

การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพด้วยแอคติโนแบคทีเรียจากดินสำหรับ
ควบคุมการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืช
**Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Soil Actinobacteria for
Plant Pathogen Control**

พสุ ปรามอกข์ชน¹ ชเนษฎ์ วิชาศิลป์² และอัจฉริยา ชมเชย^{3*}

¹ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

²ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

³ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

*E-mail: atchareeya_c@hotmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินมาใช้สังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์กับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (AgNO_3) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ พบว่า 88.5% ของจำนวนตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์แอคติโนแบคทีเรียทั้งหมด 52 ตัวอย่างสามารถกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนได้ โดยเปลี่ยนสีสารละลายเป็นสีเหลืองถึงสีเหลืองส้มเทียบกับชุดควบคุมเมื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยราสาเหตุโรคพืชจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Colletotrichum* sp. *Fusarium* sp. *Pyricularia* sp. และ *Alternaria* sp. พบว่า อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพของแอคติโนแบคทีเรีย DSK-3 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้มากกว่า 30% จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *Alternaria* sp. (36.6%) *Colletotrichum* sp. (32.4%) และ *Fusarium* sp. (31.7%) เมื่อศึกษาความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพของแอคติโนแบคทีเรีย DSK-3 พบว่า ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้ทั้งหมดและมีค่าการยับยั้งมากกว่า 50% อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพมีลักษณะเป็นลูกบาศก์ขนาด 100-200 นาโนเมตร และมีปริมาณธาตุองค์ประกอบของซิลเวอร์สูงถึง 64.4% จากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และเทคนิคเอกซเรย์สเปกโตรสโคปีแบบกระจายพลังงาน เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA ของแอคติโนแบคทีเรียกับข้อมูลใน GenBank สามารถบ่งชี้ได้ว่า แอคติโนแบคทีเรียไอโซเลต DSK-3 จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* โดยมีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces coelicoflavus* (NBRC 15399) ที่ความเชื่อมั่น 98%

คำสำคัญ: อนุภาคซิลเวอร์นาโน การสังเคราะห์ทางชีวภาพ แอคติโนแบคทีเรีย ราก่อโรคพืช

Abstract

This research studies on actinobacteria isolated various environmental soils for biosynthesis of silver nanoparticles (Ag-NPs). The Ag-NPs was prepared by using extracellular culture fluid as reducing agent with 1 mM AgNO₃. Results, 88.5% of extracellular culture fluid from total 52 samples of actinobacteria isolate showed positive results for biological synthesis Ag-NPs which changed the colorless of the mixing solution to yellowish-orange. The antifungal activity of Ag-NPs on four plant pathogens including *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Pyricularia* sp. and *Alternaria* sp. were evaluated. Ag-NPs from actinobacteria DSK-3 showed the effective activity which higher percent inhibition than 30% against three fungal strains including *Alternaria* sp. (36.6%), *Colletotrichum* sp. (32.4%) and *Fusarium* sp. (31.7%), respectively. The concentration effect of biosynthesized Ag-NPs from actinobacteria DSK-3 were tested. Ag-NPs showed higher inhibition than 50% against all tested fungi at concentration 500 µg/ml. The particles of biosynthesized Ag-NPs are cubic in shape which the size ranged from 100-200 nm and the presence element composition of silver (Ag) amount 64.4% by SEM-EDX analysis. Based on 16S rRNA sequencing of actinobacteria strain DSK-3 was analyzed and compared to other actinobacteria in GenBank. Results indicated that strain DSK-3 belonged to the genus *Streptomyces* and was related closely to *Streptomyces coelicoflavus* (NBRC 15399) at 98%.

Keywords: Silver nanoparticle, Biosynthesis, Actinobacteria and Plant pathogen

บทนำ

อนุภาคซิลเวอร์นาโนได้มีการนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านต่างๆ อาทิ การแพทย์ การเกษตร สิ่งแวดล้อม อาหาร และ อุตสาหกรรม เป็นต้น (Li et al., 2011) อนุภาคซิลเวอร์นาโนสามารถสังเคราะห์ด้วยหลากหลายวิธีการ ซึ่งวิธีทางชีวภาพถือว่าเป็นกระบวนการที่ถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนเนื่องจากสามารถลดการใช้สารเคมีที่เป็นพิษจากกระบวนการทางเคมี และเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยใช้จุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ สาหร่าย และพืชในการสังเคราะห์ (Zhang et al., 2016) เนื่องจากสารชีวโมเลกุลที่อยู่ในเซลล์จุลินทรีย์และพืชสามารถเป็นได้ทั้งตัวรีดิวซ์และสารให้ความคงตัว ทำให้ได้ปริมาณของอนุภาคซิลเวอร์นาโนปริมาณสูง และช่วยลดต้นทุนในการผลิต (Tran, Nguyen & Le, 2013) ซึ่งถือว่าวิธีทางชีวภาพเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ประหยัด รวมทั้งใช้สารเคมีในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับการสังเคราะห์ทางเคมี การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพด้วยจุลินทรีย์มีกลไกการสังเคราะห์ 2 แบบ คือ แบบที่อาศัยเอนไซม์เป็นตัวตัวรีดิวซ์ (enzymatic reduction) ซึ่งเอนไซม์จากเซลล์สามารถรีดิวซ์ไอออนของโลหะเงิน (Ag⁺) เป็นอนุภาคซิลเวอร์นาโนได้ และแบบที่ไม่อาศัยเอนไซม์เป็นตัวรีดิวซ์ (non-enzymatic reduction) โดยเซลล์จุลินทรีย์จะสร้างและปล่อยสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์และเป็นสารที่ทำให้ความคงตัวออกมา อีกทั้งใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่เร็วกว่า (Ge et al., 2014)

แอคติโนแบคทีเรียจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน และพบได้ทั่วไปในดิน เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย ดังนั้นจึงมีการนำแอคติโนแบคทีเรียมาใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ เนื่องจากสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิจากเซลล์แอคติโนแบคทีเรียสามารถเป็นตัวรีดิวซ์ให้เกิดการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพได้ (Vidhya & Balagurunathan, 2013; Wypij et al., 2018) มีการรายงานการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพจากแอคติโนแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Streptomyces xinghaiensis* OF1 *Streptacidiphilus durhamensis* HGG16n *Streptomyces somaliensis* *Streptomyces rochei* MHM 13 และ *Streptomyces* sp. TG-1 เป็นต้น โดยอนุภาคซิลเวอร์นาโนดังกล่าวสามารถยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคได้ (Buszewski et al. 2018; Nejad, Khatami & Bonjar, 2015; Priyaragini, Sathishkumar & Bhaskararao, 2013; Sastry et al., 2003; Wypij et al., 2018) ซึ่งอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพมีคุณสมบัติทำลายเซลล์จุลินทรีย์ได้นั้นเป็นผลจากซิลเวอร์ไอออน (Ag^+) เข้าไปจับกับโมเลกุลโปรตีน เอนไซม์ที่ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้โครงสร้างดังกล่าวของเซลล์เกิดความเสียหาย อีกทั้งเอนไซม์ต่างๆที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมเมแทบอลิซึมของเซลล์เสียสภาพไม่สามารถทำงานตามปกติได้ (Alananbeh, Al-Refaei & Al-Qodah, 2017; Kim et al., 2012; Wypij et al., 2018;) รวมทั้งเข้าไปทำลายโครงสร้างสารพันธุกรรมภายในเซลล์ทำให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมได้จึงทำให้เซลล์ไม่สามารถแบ่งเซลล์เพื่อการเจริญเติบโตได้ (Mahdizadeh, Safaie & Khelghatibana, 2015) แต่การประยุกต์ใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพที่สังเคราะห์จากแอคติโนแบคทีเรียสำหรับควบคุมการเจริญของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืชยังพบว่ามีการศึกษาและรายงานน้อยเมื่อเทียบกับการยับยั้งแบคทีเรีย โดยมีการรายงานการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporium* ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากแอคติโนแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. SBU3 (Krishnakumar & Bai, 2015) เป็นต้น อย่างไรก็ตามแอคติโนแบคทีเรียถือว่าเป็นจุลินทรีย์ที่น่าสนใจเนื่องจากสามารถนำไปใช้สังเคราะห์และพัฒนาอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพสำหรับใช้ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพ และช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพด้วยแอคติโนแบคทีเรียและศึกษาการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและนำไปประยุกต์ใช้ทางการเกษตรในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพสำหรับควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในระดับโรงเรียนต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกคัดเลือกแอคติโนแบคทีเรียจากดินที่น้ำเลี้ยงเซลล์สามารถรีดิวซ์ให้เกิดอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพและศึกษาการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืช
2. เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพจากแอคติโนแบคทีเรียสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชในระดับโรงเรียน

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

เชื้อราที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อราสาเหตุโรคพืช จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Colletotrichum* sp. *Fusarium* sp. *Pyricularia* sp. และ *Alternaria* sp. ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การแยกแอคติโนแบคทีเรียจากดิน

เก็บตัวอย่างดินจากสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้แก่ แปลงนาข้าว สวนผลไม้ สวนไผ่ และไร่ข้าวโพด ในบริเวณพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ที่ระดับความลึก 5-10 เซนติเมตร ใส่ในถุงพลาสติกแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิธีการแยกแอคติโนแบคทีเรียดัดแปลงวิธีการ Chaudhary et al. (2013) โดยนำตัวอย่างดินมาอบแห้ง (air-dried) อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างดิน 25 กรัม มากระจายในสารละลาย 0.85% NaCl ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 225 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเจือจางสารละลายตัวอย่างดินแบบลำดับส่วนตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-6} แล้วเปิดสารละลายเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง Starch Casein Agar (SCA) ที่เติม cyclohexamide (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ nystatin (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้วกระจายตัวอย่างสารละลายดินให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยเทคนิค spread plate โดยใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม (spreader) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน คัดเลือกโคโลนีที่ยึดติดแน่นบนอาหาร มีลักษณะการเจริญแผ่กระจาย คล้ายผงแป้ง ก้ำมะหยี่ หรือขรุขระ ไม่มันวาว แล้วเชยโคโลนีไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง Hickey Tresner's agar (HTA) ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บในสารละลาย 25% glycerol ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การคัดเลือกน้ำเลี้ยงเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ให้เกิดอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ

นำแอคติโนแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง International *Streptomyces* Project Medium 2 (ISP2 medium) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นใช้อุปกรณ์เจาะจุกคอร์ก (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร เจาะโคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียไปเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 (pH 6.8) ในขวดรูปชมพู่ 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นแยกเซลล์ออกด้วยการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1) รวบรวมน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการกรองไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์ไปผ่านชุดกรองแบคทีเรียขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน โดยนำตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์ผสมกับสารละลาย AgNO_3 ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในขวดรูปชมพู่ ด้วยอัตราส่วน 1:1 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยไม่ให้โดนแสง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายเป็นสีเหลือง (yellowish color) ถึงสีเหลืองน้ำตาล (yellowish-brown color) ซึ่งแสดงว่ามีการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนของน้ำเลี้ยงเซลล์จากแอคติโนแบคทีเรีย (Krishnakumar & Bai, 2015) จากนั้นปั่นเหวี่ยงล้างอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยสารละลาย 0.85% NaCl จำนวน 2 ครั้ง ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ไปทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying) แล้วเก็บในภาชนะป้องกันแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การศึกษาประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืช

นำอนุภาคซิลเวอร์นาโนมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราสาเหตุโรคพืชจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Colletotrichum* sp. *Fusarium* sp. *Pyricularia* sp. และ *Alternaria* sp. โดยนำเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ใช้อุปกรณ์ cork borer (0.5 เซนติเมตร) เจาะหลุมในอาหารแข็ง PDA ให้มีตำแหน่งตรงข้ามกันแล้วห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.5 เซนติเมตร ปิเปิดตัวอย่างอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพที่กระจายตัวในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงในหลุมๆละ 30 ไมโครลิตร จากนั้นเจาะโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคพืชด้วยอุปกรณ์ cork borer (0.5 เซนติเมตร) แล้ววางชิ้นวุ้นเชื้อราตรงกลางผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ชุดควบคุมทำการทดลองโดยวางชิ้นวุ้นเชื้อราสาเหตุโรคพืชเพียงเชื้อเดียวตรงกลางจานผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อครบเวลา วัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อรา จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืชจากสมการ

$$\% \text{ การยับยั้ง} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหารชุดควบคุม

B = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหารชุดทดสอบ

การศึกษาระดับความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืช

นำอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดเลือกมาทดสอบยับยั้งการเจริญของเส้นใยราสาเหตุโรคที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10 50 100 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เพื่อหาความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ที่ระดับ 50% ด้วยวิธี poisoned food technique โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เจาะโคโลนีเชื้อราด้วยอุปกรณ์ cork borer (0.5 เซนติเมตร) จากนั้นเขี่ยชิ้นวุ้นเชื้อราวางไว้ตำแหน่งตรงกลางผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนตามที่กำหนด (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ส่วนชุดควบคุมทำการทดลองโดยวางชิ้นวุ้น

เชื้อราสาเหตุโรคพืชเพียงเชื้อเดียวตรงกลางผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อครบเวลาวัดขนาดของโคโลนีเชื้อราแล้วคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืชเทียบกับชุดควบคุมดังที่กล่าวมาแล้ว

การศึกษาขนาดรูปร่างและองค์ประกอบของธาตุบนพื้นผิวของผลึกอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ

นำตัวอย่างอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพที่สังเคราะห์ด้วยแอคติโนแบคทีเรียมาศึกษารูปร่างและขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM) โดยนำผงอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ 1 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วทำให้กระจายตัวด้วยเทคนิค sonication เป็นเวลา 30 นาที โดยไม่ใช้ความร้อน ทำแห้งด้วยเครื่อง critical point drying จากนั้นติดลงบน stub แล้วนำไปเคลือบด้วยทอง โดยทำการตรวจวัดลักษณะรูปร่างและขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพที่สังเคราะห์ได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Tecnai G2 20 S-Twin พร้อมทั้งวิเคราะห์ธาตุบนพื้นผิวของผลึกอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยเทคนิคเอกซเรย์สเปกโตรสโคปีแบบกระจายพลังงาน (Energy-Dispersive X-ray, EDX)

การระบุสายพันธุ์แอคติโนแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

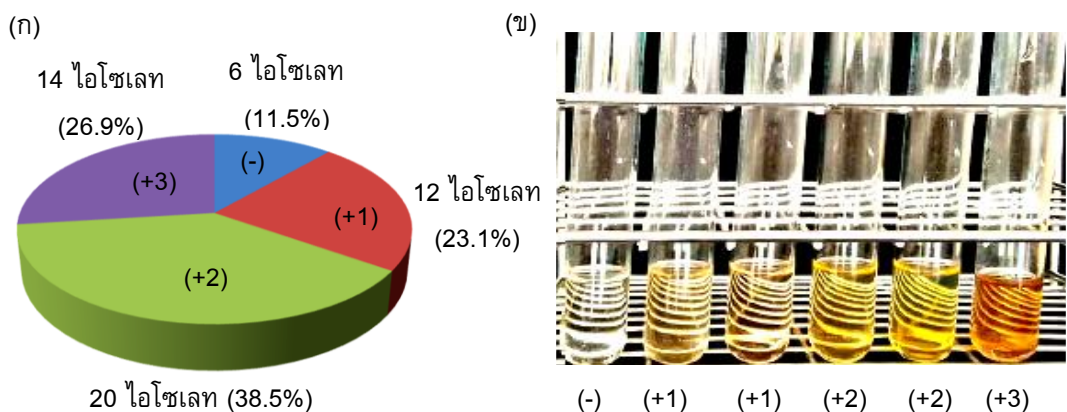
นำแอคติโนแบคทีเรียที่อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้เปอร์เซ็นต์สูงมาระบุสายพันธุ์ โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 medium บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จำนวน 2 ครั้ง ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นสกัด genomic DNA ด้วยชุดสกัด G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit แล้วเพิ่มจำนวน 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ universal primer forward 27F และ reverse 1525R แล้วนำ PCR เข้าโปรแกรมเริ่มต้นด้วย pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นทำ denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing 54 องศาเซลเซียส 1 นาที elongation 72 องศาเซลเซียส 2 นาที รวมทั้งหมด 35 รอบ และ post-elongation 72 องศาเซลเซียส 10 นาที (Farris, & Oslon, 2007) จากนั้นตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี electrophoresis โดยนำส่วนผสมของ PCR product 3 ไมโครลิตร กับ loading dye 1 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่น agarose gel (1%) ในสารละลาย TE buffer จากนั้นนำ PCR product ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma) และนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส นำข้อมูลนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน (phylogenetic analysis) และสร้าง phylogenetic tree ตามวิธี neighbor-joining (16S rRNA) gene

ผลการวิจัย

1. การแยกและคัดเลือกแอคติโนแบคทีเรียที่สังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ

จากการแยกแอคติโนแบคทีเรียจากดินในบริเวณต่างๆ เขตพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ทั้งหมดจำนวน 52 ไอโซเลท แล้วนำมาทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเซลล์ในการทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการ

สังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ พบว่า น้ำเลี้ยงเซลล์จากแอคติโนแบคทีเรีย 46 ตัวอย่าง (88.5%) สามารถสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนได้ โดยเปลี่ยนสีสารละลาย AgNO_3 จากไม่มีสีเป็นสีเหลือง และน้ำเลี้ยงเซลล์จำนวน 14 ตัวอย่าง (26.9%) ของแอคติโนแบคทีเรีย สามารถรีดิวซ์ให้เกิดอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพได้ประสิทธิภาพสูง โดยทำให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้มให้ค่าบวกสาม (+3) ขณะเดียวกันพบว่าตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์แอคติโนแบคทีเรียส่วนใหญ่คิดเป็น 38.5% สามารถรีดิวซ์ให้เกิดอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพระดับปานกลางบวกสอง (+2) โดยสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และ 23.1% ให้ผลบวกหนึ่ง (+1) สีเหลืองอ่อน และไม่เกิดการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพคิดเป็น 11.5% โดยไม่มีการเปลี่ยนของสารละลาย (-) ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 จำนวนแอคติโนแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ (ก) และลักษณะการเปลี่ยนสีของสารละลายที่รีดิวซ์ให้เกิดอนุภาคซิลเวอร์นาโน (ข)

2. ประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืช

อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพทั้งหมดของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เบื้องต้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืช *Colletotrichum* sp. *Fusarium* sp. *Pyricularia* sp. และ *Alternaria* sp. ได้มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตั้งแต่ 1-25% โดยอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ค่าสูงกว่า 25% มีจำนวน 15 ไอโซเลต (ตารางที่ 1) โดยพบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพของน้ำเลี้ยงเซลล์จากแอคติโนแบคทีเรีย DSK-3 ซึ่งแยกจากดินสวนไผ่บริเวณอำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 30% ในจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Colletotrichum* sp. *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp. เท่ากับ 32.4% 31.7% และ 36.6% ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพของแอคติโนแบคทีเรียดังกล่าวในการนำไปศึกษาความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพต่อการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชต่อไป

ตารางที่ 1 อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพของแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 15 ตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพของการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชมากกว่า 25%

ตัวอย่าง	ประสิทธิภาพของการยับยั้ง (%)			
	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Pyricularia</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.
CD-2	33.7	8.2	-	26.3
CD-6	32.1	-	6.5	9.5
CD-13	6.4	12.5	35.9	23.2
DSK-3	32.4	31.7	24.5	36.6
DSK-7	-	20.7	32.8	7.7
DSK-10	13.9	34.8	10.4	-
F-1	5.4	20.1	-	31.7
F-3	-	17.4	9.2	34.3
MT-5	24.7	30.1	32.3	15.4
MT-9	31.3	11.7	23.4	-
MT-13	-	14.0	36.1	10.5
MR-4	-	32.5	22.1	37.9
MR-6	28.2	-	24.3	32.2
MR-11	31.5	12.9	-	21.3
MR-17	33.0	-	18.5	-

(-) = No inhibition

3. ผลของความเข้มข้นอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพต่อการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช

การทดสอบความเข้มข้นอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพของแอคติโนแบคทีเรีย DSK-3 ตั้งแต่ 10-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการเจริญของโคโลนีราสาเหตุโรคพืช 4 สายพันธุ์ พบว่า ระดับความเข้มข้นมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของโคโลนีราได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แสดงในตารางที่ 2 โดยระดับความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อรา *Colletotrichum* sp. *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp. ได้ แต่ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญเชื้อรา *Pyricularia* sp. เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าเชื้อรามีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว และเมื่อเพิ่มค่าความเข้มข้นมากขึ้นส่งผลทำให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งมีค่ามากขึ้นตาม โดยค่าความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพที่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และ *Alternaria* sp. ได้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 50% ในขณะที่เชื้อรา *Fusarium* sp. และ *Pyricularia* sp. พบว่าสามารถถูกยับยั้งการเจริญของโคโลนีได้มากกว่า 50% ที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งความแตกต่างของประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพต่อการยับยั้งเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน เป็นผลจากคุณสมบัติของเซลล์เชื้อราที่มีความต้านทานได้แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองครั้งนี้ คือ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 50% เพื่อนำไปใช้เป็นความเข้มข้นเบื้องต้นในการประยุกต์ใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชดังกล่าวในระดับโรงเรือนต่อไป

ตารางที่ 2 การยับยั้งการเจริญเส้นใยราที่ระดับความเข้มข้นต่างๆของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ

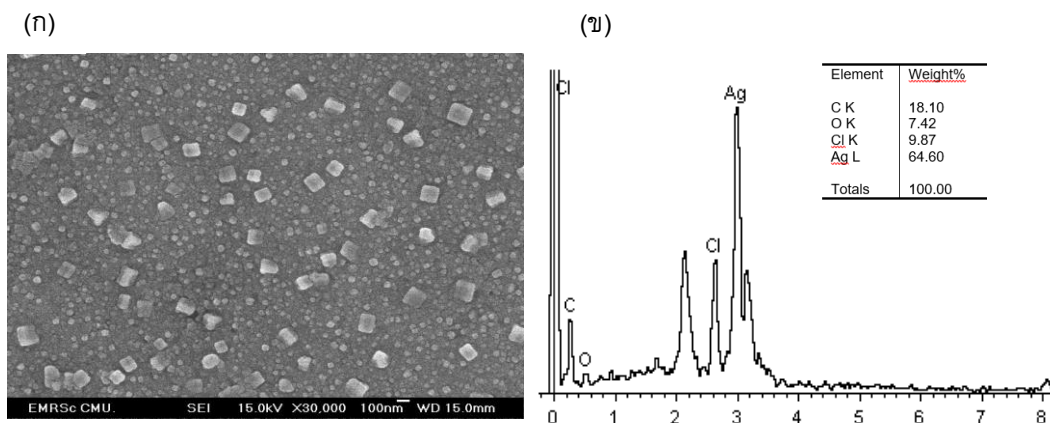
ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ประสิทธิภาพของการยับยั้ง* (%)			
	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Pyricularia</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.
10	18.10 ^a ±1.30	9.20 ^a ±0.79	N.I.	16.93 ^a ±1.18
50	36.90 ^d ±1.46	24.47 ^d ±1.12	17.67 ^c ±1.04	40.35 ^d ±2.25
100	51.26 ^c ±2.80	47.53 ^c ±1.86	39.10 ^b ±1.93	56.24 ^c ±3.10
500	63.75 ^b ±3.46	56.92 ^b ±1.53	53.85 ^a ±2.05	68.31 ^b ±2.52
1,000	72.12 ^a ±3.72	61.86 ^a ±2.16	57.71 ^a ±2.32	79.35 ^a ±2.86

N.I. = No inhibition

*ค่าเฉลี่ยการยับยั้งที่อักษรภาษาอังกฤษแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

4. ขนาดรูปร่างและองค์ประกอบของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

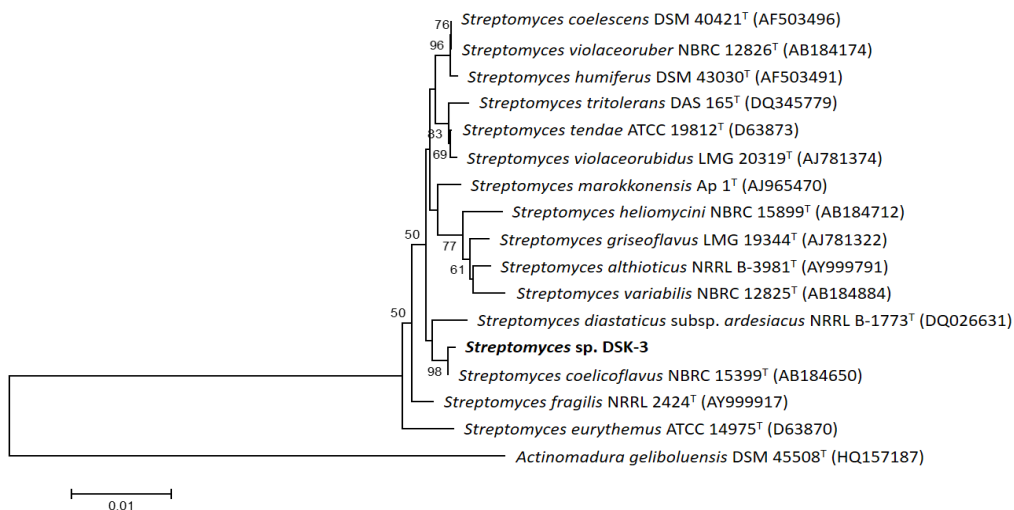
การตรวจสอบขนาดและรูปร่างของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพของแอคติโนแบคทีเรีย DSK-3 ด้วยกล้องจุลทรรศน์ SEM พบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพมีลักษณะรูปร่างเป็นลูกบาศก์ (cubic) ขนาด 100-200 นาโนเมตร (ภาพที่ 2-ก) และจากสเปกตรัมของ EDX พบองค์ประกอบของธาตุ Ag บนพื้นผิวผลึกของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพสูงที่สุด 64.60% รองลงมาคือธาตุ C 18.10% และ Cl และ O เท่ากับ 9.87% และ 7.42% ตามลำดับ (ภาพที่ 2-ข) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวช่วยยืนยันได้ว่าอนุภาคนาโนทางชีวภาพที่สังเคราะห์ได้เป็นอนุภาคซิลเวอร์นาโน



ภาพที่ 2 ภาพถ่ายอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพด้วย SEM (ก) และสเปกตรัมของธาตุที่ปรากฏบนพื้นผิวของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ (ข) ของแอกติโนแบคทีเรีย DSK-3

5. การระบุสายพันธุ์แอกติโนแบคทีเรียด้วย 16S rRNA และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis)

เมื่อนำลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA ของเชื้อแอกติโนแบคทีเรีย DSK-3 มาเปรียบเทียบกับความคล้ายคลึงกับแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST แล้วพบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces coelicoflavus* (NBRC 15399^T) 99.93% และจากแผนภูมิ phylogenetic tree แสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับสกุล *Streptomyces* โดยพบที่มีความใกล้ชิดกับ *Streptomyces coelicoflavus* (NBRC 15399^T) ที่ความเชื่อมั่น 98% ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 Phylogenetic tree ของแอกติโนแบคทีเรีย DSK-3 ตามวิธี neighbor-joining (boot strap 1,000 ครั้ง)

อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

น้ำเลี้ยงเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินทั้งหมด 52 ไอโซเลต สามารถเป็นตัวรีดิวซ์ให้เกิดการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพได้ด้วยการทำปฏิกิริยากับสารละลาย AgNO_3 ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ โดยพบว่ามีตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์จำนวน 46 ไอโซเลต (88.5%) ที่มีการเปลี่ยนสีสารละลายเป็นสีเหลืองถึงสีเหลืองส้ม ซึ่งเกิดจากสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ ได้แก่ โปรตีน เอนไซม์ ที่เซลล์สร้างและปล่อยออกมาภายนอกเซลล์สามารถรีดิวซ์ไอออนของ Ag^+ ให้เป็นศูนย์ (Ag^0) จึงทำให้เกิดการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพได้ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Manivasagan et al. (2016) ที่สารละลายจากเซลล์แอคติโนแบคทีเรีย ได้แก่ *Thermomonospora* sp. *Streptomyces* sp. VITBT7 *Streptomyces* sp. JAR *Streptomyces* sp. LK3 *Streptomyces griseus* *Streptomyces glaucus* *Streptomyces hygroscopicus* *Streptomyces albobogriseolus* *Nocardia* sp. MBRC-1 และ *Nocardia farcinica* สามารถเป็นตัวรีดิวซ์ให้เกิดการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพได้

เมื่อนำอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืช 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Colletotrichum* sp. *Fusarium* sp. *Pyricularia* sp. และ *Alternaria* sp. พบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพของแอคติโนแบคทีเรีย DSK-3 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชมากกว่า 30% จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *Alternaria* sp. (36.6%), *Colletotrichum* sp. (32.4%) และ *Fusarium* sp. (31.7%) ดังนั้นจึงเลือกอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพจากแอคติโนแบคทีเรียดังกล่าวเพื่อไปศึกษาต่อ ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพจากแอคติโนแบคทีเรียสามารถยับยั้งการเจริญของโคโรนีราสาเหตุโรคพืชได้ โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Krishnakumar & Bai (2015) ที่พบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพของ *Streptomyces* sp. SBU3 สามารถยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ได้ นอกจากนี้ Kim et al. (2012) ยังพบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนสามารถยับยั้งการเจริญของโคโรนีราสาเหตุโรคพืช *Alternaria solani* *Alternaria alternata* *Fusarium oxysporum* และ *Fusarium solani* ได้ เช่นเดียวกับ Mahdizadeh, Safaie & Khelghatibana (2015) ที่พบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนสามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช *Rhizoctonia solani* *Macrophomina phaseolina* *Sclerotinia sclerotiorum* และ *Pythium aphanidermatum* ได้ดีเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งกลไกการทำลายเซลล์เชื้อราของอนุภาคซิลเวอร์นาโนยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัด แต่ได้มีการอธิบายถึงกลไกดังนี้ อนุภาคซิลเวอร์นาโนอาจจะเข้าไปสัมผัสกับผนังเซลล์และค่อยๆแทรกเข้าไปภายในเซลล์ โดยไอออน Ag^+ ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนจะเข้าไปจับโมเลกุลซัลเฟอร์ (Ag-S) ของเอนไซม์และโปรตีนด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Boxi, Mukherjee & Paria, 2016) ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียคุณสมบัติ และสามารถไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATP synthase ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานของเซลล์ รวมทั้งไปยับยั้งการทำงานของไรโบโซมในส่วนของ rRNA ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ (Kim et al., 2012; Manivasagan et al., 2016) นอกจากนี้มีการรายงานว่าอาจจะเป็นผลมาจากคุณสมบัติความเป็นเบสอ่อนของไอออน Ag^+ ที่สามารถไปทำปฏิกิริยากับโมเลกุลซัลเฟอร์และฟอสฟอรัสที่เป็นองค์ประกอบของโมเลกุลดีเอ็นเอส่งผลต่อกระบวนการ DNA replication (Mahdizadeh, Safaie & Khelghatibana, 2015)

ส่วนการศึกษาผลความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพของแอคติโนแบคทีเรีย DSK-3 ต่อการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืชนั้น พบว่าความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนนั้นส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 4 สายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าการเพิ่มระดับความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนชีวภาพมากขึ้นส่งผลให้มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรามากขึ้นตามไปด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ali, Yousef & Nafady (2015) ที่พบว่าการยับยั้งการเจริญของโคโลนีราสาเหตุโรคพืช *Fusarium salani* *F. oxysporum* *F. graminearum* และ *Penicillium expansum* มีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโน ซึ่งประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืชเป็นผลมาจากคุณสมบัติของอนุภาคซิลเวอร์นาโนในการเข้าไปทำลายเซลล์เชื้อรา รวมทั้งความแตกต่างของกลไกความต้านทานและกระบวนการของเซลล์เชื้อราแต่ละสายพันธุ์สำหรับช่วยป้องกันการเข้าทำลายได้แตกต่างกัน (Elamawi, Al-Harbi & Hendi, 2018) ในการวิจัยครั้งนี้พบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชทดสอบทั้งหมดจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้ค่าประสิทธิภาพการยับยั้งมากกว่า 50% ดังนั้นความเข้มข้นดังกล่าวนี้จึงถือว่าเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในระดับโรงเรือนต่อไป

จากการวิเคราะห์รูปร่าง ขนาด และองค์ประกอบธาตุของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพจากแอคติโนแบคทีเรีย DSK-3 พบว่าเป็นรูปลูกบาศก์ ขนาด 100-200 นาโนเมตร และมีปริมาณธาตุ Ag ที่สูงซึ่งสามารถช่วยยืนยันได้ว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ได้เป็นอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพจากแอคติโนแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. *Thermomonospora* sp. และ *Rhodococcuc* sp. ที่พบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้มีรูปร่างแบบทรงกลมและลูกบาศก์ ขนาดตั้งแต่ 5-150 นาโนเมตร และมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิดทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา (Manivasagan et al., 2016) โดยในงานวิจัยของ Vinay, Thenmozhi & Kannabiran (2013) พบว่าอนุภาคนาโนรูปร่างลูกบาศก์ ขนาด 90 นาโนเมตร ที่สังเคราะห์จากน้ำเลี้ยงเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. VITDDK3 สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อราได้ และจากการศึกษายีนบริเวณ 16S rRNA ของแอคติโนแบคทีเรีย DSK-3 เทียบกับข้อมูลในฐาน GenBank สามารถบ่งชี้ได้ว่าแอคติโนแบคทีเรียดังกล่าวจะจัดอยู่ใน Genus *Streptomyces* ถึงแม้ว่าจะมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกันของยีนในส่วน 16S rRNA กับเชื้อ *Streptomyces coelicoflavus* (NBRC 15399) ถึง 99.93% ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่พบว่า *Streptomyces* เป็นแอคติโนแบคทีเรียที่สำคัญและนำมาใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนชีวภาพได้อย่างดีเยี่ยม เนื่องจากมีคุณสมบัติในการสร้างสารเมแทบอลิทุติยภูมิที่สำคัญมากมายที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ สำหรับประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ เกษตร สิ่งแวดล้อม และอุตสาหกรรม (Krishnakumar & Bai, 2015; Manivasagan et al., 2016; Wypij et al., 2018) แต่เพื่อยืนยันความถูกต้องเพื่อการจดจำแนกจำเป็นต้องมีการศึกษาทางด้าน chemotaxonomic physiological และ morphological เพิ่มเติม อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า แอคติโนแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพได้ สำหรับไปประยุกต์ใช้ควบคุมการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่เป็นปัญหาทางการเกษตรและสามารถนำไปศึกษาต่อยอดพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ nanofungicides ที่เป็นมิตรและปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 (เลขที่ วช. 19/60) ที่สนับสนุนทุนวิจัย ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่สนับสนุนอุปกรณ์เครื่องมือ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ที่ให้ช่วยเหลือให้การดำเนินงานวิจัยนี้สำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Alananbeh, K.M., Al-Refaei, W.J., & Al-Qodah, Z. (2017). Antifungal effect of silver nanoparticles on selected fungi isolated from raw and waste water. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79 (4), 559-567.
- Ali, S.M., Yousef, N.M.H. & Nafady, N.A. (2015). Application of biosynthesized silver nanoparticles for the control of land snail *Eobania vermiculata* and some plant pathogenic fungi. *Journal of Nanomaterials*, 3, 1-10.
- Boxi, S.S., Mukherjee, K. & Paria, S. (2016). Ag doped hollow TiO₂ nanoparticles as an effective green fungicide against *Fusarium solani* and *Venturia inaequalis* phytopathogens. *Nanotechnology*, 27 (3), 42-51.
- Buszewski, B., Railean-Plugaru, V., Pomastowski, P., Rafinska, K., Szultka-Mlynska, M., Golinska, P., Wypij, M., Laskowski, D. & Dahm, H. (2018). Antimicrobial activity of biosilvernanoparticles produced by a novel *Streptacidiphilus durhamensis* strain. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 51, 45-54.
- Chaudhary, H.S., Yadav, J., Shrivastava, A.R., Singh, S., Singh, A.K. & Gopalan, N. (2013). Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 4(2), 118-123.
- Elamawi, R.M., Al-Harbi, R.E. & Hendi, A.A. (2018). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi. *Egyptian journal of biological pest control*, 28 (28), 1-11.
- Farris, M.H. & Oslon, J.B. (2007). Detection of actinobacteria cultivated from environmental samples reveals bias in universal primer. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 376-381.
- Ge, L., Li, Q., Wang, M., Ouyang, J., Li, X. & Xing, M.M.Q. (2014). Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 2399-2407.
- Kim, S.W., Jung, J.H., Lamsal, K., Kim, Y.S., Min, J.S. & Lee, Y.S. (2012). Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. *Mycobiology*, 40 (1), 53-58.

- Krishnakumar, S. & Bai, V.D.M. (2015). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using terrestrial *Streptomyces* sp-SBU3 and its antimicrobial efficiency against plant pathogens. *International Journal of Technochem Research*, 1 (2), 112-118.
- Li, X., Xu, H., Chen, Z. & Chen, G. (2011). Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. *Journal of Nanomaterials*, 8, 1-15.
- Mahdizadeh, V., Safaie, N. & Khelghatibana, F. (2015). Evaluation of antifungal activity of silver nanoparticles against some phytopathogenic fungi and *Trichoderma harzianum*. *Journal of Crop Production*, 4 (3), 291-300.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K. & Kim, S. (2016). Actinobacteria mediated synthesis of nanoparticles and their biological properties: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 42 (2), 209-221.
- Nejad, M.S., Khatami, M. & Bonjar, G.H.S. (2015). *Streptomyces somaliensis* mediated green synthesis of silver nanoparticles. *Nanomedicine Journal*, 2 (3), 233-238.
- Priyaragini, S., Sathishkumar, S.R. & Bhaskararao, K.V. (2013). Biosynthesis of silver nanoparticles using actinobacteria and evaluating its antimicrobial and cytotoxicity activity. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5 (2), 1-4.
- Sastry, M., Ahmad, A., Khan, M.S. & Kumar, R. (2003). *Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete*. *Current Science*, 85 (2), 162-170.
- Tran, Q.H., Nguyen, V.Q. & Le, A. (2013). Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advance in Natural Science: Nanoscience and Nanotechnology*, 4 (3), 1-22.
- Vidhya, A. & Balagurunathan, R. (2013). Isolation and screening of alkalophilic actinobacteria, for biosynthesis and characterization of silver nanoparticles. *International Journal of Novel Trend in Pharmaceutical Science*, 3 (1), 7-14.
- Vinay, G.J., Thenmozhi, M. & Kannabiran, K. (2013). Actinobacteria mediated synthesis of gold nanoparticles using *Streptomyces* sp. VITDDK3 and its antifungal activity. *Materials Letters*, 93, 360–362.
- Wypij, M., Czarnecka, J., Swiecimska, M., Dahm, H., Rai, M. & Golinska, P. (2018). Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of biogenic silver nanoparticles synthesized from *Streptomyces xinghaiensis* OF1 strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34 (2), 1-23.
- Zhang, X., Liu, Z. Shen, W. & Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (9), 1-34.