

การพัฒนาหาค่า MIC ของอนุภาคนาโนโดยใช้รีซาซูริน
Development of Minimum Inhibitory Concentration
test for Nanoparticles using Resazurin

วิรุณพร สร้อยเสนา
สุกัญญา ญาณศิริ

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การพัฒนาหาค่า MIC ของอนุภาคนาโนโดยใช้สีรีซาซูริน
Development of Minimum Inhibitory Concentration
test for Nanoparticles using Resazurin

วิรุณพร สร้อยเสนา
สุกัญญา ญาณศิริ

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

Development of Minimum Inhibitory Concentration
test for Nanoparticles using Resazurin

WIROONPORN SROYSENA
SUKANYA YANSIRI

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIRMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCEIN (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงการพิเศษ	การพัฒนาหาค่า MIC ของอนุภาคนาโนโดยใช้สีรีซาซูริน Development of Minimum Inhibitory Concentration test for Nanoparticles using Resazurin
ชื่อนักศึกษา	นางสาววิรุณพร สร้อยเสนา รหัสนักศึกษา 57050762 นางสาวสุกัญญา ญาณศิริ รหัสนักศึกษา 57050769
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.สุวิมล บุญรังสีมันต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ประธานกรรมการ	วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์
ดร. สุวิมล บุญรังสีมันต์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	สุวิมล บุญรังสีมันต์
ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	สุทธิจิต ศรีวัชรกุล

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	การพัฒนาหาค่า MIC ของอนุภาคนาโนโดยใช้สรีรชาซูริน
ชื่อนักศึกษา	นางสาววิรุณพร สร้อยเสนา รหัสนักศึกษา 57050762 นางสาวสุกัญญา ญาณศิริ รหัสนักศึกษา 57050769
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.สุวิมล บุญรังสิมันต์

บทคัดย่อ

อนุภาคนาโนเป็นสารที่มีความขุ่นเมื่อนำมาทดสอบหาค่า MIC กับเชื้อแบคทีเรียทำให้ยากต่อการระบุความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Minimum Inhibitory Concentration : MIC) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้สรีรชาซูรินร่วมกับอนุภาคนาโนสองชนิด คือ อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์และอนุภาคนาโนซิลเวอร์เนื่องจากอนุภาคนาโนทั้งสองชนิดนี้มีสีความขุ่น และกลไกการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ต่างกันโดยใช้เชื้อแบคทีเรียสองชนิดได้แก่แบคทีเรียแกรมบวก คือ *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Escherichia coli* เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของสรีรชาซูริน ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความเข้มข้นสรีรชาซูรินที่เหมาะสมและระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มต่อการเปลี่ยนสรีรชาซูริน พบว่าสรีรชาซูรินที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากบ่ม 3 ชั่วโมงเหมาะสมต่อการสังเกตการเจริญของเชื้อมากที่สุด จากนั้นศึกษาหาความเข้มข้นของ DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายอนุภาคนาโน พบว่าที่ความเข้มข้น 5% DMSO ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ และเมื่อทดสอบหาค่า MIC ของอนุภาคนาโนโดยใช้สรีรชาซูรินเทียบกับไมสรีรชาซูริน พบว่าสามารถบ่งชี้การเจริญของเชื้อได้โดยให้ผลไม่แตกต่างกัน สังเกตจากการเปลี่ยนแปลงของสีของรีชาซูริน ที่ทำปฏิกิริยากับเชื้อแบคทีเรีย และนำช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงของสีของรีชาซูริน จากสีม่วงจนถึงสีชมพูมา Spread plate เพื่อนับจำนวนโคโลนี พบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ทดสอบกับเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *S. aureus* มีค่า MIC ที่ความเข้มข้น 6 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ในขณะที่อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ที่ทดสอบกับเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *S. aureus* มีค่า MIC ที่ความเข้มข้น 1 และ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลทดลองพบว่าอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์เนื่องมาจากผลของปฏิกิริยาโฟโตคะตะลิสต์ภายใต้แสงยูวีของอนุภาคซิงก์ออกไซด์ และพบว่าค่า MIC โดยอนุภาคนาโนซิลเวอร์และอนุภาคซิงก์ออกไซด์ ให้ผลเหมือนกัน คือ แบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) มีความต้านทานต่ออนุภาคนาโนมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus*) เพราะต้องใช้ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ใน

การยับยั้งการเจริญเติบโตสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกเนื่องจากความแตกต่างของผนังเซลล์ที่เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้อนุภาคนาโนสามารถเข้าไปทำลายระบบต่างๆของเซลล์แบคทีเรียได้ ในงานวิจัยนี้ทดลองใช้สรีรชาซูรินกับอนุภาคนาโนพบว่าสามารถใช้สรีรชาซูรินเป็นตัวบ่งชี้การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบที่ทดสอบด้วยอนุภาคนาโนได้

คำสำคัญ : ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ สรีรชาซูริน
อนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ อนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์

Title	Development of Minimum Inhibitory Concentration test for Nanoparticles using Resazurin
Students	Wiroonporn Sroysena Sukanya Yansiri
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Academic Year	2017
Advisor	Suttijit Sriwatcharaku
Co-advisor	Suwimon Boonrunsiman

Abstract

Nanoparticles are turbid substances that difficult to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). This research aims to apply resazurin with Zinc oxide nanoparticles (ZnO) and silver nanoparticles (Ag) to determined MIC. Because both of the 2 type of nanoparticles exhibit color, turbidity and different inhibitory mechanisms. Tested with 2 bacterial species gram-positive: *Staphylococcus aureus* and gram-negative: *Escherichia coli* to compared the color conversion of resazurin. In this study, the optimal resazurin concentration and incubate time were investigated. exhibited that 0.5 mg/ml of resazurin incubated after 3 hours. To investigate concentration of DMSO used as nanoparticles solvent found that at 5% DMSO did not have any effect on bacterial growth. The results showed that the MIC of 2 bacterial species against the 2 nanoparticles tested with and without resazurin were the same. The MIC that make the color of resazurin changed from violet to pink were picked to spread plate to determine the colornies forming unit. The MIC value of silver nanoparticles tested with *E.coli* and *S.aureus* were 6 and 4 mg/ml, respectively, and The MIC value of zinc oxide nanoparticles tested with *E. coli* and *S. aureus* were 1 and 0.125 mg/ml, respecly. The results showed that the zinc oxide nanoparticles were more effective to inhibit bacterial growth than the silver nanoparticle due to the effect of the photocatalyst under the UV light of the zinc oxide particles. MICs with silver nanoparticles and zinc oxide nanoparticles give the same result, that gram-negative bacteria (*E. coli*) are more resistant than gram-positive bacteria (*S. aureus*). Because *E. coli* use higher concentration of nanoparticles to inhibit growth due to differences in cell walls formation that make it possible for

nanoparticles to break down bacterial cell systems. In this research, resazurin tests cooperate with 2 nanoparticles were effective determine the growth of both gram-positive and gram-negative bacteria tested with nanoparticles.

Keywords: Minimum Inhibitory Concentration (MIC), resazurin, Silver Nanoparticles, Zinc Oxide Nanoparticles

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สำเร็จได้ด้วยดีจากการได้รับความช่วยเหลือ ความกรุณา และการชี้แนะจาก ดร.สุวิมล บุญรังสีมันต์ และ ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ที่เสียสละเวลาและเมตตาให้คำปรึกษาในการทำโครงการพิเศษนี้ในทุกขั้นตอน รวมถึงให้ความรู้ให้การตรวจทานข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำรายงานนี้จนสำเร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (NANOTEC) ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่วิจัยโครงการพิเศษ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านและสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้ผู้จัดทำเข้ามาศึกษาในสถาบันแห่งนี้และทำให้ผู้จัดทำได้รับความรู้และประสบการณ์ที่จะนำไปปรับใช้ในชีวิตประจำวัน

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำโครงการพิเศษขอขอบพระคุณบุพการีที่ได้อบรมเลี้ยงดูและพี่น้องตลอดจนเพื่อนๆทุกคนที่คอยให้กำลังใจ ให้การสนับสนุน และให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งเสมอมา

วิรุณพร สร้อยเสนา
สุกัญญา ญาณศิริ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป.....	ญ
คำย่อและสัญลักษณ์	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 Minimum Inhibitory Concentration (MIC).....	3
2.2 วิธีทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารหรือยาปฏิชีวนะ	3
2.3 สีรีซาซูริน (resazurin).....	5
2.4 การประยุกต์ใช้สีรีซาซูรินกับเซลล์แบคทีเรีย	5
2.5 การประยุกต์ใช้สีรีซาซูริน (resazurin) ด้านอื่นๆ	6
2.6 การสังเคราะห์สีรีซาซูริน (resazurin).....	7
2.7 แบคทีเรีย (Bacteria)	7
2.7.1 ชนิดของแบคทีเรีย.....	8
2.7.2 ปัจจัยที่มีผลที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย	8
2.7.3 โครงสร้างของแบคทีเรีย.....	8
2.7.4 ความแตกต่างของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ.....	9
2.7.5 <i>Escherichia coli</i>	10
2.7.6 <i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.8 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย.....	12
2.8.1 การสังเคราะห์วัสดุนาโน.....	13
2.8.2 ซิงก์ออกไซด์ (Zinc Oxide :ZnO).....	16
2.8.3 ซิลเวอร์ (Silver : Ag).....	19

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.8.4 Reactive oxygen species(ROS).....	21
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	22
2.9.1 ผลกระทบของสรีรชาซูรินต่อการบ่มร่วมกับเซลล์.....	22
2.9.2 การปรับปรุงการวิเคราะห์ด้วยรีชาซูรินเพื่อวิเคราะห์การตายของเซลล์ ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี.....	22
2.9.3 การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอีโคไลด้วยซิงก์ออกไซด์ เตตระพอด	23
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	24
3.1 สารที่ใช้ดำเนินงานวิจัย.....	24
3.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ	24
3.3 อุปกรณ์.....	24
3.4 สารเคมี	24
3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ	25
3.6 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	25
3.6.1 การเตรียมสรีรชาซูริน.....	25
3.6.2 ศึกษาความเข้มข้นสรีรชาซูรินและเวลาในการบ่มที่เหมาะสม	25
3.6.3 ทดสอบความเป็นพิษของสารละลาย DMSO ต่อเชื้อแบคทีเรีย.....	25
3.6.4 การเตรียมอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์และซิลเวอร์	25
3.6.5 การทดลองหาค่า MIC ของอนุภาคนาโนโดยใช้เชื้อ <i>E.coli</i> และ <i>S.aureus</i>	26
3.6.6 Spread plate นับจำนวนโคโลนี.....	26
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	
4.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นสรีรชาซูรินที่เหมาะสมและเวลาในการบ่มที่เหมาะสมต่อ การเปลี่ยนสรีรชาซูริน	27
4.2 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นตัวทำละลายอนุภาคนาโนที่ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ	27
4.3 ผลการเปรียบเทียบความเป็นไปได้ของขั้นตอนที่พัฒนาขึ้นโดยเทียบผลจากการ ใส่สรีรชาซูรินและไม่ใส่สรีรชาซูริน	28
4.3.1 ผลการหาค่า MIC ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ <i>E. coli</i>	29
4.3.2 ผลการหาค่า MIC ของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ <i>E. coli</i>	31
4.3.3 ผลการหาค่า MIC ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ <i>S. aureus</i>	33
4.3.4 ผลการหาค่า MIC ของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ <i>S. aureus</i>	35

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	39
5.1 สรุปผลการวิจัย	39
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	40
เอกสารอ้างอิง.....	41
ภาคผนวก	45
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	46
ภาคผนวก ข การใช้เครื่องมือ	47
ภาคผนวก ค การแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์และการนับจำนวนแบคทีเรีย	50
ภาคผนวก ง ผลการ Spread plate.....	56
ภาคผนวก จ ตารางข้อมูลการนับโคโลนี	80

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงค่าการวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของ DMSO แต่ละความเข้มข้นต่อการเจริญของเชื้อ.....	28
4.2 เปรียบเทียบผลการนับโคโลนี (CFU/ml) ทดลองการใช้สีและไม่ใช้สีรีซาซูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ <i>E. coli</i>	30
4.3 เปรียบเทียบผลการนับโคโลนี (CFU/ml) ทดลองการใช้สีและไม่ใช้สีรีซาซูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ <i>E. coli</i>	32
4.4 เปรียบเทียบผลการนับโคโลนี (CFU/ml) ทดลองการใช้สีและไม่ใช้สีรีซาซูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ <i>S. aureus</i>	34
4.5 เปรียบเทียบผลการนับโคโลนี (CFU/ml) ทดลองการใช้สีและไม่ใช้สีรีซาซูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ <i>S. aureus</i>	36
ค.1 นับจำนวนเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธี appendix F cfu/ml Table.....	54
ง.1 ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ <i>E. coli</i>	56
ง.2 ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ <i>E. coli</i>	62
ง.3 ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ <i>S. aureus</i>	68
ง.4 ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ <i>S. aureus</i>	74
จ.1 เปรียบเทียบผลการนับโคโลนี (CFU/ml) ทดลองการใช้สีและไม่ใช้สีรีซาซูริน เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ <i>E. coli</i>	80
จ.2 เปรียบเทียบผลการนับโคโลนี (CFU/ml) ทดลองการใช้สีและไม่ใช้สีรีซาซูริน เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ <i>E. coli</i>	82
จ.3 เปรียบเทียบผลการนับโคโลนี (CFU/ml) ทดลองการใช้สีและไม่ใช้สีรีซาซูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ <i>S. aureus</i>	83
จ.4 เปรียบเทียบผลการนับโคโลนี (CFU/ml) ทดลองการใช้สีและไม่ใช้สีรีซาซูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ <i>S. aureus</i>	84

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 การทดสอบการหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC)	4
2.2 โครงสร้างทางเคมีของสรีรชาซูริน	5
2.3 การใช้สรีรชาซูรินทดสอบเชื้อแบคทีเรีย	6
2.4 วิธีการตรวจเรืองแสงเซลล์มีชีวิตโดยใช้สรีรชาซูริน	6
2.5 ปฏิกริยารีดักชันในเซลล์สิ่งมีชีวิต	7
2.6 การสังเคราะห์สรีรชาซูริน	7
2.7 โครงสร้างของแบคทีเรีย	9
2.8 แสดงโครงสร้างของชั้น Peptidoglycan ของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (a) ผนังเซลล์ ของแบคทีเรียแกรมบวก (b) และแบคทีเรียแกรมลบ (c)	10
2.9 ลักษณะรูปร่างของเชื้อ <i>E. coli</i>	11
2.10 ลักษณะรูปร่างของเชื้อ <i>S. aureus</i>	12
2.11 โครงสร้างแบบต่างๆของอนุภาคนาโน	13
2.12 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนวิธี Sol-gel process	14
2.13 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนวิธี Electric arc discharge process	14
2.14 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนวิธี Dip coating process	15
2.15 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนวิธี Electrodeposition process	16
2.16 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนวิธี Electrospinning process	16
2.17 โครงสร้างของเวิร์ตไซต์ (Wurtzite struction)	17
2.18 โครงสร้างของแบบซิงค์แบลนด์	17
2.19 กลไกการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์	18
2.20 รูปแบบที่เกิดขึ้นของกระบวนการเร่งปฏิกิริยาด้วยแสง	18
2.21 ลักษณะโครงสร้างของผลึกของอนุภาคนาโนซิลเวอร์	20
2.22 กลไกการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิลเวอร์	21
2.23 Reactive oxygen species	21
4.1 แสดงสีของรีชาซูรินที่ความเข้มข้นต่างๆหลังจากเติมสี 3 ชั่วโมง	27
4.2 แสดงผลของ DMSO แต่ละความเข้มข้นต่อการเจริญของเชื้อ	28
4.3 แสดงการใช้สรีรชาซูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> ของ อนุภาคนาโนซิลเวอร์ และช่วงความเข้มข้นที่มีการเปลี่ยนสีของรีชาซูรินของอนุภาคนาโน ซิลเวอร์	29
4.4 แสดงการใช้สรีรชาซูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i>	

สารบัญญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์และช่วงความเข้มข้นที่มีการเปลี่ยนสีรีซาชูรินของ อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์.....	31
4.5 แสดงการใช้สีรีซาชูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์และช่วงความเข้มข้นที่มีการเปลี่ยนสีรีซาชูรินของอนุภาคนาโน ซิลเวอร์.....	33
4.6 แสดงการใช้สีรีซาชูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> ของ อนุภาคนาโน ซิงก์ออกไซด์และช่วงความเข้มข้นที่มีการเปลี่ยนสีรีซาชูรินของอนุภาคนาโน ซิงก์ออกไซด์.....	35
4.7 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อแบคทีเรีย.....	48
ข.1 เครื่องทำความสะอาด (ULTRASONIC CLEANER)	48
ข.2 เครื่อง Spread Plate.....	49
ข.3 ตู้ UV Chamber.....	49
ข.4 การฉายแสงยูวี.....	50
ค.1 รูปแบบการ steak plate.....	51
ค.3 การเจือจางตัวอย่าง.....	52
ค.4 calibraton curve ระหว่าง absorbance (A600) และปริมาณเซลล์แบคทีเรีย <i>Esherichia coli</i>	53

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
NPs	Nanoparticles
ZnO	Zinc Oxide Nanoparticles
Ag	Silver Nanoparticles
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MHB	Muller Hinton broth
NaCl	Sodium Chloride
O.D.	optical density
CFU	Colony forming unit
μ l	ไมโครลิตร
ml	มิลลิลิตร
mg	มิลลิกรัม
g	กรัม
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Minimal inhibitory concentration (MIC) คือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ ซึ่งเป็นการทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อสารหรือยาปฏิชีวนะนั้นๆ หลักการทั่วไปของวิธีนี้คือ การเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งมีสารหรือยาปฏิชีวนะในปริมาณต่างๆกันผสมอยู่และสังเกตการเจริญของแบคทีเรียจากความขุ่นของเชื้อ เนื่องจากการทดลองนี้มีการใช้อุณหภูมิ 2 ประเภทที่มีกลไกการทำงานในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ต่างกัน คือ อุณหภูมิที่ต้องใช้รังสีอัลตราไวโอเลตกระตุ้นการทำงานคือ ซิงก์ออกไซด์ (ZnO) และอุณหภูมิที่ไม่ใช้รังสีอัลตราไวโอเลตกระตุ้นการทำงานคือ ซิลเวอร์ (Ag) โดยทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกคือ *S. aureus* เทียบกับแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. coli*

อุณหภูมิทั้ง 2 ประเภทมีความขุ่น มีสี เมื่อนำมาทดสอบหาค่า MIC ทำให้ไม่สามารถสังเกตการเจริญของเชื้อด้วยตาเปล่าได้จึงนำสีรีซาซูริน (resazurin) ซึ่งเป็นสีประเภท dye reduction test เป็นสารสีม่วง ใช้เพื่อประมาณจำนวนเชื้อแบคทีเรีย หลักการของสีเกิดจากปฏิกิริยารีดักชันโดยมีเอนไซม์รีดักเตส (reductase) ของแบคทีเรียเมื่อเกิดปฏิกิริยารีดักชันจะเปลี่ยนเป็น รีโซรูฟิน (resorufin) มีสีชมพูแสดงถึงการเจริญของเชื้อ และเมื่อปฏิกิริยายังดำเนินต่อไปจะเปลี่ยนเป็น ไฮโดรรีโซฟูริน (Hydroresofurin) ไม่มีสี แสดงถึงการเจริญของเชื้อมาก ปริมาณแบคทีเรียจะทำให้สีของน้ำยารีซาซูรินเปลี่ยนไป ซึ่งดูได้จากการเปลี่ยนแปลงของสีหลังเติมและบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส การอ่านผลจะอ่านผลในชั่วโมงที่ 1 และ 3

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้รีซาซูริน ในการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโน ซึ่งเป็นสารมีความขุ่น มีสี และกลไกการยับยั้งแบคทีเรียที่ต่างกันทำให้ไม่สามารถสังเกตการเจริญของเชื้อได้ด้วยตาเปล่าจึงนำมาประยุกต์ใช้โดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงของสีที่เปลี่ยนไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.) เพื่อทดสอบความเป็นไปได้ในการใช้รีซาซูรินในการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโน
- 2.) เพื่อทดสอบหาขั้นตอนที่เหมาะสมในการหาค่า MIC โดยใช้รีซาซูริน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.) ศึกษาคุณสมบัติของรีซาซูรินที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

- 2.) ศึกษาความเข้มข้นสีรีซาซูรินที่เหมาะสมและเวลาในการบ่มที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนสีรีซาซูริน
- 3.) ศึกษาหาความเข้มข้นตัวทำละลายอนุภาคนาโนที่ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ
- 4.) เปรียบเทียบความเป็นไปได้ของขั้นตอนที่พัฒนาขึ้นโดยเทียบผลจากการใส่สีรีซาซูรินและไม่ใส่สีรีซาซูริน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จากการทดลองใช้สีรีซาซูรินในการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโน สีรีซาซูรินสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับอนุภาคนาโนที่มีกลไกการทำงานที่ใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตกระตุ้นการทำงานและไม่ใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิดอื่นๆได้ สังเกตการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากการเปลี่ยนแปลงของสีรีซาซูรินซึ่งทำให้ง่ายต่อการระบุว่าความเข้มข้นใดเป็นค่า MIC

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งหรือป้องกันการเจริญของเชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็นการทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อสารหรือยาปฏิชีวนะนั้นหลักการทั่วไปของวิธีการนี้คือ การเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารชนิดเหลวซึ่งมีสารหรือยาปฏิชีวนะในปริมาณที่ต่าง ๆ กันผสมอยู่ และสังเกตการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

2.2 วิธีทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารหรือยาปฏิชีวนะ

มีหลายวิธีหากเชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรียและเราสามารถทำได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (broth medium) และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (agar medium) โดยมีวิธีหลักอยู่ 2 รูปแบบ คือ (1) dilution susceptibility test และ (2) agar diffusion test

การเลือกรูปแบบวิธีการทดสอบ ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างที่สำคัญ คือ

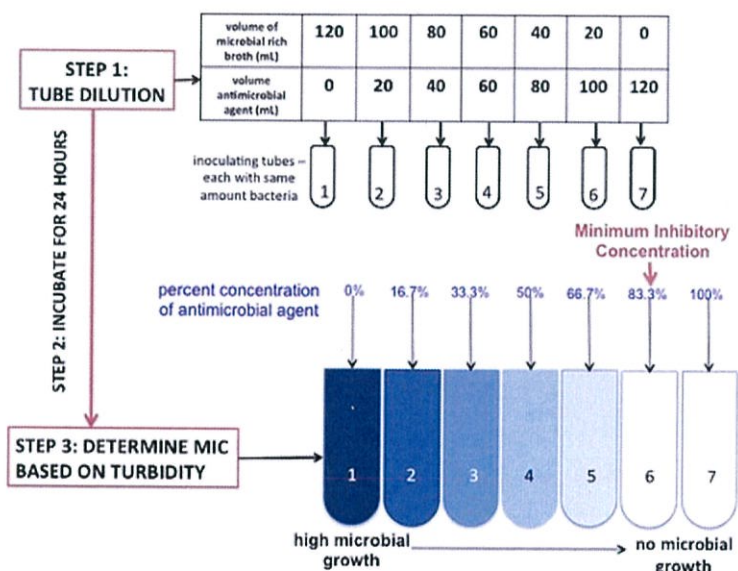
1. ลักษณะของงาน เช่น เป็นงานวิจัยงานตรวจสอบในห้องปฏิบัติการที่ทำเป็นประจำ หรือนานๆ ทำครั้ง งานตรวจสอบในห้องปฏิบัติการที่นานๆ ทำครั้ง และแต่ละครั้งมีจำนวนเชื้อที่ทดสอบน้อย จะนิยมใช้ agar diffusion test (เพื่อตัดปัญหาต้องเตรียมและเก็บสารละลายของตัวอย่างที่ต้องใช้ใน dilution test) ขณะที่งานที่ต้องการรู้ค่า MBC ของตัวอย่างจะนิยมใช้ broth dilution test
2. ชนิดของเชื้อทดสอบ เช่น เชื้อที่เจริญช้าหรือเลือกเฟ้นการใช้อาหารมาก (fastidious dilution test) จะนิยมใช้ broth dilution test ขณะที่เชื้อไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobe) มักใช้ agar diffusion test หรือเชื้อที่มีอัตราการเจริญไม่คงที่ควรเลือก dilution test
3. จำนวนเชื้อทดสอบ เช่น มีจำนวนเชื้อทดสอบมากและต้องการหาค่า MIC จะนิยมทำ agar dilution test
4. ชนิดของยาทดสอบ เช่น ตัวอย่างกระจาย (diffuse) ใน agar medium ไม่ดีจะนิยมหาค่า MIC ด้วยวิธี dilution test เป็นต้น
5. จำนวนยาทดสอบ เช่น มีตัวอย่างจำนวนมากแต่มีเชื้อจำนวนน้อยจะนิยมใช้ agar diffusion test

เมื่อเลือกรูปแบบวิธีการทดสอบได้แล้ว อาจต้องพิจารณาปัจจัยต่างๆที่อาจจะมีผลต่อการทดสอบ อาทิ ชนิดของอาหาร สำหรับอาหารที่ดีควรยอมให้เชื้อทุกชนิดชนิดได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง (pH) มากขณะที่มีเชื้อเจริญ ไม่มีการรบกวนการออกฤทธิ์ของยามีส่วนผสมที่ปรากฏใน broth และ agar medium เหมือนกัน (ยกเว้นสารช่วยให้แข็ง) และควรทดสอบก่อนว่าเชื้อที่ต้องการทดสอบสามารถเจริญได้ (Alderman and Smith , 2001) อาหารที่นิยมใช้ได้แก่ Mueller Hinton broth (MHB)

ถ้าทดสอบพวกที่เจริญยากจะนิยมใช้ brain heart infusion broth (agar) หรือ trypticase soy broth (agar) ในการทดสอบเชื้อรา medium ที่ใช้มีหลายชนิดขึ้นกับชนิดของรา และชนิดยา

ทดสอบ กล่าวคือถ้าเป็นราชั้นสูงจะใช้ Sabouraud dextrose broth (agar), tryptic soy broth (agar), potato dextrose agar แต่ถ้าเป็นราชั้นต่ำ จะใช้ glucose yeast extract broth (agar) เป็นต้น

ค่า MIC มีหน่วยที่ใช้โดยทั่วไปคือ ไมโครกรัม (μg) ต่อมิลลิลิตร (ml) หรือหน่วยสากล (IU, international unit) ต่อมิลลิลิตร การทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) แตกต่างกับค่า Minimum Bactericidal concentration (MBC) เนื่องจากค่า MBC เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อแบคทีเรีย (หรือมีปริมาณเชื้อไม่เกินในปริมาณที่กำหนด) ถ้าค่า MIC และค่า MBC มีค่าใกล้เคียงกันแสดงให้เห็นถึงสารนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้มากขึ้น การทดสอบหาค่า MIC ของสารจะถูกกำหนดโดยการเตรียมสารละลายเคมีในหลอดก่อนนำมาทดสอบ

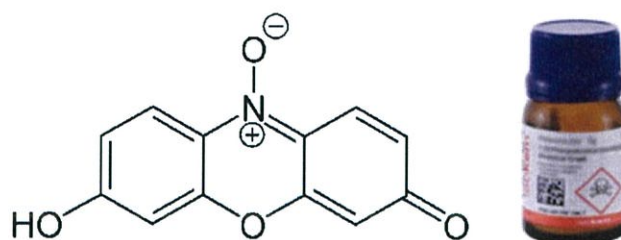


รูปที่ 2.1 การทดสอบการหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

ที่มา : Tripathi, K.D.และคณะ (2013)

จากภาพแสดงการทดสอบหาค่า MIC ขั้นตอนแรกต้องเจือจางสารหรือยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบกับแบคทีเรียด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมตามปริมาณที่กำหนด ขั้นตอนที่สอง นำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขั้นตอนที่สามวัดค่า MIC จะเห็นว่า โดยหลอดที่ 6 และ 7 มีการเจริญของเชื่อน้อย หลอดที่ 1 ปริมาณเชื้อมาก เมื่อความเข้มข้นของสารยับยั้งจุลชีพเพิ่มขึ้นความขุ่นจะลดลง จุลินทรีย์ไม่สามารถอยู่รอดได้อีกต่อไป ยาด้านจุลชีพที่มี MICs ต่ำจะมีประสิทธิภาพมากกว่าที่มี MICs สูงเนื่องจากต้องใช้ยาเพียงปริมาณน้อยก็สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ในทางการแพทย์การกำหนด MICs เป็นสิ่งสำคัญในการระบุยาที่ถูกต้องในการดูแลผู้ป่วย

2.3 สีรีซาซูริน (resazurin)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของสีรีซาซูริน
ที่มา : Pesch, K. L.; Simmert และคณะ (1929)

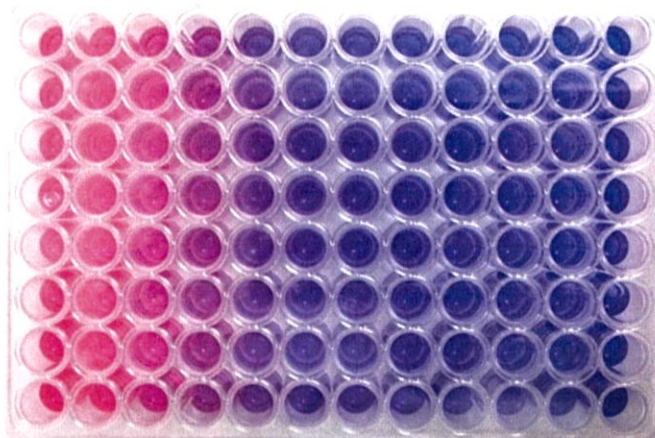
สีรีซาซูริน (Resazurin : 7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) หรือ Alamar Blue เป็นสีประเภท reduction test มีสีม่วง มีค่า pH ระหว่าง 3.8-6.5 และมีคุณสมบัติสามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ได้ มีวัตถุประสงค์ในการใช้ประมาณจำนวนเชื้อแบคทีเรียหลักการของสีเกิดจากปฏิกิริยารีดักชันโดยมีเอนไซม์รีดักเตส (reductase) ของแบคทีเรียเมื่อเกิดปฏิกิริยารีดักชันจะเปลี่ยนสีของเรซาซูริน (resazurin) ที่มีสีม่วงเป็น รีโซรูฟิน ซึ่งมีสีชมพู และเมื่อปฏิกิริยายังดำเนินต่อไปจะเปลี่ยนเป็น ไฮโดรรีโซฟูริน ที่ไม่มีสี



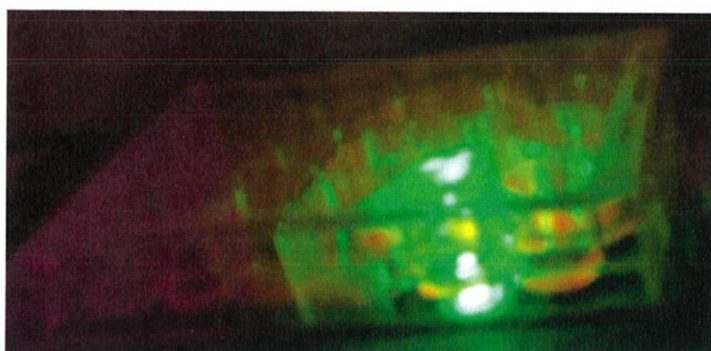
สีรีซาซูริน (Resazurin) สามารถใช้ทดสอบกับแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่ไม่ต้องการอากาศ (Anaerobic bacteria) และแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่ต้องการอากาศ (Aerobic bacteria) ปริมาณแบคทีเรียจะทำให้สีของน้ำยารีซาซูรินเปลี่ยนไป ดูจากการเปลี่ยนแปลงของสีหลังเติมและบ่มที่ 37 °c การอ่านผลจะอ่านผลในช่วงเวลาที่ 1 และ 3

2.4 การประยุกต์ใช้สีรีซาซูรินกับเซลล์แบคทีเรีย

สีรีซาซูรินใช้ครั้งแรกในการประมาณปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำนม โดย Pesch และ Simmert มีชื่อทางการค้า คือ Alamar Blue (Trek Diagnostic Systems, Inc) และมีชื่ออื่นๆ เช่น AB assay, Vybrant (Molecular Probes) และ UptiBlue (Interchim). สีรีซาซูรินสามารถใช้ตรวจวัดปริมาณเซลล์สิ่งมีชีวิตด้วยวิธี formazan-based assays (MTT/XTT) และ tritiated thymidine based techniques เพราะใช้งานง่ายและปลอดภัยต่อผู้ทดลอง นอกจากนี้ยังเหมาะสมสำหรับงานวิจัยที่ต้องใช้เวลาในการทดลองเป็นเวลานาน เช่น การเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย และเชื้อรา ในการเพาะเลี้ยงเซลล์จะใช้สีรีซาซูรินสำหรับการนับเซลล์ ใช้ตรวจ cytokine ตรวจวัด caspase เพื่อวัดเซลล์ apoptosis และตรวจการแพร่กระจายของเซลล์ เนื่องจากสามารถวิเคราะห์ผลได้รวดเร็ว ส่งผลต่อเซลล์น้อย



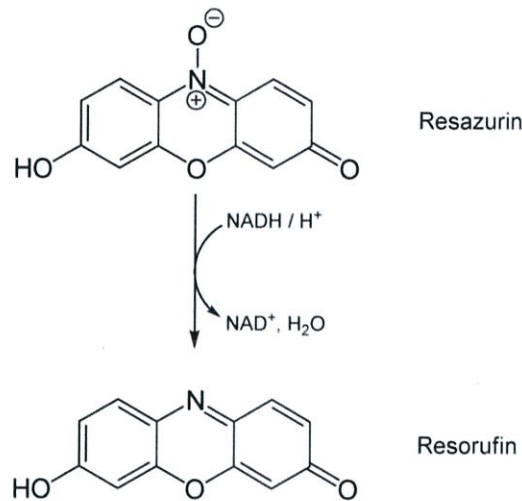
รูปที่ 2.3 การใช้สีรีซาซุรินทดสอบเชื้อแบคทีเรีย (ที่มา : Kreft, Marko (2009)



รูปที่ 2.4 วิธีการตรวจเรืองแสงเซลล์มีชีวิตโดยใช้สีรีซาซุริน (ที่มา : Freier, EF (1983)

2.5 การประยุกต์ใช้สีรีซาซุริน (resazurin) ด้านอื่นๆ

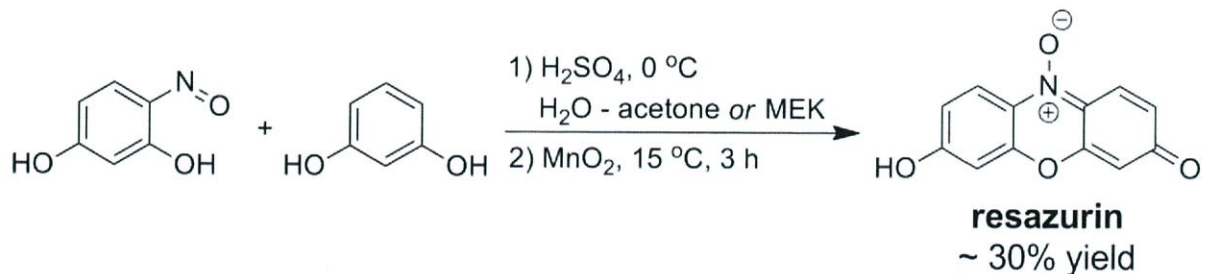
สีรีซาซุริน (Resazurin) จะทำปฏิกิริยากับกระบวนการเมแทบอลิซึมในไมโทคอนเดรียของเซลล์แบคทีเรียจะเปลี่ยนเอนไซม์ NADPH dehydrogenase (NADPH) หรือ NADH dehydrogenase (NADH) เมื่อเกิดปฏิกิริยารีดักชัน ทำให้เกิดกรดทำให้รีซาซุริน (resazurin) ที่มีสีม่วงเปลี่ยนเป็นเรโซรูฟิน (resorufin) ที่มีสีชมพู ดังนั้นสีรีซาซุรินสามารถใช้ตรวจหาระดับ NADPH, NADH และ diaphorase และกิจกรรมชีวเคมีหรือเอนไซม์ใดๆที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่สร้าง NADPH หรือ NADH ได้ นอกจากนี้สามารถใช้สีรีซาซุรินในการตรวจวิเคราะห์ L-Glutamate และวัดการสลายตัวทางชีวภาพของสารอินทรีย์ที่พบในน้ำทิ้งได้



รูปที่ 2.5 ปฏิกิริยารีดักชันในเซลล์สิ่งมีชีวิต
ที่มา : Encinas, M. V. และคณะ (2002)

2.6 การสังเคราะห์สีรีซาซูริน (resazurin)

สีรีซาซูริน (Resazurin) สังเคราะห์จากการควบแน่นด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรดระหว่าง resorcinol และ 4-nitrosoresorcinol ตามด้วยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารตัวกลางกับแมงกานีส (IV) ออกไซด์ (manganese(IV) oxide) แทนการควบแน่นด้วยแอลกอฮอล์เนื่องจากส่งผลต่อผลิตภัณฑ์ลดน้อยลง การเก็บรักษาจะใช้โซเดียมคาร์บอเนตเพื่อยืดอายุของการใช้งาน



รูปที่ 2.6 การสังเคราะห์สีรีซาซูริน (ที่มา : Nancy B. และคณะ(2009))

2.7 แบคทีเรีย (Bacteria)

แบคทีเรีย (Bacteria) เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งซึ่งมีขนาดเล็กมากจนมองด้วยตาเปล่าไม่เห็น (Microorganism) มีอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม แบคทีเรียบางชนิดสามารถทำให้เกิดโรคในมนุษย์ได้ ในขณะที่เดียวกันก็มีแบคทีเรียบางชนิดที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์เป็นอย่างมาก ยิ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถอยู่เป็นอิสระนอกร่างกายมนุษย์ได้ มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่จำเป็นต้องอาศัยอยู่ในเซลล์ของมนุษย์เพื่อการดำรงชีวิต

2.7.1 ชนิดของแบคทีเรีย

การแบ่งชนิดของแบคทีเรียสามารถแบ่งได้หลายแบบ เช่น

1. แบ่งตามการติดสีย้อมแกรม (Gram stain) ถ้าย้อมแกรมติดสีน้ำเงินเรียกว่าแบคทีเรียชนิดแกรมบวก (Gram positive bacteria) ถ้าย้อมแกรมติดสีแดงเรียกว่าแบคทีเรียชนิดแกรมลบ (Gram negative bacteria)
2. แบ่งตามรูปร่างของแบคทีเรีย เช่น แบคทีเรียรูปร่างกลมเรียกว่าคอคคัส (Coccus) แบคทีเรียรูปร่างเป็นแท่งเรียกว่า บาซิลลัส (Bacillus)
3. แบคทีเรียรูปร่างบิดเป็นเกลียว เรียกว่า สไปโรคีท (Spirochete) แบ่งตามการใช้ออกซิเจนของแบคทีเรีย ทั้งนี้ชนิดต่างๆของแบคทีเรียทำให้มีความแตกต่างในด้านต่างๆเช่น แบคทีเรียที่ต้องใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิตเรียกว่า แอโรบิกแบคทีเรีย (Aerobic bacteria) แบคทีเรียที่ไม่ต้องใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิตเรียกว่า แอนแอโรบิกแบคทีเรีย (Anaerobic bacteria)

2.7.2 ปัจจัยที่มีผลที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

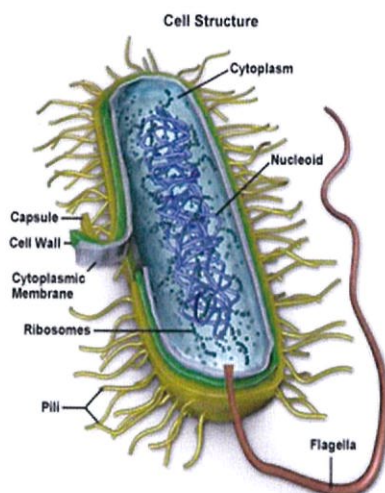
1. ออกซิเจน (O_2) โดยแบคทีเรียมีทั้งชนิดที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (Aerobe) ได้แก่ *Escherichia* และ *Pseudomonas* ชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (Anaerobe) ได้แก่ *Clostridium*
2. พีเอช (pH) ส่วนใหญ่มีพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตระหว่าง 6.5-7.5 มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่สามารถเจริญในสภาวะที่เป็นกรด
3. ความชื้น แบคทีเรียส่วนใหญ่ต้องการความชื้นในการเจริญ แต่บางชนิดมีสปอร์ทนต่อความแห้งแล้งได้ดี เช่น *Tubercle bacilli*
4. อุณหภูมิ แบคทีเรียแต่ละชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญที่ต่างกัน เช่น *Pseudomonas* , *Achromobacter* , *Flavobacterium* เป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่ำในช่วง 12-15 องศาเซลเซียส และ *Neisseria gonorrhoeae* , *Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิสูงในช่วง 30-45 องศาเซลเซียส

2.7.3 โครงสร้างของแบคทีเรีย

แบคทีเรียมีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.3 – 2 ไมโครเมตร แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

1. Cell envelope เป็นส่วนที่ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์ ทำให้เซลล์มีรูปร่างลักษณะแตกต่างกันออกไป ได้แก่ ผนังเซลล์ (cell wall) ส่วนเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และ ไกลโคคาลิกซ์ (glycocalyx) ซึ่งเป็นเปลือกนอกพวกแคปซูล (capsule) หรือสารเมือก (slime layers)
2. Protoplasm เป็นของเหลว ภายในประกอบด้วยออร์แกเนลล์หลายชนิด ได้แก่ ไรโบโซม (ribosome) และ นิวคลีโออยด์ (nucleoid)

3. Appendages เป็นส่วนที่ยื่นออกจากเซลล์ทำหน้าที่เคลื่อนที่ เช่น แฟลกเจลลา (flagella) ซึ่งอาจมีหรือไม่มีก็ได้



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของแบคทีเรีย (ที่มา : C.Michael Hogan. (2010))

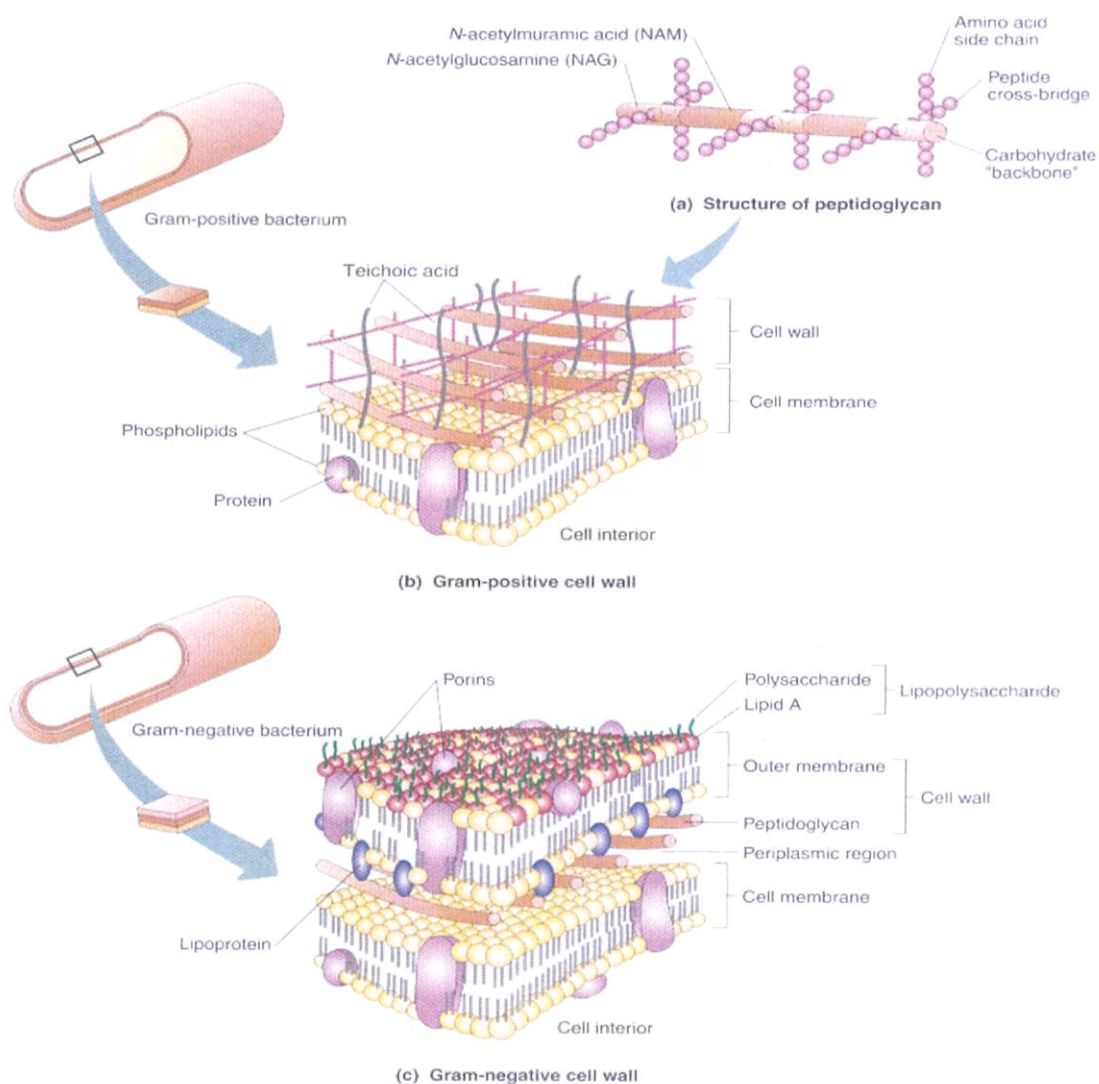
2.7.4 ความแตกต่างของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีความซับซ้อน มากกว่าของแบคทีเรียแกรมบวก คือ ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วย peptidoglycan เพียงประมาณร้อยละ 5 – 20 เท่านั้น นอกจากนี้ประกอบด้วย lipoprotein, lipopolysaccharide และ ยังมี diaminopimelic acid แทนที่ lysine แต่มีจำนวน peptide bridge น้อยกว่าของแบคทีเรีย แกรมบวก นอกจากนี้ปริมาณไขมันที่มีมากกว่าในแบคทีเรียแกรมลบบยังมีคุณสมบัติเป็น specific antigen (O-antigen) และ endotoxin และเป็นเครื่องกั้นไม่ให้ถูกย่อยด้วยเอนไซม์บางชนิด องค์ประกอบของ lipopolysaccharide (LPS) ยังช่วยป้องกันการถูกกลืนทำลาย (Phagocytosis) จากเซลล์ของร่างกายได้ด้วย เมมเบรนชั้นนอก (Outer Membrane) ของแบคทีเรียแกรมลบบยึดติดกับ peptidoglycan ที่อยู่ ข้างใต้ด้วย Lipoprotein เมมเบรนชั้นนอกมีลักษณะเป็น 2 ชั้น องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น

- phospholipid
- โปรตีน เช่น porin protein ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวคัดเลือกการผ่านของสารอาหารเข้าสู่ ผนังเซลล์ ปกติขนาดโมเลกุลของสารที่สามารถผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์ของพวก enteric
- lipopolysaccharide (LPS) ส่วนองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (รูปที่ 11) ผนังเซลล์มี องค์ประกอบเป็น Peptidoglycan ถึงร้อยละ 90 และยังพบกรด ไทโคอิก (Teichoic acid) ซึ่งไม่พบใน แบคทีเรียแกรมลบด้วย ส่วนในด้านความหนา โดยประมาณ ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกจะ หนากว่าแกรมลบ คือ หนา 25 - 30 มิลลิ ไมโครเมตร แต่แกรมลบบหนา 15 – 20 มิลลิไมโครเมตร

ความแตกต่างที่สำคัญของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ คือ แบคทีเรีย แกรมลบบมี เมมเบรนชั้นนอก (outer membrane) ล้อมรอบ peptidoglycan ไว้ membrane นี้มีชั้น ไขมัน

มากถึง 11-22 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ membrane ชั้นนอกทำหน้าที่เป็น เครื่องกั้นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเจริญของผนังเซลล์ไม่ให้ออกจากช่องว่าง periplasm และยังกั้น สารเคมีและเอนไซม์จากภายนอกไม่ให้เข้าไปทำลายเซลล์ ดังนั้นผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก จึงถูกทำลายด้วย lysozyme ได้ง่ายกว่าของแบคทีเรียแกรมลบ



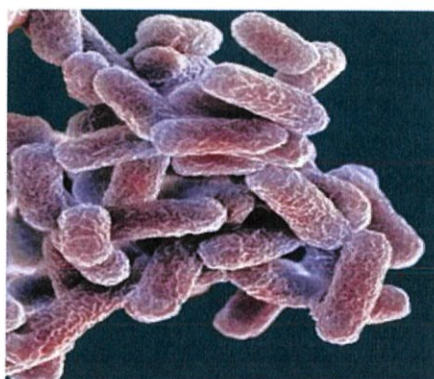
รูปที่ 2.8 แสดงโครงสร้างของชั้น Peptidoglycan ของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (a)ผนังเซลล์ของ แบคทีเรียแกรมบวก (b) และแบคทีเรียแกรมลบ (c) (Pommerville, 2004)

2.7.5 *Escherichia coli*

E.coli เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) อยู่ในกลุ่มเอ็นเทอโรแบคทีเรียซี (Family Enterobacteriaceae) ที่พบได้บ่อยอยู่ในลำไส้คนและสัตว์โดยเชื้อ *E. coli* ส่วนใหญ่จะไม่ก่อโรคในคน แต่ก็มีเชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารและระบบอื่นของร่างกายได้ทั้งในคนและสัตว์ โดยส่วนใหญ่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อลงในอาหารและน้ำดื่ม

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง (rod shape) มีขนาดตั้งแต่ 1.1-1.5x2.0-6.0 ไมโครเมตร สายพันธุ์ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ (motile) โดยอาศัย flagella ที่มีอยู่รอบตัว (รูปที่1) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobe) และสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ปกติสามารถเจริญบนอาหารธรรมดาที่ใช้ในห้องปฏิบัติการที่ช่วงอุณหภูมิ 7 – 46 °C pH ของอาหารตั้งแต่ 4.4 – 10 มี capsule บางๆ หุ้มอยู่รอบตัวทำให้เชื้อทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆได้ดี



รูปที่ 2.9 ลักษณะรูปร่างของเชื้อ *E. coli*
ที่มา : Andrew R., eds.และคณะ (1997)

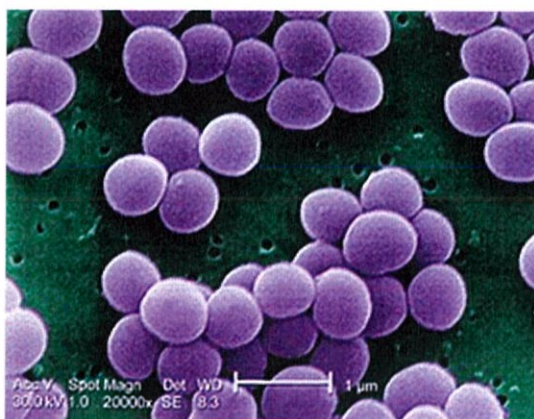
2.7.6 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus เป็นจุลินทรีย์ใน Family Micrococcaceae ซึ่งมีคุณสมบัติย้อมติดสีแกรมบวก แหล่งที่พบเชื้อ *S. aureus* เป็นเชื้อที่สามารถพบได้ที่ผิวหนัง โพรงจมูก เยื่อบุทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร และบาดแผลที่เป็นฝี หนอง รวมถึงในดินฝุ่นละออง อาหารที่มักพบเชื้อ *S. aureus* ปนเปื้อนได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ เนื้อสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์จากไข่ อาหารประเภทสลัดเช่น ไข่ ทูน่า เนื้อไก่ มันฝรั่ง เป็นต้น

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม มักพบเป็นคู่เกาะกันด้วยสายสั้นๆ เป็นกิ่งหรือเป็นลักษณะพวงองุ่น (spherical shape) สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศและมีอากาศ (facultative anaerobes) เจริญได้ในระดับความเข้มข้นของเกลือสูงถึง 15 เปอร์เซ็นต์ *Staphylococcus aureus* ไม่เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ ลักษณะโคโลนิกรวม ขอบเรียบ หนูนม สีครีม เหลือง ส้ม (ขึ้นอยู่กับชนิดของคาโรทีนอยด์ในเซลล์เมมเบรน รวมถึงอุณหภูมิ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะแวดล้อมที่ทำให้เชื้อเจริญ) *S. aureus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 6 – 46 °C โดยมีช่วง

อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 – 37 °C ทนความร้อนที่ 60 °C นาน 30 นาที ค่า pH ที่สามารถเจริญได้ อยู่ในช่วง 4.0 – 10.0 pH โดยมีช่วงที่เหมาะสม คือ 7.0 – 7.5

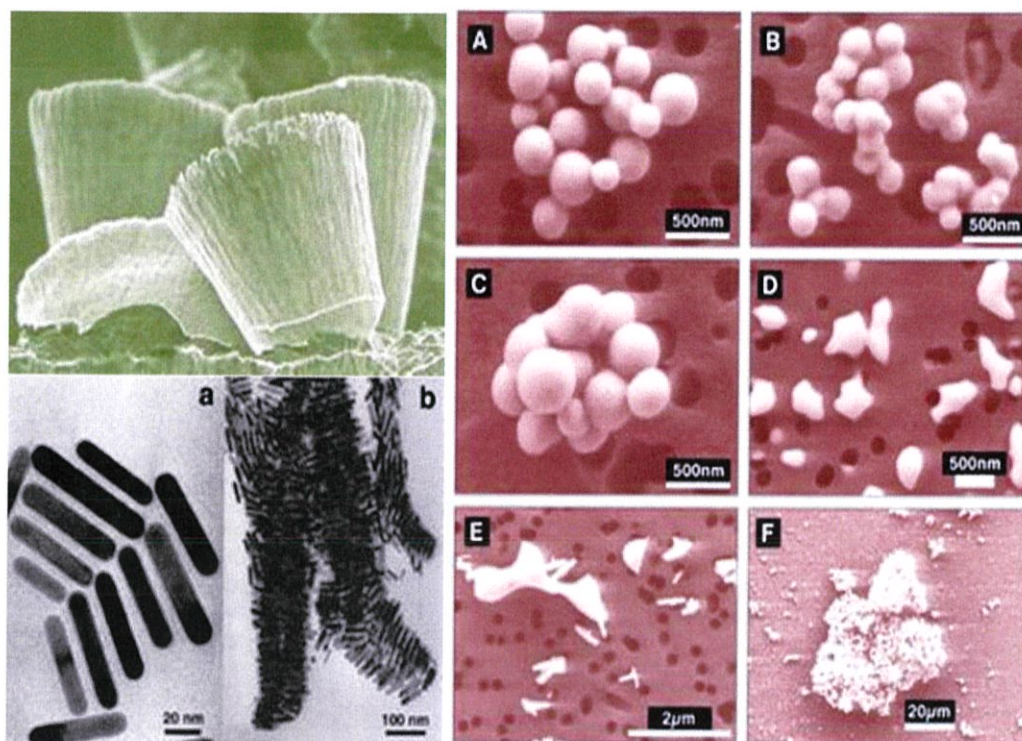


รูปที่ 2.10 ลักษณะรูปร่างของเชื้อ *S.aureus*
ที่มา : Verbrugh H และคณะ (July 1997)

2.8 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

อนุภาคนาโน (Nanoparticle) วัสดุนาโนหรืออนุภาคนาโนเป็นอนุภาคที่มีขนาดในระดับ 1 – 100 นาโนเมตร ซึ่งโดยประมาณเทียบได้กับขนาดเฉลี่ยของไวรัส หรือมีขนาดเล็กกว่าเส้นผมของคน ประมาณ 1,000 ถึง 100,000 เท่า ซึ่งสามารถตรวจพบ หรือสัมผัสรับเข้าไปโดยไม่รู้ตัว วัสดุนาโนสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ และเกิดจากการกระทำของมนุษย์ ชนิดที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ อาจพบได้หลังเกิดไฟป่า หรือภูเขาไฟระเบิด บางชนิดอาจอยู่ในรูปของอนุภาคไวรัส ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ส่วนอนุภาคนาโน ที่เกิดจากการกระทำของมนุษย์ได้จากการสังเคราะห์โดยตรง และเป็นสารปนเปื้อนออกมา เช่น จากการเผาไหม้ของเครื่องยนต์ เครื่องจักร หรือยานพาหนะ หรือจากกระบวนการผลิต ทั้งทางเคมี และชีวภาพ โดยทั่วไปอนุภาคนาโนถูกสร้างมาจากวัตถุดิบนำโดยอาจจะนำมาติดด้วยควอนตัมดอท (quantum dot หรือรู้จักกันในอีกนามว่า semiconductor nanocrystal ซึ่งหมายถึงผลึกของแข็งของสารกึ่งตัวนำ ที่ประกอบไปด้วยขนาดของอะตอมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางราว 10-20 นาโนเมตร ประมาณ 10 – 50 อะตอม รวมทั้งมี electron เป็นองค์ประกอบตั้งแต่ 100 – 1000 electrons) อนุภาคนาโนนั้นเป็นอนุภาคที่สำคัญอย่างยิ่งในวงการวิทยาศาสตร์เนื่องจากเป็นสะพานเชื่อมของวัตถุ อะตอม และโครงสร้างระดับโมเลกุลได้เป็นอย่างดี วัสดุที่มีขนาดใหญ่จะมีคุณสมบัติทางฟิสิกส์คงที่ตามขนาดของวัตถุนั้น แต่ในวัสดุระดับนาโนไม่เป็นเช่นนั้นเนื่องจากมีคุณสมบัติอื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง ได้แก่ quantum confinement, surface plasmon resonance และ superparamagnetism อนุภาคนาโนถูกสร้างขึ้นเป็นโครงสร้างผสมขึ้นมาไปประยุกต์ใช้งานได้หลายๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการนำไปใช้ให้ดียิ่งขึ้น เช่น นาโนเชล (core-shell

nanoparticles) ยิ่งไปกว่านั้นอนุภาคนาโนสามารถถูกออกแบบให้มีรูปร่างแตกต่างกันไป เช่น ทรงกลม (nanospheres) แบบท่อน (nanorods) และแบบถ้วย (nanocup)



รูปที่ 2.11 โครงสร้างแบบต่างๆของอนุภาคนาโน
ที่มา : Pais, A. และคณะ (2005)

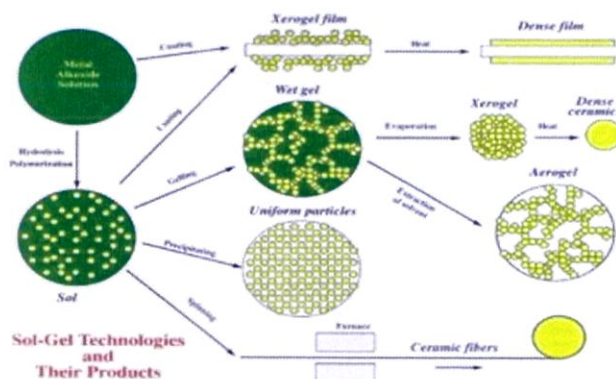
ช่วงก่อนศตวรรษที่ 21 ตามปกติ เมื่อกล่าวถึงวัสดุในทางวัสดุศาสตร์ เรามักจะนึกถึงโลหะ อโลหะ เซรามิก และพอลิเมอร์ แต่เมื่อมาถึงยุคนาโนเทคโนโลยี เราต้องปฏิวัติแนวคิด และค่านิยมให้สอดคล้องกับความเปลี่ยนแปลง กล่าวคือ วัสดุในยุคปัจจุบันจะขยายรวมถึงวัสดุในความหมายเดิม และวัสดุที่มีขนาดนาโนที่ในปัจจุบัน มักมีการนำมาใช้ในกระบวนการผลิต เช่น อนุภาคนาโน วัสดุดีเอ็นเอด้วย วิวัฒนาการนี้เอง เป็นผลให้องค์ความรู้เดิมด้านวิทยาศาสตร์ พื้นฐานที่ใช้อธิบายวัสดุ จะต้องมีการพัฒนาขึ้น เพื่อให้สอดคล้อง และสมจริง สิ่งที่เคยอธิบายได้ด้วยหลักการเดิม กลับมีความซับซ้อน และมีความเป็นไป ที่แปลกไปจากเดิมมาก ดังนั้น หลักการ หรือคำอธิบาย ที่เกี่ยวกับระบบนาโนจะต้องได้รับการบูรณาการขึ้นใหม่ เพื่อให้สามารถเข้าใจปรากฏการณ์ทางธรรมชาติ ที่เกี่ยวกับระบบนาโนอย่างแท้จริง

2.8.1 การสังเคราะห์วัสดุนาโน

1. Sol-gel process

เป็นการเตรียมวัสดุนาโนโดยการนำสารละลายมาทำปฏิกิริยา โดยการเปลี่ยนสถานะจากของเหลวที่เรียกว่า “Sol” ให้อยู่ในรูปของสารแขวนลอยที่มีขนาดอนุภาคประมาณ 0.1-1 ไมครอน

และเกาะตัวกันเป็นร่างแหอย่างไม่เป็นระเบียบเรียกว่า “Gel” จากนั้นนำสารที่ได้ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิในช่วงไม่เกิน 1000 องศาเซลเซียส จะได้ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ เช่น เส้นใย (Fiber) แอโรเจล (Aerogel) ซีโรเจล (Xerogel) ผง (Powder)



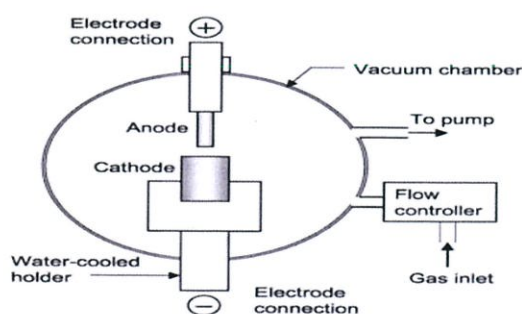
รูปที่ 2.12 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนวิธี Sol-gel process

ที่มา : <http://www.lswn.it/en/node/10186>

(วันที่สืบค้น 2 กรกฎาคม 2561)

2. Electric arc discharge process

เป็นการเตรียมวัสดุนาโนโดยเป็นกระบวนการป้อนกระแสไฟฟ้าและความต่างศักย์เข้าไปเพื่อให้อนุภาคเกิดการแตกตัวกลายเป็นพลาสมาร้อน จากนั้นอนุภาคที่แตกตัวจะเกิดการควบแน่นและก่อตัวใหม่ที่ขั้วแคโทด วิธีนี้ง่ายและมีค่าใช้จ่ายน้อย แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้อาจจะมีความไม่สม่ำเสมอและมีสิ่งเจือปนผสมอยู่ นิยมใช้ในการเตรียมท่อนาโนคาร์บอน



รูปที่ 2.13 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนวิธี Electric arc discharge process

ที่มา : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493101003034>

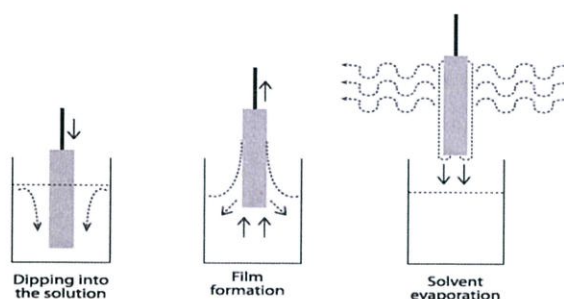
(วันที่สืบค้น 2 กรกฎาคม 2561)

3. Electric sparking process

เป็นการเตรียมวัสดุนาโนที่อาศัยการถ่ายเทประจุไฟฟ้าที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้เกิดประกายไฟและไอออนของอนุภาคขึ้น ทำให้มีอิเล็กตรอนอิสระและไอออนในอากาศมากขึ้น จากนั้นอนุภาคที่แตกตัวจะเกิดการควบแน่นและก่อตัวขึ้นใหม่ นิยมใช้ในการเตรียมวัสดุนาโนในกลุ่มโลหะ ออกไซด์ นาโนดอทและฟิล์มบาง เช่นการเคลือบโลหะออกไซด์ลงบนกระจก

4. Dip coating process

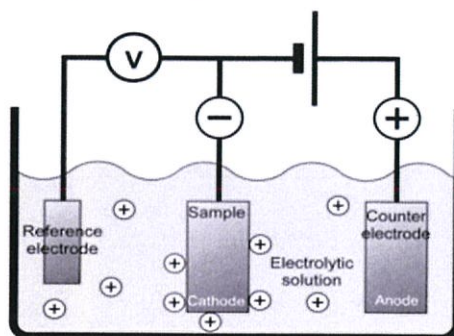
เป็นการเตรียมวัสดุนาโนโดยการนำสารละลายที่เตรียมได้จากกระบวนการอื่นๆ มาทำการจุ่มเคลือบตัวกลางที่ต้องการ ทำให้เกิดการเรียงตัวของอนุภาคบนพื้นผิวของตัวกลางที่ต้องการจึงเกิดเป็นฟิล์มบางขนาดนาโนขึ้น จากนั้นนำฟิล์มบางนาโนที่ได้ไปให้ความร้อน เพื่อให้ฟิล์มสามารถยึดติดบนผิวของแผ่นรองรับได้ดี



รูปที่ 2.14 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนวิธี Dip coating process
ที่มา : <http://hosting.umons.ac.be/php/lpsi/Dip>
(วันที่สืบค้น 2 กรกฎาคม 2561)

5. Electrodeposition process

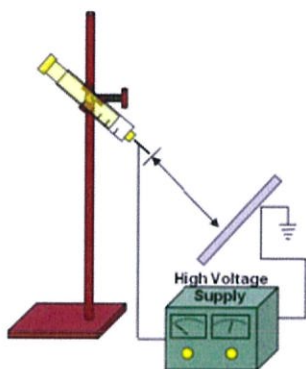
เป็นการเตรียมวัสดุนาโนโดยการทำให้โลหะไปพอกพูนอยู่บนผิวหน้าของชิ้นงาน โดยการให้ศักย์ไฟฟ้าหรือกระแสไฟฟ้า ทำให้โลหะไอออนที่อยู่ในสารละลายเกิดปฏิกิริยารีดักชันโดยโลหะไอออนจะเคลื่อนที่ไปรับอิเล็กตรอนที่ขั้วลบของอิเล็กโทรดและเปลี่ยนสภาพเป็นโลหะที่เป็นของแข็งพอกพูนอยู่ที่ขั้ว นิยมใช้ในการเตรียมท่อนาโน ฟิล์มบางนาโน



รูปที่ 2.15 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนวิธี Electrodeposition process
ที่มา : <http://www.intechopen.com/books/electrodeposited-nanowires>
(วันที่สืบค้น 2 กรกฎาคม 2561)

6. Electospinning process

เป็นการเตรียมวัสดุนาโนโดยอาศัยแรงทางไฟฟ้าเพื่อทำให้เกิดการพุ่งเป็นลาของสารละลายซึ่งมีประจุไฟฟ้า อันเป็นผลจากการเชื่อมต่อกับแหล่งกำเนิดศักย์ไฟฟ้ากำลังสูง (High voltage power supply) ส่งผลทำให้เกิดการยืดตัวของสารละลายพอลิเมอร์หรือพอลิเมอร์หลอมเหลว แล้วเกิดเป็นเส้นที่มีขนาดเล็กซ้อนทับกันบนวัสดุรองรับที่เป็นโลหะหรือวัสดุที่มีสมบัตินำไฟฟ้าได้ นิยมใช้ในการเตรียมเส้นใยนาโน



รูปที่ 2.16 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนวิธี Electospinning process

ที่มา : พวงรัตน์ ขจิตวิทยานุกุลและคณะ, 2555

(วันที่สืบค้น 2 กรกฎาคม 2561)

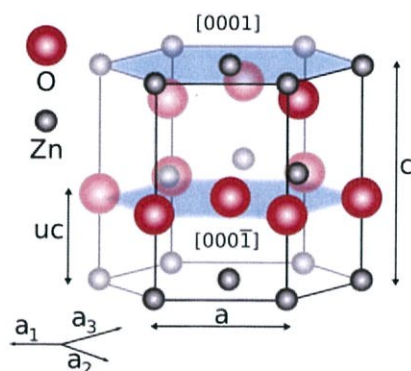
2.8.2 ซิงก์ออกไซด์ (Zinc Oxide: ZnO)

เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนขนาดอนุภาคซิงก์ออกไซด์ให้มีขนาดเล็กลงอยู่ในระดับอนุภาคนาโนเมตร มีขนาดอนุภาคเล็กระดับนาโนเมตร (10^{-9} เมตร) มีความบริสุทธิ์สูง มีสีขาวและไม่เปลี่ยนสี ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันและยับยั้งการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย นาโนซิงก์ออกไซด์มีประจุบวกสามารถจับกับผิวของแบคทีเรียที่มีประจุลบด้วยแรงทางประจุ (Electrostatic force) ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียมีช่องว่างและอนุภาคซิงก์ออกไซด์เข้าไปทำลายเซลล์ โดยการขัดขวางการส่งอิเล็กตรอนในชั้น เมมเบรนเมื่อกิจกรรมภายในเซลล์ถูกทำลายแบคทีเรียจึงตายลงซึ่งซิงก์ออกไซด์สามารถเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้เมื่ออยู่ภายใต้การฉายแสงด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตไม่สามารถถูกกระตุ้นด้วยแสงธรรมชาติได้ จึงเป็นข้อดีในการนำมาใช้ประโยชน์

โครงสร้างของซิงก์ออกไซด์ (ZnO)

สารประกอบซิงก์ออกไซด์มีโครงสร้างผลึกได้หลายรูปแบบ คือ โครงสร้างของเวิร์ทไซท์ (Wurtzite structure) และ แบบซิงก์เบลนด์ (zinc blend structure) สำหรับโครงสร้างเวิร์ทไซท์ประกอบด้วย O^{2-} จัดเรียงตัวกันในรูปแบบเฮกซาโกนอล และครึ่งหนึ่งของจำนวนช่องเตตระฮีดรอล มี Zn^{+2} แทรกอยู่ เพื่อให้ทำให้อนุมูลบวก อยู่ห่างกันมากที่สุด ซิงก์ออกไซด์มีอัตราส่วนของรัศมี 0.25 ดังนั้น Zn^{+2} จะมี O^{2-} 4 ตัวล้อมรอบอยู่โดยรอบ ความแข็งแรงของพันธะจะมีค่า 0.5 ดังนั้น O^{2-}

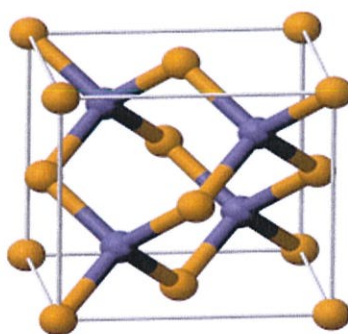
จะต้องมี Zn^{+2} 4 ตัวล้อมรอบโดยรอบดั่งนั้นโคออร์ดิเนชันชั้นของการจัดเรียงไอออนของสารประกอบนี้คือ 4:4



รูปที่ 2.17 โครงสร้างของเวิร์ตไซต์ (Wurtzite structure)

ที่มา : J. Behler และคณะ (2015)

สำหรับโครงสร้างแบบ Zinc Blend ประกอบไปด้วยไอออน O^{-2} จัดเรียงตัวแบบ face-centered structure (FCC) และมี Zn^{+2} เข้าไปบรรจุอยู่ครึ่งหนึ่งของจำนวนช่องเตตระฮีดรอล แต่ละไอออน Zn^{+2} จะมี O^{-2} 4 ไอออนมาล้อมรอบในทำนองเดียวกันแต่ละไอออนของ O^{-2} จะมี Zn^{+2} มาล้อมรอบอยู่ 4 ไอออนเช่นกัน ทำให้เลขโคออร์ดิเนชันของสารประกอบนี้เท่ากับ 4:4

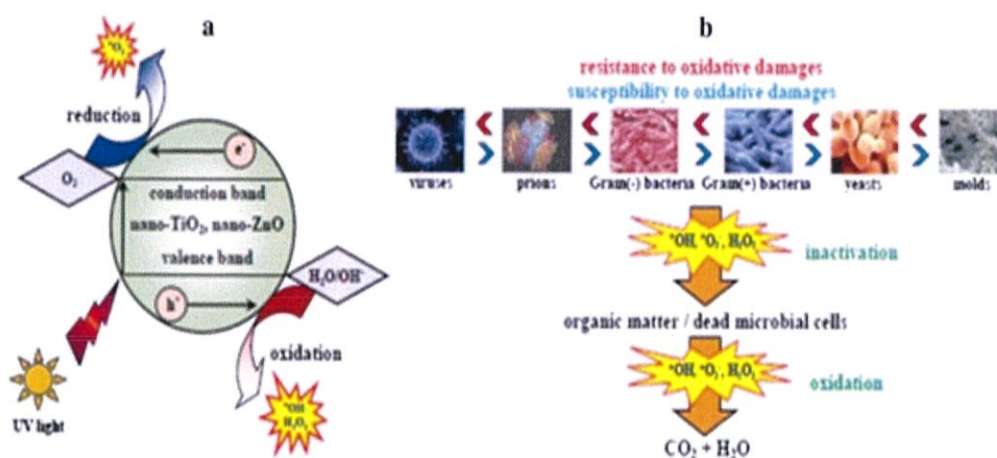


รูปที่ 2.18 โครงสร้างของแบบซิงค์แบลนด์ (ที่มา : M. Parrinello และคณะ (1985))

กลไกการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์

กลไกการยับยั้งแบคทีเรียของนาโนซิงก์ออกไซด์ใช้หลักการโฟโตคะตะลิสต์ (Photocatalytic) โดยมีกลไก คือ เมื่อแสงทำปฏิกิริยากับซิงก์ออกไซด์จะทำให้อิเล็กตรอนขึ้นไปยังสถานะกระตุ้น (excited state : e^-) และเกิดช่องว่างของอิเล็กตรอน (hole : h^+) ที่บริเวณของ

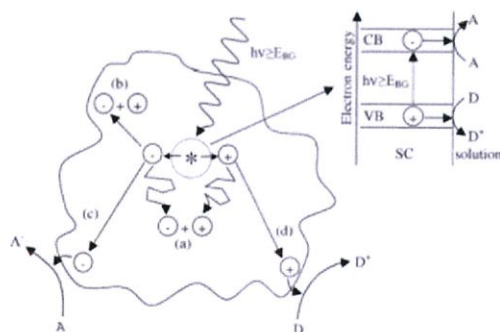
สถานะเดิม(ground state) เมื่อ $h\nu$ ทำปฏิกิริยานำ ได้ hydroxyl radicals กับไฮโดรเจนไอออน ส่วนอิเล็กตรอน จะทำปฏิกิริยากับก๊าซออกซิเจน ได้ superoxide radical anion และทำปฏิกิริยาต่อไปกับไฮโดรเจนไอออน ได้ hydrogen superoxide และเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องระหว่าง hydrogen superoxide กับไฮโดรเจนไอออนและอิเล็กตรอน ได้ hydrogen peroxide โดยพบว่า hydrogen peroxide จะผ่านเข้าไปในผนังเซลล์ของแบคทีเรียเกิดอันตรกริยากับ organic materials จนเกิดการเสื่อมสลายและฆ่าแบคทีเรีย ได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ



รูปที่ 2.19 กลไกการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ (ที่มา : Bogdan และคณะ (2015))

กลไกการเกิดกระบวนการเร่งปฏิกิริยาแสง

กล่าวได้ว่าบวมนการข้างต้นจะเกิดขึ้นที่ผิวของสารกึ่งตัวนำ (Semi conductor) โดยจะดูดซับโฟตอนจากแสง UV ที่มีพลังงานมากกว่าหรือเท่ากับพลังงานแบนด์แก๊ป ($h\nu \geq E_{BG}$) โดยส่งผลให้เกิดการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนในแถบวาเลนซ์ไปสู่แถบคอนดักชัน (Electron in Conduction Band) และทำให้เกิดโฮล (หลุม) ในแถบวาเลนซ์ (Hole in Valence Band)



a) เป็นการรวมตัวกันของอิเล็กตรอน-โฮล ($e^- \cdot h^+$)
 b) กระบวนการรวมตัวกับบริเวณผิว
 c) ตัวให้ชนิดตรง (A) ในปฏิกิริยารีดอกซ์กับอิเล็กตรอน (e^-)
 d) ตัวให้ชนิดตรง (D) ในปฏิกิริยาออกซิเดชันกับอิเล็กตรอน (h^+)

รูปที่ 2.20 รูปแบบที่เกิดขึ้นของกระบวนการเร่งปฏิกิริยาด้วยแสง

ความสัมพันธ์กับการประยุกต์ใช้งานเพื่อบำบัดมลพิษหรือสารอินทรีย์ที่สัมพันธ์กับปรากฏการณ์ของการเกิดคู่อิเล็กตรอน-โฮล ($e^- - h^+$) เมื่อสารกึ่งตัวนำดูดซับโฟตอนจากแสงยูวี ในกระบวนการเร่งปฏิกิริยาด้วยแสง สามารถแบ่งออกเป็นกลไกต่างๆอาจเกิดขึ้นได้เป็น 4 รูปแบบ กล่าวคือ

รูปแบบ a จะเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดจากการรวมตัวอีกครั้งของคู่อิเล็กตรอน-โฮล ภายในสารกึ่งตัวนำที่เลือกใช้ในบริเวณดังกล่าวอาจมีพลังงานแบนด์แก๊ปที่ต่ำจนกระทั่งคล้ายกับสภาวะไม่มีพลังงาน

รูปแบบ b ขั้นตอนนี้จะเกิดปรากฏการณ์เช่นเดียวกับการเกิดคู่อิเล็กตรอน-โฮล ในรูปแบบ a ที่กล่าวถึงข้างต้น โดยประเด็นที่แตกต่างกันคือในกรณีนี้จะเกิดการรวมตัวกันใหม่ที่ผิวของสารกึ่งตัวนำ ในการนี้ อาจกล่าวได้ว่าทั้ง 2 รูปแบบข้างต้น (a และ b) นั้นมีส่วนร่วมค่อนข้างน้อยต่อกลไกการบำบัดมลพิษหรือสารอินทรีย์

รูปแบบ c กล่าวได้ว่าขณะที่อิเล็กตรอนเคลื่อนที่อย่างอิสระที่บริเวณผิวของสารกึ่งตัวนำเมื่อมีตัวรับอิเล็กตรอน หรือตัวออกซิแดนท์ ยกตัวอย่างเช่น ออกซิเจน เข้ามาใกล้บริเวณผิวบนสารกึ่งตัวนำ จะเกิดปฏิกิริยารีดักชัน ทำให้ได้ซูเปอร์ออกไซด์อออนเรดิคัล (O_2^\ominus) เพอร์ไฮดรอกซิลเรดิคัล (OH_2^\ominus) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของมลพิษที่เรากำจัดให้กลายเป็นโครงสร้างที่ไม่เป็นพิษหรือเป็นอันตรายด้วยปฏิกิริยารีดอกซ์ ที่เกิดขึ้นหรืออาจเรียกว่ากลไกการโฟโตรีดักชัน

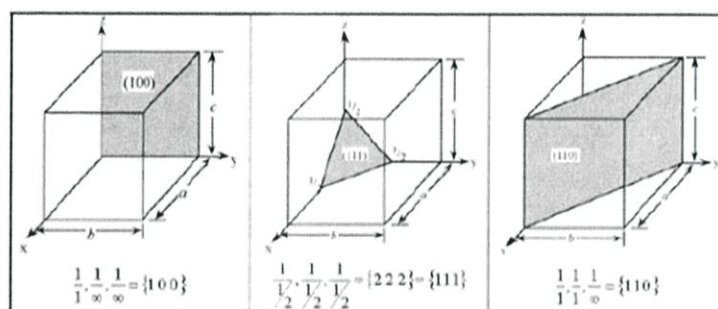
รูปแบบ d จะเกี่ยวข้องกับส่วนที่เป็นโฮล ที่อยู่บริเวณผิวของสารกึ่งตัวนำ ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับเฟสน้ำหรือไฮโดรเจนอออน ทำให้เกิดเป็นไฮดรอกซิลเรดิคัล (OH^\ominus) สูงในการย่อยมลพิษในรูปแบบสารอินทรีย์มักจะมีลักษณะที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนดังนั้น เมื่อเกิดการเคลื่อนที่เข้ามาใกล้หรือเกาะติดผิวที่ผิวของสารกึ่งตัวนำ จึงสามารถถูกย่อยสลาย ให้เกิดเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดยกลไกดังกล่าวสัมพันธ์กับการย่อยสลายมลพิษด้วยกระบวนการออกซิเดชันขั้นสูง

2.8.3 ซิลเวอร์ (Silver : Ag)

ซิลเวอร์นาโนมีคุณสมบัติเหมือนกันกับซิลเวอร์ทั่วไป ซิลเวอร์นาโนเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถเปลี่ยนเป็นรูปเป็นไอออนซิลเวอร์ที่แตกตัวอยู่ในน้ำได้ ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ต่อไป โดยซิลเวอร์นาโนซึ่งเป็นของแข็งที่เป็นโลหะมักจะไม่ละลายน้ำ แต่จะอยู่ลักษณะรวมเป็นกลุ่มก้อน หรือในรูปของอนุภาคนาโนที่ไม่ละลายน้ำ เมื่อซิลเวอร์นาโนปรากฏในน้ำจะแตกตัวเป็นไอออนของซิลเวอร์และเกิดการออกซิเดชันที่ผิว ซึ่งจะทำได้ไอออนของโลหะที่ถูกออกซิเดชันในรูปของ Ag^+ ที่ล้อมรอบด้วยนาโนซิลเวอร์ที่ยังอยู่ในรูปโลหะหรืออนุภาคนาโนอยู่ในน้ำ อนุภาคนาโนซิลเวอร์เมื่อปรากฏในน้ำจึงจะให้ไอออนของซิลเวอร์ด้วย ซึ่งในการพิจารณาถึงเคมีของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ จึงต้องครอบคลุมถึงไอออนของซิลเวอร์ร่วมด้วย

คุณสมบัติการฆ่าเชื้อโรค

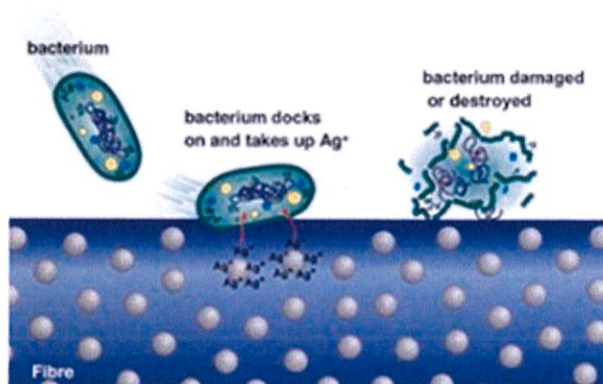
ซิลเวอร์นาโนเป็นสารที่ฆ่าเชื้อโรคได้ในวงกว้างทั้งในส่วนจุลินทรีย์ที่เป็นแกรมบวกและแกรมลบ โดยตัวอย่างของจุลินทรีย์แกรมลบได้แก่ *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* และ *Vibrio acinetobacter* และตัวอย่างของจุลินทรีย์แกรมบวกได้แก่ *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus* และ *Streptococcus* ขนาดของซิลเวอร์นาโนที่มีขนาดเล็กมากทำให้อัตราส่วนของพื้นที่ต่อปริมาตรสูง ทำให้สามารถฆ่าจุลินทรีย์ได้ดี แม้ว่าจุลินทรีย์จะมีในปริมาณน้อยมากๆ นอกจากนี้รูปร่างของซิลเวอร์ที่แตกต่างกัน เช่น ทรงกลมแท่ง หรือแผ่นสามเหลี่ยม ทำให้เกิดการกำจัดจุลินทรีย์แกรมลบได้แตกต่างกันอีกด้วย โดยซิลเวอร์นาโนที่มีรูปร่างแผ่นสามเหลี่ยมสามารถกำจัดจุลินทรีย์ได้มีประสิทธิภาพมากที่สุด เนื่องจากกระบวนการบนพื้นผิวบริเวณที่มีการจัดเรียงตัวที่ทำให้มีความหนาแน่นของอะตอมซิลเวอร์สูงสุด เช่น การเรียงตัว {111} เป็นต้น ในขณะที่ซิลเวอร์นาโนทรงกลมจะมีลักษณะเป็น {100} โดยมีส่วนน้อยที่เป็น {111} ส่วนซิลเวอร์นาโนแบบแท่งจะมีด้านของเป็น {100} และมีส่วนด้านปลายเท่านั้นที่เป็น {111} (Wijnhoven et al.,2009, Wiley et al. 2005)



รูปที่ 2.21 ลักษณะโครงสร้างของผลึกของอนุภาคนาโนซิลเวอร์
ที่มา : <http://web.eng.nu.ac.th/eng2012/ceri/nanodatabase>
(วันที่สืบค้น 2 กรกฎาคม 2561)

กลไกการทำงานของอนุภาคซิลเวอร์นาโน

เริ่มต้นที่ซิลเวอร์นาโนถูกออกซิไดซ์ด้วยออกซิเจน (O_2) ที่ผิวสัมผัสของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย แล้วเกิดปฏิกิริยากับโปรตีน จนทำให้ซิลเวอร์นาโน แตกตัวเป็นซิลเวอร์ไอออน (Ag^+) กระบวนการเกิดปฏิกิริยาของซิลเวอร์นาโนกับโปรตีน จนได้เป็นซิลเวอร์ไอออน (Ag^+) ต่อจากนั้น ซิลเวอร์ไอออน (Ag^+) จะแพร่ผ่านไปสู่ชั้นในของเซลล์แบคทีเรีย ทำให้การทำงานของไมโทคอนเดรีย ผิดปกติหรือเซลล์ถูกทำลาย จนก่อให้เกิดสารอนุมูลอิสระชนิด ROS ในปริมาณที่มากขึ้น แล้วส่งผลต่อมากับระบบการหายใจของเซลล์ และการสร้างพลังงานเอทีพี (ATP) จนนำไปสู่การทำลายโปรตีน และดีเอ็นเอ (DNA) ภายในเซลล์ ทำให้แบคทีเรียถูกทำลาย และตายในที่สุด

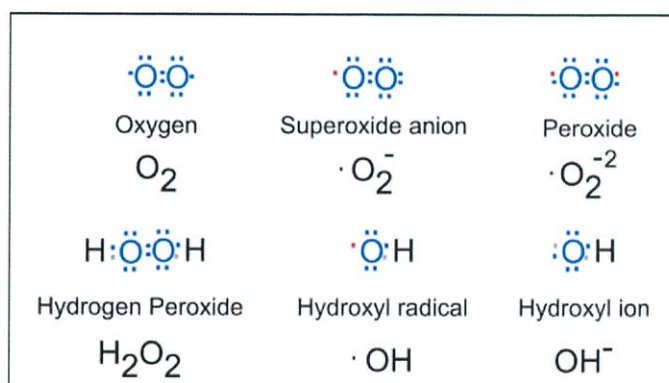


รูปที่ 2.22 กลไกการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิลเวอร์

ที่มา : <http://www.vali-tech.net/home/article-read.php?ArticleId=9>

(วันที่สืบค้น 2 กรกฎาคม 2561)

2.8.4 Reactive oxygen species (ROS)



รูปที่ 2.23 Reactive oxygen species

ที่มา : <http://biochem.md.chula.ac.th/CHD/lesson/main07.html>

(วันที่สืบค้น 2 กรกฎาคม 2561)

Reactive oxygen species (ROS) เป็นกลุ่มสารที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี ทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) กับโมเลกุลต่างๆ ภายในเซลล์ร่างกาย ROS หมายความรวมถึงสารประกอบเปอร์ออกไซด์ (peroxides) เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) และสารอนุมูลอิสระซึ่งเป็นโมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอก ชนิดที่สำคัญคืออนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Superoxide anion) และอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical) เมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นจะเกิดการทำลายโมเลกุลอื่นๆ ต่อเนื่องกันเป็นลูกโซ่ส่งผลให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อร่างกายเป็นสาเหตุของการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ เช่น โรคหัวใจขาดเลือด ต้อกระจก ความดันโลหิตสูง อัลไซเมอร์ เบาหวาน มะเร็ง เป็นต้น ปกติภายในร่างกายของเรามีกลไกป้องกันการโจมตีจากอนุมูลอิสระโดยอาศัยการทำงานของสารหรือเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นในร่างกาย เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส Superoxide dismutase)

คะตาเลส Catalase) กลูตาไทโอนเพอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase) เป็นต้น แต่การทำหน้าที่ของสารหรือเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระนั้นยังไม่เพียงพอและมีขีดจำกัด ประกอบกับเมื่ออายุมากขึ้นร่างกายสร้างสารหรือเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระได้น้อยลง ดังนั้นร่างกายจึงควรรับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกด้วยเช่นกัน ในปัจจุบันผู้รักสุขภาพจำนวนมากนิยมบริโภคสารต้านอนุมูลอิสระทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมประเภทสารต้านอนุมูลอิสระมีหลากหลายและเป็นที่ต้องการของตลาด สารต้านอนุมูลอิสระหรือสารแอนติออกซิแดนท์ (Antioxidants) ที่เรารู้จักกันดี ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี วิตามินเอ ลูทีน Lutein) และพฤกษเคมีต่างๆ (Phytochemical) เช่น โพลีฟีนอล (Polyphenols) ไอโซฟลาโวน (Isoflavone) เบต้าแคโรทีน (β -carotene) คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) แคโรทีนอยด์ (Carotenoids) เป็นต้น สามารถพบสารเหล่านี้ได้จากพืช ผัก และผลไม้ ที่มีอยู่ตามธรรมชาติหรืออาจพบได้ในสาหร่ายและยีสต์ เช่น สารแอสตาแซนธิน แต่การที่จะรับประทานพืชหรือผักเหล่านี้ในปริมาณมากคงเป็นไปได้ยากจึงต้องทำการสกัด

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

R. T. Pace K. J. L. Burg และคณะ (2005) ได้ทำการทดสอบสรีรศาสตร์ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การเจริญของเซลล์ ชื่อทางการค้า คือ alamarBlue โดยทั่วไปถือได้ว่าเป็นสารปลอดภัยเมื่อใช้ตามข้อกำหนดของผู้ผลิตที่แนะนำ ในบ่มเซลล์ระยะเวลานาน มักเกิดปัญหา จึงมีการนำสรีรศาสตร์มาใช้ เนื่องจากไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ โดยมีใช้สรีรศาสตร์ในปริมาณที่ต่างกัน คือ 4 และ 8 วัน ร่วมกับเซลล์ MCF7, 3T3-L1 และ D1 เซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วันร่วมกับ alamarBlue (%) 5% มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะระดับของกิจกรรมการเผาผลาญ ความเข้มข้น deoxyribonucleic acid (DNA) และการบริโภคกลูโคสของเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วันในอาหารที่มี alamarBlue (®) 20% มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากกิจกรรมการเผาผลาญความเข้มข้นของดีเอ็นเอและ การบริโภคกลูโคสของเซลล์ MCF7 ที่เลี้ยงนาน 8 วันโดยไม่มี alamarBlue (®) MCF7, 3T3-L1 และ D1 เซลล์ใช้น้ำตาลกลูโคสน้อยลงที่ระดับความเข้มข้นต่ำถึง 5% ข้อมูลยังชี้ให้เห็นว่าผลกระทบที่เป็นพิษจะเด่นชัดมากขึ้นในเซลล์มะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง

ดร.เอื้อมเดือน ประวาท (2008) ศึกษาการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงมักทำการประเมินด้วยการวัดความสามารถในการเมแทบอลิซึมของเซลล์โดยการเปลี่ยนสารเคมีเป็นสีที่สามารถตรวจวัดได้อย่างสะดวกโดยเครื่องอ่านแพลท อย่างไรก็ตามมักมีรายงานกล่าวถึงความไม่เท่าเทียมกันของการประเมินผลระหว่างวิธีการวัดเมแทบอลิซึมของเซลล์กับการสังเกตโดยตรงจากกล้องจุลทรรศน์ ทำให้ความเป็นห่วงถึงความถูกต้องของผลการอ่านจากการอ่านสีโดยวิธีต่างๆ การวิเคราะห์ด้วยสรีรศาสตร์ซึ่งจัดเป็นการวัดสีจากเมแทบอลิซึมของเซลล์เช่นเดียวกับวิธีอื่นเช่น tetrazolium MTT ได้นำมา

ศึกษาเปรียบเทียบโดยวัดการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100 ที่ได้รับยาเคมีบำบัด gemcitabine โดยการวัดย้อมเซลล์ด้วยฟลูออเรสเซนต์และนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กับวิธีสีรีซาซูรินการศึกษาพบว่าจำนวนเซลล์ ชนิดของน้ำยาทำปฏิกิริยา และเวลาของปฏิกิริยาของสีรีซาซูรินมีผลต่อความแม่นยำของการวิเคราะห์ เมื่อได้ปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์ ทั้งสองวิธีมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน ดังนั้น วิธีรีซาซูรินจึงเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และมีความไวสูง และสามารถใช้เพื่อทดสอบความไวหรือการตอบสนองต่อยาต้านมะเร็งของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

สุชีวัน กรอบทอง และคณะ (2013) ศึกษาซิงก์ออกไซด์เตตระ (ZnO tetrapods) ถูกเตรียมด้วยเทคนิคออกซิเดชันด้วยความร้อนภายใต้ความดันบรรยากาศ ให้มีโครงสร้างในระดับจุลภาคเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวต่อปริมาตรซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ตื้นขึ้นจากนั้นนำไปผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Nutrient broth ; NB) ด้วยความเข้มข้น 1,000 – 500,000 ppm และนำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปเชื้อเชื้อแบคทีเรียอีโคไล (*Escherichia coli*) ภายใต้อุณหภูมิ 37 °c เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการศึกษการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอีโคไลทำได้ด้วยการวัดความขุ่น (optical density : OD) ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากการทดสอบพบว่าค่า OD จะลดลงแบบเชิงเส้นเมื่อความเข้มข้นของซิงก์ออกไซด์เตตระพอดมีค่าตั้งแต่ 1,000 – 50,000 ppm และจะลดลงอย่างรวดเร็วที่ความเข้มข้น 100,000 ppm และ 500,000 ppm ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอีโคไลลดลงทำให้สามารถสรุปได้ว่าซิงก์ออกไซด์เตตระพอดมีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอีโคไล

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สารที่ใช้ดำเนินงานวิจัย

สารตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์และอนุภาคนาโนซิลเวอร์ จากการสังเคราะห์โดยสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ซึ่งเป็นหน่วยงานของรัฐที่จัดตั้งขึ้นเพื่อศึกษาวิจัยและพัฒนาทางด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีเพื่อการพัฒนาประเทศไทย

3.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

Escherichia coli ATCC 8739

Staphylococcus aureus ATCC 6538P

3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 96-well plate
- 3.3.2 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)
- 3.3.3 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- 3.3.4 Micropipette
- 3.3.5 eppendorf tube
- 3.3.6 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
- 3.3.7 ตู้บ่ม UV
- 3.3.8 เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง
- 3.3.9 เครื่อง automatic spiral plater
- 3.3.10 ตู้เย็น
- 3.3.11 เครื่องเขย่าสาร (vortex)
- 3.3.12 ข้อนตักสาร
- 3.3.13 ถังมือ
- 3.3.14 เครื่องทำความสะอาดด้วยคลื่นความถี่สูง (ultrasonic cleaner)
- 3.3.15 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)
- 3.3.16 กระบอกลง
- 3.3.17 หลอดทดลอง
- 3.3.18 ปีกเกอร์
- 3.3.19 Erlenmeyer flask
- 3.3.20 ที่วางหลอดทดลอง (test tube rack)
- 3.3.21 ปิเปตดูดสารขนาด 10 มิลลิลิตร
- 3.3.22 เครื่องดูดสารอัตโนมัติ

- 3.3.23 ฟอยล์ (Foil)
- 3.3.24 Sterile Syringe Filter 0.20 μ m
- 3.3.25 ทิป (tip)

3.4 สารเคมี

- 3.4.1 อนุภาคนาโนซิลเวอร์
- 3.4.2 อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์
- 3.4.3 ซีรีชาซูริน
- 3.4.4 สารละลาย 99.98 % DMSO
- 3.4.5 โซเดียมคลอไรด์

3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.5.1 Trypticase Soy Agar
- 3.5.2 Trypticase Soy Broth
- 3.5.3 Mueller Hinton Broth

3.6 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.6.1 การเตรียมซีรีชาซูริน

ชั่งซีรีชาซูรินความเข้มข้น 0.25 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ใน Biosafety Cabinet ทำการ Sterile โดยใช้ Sterile Syringe Filter 0.20 ไมโครเมตร

3.6.2 ศึกษาความเข้มข้นซีรีชาซูรินและเวลาในการบ่มที่เหมาะสม

ทำการถ่ายเชื้อที่บ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใส่หลอดอาหาร MHB ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ความเข้มข้นเชื้อ 10^8 CFU/ml และเจือจางให้เป็น 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 CFU/ml ตามลำดับ นำสารละลายลง 96-well plate ทุกหลุมใส่อาหาร MHB ปริมาตร 90 ไมโครลิตร สารละลายเชื้อ 10 ไมโครลิตรและสารละลายซีรีชาซูรินแต่ละความเข้มข้น 10 ไมโครลิตร

3.6.3 ทดสอบความเป็นพิษของสารละลาย DMSO ต่อเชื้อแบคทีเรีย

ทำการถ่ายเชื้อที่บ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใส่หลอดอาหาร MHB ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงให้ได้ความเข้มข้นเชื้อ 10^8 CFU/ml เจือจางสารละลายเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml เตรียมสารละลาย DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 20% 15% 10% 5% 2.5% ตามลำดับ ใส่ DMSO แต่ละความเข้มข้นหลุมละ 90 ไมโครลิตร ใส่เชื้อหลุมละ 10 ไมโครลิตร บ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.6.4 การเตรียมอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์และซิลเวอร์

ซั่งตัวอย่างสารซิงก์ออกไซด์และซิลเวอร์อย่างละ 200 มิลลิกรัม นำสารไป sterile ด้วยการฉาย UV 15-20 นาที ละลายสารด้วย 5% DMSO ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำสารใส่ในเครื่อง Ultrasonic Cleaner เพื่อให้อนุภาคเกิดการกระจายตัว 15 นาที

3.6.5 การทดลองหาค่า MIC ของอนุภาคนาโนโดยใช้เชื้อ *E. coli* และ *S. aureus*

ทำการถ่ายเชื้อที่บ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใส่ลงในหลอดอาหาร MHB ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงให้ได้ความเข้มข้นเชื้อ 10^8 CFU/ml ทำการเจือจางสารละลายเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml โดยใช้อาหาร MHB ในการเจือจางเตรียม stock ของซิงก์ออกไซด์และซิลเวอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายสารด้วย 5% DMSO ใส่ในเครื่อง Ultrasonic Cleaner เพื่อให้อนุภาคเกิดการกระจายตัว 15 นาที ปรับความเข้มข้น ซิงก์ออกไซด์และซิลเวอร์จาก stock ให้ได้ 15 12 10 8 6 4 2 1 0.5 0.25 0.125 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ นำสารละลายซิงก์ออกไซด์และซิลเวอร์ลง 96-well plate หลุมละ 90 ไมโครลิตร และเชื้อหลุมละ 10 ไมโครลิตร นำเพลทซิลเวอร์บ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและเพลท ZnO บ่มในตู้ UV 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง นำเพลทซิลเวอร์และเพลทซิงก์ออกไซด์มาเติมสารละลายซีรีซาซูรินความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 10 ไมโครลิตร นำเพลทซิลเวอร์และเพลทซิงก์ออกไซด์มาบ่มต่อในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี

3.6.6 Spread plate นับจำนวนโคโลนี

เลือกความเข้มข้นของเพลทอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์และซิลเวอร์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของซีรีซาซูรินระหว่างชมพู-ม่วง ดูดสารละลายจากหลุม 50 ไมโครลิตรใส่หลอด eppendorf tube ทำการเจือจางสารละลายด้วย NaCl ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} – 10^{-6} นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นมา spread plate บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

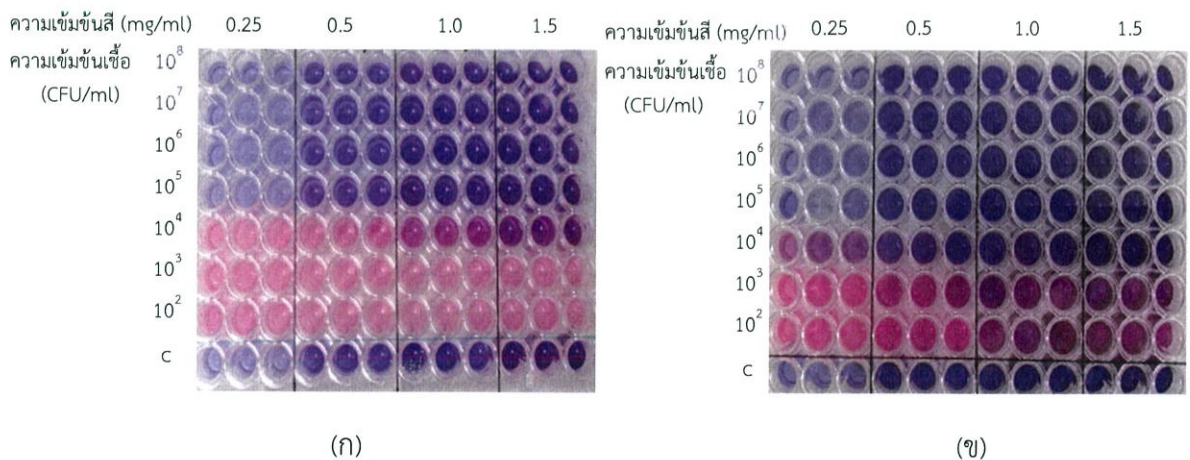
บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

จากการทดสอบหาค่า MIC ของอนุภาคนาโนโดยใช้สรีรชาซูรินเป็นตัวบ่งชี้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยทำการศึกษาคุณสมบัติของสี ความเข้มข้นสี ระยะเวลาการบ่มหลังเติมสี กลไกการยับยั้งเชื้อที่แตกต่างกันของสาร 2 ชนิด ศึกษาตัวทำละลายอนุภาคนาโน ศึกษาการใส่สรีรชาซูรินเทียบกับไม่ใส่สรีรชาซูรินและทดสอบหาค่า MIC ของอนุภาคนาโน เนื่องจากตัวสารมีความขุ่นมาก ไม่สามารถอ่านผลได้ว่าความเข้มข้นใดเป็น MIC จึงต้องใช้สรีรชาซูรินในการวิเคราะห์หาค่า MIC ซึ่งพบว่าสามารถใช้สรีรชาซูรินเป็นตัวบ่งชี้การเจริญของแบคทีเรียที่มีการทดสอบด้วยอนุภาคนาโนได้ แต่ยังไม่ชัดเจนในการบอกค่า MIC จึงต้องมีการนำไปวัดผลด้วยวิธีการ spread plate เพื่อหาปริมาณเชื้อที่เหลืออยู่ ได้ผลการทดลองดังนี้

4.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นสรีรชาซูรินที่เหมาะสมและเวลาในการบ่มที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนสีของสรีรชาซูริน

หลังจากการทดลองการทดสอบความเข้มข้นของสรีรชาซูรินเทียบกับความเข้มข้นเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* และระยะเวลาในการบ่มจะเห็นได้ว่าผลของสรีรชาซูรินจะเปลี่ยนจากม่วงเป็นสีม่วงอมชมพู และ สีชมพูของ resorufin ซึ่งที่ความเข้มข้นของสรีรชาซูริน 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของชั่วโมงที่ 3 สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีม่วง ม่วงอมชมพู และชมพูได้อย่างชัดเจน ซึ่งตรงกับหลักการการเปลี่ยนสีของน้ำยาริชาซูริน



รูปที่ 4.1 แสดงสีของริชาซูรินที่ความเข้มข้นต่างๆหลังจากเติมสี 3 ชั่วโมง

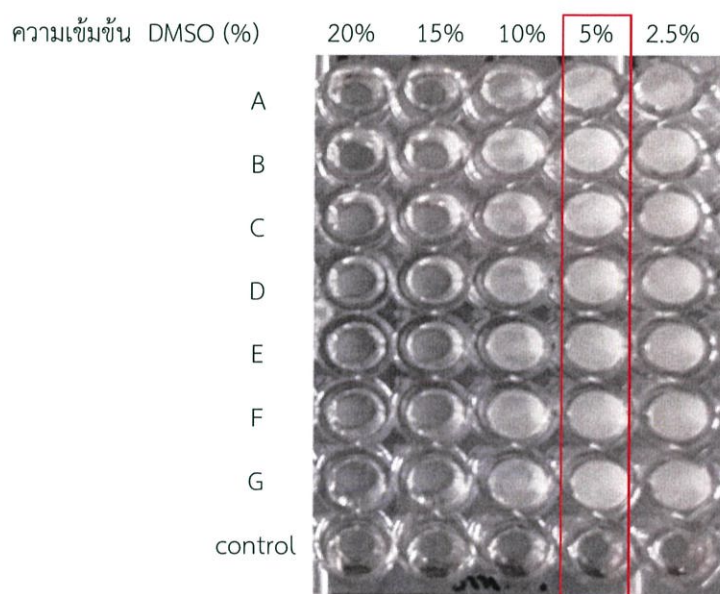
(ก) แสดงความเข้มข้นของเชื้อ *E. coli*

(ข) แสดงความเข้มข้นของเชื้อ *S. aureus*

c หมายถึง หลุมควบคุมของสรีรชาซูรินที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.2 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นตัวทำละลายอนุภาคนาโนที่ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ

หลังจากทำการศึกษาหาความเข้มข้นตัวทำละลายอนุภาคนาโนที่ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *E. coli* พบว่าที่ความเข้มข้น DMSO ที่ 20% 15% สารละลายมีลักษณะสีใส ที่ความเข้มข้น DMSO ที่ 10% 5% 2.5% สารละลายมีลักษณะสีขาวขุ่นแสดงว่าเชื้อมีการเจริญ จึงสรุปได้ว่าที่ความเข้มข้น DMSO ที่ 10% 5% 2.5% ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *E. coli* เพื่อยืนยันผลให้แน่ชัดว่า DMSO ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจึงนำเชื้อที่ทดสอบทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร จะเห็นว่าที่การละลายอนุภาคนาโนที่ความเข้มข้น DMSO 5% เชื้อสามารถเจริญได้ดีจึงนำความเข้มข้นนี้มาใช้ในการทดลอง



รูปที่ 4.2 แสดงผลของ DMSO แต่ละความเข้มข้นต่อการเจริญของเชื้อ

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงค่าการวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของ DMSO แต่ละความเข้มข้นต่อการเจริญของเชื้อ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

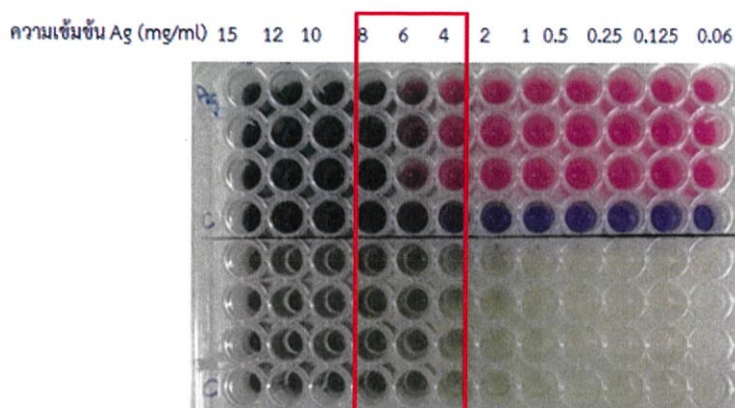
ความเข้มข้น [DMSO]	ละลาย DMSO ด้วยอาหาร MHB				
	20%	15%	10%	5%	2.5%
A	0.081	0.057	0.491	0.891	0.738
B	0.087	0.053	0.495	0.852	0.787
C	0.085	0.054	0.461	0.856	0.768
D	0.075	0.050	0.462	0.862	0.764
E	0.078	0.058	0.476	0.875	0.789
F	0.089	0.050	0.493	0.863	0.743
G	0.084	0.046	0.490	0.865	0.787
control	0.051	0.065	0.058	0.072	0.094

จากผลการวัดค่าดูดกลืนแสง (OD) ของ DMSO แต่ละความเข้มข้นต่อการเจริญของเชื้อ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในตารางที่ 4.1 DMSO ที่ความเข้มข้น 5% เชื้อมีการเจริญได้ดีกว่า 2.5% และ 10% จึงเลือกความเข้มข้นนี้ใช้ในการทดลอง

4.3 ผลการเปรียบเทียบความเป็นไปได้ของขั้นตอนที่พัฒนาขึ้นโดยเทียบผลจากการใส่สรีรชาซูรินและไม่ใส่สรีรชาซูริน

จากการทดลองการใช้สรีรชาซูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *S. aureus* ที่บ่มในตู้ incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *S. aureus* โดยความเข้มข้นอนุภาคนาโนที่ใช้คือ 15 12 10 8 6 4 2 1 0.5 0.25 0.125 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่บ่มในตู้ UV อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความชื้น 95% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลดังนี้


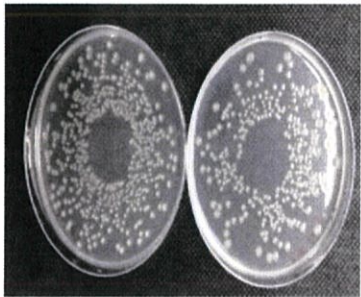

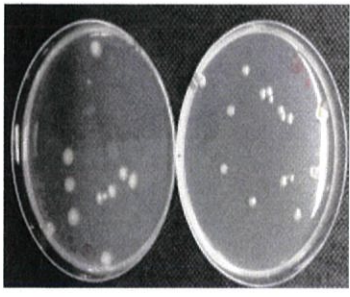
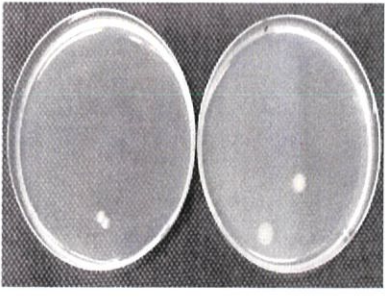
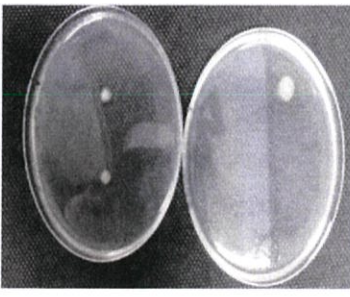
4.3.1 ผลการหาค่า MIC ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ *E. coli*



รูปที่ 4.3 แสดงการใช้สรีรชาซูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ และช่วงความเข้มข้นที่มีการเปลี่ยนสีของอนุภาคนาโนซิลเวอร์

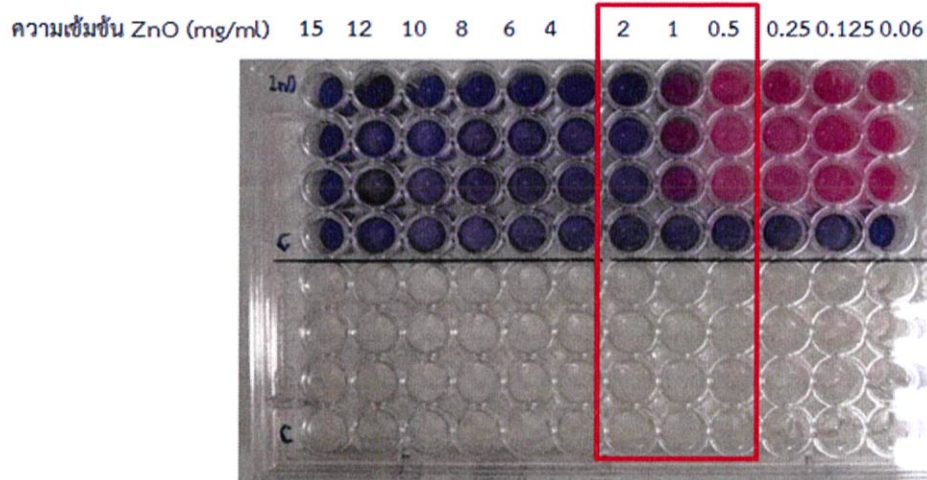
จากการทดลองการใช้สรีรชาซูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ *E. coli* ที่บ่มในตู้ incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะเห็นได้ว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเปลี่ยนแปลงของสีของสรีรชาซูรินเป็นสีชมพู อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเปลี่ยนแปลงของสีของสรีรชาซูรินเป็นสีชมพูอมม่วง อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเปลี่ยนแปลงของสีของสรีรชาซูรินเป็นสีม่วง จากการใช้สรีรชาซูรินในการหาความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ *E. coli* เนื่องจากสารละลายมีความขุ่นไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าความเข้มข้นใดเป็น MIC จึงต้องนำไป Spread plate เพื่อยืนยันผลโดยเลือกช่วงความเข้มข้นที่มีการเปลี่ยนสี สีชมพู-ม่วง

ตารางที่ 4.2 ตารางเปรียบเทียบผลการนับโคโลนี (CFU/ml) ทดลองการใช้สีและไม่ใช้สีรีซาซูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ *E. coli*

ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ผลการนับโคโลนี (CFU/ml)	
	ใส่สี	ไม่ใส่สี
4	 $2.09 \pm 0.04 \times 10^7$	 $2.24 \pm 0.04 \times 10^7$
6	 $0.17 \pm 0.01 \times 10^3$	 $0.12 \pm 0.01 \times 10^3$
8	 น้อยกว่า 100	 น้อยกว่า 100

จากตารางเปรียบเทียบผลการนับโคโลนี (CFU/ml) ทดลองการใช้สีและไม่ใช้สีรีซาซูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ *E. coli* พบว่าการใช้สีรีซาซูรินและไม่ใช้สีรีซาซูรินให้ผลไม่ต่างกันและสามารถระบุค่า MIC ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ *E. coli* อยู่ที่ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเนื่องจากเชื้อเจริญลดลงจาก 10^7 เป็น 10^3 CFU/ml

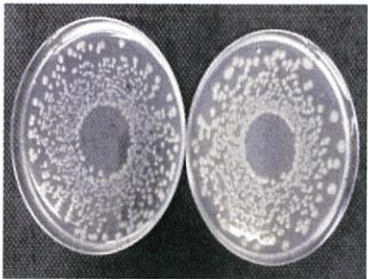
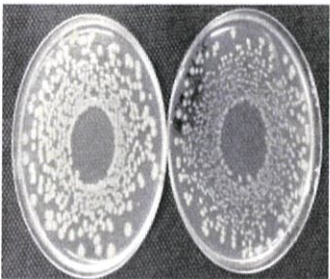
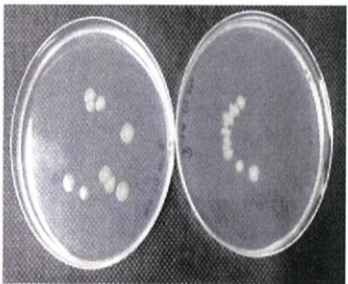

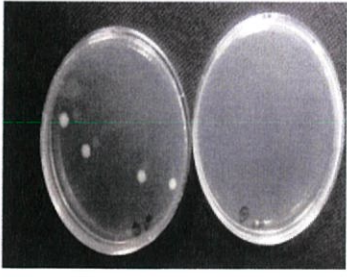
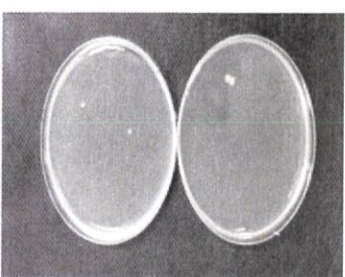
4.3.2 ผลการหาค่า MIC ของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ *E. coli*



รูปที่ 4.4 แสดงการใช้สีรีซาชูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์และช่วงความเข้มข้นที่มีการเปลี่ยนสีรีซาชูรินของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์

จากการทดลองการใช้สีรีซาชูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ *E. coli* ที่บ่มในตู้ UV อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความชื้น 95% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเปลี่ยนแปลงของสีรีซาชูรินเป็นสีชมพู อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเปลี่ยนแปลงของสีรีซาชูรินเป็นสีชมพูอมม่วง อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเปลี่ยนแปลงของสีรีซาชูรินเป็นสีม่วง จากการใช้สีรีซาชูรินในการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ *E. coli* เนื่องจากสารละลายมีความขุ่นไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าที่ความเข้มข้นใดเป็นค่า MIC จึงต้องนำไป Spread plate เพื่อยืนยันผลโดยเลือกช่วงความเข้มข้นที่มีการเปลี่ยนสีชมพู-ม่วง

ตารางที่ 4.3 ตารางเปรียบเทียบผลการนับโคโลนี (CFU/ml) ทดลองการใช้สีและไม่ใช้สีรีซาซูริน เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ *E. coli*

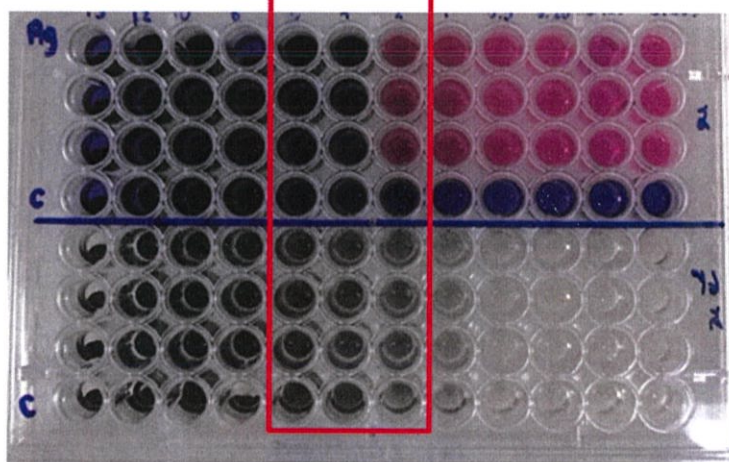
ความเข้มข้นของ อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ผลการนับโคโลนี (CFU/ml)	
	ใส่สี	ไม่ใส่สี
0.5	 $1.60 \pm 0.09 \times 10^7$	 $1.30 \pm 0.16 \times 10^7$
1	 $2.70 \pm 0.20 \times 10^3$	 $1.67 \pm 0.25 \times 10^3$
2	 น้อยกว่า 100	 น้อยกว่า 100

จากตารางเปรียบเทียบผลการนับโคโลนี (CFU/ml) ทดลองการใช้สีและไม่ใช้สีรีซาซูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ *E. coli* พบว่าการใช้สีรีซาซูรินและไม่ใช้สีรีซาซูรินให้ผลไม่ต่างกันและสามารถระบุค่า MIC ของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ *E. coli* อยู่ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเนื่องจากเชื้อเจริญลดลงจาก 10^7 เป็น 10^3 CFU/ml

จากผลการเปรียบเทียบทดลองการใช้สรีรชาซูรินเทียบกับการไม่ใช้สรีรชาซูรินเพื่อทดสอบความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิลเวอร์และอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์พบว่าผลการนับโคโลนีในการใช้สรีรชาซูรินและไม่ใช้สรีรชาซูรินให้ผลไม่แตกต่างกัน ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์และอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* (แบคทีเรียแกรมลบ) ทำให้จำนวนโคโลนีลดลงจาก 10^7 เป็น 10^3 CFU/ml อยู่ที่ 6 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จะเห็นว่าอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* มากกว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ เนื่องจากใช้ความเข้มข้นต่ำสุดใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ต่ำกว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์

4.3.3 ผลการหาค่า MIC ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ *S. aureus*

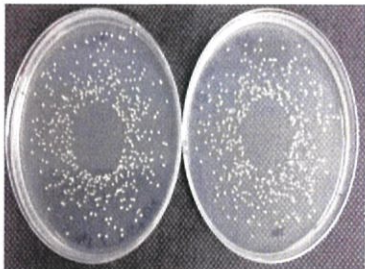
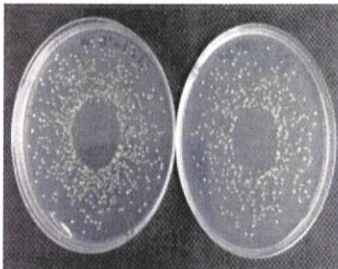
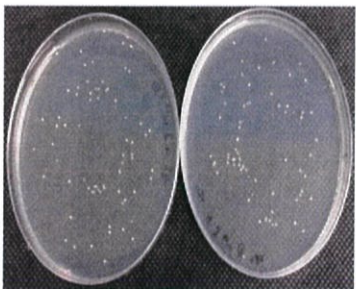
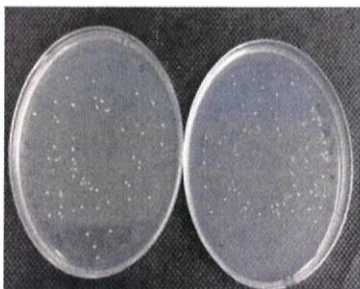
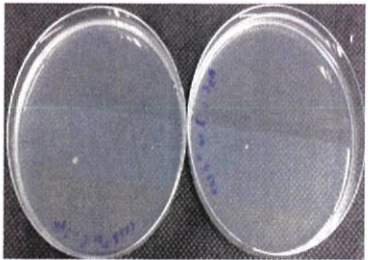
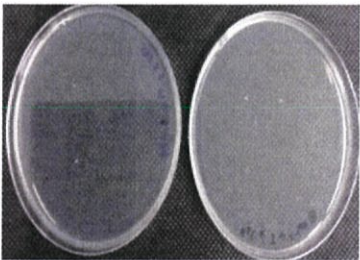
ความเข้มข้น Ag (mg/ml) 15 12 10 8 6 4 2 1 0.5 0.25 0.125 0.06



รูปที่ 4.5 แสดงการใช้สรีรชาซูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์และช่วงความเข้มข้นที่มีการเปลี่ยนสีรชาซูรินของอนุภาคนาโนซิลเวอร์

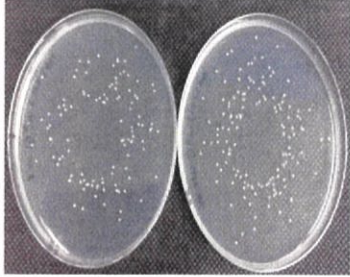
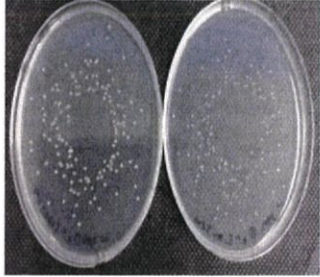
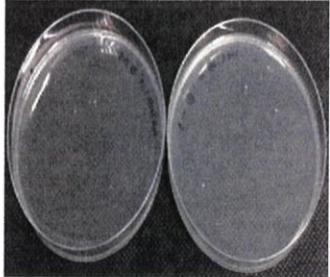
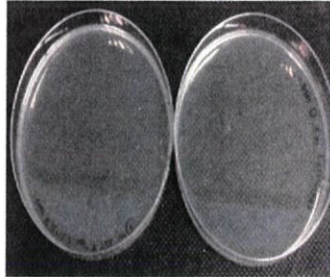
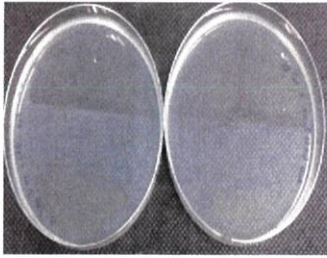
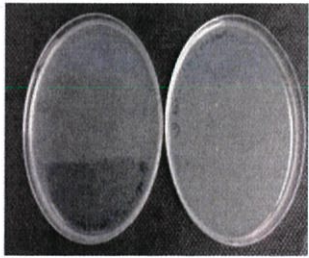
จากการทดลองการใช้สรีรชาซูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ ต่อเชื้อ *S. aureus* ที่บ่มในตู้ incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่า อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเปลี่ยนแปลงของสีรชาซูรินเป็นสีชมพู อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้น 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเปลี่ยนแปลงของสีรชาซูรินเป็นสีม่วง จากการใช้สรีรชาซูรินในการหาความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ *S. aureus* เนื่องจากสารละลายมีความขุ่นไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าความเข้มข้นใดเป็น MIC จึงต้องนำไป Spread plate เพื่อยืนยันผลโดยเลือกช่วงความเข้มข้นที่มีการเปลี่ยนสีชมพู-ม่วง

ตารางที่ 4.4 ตารางเปรียบเทียบผลการนับโคโลนี (CFU/ml) ทดลองการใช้สีและไม่ใช้สีรีซาชูริน เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ *S. aureus*

ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ใส่สี	ไม่ใส่สี
2	 $3.14 \pm 0.12 \times 10^7$	 $3.29 \pm 0.08 \times 10^7$
4	 $2.72 \pm 0.05 \times 10^3$	 $2.92 \pm 0.03 \times 10^3$
6	 น้อยกว่า 100	 น้อยกว่า 100

จากตารางเปรียบเทียบผลการนับโคโลนี (CFU/ml) ทดลองการใช้สีและไม่ใช้สีรีซาชูริน เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ *S. aureus* พบว่าใช้สีรีซาชูรินและไม่ใช้สีรีซาชูรินให้ผลไม่ต่างกันและสามารถระบุค่า MIC ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ *S. aureus* อยู่ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเนื่องจากเชื้อเจริญลดลงจาก 10^7 เป็น 10^3 CFU/ml

ตารางที่ 4.5 ตารางเปรียบเทียบผลการนับโคโลนี (CFU/ml) ทดลองการใช้และไม่ใช้สรีรียาซุริน เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ *S. aureus*

ความเข้มข้นของ อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ผลการนับโคโลนี (CFU/ml)	
	ใส่	ไม่ใส่
0.06	 $2.38 \pm 0.15 \times 10^7$	 $2.00 \pm 0.39 \times 10^7$
0.125	 $1.53 \pm 0.12 \times 10^2$	 $1.89 \pm 0.06 \times 10^2$
0.25	 น้อยกว่า 100	 น้อยกว่า 100

จากตารางเปรียบเทียบผลการนับโคโลนี (CFU/ml) ทดลองการใช้และไม่ใช้สรีรียาซุรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ *S. aureus* พบว่าการใช้สรีรียาซุรินและไม่ใช้สรีรียาซุรินให้ผลไม่ต่างกันและสามารถระบุค่า MIC ของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ *S. aureus* อยู่ที่ความเข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเนื่องจากเชื้อเจริญลดลงจาก 10^7 เป็น 10^2 CFU/ml

จากผลการเปรียบเทียบทดลองการใช้สี่เรซาซูรินเทียบกับการไม่ใช้สี่เรซาซูรินเพื่อทดสอบความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิลเวอร์และอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์พบว่าผลการยับยั้งเชื้อในการใช้สี่เรซาซูรินและไม่ใช้สี่เรซาซูรินให้ผลไม่แตกต่างกัน ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์และอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* (แบคทีเรียแกรมลบ) ทำให้จำนวนโคโลนีลดลงจาก 10^7 เป็น 10^3 และ 10^2 CFU/ml อยู่ที่ 4 และ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จะเห็นว่าอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มากกว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ เนื่องจากใช้ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์

ในการทดลองหาค่า MIC ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์และอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์เมื่อทดลองกับเชื้อ *E. coli* มีค่า MIC เท่ากับ อนุภาคนาโนซิลเวอร์กับเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *S. aureus* พบว่ามีค่า MIC ที่ความเข้มข้น 6 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเมื่อทดสอบด้วยอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ที่ทดสอบกับเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *S. aureus* มีค่า MIC ที่ความเข้มข้น 1 และ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เห็นได้ว่าอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ และแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) มีความต้านทานต่ออนุภาคนาโนทั้ง 2 ชนิด มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* เนื่องจากต้องใช้ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกเพราะแบคทีเรียแกรมบวกมักอ่อนแอไม่ทนต่อยาหรืออนุภาคต่างๆ เพราะไม่มีชั้นไขมัน Lipopolysaccharides จึงทำลายได้ง่าย แต่แบคทีเรียแกรมลบทำลายได้ยากเนื่องจากกระบวนการต่างๆไม่สามารถผ่านเข้าไปง่ายเพราะผนังเซลล์มีส่วนประกอบของ Lipopolysaccharides ทางเดียวที่อนุภาคจะผ่านเข้าสู่เซลล์ได้คือ ทางโปรตีนขนสั้น หรือ โปรตีนขนส่ง พอรินส์ (Porins) ที่คัดเลือกเฉพาะสารที่เป็นประโยชน์ต่อเซลล์เข้าไปได้ ดังนั้นอนุภาคนาโนจึงเข้าไปทำลาย แบคทีเรีย แกรมลบได้ยากแบคทีเรียแกรมลบจึงพบว่ามีกรดดีออกซอนิกมากขึ้นเรื่อยๆ (Nature 2017) และการฆ่าเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *S. aureus* ภายใต้อสงยูวีกับอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์มีแนวโน้มเดียวกันกับปฏิกิริยาโฟโตคะตะลิสต์ คือ เมื่อเวลาการได้รับแสงยูวีมากขึ้นส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การตายของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 เพิ่มขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาโฟโตคะตะลิสต์ส่งผลต่อระบบเมตาบอลิซึมและกระบวนการหายใจของเซลล์ทำให้ตายในที่สุด (Bhadra et.al, 2010)

จากการทดลองหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) เมื่อทดสอบด้วยอนุภาคนาโนซิลเวอร์กับเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *S. aureus* พบว่ามีค่า MIC ที่ความเข้มข้น 6 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเมื่อทดสอบด้วยอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ที่ทดสอบกับเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *S. aureus* มีค่า MIC ที่ความเข้มข้น 1 และ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยให้ผลสอดคล้องกับผลการทดลองของ Mami-Karvani and Chehrizi (2011) ที่ทดสอบอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์กับเชื้อ กับ *E. coli* และเชื้อ *S. aureus* ได้ค่า MIC เท่ากับ 1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และยังสอดคล้องกับของ Besinis et al. ,2014 มีการทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนซิงก์

ออกไซด์ ซิลเวอร์ และคอปเปอร์ กับแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *Salmonella* และ *Campylobacter* จากได้จากสัตว์ปีกในโรงงานอุตสาหกรรมพบว่าอนุภาคซิงก์ออกไซด์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อมากที่สุด รองลงมาคือคอปเปอร์ และอนุภาคนาโนซิลเวอร์ ตามลำดับ อนุภาคนาโน ซิงก์ออกไซด์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* มากกว่าอนุภาค นาโนซิลเวอร์ ซึ่งเป็นผลมาจากการกระตุ้นด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตช่วยให้การทำงานของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากยิ่งขึ้น (Azam *et al.*, 2012) แต่ให้ผลตรงข้ามกับการทดลองของ Manish Kumar Sigh และคณะ (2014) ที่ทดสอบอนุภาคนาโนซิลเวอร์กับเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *S. aureus* ได้ค่า MIC เท่ากับ 5.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร

กลไกการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์และอนุภาคนาโนซิลเวอร์ โดยอนุภาคทั้ง 2 ชนิดนี้มีกลไกการยับยั้งเชื้อที่แตกต่างกันซึ่งซิงก์ออกไซด์จะสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพจะต้องใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตในการกระตุ้นการทำงานและใช้หลักการโฟโตคะตะลิสต์ (Photocatalytic) พบว่า hydrogen peroxide จะผ่านเข้าไปในผนังเซลล์ ในขณะที่เกิดปฏิกิริยาของอนุภาคซิลเวอร์นาโนจะทำปฏิกิริยากับโปรตีนในเซลล์จนได้เป็นซิลเวอร์ไอออน (Ag^+) และแพร่ผ่านไปสู่ชั้นในของเซลล์แบคทีเรีย ทำให้การทำงานของไมโทคอนเดรียผิดปกติหรือเซลล์ถูกทำลาย แต่อนุภาคนาโนทั้ง 2 ชนิดนี้มีคุณสมบัติที่เหมือนกัน คือ สามารถสร้างอนุมูลอิสระ ROS (Reactive oxygen species) เช่น อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical) อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (Superoxide anion) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) การผลิตสารเหล่านี้ทำให้เกิดความผิดปกติกับเมมเบรนและไมโทคอนเดรีย และทำให้เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอ เป็นสาเหตุให้เซลล์แบคทีเรียตายในที่สุด

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดสอบหาค่า MIC อนุภาคนาโน 2 ชนิด ได้แก่ อนุภาคนาโนซิลเวอร์และอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์กับเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *E. coli* และ *S. aureus* โดยใช้สรีรชาซูรินเป็นตัวบ่งชี้การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยทำการศึกษาความเข้มข้นสรีรชาซูรินและระยะเวลาการบ่มหลังเติมสี พบว่า ความเข้มข้นของสรีรชาซูรินและเวลาในการบ่มที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงของสรีรชาซูรินคือ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และเมื่อศึกษาหาความเข้มข้นตัวทำละลาย DMSO ที่มีผลต่ออนุภาคนาโนทั้ง 2 ชนิด และไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าที่ความเข้มข้น 5% ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อทั้ง *E. coli* และ *S. aureus* และเป็นความเข้มข้นที่อนุภาคนาโนทั้ง 2 ชนิดละลายได้ดีที่สุด

และเมื่อทำการทดสอบหาค่า MIC ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์และอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์พบว่าตัวสารมีความขุ่นมากไม่สามารถอ่านผลความเข้มข้นต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ จึงพัฒนาขั้นตอนความเป็นไปได้ของการใช้สรีรชาซูรินร่วมกับอนุภาคนาโนทั้ง 2 ชนิด ในการวิเคราะห์หาค่า MIC ขึ้น โดยขั้นตอนแรกทำการเปรียบเทียบผลของการใส่สรีรชาซูรินและไม่ใส่สรีรชาซูรินต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด มีค่า MIC และมีการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่เนื่องจากอนุภาคนาโนทั้ง 2 ชนิดมีความขุ่นทำให้ไม่สามารถระบุค่า MIC ได้ จึงต้องยืนยันผลโดยการนำไป spread plate เพื่อหาปริมาณเชื้อที่เหลืออยู่ จากผลการทดลอง spread plate พบว่าค่า MIC ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ทดสอบกับเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *S. aureus* พบว่ามีค่า MIC ที่ความเข้มข้น 6 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเมื่อทดสอบด้วยอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ที่ทดสอบกับเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *S. aureus* มีค่า MIC ที่ความเข้มข้น 1 และ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่า ค่า MIC โดยอนุภาคนาโนซิลเวอร์และซิงก์ออกไซด์ ให้ผลเหมือนกันคือ แบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) มีความต้านทานมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus*) เพราะต้องใช้ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกมีก้อนแอมไทม์ต่ออนุภาคนาโนเพราะไม่มีชั้นไขมัน Lipopolysaccharides จึงทำลายได้ง่ายแต่แบคทีเรียแกรมลบทำลายได้ยากเพราะมีชั้น Lipopolysaccharides ทำให้การที่อนุภาคนาโนจะเข้าไปขัดขวาง กระบวนการต่างๆ ไม่สามารถผ่านเข้าไปง่าย

จากผลการทดลองทั้งหมดจึงสรุปได้ว่าสามารถใช้สรีรชาซูรินพัฒนาขั้นตอนเพื่อเป็นตัวบ่งชี้การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่มีการทดสอบด้วยอนุภาคนาโนทั้งอนุภาคนาโนซิลเวอร์และอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการทดลองนี้มีการประยุกต์ใช้สรีรชาซูรินกับอนุภาคนาโนสองชนิด คืออนุภาคนาโนซิลเวอร์ และอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ที่เป็นสารมีความชุ่ม สี และกลไกการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ต่างกัน โดยใช้เชื้อ *E. coli* เทียบกับ *S. aureus* พบว่าสามารถใช้สรีรชาซูรินเป็นตัวบ่งชี้การเจริญของแบคทีเรียที่มีการทดสอบด้วยอนุภาคนาโนได้ ดังนั้นจึงควรศึกษาทดลองกับอนุภาคนาโนชนิดอื่นๆ รวมถึงเชื้อชนิดอื่น เพื่อให้ทราบถึงปัจจัยต่างๆและกลไกการทำงานร่วมกับสารหรืออนุภาคอื่นๆ ที่ทำให้สรีรชาซูรินเกิดการเปลี่ยนแปลงซึ่งเป็นแนวทางในการพัฒนาเพื่อให้สามารถนำไปใช้งานอื่น

เอกสารอ้างอิง

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ ปรีชา สุวรรณพินิจ 2541 (1998) ลักษณะและโครงสร้างละเอียดของ
แบคทีเรีย จุลชีววิทยาทั่วไป พิมพ์ครั้งที่ 2 สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยหน้า 42 –
73

สุปราณี พิสมัย. 2558. ผลของสารนาโนซิงค์ออกไซด์ในการยับยั้งเชื้อราแป้งของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้.
รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์มหาวิทยาลัยราชภัฏ
เพชรบูรณ์.

A. Azam, A.S. Ahmed, M. Oves, M.S. Khan, S.S. Habib, A. MemicAntimicrobial activity of
metal oxide nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria:A
comparative study International Journal of Nanomedicine, 7 (2012), pp. 6003-
6009

A. Besinis, T. De Peralta, R.D. Handy The antibacterial effects of silver, titanium dioxide
and silica dioxide nanoparticles compared to the dental disinfectant
chlorhexidine on Streptococcus mutans using a suite of bioassays
Nanotoxicology, 8 (2014), pp. 1-16

African Journal of Microbiology Research Vol. 5(12), pp. 1368-1373, 18 June, 2011
Available online <http://www.academicjournals.org/ajmr> DOI:
10.5897/AJMR10.159 ISSN 1996-0808 ©2011 Academic Journals

Alessandra Polissit and Costa Georgopoulos Departement de Biochimie Medicale,
Cenfre Medical Universitaire, I rue Michel-Setvef, 121 1 Geneva 4, Switzerland.
Molecular Microbiology (1996) 20(6), 1221-1233

B. Ashe, A Detail investigation to observe the effect of zincoxide and Silver
nanoparticles in biological system, M.Sc. (RollNO-607bm004), National Institute
of Technology, 2011

Bhadra P. Bansal, Photocatalytic degradation of azo dye in aqueous TiO₂ suspension:
Reaction pathway and identification of intermediates products by LC/MS
Lab on a Chip 2011; 12: 3983–3990.

Bueno, C.; Villegas, M. L.; Bertolotti, S. G.; Previtali, C. M.; Neumann, M. G.; Encinas, M.
V. (2002). "The Excited-State Interaction of Resazurin and Resorufin with
Amines in Aqueous Solutions. Photophysics and Photochemical Reaction".

- Photochemistry and Photobiology. 76 (4): 385–90. doi:10.1562/0031-8655(2002)0760385TESIOR2.0.CO2. PMID 124051
- Chen, J. L., Steele, T. W., & Stuckey, D. C. (2015). Modeling and application of a rapid fluorescence-based assay for biotoxicity in anaerobic digestion. *Environmental science & technology*, 49(22), 13463
- Das P, Yang X-P, Ma LZ. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity. *Front Microbiol.* 2014;5:696.
- Jitendra Kumar Pandey & R. K. Swarnkar *Appl Biochem Biotechnol* (2014) 174:1021–1031 DOI 10.1007/s12010-014-0934-y Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis.* 2009;49:1749–1755. doi: 10.1086/647952
- Kim SH, No HK, Prinyawiwatkul W. Effect of molecular weight, type of chitosan, and chitosan solution pH on the shelf-life and quality of coated eggs. *J Food Sci.* 2007;72:S044–S048
- Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Možina SS. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J Microbiol Methods.* 2010;81:121–126. doi: 10.1016/j.mimet.2010.02.004.
- Kreft, Samo; Kreft, Marko (2009). "Quantification of dichromatism: A characteristic of color in transparent materials". *Journal of the Optical Society of America A.* 26 (7): 1576–81. Bibcode:2009JOSAA..26.1576K. doi:10.1364/JOSAA.26.001576. PMID 19568292.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2012) *Clinical and Laboratory Standards Institute "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing"; twenty-second informational supplement—11th edn. M100-S22. Standards, vol 32*
- Negative and Gram-Positive pathogens. *J Clin Microbiol.* 2010;48:3353–3357. doi: 10.1128/JCM.01432-10.2010
- Nature. 2017 Sep 7;549(7670):48-53. doi: 10.1038/nature23874. Epub 2017 Aug 30.
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2000;267:5421–5426. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x.

Pal, Y.K. Tak, J.M. Song, Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium

Pesch, K. L.; Simmert, U. (1929). "Combined assays for lactose and galactose by enzymatic reactions". *Milchw. Forsch.* 8: 551

Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R. Biosurfactants: potential applications in medicine. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:609–618. doi: 10.1093/jac/dkl024.

Sanchez JGB, Kouznetsov VV. Antimycobacterial susceptibility testing methods for natural products research. *Brazil J Microbiol.* 2010;41:270–277. doi: 10.1590/S1517-83822010000200001.

Singh CR, Kathiresan K, Anandhan S, Suganthi K. Antioxidant and antibacterial activity of field grown and tissue cultured root callus of mangrove species. *Eur J Med Plants.* 2014;4:723–742. doi: 10.9734/EJMP/2014/7340.

Weber A, May A, Zeiner T, Gorak A. Downstream processing of biosurfactants. *Chem Eng Trans.* 2012;27:115–120.

Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc.* 2008;3:163–175. doi: 10.1038/nprot.2007.521.

Yemoa A, Gbenou J, Affolabi D, Moudachirou M, Bigot A, Anagonou S, Portaels F, Quetin-Leclercq J, Martin A. Buruli ulcer: a review of in vitro tests to screen natural products for activity against *Mycobacterium ulcerans*. *Planta Med.* 2011;77:641–646. doi: 10.1055/s-0030-1250642

วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง. 2559. นาโนซิงค์ออกไซด์ลดโรคแคงเกอร์ในมะนาว. สืบค้นจาก: <http://www.nano.kmitl.ac.th/index.php>. [วันที่สืบค้น 30 สิงหาคม 2559]

พวงรัตน์ ขจิตวิษยานุกูลและคณะ, 2555 Reactive oxygen species.(ออนไลน์). สืบค้นจาก: <http://biochem.md.chula.ac.th/CHD/lesson/main07.html> [วันที่สืบค้น 2 กรกฎาคม 2561]

ผศ.ดร. มณิศรา พิริยวิรุตม์ 2556 กลไกการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิลเวอร์.(ออนไลน์). สืบค้นจาก:
<http://www.valitech.net/home/article-read.php?ArticleId=9>[วันที่สืบค้น 2 กรกฎาคม 2561]

ผศ.ดร. มณิศรา พิริยวิรุตม์ 2556 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนวิธี Dip coating process.(ออนไลน์).
สืบค้นจาก<http://hosting.umons.ac.be/php/lpsi/Dip> [วันที่สืบค้น 2 กรกฎาคม 2561]

ผศ.ดร. มณิศรา พิริยวิรุตม์ 2556 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนวิธี Electrodeposition process.
(ออนไลน์). สืบค้นจาก: <http://www.intechopen.com/books/electrodeposited-nanowires> [วันที่สืบค้น 2 กรกฎาคม 2561]

ผศ.ดร. มณิศรา พิริยวิรุตม์ 2556 ลักษณะโครงสร้างของผลึกของอนุภาคนาโนซิลเวอร์.(ออนไลน์).
สืบค้นจาก:<http://web.eng.nu.ac.th/eng2012/cei/nanodatabase>
[วันที่สืบค้น 2 กรกฎาคม 2561]

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร Tryptic Soy Agar (TSA)

Pancreatic Digest of Casein	15 g
Enzymatic Digest of Soybean Meal	5 g
Sodium Chloride	5 g
Agar	15 g
Distilled water	1000 ml
pH	7.3±0.2

ชั่ง TSA 40 กรัม ลงในน้ำ 1 ลิตร และเติมเกลือ NaCl 15 กรัม ต้มให้ละลาย แล้วใส่ในขวดนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหาร Tryptic Soy Broth (TSB)

Pancreatic Digest of Casein	15 g
Enzymatic Digest of Soybean Meal	5 g
Sodium Chloride	5 g
Distilled water	1000 ml
pH	7.3±0.2

ชั่ง TSB 30 กรัม ลงในน้ำ 1 ลิตร และเติมเกลือ NaCl 15 กรัม ต้มให้ละลาย แล้วใส่ในขวดนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหาร Mueller Hinton Broth (MHB)

Beef extract power	2 g
Acid Digest of Casein	17.5 g
Soluble starch	1.5 g
Distilled water	1000 ml
pH	7.3±0.1

ชั่ง MHB 21 กรัม ลงในน้ำ 1 ลิตร และเติมเกลือ NaCl 15 กรัม ต้มให้ละลาย แล้วใส่ในขวดนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

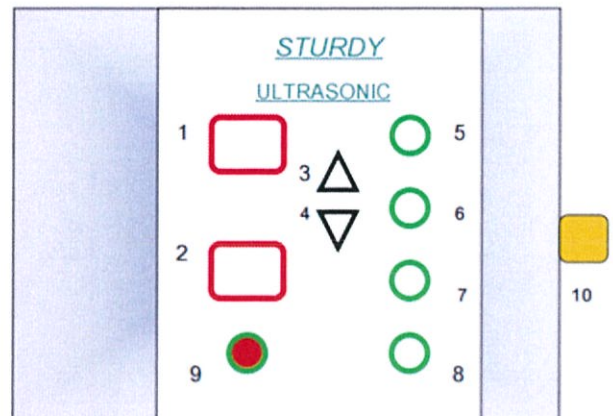
ภาคผนวก ข

การใช้เครื่องมือ

1. เครื่องทำความสะอาด (ULTRASONIC CLEANER)

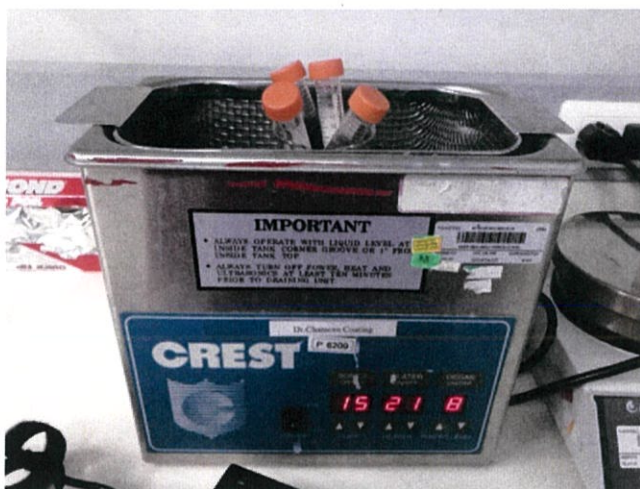
หลักการทำความสะอาดของเครื่องล้างระบบอัลตราโซนิก คือการยิงคลื่นเสียงผ่านของเหลว สร้างคลื่นขนาดเล็กไปกระทบเศษสกปรกให้หลุดออกและช่วยให้เกิดการกระจายตัวของอนุภาคหรือสารได้ดีโดยไม่ทำลายพื้นผิวของชิ้นงาน ซึ่งเป็นรูปแบบการล้างชิ้นงานที่ละเอียดที่สุดวิธีหนึ่ง รายละเอียดปุ่มต่างๆ

1. ช่องแสดงเวลาทำงาน
2. ช่องแสดงอุณหภูมิเวลาทำงาน
3. ปุ่มเลื่อนขึ้น
4. ปุ่มเลื่อนลง
5. ปุ่มสั่งเครื่องทำงาน และตั้งเวลา
6. ปุ่มสั่งกำหนดตั้งเวลาและตั้งอุณหภูมิ
7. ปุ่มสั่งเครื่องทำความร้อนและตั้งอุณหภูมิ
8. ปุ่มเปิด-ปิดเครื่อง
9. ปุ่มแสดงเครื่องทำความร้อน
10. วาล์วถ่ายน้ำทิ้ง



วิธีการทำงานต่างๆ

1. เติมน้ำกลั่นลงในแทงค์ (ไม่น้อยกว่าครึ่งแทงค์)
2. เสียบปลั๊กกดปุ่มเปิดเครื่อง 8.(Power on/off) , เครื่องจะแสดงเวลาและอุณหภูมิเท่าที่ทำงาน
3. ปรับตั้งเวลาและอุณหภูมิ โดยการกดปุ่ม 6. (Set) , ช่อง 1. และ 2. จะมีไฟกระพริบ
4. ปรับตั้งเวลา โดยกดปุ่ม 5. (Time/s) , แล้วกดปุ่ม 3 , 4 เพื่อปรับขึ้นหรือลง , แล้วกดปุ่ม 6. อีกครั้ง
5. ปรับตั้งอุณหภูมิโดยกดปุ่ม 7. (Temp/s) , แล้วกดปุ่ม 3 , 4 เพื่อปรับขึ้นหรือลง, แล้วกดปุ่ม 6. อีกครั้ง
6. เริ่มทำงานล้าง โดยกดปุ่ม 5. (เครื่องเริ่มทำงานโดยจะได้ยินเสียง)
7. เริ่มทำงานอุ่นน้ำโดยกดปุ่ม 7. (ปุ่ม 9. จะสว่างหากอุณหภูมิน้ำน้อยกว่าที่ตั้งไว้)
8. เครื่องจะแสดงเวลาในเหลือที่ช่อง 1. และแสดงอุณหภูมิน้ำในช่อง 2.
9. เมื่อเครื่องทำงานเสร็จ เครื่องจะแสดงเวลาและอุณหภูมิ ที่ตั้งไว้เริ่มต้น
10. หากต้องการทำงานต่อ ให้กดปุ่ม 5. ได้
11. หากไม่ต้องการทำงานต่อ ควรกดปุ่มปิดเครื่อง 8. (หากไม่ปิดเครื่องจะอุ่นน้ำตลอดเวลา)



รูปภาพผนวก ข.1 เครื่องทำความสะอาด (ULTRASONIC CLEANER)

2. เครื่อง Spread Plate

รายละเอียดปุ่มต่างๆและการทำงาน

1. ฟังก์ชันเป็นโซนควบคุม การตั้งค่าต่างๆ (setting) เกี่ยวกับปริมาณสารละลายที่เราต้องการนำไป spread plate ส่วนใหญ่จะทำการ spread plate ที่ปริมาณ 50 หรือ 100 ไมโครลิตรสามารถเลือกเส้นผ่านศูนย์กลางเพื่อให้โคโลนีกระจายตัวได้มากขึ้น โซนล่างจะเป็นส่วนล่างทำความสะอาดหัวที่ใช้ spread ประกอบ แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ถาดและน้ำกลั่น 1 ถาด
2. ส่วนกลางเป็นโซนควบคุมเกี่ยวกับการ spread plate โดยกดที่ปุ่ม PLATE และการทำความสะอาดกดที่ปุ่ม POWER CLEAN เมื่อใช้งานเสร็จหรือกดปุ่ม CLEAN เมื่อต้องการเปลี่ยนตัวอย่าง
3. ฟังก์ชันเป็นโซนที่ใช้โซนที่ใช้ดูสารตัวอย่างที่ต้องการ spread โดยกดที่ปุ่ม MIN



รูปภาพผนวก ข.2 เครื่อง Spread Plate

3. ตู้ยิวี (UV Chamber)

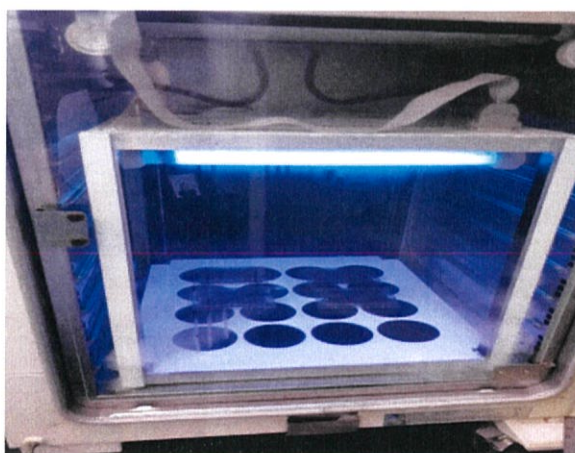
เป็นตู้ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิและความชื้น สามารถเร่งสภาวะที่สภาวะ 25°C 65% R.H. 30 °C 65% R.H. 40 °C 75%R.H. ได้ สามารถฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) เพื่อฆ่าเชื้อและกระตุ้นการทำงานของอนุภาคนาโนได้



รูปภาพผนวก ข.3 ตู้ UV Chamber

รายละเอียดปุ่มต่างๆและการทำงาน

1. เปิดปุ่ม ON/OFF เพื่อเปิดเครื่อง
2. ◀ ▶ ใช้สำหรับเลื่อนเพื่อปรับเวลาในการบ่ม ความชื้นและอุณหภูมิ
3. ▲ ใช้เพิ่มเวลาในการบ่ม ความชื้นและอุณหภูมิ
4. ใสตัวอย่างที่ต้องการบ่ม
5. เปิดยิวีที่ปุ่มด้านบ่มของเครื่อง
6. จากนั้นกด START เพื่อเริ่ม กด STOP เพื่อหยุดการทำงาน
7. ถ้าต้องการดูเวลาในการบ่ม ความชื้นและอุณหภูมิที่ตั้งไว้ให้กดที่ปุ่ม X/W
8. ปิดตู้ให้สนิท



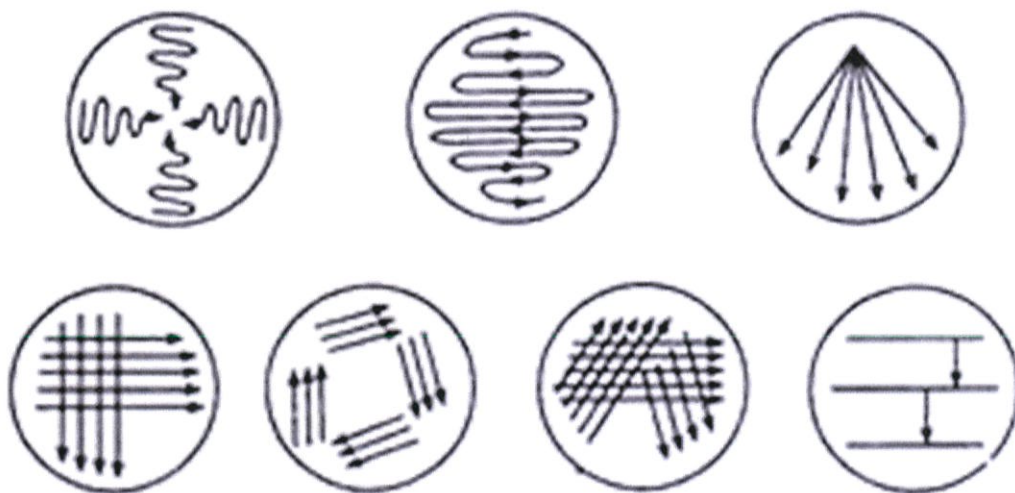
รูปภาพผนวก ข.4 การฉายแสงยิวี

ภาคผนวก ค

การแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์และการนับจำนวนแบคทีเรีย

1. การแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์

การแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์เป็นขั้นตอนสำคัญที่ทำให้ได้แบคทีเรียซึ่งเกิดจากแบคทีเรียเพียง 1 เซลล์หรือ 1 โคลน (clone) เพื่อนำไปศึกษารูปร่างลักษณะของโคโลนีและเซลล์แบคทีเรียการตีแกรม การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ปฏิกริยาต่อสารต้านจุลชีพต่างๆ ซึ่งจะใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรานั้น วิธีการใช้ในการแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์มีหลายวิธี ได้แก่ steak plate , spread plate , pour plate เป็นต้นโดยทั่วไปวิธีที่นิยมใช้ในการแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ คือ การ steak plate ซึ่งจะได้แบคทีเรียบริสุทธิ์ในรูปของโคโลนีเดี่ยวๆ และในแต่ละโคโลนีจะมีแบคทีเรียประมาณ $10^6 - 10^9$ เซลล์รูปแบบในการ steak plate เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ นั้นมีหลายรูปแบบ แต่หลักการนั้นจะไม่เหมือนกัน คือ พยายามกระจายเซลล์แบคทีเรียแต่ละเซลล์ให้ห่างออกจากกัน เพื่อโคโลนีที่เจริญเติบโตจากแบคทีเรียเพียงเซลล์เดียวนั้นจะแยกอยู่อย่างเดี่ยวๆ ไม่มาเชื่อมติดกัน



รูปภาคผนวก ค.1 รูปแบบการ steak plate (ที่มา : Quora และคณะ)

2. การแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี Streak plate

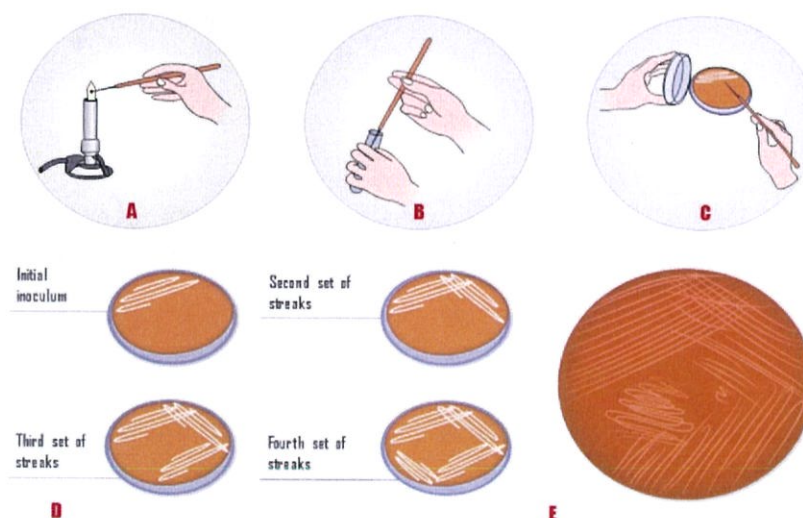
อุปกรณ์

1. ลูบ

2. ตะเกียงบุนเส้น
3. Nutrient agar ใน petri-dishes
4. แบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *E.coli* และ *S.aureus*

วิธีการ

1. ฆ่าเชื้อที่ลู่ไปด้วยการล่นไฟจากตะเกียงบุนเส้นจนร้อนแดง ปล่อยให้เย็นลง 10-15 วินาทีหรือแตะที่ผิวอาหารแข็ง
2. ใช้ลู่เขี่ยแบคทีเรียใน slan ให้ได้แบคทีเรียติดขึ้นมา นำมาขีดบนอาหารแข็งด้วยวิธี aseptic technique โดยขีดเป็น 4-5 แนว เริ่มจากด้านหนึ่งของเพลท และก่อนเริ่มแนวใหม่ต้องเผา ลู่ฆ่าเชื้อก่อนแล้วให้แนวขีดใหม่ทับรอยขีดเดิมเล็กน้อย เพื่อดึงแบคทีเรียที่กระจายออกไปบ้างแล้วให้กระจายออกไปให้ดียิ่งขึ้น
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ ในตู้บ่ม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยคว่ำผิวอาหารลง เมื่อครบเวลาให้บันทึก ผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนผิวหน้าของอาหารแข็ง



รูปภาคผนวก ค.2 เทคนิคการขีด (streak) แบคทีเรียบนผิวอาหารแข็งเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ

(ที่มา : Gloria Johnson)

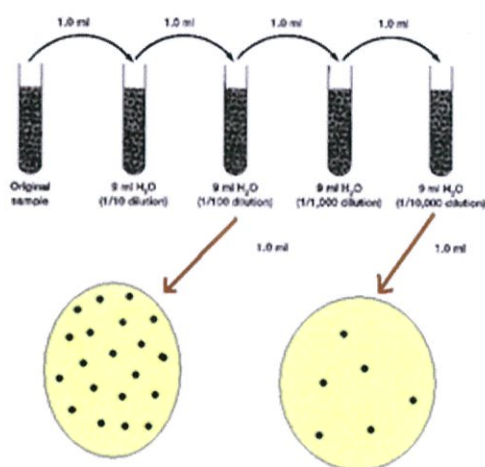
3. การนับจำนวนแบคทีเรีย

การเจริญเติบโตของแบคทีเรียเป็นการเพิ่มส่วนประกอบภายในและโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรียโดยที่มีการแบ่งเซลล์หรือไม่มีการแบ่งเซลล์หรือไม่มีการแบ่งเซลล์ก็ได้ ซึ่งถ้าไม่มีการแบ่งเซลล์ก็จะเป็นการเพิ่มของขนาดและมวล (น้ำหนัก) แต่ถ้ามีการแบ่งเซลล์ก็จะเพิ่มทั้งจำนวนและมวลของเซลล์โดยปกติแบคทีเรียจะมีวงจรชีวิตสั้น ดังนั้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจึงมีทั้งการเพิ่มมวลและจำนวนเซลล์ไปพร้อมกัน ในการวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจึงสามารถวัดได้ทั้งการเพิ่มมวลและจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามในการนับจำนวนแบคทีเรียจะได้ผลดีเพียงใดนั้น ขึ้นอยู่

กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น การเก็บรักษาตัวอย่างแบคทีเรียอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย อุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มแบคทีเรีย ความละเอียดรอบคอบของผู้ปฏิบัติงาน และปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ

4. การเจือจางตัวอย่าง

โดยทั่วไปการนับจำนวนจุลินทรีย์ จะนับเฉพาะจานอาหารที่มีจำนวนเซลล์ระหว่าง 25-250 เซลล์ เพื่อให้จำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหาร อยู่ในช่วงดังกล่าว ไม่มากหรือน้อยเกินไป จึงต้องนำตัวอย่างมาเจือจางเป็นลำดับ ด้วยวิธี serial dilution การทำ serial dilution คือ เจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้นโดยทั่วไปทำเป็นลำดับๆ ละ 10 เท่า

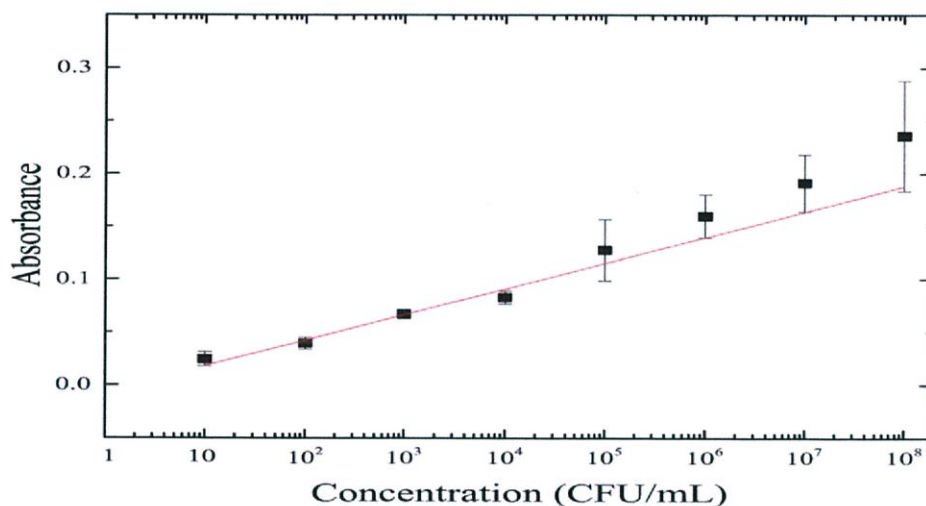


รูปภาคผนวก ค.3 การเจือจางตัวอย่าง

5. การวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

การวัดมวลเซลล์ (cell mass) จะวัดในรูปของน้ำหนักแห้งหรือน้ำหนักเปียก ซึ่งเป็นวิธีอ้างอิง (reference

Method) สำหรับเป็นมาตรฐานเปรียบเทียบกับวิธีอื่น ปัจจุบันวิธีวัดมวลเซลล์ที่นิยมกันที่สุด คือ การวัดความขุ่นของเซลล์ โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง วัดความขุ่นของเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลว ซึ่งจะได้ค่า absorbance (A) หรือ transmittance (%T) วิธีนี้จะอาศัยหลักการหักเหของแสง เมื่อส่องถูกเซลล์แบคทีเรีย ความยาวคลื่นแสงที่เหมาะสม คือ 600 nm. หลังจากได้ค่า absorbance แล้วต้องนำไปอ่านจาก Calibraton curve หรือ standard curve ที่ plot ระหว่างค่า absorbance และ จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่หาโดยวิธี total count หรือ viable count ซึ่ง จาก calibraton curve นี้จะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรีย ตัวอย่าง calibraton curve ระหว่างค่า absorbance (A_{600}) และปริมาณเซลล์ของแบคทีเรีย *Esherichia coli* ในการทดลองทั่วไปสามารถ คาดคะเนจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *Esherichia coli* ได้จากค่า (A_{600}) $0.1 = 1.0 \times 10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร



รูปภาคผนวก ค. 4 calibraton curve ระหว่าง absorbance (A_{600}) และปริมาณเซลล์แบคทีเรีย *Esherichia coli*

1. การนับจำนวนเซลล์

การนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียทำได้โดยตรง คือ การนับเซลล์ทั้งหมด (total count) ทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต หรือโดยทางอ้อม คือ การนับแต่เซลล์ที่มีชีวิต

1.1 การนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธี Rapid Method

หลักการเลือก plate เพื่อคำนวณผลที่อ่านได้

1. พิจารณา plate ปริมาณแอโรบิกแบคทีเรีย (Aerobic Bacteria Count) จะพิจารณาเฉพาะ แผ่น ที่สามารถนับได้ มีจำนวนอยู่ระหว่าง 30 - 300 โคโลนี ปริมาณโคลิฟอร์ม (Total Coliform) และ อีโคไล (*E.coli*) พิจารณาเฉพาะ แผ่นที่สามารถนับได้ มีจำนวนอยู่ระหว่าง 15 - 150 โคโลนี หมายเหตุ ให้เลือกนับเฉพาะโคโลนีในช่องที่ไม่ถูกรบกวน เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยเนื้อเจลในแผ่นได้ และรูปร่างที่ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากอาจเป็นเศษอาหารปะปนอยู่ในแผ่น

2. ถ้าแผ่นใดมีจำนวนแอโรบิกแบคทีเรีย มากกว่า 300 โคโลนี จำนวนโคลิฟอร์มและอีโคไล จำนวนมากกว่า 150 โคโลนี ถ้าสามารถนับจำนวนได้ใน dilution นั้น ก็ให้ค่าที่นับได้นั้น หรือ ถ้าหากไม่สามารถนับได้ ก็ให้นับค่าเฉลี่ยโดยเลือกนับโคโลนีจากช่องใดช่องหนึ่งที่มีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ (1 ซม.2) แล้วคูณด้วย 20 จะได้จำนวนโคโลนีทั้งหมดโดยประมาณ แล้วรายงานเป็น TNTC (Estimated count) Est. CFU/ml (โดยที่ Est. หมายถึง estimated)

3. ถ้าแผ่นใดมีจำนวนแอโรบิกแบคทีเรีย จำนวนน้อยกว่า 30 โคโลนี จำนวนโคลิฟอร์มและอีโคไลจำนวนน้อยกว่า 15 โคโลนี- ถ้าสามารถนับจำนวนได้ใน dilution นั้น ก็ให้ค่าที่นับได้นั้น - ถ้าไม่พบโคโลนีใดเลย ให้คำนวณ Est. CFU/ml เป็น < 1 DF (dilution factor) หรือ count = 0

ตัวอย่าง การคำนวณ Aerobic Bacteria Count

10-flod serial dilution			รายงานผล (results reported)	คำอธิบายและกฎที่ใช้
10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴		
244	20	4	Count = 2.4×10^4 CFU/ml	นับเฉพาะ dilution ในช่วง 30-300
257	32	4	Count = 2.6×10^4 CFU/ml	เฉลี่ยค่าระหว่าง 2 dilution ติดกันในช่วง 30-300 แต่สัดส่วนทั้ง 2 dilution จึงรายงาน dilution ที่มีค่าสูงกว่า

148	31	4	Count = 1.5×10^4 CFU/ml	ควรจะเฉลี่ยค่าระหว่าง 2 dilution ติดกันในช่วง 30-300 แต่สัดส่วนทั้ง 2 dilution จึงรายงาน dilution ที่มีค่าต่ำกว่ากว่า
	>600		Count = TNTC (Estimated count = 10^3 CFU/ml)	บันทึกผลเป็นมากเกินกว่าจะนับได้
0	0	0	Count = 0 CFU/ml	ทุก count < 30

ตัวอย่าง การคำนวณ Total Coliform , *E.coli*

10-fold serial dilution		รายงานผล (results reported)	คำอธิบายและกฎที่ใช้	
10^{-2}	10^{-3} 10^{-4}			
144	10	Count = 2.4×10^4 CFU/ml	นับเฉพาะ dilution ในช่วง 15-150	
4				
140	17	Count = 2.6×10^4 CFU/ml	เฉลี่ยค่าระหว่าง 2 dilution ติดกันในช่วง 30-300 แต่สัดส่วนทั้ง 2 dilution จึงรายงาน dilution ที่มีค่าสูงกว่ากว่า	
4				
148	31	Count = 1.5×10^4 CFU/ml	ควรจะเฉลี่ยค่าระหว่าง 2 dilution ติดกัน ในช่วง 30-300 แต่สัดส่วนทั้ง 2 dilution จึงรายงาน dilution ที่มีค่าต่ำกว่ากว่า	
2				
	>300	Count = TNTC (Estimated count = 10^3 CFU/ml)	บันทึกผลเป็นมากเกินกว่าจะนับได้	
0	0	0	Count = 0 CFU/ml	ทุก count < 30

1.2 การนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธี appendix F cfu/ml Table

คือการนับแบคทีเรียที่มีการเจริญเติบโตโดยการใช้แผ่นนับ สามารถนับเชื้อได้ในกรณีที่เชื้อมีการเจริญอย่างหนาแน่น โดยวัดจากขอบบริเวณด้านนอก ตามช่องจนถึงโคโลนีที่กำหนด แล้วดูตามตารางที่กำหนด ดังนี้

ตารางภาคผนวก ค.1 นับจำนวนเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธี appendix F cfu/ml Table

COUNT	8	9	10	11	12	13	Plate total
20	1.65E+04	6.74E+03	3.64E+03	2.18E+03	1.38E+03	8.00E+02	4.00E+02
22	1.81E+04	7.41E+03	4.00E+03	2.40E+03	1.52E+03	8.79E+02	4.40E+02
24	1.98E+04	8.09E+03	4.36E+03	2.62E+03	1.66E+03	9.59E+02	4.80E+02
26	2.14E+04	8.76E+03	4.73E+03	2.84E+03	1.80E+03	1.04E+03	5.20E+02
28	2.31E+04	9.43E+03	5.09E+03	3.06E+03	1.93E+03	1.12E+03	5.60E+02
30	2.47E+04	1.01E+04	5.45E+03	3.28E+03	2.07E+03	1.20E+03	6.00E+02
32	2.64E+04	1.08E+04	5.82E+03	3.49E+03	2.21E+03	1.28E+03	6.40E+02
34	2.80E+04	1.15E+04	6.18E+03	3.71E+03	2.35E+03	1.36E+03	6.80E+02




36	2.97E+04	1.21E+04	6.55E+03	3.93E+03	2.49E+03	1.44E+03	7.20E+02
38	3.13E+04	1.28E+04	6.91E+03	4.15E+03	2.62E+03	1.52E+03	7.60E+02
40	3.29E+04	1.35E+04	7.27E+03	4.37E+03	2.76E+03	1.60E+03	8.00E+02
42	3.46E+04	1.42E+04	7.64E+03	4.59E+03	2.90E+03	1.68E+03	8.39E+02
44	3.62E+04	1.48E+04	8.00E+03	4.81E+03	3.04E+03	1.76E+03	8.79E+02
46	3.79E+04	1.55E+04	8.36E+03	5.02E+03	3.18E+03	1.84E+03	9.19E+02
48	3.95E+04	1.62E+04	8.73E+03	5.24E+03	3.31E+03	1.92E+03	9.59E+02
50	4.12E+04	1.68E+04	9.09E+03	5.46E+03	3.45E+03	2.00E+03	9.99E+02
52	4.28E+04	1.75E+04	9.45E+03	5.68E+03	3.59E+03	2.08E+03	1.04E+03
54	4.45E+04	1.82E+04	9.82E+03	5.90E+03	3.79E+03	2.16E+03	1.08E+03
56	4.61E+04	1.89E+04	1.02E+04	6.12E+03	3.87E+03	2.24E+03	1.12E+03
58	4.78E+04	1.95E+04	1.05E+04	6.33E+03	4.00E+03	2.32E+03	1.16E+03
60	4.94E+04	2.02E+04	1.09E+04	6.55E+03	4.14E+03	2.40E+03	1.20E+03
62	5.11E+04	2.09E+04	1.13E+04	6.77E+03	4.28E+03	2.48E+03	1.24E+03
64	5.27E+04	2.16E+04	1.16E+04	6.99E+03	4.42E+03	2.56E+03	1.28E+03
66	5.44E+04	2.22E+04	1.20E+04	7.21E+03	4.56E+03	2.64E+03	1.32E+03
68	5.60E+04	2.29E+04	1.24E+04	7.43E+03	4.70E+03	2.72E+03	1.36E+03
72	5.93E+04	2.43E+04	1.31E+04	7.86E+03	4.97E+03	2.88E+03	1.44E+03
74	6.10E+04	2.49E+04	1.35E+04	8.08E+03	5.11E+03	2.96E+03	1.48E+03
76	6.26E+04	2.56E+04	1.38E+04	8.30E+03	5.25E+03	3.04E+03	1.52E+03
78	6.23E+04	2.63E+04	1.42E+04	8.52E+03	5.39E+03	3.12E+03	1.56E+03
80	6.59E+04	2.70E+04	1.45E+04	8.74E+03	5.52E+03	3.20E+03	1.60E+03
82	6.75E+04	2.76E+04	1.49E+04	8.95E+03	5.66E+03	3.28E+03	1.64E+03
84	6.92E+04	2.83E+04	1.53E+04	9.17E+03	5.80E+03	3.36E+03	1.68E+03
86	7.08E+04	2.90E+04	1.56E+04	9.39E+03	5.94E+03	3.44E+03	1.72E+03
88	7.25E+04	2.96E+04	1.60E+04	9.61E+03	6.08E+03	3.52E+03	1.76E+03
90	7.41E+04	3.03E+04	1.64E+04	9.83E+03	6.21E+03	3.60E+03	1.80E+03
92	7.58E+04	3.10E+04	1.67E+04	1.00E+04	6.35E+03	3.68E+03	1.84E+03
94	7.74E+04	3.17E+04	1.71E+04	1.03E+04	6.49E+03	3.76E+03	1.88E+03
96	7.91E+04	3.23E+04	1.75E+04	1.05E+04	6.63E+03	3.84E+03	1.92E+03
98	8.07E+04	3.30E+04	1.78E+04	1.07E+04	6.77E+03	3.92E+03	1.96E+03
100	8.24E+04	3.37E+04	1.82E+04	1.09E+04	6.91E+03	4.00E+03	2.00E+03

ภาคผนวก ง

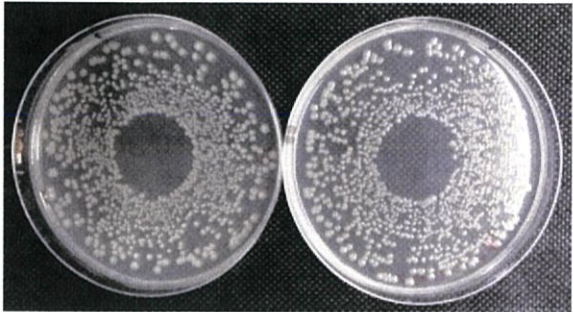

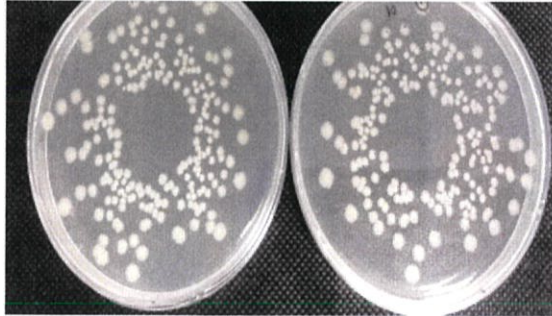
ผลการ Spread plate

ตารางภาคผนวก ง.1 ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ *E. coli*



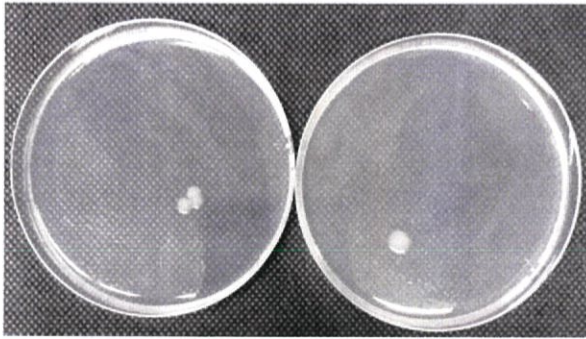
ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ใส่สี่รีซาซูริน)

อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-4}
	ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-5}
	ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-6}


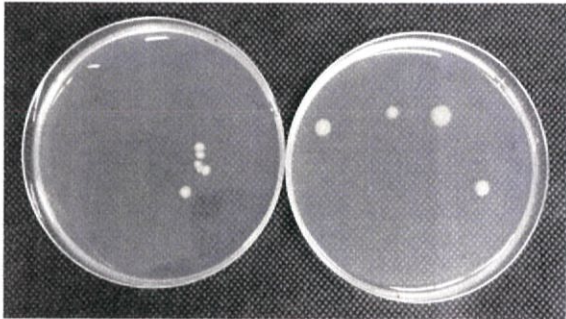
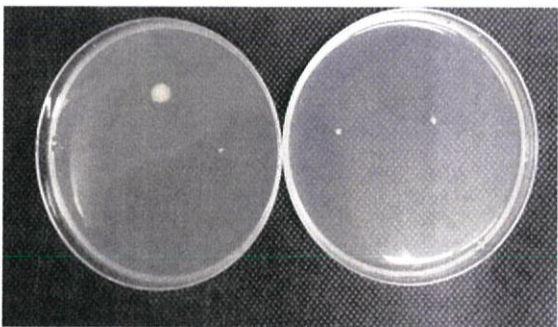
ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ไม่ใส่สี่รีซาซูริน)

อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-4}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-5}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-6}</p>

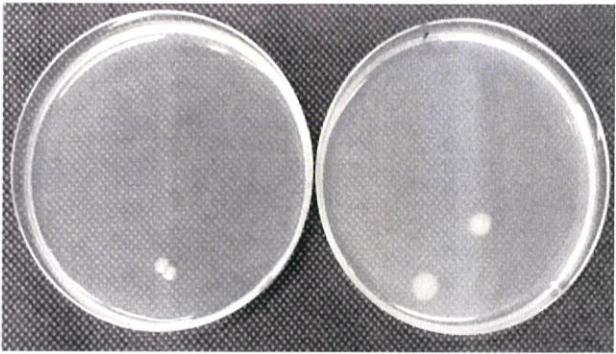
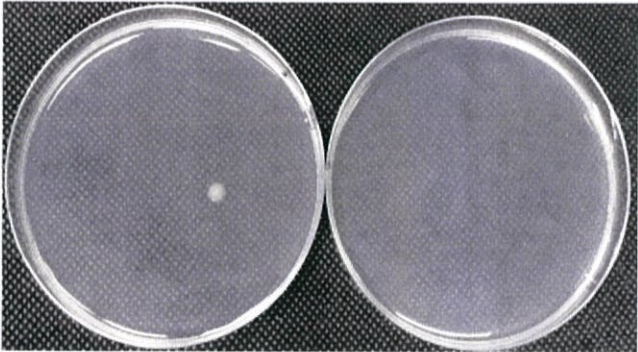

ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ใส่สี่รีซาซูริน)

อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-4}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-5}</p>

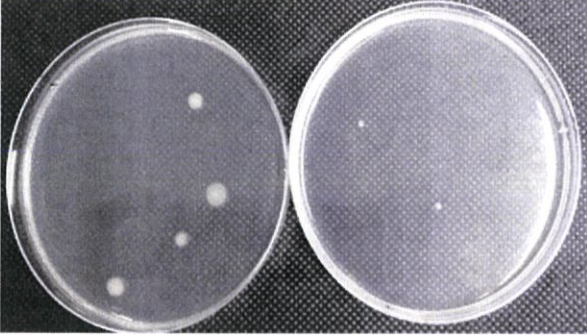
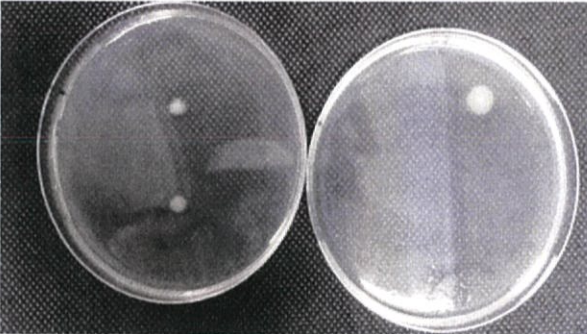
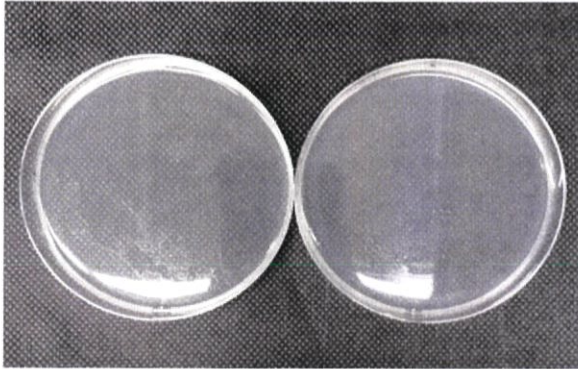
ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ไม่ใส่สารชีวรีน)

อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-4}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-5}</p>

ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ใส่สี่รีชาซูริน)



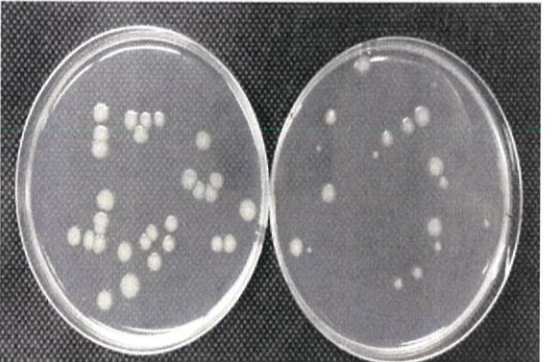
อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-4}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-5}</p>

ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ไม่ใช่สรีรชาซูริน)




อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-4}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-5}</p>

ตารางภาคผนวก ง.2 ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ *E. coli*



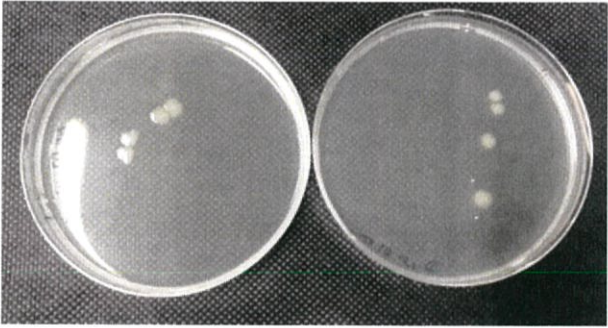
ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
(ใส่สารซุริน)

อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-4}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-5}</p>



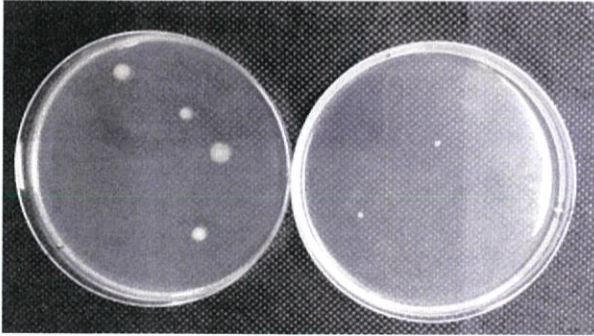
ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
(ไม้ใส่สีรีซาชูริน)

อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-4}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-5}</p>


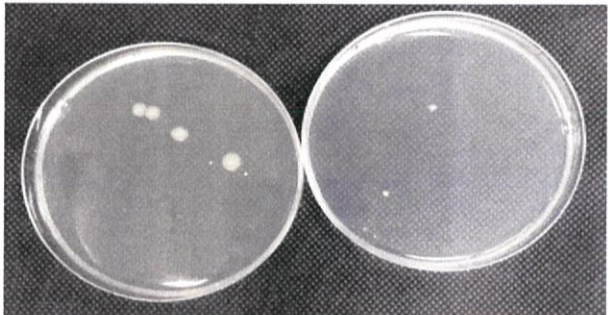
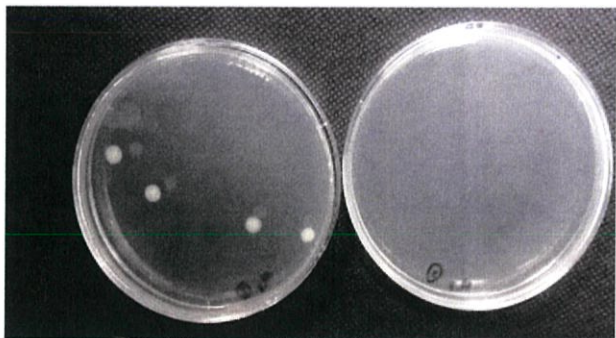
ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ใส่สี่รีซาซูริน)

อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-2}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-4}</p>

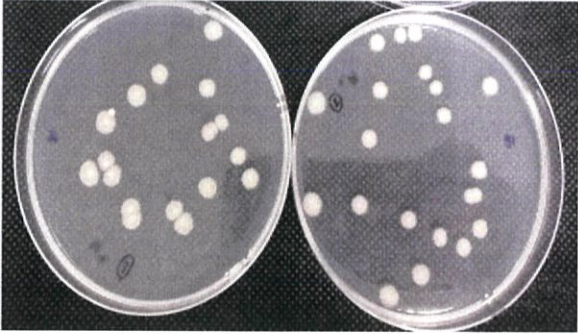

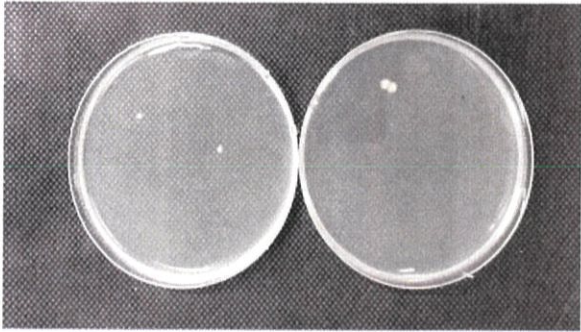
ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
(ไมสไล์รีซาซูริน)

อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-2}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-4}</p>

ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ใส่สี่รีซาซูริน)

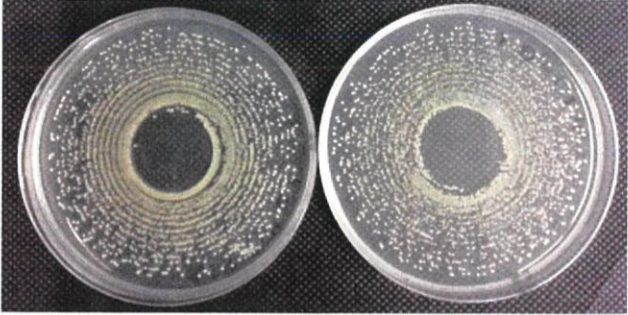
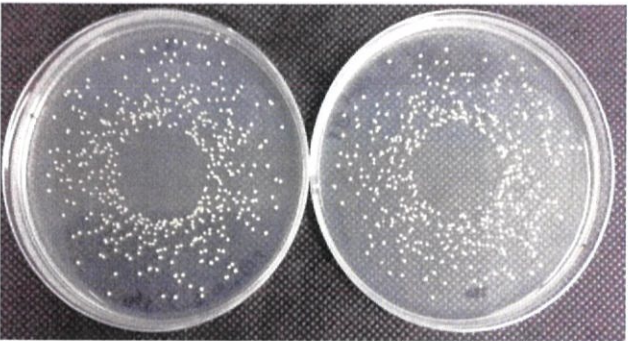
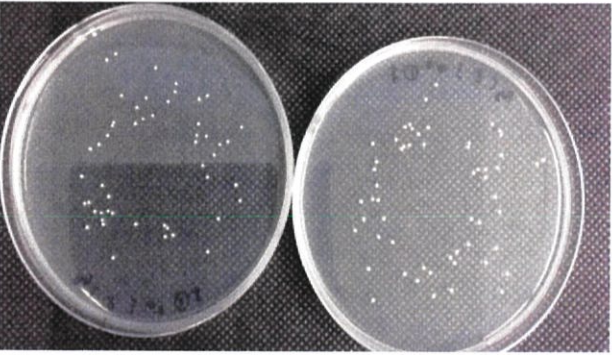
อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-2}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-4}</p>

ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
(ไมเสีรีซาซูริน)

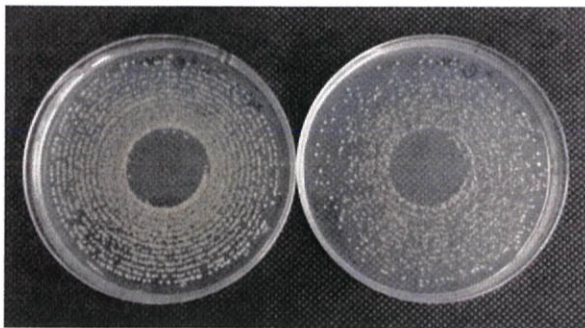
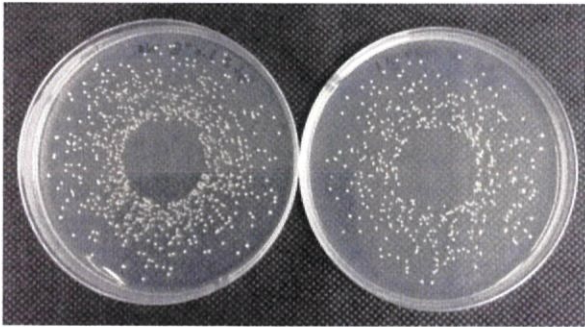
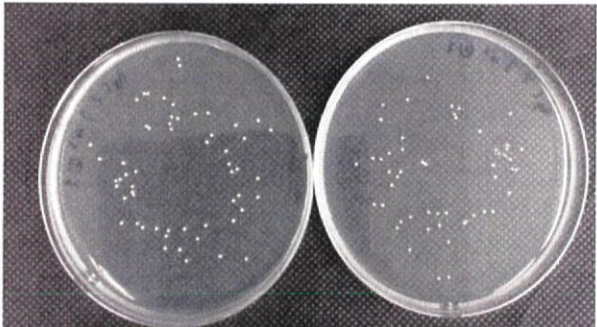
อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-2}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-4}</p>

ตารางภาคผนวก ง.3 ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ *S. aureus*

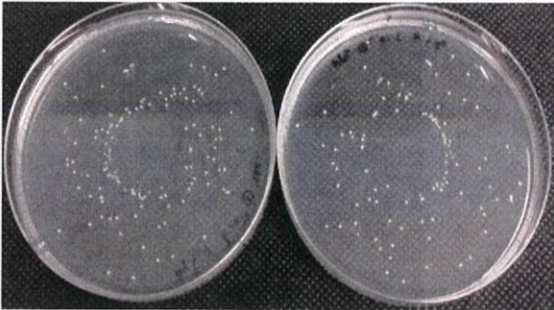
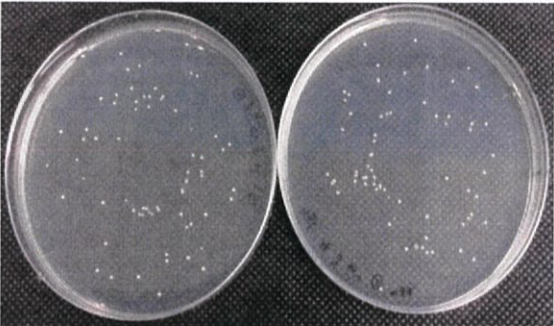
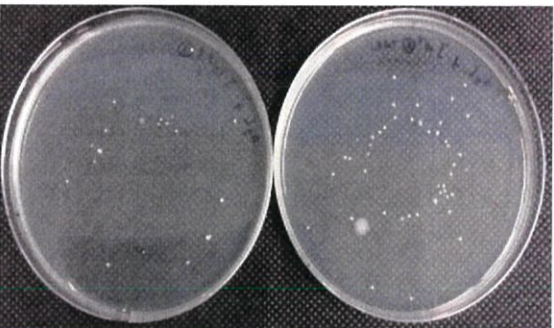
ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ใส่สี่รีซาซูริน)

อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-4}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-5}</p>

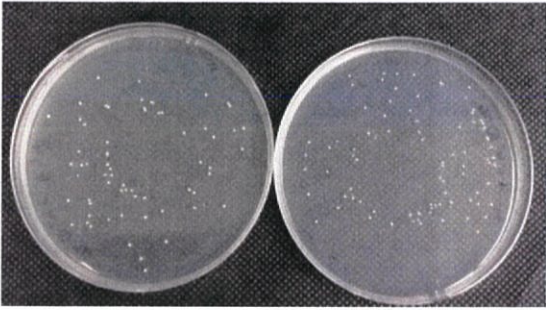
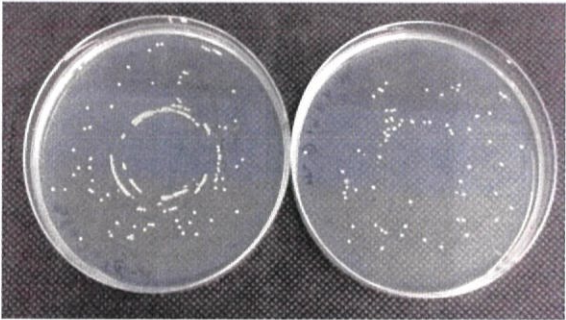
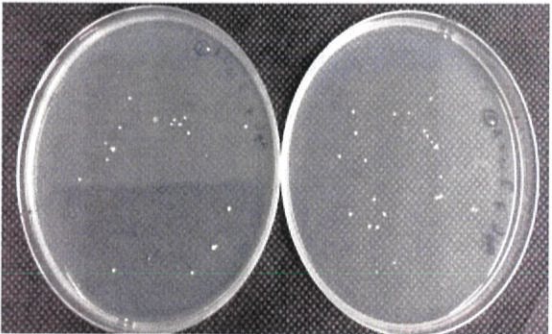
ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ไม่ใช่สรีรชาซูริน)

อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-4}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-5}</p>

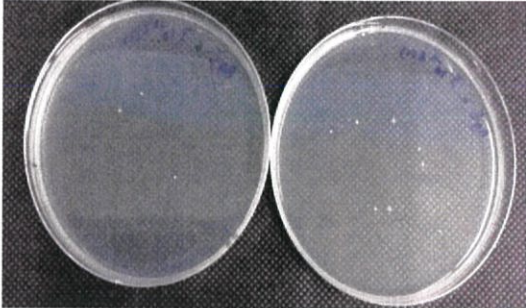

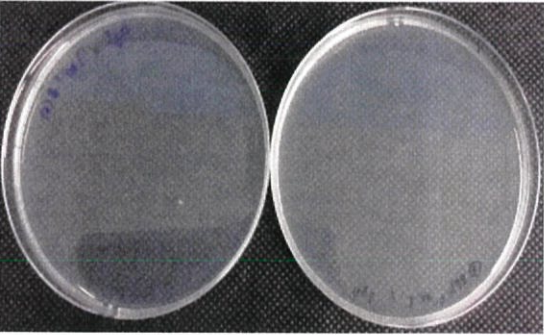
ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ใส่สี่รีซาซูริน)

อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-4}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-5}</p>


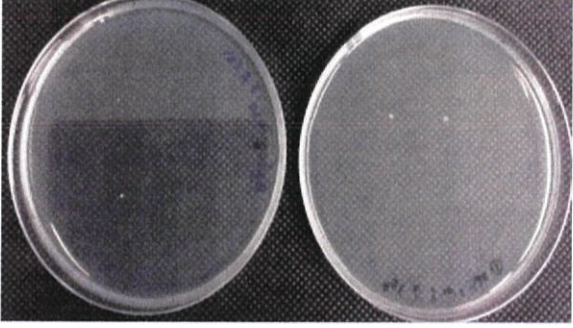
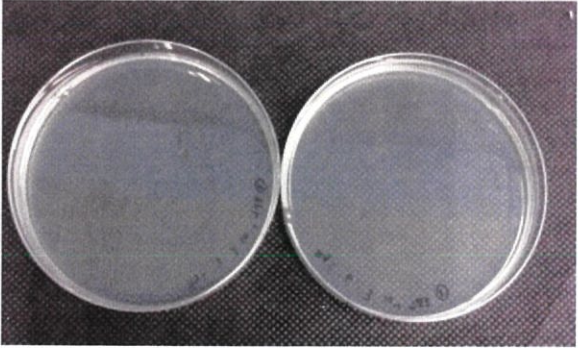
ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ไมสโอสีรีชาซูริน)

อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-4}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-5}</p>

ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ใส่สี่รีชาซูริน)

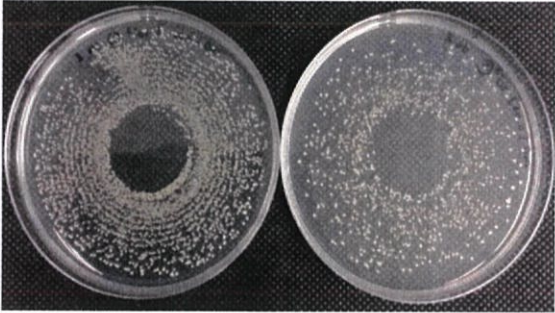

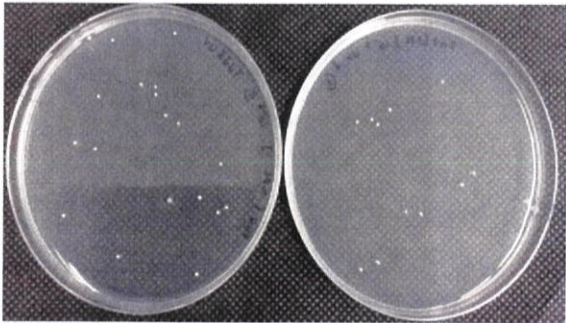
อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-1}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-2}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}</p>

ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ไม้ใส่สีรีซาซูริน)

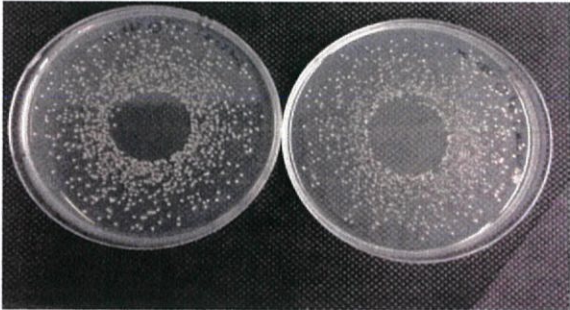
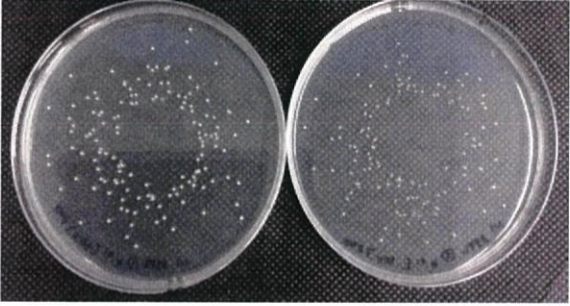
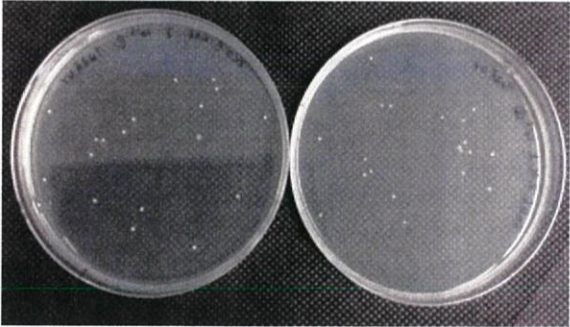
อนุภาคนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-1}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-2}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}</p>

ตารางภาคผนวก ง.4 ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ *S. aureus*

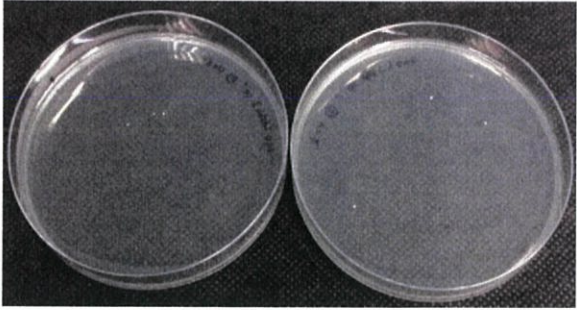
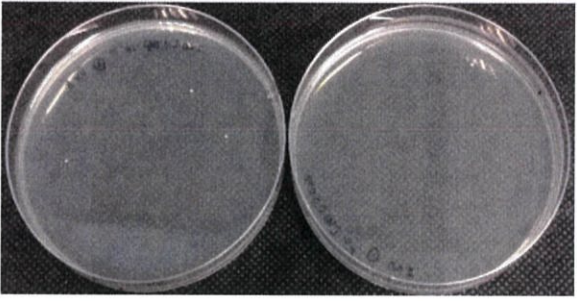

ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
(ใส่สี่รีซาซูริน)

อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-4}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-5}</p>

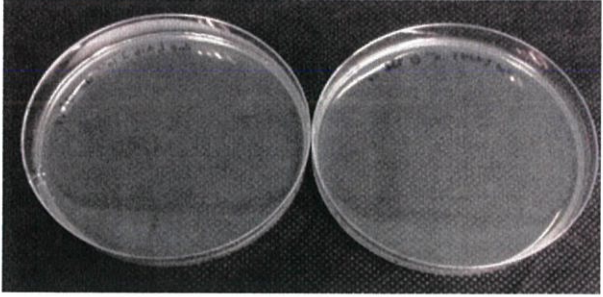
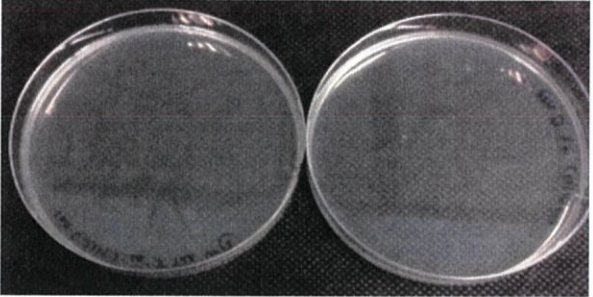

ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
(ไม่ใส่สารชีวริ่น)

อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-4}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-5}</p>

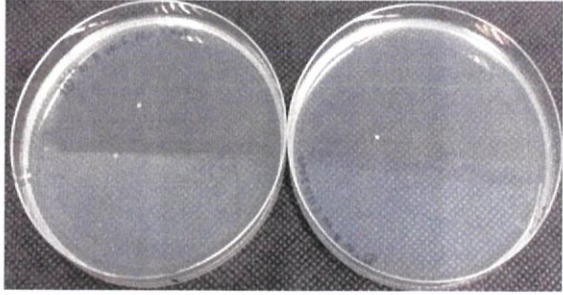
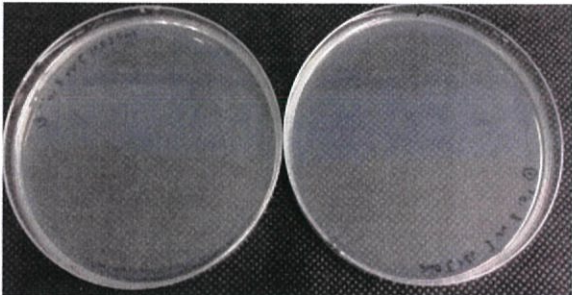
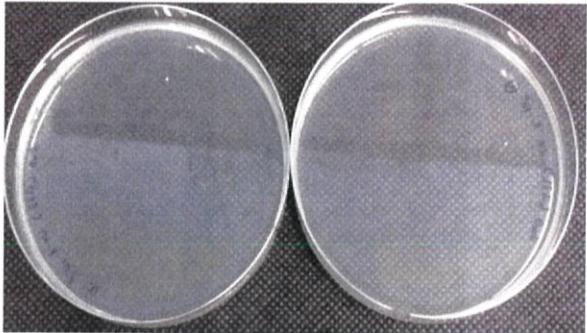
ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
(ไส้สีรีซาซูริน)

อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-1}
	ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-2}
	ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}

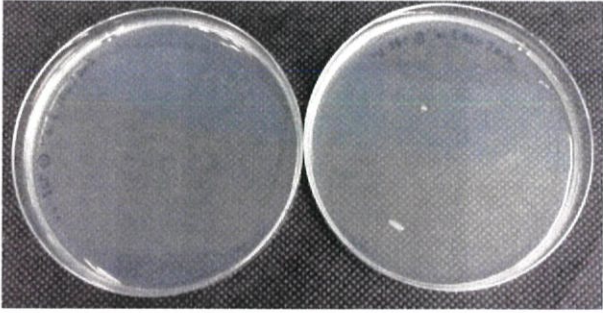
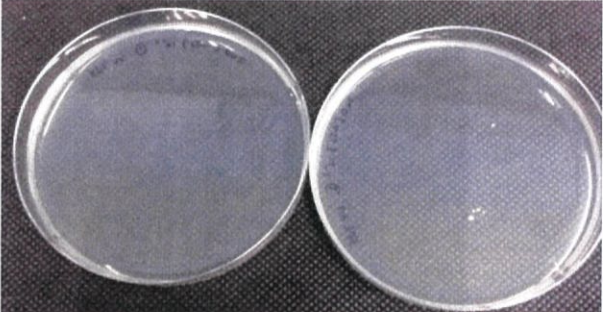
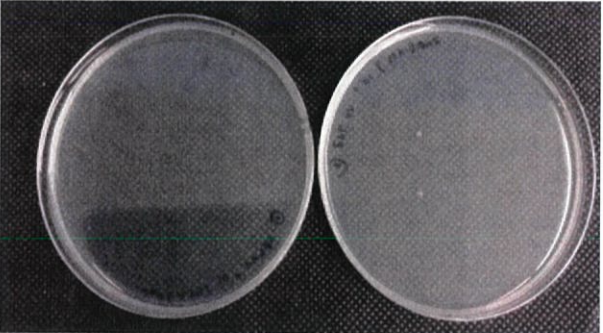
ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
(ไม่ใส่สารชีวริ่น)

อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-1}
	ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-2}
	ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}

ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
(ใส่สี่รีซาซูริน)

อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-1}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-2}</p>
	<p>ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}</p>

ผลการ Spread plate อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
(ไม่ใส่สารชีวรี)

อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	dilution factor
	ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-1}
	ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-2}
	ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-3}

ภาคผนวก จ

ตารางข้อมูลการนับโคโลนี

ตารางภาคผนวก จ.1 เปรียบเทียบผลการนับโคโลนี (CFU/ml) ทดลองการใช้และไม่ใช้สเตรปโตไมซิน เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ *E. coli*

ความเข้มข้นของ อนุภาคนาโนซิลเวอร์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ผลการนับโคโลนี (CFU/ml)	
	ใส่สเตรปโตไมซิน	ไม่ใส่สเตรปโตไมซิน
4	2.08×10^7	2.25×10^7
	2.13×10^7	2.27×10^7
	2.05×10^7	2.20×10^7
ค่าเฉลี่ย	2.09×10^7	2.24×10^7
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.04×10^7	0.04×10^7
6	0.16×10^3	0.12×10^3
	0.18×10^3	0.14×10^3
	0.16×10^3	0.09×10^3
ค่าเฉลี่ย	0.17×10^3	0.12×10^3
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.01×10^3	0.03×10^3
8	น้อยกว่า 100	น้อยกว่า 100

ตารางภาคผนวก จ.2 เปรียบเทียบผลการนับโคโลนี (CFU/ml) ทดลองการใช้และไม่ใช้สรีรชาซูริน เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ *E. coli*

ความเข้มข้นของ อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ผลการนับโคโลนี (CFU/ml)	
	ใส่สรีรชาซูริน	ไม่ใส่สรีรชาซูริน
0.5	1.66×10^7	1.30×10^7
	1.50×10^7	1.14×10^7
	1.58×10^7	1.45×10^7
ค่าเฉลี่ย	1.60×10^7	1.30×10^7
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.09×10^7	0.16×10^7
1	2.90×10^3	1.90×10^3
	2.70×10^3	1.40×10^3
	2.50×10^3	1.70×10^3
ค่าเฉลี่ย	2.70×10^3	1.67×10^3
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.20×10^3	0.25×10^3
2	น้อยกว่า 100	น้อยกว่า 100

ตารางภาคผนวก จ.3 ตารางเปรียบเทียบผลการนับโคโลนี (CFU/ml) ทดลองการใช้และไม่ใช้
สไตรีซาซูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อเชื้อ
S. aureus

ความเข้มข้นของ อนุภาคนาโนซิลเวอร์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ผลการนับโคโลนี (CFU/ml)	
	ใส่สไตรีซาซูริน	ไม่ใส่สไตรีซาซูริน
2	3.19×10^7	3.32×10^7
	3.00×10^7	3.20×10^7
	3.22×10^7	3.35×10^7
ค่าเฉลี่ย	3.14×10^7	3.29×10^7
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.12×10^7	0.08×10^7
4	2.77×10^3	2.91×10^3
	2.70×10^3	2.89×10^3
	2.68×10^3	2.95×10^3
ค่าเฉลี่ย	2.72×10^3	2.92×10^3
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.05×10^3	0.03×10^3
6	น้อยกว่า 100	น้อยกว่า 100

ตารางภาคผนวก จ.4 ตารางเปรียบเทียบผลการนับโคโลนี (CFU/ml) ทดลองการใช้สียและไม่ใช่สียริซาซูรินเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ต่อเชื้อ *S. aureus*

ความเข้มข้นของ อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ผลการนับโคโลนี (CFU/ml)	
	ใส่สียริซาซูริน	ไม่ใส่สียริซาซูริน
0.06	2.48×10^7	1.62×10^7
	2.20×10^7	2.40×10^7
	2.45×10^7	1.97×10^7
ค่าเฉลี่ย	2.38×10^7	2.00×10^7
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.15×10^7	0.39×10^7
0.125	1.60×10^2	1.94×10^2
	1.40×10^2	1.83×10^2
	1.60×10^2	1.90×10^2
ค่าเฉลี่ย	1.53×10^2	1.89×10^2
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.12×10^2	0.06×10^2
0.25	น้อยกว่า 100	น้อยกว่า 100



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ

วันที่ 16 เดือน กรกฎาคม พ.ศ 2561

ข้าพเจ้า นางสาววิรุณพร สร้อยเสนา รหัสประจำตัว 57050762
นางสาวสุกัญญา ญาณศิริ รหัสประจำตัว 57050769

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชา ชีววิทยา
ขอรับรองว่าโครงการพิเศษเรื่อง

ชื่อภาษาไทย การพัฒนาหาค่า MIC ของอนุภาคนาโนโดยใช้สีรีซาซูริน

ชื่อภาษาอังกฤษ Development of Minimum Inhibitory Concentration test for
Nanoparticle using Resazurin

ปีการศึกษา 2560

เป็นผลงานวิจัยที่ได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อน
เรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่ม
โครงการพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.88 %

ลงชื่อ.....วิรุณพร สร้อยเสนา

(วิรุณพร สร้อยเสนา)

นักศึกษา

ลงชื่อ.....สุกัญญา ญาณศิริ

(สุกัญญา ญาณศิริ)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงการพิเศษศึกษา
ของนักศึกษาข้างต้นแล้วขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อ
ไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....สุทธิจิต ศรีวัชรกุล

อาจารย์ที่ปรึกษา

ลงชื่อ.....วิเชียร ยุคธีระชัย

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม