โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพและการประยุกต์ใช้ในการต้านจุลชีพ

ชื่อนิสิต นายอัมรินทร์ อะโน เลขประจำตัว 6032358723

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพและการประยุกต์ใช้ในการต้านจุลชีพ

ชื่อนิสิต นายอัมรินทร์ อะโน เลขประจำตัว 6032358723

ภาควิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงงาน	การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพและการประยุกต์ใช้ในการต้านจุลชีพ		
โดย	นายอัมรินทร์ อะโน	เลขประจำตัว	6032358723
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	อาจารย์ ดร.สริสา ณ ป้อมเพ็ชร์		
ปีการศึกษา	2563		

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน
(อาจารย์ ดร.สริสา ณ ป้อมเพ็ชร์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์

เรื่อง

การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพและการประยุกต์ใช้ในการต้านจุลชีพ

(Biosynthesis of gold nanoparticles and its application in antimicrobial activity)

อาจารย์ที่ปรึกษาในโครงการ

อาจารย์ ดร.สริสา ณ ป้อมเพ็ชร์

นิสิตหัวหน้าโครงการ

นายอัมรินทร์ อะโน

รหัสประจำตัวนิสิต 6032358723

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

ชื่อโครงการ: การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพและการประยุกต์ใช้ในการต้านจุลชีพ

นิสิตในโครงการ: นายอัมรินทร์ อะโน

เลขประจำตัวนิสิต 6032358723

อาจารย์ที่ปรึกษา: อาจารย์ ดร.สริสา ณ ป้อมเพ็ชร์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาค้นคว้าหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆมากมาย เนื่องจากจุลชีพได้มีการพัฒนาเพื่อต้านทานต่อยาปฏิชีวนะรูปแบบเดิมที่มีอยู่ในปัจจุบัน อนุภาคนาโนทองคำ (gold nanoparticle, AuNP) ได้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการค้นคว้าหาสารยับยั้งจุลชีพ โดยมีรายงานว่าอนุภาคทองนาโนแสดงประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งและทำลายจุลชีพได้ ในงานวิจัยนี้เรามุ่งเน้นไปที่การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนด้วยสารชีวโมเลกุลจากเชื้อรา *Aspergillus niger* เพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการต้านจุลชีพของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้ การสังเคราะห์นี้เป็นวิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำโดยวิธีการทางชีวภาพซึ่งใช้ต้นทุนน้อยและมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำด้วยวิธีการทางเคมี อนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปตรวจสอบลักษณะคุณสมบัติจากหลายเทคนิค ได้แก่ การส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope, TEM) การใช้เทคนิค dynamic light scattering (DLS) เพื่อวัดขนาดอนุภาค (zeta sizer) การวัดค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) และการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-visible spectrophotometry จากการศึกษาพบว่าอนุภาคนาโนทองคำมีขนาดเฉลี่ยอยู่ที่ 76.22 นาโนเมตร มีรูปร่างเป็นทรงกลม สม่ำเสมอ มีค่าศักย์ซีต้าเท่ากับ -18 มิลลิโวลต์ และพบว่าอนุภาคนาโนทองคำมีการดูดกลืนช่วงความยาวคลื่นที่ 550 – 570 นาโนเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดได้เท่ากับ 0.055 ที่ความยาวคลื่น 569 นาโนเมตร จากนั้นได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นสารยับยั้งจุลชีพของอนุภาคนาโนทองคำด้วยวิธี agar well plate assay กับจุลชีพทั้งสามชนิด คือ *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) และ *Cryptococcus neoformans* (ATCC 208821) โดยใช้อนุภาคนาโนทองคำที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่า อนุภาคนาโนทองคำที่ทั้งสามความเข้มข้นไม่มีความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 6538P) และ *C. neoformans* (ATCC 208821)

คำสำคัญ : อนุภาคนาโนทองคำ, การสังเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวภาพ, ฤทธิ์การต้านจุลชีพ

Project title: Biosynthesis of gold nanoparticles and its application in antimicrobial activity

Investigator: Mr. Ammarin Ano

Student ID 6032358723

Advisor: Sarisa Na Pombejra, Ph.D.

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University Academic Year 2020

Abstract

Currently, many studies have been looking for discovering of new antibiotics, as microbes have evolved to resist existing forms of antibiotics. Gold nanoparticle (AuNP) has been an alternative in the research of antimicrobial agents because it exhibits a high efficiency in inhibition and destruction of microorganisms. In this research, we focused on the synthesis of AuNP using biomolecules from *Aspergillus niger*. This biosynthesis of AuNP is cost effective and environmental friendly than the chemical method. The characteristics of AuNP were examined by several techniques: transmission electron microscope (TEM), dynamic light scattering (DLS) for zeta-sizer as well as zeta potential, and UV-visible spectrophotometry. A uniform spherical shape of AuNP with a zeta potential of -18 mV was reported. The UV-vis absorption wavelength ranged from 550 - 570 nm with the maximum absorbance 0.055 at 569 nm. An antimicrobial efficacy of AuNP was evaluated using agar-well plate assay against three microorganisms: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) and *Cryptococcus neoformans* (ATCC 208821). The AuNP concentration at 20, 25, and 30 µg/ml were tested in this study, and the result showed no antimicrobial activity against all three microorganisms.

Keywords: gold nanoparticle, biosynthesis, antimicrobial activity

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีเนื่องจากความกรุณาของ อาจารย์ ดร.สริสา ณ ป้อมเพ็ชร์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ และยังเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาในภาควิชา ผู้ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อแนะนำต่าง ๆ ตลอดจนช่วยติชมปรับปรุงโครงการวิจัยมาตลอดจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณเงินทุนสนับสนุนงานวิจัย ที่ได้รับจากโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณสมาชิกห้องวิจัย 1804/13 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สอนและให้คำแนะนำในการทำปฏิบัติการ รวมถึงให้ความช่วยเหลืออื่น ๆ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ตั้งแต่เริ่มดำเนินการวิจัยจนเสร็จสิ้น

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ นิสิตจุลชีววิทยา รุ่นที่ 44 ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือและขอสนับสนุน เป็นกำลังใจให้กันตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ ได้ถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำและคำปรึกษา ที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการนี้และตัวผู้วิจัยเอง

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ เครื่องมือต่าง ๆ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณมารดา บิดา ที่ให้กำลังใจและคอยสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา ตลอดจนสิ้นสุดโครงการ

นายอัมรินทร์ อะโน

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตารางและกราฟ	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์ และเคมีภัณฑ์	12
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	17
บทที่ 4 ผลการทดลอง	23
บทที่ 5 สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง	40
เอกสารอ้างอิง	43
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	
ภาคผนวก ข	
ภาคผนวก ค	
ภาคผนวก ง	

สารบัญตารางและกราฟ

เรื่อง **หน้า**

ตารางที่ 4.1 ขนาดโดยเฉลี่ยของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ และ acetate buffer 28

สารบัญรูปภาพ

เรื่อง **หน้า**

รูปที่ 1.1 แสดงลักษณะของโคนิเดีย (conidia) 1

รูปที่ 1.2 รูปภาพวงจรชีวิต (life cycle) ของรา *A. niger*(El-Sheikh, 2016) 2

รูปที่ 1.3 การประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนทองคำด้านการแพทย์ (Raji V et al., 2020) 3

รูปที่ 1.4 การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนแบ่งตามหลักการ top-down approach และbottom-up approach และวิธีการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน ทั้ง3วิธี (Rajasekhar et al., 2018) 4

รูปที่ 1.5 โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) 5

รูปที่ 1.6 โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) 6

รูปที่ 1.7 โครงสร้างของเซลล์ยีสต์ (yeast cell) 8

รูปที่ 1.8 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำภายในเซลล์ และนอกเซลล์ของเชื้อรา (Sengani et al., 2017) 9

รูปที่ 1.9 คุณสมบัติของอนุภาคนาโนทองคำในการยับยั้งจุลชีพ (Xiao Gu et al., 2021) 10

รูปที่ 3.1. วิธีการนับสปอร์ของรา *A. niger* ด้วย hemocytometer 17

รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของ *A. niger* MSCU 3061 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 22

รูปที่ 4.2 (A) ลักษณะสีของน้ำเลี้ยงเชื้อรา (fungal filtrate) ของ *A. niger* MSCU 3061 ที่ผสมด้วยสารละลาย acetate buffer ที่ pH 4.7 และสารละลาย 0.02 M HAuCl4 (B) ลักษณะสีของสารละลายที่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองเป็นสีม่วงอมดำ 23

รูปที่ 4.3 (A) ชุดควบคุม 1 (acetate buffer + $HAuCl_4$ + H_2O), (B) ชุดควบคุม 2 (acetate buffer + น้ำเลี้ยงเชื้อรา + H_2O) 24

รูปที่ 4.4 (A) สารละลายที่เวลาเริ่มต้นในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ, (B) สารละลายที่เวลา 55 – 70 นาทีในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ 24

รูปที่ 4.5 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมในสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ และ acetate buffer 25

รูปที่ 4.6 ตะกอนของอนุภาคนาโนทองคำหลังปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 14000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที 26

รูปที่ 4.7 รูปภาพจากกล้อง TEM แสดงลักษณะของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์โดยน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ และ acetate buffer 27

รูปที่ 4.8 กราฟการกระจายตัวของขนาดอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์จากสารสกัดจากเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ และ acetate buffer 29

เรื่อง **หน้า**

รูปที่ 4.9 กราฟแสดงค่าศักย์ซีต้าของอนุภาคนาโนทองคำสังเคราะห์จากสารสกัดจากเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ และ acetate buffer 30

รูปที่ 4.10 (A) ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (ATCC 25922) , (B) ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* (ATCC 6538P) และ (C) ลักษณะโคโลนีของยีสต์ *C. neoformans* (ATCC 208821) 31

รูปที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ *E. coli* (ATCC 25922) ในหนึ่งมิลลิลิตร และค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร 32

รูปที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ *S. aureus* (ATCC 6538P) ในหนึ่งมิลลิลิตร และค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร 32

รูปที่ 4.13 ผลของการทดลองตรวจสอบโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อเชื้อ *E. coli* (ATCC 25922) 33

รูปที่ 4.14 ผลของการทดลองตรวจสอบโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อเชื้อ *E. coli* (ATCC 25922) 34

รูปที่ 4.15 ผลของการทดลองตรวจสอบโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อเชื้อ *E. coli* (ATCC 25922) 34

รูปที่ 4.16 ผลของการทดลองตรวจสอบโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อ *S. aureus* (ATCC 6538P) 35

รูปที่ 4.17 ผลของการทดลองตรวจสอบโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อ *S. aureus* (ATCC 6538P) 36

รูปที่ 4.18 ผลของการทดลองตรวจสอบโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อ *S. aureus* (ATCC 6538P) 36

เรื่อง **หน้า**

รูปที่ 4.19 ผลของการทดลองตรวจสอบโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำ ที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อ *C. neoformans* (ATCC 208821) 37

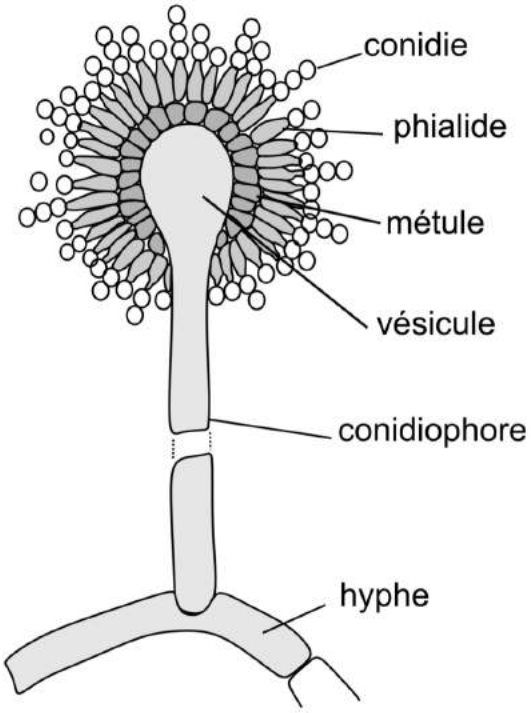
รูปที่ 4.20 ผลของการทดลองตรวจสอบโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำ ที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อ *C. neoformans* (ATCC 208821) 38

รูปที่ 4.21 ผลของการทดลองตรวจสอบโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำ ที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อ *C. neoformans* (ATCC 208821) 38

บทที่ 1
บทนำ

1. เชื้อรา *Aspergillus niger*

ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *A.niger* คือเป็น filamentous fungi มีการสร้างสายใยราที่มีผนังกั้น โดย *A.niger* จัดอยู่ในกลุ่มของ Ascomycota มีการสืบพันธ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของราชนิดนี้คือราชนิดนี้จะมีการสร้างสปอร์โดยสร้างจากส่วนของโคนิเดีย (Conidia) **ดังรูป 1.1** ซึ่งโคนิเดียของ *A.niger* มีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเข็ม จึงทำให้เมื่อเชื้อราชนิดนี้มีการสร้างสปอร์จะทำให้โคโลนีของราเป็นสีดำ ส่วนการสืบพันธ์แบบอาศัยเพศของ *A.niger* คือ จะมีการสร้าง ascospore ซึ่งภายในจะบรรจุ ascus อยู่

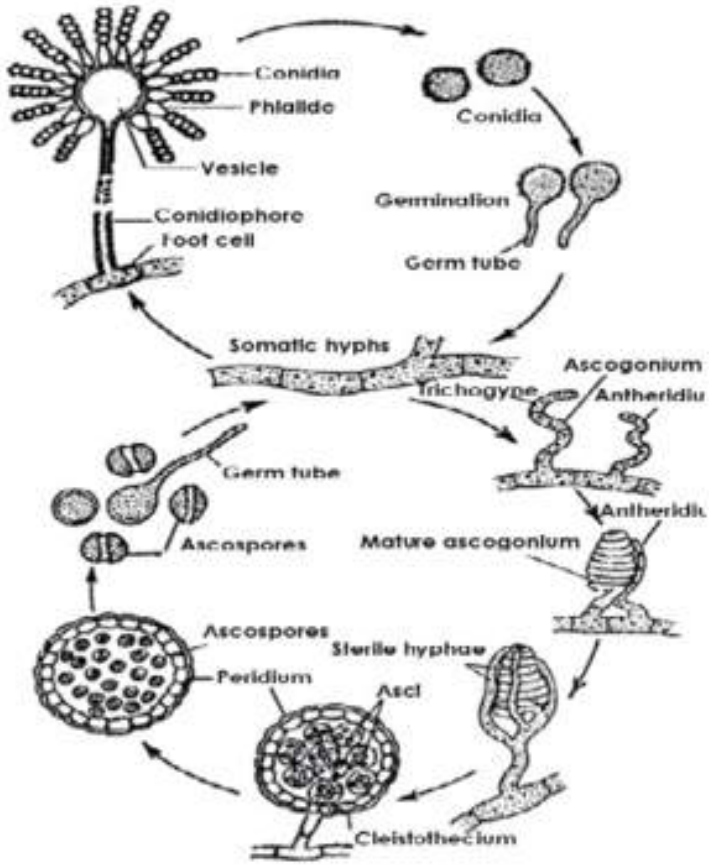


รูปที่ 1.1 แสดงลักษณะของโคนิเดีย (conidia)

ที่มา : https://microbenotes.com/aspergillus-niger/

ในช่วงวงจรชีวิตแบบไม่อาศัยเพศของ *A. niger* จะเริ่มจากการที่เชื้อรา *A. niger* จะสร้างโซมาติกไฮฟา (somatic hypha) หลังจากนั้นบริเวณฟุตเซลล์ (foot cell) ของโซมาติกไฮฟาจะเริ่มมีการสร้างก้านชูอับสปอร์ (conidiophore) ขึ้นมา บนก้านชูอับสปอร์จะประกอบด้วยเวสซิเคิล (vesicle) และโคนิเดีย ซึ่งเป็นสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual spore) โดยโคนิเดียจะสามารถเจริญต่อไปเป็นท่องอก (germ tube) และแบ่งเซลล์เป็นโซมาติกไฮฟาต่อไป

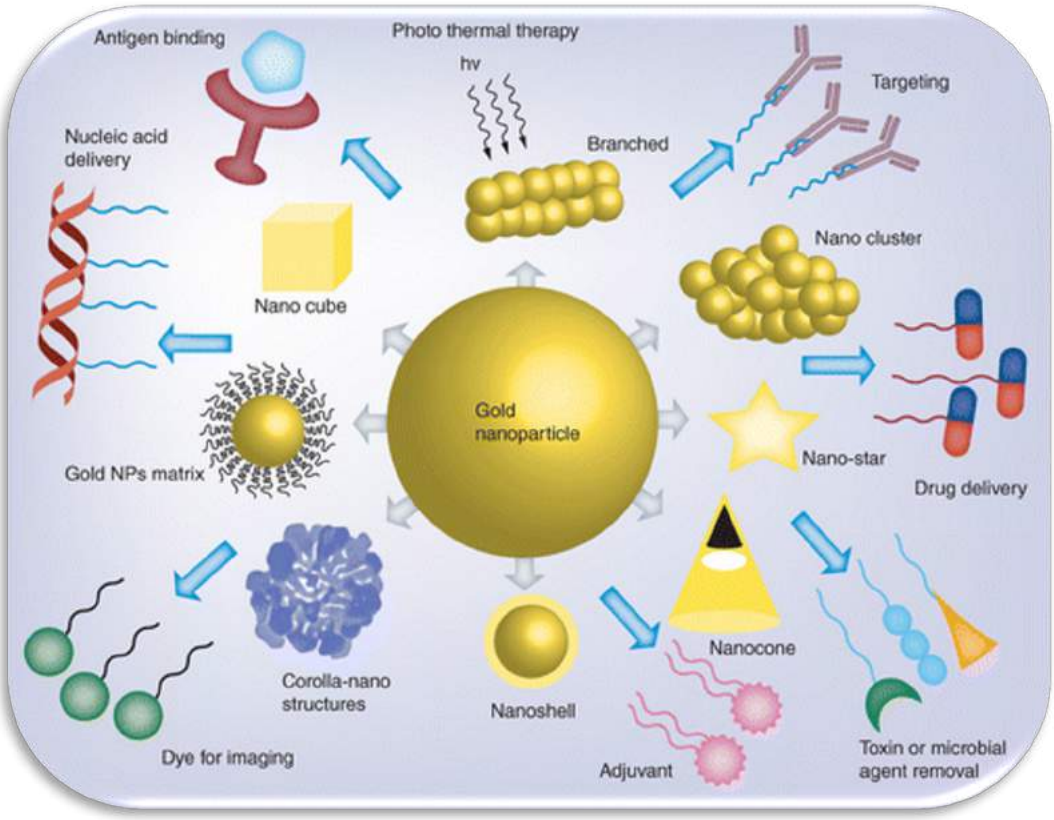
ในส่วนของวงจรชีวิตแบบอาศัยเพศเกิดจากการที่โซมาติกไฮฟาสร้างแอสโคโกเนีย (ascogonium) และแอนเทอริเดียม (antheridium) โดยแอสโคโกเนียและแอนเทอริเดียมจะเกิดการผสมพันธุ์กันและกลายเป็นแอสโคคาร์ปรูปร่างกลม เรียกว่า cleistothecium ที่ภายในมีถุงเก็บสปอร์เรียกว่าแอสคัส ภายในแอสคัสจะมีการพัฒนาเกิดแอสโคสปอร์ **ดังรูป 1.2**



รูปที่ 1.2 รูปภาพวงจรชีวิต (life cycle) ของรา *A. niger*(El-Sheikh, 2016)

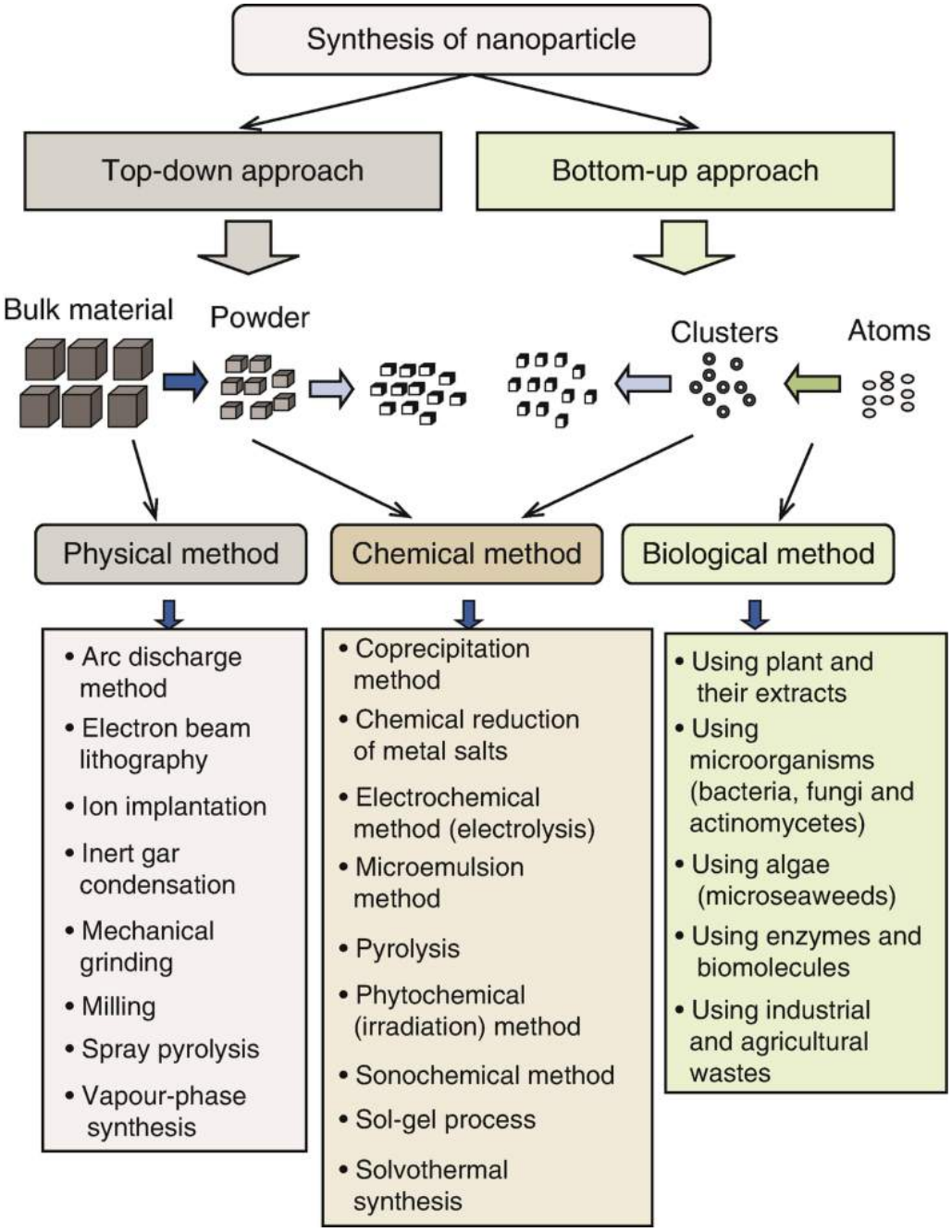
2. อนุภาคนาโนทองคำ (Gold nanoparticle)

นาโน (nano) เป็นคำจากภาษากรีกที่ใช้เพื่ออธิบายวัตถุหรือสิ่งของใดๆ ที่มีขนาดเล็กมากในระดับนาโนเมตร (1-100 นาโนเมตร) โดยอนุภาคนาโนทองคำ (gold nanoparticle; AuNP) คืออนุภาคของทองคำขนาดเล็กที่มีขนาดอยู่ในหน่วยนาโนเมตร จึงทำให้มีคุณสมบัติแตกต่างจากทองคำทั่วไป ทั้งคุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมี เนื่องจากอนุภาคนาโนทองคำมีขนาดเล็กและมีรูปร่างที่แตกต่างจากโมเลกุลอื่น สามารถปรับเปลี่ยนโครงสร้างได้ง่าย (Ying S. et al., 2017) จึงทำให้ในปัจจุบันได้มีการค้นคว้าและพัฒนาอนุภาคนาโนทองคำ เพื่อประยุกต์ใช้ในงานหลายด้าน เช่น ด้านการแพทย์ **ดังรูปที่ 1.3** (Raji V. et al., 2020) ด้านอุตสาหกรรม เช่นการผลิตยาปฏิชีวนะ (Bindhu M.R. et al., 2014) ด้านสิ่งแวดล้อมโดยมีการนำอนุภาคนาโนทองคำไปเป็นตัวเร่งปฏิกริยาในการสลายสีย้อมที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำเสีย (Wunder S. et al., 2011)



รูปที่ 1.3 การประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนทองคำด้านการแพทย์ (Raji V et al., 2020)

วิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ สามารถแบ่งได้เป็นสองรูปแบบคือ top-down approach เป็นวิธีที่ทำการสลายสารโมเลกุลขนาดใหญ่ให้มีขนาดเล็กลงจนถึงระดับนาโนเมตร และอีกวิธีคือ bottom-up approach เป็นวิธีการที่เกิดจากการรวมกันของโมเลกุลและสารอื่นๆที่มีขนาดเล็กให้กลายเป็นโครงสร้างระดับนาโนขึ้น **ดังรูป 1.4** (Rajasekhar et al., 2018)



รูปที่ 1.4 การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนแบ่งตามหลักการ top-down approach และ bottom-up approach และวิธีการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนทั้ง3วิธี (Rajasekhar et al., 2018)

3. แบคทีเรีย (bacteria)

3.1 สัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย

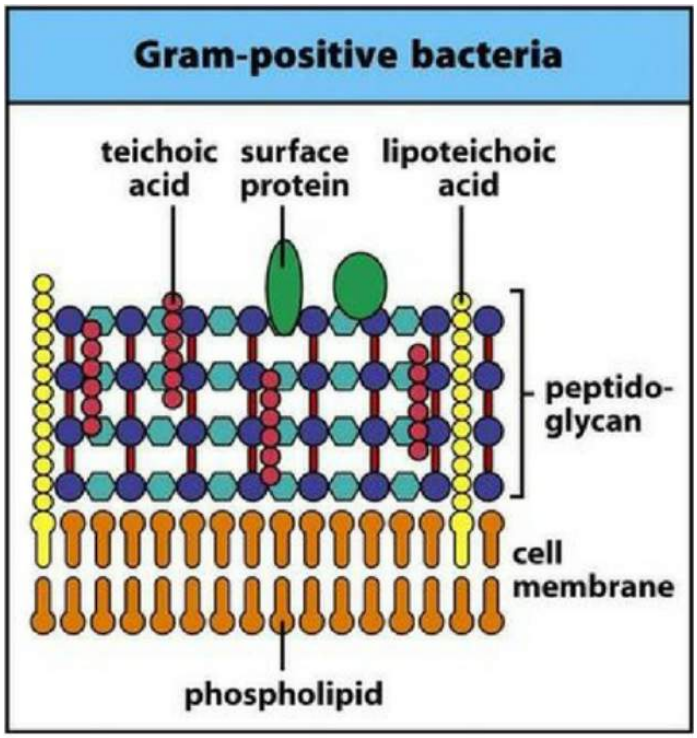
แบคทีเรีย (bacteria) เป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในกลุ่มของโพรแคริโอต (prokaryote) มีขนาดระหว่าง0.5-10 ไมครอน เป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีนิวเคลียสและออแกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้ม อยู่ในกลุ่มของอาณาจักรยูแบคทีเรีย (eubacteria) ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วยผนังเซลล์และเซลล์เมมเบรน อีกทั้งแบคทีเรียบางชนิดยังมีแคปซูลหุ้มผนังเซลล์อีกหนึ่งชั้น

3.2 โครงสร้างของแบคทีเรีย

เซลล์ของแบคทีเรียมีหลากหลายชนิด โดยสามารถอาศัยเป็นเซลล์เดี่ยวหรือหลายเซลล์หรืออยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย ซึ่งโครงสร้างของแบคทีเรียจะปรับเปลี่ยนให้มีความปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัย เหมาะแก่การดำรงชีวิต ออแกเนลล์ที่สำคัญของแบคทีเรีย คือ ผนังเซลล์ มีไว้เพื่อปกป้องเซลล์ของแบคทีเรียจากสภาพแวดล้อมภายนอก โดยแบคทีเรียนั้นสามารถจำแนกกลุ่มได้ออกเป็นสองกลุ่มแยกจากการย้อมสีติดของผนังเซลล์แบคทีเรีย (Heratage, J. et al., 1996) ได้แก่

3.2.1 กลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria)

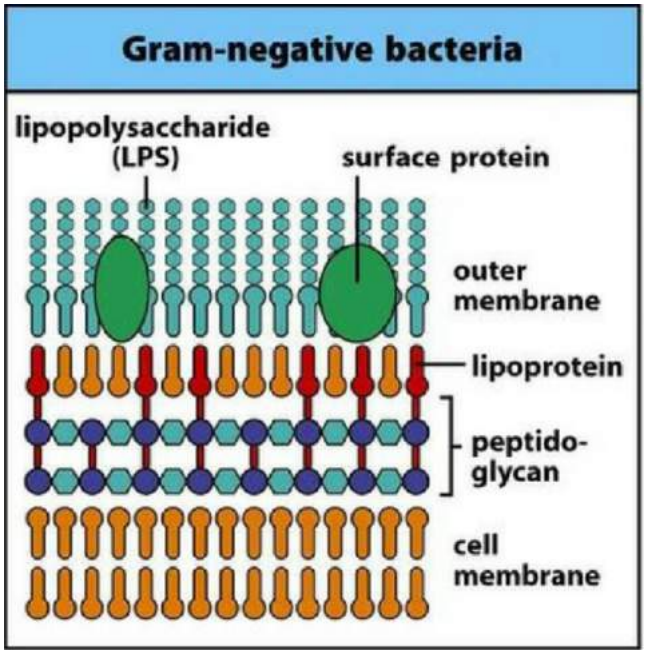
เป็นแบคทีเรียที่มีผนังเซลล์หนา ซึ่งองค์ประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์แบคทีเรียในกลุ่มนี้คือเปปทิโดไกลเคน (peptidoglycan) และกรดไทโคอิค (teichoic acid) **ดังรูป 1.5** แทรกผ่านชั้นเปปทิโดไกลเคนและเชื่อมติดเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยพันธะโควาเลนต์ ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Micrococcus luteus*, *Streptococcus sp*., *Staphylococcus aureus*. และ *Bacillus sp*. เป็นต้น



รูปที่ 1.5 โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria)
ที่มา : https://www.majordifferences.com/2018/06

3.2.2 กลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria)

โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบจะมีความซับซ้อนมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวกและประกอบด้วยองค์ประกอบหลายส่วนมากกว่า โดยผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบจะประกอบด้วยส่วนของผนังเซลล์ชั้นในและส่วนของผนังเซลล์ชั้นนอก ชั้นในของผนังเซลล์จะเป็นชั้นเปปทิโดไกลเคนบางๆ ในส่วนของผนังเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) จะมีองค์ประกอบเป็นชั้นของไขมัน ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) ลิโพโพลิแซกคาร์ไรด์ (lipopolysaccharide) และลิโพโปรตีน (lipoprotein) **ดังในรูป 1.6** ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Enterobacter sp*. เป็นต้น



รูปที่ 1.6 โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria)
ที่มา : https://www.majordifferences.com/2018/06

4. ยีสต์ (yeast)

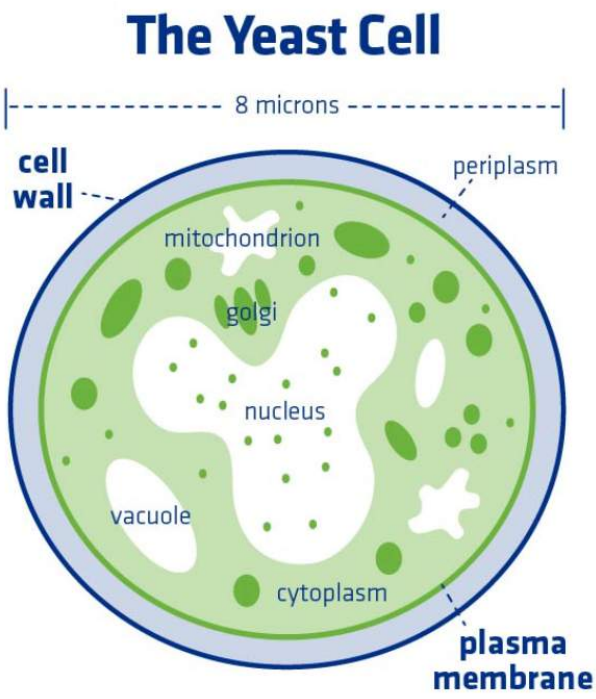
4.1 สัณฐานวิทยาของยีสต์ (yeast)

ยีสต์มีลักษณะและสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับรา เนื่องจากอยู่ในอาณาจักรเดียวกัน แต่ก็ยังมีส่วนที่แตกต่างกันหลายจุด ส่วนมากแล้วยีสต์จะอาศัยเป็นเซลล์เดียว โดยทั่วไปเซลล์ยีสต์มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรียเกือบทั้งหมด ยีสต์มีขนาดต่างๆ กันมีความกว้างตั่งแต่ 1 ถึง 5 ไมโครเมตรและมีความยาวตั่งแต่ 5 ถึง 30 ไมโครเมตร โดยทั่วไปแล้วยีสต์มีรูปร่างแบบรูปไข่แต่บางพวกก็มีรูปร่างยาวและบางพวกก็มีรูปร่างกลม

4.2 โครงสร้างของยีสต์ (yeast)

ยีสต์มีโครงสร้างพื้นฐานต่างๆคล้ายคลึงกับพวกยูคารีโอติคเซลล์ รูปแบบและโครงสร้างของยีสต์จะมีการเปลี่ยนแปลงไปตามสปีชีส์ของยีสต์ โดยองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ประกอบด้วย

- แคปซูล (capsule) ยีสต์บางชนิดจะถูกปกคลุมด้วยสารหรือเมทาบอไลต์ที่ขับออกมานอกเซลล์ มีลักษณะเป็นเมือกเหนียวข้น เรียกว่าแคปซูล แคปซูลของยีสต์ส่วนใหญ่ประกอบด้วยสารจำพวกโพลีแซคคาไรด์ต่างๆ เช่น mannan และสารประกอบอื่นๆที่มีลักษณะคล้ายแป้ง
- ผนังเซลล์ (cell wall) ผนังเซลล์ของยีสต์จะบางเมื่อมีอายุน้อย แต่จะหนาขึ้นเมื่อเซลล์ยีสต์มีอายุมากขึ้น ส่วนประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ส่วนใหญ่คือสารจำพวกโพลีแซคคาไรด์จำพวกกลูแคน (Glucan)
- เยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) ของยีสต์มีคุณสมบัติเกี่ยวกับการออสโมสิสเช่นเดียวกับแบคทีเรีย มีความหนาประมาณ 8 ไมโครมีเตอร์ ประกอบด้วยสามชั้น (triple-layered) องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์มีสารจำพวกลิปิด โปรตีนและโพลีแซคคาไรด์
- นิวเคลียส (nucleus) นิวเคลียสของเซลล์ยีสต์จะถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อที่มีชื่อว่า semipermeable nuclear membrane โดยนิวเคลียสมีหน้าที่เกี่ยวกับเมทาบอไลท์และการสืบพันธุ์ของเซลล์ยีสต์
- ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ไมโทคอนเดียเป็นโครงสร้างที่มีเยื่อหุ้ม (membrane-bond organelle) มีหน้าที่ในการผลิตพลังงานภายในเซลล์ยีสต์
- แวคูโอล (vacuole) แต่ละเซลล์ยีสต์สามารถมีแวคูลโอได้มากกว่า 1 แวคูลโออยู่ภายในไซโทพลาสซึม มีหน้าที่แตกต่างกันออกไปตามชนิดของแวคูลโอในเซลล์



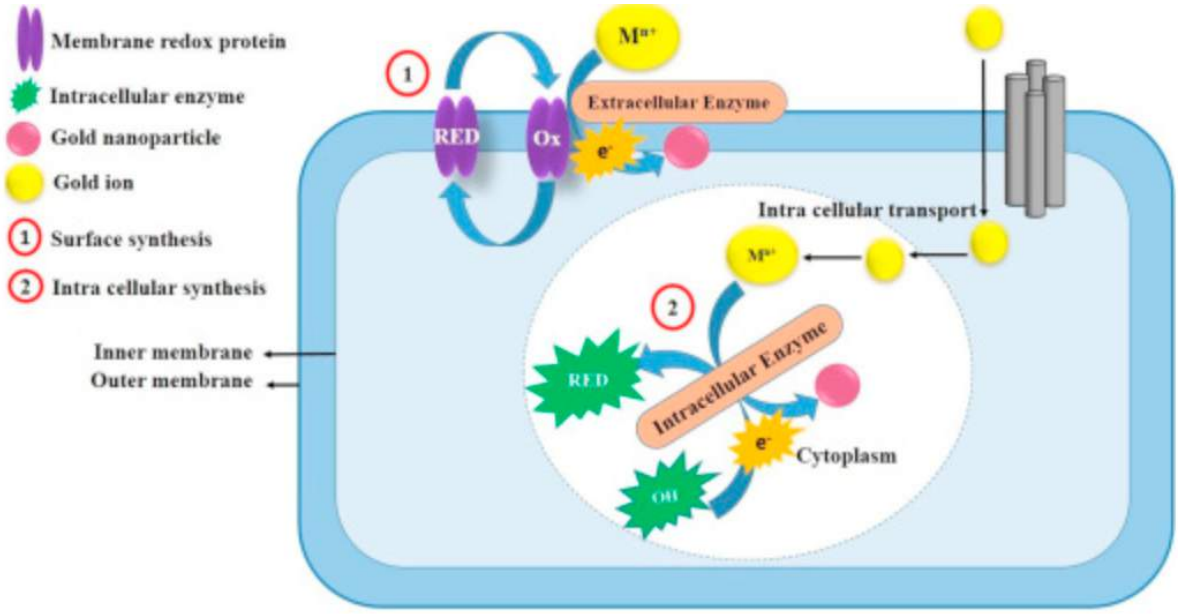
รูปที่ 1.7 โครงสร้างของเซลล์ยีสต์ (yeast cell)

ที่มา : https://fermfacts.com/ferm-facts/the-right-foundation/

5. การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำด้วยเชื้อรา

เชื้อราเป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในกลุ่มยูคาริโอติคเซลล์ มีการดำรงชีวิตด้วยการย่อยสลายสารอินทรีย์จากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ โดยการหลั่งเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อย่อยสลายโมเลกุลขนาดใหญ่ของสิ่งมีชีวิตให้มีขนาดเล็กลงก่อนดูดซึมเพื่อเป็นอาหารแก่ร่างกายซึ่งเอนไซม์ที่ทำงานภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) และสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่หลั่งออกมามีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของเชื้อรา (Abiramy K. et al., 2016)

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำด้วยวิธีการทางธรรมชาติ เป็นวิธีการสังเคราะห์ที่ดีเนื่องจากเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและมีต้นทุนที่ต่ำในการสังเคราะห์ การเลือกใช้เอนไซม์ที่ทำงานภายนอกเซลล์จากราเป็นตัวเลือกที่ดีในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ (Molnár Z. et al., 2021) โดยจากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ที่ทำงานภายนอกเซลล์ ที่เชื้อราได้ผลิต มีความสามารถในการทำให้เกิดปฏิกริยารีดักชั่น (reduction) เป็นตัวรีดิวซ์ (reducing agent) เปลี่ยนไอออนของทองคำ (Au^{3+}; gold ion) ให้กลายเป็นอนุภาคนาโนทองคำ (Au_0; AuNP) **ดังในรูปที่ 1.8** (Sengani et al., 2017) แต่จากการศึกษาในปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเอนไซม์ของเชื้อราที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำคือเอนไซม์ชนิดใด โดยการใช้เชื้อราต่างชนิดกันจะทำให้ได้อนุภาคนาโนทองคำที่มีลักษณะแตกต่างกันออกไป

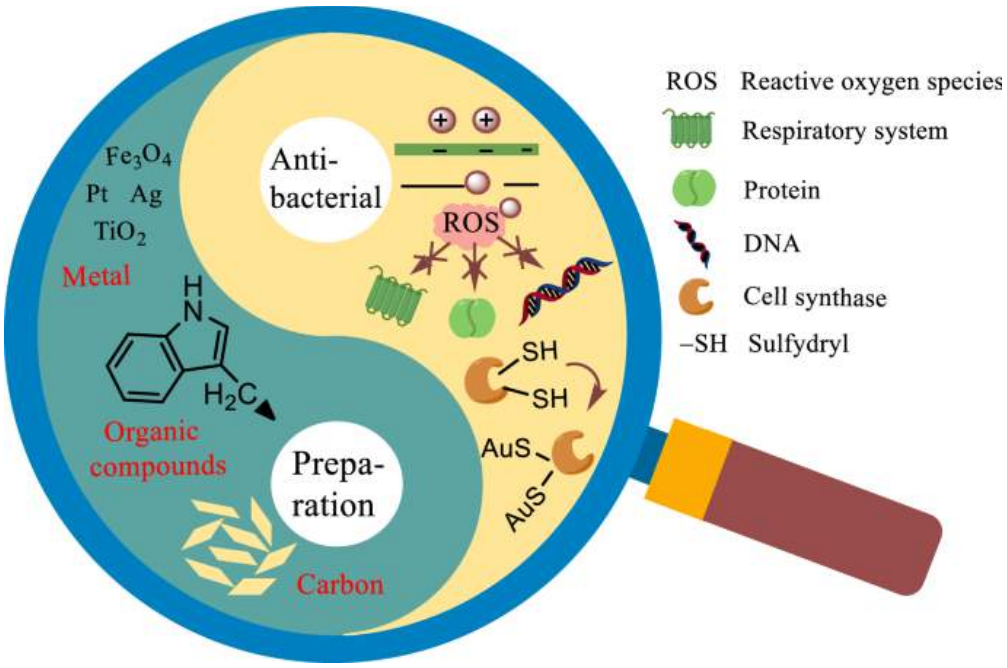


รูปที่ 1.8 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำภายในเซลล์และนอกเซลล์ของเชื้อรา (Sengani et al., 2017)

10. คุณสมบัติของอนุภาคนาโนทองคำในการยับยั้งจุลชีพ

เนื่องจากในปัจจุบันมีการดื้อยาของจุลชีพเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ การพัฒนาวัสดุนาโนที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลชีพจึงเป็นทางเลือกใหม่และมีประสิทธิภาพในการจัดการกับปัญหานี้ อนุภาคนาโนทองคำ เป็นอนุภาคที่มีความเสถียรและมีความเข้ากันได้ดีกับเซลล์ของมนุษย์และยังสามารถปรับเปลี่ยนโครงสร้างได้ง่ายและคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนทองคำขึ้นอยู่กับการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของอนุภาคนาโนทองคำ เช่น ขนาด ลักษณะของอนุภาคทองนาโน และส่วนของสารชีวภาพที่ปกคลุมอนุภาคทองนาโน ในงานวิจัยพบว่าอนุภาคนาโนทองคำยังมีบทบาทสำคัญในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียหรือจุลชีพที่มีความสามารถในการดื้อยาบางชนิดได้ (Chen S. et al., 2020)

ในปัจจุบันหลายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพในการเป็นสารยับยั้งจุลชีพของอนุภาคนาโนทองคำได้ค้นพบว่าอนุภาคนาโนทองคำมีความสามารถในการสร้างอนุมูลอิสระออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) ภายในเซลล์ของจุลชีพ ซึ่ง อนุมูลอิสระออกซิเจนที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการต่างๆ ของจุลชีพ เช่น กระบวนการหายใจ การสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ของจุลชีพและดีเอ็นเอ อีกทั้งยังมีความสามารถในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลชีพอีกด้วย**ดังรูป 1.9** (Xiao G. et al., 2021)



รูปที่ 1.9 คุณสมบัติของอนุภาคนาโนทองคำในการยับยั้งจุลชีพ (Xiao Gu et al., 2021)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

ก. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลชีพของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์จากวิธีการทางชีวภาพด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger*

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ก. ได้ฝึกฝนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำด้วยวิธีการทางชีวภาพ

ข. พัฒนากระบวนการคิดวิเคราะห์ผลการทดลองแบบวิทยาศาสตร์

ค. สามารถนำผลการทดลองต่อยอดสำหรับการปรับปรุงยาปฏิชีวนะชนิดใหม่

บทที่ 2
เครื่องมือ วัสดุ เคมีภัณฑ์

2.1 เครื่องมือ

1. กรวยกรองแก้ว
2. กระบอกตวงปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ 500 มิลลิลิตร
3. แท่งแก้ว spreader
4. ขวด Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ของบริษัท ISO Laborgerate GmbH ประเทศเยอรมัน
5. ขวดใส่สารเคมี ขนาด 500 มิลลิลิตร และ 1000 มิลลิลิตร ของบริษัท DWK Life Science ประเทศเยอรมัน
6. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) 30 องศาเซลเซียส รุ่น INNOVA 4330 ของบริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. เครื่องชั่งหยาบ แบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น PG 2002-s ของบริษัท Melter Toledo ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
8. เครื่องชั่งหยาบขนาดเล็ก ของบริษัท Camry
9. เครื่องอบฆ่าเชื้อขนาดเล็ก (Autoclave) รุ่น ES-215 ของบริษัท TOMY Seiko ประเทศญี่ปุ่น
10. เครื่องอบฆ่าเชื้อขนาดใหญ่ (Autoclave) รุ่น ES-315 ของบริษัท TOMY Seiko ประเทศญี่ปุ่น
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารตกตะกอนขนาดเล็ก microcentrifuge (spin down) รุ่น KUBOTA 3700 ของบริษัท KUBOTA ประเทศญี่ปุ่น
12. เครื่องทำความร้อนชนิดตั้งโต๊ะ (heat plate) รุ่น MS-H280-Pro ของบริษัท Scilogex ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. เครื่องมือนับจำนวนเซลล์ (Hemocytometer) ของบริษัท LW Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscopy) รุ่น CH30RF200 ของบริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น
15. เครื่องนาโนดรอป (NanoDrop spectrophotometer) รุ่น Nanodrop 2000c ของบริษัท Thermo Scientific ประเทศสหรับอเมริกา
16. ตู้ชีวนิรภัย (Biosafety cabinet) ของบริษัท LabMicrotech ประเทศไทย

17. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U71V ของบริษัท Sanyo Electric Co. ประเทศญี่ปุ่น
18. ตู้อบแห้ง (Hot air oven) ของบริษัท Contherm Digital Series
19. ไมโครปิเปตต์ ปริมาตร 10 100 และ 1000 ไมโครลิตร ของบริษัท Capp Bravo ประเทศเยอรมัน
20. อุปกรณ์นับจำนวนเซลล์ (Hand tally counter) ของบริษัท GOGO for digital ประเทศจีน
21. Automatic pipette ของบริษัท DLAB Levo plus
22. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น K-550 GE ของบริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
23. เครื่องเขย่าสารใช้ความถี่สูง (Ultrasonic sonicator) ของบริษัท Elma ประเทศเยอรมัน

2.2 วัสดุ

1. จานเพาะเชื้อ (plastic plate) ของบริษัท Bioscan
2. ทิปขนาดเล็ก (pipette tip) ปริมาตร 10 100 และ 1000 ไมโครลิตร ของบริษัท Kirgen
3. หลอดปั่นเหวี่ยง (conical tube) ขนาด 50 มิลลิลตร ของบริษัท Thermo Scientific
4. Microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท Kirgen
5. กระดาษกรอง เบอร์ 1 (Whatman No.1) ของบริษัท GE Healthcare
6. ผ้าก๊อซ
7. ปิเปตพลาสติก (plastic pipette) ของบริษัท Volac
8. ฟิวเตอร์ขนาด 0.2 ไมครอน (filter) ของบริษัท GE Healthcare
9. หลอดฉีด 5 มิลลิลิตร (syring) ของบริษัท Nipro ประเทศไทย

2.3 เคมีภัณฑ์

1. 85% กลีลเซอรอล (85% glycerol) ของบริษัท Himedia
2. ผงอาหารเลี้ยงราสำเร็จรูปโปเตโต้เดร็กโตส (potato dextrose agar) ของบริษัท Himedia
3. ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Himedia
4. ผง Muller Hinton ของบริษัท Himedia
5. Yeast extract ของบริษัท Himedia
6. Tween-20 ของบริษัท Life science

7. โกลคลอไรด์ (Gold chloride, $HAuCl_4$)
8. Amoxicillin
9. Streptomycin
10. Amphotericin B

2.4 น้ำ

1. น้ำสำหรับเตรียม cell free filtrate คือ น้ำบริสุทธิ์ชนิดที่ 1 (purified water type I)
2. น้ำสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ น้ำบริสุทธิ์ชนิดที่ 2 (purified water type II)

2.5 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ขนาดและรูปร่าง

1. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy) รุ่น JEM-2100 ของบริษัท Jeol ประเทศญี่ปุ่น เครื่องมือจากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. เครื่องมือวัดขนาดด้วยแสงตกกระทบ (dynamic light scatter) ของบริษัท Malvern Instruments ประเทศอังกฤษ เครื่องมือจากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6 เชื้อรา

เชื้อราที่ใช้ในการทดลองนี้ได้รับจาก MSCU Microbial Culture Collection ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นเชื้อราที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน และทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนทองคำได้แก่

1. *Aspergillus niger* MSCU 0361

   Kingdom Fungi
   Division Ascomycota
   Class Eurotiomycetes
   Order Trichocomaceae
   Genus *Aspergillus*
   Species *Aspergillus niger*

2. *Cryptococcus neoformans*(ATCC 208821)

   Kingdom Fungi
   Division Basidiomycota
   Class Tremellomycetes
   Order Tremellales
   Genus *Cryptococcus*
   Species *C. neoformans*

2.7 แบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดลองคือ *Escherichia coli*(ATCC 25922), *Staphylococcus aureus*(ATCC 6538P) โดยเชื้อทั้งหมดนี้ได้มาจาก The American Type Culture Collection (ATCC) ประเทศสหรัฐอเมริกา

1. *Escherichia coli*(ATCC 25922)

Kingdom Bacteria
Phylum Proteobacteria
Class Gamma Proteobacteria
Order Enterobacteriales
Family Enterobacteriaceae
Genus *Escherichia*
Species *Escherichia coli*

2. *Staphylococcus aureus*(ATCC 6538P)

Kingdom Bacteria
Phylum Firmicutes
Class Bacilli
Order Bacillales
Family Staphylococcaceae
Genus *Staphylococcus*
Species *Staphylococcus aureus*

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ

3.1.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน

นำเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์ MSCU0361 ที่ถูกเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำมาเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 72-96 ชั่วโมง หรือเป็นเวลา 3-4 วัน เมื่อเชื้อเจริญเติบโตเต็มที่จะมีลักษณะของโคโลนีเป็นสีเขียวขี้ม้าและมีการสร้างสปอร์สีดำ

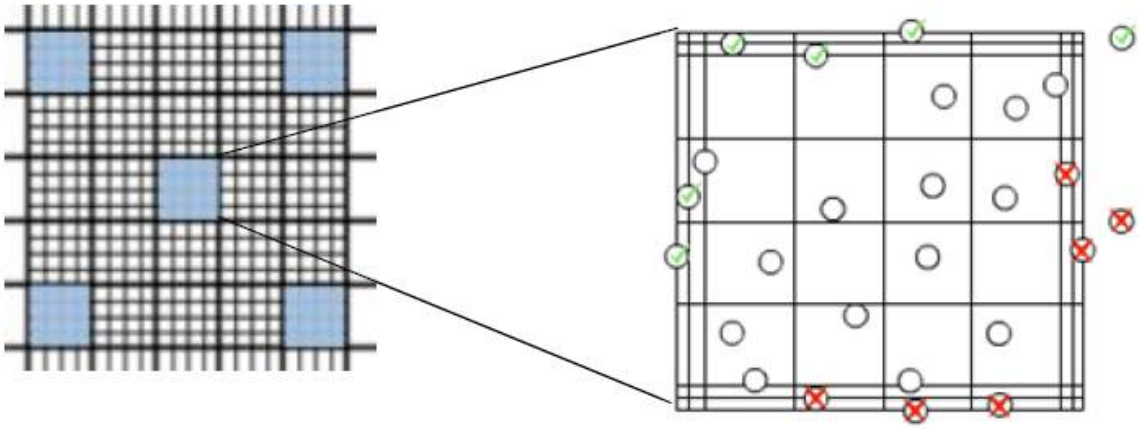
3.1.2 การเก็บสปอร์และนับจำนวนสปอร์

หลังจากเชื้อรา *A. niger* เจริญเติบโตเต็มที่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้ว จะทำการดูด 0.2% Tween20 ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร 5 ครั้ง ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีราเจริญอยู่และต้องทำการเปลี่ยน pipette tips ทุกครั้ง จากนั้นใช้แท่ง spreader ที่ทำการฆ่าเชื้อด้วย 95% ethanol เกลี่ยเบาๆ เพื่อขูดเอาสปอร์ของราให้หลุดออกและผสมกับ 0.2% Tween20 แล้วดูดเอาสารละลายส่วนนี้กรองผ่านผ้าก๊อซที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วพับ 2 ทบ วางบนหลอดก้นแหลม ทำการกรองสปอร์ของ *A. niger* โดยส่วนเส้นใยของราจะติดอยู่บริเวณผ้าก๊อซและส่วนของสปอร์ราจะถูกกรองผ่านผ้าก๊อซลงไป จากนั้นทำการชะด้วย 0.2% Tween20 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เพื่อล้างสปอร์ที่อาจจะติดอยู่บนผ้าก๊อซลงไป ทำการเจือจางสปอร์ด้วย 0.2% Tween20 ในอัตราส่วนของ spore: 0.2% Tween20 เป็น 1:5 ใส่ในหลอด microcentrifuge จากนั้นจะนำไปนับจำนวนสปอร์โดยใช้ hemocytometer โดยดูดสารละลายจาก microcentrifuge ปริมาตร 10 ไมโครลิตรในแต่ละฝั่ง ปล่อยสารละลายให้ไหลผ่านเข้าไปในช่องว่างที่มีเส้นตารางอยู่โดยที่มีกระจกปิดสไลด์ปิดอยู่ ระมัดระวังไม่ให้มีฟองอากาศเข้าไปด้านในเพราะอาจจะส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในการนับได้ การนับสปอร์จะมองผ่านกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย 400 เท่า จะทำการนับ 5 ช่องใหญ่จากทั้งหมด 25 ช่องเท่านั้น ดัง**รูปที่ 3.1** และทำซ้ำเดิมกับอีกด้านนึงแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{จำนวนสปอร์ (spores/ml)} = df \times n \times 5 \times 10^4$$

โดยที่ df หมายถึง ค่า dilution factor

n หมายถึง จำนวนค่าเฉลี่ยสปอร์ที่ทำการนับได้



รูปที่ 3.1. วิธีการนับสปอร์ของรา *A. niger* ด้วย hemocytometer

ที่มา : The Methods and Math of Yeast Counting - Colorado Brewers Guild (coloradobeer.org)

3.1.3 ขั้นตอนการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อรา (fungal filtrate)

ดูดสปอร์จากหลอดก้นแหลมที่ทำการกรองไว้ ปริมาตรที่คำนวณได้ โดยให้มีจำนวนสปอร์อยู่เป็น 10^6 สปอร์ ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตรที่มี potato dextrose broth (PDB) อยู่ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการบ่มในเครื่องบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รอบเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 4 วัน หลังจากนั้นจะได้ส่วนของชีวมวลเชื้อรา (fungal biomass) นำมากรองโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อทำการแยกส่วนของชีวมวลเชื้อราออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB จากนั้นทำการชะล้างส่วนของชีวมวลเชื้อราด้วยน้ำปราศจากเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร 3 ครั้ง เพื่อชะล้างส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจจะติดอยู่กับชีวมวลเชื้อราออกจนน้ำถูกกรองลงไปหมด จากนั้นทำการชั่งชีวมวลเชื้อรา30 กรัม ใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำปราศจากเชื้ออยู่ 60 มิลลิลิตร โดยมีอัตราส่วนของชีวมวลเชื้อรากับ น้ำปราศจากเชื้อเป็น 1:2 ทำการบ่มในเครื่องบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รอบเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 4 วัน ซึ่งหลังจากครบระยะเวลา 4 วันแล้วจะนำชีวมวลเชื้อรามากรองออกโดยใช้กระดาษ Whatman No.1 เพื่อเก็บเอาส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อราซึ่งเป็นส่วนที่รามีการหลั่งสารต่างๆที่สำคัญในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนออกมาไว้เพื่อทำการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนต่อไป

3.1.4 ขั้นตอนการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน

จะแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ชุดควบคุม 1 (control 1) ชุดควบคุม 2 (control 2) และชุดการทดลอง (experiment) ซึ่งเป็นส่วนที่เกิดการสังเคราะห์อนุภาคทองนาโน โดยที่

3.1.4.1. ชุดควบคุม 1 มีการเติมสารละลายต่างๆ ดังนี้ acetate buffer pH 4.7 ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร, น้ำปราศจากเชื้อ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และน้ำเลี้ยงเชื้อราปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร ผสมกันในหลอดทดลอง

3.1.4.2. ชุดควบคุม 2 มีสารละลายต่างๆ ดังนี้ acetate buffer pH 4.7 ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร, $HAuCl_4$ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และ น้ำปราศจากเชื้อ ปริมาตร 2.25 ไมโครลิตร ผสมกันในหลอดทดลอง

3.1.4.3. ชุดการทดลอง มีสารละลายต่างๆ ดังนี้ $HAuCl_4$ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร, acetate buffer pH 4.7 ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร และน้ำเลี้ยงเชื้อรา ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร ผสมกันลงในหลอดทดลอง

ปริมาตรทั้งหมดของทั้ง 3 หลอด (ชุดควบคุม 1 ชุดควบคุม 2 และชุดการทดลอง) มีปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำทั้ง 3 หลอดเก็บไว้ในที่มืดโดยใช้กระดาษฟอยด์ห่อหุ้มส่วนหลอดทดลองเอาไว้ สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเป็นระยะเวลา 60-90 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ทั้ง 3 หลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง UV-visible spectrophotometer และทำการเตรียมตัวอย่างอนุภาคทองนาโนเพื่อนำไปทำ zeta sizer, zeta potential และส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy;TEM)

3.1.5. ขั้นตอนการแยกอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา

นำอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้จาก 3.1.4.3. มาใส่ลงในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที ทำซ้ำจนกว่าสารละลายจะใสและอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้จะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด microtube จนหมด จากนั้นค่อยๆทำการดูดสารละลายส่วนใสที่อยู่ด้านบนออกให้ได้มากที่สุดและทำอย่างระมัดระวังเพื่อไม่ให้ตะกอนของอนุภาคทองคำนาโนที่อยู่ก้นหลอด microtube เกิดการฟุ้งกระจาย จากนั้นทำการระเหยในส่วนของน้ำที่หลงเหลืออยู่โดยมีการเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ จากนั้นนำอนุภาคทองคำนาโนไปชั่งในเครื่องชั่งละเอียดเพื่อวัดน้ำหนักในหน่วยมิลลิกรัม และจากนั้นทำการเติมน้ำที่ปราศจากเชื้อเพื่อปรับให้มีความเข้มข้น

3.1.6 **การวัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำนาโนด้วย UV-visible spectrometry**

นำสารละลายอนุภาคทองคำนาโนที่ทำการสังเคราะห์ขึ้นได้จากข้อที่ 3.1.1.4.1.-3.1.1.4.3. มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-visible spectrometry ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 200-800 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง NanoDrop2000 ซึ่งเป็นวิธีพื้นฐานในการยืนยันว่าภายในสารละลายมีการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนเกิดขึ้น โดยอนุภาคทองคำนาโนจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ช่วงความยาวคลื่น 530-560 นาโนเมตร โดยขั้นตอนในการวัดค่าการดูดกลืนแสงจะใช้ Blank เป็นน้ำกลั่น จากนั้นจึงทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้

3.1.7 **การเตรียมตัวอย่างอนุภาคทองคำนาโนเพื่อทำ dynamic light scattering (DLS) และ zeta potential**

นำอนุภาคทองคำนาโนที่ทำการสังเคราะห์ขึ้นได้เสร็จสิ้นแล้ว มาเจือจางโดยที่ใช้อัตราส่วนของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ต่อน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อในเป็น 1:5 จากนั้นทำการผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) และส่งตัวอย่างที่ทำการเตรียมได้ไปวัดผล dynamic light scattering (DLS) และ Zeta potential ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.8 **การเตรียมตัวอย่างอนุภาคทองคำนาโนเพื่อส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy;TEM)**

นำอนุภาคทองคำนาโนที่ทำการสังเคราะห์แล้ว มาเจือจางโดยที่ใช้อัตราส่วนของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ต่อน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อในเป็น 1:9 จากนั้นทำการผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) และส่งตัวอย่างที่ทำการเตรียมได้ไปส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลชีพของอนุภาคนาโนทองคำ

3.2.1 การทำกราฟมาตรฐาน (standard curve)

เชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) ทำการทดลองเช่นเดียวกันในเชื้อทุกตัว โดยนำแบคทีเรียจากตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาส streak ลงบนอาหารแข็งและบ่ม 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารแข็งจำนวนหนึ่งโคโลนีใส่ลงในอาหารเหลว ปริมาตร 4 มิลลิลิตรและบ่ม 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที หลังจากที่บ่มเป็นเวลา 3 ถึง 5 ชั่วโมงนำเชื้อที่เพาะเลี้ยงจำนวน 2 มิลลิลิตรไปเจือจางในอัตราส่วน 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร นำเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปเจือจางให้ได้ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} และ 10^{-8} เท่า แล้วนำ ความ

เข้มข้นเชื้อที่ 10^{-3} – 10^{-8} ไป spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar และนำไปบ่ม 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนับโคโลนีและคำนวณกลับเป็นหน่วย CFU/ml นำข้อมูล CFU/ml และค่า O.D.600 ที่วัดได้มาทำกราฟ สร้างสมการของเส้นกราฟ (y=mx+C) ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด

3.2.2 การเตรียม agar well plate ใช้สำหรับทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพ

3.2.2.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar สำหรับการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* และเตรียม YPD agar สำหรับการทดสอบยีสต์ *C. neoformans*

3.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคทองนาโนในการต้านจุลชีพ

3.2.3.1 นำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* จาก stock เชื้อที่ได้ทำการหากราฟมาตรฐานไว้มาใช้ในการทดสอบด้วยการนำไปลงเชื้อใน Nutrient broth เป็นเวลา 1 วัน

3.2.3.2 นำเชื้อจากข้อ 3.2.3.1 มาลงเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ความเข้มข้นของแบคทีเรีย $1.5x10^{8}$ CFU/ml ลงบน Mueller-Hinton agar โดยวิธีการ spread เชื้อแบคทีเรียให้ทั่วอาหาร

3.2.3.3 เจาะหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อจานละ 4 หลุม

3.2.3.4 ปิเปตสารลงในหลุม 4 หลุม ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

1. กลุ่มควบคุมบวก (positive control) ได้แก่streptomycin และ amoxicillin
2. อนุภาคทองนาโน (AuNPs)
3. กลุ่มควบคุมลบที่ 1 (negative control 1) ได้แก่ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ
4. กลุ่มควบคุมลบที่ 2 (negative control 2) ได้แก่ น้ำเลี้ยงเชื้อรา (fungal filtrate)

3.2.3.5 ทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคทองนาโนที่ความเข้มข้น 5 , 10 , 15 ไมโครกรัมต่อหลุม

3.2.3.6 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

3.2.3.7 ตรวจสอบผลในวันที่ 1 โดยการวัดค่า inhibition zone ที่เกิดรอบบริเวณหลุม สรุปผลการทดลองและอภิปรายผล

3.2.4 ทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคทองนาโนในการต้านยีสต์ก่อโรค

3.2.4.1 เลี้ยงยีสต์ *C. neoformans* บนอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD agar เป็นเวลา 4 วัน

3.2.4.2 นำโคโลนีเดี่ยวของ *C. neoformans* ลงใน YPD broth บ่มข้ามคืน

3.2.4.3 นำยีสต์ที่บ่มข้ามคืนมานับยีสต์ด้วย hemocytometer

3.2.4.4 ปรับความเข้มข้นของยีสต์ให้เท่ากับ $1.5x10^8$ cells/ml

3.2.4.5 ทำการ spread ยีสต์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar

3.2.4.6 เจาะหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อจานละ 4 หลุม

3.2.4.7 ปิเปตสารลงในหลุม ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

1. กลุ่มควบคุมบวก ได้แก่ amphotericin B
2. อนุภาคทองนาโน (AuNPs)
3. กลุ่มควบคุมลบที่ 1 (negative control 1) ได้แก่ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ
4. กลุ่มควบคุมลบที่ 2 (negative control 2) ได้แก่ น้ำเลี้ยงเชื้อรา (fungal filtrate)

3.2.4.8 ทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนที่ความเข้มข้น 5 , 10 , 15 ไมโครกรัมต่อหลุม

3.2.4.9 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

3.2.4.10 ตรวจสอบผลในวันที่ 1 โดยการวัดค่า inhibition zone ที่เกิดรอบบริเวณหลุม สรุปผลการทดลองและอภิปรายผล

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 เชื้อราที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. niger* MSCU 0361 ที่ได้จาก Microbial Culture Collection จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ทำการเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน (96 ชั่วโมง) พบว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เกิดขึ้นบนอาหาร PDA ในระยะแรกของการเจริญพบว่ามีสีขาว แต่เมื่อราเจริญไปได้เต็มที่จะเกิดการสร้างสปอร์ขึ้นทำให้ลักษณะโคโลนีของราเปลี่ยนเป็นสีดำ ในบริเวณที่มีการสร้างสปอร์ **ดังแสดงในรูป 4.1**

รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของ *A. niger* MSCU 3061 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

4.2 ผลของการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำของสารสกัดจากเชื้อรา

จากการทดลองสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อรา (fungal filtrate) ของเชื้อรา *A. niger* MSCU 3061 โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อราผสมด้วยสารละลาย acetate buffer ที่ pH 4.7 หลังจากนั้นเติมสารละลาย 0.02 M $HAuCl_4$ และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด

พบว่าเกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำขึ้นโดยเป็นการแสดงว่าเกิดการสังเคราะห์ขึ้น เปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีม่วงอมดำ ซึ่งเป็นผลจากการเกิดปฏิกิริยารีดักชั่นและเกิดการสังเคราะห์อนุภาคนาโนขึ้นภายในสารละลาย **ดังรูป 4.2**

(A)

(B)

รูปที่ 4.2 (A) ลักษณะสีของน้ำเลี้ยงเชื้อรา (fungal filtrate) ของ *A. niger* MSCU 3061 ที่ผสมด้วยสารละลาย acetate buffer ที่ pH 4.7 และสารละลาย 0.02 M HAuCl4 (B) ลักษณะสีของสารละลายที่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองเป็นสีม่วงอมดำ

จากการทดลองสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำจะประกอบด้วยชุดควบคุม 1 (control 1: acetate buffer + $HAuCl_4$ + H_2O), ชุดควบคุม 2 (control 2: acetate buffer + น้ำเลี้ยงเชื้อรา+ H_2O) เพื่อใช้เทียบสีสารละลายในการทดลอง **ดังรูปที่ 4.3**

(a) (b)

รูปที่ 4.3 (A) ชุดควบคุม 1 (acetate buffer + $HAuCl_4$ + H_2O), (B) ชุดควบคุม 2 (acetate buffer + น้ำเลี้ยงเชื้อรา + H_2O)

ผลการทดลองพบว่า การทดลองสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำโดยน้ำเลี้ยงเชื้อรา ที่ผสมด้วยสารละลาย acetate buffer แล้วเติมด้วยสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด พบการเปลี่ยนแปลงของสีสารละลายจากสีเหลืองใสเป็นสีม่วงดำ **ดังรูปที่ 4.4** ภายในเวลา 55 – 70 นาที

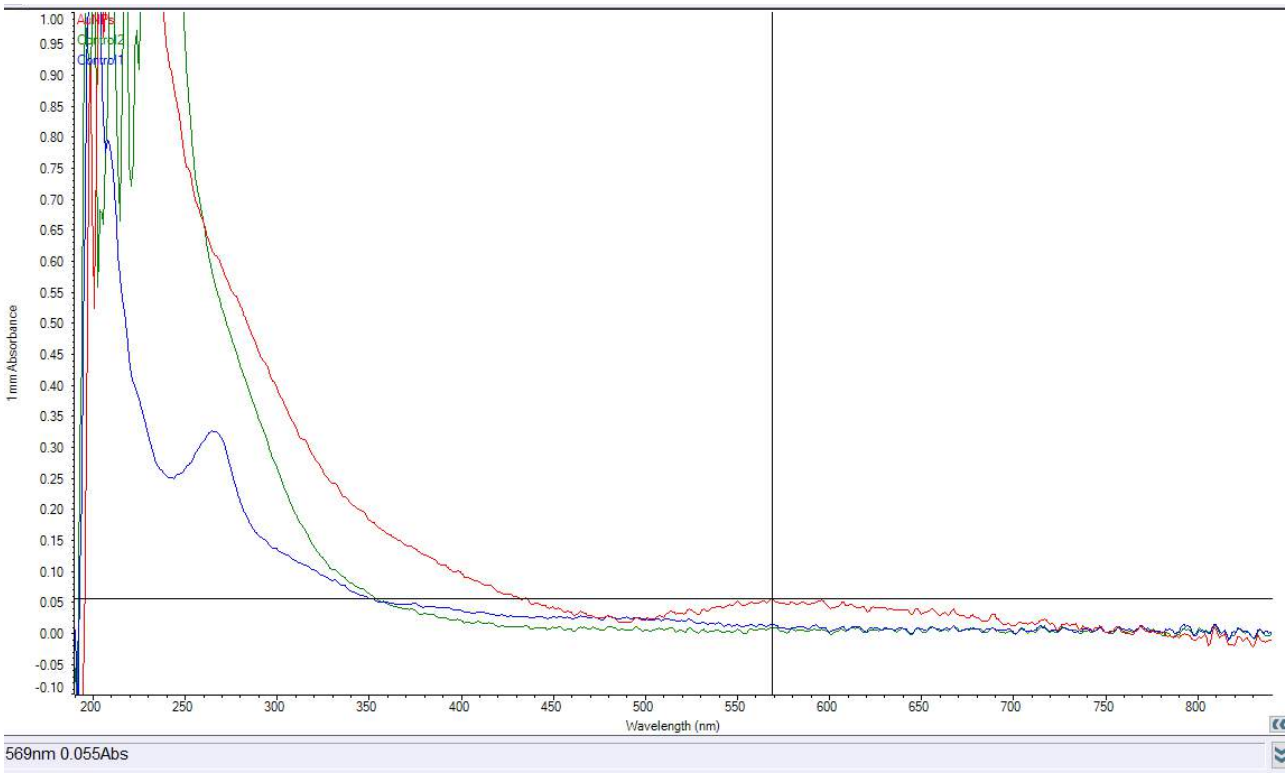
(a) (b)

รูปที่ 4.4 (A) สารละลายที่เวลาเริ่มต้นในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ, (B) สารละลายที่เวลา 55 – 70 นาทีในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ

4.3 ผลของการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนทองคำ (UV-visible absorption)

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำที่เกิดขึ้นนั้น นอกจากจะสังเกตุได้จากสีของสารละลายที่เกิดการเปลี่ยนแปลงแล้ว ยังสามารถตรวจสอบได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่นในช่วง 200 – 800 นาโนเมตร อีกด้วย โดยใช้ UV-visible spectrophotometer จากผลจะแสดงใน **รูปที่ 4.5**

พบว่ามีการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่นที่ 550 – 570 นาโนเมตร ในสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ และ acetate buffer โดยสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำในสารละลาย acetate buffer เท่ากับ 0.055 ที่ความยาวคลื่น 569 นาโนเมตร และจากกราฟของการทดลองพบว่า พบการดูดกลืนแสงที่ช่วง 280 นาโนเมตร เป็นผลมาจากกรดอะมิโนและโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา

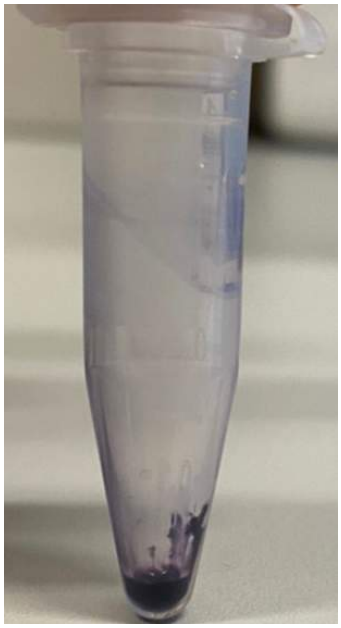


รูปที่ 4.5 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมในสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ และ acetate buffer

4.4 การปั่นแยกอนุภาคนาโนทองคำ

โดยในขั้นตอนนี้เป็นการแยกอนุภาคนาโนทองคำให้มีความบริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการทดลองอื่นๆต่อไป โดยนำสารละลายที่สังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จะสังเกตเห็นตะกอนของอนุภาคนาโนทองคำเล็กๆอยู่ที่ก้นหลอด ดังที่แสดงใน **รูปที่ 4.6** ซึ่งอนุภาคนาโนทองคำเหล่านี้ เกิดจากการสังเคราะห์ของสารละลายที่ผสมด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อรา สารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ และ acetate buffer

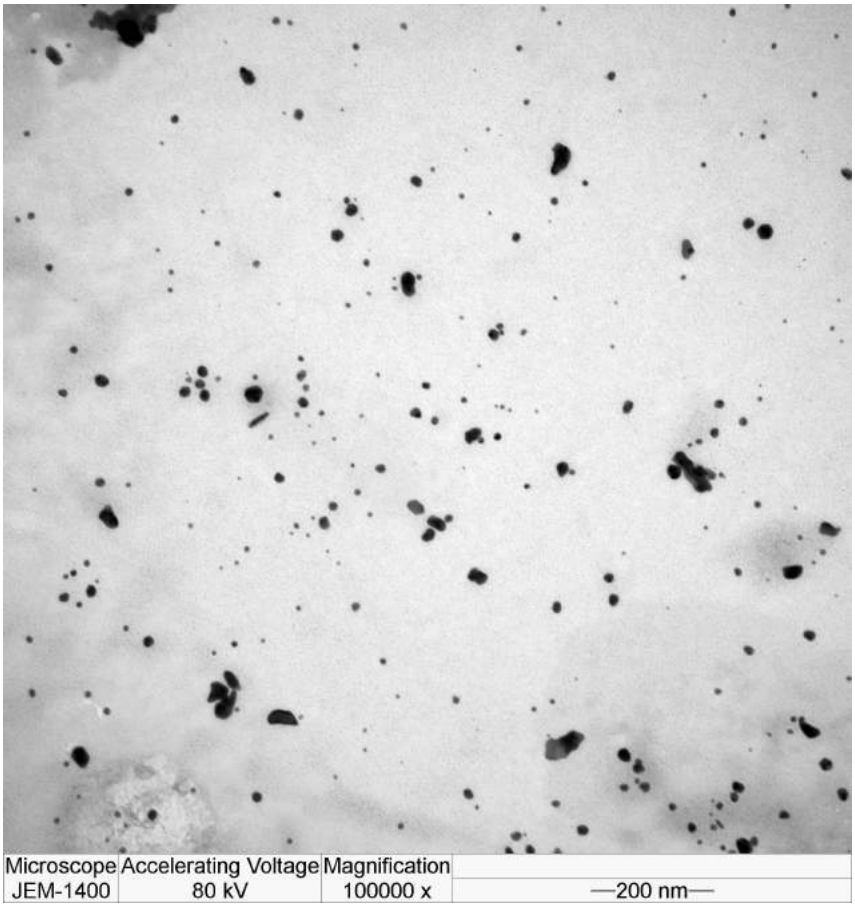
นำสารละลายที่เห็นตะกอนของอนุภาคนาโนทองคำไประเหยให้แห้งภายใต้อุณหภูมิห้องเพื่อให้ส่วนของเหลวออกหมด เป็นเวลา 1 วัน นำออกมาวัดน้ำหนักได้ 0.77 มิลลิกรัม



รูปที่ 4.6 ตะกอนของอนุภาคนาโนทองคำหลังปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

4.5 ผลการวิเคราะห์ลักษณะรูปร่างของอนุภาคนาโนทองคำด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy; TEM)

จากการวิเคราะห์รูปร่างและการกระจายตัวของอนุภาคนาโนทองคำของสารละลายที่ใช้สังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ และ acetate buffer ด้วยกล้อง TEM พบว่ารูปร่างของอนุภาคนาโนทองคำ และลักษณะของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์โดยน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ และ acetate buffer มีรูปร่างที่สม่ำเสมอ พบว่ารูปร่างส่วนใหญ่ของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้เป็นทรงกลม ในส่วนของการกระจายของอนุภาคนาโนทองคำ พบว่า อนุภาคนาโนทองคำจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ และ acetate buffer มีการรวมกลุ่มกันในบางจุด และกระจายตัวกันออกไป ขนาดของอนุภาคนาโนทองคำจากสารสกัดจากเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ และ acetate buffer พบว่ามีขนาดที่ไม่สม่ำเสมอ พบอนุภาคนาโนทองคำที่มีขนาดเล็ก และขนาดใหญ่ กระจายอยู่ **ดังรูปที่ 4.7**



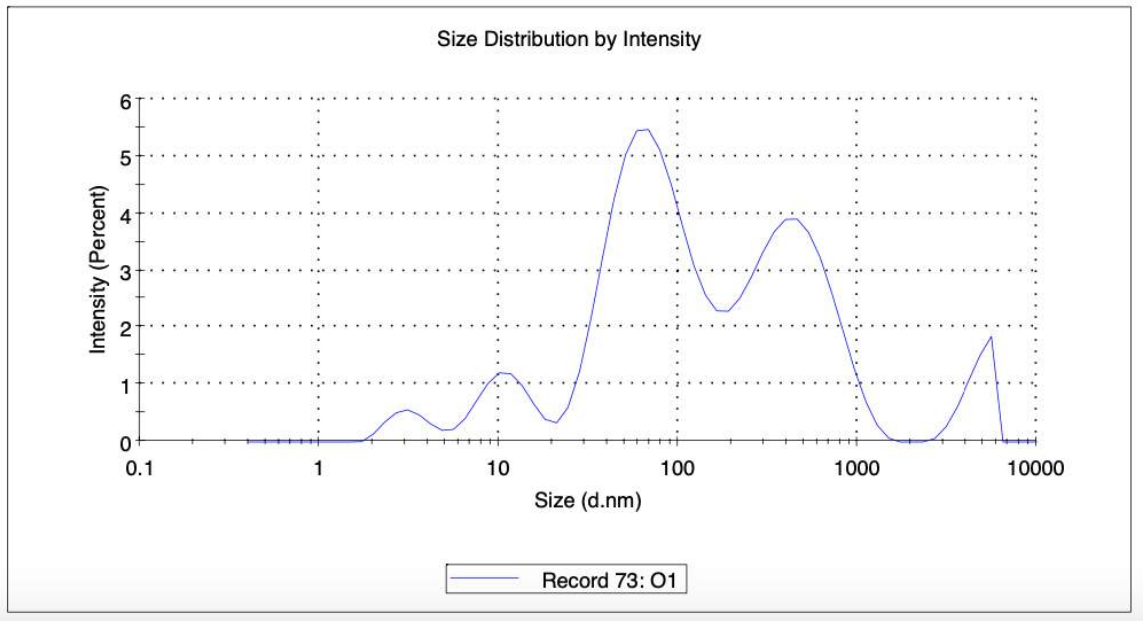
รูปที่ 4.7 รูปภาพจากกล้อง TEM แสดงลักษณะของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์โดยน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ และ acetate buffer

4.6 ผลการวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคนาโทองคำที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี Dynamic Light Scattering (DLS)

ผลของการวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคนาโนทองคำที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย Dynamic Light Scattering (DLS) โดยวิธีการนี้อาศัยหลักการของการตรวจวัดความถี่ที่เปลี่ยนไปของแสงที่กระเจิงบริเวณพื้นผิวของอนุภาคนาโนทองคำ ในการทดลองนี้ได้ใช้อนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ และ acetate buffer ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DLS พบว่า ขนาดของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้มีขนาดอยู่ในช่วง 10 – 1100 นาโนเมตร ดัง**รูปที่ 4.8** มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 76.22 นาโนเมตร และมีค่า Polydispersity index (PDI) เท่ากับ 0.770 **ดังตารางที่ 4.1**

ตารางที่ 4.1 ขนาดโดยเฉลี่ยของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ และ acetate buffer

ชุดการทดลอง	Average particle size(nm)	Average PDI
AuNP ที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อราที่เติมสารละลาย 0.2 M HAuCl4 และ acetate buffer	76.22	0.77

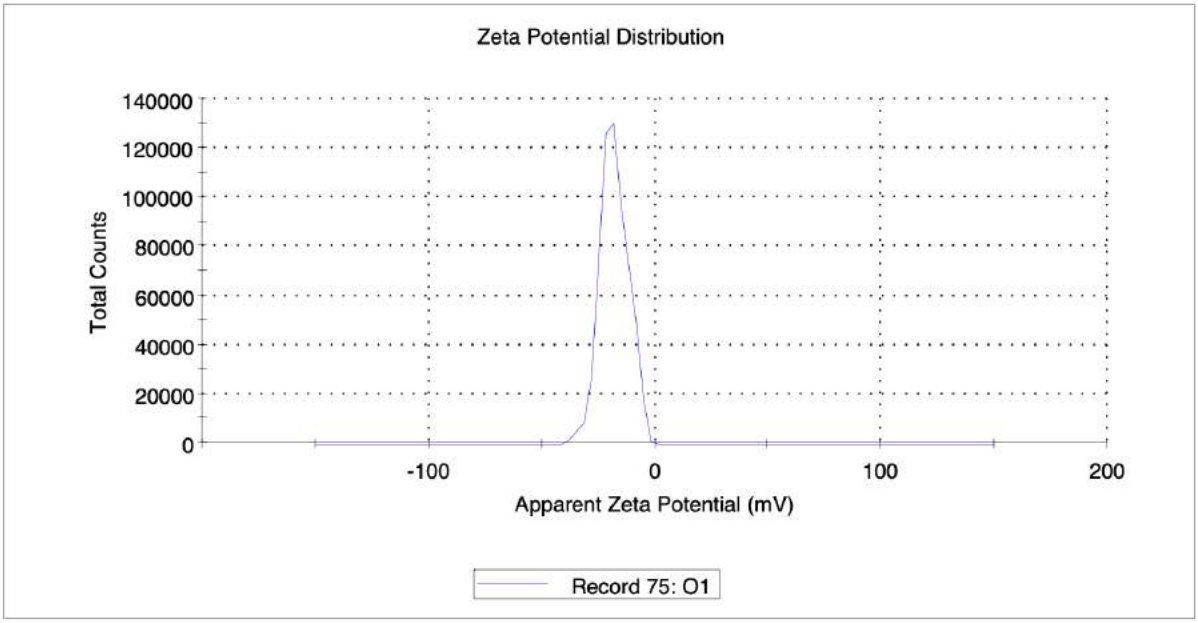


รูปที่ 4.8 กราฟการกระจายตัวของขนาดอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์จากสารสกัดจากเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ และ acetate buffer

4.7 ผลการวิเคราะห์ความเสถียรของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี zeta potential

ผลของค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) ซึ่งเป็นค่าความแตกต่างของประจุไฟฟ้าระหว่างชั้นความหนาแน่นของไอออนที่อยู่รอบๆอนุภาคนาโนทองคำและประจุในของเหลวที่อยู่ล้อมรอบอนุภาคทองคำนาโน (มีหน่วยเป็นมิลลิโวลต์)

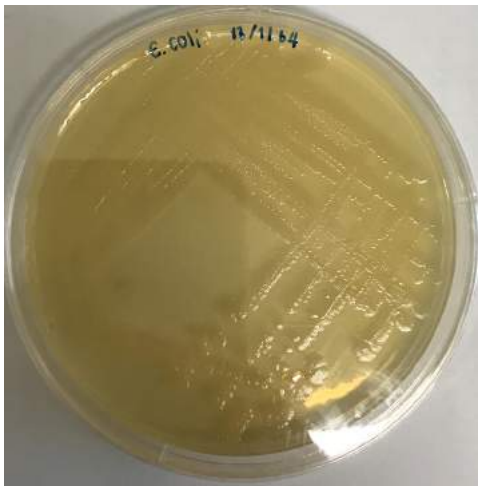
โดยปกติแล้วอนุภาคนาโนทองคำจะมีความเสถียรเมื่อมีค่าศักย์ซีต้าเป็นบวกมากกว่า +20 มิลลิโวลต์ หรือมีค่าเป็นลบมากกว่า -20 มิลลิโวลต์ ซึ่งผลการวิเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำด้วยวิธีนี้ พบว่าอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์จากสารสกัดจากเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ และ acetate buffer มีค่าศักย์ซีต้า เท่ากับ -18 มิลลิโวลต์ **ดังรูป 4.9**

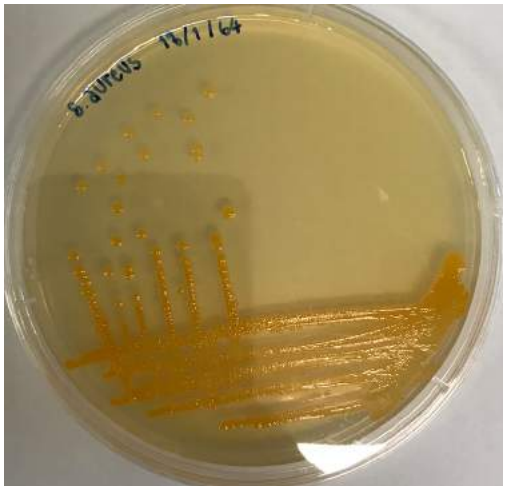


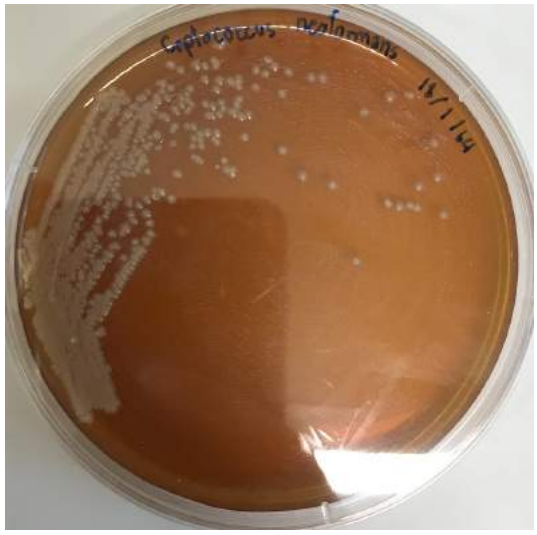
รูปที่ 4.9 กราฟแสดงค่าศักย์ซีต้าของอนุภาคนาโนทองคำสังเคราะห์จากสารสกัดจากเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ และ acetate buffer

4.8 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นสารยับยั้งจุลชีพของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้

จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* (ATCC 25922) และ *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง พบว่าโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ของ *E. coli* (ATCC 25922) นั้นมีโคโลนีสีขาว ส่วน*S. aureus* (ATCC 6538P) มีโคโลนีเป็นสีเหลือง และยีสต์ *Cryptococcus neoformans* (ATCC 208821) ที่เลี้ยงบนอาหาร yeast extract peptone dextrose agar (YPD) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ องศาเซลเซียส มีลักษณะของโคโลนีเป็นสีขาวขุ่น **ดังรูปที่ 4.10**

(A) 

(B) 

(C) 

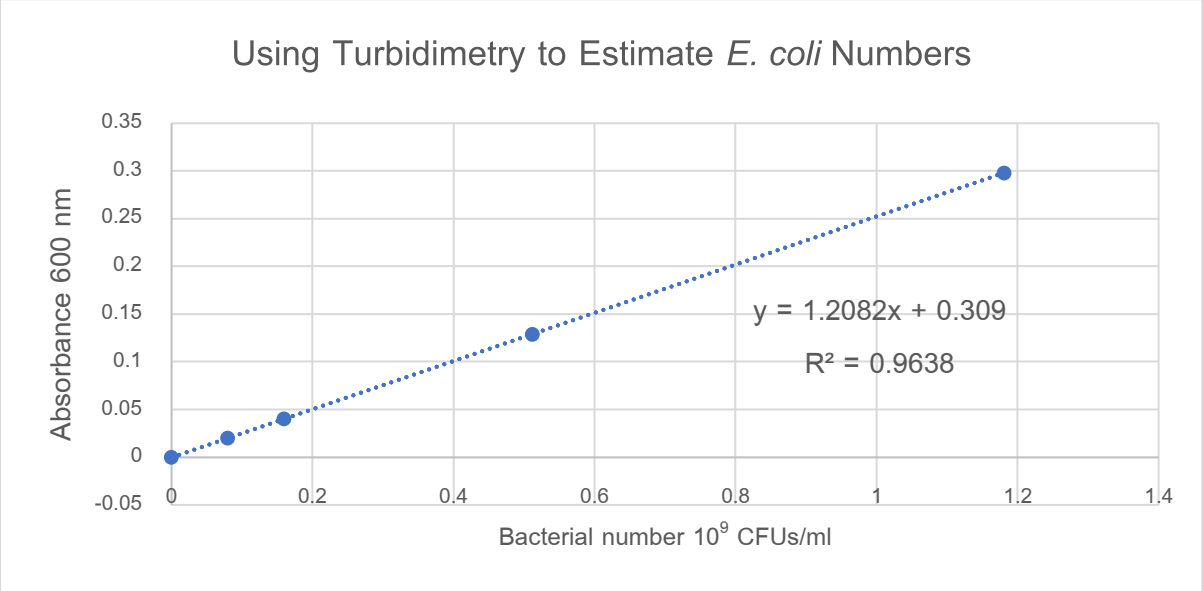
รูปที่ 4.10 (A) ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (ATCC 25922) , (B) ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* (ATCC 6538P) และ (C) ลักษณะโคโลนีของยีสต์ *C. neoformans* (ATCC 208821)

4.9 การทำกราฟมาตรฐาน (standard curve)

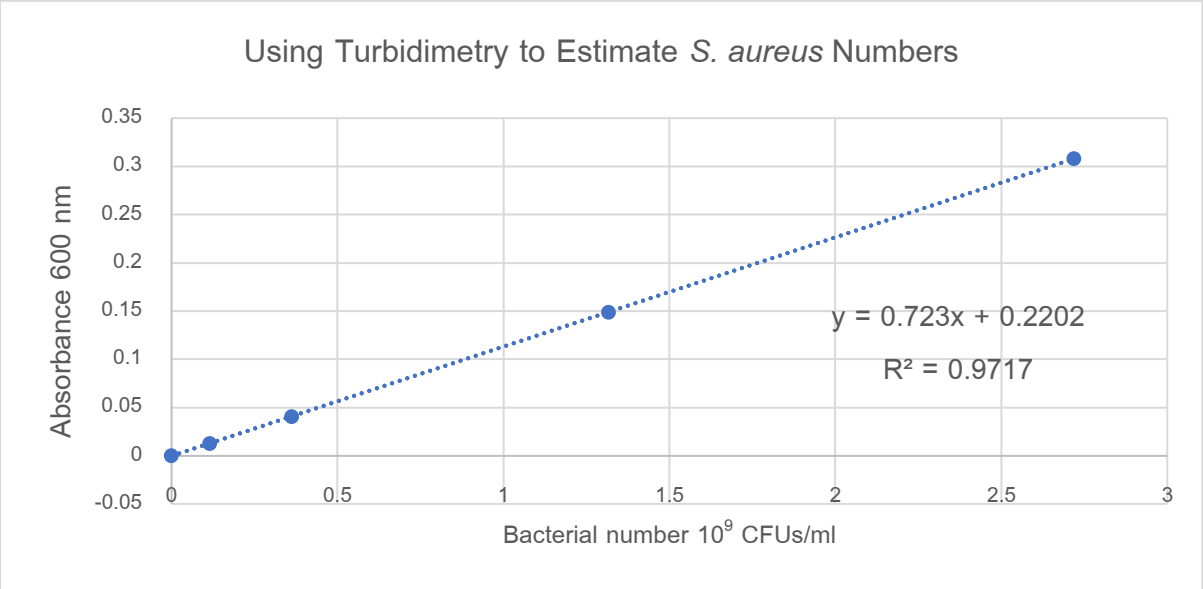
จากการหาปริมาณเซลล์แบคทีเรีย 2 ชนิดคือ เชื้อ *E. coli* (ATCC 25922) และ*S. aureus* (ATCC 6538P) เพื่อใช้ในการวัดปริมาณเซลล์ในการทดสอบประสิทธิภาพกับอนุภาคนาโนทองคำ โดยในแต่ละเชื้อมีกระบวนการทดลองที่เหมือนกัน เมื่อนำข้อมูลจากการทดลองคือ CFU/ml และค่า O.D. 600 ที่วัดได้มาทำกราฟสร้างสมการ (y= mx + c) ของเชื้อแบคทีเรียได้ผลดังแสดงใน

รูปที่ 4.11 – 4.12

รูปที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ *E. coli* (ATCC 25922) ในหนึ่งมิลลิลิตรและค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

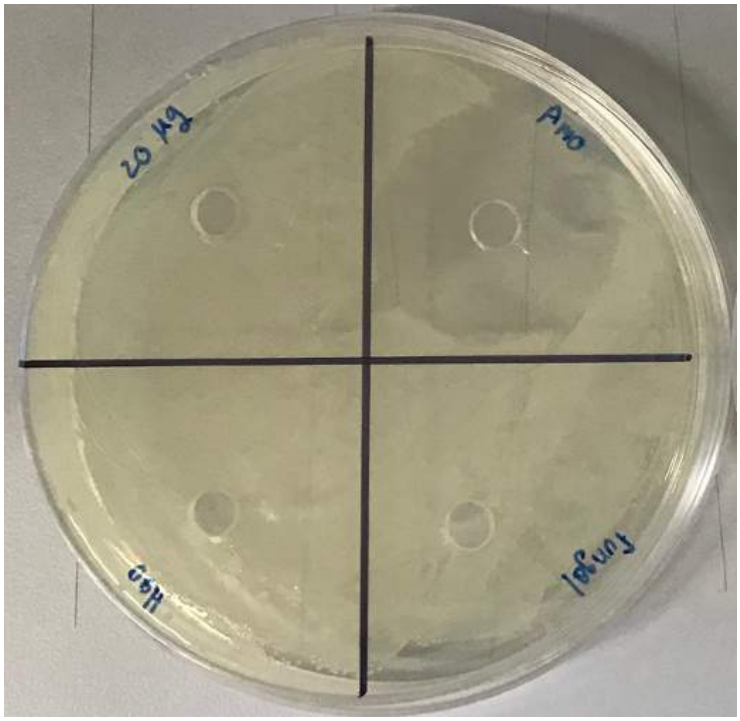


รูปที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ *S. aureus* (ATCC 6538P) ในหนึ่งมิลลิลิตรและค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

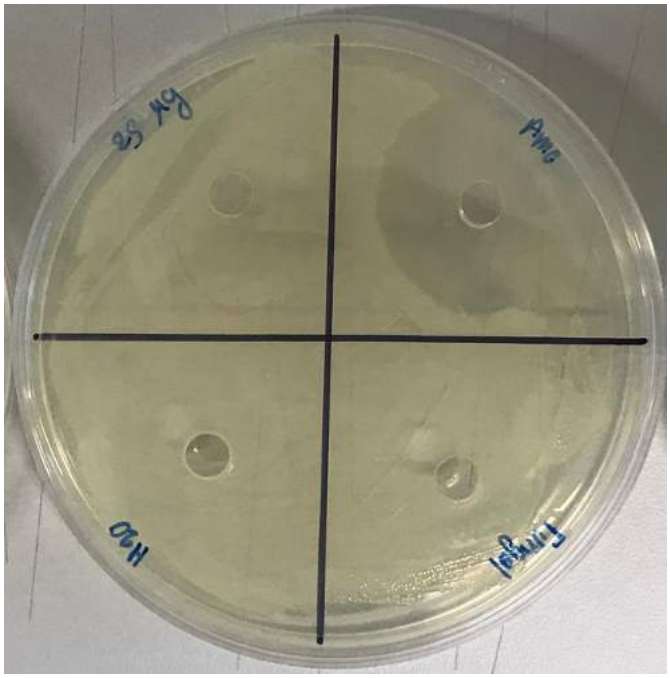


4.10 ผลการทดลองประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M HAuCl4 และ acetate buffer กับเชื้อ *E. coli* (ATCC 25922)

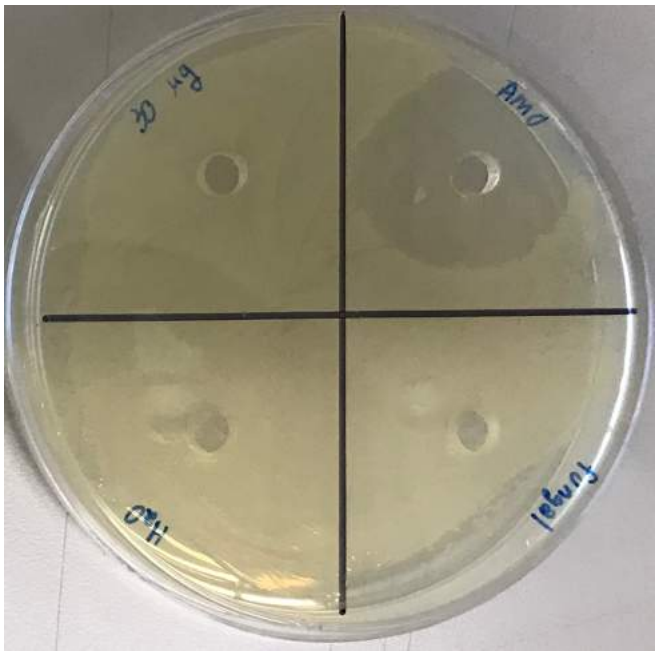
ผลการทดลองของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M HAuCl4 และ acetate buffer กับเชื้อ *E. coli* (ATCC 25922) ด้วยวิธี agar-well diffusion เพื่อดูโซนยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M HAuCl4 และ acetate buffer ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อรา น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และยาปฏิชีวนะ amoxicillin ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) โดยพบโซนยังยั้งในกลุ่มควบคุมบวกเท่านั้น ขนาดของโซนยับยั้งที่พบในยาปฏิชีวนะ amoxicillin มีค่าเท่ากับ 14 มิลลิเมตร ดังแสดงใน**รูปที่ 4.13 – 4.15**



รูปที่ 4.13 ผลของการทดลองตรวจสอบโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อเชื้อ *E. coli* (ATCC 25922)



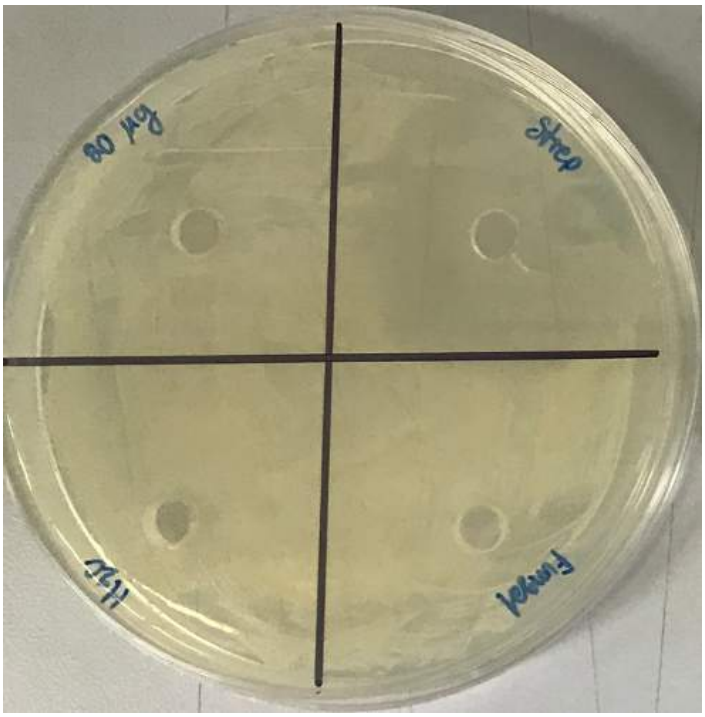
รูปที่ 4.14 ผลของการทดลองตรวจสอบโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อเชื้อ *E. coli* (ATCC 25922)



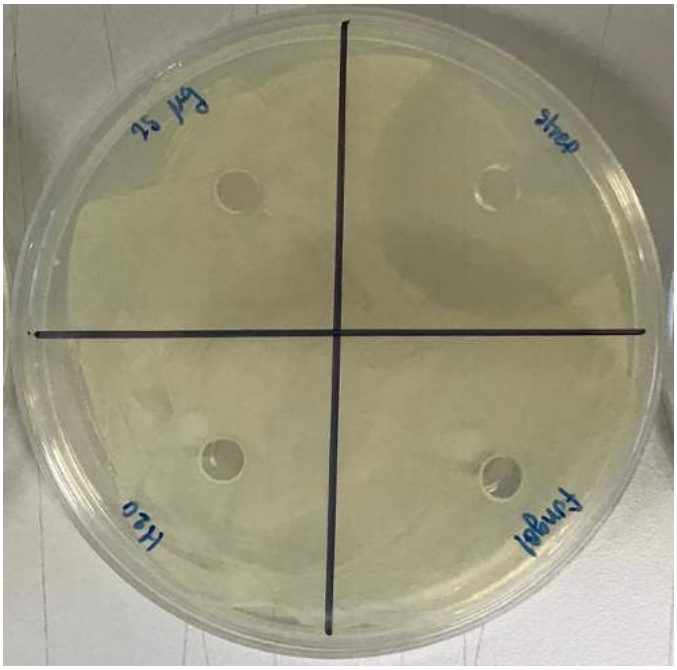
รูปที่ 4.15 ผลของการทดลองตรวจสอบโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อเชื้อ *E. coli* (ATCC 25922)

4.10 ผลการทดลองประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากสารสกัดจากเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M HAuCl4 และ acetate buffer กับเชื้อ *S. aureus* (ATCC 6538P)

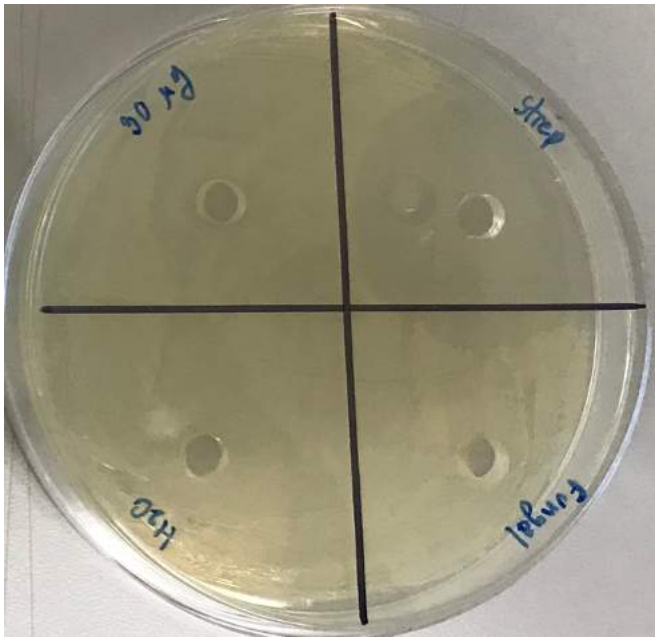
ผลการทดลองของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M HAuCl4 และ acetate buffer กับเชื้อ *S. aureus* (ATCC 6538P) ด้วยวิธี agar-well diffusion เพื่อดูโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M HAuCl4 และ acetate buffer ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อรา น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และยาปฏิชีวนะ streptomycin ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) โดยพบโซนยังยั้งในกลุ่มควบคุมบวกเท่านั้น ขนาดของโซนยับยั้งที่พบในยาปฏิชีวนะ streptomycin มีค่าเท่ากับ 16 มิลลิเมตร ดังแสดงใน**รูปที่ 4.16 – 4.18**



รูปที่ 4.16 ผลของการทดลองตรวจสอบโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อ *S. aureus* (ATCC 6538P)



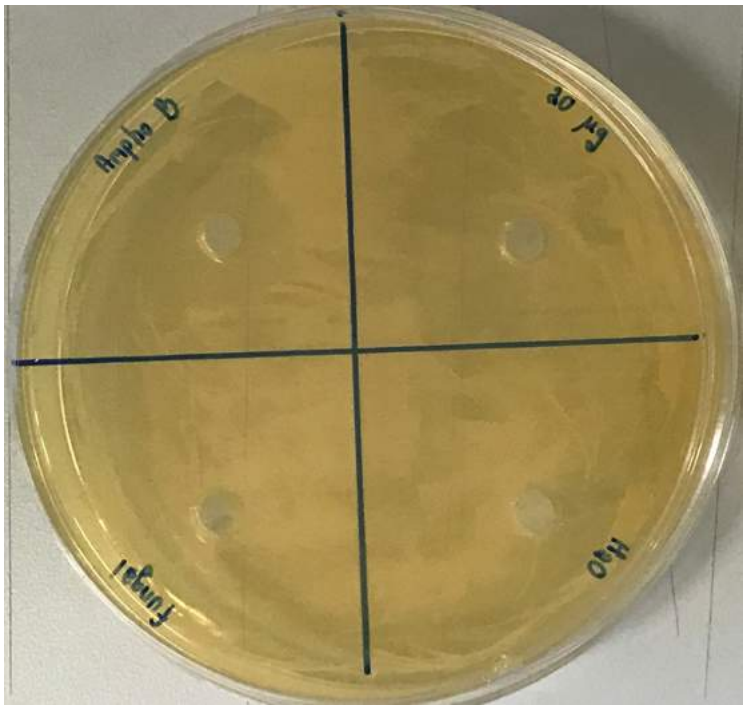
รูปที่ 4.17 ผลของการทดลองตรวจสอบโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อ *S. aureus* (ATCC 6538P)



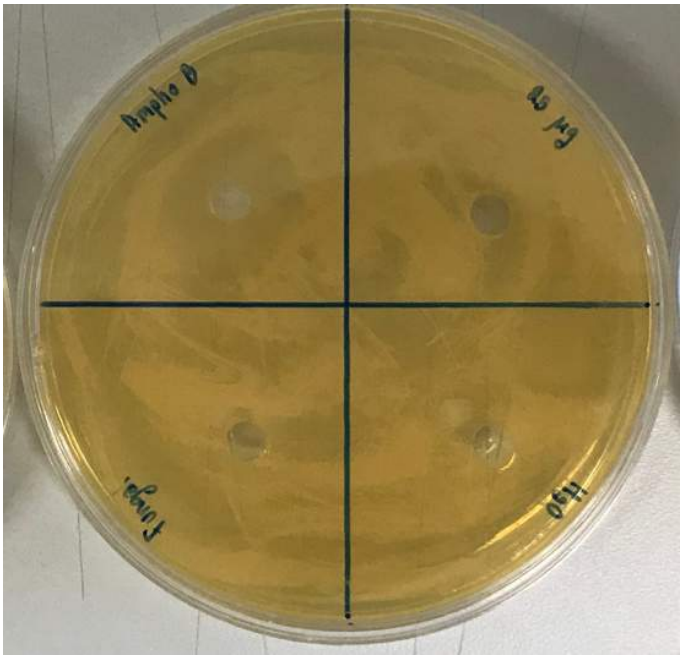
รูปที่ 4.18 ผลของการทดลองตรวจสอบโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อ *S. aureus* (ATCC 6538P)

4.10 ผลการทดลองประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากสารสกัดจากเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M HAuCl4 และ acetate buffer กับเชื้อ C. neoformans (ATCC 208821)

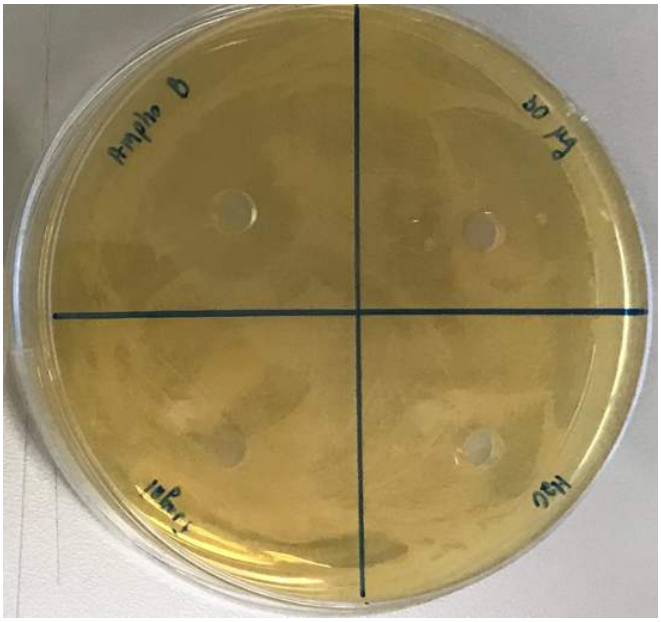
ผลการทดลองของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M HAuCl4 และ acetate buffer กับเชื้อ C. neoformans (ATCC 208821) ด้วยวิธี agar-well diffusion เพื่อดูโซนยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M HAuCl4 และ acetate buffer ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อรา น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และยาปฏิชีวนะ amphotericin B ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) โดยพบโซนยังยั้งในกลุ่มควบคุมบวกเท่านั้น ขนาดของโซนยับยั้งที่พบในยาปฏิชีวนะ amphotericin B มีค่าเท่ากับ 10 มิลลิเมตร ดังแสดงใน**รูปที่ 4.19 – 4.21**



รูปที่ 4.19 ผลของการทดลองตรวจสอบโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อ *C. neoformans* (ATCC 208821)



รูปที่ 4.20 ผลของการทดลองตรวจสอบโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อเชื้อ *C. neoformans* (ATCC 208821)



รูปที่ 4.21 ผลของการทดลองตรวจสอบโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อเชื้อ *C. neoformans* (ATCC 208821)

บทที่ 5
สรุป วิเคราะห์ผลการทดลอง และแผนการทดลองในอนาคต

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ (AuNP) ด้วยวิธีการทางชีวภาพ (biosynthesis) ซึ่งมีต้นทุนต่ำและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อรา (fungal filtrate) ของเชื้อรา *Aspergillus niger* MSCU 0361 ที่ได้จาก Microbial Culture Collection จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำได้มีการรายงานไว้ว่ามีความเกี่ยวข้องกับเอนไซม์หรือเมทาบอไลต์ที่มีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ (reducing agent) ทำหน้าที่ในการรีดิวซ์ไอออนของทองคำ (Au^{3+}; gold ion) ในสารละลายโกลคลอไรด์ ($HAuCl_4$) ให้กลายเป็นอนุภาคนาโนทองคำ (Au^0; AuNP) ได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้ต้องการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำด้วยวิธีการทางชีวภาพจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 และนำอนุภาคนาโนทองคำเหล่านั้นไปตรวจสอบรูปร่าง ลักษณะของอนุภาคนาโนทองคำ ขนาด ความเสถียรและความสามารถในการเป็นสารยับยั้งจุลชีพกับตัวแทนของจุลินทรีย์สามชนิดคือ *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) และ *Cryptococcus neoformans* (ATCC 208821) โดยจากการทดลองพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อรา สามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำได้จากการใช้น้ำเลี้ยงเชื้อราผสมกับสารละลายกับสารละลายโกลคลอไรด์ ($HAuCl_4$) และ acetate buffer สังเกตการณ์สังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำเบื้องต้นได้จากสีของสารละลายที่เปลี่ยนแปลงไปจากสีเหลืองใส เป็นสีม่วงดำ และจากการนำสารละลายไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงพบว่า สารละลายอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้มีช่วงการดูดกลืนความยาวคลื่นที่ 550 – 570 นาโนเมตร ซึ่งเป็นผลจากคุณสมบัติเฉพาะของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้ เรียกว่า surface plasmon resonance (SPR) ที่ใช้ระบุได้ว่ามีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำเกิดขึ้นจริง เป็นเหตุให้การดูดกลืนแสงของสารละลายเปลี่ยนแปลงเมื่อเกิดการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำขึ้นภายในสารละลาย (El-Brolossy et al., 2008) และสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายอนุภาคนาโนทองคำได้เท่ากับ 0.055 ที่ความยาวคลื่น 569 นาโนเมตร

ผลของการตรวจสอบลักษณะต่างๆของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 จากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM) พบว่ารูปร่างของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้มีรูปร่างที่สม่ำเสมอ และรูปร่างส่วนใหญ่เป็นทรงกลม การกระจายตัวของอนุภาคนาโนทองคำมีการกระจายตัวดี แต่มีบางส่วนที่เกิดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคนาโนทองคำอยู่บ้าง ในส่วนของการวิเคราะห์ด้วย dynamic light scattering (DLS) พบว่า ขนาดเฉลี่ยของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 มีขนาดของอนุภาคนาโนทองคำอยู่ในช่วง 10 – 1100 นาโนเมตร โดยมีขนาดเฉลี่ยของอนุภาคนาโนทองคำอยู่ที่ 76.22 นาโนเมตร และมีค่า polydispersity index (PDI) เท่ากับ 0.770 ซึ่งค่า PDI บ่งบอกถึงลักษณะการกระจายตัวของอนุภาคนาโนทองคำว่ามีการกระจายตัวอย่างไม่สม่ำเสมอ และการตรวจสอบความเสถียรของอนุภาคนาโนทองคำด้วยการวิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) ซึ่งเป็นค่าความแตกต่างของประจุไฟฟ้าระหว่างชั้นความหนาแน่นของไอออนที่อยู่รอบๆอนุภาคนาโนทองคำและประจุในของเหลวที่อยู่ล้อมรอบ

อนุภาคทองคำนาโน พบว่า อนุภาคนาโนทองคำอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ และ acetate buffer มีค่าศักย์ซีต้า เท่ากับ -18 มิลิโวลล์ ซึ่งมีค่าเป็นลบ น้อยกว่า -20 มิลลิโวลต์ (Thilagam et al., 2020) จึงสรุปได้ว่าอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้มีความเสถียรน้อย

ผลของการทดลองนำอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M $HAuCl_4$ และ acetate buffer และได้ตรวจสอบลักษณะต่างๆมาทำการวัดประสิทธิภาพในการเป็นสารยับยั้งจุลชีพกับจุลชีพทั้งสามชนิด คือ แบคทีเรีย *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) และยีสต์ *Cryptococcus neoformans* (ATCC 208821) โดยเริ่มต้นที่การทำกราฟมาตรฐานของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด เพื่อสร้างสมการเส้นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์แบคทีเรียในหนึ่งมิลลิลิตร (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (แกน Y) และทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนทองคำในการยับยั้งแบคทีเรียแต่ละชนิดด้วยวิธี agar-well plate assay โดยใช้อนุภาคนาโนทองคำที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นวัดโซนยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นบริเวณรอบหลุมที่ใส่อนุภาคนาโนทองคำ

ผลการสร้างกราฟมาตรฐานของ *E. coli* (ATCC 25922) ได้ความสัมพันธ์สมการเชิงเส้น (y= mx + c) ระหว่างปริมาณเซลล์แบคทีเรียในหนึ่งมิลลิลิตรและค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ $y = 1.2082x + 0.309$ โดยมีค่า $R^2 = 0.9638$ เมื่อนำอนุภาคนาโนทองคำ ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* (ATCC 25922) โดยทดสอบกับอนุภาคนาโนทองคำที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ไม่พบโซนยับยั้งบริเวณรอบหลุมของอนุภาคนาโนทองคำที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไม่พบโซนยับยั้งบริเวณรอบน้ำกลั่นและน้ำเลี้ยงเชื้อรา ซึ่งเป็นชุดควบคุมลบ (negative control) แต่พบโซนยับยั้งบริเวณหลุมที่ใส่ยาปฏิชีวนะ amoxicillin ซึ่งเป็นชุดควบคุมบวก (positive control) เท่านั้น พบขนาดของโซนยับยั้งเท่ากับ 14 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนทองคำที่ความเข้มข้น เข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* (ATCC 25922)

ผลการทดลองของเชื้อ *S. aureus* (ATCC 6538P) โดยการสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้น (y= mx + c) ระหว่างปริมาณเซลล์แบคทีเรียในหนึ่งมิลลิลิตรและค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ได้สมการคือ $y = 0.723x + 0.2202$ โดยมีค่า $R^2 = 0.9717$ เมื่อนำอนุภาคนาโนทองคำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง S. aureus (ATCC 6538P) โดยใช้ความเข้มข้นอนุภาคนาโนทองคำที่ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่ปรากฏโซนยับยั้งบริเวณรอบหลุมของอนุภาคนาโนทองคำทั้งในความเข้มข้นที่ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไม่พบโซนยับยั้งบริเวณรอบน้ำกลั่นและน้ำเลี้ยงเชื้อราซึ่งเป็นชุดควบคุมลบ แต่พบโซนยับยั้งรอบหลุมที่มียาปฏิชีวนะ streptomycin ซึ่งเป็นชุดควบคุมบวกเท่านั้น พบขนาดของโซนยับยั้ง

เท่ากับ 16 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นว่า อนุภาคนาโนทองคำทั้งในความเข้มข้นที่ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* (ATCC 6538P) ได้

การทดลองกับยีสต์ *C. neoformans* (ATCC 208821) เริ่มโดยวัดปริมาณของ *C. neoformans* (ATCC 208821) จากการนำโคโลนีเดียวของยีสต์ไปลงใน YPD broth บ่ม 24 ชั่วโมง ที่ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำนับเซลล์โดยใช้ hemocytometer แล้วปรับความเข้มข้นของยีสต์ให้เท่ากับ 1.5x108 cell/ml ผลการทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนทองคำในการยับยั้ง *C. neoformans* (ATCC 208821) ที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนทองคำ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่พบโซนยับยั้งบริเวณรอบหลุมของอนุภาคนาโนทองคำที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไม่พบโซนยับยั้งบริเวณรอบน้ำกลั่นและน้ำเลี้ยงเชื้อราซึ่งเป็นชุดควบคุมลบ แต่พบโซนยับยั้งรอบหลุมที่ใส่ amphotericin B เท่านั้น พบขนาดของโซนยับยั้งเท่ากับ 10 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนทองคำที่ความเข้มข้น เข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งยีสต์ก่อโรค C. neoformans (ATCC 208821)

โดยสรุปแล้วพบว่าอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา A. niger MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M HAuCl4 และ acetate buffer เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ E. coli (ATCC 25922) S. aureus (ATCC 6538P) และ C. neoformans (ATCC 208821) ด้วยวิธี agar well plate assay โดยใช้ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนทองคำที่ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่พบโซนยับยั้งเชื้อ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากความเข้มข้นของอนุภาคนาโนทองคำที่ใช้ในการทดสอบมีความเข้มข้นต่ำเกินไป นอกจากนี้ในหลายงานวิจัยได้กล่าวไว้ว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลชีพของอนุภาคนาโนทองคำขึ้นอยู่กับความเสถียรของอนุภาคนาโนทองคำ ขนาดและรูปทรง ดังนั้นการปรับสภาพแวดล้อมในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ เพื่อให้อนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเล็กและรูปทรงที่สม่ำเสมอจะช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลชีพของอนุภาคนาโนทองคำได้

งานวิจัยในอนาคตคือจะทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.2 M HAuCl4 และ acetate buffer ให้ได้สภาวะที่เหมาะสมมีความเสถียรมากขึ้น และทำการทดลองเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคนาโนทองคำให้อยู่ในช่วง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถึง 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ควรทำการทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนทองคำด้วยเทคนิคอื่นนอกเหนือจาก agar well plate assay เช่น ใช้วิธี resazurin microdilution assay เนื่องจากเป็นวิธีที่เห็นระดับการยับยั้งเชื้อได้ชัดเจนกว่า และยังสามารถหาค่าความเข้มข้นในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพได้ (minimum inhibitory concentration; MIC) นอกจากนี้การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลชีพของอนุภาคนาโนทองคำร่วมกับยาปฏิชีวนะชนิดอื่นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของยาฏิชีวนะยังเป็นทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับงานวิจัยในอนาคต (C. Tao et al., 2018)

เอกสารอ้างอิง

หนังสือ

Heritage, J., Evans, E. G. V., & Killington, R. A. (1996). Introductory microbiology. The Press Syndicate of the University of Cambridge, The Pitt Building, Trumpington Street, Cambridge, United Kingdom.

เว็บไซต์

แสดงลักษณะของโคนิเดีย (Conidia)
: https://microbenotes.com/aspergillus-niger/

โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria)
: https://www.majordifferences.com/2018/06

โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria)
: https://www.majordifferences.com/2018/06

โครงสร้างของเซลล์ยีสต์ (yeast cell)
: https://fermfacts.com/ferm-facts/the-right-foundation/

งานวิจัย

Abiramy, K. Peter, C. Gerardo, G.R. Siti, A.A. (2016). Production of extracellular hydrolaseenzymes by fungi from King George Island. Polar Biol . 39:65– 76
Doi : 10.1007/s00300-014-1606-7

C, Tao. (2018). Antimicrobial activity and toxicity of gold nanoparticles: research challenges and prospects. Letters in Applied Microbiology 67, 537—543
Doi: https://doi.org/10.1111/lam.13082

Chen, S. Kun, H. Hao Hong, L. You Guang, L. Da Li, Z. (2020). Antibacterial Properties of Functionalized. Gold Nanoparticles and Their Application in Oral Biology. Journal of Nanomaterials. Volume 2020.
Doi : https://doi.org/10.1155/2020/5616379

El-Brolossy, T. A., Abdallah, T., Mohamed, M. B., Abdallah, S., Easawi, K., Negm, S., & Talaat, H. (2008). Shape and size dependence of the surface plasmon resonance of gold nanoparticles studied by Photoacoustic technique. The European Physical Journal Special Topics, 153(1), 361-364.
doi:10.1140/epjst/e2008-00462-0

M.R. Bindhu. (2014). Antibacterial activities of green synthesized gold nanoparticles. Materials Letters 120, 122–125.
Doi : https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.01.108

Rajasekhar C., Kanchi S. (2018). Green Nanomaterials for Clean Environment.(eds) Handbook of Ecomaterials. Springer, Cham.
Doi : https://doi.org/10.1007/978-3-319-48281-1_73-1

Raji, V. Kaushik P. Tean, Z. Nandakumar, K. Sabu, T. (2020). Gold nanoparticles against respiratory diseases: oncogenic and viral pathogens review. Therapeutic delivery Vol. 11, NO. 8.
Doi : https://doi.org/10.4155/tde-2020-0071

Sengani, M., Grumezescu, A. M., & Rajeswari, V. D. (2017). Recent trends and methodologies in gold nanoparticle synthesis–Aprospective review on drug delivery aspect. OpenNano, 37-46.
Doi:10.1016/j.onano.2017.07.001

Stefanie, W. Yan, L. Martin, A. Matthias, B. (2011). Catalytic Activity of Faceted Gold Nanoparticles Studied by a Model Reaction: Evidence for Substrate- Induced Surface Restructuring. ACS Catal. 2011, 1, 908–916
Doi : https://doi.org/10.1021/cs200208a

Sun, Y. Wang, Q.Chen, J. Liu, L. Ding, L. Shen, M. Li, J. Han, B. Duan, Y. (2017) Temperature-sensitive gold nanoparticle-coated Pluronic-PLL nanoparticles for drug delivery and chemo-photo-thermal therapy. Theranostics 7, 4424– 4444
Doi : 10.7150/thno.18832

Thilagam, R. Gnanamani, A. (2020). Preparation, characterization and stability assessmentofkeratinandalbuminfunctionalizedgoldnanoparticlesfor biomedical applications. Applied Nanoscience.
Doi:10.1007/s13204-020-01250-z

Xiao,G.Zhixiang,X.Lipeng,G.Huayu,X.Fengxia,H.Bo,Chen.Xuejun,P. (2021). Preparation and antibacterial properties of gold nanoparticles. Environmental Chemistry Letters volume 19, pages167–187.
Doi : https://doi.org/10.1007/s10311-020-01071-0

Zsófia, M. Viktória, B. George, S. Balázs, E. Zsolt, F. György, S. Tamas, V. Zoltán, K. Eszter, T.S. Rózsa, S. István, L. (2018). Green synthesis of gold nanoparticles by thermophilic filamentous fungi /Sci. Rep. 8:3943.
Doi : 10.1038/s41598-018-22112-3

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงราเหลว potato dextrose broth (PDB) ผงอาหารสำเร็จรูป

ผงอาหารสำเร็จรูป potato dextrose 24.0 กรัม

ค่าความเป็นกรด-ด่าง (25 องศาเซลเซียส) 5.1 ± 0.2

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงราแข็ง potato dextrose agar (PDA)

ผงอาหารสำเร็จรูป potato dextrose	24.0 กรัม
ผงวุ้น	15 กรัม
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (25 องศาเซลเซียส)	5.1 ± 0.2

ละลายลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว nutrient broth (NB)

เปปโทน	5.0 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0 กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	1.5 กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.5 กรัม
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (25 °C)	7.2±0.2

ละลายลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง nutrient agar (NA)

เปปโทน	5.0 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0 กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	1.5 กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.5 กรัม
ผงวุ้น	15 กรัม
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (25 °C)	7.2±0.2

ละลายลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเหลว Muller-Hinton broth (MHB)

ผงอาหารสำเร็จรูป Muller-Hinton 21.0 กรัม

ผงวุ้น 15 กรัมค่าความเป็นกรด-ด่าง (25 °C) 7.3 ± 0.1

ละลายลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารแข็ง Muller-Hinton agar (MHA)

ผงอาหารสำเร็จรูป Muller-Hinton ผงวุ้น 21.0 กรัม

ผงวุ้น 15 กรัม

ละลายลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. อาหารแข็ง yeast extract peptone dextrose agar (YPD agar)

Yeast extract 5 กรัม

เปปโทน 10 กรัม

Dextrose 10 กรัม

ผงวุ้น 15 กรัมละลายลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. อาหารเหลว yeast extract peptone dextrose broth (YPD broth)

Yeast extract 5 กรัม

เปปโทน 10 กรัม

Dextrose 10 กรัม

ละลายลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
วิธีเตรียมสารเคมี

1. 0.02 M Chloroauric acid solution ($HAuCl_4$) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

Gold (III) chloride 0.60 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ใช้กระดาษฟรอยด์ปิดรอบขวด และนำไปแช่ใน ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. Acetate buffer ปริมาตร 1 ลิตร

น้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร

Sodium Acetate 6.80 กรัม

Acetic Acid 2.87 มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วปรับ pH ด้วยเครื่อง pH meter ให้ได้ pH เท่ากับ 4.6 จากนั้นจึง ปรับปริมาณให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำปราศจากเชื้อ

3. ยาปฏิชีวนะ Amoxicillin
10 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร

นำ Amoxicillin 0.01 มิลลิกรัม ละลายด้วย 4% DMSO 1 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร สำหรับใช้เป็นชุดควบคุมผลบวกของการทดสอบกับ *Escherichia coli* (ATCC 25922)

3. ยาปฏิชีวนะ Streptomycin
50 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร

นำ Streptomycin 0.05 มิลลิกรัม ละลายด้วย 4% DMSO 1 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร สำหรับใช้เป็นชุดควบคุมผลบวกของการทดสอบกับ *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P)

3. ยาปฏิชีวนะ Amphotericin B

25 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร

นำ Amphotericin B 0.025 มิลลิกรัม ละลายด้วย 4% DMSO 1 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร สำหรับใช้เป็นชุดควบคุมผลบวกของการทดสอบกับ *Cryptococcus neoformans* (ATCC 208821)

ภาคผนวก ค

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง

เครื่องนาโนดรอป (Nanodrop2000)

ลักษณะและองค์ประกอบของเครื่องนาโนดรอป (NanoDrop2000) ของบริษัท Thermo Scientific ประเทศ สหรัฐอเมริกา เครื่องนาโนดรอปที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงนี้ทำการวัดที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง

ขั้นตอนการวัดค่าการดูดกลืนแสงมีดังนี้

1. คลิกโปรแกรม NanoDrop 2000 ที่ PC หรือ Notebook
2. เลือกวิธีการวัดเป็น UV-visible
3. ตั้งค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ต้องการจะวัด เช่น ความยาวคลื่น
4. ทำความสะอาดแท่นวัด (pedestal) ด้วยน้ำกลั่นก่อนใช้งานทุกครั้ง
5. หยดสารละลาย Blank ที่แทนวัด และคลิกที่ปุ่ม Blank เพื่อวัด
6. เช็ดสารละลาย Blank ออกด้วยกระดาษเช็ดเลนส์และหยดตัวอย่าง (sample) ปริมาตรไม่เกิน 10 ไมโครลิตร ลงบนแท่นวัด จากนั้นคลิก Measure เพื่อวัดค่า
7. อ่านผลการวัดที่หน้าจอคอมพิวเตอร์

คำแนะนำ

1. ควรทำการ Re-blank ทุก 30 นาที
2. ทำความสะอาดหัวอ่านด้วยน้ำกลั่นทุกครั้งเมื่อเปลี่ยนตัวอย่าง 3. ห้ามนำของแข็งไปขูดแท่นวัด

ภาคผนวก ง

การคำนวณปริมาณเซลล์

1.ทำให้แบคทีเรียมีความเข้มข้น 1.15x10^6 CFU/ml

เมื่อได้ปริมาณแบคทีเรียเป็น CFU/ml จากการเปรียบเทียบกับสมการเส้นกราฟ ทำให้แบคทีเรียมีความเข้มข้น 1.15x10^6 CFU/ml และให้ได้ปริมาตรตามที่ต้องการได้จากสมการ

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

C_1 = ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นใน 1 มิลลิลิตร (CFU/ml)

V_1 = ปริมาตรที่ต้องนำไปใส่ใน V_2 (ml)

C_1 = ปริมาณแบคทีที่ต้องการใน 1 มิลลิลิตร (CFU/ml)

V_2 = ปริมาตรที่ต้องการ