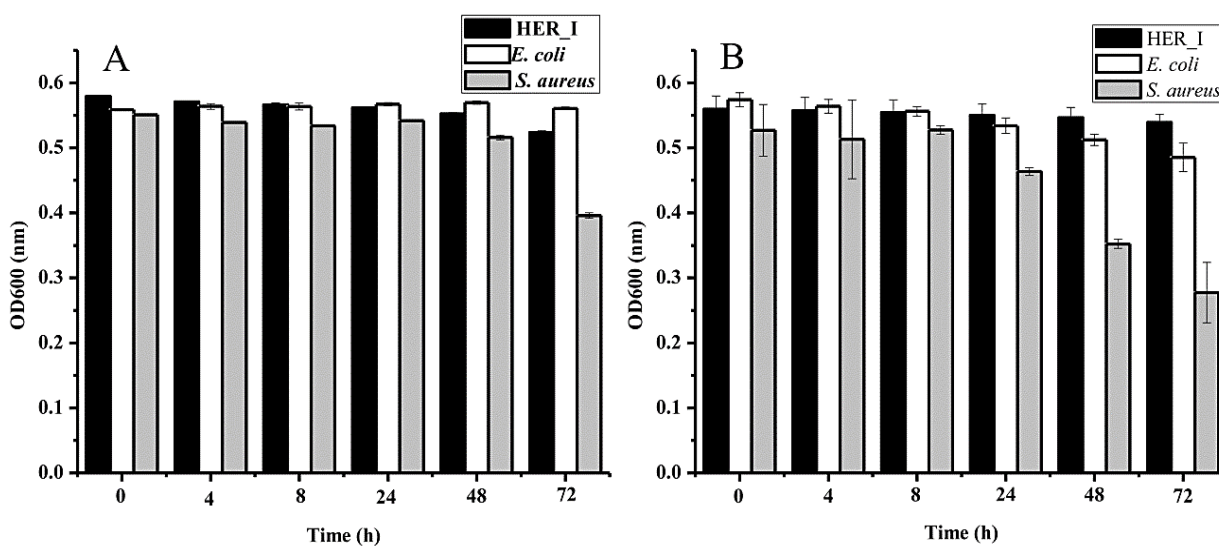
จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กได้ แต่ยังไม่มีการรายงานการศึกษาถึงความทนต่อสภาวะที่มีความเข้มข้นของไอออนของเหล็กสูง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้เลี้ยงแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I ในสารละลายเหล็กที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันดังนี้ 0 5.4 10 20 40 80 160 และ 320 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นศึกษาอัตราการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.19 โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายเหล็ก 5.4–20 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I มีการเจริญอย่างต่อเนื่องและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีสารละลายเหล็ก ในขณะที่ในสภาวะที่มีสารละลายเหล็กความเข้มข้น 40–160 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแบบแปรผันตามความเข้มข้น ซึ่งการเจริญนี้มีสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีสารละลายเหล็ก แต่อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นของสารละลายเหล็กที่ความเข้มข้น 320 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีผลเป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรียและทำให้แบคทีเรียตาย ผลจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I สามารถทนต่อสารละลายเหล็กได้สูงถึง 160 มิลลิกรัมต่อลิตร

นอกจากนี้ได้ทดลองเปรียบเทียบความสามารถของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I กับแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ในการทนต่อสภาวะที่มีสารละลายเหล็กสูงถึง 160 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลาต่อเนื่อง 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.20 พบว่าแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I สามารถทนต่อสภาวะดังกล่าวได้ดีกว่า แบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้ไอออนของเหล็กเป็นธาตุที่สำคัญต่อการขนส่งออกซิเจน

การสร้าง ATP กระตุ้นการเจริญของเซลล์ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการกำจัดสารพิษของเซลล์ แต่หากมีปริมาณมากเกินไปที่เซลล์ต้องการอาจส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ เพราะภายในเซลล์มีการกระตุ้นให้เกิดสารประกอบอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ดังนั้นผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I มีความสามารถทนต่อการเจริญของแบคทีเรียในสารละลายเหล็กที่มีความเข้มข้นสูงได้ดี



ภาพที่ 4.19 ผลของสารละลายเหล็กต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I



ภาพที่ 4.20 ความสามารถของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I เมื่อเปรียบเทียบกับ *E. coli* และ *S. aureus* ในการทนต่อสภาวะที่มีสารละลายเหล็กที่ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยภาพ A คือแบคทีเรียที่เลี้ยงในน้ำกลั่น และภาพ B คือ แบคทีเรียที่เลี้ยงในสารละลายเหล็กที่ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อลิตร

#### 4.9. การศึกษาการดูดซับและการดูดซึมอออนของเหล็กของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I

ความสามารถในการดูดซับและการดูดซึมอออนของเหล็กของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I ถูกระบุและเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* และ *S. aureus* การศึกษาดังกล่าวทำได้โดยนำแบคทีเรีย 0.7 กรัมโดยน้ำหนัก บ่มในสารละลายอออนของเหล็ก 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 160 มิลลิกรัมต่อลิตร (20 ไมโครโมลาร์) เป็นเวลา 0 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการทดสอบการดูดซับและการดูดซึมอออนของเหล็กด้วย Ferrozine assay ซึ่งคำนวณได้จากสมการ (1) และ (2) ตามลำดับ

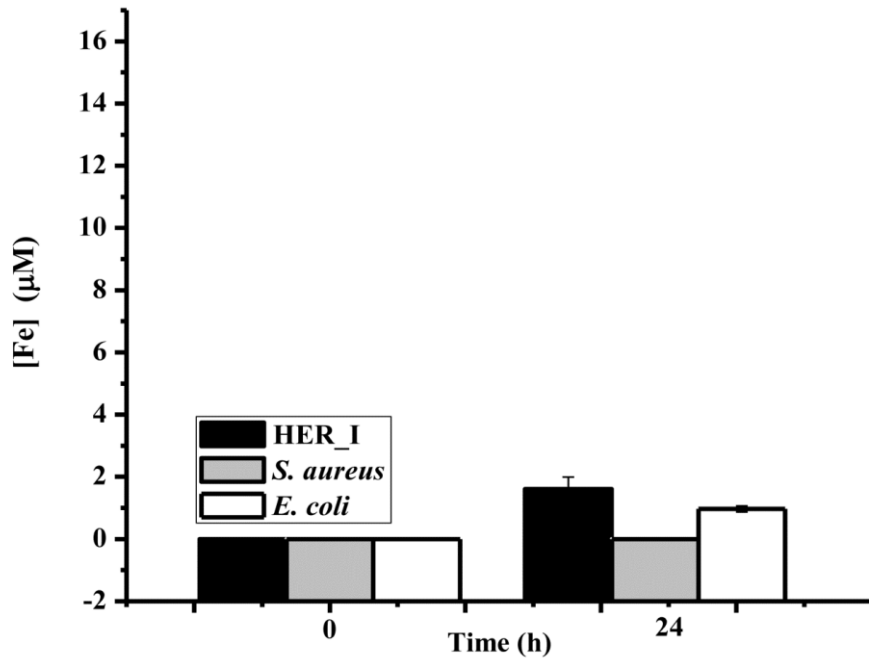
$$Fe_{\text{adsorption}} = (Int_{Fe} - R_{Fe(T)}) - Fe_{\text{uptake}} \dots \dots \dots (1)$$

$Fe_{\text{adsorption}}$	คือความเข้มข้นของสารละลายเหล็กเริ่มต้นในอาหาร
$R_{Fe(T)}$	คือความเข้มข้นของสารละลายเหล็กที่เหลือในอาหาร ณ เวลาที่วัดค่า
$Fe_{\text{uptake}}$	คือค่าดูดซึมอออนของเหล็ก
T	คือเวลาที่วัดค่า

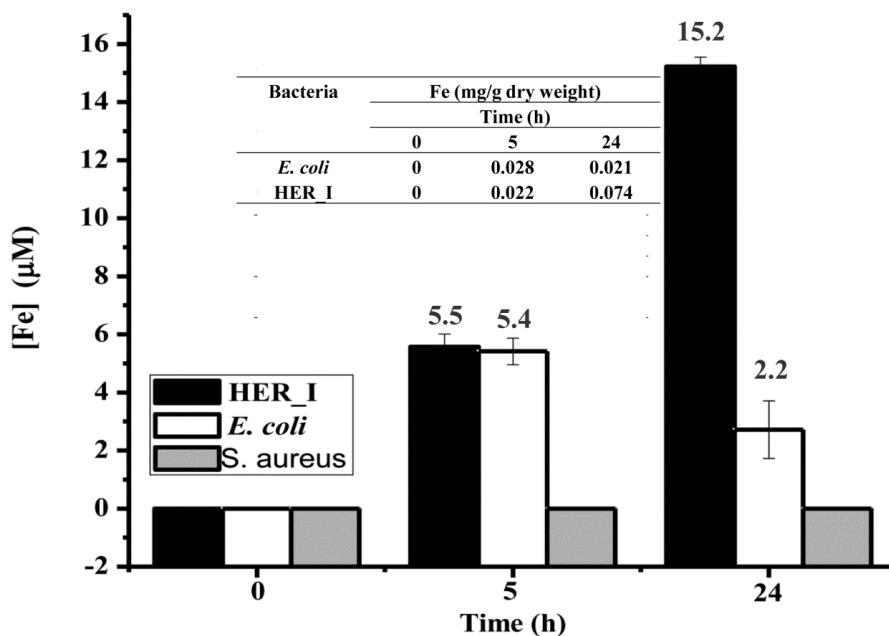
$$Fe_{\text{uptake}} = CL_{Fe(T)} - CS_{Fe(T)} \dots \dots \dots (2)$$

$CL_{Fe(T)}$	คือความเข้มข้นของสารละลายเหล็กทั้งหมดในสารละลายเซลล์ที่แตก (cell lysate) มีค่าเป็นไมโครโมลาร์ ณ เวลาที่วัดค่า
$CS_{Fe(T)}$	คือความเข้มข้นของสารละลายเหล็กบนพื้นผิวของเซลล์แบคทีเรีย ณ เวลาที่วัดค่า

จากการทดลองพบว่า ความสามารถในการดูดซึมอออนของเหล็กเข้าสู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I (ภาพที่ 4.21–4.22) ในกรณีที่ทดลองกับสารละลายเหล็ก 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเหล็กในเซลล์แบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I มีการสะสมอออนของเหล็กสูงกว่า *E. coli* และ *S. aureus* อย่างมีนัยสำคัญ โดยการสะสมของอออนของเหล็กที่ 0 และ 24 ชั่วโมง ของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในกรณีที่ทดลองกับสารละลายเหล็กที่สูงถึง 160 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกัน คือพบการดูดซึมอออนของเหล็กในเซลล์แบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I สูงกว่า *E. coli* และ *S. aureus* อย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I มีความสามารถในการดูดซึมอออนของเหล็กเข้าสู่เซลล์ได้ดี และสูงกว่า *E. coli* และ *S. aureus* อย่างชัดเจน

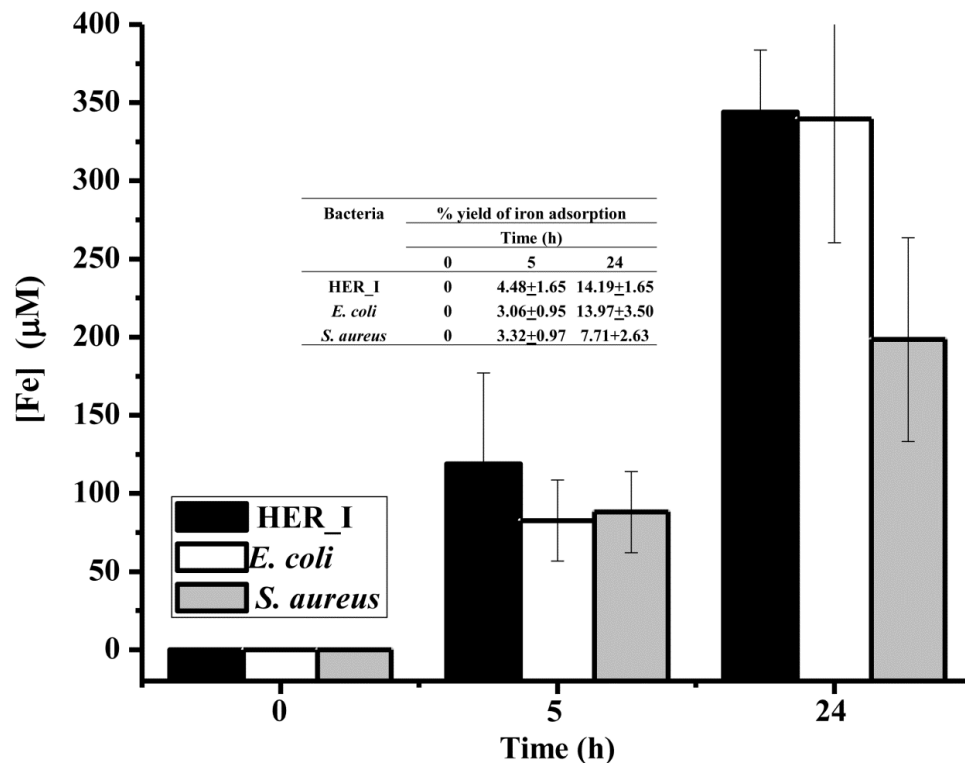


ภาพที่ 4.21 ความสามารถในการการดูดซึมไอออนของเหล็กเข้าสู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I เมื่อเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* และ *S. aureus* ที่ความเข้มข้นของสารละลายไอออนของเหล็ก 1 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.22 ความสามารถในการการดูดซึมไอออนของเหล็กเข้าสู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I เมื่อเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* และ *S. aureus* ที่ความเข้มข้นของสารละลายไอออนของเหล็ก 160 มิลลิกรัมต่อลิตร

สำหรับการศึกษาความสามารถในการดูดซับอีดอนของเหล็กของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I เปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* และ *S. aureus* (ภาพที่ 4.23) ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I และแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* มีความสามารถในการดูดซับอีดอนของเหล็กใกล้เคียงกัน และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลการดูดซับอีดอนของเหล็กของแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus*



ภาพที่ 4.23 ความสามารถในการดูดซับอีดอนของเหล็กของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* และ *S. aureus*

## บทที่ 5

### บทสรุป

โครงการวิจัยนี้ต้องการศึกษาผลของระยะการเจริญและสูตรอาหารต่อการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่แยกได้ในเหมืองแร่เหล็กของประเทศไทย การผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กของแบคทีเรีย และสมบัติบางประการของอนุภาคนาโนแม่เหล็กภายในเซลล์แบคทีเรีย นอกจากนี้ยังต้องการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะและสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่ได้จากการทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก และจากการเผา ในการศึกษาที่สามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลท ได้แก่ HER\_I HER\_II KPI\_I L3\_5 SRL1 และ TSB2 ซึ่งมีคุณสมบัติในการเคลื่อนที่ตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กอย่างอ่อน (weak magnetotaxis) และมีโครงสร้างแมกนีโตโซมภายในเซลล์ โดยแบคทีเรียไอโซเลท HER\_I HER\_II KPI\_I SRL1 และ TSB2 มีรูปร่างเป็นท่อน ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ L3\_5 มีรูปร่างเป็นทรงกลม แบคทีเรียทั้งหมดมีความกว้างในช่วง 0.34–0.68 ไมโครเมตร และความยาวในช่วง 0.97–1.81 ไมโครเมตร จากการศึกษาสมบัติทางชีวเคมี พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท HER\_I ให้ผลการทดสอบเอนไซม์ oxidase และเอนไซม์ catalase เป็นลบ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม microaerophilic ส่วนแบคทีเรียอีก 5 สายพันธุ์ ให้ผลการทดสอบเอนไซม์ catalase เป็นบวก จึงถูกจัดอยู่ในกลุ่ม anaerobic เมื่อศึกษาการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่าระยะเวลาการเพิ่มจำนวน (doubling time) ของ HER\_I HER\_II KPI\_I L3\_5 SRL1 และ TSB2 เท่ากับ 18.1 20.9 27.8 12.2 19.9 และ 22.0 ชั่วโมง ตามลำดับ จากลำดับเบสของยีน 16S rRNA สามารถระบุแบคทีเรียดังกล่าวในระดับสกุล คือ *Acinetobacter* sp. HER\_I *Acinetobacter* sp. L3\_5 *Pseudomonas* sp. KPI\_I *Pseudomonas* sp. SRL1 *Serratia* sp. TSB2 และ *Comamonas* sp. HER\_II ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าแบคทีเรียไอโซเลท HER\_I HER\_II L3\_5 KPI\_I TSB2 และ SRL1 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับแมกนีโตแทกติกแบคทีเรียที่จัดอยู่ในลำดับชั้น Gamma และ Beta proteobacteria จากการวิเคราะห์แมกนีโตโซมของเซลล์แบคทีเรียที่สกัดออกจากเซลล์ที่ทำให้แตก และการเผาเซลล์แบคทีเรียพบว่าแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I มีการผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กในรูปแมกนีไทต์จากการวิเคราะห์ด้วย TEM-SAED โดยคุณสมบัติของอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่ได้จากการสกัดและการเผาไม่แตกต่างกัน แบคทีเรียไอโซเลท HER\_I สามารถเจริญในอาหาร Modified MTB ที่มีกรดแอสติคได้ดีกว่าสูตรอาหารปกติที่ใช้ (Modified MTB) แต่เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค XANES พบว่าแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร Modified MTB มีการผลิต  $Fe_3O_4$  มากกว่า  $Fe_2O_3$  ในระยะเจริญ แต่แบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร Modified MTB ที่มีกรดแอสติค มีการผลิต  $Fe_2O_3$  มากกว่า  $Fe_3O_4$  นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HER\_I มีความสามารถในการดูดซึมไอออนของเหล็กได้ดีกว่า *E. coli* และ *S. aureus* ผลจากการศึกษานี้ทั้งหมดได้แสดงถึงแบคทีเรียที่แยกได้ในประเทศไทย ซึ่งสามารถผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กในรูปแมกนีไทต์ได้

## สรุปผลดำเนินการ

หัวข้อ	ผลการดำเนินงาน
<b>1. การบรรลุวัตถุประสงค์</b>	
1) เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาการเจริญและสูตรอาหารต่อการเจริญของแบคทีเรีย การผลิตอนุภาคนาโนแม่เหล็กของแบคทีเรีย และสมบัติบางประการของอนุภาคนาโนแม่เหล็กภายในเซลล์แบคทีเรีย	100%
2) เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลักษณะและสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่ได้จากการทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกและจากการเผา	100%
<b>2. ผลงานตีพิมพ์</b>	
20xx. Kwantrairat S, Khamhaengpol A, Chumpol J, Siri S. Biological synthesis of iron oxide nanoparticles by the micro-aerobic bacterium, <i>Acinetobacter</i> sp. strain LH-1.	Submission
20xx. Kwantrairat S, Chumpol J, Siri S. Biological synthesis of magnetite nanoparticles by <i>Pseudomonas</i> sp. strain LT-1.	Submission
<b>3. การนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการ</b>	
2014. Khwantrairat S. and Siri S. Screening for bacteria capable to form iron nanoparticles from iron contaminated water. International Conference on Agriculture, Biology and Environmental Sciences (ICABES'14).	December 8-9, 2014. Ibis Bali Kuta Hotel, Bali, Indonesia.

## บรรณานุกรม

- Alphandéry, E. (2014). Applications of magnetosomes synthesized by magnetotactic bacteria in medicine. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. 2: 1-6.
- Arakaki, A., Kikuchi, D., Tanaka, M., Yamagishi, A., Yoda, T., and Matsunaga, T. (2016). Comparative subcellular localization analysis of magnetosome proteins reveals a unique localization behavior of Mms6 protein onto magnetite crystals. **Journal of bacteriology**. 198(20): 2794-2802.
- Araujo, A. C. V., Abreu, F., Silva, K. T., Bazylinski, D. A., and Lins, U. (2015). Magnetotactic bacteria as potential sources of bioproducts. **Marine Drugs**. 13(1): 389-430.
- Atlas, R. M. (2010). **Handbook of microbiological media**. CRC press.
- Baeuerlein, E. (2004). **Biom mineralization: Progress in biology, molecular biology and application**. John Wiley & Sons.
- Bazylinski, D. A., and Frankel, R. B. (2003). Biologically controlled mineralization in prokaryotes. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**. 54(1): 217-247.
- Bazylinski, D. A., and Frankel, R. B. (2004). Magnetosome formation in prokaryotes. **Nature Reviews Microbiology**. 2(3): 217-230.
- Bazylinski, D. A., and Lefèvre, C. T. (2013). Magnetotactic bacteria from extreme environments. **Life : Open Access Journal**. 3(2): 295-307.
- Bazylinski, D. A., Lefèvre, C. T., and Frankel, R. B. (2012). Magnetotactic protists at the oxic–Anoxic transition zones of coastal aquatic environments. In: Altenbach, A. V., J. M. Bernhard and J. Seckbach (Ed.). **Anoxia: Evidence for Eukaryote Survival and Paleontological Strategies**. Dordrecht, Springer Netherlands, pp. 131-143
- Bazylinski, D. A., and Schübbe, S. (2007). Controlled biomineralization by and applications of magnetotactic bacteria. **Advances in Applied Microbiology**. 62: 21-62.
- Blakemore, R. P., Maratea, D., and Wolfe, R. S. (1979). Isolation and pure culture of a freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium. **Journal of Bacteriology**. 140(2): 720-729.
- Blakemore, R. P., and Wolfe, R. S. (1984). Culture medium and conditions for growth of magnetic bacteria (pp. 1-6): Google Patents.
- Callister, W. D., and Rethwisch, D. G. (2011). **Materials science and engineering**. John Wiley & Sons NY.

- Chambers, S. A., Droubay, T. C., Wang, C. M., Rosso, K. M., Heald, S. M., Schwartz, D. A., Kittilstved, K. R., and Gamelin, D. R. (2006). Ferromagnetism in oxide semiconductors. **Materials Today**. 9(11): 28-35.
- Elena, Y. F., Mircea, I., and Ioan, A. (2017). A bionic study of the magnetic bacteria with applications to the mecano-magnetic micromanipulators. **Procedia Engineering**. 174: 1128-1139.
- Faivre, D., and Schuler, D. (2008). Magnetotactic bacteria and magnetosomes. **Chemical Reviews**. 108(11): 4875-4898.
- Farzan, F., Shojaosadati, S. A., and Abdul Tehrani, H. (2010). A preliminary report on the isolation and identification of magnetotactic bacteria from iran environment. **Iranian Journal of Biotechnology**. 8(2): 98-102.
- Flies, C. B., Jonkers, H. M., de Beer, D., Bosselmann, K., Böttcher, M. E., and Schüler, D. (2005). Diversity and vertical distribution of magnetotactic bacteria along chemical gradients in freshwater microcosms. **FEMS Microbiology Ecology**. 52(2): 185-195.
- Flies, C. B., Peplies, J., and Schüler, D. (2005). Combined approach for characterization of uncultivated magnetotactic bacteria from various aquatic environments. **Applied and Environmental Microbiology**. 71(5): 2723-2731.
- Haering, R. R., and Wallace, P. R. (1957). The electric and magnetic properties of graphite. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**. 3(3): 253-274.
- Han, L., Li, S., Yang, Y., Zhao, F., Huang, J., and Chang, J. (2007). Comparison of magnetite nanocrystal formed by biomineralization and chemosynthesis. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. 313(1): 236-242.
- Havholm, K. G., and Kocurek, G. (1988). A preliminary study of the dynamics of a modern draa, Algodones, southeastern California, USA. **Sedimentology**. 35(4): 649-669.
- Hennebel, T., De Gusseme, B., Boon, N., and Verstraete, W. (2009). Biogenic metals in advanced water treatment. **Trends in Biotechnology**. 27(2): 90-98.
- Hergt, R., Hiergeist, R., Zeisberger, M., Schüler, D., Heyen, U., Hilger, I., and Kaiser, W. A. (2005). Magnetic properties of bacterial magnetosomes as potential diagnostic and therapeutic tools. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. 293(1): 80-86.
- Husseiny, S. M., Salah, T. A., and Anter, H. A. (2015). Biosynthesis of size controlled silver nanoparticles by *Fusarium oxysporum*, their antibacterial and antitumor activities. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**. 4(3): 225-231.

- Jacob, J. J., and Suthindhiran, K. (2016). Magnetotactic bacteria and magnetosomes – Scope and challenges. **Materials Science and Engineering: C**. 68: 919-928.
- Jogler, C., Lin, W., Meyerdierks, A., Kube, M., Katzmann, E., Flies, C., Pan, Y., Amann, R., Reinhardt, R., and Schüler, D. (2009). Toward cloning of the magnetotactic metagenome: identification of magnetosome island gene clusters in uncultivated magnetotactic bacteria from different aquatic sediments. **Applied and environmental microbiology**. 75(12): 3972-3979.
- Jun, G., Hongmiao, P., Haidong, Y., Tao, S., Yong, Z., Guanjun, C., Longfei, W., and Tian, X. (2006). Isolation and biological characteristics of aerobic marine magnetotactic bacterium YSC-1. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**. 24(4): 358-363.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**. 16(2): 111-120.
- Komeili, A. (2007). Molecular mechanisms of magnetosome formation. **Annual review of biochemistry**. 76: 351-366.
- Komeili, A., Li, Z., Newman, D. K., and Jensen, G. J. (2006). Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein mamK. **Science**. 311(5758): 242-245.
- Kotani, M. (1968). Paramagnetic properties and electronic structure of iron in heme proteins. **Advances in Quantum Chemistry**. 4: 227-266.
- Lefèvre, C. T., and Bazylinski, D. A. (2013). Ecology, diversity, and evolution of magnetotactic bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**. 77(3): 497-526.
- Lefèvre, Christopher T., Bennet, M., Landau, L., Vach, P., Pignol, D., Bazylinski, Dennis A., Frankel, Richard B., Klumpp, S., and Faivre, D. (2014). Diversity of magneto-aerotactic behaviors and oxygen sensing mechanisms in cultured magnetotactic bacteria. **Biophysical Journal**. 107(2): 527-538.
- Lefèvre, C. T., and Wu, L.-F. (2013). Evolution of the bacterial organelle responsible for magnetotaxis. **Trends in Microbiology**. 21(10): 534-543.
- Li, J., Pan, Y., Chen, G., Liu, Q., Tian, L., and Lin, W. (2009). Magnetite magnetosome and fragmental chain formation of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1: transmission electron microscopy and magnetic observations. **Geophys. J. Int.** 177: 33-42.

- Lin, W., Jogler, C., Schüler, D., and Pan, Y. (2011). Metagenomic analysis reveals unexpected subgenomic diversity of magnetotactic bacteria within the phylum Nitrospirae. **Applied and environmental microbiology**. 77(1): 323-326.
- Lin, W., Li, J., and Pan, Y. (2012). Newly isolated but uncultivated magnetotactic bacterium of the phylum Nitrospirae from Beijing, China. **Applied and environmental microbiology**. 78(3): 668-675.
- Lins, U., and Bazylinski, D. A. (2009). Magnetotaxis A2 - Schaechter, Moselio. In: **Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)**. Oxford, Academic Press, pp. 229-241
- Lins, U., McCartney, M. R., Farina, M., Frankel, R. B., and Buseck, P. R. (2006). Crystal habits and magnetic microstructures of magnetosomes in coccoid magnetotactic bacteria. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 78(3): 463-474.
- Liu, W.-B., Wu, H.-Y., Liu, X.-D., and Liu, X.-X. (2008). Influence of different Fe sources and concentrations on formation of magnetosomes in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Transactions of nonferrous metals society of China**. 18(6): 1379-1385.
- Liu, Y., Gao, M., Dai, S., Peng, K., and Jia, R. (2006). Characterization of magnetotactic bacteria and their magnetosomes isolated from Tieshan iron ore in Hubei Province of China. **Materials Science and Engineering: C**. 26(4): 597-601.
- Lohße, A., Ullrich, S., Katzmann, E., Borg, S., Wanner, G., Richter, M., Voigt, B., Schweder, T., and Schüler, D. (2011). Functional analysis of the magnetosome island in *Magnetospirillum gryphiswaldense*: The mamAB operon is sufficient for magnetite biomineralization. **PLoS ONE**. 6(10): e25561-e25570.
- Mackenzie, E. L., Iwasaki, K., and Tsuji, Y. (2008). Intracellular iron transport and storage: From molecular mechanisms to health implications. **Antioxidants & Redox Signaling**. 10(6): 997-1030.
- MEYER, D. J., and JONES, C. W. (1973). Distribution of cytochromes in bacteria: Relationship to general physiology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 23(4): 459-467.
- Molcan, M., Petrenko, V. I., Avdeev, M. V., Ivankov, O. I., Garamus, V. M., Skumiel, A., Jozefczak, A., Kubovcikova, M., Kopcansky, P., and Timko, M. (2017). Structure characterization of the magnetosome solutions for hyperthermia study. **Journal of Molecular Liquids**. 235: 11-16.

- Narayanan, K. B., and Sakthivel, N. (2010). Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. **Advances in Colloid and Interface Science**. 156(1): 1-13.
- Pan, Y., Petersen, N., Davila, A. F., Zhang, L., Winklhofer, M., Liu, Q., Hanzlik, M., and Zhu, R. (2005). The detection of bacterial magnetite in recent sediments of Lake Chiemsee (southern Germany). **Earth and Planetary Science Letters**. 232(1): 109-123.
- Peigneux, A., Valverde-Tercedor, C., López-Moreno, R., Pérez-González, T., Fernández-Vivas, M. A., and Jiménez-López, C. (2016). Learning from magnetotactic bacteria: A review on the synthesis of biomimetic nanoparticles mediated by magnetosome-associated proteins. **Journal of Structural Biology**. 196(2): 75-84.
- Perez-Gonzalez, T., Jimenez-Lopez, C., Neal, A. L., Rull-Perez, F., Rodriguez-Navarro, A., Fernandez-Vivas, A., and Iañez-Pareja, E. (2010). Magnetite biomineralization induced by *Shewanella oneidensis*. **Geochimica et Cosmochimica Acta**. 74(3): 967-979.
- Philipse, A. P., and Maas, D. (2002). Magnetic colloids from magnetotactic bacteria: Chain formation and colloidal stability. **Langmuir**. 18(25): 9977-9984.
- Polyakova, T., and Zablotskii, V. (2005). Magnetization processes in magnetotactic bacteria systems. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. 293(1): 365-370.
- Prozorov, T. (2015). Magnetic microbes: Bacterial magnetite biomineralization. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. 46: 36-43.
- Prozorov, T., Bazylinski, D. A., Mallapragada, S. K., and Prozorov, R. (2013). Novel magnetic nanomaterials inspired by magnetotactic bacteria: Topical review. **Materials Science and Engineering: R: Reports**. 74(5): 133-172.
- Sakaguchi, T., Tsujimura, N., and Matsunaga, T. (1996). A novel method for isolation of magnetic bacteria without magnetic collection using magnetotaxis. **Journal of Microbiological Methods**. 26(1): 139-145.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold spring harbor laboratory press.
- Scheffel, A., Gruska, M., Faivre, D., Linaroudis, A., Plitzko, J. M., and Schüler, D. (2006). An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria. **Nature**. 440(7080): 110-114.
- Schüler, D. (2008). Genetics and cell biology of magnetosome formation in magnetotactic bacteria. **FEMS microbiology reviews**. 32(4): 654-672.

- Schüler, D., Uhl, R., and Bäuerlein, E. (1995). A simple light scattering method to assay magnetism in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. **FEMS Microbiology Letters**. 132(1): 139-145.
- Sharma, G. P., and Balomajumder, C. (2011). Preliminary isolation report of aerobic magnetotactic bacteria in a modified nutrient medium. **Recent Research in Science and Technology**. 3(11): 71-75.
- Song, H.-P., Li, X.-G., Sun, J.-S., Xu, S.-M., and Han, X. (2008). Application of a magnetotactic bacterium, *Stenotrophomonas* sp. to the removal of Au(III) from contaminated wastewater with a magnetic separator. **Chemosphere**. 72(4): 616-621.
- Song, H., Li, X., Sun, J., Yin, X., Wang, Y., and Wu, Z. (2007). Biosorption equilibrium and kinetics of Au(III) and Cu(II) on magnetotactic bacteria: Supported by the ational Natural Science Foundation of China (No.20206024) and the Natural Science Foundation of Tianjin (No.07JCYBJC06800). **Chinese Journal of Chemical Engineering**. 15(6): 847-854.
- Sorop, T. G., Evangelisti, M., Haase, M., and de Jongh, L. J. (2004). Superparamagnetic behaviour of antiferromagnetic DyPO<sub>4</sub> nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. 272: 1573-1574.
- Tajer Mohammad Ghazvini, P., Kermanshahi, R. K., Nozad Golikand, A., and Sadeghizadeh, M. (2014). Isolation and characterization of a novel magnetotactic bacterium from iran: Iron uptake and producing magnetic nanoparticles in *Alphaproteobacterium* MTB-KTN90. **Jundishapur Journal of Microbiology**. 7(9): e19343-e19353.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**. 30(12): 2725-2729.
- Tanaka, M., Arakaki, A., Staniland, S. S., and Matsunaga, T. (2010). Simultaneously discrete biomineralization of magnetite and tellurium nanocrystals in magnetotactic bacteria. **Applied and environmental microbiology**. 76(16): 5526-5532.
- Wang, Y., Lin, W., Li, J., and Pan, Y. (2013). Changes of cell growth and magnetosome biomineralization in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 after ultraviolet-B irradiation. **Frontiers in Microbiology**. 4: 397-407.

- Wenbing, L., Longjiang, Y., Pengpeng, Z., and Min, Z. (2007). Isolation of magnetotactic bacterium WM-1 from freshwater sediment and phylogenetic characterization. **Archives of Microbiology**. 188(1): 97-102.
- Wolfe, R. S., Thauer, R. K., and Pfennig, N. (1987). A 'capillary racetrack' method for isolation of magnetotactic bacteria. **FEMS Microbiology Letters**. 45(1): 31-35.
- Wong-Ng, W., McMurdie, H. F., Hubbard, C. R., and Mighell, A. D. (2001). JCPDS-ICDD Research associateship (cooperative program with NBS/NIST). **Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology**. 106(6): 1013-1028.
- Xie, J., Chen, K., and Chen, X. (2009). Production, modification and bio-applications of magnetic nanoparticles gestated by magnetotactic bacteria. **Nano research**. 2(4): 261-278.
- Yan, L., Da, H., Zhang, S., López, V. M., and Wang, W. (2017). Bacterial magnetosome and its potential application. **Microbiological Research**. 203: 19-28.
- Yan, L., Zhang, S., Chen, P., Liu, H., Yin, H., and Li, H. (2012). Magnetotactic bacteria, magnetosomes and their application. **Microbiological Research**. 167(9): 507-519.
- Yan, L., Zhang, S., Chen, P., Wang, W., Wang, Y., and Li, H. (2013). Magnetic properties of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Materials Science and Engineering: C**. 33(7): 4026-4031.
- Yang, C.-D., Takeyama, H., Tanaka, T., and Matsunaga, T. (2001). Effects of growth medium composition, iron sources and atmospheric oxygen concentrations on production of luciferase-bacterial magnetic particle complex by a recombinant *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. **Enzyme and Microbial Technology**. 29(1): 13-19.
- Zablotskii, V., Yurchenko, V., Kamysa, Y., and Chelombetskaya, M. (2001). Calculations of magnetic susceptibility of magnetotactic bacteria culture. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. 234(3): 575-583.
- Zhang, S., Yan, L., Li, H., and Liu, H. (2012). Optimal conditions for growth and magnetosome formation of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **African Journal of Microbiology Research**. 6(32): 6142-6151.
- Zhang, W.-Y., Zhou, K., Pan, H.-M., Yue, H.-D., Jiang, M., Xiao, T., and Wu, L.-F. (2012). Two genera of *Magnetococci* with bean-like morphology from intertidal sediments of the yellow sea, China. **Applied and Environmental Microbiology**. 78(16): 5606-5611.

- Zhang, X., Yan, S., Tyagi, R. D., and Surampalli, R. Y. (2011). Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. **Chemosphere**. 82(4): 489-494.
- Zhu, K., Pan, H., Li, J., Yu-Zhang, K., Zhang, S.-D., Zhang, W.-Y., Zhou, K., Yue, H., Pan, Y., Xiao, T., and Wu, L.-F. (2010). Isolation and characterization of a marine *magnetotactic spirillum* axenic culture QH-2 from an intertidal zone of the China Sea. **Research in Microbiology**. 161(4): 276-283.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก  
อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารละลาย

## 1. สารเคมี

Ammonium nitrate ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	Sigma, USA
Aluminum potassium sulfate dodecahydrate ( $\text{AlK}(\text{SO})_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma, USA
Api 20E kits	BioMerieux, France
Boric acid ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	Sigma, USA
Calcium chloride dihydrate ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma, USA
Cobalt(II) chloride hexahydrate ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma, USA
Ferrozine or 3-(2-Pridyl)-5, 6-diphenyl-1, 2, 4-triazine-p,p'-disulfonic acid monosodium salt hydrate ( $\text{C}_2\text{OH}_{13}\text{N}_4\text{NaO}_6\text{S}_2$ )	Sigma, USA
Formvar carbon coat copper grid	Sigma, USA
Gel/PCR DNA Fragment Extraxtion Kit	Geneaid, Taiwan
Hydroxylamine hydrochloride ( $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ )	Sigma, USA
Hydroxylammonium chloride ( $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ )	Merck, Germany
Iron(III) chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma, USA
Iron(II) sulfate heptahydrate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma, USA
Nitilotriacetic acid ( $\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}_6$ )	Sigma, USA
Manganese sulfate dihydrate ( $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma, USA
Magnesium sulfate heptahydrate ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma, USA
Potassium phosphate monobasic ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Sigma, USA
Potassium thiocyanate (KSCN)	Sigma, USA
Quinic acid ( $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_6$ )	Sigma, USA
Sodium chloride (NaCl)	Sigma, USA
Sodium molybdate dehydrate ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	Bio Basic Inc, Canada
Zinc sulfate heptahydrate ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma, USA

## 2. Modified MTB medium agar/broth

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.68	g
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.12	g
Wolfe's mineral solution	5.0	ml
0.01 M Ferric quinate solution	2.0	ml
Sodium acetate	0.05	g
Sodium thioglycollate	0.05	g
Tartaric acid	0.37	g
Succinic acid	0.37	g

Agar 15 ml  
 ละลายสารในน้ำกลั่นปรับพีเอช 6.9 ด้วย 10 M NaOH และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

### 3. Wolfe's mineral solution

Nitrilotriacetic acid	1.5	g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.0	g
MnSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.5	g
NaCl	1.0	g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.1	g
CaCl <sub>2</sub>	0.1	g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.01	g
AlK(SO) <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0.01	g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01	g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01	g

ละลาย nitrilotriacetic acid จำนวน 1.5 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มล. ปรับ pH เท่ากับ 6.5 ด้วย KOH จากนั้นเติมสารอื่น ๆ ละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่น และทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองปราศจากเชื้อ Nitrocellulose membrane มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร

### 4. Gram stain solution

#### 4.1 Primary stain: crystal violet staining reagent

##### 4.1.1 Solution A

Crystal violet (certified 90% dye content)	2	g
Ethanol, 95% (v/v)	20	ml

##### 4.1.2 Solution B

Ammonium oxalate	0.8	g
Distilled water	80	ml

ผสมสารละลาย A และ B ให้เข้ากัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 ก่อนการใช้

#### 4.2 Mordant: Gram's iodine

Iodine	1.0	g
Potassium iodide	2.0	g
Distilled water	300	ml

บด Iodine และ Potassium iodide ละลาย และปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 300 มล.

#### 4.3 Decolorizing agent

95% Ethanol

#### 4.4 Counterstain: safranin

##### 4.4.1 Stock solution

Safranin O	2.5 g
95% Ethanol	100 ml

#### 4.5 Working solution

Stock solution	10 ml
Distilled water	90 ml

#### 4.6 Fixative reagent

Formaldehyde	10%
Glutaraldehyde in distill water	5%

#### 4.7 STE buffer

NaCl	10 mM
Tris-HCl, pH 8	10 mM
Na <sub>2</sub> DETA	1 mM

#### 4.8 TGE buffer

Tris-HCl, พีเอช 8	12.5 mM
Glucose	25 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	5 mM

#### 4.9 10x TAE buffer (1000 ml)

Tris Base	48.4 g
Glacial acetic acid	11.4 ml
0.5MEDTA (พีเอช 8.0)	20.0 ml
Distilled water	1000 ml

#### 4.10 0.8% agarose

Agarose	0.8 g
---------	-------

1x TAE buffer	100	ml
4.11 6X DNA loading buffer		
Bromophenol blue	0.05	g
Xylene cyanol FF	0.05	g
30% Glycerol in water	20	ml
4.12 Ferrozine solution		
0.1 M Ammonium acetate		
Ammonium acetate	7.71	g
Distilled water	1000	ml
0.02 M Ferrozine		
Ferrozine	0.25	g
0.1 M Ammonium acetate	50	ml
4.13 Reducing agent (for Ferrozine assay)		
2 M HCl		
38% HCl	80.71	ml
เจือจาง 38% HCl และปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 500 มล. ในน้ำกลั่น		
1.4 M Hydroxylamine hydrochloride		
Hydroxylamine hydrochloride	9.73	g
2 M Hydrochloric acid	100	ml
4.14 10 M Ammonium acetate		
Ammonium acetate	38.54	g
Distilled water	50	ml
ละลาย Ammonium acetate และปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 มล. ด้วยน้ำกลั่น		



ภาคผนวก ข

1. ที่ตั้งแหล่งเก็บตัวอย่าง และรหัสตัวอย่าง
2. ลักษณะแหล่งเก็บตัวอย่าง

## 1. ที่ตั้งแหล่งเก็บตัวอย่าง และรหัสตัวอย่าง

ชื่อบริษัท/เหมืองแร่	รหัส ตัวอย่าง	ข้อมูลทางกายภาพของแหล่งเก็บตัวอย่าง				
		พี เอช	อุณหภูมิ (°C)	ค่าการนำไฟฟ้า ( $\mu\text{s}/\text{cm}$ )	สี	เนื้อสัมผัสดิน ตะกอน
1. Phu Thup Pha Gold Mine	L	9.3	28	1128	ดำ	ตะกอนละเอียด
2. Herr Sheng Tai Co., Ltd.	HER	6.8	28	721	ส้ม	ตะกอนละเอียด
3. T.P.K. Mining Co., Ltd.	SRL	7.3	28	204	ดำ	ตะกอนหยาบ
4. Thai steel bars Co., Ltd.	TSB	6.3	28	603	ดำ	ตะกอนหยาบ
5. Bangkok Steel Industry Co., Ltd.	KPI	6.7	28	606	ดำ	ตะกอนหยาบ

2. ลักษณะแหล่งเก็บตัวอย่าง



(A) Gold mine of Phu Thup Pha Tungkhum Co., Ltd.



(B) Iron mine of Herr Sheng Tai Co., Ltd.



(C) Natural pond near T.P.K. Mining Co., Ltd.



(D) Thai steel bars Co., Ltd.



(E) Bangkok Steel Industry Co., Ltd.

### ภาคผนวก ค

1. ข้อมูล  $d$ -spacing และระนาบผลึกหลักออกไซด์ของแบคทีเรียที่แยกได้ 6 ไอโซเลต
2. ข้อมูล  $d$ -spacing และระนาบผลึกออกไซด์ของเหล็กได้จากการเผาเซลล์ และสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย HER\_I
3. เปรียบเทียบรูปร่างเซลล์และแมกนีโตโซมของแบคทีเรียที่แยกได้กับแบคทีเรีย MTB ที่มีรายงานก่อนหน้า

1. ข้อมูล  $d$ -spacing และระนาบผลึกออกไซด์ของเหล็กของแบคทีเรียที่แยกได้ 6 ไอโซเลต เทียบกับการวัดมาตรฐาน JCPDS No. 89-0951

Bacterial isolates	spots	Diameter (nm)					Mean	Radius (nm)	1/Radius	d[°A]	JCPDS No. 890951	
		1	2	3	4	5					d[°A]	h l k
KPI_I	1	6.61	6.62	6.60	6.62	6.62	6.614	3.307	0.302	3.02	3.00	2 2 0
	2	7.80	7.820	7.80	7.80	7.90	7.824	3.912	0.256	2.56	2.56	3 1 1
	3	13.30	13.20	13.30	13.30	13.30	13.28	6.640	0.151	1.51	1.50	4 4 0
	4	14.90	15.00	14.90	14.90	14.80	14.90	7.450	0.134	1.34	1.34	6 2 0
HER_II	1	7.80	7.80	7.80	7.80	7.80	7.80	3.900	0.256	2.56	2.56	3 1 1
	2	12.30	12.30	12.30	12.30	12.30	12.30	6.150	0.163	1.63	1.63	5 1 1
	3	15.60	15.70	15.70	15.70	15.70	15.68	7.840	0.128	1.28	1.28	6 2 2
HER_I	1	12.20	12.20	12.30	12.30	12.30	12.26	6.130	0.163	1.63	1.63	5 1 1
	2	13.95	13.95	13.90	13.95	13.95	13.94	6.970	0.143	1.43	1.43	5 3 1
L3_5	1	11.50	11.60	11.60	11.65	11.60	11.59	5.795	0.173	1.73	1.73	4 2 2
	2	13.30	13.30	13.30	13.20	13.40	13.30	6.650	0.150	1.50	1.50	4 4 0
SRL_I	1	7.80	7.80	7.81	7.78	7.90	7.818	3.909	0.256	2.56	2.56	3 1 1
	2	11.50	11.60	11.50	11.50	11.60	11.54	5.770	0.173	1.73	1.73	4 2 2
TSB_II	1	7.85	7.80	7.80	7.81	7.80	7.81	3.906	0.256	2.56	2.56	3 1 1
	2	13.90	13.90	13.90	13.90	13.90	13.90	6.950	0.144	1.44	1.43	5 3 1

2. ข้อมูล  $d$ -spacings และระนาบผลึกออกไซด์ของเหล็กที่ได้จากการเผาเซลล์ และสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย HER<sub>I</sub> เทียบกับการวัดมาตรฐาน JCPDS No. 89-0951

Sample preparation	Spots	Diameter (nm)					Mean	Radius	1/Radius	d[°A]	JCPDS No. 890951	
		1	2	3	4	5					d[°A]	h l k
Calcination	1	6.43	6.38	7.04	6.82	6.76	6.686	3.343	0.299	3.00	3.00	2 2 0
	2	9.37	9.42	9.41	9.45	9.47	9.424	4.712	0.212	2.12	2.12	4 0 0
	3	11.60	11.60	11.70	11.70	11.6	11.640	5.820	0.172	1.72	1.72	4 2 2
	4	14.10	14.40	14.10	14.20	14.00	14.160	7.080	0.141	1.41	1.42	4 4 2
Extraction	1	6.58	6.68	6.68	6.79	6.68	6.682	3.341	0.299	3.00	3.00	2 2 0
	2	10.30	10.20	10.30	10.20	10.20	10.240	5.12	0.195	1.95	1.95	3 3 1
	3	11.60	11.60	11.60	11.70	11.60	11.620	5.810	0.172	1.72	1.72	4 2 2

3. ตารางเปรียบเทียบรูปร่างเซลล์และแมกนีโตโซมของแบคทีเรียที่แยกได้กับแบคทีเรีย MTB ที่มีรายงาน  
ก่อนหน้า

MTB	Cell shape	MNP shape	MNPs distribution	Main magnetosome composition	References
<i>Magnetospirillum magneticum</i> strain AMB_1	Spirillum	Hexahedral-prism	In chain	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	[Noguchi et al., 1999]
<i>M. magnetotacticum</i> strain MS-1	Spirillum	Cubo-octahedral	In chain	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	[Blackmore, 1975]
<i>Desulfovibrio</i> sp. strain RS-1	Helicoid to Rods	Bean-shaped	Nd	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	[Kawaguchi et al., 1999]
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Rods	Rounded	No chain	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	[Yan et al., 2013]
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> strain MRS-1	Spirillum	Hexahedral-prism	In chain	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	[Lohbe et al., 2011]
<i>Magnetovibrio blaakemorei</i> strain NMV-1	Spirillum	Rectangle	In chain	Nd	[Liu et al., 2006]
' <i>Candidatus Magnetoglobus multicellularis</i> '	Multicellular	Rounded	No chain	Fe <sub>3</sub> S <sub>4</sub>	[Silva et al., 2008]
<i>Acinetobacter</i> sp. strain HER_I	Short Rods	Spheroid	No chain	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	this study
Bacterial strain HER_II	Rods	Spheroid	No chain	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	this study
Bacterial strain KPI_I	Rods	Spheroid	No chain	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	this study
Bacterial strain L3_5	cocci	Spheroid	No chain	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	this study
Bacterial strain SRL_I	Rods	Spheroid	No chain	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	this study
Bacterial strain TSB_II	Rods	Spheroid	No chain	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	this study

Note: Nd (Not determined)

ภาคผนวก ง

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้และแบคทีเรียที่ใช้เปรียบเทียบ

**16S rRNA gene sequence of HER\_I reverse sequence (960 bp)**

TCGCACACGTGGTACCCGCCCTCTTTTGCAGTTAGGCTAGCTACTTCTGGTGCAACAACTCCCATGGTG  
TGACGGGCGGTGTGTACAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATTCTGATCCGCGATTACTAGCGATT  
CCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGATCGGCTTTTTGAGATTAGCATCACAT  
CGCTGTGTAGCAACCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATG  
ACTTGACGTCGTCCCCGCCTTCCTCCAGTTTGTCACTGGCAGTATCCTTAAAGTTCCCGACATTACTCGC  
TGGCAAATAAGGAAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAACCCAACATCTCACGACAACGAGGCTGA  
CGACAGCCCATGCAAGCACCTGTATGTAAGTTCCCCGGAAAGGCCCAATCCATCTCTGGGAAAGTTTCTT  
ACTATGTCAAGGCCCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCG  
GGCCCCCGTNCAATTCATTTAGAGTTTTAAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCAG  
TTAGCTGCGCCCAATTAAGCCTTCAGAAAANGGCCCAACACGGGCTAATTAGCACATTCGTTTACCGC  
ATGGACTACACCAGGGTTATCTTNAATCCTTGTTTTGNTCCCCCTTGCGTTTCCACCATCTACGTNTG  
ATGTTATGGCACAATAGGTGCNCTATCAAAGGGTANATCCACATATTATAGCAATTACGATCAAGGAAA  
TATTNNGCACCCCAANTAGTACACGATAANAATCCCAGTAACGAGAGAAGATATATTATAATACACANAC  
AAGAAAAAATAGACANTAACCTTGAGAGGGAACGAGAAANAAAAAGAAAAAAC

**16S rRNA gene sequence of HER\_II reverse sequence (981 bp)**

AACCGCGTGGTCAGCGCCTCCTTGCGGTTAGGCTACTACTTCTGGCGAGACCGCTCCCATGGTGTGACG  
GGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAAACGTATTCACCGTGACATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCG  
ACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGACTGGCTTTATGGGATTAGCTCCCCCTCG  
CGGGTTGGCAACCCTTTGTACCAGCCATTGTATGACGTGTGTAGCCCCACCTATAAGGGCCATGAGGAC  
TTGACGTCATACCCACCTTCCTCCGTTTTGTCACCGGCAGTCCCATTAGAGNNGCTCAACTGAATGTAN  
CAACTAATGGCAAGGTTTTCGCTCGTAGCGGGACTTAACCAACATCTCACGGACCACGAAGGCTTGAAC  
GACAGCCATTGCCAGACACCACTGTGTTGCAGGTTTCTCTTTATCGAAGCAACCAAACCCATCCTCTGGN  
TAAGNTTCACTGCCAATGGTCAAAGGGGAGGGGTAAAGGTTAAACAGACGTATGACATCCGAATAAAA  
CCACATCATTCCACCCGCTTGTTCGCGGGTCCCCGTCATCCTTTGGAAGATTTCCAAAAACAATTTGAC  
GGGACGGAAACNTCCCCCAAGAGGCAGGTCAAACCTATNCAACGCCGTNAAACAATCAGGAGTAACAAT  
GAGACCAGANTTAAAGACCCAAAAAAACCAAATTGAACAACAGACATAAAGGGCGATGGGAACAAACC  
AAGGGTACACAACAACACCGATTAAGCGACACCAACGAATATANAAGACAAAAANCGAGATGAAAANAG  
GCCAGAGGANAGCAATACCAAAGAAAGCACCCACAAAANAGGANAAACAAGAGGAACNGANGAATAAAA  
NCAAGGAAGAAACAAGAGAAAAGAACANAGAAGAACAGAANNCAAGAAAACAAGAAAANAACAAAAAC  
AAGAAGAAACNG

**16S rRNA gene sequence of KPI\_I forward sequence (976 bp)**

TCGCGGCAGGCTACCATGCAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTG  
AGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAACGT  
CCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTACTAGTTG  
GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC  
GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC  
AGCCATGCCCGCTGTGTGAAGAAGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTAC  
CTAATACGTGATTGTTTTGACGTTACCGACAGAATNAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGT  
AATACAGAGGGTGCAAGCGTTATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCNCGTAAGTGGTTTTGTTAACGTTG  
GGACTGTTGAACTCCACCGGGGCTCAACCTTGGGAACTGCACTTCAAACACTGACTTGAACCTTNAAGAA  
AGTTTTATTGGGGTTAAAAAAGGGGTTGGGTAGNGAAAAATTTACCTGGTTGGTTAGCCGGGTGGCAA  
CNTTGNCNTTCAANTATTTAGGAAAAGGGNAACACACCAAAGTTGGGCAGAAATAGGGAANCACCACCT  
TGGAGAAATATTACNGGCACACTTNAAGGGTCCAAGATAACGTTTTGNGGGGCGANCAACAAGGGTTTA  
ATCACCCGGGTNTCNACGCCNGAAAATATTAGTAATNACNAAAGAAACCATATAGATATTATGGGACATT  
CACGTTATATTCCCACTGNGATAGAGCGGGANAAAATATAATGACGAGACGAGAGTTATTATTGAGAAAA  
ACAGCTA

**16S rRNA gene sequence of L3\_5 reverse sequence (1202 bp)**

AAAAAAAAATGCACGGACACACGTGGTCACCGCCCTCTTTGCAGATTAGGCTAGCTACTTCTGGTGCTNAC  
AAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATTCTAGATCC  
AGCAGATTACTANCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGATACGGCTT  
TTGAGAATTAGCAATACCATAATCGCATAGGATAAGCAACCCATATTGATACCAGACCAATTGTAGCACA  
GATGTGTAAGCCCATGGACGTAAGGGCCAATGAATAGACATTGACGATNGTCNACCAGAACTATCCTCC  
AAGTTTGTGANATGAGACAGATATAACATTTAAAGATATCCCGANATAACTCAGACATAGGACACAATAA  
GGAAAAAGGAGGGTANAGCAGACNAACCAGAAAAGGCCAGGGAACCATATAAACACCAAAAAACAATAC  
CATCAAACCAGAAAACAACGAAGCCATGGAAACCAGAAACAAAGAAANCAAAANGACAAAGCAAACACC  
ATAGATAAATAGGATAAAAAGAACCCACAGGAAAAAGAGGCCAACCAAAAATACCAAAATCCTNCATGAC  
GAAAAAGAATACCAATNACAAAATAGGATACAAAAGGCCCAAAGGATAAAAAGGGGATACAAAACAGA  
ACNTATAAGGCAATCAAAATAAAAACACACAATAGACTACACCAACCAGAATTGGATGCANGGGGCACC  
ACNCCNGAACAAAATAAAACNACAAGAGAACGATAANAACGAATCAATAGAACGAAACCAGAAACATA  
CAACCACAGAGAAGGNGCCANAAAATANATCGCAGATAAGANCCTGGCGCCCAACTAAAAGCCAACGAA  
CAGGCCACACANAAGGNCATAAGAATAAGAACATACCGATATCACAGGNAACCGGGAACAACAAAGAG  
GACANAAAAGCACAAGGTAAGGAACACACATGCATAAAGCAACANAAAAGNNAAGAAAGNACAAAATG  
AGACGGCATAAACCAACGACTANCACCGAGACCTAGACAAAACACAAGCACACAGAAGATAAAAAGACA  
ACACAAAAAACANAAAANAAGACAACAAACCCGGGANACATAAAGACNCACAANCAATAAAAACAAAAN  
ACAAACAAGAAAAAAGAAAAAAT

**16S rRNA gene sequence of SRL\_I reverse sequence (1002 bp)**

TTCGATCCACGTGGTACCGTCCNCCCGAAGGTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTG  
TGACGGGCGGTGTGTACAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTGCGGATTACTAGCGATT  
CCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCT  
CGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATG  
ACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATAACGTGC  
TGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTTACGGGACTTTACCCCAAACATCTCACGGACACGAGCTG  
ACGGAACAGCCCATGCAAGGCAACCTTGTGTCAAGAGGTTTCCCCGAAGGCAACCAATCCCAATCTCTG  
GGAAAAGTTCTCTGGCATGTCAAGGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCAGTTGCTTCGAATTTAACCACATGCT  
CCACCGATTGTGCGGGCCCCGTCAATTCATTTGAGGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGGCGG  
TCCACCTTAAATTGGGCGTTTTAAAGCCTTNGGCGCCCAACATTAATAAATTCTTCCAAAGGGGAATTT  
CCAACCGGGCTTAAGTTTGAACACTTCGTTTTACCNGCGTTGGCACCTNAACCCAAGGGGTTTTCTAA  
TTCACNGTTTTGGCACCCCAAAGCTTTTTGCGCCNTATGTATAATATCAAGACCCAGGTGGGTTCCAT  
NTCGCACCATGAGTTNCATATCCNTATTATATCAAGTATACCGNTCAGGAGAATACACCCCCACTTCGAG  
ATACCACCCAGTTTGGTGANTCNCAGAAGAAGAGAGTATAATAAAAAACAACAGCGAGTAAAATACTATA  
CAGAGGAGTTAACAGGAGATTAATCGC

**16S rRNA gene sequence of TSB\_II forward sequence (660 bp)**

TTTCCGGCAGGCTTACACATGCAGTTTGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGCTCCCCGGGTGACGAGCGGC  
GGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATAC  
CGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGAT  
TAGCTAGTAGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCAC  
ACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAATGGGCGCA  
AGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAAAAAGGCCTTCGGGTTTGTAAACAGGCACTTTCAGCGAG  
GGAGGAAGAGTGGGTGAGCTTTAATTACGTTTCAATCAAATTGAACGTTACTCGGCAGAACAGAAAGCAC  
CGGCTTACTCCGTGCCAAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCCAAGCGTTAATCGGAATTTACTGGGC  
GTAAGCGCACAGCAGAGCGGTTTGTNAAAGTCACGAATGTGACAATCCCCGGGCTCANCTGGGAACTGC  
ATATTGAAACTGGACAAGCTNAATCTCACATAAGGGGG

**Magnetic coccus 16S rRNA gene (CS408)**

>gi|1061214|emb|X81188.1| Magnetic coccus 16S rRNA gene (CS408)

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCACGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCGGG  
TCCTTCGGGATGCCGGCGAGTGCGAACGGGTGAGTAATACGTGGAAACCTATCCTGAGGTAGGGGATA  
ACAGCTGGAAACGGCTGCTAATACCGCATAAGCCCTAAGGGGGAAAGATTTATCGCCTTAGGAGGGGTC  
CACGTCGGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGA  
TGGACAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGC  
AATGGGGGAAACCCTGACGCAGCGATGCCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTCA  
GTGGGGAAGATAGTGACGGTACCCACAGAAGAAGCTCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  
CGGAGGGGGCGAGCGTTGTTGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTGCAGCAAGTCAGGA  
GTGAAAATCCAGGGCTTAACCCGGGAACTGCTTTTGAAACTGGTAGGCTAGAGTCCGGCAGAGGGTGGT  
GGAATCCCCGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATGGGGAGGAAGACCAGAGGCGAAGGCGGCCACCTG  
GACCGGTACTGACGCTGAGGCGCGAGAGCGTGGGGAGCAAACA

**Magnetic coccus 16S rRNA gene (CS105)**

>gi|1061212|emb|X81186.1| Magnetic coccus 16S rRNA gene (CS105)

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCACGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCGGG  
TCCTTCGGGATGCCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACGTGGAAACCTATCCTGAGGTGGGGGATA  
ACAGCTGGAAACGGCTGCTAATACCGCATAAGCCCTAAGGGGGAAAGATTTATCGCCTTAGGAGGGGTC  
CACGTCGGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGA  
TGGACAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGC  
AATGGGGGAAACCCTGACGCAGCGATGCCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTCA  
GTGGGGAAGATAGTGACGGTACCCACAGAAGAAGCTCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  
CGTAGGGGGCGAGCGTTGTTGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTGCAGCAAGTCAGGAG  
TGAAAATCCAGGGCTTAACTCTGGAAGTGCTTTTGAAACTGCGGCACTAGAGACAGGCAGAGGGTGGTG  
GAATCCCCGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATGGGGAGGAAGACCGGAGGCGAAGGCGGCCACCTGG  
ACCTGAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA

**Magnetic coccus 16S rRNA gene (CS106)**

>gi|1061213|emb|X81187.1| Magnetic coccus 16S rRNA gene (CS106)

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCGCGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACGGG  
TCCTTCGGGACCCGACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGATACCTGTCCTATGGTGGGGAATA  
ACGTTTAGAAATGAACGCTAATACCGCATAAGCCCTACGGGGGAAAGATTTATCGCCATAGGAGGGGTC  
TGCGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGA  
TGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGC  
AATGGGGGAAACCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCCCTTTCA  
GTGGGAAAGATAATGACGGTACCCACAGAAGAAGCTCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  
CGGAGGGGGCTAGCGTTGTTGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTCATGTAAGTCAGGAG  
TGAAATCCTCAGGCTCAACCTGGGAACTGCTTCTGAAACTGTGTGACTAGAGTTCGGTAGAGGATGGTG  
GAATCCCCGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATGGGGAGGAAGACCGGAGGCGAAGGCGGCCATCTGG  
ACCGAACTGACGCTAAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA

**Magnetic coccus MP17 16S rRNA gene, partial sequence, clone NKMC9**

>gi|1330259|dbj|D38096.1|PSC16SRD5 Magnetic coccus MP17 16S rRNA gene, partial  
sequence, clone NKMC9

TAAAGCCCTTTCAGTGGGAACGATGATGACGGTACCCACAGAAGAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGC  
AGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCGAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGCTT  
GTTAAGTCAGAAGTGAAAGCCCCGGGCTTAACCCGGGAACTGCTTTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCCG  
GCAGAGGGTGGTGGGAATTCCCCGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATGGGGAGGAAGACC

## Undescribed magnetotactic alpha proteobacterium (strain Cs310) 16S rRNA

>gi|38865|emb|X61606.1| Undescribed magnetotactic alpha proteobacterium (strain Cs310)  
16S rRNA

AACGAACGCTGGCGGTACGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTACCAGGCCCGCAAGGGTGCTGGCGAG  
TGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGATGACCTACCTTGAGGTGGGGACAACAGCTAGAAATGGCTGCT  
AATACCGCATATCTCCTAAGGGATAAAGGCGCAAGTCGCCTTAAGATGGGTCCGCGTTGGATTAGCTAGT  
TGGTGAGGTAATGGCCCACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGA  
CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCTGAC  
GCAGCGATACCGCGTGGGTGAAGAAGGTCTTAGGATTGTAAAGCCCTTTCAGTGGGAACGATTGTGACG  
GTACCCACAGAAGAAGCACCCGGCCAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTG  
TTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCACGTAGGCGGTCCGATAAGTCAGGAGTGAAATGCAAAGGCTCAA  
CCTTTGAACTGCTCTTGAAACTGTTGGACTTGAGTTTGGCAGAGGGTGGTGGAAATCCCCAAGTAGAGGT  
GAAATTCGTAGATATGGGGAGGAAGACCCGAGGCGAAAGCGGCCACCTGGACCAAACTGACGCTGAGG  
TGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA

**Magnetic coccus MP17 16S rRNA gene, partial sequence, clone NKMC9**

>gi|1330259|dbj|D38096.1|PSC16SRD5 Magnetic coccus MP17 16S rRNA gene, partial  
sequence, clone NKMC9

TAAAGCCCTTTCAGTGGGAACGATGATGACGGTACCCACAGAAGAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGC  
AGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCGAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGCTT  
GTTAAGTCAGAAGTGAAAGCCCCGGGCTTAACCCGGGAACTGCTTTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCCG  
GCAGAGGGTGGTGGGAATTCCCCGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATGGGGAGGAAGACC

Uncultured Nitrospirae bacterium clone OTU1 16S ribosomal RNA gene, partial  
sequence

>gj|259014856|gb|GQ468508.1| Uncultured Nitrospirae bacterium clone OTU1 16S ribosomal  
RNA gene, partial sequence

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAGCGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCATACGGAGTTATG  
GAGGGGTAACCTGACATAACTAAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGTGACCTGCCCTTGTGACTG  
GGATAACCACTGGAAACGGTGGATAATACCGGATAAGCCCACGATTAGGTGATAGTAGTGGGAAAAGGA  
GAAATCTGCACAAGGATGGGCCTGCGTCCTATCAGGTAGTTGGTAAGGTAAAGGCTTACCAAGCCTAAG  
ACGGGTAGCCGGTCTGAGAGGATGGACGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG  
GCAGCAGTGAGGAATTTTGCACAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGAAGGCC  
TTCGGGTTGTAAACCCCTTTTGTAAAGGAAGATAGTGACGGTACCTTAAGAATAAGCCACGGCTAACTCT  
GTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACAGAGGTGGCAAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCTTAAAGGGCGCGTA  
GGCGGTTAATCAAGTTTAGGGTGAATGCATGGGCTCAACCTGTGAATTGCCTTGAAAAGTGGTTGACTT  
GAGTAAGCGAGGGGATGGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAGGAAGGCCGG  
TGGCGAAGGCGGCCATCTGGCGCTTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAG  
ATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAACGGTGGGTACTAGGTGTAGGGCTCTTTAGGGTTCTGTGCCGAAG  
GGAAACCGATAAGTACCCCGCCTGGGAAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGC  
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGC  
AGATGGTAGTGATCCGAAAGGTGAGCGACTTTCCCGTAAGGGAGAGAGTCTGCACAGGTGCTGCATGGC  
TGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTTTGTTGC  
CATCAGGTTAAGCTGGGCACTCTAAGGAAACTGCCGGCGATGAGTTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCA  
AGTCATCATGGCCCTTATATCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTATTACAGAGGGAAGCAATACCG  
CGAGGTGGAGCAAATCCCCAAAAATATTCGTAGTTGGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAACGT  
GAAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCTACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC  
GTCACACCACGAAAGTCTGCTGTACCCGAAGAGGGTGAGCTAACCAGCAATGGAGGCAGCTCGCTAAGG  
TATGGTAGGTAATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACC

Uncultured gamma proteobacterium clone SP\_B3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

>gj|46451455|gb|AY587201.1| Uncultured gamma proteobacterium clone SP\_B3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GACAATGGGCGCAAGCCTGACCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTT  
TGTTGGGAAAGAAATCCAGCTGGTTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCT  
AACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCG  
TGCGTAGGTGGTCGTTTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAACTGCAGTGGATACTGG  
GCGACTAGAATGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAGGA  
ACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACATTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACA  
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCA  
GTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATT  
GACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCC  
TTGACATGTCGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCGAACACAGGTGCTGCATGGC  
TGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCC  
AGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA  
GTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTACTACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAGCCGG  
CGACGGTAAGCCAATCCCAGAAACCCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTC  
GGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC  
GTCACACCATGGGAGTTTGTGACCAGAAGCAGGTAGCTTAACCATCGGGAGGGCGCTTGCCACGGTG  
TGGCCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAA

Uncultured beta proteobacterium clone SP\_A36 16S ribosomal RNA gene, partial  
sequence

>gj|46577848|gb|AY589477.1| Uncultured beta proteobacterium clone SP\_A36 16S ribosomal  
RNA gene, partial sequence

GAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGATAAATACTGACGCTCAGACACGAAAGCGTGGGGAGC  
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGCTGTTGGGGCCGTTAGGCC  
TTAGTAGCGCAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGA  
ATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTA  
CCCTTGACATGTCTGGAAAGCCGAAGAGGTTTGGCCGTGCTCACAAGAGAACCGGAACACAGGTGCTGC  
ATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTGATTA  
GTTGCTACGCAAGAGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAG  
TCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATAAATGGTCGGGACAGAGGGTCGCCAACCCGC  
GAGGGGGAGCCAATCTCAGAAACCCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCCGCAACTCGACTGCGTGAAGTC  
GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCG  
TCACACCATGGGAGTGGGTTTCACCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGTAAGGAGGGCGCTTACCACGGTGG  
GATTCA

Uncultured gamma proteobacterium clone SP\_A27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

>gj|46577849|gb|AY589478.1| Uncultured gamma proteobacterium clone SP\_A27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGAGCAAACCAGGATTAGAT  
ACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAG  
CTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC  
CCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGT  
CGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAG  
CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAA  
TGGTGGGAACTCTAAGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG  
GCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTACTIONACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAGCCGGCGACGGTAA  
GCCAATCCCAGAAACCCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCT  
AGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCA  
TGGGAGTTTGTTCACCAGAAGCAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTGCCACGGTGTGGCCGATA  
ACTGGGGTGAAG

**Uncultured *Acinetobacter* sp. clone MRT-87 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

>gi|124507364|gb|EF371492.1| Uncultured *Acinetobacter* sp. clone MRT-87 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGGAAGG  
TAGCTTGCTACCTAACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACA  
ACATTCCGAAAGGAATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCG  
CTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAG  
CGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
GGGGAATATTGGACAATGGGCGGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTT  
GTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTCTAGTTAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAA  
TAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGATTTACT  
GGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGCTGATTAAGTCGGATGTGAAATCCCTGAGCTTAACTTAGGAATTGC  
ATTCGATACTGGTCAGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG  
AGATCTGGAGGAATAACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCAT  
GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCT  
TTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAAC  
TCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAAC  
CTTACCTGGTCTTGACATAGTAAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTTACATACAGGT  
GCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTT  
CCTTATTTGCCAGCGGGTTAAGCCGGGAACTTTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGAAGGCGGG  
GACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGG  
TTGCTACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGAC  
TCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA  
CACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTGACCAGAAGTAGGTAGTCTAACCGTAAGGAGGACGCT  
TACCACGGTGTGGCCGAT

Uncultured gamma proteobacterium clone SP\_C1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

>gj|46577850|gb|AY589479.1| Uncultured gamma proteobacterium clone SP\_C1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGAAGCTAGCCGTTGGGGTCTTACG  
AGATCTTAGTGGCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCA  
AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTT  
ACCAGCCCTTGACATCCTCAGAACTTGTTAGAGATAACTTGGTGCCTTCGGGAACTGAGAGACAGGTGCT  
GCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTT  
AGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGAACTCTAAGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG  
ACGTCAAGTCATCATGGCCCTTATGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCAGTACAAACGGTTGC  
GAACTCGCGAGAGTAAGCCAATCTGAAAAAGCTGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCC  
ATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAT  
ACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCTGCACCAGACGTCAGTAGCGTAACCTTCGGGAGCGCGCTGCC  
CACGGTGTGGTCAA

Uncultured *Magnetococcus* sp. clone M-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

>gi|124507353|gb|EF371481.1| Uncultured Magnetococcus sp. clone M-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

AGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGCAG  
GGCTTGCTCTGGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTACCTTAGAGTTGGGGATA  
AGCCTTGAAACAGGGTCTAATACCGAATACGGTTTAAGGACTAAAGTGTGCCTCTCCTTGGAAGCACAC  
GCTTTAAGATGAGCCCGCTTAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTATA  
GCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
TGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTGAGGGT  
TGTAAGCACTTTCAATTGTGAAGAAGGATTGGTCGTTAATAGCGGCTAGTTTTGACGTTAACTTTAGAA  
GAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACT  
GGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTGCTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTTAACCTGGGATGGTC  
ATTCAAAAGTGGCAGGCTAGAGTGTGATAGAGGATAGTGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG  
ATATTAGGAGGAACATCAGTGGCGAAGGCGACTGTCTGGGTCAACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGT  
GGGTAGCGAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGAAGTACTAGATGTTGGTTTCA  
TAAAAGAGATTAGTATCGTAGCAAACGCGTTAAGTTCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAA  
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAA  
CCTTACCATCCCTTGACATCATCAGGATTTGTTAGAGATAACTTAGTGCCTTCGGGAAGTGGTTGACAGG  
TGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTA  
TCTTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG  
GGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGGATGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCAGTACAGAGG  
GTTGCGAAGCGGTGACGTGGAGCTAATCTCAGAAAGCTGGTCGTAGTCCGGATTGAAGTCTGCAACTCG  
ACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT  
ACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTGGGTAGACTAACCTTCGGGAGGTCGC  
TCACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACC

Uncultured beta proteobacterium clone SP\_A36 16S ribosomal RNA gene, partial  
sequence

>gj|46577848|gb|AY589477.1| Uncultured beta proteobacterium clone SP\_A36 16S ribosomal  
RNA gene, partial sequence

GAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGATAATACTGACGCTCAGACACGAAAGCGTGGGGAGC  
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGCTGTTGGGGCCGTTAGGCC  
TTAGTAGCGCAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGA  
ATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTA  
CCCTTGACATGTCTGGAAAGCCGAAGAGGTTTGGCCGTGCTCACAAGAGAACCGGAACACAGGTGCTGC  
ATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCATTA  
GTTGCTACGCAAGAGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAG  
TCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGGACAGAGGGTCGCCAACCCGC  
GAGGGGGAGCCAATCTCAGAAACCCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCCGCAACTCGACTGCGTGAAGTC  
GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCG  
TCACACCATGGGAGTGGGTTTCACCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGTAAGGAGGGCGCTTACCACGGTGG  
GATTCA

Uncultured gamma proteobacterium clone SP\_B37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

>gj|46451459|gb|AY587205.1| Uncultured gamma proteobacterium clone SP\_B37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATG  
TTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCA  
AGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAA  
CGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACT  
CGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGC  
GCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACCGCCGGTGACAAACCGG  
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTACTIONACAATGGTA  
GGGACAGAGGGCTGCAAGCCGGCGACGGTAAGCCAATCCCAGAAACCCTATCTCAGTCCGGATTGGAGT  
CTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTT  
CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTTCACCAGAAGCAGGTAGCTTAACCTT  
CGGGAGGGCGCTTGCCACGGTGTGGCCGATAACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAA

***Magnetospirillum magneticum* gene for 16S rRNA, strain AMB-1**

>gi|450310|dbj|D17514.1|MGN16RRNA1 *Magnetospirillum magneticum* gene for 16S rRNA,  
strain:AMB-1

ATAGAGTTTGATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCGTAACACATCCAAGTCGAACGAAGTCT  
TCGGACTTAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAATATACCTCTTGGTGGGGAATAACATCGGGAA  
ACTGATGCTAATACCGCATAACGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGCCGAGAGATTAGCCCGGTCCGAT  
TAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCA  
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAA  
AGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCCACGACGA  
TGATGACGGTAGTGGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGC  
TAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTGGTCATAGTCAGAAGTGAAAGCCCT  
GGGCTCAACCCGGGAATTGCTTTTGATACTGGACCGCTAGAATCTCGGAGAGGGTAGTGGAATCCGAG  
TGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACCAGTGCGGAAGGCGACTACCTGGCCGTGATTG  
ACGCTCATGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG  
AGTGCTAGTTGTTGGGGTGCATGCACCTCAGTGACGCAGCTAACGCGTTAAGCACTCCGCCTGGGGAGT  
ACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT  
TCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGGGACGTATGTTTCCCAGAGATGGTGACTTGT  
CTTCGGACGCGTCCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTC  
CCGCAACGAGCGCAACCCTCATCTTCAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTGAAGAAACTGCCGGTGA  
CAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTA  
CAATGGTGGTGACAGTGGGTCGCTAACTCGCGAGAGTATGCTAATCCCTATAAGCCATCTCAGTTCGGAT  
TGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCTCGGTGAATA  
CGTTCGGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCTTTACCCGAAGCCGGTGGCGCTA  
ACCGCAAGGAGGCAGCCGACCACGGTAAGGTCAGCGACTGGGGTG

***Magnetospirillum magneticum* gene for 16S rRNA, strain MGT-1**

>gi|450311|dbj|D17515.1|MGN16RRNA2 *Magnetospirillum magneticum* gene for 16S rRNA,  
strain:MGT-1

ATAGAGTTAGATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATCCAAGTCGAGCGAAGTCT  
TCGGACTTAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAATATACCTCTTGGTGGGGAATAACATCGGGAA  
ACTGATGCTAATACCGCATAACGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGCCGAGAGATTAGCCCGCGTCCGAT  
TAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCA  
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAA  
AGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCCACGACGA  
TGATGACGGTAGTGGGAGAAGAAGCCCCGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGC  
TAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTGGTCATAGTCAGAAGTGAAAGCCCT  
GGGCTCAACCCGGGAATTGCTTTTGATACTGGACCGCTAGAATCTCGGAGAGGGTAGTGGAATCCGAG  
TGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACCAGTGCCGAAGGCGACTACCTGGCCGTCGATTG  
ACGCTCATGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG  
AGTGCTAGTTGTTGGGGTGCATGCACCTCAGTGACGCAGCTAACGCGTTAAGCACTCCGCCTGGGGAGT  
ACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT  
TCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGGGACGTATGTTTGCCAGAGATGGTGACTTGT  
CTTCGGACGCGTCCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTC  
CCGCAACGAGCGCAACCCTCATCTTCAGTTGCCATCATTTAGTTGGCCACTCTGAAGAAACTGCCGGTGA  
CAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGACTACACACGTGCTA  
CAATGGTGGTGACAGTGGGTCGCTAACTCGCGAGAGTATGCTAATCCCTATAAGCCATCTCAGTTCGGAT  
TGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCTCGGTGAATA  
CGTTGCCGGCCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCTTTACCCGTAGCCGGTGCGCTA  
ACCGCAAGGAGGCAGCCGACCACGGTAAGGTCAGCGACTGGGGTG

***Magnetospirillum* sp. WM-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

>gi|114228557|gb|DQ899734.1| *Magnetospirillum* sp. WM-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
ATAGAGTTAGATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAAC  
GAAGTCTTCGGACTTAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAATATACCTCTTGGTGGGGAATAACA  
TCGGGAAACTGATGCTAATACCGCATAACGCCCTTCGGGGAAAGATTTATCGCCGAGAGATTAGCCCGC  
GTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGA  
TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAT  
GGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTCACCC  
ACGACGATGATGACGGTAGTGGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGA  
AGGGGGCTAGCGTTGTTCCGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTGGTCATAGTCAGAAGTGA  
AAGCCCTGGGCTCAACCCGGGAATTGCTTTTTGATACTGGATCGCTAGAATCACGGAGAGGGTAGTGGAA  
TTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTACCTGGCCG  
TCGATTGACGCTCATGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA  
AACGATGAGTGCTAGTTGTTGGGGTGCATGCACCTCAGTGACGCAGCTAACGCGTTAAGCACTCCGCCT  
GGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG  
GTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGGGACGTATGTTTGCCAGAGATGGTG  
ACTTGTCTTCGGACGCGTCCGCACAGGTGCTGCATGCGCTCGGCGTCACCTGCTCGCACAAGGAGGCGG  
GGCCGCTGGTCTACAGCCTGTTGCCCGAGCGCAACCCCTCATCTTCAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACT  
CTGAAGAAACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGG  
CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGTTCGCTAACTCGCGAGAGTATGCTAATCCCTA  
AAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGA  
TCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGCTT  
TACCCGAAGCCGGTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGCCGACCACGGTAAGGTCAGCGACTGGGGTGAAGT  
CGTAACAAGGTAA

***A. magnetotacticum* 16S ribosomal RNA gene**

>gi|142213|gb|M58171.1|ASERRDQ *A. magnetotacticum* 16S ribosomal RNA

geneAACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAAGTCTTCGGACTTAGTGGCGCAC  
GGGTGAGTAACACGTGGGAATATACCTCTTGGTGGGGAATAACGTCGGGAAACTGACGCTAATACCGCA  
TACGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGCCGAGAGATTAGCCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTA  
ATGGCTACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACG  
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGC  
CGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCCACGACGATGATGACGGTAGTGGGAG  
AAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTA  
CTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTGGTCATAGTCAGAAGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCCGGGAATT  
GCTTTTGATACTGGACCGCTAGAATCACGGAGAGGGTAGTGGAATTCCGAGTG TAGAGGTGAAATTCGT  
AGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTACCTGGCCGTSGATTGASSCTCATGTGCGAAAGC  
NTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTTGTTGGGT  
GCATGCACCTCAGTGACGCACGTAACGCGTTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAA  
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAA  
CCTTACCAGCCCTTGACATGGGACGTMTGTTTGCCAGAGATGGTGACTTGTCTTCGGGACGCGTCACAC  
AGGTGCTGCATGGCTGTCGTGCTGAGTGTGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  
TCATCTTCAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACGCTGAAGAACTGCCGGTGACAAGCCNGGAGGAAGGT  
GGGGATGACGTCAAGTCCTCATGCGNNTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGT  
GGGTSSCTAACTCGCGAGGTATGNCTAATCCCTAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCG  
AGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG  
TACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCTTTACCCGAAGCCGGTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAG  
CCGACCACGGTAAGGTCAGCGACTGGGGTG

**Candidatus Magnetoglobus multicellularis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

>gi|120556925|gb|EF014726.1| Candidatus Magnetoglobus multicellularis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

TTTGATCCTGGCTCAGAATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAGAACTCTCCTG  
CTTGCAGGAGATAGTAAAGTGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTGGATAATCTTTCCTTAAATCGGGGATA  
ACATTGCGAAAGCGATGCTAATACCGGATATGATTTATACTTATAAGAGTATAAATCAAAGGTGGTCTCT  
ACATGTAAGCTACCGTTTAAGGGTGAGTCCGCGTACCATTAGCTAGTTGGTGAGATAAAAGCTCACCAAG  
GCGACGATGGTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTAAACACGGTCCAGACTCCTA  
CGGGAGGCAGCAGTGAGGAATTTTTCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATG  
AAGGCTCTCGGGTCGTAAAGCTCTGTCAAGTGGGAAGAAAATATTTAATACGAATAGTGTTAAGTACTGA  
CGGTACCACTGAAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGT  
TATTCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCGCGTAGGCGGTCTTATAAGTCAGATGTGAAATCCCGGGGCTT  
AACCCCGTAAGTGCATTTGAAACTATAAGACTTGAGTATGGGAGAGGGAAGTGAATTCTGGTGTAGC  
GGTGAAATGCGTAGATATCAGGAAGAACATCGGTGGCGAAGGCGACTTCCTGGACCAATACTGACGCTG  
AGGCGCGAAGGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCAGTAAACGTTGAACACT  
AGGTGTGGCGGGTATTGACCCCTGCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGTCCGCTGGGGAGTACGG  
CCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA  
CGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGACTTGACATCTCGGGAATCCACTTGAAAATTTGGAGTGCCCTTCGG  
GGAGCCCGATGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCA  
ACGAGCGCAACCCCTTGTCTTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGAACTCTAAAGATACTGCCCCGGTTAACA  
GGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCTTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATG  
GGATGTACAAAGGGTCGCGAACTCGCAAGAGTGAGCCAATCTCATAAAACATTCCCTAGTTCGGATTGG  
AGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG  
TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGAGAGTTGGTTGTACCAGAAGTTGTTTCAGCTAACC  
TTTATTGGAGGCAAGCACCTAAGGTATGGCCGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTATCCGT

*Desulfovibrio magneticus* strain RS-1 16S ribosomal RNA, complete sequence

>gi|228718692|ref|NR\_027575.1| *Desulfovibrio magneticus* strain RS-1 16S ribosomal RNA,  
complete sequence

AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGTGCGAGAAAGGG  
GACTTCGTTCCCTGAGTAGAGCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTGGATTATCTACCCAGATATTCGGGA  
TAACGGCGGGAAACTGCCGCTAATACCGGATACGCTCCAATTTTCGGTTGGGGAAAGGCGGCCTCTGCT  
TGCAAGCTGTTCGTATCTGGATGAGTCCGCGTCCCATTAGCTTGTGGCGGGTAATGGCCCACCAAGGC  
TACGATGGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACG  
GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGAAACCCTGACGCAGCGACGCCGTGTGAGGGAAGA  
AGGCTTTCGGGTTCGTAAACCTCTGTCCGGAGGGAAGAACCTTCCAGGTCTGAATAAGCCCTGGAAGTGA  
CGGTACCTCCAAAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGT  
TAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCCGCTTTTAAGTCGGACGTGAAAGCCCTCGGCTC  
AACCGAGGAAGTTCGTTTCGAAACTGGGAGGCTTGAGTCCTGGAGAGGGTGGCGGAATTCGGGGTGTAGG  
AGTGAAATCCGTAGATATCCGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGACAGGTACTGACGCTG  
AGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGGATGCT  
AGGTGTCCGGGAGCGATCTTCGGTGCCGCAGTTAACGCATTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGTCCG  
AAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCA  
ACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTTGACATCCCGCAATCCTCCCGAAAAGGAGGAGTGCCCTTCGGGGA  
GCGCGGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGGTAAAGTCCCGCAACG  
AGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGCACTCTAGAGAGCCGCCTCGGTCAACGG  
GGAGGAAGGTGGGGACGACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACGCCAGGGCTACACACGTA CTACAATGG  
TGGGTACAATGGGCTGCGAGACCGCAAGGTGGAGCCAATCCCAAAAAACCCATCCAGTCCGGATCGGG  
GTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGGAGATCAGCATGCTCCGGTGAATACGT  
TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAAAGTTGGTTCTACCCGAAAGCTCCGGGCTAACC  
GCAAGGAGGCAGGAGTCTACGGTAGGGCCGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTAGGGGG  
ACGCGGTTGGATCACCTCCTTA

## ประวัตินักวิจัย

**ชื่อ-สกุล** รองศาสตราจารย์ ดร.สินีนามู ศิริ (Sineenat Siri)  
**สถานที่ทำงาน** สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ.เมือง  
 จ. นครราชสีมา 30000 โทรศัพท์ 044-223305, 089-7119112 โทรสาร 044-224633  
 อีเมลล์: ssinee@sut.ac.th

### ประวัติการศึกษา

วท.บ. (ชีววิทยา เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง)	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	2532-2536
M.Sc. (Biological Science, Emphasis Mol. Biol.)	U. of Southern Mississippi, USA	2537-2540
Ph.D. (Cell Biology, Emphasis Mol. Biol.)	U. of Connecticut, USA	2540-2546

### Publications

2017. Chumpol J and **Siri S\***. Simple green production of silver nanoparticles facilitated by bacterial genomic DNA and their antibacterial activity. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**. DOI: 10.1080/21691401.2017.xxxxxxxx. (IF2016=5.605)
2017. Jaisabai W, Khamhaengpol A and **Siri S\***. Sericins of mulberry and non-mulberry silkworms for eco-friendly synthesis of silver nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**. DOI: 10.1080/21691401.2017.1328686. (IF2016=5.605)
2017. Janthima R, Khamhaengpol A and **Siri S\***. Egg extract of apple snail for eco-friendly synthesis of small silver nanoparticles and their antibacterial activity. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**. DOI: 10.1080/21691401.2017.1313264. (IF2016=5.605)
2017. Khamhaengpol A and **Siri S\***. Composite electrospun scaffold derived from recombinant fibroin of weaver ant (*Oecophylla smaragdina*) as cell-substratum. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 183(1): 110-125. DOI 10.1007/s12010-017-2433-4 (IF2015=1.606)
2017. Khamhaengpol A and **Siri S\***. Green synthesis of silver nanoparticles using tissue extract of weaver ant larvae. **Materials Letters**. 192: 72-75. (IF2015= 2.437)
2017. Busayapongchai P and **Siri S\***. Sensitive detection of estradiol based on ligand binding domain of estrogen receptor and gold nanoparticles. **Analytical Biochemistry**. 518: 60-68. (IF2015=2.243)
2017. Busayapongchai P and **Siri S\***. Estrogenic Receptor-Functionalized Magnetite Nanoparticles for Rapid Separation of Phytoestrogens in Plant Extracts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 181:925-938. DOI: 10.1007/s12010-016-2259-5. (IF2015=1.606)

2017. Busayapongchai P and **Siri S\***. Simple assay for screening phytoestrogenic compounds using oestrogen receptor immobilized magnetite nanoparticles. **IET Nanobiotechnology**. 11(4): 395-402. DOI 10.1049/iet-nbt.2016.0139. (IF2015=1.500)
2016. Khamhaengpol A and **Siri S\***. Fluorescent light mediated a green synthesis of silver nanoparticles using the protein extract of weaver ant larvae. **Journal of Phytochemistry and Phytobiology B: Biology**. 163:337-344. (IF2015=3.035)
2016. Chumwangwapee S, Chingsongnoen A and **Siri S\***. A Plasma modified cellulose-chitosan porous membrane allows efficient DNA binding and provides antibacterial properties: A step towards developing a new DNA collecting card. **Forensic Science International: Genetics**. 25: 19-25. (IF2015=4.988)
2016. Chumpol J and **Siri S\***. Electrospun cellulose acetate membrane for size separating and antibacterial screening of crude polysaccharides. **IET Nanobiotechnology**. 10(6): 405-410. DOI: [10.1049/iet-nbt.2015.0120](https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2015.0120). (IF2015=1.500)
2015. [Chaisri P](#), [Chingsungnoen A](#), [Siri S\\*](#). Repetitive Gly-Leu-Lys-Gly-Glu-Asn-Arg-Gly-Asp Peptide Derived from Collagen and Fibronectin for Improving Cell-Scaffold Interaction. [Apply Biochemistry and Biotechnology](#). 175:2489-2500. (IF2014=1.735)
2013. Chaisri P, Chingsungnoen and [Siri S\\*](#). Repetitive RGD peptide as cell-stimulating agent on electrospun PCL scaffold for tissue engineering. **Biotechnology Journal**. 8: 1232-1331. (IF2012=3.446)
2012. Ngermpimai S, Thomas C, Maensiri S and **Siri S\***. Stability and cytotoxicity of well-dispersed magnetite nanoparticles prepared by hydrothermal method. **Advanced Materials Research**. 506: 122-125. (IF2011=0.220)
2010. **Siri S\***, Wadbua P, Amornkitbamrung V, Kampa N, and Maensiri S. Surface modification of electrospun PCL scaffolds by plasma treatment and addition of adhesive proteins to promote fibroblast cell adhesion. **Materials Science and Technology**. 26: 1292-1297. (IF2009 = 0.794)
2010. Wadbua P, Promdonkoy B, Maensiri S and **Siri S\***. Different properties of electrospun fibrous scaffolds of separated heavy-chain and light-chain fibroins of *Bombyx mori*. **International Journal of Biological Macromolecules**. 46: 493-501. (IF2009 = 2.366)
2010. **Siri S\*** and Maensiri S. Alternative biomaterials: Natural, non-woven, fibroin-based silk nanofibers of weaver ants (*Oecophylla smaragdina*). **International Journal of Biological Macromolecules**. 46: 529-534. (IF2009 = 2.366)
2010. Bophimai P and **Siri S\***. Fatty acid composition of six edible dung beetles in Thailand. **International Journal of Food Research**. 17: 1025-1030.
2009. Daengskul S, Thomas C, Thomas I, Mongkolkachit C, **Siri S**, Amornkitbamrung V and Maensiri S\*. Magnetic and cytotoxicity properties of  $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$  ( $0 \leq x \leq 0.5$ ) nanoparticles prepared by a simple thermal hydro-decomposition. **Nanoscale Research Letters**. 4 (8): 839-845. (IF2008=1.731)

2009. Daengskul S, Mongkolkachit C, Thomas C, **Siri S**, Thomas I, Amornkitbamrung V and Maensiri S\*. A simple thermal decomposition synthesis, magnetic properties, and cytotoxicity of  $\text{La}_{0.7}\text{Sr}_{0.3}\text{MnO}_3$  nanoparticles. **Applied Physics A**. 96: 691-699. (IF2008=1.884)
2009. Daengskul S, Mongkolkachit C, Thomas C, Thomas I, **Siri S**, Amornkitbamrung V and Maensiri S\*. Synthesis and characterization of  $\text{LaMnO}_{3+\delta}$  nanoparticles prepared by a simple thermal hydro-decomposition method. **Optoelectronics and Advanced Materials-Rapid Communications**. 3(2): 106-109. (IF2008= 0.577)
2008. Labuyai S, **Siri S** and Maensiri S\*. Synthesis of yttrium iron garnet ( $\text{Y}_3\text{Fe}_5\text{O}_{12}$ ) nanopowders by a simple proteic sol-gel process. **Journal of Optoelectronics and Advanced Materials**. 10(10): 2694-2699. (IF 2008= 0.577)
2007. **Siri S\***, Kaewjumpol G, Trongpanich Y and Maensiri S. Single and composite electrospun PCL and PLCG fibers and their biological properties. **International Journal of Electrospun Nanofibers and Applications**. 1(1): 29-40.
2007. Kampa N, Waropastrakul S, Thomas W, Suwannachot N, **Siri S\***, Amornkitbamrung V and Maensiri S. Comparison of wound morphology in response to electrospun PCL nanofiber and gauze patches in hamsters. **International Journal of Electrospun Nanofibers and Applications**. 1(3): 195-203.
2007. [Chen MJ](#), [Peter Chiou P](#), [Lin P](#), [Lin CM](#), [Siri S](#), [Peck K](#), [Chen TT\\*](#). Suppression of growth and cancer-induced angiogenesis of aggressive human breast cancer cells (MDA-MB-231) on the chorioallantoic membrane of developing chicken embryos by E-peptide of pro-IGF-I. **Journal of Cellular Biochemistry**. 101(5): 1316-1327. (IF2007 = 3.381)
2007. Trongpanich Y\*, Phimwapi S, Niamsanit S, Wangsomnuk PP, Boonmee M, **Siri S**. Isolation and characterization of bacteria capable of producing pyridoxamine (PM) and pyridoxamine 5'-phosphate (PMP), vitamin B6 compounds. **The Journal of General and Applied Microbiology**. 53(5): 295-299. (IF2007 = 0.925)
2006. **Siri S**, Chen MJ, Chen TT\*. Biological activity of rainbow trout Ea4-peptide of the pro-insulin-like growth factor (pro-IGF)-I on promoting attachment of breast cancer cells (MDA-MB-231) via alpha2- and beta1-integrin. **Journal of Cellular Biochemistry**. 99(6): 1524-35. (IF 2006 = 3.409)
2006. **Siri S**, Chen MJ, Chen TT\*. Inhibition of human breast cancer cell (MBA-MD-231) invasion by the Ea4-peptide of rainbow trout pro-IGF-I. **Journal of Cellular Biochemistry**. 99(5): 1363-73. (IF 2006 = 3.409)
2005. Trongpanich Y\*, Niamsanit S, and **Siri S**. Vitamin B-6 degradation by pyridoxamine-pyruvate transaminase and pyridoxine 4-oxidase from *Ochrobactrum anthropi* and *Enterobacter cloacae*-like bacteria. **ScienceAsia**. 31(3):307-311.

## ประวัตินักวิจัย

**ชื่อ-สกุล** นางสาวสุทธิลักษณ์ ชวัญไตรรัตน์

**สถานที่ทำงาน** ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ. ขอนแก่น 40001

### ประวัติการศึกษา

วท.บ. (จุลชีววิทยา)

มหาวิทยาลัยบูรพา

วท.ม. (Biopharmaceutical Science)

มหาวิทยาลัยมหิดล