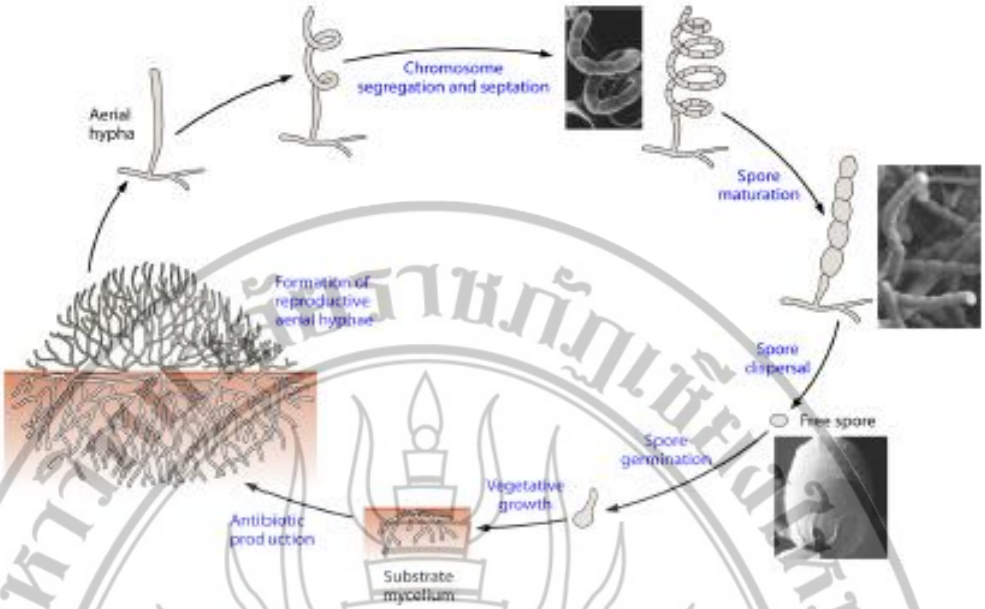
บทที่ 2
แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

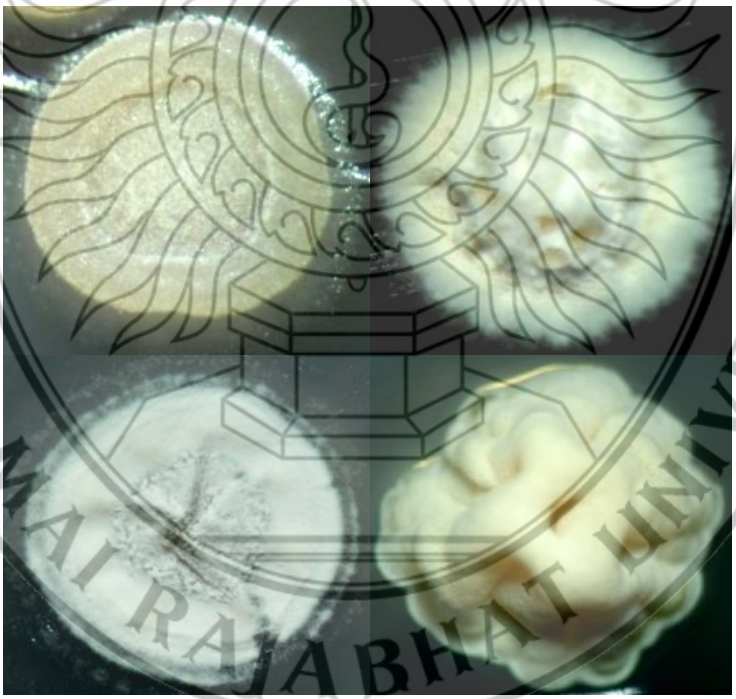
แอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีท (Actinomycete) หรือ แอคติโนแบคทีเรีย (Actinobacteria) จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยมีส่วนเส้นสาย (mycelium) แตกแขนงกิ่งก้านและมีการสร้างสปอร์คล้ายเชื้อรา แต่ลักษณะโคโลนีมีขนาดเล็กฝังแน่นบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงเรียกจุลินทรีย์กลุ่มนี้ว่าแบคทีเรียรูปร่างคล้ายเชื้อรา (พงศ์ระวี, 2558; Barka et al., 2016) แอคติโนมัยซีทจัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มโปรคาริโอตที่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญที่ทำให้แตกต่างจากรา รวมทั้งลักษณะขนาดของเส้นใยมีขนาดเล็กกว่ารา โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมโครเมตร และมีความแตกต่างจากแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป คือ มีปริมาณของเบสกัวนีนและไซโตซีน (G+C) ใน DNA มากกว่าร้อยละ 55 ขึ้นไป (สุจรรยา, 2556; Taechowisan et al., 2009) นอกจากนี้ลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีลักษณะการเจริญของโคโลนีที่เกาะแน่นจมลงไปในอาหาร หรือโคโลนีคล้ายผงหรือฝุ่นแป้ง เนื้อหยาบขุรขระ คล้ายหนังสัตว์ โดยมีการเจริญของเส้นใย 2 ลักษณะ คือ เส้นใยที่เจริญลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เรียกว่า substrate mycelium เพื่อนำสารอาหารไปใช้ได้อย่างเต็มที่ และส่วนของเส้นใยที่เหนือผิวอาหารที่ชูในอากาศ เรียกว่า aerial mycelium เพื่อทำหน้าที่สืบพันธุ์ (ภาพที่ 2.1) โคโลนีของแอคติโนมัยซีทหลายสกุล เช่น *Streptomyces* จะปกคลุมไปด้วยเส้นใยเหนือผิวอาหารที่ห่อหุ้มด้วยชั้นของผิวที่เป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) และเจริญขึ้นสู่ด้านบน ในระยะเริ่มแรกเส้นใยเหนือผิวอาหารมีสีขาวและจะเปลี่ยนเป็นสีต่างๆ เมื่อเริ่มมีการสร้างสปอร์ ทำให้เห็นโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายผงแป้งหรือคล้ายกำมะหยี่ (ภาพที่ 2.2) โดยมีสีของเส้นใยใต้ผิวอาหารและเส้นใยเหนือผิวอาหารหลากหลายสี บางชนิดมีการสร้างรงควัตถุสี (pigment) ที่ละลายน้ำแพร่ออกมาในอาหาร ได้แก่ สีขาว น้ำตาล เหลือง ส้ม ชมพู ดำ เทา และแดง เป็นต้น (สุจรรยา, 2556; William, 1989; Barka et al. 2016)

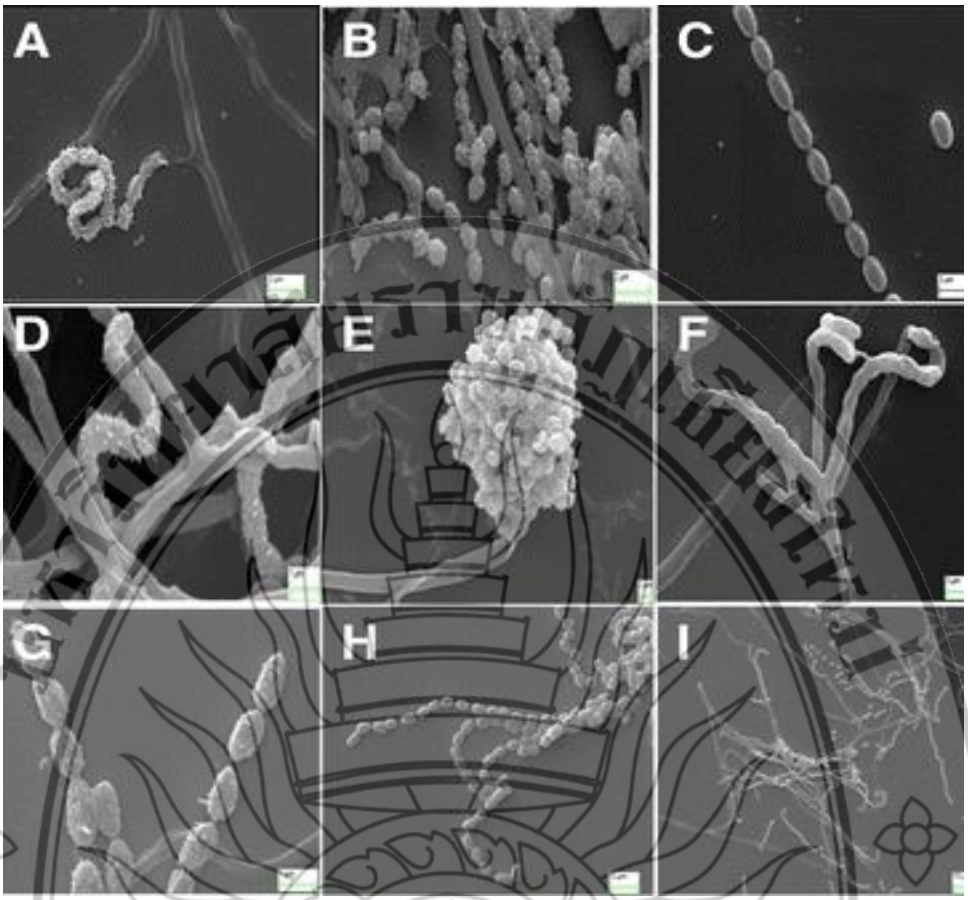
แอคติโนมัยซีทสามารถสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า conidiospore หรือ conidia และสปอร์ที่อยู่ในถุงห่อหุ้ม sporangium ที่เรียกว่า sporangiospore เส้นใยเหนือผิวอาหารมีการเจริญแตกกิ่งก้านยึดเกาะกันไปมา ทำให้เห็นโคโลนีมีลักษณะคล้ายแผ่นหนังและเจริญฝังแน่นลงในเนื้ออาหาร ส่วนโคโลนีที่มีลักษณะอ่อนนิ่มและร่วนเกิดจากเส้นใยแตกหัก โดยสายสปอร์เรียงตัวในลักษณะที่แตกต่างกันไป เช่น สายตรง เกลียวอยู่บนก้านชูสปอร์ (conidiophore) หรือโค้งงอ เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 2.3 ซึ่งรูปร่างของสปอร์ช่วยในการระบุและจัดจำแนกแอคติโนมัยซีท (พงศ์ระวี, 2558; สุจรรยา, 2556)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะการเจริญของเส้นใยของแอคติโนมัยซีทที่สร้างขึ้นเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) และเส้นใยที่สร้างลงไปในอาหาร (substrate mycelium)
ที่มา: Barka et al. (2016)



ภาพที่ 2.2 ลักษณะโคโลนีแอคติโนมัยซีทที่เจริญบนผิวหน้าอาหารแข็ง



ภาพที่ 2.3 ลักษณะสปอร์ของแอคติโนมัยซีทภายใต้ scanning electron microscopy
ที่มา: Sengupta et al. (2015)

แอคติโนมัยซีทที่อยู่ในธรรมชาติเป็นกลุ่มซาโพรไฟต์ ที่มีบทบาทสำคัญทางนิเวศวิทยา ช่วยให้มีการหมุนเวียนของสารต่างๆในธรรมชาติ โดยการช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ ให้นำกลับ ไปใช้ใหม่ แอคติโนมัยซีทสามารถพบได้ทั่วไปตามแหล่งธรรมชาติทั่วไป ทั้งดิน น้ำจืด และน้ำทะเล โดยกลิ่นดินที่เกิดหลังจากฝนตกใหม่ๆ เกิดจากสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ เรียกว่า จีออสมิน ที่แอคติโนมัยซีทสร้างออกมา นอกจากนี้แอคติโนมัยซีทบางกลุ่มเป็นพวกพาราไซต์สามารถก่อให้เกิดโรคในสิ่งมีชีวิตได้ เช่น *Nocardia* spp. เป็นเชื้อฉวยโอกาสทำให้เกิดโรค Cardiosis ในคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำหรือบกพร่อง (Abreu et al., 2015) *Actinomadura* ก่อโรคมายซีโทมาที่ทำให้เท้าเป็นปุ่มปมและเน่า (Barka et al., 2016) *Mycobacterium* ก่อให้เกิดวัณโรค (Smith, 2003)

แอคติโนมัยซีทเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันพอสมควรคือ นอกจากจะพบในดินที่เป็นสภาพธรรมชาติแล้วยังพบในกองปุ๋ย ในโคลนแม่น้ำ ทะเลสาบ แต่โดยปกติมักจะเจริญอยู่ผิวดินหรือในดินที่ไม่ลึกไปกว่า 4 เซนติเมตร ในดินที่มีสภาพความเป็นด่างจะพบแอคติโนมัยซีทจำนวนมากว่าแบคทีเรีย โดยในดินที่มีค่า pH 6.5-8 จะมีแอคติโนมัยซีทสูงถึงร้อยละ 95 ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด แต่ในดินที่มีความเป็นด่างทั่วไปๆจะพบ ประมาณร้อยละ 10-70 ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด แอคติโนมัยซีทมีความสามารถในการทนความแห้งแล้งได้ดี ทำให้พบในดินเขตร้อนมากกว่าอบอุ่น ได้แก่ บริเวณทุ่งหญ้าธรรมชาติ ทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ (จามจุรี และคณะ 2555) แอคติโนมัยซีทที่กระจายตัวตามแหล่งดินธรรมชาติจะมีชนิดและจำนวนแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมและองค์ประกอบ

ของดิน ซึ่งมีความสำคัญต่อนิเวศวิทยาของดิน เพราะเป็นตัวบ่งบอกถึงพื้นผิวที่จุลินทรีย์เจริญและอาศัย โดยโครงสร้างของดินมีผลต่อการเคลื่อนที่และเกาะติดจุลินทรีย์ ส่วนอนุภาคของดินที่มีขนาดเล็กทำให้สามารถกักเก็บสารอาหารต่างได้ดี และฮิวมิคในดินจัดเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการดำรงอยู่และกระจายตัวของแอคติโนมัยซีท โดยที่ระดับความลึกประมาณ 5 เซนติเมตร จะพบแอคติโนมัยซีทถึง 2 ล้านกว่าเซลล์ต่อดินประมาณ 1 กรัม ในขณะที่ความลึกมากกว่านี้จะทำให้พบจุลินทรีย์ลดลง (พงศ์ระวี, 2558) โดยปัจจัยทางด้านสารอาหาร สภาวะแวดล้อม เช่น pH อุณหภูมิ ความชื้น ถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญต่อการจำนวนและการเจริญของแอคติโนมัยซีท โดยอุณหภูมิในดินที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 25-30 °C มีค่า pH กว้างตั้งแต่ 3.5-9.0 และส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (Edward, 1993; Barka et al., 2016)

แอคติโนมัยซีทกลุ่ม Streptomycetes เป็นกลุ่มหลักที่พบตามดินและเจริญได้ในอาหารส่วนมาก แต่ถ้าต้องการให้มีการสร้างสปอร์ด้วยนั้น ต้องเลี้ยงในอาหารที่มีสัดส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนค่อนข้างสูง อาหารที่นิยมใช้ ได้แก่ glucose yeast extract-malt extract, oatmeal, inorganic salt-starch และ glycerol-asparagine agar ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้ในโครงการศึกษา Streptomycetes นานาชาติ (The International Streptomycetes Project, ISP) ส่วนมาก Streptomycetes สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 10-37°C ดังนั้นจึงเป็นพวก mesophiles อย่างไรก็ตามหลายชนิดสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 37 °C อย่างไรก็ตามเนื่องจาก *Streptomyces* มีหลายชนิดจึงมีความหลากหลายในความต้องการสารอาหาร ดังนั้นจึงเป็นการยากเหมือนกัน ที่จะสรุปว่าอาหารที่เหมาะสมในการแยกเชื้อทั่วๆไป สำหรับ Streptomycetes ควรจะมีอะไรเป็นองค์ประกอบอยู่บ้าง จึงทำให้ยากที่จะสร้างเป็นสูตรอาหารที่มีความจำ เพาะสำหรับ Streptomycetes และพวกแบคทีเรีย หรือเชื้อราอื่นๆ จะไม่เจริญขึ้นมาด้วย เนื่องจากทั้งราและแบคทีเรียสามารถเจริญเร็วกว่า Streptomycetes ดังนั้นในการเตรียมอาหารสำหรับการแยกเชื้อส่วนมากก็จะเติมสารที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นลงไปพร้อมกับอาหารช่วยให้ Streptomycetes มีการเจริญ เช่น การเติมสาร nystatin หรือ cycloheximide ในปริมาณ 50-100 µg/ml นอกจากนี้ก็ต้องมีวิธีการแยกเชื้อที่ช่วยกำจัดแบคทีเรียอื่นๆ ที่ไม่ต้องการออกไปด้วย อาทิ การนำตัวอย่างดินมาทำพรีทรีทเม้นท์ (pre-treatment) ก่อน เช่นนำมาเจือจางในน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อแล้วเขย่า หรือนำดินมาอบด้วยความร้อน หรืออาจต้องใช้เครื่องอัลตราโซนิกช่วยด้วย (พงศ์ระวี, 2558; อำไพทิพย์ม 2553)

จากการศึกษาของ Xu et al. (1996) ที่ศึกษาความหลากหลายของแอคติโนมัยซีทจากดินในสภาวะต่างๆของจีน พบว่าดินที่นำมาศึกษามีจำนวนแอคติโนมัยซีท กลุ่ม *Streptomyces* มากที่สุด โดยพบร้อยละ 86 ในดินจากเขตป่าฝน ส่วนดินเขตอากาศเย็นอุณหภูมิ 5 °C ตลอดทั้งปีพบร้อยละ 97 และดินบริเวณเยือกแข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 °C พบร้อยละ 83 โดยจำนวนที่เหลือเป็นกลุ่มแอคติโนมัยซีท *Micromonospora*,*Streptosporangium*, *Actinomadura*, *Saccharopolyspora* และ *Norcadia* ส่วนชนินทร์ และคณะ (2546) คัดแยกแอคติโนมัยซีทจากดินในป่าเบญจพรรณและป่าเต็งรัง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ห้วยขาแข้ง โดยคัดแยกแอคติโนมัยซีท 160 และ 186 ไอโซเลท ตามลำดับ ส่วน ใหญ่เป็นแอคติโนมัยซีทใน *Streptomyces* ในขณะที่ กิ่งจันทน์ (2558) พบแอคติโนมัยซีท *Streptomyces*, *Microbispora* และ *Microtetraspora* จากดินรอบรากของกล้วยไม้ ดินใต้ต้นไม้ ดินบริเวณที่เห็ดเจริญ และดินจอมปลวก บริเวณอุทยานแหงชาติภูลังกา จังหวัดนครพนม ส่วนการรายงานของ Wang et al. (1999) พบแอคติโนมัยซีท *Actinopolymorpha* จากดินในป่าเขต

ร้อน (tropical rainforest) ในประเทศสิงคโปร์ นอกจากนี้ สามารถพบแอคติโนมัยซีทได้จากดินในป่าต่างๆ เช่น ป่าสนในอเมริกาเหนือและอินเดีย ป่าฝนเขตร้อนใน สิงคโปร์ ป่าภูเขาในญี่ปุ่น ป่าใบแข็งในออสเตรเลีย เป็นต้น El-Tarabily (2006) คัดแยก *Streptomyces* และ non-*Streptomycete* actinomycetes จากดินบริเวณรอบพืชแตงกวา ซึ่งไอโซเลตที่คัดแยกได้มีความสามารถในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*

แอคติโนมัยซีทเป็นจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพและสามารถสร้างสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิหลากหลายกลุ่ม เช่น pigment สารพิษ ฮอร์โมนพืช เอนไซม์ และสารปฏิชีวนะ ที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจและเกี่ยวข้องต่อการดำรงชีวิต ได้แก่ ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด (antibiotics) เช่น ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย รา ไวรัส โปรโตซัว (Manivasagan et al., 2016) รวมทั้งสามารถต้านเซลล์มะเร็ง (anti-cancer) หรือเซลล์เนื้องอก (anti-tumor) (Abd-Elnabya et al., 2016) ส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช เช่น phytohormone, siderophores และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น nitrogen fixation, nutrient composition และ systermic disease resistance (Doumbou et al., 2002; El-Tarabily et al. 2006) และสร้างเอนไซม์ไคติเนส กลูแคนเนส (El-Tarabily, 2006) เคราติเนส เพกทิเนส ไลเปส (Mukhtar et al., 2017) ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากจุลินทรีย์นับ 10,000 ชนิดนั้น เกินครึ่งผลิตมากจากแอคติโนมัยซีทและมีถูกนำมาผลิตเป็นยาที่สำคัญในการบำบัดรักษาโรคในปัจจุบัน ในบรรดาแอคติโนมัยซีททั้งหมด สกุล *Streptomyces* เป็นสกุลที่มีการแพร่กระจายอย่าง

อนุภาคนาโน

นาโนเทคโนโลยี (nanotechonolgy, NT) ได้ถูกนิยามขึ้นครั้งแรกโดย Professor Norio Taniguchi ในปี ค.ศ. 1974 และได้ถูกนำไปใช้ในการเป็นวัตถุดิบในการผลิตทางอุตสาหกรรมต่างๆ มากมายจนถึงปัจจุบัน กระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโน (nanoparticles, NPs) ซึ่งมีขนาด ≤ 100 nm จะใช้ธาตุโลหะต่างๆ เช่น เงิน (Ag) ทอง (Au) แพลตินัม (Pt) ซิลิเนียม (Se) เป็นต้น (Alghuthaymi et al., 2015) ปัจจุบันนาโนเทคโนโลยีของโลหะเป็นที่สนใจเนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับสารชนิดเดียวกันที่มีขนาดใหญ่ ขนาดของอนุภาคนาโนที่นำไปประยุกต์ใช้ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 1–100 นาโนเมตร ซึ่งเป็นระดับขนาดที่มีความน่าสนใจทางนาโนเทคโนโลยีเป็นอย่างมาก และมีโลหะมากมายที่นำมาสังเคราะห์ให้มีขนาดระดับนาโนเพื่อการนำไปประยุกต์ใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เช่น โลหะเงิน (Silver, Ag) โลหะทอง (Gold, Au) โลหะทองแดง (Copper, Cu) เป็นต้น (ปวีณา และคณะ 2559, Kalimuthu, et al., 2008) อนุภาคซิลเวอร์นาโนสามารถประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนในอุตสาหกรรมที่หลากหลาย เช่น อิเล็กทรอนิกส์ การแพทย์ เคมี การเกษตร สิ่งแวดล้อม เป็นต้น (สนอง, 2558) หนึ่งในอนุภาคนาโนที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบันคืออนุภาคเงินนาโน เนื่องจากมีสมบัติที่พิเศษ (กานต์พิมล และ รินา, 2560; Ge et al., 2014) คือ

1. สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดังนั้นจึงถูกนำไปใช้ร่วมกับผลิตภัณฑ์ต่างๆ เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับสินค้า เช่น เสื้อผ้า ระบบกรองน้ำ เครื่องมือทางการแพทย์ เครื่องสำอาง อุปกรณ์ไฟฟ้า และเครื่องใช้ภายในบ้าน

2. มีสมบัติทางแสง ทำให้เหมาะกับการนำไปประยุกต์ใช้ในงานไบโอเซ็นเซอร์

3. มีสมบัติเป็นตัวนำไฟฟ้า จึงถูกนำไปประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมในหมึกตัวนำ กาว และแป้งเปียก สำหรับใช้ในอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และ

4. เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาต่างๆเช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชันของสไตรีน

การสังเคราะห์อนุภาคนาโน

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนสามารถทำได้หลายวิธีได้แก่ การสังเคราะห์โดยอาศัยปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction reaction) ปฏิกิริยาทางเคมีและเคมีโฟโตเคมิคัล (Chemical and photochemical reaction) การสลายตัวโดยใช้ความร้อน (Thermal decomposition method) กระบวนการทางอิเล็กโตรเคมิคัล (Electrochemical method) และการใช้ไมโครเวฟในการสังเคราะห์ (Microwave assisted synthesis) เป็นต้น (สนอง, 2558) ซึ่งสามารถแบ่งวิธีการที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในปัจจุบันได้ 3 วิธีการ (กานต์พิมล และ รินา, 2560) ดังนี้

1. การสังเคราะห์โดยวิธีการทางเคมี (chemical approach) วิธีการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนด้วยวิธีการทางเคมีเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เนื่องจากสามารถสังเคราะห์ได้ในปริมาณมาก ควบคุมขนาดและรูปร่างได้ง่าย ในการสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมีประกอบไปด้วยส่วนประกอบหลัก 3 ส่วนคือ

1.1 เกลือของซิลเวอร์(silver salt) ที่นิยมใช้คือซิลเวอร์ไนเตรต

1.2 ตัวรีดิวซ์ (reducing agent) เช่น sodium citrate, ascorbate, sodium borohydride ($NaBH_4$), elemental hydrogen, polyol process, Tollens reagent, และ N, N-dimethylformamide (DMF) เป็นต้น ซึ่งตัวรีดิวซ์มีหน้าที่รีดิวซ์ Ag^+ ในสารละลายให้กลายเป็น Ag^0

1.3 สารให้ความคงตัว (stabilizer) หรือ capping agent โดยส่วนมาก นิยมใช้สารพอลีเมอร์ เช่น poly(vinyl alcohol), polyvinylpyrrolidone, poly(ethylene glycol), poly (methacrylic acid), และ poly(methyl methacrylate) เป็นต้น ซึ่งสารให้ความคงตัวมีหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและป้องกันการรวมตัวกันของอนุภาคเงินนาโน

การสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนที่มีการผสมซิลเวอร์ไนเตรตกับ polyvinyl pyrrolidone จากนั้นค่อยๆ หยด sodium citrate ลงไปในสารละลายผสม กวนสารละลายเป็นเวลา 1 ชั่วโมง สีสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว แสดงให้เห็นว่าซิลเวอร์ไอออนถูกเปลี่ยนเป็นอนุภาคเงินนาโนจากนั้นทำการตกตะกอนเพื่อแยกเอาอนุภาคเงินนาโนไปพิสูจน์เอกลักษณ์ต่อไป นอกจากนี้ยังมีหลายงานวิจัยที่ในขั้นตอนการสังเคราะห์ยังมีการใช้ตัวทำละลายเช่น เอทานอล ไดเมทิล-ฟอร์มาไมด์เอทิลีนไกลคอล โทลูอีน และคลอโรฟอร์ม เป็นต้น จะเห็นว่าการสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้ใช้สารเคมีค่อนข้างมากซึ่งสารเคมีเหล่านี้มีความเป็นพิษส่งผลให้เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต สิ่งแวดล้อม และส่งผลให้มีต้นทุนในการผลิตสูง อีกทั้งยังพบว่าสารเคมีที่เป็นพิษบางชนิดมีโอกาสปนเปื้อนที่บริเวณพื้นผิวของอนุภาคเงินนาโน ทำให้ไม่เหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านชีวการแพทย์ (กานต์พิมล และ รินา, 2560)

2. การสังเคราะห์โดยวิธีการทางกายภาพ (physical approach) เป็นอีกหนึ่งวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากอนุภาคเงินนาโนที่สังเคราะห์ได้มีความบริสุทธิ์สูง สามารถควบคุมขนาด รูปร่าง และปริมาณของอนุภาคเงินนาโนได้ง่าย แต่ข้อเสียคือเครื่องมือที่ใช้มีราคาแพงทำให้มีต้นทุนในการผลิตสูง การสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางกายภาพโดยทั่วไปจะใช้วิธีการระเหยและควบแน่น(evaporation–condensation) โดยใช้เตาเผาแบบหลอดแก้ว (tube furnace) ที่ความดันบรรยากาศ แต่ข้อเสียของการใช้เตาเผาแบบหลอดแก้วคือต้องใช้พลังงานสูงและใช้เวลานานเพื่อทำให้ความเกิดความเสถียรทางความร้อน ดังนั้นจึงมีการใช้เซรามิคฮีตเตอร์ขนาดเล็ก (small ceramic heater) เนื่องจากไอที่เกิด

จากการระเหยจะควบแน่นกลับมาในอัตราเร็วที่เหมาะสมทำให้พื้นผิวของฮีตเตอร์สามารถถ่ายเทความร้อนได้ดี นอกจากนี้อุณหภูมิที่พื้นผิวของฮีตเตอร์ยังค่อนข้างคงที่ตลอดเวลาทำ ให้อนุภาคเงินนาโนที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเล็กและมีความเข้มข้นสูง อีกหนึ่งวิธีที่นิยมใช้ในสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโน คือวิธีการยิงด้วยเลเซอร์(laser ablation) ซึ่งสามารถควบคุมขนาดและรูปร่างได้ง่ายด้วยการควบคุมปัจจัยต่างๆ เช่น ความยาวคลื่นของเลเซอร์ ความเข้มของแสงเลเซอร์ และเวลาในการยิงเลเซอร์ เป็นต้น (กานต์พิมล และ รินา, 2560)

3. การสังเคราะห์โดยวิธีการทางชีวภาพ (biological approach) ปัจจุบันนักวิจัยให้ความสนใจการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนด้วยวิธีทางชีวภาพมากขึ้น เนื่องจากสามารถลดการใช้สารเคมีที่เป็นพิษและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทางชีวภาพ จะใช้สารจากธรรมชาติที่ได้จากพืชและจุลินทรีย์เป็นตัวรีดิวซ์ ได้แก่ proteins, polypeptides, nucleic acids และ plant extract ถือว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ประหยัดไม่ต้องลงทุนสูงด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ ควบคุมปฏิกิริยาได้ง่าย ปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์ และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมโดยใช้ตัวทำละลายที่ไม่เป็นพิษ (ปวีณา และคณะ, 2559; Bagherzade et al., 2017; Ahmed et al., 2015) ข้อดีของวิธีการสังเคราะห์ทางชีวภาพ คือใช้สารเคมีในปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการสังเคราะห์ทางเคมีและทางกายภาพ เนื่องจากสารชีวโมเลกุลที่อยู่ในจุลินทรีย์และสารสกัดจากพืชสามารถเป็นได้ทั้งตัวรีดิวซ์และสารให้ความคงตัว ทำให้มีต้นทุนในการผลิตต่ำ แต่ข้อเสียคือควบคุมขนาด รูปร่าง ความเป็นผลึกได้ยาก

อนุภาคนาโนจากแอคติโนมัยซีท

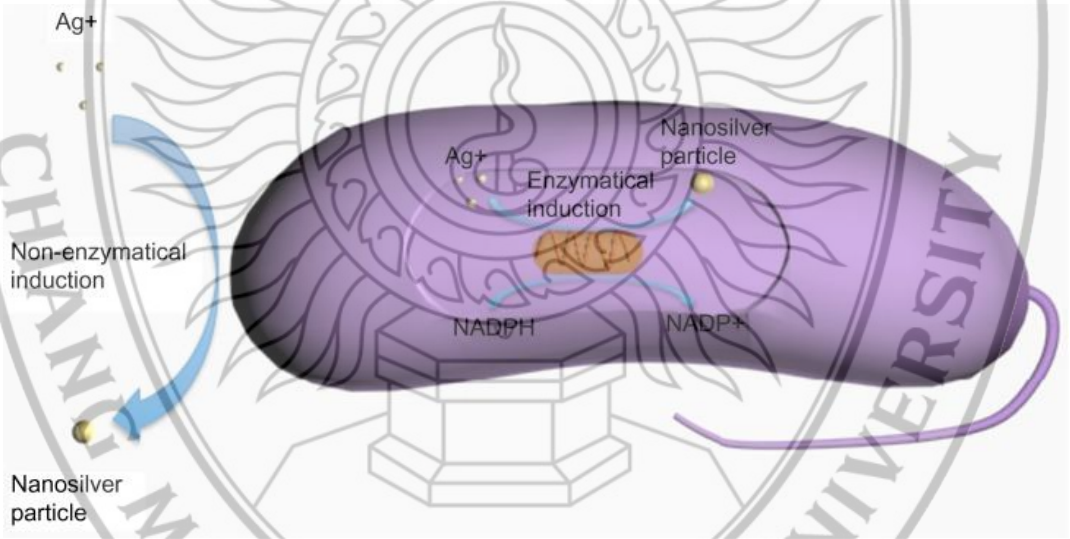
การสังเคราะห์อนุภาคนาโนด้วยจุลินทรีย์เป็นกลุ่มที่น่าสนใจมากที่สุด เนื่องจากเซลล์ของจุลินทรีย์สามารถสร้างสารแมทาบอไลท์หลากหลายชนิด ได้แก่ proteins, polypeptides, nucleic acids ที่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ไอออน Ag^{+} กลายเป็นอนุภาค Ag-NPs และเซลล์จุลินทรีย์ยังสามารถนำธาตุโลหะเหล่านั้นไปใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึมและการเจริญของเซลล์ช่วยช่วยบำบัดย่อยสลายโลหะที่เป็นพิษในสิ่งแวดล้อม (Saminathan, 2015) จุลินทรีย์แตกต่างชนิดกันส่งผลต่อกลไกในเกิดอนุภาคนาโนได้ต่างกัน ซึ่งทั่วไปมีกลไกในการสร้างโดยเริ่มต้นที่ไอออนของโลหะจะยึดจับบริเวณพื้นผิวของเซลล์หรือบริเวณภายในเซลล์ หลังจากนั้นไอออนของโลหะจะถูกรีดิวซ์เป็นอนุภาคนาโนในสภาวะที่มีเอนไซม์เข้ามาช่วยเร่งปฏิกิริยา กลไกดังกล่าวจะพบในการสร้างอนุภาคนาโนของ gold และ silver NPs, heavy metallic NPs, magnetic NPs และ sulfide NPs

กลไกการสังเคราะหในปจจุบันมีนักวิจัยใหความสนใจเกี่ยวกับการ สังเคราะหอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากจุลินทรีย์มากขึ้น แมวาจะยังไมทราบกลไกการสังเคราะหที่แนนอน แตก็มีขอสันนิษฐานวาสารประกอบที่เซลล์จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นมา เชน วิตามิน กรดอินทรีย พอลิแซ็กคาไรด โปรตีน และคารโบไฮเดรต มีสวนชวยในการรีดิวซและทำหนาที่เปนสารใหความคงตัว (Ahmad et al., 2010) จาก การศึกษาดวยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปพบวา สารเหลานี้มีหมูไฮดรอกซิล คารบอนิล และเอมีน ซึ่งหมู่ฟงชันกเหลานี้มีบทบาทในการรีดิวซซิลเวอรไอออน นอกจากนี้ยังทำหนาที่เปนสารใหความคงตัวซึ่งชวยให อนุภาคเงินซิลเวอร์นาโนมีความเสถียรมากขึ้นและชวยไมใหเกิดการรวมตัวของอนุภาคซิลเวอร์นาโนกลายเปนอนุภาคที่มีขนาดใหญ สารที่มีบทบาทในการเปนตัวรีดิวซ์ (กานต์พิมล และ รินา, 2560)

ซึ่งจุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างสารชีวโมเลกุลที่สำคัญต่างๆมากมายจากกระบวนการ metabolism ได้แก่ โปรตีน เปปไทด์ คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นตัว reducing agents และเป็นตัว capping agents ที่สำคัญของกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน ดังนี้ $2AgNO_3$ (s) + cellular fluid (aq) 2Ag (s) + O_2 (g) + $2NO_2$ (g) + cellular fluid (aq) (Li et al., 2011; Balashanmugam et al., 2016)

โดยการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนชีวภาพของเซลล์จุลินทรีย์ ได้มีการอธิบายกลไกการสังเคราะห์ เป็น 2 แบบ คือ แบบที่อาศัยเอนไซม์เป็นตัวตัวรีดิวซ์ (enzymatic reduction) และแบบที่ไม่อาศัยเอนไซม์เป็นตัวรีดิวซ์ (non-enzymatic reduction) (ภาพที่ 2.4)

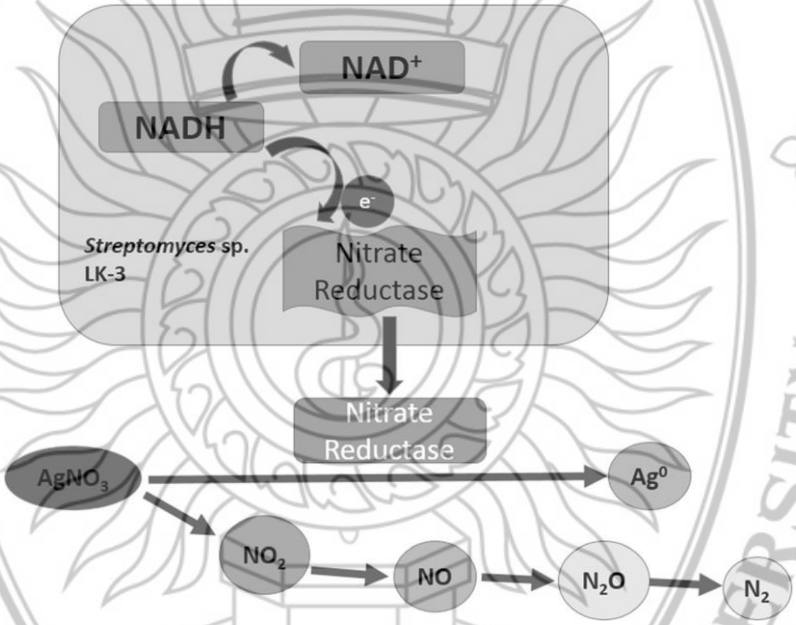
การสังเคราะห์ที่อาศัยเอนไซม์นั้นเกิดจากเอนไซม์ nicotinamide adenine dinucleotide phosphatedependent reductase ที่สร้างจากเซลล์ที่สามารถรีดิวซ์ไอออนของโลหะเงิน (Ag^+) เป็นอนุภาคซิลเวอร์นาโนได้ โดยพบว่าจะปฏิกิริยาที่เกิดการสังเคราะห์จะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ภายในระยะเวลา 24-120 ชั่วโมง ในขณะที่มีการอธิบายกลไกของการสังเคราะห์อนุภาคนาโนโดย ไม่อาศัยเอนไซม์คล้ายกับการสังเคราะห์แบบ chemical reduction แต่สารที่ทำหน้าที่เป็นตัว reducing agents และ stabilizing agents สร้างและปล่อยออกมาจากจุลินทรีย์ ซึ่งจะใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่เร็วกว่า ซึ่งจะเกิดขึ้นได้ดีภายใต้สภาวะและปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ เช่น pH อุณหภูมิ และระดับความเข้มข้นของสารละลายเกลือ $AgNO_3$ (Ge et al., 2014)



ภาพที่ 2.4 กลไกการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนโดยเซลล์จุลินทรีย์
ที่มา: Ge et al. (2014)

ส่วนในจุลินทรีย์บางชนิดที่เกิดอนุภาคนาโนภายในเซลล์ เช่น เซลล์ของเชื้อรา *Verticillium* sp. และสาหร่าย แต่ก็ยังไม่สามารถเข้าใจถึงกลไกได้ ซึ่งตามความเป็นจริงน่าจะอธิบายได้ว่าอนุภาคนาโนจะถูกสร้างบริเวณส่วนพื้นผิวของเซลล์เชื้อราโดยการกระทำของแรงของประจุไฟฟ้า (electrostatic interaction) ระหว่างไอออนบวกของโลหะและไอออนลบบริเวณผนังเซลล์ซึ่งเป็นประจุของหมู่ carboxy group ในโมเลกุลของเอนไซม์ หลังจากนั้นเอนไซม์จะเป็นตัวรีดิวซ์ให้ประจุ

ของโลหะเกิดการสร้างเป็นอนุภาค gold หรือ silver nuclei แล้วขยายเพิ่มปริมาณมากขึ้น (Zhang et al., 2011) ในเซลล์จุลินทรีย์คาดว่าเอนไซม์ nitrate reductase น่าจะมีส่วนสำคัญและเกี่ยวข้องในปฏิกิริยา โดยเอนไซม์นี้จะถูกชักนำโดยประจุของไนเตรทแล้วไปรีดิวซ์ไอออนของซิลเวอร์เป็น meatallic silver ซึ่งจากกลไกนี้น่าจะอธิบายได้ว่าเอนไซม์ NADH-dependent nitrate reductase enzymes เป็นปัจจัยสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของโลหะด้วยเซลล์จุลินทรีย์ผ่านกระบวนการปฏิกิริยาที่เรียกว่า electron shuttle enzymatic metal reduction (ภาพที่ 2.5) อนุภาคของซิลเวอร์นาโนมีพื้นที่ผิวมากทำให้โอกาสการสัมผัสกับเชื้อจุลินทรีย์มีมากเป็นผลให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มสูงขึ้น อนุภาคซิลเวอร์นาโนจะมีปฏิกิริยาต่อโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์จุลินทรีย์ ดังนั้นเมื่ออนุภาคซิลเวอร์นาโนสัมผัสกับจุลินทรีย์ มันจะไปเกาะที่ผนังเซลล์และแทรกเข้าไปภายในโดยจะไปเกาะกับหมู่ –SH (Sulfphydryl) ของเอนไซม์ ซึ่งจะมีผลต่อระบบเมทาบอลิซึม ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และเกิดการทำลายระบบหายใจระบบการขนย้ายอิเล็กตรอนในกระบวนการเมทาบอลิซึมและระบบขนย้ายซับสเตรทในเยื่อหุ้มเซลล์ (Zhang et al., 2011; Kalishwaralal et al., 2008)



ภาพที่ 2.5 กระบวนการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากเชื้อแอคติโนมัยซีท
ที่มา: Golinska et al. (2014)

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนจากเซลล์จุลินทรีย์ต้องอาศัยสภาวะต่างๆที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ pH อุณหภูมิ ซึ่งต้องมีการควบคุมให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ แต่อย่างไรก็ตามอนุภาคนาโนจากเซลล์จุลินทรีย์ก็ยังมีข้อดีกว่าเนื่องจากสามารถผลิตได้ปริมาณสูงและประหยัดค่าใช้จ่ายการผลิต (Asharani et al., 2009) ซึ่งเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนจะพบว่าส่วนใหญ่จะมีลักษณะกลม (spherical particles) มีการศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ชักนำด้วยสารแมทาบอไลท์จากภายในเซลล์ (intracellular metabolite) และ ภายนอกเซลล์ (extracellular metabolite) เพื่อศึกษาคุณสมบัติของอนุภาคซิลเวอร์นาโนและฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ อาทิ

antibacterial, antifungal และ anticancer เป็นต้น Nejad et al. (2015) ได้ศึกษาและพัฒนาอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces somaliensis* พบว่ามีรูปร่างกลม ขนาด 5-35 nm และสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm นอกจากนี้ยังมี Buszewski et al. (2018) ศึกษาอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากเชื้อ *Streptacidiphilus durhamensis* HGG16n โดยอนุภาคซิลเวอร์นาโนมีรูปร่างกลม (spherical shape) ขนาด 8-48 nm ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชัน C-N (aliphatic groups of amide), C=O (stretch carbonyl groups) และ C-Br (stretch halo compounds)สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Bacillus subtilis*

Sastry et al. (2003) รายงานการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces* sp. TG-1 ที่แยกได้จากดินประเทศอินเดีย สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 nm มีรูปร่างแบบไม่แน่นอน (irregular shape) เมื่อวิเคราะห์ FT-IR พบว่าประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชัน N-H (stretch primary amine), C=C (stretch alkene), C=O (stretch aliphatic ether) โดยอนุภาคซิลเวอร์นาโนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชได้แก่ *P.* aeruginosa, *K. pneumoniae* และ *E. coli*

Krishnakumar and Bai (2015) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพภายนอกเซลล์จากเชื้อ *Streptomyces* sp-SBU3 ที่อยู่บนสวนดินแดง และศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคพืช ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้ทาการสังเคราะห์โดยเลือกไอโซเลท *Streptomyces* sp. SBU3 มาใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ และสังเคราะห์เอาสารภายนอกเซลล์ มาทดสอบกับสารละลาย 1 มิลลิโมลาร์ ซิลเวอร์ไนเตรต โดยสีของน้าเลี้ยงเซลล์ที่สังเคราะห์ขึ้นได้นั้น จะเปลี่ยนจากสีซีดจางเป็นสีน้าตาล ซึ่งยืนยันจากการนาไปวิเคราะห์โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Vis Spectrophotometer) มีค่ารัศมีการยับยั้งเท่ากับ 0.70 และทราบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และสามารถใช้ควบคุมโรคพืชได้ อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพที่สังเคราะห์ขึ้นได้นั้นมีค่าการยับยั้งของแบคทีเรีย *B. compestris* ที่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา *Fusarium oxysporium* อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพที่สังเคราะห์จากเชื้อ *Streptomyces* sp. –SBU3 มีแนวโน้มที่จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืช และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

Abd-Elnaby et al. (2016) สังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces* rochei MHM 13 ที่แยกได้จากดินตะกอนบริเวณชายฝั่งของทะเลแดง ประเทศอียิปต์ มีรูปร่างกลม (spherical shape) ขนาด 22-85 nm และสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm เมื่อวิเคราะห์ FT-IR พบว่าประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชัน N-H (stretch primary amine), C=H (stretch alkane), O=C=O (stretch carbon dioxide) C=C (stretch alkene), C=H (bend alkane), C=O (stretch aliphatic ether), C=Cl หรือ C=Br (stretch halo compounds) แล้วสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทางการแพทย์ *Vibrio fluvialis*, *Salmonella typhimurium*, *P. aeruginosa*, *V. damsela*, *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *B. cereus*

Wypij et al. (2018). ศึกษาคุณสมบัติของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพน้ำเลี้ยงเซลล์ของแอคติโนมัยซีท *Streptomyces xinghaiensis* OF1 ด้วยการเติมสารละลาย 1mM $AgNO_3$ และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่า สารละลายน้ำเลี้ยงเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีเหลือง

ถึงน้ำตาล ดูดกลืนแสง UV- vis สูงสุดได้ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร อนุภาคซิลเวอร์นาโนมีรูปร่าง spherical และ polydispersed ขนาด 5–20 nm มีลักษณะตำแหน่งสเปคตรัม FTIR ที่ตำแหน่ง 3432, 2925, 1631, 1385 และ 1033 cm^{-1} มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Candida albicans Malassezia furfur*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *E. coli*., *K. pneumoniae* และ *S. aureus* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 32, 32, 16, 64, 64 and 256 µg ml^{-1} ตามลำดับ โดยได้มีรายงานคุณสมบัติของอนุภาคนาโนชีวภาพที่สังเคราะห์จากแอคติโนมัยซีททั้งการสังเคราะห์ด้วย intracellular synthesis และ extracellular synthesis แสดงในตารางที่ 2.1

ตางรางที่ 2.1 ข้อมูลอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ทางชีวภาพจาก intracellular fluid และ extracellular fluid ของแอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีท	ชนิดของอนุภาคนาโน	รูปร่าง/บริเวณที่พบ	ขนาด (nm)	การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
Intracellular				
Streptomyces sp.	Gold	ND	11–25	ND
Streptomyces sp.	Manganese / Zinc	ND	10–20	ND
Streptomyces sp.	Silver	ND	15–25	ND
Streptomyces viridogens	Silver	Spherical	18–20	Antibacterial
Streptomyces naganishii (MA7)	Silver	Spherical	5–10	Anti-biofouling Anticancer Antioxidant
Extracellular				
Thermomonospora sp.	Gold	Spherical	9-10	ND
Streptomyces sp.	Silver	Spherical	21-48	Antibacterial
Streptomyces sp.	Silver	Spherical	10-100	ND
Streptomyces sp. VITBT7	Silver	Spherical	20-70	Antimicrobial
Streptomyces sp. JAR	Silver	Spherical	68.13	Antimicrobial
Streptomyces sp. LK3	Silver	Spherical	5	Antiparasite
Streptomycec griseus	Gold	Spherical	50	ND
Streptomyces glaucus	Silver	Spherical	10	ND
Streptomyces hygroscopicus	Silver	Spherical	20–30	Antimicrobial
Streptomyces albogriseolus	Silver	Spherical	10-40	Antimicrobial
Nocardiopsis sp. MBRC-1	Silver	Spherical	45	Anticancer Antimicrobial
Nocardia farcinica	Gold	Spherical	15–20	ND

ND = Not done

ที่มา: Manivasagan et al. (2016)

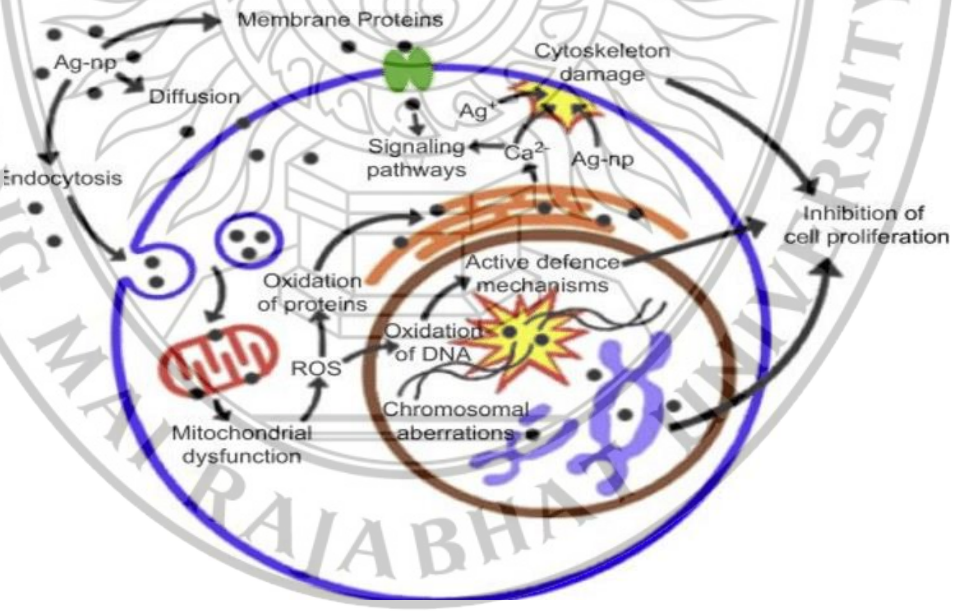
การยับยั้งการเจริญของเซลล์ด้วยอนุภาคซิลเวอร์นาโน

อนุภาคซิลเวอร์นาโนมีคุณสมบัติในการยับยั้ง เชื้อจุลินทรีย เนื่องจากมีพื้นที่ผิวมากทำให้สามารถสัมผัสกับเชื้อจุลินทรียไดมาก ดวยคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรียไมวาจะเปนแบคทีเรีย เชื้อรา หรือ ไวรัส ทำใหอนุภาคซิลเวอร์นาโนถูกนำไปประยุกตใชงานได อยางหลากหลาย เชน นำอนุภาคซิลเวอร์นาโนเคลือบลงบนเครื่องมือทางการแพทยบางชนิดที่ตองใชงานในโรงพยาบาลเพื่อปองกันการติดเชื้อ เคลือบกับผาปดแผล นำไปฝงไวในเสนใยผา ผสมกับสีทาบาน และผสมกับกระดาษเพื่อนำไปหออาหาร เปนตน แมวากลไกในการตานเชื้อจุลินทรียของอนุภาคเงินนาโนยังไมเปนที่ทราบแนชัดในปจจุบัน แตก็มีนักวิจัยไดเสนอทฤษฎีเพื่ออธิบายถึงกลไกในการยับยั้งจุลินทรีย์ (ภาพที่ 2.6) ที่นาจะเปนไปได้ดังนี้

1. อนุภาคซิลเวอร์นาโนสามารถสัมผัสกับผนังเซลลของจุลินทรีย์และคอยๆแทรกเขาไปภายในสงผลใหเกิดความเสียหายตอผนังเซลล์ ทำใหเกิดการรั่วบนพื้นผิวของเซลล และมีการสะสมอนุภาคซิลเวอร์นาโนบนพื้นผิวเซลลเปนเหตุใหเซลล์จุลินทรีย์ตาย

2. จะมีการสรางอนุมูลอิสระขึ้นมาเมื่ออนุภาคซิลเวอร์นาโนสัมผัสกับเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งอนุมูลอิสระนี้มีความสามารถในการทำลายเยื่อหุมเซลลทำใหเกิดรูพรุนขึ้น ทำลายสารชีวโมเลกุลตางๆ ภายในเซลลทำใหไมสามารถทำงานไดปกติ สงผลใหเซลลตายในที่สุด

3. อนุภาคอนุภาคซิลเวอร์นาโนสามารถปลดปลอยซิลเวอรไอออนซึ่งเปน soft base โดยซิลเวอรไอออนจะทำปฏิกิริยากับ ซัลเฟอรและฟอสฟอรัส ซึ่งเปนองคประกอบของดีเอ็นเอ เนื่องจากซัลเฟอร และฟอสฟอรัส มีสมบัติเปน soft acid ซึ่งปฏิกิริยาระหวางอนุภาคอนุภาคซิลเวอร์นาโนสัมผัสกับเซลล์จุลินทรีย์กับซัลเฟอรและฟอสฟอรัสจะไปขัดขวางกระบวนการของ DNA replication และทำใหเซลลตายในที่สุด (กานตพิมล และรินา, 2560)



ภาพที่ 2.6 กลไกการยับยั้งการเจริญของเซลล์
ที่มา: Asharani et al. (2009)

ในการควบคุมจุลินทรีย์สาเหตุในพืช ได้มีการศึกษาใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโนเพื่อใช้เป็น biocontrol agent ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช (phytopathogenic fungi) หลายหลายชนิด อาทิ มีการรายงานการยับยั้ง *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma harzianum* และ *Pythium aphanidermatum* (Mahdizadeh et al., 2015)

นอกจากนี้ยังมีการรายงานการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชจากอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์จากสารละลายภายนอกเซลล์ (extracellular) ของเชื้อรา *Trichoderma longibrachiatum* ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช (phytopathogenic fungi) ได้แก่ *Fusarium verticillioides*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium brevicompactum*, *Helminthosporium oryzae* และ *Pyricularia grisea* ได้ประสิทธิภาพการยับยั้งสูงถึง 90% (Elamawi et al., 2018)

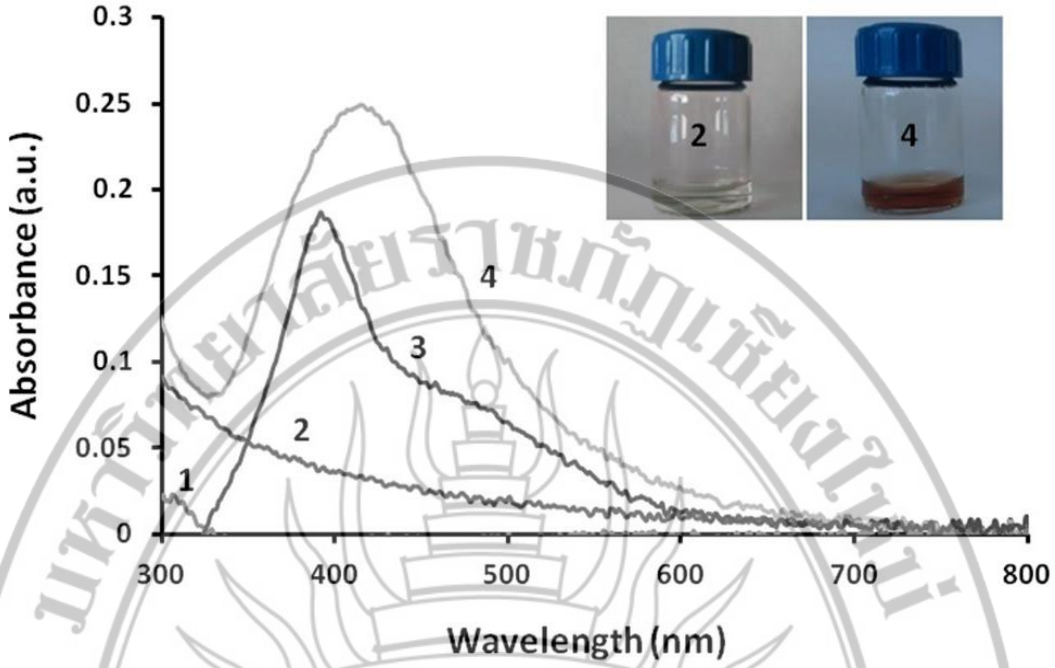
มีการศึกษาอนุภาคนาโนของนาโนซิงค์ออกไซด์ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืช 3 ชนิด *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. และ *Colletotrichum* sp. โดยใช้นาโนซิลเวอร์-ซิงค์ออกไซด์รูปแผ่นที่ความเข้มข้น 500 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใย *Alternaria* sp. ได้ดีที่สุดที่เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 64.50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum* sp. ได้ 51.67 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนามาเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งกับสารเคมีแมนโคเซบ พบว่า มีประสิทธิภาพในการยับยั้งใกล้เคียงกัน จากนั้นทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของเส้นใย *Alternaria* sp. โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบแสงธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า นาโนซิลเวอร์-ซิงค์ออกไซด์รูปแผ่นสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยโดยมีผลต่อกลไกการทำงานภายในเซลล์ทำให้เส้นใยเชื้อรามีรูปร่างผิดปกติ และยังมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *Alternaria* sp. (นิศาชล และการะเกด, 2559)

การวิเคราะห์คุณสมบัติของอนุภาคซิลเวิอร์นาโน

1. การดูดกลืนแสง

โดยอาศัย UV -Vis spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้ในวิเคราะห์สารโดยอาศัยหลักการดูดกลืนรังสีของสารที่อยู่ในช่วง ultra violet (UV) และ visible (Vis) ความยาวคลื่นประมาณ 190-1000 nm ส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์สารประกอบเชิงซ้อน หรือสารอนินทรีย์ทั้งที่มีสีและไม่มีสี สารแต่ละชนิดจะดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่นที่แตกต่างกันและปริมาณการดูดกลืนรังสีก็ขึ้นอยู่กับความเข้มของสารนั้น การดูดกลืนแสงของสารต่างๆ เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารจึงสามารถวิเคราะห์ได้ในเชิงคุณภาพและปริมาณ เป็นเทคนิคที่ให้สภาพไวที่ดี และใช้กันอย่างแพร่หลาย ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้จะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) และค่าความยาวคลื่น (wavelength) ซึ่งเรียกว่า spectrum (ศรินยา, 2557)

โดยหลังจากเติมสารละลาย 1mM $AgNO_3$ พบว่าน้ำเลี้ยงเซลล์ของเชื้อ *Streptomyces xinghaiensis* OF1 จะมีการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพโดยมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีเหลืองถึงน้ำตาลและมีคุณสมบัติดูดกลืนแสง UV- vis สูงสุดได้ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (Wypij et al., 2018) ดังแสดงในภาพที่ 2.7

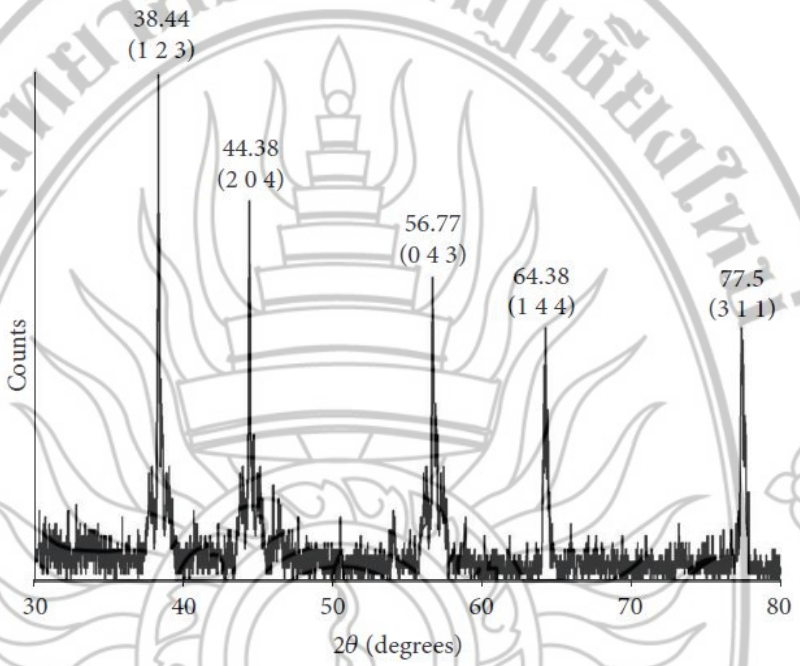


ภาพที่ 2.7 UV-Vis spectra ของสารคอลลอยด์อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces xinghaiensis* OF1 strain. $AgNO_3$(1), ชุดควบคุม (2), standard AgNPs (3), และชุดทดลอง (4) ในช่วงความยาวคลื่น 200 – 800 นาโนเมตร
ที่มา: Wypij et al. (2018)

2. X-ray diffraction (XRD)

เทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ ในการตรวจสอบหาองค์ประกอบทางเคมีและชนิดของเฟสที่เกิดขึ้น โดยอาศัยหลักการการตกกระทบของรังสีเอ็กซ์ลงบนพื้นผิวของวัสดุแล้วเกิดการกระเจิงและเลี้ยวเบน โดยมีมุมการเลี้ยวเบนแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับโครงสร้างผลึกและระนาบ (hkl) ของที่รังสีที่ตกกระทบภายในวัสดุ ซึ่งพบว่า รูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ของแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะเจาะจงสำหรับวัสดุนั้นๆ ดังนั้นเมื่อนำเครื่องมือตรวจวัด (detector) มารองรับรังสีเอ็กซ์ที่กระเจิงออกมาจากวัสดุในตำแหน่งต่างๆ ก็สามารถตรวจสอบได้ว่าวัสดุนั้นเป็นสารประเภท ใด โดยพิจารณาความสัมพันธ์ค่ามุมของแบรกก (Bragg‘s angle) และความเข้มของพีครังสีเอกซ์ของรูปแบบการเลี้ยวเบนที่ปรากฏซึ่งสารแต่ละชนิดจะมีรูปแบบการเลี้ยวเบนที่มีลักษณะเฉพาะแตกต่างกันไปจึงสามารถนำรูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ที่ตรวจสอบมาเปรียบเทียบกับข้อมูลชนิดต่างๆ ที่มีในฐานข้อมูลมาตรฐาน (JCPDS file) ได้ลักษณะของเครื่อง x-ray diffraction โดยลักษณะ XRD ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพที่เป็นผลึกของโลหะเงินที่มีโครงสร้างผลึกเป็นแบบ face centered cubic (fcc) (ศรินยา, 2557)

อนุภาคเงินนาโนที่สังเคราะห์จากสารละลายเมทาบอไลท์ภายนอกเซลล์ (extracellular metabolite) ของแอคติโนมัยซีท *Nocardiopsis* sp. MBRC-1 มีลักษณะสเปกตรัมของ XRD ดังแสดงในภาพที่ 2.8 โดยมีตำแหน่งการเลี้ยวเบน 2θ values of 38.44°, 44.38°, 56.77°, 64.38° และ 77.50° ซึ่งเกิดจากการเลี้ยวเบนเนื่องจากระนาบ (1 2 3), (2 0 4), (0 4 3), (1 4 4) และ (3 1 1) ตามลำดับของซิลเวอร์

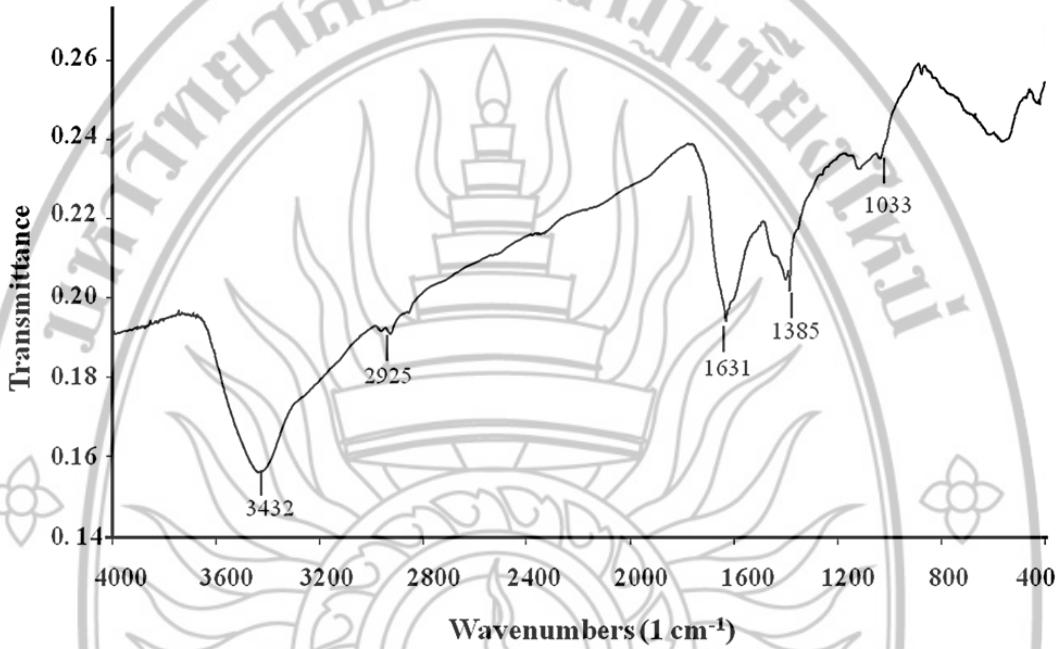


ภาพที่ 2.8 สเปกตรัม XRD ขออนุภาคนาโนที่สังเคราะห์จาก *Nocardiopsis* sp. MBRC-1
ที่มา: Manivasagan et al. (2013)

3. Fourier transform infrared spectroscopic (FTIR)

เป็นหนึ่งในเทคนิคทางด้าน infrared spectroscopy ที่มีประสิทธิภาพ ในการจำแนกประเภทของสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และพันธะเคมีในโมเลกุล รวมถึงสามารถบอกถึงปริมาณขององค์ประกอบที่มีอยู่ในโมเลกุลของสารผสมตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิด โดยทำการตรวจวัดการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของตัวอย่างที่ความถี่ต่างๆ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละพันธะการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิศูนย์องศาสมบูรณ์ อะตอมทุกตัวในโมเลกุลจะมีการสั่นอยู่ตลอดเวลา เมื่อความถี่ของการสั่นมีค่าเท่ากับความถี่ของรังสีอินฟราเรดที่ฉายมายังโมเลกุล โมเลกุลก็จะดูดกลืนรังสี จำนวนแถบการดูดกลืนทั้งหมดที่สังเกตได้จะมีค่าไม่เท่ากับการสั่นมูลฐานของโมเลกุลทั้งหมด โดยจะมีค่าลดลง ทั้งนี้เพราะจะมีบางแถบพลังงานที่ไม่มีการตอบสนองต่อ พลังงานในช่วงรังสีอินฟราเรด (ศรินยา, 2557)

โดยลักษณะตัวอย่างอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพจากแอคติโนมัยซีทที่สังเคราะห์จะมี FTIR ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และพันธะเคมีของสารเมทาบอไลท์ที่สังเคราะห์จากเซลล์ โดยพบว่า อนุภาคซิลเวอร์นาโนจาก *Streptomyces xinghaiensis* OF1 strain มีลักษณะตำแหน่งสเปคตรัมตำแหน่ง 3432, 2925, 1631, 1385 และ 1033 cm^{-1} (Wypij et al., 2018) ดังแดสงในภาพที่ 2.9

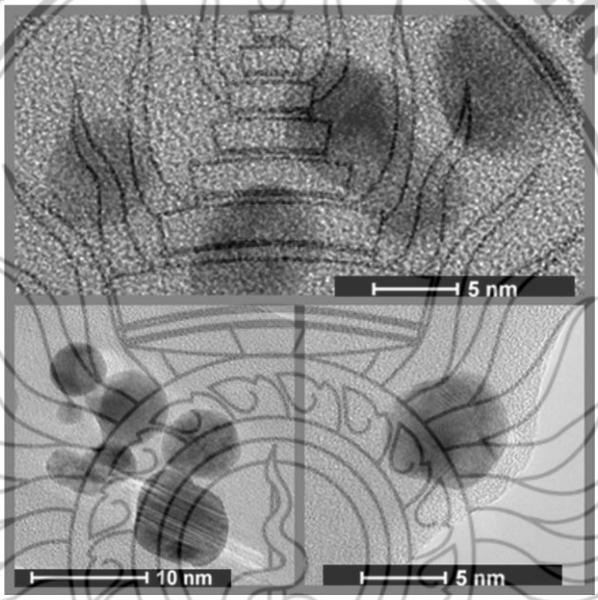


ภาพที่ 2.9 ลักษณะตำแหน่งสเปคตรัมจากการวิเคราะห์ FTIR ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนจาก *Streptomyces xinghaiensis* OF1 strain
ที่มา: Wypij et al. (2018)

4. Electron microscope (EM)

เป็นกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่ใช้ศึกษาตัวอย่างชนิดบาง ซึ่งเตรียมขึ้นโดยวิธีพิเศษเพื่อให้ลำอนุภาคอิเล็กตรอนผ่านทะลุได้ การสร้างภาพจากกล้องประเภทนี้ทำได้โดยการตรวจวัดอิเล็กตรอน เหมาะสำหรับศึกษารายละเอียดขององค์ประกอบภายในของตัวอย่าง เช่น องค์ประกอบภายในเซลล์ ลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ เป็นต้น ซึ่งจะให้รายละเอียดสูงกว่ากล้องจุลทรรศน์ชนิดอื่นๆ เนื่องจากมีกำลังขยายและประสิทธิภาพในการแจกแจงรายละเอียดสูงมาก (กำลังขยายสูงสุดประมาณ 0.1 นาโนเมตร) เครื่องประกอบด้วยแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนซึ่งทำหน้าที่ผลิตอิเล็กตรอนเพื่อป้อนให้กับระบบ โดยกลุ่มอิเล็กตรอนที่ได้จากแหล่งกำเนิดจะถูกเร่งด้วยสนามไฟฟ้า จากนั้นกลุ่มอิเล็กตรอนจะผ่านเลนส์รวบรวมรังสี (condenser lens) เพื่อทำให้กลุ่มอิเล็กตรอนกลายเป็นลำอิเล็กตรอน ซึ่งสามารถปรับให้ขนาดของลำอิเล็กตรอนใหญ่หรือเล็กได้ตามต้องการ จากนั้นลำอิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ผ่านตัวอย่างที่จะศึกษา (specimen) ไป ซึ่งตัวอย่างที่จะศึกษาจะต้องมีลักษณะที่แบนและบางมาก (ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงระหว่าง 1 – 100 นาโนเมตร) จากนั้นจะเกิดการกระเจิงอนุภาคขึ้นเมื่ออิเล็กตรอนทะลุผ่านตัวอย่างไปและอิเล็กตรอนที่ทะลุตัวอย่างนี้ก็จะถูกปรับ

โฟกัสของภาพโดยเลนส์ใกล้วัตถุ (objective lens) ซึ่งเป็นเลนส์ที่ทำหน้าที่ขยายภาพให้ได้รายละเอียดมากที่สุด จากนั้นจะได้รับการขยายด้วยเลนส์ทอดภาพไปสู่จอรับ (projector lens) และปรับโฟกัสของลำอนุภาคอิเล็กตรอนให้ยาวพอดีที่จะปรากฏบนฉากเรืองแสงสุดท้ายจะเกิดการสร้างภาพขึ้น (ศรินยา, 2557) ส่วนใหญ่ลักษณะอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์จากเชื้อแอคติโนมัยซีทภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จะมีลักษณะกลม (spherical shape) โดยมีขนาดที่แตกต่างกันออกไป โดยอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces xinghaiensis* OF1 strain มี ขนาด 5–20 nm (Wypij et al., 2018) ดังแสดงในภาพที่ 2.10



ภาพที่ 2.10 ลักษณะอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีทภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
ที่มา: Wypij et al. (2018)

5. Energy dispersive x-ray spectrometer (EDX)

เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ธาตุ สามารถวิเคราะห์ได้ตั้งแต่ธาตุโซเดียมจนถึงธาตุยูเรเนียม ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ หลักการของเทคนิคนี้ คือ ให้รังสีเอ็กซ์จากแหล่งกำเนิดเข้าไปชนสารตัวอย่าง โดยรังสีเอ็กซ์จะทำให้อิเล็กตรอนในวงในสุดของอะตอมของธาตุหลุดออกไป อิเล็กตรอนในวงถัดมาจะเข้ามาแทนที่และคายพลังงานส่วนเกินออกมาในลักษณะของเอ็กซ์เรย์ฟลูออเรสเซนส์ซึ่งจะมีค่าพลังงานเป็นค่าเฉพาะของตัวของธาตุนั้นเป็นพื้นฐานการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และความเข้มข้นของเอ็กเรย์ฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดขึ้นจะเป็นพื้นฐานการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (ศรินยา, 2557)

6. Zeta potential

หลักการทำงานของเครื่องวัดค่าความต่างศักย์ซีต้า คือ วัดอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของอนุภาคเมื่อทำให้อยู่ภายใต้สนามไฟฟ้า โดยใช้ laser doppler velocimetry (LDV) โดยเครื่องวัดค่าศักย์ซีต้า โดยค่าศักย์ซีต้า คือ ค่าความต่างศักย์ระหว่างศักย์ไฟฟ้าบริเวณพื้นผิวอนุภาคกับศักย์ไฟฟ้าในชั้นสารละลาย ซึ่งค่าศักย์ไฟฟ้าที่ได้สามารถบอกค่าความเสถียรและสามารถทำนายความคงตัวของการกระจายตัวของอนุภาคได้ อนุภาคที่มีศักย์ซีต้าเป็นบวกหรือลบมากจะเกิดการหักล้างต่อกันเกิดเสถียรภาพการกระจายตัว แต่ถ้าอนุภาคมีค่าศักย์ซีต้าเป็นบวกหรือลบน้อยทำให้ไม่มีแรงป้องกันอนุภาคอื่นที่เข้ามา ดังนั้นจึงไม่เกิดเสถียรภาพการกระจายตัวหรือเกิดการรวมกัน ค่าศักย์ซีต้าขึ้นกับค่า pH ซึ่งอนุภาคคอลลอยด์จะเสถียรเมื่อศักย์ซีต้ามีค่ามากกว่า +30 มิลลิโวลต์ หรือน้อยกว่า -30 มิลลิโวลต์ สภาวะที่ค่า pH ต่ำ (กรด) จะให้ค่าศักย์ซีต้าสูงกว่าสภาะที่ค่า pH สูง (เบส) ถ้าศักย์ซีต้ามีค่าอยู่ในช่วง -30 ถึง 30 มิลลิโวลต์ สารคอลลอยด์จะไม่เสถียร จะมีการเกาะตัวกันเป็นก้อนและตกตะกอน (ศรินยา, 2557)